



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109971851 A

(43)申请公布日 2019.07.05

(21)申请号 201910057505.4

(22)申请日 2019.01.22

(71)申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路  
818号

(72)发明人 王萍 孟祥余 马琪 陈一勇

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

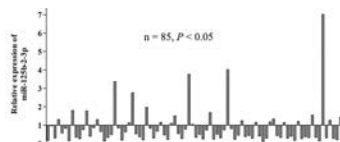
权利要求书1页 说明书13页  
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

MiR-125b-2-3p作为鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物及其在肿瘤转移中的用途

(57)摘要

本发明涉及一种MiR-125b-2-3p作为鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物及其在肿瘤转移中的用途;本发明首次发现了肾透明细胞癌发生发展相关的生物分子标志物MiR-125b-2-3p,通过检测病人组织和血液中MiR-125b-2-3p的表达,来实验肾透明细胞癌的早期诊断;并且本发明首次提供了治疗肾透明细胞癌转移的分子靶标,通过靶向与分子标志物来治疗转移性肾透明细胞癌具有敏感性和特异性。



1. 一种鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物,其特征是:所述的分子标志物为MiR-125b-2-3p,其具有如SEQ ID No.1所示的核苷酸序列;

SEQ ID No.1核苷酸序列为:>hsa-miR-125b-2-3p MIMAT0004603  
UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC。

2. 一种PCR引物,其特征在于,包括可特异性扩增权利要求1所述的肾癌亚型分子标志物MiR-125b-2-3p的上游引物和下游引物。

3. 根据权利要求2所述的PCR引物,其特征在于:所述上游引物具有如SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列;SEQ ID NO.2核苷酸序列为:

miR-125b-2-3p 5'-TCACAAGTCAGGCTCTGGGA-3';  
U6 5'-ACGCAAATTCGTGAAGCGTTC-3'。

4. 一种基于鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物MiR-125b-2-3p表达水平的检测方法,其特征在于:所述的检测方法为荧光定量PCR法;该检测方法所需材料包括:标准DNA模板、PCR反应液以及如权利要求2或3所述的PCR引物;所述检测方法的具体步骤如下:首先通过对该PCR引物的PCR产物测序,验证了引物扩增的特异性;其次研究RCC组织中MiR-125b-2-3p的表达水平:分析从医院收集RCC组织及配对的癌旁组织样本;选三对RCC组织及配对的癌旁组织样本进行MiRNA芯片分析,检测在RCC组织中差异表达的MiRNA;采用qRT-PCR法验证RCC组织及癌旁组织中miR-125b-2-3p的表达情况;最后研究MiR-125b-2-3p表达水平与RCC发生、发展之间的关系:分析MiR-125b-2-3p在RCC各亚型之间的表达差异;分析MiR-125b-2-3p表达对ccRCC患者预后的影响;分析MiR-125b-2-3p表达与ccRCC患者临床病理资料的联系。

5. 如权利要求1所述的肾癌亚型分子标志物在制备诊断或检测肾癌亚型试剂或基因检测芯片中的应用。

6. 如权利要求1所述的肾癌亚型分子标志物在研究肾透明细胞转移的影响中的应用,其特征在于:首先研究MiR-125b-2-3p对肾癌细胞体内、外增殖的影响;其次研究MiR-125b-2-3p对肾癌细胞体内、外迁移的影响。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征是:研究MiR-125b-2-3p对肾癌细胞体内、外增殖的影响,具体包括:(1) 培养人肾癌细胞系(Caki-1、ACHN、786-0和OS-RC-2)和肾上皮细胞HK-2,用qRT-PCR法检测肾癌细胞系和HK-2中MiR-125b-2-3p的原始表达水平;(2) 瞬时转染MiR-125b-2-3p 模拟物或抑制剂到肾癌细胞系,qRT-PCR法检验转染效率,MTS法检测细胞体外增殖;(3) 利用慢病毒系统构建稳定表达MiR-125b-2-3p的肾癌细胞系,裸鼠皮下成瘤实验检测细胞体内增殖。

8. 如权利要求6所述的应用,其特征是:研究MiR-125b-2-3p对肾癌细胞体内、外迁移的影响,具体包括:(1) 瞬时转染MiR-125b-2-3p 模拟物或抑制剂到肾癌细胞系,划痕实验和Transwell实验研究miR-125b-2-3p对肾癌细胞体外迁移的影响;(2) 利用慢病毒系统构建稳定表达MiR-125b-2-3p的肾癌细胞系,裸鼠尾静脉注射实验检测细胞体内转移。

9. 一种鉴别诊断肾癌亚型的诊断试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求7或8所述的PCR引物。

## MiR-125b-2-3p作为鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物及其在肿瘤转移中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤标志物领域,特别涉及一种鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物 MiR-125b-2-3p及其在肿瘤转移中的应用。

### 背景技术

[0002] 肾细胞癌(renal cell carcinoma,RCC)起源于肾实质泌尿小管上皮,是最常见、最致命的肾脏恶性肿瘤,发病率占全部肾脏肿瘤的90%。RCC 是一种异质性疾病,包含一系列有明显遗传和/或表观遗传差异和临床特征 差异的恶性肿瘤<sup>[2,3]</sup>,主要包括透明细胞癌(clear cell RCC,ccRCC)、乳头状细胞癌(papillary RCC,pRCC)和嫌色细胞细胞癌(chromophobe RCC, chRCC)<sup>[4,5]</sup>。目前手术切除术仍然是治疗肾细胞癌的最主要手段,但是治疗效果不佳。同时,因为不同RCC亚型有明显遗传学和表观遗传学等差异,致使不同RCC亚型患者的预后差异较大。因此深入研究RCC各亚型之间的差异,将有助于RCC各亚型的区别治疗。

[0003] MicroRNA(miRNA)是一种天然小分子非编码RNA,长度约为22个核苷酸,主要通过 与靶标mRNA分子的3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合,调控目的基因的表达,最终影响细胞的生命活动。近年来 研究表明,miRNA能作为潜在的原癌基因或肿瘤抑制基因在肿瘤的发生和 发展进程中发挥作用。现已发现许多miRNA在ccRCC中表达异常,并且 影响了ccRCC的发生、发展和预后,其中miR-21-5p、miR-210-3p、miR-487a、miR-491-3p和miR-452等在ccRCC中高表达,另外miR-124-3p、miR-30a-5p、miR-217、miR-142-3p、miR-199a-5p、miR-299-3p、miR-532-5p和miR-200c-3p 等表达下调。由此可见,miRNA的异常表达与ccRCC的发生发展密切相关。

