

(肿 瘤)

MicroRNA-106b 在肾细胞癌中的表达及临床意义^{*}

陶令之¹ 李一帆^{1,2} 金露^{1,2} 刘家驹¹ 陈独群^{1,2}
苏郑明¹ 倪梁朝¹ 杨尚琪¹ 桂耀庭¹ 毛向明¹ 来永庆¹

[摘要] 目的:比较 microRNA-106b(miR-106b)在肾癌及癌旁正常组织之间和肾癌细胞系和正常肾细胞系之间的表达水平,并分析其表达水平与临床病理资料之间的关系。方法:采用 RT-qPCR 方法检测 miR-106b 表达量在 35 对肾癌组织和癌旁正常组织中的差异,并运用秩和检验方法分析肾癌组织中 miR-106b 表达量与患者临床病理特征之间的相关性。培养肾癌细胞系(786-O 和 ACHN)和正常肾上皮细胞系(HK-2)并采用 RT-qPCR 方法检测细胞 miR-106b 表达量。结果:miR-106b 在肾癌组织中的表达量明显高于癌旁正常组织($P<0.01$),且肾癌组织中 miR-106b 表达量与肾癌的组织类型有相关性($P=0.049$),未发现与其他临床病理资料如年龄、性别、T 分期、Fuhrman 分级和 AJCC 临床分期有明显相关关系($P>0.05$)。同时,miR-106b 表达量在肾癌细胞系中也明显高于正常肾上皮细胞系($P<0.01$)。结论:miR-106b 在肾癌组织和细胞系中均高表达,且其在肾癌组织中的表达水平与肾癌组织类型相关,提示 miR-106b 与肾癌的发生和发展相关。

[关键词] miR-106b;肾癌;组织类型

doi: 10.13201/j.issn.1001-1420.2015.10.007

[中图分类号] R737.11 **[文献标识码]** A

Expression and clinical significance of miR-106b in renal cell carcinoma

TAO Lingzhi¹ LI Yifan^{1,2} JIN Lu^{1,2} LIU Jiaju¹ CHEN Duqun^{1,2} SU Zhengming¹
NI Liangchao¹ YANG Shangqi¹ GUI Yaoting¹ MAO Xiangming¹ LAI Yongqing¹

(¹ Department of Urology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518035, China; ² Anhui Medical University Graduate School)

Corresponding author: LAI Yongqing, E-mail: yqlord@163.com

Abstract Objective: To compare the expression level of miR-106b between renal cancer and adjacent normal kidney tissues (ANTs) and between cells derived from renal cancer and normal kidney and to analyze the relationship between the expression level of miR-106b and the clinicopathology. **Method:** Through quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) we determined the expression of miR-106b in 35 paired renal cancer tissues and ANTs and we analysed the relationship between miR-106b expression and clinicopathology by rank sum test. We cultivated the renal cancer cell lines (786-O and ACHN) and human normal kidney cell line HK-2 and determined the expression level of miR-106b in cells by RT-qPCR. **Result:** MiR-106b was up-regulated in renal cell carcinoma (RCC) tissues and cell lines compared with control normal tissues and cell line($P<0.01$). And the miR-106b expression in RCC tissues was correlated with histological type ($P=0.049$), but there was no correlation between miR-106b expression and other clinicopathological variables such as age, sex, T stage, Fuhrman grade and AJCC staging ($P>0.05$). **Conclusion:** MiR-106b was up-regulated in both renal cancer tissues and cell lines and miR-106b expression level was related to histological type of renal cancer. It is suggested that miR-106b play a potential role in the tumorigenesis and development.

Key words miR-106b; renal cell carcinoma; histological type

肾癌是世界上第 14 位最常见的癌症,发生率和死亡率在欧美国家居高不下,而在发展中国家持

续上升^[1,2]。临床分期为 I 期的肾细胞癌患者的 5 年生存率显著高于 III 期的肾细胞癌患者,说明早期发现和治疗肾细胞癌的重要性。然而肾细胞癌的早期发现和治疗很困难,因为缺乏特异性的临床表现、早期症状而且对放疗不敏感^[3,4]。所以寻找肾癌的肿瘤生物标志物至关重要。

