

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000127

Has-miRNA-96 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义

周 雯,郝辰璐,关 婷

(广州军区广州总医院妇产科,广州 510010)

【摘要】目的:探讨 Has-miRNA-96(miR-96)在宫颈癌组织中的表达情况及其与临床病理特征间的关系。**方法:**采用茎环 real-time PCR 方法检测 52 例宫颈癌、28 例正常宫颈组织中 miR-96 的表达,分析 miR-96 表达与宫颈癌常见临床病理特征的关系。**结果:**miR-96 在宫颈癌组织中的相对表达量(127.045 ± 235.424)高于正常宫颈组织(0.995 ± 0.236),差异有统计学意义($P=0.000$);在中、低分化癌的相对表达量(137.778 ± 249.981)高于高分化癌中的相对表达量(75.766 ± 147.237),差异有统计学意义($P=0.005$);在腺癌中相对表达量为(196.213 ± 172.519),明显高于鳞癌(110.576 ± 246.910)($P=0.004$);临床 I 期、II 期、III~IV 期子宫颈癌患者组织中 miR-96 相对表达量分别为(22.614 ± 25.828)、(122.493 ± 78.043)、(672.902 ± 476.169),III~IV 期高于 I 期、II 期($P=0.000$ 、 $P=0.001$),II 期高于 I 期,差异有统计学意义($P=0.000$);有淋巴结转移组相对表达量为(142.537 ± 104.673)明显高于无淋巴结转移组(19.787 ± 26.204 , $P=0.000$);浸润深度: $\geq 1/2$ 间质相对表达量为(75.323 ± 94.822),高于 $<1/2$ 间质者(27.449 ± 49.728 , $P=0.025$);而与患者年龄无明显关系($P=0.385$)。**结论:**miR-96 在宫颈癌组织中存在异常高表达,提示其可能在宫颈癌的发生发展中发挥致癌基因的作用,并且与宫颈癌的演进及不良预后密切相关。

【关键词】Has-miRNA-96(miR-96);宫颈癌;茎环 real-time PCR;临床意义

【中图分类号】R711.74

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-14

作者介绍:周 雯,Email:zwen1988@163.com,

研究方向:妇科肿瘤。

通信作者:关 婷,Email:lxgdut@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000127.html>

参 考 文 献

- [1] Bradford LS, Rauh-Hain JA, Schorqe J, et al. Advances in the management of recurrent endometrial cancer[J]. Am J Clin Oncol, 2013[Epub ahead of print].
- [2] Lobanekov VV, Nicolas RH, Adler VV, et al. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene[J]. Oncogene, 1990, 5(12): 1743-1753.
- [3] Dunn KL, Davie JR. The many roles of the transcriptional regulator CTCF[J]. Biochem Cell Biol, 2003, 81(3): 161-167.
- [4] Filippova GN, Qi CF, Ulmer JE, et al. Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity[J]. Cancer Res, 2002, 62(1): 48-52.
- [5] 任立成, 王 洋, 师明磊, 等. CTCF 是一种细胞类型特异性表达的核内定位蛋白因子[J]. 国际遗传学杂志, 2012, 35(3): 146-150.
- [6] Docquier F, Farrar D, D'Arcy V, et al. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis[J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5112-5122.
- [7] Awad TA, Bigler J, Ulmer JE, et al. Negative transcriptional regulation mediated by thyroid hormone response element 144 requires binding of the multivalent factor CTCF to a novel target DNA sequence[J]. J Biol Chem, 1999, 274(38): 27092.
- [8] Rodriguez BAT, Weng YI, Liu TM, et al. Estrogen-mediated epigenetic repression of the imprinted gene cyclin dependent kinase inhibitor IC in breast cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(6): 812-821.
- [9] Wu J, Qin Y, Li B, et al. Hypomethylated and hypermethylated profiles of H19 DMR are associated with the aberrant imprinting of IGF2 and H19 in human hepatocellular carcinoma[J]. Genomics, 2008, 91(5): 443-450.
- [10] Honda S, Arai Y, Haruta M, et al. Loss of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma[J]. Br J Cancer, 2008, 99(11): 1891-1899.
- [11] Rakha EA, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression of the transcription factor CTCF in invasive breast cancer: a candidate gene located at 16q22.1[J]. Br J Cancer, 2004, 91(8): 1591-1596.
- [12] 何 莉, 朱旭东, 黄培堂. 多功能转录因子 CTCF 研究进展[J]. 生物技术通报, 2004, 15(6): 600-603.
- [13] 王 荣, 黄培堂, 朱旭东. CCCTC-结合因子的表达水平影响其在细胞内的分布[J]. 生物技术通报, 2011, 22(4): 519-521.
- [14] Oshita T, Naqai N, Ohama K. Expression of telomerase reverse transcriptase mRNA and its quantitative analysis in human endometrial cancer[J]. Int J Oncol, 2000, 17(6): 1225-1230.
- [15] Wong TC, Sokol ES, Schep AN. Transcriptional repression by the proximal exonic region at the human TERT gene[J]. Gene, 2011, 486(1-2): 65-73.

