

MDM4 表达在肾细胞癌中的临床相关性与作用研究

张惟¹ 张建国¹

[摘要] **目的:**通过研究肾细胞癌(RCC)组织 MDM4 的 mRNA 和蛋白表达水平,分析其与 RCC 临床病理特征的相关性,并利用细胞系研究 MDM4 对 RCC 细胞迁移和侵袭能力的作用,探讨其潜在的作用。**方法:**选取 2014 年 1 月~2017 年 2 月在我院行手术切除治疗的 RCC 组织标本 82 例和癌旁组织标本 20 例为研究对象,应用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 MDM4 的表达水平。收集患者性别、年龄、病理分级等临床病理资料,并分析其与 MDM4 mRNA 表达的相关性。体外应用 RCC 细胞系研究 MDM4 对 RCC 细胞迁移和侵袭能力的影响。**结果:**与癌旁组织相比,MDM4 mRNA 和蛋白在 RCC 组织中表达显著上调。统计学分析发现,MDM4 mRNA 的表达与 RCC 病理 TNM 分期和远隔转移呈正相关($P < 0.01$)。肿瘤细胞系 ACHN 细胞中 MDM4 表达显著高于其他肿瘤细胞系及人正常肾小管上皮细胞 HK-2($P < 0.01$)。体外沉默 MDM4 显著抑制 ACHN 的细胞增殖、迁移和侵袭。**结论:**MDM4 表达与 RCC 的恶性特征及癌细胞增殖、迁移和侵袭能力密切相关,有望成为 RCC 的潜在治疗靶点。

[关键词] 肾细胞癌;MDM4;肿瘤转移;细胞侵袭

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.07.009

[中图分类号] R737.11 **[文献标志码]** A

Expression of MDM4 and its clinical significance and role in renal cell carcinoma

ZHANG Wei ZHANG Jianguo

(Department of Urology, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, 471003, China)

Corresponding author: ZHANG Wei, E-mail: 15837950734@163.com

Abstract Objective: By studying the mRNA and protein expression levels of MDM4 in renal cell carcinoma, the correlation between the expression of MDM4 and the clinicopathological features of renal cell carcinoma was analyzed. The effect of MDM4 on the migration and invasion of renal cell carcinoma cells was also studied using cell lines to explore its potential role. **Method:** From January 2014 to February 2017, tumor samples from 82 patients with renal cell carcinoma who were treated with surgical resection and 20 adjacent samples at the first Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology were collected. The real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were utilized to detect the expression of MDM4. The clinicopathologic data including sex, age and pathological grade were collected and analyzed for their associations with MDM4 mRNA expression. Effects of MDM4 on migration and invasion of renal cell carcinoma cells in vitro were studied using renal cell carcinoma cell lines. **Result:** Compared with adjacent tissues, the expression of MDM4 mRNA and protein significantly up-regulated in renal cell carcinoma samples. Statistical analysis showed that the expression of MDM4 mRNA was positively correlated with TNM staging and metastasis of renal cell carcinoma ($P < 0.01$). The expression of MDM4 in tumor cell line ACHN was significantly higher than that in other tumor cell lines and normal renal tubular epithelial cells HK-2 ($P < 0.01$). In vitro silencing of MDM4 significantly inhibited ACHN cell proliferation, migration and invasion. **Conclusion:** MDM4 expression is closely related to the malignant features of renal cell carcinoma and the proliferation, migration and invasion of cancer cells, which is expected to be a potential therapeutic target for renal cell carcinoma.

Key words renal cell carcinoma; MDM4; tumor metastasis; cell invasion

肾细胞癌(RCC)是全球最常见的泌尿生殖肿瘤之一,约占全球恶性肿瘤的 3%,全球发病率每年增加 2%~3%^[1,2]。肾透明细胞癌(CCRCC)是 RCC 的主要亚型,约占所有肾脏肿瘤的 75%^[3],具

有侵袭力强、转移率高和预后差等特点^[4]。原发肿瘤根治术后仍有 30%~40%的患者可能发生肿瘤转移^[5,6]。转移性 CCRCC 患者的预后依然普遍较差,其 5 年生存率约为 10%^[7]。因此,研究 CCRCC 启动和发展过程中的分子机制有助于确定 CCRCC 中的治疗策略。

