

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.012

miRNA-125b 在膀胱癌中的表达和意义

任玉欣¹ 赵松² 付英梅³ 刘云力⁴ 罗娜⁴ 赵柏^{4△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院肿瘤一科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学附属第一医院普外三科 黑龙江 哈尔滨 150001; 3 哈尔滨医科大学微生物教研室 黑龙江 哈尔滨 150086; 4 哈尔滨医科大学附属第二医院泌尿外科 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:探讨膀胱癌组织中 miR-125b 的表达在膀胱癌发生发展中的作用及其临床意义。**方法:**采用应用茎环 RT-PCR 的方法检测 66 例膀胱尿路上皮癌组织标本的 miR-125b 的表达,另有 16 例正常膀胱黏膜组织作对照,并结合临床病理资料进行统计学分析。**结果:**miR-125b 在膀胱癌组织中的表达显著高于非肿瘤的正常膀胱黏膜组织($P<0.05$),miR-125b 的水平还与表达水平与膀胱癌的组织学分级、肿瘤转移、术后复发均明显相关性($P<0.05$)。**结论:**miR-125b 在膀胱癌组织中表达量升高,且与组织学分级、肿瘤转移、术后复发相关,可能作为膀胱癌诊断和预后指标。

关键词:膀胱癌;miR-125b;表达;意义

中图分类号:Q95-3,R737.14 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2251-04

Expression and Clinical Significance of miR-125b in Bladder Cancer

REN Yu-xin¹, ZHAO Song², FU Ying-mei³, LIU Yun-li⁴, LUO Na⁴, ZHAO Bo^{4△}

(1 Department of First Oncology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department of third general surgery, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

3 Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China; 4 Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: To investigate miR-125b expression in bladder cancer and to evaluate the potential correlations between miR-125b expression and clinicopathologic features of bladder cancer patients. **Methods:** Total RNA from 66 bladder cancer tissues and 16 normal bladder tissues were extracted and analyzed for miR-125b expression by stem-loop real-time RT-PCR. The correlation between miR-125b expression and clinicopathologic features was investigated. **Results:** miR-125b expression in bladder cancer tissues was significantly increased than those in those of normal bladder tissues ($P<0.05$). And expression level of miR-125b was related to histological grade, metastasis and recurrence ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-125b has a higher expression level in bladder cancer. Expression level of miR-125b also has a strong association with histological grade, metastasis and recurrence in bladder cancer. And it has a potential application working as a diagnostic and prognostic indicator in bladder cancer.

Key Words: Prostate cancer; MiR-125b; Expression; Significance

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R737.14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)12-2251-04

前言

膀胱癌是一种常见的人类恶性肿瘤^[1],约占全部恶性肿瘤的 2%,在我国其发病率多年高居泌尿生殖系肿瘤的榜首^[2],膀胱癌复发率高达 55%-85%,因此其诊治和预后具有重大的科学意义和社会意义。Micro-RNA 是一类长为 18-24 个核苷酸的小分子非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA),它通过碱基互补配对与靶基因 mRNA 结合,从而抑制靶基因的表达。真核生物中 miRNA 广泛参与神经系统的发育^[3]、胰岛素分泌和脂肪细胞调控^[4,5]、造血和红系分化^[6,7]、细胞凋亡和肿瘤形成^[8,9]等生物学过程,也有研究提出将 miRNA 作为肿瘤分子标记物辅

助癌症的诊断和预后^[10,12]。miR-125b 的编码基因 miR-125b-1 位于 11q23 和 11q24 间的杂合型缺失(LOH)微小区域,该区域在肺癌、乳腺癌和卵巢癌组织中存在突变或缺失^[13],提示其可能与各种癌症的发生与发展有关。本研究旨在通过茎环 RT-PCR 的方法检测膀胱尿路上皮癌组织标本中 miR-125b 的表达情况,并分析其与病人各种临床资料间的相关性,探讨这 miR-125b 在膀胱癌发生发展中的作用及其可能的临床应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

