

miR-25 靶向作用 FBXO33 在肾透明细胞癌 凋亡及预后的相关实验研究*

和新盈^{1,2}, 王书文¹, 李宇³, 张冠军¹ (1. 西安交通大学第一附属医院病理科, 西安 710061;

2. 西安医学院病理教研室, 西安 710061; 3. 陕西省人民医院放疗科, 西安 710068)

摘要:目的 探索 miR-25 与 FBXO33 在肾透明细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)中的相关性, 并分析其与肾癌细胞凋亡及预后的关系。方法 从肿瘤基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库中获取 1998~2013 年 511 例 RCC 芯片数据, Pearson 检验分析 miR-25 和 FBXO33 表达的相关性; 检测 miR-25 对构建的 FBXO33 3'UTR 野生型、突变型及空白对照荧光素酶报告基因中荧光素表达的影响; CCK8 法检测瞬转 miR-25 mimic, siRNA 及对照序列对 RCC 细胞活力的影响; 流式细胞术检测瞬转 miR-25 mimic, siRNA 及对照序列对 RCC 细胞凋亡的影响; TCGA 数据库中筛选出 miR-25 与 FBXO33 表达负相关且具有随访的 58 例患者, 分为 miR-25 低表达联合 FBXO33 高表达组($n=34$)和 miR-25 高表达联合 FBXO33 低表达组($n=24$)进行生存分析, 采用 Log-rank 检验和 Gehan-Breslow-Wilcoxon 检验。结果 RCC 组织中 FBXO33 与 miR-25 表达负相关($r=-0.1611$, Pearson 检验)。与空白对照组相比, miR-25 可降低野生型组 RLU 至 $80.2\% \pm 2.6\%$, 差异具有统计学意义($t=6.539$, $P=0.006$); 而突变序列组 RLU 为空白对照组的 $103.5\% \pm 8.4\%$, 差异不具有统计学意义($t=0.0413$, $P=0.9684$)。72 h 细胞活力与空白对照组相比, miR-2 siRNA 组提高 $32.7\% \pm 3.5\%$, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 而 miR-25 mimic 组降低 $23.3\% \pm 1.7\%$, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。mimic-miR-25-3p 与其对照组比较, 早期凋亡率降低(8.83 ± 0.09 vs 12.83 ± 0.14), 差异具有统计学意义($t=42.17$, $P=0.005$); 晚期凋亡率轻度升高(0.41 ± 0.10 vs 0.33 ± 0.15), 差异无统计学意义($t=0.75$, $P=0.639$); siRNA-miR-25-3p 与其对照组比较, 早期凋亡率升高(19.05 ± 1.64 vs 13.68 ± 0.78), 差异具有统计学意义($t=5.12$, $P=0.006$); 晚期凋亡率轻度降低(0.56 ± 0.10 vs 0.62 ± 0.08), 差异无统计学意义($t=0.83$, $P=0.376$)。miR-25 低表达同时 FBXO33 高表达患者($n=34$)与 miR-25 高表达而 FBXO33 低表达者($n=24$)相比生存率更高, 差异具有统计学意义(采用 Log-rank 检验 $P=0.0252$, 采用 Gehan-Breslow-Wilcoxon 检验 $P=0.0049$)。结论 miR-25 可抑制肾癌 FBXO33, 提高细胞活性, 抑制凋亡而降低患者预后。

关键词: miR-25; FBXO33; 肾透明细胞癌; 细胞凋亡; 预后

中图分类号: R737.11; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)01-038-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.011

Study on the Relationship of MiR-25 Targeting FBXO33 with Cell Apoptosis and Prognosis in Renal Cell Carcinoma

HE Xin-ying^{1,2}, WANG Shu-wen¹, LI Yu³, ZHANG Guan-jun¹ (1. Department of Pathological

