

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.17.004

文章编号: 1005-8982(2017)17-0019-06

MicroRNA-224 靶向 CNNM1 抑制 前列腺癌血管生成的实验研究*

黄亚强, 黄红星, 麦智鹏, 黎卫, 郑轶群, 袁润强

(中山大学附属中山医院 泌尿外科, 广东 中山 528403)

摘要:目的 研究 microRNA-224(miR-224)对前列腺癌生化复发及血管生成的影响。**方法** 生物信息学分析及荧光素酶报告实验预测细胞周期调节蛋白 1(CNNM1)受 miR-224 负性调控。Taylor 前列腺癌数据库分析、验证 CNNM1、miR-224 的表达关系及其与前列腺癌生化复发的相关性。前列腺癌 PC3 细胞体外培养及动物体内成瘤实验研究 CNNM1、miR-224 表达对前列腺癌微血管生成标志物 CD31 的影响。**结果** CNNM1 表达受 miR-224 靶向调节,前列腺癌组织中 CNNM1 与 miR-224 的表达呈负相关($P < 0.05$)。miR-224 与前列腺癌的生化复发呈负相关($P < 0.05$),CNNM1 与前列腺的生化复发呈正相关($P < 0.05$);在过表达 miR-224 的 PC3 细胞株内,CNNM1 和 CD31 的表达量下降;CNNM1 过表达能促进 CD31 的生成。前列腺癌细胞裸鼠体内成瘤组织免疫组织化学染色提示,miR-224 过表达能抑制前列腺癌组织内微血管形成。**结论** miR-224 通过靶向调控 CNNM1 表达,抑制前列腺癌微血管形成,控制前列腺癌生化复发。

关键词: 前列腺癌;microRNA-224;细胞周期调节蛋白 1;生化复发;血管生成

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

miR-224 inhibits angiogenesis of prostate cancer by targeting cyclin protein M1*

Ya-qiang Huang, Hong-xing Huang, Zhi-peng Mai, Wei Li, Yi-qun Zheng, Run-qiang Yuan
(Department of Urology, Zhongshan Hospital of Sun Yat-sen University,
Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To investigate the impacts of miR-224 on biochemical recurrence and angiogenesis of prostate cancer. **Methods** Bioinformatics analysis and luciferase reporter assay were performed to predict the gene that can be directly inhibited by miR-224. Taylor database was used for confirming the expressions of CNNM1 and miR-224, and their correlations with biochemical recurrence of prostate cancer. Finally, the impacts of CNNM1 and miR-224 on angiogenesis of prostate cancer were explored by PC3 cell *in vitro* and *in vivo*. **Results** CNNM1 was directly regulated by miR-224, and their expression levels were negatively correlated in prostate cancer tissue ($r = -0.378$, $P < 0.05$). miR-224 was negatively correlated to, while CNNM1 was positively correlated to biochemical recurrence of prostate cancer ($P < 0.05$). The expressions of CNNM1 and CD31 decreased in the PC3 cells overexpressing miR-224 ($P < 0.05$). However, CNNM1 enhanced the expression level of CD31 ($P < 0.05$). The immunochemical staining of the transplantation tumor in the nude mice displayed that miR-224 overexpression could suppress angiogenesis in the prostate cancer tissue. **Conclusions** miR-224 suppresses angiogenesis and biochemical recurrence of prostate cancer by targeting CNNM1.

