

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.005

· 基础研究 ·

miR-124通过调节 Jagged1/Notch 信号通路影响肾细胞癌 OS-RC-2 细胞的恶性生物学行为

张炜, 胡志, 付桥, 孙伟, 徐律, 褚浩, 王潇, 张志超(武汉市第三医院 泌尿外科, 湖北 武汉 430074)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-124 通过调节 Jagged1 (JAG1)/Notch 信号通路对肾细胞癌(RCC)细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。**方法:** 收集 2018 年 6 月至 2021 年 10 月在武汉市第三医院治疗的 38 例 RCC 患者的 RCC 组织和癌旁组织标本, 并体外培养 RCC 细胞(Caki-2、A498、ACHN、786-O、OS-RC-2)和人正常肾细胞(293T), 采用免疫组织化学法、qPCR 和 WB 法检测 miR-124 和 JAG1 蛋白在 RCC 组织和细胞中的表达水平。选择 miR-124 表达与 293T 细胞差异最大的 OS-RC-2 细胞进行转染, 按转染物不同分为 Control 组、NC mimic 组、miR-124 mimic 组、miR-124 mimic+pcDNA 组和 miR-124 mimic+pc-JAG1 组。采用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-124 与 JAG1 的关系; qPCR 法检测 miR-124、JAG1 mRNA 表达; 免疫组化法分析 JAG1 蛋白表达; WB 法检测 JAG1、凋亡相关蛋白(cleaved caspase-3、BAX 和 Bcl2)和 Notch 信号通路相关蛋白(NICD、HES1 和 HES5)的表达; MTT 法检测 OS-RC-2 细胞增殖; Transwell 检测 OS-RC-2 细胞迁移和侵袭; 流式细胞术检测 OS-RC-2 细胞凋亡。**结果:** 与癌旁组织比较, RCC 组织中 miR-124 表达降低, JAG1 mRNA 和蛋白表达均升高(均 $P < 0.01$); 与 293T 细胞比较, Caki-2、A498、ACHN、786-O、OS-RC-2 细胞中 miR-124 水平降低, JAG1 mRNA 和蛋白表达均升高(均 $P < 0.05$); miR-124 直接负调控 JAG1。与 Control 组和 NC mimic 组比较, miR-124 mimic 组 miR-124 表达水平、细胞凋亡率以及 cleaved caspase-3 和 BAX 蛋白表达均升高, JAG1 mRNA 和蛋白表达均降低, 细胞活力(24、48、72 h)下降, 迁移、侵袭细胞数减少, Bcl2 及 NICD、HES1、HES5 蛋白表达降低(均 $P < 0.05$); 与 miR-124 mimic+pcDNA 组和 miR-124 mimic 组相比, miR-124 mimic+pc-JAG1 组 miR-124 表达水平、细胞凋亡率以及 cleaved caspase-3 和 BAX 蛋白表达均降低, JAG1 mRNA 和蛋白表达均升高, 细胞活力(24、48、72 h)增加, 迁移、侵袭细胞数增多, Bcl2 及 NICD、HES1、HES5 蛋白表达均增加(均 $P < 0.05$)。**结论:** miR-124 通过下调 JAG1 抑制 Notch 信号通路, 降低 RCC OS-RC-2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 促进细胞凋亡。

[关键词] miR-124; Jagged1/Notch 信号通路; 肾细胞癌; OS-RC-2 细胞; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.11; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)08-0732-09

miR-124 affects malignant biological behaviours of renal cell carcinoma OS-RC-2 cells by regulating the Jagged1/Notch signaling pathway

ZHANG Wei, HU Zhi, FU Qiao, SUN Wei, XU Lü, CHU Hao, WANG Xiao, ZHANG Zhichao (Department of Urology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430074, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of miR-124 on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of renal cell carcinoma (RCC) cells by regulating the Jagged1 (JAG1)/Notch signaling pathway. **Methods:** The RCC tissues and paracancerous tissues of 38 RCC patients treated in Wuhan Third Hospital from June 2018 to October 2021 were collected, and RCC cells (Caki-2, A498, ACHN, 786-O, OS-RC-2) and human normal kidney cells (293T) were cultured *in vitro*. The expression levels of miR-124 and JAG1 proteins in RCC tissues and cells were detected by immunohistochemistry, qPCR and WB assay. OS-RC-2 cells, which had the greatest difference in expression of miR-124 with that of 293T cells, were selected for transfection and divided into control group, NC mimic group, miR-124 mimic group, miR-124 mimic+pcDNA group and miR-124 mimic+pc-JAG1 group according to the difference in transfectants. The relationship between miR-124 and JAG1 was verified by dual-luciferase reporter gene experiments; the expressions of miR-124 and JAG1 mRNA were detected by qPCR; the protein expression of JAG1 was analyzed by immunohistochemistry method; WB assay was performed to measure the expressions of JAG1, apoptosis-related proteins (cleaved caspase-3, BAX, Bcl2) and Notch signaling pathway-related proteins (NICD, HES1 and HES5); MTT method was performed to measure the proliferation of OS-RC-2 cells; Transwell assay was performed to measure the migration and invasion of OS-RC-2 cells;

[基金项目] 武汉市医学科研项目资助(No. WX21B04)

[作者简介] 张炜(1972—),男,硕士,副主任医师,主要从事泌尿系肿瘤相关研究, E-mail: vonbasten@163.com

[通信作者] 胡志, E-mail: huzhi_2002@163.com

and flow cytometry was performed to measure the apoptosis of OS-RC-2 cells. **Results:** Compared with paracancerous tissues, the expression of miR-124 in RCC tissues decreased, and the expressions of JAG1 mRNA and protein increased (all $P < 0.01$); compared with 293T cells, the levels of miR-124 decreased while the expressions of JAG1 mRNA and protein increased in Caki-2, A498, ACHN, 786-O and OS-RC-2 cells (all $P < 0.05$); miR-124 directly negatively regulated JAG1. Compared with the Control group and the NC mimic group, the expression level of miR-124, the apoptosis rate and the expressions of cleaved caspase-3 and BAX proteins in the miR-124 mimic group increased; the expressions of JAG1 mRNA and protein decreased; the cell viability (24, 48, 72 h) decreased; the numbers of migrating and invasive cells decreased; the expressions of Bcl2 and NICD, HES1, HES5 proteins decreased (all $P < 0.05$). Compared with the miR-124 mimic+pcDNA group and the miR-124 mimic group, the expression level of miR-124, the apoptosis rate and the expressions of cleaved caspase-3 and BAX proteins in the miR-124 mimic+pc-JAG1 group decreased; the expressions of JAG1 mRNA and protein increased; the cell viability (24, 48, 72 h) increased; the numbers of migrating and invasive cells increased and the expressions of Bcl2 and NICD, HES1, HES5 proteins increased (all $P < 0.05$). **Conclusion:** miR-124 reduced the proliferation, migration and invasion abilities of RCC OS-RC-2 cells and promoted apoptosis by downregulating JAG1 and inhibiting the Notch signaling pathway.

