

miRNA-449b 在胃癌组织中的表达及与淋巴结转移的关系

林爱琴 汪根莲 段仁杰 李铁臣

(皖南医学院 分子生物学研究室 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 通过对胃癌组织及癌旁组织中 miRNA-449b 表达的比较, 分析 miRNA-449b 与胃癌发生及淋巴结转移的关系, 为进一步探讨其在胃癌中的作用机制提供依据。方法: 收集 30 例胃癌及癌旁组织标本, 提取组织总 RNA; 茎环法反转录成 cDNA; 用实时荧光定量 PCR 方法检测 miRNA-449b 在组织中的表达水平。结果: 相比于癌旁组织, miRNA-449b 在胃癌组织中有 23 例(76. 67%) 表达下调, 7 例(23. 33%) 表达上调, 其平均表达水平低于癌旁组织, 差异有统计学意义($t = 2. 395, P = 0. 023, P < 0. 05$)。miRNA-449b 在 17 例有淋巴结转移的样本中 16 例表达下调(94. 12%) , 13 例无淋巴结转移的样本只有 7 例表达下调(53. 85%) , 淋巴结转移组与无淋巴结转移组 miRNA-449b 的下调比例, 经卡方检验, 差异有统计学意义($P = 0. 025, P < 0. 05$)。结论: miRNA-449b 与胃癌的发生及淋巴结转移相关。

【关键词】胃癌; miRNA-449b; 淋巴结转移

【中图分类号】R 735. 2 **【文献标识码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 02. 004

Expression of miRNA-449b in gastric cancer and lymph node metastasis

LIN Aiqin, WANG Genlian, DUAN Renjie, LI Tiechen

Laboratory of Molecular Biology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the expression of miRNA-449b in gastric cancer and its adjacent tissue and incidence of lymph node metastasis for elucidating the mechanisms of this gene in development of gastric cancer. **Methods:** The specimen together with adjacent tissues was obtained in 30 patients of gastric carcinoma. Total RNA was extracted from these tissues, and reversely transcribed into cDNA by stem-loop technique. Real-time fluorescence quota PCR was used to determine miRNA-449b expression in the tissues. **Results:** Expression of miRNA-449b was down-regulated in 23 cases (76. 67%) and up-regulated in 7 (23. 33%) . The expression level was generally lower than that of the adjacent tissues($t = 2. 395, P = 0. 023, P < 0. 05$) . The miRNA-449b expression was down-regulated in 16 of 17 cases with lymph node metastasis (94. 12%) , and in 7 of 13 without metastasis(53. 85%) , which suggested significant difference by Chi-square test ($P = 0. 025, P < 0. 05$) . **Conclusion:** miR-449b is associated with the development of gastric cancer and presence of lymph node metastasis.

【Key words】gastric cancer; miRNA-449b; lymph node metastasis

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目(WK201309)

收稿日期: 2014-10-20

作者简介: 林爱琴(1982-) , 女, 助理实验师, (电话) 13855363548, (电子信箱) linaiqin945@ 163. com;

李铁臣, 男, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) tiechenli@ 126. com, 通讯作者。

[2] Hoyer PB. Reproductive toxicology: current and future directions [J]. Biochem Pharmacol 2001; 62(12): 1557 - 1564.

[3] Akingbemi BT, Hardy MP. Oestrogenic and antiandrogenic chemicals in the environment: effects on male reproductive health [J]. Ann Med 2010; 33(6): 391 - 403.

[4] Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, et al. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum 2006; 54(8): 2481 - 2487.

[5] 张银昌, 王文波. 雌激素 α, β 受体在大鼠椎间盘组织中的免疫组织化学定位 [J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(21): 1981 - 1984.

[6] 张银昌, 王强, 杨昕, 等. 雌激素受体在椎间盘组织中的表达及意义 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(8): 739 - 743.

[7] Cooley HM, Stankovich J, Jones G, et al. the association between hormonal and reproductive factors and hand osteoarthritis [J]. Maturitas 2003; 45(4): 257 - 265.

