

miR-155在子宫内膜癌组织中的表达及其临床意义

刘伏香 谭志琴 龙丹 戈立东*

解放军169医院妇产科, *病理科, 湖南衡阳421002

[摘要] **背景与目的:** MicroRNAs是一类19~25 bp内源非编码的小分子RNA, 能通过靶向抑制基因的转录和翻译水平。本研究旨在探讨hsa-miR-155(Homo sapiens miR-155, miR-155)在子宫内膜癌患者组织中的表达及其临床意义。**方法:** 收集2007年9月—2009年12月子宫内膜癌患者手术标本66例, 癌旁组织标本作为正常对照, 并取其表达水平为1, 应用原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)及实时荧光定量PCR(real time quantity PCR, qRT-PCR)检测子宫内膜癌患者组织及癌旁组织中miR-155的表达水平, miR-155表达与子宫内膜癌临床病理参数及临床分期之间的关系, 并分析miR-155表达与患者预后关系。**结果:** ISH结果显示, 在66例子官内膜癌组织中miR-155阳性表达率为84.85%, 与癌旁对照组18.18%相比, 差异有统计学意义($\chi^2=58.72$, $P<0.01$); qRT-PCR结果显示, 临床I/II、III/IV子宫内膜癌患者组织miR-155表达水平为(4.54±0.55)、(7.93±0.88)倍, 差异有统计学意义($t=13.51$, $P<0.01$); 有、无盆腔淋巴结转移子宫内膜癌患者组织miR-155的表达水平分别为(9.56±0.86)、(5.49±0.47)倍, 差异有统计学意义($t=15.12$, $P<0.01$); 高、中、低分化子宫内膜癌组织中miR-155表达水平分别为(6.42±0.63)、(6.97±0.59)、(6.27±0.46)倍, 差异均无统计学意义($t=0.412$, $P>0.05$); Kaplan-Meier生存分析显示, miR-155表达越高患者生存率越低($P=0.001$)。**结论:** miR-155与子宫内膜癌的发生、进展及淋巴结转移等密切相关, 对子宫内膜癌潜在的治疗靶点及预后判断具有重大意义。

[关键词] 微小RNA; 子宫内膜癌; 临床意义; 预后分析

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2011.09.006

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2011)09-0684-04

Expression and its clinical significance of miR-155 in tissues of endometrial cancer LIU Fu-xiang, TAN Zhi-qin, LONG Dan, GE Li-dong (Department of Obstetrics and Gynecology, the 169th Hospital of PLA, Hengyang Hunan 421002, China)

Correspondence to: TAN Zhi-qin E-mail: tzq169@yahoo.com.cn

[Abstract] **Background and purpose:** MicroRNAs are 19- to 25-nucleotide noncoding RNA molecules that regulate gene expression at the level of transcription and translation. This study investigated the expression of the miR-155 in tissue of endometrial cancer and its clinical significance. **Methods:** We collected the 44 cases tissue specimens and paracancerous tissues from September 2007 to December 2009, ISH and qRT-PCR was used to detect the miR-155 expression in those specimens. **Results:** ISH was used to detect the positive expression rate of the miR-155 was 18.18% in control and 84.85% in endometrial cancer. The real time quantity PCR detect the the expressions of the miR-155 were (4.54±0.55), (7.93±0.88) times in stage I - II and III -IV endometrial cancer, respectively, the difference was statistically significant ($P<0.01$), the expressions of miR-155 were (9.56±0.86), (5.49±0.47) times in endometrial cancer of lymph node metastasis and without lymph node metastasis. The difference was statistically significant ($P<0.01$). The expression of miR-155 were not associated with differentiation degree, the difference was not statistically significant($P>0.05$). The higher mortality with the higher expression of miR-155 from Kaplan-Meier survival curves. **Conclusion:** miR-155 may play an important role in the carcinogenesis, and metastasis of endometrial cancer, and it could be an indicator in the diagnosis and prognosis of endometrial cancer. miR-155 can be used as a potential target of therapy and a predictive biomarker.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No: 31000629)。