肾癌的发生是由多种因素共同作用的结果。每一种肾癌都有其独特的基因改变、组织类型、临床病程及对各种治疗的敏感性^[5]。目前所知的肾

^{*} 基金项目:国家自然科学基金(编号 81101922),广东省医学科研基金(编号 A2012584)和(编号 A2013606),深圳市科技研发资金知识创新计划基础研究项目(编号 JCYJ20130402114702124)和广东省重点医学学科课题基金

¹ 北京大学深圳医院泌尿外科,北京大学深圳医院男性生殖实验室(广东深圳,518036)

² 安徽医科大学研究生院

通信作者:来永庆,E-mail: yqlord@163.com

癌相关基因有 VHL、MET、FLCN、TSC1、TSC2、FH 和 SDH 等, 它们均可被 microRNAs (miRNAs) 通过翻译抑制和/或信使 RNA 降解的方式调节^[6]。越来越多的文献报道 miRNAs 在肾癌中的作用以及 miRNAs 的临床和病理意义。在肾癌等其他癌症中 miRNAs 基因突变造成的 miRNAs 在癌症中的异常表达, 在癌症的发生发展中起到重要作用^[7]。采用芯片技术测定 miRNAs 的表达量不仅可以区别肾细胞癌和正常肾组织, 而且可以区分不同组织类型的肾细胞癌。在肾癌发生发展中起重要作用的一些特别的 miRNAs 可以作为肾透明细胞癌的治疗靶点^[8,9]。

在肾癌组织及癌旁正常组织之间微阵列芯片测序结果显示, 与癌旁正常组织相比, microRNA-106b (miR-106b) 在肾癌组织中明显升高^[10~13]。Slaby 等^[11]在统计大量肾癌术后随访资料的基础上发现 miR-106b 还能作为预测肾癌患者术后转移的生物学标志物, 判断肾癌患者预后。通过综合性 miRNAs 测序, 除了在肾癌组织中异常表达, miR-106b 在头颈部、子宫、前列腺、胃、结肠、喉和脑癌症组织中显著高表达^[14~20]。然而 miR-106b 在肾癌组织和细胞中的表达量尚未采用 RT-qPCR 定量检测, 并分析 miR-106b 在肾细胞癌中临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床标本和临床资料的收集

①临床标本收集: 35 对肾癌及癌旁正常组织标本是在 2011 年 6 月~2013 年 6 月收集于北京大学深圳医院泌尿外科。所有标本的收集均于术前得到患者及其家属的知情同意, 而且此项研究得到北京大学深圳医院伦理委员会的批准。每一例肾癌标本及配对的癌旁正常组织, 距离可见癌组织约 5 cm 范围以外, 手术切除后, 立即浸入 RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany), 在液氮中暂时保存后迅速转移入 -80℃ 冰箱长久保存。所有的标本均经术后病理确诊为肾癌, 并且癌旁正常组织无癌组织浸润。②临床资料收集: 每一例患者临床资料的整理和收集是在北京大学深圳医院病案室完成。临床资料采用 2009 年国际抗癌组织 (UICC)/美国癌症联合会 (AJCC) 分期系统进行 TNM 及临床分期, 所有患者的临床病理资料见表 1。

1.2 细胞系及细胞培养试剂

①细胞系: 两种肾癌细胞系 (786-O 和 ACHN) 和一种人正常胚肾细胞系 (HK-2) 均来源于男性生殖与遗传广东省重点实验室。②培养试剂: DMEM 培养基 (Gibco, Carlsbad, CA, USA)、10% 胎牛血清 (Gibco, Carlsbad, CA, USA)、1% 双抗 (100 μ/ml 青霉素 and 100 mg/ml 链霉素硫酸盐) 和 1% 谷氨酸盐 (Gibco, Carlsbad, CA, USA)。

