

• 临床研究 •

NNMT 在肾透明细胞癌的表达及对 肾癌细胞侵袭能力的影响*

陈伟浩¹ 宋尔霖¹ 张鹏¹ 范阳¹ 高宇¹ 倪栋¹
逢海港¹ 艾青¹ 马鑫¹ 张旭¹

【摘要】 目的:研究 NNMT 在肾透明细胞癌中的表达情况及对肾癌细胞侵袭能力的影响。**方法:**采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测正常肾小管上皮细胞株 HKC、肾癌细胞株 786-O 及 30 例肾透明细胞癌组织、相应癌旁组织中 NNMT 的 mRNA 和蛋白的表达水平,并分析 NNMT 的 mRNA 水平与临床病理参数的关系。化学合成针对 NNMT 特异的 siRNA 序列,应用脂质体 Lipofectamine 2000 将其转染进 786-O 细胞中,利用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 NNMT 在 786-O 细胞中的表达水平,用 Transwell 小室法检测肾癌细胞 786-O 侵袭能力的变化。**结果:**NNMT 在肾癌细胞 786-O 中的 mRNA 和蛋白表达水平显著高于正常肾小管上皮细胞株 HKC ($P < 0.001$);肾透明细胞癌组织和对应的癌旁组织中 NNMT 的 mRNA 相对表达量分别为 (1.582 ± 0.2145) 、 (0.1269 ± 0.04279) ,两组比较 $P < 0.001$ 。NNMT 的 mRNA 水平与肿瘤大小、临床分期有关 ($P < 0.05$);Transwell 法检测结果显示降低 NNMT 的表达后 786-O 细胞的侵袭能力明显下降。**结论:**NNMT 在肾透明细胞癌组织和细胞中表达升高,可能在肾癌发生、发展过程中发挥重要作用。

【关键词】 肾细胞癌;尼克酰胺-N-甲基化酶;侵袭

【中图分类号】 R737.11 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-1420(2013)04-0241-05

Expression of NNMT in clear-cell renal cell carcinoma and its role in renal cell carcinoma invasion

CHEN Weihao SONG Erlin ZHANG Peng FAN Yang GAO Yu NI Dong
PANG Haigang AI Qing MA Xin ZHANG Xu

(Departments of Urology, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing, 100853, China)

Corresponding author: ZHANG Xu, E-mail: xzhang@foxmail.com

Abstract Objective: To study the expression of NNMT in clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC) and its role in renal cell carcinoma invasion in vitro. **Method:** The expression of NNMT in mRNA and protein levels were detected in human kidney tubule epithelial cell line HKC, renal cell cancer line 786-O, 30 cases of ccRCC surgical specimens and their corresponding adjacent tissues, using real-time PCR and Western blot respectively. And the relationship between the mRNA levels of NNMT and clinic-pathological parameters were analyzed. The special siRNA sequence of NNMT was synthesized chemically, and transfected into 786-O cells in mediation of liposome. The expression level of NNMT in 786-O cells was determined by RT-PCR and Western blot; and the changes in cell invasion were detect by Transwell assays. **Result:** The mRNA and protein levels of NNMT were significantly up-regulated in ccRCC cell lines of 786-O, compared to human kidney tubule epithelial cell line HKC ($P < 0.001$). Meanwhile, the mRNA levels of NNMT in ccRCC surgical specimens and adjacent normal renal tissues were (1.582 ± 0.2145) , (0.1269 ± 0.04279) ($P < 0.001$). The mRNA levels of NNMT in renal carcinoma were significantly related with some clinic-pathologic parameters, such as tumor size and clinicopathological stage ($P < 0.05$). The results of Transwell assay indicated that down-regulated the expression of NNMT significantly inhibited the invasion ability of 786-O cells. **Conclusion:** NNMT was up-expressed in ccRcc tissues and renal cancer cells, and it may be related to the carcinogenesis and progression of renal cell carcinoma.

