

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.01.0006

•论著•

TRPM8 调控 EMT 促进人肾癌细胞 A498 迁移及侵袭的作用研究

黄维, 陈洁仪, 黄俊勇, 周成宇

(佛山市顺德区第一人民医院肿瘤科, 广东 佛山 528000)

【摘要】目的 探讨瞬时受体电位 M8 (TRPM8)是否通过上皮-间充质转化(EMT)影响人肾癌细胞的侵袭及迁移能力。**方法** 利用荧光定量 PCR 来检测人肾癌细胞 A498、786-0 以及 GRC-1 中 TRPM8 的表达水平;设计并合成靶向 TRPM8 的特异性 shRNA, 通过脂质体转染法转染 TRPM8 表达最高的肾癌细胞 A498 以构建稳定低表达 TRPM8 细胞株, 通过 Western blot 和定量 PCR 来验证 shRNA 的干扰效率;通过 Transwell 法检测干扰后细胞的迁移及侵袭能力, Western blot 法检测 EMT 相关指标 E-cadherin 和 N-cadherin 以及其上游信号分子 Snail 和 WNT-5a 的变化。**结果** TRPM8-shRNA 转染后, 能够有效抑制 A498 细胞中 TRPM8 的表达; Transwell 法检测细胞侵袭能力结果显示, A498 组、Control 组和 shRNA 组的穿膜细胞数分别为 (102.56 ± 11.41) 、 (105.67 ± 10.83) 、 (74.62 ± 8.65) , A498/shRNA 组细胞侵袭能力受到显著抑制 ($F=49.105, P<0.01$); Transwell 法检测细胞迁移能力结果显示, A498 组、Control 组和 shRNA 组的穿膜细胞数分别为 (115.45 ± 10.31) 、 (109.33 ± 7.53) 、 (76.21 ± 13.28) , A498/shRNA 组细胞迁移能力受到显著抑制 ($F=36.168, P<0.01$); Western blot 法结果发现, TRPM8 干扰组细胞的 E-cadherin 表达增加, N-cadherin 的表达降低;此外, TRPM8 干扰组细胞的 Snail 以及 WNT-5a 表达较对照组显著下降。**结论** 运用 RNA 干扰技术能够有效沉默 A498 细胞的 TRPM8 基因, 并诱导其迁移侵袭能力的下降, 其可能的机制是通过调节 EMT 的上游信号分子 Snail、WNT-5a 的表达来调控 EMT, 从而影响肾癌细胞的迁移及侵袭。以上提示 TRPM8 在肾癌的发生发展中起重要作用, 抑制 TRPM8 的表达可能成为一种治疗肾癌的新方法。

【关键词】 TRPM8; 肾癌; 侵袭; 迁移

【中图分类号】 R737.11 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)01—0018—04

Down-regulation of TRPM8 suppresses invasion and migration of human renal carcinoma cell A498 via inhibiting EMT. HUANG Wei, CHEN Jie-yi, HUANG Jun-yong, ZHOU Cheng-yu. Department of Oncology, the First People's Hospital of Shunde District of Foshan, Foshan 528000, Guangdong, CHINA

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of down-regulation of TRPM8 on the invasion and migration of renal carcinoma cells A498. **Methods** The expression of TRPM8 in human renal carcinoma cell A498, 786-0 and GRC-1 were detected by fluorescence quantitative PCR. shRNA targeting TRPM8 was designed and synthesized, and then transfected into the A498 cells via Lipofectamine 2000 mediation. The interference efficiency of shRNA was evaluated by Western blot and quantitative PCR. The migration ability and invasion ability of A498 were detected by using transwell assay. Expression of E-cadherin, N-cadherin, WNT-5a and Snail were detected by using Western blot. **Results** TRPM8-targeted shRNA could down-regulate the TRPM8 expression of A498. Transwell Cell number of invasion was (102.56 ± 11.41) , (105.67 ± 10.83) , (74.62 ± 8.65) in A498 group, control group and shRNA group, respectively, which indicated that cell invasion ability were significantly inhibited in shRNA group ($F=49.105, P<0.01$). Transwell Cell number of migration was (115.45 ± 10.31) , (109.33 ± 7.53) , (76.21 ± 13.28) in A498 group, control group and shRNA group, respectively, which indicated that cell migration ability were significantly inhibited in shRNA group ($F=36.168, P<0.01$). In addition, the expression of E-cadherin was increased, while that of N-cadherin, WNT-5a and Snail was decreased in shRNA interference group. **Conclusion** Down-regulation of TRPM8 can induce inhibition of invasion and migration in human renal carcinoma cells A498 via regulating epithelial mesenchymal transitions (EMT), specifically, the upstream signal molecule Snail, WNT-5a of EMT. It could be regarded as a novel target for clinical diagnosis and gene therapy for renal carcinoma.