[0004] miR-125b-2-3p从前体miR-125b-2的-3p裂解而来。Murray等发现 miR-125b-2-3p的表达水平在发生生殖系和体细胞DICER1双重突变的胸膜 肺母细胞瘤(PPB)患者的血清中异常升高;并且患者血清中的 miR-125b-2-3p水平在化疗后显著性降低;然而,miR-125b-2-3p在仅仅发 生生殖系DICER1突变的PPB患者亲属中却没有上调;这些结果提示,miR-125b-2-3p可以作为血清筛选标志物用于胸膜肺母细胞瘤患者的早期筛 查和肿瘤治疗效果的指针。此外,miR-125b-2-3p在发生肝脏转移的结直肠 癌组织中的表达水平显著性高于未发生肝脏转移的组织;此外,生物信息 学分析发现miR-125b-2-3p调控一系列与肿瘤转移相关的基因和信号通路;因此,miR-125b-2-3p表达上调影响了结直肠癌发生肝 脏转移。但是,另有 研究报道,miR-125b-2-3p在口腔鳞状细胞癌组织中显著性低表达。这些研 究表明,miR-125b-2-3p在不同肿瘤中呈现相反的表达情况,并且参与肿瘤 的发生发展。然而,miR-125b-2-3p是否参与RCC的发生发展,尤其是与 RCC亚型之间的关系尚不清楚。

[0005] 目前肾癌亚型的发病机制尚不完全清楚,临床上也没有用于肾癌亚型 诊治的有效分子标志物,寻找新的分子标志物对于肾癌亚型的机制研究 和临床应用都具有重要

的意义。

### 发明内容

[0006] 本发明针对上述现有技术中存在的技术问题,提供了一种具有高特异性和高灵敏性的肾癌亚型诊断分子标志物miR-125b-2-3p及其应用,该分子标志物具有极好的肾癌亚型组织特异性和相关性,并且可通过RT-PCR方法实现定量检测,为肾癌亚型的发现和诊断提供了新的分子标志物,对进一步提高当前肾癌的诊治水平具有一定的意义。

[0007] 为了实现上述目的,本发明提供的技术方案为:

[0008] 一种鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物,所述的分子标志物为 MiR-125b-2-3p,其具有如SEQ ID No.1所示的核苷酸序列;

[0009] SEQ ID No.1核苷酸序列为:>hsa-miR-125b-2-3p MIMAT0004603

[0010] UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC

[0011] 一种PCR引物,包括可特异性扩增上述肾癌亚型分子标志物 MiR-125b-2-3p的上游引物和下游引物。

[0012] 作为优选,所述上游引物具有如SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列;

[0013] SEQ ID NO.2核苷酸序列为:

[0014] miR-125b-2-3p 5'-TCACAAGTCAGGCTCTTGGGA-3';

[0015] U6 5'-ACGCAAATTCGTGAAGCGTTC-3';下游引物来源为德国 QIAGEN公司的 miScript SYBR Green PCR Kit试剂盒。

[0016] 本发明进一步提供了一种基于鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物 MiR-125b-2-3p表达水平的检测方法,所述的检测方法为荧光定量PCR法;该检测方法所需材料包括:标准DNA模板、PCR反应液以及如上所述的 PCR引物;所述检测方法的具体步骤如下:首先通过对该PCR引物的PCR产物测序,验证了引物扩增的特异性;其次研究RCC组织中MiR-125b-2-3p的表达水平:分析从医院收集RCC组织及配对的癌旁组织样本;选三对 RCC组织及配对的癌旁组织样本进行MiRNA芯片分析,检测在RCC组织中差异表达的MiRNA;采用qRT-PCR法验证RCC组织及癌旁组织中 miR-125b-2-3p的表达情况;最后研究MiR-125b-2-3p表达水平与RCC发生、发展之间的关系:分析MiR-125b-2-3p在RCC各亚型之间的表达差异;分析MiR-125b-2-3p表达对ccRCC患者预后的影响;分析MiR-125b-2-3p表达与ccRCC患者临床病理资料的联系。

[0017] 所述miR-125b-2-3p在肾癌组织中低表达,这一结果和miRNA芯片结果一致;分析miR-125b-2-3p在RCC各亚型之间的表达差异时发现 miR-125b-2-3p低表达特异性与ccRCC相关;然而,进一步分析 miR-125b-2-3p表达与ccRCC患者临床资料之间的关系时发现,miR-125b-2-3p高表达与ccRCC的远端转移和预后不良相关。

[0018] 本发明进一步提供了一种肾癌亚型分子标志物在制备诊断或检测肾癌亚型试剂或基因检测芯片中的应用。

[0019] 再进一步说,本发明又提供了一种肾癌亚型分子标志物miR-125b-2-3p的应用,应用于研究肾透明细胞转移的影响。

[0020] 首先研究miR-125b-2-3p对肾癌细胞体内、外增殖的影响:

[0021] (1)培养人肾癌细胞系(Caki-1、ACHN、786-0和OS-RC-2)和肾上皮细胞HK-2,用

qRT-PCR法检测肾癌细胞系和HK-2中miR-125b-2-3p的原始表达水平;

[0022] (2) 瞬时转染miR-125b-2-3p模拟物或抑制剂到肾癌细胞系,qRT-PCR 法检验转染效率,MTS法检测细胞体外增殖;

[0023] (3) 利用慢病毒系统构建稳定表达miR-125b-2-3p的肾癌细胞系,裸鼠 皮下成瘤实验检测细胞体内增殖。

[0024] 其次研究miR-125b-2-3p对肾癌细胞体内、外迁移的影响:

[0025] (1) 瞬时转染miR-125b-2-3p模拟物或抑制剂到肾癌细胞系,划痕实验 和Transwell实验研究miR-125b-2-3p对肾癌细胞体外迁移的影响;

[0026] (2) 利用慢病毒系统构建稳定表达miR-125b-2-3p的肾癌细胞系,裸鼠 尾静脉注射实验检测细胞体内转移。

[0027] 功能研究表明上调ccRCC细胞内miR-125b-2-3p表达,显著性促进了 细胞的体外迁移能力和体内肺转移能力;但是miR-125b-2-3p表达对ccRCC 细胞的体内、外增殖没有显著性影响。

[0028] 本发明的优点和有益效果:

[0029] 本发明首次发现了肾透明细胞癌发生发展相关的生物分子标志物 MiR-125b-2-3p,通过检测病人组织和血液中MiR-125b-2-3p的表达,来实 验肾透明细胞癌的早期诊断。

[0030] 本发明首次提供了治疗肾透明细胞癌转移的分子靶标,通过靶向与分 子标志物来治疗转移性肾透明细胞癌具有敏感性和特异性。

[0031] 本发明对肾癌亚型的机制研究提供了一种新的实验方法和理论依据。

## 附图说明

[0032] 图1是qRT-PCR法检测miR-125b-2-3p在肾细胞癌组织中的表达低于 癌旁组织。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析miR-125b-2-3p的表达情况,U6作为内参照 物。

