

• 论著-实验研究 •

OIP5 基因在肾癌中的表达及作用*

宫满成¹ 董文静² 丘少鹏³ 袁润强¹

[摘要] 目的:探讨 OIP5 基因与肾癌发生发展的相关性,及下调 OIP5 基因对肾癌细胞增殖活力、侵袭力及成瘤能力的影响。方法:利用 RT-PCR 及 Real-time PCR 在 4 对肾癌组织及癌旁正常组织中检测 OIP5 的表达情况,利用 Real-time PCR 在肾正常细胞系 HK-2 及肾癌细胞系 786-O 中检测 OIP5 基因的表达情况。转染 shRNA 下调 OIP5 基因后,检测肾癌细胞的增殖活力、侵袭能力及成瘤能力等。进一步利用免疫组化的方法在裸鼠成瘤的组织中检测 OIP5 蛋白的表达。结果:我们发现 OIP5 基因在肾癌组织及肾癌细胞系中都明显的高表达。降低 OIP5 基因的表达后,肾癌细胞的增殖能力、侵袭能力及成瘤能力都明显的减弱了。结论:OIP5 基因与肾癌的发生发展有关,OIP5 可能是肾癌基因治疗的一个新靶点。

[关键词] 肾癌;OIP5 基因;基因治疗

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2017.06.015

[中图分类号] R737.11 **[文献标识码]** A

Expression and function of OIP5 gene in renal cancer

GONG Mancheng¹ DONG Wenjing² QIU Shaopeng³ YUAN Runqiang¹

(¹Department of Urology, People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong, 528403, China; ²Department of Oncology, People's Hospital of Zhongshan; ³Department of Urology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University)

Corresponding author: YUAN Runqiang, E-mail: yuanrunqiang2013@163.com

Abstract Objective: To investigate the relationship between OIP5 gene and the renal cancer risk, and the effect of down regulation of OIP5 gene expression on proliferation, invasion and tumorigenic ability of 786-O cell. **Method:** We used RT-PCR and real-time PCR to detect the OIP5 expression in four pairs of renal cell carcinoma tissues and adjacent normal tissues. At the same time, we detected OIP5 expression in HK-2 and 786-O cell lines. After down regulation of OIP5 gene through transfecting shRNA, we detected proliferation, invasion and tumorigenic ability of 786-O cell. **Result:** We found OIP5 gene was obviously high expressed in renal cell carcinoma tissues and cell line. After reducing OIP5 gene expression, renal cancer cell proliferation, invasion and tumorigenic ability were significantly attenuate. **Conclusion:** OIP5 gene is associated with the risk of renal cancer, which may be a new target of renal cancer gene therapy.

Key words renal cancer; OIP5 gene; gene therapy

肾癌,也叫做肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC),是严重危害人类生命和健康的最常见肿瘤之一,发病率占有恶性肿瘤的 3%~4%^[1],其全球的发病率正以每年超过 20 万新发病例和 10 万死亡病例的速度在增长^[2,3]。早期肾癌无明显症状,20%~30%的患者在就诊时已出现不同程度的扩散或转移。30%~40%的患者在肾脏切除后的数月或数年之后仍会进展为转移性肾癌^[4]。所以寻找一种有效的肾癌的诊断及治疗方法显得十分迫切。

最近,OIP5 由于其生物学功能被认为是某些癌症的分子靶标从而引起了较多研究学者的兴趣。有研究表明,OIP5 的 mRNA 水平在人胃癌^[5]、结直肠癌^[5]和女性急性髓系白血病^[6]患者中均表达上调。并且,OIP5 的上调可能与肺癌^[7]和食管癌^[7]细胞的恶性度有关。此外,小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3 细胞)被转染 OIP5 后增殖率增加了 2 倍,这也说明了其致癌性^[8]。更进一步,Nakamura 等^[9]报道指出与胃正常组织相比较而言,OIP5 在胃肿瘤组织中表达上调,提示 OIP5 可能是胃癌患者的一种新型的免疫治疗靶点。但是到目前为止,OIP5 基因在肾癌中的表达及其具体作用机制还未见深入研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 4 对肾透明细胞癌及癌旁正常

* 基金项目:广东省医学科研基金项目(编号 A2016058);中山市科技计划项目(编号 2015B1012);中山市医学科研基金项目(编号 2016J040)

¹ 中山市人民医院泌尿外科(广东中山,528403)

