

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.09.012

# miRNA21/PDCD4 环路在卵巢癌组织中的表达

万冬<sup>1</sup>, 杨廷桐<sup>2</sup>, 秦玉凤<sup>3</sup>, 王玉<sup>2</sup>, 王媛<sup>3</sup>, 席乐峰<sup>2</sup>

## Expression of miRNA21/PDCD4 in Ovarian Cancer Tissues

WAN Dong<sup>1</sup>, YANG Tingtong<sup>2</sup>, QIN Yufeng<sup>3</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, WANG Yuan<sup>3</sup>, XI Lefeng<sup>2</sup>

1. Department of Gynecology, Xinxiang Center Hospital, Xinxiang 453000, China; 2. Department of Pathology, Xinxiang Medical University; 3. Department of Laboratory and Pathology, The 371 Central Hospital, PLA

Corresponding Author: YANG Tingtong, E-mail: Yangtt@xxmu.edu.cn

**Abstract: Objective** To investigate the expression and clinical significance of miRNA21 mRNA in ovarian cancer. **Methods** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect miRNA21 mRNA and PDCD4 protein levels in 108 cases of ovarian cancer patients, 67 cases of borderline lesion, 75 cases of benign lesion, and 35 cases of normal tissues. **Results** The expression levels of miRNA21 mRNA in ovarian cancer, borderline lesion and benign lesion were significantly 11.3 times, 6.8 times and 2.6 times respectively higher than those in normal tissues ( $P < 0.01$ ). The expression levels of miRNA21 mRNA in borderline lesion were significantly 6.8 times higher than those in normal tissues ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ). The expression levels of PDCD4 in ovarian cancer borderline lesion, benign lesion and normal tissues were gradually and significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Up-regulated and down-regulated expressions of miRNA21 mRNA and PDCD4 protein in ovarian cancer tissue might contribute to ovarian cancer carcinogenesis.

**Key words:** miRNA-21; PDCD4; Ovarian cancer; qRT-PCR; Western blot

**摘要: 目的** 探讨 miRNA21/PDCD4 环路在卵巢肿瘤中的作用及其临床意义。**方法** 采用 qRT-PCR 和 Western blot 方法检测 miRNA21 和 PDCD4 在 108 例卵巢癌患者、67 例交界性病变、75 例良性病变和 35 例正常组织中的表达情况。**结果** miRNA21 在卵巢癌组织中的表达水平是正常卵巢组织的 12.3 倍 ( $P < 0.01$ ); 在交界性病变组织中的表达水平是正常卵巢组织的 7.8 倍 ( $P < 0.01$ ); 在良性病变组织中的表达水平是正常卵巢组织的 3.6 倍 ( $P < 0.05$ )。PDCD4 蛋白含量在卵巢癌组织中的表达明显低于交界性病变组织, 交界性病变组织低于良性病变组织, 良性病变组织低于正常卵巢组织, 两两相比差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 正常卵巢组织与卵巢癌和交界性病变组织中 PDCD4 蛋白含量相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。**结论** miRNA21/PDCD4 环路异常在卵巢癌发生中具有重要的作用。

**关键词:** 微小 RNA21; 程序性细胞死亡因子 4; 卵巢癌; 荧光定量 PCR; 免疫印迹

中图分类号: R737.31 文献标识码: A

## 0 引言

上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 是妇科常见的恶性肿瘤之一, 早期无明显症状, 且缺乏有效的筛查及早期诊断方法, 70% 以上

患者就诊时已属晚期, 且 5 年生存率低于 30%, 死亡率居所有女性生殖道恶性肿瘤的首位<sup>[1]</sup>。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内源性的非编码单链小分子 RNA, 可以引起靶 mRNA 降解或翻译抑制, 表现出调控基因表达功能。近年来 miRNA 与肿瘤的研究十分活跃。有关 miRNA21/PDCD4 调控环路与 EOC 的演进关系, 目前极少见报道。本研究拟采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 和免疫印迹 (Western blot) 方法, 检测正常卵巢、良性病变、交界性病变和 EOC 组