[0033] 图2是miRNA芯片检测3对RCC及其配对的癌旁组织中异常表达的 miRNA。结果发现30个miRNAs在RCC组织中显著性高表达;另有17个 miRNAs的表达水平显著性下调,其中包括miR-125b-2-3p。

[0034] 图3是MiR-125b-2-3p高表达患者的总体生存率显著性高于 miR-125b-2-3p低表达的患者( $P=0.0098$ )。

[0035] 图4是miR-125b-2-3p在肾癌不同亚型细胞中的表达。与HK-2细胞比 较,miR-125b-2-3p在Caki-1和ACHN细胞中显著性高表达,在786-0细 胞中显著性低表达,而在OS-RC-2细胞中,miR-125b-2-3p表达水平没有显 著性变化(A);抑制剂和模拟物能显著性逆转 Caki-1(B)和786-0(C) 细胞中miR-125b-2-3p的表达。结果以均值±标准差表示;\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$

[0036] 图5是miR-125b-2-3p表达对ccRCC细胞增殖没有显著性影响。MTS 实验发现改变 Caki-1和786-0细胞内miR-125b-2-3p的表达对细胞的体外 增殖没有显著性影响(A);裸鼠 体内成瘤实验肿瘤图(B);裸鼠体内成 瘤实验肿瘤体积(C)及重量统计图(D)。

[0037] 图6是miR-125b-2-3p促进ccRCC细胞体外转移。Caki-1细胞瞬时转 染miR-125b-2-3p抑制剂后,细胞的迁移距离显著性低于对照组,786-0细 胞瞬时转染miR-125b-2-3p模 拟物后,细胞的迁移距离显著性高于对照组 (A);Caki-1细胞瞬时转染miR-125b-2-3p抑制

剂后,细胞穿过transwell 小室的能力被显著性抑制;786-0细胞瞬时转染miR-125b-2-3p模拟物后,细胞穿过transwell小室的能力显著性增强(B)。\*\*P<0.01。

### 具体实施方式

[0038] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,以便更明确的阐述其优点 和特点。但实施例仅为范例,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域 技术人员在不偏离本发明的精神和范围下可对本发明的技术方案细节和形 式进行修改或替换,但均属本发明的保护范围。

#### [0039] 1. 细胞培养

[0040] HK-2和ACHN细胞均培养在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中, OS-RC-2和786-0细胞均培养在含有10%胎牛血清的RPMI培养基中;所有细胞的组织学特性和转移能力如表1所示;所有细胞均在37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度细胞恒温培养箱中培养。

#### [0041] 表1 RCC细胞的组织学特性和转移能力

Cell lines	Histological origin	Metastatic capability
[0042] Caki-1	Clear cell carcinoma, derived from skin	High
ACHN	Renal cell adenocarcinoma, derived from pleural effusion	High
786-O	Primary clear cell adenocarcinoma	Low
OS-RC-2	Kidney cancer	Low

#### [0043] 2. QRT-PCR实验

##### [0044] 反转录:

[0045] (1) 在200μl RNase-free离心管中配制下列反转录反应液(表2):

##### [0046] 表2

[0047]	5 × miScript HiSpec Buffer	4 μl
	10 × miScript Nucleics Mix	2 μl
	miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μl
	Template RNA	2 μg
	RNase-free H <sub>2</sub> O	to 20 μl

[0048] (2) 在PCR仪上按下列程序进行反转录反应:37℃ 60min,95℃ 5min。

[0049] 反转录产物-20℃保存或用于后续实验。

[0050] qPCR:以反转录所得的cDNA为模板,用qPCR技术检测分析 miRR-125b-2-3p的表达水平。

[0051] (1) 按照如下qPCR反应体系配置反应液(表3):

##### [0052] 表3

[0053]	2 × Quantitect SYBR Green PCR Master	5 μl
	Mix	
	10 × miScript Universal Primer	1 μl
[0054]	Gene-specific Primer	1 μl
	Template cDNA	1 μl
	RNase-free H2O	to 20 μl

[0055] (2) 反应程序如下：

	95 °C	15 min	
[0056]	94 °C	15 s	} 45 cycles
	59 °C	30 s	
	70 °C	30 s	

[0057] qRT-PCR实验中用到的引物见表4：

[0058] 表4

Gene	Primer sequence
[0059] miR-125b-2-3p	5'-TCACAAGTCAGGCTCTTGGGA-3'
U6	5'-ACGCAAATTCGTGAAGCGTTC-3'

[0060] 3. 结果

[0061] 本发明首次研究miR-125b-2-3p在85对RCC及其配对癌旁组织中的表达情况。结果发现,miR-125b-2-3p在70.6% (60/85) 的RCC组织中的表达水平显著性低于癌旁组织(图1)。这一结果和基因芯片的结果一致(图2, 表5和6)。

[0062] 表5用于miRNA芯片检测的3例RCC患者的临床资料

Variables	Tamples		
	1	2	3
Gender	Female	Male	Male
Age	45	58	69
Side	Right	Right	Left
[0063] Tumor size (cm)	4*3	2.5*3	2.5*2.5
Tumor stage	I-II	I	II
The histology of RCC patient tissues	ccRCC	ccRCC	ccRCC
N Status	N0	N0	N0
Distant metastasis	M0	M0	M0

[0064] ccRCC:Clear cell RCC

[0065] 表6 RCC中异常表达的miRNAs

[0066]