Key words renal cell carcinoma; nicotinamide N-methyltransferase; invasion

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿

生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率约占全身恶性肿瘤的 3%^[1]。肾癌侵袭和转移能力强,且对化疗、放疗及传统免疫治疗均不敏感,患者预后较差。我们前期应用蛋白质谱分析技术发现尼克

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 30972982)

¹ 中国人民解放军总医院泌尿外科(北京,100853)

通信作者:张旭, E-mail: xzhang@foxmail.com

酰胺-N-甲基化酶 (nicotinamide N-methyltransferase, NNMT) 在肾癌细胞株 786-O 中的表达水平比正常肾小管上皮细胞 HKC 升高近 40 倍, 因此本实验主要研究 NNMT 在肾透明细胞癌组织中的表达情况, 并进一步探讨它对肾癌细胞侵袭能力的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

30 例肾癌患者的肿瘤组织及其对应癌旁正常组织取自解放军总医院泌尿外科 2009~2011 年手术标本, 并经术后病理确诊为肾透明细胞癌, 且所有患者术前均未接受放、化疗。组织标本切除后放入 -80℃ 冰箱中保存。正常肾小管上皮细胞株 HKC、肾癌细胞株 786-O 均为本实验室保存, 胎牛血清、DMEM/F12 和 RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司。总 RNA 提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; 逆转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司; NNMT 引物由上海 Invitrogen 公司合成; NNMT-siRNA 由上海吉码公司合成; Transwell 小室购自 Corning 公司; 鼠抗人 NNMT 单克隆抗体购自 Abcam 公司, 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2 检测方法

荧光定量 PCR 检测 NNMT 的表达: 按照 RNA 提取试剂盒说明书抽提细胞和组织的总 RNA, 并逆转录合成 cDNA。应用 Primer 5.0 设计引物, NNMT 上游引物: 5'-TTGGTTCTAG-GCACTCTG-3', 下游引物: 5'-TGTCATCAG-CAGGTCTC-3', 扩增产物 105 bp; 内参基因 SDHA 上游引物: 5'-TCCATCGCATAAGAG-CAA-3', 下游引物: 5'-TTCCGTAATGAG-CAACCA-3', 扩增产物 197 bp。按照 SYBR-Green 试剂盒说明进行 PCR 扩增, 使用的仪器是 ABI 公司的 7500 荧光定量仪, 反应程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 60℃ 34 s, 作 40 个循环。以人 SDHA 做为内参。

Western blot 检测 NNMT 的表达: 采用 RIPA 蛋白裂解液分别提取细胞和组织的总蛋白, BCA 蛋白定量法测定样品蛋白浓度。蛋白变性后经 SDS-PAGE (10% 分离胶, 5% 浓缩胶) 电泳分离后, 转印至 PVDF 膜 (200 mA, 2 h), 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 后加入 NNMT 鼠抗人 NNMT 一抗 (1:1 000 稀释), 4℃ 孵育过夜后, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:3 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 最后用 ECL 化学发光检测, 暗室中显影定影后胶片保存, 用图像分析仪测定各样品显色的灰度值, 利用灰度值进行蛋白相对表达分析。以 β -actin 为内参, 1:1 000 稀释使用。

细胞培养及 siRNA 转染: 786-O 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。NNMT 的特异 siRNA 序列: 正义链: GCUGGCUACACAAUCGAAUTT, 反义链: AUUCGAUUGUGUAGCCAGCTT; 阴性对照序列: 正义链: UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT, 反义链: ACGUGACACGUUCG-GAGAATT。实验分为 NNMT-siRNA 组 (加入 NNMT-siRNA 及转染试剂)、阴性对照组 (加入阴性对照序列及转染试剂)、空白对照组 (未作任何处理)。取对数生长期细胞, 每孔按照 3×10^5 细胞密度接种于 6 孔板培养皿中, 待细胞生长达到 70%~80% 覆盖率时, 按照 Lipofectamine 2000 转染试剂操作步骤进行 siRNA 转染, 转染 6 h 后更换培养基继续培养。

Transwell 实验检测转染后细胞迁移和侵袭能力的变化: 将孔径为 8 μ m 的 Transwell 小室放入 24 孔板中, 每个 Transwell 小室加入 60 μ l 含 50 mg/L Matrigel (基质胶) 稀释液, 37℃ 培养箱放置 2 h 使其成胶。各组细胞转染 48 小时后胰酶消化, 用含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬, 细胞计数, 调整细胞浓度至 1×10^6 个细胞/ml, 加 200 μ l 细胞悬液在 Transwell 小室中, 下室加入 500 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。各组细胞在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时后取出小室, 用 4% 多聚甲醛固定下室细胞, 0.1% 结晶紫染色, 在 100 倍显微镜下观察并拍照, 随机计数 4 个视野中的细胞数目, 并计算平均值。实验重复 3 次。

