

miR-145 在胃癌中的表达及其临床意义

杨学文, 高峰, 滕凤猛(江苏省中医院/南京中医药大学附属医院检验科, 南京 210029)

【摘要】 目的 探讨 miR-145 在胃癌中的表达及其临床意义。**方法** 选取 2011 年 2 月至 2012 年 6 月江苏省中医院就诊的 67 例胃癌患者, 采用荧光实时定量聚合酶链反应(PCR)技术检测胃癌患者 miR-145 的表达情况, 取肿瘤边缘外 5 cm 处的非癌胃黏膜作为对照, 比较 miR-145 在正常组织及胃癌组织中的表达差异及与胃癌临床病理参数的相关性。**结果** 54 例(80.60%)胃癌患者胃癌组织 miR-145 表达明显低于正常组织, miR-145 的表达在不同性别、年龄及 TNM 分期患者间的差异无统计学意义($P>0.05$), 但在不同组织学分级及淋巴结转移情况患者间的差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** miR-145 在胃癌中呈低表达, 可能与胃癌的发生、发展密切相关, 可成为胃癌诊断及预后判断的指标。

【关键词】 miR-145; 胃癌; 实时定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.07.015 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)07-0896-02

Expression of miR-145 in gastric carcinoma and its significance YANG Xue-wen, GAO Feng, TENG Feng-meng (Clinical Laboratory, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medical/Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression status and clinical significance of miR-145 in gastric carcinoma. **Methods** miR-145 levels in 67 patients with gastric carcinoma were detected by using quantitative real-time fluorescent polymerase chain reaction. The relationship between miR-145 expression and clinicopathological factors of gastric carcinoma was analyzed. **Results** 54 patients were with low expression level of miR-145 in the 67 patients, accounting for 80.60%, and the expression level of miR-145 in gastric carcinoma tissue samples was significantly lower than normal tissues. miR-145 expression level was not associated significantly with age and gender of patients, and TNM staging ($P>0.05$), but closely correlated with histology grading and lymphatic metastasis ($P<0.01$). **Conclusion** The expression level of miR-145 might be low in patients with gastric carcinoma, which could be correlated with the pathogenesis and development of diseases, and could be the indicator of diagnosis and prognosis of gastric carcinoma.

【Key words】 miR-145; gastric carcinoma; quantitative real-time polymerase chain reaction

胃癌患者就诊时多数已处于进展期, 其早期病变确诊率不足 10%^[1]。胃癌的发生通常是一个多步骤、涉及多因素的过程, 其机制可能与某些胃癌相关基因的改变有关。microRNAs (miRNA) 为内源性非编码单链小分子 RNA, 长度约为 19~24 nt, 其异常表达可能参与肿瘤的发生、发展, 可作为肿瘤早期诊断及判断预后的指标^[2]。目前已有研究证实 miR-145 在膀胱癌、宫颈癌、肺癌、肝癌及乳腺癌中均有不同程度的表达下调。本研究通过比较 miR-145 在正常组织及胃癌组织中的表达差异及与胃癌临床病理参数的相关性, 探讨 miR-145 作为胃癌早期诊断的预测价值。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选择 2011 年 2 月至 2012 年 6 月本院就诊的 67 例胃癌患者, 均经胃镜检查及活检病理证实。所有患者术前均未接受放疗、化疗以及其他针对肿瘤的特殊治疗, 其中男 41 例, 女 26 例, 年龄 33~81 岁, 平均 61.2 岁。TNM 分期以 UICC 2010 年第 7 版为标准。取肿瘤边缘外 5 cm 处的非癌胃黏膜作为对照, 所有组织标本均置于液氮保存。

1.2 试剂 用于 RNA 提取的 Trizol 购自 Invitrogen 公司, RNA 反转录试剂盒及 SYBR 购自 Takara 公司, miR-145 和 U6 引物由生物工程(上海)股份有限公司加工合成。

1.3 方法 取胃癌和胃癌肿瘤边缘外 5 cm 正常组织各 100

mg 用 1 mL Trizol 浸泡, 匀浆器捣碎, 经氯仿分离, 异丙醇沉淀, 75%乙醇清洗, 离心后用焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解, 使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计测定浓度后, 记录 $A_{260/280}$ 后 -80℃保存。采用 Takara 公司反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA(miR-145 和 U6), 总体积为 10 μ L, RNA 总量小于 500 ng, 37℃孵育 15 min(85℃孵育 5 s)。荧光实时定量聚合酶链反应(PCR)总体积为 20 μ L, cDNA 总量小于 100 ng, SYBR 10 μ L, 上游引物 10 μ mol, 下游引物 10 μ mol, 起始模板变性 95℃1 min, PCR 循环中 95℃10 s, 60℃40 s, 40 个循环。所有样品设置 3 个复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-145 和 U6 的相对表达量, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-145} - Ct_{U6})_{胃癌} - (Ct_{miR-145} - Ct_{U6})_{正常}$ 。miR-145 和 U6 的反转录引物及上下游引物见表 1。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-145 在胃癌及正常组织的表达 67 例胃癌组织标本中仅有 13 例 miR-145 表达量高于正常组织, 仅占 19.40%, 其他 54 例(80.60%)标本中的表达明显低于正常组织, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