Keywords: prostate cancer; miR-224; CNNM1; biochemical recurrence; angiogenesis

收稿日期: 2017-02-06

* 基金项目: 中国博士后科学基金(No: 2016M590842); 广东省医学科研基金(No: A2016052); 广东省中山市科技计划(No: 2016B1028)

[通信作者] 黄红星, E-mail: hhxs@21cn.com

血管生成成为肿瘤提供营养物质,是肿瘤侵袭、转移的关键环节。抗血管生成疗法为肿瘤治疗,特别是晚期恶性肿瘤的治疗提供一种有效的方法^[1]。Micro RNA (miRNAs) 的主要生物学功能是通过抑制翻译起始和/或降解信使 RNA 的途径,来调控编码基因的表达而实现^[2]。研究发现,microRNA-224(miR-224)过表达能抑制前列腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移,并促进细胞凋亡,起抑癌基因作用^[3]。本研究旨在探索 miR-224 调节细胞周期调节蛋白 1(cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 1, CNNM1)抑制前列腺癌微血管形成的机制。

1 材料与方法

1.1 一般材料

PC3 细胞(美国 ATCC 公司),改良伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)(北京塞默飞世尔生物),胎牛血清(fetal calf serum,FBS)(浙江天杭生物科技),过表达 miRNA-224 质粒/过表达 CNNM1 质粒(长沙赢润生物技术有限公司,has-let-7e),裸鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),双荧光报告分析系统(美国 Promega 公司),免疫组织化学法试剂盒 PK-6100(美国 Vector 公司),Western blot 试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),CNM1、CD31 抗体购自美国 Abcam 公司。

1.2 Taylor 数据库筛选及靶基因预测

Taylor 数据库是一个公用的数据平台,其中包含 139 例原发性前列腺癌组织的 miRNAs、mRNA 表达谱及临床相关数据^[4]。在 SPSS 17 中采用 Pearson 相关性分析筛选 Taylor 数据库中与 miR-224 呈负相关的基因($r < -0.32, P < 0.05$),再用 miRNAs 靶基因预测软件 Targetscan、PicTar、miRanda 及 miRwalk 共同对 miR-224 下游靶基因进行预测,选 4 个预测软件共有的交集靶基因进一步研究。

1.3 过表达 miR-224 的 PC3 细胞构建及细胞保存、培养

用 has-let-7e 包装质粒混合液转染 miR-224/miR-NC 到 293TN 细胞株,3 d 后根据包装的说明书用 Lenti-Concentin 病毒沉淀溶液(LV810A-1,美国 SBI 公司)提取收集病毒颗粒。然后用 Trans Dux 病毒转染试剂(LV850A-1,美国 SBI 公司)转染 PC3 细胞株。流式细胞仪分选 miR-224 过表达及空白对照细胞株并经逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)和 Western

blot 检测验证。用 10%二甲基亚砷+90% FBS 悬浮 PC3 细胞,冷冻保存于液氮中。使用时,取出冷冻的 PC3 细胞,置于 37℃温水中致其融化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,10% FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞,在 5% CO₂ 培养箱内培养,使其成对数生长时进行实验。

1.4 双荧光素酶报告基因实验

含有 miR-224 结合靶位点的野生型和突变型序列的 CNM1 3'UTR 分别克隆到 psi-CHECK2 荧光素酶报告载体,3'UTR 序列载体分别与 miR-224 模拟物(miR-224)或对照序列(miR-NC)共转染到 PC3 细胞株中,双荧光素酶报告基因实验测定 PC3 细胞荧光素酶的活性以判断 miR-224 对 CNM1 3'UTR 的潜在结合位点的作用。

1.5 Western blot 检测

提取 PC3 细胞蛋白,灌胶上样蛋白 20 μg/孔,浓缩胶电泳条件为 80 V、30 min,分离胶电泳条件为 90 V、90 min,转膜条件为 120 V、90 min。一抗 4℃过夜,二抗孵育 2 h。选择合适的曝光底片,将底片进行高清扫描,通过 Image J 软件进行灰度值的分析。

1.6 裸鼠成瘤实验及免疫组织化学法染色

取过表达 miR-224 和对照组 PC3 细胞,分别注射到同裸鼠背部左右对称部位的皮下,接种细胞数 5×10^6 个/侧,共接种 4 只裸鼠。每 4 天测量 1 次肿瘤长度和宽度,并计算肿瘤体积(mm^3)=宽²(mm^2)×长(mm)/2。接种后第 32 天处死裸鼠获取移植瘤组织,绘制肿瘤生长曲线图。