收稿日期: 2012-12-06; 修回日期: 2013-02-20

基金项目: 新乡市科技局发展重点资助项目 (095084); 新乡医学院研究生课题创新计划资助项目 (YJSCX201002Z)  
作者单位: 1. 453000 河南新乡, 新乡市中心医院妇产科; 2. 新乡医学院病理学教研室; 3. 解放军第 371 中心医院检验病理科

通信作者: 杨廷桐, E-mail: yangtt@xxmu.edu.cn

作者简介: 万冬 (1966-), 女, 本科, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的分生物学研究

织中 miRNA21/PDCD4 的表达水平,探讨 miRNA21/PDCD4 环路与 EOC 发生与演进的关系,为临床上防治 EOC 提供科学依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例资料

收集 2008 年—2011 年在解放军第 371 中心医院和新乡市中心医院门诊与病房收治的 EOC 患者 108 例,年龄 28~71 岁,中位年龄为 57 岁。病理分级:高分化 75 例,低分化 33 例;临床分期按国际妇产科联盟标准:I~II 期 86 例、III~IV 期 22 例。卵巢交界性病变 67 例,年龄 26~68 岁,中位年龄为 46 岁。卵巢良性病变 75 例,年龄 24~62 岁,中位年龄为 34 岁。正常健康对照 35 例为同期因子宫肌瘤行全子宫切除术,术后卵巢组织病理检查报告为正常卵巢者,年龄 35~57 岁,中位年龄为 43 岁,无其他疾病。所有标本均置于液氮内保存备用。全部组织均经组织病理学确诊。

### 1.2 方法

1.2.1 仪器 PRISM7700 Sequence Detector RQ-PCR 仪为美国 ABI 公司产品,半干电转仪为 BioRad 公司产品。

1.2.2 qRT-PCR 检测 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成,以 U6 作为内参照。序列如下:miRNA21 上游引物:5'-GAAATGCCTCACAGC-TATCGT-3',下游引物:5'-CCTCCACAAAGAGC-CACC-3';大小 70 bp,U6 上游引物:5'-ATCAT-GTTTGTGAGACCTTCAACA-3',下游引物:5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3',大小 75 bp。

取适量组织,用 Trizol 提取总 RNA,反转录合成 cDNA。反转录反应体积为 20  $\mu$ l,反应体系如下:RNA 5  $\mu$ l、10 mM dNTP 0.4  $\mu$ l、N6RandomPrimer 0.8  $\mu$ l、5 $\times$ 反转录缓冲液 4  $\mu$ l、MMLV 反转录酶 0.3  $\mu$ l、RNasin 0.4  $\mu$ l,补充 DEPC(焦炭酸二乙酯)水至 20  $\mu$ l。将上述反应液混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴作用 1 h。然后 94 $^{\circ}$ C 3 min 灭活反转录酶,反转录产物以特异引物进行 PCR 扩增反应。PCR 扩增反应体积为 25  $\mu$ l,反应体系如下:cDNA 5  $\mu$ l,10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l,dNTP(10 mmol/L)0.2  $\mu$ l,TaqDNA 聚合酶(2.5 u/ $\mu$ l)0.4  $\mu$ l,50 $\times$ SYBR Green 0.12  $\mu$ l,MgCl<sub>2</sub>(50 mmol/L)0.7  $\mu$ l,双蒸水补足至反应终体

积 25  $\mu$ l。反应条件如下:37 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,重复 40 个循环。反应结束后,由软件自动分析并显示分析结果循环阈值(cycle threshold,Ct)和实时定量荧光值动态曲线。目的基因的表达以 U6 作内对照,采用 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法<sup>[2]</sup>分析比较目的基因在卵巢癌组织和正常组织中的表达差异。 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-21} - Ct_{U6})_{肿瘤} - (Ct_{miR-21} - Ct_{U6})_{正常}$ ,对正常组织来说, $\Delta\Delta Ct = 0$ ,2 $^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ 。