² 中山市人民医院肿瘤内科

³ 中山大学附属第一医院泌尿外科

通信作者:袁润强,E-mail:yuanrunqiang2013@163.com

组织标本均来源于2015年中山市人民医院泌尿外科手术患者,患者年龄45~74岁,平均年龄57岁。组织标本切取后立即置入液氮中保存。

1.1.2 细胞 人肾癌细胞系(786-O)购自于上海细胞库,正常人肾近曲小管上皮细胞系 HK-2 购自于美国 ATCC 细胞库。

1.1.3 主要试剂 提取 RNA 的 TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,转染试剂 lipofectamin 2000 购自 Invitrogen 公司,兔抗人 OIP5 多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,鼠抗兔多克隆抗体购自北京中杉金桥生物公司,Transwell 小室购自 Coster 公司,人工基质 Matrigel 购自 BD 公司,引物及质粒由上海生工合成,CCK8 购自于 Dojindo Corp 公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 及荧光定量 PCR 利用 TRIZOL 试剂提取肾癌及癌旁组织标本总 RNA,逆转录成 cDNA。应用 Primer 5.0 设计引物,OIP5 引物上游:5'-CCCTTCCTAGTTGGCATTGA-3',下游:5'-GCACACCATTTTGTCACTGG-3';内参基因 GAPDH 引物上游:5'-AAGCCCATCAC-CATCTTCCA-3',下游:5'-CCTGCTTCACCAC-CTTCTTG-3'。按照试剂盒说明书进行实验,应用的仪器分别是美国 BIO-RAD 和 ABI 公司的 7500 荧光定量 PCR 仪,使用的软件是 7500 Software v2.0。

1.2.2 shRNA 转染 收获处于对数生长期的 786-O 细胞,以 2×10^4 个细胞/孔转种于 6 孔培养板中,培养 24 h,细胞长至 60% 融合。利用 lipofectamin 2000 转染试剂按照说明书进行转染。OIP5shRNA 序列:上游:5'-CCUAGUUG-GCAUUGAAGGUTT-3',下游:5'-ACCUU-CAAUGCCAACUAGGTT-3'。

1.2.3 CCK-8 实验 786-O 细胞以 4×10^3 接种于 96 孔板中,于 37℃,5% CO₂ 的培养箱内培养 48 h 后,每孔加入 20 μl 的 CCK-8,轻轻摇晃后,放入孵箱继续培养 1.5 h。酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值。实验重复 3 次。

1.2.4 体外细胞侵袭实验 将 786-O 细胞加入含人工基质 Matrigel 的孔径是 8 μm 的 Transwell 小室中,每孔的细胞数是 1×10^5 ,每组设 3 个复孔。培养 24 h 后取出滤膜固定、结晶紫染色。随机于显微镜下取 5 个视野,计数穿膜的细胞数,再取 5 个视野的平均数代表肿瘤细胞的侵袭能力。

1.2.5 裸鼠成瘤实验 12 只 BALB/c-nu 雌性裸鼠,4~6 周龄,体重 18~22 g;通过随机数字表将 12 只裸鼠分为三组:①786-O 细胞组,②对照组,③转染 OIP5 shRNA 组。用带 6 号针头的注射器抽

取 0.2 ml 含 2×10^7 个活细胞的细胞悬液,接种于每只裸鼠的右后背部。接种 3 周后,麻醉无痛处死裸鼠,切取移植瘤,并称量其重量。用 10% 甲酸固定移植瘤,常规石蜡包埋,制作切片,免疫组化标记 OIP5 蛋白,显微镜下观察。