MDM4 是肿瘤抑制蛋白 p53 的重要负性调节

¹ 河南科技大学临床医学院 河南科技大学第一附属医院泌尿外科(河南洛阳,471003)
通信作者:张惟,E-mail:15837950734@163.com

因子,在多种人类癌症中过表达,与疾病预后有关^[8,9]。小鼠中 MDM4 的过度表达促使大多数淋巴瘤和肉瘤的发生和发展。在这项研究中我们检测了 RCC 中 MDM4 的表达,分析其与临床病理特征间的关系,并探讨 RCC 细胞系中 MDM4 的表达水平,分析其与癌细胞侵袭和迁移能力的相关性。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 RCC 组织标本

选择 2014 年 1 月~2017 年 2 月在我院泌尿外科住院行手术切除治疗,术后经病理专科医师确诊为 RCC 的患者癌组织 82 例及相对应癌旁组织 20 例。记录临床病理特征包括年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期等资料。根据 2010 年 AJCC TNM 分类对肿瘤分期进行分类^[10]。排除合并其他恶性肿瘤、围手术期死亡患者以及行辅助化疗(包括靶向治疗)的患者。手术切除后的 RCC 组织标本置于 -80°C 冰箱冻存。上述取材均经患者知情同意,并通过医院伦理委员批准。

1.2 材料与试剂

RCC 系 ACHN、786-O 和 OSRC-2RCC 细胞系和肾小管上皮细胞 HK-2 均购自中国科学院上海细胞库。用含 10% 胎牛血清及双抗(青霉素和链霉素各 $100\ \mu\text{L}$)的 RPMI 1640 培养基,在 37°C 、5% CO_2 条件下常规培养、传代。选择对数生长期的细胞进行后续实验。

MDM4 单克隆抗体、内参 GAPDH 抗体、兔抗人 IgG/辣根酶标记二抗购自 Santa Cruz 公司。MDM4 siRNA、乱序 siRNA 以及转染试剂 Lipofectamine[®] RNAiMAX 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 实时定量 PCR 检测 MDM4 mRNA

从 3 种 RCC 细胞系及 RCC 组织标本中分别提取总 RNA,检测纯度及 RNA 浓度。取 $2\ \mu\text{L}$ 逆转录, GAPDH 为内参照物。利用 SYBR Green RT-PCR Kit(QIAGEN),反应体系为 $25\ \mu\text{L}$,反转录产物 $4\ \mu\text{L}$ 为模板,进行 PCR 扩增。引物序列: MDM4 上游引物 $5'$ -TGATTGTCGAAGAACCATTTCGG'-3',下游引物 $5'$ -TGCAGGGATCAAAAAGTTTGGAG-3'; GAPDH 上游引物 $5'$ -CTGGGCTAC ACTGAGCACC-3',下游引物 $5'$ -AAGTGGTTCGTTGAGG GCA ATG-3'; PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。RT-PCR 反应条件, 95°C 5 min, 95°C 20 s, 61°C 5 min 20 s, 72°C 20 s,共 35 个循环。GAPDH 浓度用于校正扩增结果,用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算 MDM4 mRNA 相对表达量,上述实验重复 3 次。

1.4 Western blot 检测 MDM4 蛋白表达

收集 1.3 中各组细胞及组织标本分别提取蛋白,测定蛋白浓度,煮沸变性 10 min 后备用。分别取 $60\ \mu\text{g}$ 细胞蛋白及 $200\ \mu\text{g}$ 组织样品行 SDS-PAGE 电泳,转膜。封闭 2 h,加入 MDM4 兔抗人单克隆一抗(1:1 000), 4°C 孵育过夜,洗膜,加入兔抗人二抗(1:5 000),室温下孵育 1 h,显色。测定各条带的积分吸光度值,计算 MDM4 蛋白的含量,选择 GAPDH 为内参照蛋白。

1.5 MDM4 siRNA 细胞转染

PBS 洗涤细胞 2 次,并加入 Opti-MEM[®] I 低血清培养基;分别稀释 Lipofectamine[®] RNAiMAX 和 MDM4 siRNA,然后二者等体积混合,并室温孵育 5 min;将上述 siRNA-脂质体复合物加入细胞培养体系,同时设乱序 siRNA 作为对照, 37°C 、5% CO_2 培养 6 h;用 1640 全培养基换液后,继续培养 30 h;回收细胞进行转染效率检测,或者继续加入刺激试剂进行后续研究。