Name	Fold change	Expressed in RCC	P-value	Name	Fold change	Expressed in RCC	P-value
hsa-miR-450b-5p	2.8642	up	0.0181	hsa-miR-451a	4.2475	up	0.0147
hsa-miR-29a-5p	2.1619	up	0.0038	hsa-miR-34a-5p	7.3549	up	0.0062
hsa-miR-320b	2.9334	up	0.0137	bkv-miR-B1-5p	2.8602	up	0.0309
hsa-miR-139-5p	5.9607	up	0.0187	hsa-miR-5571-5p	2.5892	up	0.0317
hsa-miR-3607-3p	3.3017	up	0.0073	hsa-miR-185-5p	2.6226	up	0.0177
hsa-miR-33a-5p	2.5152	up	0.0450	hsa-miR-146a-5p	3.6577	up	0.0219
hsa-miR-24-1-5p	2.1230	up	0.0112	hsa-miR-4454	2.0453	up	0.0441
hsa-miR-486-5p	2.5202	up	0.0191	hsa-miR-3915	2.3994	down	0.0083
hsa-miR-145-3p	3.0145	up	0.0046	hsa-miR-4725-5p	5.5890	down	0.0429
hsa-miR-210-3p	31.5719	up	0.0368	hsa-miR-3201	2.6646	down	0.0467
hsa-miR-181d-5p	3.6926	up	0.0416	hsa-miR-4503	2.8998	down	0.0043
hsa-miR-885-5p	2.2497	up	0.0078	hsa-miR-3120-5p	8.6305	down	0.0436
hsa-miR-144-3p	8.8645	up	0.0081	hsa-miR-5009-5p	2.2970	down	0.0420
hsa-miR-505-3p	3.0574	up	0.0325	hsa-miR-659-5p	6.6298	down	0.0402
hsa-let-7i-3p	3.2889	up	0.0251	hsa-miR-2467-3p	2.5720	down	0.0411
hsa-miR-193a-3p	4.7634	up	0.0073	hsa-miR-200c-3p	19.1741	down	0.0350
hsa-miR-186-5p	3.0548	up	0.0491	cbv-miR-BART6-3p	15.1165	down	0.0220
hsa-miR-99b-5p	3.0469	up	0.0038	hsa-miR-4758-3p	2.0065	down	0.0282
hsa-miR-483-5p	2.6794	up	0.0454	hsa-miR-4677-3p	3.9565	down	0.0224
hsa-miR-222-3p	2.3321	up	0.0419	<b>hsa-miR-125b-2-3p</b>	2.9492	down	0.0106
hsa-miR-140-5p	4.8766	up	0.0498	hsa-miR-4434	5.0828	down	0.0267
hsa-miR-106b-5p	4.6637	up	0.0439	kshv-miR-K12-1-5p	9.7987	down	0.0411
hsa-miR-151a-5p	3.6032	up	0.0281	hsa-miR-4436b-3p	2.3024	down	0.0364
hsa-miR-151b	3.6032	up	0.0281	hsa-miR-891a-5p	3.4064	down	0.0112

[0067] 实施例1:miR-125b-2-3p低表达与ccRCC特异性相关以及和患者预后的关系

[0068] 本研究中所有RCC及配对的癌旁组织均收集于宁波市泌尿肾病医院,经病理检查证实。患者知情并同意样本用于该研究,并且本研究经宁波大学伦理科学委员会批准并实施。

[0069] 结果如下:

[0070] (1) miR-125b-2-3p低表达与ccRCC特异性相关

[0071] 为了研究miR-125b-2-3p表达与RCC亚型之间的关系,我们分析了 miR-125b-2-3p在ccRCC (66例),pRCC (12例)和chRCC (7例)中的表达差异。结果显示,miR-125b-2-3p低表达患者在ccRCC样本中占 53/66 (80.3%),显著性高于另外两种 ( $P=0.001$ ) (表7)。由此可见,miR-125b-2-3p低表达与ccRCC特异性相关。

[0072] 表7 miR-125b-2-3p表达与RCC亚型之间的关联

Variable	No. of patients	miR-125b-2-3p expression		P value
		Low (%)	High (%)	
RCC Tissue	85	60	25	0.001
ccRCC	66	53 (80.3)	13 (19.7)	
pRCC	12	4 (33.3)	8 (66.7)	
chRCC	7	3 (42.9)	4 (57.1)	

[0074] ccRCC:Clear cell RCC;pRCC: Papillary RCC;chRCC:Chromophobe RCC

[0075] (2) MiR-125b-2-3p表达与ccRCC患者预后

[0076] 通过生存分析探究miR-125b-2-3p表达与ccRCC患者预后的关系时发现,miR-125b-2-3p高表达患者的总体生存率显著性低于miR-125b-2-3p低表达的患者 ( $P=0.0098$ , HR:3.595;95%CI:1.361 to 9.497) (图3)。上述结果提示,miR-125b-2-3p高表达显著性影响了ccRCC的发展和预后,



[0077] (3) miR-125b-2-3p高表达促进ccRCC细胞转移

[0078] 我们分析了miR-125b-2-3p表达与ccRCC患者的临床病理参数之间的 关联。如表8所示,患者的肿瘤大小与miR-125b-2-3p表达无关;然而高等 级分级、低分化程度、淋巴转移和远端转移组中含有更多的miR-125b-2-3p 高表达的患者;所占比例分别为9/17 ( $P < 0.001$ ), 9/15 ( $P < 0.001$ ), 11/20 ( $P < 0.001$ ) 和9/14 ( $P < 0.001$ )。由此可见,miR-125b-2-3p高表达促进 ccRCC细胞转移。

[0079] 表8

Variables	Patients	miR-125b-2-3p expression level		P-value
		Low (%)	High (%)	
Age				0.498
≤ 60	30	23 (76.7)	7 (23.3)	
> 60	36	30 (83.3)	6 (16.7)	
Gender				0.478
Male	40	31 (77.5)	9 (22.5)	
Female	26	22 (84.6)	4 (15.4)	
Tumor size (cm)				0.340
≤ 7	43	36 (83.7)	7 (16.3)	
> 7	23	17 (73.9)	6 (26.1)	
Tumor stage				< 0.001
I + II	49	45 (91.8)	4 (8.2)	
III + IV	17	8 (47.1)	9 (52.9)	
Differentiation				< 0.001
Well and moderate	51	47 (92.2)	4 (7.8)	
Low	15	6 (40.0)	9 (60.0)	
N status				< 0.001
N0	46	44 (95.7)	2 (4.3)	
N+	20	9 (45.0)	11 (55.0)	
Distant metastasis				< 0.001
M0	52	48 (92.3)	4 (7.7)	
M1	14	5 (35.7)	9 (64.3)	

[0081] 上述结果表明,miR-125b-2-3p低表达促进了肾透明细胞癌的发生 发展,并且,高表达患者总体生存率显著性高于miR-125b-2-3p低表 达的患者。

[0082] 实施例2:

[0083] MiR-125b-2-3p在影响肾透明细胞癌转移性中的作用及其预后因素分析

[0084] 1. MTS实验:

[0085] 瞬时转染24h后,进行MTS试验。倒掉旧的培养基,PBS漂洗1次; 加入适量0.25%的胰蛋白酶,37℃消化至细胞收回突起变圆或细胞间隙增 大后,立即加入完全培养基终止消化;反复吹打细胞使其脱壁并分散,形 成细胞悬液;吸入15ml离心管,1000r/m离心5min;倒 掉上清液,加入 1ml完全培养基重悬细胞,然后细胞计数后;用完全培养基稀释细胞至 50000个细胞/毫升培养基,然后将细胞加到96孔板中,每孔100μl细胞悬 液,做5个复孔;37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中常规培养,分别在培 养4、24、48、72、96h时,每孔加入20μl MTS试剂(Cell Titer 96® Aqueous One Solution Reagent),继续培养2-4h后,490nm测 吸光值。