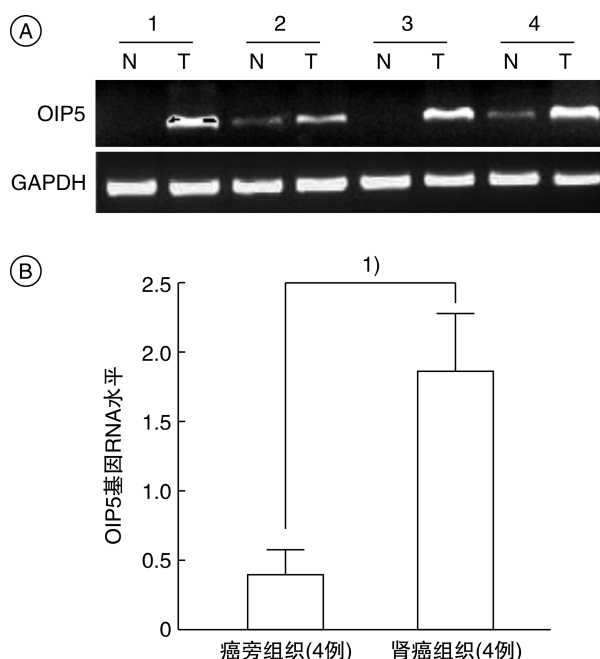
1.3 统计学方法

利用 SPSS 17.0 软件处理数据,计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对组间差异进行单因素方差分析和 t 检验,每组实验重复 3 次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 及 Real-time PCR 检测 OIP5 基因在肾透明细胞癌及癌旁正常组织中的表达情况

从实验结果我们可以看出,OIP5 基因在肾透明细胞癌组织中明显的高表达,而在癌旁的正常组织中几乎不表达或是低表达(图 1)。



与癌旁组织中 OIP5 基因 mRNA 的表达比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

A:利用 RT-PCR 在 4 对肾透明细胞癌及癌旁正常组织中检测 OIP5 基因 mRNA 的表达情况。N 代表癌旁正常组织,T 代表肾透明细胞癌组织;B:利用 Real-time PCR 在 4 对肾透明细胞癌及癌旁正常组织中检测 OIP5 基因 mRNA 的表达情况

图 1 4 对肾透明细胞癌及癌旁正常组织中 OIP5 的表达情况

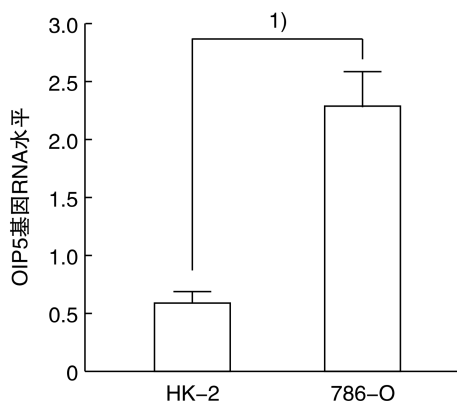
2.2 Real-time PCR 检测 OIP5 基因在肾正常细胞 HK-2 及肾透明细胞癌 786-O 细胞系中的表达情况

从实验结果我们可以看出 OIP5 基因在肾透明细胞癌细胞系 786-O 中的表达量明显高于肾正常细胞 HK-2,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验均重复 3 遍(图 2)。

2.3 CCK-8 实验检测沉默 OIP5 基因后 786-O

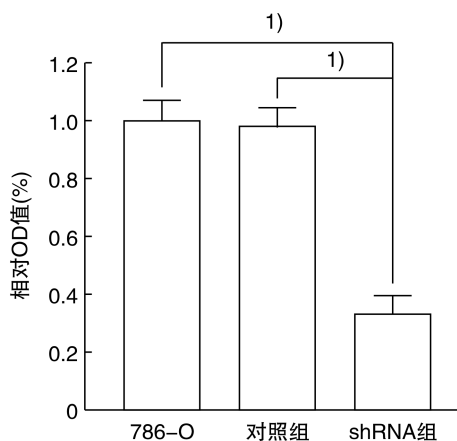
细胞的增殖活力

实验结果表明,沉默 OIP5 基因后 786-O 的增殖活力明显的降低了,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验均重复 3 遍(图 3)。



与 HK-2 中 OIP5 基因 mRNA 的表达比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 2 利用 Real-time PCR 在肾正常细胞系 HK-2 及肾透明细胞癌 786-O 中检测 OIP5 基因的表达情况



与 shRNA 组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 3 利用 CCK-8 检测 786-O 细胞转染 OIP5 shRNA 前后的细胞增殖活力

2.4 侵袭实验检测沉默 OIP5 基因后 786-O 细胞的侵袭能力

沉默 OIP5 基因后,786-O 细胞的侵袭能力明显的降低了,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验均重复 3 遍(图 4)。

2.5 动物实验检测沉默 OIP5 基因后 786-O 细胞的成瘤能力

与正常 786-O 细胞组和对照组相比,转染 OIP5 shRNA 组的肿瘤体积显著减小($P < 0.05$);而正常 786-O 细胞组和对照组相比,裸鼠体内移植瘤的体积无明显差异(图 5)。我们的实验结果表明下调 OIP5 基因后,786-O 细胞的成瘤能力明显减弱。