1.6 细胞增殖测定

MTT 检测细胞存活率,对细胞进行消化和清洗后接种在 96 孔板中,平均 2×10^4 个/孔,培养过夜,然后暴露于与 MDM4 siRNA 24 h,MTT 工作液为 $0.5\ \text{mg/ml}$ MTT 液/PBS 在 37°C 培养箱孵育 4 h,然后以 DMSO 代替。用化学发光酶标仪(MRX[®] II Absorbance Reader, USA)在 490 nm 波长处测定其吸光度(OD)值。

1.7 细胞迁移和侵袭

采用 Transwell 小室($8\ \mu\text{m}$ 孔径, Millipore, USA)和 Matrigel 胶(BD Biosciences, 美国)测定细胞迁移和侵袭能力。膜的上层涂有 Matrigel 用于侵袭测定。进行侵袭实验时,Transwell 小室置于 24 孔板和涂有 $30\ \mu\text{L}$ Matrigel 胶(BD, USA)在 37°C 孵育 40 min。转染 24 h 后,在无血清培养基中以 1×10^5 个/ml 接种到上室,含 10% 血清的培养基置入下室作为趋化因子。48 h 后,用棉签移除膜上层的细胞,将侵入下室的细胞 4% 多聚甲醛固定、染色,用倒置显微镜在 $100 \times$ 下观察穿过滤膜的细胞,随机选择 5 个视野计数,取平均值进行分析。

1.8 统计学方法

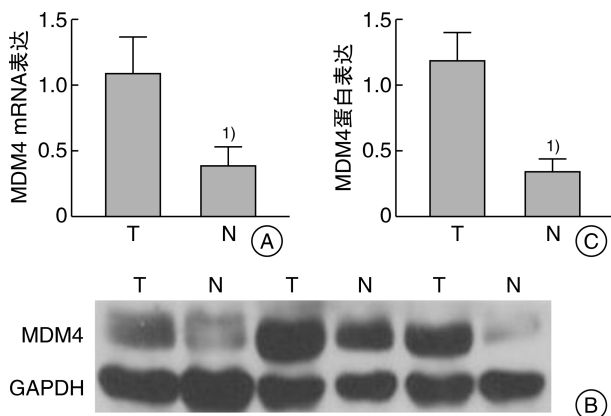
采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,连续变量数据表达为 $\bar{x} \pm s$,利用 Student *t*、方差分析比较组间差异。应用卡方检验和确切概率法进行分析 MDM4 表达与临床病理的相关性分类变量比较比率。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RCC 组织中 MDM4 表达升高

实时定量 PCR 结果显示,与癌旁组织比较,RCC 组织 MDM4 mRNA 表达显著增强($P <$

0.01),见图 1A。进一步 Western blot 分析显示: RCC 组织中 MDM4 蛋白表达也明显上调($P < 0.01$),见图 1B。灰度值分析结果显示二者差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1C。



A:MDM4 mRNA 表达;B:MDM4 蛋白表达;C:灰度值分析。与癌旁组织比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。N 为癌旁组织,T 为肿瘤组织。

图 1 MDM4 mRNA 和蛋白在 RCC 组织及癌旁组织中的表达(相对 GAPDH 的表达水平)

2.2 MDM4 mRNA 表达与 RCC 患者临床病理特征的相关性

MDM4 mRNA 表达水平以中位数为界分为低表达和高表达组。统计学分析显示,MDM4 mRNA 表达水平与患者的 TNM 分期和远隔转移相关,而与性别、年龄等临床资料之间无明显相关性($P > 0.05$),见表 1。

表 1 MDM4 mRNA 表达与 RCC 患者临床病理特征的相关性分析 例, $\bar{x} \pm s$

临床病理特征	低表达 (n=42)	高表达 (n=40)	P 值
年龄/岁	54.6±12.1	53.6±13.4	0.84
女/男	14/28	11/29	0.39
肿瘤大小/cm	5.27±2.01	4.76±2.44	0.112
远隔转移			0.007
否	40	36	
是	2	4	
TNM 分期			0.005
I	29	22	
II	3	4	
III	8	10	
IV	2	4	