通信作者: 谭志琴 E-mail:tzq169@yahoo.com.cn

[Key words] miRNA; Endometrial cancer; Clinical significance; Prognosis analysis

微小RNA (miRNA)是长度约为21~25个核苷酸的小分子非编码RNA,能够在转录后水平调控蛋白合成,几乎参与了调控细胞活动的各个环节。多数miRNA具有高度保守性、时序性、组织细胞特异性,受到发育和空间的调控,并参与细胞的分化、增殖和死亡。组织中某种或某些miRNA的表达失常,细胞内许多起重要作用的瘤基因或抑瘤基因就会受到异常调控而表达失常,从而导致肿瘤的发生。有研究表明,miR-155在肺癌、乳腺癌和胰腺癌等组织和细胞中呈高表达^[1-4]。谭志琴等^[5]报道,miR-155在子宫内膜癌患者血清中呈高表达,本研究采用ISH和qRT-PCR技术,探讨miR-155在子宫内膜癌与癌旁组织中的表达差异,miR-155表达与子宫内膜癌分化程度、临床分期以及有无淋巴结转移之间的关系,同时对其进行预后分析,为进一步揭示子宫内膜癌发病机制和寻找治疗方法提供依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选择2007年9月—2009年12月解放军169医院收治的66例子宫内膜癌患者手术标本,术前均未接受放疗及化疗,且经病理诊断证实。患者平均年龄为56岁;手术分期:按2009年国际妇产科联盟(FIGO)的分期标准,I期17例、II期22例、III期18例、IV期9例;病理分化程度:高分化26例、中分化21例、低分化19例;病理类型:子宫内膜样腺癌47例、透明细胞癌9例、浆液性乳头状癌10例;有盆腔淋巴结转移者21例。

1.2 试剂与仪器

TRIzol 试剂盒购自Invitrogen公司,miRNAs 逆转录试剂盒购自Promega公司,U6snRNA,miR-155实时荧光定量试剂盒购自上海吉玛生物技术有限公司,各种无酶Tube和Tip购自美国Axygen公司,其余试剂均为国产分析纯。DU800型分光光度计购自Beckman公司,BioRad-IQ5 qRT-PCR仪购自美国Bio-Rad公司。

1.3 标本收集、总RNA的抽提与纯化

收集44例子宫内膜癌患者组织标本以及相

应的癌旁组织作为正常对照。所有标本液氮冻存储备用。按照TRIzol试剂盒使用说明书从组织中提取总RNA。紫外分光光度计测定RNA提取液的 D_{260} 吸光度值,计算纯度和浓度。

1.4 ISH检测miR-155在子宫内膜癌和癌旁组织中的表达

(1)组织样本经多聚甲醛固定,脱水,包埋,切片。(2)将切片脱蜡至水。(3)用3%的过氧化氢室温处理10 min,无酶水洗3次。(4)3%胃蛋白酶室温消化15~20 min,PBS洗5 min×3次,无酶水洗1次。(5)1%多聚甲醛室温10 min,无酶水洗3次。滴加适量预杂交液,55℃预杂交4 h。(6)将miR-155探针按说明添加于预杂交液中,混匀,55℃杂交过夜。用预热至37℃的2×柠檬酸钠缓冲液(salt-sodium citrate,SSC)漂洗5 min×2次,然后依次用0.5×SSC,0.2×SSC各漂洗15 min。(7)滴加封闭液,室温封闭30 min。(8)滴加生物素化鼠抗地高辛,室温温育2 h,ISH用PBS漂洗5 min×4次。(9)滴加DAB显色。(10)ISH检测miR-155阳性染色均为棕黄色颗粒,位于细胞质内,染色强度:根据光镜下观察阳性染色的细胞比例(5个高倍视野下的均数)分为:①阴性(-),染色细胞数少于10%;②阳性(+),染色细胞数在10%~50%之间;③强阳性(++),染色细胞数多于50%,以(++)为miR-155高表达,(+)或者(-)为miR-155低表达对患者随访进行预后分析。