表 1 肾癌组织中 miR-106b 表达水平与临床病理特征之间的关系

临床病理特征	miR-106b 表达水平		检验值	P 值
	低表达 (n=20)	高表达 (n=15)		
年龄				
高年龄组 (n=18)	10 (55. 56)	8 (44. 44)	148. 000	0. 847
低年龄组 (n=17)	10 (58. 82)	7 (41. 18)		
性别				
男(n=25)	12 (48. 00)	13 (52. 00)	85. 000	0. 089
女(n=10)	8 (80. 00)	2 (20. 00)		
T 分期				
T ₁ (n=18)	10 (55. 56)	8 (44. 44)	0. 107	0. 948
T ₂ (n=15)	9 (60. 00)	6 (40. 00)		
T ₃ ~T ₄ (n=2)	1 (50. 00)	1 (50. 00)		
组织类型				
透明细胞癌 (n=24)	11 (45. 83)	13 (54. 17)	84. 500	0. 049
非透明细胞癌 (n=11)	9 (81. 82)	2 (18. 18)		
Fuhrman 分级				
I 期(n=12)	7 (58. 33)	5 (41. 67)	0. 756	0. 685
II 期(n=16)	10 (62. 50)	6 (37. 50)		
III /IV 期 (n=7)	3 (42. 86)	4 (57. 14)		
AJCC 临床分期				
I 期(n=20)	15 (75. 00)	5 (25. 00)	5. 903	0. 052
II 期(n=12)	4 (33. 33)	8 (66. 67)		
III /IV 期 (n=3)	1 (33. 33)	2 (66. 67)		

1.3 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂 RNAiso (Takara, Japan)、NanoDrop 2000c 紫外分光光度计 (Thermo Scientific, USA)、逆转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa, Japan)、普通 RT-PCR 仪 (BIO-RAD, USA)、荧光定量试剂盒 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TaKaRa, Japan)、罗氏 LC480 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA)、常规试剂、普通及预冷离心机、冰箱等由北京大学深圳医院男性生殖与遗传中心实验室提供。

1.4 试验方法

细胞和临床组织标本总 RNA 提取:①细胞收集:第一天将本研究的三种细胞系(786-O、ACHN 和 HK-2)分别接种于 6 孔板中,设置 3 个复孔,每孔的细胞数约为 4×10^5 。第二天细胞汇合度约 90%以上,用 0.25%胰酶消化细胞至 15 ml 离心管中,并用 PBS 洗 3 遍,最终收集于 1.5 ml EP 管中。每一管细胞加入 1 ml RNAiso 提取总 RNA。②组织标本处理:从-80℃冰箱中取出肾癌及配对癌旁正常组织,在冰上融化,剪取黄豆大小组织块于 1.5 ml 离心管中。每一管组织中加入 1 ml RNAiso,并用慢速电动研磨器研磨至匀浆。③RNA 提取和鉴定:上述用 RNAiso 处理过的细胞和组织,按照 RNAiso 试剂盒说明书进行用氯仿和异丙醇等试剂进行总 RNA 提取。用 NanoDrop 2000c 紫外分光光度计来测定总 RNA 浓度,260/280 比值在 1.8~2.1 之间,浓度在 142.86 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上的总 RNA 才符合逆转录所需 RNA 的纯度和浓度要求。符合标准的 RNA 应立即逆转录或保存于-80℃冰箱用于后续试验。

RNA 逆转录成 cDNA:根据所测总 RNA 浓度,计算 1 μg 的总 RNA 体积。根据说明书用逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, Japan)采用两步法将总量为 1 μg 的 RNA 逆转录成 cDNA。

qRT-PCR 检测 miR-106b 表达量:①引物设计:miR-106b 前引物为 5'-TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT-3',后引物为 Qiagen 逆转录试剂盒中提供的通用引物。内参基因:U6 snRNA 的前引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',后引物为

5'-ACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。② RT-qPCR 反应体系:1 μl 的 cDNA 模板,0.8 μl 的 miR-106b 前后引物,7.4 μl 双蒸水和 10 μl 2 $\times$ SYBR Green PCR Mix。③反应条件:在罗氏 LC 480 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)上设置反应条件为:95℃反应 15 min,接着 40 个循环(94℃反应 15 s,60℃反应 30 s,72℃反应 30 s)。④计算方法:miR-106b 表达量是相对于内参基因 U6 snRNA 的倍数(Ct 值)呈现,miR-106b 表达量计算公式为: $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ($\Delta\text{Ct}=\text{Ct}_{\text{癌组织}}/\text{正常组织}-\text{Ct}_{\text{U6}}$)。

1.5 统计学方法

miR-106b 表达量在肾癌及癌旁组织之间的表达差异采用 Student-*t* 检验。肾癌组织中 miR-106b 表达量与临床病理特征之间的关系采用 Kruskal-Wallis 和 Mann-Whitney 秩和检验。所有检验以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