1.2.3 Western blot 分析 取适量组织,提取总蛋白,用 Bradford 法测定蛋白含量。取 50  $\mu$ g 总蛋白变性 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳,分离后的蛋白 10 V 恒压 35 min 转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,用含 0.05% Tween-20 的 Tris 缓冲液(TBST)洗涤 NC 膜 3 次,加入 1:100 稀释的 Anx-A1 特异抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:1 000 稀释),室温 2 h,洗膜后加入化学发光(electrochemiluminescence,ECL)试剂显色曝光。以  $\beta$ -actin 作为上样量的内参照,用相对吸光度值(目的基因条带吸光度值/ $\beta$ -actin 条带吸光度值)表示 miRNA21 蛋白的相对表达强度。

### 1.3 统计学方法

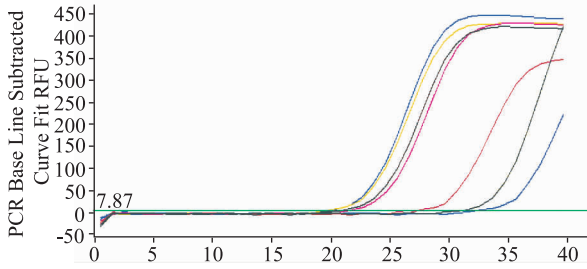
利用 SPSS13.0 软件进行统计分析。采用 *t* 检验方法分析目的基因的表达差异,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 miRNA21 mRNA 表达分析结果

扩增曲线表明对数期阶段模板拷贝数与荧光累计值之间存在线性关系,以此形成定量的基础,见图 1。在 PCR 反应完毕后进行融解曲线分析,miRNA21 的融解曲线均为单峰,说明扩增产物单一,同时也进一步验证了引物的特异性与可信性,见图 2。采用 2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 miRNA21 在正常卵巢组织、良性病变、交界性病变和 EOC 组织中的表达差异,EOC 和正常卵巢组织中的 miRNA21 Ct 值与  $\beta$ -actin Ct 值的差值,经 *t* 检验差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。qRT-PCR 检测 miRNA21 在正常卵巢组织中的表达为(0.834 $\pm$ 0.166)、在良性病变中为(3.6273 $\pm$ 1.461)、在交界性病变中为(7.862 $\pm$ 3.716)、在 EOC 中为(12.315 $\pm$ 2.726),两两相比差异均有统计学意义( $P$

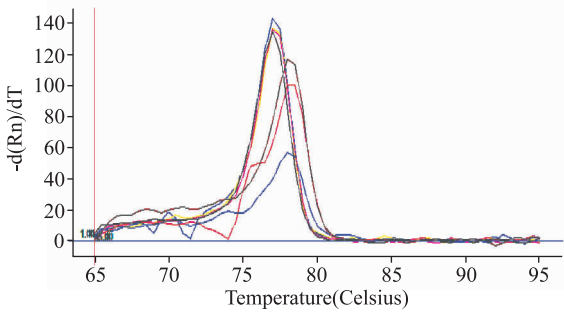
$<0.01$ )。miRNA21 在 EOC 组织中的表达水平是正常卵巢组织的 12.3 倍( $P<0.01$ )。在交界性病变组织中的表达水平是正常卵巢组织的 7.8 倍( $P<0.01$ )。在良性病变组织中的表达水平是正常卵巢组织的 3.6 倍( $P<0.05$ )。



The relationships of templates circle number of difference copy number with fluorescence intensity of coal maceral formation quantitativ basis

图 1 micRNA-21mRNA 扩增曲线图

Figure 1 Amplification curve of micRNA-21mRNA



miRNA21 was singlet description amplification product unity. Specificity and Reliability of Validate primer