裸鼠成瘤组织进行石蜡切片,常规脱蜡、抗原修复及内源性过氧化物酶灭活,加一抗 4℃孵育过夜。次日依次加入生物素化二抗、二氨基联苯氨避光显色、苏木素复染、梯度乙醇脱水及二甲苯透明,中性树胶封片。染色结果判断:显微镜下随机选取 10 个视野,以微血管着色为基准,无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;400 倍显微镜下无微血管染色为 0 分,1~5 条微血管着色为 1 分,6~10 条微血管着色为 2 分,>10 条微血管着色为 3 分。2 项结果相乘为染色总评分。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验或重复测量设计的方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验;相关性分析用 Pearson 法,生存率的比较用 Log-rank χ^2 检验,

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺癌组织 miR-224、CNNM1 表达与疾病生化复发的相关性

从 Talyor 数据库得到 139 例前列腺癌根治术患者的资料,其中 133 例患者有 miR-224 表达数据,采用 Kaplan-Meier 法分析 miR-224、CNNM1 与前列腺癌生化复发的相关性。miR-224 高表达组的无生化复发生存率与低表达组比较,经 Log-rank χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=5.593, P=0.018$),高表达组的无生化复发生存率高于低表达组。CNNM1 高表达组的无生化复发生存率与低表达组比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.528, P=0.033$),高表达组低于低表达组。见图 1。

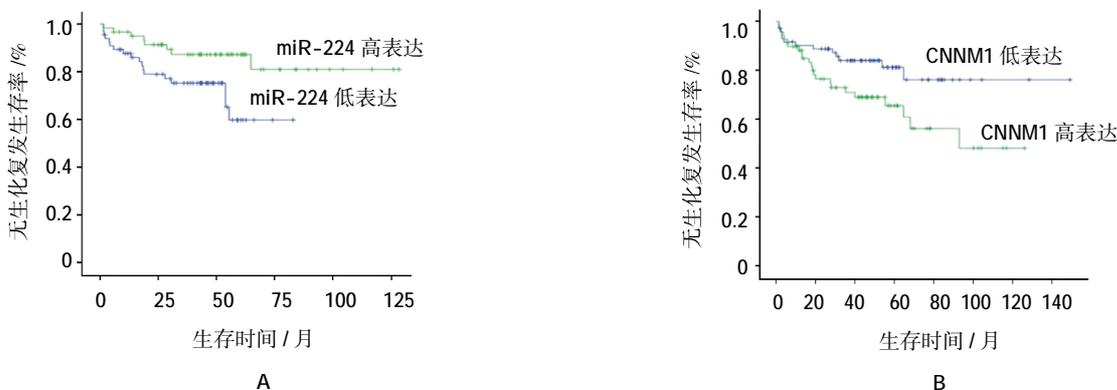
2.2 miR-224 的下游靶基因 CNNM1

Pearson 相关性分析提示,Taylor 数据库中与 miR-224 呈负相关的基因共 39 个,再经软件 Targetscan、Pic Tar、miRanda 及 miRwalk 共同对 miR-224 下游

靶基因进行预测,结果显示,CNNM1 为 miR-224 的下游靶基因($r=-0.378, P=0.010$)。双荧光素酶报告实验结果显示,miR-224 过表达对 CNNM1 野生型和突变型 3'UTR 序列的荧光载体活性影响比较,差异有统计学意义($F=12.926, P=0.007$)。与对照组比较,miR-224 过表达降低 CNNM1 野生型 3'UTR 区的荧光载体活性,而对 CNNM1 突变型 3'UTR 区的荧光载体活性无影响;在 miR-224 过表达的细胞中,与 CNNM1 突变型 3'UTR 区相比,miR-224 降低 CNNM1 野生型 3'UTR 区的荧光载体活性,表明 miR-224 能与 CNNM1 基因的 3'UTR 区特异性结合,影响 CNNM1 基因的表达。见图 2。