Section, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

2. Pathological Staff Room, Xi'an Medical College, Xi'an 710061, China;

3. Department of Radiotherapy, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation between miR-25 and FBXO33 in renal cell carcinoma (RCC), and to analyze the relationship with apoptosis and prognosis of renal cell carcinoma. **Methods** The 511 RCC chip results, from 1998 to 2013, were downloaded from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and were analyzed for the correlation between miR-25 and FBXO33 by Pearson test. The expression of luciferase were detected with the FBXO33 3'UTR wild-type, mutant and blank control luciferase reporter gene treated by miR-25. The viability of cells transiently transfected by the miR-25 mimic, siRNA and the controls were detected by CCK8 method. The apoptosis of cells transiently transfected by the miR-25 mimic, siRNA and the controls were detected by flow cytometry. 58 cases with follow-up data were screened from TCGA by expression of FBXO33 negative correlation miR-25. The survival was analyzed between low expression of miR-25 combined with FBXO33 high expression group ($n=34$) with high expression of miR-25 combined with FBXO33 low expression group ($n=24$), using Log-rank test and Gehan-Breslow-Wilcoxon test. **Results** FBXO33 was negatively correlated with miR-25 in RCC tissue ($r=-0.1611$, Pearson test). Compared with the control group, miR-25 could reduce the RLU of wild type group to $80.2\% \pm 2.6\%$, the difference was statistically significant ($t=6.539$, $P=0.006$). The RLU of mutation group was $103.5\% \pm 8.4\%$ compared with that of blank control group, the difference was not statistically significant ($t=0.0413$, $P=$

* 基金项目: 陕西省教育厅科学研究项目(12JK0699); 陕西省科学技术研究发展计划(2011JM4038)。

作者简介: 和新盈(1972-), 女, 硕士研究生, 副教授, 主要研究方向: 肿瘤分子病理, Tel: 13991831377, E-mail: hxyxiyi@163.com。

通讯作者: 张冠军, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要研究方向: 肾癌分子病理学研究及肿瘤病理诊断, E-mail: zgjdoc@163.com。

0.968 4), compared with the blank group in 72h for the cell variability, miR-25 siRNA group were elevated by 32.7% ± 3.5%, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The miR-25 mimic group were reduced by 23.3% ± 1.7%, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and compared with the control group, the early apoptosis rate was decreased in mimic-miR-25-3p group (8.83 ± 0.09 vs 12.83 ± 0.14), while the difference was statistically significant ($t = 42.17, P = 0.005$). The late apoptosis rate was slightly escalated (0.41 ± 0.10 vs 0.33 ± 0.15), while the difference was not statistically significant ($t = 0.75, P = 0.639$). Compared with the control group, the early apoptosis rate was increased in siRNA-miR-25-3p group (19.05 ± 1.64 vs 13.68 ± 0.78), while the difference was statistically significant ($t = 5.12, P = 0.006$). But the late apoptosis rate was reduced (0.56 ± 0.10 vs 0.62 ± 0.08), while the difference was not statistically significant ($t = 0.83, P = 0.376$). The survival rate was higher in patients with low expression of miR-25 combined with high expression of FBXO33 ($n = 34$) than that of miR-25 high expression combined with low expression of FBXO33 ($n = 24$), the difference was statistically significant (Log-rank test $P = 0.025 2$, Gehan-Breslow-Wilcoxon test $P = 0.004 9$). **Conclusion** MiR-25 can inhibit FBXO33 in renal cell carcinoma, improve the cell activity, inhibit apoptosis and reduce the prognosis.

Keywords: miR-25; FBXO33; renal cell carcinoma; cell apoptosis; prognosis

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)约占成人恶性肿瘤的2%~3%,其病理类型以透明细胞癌为主。约1/3的RCC患者就诊前已出现转移,约1/3的局限性RCC患者术后复发,然而目前尚无明确的RCC预后指标。研究表明microRNA与多种恶性肿瘤的发生及发展密切相关。在肾癌中也发现多种miRNA异常表达,且与细胞凋亡相关^[1]。miR-25可通过下调MOAP1表达调节三阴性乳腺癌细胞增殖和凋亡^[2],然而miR-25在肾癌中的作用国内尚无研究报道。FBXO是泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)中E3连接酶SCF(SKPI1-CUL1F-box)复合体的接头蛋白,负责特异性识别底物^[3]。改造FBXO33可影响垂体瘤的发生、增殖和转移^[4]。然而暂无FBXO33在RCC中的研究。因此,本研究将通过探索分析miR-25与FBXO33在RCC中的相关性,检测与细胞凋亡和预后的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象 786细胞株购自中科院上海细胞所,经DMEM驯服。肿瘤基因图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库中RCC样本收集自1998~2013年所有分期肾癌患者作为表达及预后分析对象,排除严重并发症。