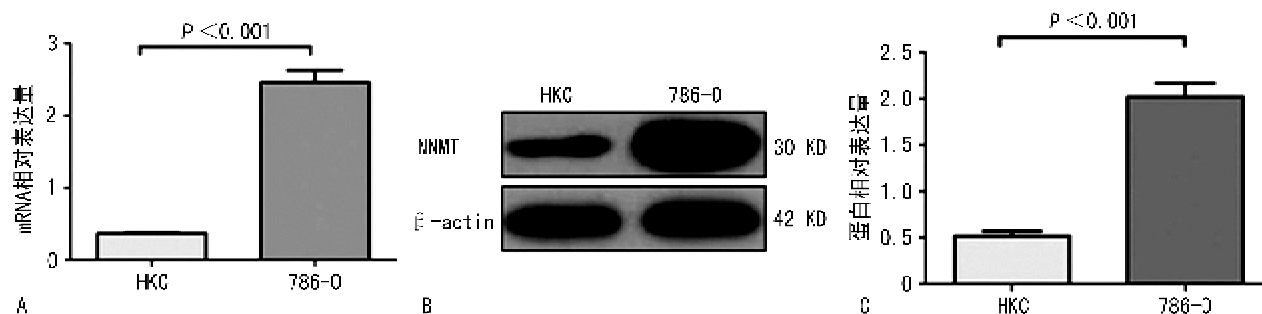
1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据比较采用 *t* 检验, 多组之间的比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NNMT 在正常肾小管上皮细胞 HKC 和肾癌细胞 786-O 中的表达情况

收取正常肾小管上皮细胞 HKC 和肾癌细胞 786-O, 提取细胞总 RNA 后逆转录合成 cDNA, 进行 RT-PCR 检测; 并相应收取细胞总蛋白, 进行 Western blot 检测。RT-PCR 结果显示正常肾小管上皮细胞 HKC mRNA 表达水平为 (0.3683 $\pm$ 0.01224), 肾癌细胞 786-O mRNA 表达水平为 (2.461 $\pm$ 0.1651), 肾癌细胞 786-O 中 NNMT 的 mRNA 水平显著高于 HKC 细胞 (P < 0.001)。Western blot 结果显示, 786-O 细胞 NNMT 蛋白表达水平显著高于人正常肾小管上皮细胞 HKC (P < 0.001) (图 1)。



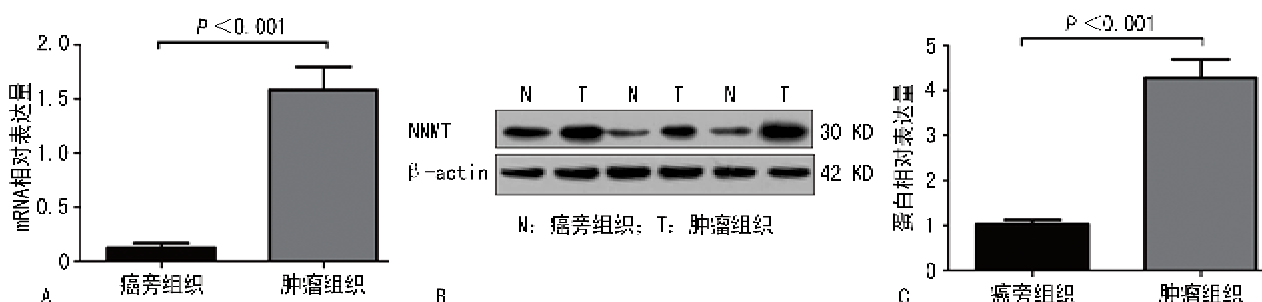
A: NNMT在HKC和786-O细胞中的mRNA表达; B: NNMT在HKC和786-O细胞中的蛋白表达; C: NNMT在HKC和786-O细胞中的蛋白表达灰度值分析

图1 NNMT在正常肾小管上皮细胞株和肾癌细胞株中的表达

2.2 NNMT在肾透明细胞癌组织及对应癌旁正常组织中的表达水平

随机选取30例透明细胞癌组织及对应的癌旁组织,提取组织总RNA并逆转录合成cDNA,进行RT-PCR检测,同时提取组织总蛋白,进行Western blot检测。肾透明细胞癌组织中NNMT的mRNA的表达水平为 (1.582 ± 0.2145) ,明显高于癌旁组织的 (0.1269 ± 0.04279) , $P < 0.001$;