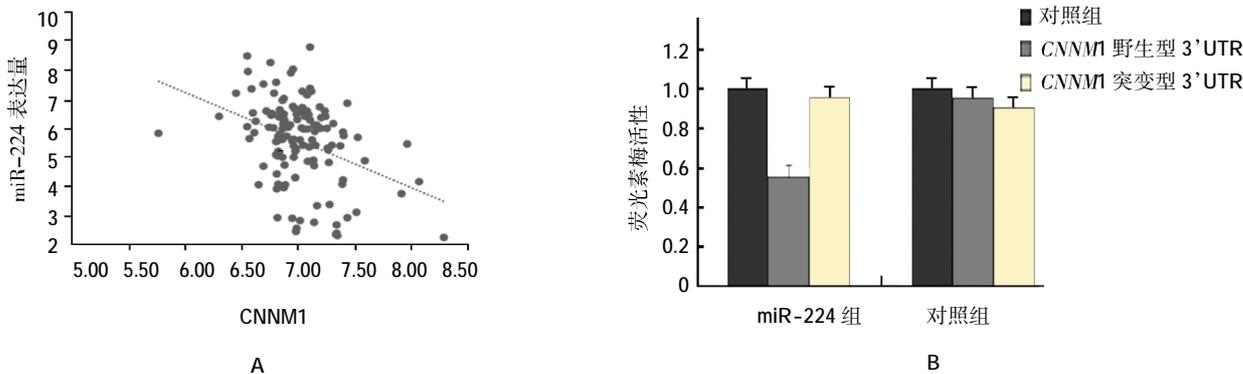
2.3 miR-224 通过 CNNM1 抑制前列腺癌细胞 CD31 的表达

前列腺癌 PC3 细胞株转染 miR-224,经复苏、培养,提取细胞 miRNA。经 RT-PCR 验证 miR-224 过表达成功,提取细胞蛋白用 Western-blot 检测 CNNM1 和 CD31 蛋白表达情况。结果提示,miR-224 过表达与对照组的 CNNM1 表达比较,差异有统计学意义



A:miR-224 表达与前列腺癌无生化复发呈正相关;B:CNNM1 表达与前列腺癌无生化复发呈负相关

图 1 Kaplan-Meier 生存曲线分析



A:Pearson 相关性分析;B:荧光素酶报告实验

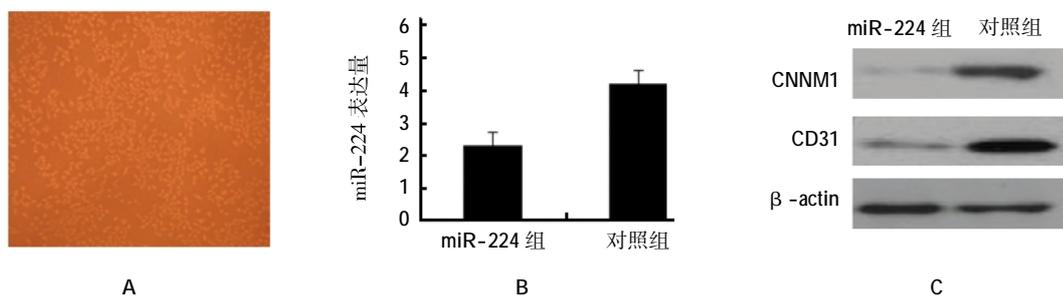
图 2 miR-224 与 CNNM1 的相关性及调控关系

($t=4.905, P=0.008$); miR-224 过表达与对照组 CD31 表达比较, 差异有统计学意义($t=4.658, P=0.009$)。miR-224 过表达的 PC3 细胞 CNNM1 和 CD31 表达量较对照组减少。见图 3。