(责任编辑:冉明会)

Expression and clinical significances of Has-miRNA-96 in tissues of cervical cancer

Zhou Wen, Hao Chenjun, Guan Ting

(Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of Guangzhou Military Command)

[Abstract] **Objective:** To evaluate has-miRNA-96(miR-96) expression in cervical cancer tissues and their association with the clinicopathological features. **Methods:** Expression of miR-96 in 52 cases of cervical cancer tissues and 28 cases of normal tissues was examined by stem-loop real-time PCR. Correlations between expression of miR-96 and related clinicopathologic features of cervical cancer (age, pathologic pattern, histological grade, depths of interstitial infiltration, lymph node metastasis, clinical stage) were further analyzed. **Results:** Relative expression of miR-96 was significantly higher in cancer tissues (127.045 ± 235.424) than in normal tissues (0.995 ± 0.236) ($P=0.000$). Expression of miR-96 was significantly higher in middle and low differentiated carcinoma (137.778 ± 249.981) than in high differentiated carcinoma (75.766 ± 147.237), with statistical differences ($P=0.005$). Expression of miR-96 was significantly higher in cervical adenocarcinoma (196.213 ± 172.519) than in squamous cell carcinomas (110.576 ± 246.910) ($P=0.004$). Expression of miR-96 at I stage, II stage and III-IV stage was (22.614 ± 25.828), (122.493 ± 78.043) and (672.902 ± 476.169) respectively; expression at III-IV stage was significantly higher than that at I stage and II stage ($P=0.000$, $P=0.001$) and expression at II stage was significantly higher than that at I stage ($P=0.000$). Expression of miR-96 was significantly higher in those with lymphatic metastasis (142.537 ± 104.673) than those without (19.787 ± 26.204) ($P=0.000$). Patients with invasive depth $<1/2$ interstitial substance (27.449 ± 49.728) showed lower level of miR-96 than those with invasive depth $\geq 1/2$ interstitial substance (75.323 ± 94.822) ($P=0.025$). Expression of miR-96 was not correlated with age ($P=0.385$). **Conclusions:** Aberrant expression of miR-96 suggests it might play a role as an oncogene in the tumorigenesis and development of cervical carcinoma and it possibly correlates with progression and prognosis of cervical cancer.

[Key words] has-miRNA-96(miR-96); cervical cancer; stem-loop real-time PCR; clinical significance

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种内源性、大小约 22 个核苷酸、不能编码蛋白质的单链小分子 RNA, 可以通过特异性靶基因沉默来调控基因表达, 发挥着类似于致癌或抑癌基因的功能^[1-2], 在肿瘤发生过程中起至关重要的基因调控作用。Has-miRNA-96(miR-96) 在乳腺癌、肝癌、卵巢癌、子宫内膜癌、结肠癌等多种肿瘤中表达上调^[3-4], 可能在肿瘤发生过程中发挥癌基因的作用^[5-7], 但其在宫颈癌发生发展中的作用及机制尚未见报道。本研究采用茎环 real-time PCR 方法检测宫颈癌组织中 miR-96 的表达, 分析 miR-96 和临床病理特征的关系, 探讨 miR-96 在宫颈癌发生发展的作用及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象