2.3 RCC 细胞中 MDM4 表达水平

为了解肿瘤细胞系中 MDM4 的表达情况,我们进一步检测了 3 种 RCC 细胞系 ACHN、786-O

和 OSRC-2 中 MDM4 的蛋白表达水平。结果显示:3 种细胞中 MDM4 蛋白表达 ACHN 升高最明显(图 2)。因此,后续细胞实验使用 ACHN 细胞进行。

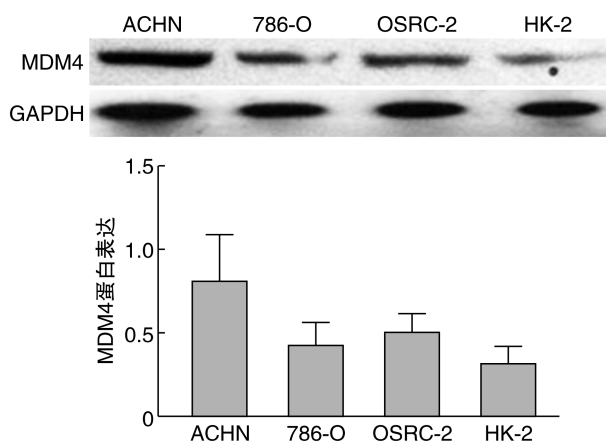
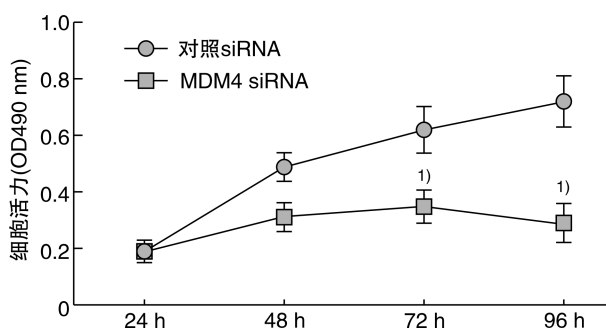


图 2 MDM 蛋白在 RCC 细胞系及正常肾小管上皮细胞 HK-2 中的表达情况(相对 GAPDH 的表达水平)

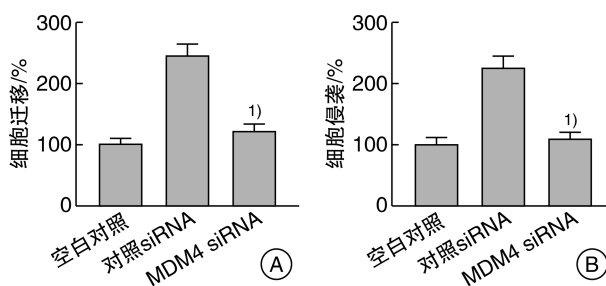
2.4 沉默 MDM4 抑制 RCC 细胞增殖、迁移和侵袭

我们进一步研究了抑制 MDM4 对 RCC 细胞增殖的影响。结果显示,沉默 MDM4 抑制 RCC 细胞 ACHN 增殖($P < 0.01$),见图 3。同时,沉默 MDM4 抑制 RCC 细胞迁移和侵袭($P < 0.01$),见图 4。



与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

图 3 沉默 MDM4 抑制 RCC 细胞 ACHN 增殖



A:细胞迁移;B:细胞侵袭。与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

图 4 沉默 MDM4 抑制 RCC 细胞 ACHN 迁移和侵袭

3 讨论

目前,众多研究均表明 RCC 对化疗药物极为抵抗,对放疗反应性也比较低,对免疫治疗有一定疗效,所以当前治疗仍以手术治疗为主。基因靶向治疗不以杀伤肿瘤细胞为目的,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,特异性作用于肿瘤细胞,阻断其生长。转移或诱导其凋亡。因此,近年来大量研究方向均集中于分子靶向治疗^[11]。

本研究表明,RCC 患者的 MDM4 表达水平上调可能与其恶性特征相关。此外,我们体外细胞学实验提示 MDM4 表达上调可能与 RCC 转移有关。这些结果表明,MDM4 在 RCC 转移和侵袭性中起关键作用,抑制 MDM4 有望作为改善 RCC 患者预后的新策略,为临床治疗带来研究的新方向。

