

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.016

胃癌组织中 miR-29 的表达及其临床意义

陈陵¹, 王宗华², 李学成¹, 邹利全¹, 范亚川¹, 刘志鹏¹, 熊晓峰¹ (1. 解放军第 324 医院 消化内科, 重庆 400020; 2. 第三军医大学 护理学院, 重庆 400038)

[摘要] 目的: 研究胃癌组织中 miR-29 的表达情况及其与临床病理特征和预后的关系。方法: 收集 2005 年至 2010 年中国人民解放军第 324 医院收治的进展期胃癌 113 例患者的手术标本, 定量 PCR 检测胃癌组织及癌旁组织内 miR-29 的表达, 并分析其与胃癌患者临床病理特征的关系。结果: 胃癌组织内 miR-29 的表达显著低于对应的癌旁组织(2.62 ± 1.17 vs 3.14 ± 1.70 , $P = 0.006$), 伴淋巴结转移的胃癌患者低表达 miR-29 百分率显著高于无淋巴结转移组(58.9% vs 32.5% , $P = 0.007$), miR-29 低表达胃癌患者中位生存率显著低于 miR-29 高表达者(33.0 vs 44.0 个月, $P = 0.013$)。结论: 胃癌组织低表达 miR-29, miR-29 有可能成为胃癌的预后判断指标及治疗靶标。

[关键词] 胃癌; microRNA; miR-29; 转移; 预后

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0320-04

Expression of miR-29 in gastric cancer and its clinical significance

CHEN Ling¹, WANG Zong-hua², LI Xue-cheng¹, ZOU Li-quan¹, FAN Ya-chuan¹, LIU Zhi-peng¹, XIONG Xiao-feng¹ (1. Department of Gastroenterology, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China; 2. Nursing School, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of miR-29 in gastric cancer and its relationship with clinic pathological features and prognosis of gastric cancer. **Methods:** Totally 113 gastric cancer samples were obtained from patients who received operation during 2005 to 2010 in the No. 324 Hospital of PLA. The expression of miR-29 in gastric cancer and paracancerous tissues was detected by real-time PCR, and its relationship with clinic pathological features of gastric cancer was analyzed. **Results:** The expression of miR-29 in gastric cancer tissues was significantly lower than that in paracancerous tissues (2.62 ± 1.17 vs 3.14 ± 1.70 , $P = 0.006$). The rate of low miR-29 expression in patients with lymph node metastases was significantly higher than that without lymph node metastases (58.9% vs 32.5% , $P = 0.007$). The median survival rate in low miR-29 expression cases was significantly lower than that in high miR-29 expression cases (33.0 vs 44.0 month, $P = 0.013$). **Conclusion:** miR-29 is lowly expressed in gastric cancer tissues, and it might be used for prediction of prognosis and as for targeted treatment of gastric cancer.

[Key words] gastric cancer; microRNA; miR-29; metastasis; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 320-323]

胃癌在我国发病率高, 不易早期发现, 诊断时多数已属中晚期, 预后不佳^[1]。长期以来, 胃癌缺乏有效的早期诊断指标, 治疗以手术、化疗和放疗为主, 但疗效不佳, 寻找有效的早期诊断指标及治疗靶标是胃癌治疗一个亟需解决的难题^[2]。MicroRNA (miRNA) 是一种广泛存在于真核生物细胞中非编码的长 19 ~ 24 nt 的单链小分子 RNA, 是一类基因表达转录后调控因子^[3]。研究^[4-7]发现, 多种 miRNA 参与了肿瘤的发生、发展及转移, 并可作为肿瘤治疗的有效靶位。miR-29 高表达于正常组织, 而低表达于神经纤维瘤、肉瘤、脑肿瘤等多种实体瘤^[8],

但 miR-29 在胃癌中的表达水平及其与胃癌生长和

[基金项目] 重庆市自然科学基金资助项目(No. 2008BB5274, No. 2009BB5314, No. 2010BB5158)。Project supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (No. 2008BB5274, No. 2009BB5314, No. 2010BB5158)