【Key words】 TRPM8; Renal carcinoma; Invasion; Migration

肾癌(Renal carcinoma)是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一,其中大部分是肾细胞癌(Renal cell carcinoma),目前肾癌有逐年增加的趋势,且早期诊断较为困难,相当一部分患者在就诊时已处于中晚期,临幊上主要以手术治疗为主,但往往疗效不佳^[1-2]。因此,迫切需要寻找新的方法提高肾癌患者的生存期。随着分子生物学的飞速发展,分子靶向治疗已成为当今肾癌防治研究的热点,目前应用于临幊的有索拉非尼及舒尼替尼^[3]。瞬时受体电位 8 (TRPM8) 是瞬时受体电位(Transient receptor potential, TRP)家族中的一員,可通过介导钙离子内流参与多种生理及病理过程。已有研究表明其与多种肿瘤发生发展密切相关^[4]。此外,上皮细胞-间充质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤转移中也发挥了重要作用^[5]。本研究拟利用特异性 shRNA 转染肾癌离体细胞株 A498 以构建 TRPM8 低表达的稳定细胞株,观察 TRPM8 基因下调后对 A498 迁移及侵袭的影响以及 EMT 相关指标的表达变化,初步探讨 TRPM8 基因在肾癌细胞中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人肾癌细胞 A498、786-0 以及 GRC-1 购自于中科院上海细胞库。四株细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 中,并置于 5% 二氧化碳以及 37℃ 细胞培养箱内培养。

1.2 TRPM8 特异性 shRNA 和转染 TRPM8 shRNA 购自美国 Santa Cruz 公司(Cat. sc-95009-SH)。采用脂质体转染技术,具体操作流程参照英韦创津公司的 Lipofectamine2000 产品说明书。48 h 后加入筛选抗生素 G418,浓度为 400 μg/ml,维持培养 6 d 后 G418 浓度改为 200 μg/ml; 细胞扩增后提取蛋白和 RNA,进行 RT-PCR 和 Western blot 鉴定。

1.3 荧光定量 PCR 采用 TGuide RNA 提取试剂盒(Tiangen 公司)提取 RNA。逆转录反应则采用 TAKARA 的 PrimeScript™ II Reverse Transcriptase 试剂盒。引物序列如下:TRPM8 正义链:5'-TATCT-TACTAACACCTGTAGTCCCAG-3', TRPM8 反义链:5'-TGAGTTATAGTGTATTCAAAGCTGAGAA-3' (256 bp);GAPDH 正义链:5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3', GAPDH 反义链:5'-CGCTCCTGGAAGAT-GGTGAT-3' (232 bp)。实验重复 3 次。

1.4 Western blot 将约 1×10^7 个细胞加至蛋白裂解液,冰上静置 30 min,低温离心 20 min (转速 12 000 r/min),提取上清。应用 BCA 定量法计算蛋白的浓度。取 60 μg 总蛋白跑胶(恒压 100 V)。电

转膜 30 min。含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h。一抗 4℃ 冰箱过夜,二抗孵育 1 h 后显影。TRPM8、E-cadherin、N-cadherin、WNT-5a、Snail 以及 GAPDH 抗体均购自美国 Santa cruz 公司。

1.5 Transwell 法检测细胞的迁移能力 首先将 Transwell 小室放进 24 孔板里,然后将稳定转染 TRPM8 或阴性对照序列的细胞用胰蛋白酶消化,用不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基洗涤细胞 3 次,随之将细胞重悬,每孔加入 100 μl 细胞悬液,在小室的下层加入 500 μl 1% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在培养箱中放置 24 h。最后取出小室,弃掉培养基,使用棉签轻轻擦去小室内的残余细胞。甲醛固定并结晶紫染色。显微镜下观察,随机选取 8 个视野进行细胞计数。