2.6 利用免疫组化在裸鼠成瘤的组织中检测 OIP5 蛋白的表达情况

我们将瘤体切片进行了免疫组化染色,结果显

示 OIP5 shRNA 组中 OIP5 蛋白的表达水平比正常 786-O 细胞组和对照组明显降低(图 6)。

3 讨论

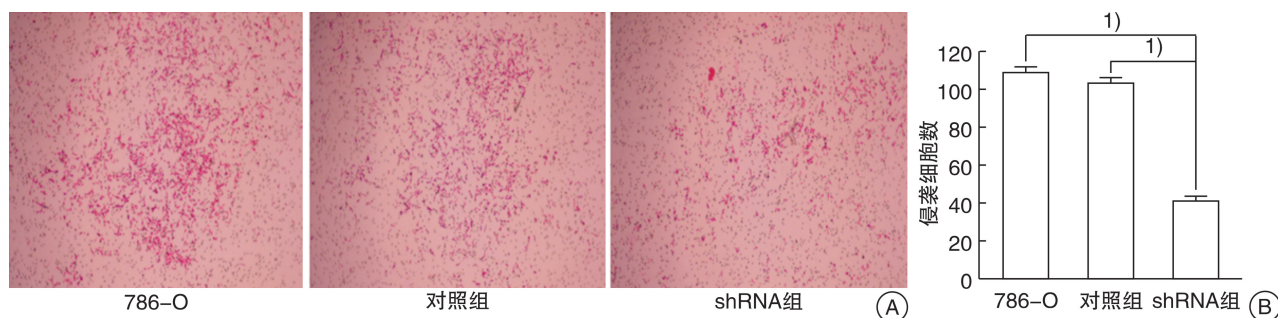
到目前为止,众多的研究结果都显示肾癌是对化疗药物最为抵抗的恶性肿瘤之一。肾癌对化学药物、激素等的治疗以及放射治疗的反应都较低或是无反应^[10]。免疫治疗对于肾癌的有效率也只有 10%~15%^[11]。所以迄今为止,肾癌的治疗仍以手术治疗为主,然而手术对非转移肾癌的治疗作用也只有 70%^[12]。转移的肾癌临床上大多只能采取一些保守对症治疗,患者生存期平均只有几个月。

基因治疗是指通过在特定靶细胞中表达该细胞本来不表达的基因,或采用特定方式封闭、抑制异常基因的表达,从而达到治疗疾病目的的治疗方法。基因治疗不是将杀伤肿瘤细胞作为目的,而是在肿瘤细胞细胞膜上或细胞内特异性表达或高表达的分子为靶点,特异性地作用于肿瘤细胞,阻断其生长、转移或诱导其凋亡。

OIP5 是 1998 年首次发现的淋球菌相关的一种相互作用蛋白,其生物学功能被认为是某一些癌症的分子靶标从而引起了较多研究学者的兴趣。已有研究表明 OIP5 与胃癌^[5]、结直肠癌^[5]、肺癌^[7]、食管癌^[7]等多种肿瘤有关,这说明 OIP5 可能在人类癌症的发生和发展过程中起着重要作用。

凋亡,作为细胞死亡的基本生物学过程和形式,与多种生物学事件相关。已有研究表明^[5],敲除 OIP5 引起了结肠癌和胃癌细胞的生长抑制,并且其生长抑制是由于细胞凋亡所诱导的。流式细胞学结果还表明^[5],在 SNU638 细胞导入靶向 OIP5 的 siRNA,孵育 72 h 后,SNU638 细胞的 sub-G1 期 DNA 含量与仅转染靶向绿色荧光蛋白的对照组细胞相比增加了 6 倍,这说明 OIP5 抑制细胞生长是通过凋亡途径进行的。另外,该研究还表明,RT-PCR 方法检测到凋亡前期细胞中的 Bax 和 Bak 因子的 mRNA 水平明显增高^[13,14]。同时,将 OIP5 敲除也可引起细胞中抗凋亡的 Mcl-1 表达降低,从而抑制 Bax 蛋白发挥功能的下游基因的表达^[15]。