Western blot结果显示肿瘤组织中NNMT的蛋白表达水平较癌旁组织的水平明显增高($P < 0.001$)(图2)。在30例肾透明细胞癌组织中,NNMT的mRNA表达水平与患者年龄、性别及组织病理分级无统计学意义($P > 0.05$),但在肿瘤大小与不同临床分期间的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。



A: NNMT在肾癌旁组织与肿瘤组织中的mRNA表达; B: NNMT在肾癌旁组织与肿瘤组织中的蛋白表达; C: NNMT在肾癌旁组织与肿瘤组织中的蛋白表达灰度值分析

图2 NNMT在肾透明细胞癌组织和对应的癌旁组织中的表达

2.3 细胞转染siRNA后NNMT mRNA和蛋白的表达水平

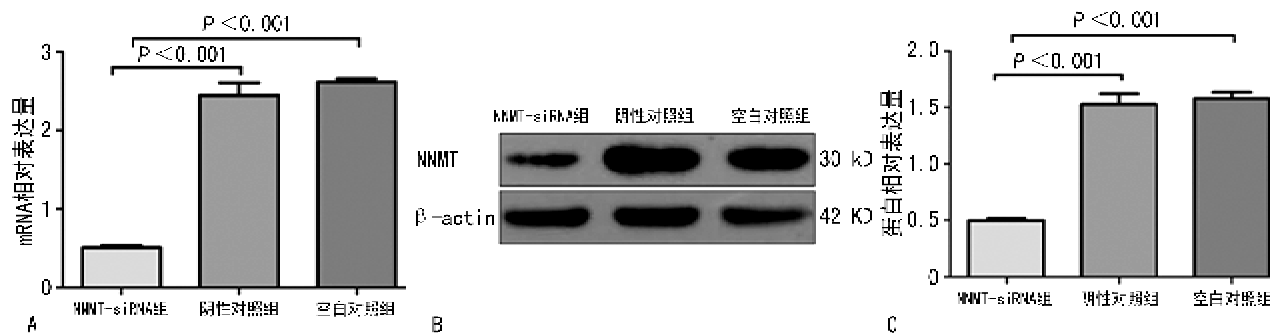
786-O细胞分别转染NNMT-siRNA、阴性对照(阴性对照序列)、空白对照(未做任何处理)48小时后,分别收取细胞总RNA后逆转录合成cDNA,并提取相应的细胞总蛋白。NNMT-siRNA组、阴性对照组与空白对照组NNMT mRNA表达水平分别为 (0.5094 ± 0.02635) 、 (2.445 ± 0.1588) 、 (2.614 ± 0.04327) , NNMT-siRNA组与阴性对照组及空白对照组相比,NNMT的表达显著降低, $P < 0.001$ 。Western blot结果显示,与阴性对照组和空白对照组相比,NNMT的蛋白表达水平在NNMT-siRNA组显著降低($P < 0.001$)。见图3。

2.4 NNMT下调抑制肾癌细胞侵袭能力

取对数生长期肾癌细胞786-O铺在6孔板里,分别转染NNMT-siRNA序列和阴性对照序列,以未做任何处理的细胞做空白对照,转染48小时后收集细胞,进行Transwell实验检测细胞侵袭能力的变化。结果显示:与阴性对照组及空白对照组相比,NNMT-siRNA组细胞的侵袭能力下降($P < 0.05$),见图4。说明抑制NNMT的表达后786-O细胞的侵袭能力显著降低。

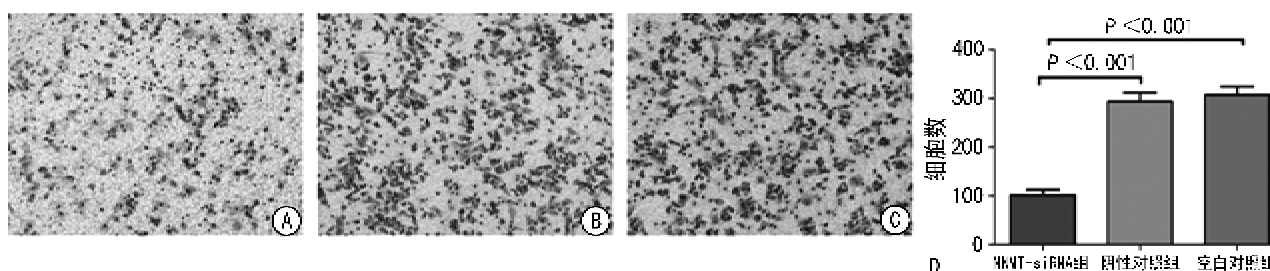
3 讨论

人类NNMT基因位于11号染色体的短臂(11q23),它由三个外显子和两个内含子组成,其编码的mRNA分子长度为952个核苷酸,其编码的蛋白质长度为264个氨基酸^[2]。NNMT主要生理作用是催化尼克酰胺和其他吡啶物甲基化,形成吡啶环,参与许多药物和一些异生物质的生物转化。