1.6 Transwell 法检测细胞的侵袭能力 方法同上,但与迁移实验有所区别的是,在上室的聚碳酸酯膜之上还要铺上一层基质胶,用以模拟体内 ECM,细胞进入下室之前,必须先将基质胶降解。随机选取 8 个视野进行细胞计数。

1.7 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。Transwell 侵袭实验采用析因设计方差分析比较各组间差异; 荧光定量 PCR 实验采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较各组间差异。以 $P < 0.05$ 界定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾癌细胞中 TRPM8 的表达 四株肾癌细胞中,A498 的 TRPM8 表达水平最高(以此为参照),而 786-0 以及 GRC-1 细胞的相对表达水平分别为 (0.35 ± 0.06) 和 (0.64 ± 0.05) 。故选择 A498 作为研究对象以作下一步实验,见图 1。

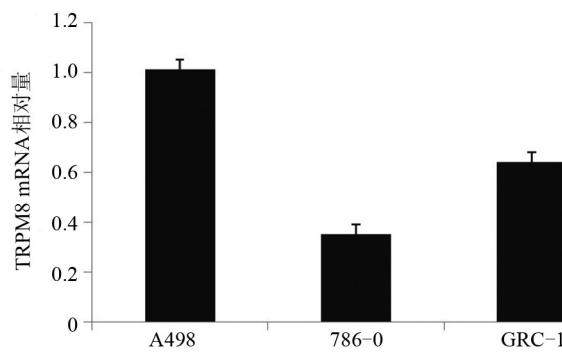


图 1 TRPM8 mRNA 在 3 株肾癌细胞中的表达水平

2.2 shRNA 抑制 A498 细胞中 TRPM8 的表达 A498 细胞经特异性 shRNA 转染筛选后,Western blot 和荧光定量 PCR 结果显示 TRPM8 的蛋白水

平及核酸水平表达均较对照组显著下调($F=103.65, P<0.01$)，提示 TRPM8 表达下调的 A498 细胞株构建成功，命名为 A498/shRNA，并用于下一步实验，见图 2。

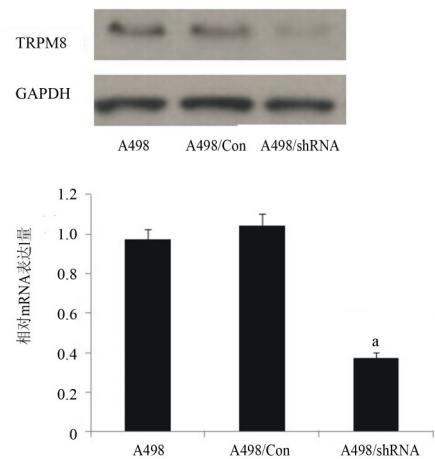


图 2 shRNA 显著抑制 A498 细胞的 TRPM8 表达

注：与对照组(A498/Con)比较，^a $P<0.01$ 。

2.3 TRPM8 基因沉默后 A498 细胞的迁移能力变化 研究结果提示：A498 组、对照组(A498/Con)组和 A498/shRNA 组的穿膜细胞数分别为(115.45±10.31)、(109.33±7.53)、(76.21±13.28)。与对照组比较，A498/shRNA 组细胞迁移能力受到显著抑制($F=36.168, P<0.01$)，见图 3。

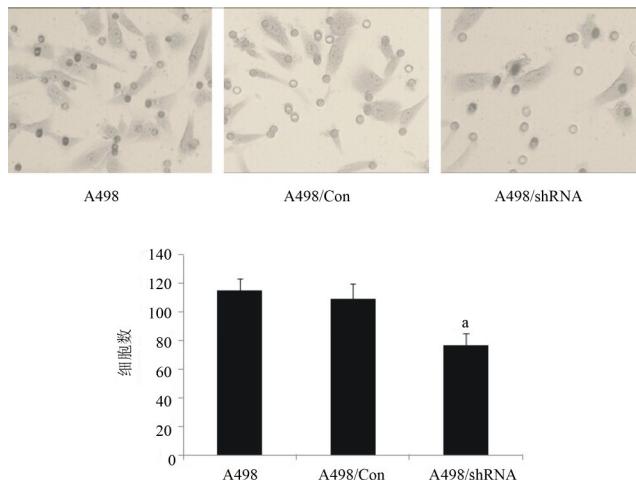


图 3 TRPM8 对细胞体外迁移能力的影响：上图为显微镜下各组细胞的观察；下图为各组中侵袭细胞的数目比较

注：与对照组(A498/Con)比较，^a $P<0.01$ 。

2.4 TRPM8 下调后 A498 细胞的侵袭能力变化 研究结果提示(图 4)，A498 组、对照组(A498/Con)组和 A498/shRNA 组的穿膜细胞数分别为(102.56±11.41)、(105.67±10.83)、(74.62±8.65)。与对照组比较，A498/shRNA 组细胞侵袭能力受到显著抑制($F=49.105, P<0.01$)。