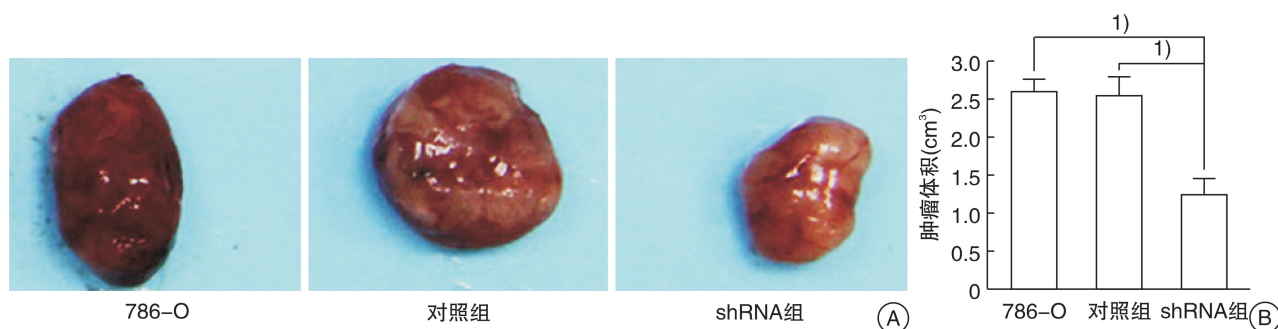
我们的前期研究已经发现 OIP5 基因在肾癌中起到类似癌基因的作用,下调 OIP5 基因后肾癌细胞的增殖与克隆能力都明显降低^[16]。本研究在 4 对肾癌及癌旁正常组织中检测了 OIP5 基因的表达情况,结果表明 OIP5 基因在肾癌组织中明显的高表达,而在相应的肾正常组织中几乎不表达或是低表达。同时我们在细胞系中检测了 OIP5 的表达情况,我们发现,OIP5 基因在肾透明细胞癌 786-O 细胞系中明显的高表达,而在肾正常细胞系 HK2 中低表达。这说明 OIP5 基因可能与肾癌的



与 shRNA 组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

A:786-O 转染 OIP5 shRNA 前后的侵袭能力图片;B:786-O 转染 OIP5 shRNA 前后的侵袭能力结果

图4 下调 OIP5 基因抑制 786-O 细胞的侵袭能力



与 shRNA 组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

A:786-O 转染 OIP5 shRNA 前后形成的瘤体组织;B:786-O 转染 OIP5 shRNA 前后形成的瘤体体积结果

图5 786-O 转染 OIP5 shRNA 前后成瘤情况

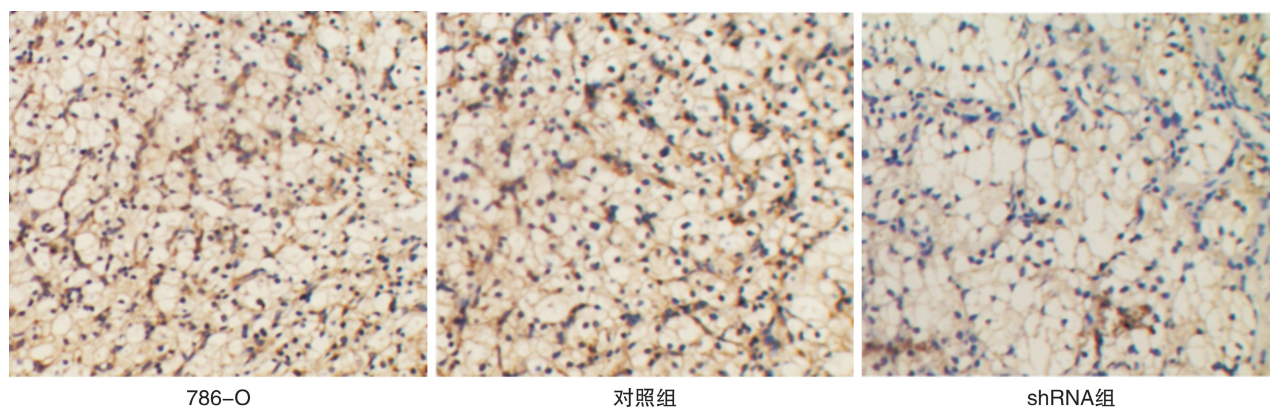


图6 786-O 转染 OIP5 shRNA 前后所形成瘤体组织的免疫组化结果($\times 200$)