## [0086] 2. 划痕实验:

[0087] 瞬时转染24h后,进行细胞划痕试验。倒掉旧的培养基,PBS漂洗1次;加入适量0.25%的胰蛋白酶,37℃消化至细胞收回突起变圆或细胞间隙增大后,立即加入完全培养基终止消化;反复吹打细胞使其脱壁并分散,形成细胞悬液;吸入15ml离心管,1000r/m离心5min;倒掉上清液,加入1ml完全培养基重悬细胞,然后细胞计数后;计数后用完全培养基稀释细胞至 $0.7 \times 10^5$ 个细胞/ml悬液,然后将细胞接种至24孔细胞培养板,1ml/孔,3个重复;37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中常规培养;24h后用蓝色枪头在培养板的每个孔的中央划一条直线,然后用PBS漂洗2次,每孔加入1ml Opti-MEM无血清培养基,在倒置显微镜下采集图像,继续培养24h后,再次采集图像;分析各组细胞从划痕边缘向划痕中央迁移的距离。

## [0088] 3. Transwell实验:

[0089] 瞬时转染24h后,进行Transwell实验。倒掉旧的培养基,PBS漂洗1次;加入适量0.25%的胰蛋白酶,37℃消化至细胞收回突起变圆或细胞间隙增大后,立即加入完全培养基终止消化;反复吹打细胞使其脱壁并分散,形成细胞悬液;吸入15ml离心管,1000r/m离心5min;倒掉上清液,加入1ml Opti-MEM无血清培养基重悬细胞,然后细胞计数后;细胞计数后,用Opti-MEM无血清培养基稀释细胞至 $5.0 \times 10^5$ 细胞/ml,按200μl细胞悬液/孔接种于Transwell板的上室(膜孔径8μm),下室为含20%血清的完全培养基600μl;37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中常规培养;24h后取出Transwell板,用棉签轻轻擦去滤膜上层的细胞,PBS漂洗2次,然后将上室置于0.1%的结晶紫中室温染色20min,PBS漂洗2-3次,晾干后倒置显微镜下拍照;用200μl 33%的乙酸洗掉结晶紫,在570nm波长下测吸光值。

## [0090] 4. 慢病毒包装:

[0091] 用限制性核酸内切酶EcoRI-HF和BamHI-HF双酶切载体质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro,以产生含有EcoRI和BamHI酶切末端的载体,酶切体系如下表9。将上述反应体系混匀后,37℃,酶切3h。然后将上述双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,用于后续酶切载体纯化回收。

[0092] 表9

反应成分	用量
pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro	2 μg
CutSmart Buffer	5 μl
EcoRI-HF	1 μl
BamHI-HF	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	up to 50 μl

[0095] 在紫外灯下从琼脂糖凝胶中切下含有pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro双酶切产物的凝胶,精确称量重量用于纯化回收,具体步骤如下:

[0096] (1) 每100mg琼脂糖凝胶加入100 $\mu$ l Binding Solution,于55 $^{\circ}$ C水浴直至 胶块完全融化,期间每2min间断轻微颠倒混匀;

[0097] (2) 将上述液体转移至套有收集管的吸附柱中,室温静置2min,6000r/m 室温离心60s,取出吸附柱并倒掉收集管中废液;

[0098] (3) 将吸附柱重新放回收集管中,加入500 $\mu$ l WASolution,12000r/m室 温离心60s,倒掉收集管中废液;

[0099] (4) 将吸附柱重新放回收集管中,加入500 $\mu$ l Wash Solution,12000r/m室 温离心60s,倒掉收集管中废液;重复此步骤一次;

[0100] (5) 将吸附柱重新放回收集管中,12000r/m室温离心60s后,打开吸附 柱的盖子,室温放置10min以彻底去除Wash Solution;

[0101] (6) 将吸附柱放入干净的收集管中,对膜中央悬空加入30 $\mu$ l灭菌的双蒸 水,37 $^{\circ}$ C放置2min,12000r/m离心60s,离心管中的液体即为包 含目的DNA片段的溶液。

[0102] 载体DNA与目的DNA片段连接:(1) miRNA前体DNA退火: miR-125b-2-3p前体DNA片 段(含有EcoRI和BamHI酶切末端)由华大基 因合成,溶解前体DNA正、反向序列片段,浓度为 20 $\mu$ M,退火连接,体 系如表10:

[0103] 表10

	反应成分	用量
[0104]	正向序列	5 $\mu$ l
	反向序列	5 $\mu$ l
[0105]	NEB 连接 buffer 4	5 $\mu$ l
	ddH <sub>2</sub> O	35 $\mu$ l

[0106] 将上述退火连接体系置于沸水中,静置恢复到室温,即可形成miR-125b-2-3p 前 体双链DNA;

[0107] (2) pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-EcoRI/BamHI与miR-125b-2-3p前体DNA连 接,体系 如表11。混匀后,18 $^{\circ}$ C过夜连接。

[0108] 表11

	反应成分	用量
[0109]	pCDH-CMV-MCS-EF1-P uro-EcoRI/BamHI	1 $\mu$ l
	miR-125b-2-3p 前体 DNA	7 $\mu$ l
	T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l
	T4 DNA Ligase buffer	1 $\mu$ l

[0110] 转化和涂平板:

[0111] (1) 从-80℃冰箱取出感受态细胞,置于冰上溶化,将连接产物加入到感受态细胞中,轻轻混匀,冰上静置30min;

[0112] (2) 42℃热激90s,然后立即转移至冰上静置2min;

[0113] (3) 将感受态细胞加入到不含氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃、100 rpm摇床培养1h,

[0114] (4) 将菌液均匀涂布在含氨苄青霉素的LB固体培养基,在37℃培养箱中过夜培养。

[0115] 挑取单克隆及提取重组质粒:

[0116] (1) 挑取单菌落,置于含氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃摇床过夜培养;

[0117] (2) 取适量过夜培养的菌液,8000r/m离心60s,弃尽上清,收集菌体;

[0118] (3) 加入Solution,振荡器漩涡振荡,充分悬浮菌体;

[0119] (4) 加入Solution II,立即轻轻颠倒并充分地混匀,使菌体裂解充分直至形成透亮的溶液,然后室温静置2min;

[0120] (5) 加入提前冰浴的Solution III,温和并充分地混合,至形成白色絮状物,室温静置3min,12000r/m室温离心10min;

[0121] (6) 将上清转移到吸附柱中,室温静置3min,6000r/m离心60s,倒掉收集管中废液;

[0122] (7) 向吸附柱中加入Wash Solution,12000r/m室温离心60s,倒掉收集管中废液;重复此步骤一次;