[Key words] miR-124; Jagged1/Notch signaling pathway; renal cell carcinoma (RCC); OS-RC-2 cell; proliferation; apoptosis; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(8): 732-740. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.005]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是肾原发肿瘤的主要类型^[1],在泌尿系统肿瘤中其发病率较高^[2]。由于放化疗效果不理想,手术切除是RCC的主要治疗方法,但其术后复发率高达20%~40%^[3]。因此,全面了解肿瘤进展的潜在分子机制有助于寻找RCC诊断和治疗的新模式。微小RNA(microRNA, miRNA)及其靶基因在细胞发育、增殖、凋亡、迁移和侵袭等许多生物学过程中发挥着重要作用。其中miR-124在肝癌^[4]和RCC^[5]等多种癌症细胞中均表达下调。在RCC中,miR-124的低表达与RCC的组织学分级、临床分期及淋巴结转移有关^[6]。此外,miR-124也被证实能够通过靶向HDAC4抑制RCC细胞的自噬而增强顺铂敏感性^[7]。Jagged1(JAG1)作为Notch配体,广泛表达于哺乳动物的多个组织和发育阶段,可间接激活Notch信号通路。JAG1/Notch通路可激活多种致癌因子,调节多种细胞功能^[8]。本课题组利用生物信息学软件预测miR-124与JAG1之间可能存在靶向关系,由此推测miR-124对RCC的抑制作用可能与JAG1有关。为此,本研究通过上调miR-124表达,观察其对RCC恶性生物学行为的影响,并进一步探讨其与JAG1/Notch通路的调控关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2018年6月至2021年10月在武汉市第三医院行根治性手术治疗的38例RCC患者的RCC组织和癌旁组织(距离肿瘤边缘4 cm处取材)标本。手术切除后,样本立即被冷冻在液氮中,并在-80℃保存以供分析。所有组织标本均用福尔马林固定,石蜡包埋。纳入标准:(1)所有患者在手术前均未接受过任何形式的辅助治疗;(2)经2017第8版国际抗癌联盟标准诊断为RCC;(3)签署知情同意书。排除标

准:术前曾接受放疗、化疗、免疫治疗的患者。

38例患者根据2005国际泌尿病理协会的诊断标准划分:1级11例、2级13例、3级8例、4级6例。本研究获武汉市第三医院伦理委员会批准(批号:2018-0419)。

1.2 细胞与试剂及仪器

RCC细胞(Caki-2、A498、ACHN、786-O、OS-RC-2)和人正常肾细胞(293T)均购自北纳生物公司。RPMI 1640培养基、胎牛血清购自武汉尚恩生物技术有限公司,青霉素-链霉素购自上海源叶生物科技有限公司,miR-124 mimic、NC mimic、miR-124 inhibitor、NC inhibitor、pcDNA和pc-JAG1均购自上海GenePharma有限公司,Lipofectamine 2000试剂盒购自北京诺为生物技术有限公司,TRIzol、SYBR Green I PCR Master Mix购自北京优尼康生物科技有限公司,miRNeasy Mini Kit购自杭州沃森生物技术有限公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒、MTT试剂盒均购自北京百奥莱博科技有限公司,兔源一抗JAG1、cleaved caspase-3、BAX、Bcl2、NICD、HES1、HES5、GAPDH单抗及辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG二抗均购自美国Abcam公司。Nanodrop 2000微量紫外分光光度计购自深圳市瑞盛科技有限公司,ABI PRISM 7500 real-time PCR System购自上海智岩科学仪器有限公司,Bio-rad Gel Doc EZ成像仪购自上海艾研生物科技有限公司仪器部;多功能酶标仪购自珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司,Transwell小室购自上海未熹生物科技有限公司,Annexin V凋亡检测试剂盒购自上海生工生物公司,流式细胞仪购自碧迪医疗器械(上海)有限公司。

1.3 免疫组化法检测JAG1在RCC组织中的表达

免疫组化采用标准技术进行。4 μm石蜡包埋组织切片在二甲苯中脱蜡,在分级醇中再水化。室温

下加入3%过氧化氢反应5 min,内源性过氧化物酶被阻断。蒸馏水冲洗后,将组织切片放入10 mmol/L柠檬酸缓冲液(pH=6.0)中煮沸10 min,完成抗原回收。用5%~10%正常山羊血清反应30 min,进行非特异性蛋白结合。这些治疗与PBS冲洗交替进行。用JAG1多克隆抗体(1:500)在室温下处理1 h后用PBS漂洗5 min,重复3次,加入辣根过氧化物酶偶联二抗(1:1 000)反应10 min,再用PBS漂洗5 min,重复3次,用3,3'-二氨基联苯胺染色,用苏木精复染,然后进行透明和封片处理。最后在显微镜下观察JAG1的表达情况。阴性对照是用非免疫血清替代一抗进行的。对照切片与样品平行处理。

所有染色切片均由3位独立调查者以盲法进行评估。评分标准^[9]:染色程度:无染色(0分)、浅黄色(1分)、棕黄色(2分)、棕褐黄色(3分);阳性细胞百分数:≤5%(0分)、>5%~25%(1分)、>25%~50%(2分)、>50%~75%(3分)、>75%(4分)。两者得分乘积为最终评分标准,≤3分为阴性,>3分为阳性。