标本采自 2011 年 5 月至 2012 年 12 月在本科治疗的宫颈癌患者组织 52 例 (均经宫颈活组织病理检查确诊), 活检术前均未接受过放疗、化疗或激素治疗。另取同期年龄匹配的子宫肌瘤手术的正常宫颈组织 28 例做对照。宫颈癌患者年龄 33~66 岁, 平均 (48.9 ± 8.0) 岁; 病理类型: 鳞癌 42 例, 腺癌 10 例; 病理分化程度: 高分化 9 例, 中、低分化 43 例。按 FIGO 的分类标准和 WHO 分级标准: I 期 26 例, II 期 21 例, III 期 4 例, IV 期 1 例; 其中 30 例宫颈癌患者 (I a1 期~I b2 期 26 例、II a 期 4 例) 行宫颈癌根治术, II a 期 4 例、II b 期~

IV 期 18 例行新辅助化疗+宫颈癌根治术或行同期放化疗。30 例行宫颈癌根治术的患者组有盆腔淋巴结转移者 8 例, 无盆腔淋巴结转移者 22 例; 浸润深度: $\geq 1/2$ 间质者 14 例, $<1/2$ 间质者 16 例; 均经术后病理确诊。组织标本离体后 30 min 内置于液氮罐内迅速冷冻保存。宫颈癌及常规病理资料由 2 位病理科医师盲法阅片后提供。

1.2 试剂与仪器

Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒, 实时荧光定量试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, 茎环引物由广州锐博生物公司设计, 其余试剂均为国产分析纯。NanoDrop ND-2000 紫外分光光度计购自 Thermo 公司, 实时荧光定量 PCR 仪 Rotor Gene-6000 购自德国 Qiagen 公司, 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取 操作步骤: 等量称取液氮中保存的宫颈癌及正常宫颈组织标本 100 mg, 切成薄片, 用液氮研磨法将组织磨成粉末, 加入 Trizol 试剂, 按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。采用美国生产的 NanoDrop ND-2000 紫外分光光度仪检测 RNA 溶液 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值, 计算 RNA 浓度和纯度, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值在 1.8~2.1 者用于进一步实验检测, 1% 琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.3.2 茎环 real-time PCR 检测 miR-96 表达分析 取 1 μg 总 RNA 行逆转录, 反应条件为: 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 终延伸。所有反应均设立 3 个复孔。记录每个反应管中标本的 Ct 值, 实验结果采用定量 PCR 中的相对定量法进行分析, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示肿瘤

组织 miR-96 表达量相对于对照组表达量的变化倍数,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-96} - Ct_{U6})_{\text{肿瘤}} - (Ct_{miR-96} - Ct_{U6})_{\text{正常组织}}$ 。PCR 产物经 4% 琼脂糖变性凝胶电泳分析。

1.4 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。宫颈癌临床病理参数、临床分期与 miR-96 表达水平之间的关系分析采用 Mann-Whitney 检验和 Kruskal-Wallis 检验;计量资料呈非正态分布的以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

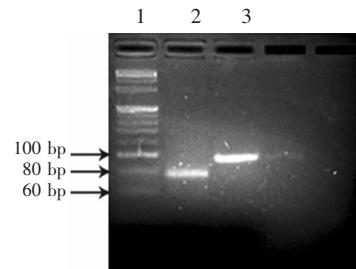
2.1 宫颈癌组织及正常宫颈组织中 miR-96 的表达

宫颈癌及正常宫颈组织中 miR-96 的表达见表 1。由图 1 可以看出 real-time PCR 产物的电泳图谱为单一的条带, miR-96-5p 引物扩增片段为 77 bp, U6 检测引物扩增片段为 94 bp。说明茎环 real-time PCR 能特异扩增 miR-96 成熟片段。宫颈癌组织中 miR-96 相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 为 45.59 (15.19, 139.61), 明显高于正常宫颈组织 0.94 (0.78, 1.11), 差异有统计学意义 ($Z=-7.344, P=0.000$)。

2.2 宫颈癌组织中 miR-96 表达和临床病理特征的关系

宫颈癌组织中 miR-96 表达和临床病理特征的关系见表 2。由表 2 可见, miR-96 在不同临床分期及病理类型中, 表达水平不同 (P 均 <0.01)。随着临床分期进展, miR-96 表达有上升的趋势, 其中 miR-96 在 III~IV 期中的相对表达量为