图 2 micRNA-21mRNA 溶解曲线图

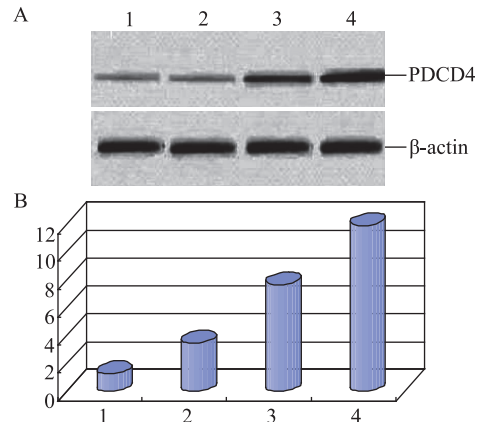
Figure 2 Solubility curve of micRNA-21mRNA

### 2.2 PDCD4 蛋白表达分析

Western blot 结果显示 PDCD4 在 EOC 组织中的表达明显低于交界性病变组织,交界性病变组织低于良性病变组织,良性病变组织低于正常卵巢组织,两两相比差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),正常卵巢组织与 EOC 和交界性病变组织中 PDCD4 蛋白含量相比差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),见图 3。

### 3 讨论

癌的发生发展是一个多基因、多步骤的复杂生物学过程<sup>[3]</sup>。由于卵巢组织形态及生物学特征的多样性,EOC 被认为是一组异质性恶性肿瘤疾病,并非单一疾病,因大部分起源于卵巢表面上皮(OSE)而得名。目前认为 EOC 的发生与反复排卵时 OSE 的损伤修复有关,但是具体机制及始动因素仍不十



A: results of PDCD4 Western blot; B: stele figure of A corresp; 1: epithelium of ovarian cancer; 2: borderline lesion; 3: benign lesion; 4: normal ovarian tissue

图 3 Western blot 检测卵巢组织中 PDCD4 的表达

Figure 3 Expressions of PDCD4 assayed by Western blot in ovarian tissue

分清楚。因此深入研究 EOC 发生发展的分子机制有着十分重要的现实意义。近年来研究已经证实 miRNAs 水平变化与 EOC 的发生密切相关<sup>[4]</sup>,比如 miR-200a 的作用可以影响 EOC 细胞的浸润与转移<sup>[5]</sup>,当 EOC 细胞中 miR-200 表达下调时,ZEB1/2 表达上调,E-钙黏蛋白表达下调,而作为间质细胞标志的纤维连接蛋白(FN)及波形蛋白(VIM)等表达上调,使 EOC 细胞呈现间质细胞表型,从而易于向腹腔及远处发生侵袭转移,表现出更大的破坏性和更高的恶性程度。

miR-21 作为最知名的致癌 miRNA 之一,在很多肿瘤组织中高表达,有研究在 EOC 组织中 miR-21 呈高表达<sup>[6]</sup>,说明 miR-21 在 EOC 的发生发展中发挥癌基因作用。也有报道 miR-21 在 EOC 组织中呈现低表达<sup>[7]</sup>。为了进一步弄清楚 miR-21 在 EOC 组织中的表达情况及 miRNA21/PDCD4 调控环路与 EOC 演进的关系,本研究采用 qRT-PCR 和 Western blot 方法,检测 miR-21/PDCD4 环路调控在 EOC 中的表达情况。结果显示 miR-21 在 EOC 组织中的表达明显高于交界性病变、良性病变和正常组织。癌与良性病变和正常组织之间的表达水平差异具有统计学意义。提示在 EOC 的发生、发展过程中 miR-21 的表达逐步上调,且在良性病变中已经开始明显的上调。推测 miR-21 可能参与了 EOC 发生与发展过程。

程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)是 1995 年发现与细胞凋亡有关的基因,不仅对细胞的程序性