1.5 实验方法

1.5.1 RT反应

20 μL反应体系,16℃30 min,42℃30 min,再以85℃10 min灭活RT酶,产物-20℃冻存储备用。

1.5.2 qRT-PCR反应

将RT产物稀释至1~2倍,混匀。20 μL反应体系,先95℃3 min活化Tag酶,然后95℃12 s,62℃35 s,共40个循环。miR-155特异性PCR引物序列,正义链:3'-ACGCTCAGTTAATGCTAATCGTGATA-5',反义链:3'-ATTCCATGTTGTCCACTGTCTCTG-5';内参照U6引物序列,正义链:3'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-5',反义链:3'-GGAACGCTTCACGAATTG-5'。

1.5.3 miR-155表达水平的计算方法

以U6为内参,测定循环阈值(Ct值),计算DCt值, $DCt = \text{miR-155平均Ct值} - \text{U6平均Ct值}$,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示miR-155的表达水平,取子宫内膜癌患者癌旁正常组织miR-155的表达水平为1,以此为对照,计算患者子宫内膜癌组织中miR-155的表达水平(以倍数表示)^[5]。

1.6 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析,子宫内膜癌临床病理参数、临床分期与miR-155表达水平之间的关系分析采用Mann-Whitney检验和Kruskal-Wallis检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 χ^2 和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-155在子宫内膜癌患者组织与癌旁组织的表达

ISH结果表明,66例癌旁对照组织中miR-155阳性表达12例,阳性率为18.18%,66例子宫内膜癌组织中miR-155阳性表达56例,阳性率为84.85%,差异有统计学意义($\chi^2 = 58.72$, $P < 0.01$)。qRT-PCR结果显示,子宫内膜癌患者组织中miR-155为 (6.17 ± 0.73) 倍,与对照组相比差异有统计学意义($t = 17.38$, $P < 0.01$)。

2.2 miR-155的表达与子宫内膜癌临床病理参数之间的关系

qRT-PCR结果显示,临床I/II、III/IV子宫内膜癌患者组织miR-155表达水平分别为 (4.54 ± 0.55) 、 (7.93 ± 0.88) ,差异有统计学意义($t = 13.51$, $P < 0.01$);有、无盆腔淋巴结转移子宫内膜癌患者组织miR-155的表达水平分别为 (9.56 ± 0.86) 、 (5.49 ± 0.47) ,差异有统计学意义($t = 15.12$, $P < 0.01$);高、中、低分化子宫内膜癌组织中miR-155表达水平分别为 (6.42 ± 0.63) 、 (6.97 ± 0.59) 、 (6.27 ± 0.46) ,差异均无统计学意义($t = 0.412$, $P > 0.05$)。

2.3 子宫内膜癌组织中miR-155的表达与其预后关系

随访到2010年12月,经Kaplan-Meier生存曲线分析发现,65例患者中(1例失访),39例miR-155相对低表达死亡3例,死亡率7.7%,而26例miR-155相对高表达死亡6例,死亡率23.1%,提示miR-155表达越高的子宫内膜

癌患者死亡率越高,两者差异有统计学意义($P = 0.001$,图1)。

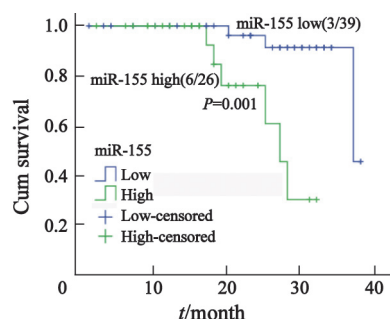


图1 Kaplan-Meier生存曲线分析miR-155表达与子宫内膜癌患者预后

Fig. 1 Survival curves between miR-155 and prognosis of endometrial cancer in Kaplan-Meier analysis

3 讨 论

子宫内膜癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率呈逐年上升的趋势。虽然大多数子宫内膜癌患者由于不规则阴道流血及排液增多等症状而得到早期诊断,但仍有15%~25%的患者就诊时已为晚期,临床治疗十分棘手^[6]。

因此,研究者一直致力于寻找子宫内膜癌中具有高度灵敏度和特异度的分子标志物,以便对子宫内膜癌患者进行早期诊断、早期治疗,提高患者生存率,但成果欠佳。最近几年学者们逐步了解miRNA分子的作用,为肿瘤的发生、发展机制研究带了新的曙光。Liu等^[7]认为miRNA可通过调控其靶标基因参与的信号通路,影响肿瘤的发生、发展、侵袭转移,发挥类似于癌基因或抑癌基因的功能。