2.5 TRPM8 基因沉默后 A498 细胞的 E-cad-

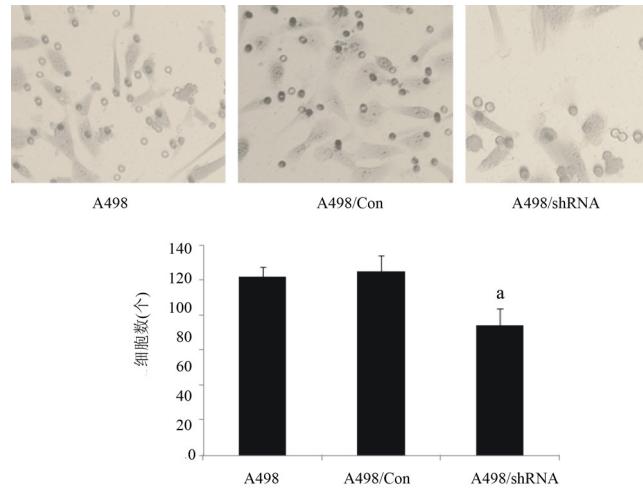


图 4 TRPM8 对细胞体外侵袭能力的影响：上图为显微镜下各组细胞的观察；下图为各组中侵袭细胞的数目比较

注：与对照组(A498/Con)比较，^a $P<0.01$ 。

herin、N-cadherin、Snail 以及 WNT-5a 表达情况 通过 Western blot 检测发现(图 5)，A498/shRNA 组的 E-cadherin 表达显著增加，而 N-cadherin 的表达显著降低；此外，TRPM8 干扰组细胞的 Snail、WNT-5a 表达较对照组显著下降。结果提示 TRPM8 可能通过调节 Snail 和 WNT-5a 两种上游信号因子来调控 EMT 的发生。

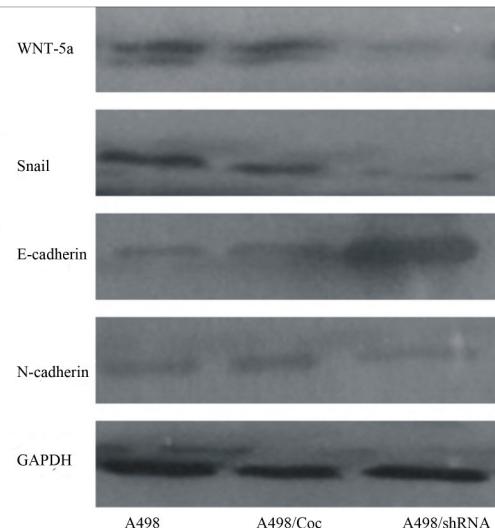


图 5 TRPM8 基因敲除对 A498 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Snail 以及 WNT-5a 表达的影响

3 讨论

肾癌与前列腺癌和膀胱癌并称泌尿系统三大恶性肿瘤，占所有男性恶性肿瘤的 3%。据流行病学报告，在美国每年将会新发 31 500 例肾癌病例^[2]。我国目前虽无准确的发病统计，但据 20 世纪 90 年代我国居民死因构成统计，肾肿瘤的死亡率约为 0.32/10 万人^[6]。有研究表明细胞内钙离子水平与肿瘤细胞恶性程度密

切相关,TRP 可通过介导钙离子内流来调节肿瘤细胞的生物学行为,TRPM8 作为 TRP 家族中的一员,已被证实实在前列腺癌、舌癌及肝癌等多种肿瘤中高表达,并与预后密切相关目前研究已证实^[7-11]。本研究结果表明,在肾癌中 TRPM8 是高表达的;成功构建 TRPM8 低表达的细胞株后,发现该组细胞的迁移及侵袭能力较对照组显著下降。因此,我们推测 TRPM8 基因是肾癌的促转移相关基因。