死亡进行重要调节,而且还可以通过抑制蛋白转录和翻译过程从而抑制肿瘤的生长。在本研究中发现卵巢良性病变、交界性病变、EOC 组织中 PD-CD4 蛋白水平逐步下调,在正常卵巢组织与交界性病变、EOC 之间差异具有统计学意义。推测 PDCD4 蛋白水平在 EOC 中的低表达可能与 EOC 发生、演进相关,这与 Jiang 等<sup>[8]</sup>在肝癌中的研究结果基本一致。在乳腺癌研究中发现 miR-21 可能参与 Raf-MAPK-PI3K 通路<sup>[9]</sup>。miR-21 可在转录后水平实现对靶基因表达的负性调控<sup>[10]</sup>。在本研究中 miR-21 靶标的 PDCD4 受到了 miR-21 的调控:正常卵巢组织中 miR-21 呈现低表达,PDCD4 呈现高表达;随着卵巢良性病变,交界性病变和 EOC 的发生与演进过程,可以看出 miR-21 逐渐呈现出高表达,而 PDCD4 则逐渐呈现出低表达,两者呈现出负相关性趋势。有研究发现<sup>[11]</sup>在肿瘤组织中恢复 PDCD4 基因的表达,则能够抑制细胞的增殖和复制能力,这更加进一步的说明在 miR-21/PDCD4 环路中,由于 miR-21 上调抑制了 PDCD4 的作用,引起细胞凋亡减少,促进了肿瘤细胞的增殖与演进。本实验也进一步证实了 PDCD4 是 miR-21 的一个有效靶标<sup>[12]</sup>。

miRNA 能够比较精确地调控许多蛋白质编码基因的表达水平,已经成为医学领域的研究热点之一。深入研究 miRNA 有可能为临床癌症的诊疗现状带来实质性的改观。近年来的研究表明,多种 miRNA 在 EOC 的发生发展中发挥重要作用,miRNA 不仅参与了 EOC 细胞对化疗药物反应性的调控,而且直接参与了 EOC 细胞耐药表型的形成,因此临床上检测某个或某些 miRNA 的表达,可以为化疗方案的个性化制定提供指导,也可作为一种独立的预后预测指标,参与 EOC 患者的预后判断。本研究为临床上防治 EOC 提供了理论基础,并且为进一步的基因治疗奠定了科学的依据。那么 miR-21/PDCD4 环路在引起 EOC 发生中是如何进行精确调控的呢?有待以后进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Cheng N, Zhu YK, Zhang L, *et al.* The roles of miRNAs in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer and its clinical significance[J]. *Sheng Ming Ke Xue*, 2012, 24(5): 428-33. [程妮, 朱耀魁, 张磊, 等. 微 RNA 在卵巢上皮性癌发生发展中作用及其临床意义[J]. *生命科学*, 2012, 24(5): 428-33.]
- [2] Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, *et al.* Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA [J]. *Methods*, 2008, 44(1): 31-8.
- [3] Tsubokura M, Komatsu T, Kami M. The prevalence of high-risk human papillomavirus in women with different types of cervical cancer[J]. *Ann Intern Med*, 2008, 149(4): 283.
- [4] Chen J, Wang L, Matyunina LV, *et al.* Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition(MET) in metastatic ovarian cancer cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 121(2): 200-5.
- [5] Bendoraitė A, Knouf EC, Garg KS, *et al.* Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 116(1): 117-25.
- [6] Nam EJ, Yoon H, Kim SW, *et al.* MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2690-5.
- [7] Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, *et al.* MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer[J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2436.
- [8] Jiang Y, Zhang SH, Han GQ, *et al.* Association of programmed cell death factor 4(PDCD4) with hepatocellular carcinoma and smoking in a Chinese male population[J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(4): 1179-83.
- [9] Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, *et al.* Programmed cell death 4(PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(2): 1026-33.
- [10] Lima RT, Busacca S, Almeida GM, *et al.* MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(2): 163-74.
- [11] Gao F, Wang X, Zhu F, *et al.* PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5'CpG island methylation and unfavourable prognosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(10): 4257-67.
- [12] Tian JM, Tu ZZ, Gu YQ. Study of MicroRNA-21 control expression [J]. *Yao Wu Sheng Wu Ji Shu*, 2012, 19(1): 65-9. [田俊梅, 涂真珍, 顾月清. MicroRNA-21 表达调控研究[J]. *药物生物技术*, 2012, 19(1): 65-9.]

[编辑校对: 黄园玲]