为进一步明确前列腺癌细胞中 CD31 与 CNNM1 表达的关系, 构建过表达 CNNM1 的 PC3 细胞, 并经 PCR 验证, 提取细胞蛋白检测 CD31 的变化, 结果提示 CNNM1 表达增加能促进 CD31 的表达($t=3.303, P=0.030$)。见图 4。

2.4 miR-224 抑制前列腺癌生长及肿瘤微血管形成

将 miR-224 过表达和对照组 PC3 细胞株注射到裸鼠皮下, 复制异体移植瘤模型。miR-224 组与对照组细胞注射到皮下 8、12、16、20、24、28 和 32 d 后, 测量移植瘤的体积, 采用重复测量数据的方差分析, 结果: ①不同生长时间点的移植瘤体积比较, 差异有统计学意义($F=14.302, P=0.003$); ②miR-224 组与对照组在相同生长时间的移植瘤体积比较, 差异有统计学意义($F=12.620, P=0.004$), miR-224 组与对照组



A: 转染 miR-224 后培养的 PC3 细胞株 ($\times 50$); B: 过表达 miR-224 的 PC3 细胞构建成功; C: miR-224 抑制 CNNM1 和 CD31 的表达

图 3 miR-224 对 CNNM1 和 CD31 表达的影响



A: 过表达 CNNM1 的 PC3 构建成功; B: 过表达 CNNM1 促进 CD31 表达

图 4 CNNM1 对 CD31 表达的影响

附表 两组不同时间的肿瘤生长情况 ($n=4, \text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

组别	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d	28 d	32 d
miR-224 组	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.18 ± 0.07	0.23 ± 0.07	0.33 ± 0.07	0.38 ± 0.10	0.42 ± 0.16
对照组	0.12 ± 0.02	0.21 ± 0.06	0.31 ± 0.07	0.46 ± 0.07	0.54 ± 0.09	0.63 ± 0.12	0.76 ± 0.19

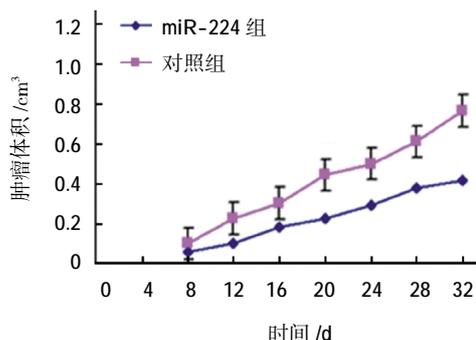
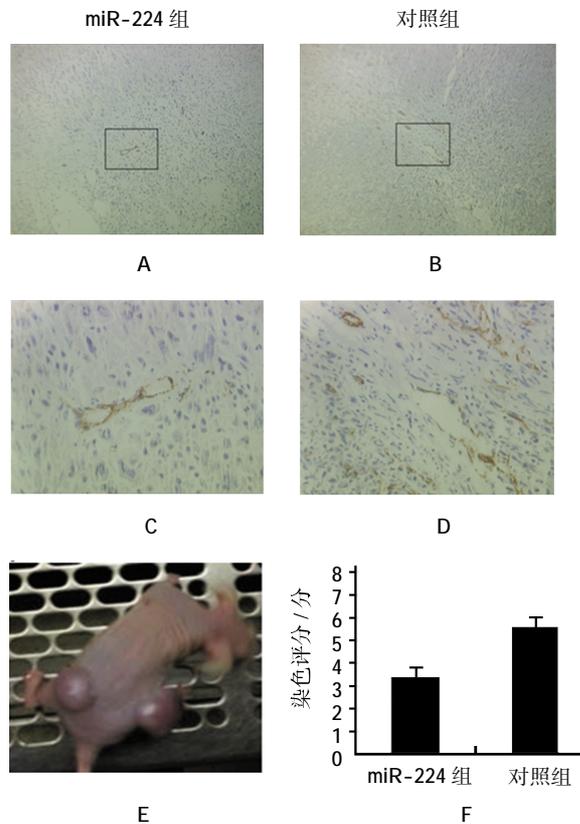