462.08 (422.57, 1 028.65), 明显高于 I 期 15.41 (7.52, 26.26) ($P=0.000$) 和 II 期 85.15 (68.32, 194.76) ($P=0.001$), II 期表达量明显高于 I 期, 差异有统计学意义 ($P=0.000$); 在腺癌中相对表达量为 155.67 (57.77, 270.61), 明显高于鳞癌 27.28 (13.35, 91.00) ($P=0.004$)。在中、低分化 (G2、G3 级) 组织中相对表达量为 61.61 (17.74, 183.42) 高于高分化 (G1 级) 组织中的相对表达量 16.78 (6.13, 66.67) ($P=0.005$), 其表达随肿瘤分化程度的降低而增加, 而与患者年龄无明显相关性。



1. 20 bp DNA Ladder Marker; 2. miR-96-5p; 3. U6

图 1 4% 的琼脂糖变性凝胶电泳图像

Fig.1 4% agarose electrophoresis image

30 例 (I a1~II a 期) 直接行宫颈癌根治术的患者结果显示: miR-96 表达与淋巴结转移密切相关, 有淋巴结转移组相对表达量为 163.46 (28.95, 205.62) 明显高于无淋巴结转移组 14.16 (6.99, 22.61) ($P=0.000$)。浸润深度: $\geq 1/2$ 间质相对表达量为 24.72 (14.44, 141.79), 明显高于 $<1/2$ 间质者 13.79 (5.14, 25.65) ($P=0.025$), 详见表 3。

表 1 宫颈癌组织、正常宫颈组织中 miR-96 的表达情况
Tab.1 Expression of miR-96 in normal and cervical cancer tissues

组别	例数 (n)	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Z 值	P 值
正常组织	28	19.11 (18.87, 19.39)	0.08 (-0.15, 0.37)	0.94 (0.78, 1.11)	-7.344	0.000
肿瘤组织	52	13.56 (11.95, 15.15)	-5.51 (-7.12, -3.93)	45.59 (15.19, 139.61)		

表 2 52 例宫颈癌组织中 miR-96 表达和临床病理特征的关系
Tab.2 Correlation between MiR-96 expression and clinicopathological features in 52 cases of cervical cancer

临床病理特征	例数 (n)	miR-96 相对表达值 $M(Q_1, Q_3)$	Z 值	P 值
年龄				
≤45 岁	17	35.98 (14.85, 93.29)		
>45 岁	35	49.94 (15.83, 99.74)	-0.868	0.385
病理类型				
鳞癌	42	27.28 (13.35, 91.00)		
腺癌	10	155.67 (57.77, 270.61)	-2.856	0.004
病理分级				
高分化	9	16.78 (6.13, 66.67)		
中、低分化	43	61.61 (17.74, 183.42)	-2.818	0.005
临床分期				
I 期	26	15.41 (7.52, 26.26)		
II 期	21	85.15 (68.32, 194.76)	-5.350 ^a	0.000 ^a
III~IV 期	5	462.08 (422.57, 1 028.65)	-3.416 ^b	0.001 ^b
			-3.491 ^c	0.000 ^c

注: a, I 期与 II 期比较; b, II 期与 III~IV 期比较; c, I 期与 III~IV 期比较

表 3 30 例直接手术宫颈癌患者组织中 miR-96 的表达与临床病理特征的关系
Tab.3 Correlation between MiR-96 expression and clinicopathological features in 30 cases of cervical cancer

临床病理特征	例数 (n)	miR-96 相对表达值 $M(Q_1, Q_3)$	Z 值	P 值
肿瘤浸润深度				
<1/2 间质	16	13.79 (5.14, 26.65)		
$\geq 1/2$ 间质	14	24.72 (14.44, 141.79)	-2.245	0.025
淋巴结转移				
无	22	14.16 (6.99, 22.61)		
有	8	163.46 (28.95, 205.62)	-3.612	0.000

3 讨论

宫颈癌的发生、发展是一个多基因改变的过程,多种癌基因和抑癌基因的表达失常或失衡,导致细胞无控增殖在肿瘤发生、发展和转归上起关键作用。Calin 等^[9]对 186 个已知序列的 miRNA 检测发现,超过 50% 的 miRNA 分子位于癌症相关的基因组不稳定区域,包括易丢失位点、HPV 结合区域、同源异型盒基因、杂合子微小缺失区域等,并通过识别并结合靶分子,直接导致 mRNA 的降解,或在转录后水平调控 mRNA 的翻译。Muralidhar 等^[9]发现,50% 以上浸润性宫颈鳞癌中存在 5p 片段获得,使 miRNAs 产生途径中的关键酶-Drosha 酶拷贝数增加,由此带来的 miRNAs 水平改变可能是促使该类患者发病的因素之一。