1.4 细胞培养和分组转染

将RCC细胞(Caki-2、A498、ACHN、786-O、OS-RC-2)和人正常肾细胞(293T)置于含有10%胎牛血清和青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基中,并在37℃、5% CO₂的加湿培养箱中培养。OS-RC-2细胞汇合度达90%左右时,根据Lipofectamine 2000试剂盒说明书进行转染:首先取0.8 μg质粒DNA(NC mimic、miR-124 mimic、pcDNA、pc-JAG1)和2 μL Lipofectamine 2000分别用50 μL Opti-MEM稀释,混合后静置20 min,将转染复合物置于24孔细胞板中,100 μL/孔,与细胞混合均匀后培养48 h。实验分成5组:Control组(常规培养,不转染)、NC mimic组(转染NC mimic与Lipofectamine 2000复合物)、miR-124 mimic组(转染miR-124 mimic与Lipofectamine 2000复合物)、miR-124 mimic+pcDNA组(共转染miR-124 mimic和pcDNA与Lipofectamine 2000复合物)和miR-124 mimic+pc-JAG1组(共转染miR-124 mimic和pc-JAG1与Lipofectamine 2000复合物)。qPCR法检测转染后的干扰/过表达效果。

1.5 qPCR法检测miR-124和JAG1 mRNA在RCC组织和细胞中的表达

采用TRIzol根据miRNeasy Mini Kit说明书从RCC组织和细胞中提取总RNA。RNA纯度和浓度用Nanodrop 2000测定,随后RNA在-80℃保存。将RNA反转录成cDNA。以cDNA为模板制备PCR反应体系:cDNA 5 μL,SYBR Green I PCR Master Mix 10 μL,正反向引物各0.4 μL,H₂O 4.2 μL。PCR反应采用ABI PRISM 7500 real-time PCR System,具

体的反应过程为95℃ 5 min、95℃ 20 s、59℃ 15 s,共39个循环。采用U6/GAPDH作为内参。miR-124和JAG1 mRNA的相对表达量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。所用引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列

基因	引物序列
miR-124	F:5'-ATGGTTGGTTGGTAAGGCACGCGG-3' R:5'-GCAGGGTCCGAGGTATTC-3'
U6	F:5'-TCGCTTCGGCAGCACATATAC-3' R:5'-TATGGAACGCTTCACGAATTTG-3'
JAG1	F:5'-GGGGCAACACCTTCAACCTC-3' R:5'-CCACGCCTCCACAAGCAAC-3'
GAPDH	F:5'-TCCCATCACCATCTTCCAGG-3' R:5'-GATGACCCTTTTGGCTCCC-3'

1.6 双荧光素酶报告基因实验验证miR-124和JAG1基因间的靶向关系

采用在线生物信息学预测软件TargetScan检测miR-124和JAG1的结合位点。以psiCHECK2载体为基础,psiCHECK载体图谱如图1所示。构建野生型(WT-JAG1 3'UTR)和突变型(MUT-JAG1 3'UTR)载体质粒。根据Lipofectamine 2000试剂盒的说明制备转染混合物(0.8 μg质粒DNA(NC mimic、miR-124 mimic、WT-JAG1 3'UTR、MUT-JAG1 3'UTR)和2 μL Lipofectamine 2000分别用50 μL Opti-MEM稀释后均匀混合即可得到转染混合物),并采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测37℃培养24 h后的荧光素酶活性。共转染组为NC mimic+WT-JAG1 3'UTR组、miR-124 mimic+WT-JAG1 3'UTR组、NC mimic+MUT-JAG1 3'UTR组、miR-124 mimic+MUT-JAG1 3'UTR组。

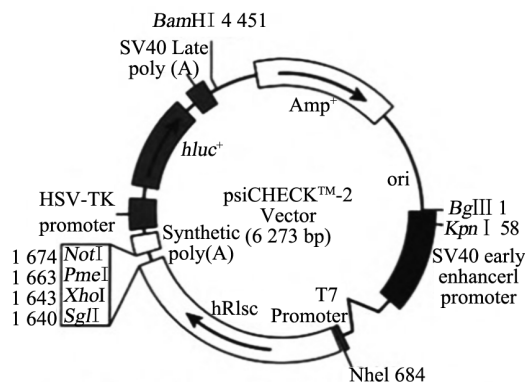


图1 psiCHECK2载体结构图

1.7 WB法检测RCC组织和细胞中相关蛋白质的表达

提取组织和细胞的总蛋白,并根据BCA试剂盒的说明测定蛋白浓度。将提取的蛋白加入样品缓冲液(30 g/孔)中,95℃加热10 min。10%聚丙烯酰胺凝胶

电泳进行蛋白分离。用 5% 牛血清白蛋白在室温下封闭聚偏氟乙烯膜 1 h。以 4 倍的比例加入一抗(1:1 000)过夜(4 °C):JAG1、cleaved caspase-3、BAX、Bcl2、NICD、HES1、HES5 和 GAPDH。然后将辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000)加入样品,室温反应 1 h,用化学发光试剂处理样品,以 GAPDH 作为内参对照。经 Bio-rad Gel Dol EZ 成像仪扫描记录。利用 ImageJ 软件对目标条带进行灰度值分析。

1.8 MTT 实验检测 miR-124 和 JAG1 过表达对 OS-RC-2 细胞增殖的影响

转染后的 OS-RC-2 细胞接种在 96 孔板上,稀释到设计浓度(5×10^3 个细胞/孔)。细胞在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 24、48 和 72 h。每孔加入 20 μ L 的 MTT(浓度 5 mg/mL),继续培养 4 h。然后小心取出孔内的培养液,各加入 150 μ L 二甲基亚砜,在摇床上缓慢震荡 10 min,待结晶全部溶解后,使用多功能酶标仪在 450 nm 波长下测量相应的光密度(D)值。根据公式计算 RCC 细胞活力:细胞活力=实验组 D 值/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。

1.9 Transwell 实验检测 miR-124 和 JAG1 过表达对 OS-RC-2 细胞迁移的影响

迁移实验:将转染后的 OS-RC-2 细胞放置在 Transwell 的上腔室,下腔室则添加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,37 °C 培养 48 h 后,取出上室,去除未迁移细胞,用 70% 甲醛固定穿膜细胞 30 min,用 0.1% 结晶紫染色穿膜细胞。倒置显微镜下捕捉迁移细胞的图像,随机选取 5 个区域计数迁移细胞。侵袭实验:操作步骤与迁移实验基本一致,只是上腔室需要预先铺满 50 mg/L 人工基膜 1:8 稀释液。