图 5 PC3 细胞裸鼠皮下移植瘤模型生长曲线图

比较, 在相同生长时间下其移植瘤的体积较小, miR-224 能抑制肿瘤的生长; ③miR-224 组与对照组的移植瘤生长的变化趋势比较, 差异有统计学意义($F=26.347, P=0.002$)。见附表和图 5。

将裸鼠肿瘤组织石蜡切片, 用 CD31 抗体进行免疫组织化学法染色以评估微血管的形成, 结果提示, 对照组肿瘤组织内微血管数量为 (5.65 ± 1.36) 条, 过表达 miR-224 肿瘤组织内微血管数量为 (3.42 ± 1.15) 条, 两者比较, 差异有统计学意义($t=3.067, P=$

0.012),过表达 miR-224 肿瘤组织内微血管数量减少。见图 6。



A: 过表达 miR-224 裸鼠移植瘤 CD31(免疫组织化学法 × 100); B: 对照组肿瘤 CD31(免疫组织化学法 × 100); C: 过表达 miR-224 裸鼠移植瘤 CD31(免疫组织化学法 × 400); D: 对照组肿瘤 CD31(免疫组织化学法 × 400); E: 裸鼠成瘤图片; F: 过表达 miR-224 肿瘤和对照组肿瘤免疫组织化学法染色评分比较

图 6 miR-224 对前列腺癌细胞体内成瘤标本血管形成的影响

3 讨论

miRNAs 对基因的调节方式复杂,1 个 microRNA 能调节不同的基因,不同的 microRNA 能调节同个基因,这样复杂的网络构成 microRNAs 对基因功能的精确调节。miR-224 与肿瘤的关系存在肿瘤异质性,即 miR-224 在不同的肿瘤中发挥不同的作用。有报道称,miR-224 在肝癌中高表达,能促进肝癌细胞的增殖、迁徙及侵袭,另外在乳腺癌、结肠癌中也有类似作用^[5-7]。在前列腺癌中,miR-224 通过靶向负性调控 CAMKK2,抑制前列腺癌细胞侵袭及增殖^[8]。

本研究首先通过 Taylor 前列腺癌数据库筛选,发现 miR-224、CNNM1 与前列腺癌的生化复发相关。再通过多种软件共同预测提示,CNNM1 是 miR-224

所调控的潜在下游靶基因,进一步分析发现 CNNM1 与 miR-224 呈负相关,miR-224 降低携带 CNNM1 野生型 3' UTR 序列的荧光报告载体的活性,这符合 miRNAs 对下游基因的调节机制。CNNM1 作为一种细胞周期调节蛋白,与人类肿瘤的关系尚不明确。有研究报道,在小鼠精原细胞中,CNNM1 与肿瘤细胞分化有关,低表达的 CNNM1 能促发精原细胞的恶性分化^[9]。FURUTA 等^[10]研究认为,CNNM1 启动子的甲基化与人类恶性黑色素瘤的形成有关。本实验结果提示,在前列腺癌细胞株 PC3 中,miR-224 过表达能使 CNNM1 和 CD31 表达下调,CNNM1 过表达能促进 CD31 的生成。裸鼠成瘤免疫组织化学法染色进一步证实,过表达 miR-224 能抑制肿瘤组织内微血管数量形成。CD31 又称为血小板-内皮细胞黏附分子,主要用于证明内皮细胞组织的存在,是常用于评估肿瘤新生血管形成的标志物,CD31 表达升高意味着肿瘤微血管生成增加^[11]。微血管的形成能促进肿瘤细胞的局部迁徙和远处转移^[12]。因此笔者推测,在前列腺癌中,miR-224 与生化复发呈负相关可能与 miR-224 抑制前列腺癌微血管生成有关。