A: NNMT 在各组细胞中的 mRNA 表达; B: NNMT 在各组细胞中的蛋白表达; C: NNMT 在各组细胞中的蛋白表达灰度值分析。与阴性对照组和空白对照组相比, NNMT-siRNA 组中的 NNMT 蛋白水平明显降低 ($P < 0.001$)

图 3 转染 48 小时后 NNMT mRNA 和蛋白表达情况



A: NNMT-siRNA 组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组; D: Transwell 侵袭实验各组细胞计数。与阴性对照组和空白对照组相比, 转染 NNMT-siRNA 组中的穿膜细胞数明显减少 ($P < 0.001$)

图 4 转染 48 小时后细胞侵袭情况

表 1 NNMT mRNA 水平与临床病理资料的关系

临床特征	例数	NNMT mRNA 相对表达	$\bar{x} \pm s$	P 值
年龄/岁				
<60	22	1.758 ± 0.2699		0.177
≥60	8	1.097 ± 0.2599		
性别				
男	25	1.621 ± 0.2442		0.691
女	5	1.387 ± 0.4479		
组织学分级				
高分化	15	1.813 ± 0.3349		
中分化	12	1.437 ± 0.3281		0.188
低分化	3	1.006 ± 0.1825		
肿瘤大小/cm				
≤7	11	5.073 ± 0.4601		<0.001
>7	19	1.348 ± 0.2166		
临床分期				
I + II	10	2.233 ± 0.4644		0.029
III + IV	20	1.256 ± 0.1936		

近期研究表明, NNMT 蛋白含量和 mRNA 水平在甲状腺乳头状癌、胰腺癌、胃癌、口腔鳞状细胞癌、肝癌等多种恶性肿瘤中表达增高, 并在结肠癌患者的血清中以分泌型存在, 可能成为结肠癌的一种血清标记物^[3~7]。Bromberg 等^[8]又提出把 NNMT 作为精神分裂症的病因学的概念。

NNMT 是维持尼克酰胺平衡的关键酶, 因此可以推测 NNMT 的增高可影响尼克酰胺参与的细胞功能, 肿瘤干细胞高表达 NNMT 通过催化尼克酰胺的降解, 进而增强肿瘤干细胞的放疗抵抗^[9]。Pozzi 等^[10]采用 RNAi 技术敲除 NNMT 的表达后能够显著抑制 KB 肿瘤细胞的增殖, 并降低软琼脂克隆形成能力。Sartini 等^[11]分析口腔鳞状细胞癌患者组织和唾液中 NNMT 的表达, 推测 NNMT 可以作为早期或非侵袭性口腔癌检测的潜在标记物。Riester 等^[12]采用基因芯片技术分析 93 例膀胱癌组织标本, 发现 NNMT 在肿瘤组织中高表达, 并把其作为临床预测高危性膀胱癌生存率的基因之一。又有学者发现与肿瘤关系较为密切的信号传导与转录激活因子 stat3 能够上调 NNMT 的表达^[13], 这些都说明 NNMT 在肿瘤的发生和发展中可能扮演重要的角色。

我们前期应用蛋白质谱技术发现, 与正常肾小管上皮细胞 HKC 相比, NNMT 在肾癌细胞株 786-O 中异常高表达, 本实验结果进一步显示 NNMT 在肾透明细胞癌组织中表达增高。将 NNMT 的 mRNA 表达情况与肾透明细胞癌患者的临床病理特征相结合, 分析结果显示 NNMT 在肿瘤大小 ≤7 cm 的肾癌组织中表达显著升高 ($P < 0.001$), 其表达与肿瘤大小成负相关; 在 I、II 期

肾癌组织中的表达水平较Ⅲ、Ⅳ期肾癌组织中的表达水平显著升高($P < 0.05$),但与患者的性别和年龄无关。我们进一步用 siRNA 技术下调 NNMT 的表达后,发现穿过 Transwell 小室聚碳酸酯膜的细胞数明显减少,说明下调肾癌细胞中 NNMT 的表达将抑制肾癌细胞的侵袭能力。