[0123] (8) 倒掉收集管中废液,12000r/m室温离心60s,以彻底去除Wash Solution;

[0124] (9) 向吸附柱的膜中央加入30μl灭菌的双蒸水,37℃静置2min,12000 r/m室温离心60s,离心管中的液体即为包含目的片段的充足质粒。

[0125] 重组质粒鉴定:

[0126] (1) 酶切验证:用EcoRI-HF和BamHI-HF双酶切提取的重组质粒,体系与双酶切载体质粒pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro相同;混匀后37℃酶切3h,琼脂糖凝胶电泳检测;

[0127] (2) 测序鉴定:将经酶切验证的重组质粒送Invitrogen公司测序,以确保构建的重组质粒的准确性

[0128] 慢病毒包装:293T细胞用于慢病毒包装和慢病毒转染786-0细胞及鉴定。

[0129] (1) 在EP管中加入下列成分:8μg构建的载体质粒、6μg Δ8.2质粒、4μg VSVG质粒、66μl 2M CaCl<sub>2</sub>、500μl 2×HBS和ddH<sub>2</sub>O;吹打30次以充分混匀,室温静置2min;

[0130] (2) 滴加入到含293T细胞的100mm dish中,6h后更换为新的完全培养基;

[0131] (3) 继续培养60h,用0.45μm的过滤器过滤培养基,收集慢病毒。

[0132] (4) 786-0细胞生长至对数生长末期时,细胞传代并感染慢病毒。786-0细胞按照1:4的比例传代,并且4ml细胞悬液与2ml慢病毒液混匀,37℃ CO<sub>2</sub>培养箱培养24h,然后更换为新的无血清培养基;继续培养48h后,更换为含有嘌呤霉素的培养基进行细胞筛选。筛选一周后,提取细胞总RNA,用qRT-PCR法鉴定细胞内miR-125b-2-3p的表达水平。

[0133] 5. 裸鼠皮下成瘤实验:

[0134] 选用4周大的裸鼠进行皮下成瘤实验,根据实验需要,设置2组,每组5只裸鼠;用

于裸鼠皮下成瘤实验实验组和对照组细胞消化、离心后,用PBS漂洗2次,然后用PBS重悬,细胞计数后用PBS调整细胞浓度至 $1 \times 10^8$ 个细胞/ml;酒精消毒裸鼠左侧背腹部后肢处皮肤,用一次性无菌注射器将单细胞悬液注入裸鼠皮下,接种量为 $1 \times 10^7$ 个细胞/100 $\mu$ l悬液,对照组裸鼠皮下注射786-0/Control细胞,实验组裸鼠皮下注射稳定表达miR-125b-2-3p的786-0/miR-125b-2-3p细胞;接种细胞后置于宁波大学动物实验中心饲养,每日观察裸鼠生长状况,待肿瘤出现后每2天测量肿瘤块的体积;40天后用颈椎脱臼法处死裸鼠,取出肿瘤块称重、拍照。

[0135] 6. 裸鼠尾静脉注射实验:

[0136] 选用4周大的裸鼠进行尾静脉注射实验,根据实验需要,设置2组,每组5只裸鼠;用于裸鼠皮下成瘤实验实验组和对照组细胞消化、离心后,用PBS漂洗2次,然后用PBS重悬,细胞计数后用PBS调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$ 个细胞/ml;酒精消毒裸鼠尾部皮肤,用一次性无菌注射器将单细胞悬液注入裸鼠尾静脉,接种量为 $1 \times 10^6$ 个细胞/100 $\mu$ l悬液,对照组裸鼠皮下注射786-0/Control细胞,实验组裸鼠皮下注射稳定表达miR-125b-2-3p的786-0/miR-125b-2-3p细胞;接种细胞后置于宁波大学动物实验中心饲养,每日观察裸鼠生长状况,50天后用颈椎脱臼法处死裸鼠,取出裸鼠肺组织观察、统计肺表面的转移结节数量,并拍照。

[0137] 7. 统计分析:

[0138] 用SPSS13.0软件统计分析实验数据。 $P < 0.05$ ,在统计学上有显著性意义。

[0139] 8. 结果:

[0140] (1) MiR-125b-2-3p的表达与ccRCC临床资料之间的关系型分析

[0141] 此外,我们分析了miR-125b-2-3p表达与ccRCC患者的临床病理参数之间的关联。如表12所示,患者的肿瘤大小与miR-125b-2-3p表达无关;然而高等级分级、低分化程度、淋巴转移和远端转移组中含有更多的miR-125b-2-3p高表达的患者;所占比例分别为9/17 ( $P < 0.001$ ), 9/15 ( $P < 0.001$ ), 11/20 ( $P < 0.001$ ) 和9/14 ( $P < 0.001$ )。由此可见,miR-125b-2-3p高表达促进ccRCC细胞转移。

[0142] 表12

Variables	Patients	miR-125b-2-3p expression level		P-value
		Low (%)	High (%)	
Age				0.498
≤ 60	30	23 (76.7)	7 (23.3)	
> 60	36	30 (83.3)	6 (16.7)	
Gender				0.478
Male	40	31 (77.5)	9 (22.5)	
Female	26	22 (84.6)	4 (15.4)	
Tumor size (cm)				0.340
≤ 7	43	36 (83.7)	7 (16.3)	
> 7	23	17 (73.9)	6 (26.1)	
Tumor stage				< 0.001
I + II	49	45 (91.8)	4 (8.2)	
III + IV	17	8 (47.1)	9 (52.9)	
Differentiation				< 0.001
Well and moderate	51	47 (92.2)	4 (7.8)	
Low	15	6 (40.0)	9 (60.0)	
N status				< 0.001
N0	46	44 (95.7)	2 (4.3)	
N+	20	9 (45.0)	11 (55.0)	
Distant metastasis				< 0.001
M0	52	48 (92.3)	4 (7.7)	
M1	14	5 (35.7)	9 (64.3)	

[0144] (2) MiR-125b-2-3p在肾癌不同亚型细胞中的表达

[0145] 我们用qRT-PCR法检测了miR-125b-2-3p在RCC不同亚型细胞中的表达,结果发现,与HK-2细胞相比,miR-125b-2-3p在Caki-1和ACHN细胞中显著性高表达(\*\*\*P<0.001),在786-0细胞中显著性低表达(\*\*\*P<0.001),而在OS-RC-2细胞中,miR-125b-2-3p表达水平没有显著性变化(图4A)。由于Caki-1和786-0都属于肾透明细胞癌细胞,miR-125b-2-3p在Caki-1和786-0中呈现相反的表达模式,在随后的功能学研究中向Caki-1(图4B)和786-0(图4C)细胞分别瞬时转染miR-125b-2-3p的抑制剂和模拟物。在用qRT-PCR法检测转染效率时发现,40nM可以显著性改变细胞内miR-125b-2-3p的水平,后续选用该浓度为实验的瞬时转染浓度。

