

miR-455-3p 在胃癌中的表达及其与 MVD 和 VEGF 表达的相关性研究*

110001 沈阳 中国医科大学附属第一医院检验科 宋鉴清, 曹伟, 吕昊玥

【摘要】 目的 探讨 miR-455-3p 在胃癌中的水平及其与微血管密度(MVD)和血管内皮生长因子(VEGF)表达的关系。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 80 例胃癌组织(胃癌组)中 miR-455-3p 水平,免疫组化法检测 80 例胃癌组织中 MVD 和 VEGF 表达,并分析胃癌组织中 miR-455-3p 水平与 MVD 和 VEGF 表达的相关性。选取同期的 37 例浅表性胃炎和 12 例正常胃黏膜组织作对照(对照组)。结果 胃癌组的 miR-455-3p 水平为 1.16 ± 0.59 , 低于对照组的 2.61 ± 0.88 , 差异有统计学意义($P < 0.05$); 胃癌组的 VEGF 阳性表达率和 MVD 分别为 $71.3\% (57/80)$ 和 54.9 ± 7.3 , 均高于对照组的 $28.6\% (14/49)$ 和 27.5 ± 6.1 , 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 胃癌组织中 miR-455-3p 水平与 VEGF 表达($r = -0.783, P < 0.05$)和 MVD($r = -0.824, P < 0.05$)均呈负相关。结论 miR-455-3p 在胃癌中为低表达,并与 VEGF 表达和 MVD 呈负相关,有可能在调控胃癌组织血管生长中发挥重要作用。

【关键词】 胃癌; miR-455-3p; 微血管密度; 血管内皮生长因子

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)03-0208-04

Expression of miR-455-3p and its relationship with MVD and VEGF in gastric carcinoma

SONG Jianqing, CAO wei, LYU Haoyue. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To investigate the level of miR-455-3p in gastric carcinoma and its relationship with microvascular density (MVD) and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** The quantitative real-time PCR was used to examine the level of miR-455-3p in 80 gastric carcinoma tissues (gastric carcinoma group). The vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and microvascular density (MVD) were measured by immunohistochemical method in 80 gastric carcinoma tissues. The correlations between level of miR-455-3p and MVD, VEGF expression were analyzed. Thirty-seven superficial gastritis and 12 normal gastric mucosa tissues were chosen as control (control group). **Results** The level of miR-455-3p in gastric carcinoma group was 1.16 ± 0.59 , lower than 2.61 ± 0.88 in control group with significant difference ($P < 0.05$). The gastric carcinoma group's positive expression rates of VEGF and MVD were $71.3\% (57/80)$ and 54.9 ± 7.3 , higher than $28.6\% (14/49)$ and 27.5 ± 6.1 in control group with significant difference ($P < 0.05$). The miR-455-3p was negatively correlated with VEGF expression ($r = -0.783, P < 0.05$) and MVD ($r = -0.824, P < 0.05$) in gastric carcinoma. **Conclusion** There was a decreased level of miR-455-3p in gastric carcinoma. The miR-455-3p was negatively correlated with VEGF expression and MVD in gastric carcinoma, which may play an important role in the regulation of blood vessel growth.

【Key Words】 Gastric carcinoma; miR-455-3p; Microvascular density; Vascular endothelial growth factor

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,血管生成对肿瘤的生长、浸润及远处转移至关重要,近年来对胃癌血管生成和抑制的研究已成为热点。miR-455-3p 是位于染色体脆性位点 9q32 区唯一的 1 个微小 RNA (MicroRNA, miRNA)。研究表明,miR-455-3p 在肿瘤组织中的表达水平低于正常组织,且过表达

miR-455-3p 可降低 3'-磷酸肌醇激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)的 R1 亚单位水平^[1]。PI3K 信号转导通路的活化可上调低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α)的表达并启动血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因的转录,通过增加 VEGF

* 基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(201102291)

表达,达到促进新生血管生成及增加肿瘤血供的目的^[2-3]。故推测 miR-455-3p 调控 VEGF 信号通路在肿瘤新血管生成中起关键作用。本研究拟通过检测胃癌组织中 miR-455-3p 水平,分析其与胃癌组织微血管密度(microvessel density, MVD)和 VEGF 表达的关系,为探讨 miR-455 在胃癌微血管形成的分子机制提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集中国医科大学附属第一医院 2009 年 1 月至 2013 年 4 月手术切除的 80 例胃癌组织(胃癌组),其中男性 57 例,女性 23 例;年龄范围 26~78 岁,中位年龄 61 岁;TNM 分期: I、II 期 38 例, III、IV 期 42 例;组织学分类:腺癌 48 例,印戒细胞癌 12 例,未分化癌 20 例。纳入标准:(1)术前均未接受抗肿瘤治疗;(2)均经病理学证实;(3)经医院伦理委员会批准并获患者知情同意。同时选取 37 例浅表性胃炎和 12 例正常胃黏膜组织作对照(对照组)。对照组:男性 32 例,女性 17 例;年龄范围 29~72 岁,中位年龄 59 岁。所有标本采集后均置于液氮速冻后于-80℃低温冰箱保存。