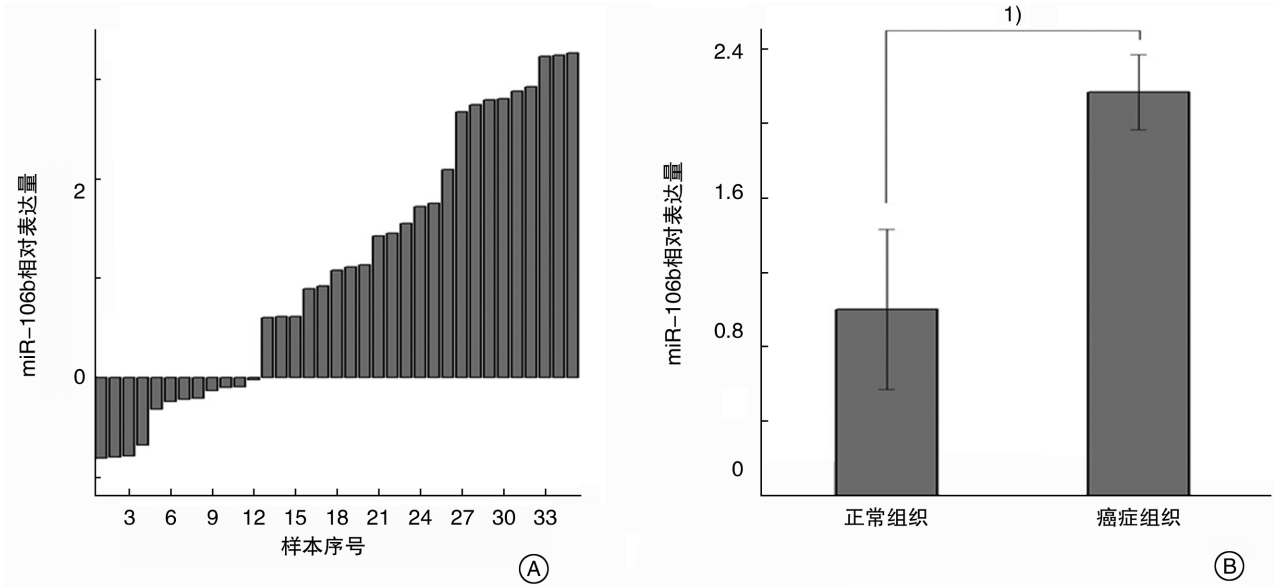
2 结果

2.1 miR-106b 在肾癌组织中表达量

如图 1A 所示,显示在肾癌组织中 miR-106b 表达上调的有 23 对(65.71%),显示表达下调(癌组织低于癌旁正常组织)的有 12 对(34.29%)。然后计算每一对肾癌组织和配对癌旁正常组织 ΔCt ,求出 miR-106b 相对表达量 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 并做配对 *t* 检验。结果显示 miR-106b 在肾癌组织中表达是癌旁正常组织的 2.44 倍($P<0.01$)(图 1B)。

2.2 肾癌组织中 miR-106b 的表达量与临床病理资料之间的关系

以肾癌组织中 miR-106b 相对表达量的平均值(2.167)为界将所有的肾癌患者分为 miR-106b



¹⁾ 与正常组织比较, $P<0.01$

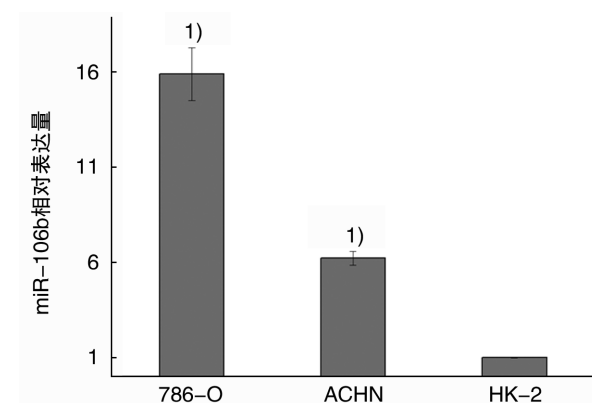
图 1 miR-106b 在 35 对肾癌组织和癌旁正常组织中相对表达量的比较

高表达组和 miR-106b 低表达组。35 例患者年龄 27~70 岁, 中位年龄 51 岁, 以平均年龄 50.83 岁为界分为高年龄组和低年龄组。用 SPSS19.0 统计软件进行 Mann-Whitney 和 Kruskal-Wallis 检验, 结果见表 1。