目前的研究资料表明 MDM4 与多种肿瘤进展和预后有关,但是 MDM4 在 RCC 表达的临床意义尚不清楚。高水平 MDM4 表达抑制 p53 活性并增强其在急性骨髓性白血病中的半衰期^[12]。Zhou 等^[13]的研究报道表明 MDM4 rs4245739 多态性导致食管鳞状细胞癌的易感性,抑制 miRNA 介导的基因调控可能改变癌症风险。Bao 等^[14]的研究发现 MDM4 在胃癌中显著过表达,MDM4 高表达与年龄、淋巴结转移状态、病理分期显著相关。Ach 等^[15]的报道也显示 MDM4 畸变与唾液腺癌的淋巴结转移相关。我们的结果与以前的研究一致,表明高 MDM4 表达与肿瘤转移相关。

在本研究中,我们不仅检测到 RCC 组织和 RCC 细胞系 MDM4 表达增高,也发现了 MDM4 表达水平与 RCC 病理 TNM 分期和远隔转移相关。体外研究的数据表明 ACHN 细胞高表达 MDM4 促进了 RCC 肿瘤细胞的增殖和侵袭,而 MDM4 潜在的分子机制有待进一步阐明。

综上所述,MDM4 表达与 RCC 的恶性特征及癌细胞增殖、迁移和侵袭能力密切相关,本研究结果有助于增加我们对 RCC 细胞转移的认识,为进一步探索治疗 RCC 的新靶点和策略提供依据。

[参考文献]

- 1 Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- 2 Bhatt J R, Finelli A. Landmarks in the diagnosis and treatment of renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Urol*,

- 2014, 11(9): 517-525.
- 3 Rini B I, Campbell S C, Escudier B. Renal cell carcinoma [J]. *Lancet*, 2009, 373(9669): 1119-1132.
- 4 何韬,李一帆,金露,等. miR-30 a-5 p 在肾癌中的表达分析及临床意义研究 [J]. *临床泌尿外科杂志*, 2016, 32(3): 215-219.
- 5 Hollingsworth J M, Miller D C, Daignault S, et al. Five-year survival after surgical treatment for kidney cancer: a population-based competing risk analysis [J]. *Cancer*, 2007, 109(9): 1763-1768.
- 6 Nguyen M M, Gill I S, Ellison L M. The evolving presentation of renal carcinoma in the United States: trends from the Surveillance, Epidemiology, and End Results program [J]. *Urol*, 2006, 176(6 Pt 1): 2397-2400.
- 7 Jonasch E, Gao J, Rathmell W K. Renal cell carcinoma [J]. *BMJ*, 2014, 349: g4797.
- 8 Karni-Schmidt O, Lokshin M, Prives C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 11: 617-644.
- 9 Cao L, Fan L, Xu W, et al. Targeting MDM4 as a Novel Therapeutic Approach for Hematologic Malignancies [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015, 15(9): 769-780.
- 10 Kim S P, Alt A L, Weight C J, et al. Independent validation of the 2010 American Joint Committee on Cancer TNM classification for renal cell carcinoma: results from a large, single institution cohort [J]. *Urol*, 2011, 185(6): 2035-2039.
- 11 宫满成,董文静,丘少鹏,等. OIP5 基因在肾癌中的表达及作用 [J]. *临床泌尿外科杂志*, 2017, 32(6): 462-466.
- 12 Tan B X, Khoo K H, Lim T M, et al. High Mdm4 levels suppress p53 activity and enhance its half-life in acute myeloid leukaemia [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(4): 933-943.
- 13 Zhou L, Zhang X, Li Z, et al. Association of a genetic variation in a miR-191 binding site in MDM4 with risk of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64331.
- 14 Bao J, Nanding A, Song H, et al. The overexpression of MDM4: an effective and novel predictor of gastric adenocarcinoma lymph node metastasis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(41): 67212-67222.
- 15 Ach T, Schwarz-Furlan S, Ach S, et al. Genomic aberrations of MDM2, MDM4, FGFR1 and FGFR3 are associated with poor outcome in patients with salivary gland cancer [J]. *Oral Pathol Med*, 2016, 45(7): 500-509.

(收稿日期: 2018-01-28)