[8] Ashok RA, Steven BA. The role of nitric oxide in articular cartilage break down in osteoarthritis [J]. Current Opinion in Rheumatology, 1998, 10: 263 - 268.

[9] Krajewska M, Krajewska S, Epstein JI, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers [J]. Am J Pathol, 1996, 148: 1567 - 1576.

胃癌具有较高的发病率和病死率,其预后很大程度上取决于疾病诊断时所处的阶段^[1]。然而,目前没有良好的生物标志物能有效的早期诊断,因此探索新的生物标志物和更好地了解这些机制有着重要的临床意义。微小 RNA(miRNA) 是存在于真核细胞中具有进化保守性的一族非编码小片段 RNA, 大约 18 ~ 25 个核苷酸大小,通过与靶基因 mRNA 3'-非翻译区的碱基互补配对介导 mRNA 的降解,或抑制其翻译降低基因的表达,实现对蛋白表达的调控^[2]。控制着细胞的分化、增殖和程序性细胞死亡等多个重要生理过程^[3]。miRNA 表达谱的研究已经证明其在很多疾病包括常见癌症中表达失调^[4], 并且可能扮演着致癌基因或抑癌基因的角色^[5]。miRNA-449 首次在胚胎鼠脑组织中发现^[6],位于细胞分裂周期 20B (CDC20B) 基因的第二个内含子,其家族由 miRNA-449a、miRNA-449b 和 miRNA-449c 三名成员组成。研究发现其在多种肿瘤细胞株和实体瘤中低表达,包括肝癌^[7]、前列腺癌^[8]、肺癌^[9]、结肠癌^[10]等,而在胃癌中的研究较少。本研究主要探讨 miRNA-449 在胃癌中的表达及其与淋巴结转移的关系,并通过生物信息学预测其可能的靶基因,以便进一步研究其在胃癌中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 标本采集 收集弋矶山医院 2014 年 1 ~ 7 月经病理确诊为原发性胃癌的患者手术切除标本,术前未经过放疗、化疗。取材时,分别取癌中央部位组织及距离肿瘤远端 > 5 cm 的正常组织。取材后存放于无 RNA 酶的收集管中,再加 10 倍体积的样本保存液(RNASTORE, TIANGEN 公司),确保完全浸没,

1 h 后转存 -20℃ 冰箱。采集的胃癌及癌旁组织标本共 30 对,患者的平均年龄(59. 57 ± 12. 12) 岁,经病理诊断均为腺癌;其中有淋巴结转移 17 例,无淋巴结转移 13 例;中分化标本 5 例,低分化标本 25 例。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 采用 TRIzol(Invitrogen, 美国) 一步法提取组织总 RNA,按照产品说明书进行操作。提取后的总 RNA 用紫外分光光度计检测其浓度与纯度,将其终浓度调至 1 μg/μL,备用。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR) 检测 以 U6 为内参,设计特异性茎环引物(表 1),引物由上海捷瑞生物有限公司合成。逆转录反应采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒(Thermo) 进行。反应体系与程序如下:总 RNA 1 μL,特异性反转录引物 1 μL(500 nmol/L),补水至 12 μL,在 My Cyclor TMPCR 仪(BIO RAD) 上 65℃ 反应 5 min,产物置于冰上 3 min 后加入 5 × Reacriion Buffer 4 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL、RNasin (20 U/μL) 1 μL、M-MLV (200 U/μL) 1 μL,于 PCR 仪上 42℃ 反应 60 min,70℃ 反应 5 min。得到的 cDNA 进行下一步荧光定量 PCR 反应。荧光定量 PCR 反应采用 Maxima SYBR Green/ROX qPCR 试剂盒(Thermo) 进行,体系 25 μL,置于 ABI step-one PCR 仪上 50℃ 2 min、95℃ 10 min,后 95℃ 15 s、60℃ 30 s、72℃ 30 s 共 40 循环。熔解曲线分析设置在该循环结束时,以确保产物的特异性。以 U6snRNA 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对定量结果。miRNA-449b 在癌组织与癌旁组织相对表达量的值大于 1 为上调,小于 1 为下调。