1.2 主要试剂与仪器 VEGF、CD34 鼠抗人单克隆抗体(1:100)及对应二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, RNA 抽提试剂盒购自美国 Ambion 公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 焦碳酸二乙酯水购自 Tiangen 公司, 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司, 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司, U6 及 miR-455-3p PCR 引物均购自广州锐博公司。480 型荧光定量 PCR 仪购自德国 Roche 公司。

1.3 实时荧光定量 PCR 将胃癌组织在液氮中研磨粉碎后,加入 1ml Trizol 吹打、混匀,按照试剂盒说明书步骤,使用 Buffer TE 洗脱并提取总 RNA。采用分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。按照试剂盒说明书对总 RNA 进行逆转录反应制备 cDNA。将总 RNA 稀释成终浓度为 1.42~1.79ng/μl,然后配成 20μl 反应体系:5×Reaction buffer 4μl、Enzyme mix 2μl、模版总 RNA 14μl。反应条件:42℃ 60 min, 95℃ 5min。根据试剂盒说明书配成 20μl 反应体系:模板 cDNA 8μl、SYBR Green master mix 10μl、miR-455-3p/内参 U6 引物 2μl。反应条件:95℃ 预变性 10min,然后以 95℃ 10s,58℃ 20s 和 72℃ 30s 进行 45 个循环。每个标本设 3 个复孔。采用

2^{-ΔΔCt}法分析结果并以相对表达定量值表示。 $\Delta\Delta Ct = [Ct\ miR-455(未知样品) - Ct\ U6(未知样品)] - [Ct\ miR-455(校正样品) - Ct\ U6(校正样品)]$ 。见表 1。

表 1 miR-455-3p 和 U6 的引物序列

基因	引物	序列(5'-3')
miR-455-3p	逆转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACGTGTATA
	上游	GAACTGCAGTCCATGGGCATA
	下游	GCAGGGTCCGAGGTATTC
U6	逆转录	AACGCTTCACGAATTTGCGT
	上游	CTCGCTTCGGCAGCAC
	下游	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.4 免疫组化染色 选取 80 例胃癌、37 例浅表性胃炎和 12 例正常胃黏膜组织的切片(4μm 厚),依次经脱蜡、3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶、胰酶修复及血清封闭,滴加 VEGF、CD34 抗体(1:100)4℃ 孵育过夜,采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法染色,DAB 显色,苏木精复染,常规脱水,封片。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 CD34 结果判断及 MVD 计数 CD34 阳性着色主要位于血管内皮细胞的细胞膜和细胞浆。将切片先置于低倍视野(×100)下确定最高血管密度区域,然后置于高倍视野(×200)下,选择 5 个最高血管密度区域计数(每个视野大小为 0.075mm²),再取 5 个区域的平均值作为该例的 MVD^[4]。与胃癌细胞和其他组织成分有明显区别并染成棕黄色的细胞或细胞丛为 1 个血管;结构不相连的分支结构也作为 1 个血管进行计算。

1.6 VEGF 表达水平判定 光镜下观察整个切片,每例切片随机选取 5 个高倍镜视野进行结果判定。免疫组化阳性染色为出现棕黄或棕褐色颗粒。两位经验丰富的病理科医师采用双盲法观察,参照二级计分法:(1)按阳性细胞数计数:阳性细胞数 ≤ 5% 计为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分;(2)按染色深浅:无阳性细胞计为 0 分,黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将两者得分相乘:0~1 分计为阴性(-),2~4 分为弱阳性(+),5~8 分为中度阳性(++),9~12 分为强阳性(+++)。