收集哈尔滨医科大学附属二院 2005 年 2 月至 2011 年 4 月泌尿外科患膀胱癌而行膀胱全切或部分切除术的液氮保存标本,均经病理组织学确诊为膀胱尿路上皮癌的组织,共计 70 例(其中 4 例样品不合格,被剔除而不用后续分析),另有 16

作者简介:任玉欣(1983-),女,硕士,住院医师,主要从事肿瘤学方向的研究

△通讯作者:赵柏(1976-),男,博士,主治医师,主要从事泌尿系统肿瘤方向的研究

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-10)

例正常膀胱黏膜组织作对照。组织保存方式为液氮冻存 30 min 后放入 -80 ℃ 保存。

1.2 试剂与仪器

Trizol (Invitrogen), M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTPs、SYBR Mastermix (Toyobo)、ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems), 分光光度仪 (EPPENDORF)。

1.3 RNA 的提取

取 -80 ℃ 保存的组织标本在液氮中碾碎, 加入氯仿 0.2 mL, 剧烈震荡后室温静置 5 min; 12000 r/min, 4 ℃ 离心 15 min, 取上清液约 300 μL 移至新的 EP 管中; 加 500 μL 异丙醇, 混匀后在碎冰中放置 20 min; 12000 r/min, 4 ℃ 离心, 90 min, 去上清取沉淀, 加 1 mL 75% 乙醇洗涤; 7500 r/min, 4 ℃ 离心 5 min; 倒掉乙醇后空甩离心再次吸尽乙醇, 开盖室温晾干; 加入 DEPC 处

理过的水 20 μL 溶解, 震荡混匀。用分光光度仪 (Biophotometer) 检测 RNA 溶液 OD260 与 OD280 的吸光值, 计算 RNA 浓度和纯度, OD260/OD280 值 >1.8 为合格样品, 可用于后续实验; 取 5 μg 的总 RNA 加入 RNA loading buffer, 1.2% 琼脂糖电泳分析, 其 28S 与 18S 条主带亮度约为 2:1。

1.4 miRNA 表达分析

用于 miR-125b 定量的所有引物和探针均购买自 ABI (Applied Biosystems CA USA) 公司, 并按照试剂盒说明书进行 RT 反应, 另外以 U6 作为内参分析 miR-125b 的相对表达量, 引物由上海生工合成, 其具体序列见表 1; 取 2 μg 总 RNA 以 U6 茎环 RT 引物进行逆转录, 逆转录的反应条件为 16 ℃ 30 min, 42 ℃ 30 min, 75 ℃ 15 min 反应结束后 -20 ℃ 保存。

表 1 U6 的 RT 及 PCR 引物序列

Table 1 RT and PCR primers of U6

基因 Gene	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	产物大小 Product size
U6	茎环 RT 引物 Stem-loop RT primer	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT	101bp
	正向引物 Forward primer	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	
	反向引物 Reverse primer	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT	

以 15 μL 的体系进行 Realtime-PCR。反应体系: 1 μL RT 产物, 1× SYBR Green I Mastermix, 0.5 μM miRNA 特异前向引物, 0.5 μM 通用的反向引物; 反应条件: 95 ℃ 10 min, 40 个循环 (95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min), 每个样品做三个复孔, 记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的域值时所经历的循环数, 即 Ct 值, 以 U6 为内参, 以 $N=2^{-Ct}$ 表示目的 miR-125b 的相对表达量。

1.5 统计学分析

数据的统计学分析使用 SPSS 13.0 软件包完成。膀胱癌组织与非肿瘤的正常膀胱黏膜组织中 miR-125b 相对表达量的比较使用 Mann Whitney U 检验; 膀胱癌组织中 miR-125b 与各临床病理资料间的关系采用 pearson 卡方法或 Fisher 精确概率法进行统计学检验, 各种假设检验均以 $P < 0.05$ 为显著性水平。