表 1 反转录和荧光定量 PCR 反应序列(5'→3')

基因	miRNA-449b	U6
反转录引物	CTCAACTGGTGTCTGGAGT-CGGCAATTCAGTTGAGGCCAGC	Oligo(dT) 15 Primer
特异性上游引物	ACACTCCAGCTGGGAGGCAG-TGTATTGTTAG	CTCGCTTCGGCAGCACA
通用下游引物	TGGTGTCTGGAGTCC	AACGCTTCACGAATTTGCC

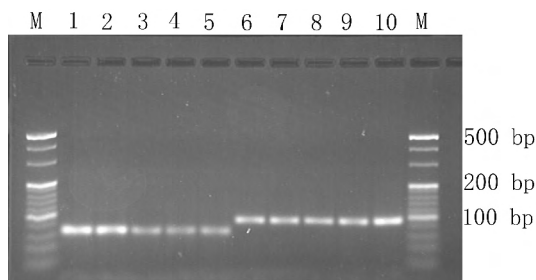
1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 进行统计分析。RT-qPCR 实验结果的数值经 log₂ 转化,所有数值均以均数 ± 标准差的形式表示。采用配对样本 t 检验分析胃癌和癌旁组织中 miRNA-449b 表达水平的差异,采用 Fisher 确切概率法分析 miRNA-449b 的表达与淋巴结转移之间的关系。设 P < 0. 05 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR 特异性表达产物的鉴定 miRNA-449b 与 U6 基因扩增出的目的片段大小分别为 66 bp 和 94 bp,经 2. 5% 的琼脂糖胶电泳结果显示条带

单一无杂带,无引物二聚体(见图1),结果显示 miRNA-449b 与 U6 基因的 qPCR 融解曲线只有一个主峰,重合性较好,可见引物特异性高且扩增时无基因组 DNA 污染(见图 2、3)。



M: Mark 20 bp DNA Ladder, 1~5 泳道为 miRNA-449 b, 6~10 泳道为 U6

图 1 miRNA-449b 与 U6 基因扩增出的目标带

2.2 miRNA-449b 在胃癌中表达 miRNA-449b 在 30 例胃癌中相对于癌旁非肿瘤组织有 23 例(76.67%)表达下调,7 例(23.33%)表达上调。miRNA-449b 的相对表达水平:胃癌组为 3.70 ± 2.58 ,癌旁组为 4.30 ± 2.36 ,两者相比,miRNA-449b 在胃癌中的表达低于癌旁组织,差异有统计学意义(0.60 ± 0.25 配对 $t = 2.395, P = 0.023$)。

2.3 miRNA-449b 与淋巴结转移的关系 miRNA-449b 在 17 例有淋巴结转移的样本中 16 例表达下调(94.12%),13 例无淋巴结转移的样本中只有 7 例表达下调(53.85%)。经 Fisher 确切概率法分析,两组差异有统计学意义($P = 0.025$)。

3 讨论

胃癌是常见的癌症之一,全球有超过 70% 的胃癌死亡病例发生在发展中国家,并且约 50% 的胃癌发生在东亚^[11]。近几十年来胃癌的发病率和死亡人数在逐年增加,尽管胃癌发生的分子基础已被广泛研究,但其确切的分子机制目前仍不完全清楚。现有研究^[1,11-12]发现多种 miRNA 参与胃癌的发生与发展。

miRNA-449 是细胞凋亡、细胞周期停滞和(或)细胞分化的强效诱导剂^[13]。他们同属于 p53 应答的 miRNA-34 家族。但是,miRNA-449 不受 p53 基因的调控,而受细胞周期调控转录因子 E2F1 的诱导^[14]。这一家族的所有 miRNA 都能够介导细胞周期停滞和细胞凋亡,从而可能抑制肿瘤。其潜在的机制包括通过下调组蛋白乙酰基转移酶连续活化 p53 基因,引起细胞凋亡;靶向细胞周期蛋白依赖性激酶及其相关的基因,直接或间接抑制 E2Fs 因子的释放,促使细胞周期阻滞。有关 miRNA-449 在胃癌