1.10 流式细胞术检测 miR-124 和 JAG1 过表达对 OS-RC-2 细胞凋亡的影响

用胰蛋白酶消化细胞并离心($400 \times g$)5 min,转染 24 h 后收集细胞,制成单细胞悬液(1×10^6 /mL)。室温下,将 100 μ L 细胞悬液注入试管中,同时将碘化丙啶与 RNase A 混合,后与细胞在 4 °C 下反应 30 min。立即采用流式细胞仪进行检测和分析,使用 Cell Quest 软件进行数据分析。

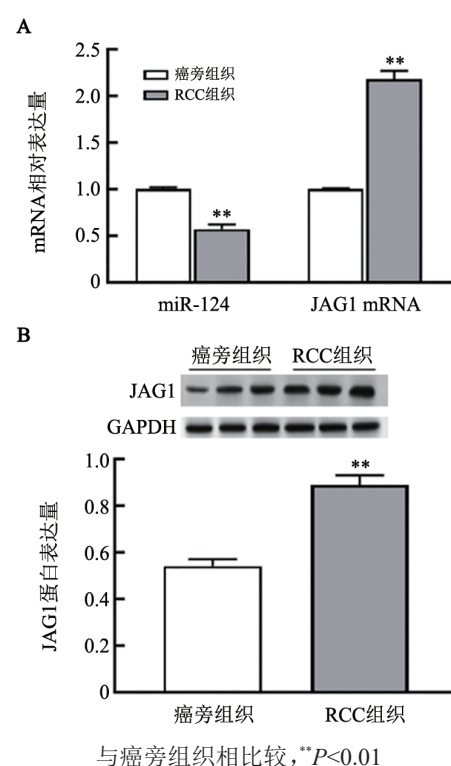
1.11 统计学处理

使用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用 *t* 检验,多组间统计分析采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RCC 组织中 miR-124 呈低表达、JAG1 呈高水平 qPCR、WB 法检测结果显示,RCC 组织中 miR-124

水平明显低于癌旁组织,JAG1 mRNA 和蛋白水平则明显高于癌旁组织(均 $P < 0.01$,图2);RCC 细胞系(Caki-2、A498、ACHN、786-O、OS-RC-2)中 miR-124 水平明显比人正常肾细胞 293T 低,JAG1 mRNA 和蛋白水平明显比人正常肾细胞 293T 高(均 $P < 0.05$),且 OS-RC-2 细胞中 miR-124 水平最低,JAG1 mRNA 和蛋白水平最高(均 $P < 0.05$,图3),因此选择 OS-RC-2 细胞进行转染实验。免疫组化检测结果(图4)显示,JAG1 染色主要存在于细胞膜和/或细胞质中。JAG1 在 RCC 组织中的阳性表达率为 92.11%(35/38),阴性表达率为 7.89%(3/38);在癌旁组织中的阳性表达率为 28.95%(11/38),阴性表达率为 71.05%(27/38),差异有统计学意义($\chi^2=31.722$, $P < 0.05$)。免疫组化评分结果显示,癌旁组织 JAG1 蛋白阳性表达评分明显低于 RCC 组织[(2.56 ± 0.24) vs (5.89 ± 0.36)分, $t=23.089$, $P < 0.05$]。



A: qPCR 法检测 RCC 组织中 miR-124 和 JAG1 mRNA 的表达;

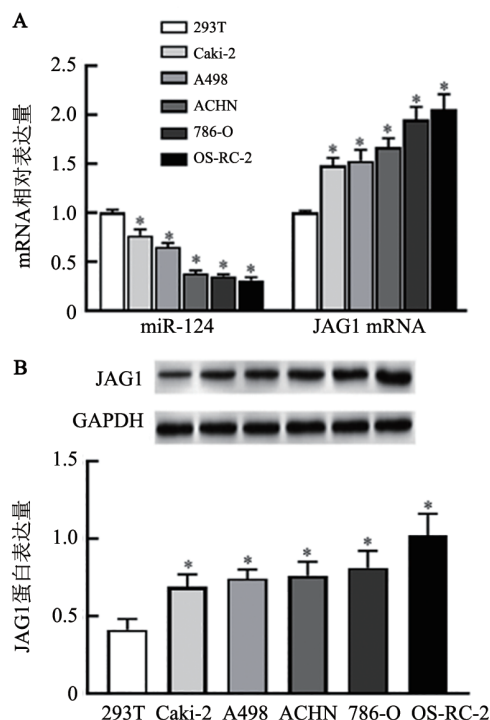
B: WB 法检测 RCC 组织中 JAG1 蛋白的表达

图2 miR-124 和 JAG1 蛋白在 RCC 组织中分别呈低表达和高表达

2.2 miR-124 直接负调控 JAG1

TargetScan 预测软件结果(图5A)显示,miR-124 与 JAG1 3'UTR 存在作用位点。双荧光素酶报告基因实验检测结果(图5B)显示,与 NC mimic+WT-JAG1 3'UTR 组相比,miR-124 mimic+WT-JAG1 3'UTR 组荧光素酶活性被显著抑制($P < 0.05$),而 miR-124 mimic+MUT-JAG1 3'UTR 组荧光素酶活性抑制

不明显($P>0.05$)。qPCR、WB法检测结果(图6)显示,miR-124 mimic组JAG1 mRNA和蛋白表达显著低于NC mimic组,miR-124 inhibitor组JAG1 mRNA和蛋白表达显著高于NC inhibitor组(均 $P<0.05$)。



与293T细胞相比较,* $P<0.05$

A:qPCR法检测RCC细胞中miR-124和JAG1 mRNA的表达;