上世纪 70 年代,FOLKMAN^[13]首次提出,肿瘤生长依赖于新血管生成,并逐渐使该领域成为肿瘤研究的热点。新生血管使肿瘤能够获得足够的营养物质,是促成肿瘤从无血管的缓慢生长阶段转变为有血管的快速增殖阶段的关键;抗血管治疗有望阻断肿瘤血管的生成,从而最终达到抑制肿瘤生长及转移的作用^[14]。由于 miRNAs 功能的多样性,人们对 miRNAs 在肿瘤血管生成方面的作用也进行广泛研究,发现 miR-494 可以促进非小细胞肺癌的血管生成,miR-21 可以通过蛋白激酶 B/缺氧诱导因子 1 α /血管内皮生长因子通路,诱导前列腺癌新生血管形成^[15-16]。可见 miRNAs 本身就是重要的肿瘤抗血管治疗靶标。本研究结果提示,miR-224 靶向 CNNM1,抑制前列腺癌生化复发及微血管生成,为研究 miRNAs 与前列腺癌血管生成的关系提供更多理论依据。

综上所述,本研究首次提出,miR-224 靶向调控前列腺癌细胞 CNNM1 的表达,抑制肿瘤微血管的形成,减少前列腺癌生化复发。对 miR-224-CNNM1 轴的进一步研究能更深入了解前列腺癌进展的分子机制,并使 miR-224 成为前列腺癌治疗的潜在靶标。

参 考 文 献:

[1] 吴培培,邢力刚. 肿瘤抗血管生成靶向药物耐药机制研究进展[J].

- 中华肿瘤防治杂志, 2012, 20(19): 1593-1596.
- [2] FARH K K, GRIMSON A, JAN C, et al. The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution[J]. *Science*, 2005, 310(5755): 1817-1821.
- [3] 韩兆冬, 林卓远, 梁应科, 等. 微小 RNA-224 靶向 Tribbles 同源蛋白 1 调控前列腺癌细胞 DU145 的迁移和侵袭[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 12(32): 2939-2942.
- [4] TAYLOR B S, SCHULTZ N, HIERONYMUS H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer[J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(1): 11-22.
- [5] LIN L, LU B, YU J, et al. Serum miR-224 as a biomarker for detection of hepatocellular carcinoma at early stage[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2016, 40(4): 397-404.
- [6] LIU F, LIU Y, SHEN J, et al. MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating fizzled 5 expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 49130-49142.
- [7] ZHU Y, XU A, LI J, et al. Fecal miR-29a and miR-224 as the noninvasive biomarkers for colorectal cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16(2): 259-264.
- [8] FU H, HE H C, HAN Z D, et al. MicroRNA-224 and its target CAMKK2 synergistically influence tumor progression and patient prognosis in prostate cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 1983-1991.
- [9] CHANDRAN U, INDU S, KUMAR A T, et al. Expression of *cn-nm1* and its association with stemness, cell cycle, and differentiation in spermatogenic cells in mouse testis [J]. *Biol Reprod*, 2016, 95(1): 7.
- [10] FURUTA J, NOBEYAMA Y, UMEBAYASHI Y, et al. Silencing of peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6080-6086.
- [11] LERTKIATMONGKOL P, LIAO D, MEI H, et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)[J]. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23(3): 253-259.
- [12] 李海民, 赵爱志, 窦科峰, 等. 肝癌生长、转移中的微血管生成机制[J]. *第四军医大学学报*, 2002(6): 559-562.
- [13] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [14] WEIS S M, CHERESH D A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1359-1370.
- [15] MAO G, LIU Y, FANG X, et al. Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer [J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(3): 373-382.
- [16] LIU L Z, LI C, CHEN Q, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): DOI: 10.1371/journal.pone.0019139.

(童颖丹 编辑)