1.2 试剂和仪器 pGL3野生型FBXO33 3'-UTR(WT)和pGL3突变型FBXO33 3'-UTR(MT)荧光素质粒购于Addgene(Cambridge, MA), pGL3 control载体(Promega), Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司)。双荧光素酶基因检测报告试剂盒(北京威格拉斯公司), CCK8细胞增殖与毒性检测试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司), Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(珠海健康元生物医药有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 数据分析:从TCGA网站(<https://cancergenome.nih.gov/>)下载相应数据,将样本名称

与随访结果以及表达量中的样本名称进行匹配,进而得到相应的分析结果。

1.3.2 荧光素酶报告基因检测:试验重复次数 $N = 3$, miR-25-3p+Glo为空白对照组, miR-25-3p+FBXO33 W为实验组, miR-25-3p+FBXO33 M为突变序列对照组。细胞于六孔板中培养(5×10^5 cells/well), 24 h后,使用Lipofectamine 2000转染入Glo载体(Promega), FBXO33 W载体和FBXO33 M载体,分别对应对照组、野生型组和突变型组。具体方法按试剂盒说明书进行。

1.3.3 miR-25表达调控:使用Lipofectamine 2000将miR-25 siRNA及相应无义序列, miR-25 mimic及无义序列载入986细胞,分别对应siRNA-miR-25-3p组, siRNA-con组, mimic-miR-25-3p组和mimic-con组。具体瞬转方法按试剂盒说明书进行。

1.3.4 CCK8检测细胞活力:将转染后的siRNA组, siRNA-con组, mimic组和mimic-con组细胞调整细胞密度接种于96孔板,每孔种约3000个细胞,设对照组和实验组,每组设3个复孔,置于细胞培养箱中培养,24 h后转染质粒。在转染24, 48, 72 h后从培养箱取出,每孔100 μ l培养液中加入10 μ l CCK8试剂,检测过程按照试剂盒说明书进行。

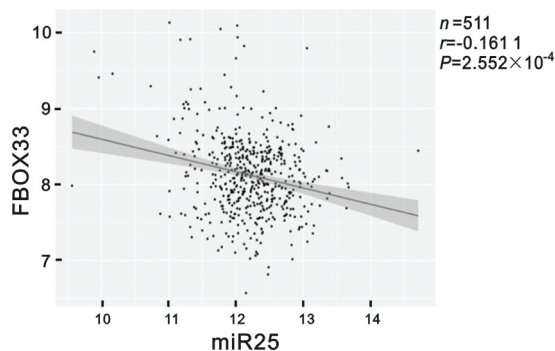
1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡:取指数生长期的siRNA-miR-25-3p组, siRNA-con组, mimic-miR-25-3p组和mimic-con组细胞,常规消化制备成浓度为 2×10^6 个/ml单细胞悬液。检测过程按照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学分析 采用统计学软件SPSS 19,所有数据均经统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间采用 t 检验行差异显著性分析($P < 0.05$)。表达相关性分析采用Pearson检验。生存分析采用Log-rank检验和Gehan-Breslow-Wilcoxon检验。