B:WB法检测RCC组织中JAG1蛋白的表达

图3 miR-124和JAG1蛋白在RCC细胞中分别呈低表达和高表达

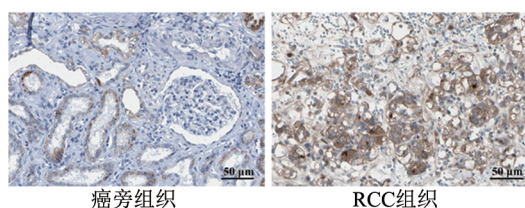


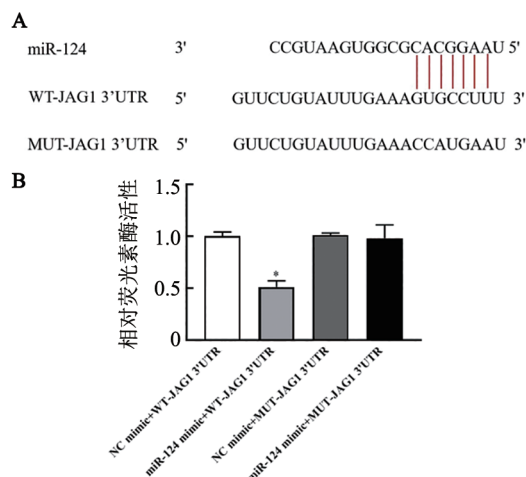
图4 JAG1在RCC组织和癌旁组织中的表达($\times 400$)

2.3 miR-124抑制OS-RC-2细胞增殖

qPCR、WB法检测结果(图7)显示,与Control组和NC mimic组比较,miR-124 mimic组OS-RC-2细胞中miR-124表达升高,JAG1 mRNA和蛋白表达降低(均 $P<0.05$);与miR-124 mimic+pcDNA组和miR-124 mimic组相比,miR-124 mimic+pc-JAG1组OS-RC-2细胞中miR-124表达降低,JAG1 mRNA和蛋白表达升高(均 $P<0.05$)。

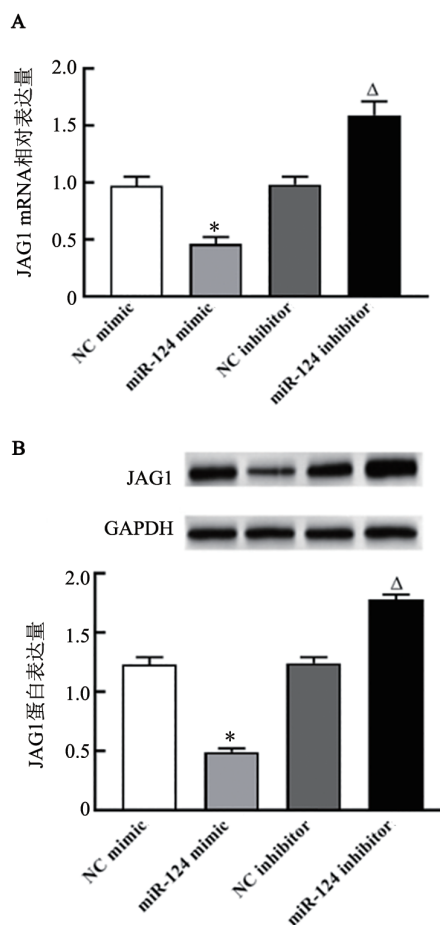
MTT法检测结果(图8)显示,miR-124 mimic组OS-RC-2细胞活力(24、48、72 h)显著低于Control组和NC mimic组,miR-124 mimic+pc-JAG1组OS-RC-2

细胞活力(24、48、72 h)显著高于miR-124 mimic+pcDNA组和miR-124 mimic组(均 $P<0.05$)。



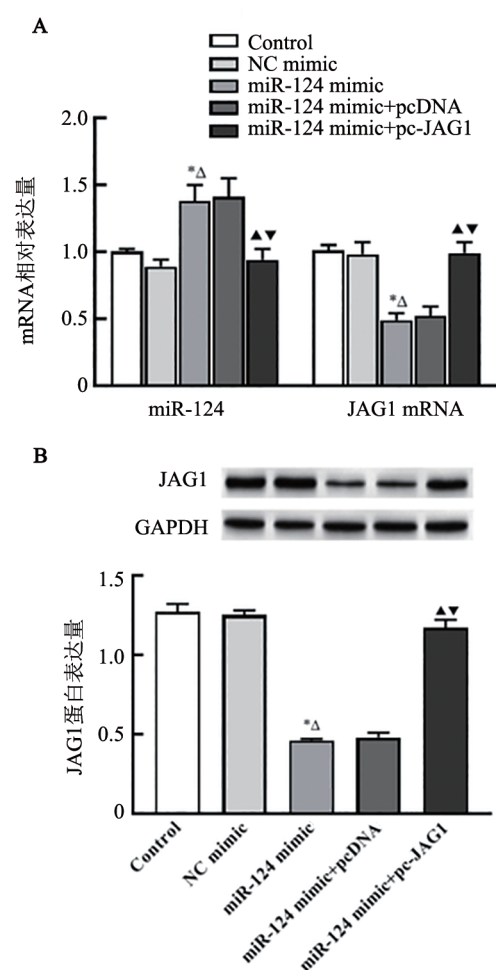
与NC mimic+WT-JAG1 3'UTR组相比较,* $P<0.05$

A:miR-124与JAG1 3'UTR的结合位点;B:相对荧光活性
图5 双荧光素酶报告基因实验验证miR-124负调控JAG1



与NC mimic组相比较,* $P<0.05$;与NC inhibitor组相比较, $\Delta P<0.05$

图6 miR-124抑制OS-RC-2细胞中JAG1 mRNA(A)和蛋白(B)的表达



与 Control 组相比较, $^*P<0.05$; 与 NC mimic 组相比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与 miR-124 mimic 组相比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与 miR-124 mimic+pcDNA 组相比较, $^{\nabla}P<0.05$

图7 共转染 miR-124 mimic 和 pc-JAG1 抑制 OS-RC-2 细胞中 miR-124 的表达(A)促进 JAG1 表达(B)