[作者简介] 陈陵(1976 -), 男, 湖南省醴陵市人, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤早期诊断与治疗方面的研究。E-mail: lingcong_008@126.com

[通信作者] 李学成(LI Xue-cheng, corresponding author), E-mail: lixuecheng1967@sohu.com

转移间关系,目前尚少报道。本研究检测胃癌组织中 miR-29 的表达情况,探讨其与胃癌临床病理特征和预后的相关性,为胃癌的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象和标本来源

收集 2005 年至 2010 年中国人民解放军 324 医院收住的进展期胃癌手术病例 113 例,术前患者均未行放疗或化疗,所有病例均经病理检查确定诊断,临床资料齐全。其中女性 49 例、男性 64 例,年龄在 38 ~ 71 岁,中位年龄为 59 岁;73 例胃癌患者伴淋巴结转移;高分化 24 例、中分化 38 例、低分化 51 例。

1.2 主要实验材料

TRIzol 总 RNA 抽提试剂购自美国 Invitrogen 公司,RT 试剂盒、SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,U6 及 miR-29 特异性 RT-PCR 引物购自广州锐博公司。实时荧光定量 PCR 仪(7500 系统)购自美国 ABI 公司,DU-640 紫外分光光度计购自美国 Beckman 公司。

1.3 Real-time PCR 检测胃癌组织中 miR-29 表达

以 U6 管家基因做内参,校正器参考文献[9]方法,选用 SGC-7901 细胞系。取胃癌组织,在液氮中研磨粉碎后,加 TRIzol 1 ml 吹打、混匀,按照 TRIzol 试剂说明书步骤提取总 RNA,再将总 RNA 溶于无 RNase 酶水中,用紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。吸取总 RNA 100 ng 作为模板,按照 RT 逆转录试剂盒说明书配 20 μ l 反应体系,反应条件为 42 $^{\circ}$ C 15 min \rightarrow 85 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 保存。然后取逆转录生成的 cDNA 4 μ l 作为模板,按照 real-time PCR 试剂

盒说明书配制 50 μ l 反应体系,预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,反应 40 个循环,循环条件为 95 $^{\circ}$ C 5 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 34 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行结果分析,将不同标本的相对表达定量值(relative quantity, RQ)进行比较。RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct$ = 待测标本的 ΔCt - 校正器 ΔCt , ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参照基因 Ct 值。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,生存率分析采用 Log-rank 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-29 在胃癌和癌旁组织中表达水平的比较

采用 real-time PCR 检测胃癌及癌旁组织内 miR-29 的表达水平,结果发现,胃癌组织内 miR-29 的相对表达量显著低于对应的癌旁组织(2.62 \pm 1.17 vs 3.14 \pm 1.70, $P = 0.006$)。

2.2 胃癌组织中 miR-29 表达与胃癌临床病理特征的关系

根据 miR-29 表达水平,以胃癌组织中 miR-29 相对表达量的平均值为界,将 113 例胃癌组织分为 miR-29 高表达组和低表达组。113 例胃癌组织中低表达 miR-29 的有 56 例,高表达的 57 例。结果(表 1)显示,伴淋巴结转移的胃癌患者低表达 miR-29 的百分率显著高于无淋巴结转移组(58.9% vs 32.5%, $P = 0.007$); miR-29 表达与胃癌患者的年龄、性别及肿瘤分化程度无关。

表 1 胃癌组织 miR-29 表达与患者临床病理特征的关系[*n*(%)]

Tab.1 Relationship between miR-29 expression and clinical features of gastric cancer patients [*n*(%)]

Group		<i>N</i>	Low-expression of miR-29	High-expression of miR-29	χ^2	<i>P</i>
Sex	Male	64	36(56.2)	28(43.8)	2.6	0.104
	Female	49	20(40.8)	29(59.2)		
Age(year)	<60	49	28(57.1)	21(42.9)	2.0	0.158
	\geq 60	64	28(43.7)	36(56.3)		
Differentiation	Highly	24	13(54.1)	11(45.9)	1.5	0.463
	Moderately	38	21(55.2)	17(44.8)		
	Poorly	51	22(43.1)	29(56.9)		
Lymphatic metastasis	+	73	43(58.9)	30(41.1)	7.2	0.007
	-	40	13(32.5)	27(67.5)		