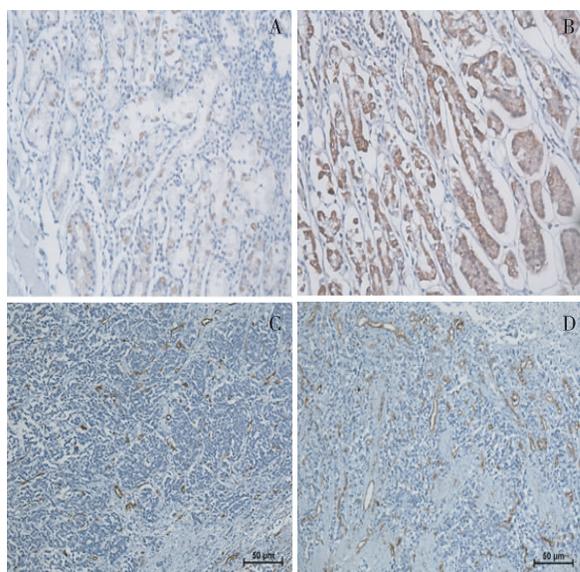
1.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 版软件分析。计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用 t 检

验,相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-455-3p 在胃癌组织中的水平 胃癌组的 miR-455-3p 水平为 1.16 ± 0.59 , 低于对照组的 2.61 ± 0.88 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 胃癌组织的 MVD 及 VEGF 表达 胃癌组的 VEGF 阳性表达率和 MVD 分别为 71.3% (57/80) 和 54.9 ± 7.3 , 均高于对照组的 28.6% (14/49) 和 27.5 ± 6.1 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。



A: 正常胃组织 VEGF 弱阳性表达 (SP $\times 400$); B: 胃癌组织 VEGF 强阳性表达 (SP $\times 400$); C: CD34 阳性标记的正常胃组织 (SP $\times 200$); D: CD34 阳性标记的胃癌组织 (SP $\times 200$)

图 1 胃癌及正常胃组织中 MVD 和 VEGF 表达

2.3 胃癌组织 miR-455-3p 水平与 MVD 和 VEGF 表达的关系 胃癌组织中 miR-455-3p 水平与 MVD 呈负相关 ($r = -0.824, P < 0.05$); 胃癌组织中 VEGF 表达为阴性、弱阳性、中度阳性和强阳性的 miR-455-3p 水平依次为 1.84 ± 0.63 、 1.62 ± 0.43 、 1.26 ± 0.38 和 0.70 ± 0.25 , miR-455-3p 水平与 VEGF 表达呈负相关 ($r = -0.783, P < 0.05$)。见图 2、图 3。

3 讨论

miRNA 是一类长度为 18~25 个核苷酸的小分子单链 RNA, 其合成及作用机制复杂。miRNA 通过与靶基因特异性作用在转录或翻译水平调节相关基因表达, 来调控发育、增殖、分化及凋亡等多种生