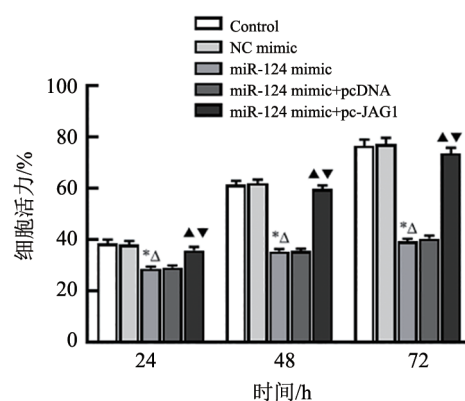
2.4 miR-124 抑制 OS-RC-2 细胞迁移和侵袭而促进凋亡

Transwell 实验检测结果(图9)显示,较 Control 组和 NC mimic 组而言,miR-124 mimic 组迁移、侵袭细胞数目显著减少,凋亡率显著升高,cleaved caspase-3 和 BAX 蛋白表达明显增加,Bcl2 蛋白表达明显减少(均 $P<0.05$);相比 miR-124 mimic+pcDNA 组和 miR-124 mimic 组,miR-124 mimic+pc-JAG1 组迁移、侵袭细胞数目明显增多,凋亡率明显降低,cleaved caspase-3 和 BAX 蛋白表达显著降低,Bcl2 蛋白表达显著增加(均 $P<0.05$)。

2.5 miR-124 抑制 OS-RC-2 细胞中 Notch 信号通路相关蛋白表达

WB 检测结果(图10)显示,miR-124 mimic 组 OS-RC-2 细胞中 NICD、HES1、HES5 蛋白表达显著低于 Control 组(均 $P<0.05$),miR-124 mimic+pc-JAG1

组 OS-RC-2 细胞中 NICD、HES1、HES5 蛋白表达显著高于 miR-124 mimic 组($P<0.05$),而 NC mimic 组和 Control 组、miR-124 mimic+pcDNA 组和 miR-124 mimic 组 OS-RC-2 细胞中 NICD、HES1、HES5 蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。



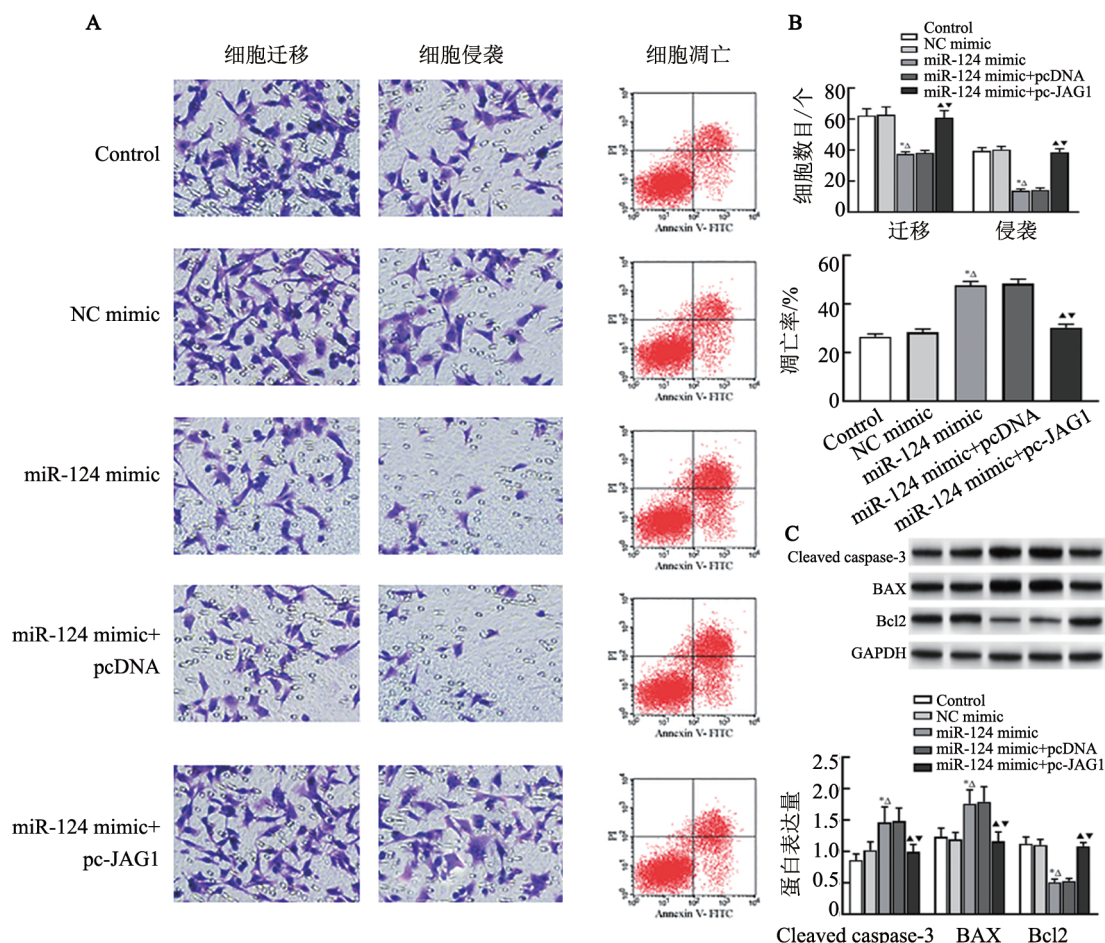
与 Control 组相比较, $^*P<0.05$; 与 NC mimic 组相比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与 miR-124 mimic 组相比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与 miR-124 mimic+pcDNA 组相比较, $^{\nabla}P<0.05$ 。

图8 共转染 miR-124 mimic 和 pc-JAG1 提高 OS-RC-2 细胞的活力

3 讨论

男性、年龄增长、吸烟和遗传易感性均是目前公认的 RCC 危险因素。由于缺乏诊断生物标志物和早期特殊症状,约 20%~30% 的 RCC 患者在初始诊断时就有转移^[10]。而且,经手术治疗后,RCC 患者发生转移或复发的概率仍然较高,约为 50%,这与预后不良有关^[11]。因此,了解 RCC 复发和转移的分子机制对改善 RCC 治疗意义重大。