综上所述,本实验结果表明 NNMT mRNA 的表达与肾透明细胞癌的肿瘤大小及临床分期关系密切,随着临床分期及肿瘤直径的升高,NNMT mRNA 的相对表达含量呈降低趋势,这一结果提示 NNMT 可能在肾癌的发生发展中发挥重要作用,其表达状态可能作为肾癌早期诊断的预测指标。同时 NNMT 在肾透明细胞癌中发挥生物学功能的具体分子机制有待进一步深入研究,进而为肾癌分子靶向治疗提供新的思路。

[参考文献]

- 1 GOTTARDO F, LIU C G, FERRACIN M, et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers[J]. Urol Oncol, 2007, 25:387-392.
- 2 Aksoy S, Brandriff B F, Ward A, et al. Human nicotinamide N-methyltransferase gene: molecular cloning, structural characterization and chromosomal localization[J]. Genomics, 1995, 29:555-561.
- 3 Roessler M, Rolling W, Palme S, et al. Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11:6550-6557.
- 4 Rogers C D, Fukushima N, Sato N, et al. Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5:1383-1389.
- 5 Emanuelli M, Santarelli A, Sartini D, et al. Nicotinamide N-Methyltransferase upregulation correlates with tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma[J]. Histol Histopathol, 2010, 25:15-20.
- 6 Lim B H, Cho B I, Kim Y N, et al. Overexpression of nicotinamide N-methyltransferase in gastric cancer tissues and its potential post-translational modification[J]. Exp Mol Med, 2006, 38:455-465.
- 7 Wu Y, Siadat M S, Berens M E, et al. Overlapping gene expression profiles of cell migration and tumor invasion in human bladder cancer identify metallothionein 1E and nicotinamide N-methyltransferase as novel regulators of cell migration[J]. Oncogene, 2008, 27:6679-6689.
- 8 Bromberg A, Lerer E, Udawela M, et al. Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) in schizophrenia: genetic association and decreased frontal cortex mRNA levels[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2012, 15:727-737.
- 9 D'Andrea F P, Safwat A, Kassem M, et al. Cancer stem cell overexpression of nicotinamide N-methyltransferase enhances cellular radiation resistance[J]. Radiother Oncol, 2011, 99:373-378.
- 10 Pozzi V, Mazzotta M, Lo Muzio L, et al. Inhibiting proliferation in KB cancer cells by RNA interference-mediated knockdown of nicotinamide N-methyltransferase expression[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2011, 24:69-77.
- 11 Sartini D, Pozzi V, Renzi E, et al. Analysis of tissue and salivary nicotinamide N-methyltransferase in oral squamous cell carcinoma: basis for the development of a noninvasive diagnostic test for early-stage disease[J]. Biol Chem, 2012, 393:505-511.
- 12 Riester M, Taylor J M, Feifer A, et al. Combination of a novel gene expression signature with a clinical nomogram improves the prediction of survival in high-risk bladder cancer[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18:1323-1333.
- 13 Tomida M, Ohtake H, Yokota T, et al. Stat3 up-regulates expression of nicotinamide N-methyltransferase in human cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134:551-559.

(收稿日期:2012-12-13)

2013年尿道修复重建高级培训班招生通知

上海交通大学附属第六人民医院定于2013年5月13~31日举办高年资主治医师以上的“尿道修复重建高级培训班”。内容为:①集中理论授课;②参加临床手术示教;③动物实验操作等。学员在近月的培训后,对尿道修复重建的理念有一个正确的认识,并获取实际的临床操作技能。系统讲课老师为国内外从事尿道修复重建的专家。

上海交通大学附属第六人民医院泌尿外科收治的需尿道修复重建的患者均来自全国各地,绝大多数为经过手术而失败的疑难病例。学员能在较短时间内获得最多的学习机会,并能深入临床一线,观摩整个治疗过程,迅速掌握诊治原则及具体方法步骤。

本学习班纳入国家级继续教育项目,参加学员可获得国家Ⅰ类学分10分。同时,学员获赠徐月敏教授主编的《尿道修复重建外科学》一册。

为保证教学质量,限招学员10~12人;报名费1000元(不退),培训费2000元/人,食宿自理。欲参加者可先电话报名,请电话联系谢森(18930172272)和谷宝军(18930177035)。培训地点:上海交通大学附属第六人民医院泌尿外科(上海市宜山路600号)

上海交通大学附属第六人民医院泌尿外科