2 结果

2.1 miR-25 与 FBXO33 在肾癌中表达负相关

从TCGA数据库获取511例RCC样本数据分析发现,miR-25和FBXO33表达具有负相关性。见图1。



注:直线示线性相关性,阴影为95%可信区间。

图1 TCGA数据库中人透明细胞肾癌 miRNA-25,FBXO33 表达相关性分析

2.2 FBXO33 是 miR-25 作用靶点蛋白 通过数据库查询发现 miR-25 可作用于 FBXO33 3'UTR 的 TGCAAT 序列。采用 miR-25-3p 作为 miR-25 的代表序列,通过构建的 FBXO33 3'UTR 荧光素酶报告基因。结果发现,具有 FBXO33 3'UTR 靶点序列的实验组 RLU 为空白对照组的 $80.2\% \pm 2.6\%$,差异具有统计学意义($t=6.539$, $P=0.006$);而突变序列对照组 RLU 为空白对照组的 $103.5\% \pm 8.4\%$,差异不具有统计学意义($t=0.0413$, $P=0.9684$)。

表1 miR-25 促进 RCC 细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s$)

组别	mimic-con	mimic-miR-25-3p	P	siRNA-con	siRNA-miR-25-3p	P		
Early apoptosis	12.83 ± 0.14	8.83 ± 0.09	42.17	0.005	13.68 ± 0.78	19.05 ± 1.64	5.12	0.006
Late apoptosis	0.33 ± 0.15	0.41 ± 0.10	0.75	0.639	0.62 ± 0.08	0.56 ± 0.10	0.83	0.376

注:重复次数 N=3,实验组与对照组(control)比较,采用 t 检验。

3 讨论 肾癌是泌尿系最常见恶性肿瘤之一,其发病率约为全身恶性肿瘤的 $2\% \sim 3\%$,其中 80% 以上为源于肾近曲小管的肾透明细胞癌,并且以每年 2% 的速度递增^[6]。近年来,研究表明 microRNA 与多种恶性肿瘤的发生及发展密切相关。在肾癌中,也发现多个 miRNA 表达的异常,包括 miR-335,miR-134,miR-21 等^[6,7],miR-193 可作为肾癌早期诊断指标^[8]。而本研究为国内首次探索 miR-25 与肾癌细胞凋亡及预后的关系,miR-25 在其它肿瘤中已证实可作为预后指标^[9]。

FBXO 是泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system,UPS)中 E3 连接酶复合体的接头蛋白,负责特异性识别底物^[10]。既往研究发现,FBXO31 与胃癌预后特征具有相关性^[11],而

2.3 miR-25 可调控肾癌细胞活力与凋亡

在 786 细胞中检测调控 miR-25 对细胞活力的影响。转染入 miR-25 siRNA 的细胞与转入空白对照序列的细胞比较,72 h 细胞活力提高 $32.7\% \pm 3.5\%$,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。转染入 miR-25 mimic 的细胞与转入相应空白对照序列的细胞比较,72h 细胞活力降低 $23.3\% \pm 1.7\%$,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。流式细胞术检测调控 miR-25 对 786 细胞凋亡的影响。抑制 miR-25 可显著诱导 RCC 细胞凋亡比例升高,而提高 miR-25 表达则凋亡降低,见表 1。

2.4 miR-25 及 FBXO33 影响肾癌患者预后 低表达而 FBXO33 高表达者较 miR-25 高表达而 FBXO33 低表达者具有更佳的生存获益,差异具有统计学意义(见图 2, $P=0.0252, 0.0049$)。

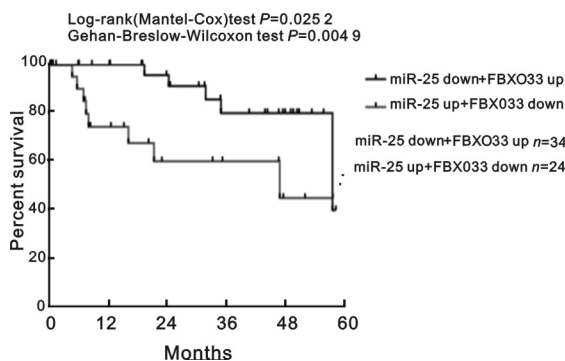


图2 miR-25 与 FBXO33 联合分组 RCC 生存曲线

FBXO32 则在食管癌中与病理特征相关^[12]。然而 FBXO33 为 FBXO 家族新近发现的成员。FBXO33 与典型 FBXO 蛋白不同,其 C 端无 LRR 序列或 WD40 配体,而其 N 端存在 YB-1 突变。因此,其具体功能可能与其它成员存在差异。既往研究发现 FBXO33 与垂体瘤的发生、增殖和转移具有相关性^[13,14],而本研究为 FBXO33 在肾癌中的首例研究,并证实了其作为 miR-25 的作用靶点参与肾癌细胞凋亡及预后的影响。