近年来研究发现 miRNA 在 RCC 的生物学过程中发挥重要作用。miR-124 是一种肿瘤抑制因子,SHEN 等^[12]指出 miR-124 在黑色素瘤组织中表达降低,过表达 miR-124 可通过降解 RACK1 抑制黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,促进黑色素瘤细胞凋亡;FAN 等^[13]的研究结果表明,miR-124 可通过抑制 IQGAP1 的表达抑制结直肠癌的进展;在食管癌中,miR-124 可抑制细胞侵袭和迁移,其抑制作用与靶向调控 BECN1 有关^[14];而在 RCC 中,miR-124 过表达可抑制 MMP-9 表达,降低 RCC 细胞的侵袭能力^[15]。本研究结果显示,miR-124 在 RCC 组织和细胞中呈低表达,与 ÇAYKARA 等^[16]的研究结果一致,说明 miR-124 在 RCC 中发挥抑癌作用。由于 miR-124 在 OS-RC-2 细胞的表达与人正常肾细胞 293T 差异最大,所以本研究选择 OS-RC-2 细胞中进行后续实验。



与 Control 组相比较, * $P < 0.05$; 与 NC mimic 组相比较, $\Delta P < 0.05$; 与 miR-124 mimic 组相比较,

$\Delta P < 0.05$; 与 miR-124 mimic+pcDNA 组相比较, $\nabla P < 0.05$

A: 过表达 miR-124 抑制 OS-RC-2 细胞的迁移和侵袭 (Transwell 法, $\times 200$) 而促进细胞凋亡 (流式细胞术);

B: miR-124 抑制 OS-RC-2 细胞迁移、侵袭并提升细胞凋亡率; C: miR-124 促进 OS-RC-2 细胞中凋亡蛋白的表达

图9 共转染 miR-124 mimic 和 pc-JAG1 促进 OS-RC-2 细胞迁移和侵袭并抑制其凋亡

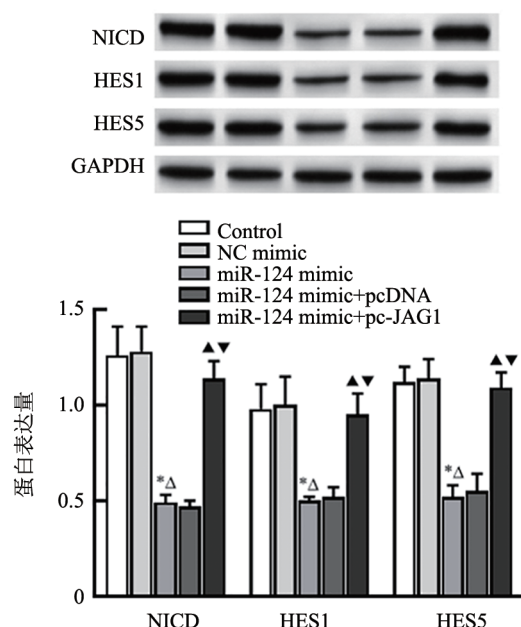
本研究通过在 OS-RC-2 细胞中转染 miR-124 mimic 发现, miR-124 表达显著升高, 说明细胞转染成功; 此外, 过表达 miR-124 可有效抑制 RCC 细胞增殖、迁移和侵袭, 促进 RCC 细胞凋亡。Cleaved caspase-3 是 caspase-3 的激活形式, 细胞中 cleaved caspase-3 表达水平与凋亡率呈正比。BAX 和 Bcl2 属于同一个家族, 且均与细胞凋亡有关, 但两者作用相反, BAX 促进细胞凋亡, 而 Bcl2 抑制细胞凋亡^[17]。本研究结果显示, 转染 miR-124 mimic 可显著升高 cleaved caspase-3 和 BAX 蛋白表达、降低 Bcl2 蛋白表达, 这与凋亡检测结果相对应, 揭示 miR-124 对 RCC 细胞凋亡的促进作用与 cleaved caspase-3、BAX、Bcl2 蛋白的表达水平有关。

JAG1 是 Notch 典型的配体之一, 已有研究证实 JAG1 在肝癌^[18]、乳腺癌^[19]等不同类型的肿瘤中发挥促癌作用。本研究发现, JAG1 在 RCC 组织和细胞中的表达显著升高, 这与吴科荣等^[20]的研究结果一致,

提示 JAG1 在 RCC 中也作为促癌因子起作用。PAN 等^[21]指出, miR-124 通过靶向 JAG1 抑制胃癌进展。而本研究通过 TargetScan 预测软件得到 miR-124 与 JAG1 3'UTR 互补的核苷酸位点。进一步研究发现, miR-124 靶向负调控 JAG1 的表达。此外, 回复实验结果显示, 过表达 JAG1 可逆转 miR-124 过表达对 RCC 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的作用。

JAG1 可通过细胞间的相互作用触发 Notch 信号。在宫颈癌、舌癌中, JAG1 表达的升高可激活 Notch 信号通路, 并进一步诱发下游基因的转录和翻译, 而上游的 miRNA 对 JAG1 的表达和 Notch 信号通路具有调控作用^[22-23]。NICD 是 Notch 受体的一种激活形式, 通过激活的 Notch 信号通路可以释放 NICD, 从而增加 HES1、HES5 等 HES 家族表达^[24]。HES1 和 HES5 对 Notch 信号通路至关重要, 可以抑制细胞凋亡, 促进细胞侵袭、迁移和增殖^[25]。本研究结果显示, miR-124 过表达时, NICD、HES1、HES5 蛋白表达下

降,而过表达 JAG1 会干扰 miR-124 对 NICD、HES1、HES5 蛋白表达的抑制作用,揭示 miR-124 通过下调 JAG1,抑制 Notch 信号通路的激活。



与 Control 组相比较, * $P<0.05$; 与 NC mimic 组相比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与 miR-124 mimic 组相比较, $^{\Delta\Delta}P<0.05$; 与 miR-124 mimic+pcDNA 组相比较, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.05$

图 10 共转染 miR-124 mimic 和 pc-JAG1 促进 OS-RC-2 细胞中 Notch 信号通路相关蛋白的表达

综上所述, 本研究发现, miR-124 通过抑制 JAG1/Notch 信号通路, 抑制 RCC 细胞迁移、侵袭和增殖, 加速 RCC 细胞凋亡, 为 RCC 的机制研究提供了参考依据。