2.2 胃癌组织中 miR-29 的表达与预后的关系

根据随访结果绘制 Kaplan-Meier 生存曲线(图 1)。113 例胃癌病例中, 低表达 miR-29 的 56 例的中位生存期为 33.0 个月, 3 年生存率为 41.6%; 高表达 miR-29 的 57 例的中位生存期为 44.0 个月, 3 年生存率为 63.9%。miR-29 低表达组的中位生存期及 3 年生存率均显著低于 miR-29 高表达组($P = 0.013$)。

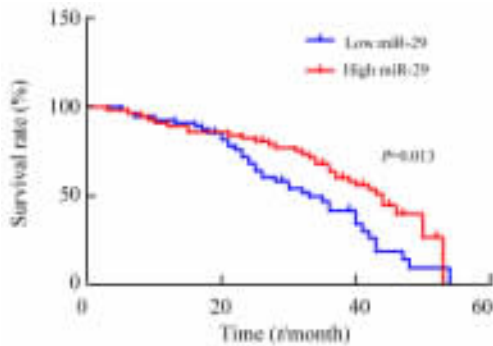


图 1 胃癌组织中 miR-29 表达与胃癌患者预后的关系

Fig. 1 Relationship between miR-29 expression and prognosis of gastric cancer patients

3 讨论

miRNA 基因芯片检测结果表明, miRNA 在肿瘤与正常组织中有不同的表达谱, 不但可以作为肿瘤的诊断指标, 还可帮助判断预后^[10]。miRNA 可促进或抑制肿瘤的发生、发展与转移, 并且部分关键 miRNA 还可作为肿瘤治疗的潜在靶标^[6]。通过调控肿瘤相关 miRNA, 可以抑制肿瘤增殖或转移^[7]。基于 miRNA 的肿瘤诊断与治疗研究正在成为肿瘤研究中的热点之一^[11]。

miR-29 功能尚未完全明确。早期 Pekarsky 等^[12]发现, miR-29 通过抑制 T 细胞白血病或淋巴瘤 1 基因, 促进 B 细胞性慢性淋巴细胞性白血病的侵袭能力。但新近资料^[13]显示, miR-29 在多数肿瘤中起到抑癌基因的作用, 如 miR-29 可通过下调抗凋亡因子 Mcl-1 促进胆管上皮癌细胞凋亡。miR-29 在多种实体肿瘤中的下调, 导致细胞膜表面免疫调节糖蛋白 B7-H3 表达上调, 抑制自然杀伤细胞和 T 细胞在肿瘤局部的免疫杀伤作用^[8]。miR-29 表达显著下调的淋巴瘤患者, 较 miR-29 表达相对较高的患者预后更差, 机制可能是 miR-29 抑制其靶基因——细胞周期素 D 激酶 6 基因(*CDK6*, 一种原癌

基因)的表达, 从而改善了预后^[10]。本课题组前期研究^[14]中采用实时荧光定量 PCR 技术, 检测 46 例胃癌患者手术前后及 30 例健康成年人血清中 miR-29 的表达水平, 结果发现, 胃癌患者血清中 miR-29 表达水平显著低于健康成年人; 胃癌患者术后血清中 miR-29 表达水平较术前上调, 且上调水平越高预后越佳; 表明胃癌患者血清内 miR-29 的表达, 不但可以作为早期诊断指标, 并且可以作为术后判断预后的有用指标。本研究进一步发现, miR-29 在胃癌组织中的表达水平显著低于癌旁组织($P = 0.006$)。虽然降低的绝对值不多, 但由于 miRNA 是在转录后水平对蛋白的翻译进行调控, 并且一条 miRNA 可以调控数个至数十个功能相近的一组靶基因, 使得微量 miRNA 的改变即可对功能产生较大的影响。因此 miR-29 在胃癌组织内表达水平的轻微下降, 可能与胃癌的发生与发展有关。