[0146] (3) MiR-125b-2-3p表达不影响细胞的增殖

[0147] 由于miR-125b-2-3p表达与患者的肿瘤大小无关,我们进行了MTS实验和裸鼠体内成瘤实验以验证miR-125b-2-3p表达对ccRCC细胞增殖的影响。MTS实验发现,miR-125b-2-3p抑制剂和模拟物分别瞬时转染Caki-1细胞和786-0细胞后,对细胞的增殖都无显著性影响(图5A)。体内成瘤实验也发现,稳定高表达miR-125b-2-3p的786-0/miR-125b-2-3p细胞及其对照786-0/Control细胞形成肿瘤的能力没有显著性差异(图5B-D)。这些结果提示,miR-125b-2-3p表达对ccRCC细胞增殖无显著性影响。

[0148] (4) MiR-125b-2-3p促进ccRCC细胞的体外和体内转移

[0149] 为了验证miR-125b-2-3p表达是否影响ccRCC细胞的转移,我们进行了细胞划痕实验和transwell小室实验。结果发现,Caki-1细胞瞬时转染miR-125b-2-3p抑制剂下调其表达后,细胞的迁移能力显著性降低;而用模拟物上调786-0细胞内miR-125b-2-3p表达后,细胞的迁移能力显著性增强(图6A)。同时,transwell小室实验也发现,下调miR-125b-

2-3p表达显著性抑制了Caki-1细胞穿过transwell小室的能力,而上调miR-125b-2-3p表达显著性促进了786-0细胞穿过transwell小室的能力(图6B)。

[0150] 为了进一步研究miR-125b-2-3p对ccRCC细胞转移的调控作用,我们进行了肿瘤细胞体内转移实验。通过尾静脉注射的方法将稳定高表达 miR-125b-2-3p的786-0/miR-125b-2-3p细胞及其对照786-0/Control细胞接种至裸鼠体内,50天后处死小鼠取肺组织,统计分析肺表面的转移结节数目。结果发现,786-0/miR-125b-2-3p组小鼠肺组织表面的转移结节数目显著性高于786-0/Control组。