本实验ISH、qRT-PCR检测结果显示,子宫内膜癌组织miR-155表达明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.01$),随着子宫内膜癌的临床分期演进而增高,且有淋巴结转移的患者组织miR-155的表达明显高于无淋巴结转移者,差异有统计学意义($P < 0.01$)。Kaplan-Meier生存曲线显示,miR-155表达越高患者预后越差。综上所述,miR-155可能作为原癌基因参与子宫内膜癌的发生、发展,为子宫内膜癌潜在的治疗靶点和预后判断提供了更有力的实验证据。

miR-155在子宫内膜癌患者血清、组织中表达增高的原因受miR-155上游哪些因素

调控(转录因子、基因扩增、突变及合成异常等)^[8-10], 以及下游调控哪些靶基因或信号通路等是下一步重点研究方向。因此, 阐明miRNA参与肿瘤的病理发病过程, 认识肿瘤发生的分子生物学机制, 为肿瘤的诊断、治疗提供新方法, 具有广阔的临床应用前景。此外, miRNA与临床相关的研究, 尚缺乏大样本、多中心的研究数据。针对miRNA建立行之有效的检测手段以及靶向治疗策略, 必将为肿瘤早期诊断、治疗方案选择、疗效评价以及预后判断提供很好的理论和实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] YANAIHARA N, CAPLEN N, BOWMAN E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(3): 189-198.
- [2] VOORTMAN J, GOTO A, MENDIBOURE J, et al. MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8288-8298.
- [3] YAN L X, HUANG X F, SHAO Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis [J]. *RNA*, 2008, 14(11): 2348-2360.
- [4] XIA Q S, ISHIGAKI Y, ZHAO X, et al. Human SMG-1 is involved in gemcitabine-induced primary microRNA-155/BIC up-regulation in human pancreatic cancer PANC-1 cells [J]. *Pancreas*, 2011, 40(1): 55-60.
- [5] 谭志琴, 刘伏香, 唐海林, 等. 子宫内膜癌患者血清中hsa-miR-155的表达及其临床意义 [J]. *中华妇产科杂志*, 2010, 45(10): 772-774.
- [6] 任玉兰, 王华英, 施达仁, 等. 晚期子宫内膜癌患者的治疗及预后分析 [J]. *中华妇产科杂志*, 2008, 43(7): 523-527.
- [7] LIU C, YU J, YU S, et al. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(1): 98-107.
- [8] MA L, YOUNG J, PRABHALA H, et al. MiR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(3): 247-256.
- [9] MARTELLO G, ROSATO A, FERRARI F, et al. MicroRNA targeting dicer for metastasis control [J]. *Cell*, 2010, 141(7): 1195-1207.
- [10] DING J, HUANG S, WU S, et al. Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI A [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(4): 390-399.

(收稿日期: 2011-02-24 修回日期: 2011-08-03)

《肿瘤预防与治疗》2012年征订启事

《肿瘤预防与治疗》是《中国科技论文统计源期刊》(即《中国科技核心期刊》), CN51-1703/R, ISSN1674-0904, 大16开, 80页, 双月刊, 单月15日出版。邮发代号, 62-142。

本刊主要报道国内外肿瘤防治研究领域的新成果、新进展。开设栏目有专家述评、应用基础研究、临床研究、临床经验与技术交流、综述与讲座、短篇与个案报道等。所征稿件内容: 肿瘤流行病学、基础研究、肿瘤病理、临床诊治经验、病例报告、肿瘤护理、国外研究动态等。

敬请读者及作者踊跃投稿, 欢迎订阅, 每期定价10.00元, 全年订价60.00元。需订阅者请到当地邮局订阅, 邮发代号62-142, 错过订阅时间可直接向编辑部订阅, 款汇至成都市武侯区人民南路四段55号《肿瘤预防与治疗》编辑部。邮编610041; 电话: 028-85420233; E-mail: zlyfyzl@163.com; zlyfyzl@yahoo.cn; 网址: <http://zlyfyzl.cn>; qq: 973469379

欢迎订阅, 欢迎使用网上投稿和电子邮件投稿。

《肿瘤预防与治疗》编辑部