本研究还发现, 淋巴结转移的胃癌患者低表达 miR-29 的百分率显著高于无淋巴结转移组; miR-29 低表达组的中位生存期及 3 年生存率均低于 miR-29 高表达组。结果表明, miR-29 低表达是肿瘤转移能力增强的一个标志。miR-29 的高表达可能在一定程度上抑制了胃癌的转移, 并进而改善胃癌患者的预后。因此, miR-29 有可能成为一个全新的胃癌预后判断指标及生物分子治疗靶标。本结果虽与报道的其他肿瘤中 miR-29 的研究结果相吻合, 但仍然存在一系列疑问, 例如是什么原因导致了 miR-29 在胃黏膜内表达的下调, 从而促进了胃癌的发生与发展? miR-29 表达下调促进胃癌发生发展的具体机制是什么? 逆转 miR-29 在胃癌中的低表达水平, 是否能抑制胃癌的进一步发展, 或改善预后? 这些问题有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 陈陵, 陈婷, 蔡永国, 等. 胃黏膜癌变过程中 hTERT 和相关基因表达的变化及其临床意义 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(5): 443-447.

[2] 贺岭风, 杨克虎, 孙宁, 等. 进展期胃癌术前应用 IL-2 治疗疗效的 Meta 分析 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1): 95-98.

[3] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610.

[4] Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, et al. miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma [J]. Nat Med, 2010, 16(10): 1134-1140.

- [5] Liu X, Jiang L, Wang A, et al. MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2009, 286(2): 217-222.
- [6] Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma [J]. *Nature*, 2010, 467(7311): 86-90.
- [7] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21 [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(3): 282-293.
- [8] Xu H, Cheung IY, Guo HF, et al. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: Potential implications for immune based therapy of human solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(15): 6275-6281.
- [9] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has *in vivo* significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification [J]. *Blood*, 2009, 113(21): 5237-5245.
- [10] Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma [J]. *Blood*, 2010, 115(13): 2630-2639.
- [11] 陈勇, 左静, 刘巍. miRNA 介导肿瘤生物学行为改变的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1): 109-114.
- [12] Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11590-11593.
- [13] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2007, 26(42): 6133-6140.
- [14] 陈陵, 陈先华, 李学成, 等. miR-29 在胃癌患者血清中的表达及对预后的影响 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(2): 17-20.
- [收稿日期] 2011-02-15 [修回日期] 2011-03-25
[本文编辑] 王莹

· 简讯 ·

2011 年《中国免疫学杂志》第十三届学术研讨会征文通知

为了推动我国免疫学的发展,促进各分支学科的学术交流,增强对作者、读者需求的了解,《中国免疫学杂志》编辑部拟于 2011 年 8 月在西宁市召开第十三届学术研讨会,会上将请免疫学领域内的知名专家、教授作精彩的大会报告。

1. 主题: 基础、临床免疫方面诊断、治疗、预防以及新技术和新方法。
2. 内容: 未在国内外学术会议及正式出版物发表的近期研究成果。

征文范围包括:分子与细胞免疫学、肿瘤免疫学、中医中药与免疫、生殖免疫学、遗传免疫学、神经内分泌与免疫、临床免疫(诊断和治疗)、免疫学新技术与新方法、兽医免疫及与免疫相关的各分支学科,综述及教学园地也可。

3. 投稿格式要求: 详见 2010 年出版的《中国免疫学杂志》。投稿须附 300 字左右的中文结构式摘要(目的、方法、结果、结论)。

4. 征文截止时间: 2011 年 6 月 30 日。

5. 经专家评审后,被录取者将发具体通知,会议期间将从大会交流的论文中评选出优秀论文,在本刊"学术会议优秀论文选登"栏目中刊出,其余会议交流的论文将发表在《中国免疫学杂志》2011 年专刊上。

6. 投稿请寄: 吉林省长春市建政路 971 号《中国免疫学杂志》编辑部,邮编: 130061, E-mail: zhmmizazh@126.com, 电话: 0431-88925027, 并在论文右上角标明"会议征文"字样,同时寄审稿费 30 元(注明会议审稿),接受网络投稿。

注: 如暂无论文但对本专业领域感兴趣者可直接参会。

《中国免疫学杂志》编辑部