表 1 miR-145 和 U6 相关引物

miRNAs	引物(5'-3')
miR-145	反转录引物:GTCGTATCCAGTGC GTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACAGGGATT
	上游引物:CAGTGCGTGTCGTGGAGT
	下游引物:AGGTCCAGTTTCCAGG
U6	反转录引物:CGCTTCACGAATTTGCGTGT CAT
	上游引物:GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	下游引物:CGCTTCACGAATTTGCGTGT CAT

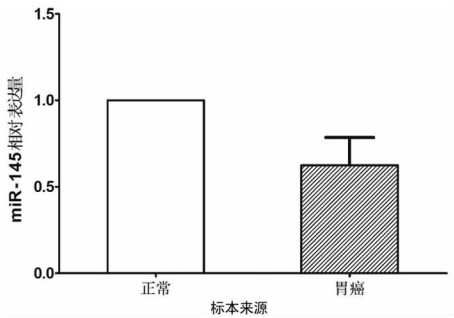


图 1 miR-145 在胃癌和正常组织中的表达

2.2 miR-145 与胃癌临床病理的相关性 miR-145 在胃癌患者的性别、年龄及不同 TNM 分期中表达差异无统计学意义 ($P>0.05$),但是与胃癌患者的组织学分级 ($\chi^2=18.135, P<0.01$)及淋巴结转移情况 ($\chi^2=31.146, P<0.01$)密切相关,见表 2。

表 2 miR-145 与胃癌临床病理的相关性 (n)

病理参数	n	miR-145		P
		高表达	低表达	
性别	男	41	7	0.545
	女	26	6	
年龄(岁)	≥55	38	9	0.310
	<55	29	4	
组织学分级	高中分化	27	12	<0.01
	低分化	40	1	
TNM 分期	I / II	24	7	0.235
	III / IV	43	6	
淋巴结转移	是	49	1	<0.01
	否	18	12	

3 讨 论

目前有研究证实 miR-145 可以通过抑制癌基因表达,阻滞细胞周期相关蛋白表达和促进肿瘤细胞的凋亡以达到抑制肿瘤生长的作用。miR-145 可以靶向 c-MYC、肾素血管紧张素系统(RAS)等多种癌基因,抑制癌基因的表达,从而发挥其抑制肿瘤细胞生长的作用[3-4]。

目前对于 miRNA 在肿瘤中表达的检测方法存在多样性,张晴等[5]采用原位分子杂交法,检测 91 例人乳腺癌与 38 例乳腺良性病变中 miR-145 表达情况。Schepeler 等[6]采用基因芯片技术对 49 例结肠癌的 miRNA 谱进行了分析,发现结肠癌组织中 miR-145 表达水平明显低于周围正常组织。本研究采用 miRNA 茎环结构设计 miR-145 反转录及实时定量 PCR 引物进行扩增,观察其在组织中的表达情况。该方法具有简便、灵敏及快速的优点,miR-145 在 54 例标本中表达显著低于其在正常组织中的表达,与龚文容等[7]在结直肠癌中观察到的 miR-145 表达情况一致。

miR-145 在多种肿瘤中呈低表达,但是不同肿瘤或相同肿瘤不同学者的研究发现,miR-145 与临床病理参数的相关性存在差异。师婕和张林燕[8]采用实时定量 PCR 检测宫颈鳞癌 miR-145 的表达情况,发现Ⅲ~Ⅳ期与Ⅰ~Ⅱ期以及在宫颈鳞癌高、中分化与低分化组中 miR-145 的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。褚以忞等[9]的研究发现 miR-145 与胃癌患者的性别、年龄、肿瘤浸润深度以及淋巴结转移均无显著性相关。然而,在本研究中 miR-145 与胃癌患者组织学分级以及淋巴结转移间具有显著相关性 ($P<0.05$),这可能与胃癌患者的选择、数量有关,也与实时定量 PCR 中引物的设计、内参的选择、扩增的条件等因素密切关系。

综上所述,本研究初步证实了 miR-145 在胃癌患者中表达呈下调,可能与胃癌的发生、发展具有密切关系,为胃癌细胞进行 miR-145 的相关功能学研究及可能的信号调控通路研究提供了一定的基础,为胃癌靶向治疗提供了新的靶点。

参考文献

[1] Archie V, Kauh J, Jones DV, et al. Gastric Cancer: standards for the 21st century[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 57(2): 123-131.

[2] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines Cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(7): 2257-2261.

[3] Sachdeva M, Zhu S, Wu F, et al. P53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(9): 3207-3212.

[4] Kent OA, Chivukula RR, Mullendore M, et al. Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway[J]. Genes Dev, 2010, 24(24): 2754-2759.

[5] 张晴, 吴正升, 张瑰红, 等. Mir-145 在乳腺癌中表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(1): 9-12.

[6] Schepeler T, Reinert JT, Ostensfeld MS, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon Cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6416-6424.

[7] 龚文容, 卢晓明, 陈志松, 等. miR-145 在结直肠癌组织的表达及临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(1): 35-36.

[8] 师婕, 张林燕. 宫颈鳞癌患者组织中 miR-145 的表达及意义[J]. 疑难病杂志, 2013, 12(5): 359-361.

[9] 褚以忞, 彭海霞, 李吉, 等. miR-145 在胃黏膜癌变中的表达及其意义[J]. 胃肠病学, 2013, 18(1): 45-47.