2 结果

2.1 miR-125b 在膀胱癌组织与正常膀胱黏膜组织中的表达

采用茎环 RT-PCR 法测量了 miR-125b 在膀胱癌组织中的表达, 以 U6 为内参与非肿瘤的正常膀胱黏膜组织中 miR-125b 进行比较, 由于样本呈非正态, 故后续集中趋势描述选用中位数, 检验方式采用非参数秩和检验。分析得到 miR-125b 在膀胱癌组织中的相对表达量 $N=2^{-Ct}$ 中位数为 450.1, 高于非肿瘤的正常膀胱黏膜组织 274.0 的表达量 (图 1), 采用独立样本的 Mann Whitney U 秩和检验其差异是否有显著性, P 值小于 0.05, 具有统计学显著性, 故可以认为在膀胱癌组织中 miR-125b 的表达量显著高于前列腺癌旁组织及正常的膀胱黏膜组织。

2.2 miR-125b 表达与膀胱癌病人临床病理特征的关系

如图 1 所示, miR-125b 在膀胱尿路上皮癌组织中表达量一般高于非肿瘤的正常膀胱黏膜组织, 我们取癌组织中 miR-125b 表达量高于正常膀胱黏膜组织中 miR-125b 表达量两倍即 548.0 的病例为阳性 (27 例), 其余病例记为阴性 (39 例); 比较 miR-125b 的表达与各临床病理参数之间的关系, 我们发现 miR-125b 的表达和膀胱癌的组织学分级、肿瘤转移、术后复发相关 ($P < 0.05$), 而与 TNM 分期、患者年龄、性别没有显著性关联。

结果显示组织学分级 G1 级的膀胱癌病人 miR-125b 的阳性率最低, G2 期次之, G3 期膀胱癌病人的癌组织中 miR-125b 表达的阳性率最高, 不同组织学分级病人癌组织 miR-125b 表达量的差异具有显著性 ($P < 0.001$); 另外在有远端转移的膀胱腺癌病例中 miR-125b 的阳性率显著高于没有远端转移的病例 ($P = 0.001$); 而术后复发的膀胱癌病人的癌组织中 miR-125b 阳性率显著高于未复发病人的癌组织 ($P = 0.021$)。见表 2。

miR-125b 一直以来仅仅是作为一个神经系统特异性表达的微小 RNA 被各科研机构研究^[14], 但是近几年来关于其与癌症的关联报道越来越多^[15-18], 而 Le 等人提出 miR-125b 可以负调控 p53 的表达, 抑制凋亡发生^[15] 这一重要结论更是让对 miR-125b 促癌作用的研究引起了广泛关注。本研究发现 miR-125b 在膀胱癌组织中的表达显著高于正常膀胱组织 ($P < 0.05$), 这提示 miR-125b 很可能作为膀胱癌的一个诊断指标; 而膀胱癌组织中 miR-125b 的表达水平与膀胱癌的组织学分级、肿瘤转移、术后复发均具有明显相关性 ($P < 0.05$), 说明