EMT 作为上皮源性肿瘤发生发展过程中的重要步骤,与肿瘤浸润及转移密切相关,其主要特征为上皮标志物 E-cadherin 表达的减少,间质标志物 N-cadherin 表达的增加^[12-13]。Snail 是 E-cadherin 的主要调节因子,可通过与 Smad 相互作用蛋白(SIP1)竞争性结合 E-cadherin 蛋白启动子区的 E-box 连接基序,抑制 E-cadherin 的表达,从而诱导 EMT 发生^[14]。已有研究表明,Snail 的表达在转录和转录后水平受到 PI3K/AKT 通路的直接调控,而 TRPM8 能直接活化 PI3K/AKT 通路^[15-16]。因此,我们推测 TRPM8 是否通过调节 Snail 来调控 E-cadherin 的表达水平,从而推动 EMT 的发生。

我们进一步研究结果显示,肾癌细胞在 TRPM8 下调后,Snail 分子的表达水平较对照组显著降低,而 E-cadherin 表达显著增加,N-cadherin 表达则显著下降,提示了 TRPM8 与肾癌细胞 EMT 密切相关,其部分机制可能为 TRPM8 通过对 Snail 因子的调控,从而影响 E-cadherin 的表达水平。然而,值得注意的是,EMT 的调节涉及多条信号通路,且这些信号通路之间可能还存在着相互作用(Cross-over)。WNT 通路是目前研究得比较深入的与 EMT 密切相关的信号通路^[17]。为了进一步明确 TRPM8 对 EMT 的调节作用,我们还检测了 WNT 通路的关键调节因子 WNT-5a 的表达,发现 TRPM8 下调后,WNT-5a 蛋白表达亦受到明显抑制,这提示了 TRPM8 对 EMT 的调控可能也与 WNT 通路相关。

综上所述,本研究探讨了 TRPM8 与 EMT 及肾癌细胞迁移侵袭之间的相互关系,发现 TRPM8 可通过调控 EMT 的发生影响肾癌细胞的迁移及侵袭,其可能机制为调节 EMT 上游通路分子 Snail 及 WNT-5a。这为

进一步揭示 TRPM8 基因与肾癌的关系提供新的实验依据,为探讨肾癌转移的分子机制提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Albiges L, Choueiri T, Escudier B, et al. A systematic review of sequencing and combinations of systemic therapy in metastatic renal cancer [J]. Eur Urol, 2014, 22(1): 243-248.
- [2] Ridge CA, Pua BB, Madoff DC. Epidemiology and staging of renal cell carcinoma [J]. Semin Intervent Radiol, 2014, 31(1): 3-8.
- [3] Kanesvaran R, Tan MH. Targeted therapy for renal cell carcinoma: The next lap [J]. J Carcinog, 2014, 13(1): 341-345.
- [4] Han H, Yi F. New insights into TRP channels: Interaction with pattern recognition receptors [J]. Channels (Austin), 2013, 8(1): 671-673.
- [5] Lamouille S, Xu J, Deryck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178-196.
- [6] 赵振威,李延江.肾细胞癌流行病学的研究进展[J].山东医药,2013,7(1): 95-97.
- [7] Defalco J, Dunton MA, Emerling D. TRPM8 biology and medicinal chemistry [J]. Curr Top Med Chem, 2011, 11(17): 2237-2252.
- [8] Voets T, Owsianik G, Nilius B. TRPM8 [J]. Handb Exp Pharmacol, 2007, 15(179): 329-344.
- [9] Zhang L, Barritt GJ. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? [J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(1): 27-38.
- [10] 潘 娴,吴煌农,傅 振,等. TRPM8 在舌癌组织及 Tca8113 中的表达及其意义[J]. 口腔生物医学, 2010, 3(1): 120-123.
- [11] 刘杰锋. TRPM8 在原发性肝细胞癌组织中的表达及临床意义 [D]. 中南大学, 2010.
- [12] Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis [J]. Genes Dev, 2013, 27(20): 2192-2206.
- [13] Schramm HM. Should EMT of cancer cells be understood as epithelial-myeloid transition? [J]. J Cancer, 2014, 5(2): 125-132.
- [14] Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 116(1): 317-336.
- [15] Wu Y, Zhou BP. Snail: More than EMT [J]. Cell Adh Migr, 2010, 4 (2): 199-203.
- [16] Riaz A, Ilan N, Vlodavsky I, et al. Characterization of heparanase-induced phosphatidylinositol 3-kinase-AKT activation and its integrin dependence [J]. J Biol Chem, 2013, 288(17): 12366-12375.
- [17] Ramani VC, Purushothaman A, Stewart MD, et al. The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies [J]. FEBS J, 2013, 280(10): 2294-2306.

(收稿日期:2014-06-29)