的研究中,Bou 等^[15]发现 miRNA-449a/b 在 10 例人类胃癌组织中 8 例表达降低,但未发现其表达与临床资料之间的关系,可能由于样本量较小;该实验显示 miRNA-449a/b 与靶基因结合,激活 P53 途径,进而诱导胃癌细胞凋亡,且进一步推测 miRNA-449 可能通过与细胞周期相关的靶基因结合下调 E2F1 的活性发挥其抑癌作用。

本研究中,我们发现 miRNA-449b 在 30 例胃癌组织中有 23 例表达下调,其平均表达水平低于癌旁组织,而且其表达与淋巴结转移相关,但其作用机制尚需进一步研究。根据生物信息学分析,目前在 miR Tar Base 上已经确定的 miRNA-449b 的靶基因有 SIRT1、CCNE2、MET、GMNN、HDAC1、CDK4、CDC25A 和 CDK6。在基因库中查询这些基因的主要功能是调节细胞凋亡、细胞周期以及生长与迁移。miRNA-449b 在细胞周期中的调节作用研究较多^[16-17]。Yan 等^[14]通过模型验证 miRNA-449 在调节细胞周期进程中起着至关重要的作用,并提供了双重的安全机制,通过细胞周期阻滞和凋亡以避免过多的 E2F 诱导的细胞增殖。最近有研究^[15]发现 miRNA-449 可靶向生长因子及生长因子受体(MET),调节生长、迁移与侵袭。Luo 等^[18]研究也表明 miRNA-449a 是在非小细胞肺癌中表达下调并通过靶向 c-Met 抑制人肿瘤细胞的迁移和侵袭。根据以上研究结果我们推测 miRNA-449b 在胃癌中表达失调不仅导致细胞周期蛋白控制的失调,也使生长因子和它们的受体表达失调,从而参与肿瘤的侵袭与转移。

虽然精确的分子机制还需要进一步的研究,miRNA-449b 为胃癌患者的诊断和治疗提供了新的见解与策略。以前的研究主要集中在 miRNA-449b 在细胞周期中的调节作用,在本研究中,我们发现 miRNA-449b 的低表达与淋巴结转移的关系。这些数据表明,作为一种潜在的肿瘤抑制基因,miRNA-449b 在胃癌的转移方面发挥着一定的作用,为胃癌的诊断与治疗提供新的思路。

【参考文献】

[1] YIN Ying, LI Jun, CHEN Shujie, et al. MicroRNAs as diagnostic biomarkers in gastric cancer [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13 (10): 12544 - 12555.
 [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281 - 297.
 [3] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. Genome Res, 2009, 19 (1): 92 - 105.

[4] Lu J ,Gent G ,Miska EA *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature* 2005 ,35(7043) : 834 – 838.

[5] ZHANG Baohong ,PAN Xiaoping ,Cobb GP *et al.* microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *Dev Biol* 2007 ,302(1) : 1 – 12.

[6] Wheeler G ,Ntounia-Fousara S ,Granda B *et al.* Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs [J]. *FEBS Lett* 2006 ,580(9) : 2195 – 2200.

[7] Buurman R ,Gürlevik E ,Schäffer V *et al.* Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Gastroenterology* 2012 , 143(3) : 811 – 820.

[8] Noonan EJ ,Place RF ,Pookot D *et al.* miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer [J]. *Oncogene* 2009 , 28(14) : 1714 – 1724.

[9] LUO Wenting ,HUANG Bo ,LI Zixuan *et al.* MicroRNA-449a is downregulated in non-small cell lung cancer and inhibits migration and invasion by targeting c-Met [J]. *PLoS One* ,2013 ,8(5) : e64759.

[10] FANG Yantian ,GU Xiaodong ,LI Zhengyang *et al.* miR-449b inhibits the proliferation of SW1116 colon cancer stem cells through downregulation of CCND1 and E2F3 expression [J]. *Oncol Rep* , 2013 ,30(1) : 399 – 406.

[11] Song JH ,Meltzer SJ. MicroRNAs in pathogenesis ,diagnosis ,and

treatment of gastroesophageal cancers [J]. *Gastroenterology* 2012 , 143(1) : 35 – 47.