发生有关,OIP5 基因可能成为肾癌的一个肿瘤标记物。

接下来我们在 786-O 细胞中检测了 OIP5 基因的功能。我们发现下调 OIP5 基因后 786-O 细胞的增殖活力及侵袭能力都明显的降低了。在体内实验我们发现下调 OIP5 基因后,786-O 细胞的成瘤能力明显降低了。为了进一步验证 OIP5 在肾癌中的作用,我们利用免疫组化的方法在裸鼠成瘤的组织中检测了 OIP5 蛋白的表达情况。结果表明,OIP5 shRNA 组中 OIP5 蛋白的表达水平比正常 786-O 细胞组和对照组明显降低。进一步说明了 OIP5 在肾癌中起到了一种类似癌基因的作用。

用。

综上所述,OIP5 基因在肾癌组织及细胞系中明显的高表达,有望成为诊断肾癌的一个肿瘤标记物。同时我们发现 OIP5 基因在肾癌发生发展中起到了一种类似癌基因的作用,下调 OIP5 基因后,肾癌细胞的增殖活力、侵袭能力、成瘤能力等都明显的下降了。OIP5 基因可能成为肾癌基因治疗的靶点,为肾癌的治疗提供一种新方法。

[参考文献]

- 1 Jemal A,Siegel R,Xu J,et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2010,60(5):277-300.
- 2 Gupta K,Miller J D,Li J Z,et al. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma

- (mRCC): a literature review[J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(3): 193—205.
- 3 Rini B I, Campbell S C, Escudier B. Renal cell carcinoma [J]. *Lancet*, 2009, 373(9669): 1119—1132.
- 4 Weikert S, Ljungberg B. Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention [J]. *World J Urol*, 2010, 28(3): 247—252.
- 5 Chun H K, Chung K S, Kim H C, et al. OIP5 is a highly expressed potential therapeutic target for colorectal and gastric cancers[J]. *BMB Rep*, 2010, 43(5): 349—354.
- 6 Yazarloo F, Shirkooi R, Mobasheri M B, et al. Expression analysis of four testis-specific genes AURKC, OIP5, PIWIL2 and TAF7L in acute myeloid leukemia: a gender-dependent expression pattern[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 368.
- 7 Koinuma J, Akiyama H, Fujita M, et al. Characterization of an Opa interacting protein 5 involved in lung and esophageal carcinogenesis[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(3): 577—586.
- 8 Chung K S, Jang Y J, Kim N S, et al. Rapid screen of human genes for relevance to cancer using fission yeast [J]. *J Biomol Screen*, 2007, 12(4): 568—577.
- 9 Nakamura Y, Tanaka F, Nagahara H, et al. Opa interacting protein 5 (OIP5) is a novel cancer-testis specific gene in gastric cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(2): 885—892.
- 10 Roberts W W, Kavoussi L R. Laparoscopic donor nephrectomy: an update[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001, 10(6): 771—775.
- 11 Smith R S, Fry W R, Tsoi E K, et al. Gasless laparoscopy and conventional instruments. The next phase of minimally invasive surgery [J]. *Arch Surg*, 1993, 128(10): 1102—1107.
- 12 Flax S. Gasless laparoscopy for the urologist[J]. *Can J Urol*, 1997, 4(1): 309—313.
- 13 Zhai D, Jin C, Huang Z, et al. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9580—9586.
- 14 Ruiz-Vela A, Opferman J T, Cheng E H, et al. Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases [J]. *EMBO*, 2005, 6(4): 379—385.
- 15 Germain M, Milburn J, Duronio V. MCL-1 inhibits BAX in the absence of MCL-1/BAX Interaction [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(10): 6384—6392.
- 16 Gong M, Xu Y, Dong W, et al. Expression of Opa interacting protein 5 (OIP5) is associated with tumor stage and prognosis of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Acta Histochem*, 2013, 115(8): 810—815.

(收稿日期: 2016-11-30)

优先刊登创新性研究文章

为了推进泌尿外科学技术的发展,本刊将优先刊登重要基金资助或国家重大课题的研究成果(包括阶段性研究成果)、新药物和新设备的临床应用、技术改进、单中心研究、多中心研究等创新性研究文章。创新性研究文章可申请进入绿色通道刊发。投递该类文章时,请附基金课题证明文件,在文章左下角注明基金类型及其编号,并写一份“关于本文创新性研究情况说明”,经所在科室主任签字后与证明材料复印件一并寄往编辑部。编辑部初审通过后,文章进入“审稿绿色通道”处理。经专家审定文章确有创新性,编辑部将安排网络或纸质刊优先出版。

《临床泌尿外科杂志》编辑部