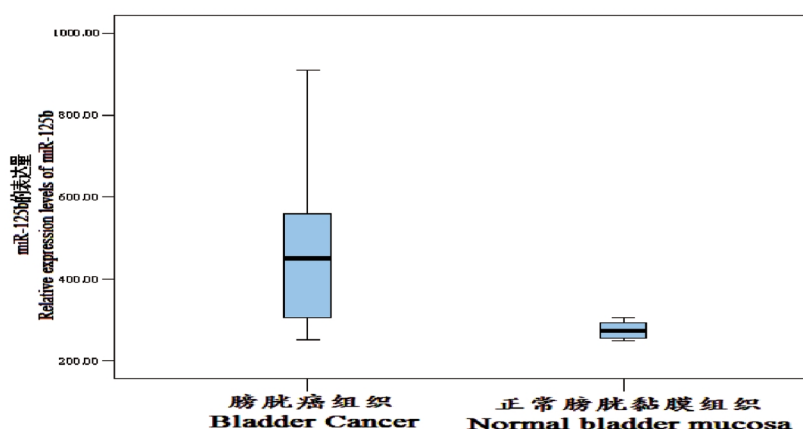


图1 膀胱癌组织与正常膀胱黏膜组织中 miR-125b 的表达

Fig.1 Expression of miR-125b in bladder cancer tissue and normal bladder mucosa

表2 miR-125b 的表达和膀胱癌临床属性之间的关系

Table 2 Expression of miR-125b and the relationship between with clinical attributes of bladder tumor

组别 Groups		miR-125b 的表达情况 Expression of miR-125b		P 值
		阳性(n=27)	阴性(n=39)	
		Masculine(n=27)	Negative(n=39)	
性别	男 Male	21	20	0.073
Gender	女 Female	6	19	
年龄(岁)	≤ 60	13	17	0.715
Age(years)	> 60	14	22	
组织学分级	G1	1	19	<0.001
Histological grade	G2	7	13	
	G3	19	7	
TNM 分期	Tis-T1	12	21	0.453
TNM stage	T2-T4	15	18	
淋巴结转移	有	20	13	0.001
Lymph node metastasis	无	7	26	
肿瘤复发	有	11	6	0.021
Tumor recurrence	无	16	33	

miR-125b 可能在参与到了膀胱癌的发生与恶化进展过程中,而 miR-125b 对重要抑癌蛋白 TP53 的负调控作用^[1]的增强是最可能的作用机制。miR-125b 上游有 CDX2^[19]、NF-KB^[20]等调节因子构成复杂的调控网络,它自身还与炎症反应及其它复杂疾病有关联,这都使得 miR-125b 在癌症中的作用显得更加复杂,对于其在膀胱癌发生发展中的具体地位还需要进一步生理生化实验的验证。

总之本研究揭示出 miR-125b 在膀胱癌组织中表达量的升高,以及 miR-125b 的表达水平与癌组织学分级、肿瘤转移、术后复发具有明显的相关性,因此我们认为,临床上对 miR-125b 的检验和研究将有助于膀胱癌的早期诊断及鉴别诊断,并能够一定程度上预测肿瘤的复发可能和转移倾向,有望成为膀胱癌的一种新临床诊断指标和分子标记物。

参考文献(References)

[1] Tharakan ST, Inamoto T, Sung B, et al. Cureum in potent iates the antitumor effect s of gemcitabine in anorthotopic model of human bladder cancer th rough suppression of proliferat ive and angiogenic

biomarkers[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(2): 218-228

[2] 刘俊江, 张蕴霞, 李瑾宜, 等. p16、survivin、cyclin D1 在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12 (7): 1309-1311, 1305

Liu Jun-jiang, Zhang Yun-xia, Li Jin-yi, et al. The Expression of p16, CyclinD1 and Survivin in Transitional Cell Carcinoma of Bladder (TCC) and their Implications [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(7): 1309-1311, 1305

[3] Choi P S, Zakhary L, Choi W Y, et al. Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis[J]. Neuron, 2008, 57(1): 41-55

[4] Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs[J]. Biol Chem, 2008, 389(3): 305-312

[5] Wang Q, Huang Z, Xue H. MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4 [J]. Blood, 2008, 111(2): 588-595

[6] Wang Q, Li YC, Wang JH, et al. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor

- Rb2/p130[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2889-2894
- [7] Shi L, Cheng Z, Zhang J, et al. The mechanism of apoptosis in human U87 glioma cells induced by miR -21 antisense oligonucleotide [J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2008, 25(5): 497-501
- [8] Garzon R, Croce C M. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis[J]. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15(4): 352-358
- [9] Cohen E E, Zhu H, Lingen M W, et al. A feed-forward loop involving protein kinase Calpha and microRNAs regulates tumor cell cycle[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 65-74
- [10] Nie J, Liu L, Zheng W, et al. microRNA-365, down-regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting Cyclin D1 and Bcl-2[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 220-225
- [11] Lu J, Getz EA, Miska E, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838
- [12] Hammond S M. MicroRNAs as oncogenes[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16(1): 4-9
- [13] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065-7070
- [14] 姜飞洲, 万小平, 陈晓悦, 等. MiR-125b 在肿瘤发生发展中作用的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(8): 1570-1572
- Jiang Fei-zhou, Wan Xiao-ping, Chen Xiao-yue, et al. Research Progress in Functions of MiR-125b in Tumors[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2010, 10(8): 1570-1572
- [15] Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(7): 862-876
- [16] Xia HF, He Tz, Liu CM, et al. MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human gloma cells by targeting Bmf Cell [J]. *Physiol Biochem*, 2009, 23(4-6): 347-358
- [17] BrianjH, Smasiddhi B, Dawn D, et al. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral Cancer Cells Contributes to Malignacy [J]. *Genes Chrom Cancer*, 2009, 48(7): 569-582
- [18] Shi XB, Xue L, Ma AH, et al. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes [J]. *Prostate*, 2011, 71(5): 538-549
- [19] Ghose J, Sinha M, Das E, et al. Regulation of miR-146a by RelA/NFkB and p53 in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells, a cell model of Huntington's disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23837
- [20] Lin KY, Zhang XJ, Feng DD, et al. miR-125b, a Target of CDX2, Regulates Cell Differentiation through Repression of the Core Binding Factor in Hematopoietic Malignancies[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(44): 38253-38263

(上接第 2223 页)

- [9] Nordfors L, Jansson M, Sandberg G, et al. Large-scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by Pyrosequencing™ and validation against the 5' nuclease (Taqman) assay [J]. *Hum Mutat*, 2002, 19(4): 395-401
- [10] 刘云龙, 陈之遥, 周国华, 等. 全血直接扩增结合焦磷酸测序法测定亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性 [J]. *分析化学*, 2012, 40(7): 1037-1042
- Liu Yun-long, Chen Zhi-yao, Zhou Guo-hua, et al. Genotyping of methylenetetrahydrofolate reductase gene by pyrosequencing coupled with polymerase chain reaction using human whole blood as starting material[J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(7): 1037-1042
- [11] Ye H, Wu HP, Huang H, et al. Prenatal diagnosis of trisomy 21 by quantitatively pyrosequencing heterozygotes using amniotic fluid as starting material of PCR[J]. *Analyst*, 2013, 138(8): 2443-2448
- [12] Klein TE, Altman RB, Eriksson N, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(8): 753-764
- [13] Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, et al. A randomized and clinical effectiveness trial comparing two pharmacogenetic algorithms and standard care for individualizing warfarin dosing (CoumaGen-II) [J]. *Circulation*, 2012, 125(16): 1997-2005
- [14] Yang J, Chen Y, Li X, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 genotypes on the risk of hemorrhagic complications in warfarin-treated patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 4234-4243
- [15] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(4): 363-375
- [16] Jeong YH, Tantry US, Kim IS, et al. Effect of CYP2C19*2 and *3 loss-of-function alleles on platelet reactivity and adverse clinical events in East Asian acute myocardial infarction survivors treated with clopidogrel and aspirin [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011, 4(6): 585-594
- [17] Ando Y, Saka H, Ando M, et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(24): 6921-6926
- [18] Iyer L, Das S, Janisch L, et al. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity [J]. *Pharmacogenomics J*, 2002, 2(1): 43-47
- [19] Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, et al. Relevance of Different UGT1A1 Polymorphisms in Irinotecan-Induced Toxicity A Molecular and Clinical Study of 75 Patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5151-5159
- [20] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 463-471