[12] Ishiguro H ,Kimura M ,Takeyama H. Role of microRNAs in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol* 2014 ,20(19) : 5694 – 5699.

[13] Lizé M ,Klimke A ,Dobbelstein M. MicroRNA-449 in cell fate determination [J]. *Cell Cycle* 2011 ,10(17) : 2874 – 2882.

[14] YAN Fang ,LIU Haihong ,HAO Junjun *et al.* Dynamical behaviors of Rb-E2F pathway including negative feedback loops involving miR449 [J]. *PLoS One* 2012 ,7(9) : e43908.

[15] Bou Kheir T ,Futoma-Kazmierczak E ,Jacobsen A *et al.* MiR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer [J]. *Molecular Cancer* 2011 ,10: 29.

[16] YANG Xiaojing ,FENG Min ,JIANG Xia *et al.* miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A [J]. *Genes Dev* 2009 ,23(20) : 2388 – 2393.

[17] 刘棣 ,黄辰 ,刁冬梅 ,等. miRNA-449 家族靶向 CCNE2 对胃癌细胞生长的抑制调节作用 [J]. *西安交通大学学报: 医学版* , 2012 ,33(5) : 544 – 548 ,559.

[18] LUO Wenting ,HUANG Bo ,LI Zixuan *et al.* MicroRNA-449a Is Downregulated in Non-Small Cell Lung Cancer and Inhibits Migration and Invasion by Targeting c-Met [J]. *PLoS One* 2013 ,8(5) : e64759.

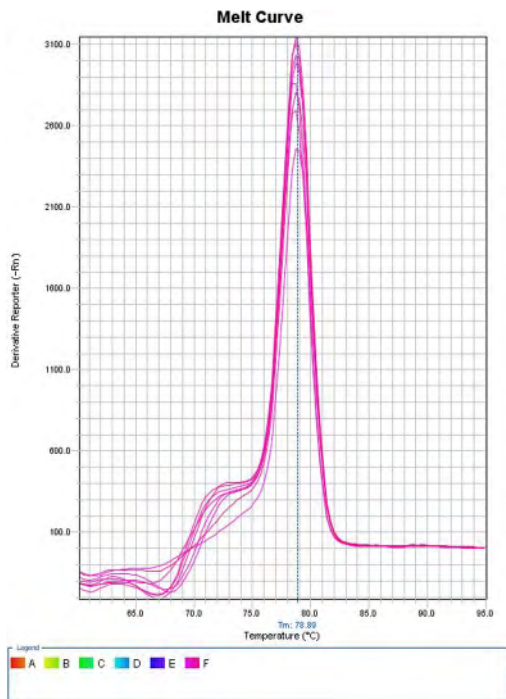


图2 miRNA-449b 的融解曲线

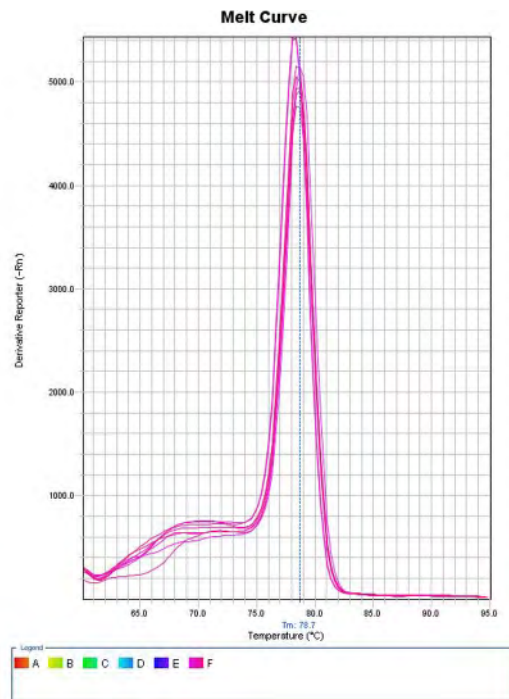


图3 U6 的融解曲线