参考文献

- [1] CHOUERI T K, MOTZER R J. Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2017, 376(4): 354-366. DOI: 10.1056/NEJMra1601333.
- [2] CHEN J, SHU Y, YU Q, *et al.* microRNA-645 promotes cell metastasis and proliferation of renal clear cell carcinoma by targeting GK5[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(20): 4557-4565.
- [3] JIN L, LI Y F, NIE L P, *et al.* MicroRNA-24-2 is associated with cell proliferation, invasion, migration and apoptosis in renal cell carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 9157-9164. DOI:10.3892/mmr.2017.7705.
- [4] FENG Y, JIANG W L, ZHAO W M, *et al.* miR-124 regulates liver cancer stem cells expansion and sorafenib resistance[J/OL]. Exp Cell Res, 2020, 394(2): 112162[2022-02-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32640195/>. DOI:10.1016/j.yexcr.2020.112162.
- [5] MAO Q Y, ZHUANG Q F, SHEN J, *et al.* MiRNA-124 regulates the sensitivity of renal cancer cells to cisplatin-induced necroptosis by targeting the CAPN4-CNOT3 axis[J]. Transl Androl Urol, 2021, 10

- (9): 3669-3683. DOI:10.21037/tau-21-777.
- [6] 胡刚强, 费安华, 李浩勇, 等. miR-124 在肾癌中的表达以及对肾癌 786-O 细胞生物学行为的影响[J]. 贵州医药, 2019, 43(11): 1696-1699. DOI:10.3969/j.issn.1000-744X.2019.11.004.
- [7] 江典存, 李晓治, 倪良诚, 等. 微小 RNA-124 对肾癌细胞的自噬和增强顺铂敏感性的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(20): 2766-2769. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2021.20.011.
- [8] XIU M X, LIU Y M, KUANG B H. The oncogenic role of Jagged1/Notch signaling in cancer[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110416 [2022-02-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32593969/>. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110416.
- [9] MASSI D, TARANTINI F, FRANCHI A, *et al.* Evidence for differential expression of Notch receptors and their ligands in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma[J]. Mod Pathol, 2006, 19(2): 246-254. DOI:10.1038/modpathol.3800526.
- [10] LI S, FENG Z Y, ZHANG X C, *et al.* Up-regulation of microRNA-200c-3p inhibits invasion and migration of renal cell carcinoma cells via the SOX2-dependent Wnt/ β -catenin signaling pathway[J/OL]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 231 [2022-02-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31516388/>. DOI:10.1186/s12935-019-0944-5.
- [11] HE T, CHEN P J, JIN L, *et al.* miR-660-5p is associated with cell migration, invasion, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 2051-2060. DOI:10.3892/mmr.2017.8052.
- [12] SHEN C C, HUA H, GU L X, *et al.* miR-124 functions as a melanoma tumor suppressor by targeting RACK1[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 9975-9986. DOI:10.2147/OTT.S225120.
- [13] FAN J Y, ZHANG W J, WU Y T, *et al.* miR-124 inhibits cell growth through targeting IQGAP1 in colorectal cancer[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(6): 5270-5278. DOI:10.3892/mmr.2018.9518.
- [14] 刘飞, 刘思桦, 刘世娜, 等. miR-124 通过靶向 BECN1 基因调控细胞自噬抑制食管癌 KYSE170 细胞的侵袭和迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(8): 778-784. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.08.005.
- [15] WANG P, ZHANG L D, SUN M C, *et al.* Over-expression of miR-124 inhibits MMP-9 expression and decreases invasion of renal cell carcinoma cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(19): 6308-6314. DOI:10.26355/eurrev_201810_16041.
- [16] ÇAYKARA B, ÖZTÜRK G, ALSAADONI H, *et al.* Evaluation of microRNA-124 expression in renal cell carcinoma[J]. Balkan J Med Genet, 2021, 23(2): 73-78. DOI:10.2478/bjmg-2020-0029.
- [17] ZHAO Y W, YE D C, LUO Q M, *et al.* Pterostilbene inhibits human renal cell carcinoma cells growth and induces DNA damage[J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(2): 258-265. DOI:10.1248/bpb.b19-00378.
- [18] KUNANOPPARAT A, HIRANKARN N, ISSARA-AMPHORN J, *et al.* The expression profile of Jagged1 and Delta-like 4 in hepatocellular carcinoma[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2021, 39(1): 44-52. DOI:10.12932/AP-040818-0388.
- [19] ZOHNY S F, ZAMZAMI M A, AL-MALKI A L, *et al.* Highly expressed DLL4 and JAG1: their role in incidence of breast cancer metastasis[J]. Arch Med Res, 2020, 51(2): 145-152. DOI:10.1016/j.arcmed.2019.12.019.
- [20] 吴科荣, 张立, 许乐, 等. 肾透明细胞癌 NOTCH1 与 JAG1 的表达及意义[J]. 中国临床医学, 2010, 17(4): 540-542. DOI: 10.3969/j.issn.1008-6358.2010.04.028.

- [21] PAN Y Y, WU A H, XU F F, *et al.* Lentivirus-mediated overexpression of miR-124 suppresses growth and invasion by targeting JAG1 and EZH2 in gastric cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15 (5): 7450-7458. DOI:10.3892/ol.2018.8194.
- [22] CHEN Y H, WU Q M, LIN J, *et al.* DARS-AS1 accelerates the proliferation of cervical cancer cells via miR-628-5p/JAG1 axis to activate Notch pathway[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 535 [2022-02-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33292218/>. DOI: 10.1186/s12935-020-01592-2.
- [23] ZHANG T H, LIANG L Z, LIU X L, *et al.* LncRNA UCA1/miR-124 axis modulates TGF β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of tongue cancer cells through JAG1/Notch signaling[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10495-10504. DOI:10.1002/jcb.28334.
- [24] ZHAO Y Y, YU G T, XIAO T, *et al.* The Notch signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(5): 881-887. DOI:10.17219/acem/64000.
- [25] GAO F, HUANG W, ZHANG Y Q, *et al.* Hes1 promotes cell proliferation and migration by activating Bmi-1 and PTEN/Akt/GSK3 β pathway in human colon cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (36): 38667-38680. DOI:10.18632/oncotarget.5484.
- [收稿日期] 2022-02-26 [修回日期] 2022-08-05
[本文编辑] 黄静怡, 郁晓路