本研究预后分析采用了单因素分析方法,尚需要通过与多种临床主要影响因素进行对比分析后,方能明确 FBXO33 或 miR-25a 是否为肾癌独立预后因素。且该标本来自于国际数据库,其与我国人种及环境差异是否影响结果,尚需要(下转 44 页)

(上接 40 页)后续在国内患者标本中的研究进行验证。

参考文献:

- [1] Yu HS, Liu ZM, Yu XY, et al. Low-dose radiation induces antitumor effects and erythrocyte system hormesis[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2013, 14(7): 4121-4126.
- [2] 梁亮, 张寅斌, 马宇光, 等. miR-25 对三阴性乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响及潜在机制[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(20): 3197-3201.
Liang L, Zhang YB, Ma YG, et al. The effect of miR-25 on proliferation and apoptosis of triple negative breast cancer cells and the potential mechanism[J]. Modern Oncology, 2016, 24(20): 3197-3201.
- [3] Xie CM, Wei W, Sun Y. Role of SKP1-CUL1-F-Box-Protein (SCF) E3 ubiquitin ligases in skin cancer[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2013, 40(3): 97-106.
- [4] Wei C, Liu J, Yu Z, et al. TALEN or Cas9-rapid, efficient and specific choices for genome modifications[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2013, 40(6): 281-289.
- [5] Mo Z, Zu X, Xie Z, et al. Antitumor effect of F-PBF (beta-TrCP)-induced targeted PTTG1 degradation in HeLa cells[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 139(1): 6-11.
- [6] Hudes GR, Carducci MA, Choueiri TK, et al. NCCN task force report: optimizing treatment of advanced renal cell carcinoma with molecular targeted therapy[J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2011, 9(Suppl 1): S1-29.
- [7] Faragalla H, Youssef YM, Scorilas A, et al. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma[J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2012, 14(4): 385-392.
- [8] 唐海霞, 王成, 路美玲, 等. 肾透明细胞癌患者血清 miR-193a-3p 水平增加及早期诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 43-45, 49.

- Tang HX, Wang C, Lu ML, et al. Elevated serum miR-193a-3p level in renal clear cell carcinoma and its early clinical value[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3): 43-45, 49.
- [9] 王静, 王成, 张春妮. 血清 miR-25 和 miR-100 作为食管鳞状细胞癌诊断和预后标志物研究[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(5): 17-21.
Wang J, Wang C, Zhang CN. Study on serum miR-25 and miR-100 as diagnostic and prognostic markers for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(5): 17-21.
- [10] Xie CM, Wei W, Sun Y. Role of SKP1-CUL1-F-Box-Protein (SCF) E3 ubiquitin ligases in skin cancer[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2013, 40(3): 97-106.
- [11] 田钰, 杨桂芳. FBXO31, Cyclin D1 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 武汉大学学报(医学版), 2014, 05: 707-709, 732.
Tian Y, Yang GF. The expression of FBXO31 and Cyclin D1 in gastric cancer and its clinical significance[J]. Journal of Hubei Medical University (Medical Edition), 2014, 35(5): 707-709, 732.
- [12] 张明慧, 郭炜, 董稚明, 等. 食管鳞状细胞癌中 FBXO32 基因表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(6): 632-636.
Zhang MH, Guo W, Dong ZM, et al. Expression of FBXO32 in esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2013, 29(6): 632-636.
- [13] Wei CX, Liu JY, Yu ZS, et al. TALEN or Cas9-Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2013, 40(6): 281-289.
- [14] Mo Z, Zu X, Xie Z, et al. Antitumor effect of F-PBF (beta-TrCP)-induced targeted PTTG1 degradation in HeLa cells[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 139(1): 6-11.

收稿日期: 2016-11-05

修回日期: 2016-12-08