本研究通过分析 35 例肾癌组织中 miR-106b 表达量与患者年龄、性别、T 分期、组织类型、Fuhrman 分级和 AJCC 临床分期并进行秩和检验, 结果发现肾癌组织 miR-106b 表达水平与肾癌组织类型有关, 肾透明细胞癌组织 miR-106b 表达量较高, 而肾非透明细胞癌组织 miR-106b 表达量较低, 差异有统计学意义。

2.3 786-O 和 ACHN 细胞系中 miR-106b 表达量与 HK-2 的关系

采用 RT-qPCR 检测 miR-106b 在 786-O、ACHN 和 HK-2 细胞系中相对表达量(图 2), 结果发现 786-O 和 ACHN 细胞系 miR-106b 表达量分别是 HK-2 的 6.76 倍和 13.32 倍($P < 0.01$)。说明 miR-106b 在肾癌细胞系中的表达量明显高于正常肾上皮细胞系。



¹⁾ 与 HK-2 相比, $P < 0.01$

图 2 miR-106b 在肾癌细胞系和人正常肾细胞系中相对表达量的比较

3 讨论

miRNAs 是一类约 22 碱基的单链非编码 RNA, 结合靶基因 3' 端非编码区, 通过诱导信使 RNA 降解或抑制翻译来调节基因表达^[8]。越来越多的文献报道 miRNAs 在癌症发生、进展、转移和侵袭中发挥关键作用。miRNAs 有两大主要应用价值: 首先作为癌症生物学指标, 肾癌组织及不同组织类型肾癌 miRNAs 表达谱, 能用于诊断、预测预后和判断病情; 其次, 单个 miRNA 功能及机制的研究可指导肾癌新的治疗方法^[21]。

miRNAs 测序研究表明 miR-106b 在多种肿瘤中高表达。肾癌组织和癌旁正常组织 miRNAs 表达谱比较发现 miR-106b 均在肾癌组织中高表达。

但是 miR-106b 在肾癌组织及癌旁正常组织的表达尚未经 RT-qPCR 验证, miR-106b 表达水平是否具有临床意义也尚未研究。在本研究中, 我们通过 RT-qPCR 定量检测并比较 miR-106b 在肾癌组织与癌旁正常组织以及肾癌细胞系与人胚肾细胞系中的表达差异。采用非参数秩和检验的方法分析 miR-106b 表达水平与患者临床病理特征之间的相关性。结果显示, 无论在肾癌组织还是细胞系, 相对于癌旁正常组织及正常细胞, miR-106b 表达量均显著升高。相关性分析表明 miR-106b 表达水平只与肾癌的组织类型相关, 肾透明细胞癌组织中 miR-106b 表达量高。肾透明细胞癌是最常见的、恶性程度最高的和预后最差的肾癌组织类型。miR-106b 表达量在肾透明细胞癌表达量显著高于其他组织类型提示 miR-106b 表达量对肾癌病理分型以及预后判断有重要作用。

关于 miR-106b 与肿瘤的关系在基础和临床上的研究已经有很多。Liu 等^[22]在脑胶质瘤中报道在胶质瘤细胞中过表达 miR-106b-5p 可以显著促进癌细胞的增殖和抑制凋亡, 而相反敲除 miR-106b-5p 后癌细胞的增殖受到抑制、凋亡被促进。进一步的机制研究发现 miR-106b-5p 促进增殖是通过作用于靶基因 RBL1 和 RBL2 而其抑制癌细胞凋亡的功能是通过下调靶基因 caspase-8 实现^[22]。临床方面研究发现血浆中 miR-106b 在胃癌及喉患者中显著升高, 提示 miR-106b 可作为诊断标志物^[19, 23]。去细胞尿液中的 miR-106b 也可作为膀胱癌诊断标志物, 并且去细胞尿液中的 miR-106b 表达量与膀胱癌患者肿瘤分期相关^[24]。血浆中 miR-106b 可预测癌症患者预后, 例如 miR-106b 表达水平越高的前列腺癌患者癌症复发风险越大^[25], 骨肉瘤患者预后及全身转移的危险性也越大^[26]。