本实验茎环 real-time PCR 检测结果显示,宫颈癌组织 miR-96 的表达明显高于正常宫颈组织,随着宫颈癌的临床分期演进而增高,miR-96 的表达呈上升趋势,提示 miR-96 高表达与宫颈癌的病情演进关系密切,且在组织分化程度低及有淋巴结转移的患者组织中 miR-96 的表达明显上调。miR-96 可通过调控其靶标基因参与的信号通路,增加肿瘤细胞的侵袭、迁徙能力,发挥类似于癌基因功能从而参与宫颈癌的发生、发展。此外,临床分期、病理分级及淋巴结转移都是影响宫颈癌预后的相关因素,因此,miR-96 高表达可能与宫颈癌的不良预后有关。

有关 miR-96 参与宫颈癌发生的作用机制,目前尚未见报道。Lin 等^[10]研究发现,FOXO3a 的 3'-UTR 区含有 miR-96 的结合位点,通过抑制乳腺癌细胞中 miR-96 的表达,可以使 FOXO3a 的表达增加,抑制细胞的增殖、迁徙和转移,从而证实 FOXO3a 可能是 miR-96 的靶基因之一;据报道,在乳腺癌和肝癌细胞系中,高表达的 miR-96 通过与肿瘤抑制基因 FOXO1 的 3'-UTR 265~271 序列位点相结合,从而降低 FOXO1 的表达,FOXO1 可能是 miR-96 的靶基因之一^[4,11];在 FOXO 家族表达明显下调的肿瘤如肝癌、乳腺癌及子宫内膜癌等组织中也发现 miR-96 表达上调,推测 miR-96 调控 FOXO 家族可能是恶性肿瘤发生发展中一个重要的分子机制。Ladeiro 等^[12]研究发现,miR-96 在 HBV(+) 的肝癌中显著高表达,为正常肝组织的 65 倍;Chen 等^[13]进一步研究发现,抑制肝癌细胞中 miR-96 的表达后,骨桥蛋白(osteopontin, OPN)表达量下降,miR-96 可能

直接作用于那些调控 OPN 的肿瘤抑制基因而间接下调 OPN 的表达。既往的研究也表明,在宫颈癌组织中存在 OPN 的高表达^[14],但 miR-96 是否通过间接调控 OPN 的表达来调控宫颈癌细胞的恶性行为从而参与宫颈癌的发生发展,是否可能成为宫颈癌的潜在治疗靶点和预后判断指标,有待于进一步的深入研究及随访,不断完善 miR-96-靶 mRNA-OPN 蛋白网络调节关系将成为进一步的研究重点。

参考文献

- [1] Hede K. Studies define role of microRNA in cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(15): 1114-1115.
- [2] Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3509-3512.
- [3] Navon R, Wang H, Steinfeld I, et al. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e8003.
- [4] Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer[J]. Cancer Res, 2010, 70(1): 367-377.
- [5] Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(35): 23204-23216.
- [6] Lin H, Dai T, Xiong H, et al. Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15797.
- [7] Shimono Y, Zabala M, Cho RW, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells[J]. Cell, 2009, 138(3): 592-603.
- [8] Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(32): 11755-11760.
- [9] Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, et al. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels[J]. Pathol, 2007, 212(4): 368-377.
- [10] Lin H, Dai T, Xiong H, et al. Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15797.
- [11] Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(35): 23204-23216.
- [12] Ladeiro Y, Couchy C, Balabaud C, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations[J]. Hepatology, 2008, 47(6): 1955-1963.
- [13] Chen RX, Xia YH, Xue TC, et al. Suppression of microRNA-96 expression inhibits the invasion of hepatocellular carcinoma cells[J]. Mol Med Report, 2012, 5(3): 800-804.
- [14] 关婷, 谭同焕. 宫颈肿瘤组织中骨桥蛋白和血管内皮生长因子的表达及意义[J]. 华南国防医学杂志, 2011, 25(4): 316-318.

(责任编辑: 冉明会)