[0151] 综上所述,miR-125b-2-3p表达可以促进ccRCC细胞的体外和体内转移。

## 序列表

<110> 宁波大学

<120> MiR-125b-2-3p作为鉴别诊断肾癌亚型的分子标志物及其在肿瘤转移中的用途

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

ucacaaguca ggcucuuggg ac 22

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

tcacaagtca ggctcttggg aacgcaaatt cgtgaagcgt tc 42



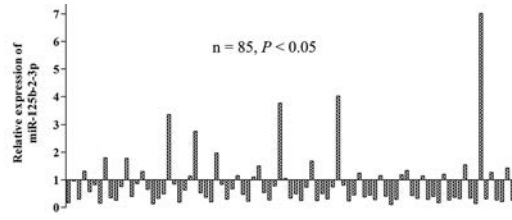


图1

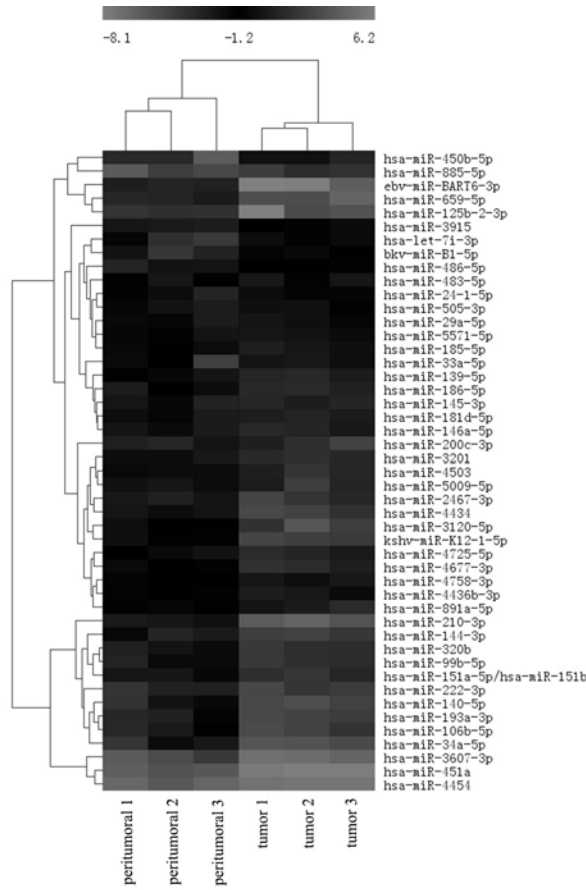


图2

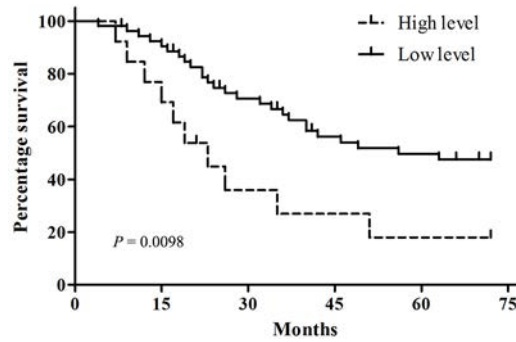


图3

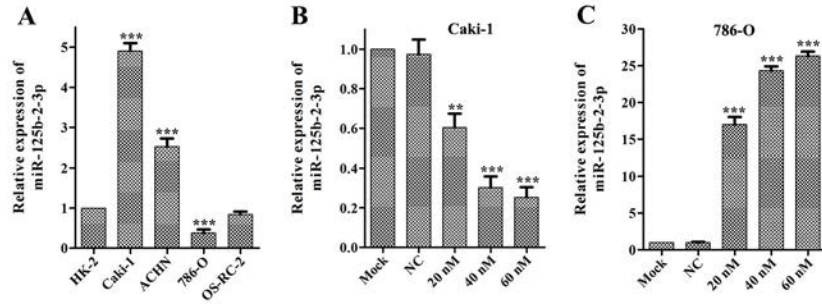


图4

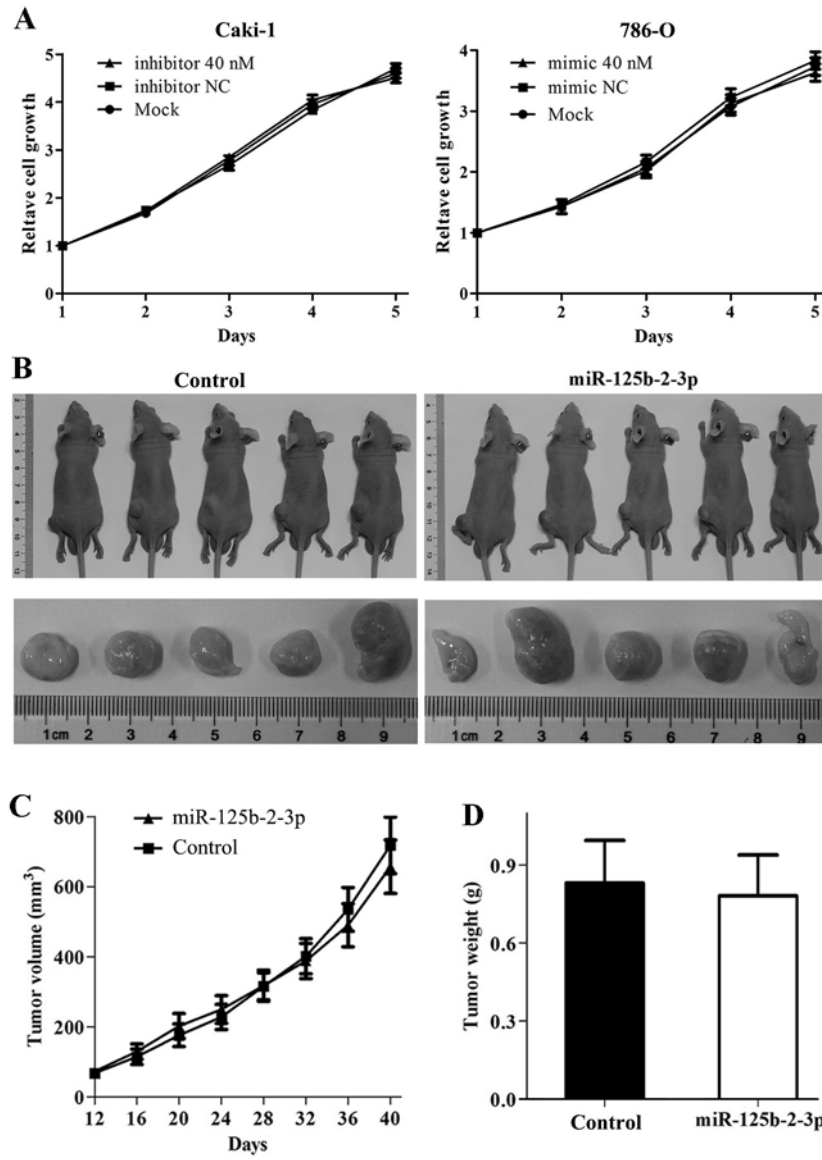


图5

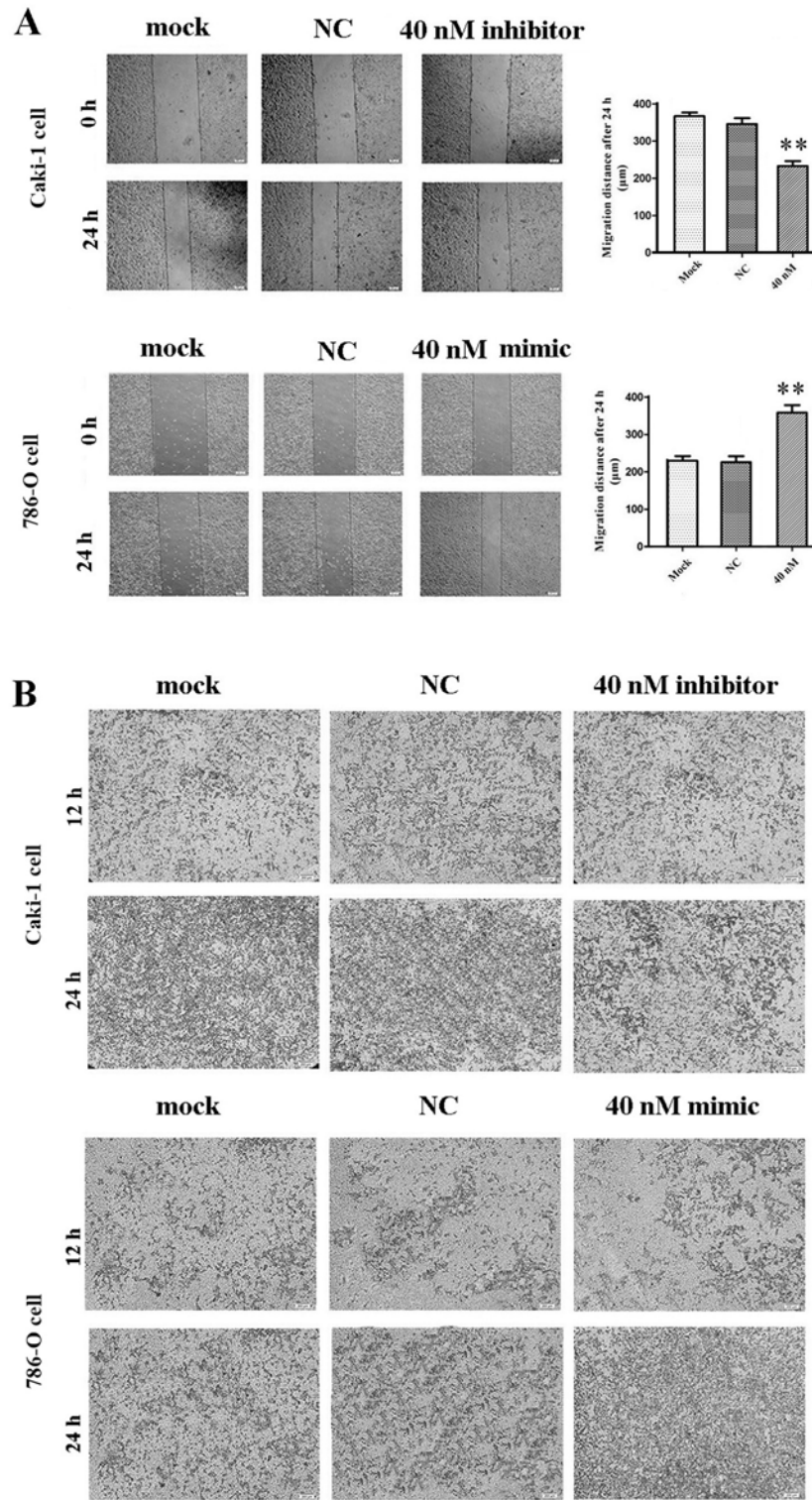


图6