据我们所知, miR-106b 在肾癌组织和细胞系中的表达及其临床意义尚未研究。本研究发现 miR-106b 在肾癌组织和细胞系中均表达上调, 并统计发现肾癌组织中 miR-106b 表达量与肾癌患者的组织类型相关, 提示 miR-106b 可能参与肾癌的发生发展。为进一步深入的功能研究及临床研究奠定了基础。

[参考文献]

- 1 Ridge C A, Pua B B, Madoff D C. Epidemiology and staging of renal cell carcinoma[J]. Semin Intervent Radiol, 2014, 31(1): 3-8.
- 2 Ferlay J, Shin H R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.
- 3 Motzer R J, Bander N H, Nanus D M. Renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 1996, 335(12): 865-875.

- 4 Iwamoto H, Kanda Y, Sejima T, et al. Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(1): 53—58.
- 5 Linehan W M, Srinivasan R, Schmidt L S. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease[J]. *Nat Rev Urol*, 2010, 7(5): 277—285.
- 6 Fendler A, Stephan C, Yousef G M, et al. MicroRNAs as regulators of signal transduction in urological tumors[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(7): 954—968.
- 7 Oulas A, Karathanasis N, Louloup A, et al. Finding cancer-associated miRNAs: methods and tools[J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 49(1): 97—107.
- 8 Maher E R. Genomics and epigenomics of renal cell carcinoma[J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(1): 10—17.
- 9 Rydzanicz M, Wrzesiński T, Bluysen H A, et al. Genomics and epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: recent developments and potential applications[J]. *Cancer Lett*, 2013, 341(2): 111—126.
- 10 Müller S, Nowak K. Exploring the miRNA-mRNA regulatory network in clear cell renal cell carcinomas by next-generation sequencing expression profiles[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 948408.
- 11 Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, et al. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 90.
- 12 Wulfken L M, Moritz R, Ohlmann C, et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25787.
- 13 Chow T F, Youssef Y M, Lianidou E, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(1-2): 150—158.
- 14 Hui A B, Lenarduzzi M, Krushel T, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4): 1129—1139.
- 15 Ji T, Zheng Z G, Wang F M, et al. Differential microRNA expression by Solexa sequencing in the sera of ovarian cancer patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(4): 1739—1743.
- 16 Ambros S, Prueitt R L, Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6162—6170.
- 17 Wang Y X, Zhang X Y, Zhang B F, et al. Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis[J]. *J Dig Dis*, 2010, 11(1): 50—54.
- 18 Yao Y, Suo A L, Li Z F, et al. MicroRNA profiling of human gastric cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2009, 2(6): 963—970.
- 19 Yu X, Wu Y, Liu Y, et al. miR-21, miR-106b and miR-375 as novel potential biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 15(5): 503—508.
- 20 Wang X, Zhang H, Zhang A, et al. Upregulation of miR-20a and miR-106b is involved in the acquisition of malignancy of pediatric brainstem gliomas[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(4): 1293—1300.
- 21 Schaefer A, Stephan C, Busch J, et al. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of microRNAs in urologic tumors[J]. *Nat Rev Urol*, 2010, 7(5): 286—297.
- 22 Liu F, Gong J, Huang W, et al. MicroRNA-106b-5p boosts glioma tumorigenesis by targeting multiple tumor suppressor genes[J]. *Oncogene*, 2014, 33(40): 4813—4822.
- 23 Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(7): 1174—1179.
- 24 Zhou X, Zhang X, Yang Y, et al. Urinary cell-free microRNA-106b as a novel biomarker for detection of bladder cancer[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(10): 197.
- 25 Hudson R S, Yi M, Esposito D, et al. MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(35): 4139—4147.
- 26 Arabi L, Gsponer J R, Smida J, et al. Upregulation of the miR-17-92 cluster and its two paralogs in osteosarcoma—reasons and consequences [J]. *Genes Cancer*, 2014, 5(1-2): 56—63.

(收稿日期:2015-06-17)