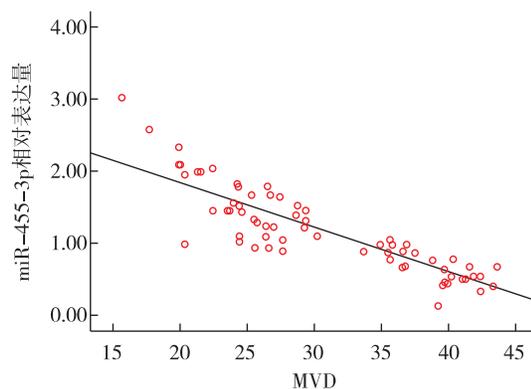


图 2 胃癌组织中 miR-455-3p 水平与 MVD 的关系

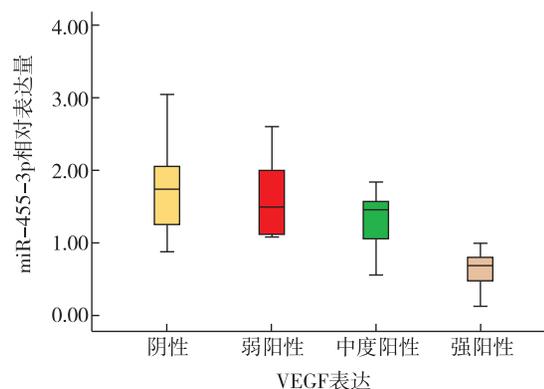


图 3 胃癌组织中 miR-455-3p 水平与 VEGF 表达的关系

物学过程, 与肿瘤相关的 miRNA 由于参与调节肿瘤发生、发展与转移等关键环节而成为近年来的研究热点^[5]。

近年研究表明, miRNA 在肿瘤的发生发展中起类似于原癌基因或抑癌基因的作用。目前, 胃癌具有独特的 miRNA 表达谱, 可帮助判断预后^[6], 扮演原癌基因或抑癌基因的角色^[7-8], 以上提示 miRNA 可能在胃癌发生、发展过程中起重要调节作用。胃癌病因涉及多因素、多基因共同作用的复杂过程, 近年研究对胃癌发生发展过程提出了许多新观点, 特别是缺氧环境下血管发生在胃癌发病机制中起重要作用。胃癌的生长、转移和预后均与血管生成有密切关系^[9]。血管再生在血管发展和内环境稳定中起重要作用。紊乱的血管再生可导致多种疾病, 如肿瘤和缺血性疾病。近年研究证实, miRNA 在血管再生及内皮细胞功能调控中起重要作用, 如 miR-126 可在内皮细胞中特异性表达并调控血管生成, miR-210 在缺氧导致的血管生成及内皮细胞存活中发挥重要作用, miR-378、miR-296、miR-21 和

miR-31 可促进肿瘤血管发生等。深入研究与血管生成有关 miRNA 的体内功能,将为有效抑制血管再生及改变血管病理发展提供一种新治疗策略。目前发现能促进肿瘤血管生成的因子有 20 多种,其中 VEGF 作用最强、特异性最高,是衡量肿瘤血管生成的量化指标。HIF-1 α 和 VEGF 均与肿瘤血管发生密切相关,阻断 HIF-1 α 从而使 VEGF 的转录及表达减少,可抑制肿瘤血管生成及肿瘤生长^[10]。包括胃癌在内的实体肿瘤的生长必须依赖新生血管的诱导和形成。内皮细胞增殖,出芽形成新生血管,构建肿瘤血运通道,为肿瘤提供营养并运输代谢产物,是肿瘤生长和转移的必要条件^[11]。

本研究显示,胃癌组的 miR-455-3p 水平低于对照组,与 Matsushima 等^[12]的研究结果一致。肿瘤血管新生机制复杂,VEGF 表达和 MVD 是衡量肿瘤血管生成的量化指标。MVD 是直接检测肿瘤组织血管数量的方法,是目前评估肿瘤血管生成状态的金标准。通过 MVD 测定肿瘤血管生成情况反映了胃癌的生物学行为特征,并与临床病理预后指标密切相关,是一个评估肿瘤血管生成和反映临床疾病进程的可靠参数。故本研究进一步检测了胃癌组织中 VEGF 表达和 MVD 水平,发现胃癌组 VEGF 阳性表达率和 MVD 均低于对照组,且胃癌组织 miR-455-3p 水平与 VEGF 表达和 MVD 呈负相关。以上提示 miR-455-3p 水平下调可能与胃癌新生血管生成有关,降低肿瘤组织内血管生成可能是通过抑制 VEGF 表达实现的,是肿瘤转移能力增强的标志。miR-455-3p 的表达不但可作为早期诊断指标,而且还可作为术后判断预后的佐证之一。

综上所述,miR-455-3p 水平在胃癌组织中降低,且与 VEGF 表达和 MVD 呈负相关,提示其可能在调控胃癌组织血管生长中发挥重要作用,但具体信号通路仍有待进一步研究。

参考文献

[1] 张康,梅倩,李祥,等.过表达 miR-455 抑制宫颈癌细胞

SiHa 的生长[J].中国生物化学与分子生物学报,2012,28(10):935-939.

- [2] Cao Y, E G, Wang E, et al. VEGF exerts an angiogenesis independent function in cancer cells to promote their malignant progression[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16):3912-3918.
- [3] Ding M, Fu X, Tan H, et al. The effect of vascular endothelial growth factor C expression in tumor associated macrophages on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(5):1023-1029.
- [4] 万珊,孟刚,顾康生,等.外周 T 细胞淋巴瘤中 VEGF 表达和 MVD 水平及其临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(8):731-735.
- [5] Zhang X, Yan Z, Zhang J, et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(10):2257-2266.
- [6] 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.
- [7] 张康,梅倩,李祥,等. miR-455 慢病毒表达载体的构建与鉴定[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(1):49-52.
- [8] 龙辉,吴清明,李欢. VEGF 的表达及其微血管密度在胃癌组织中的意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(6):557-562.
- [9] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(3):143-159.
- [10] Jafarifar F, Yao P, Eswarappa SM, et al. Repression of VEGFA by CA-rich element-binding microRNAs is modulated by hnRNP L [J]. *EMBO J*, 2011, 30(7):1324-1334.
- [11] He XX, Chang Y, Meng FY, et al. MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo [J]. *Oncogene*, 2012, 31(28):3357-3369.
- [12] Matsushima K, Isomoto H, Inoue N, et al. MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa [J]. *INT J Cancer*, 2011, 128(2):361-370.

收稿日期:2013-10-25; 修回日期:2013-11-27