

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.018

miRNA-105 在胃癌组织中的表达情况*

胡晓薇 刘 丹 王金彩 刘文涛 杨玉光 吴 瑾[△]

(哈尔滨医科大学附属第三医院内科 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:分析胃癌组织与癌旁正常胃黏膜组织中 miRNA 的差异表达情况。**方法:**收集胃癌组织和其相应癌旁正常胃黏膜组织共 33 对,经抽提、纯化 RNA 后,反转录合成荧光分子 Hy3 的 cDNA 探针,将其与 miRCURY™ LNA Array(v.16.0)(Exiqon 公司)芯片进行杂交,应用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪来扫描 miRNA 芯片的荧光强度, GenePix Pro 6.0 软件(Axon)把图像转化为数字信号,以差异大于 2 倍的标准来确定胃癌黏膜组织中差异表达的 miRNA。再用实时荧光定量 PCR 方法验证芯片结果中表达异常增高的 miR-105 在 33 例胃癌组织中的表达情况。**结果:**miRNA 表达谱芯片结果显示:胃癌组织中共有 51 种 miRNA 表达异常,其中 miR-105、miR-548n、miR-214*、miR-4309 等 31 种 miRNA 表达上调,miR-31、miR-1275、miR-26b*、miR-744 等 20 种 miRNA 表达下调;实时荧光定量 PCR 证实与癌旁正常胃黏膜组织相比,胃癌组织中 miR-105 表达显著上调 ($P<0.01$)。**结论:**miR-105 在胃癌组织的表达明显高于正常胃黏膜组织,可能与胃癌的发生、发展相关。我们的研究为胃癌的发病机制和诊断治疗提供了一个新的研究方向。

关键词:胃癌;miR-105;miRNA 芯片;实时荧光定量 PCR

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)16-3069-04

Expression of miRNA-105 in Gastric Cancer*

HU Xiao-wei, LIU Dan, WANG Jin-cai, LIU Wen-tao, YANG Yu-guang, WU Jin[△]

(Internal medicine, The third Affiliated Hospital Of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the miRNA expression difference between gastric cancer and normal gastric mucosa. **Methods:** Total miRNA extracted and purified from 33 pairs samples of gastric carcinoma's specimens and corresponding normal gastric tissue was tagged by fluorescent Hy3. The slides were scanned using the Axon GenePix 4000B microarray scanner. Scanned images were then imported into GenePix Pro 6.0 software (Axon) for grid alignment and data extraction. miRCURY™ LNA Array (v.16.0)(Exiqon company) was used to detect differential expression of miRNA with the standard of 2-fold differential expression. Real-time fluorescence quantitative PCR was applied to verify miR-105 of miRNA array results. **Results:** The expression of 51 miRNA was different between gastric cancer and normal gastric mucosa. 31 of them was up-regulated including miR-105, miR-548n, miR-214*, miR-4309 and etc, 20 of them was down-regulated including miR-31, miR-1275, miR-26b*, miR-744 and etc. The result of real-time fluorescence quantitative PCR shows that miR-105 highly expressed in gastric cancer, and the change has great statistical significance ($P<0.01$). **Conclusions:** Over expression of miRNA-105 in gastric carcinoma may be related with the pathogenesis and development of gastric cancer. Our study applied a new direction of the pathogenesis, diagnosis and treatment of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; MiR-105; MiRNA microarray; Real-time quantitative PCR

Chinese Library Classification: R735.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3069-04

前言

胃癌已成为严重危害人类健康的最常见的恶性肿瘤之一,全世界范围内发病率为 10~150/10 万,位居所有恶性肿瘤的第 2 位。同期胃癌死亡率为 24-34/10 万,居恶性肿瘤死因的第 3 位,我国每年约有 30 万新发病例,另有近 24.4 万人死于胃癌^[1]。但胃癌的发病机制至今尚未完全阐明,一种广泛存在于自然界的小分子单链非编码 RNA-微小 RNA(microRNA, miRNA)近年来逐渐成为胃癌发病机制的热点研究内容。miRNA 能以碱基互补形式结合到靶基因 mRNA 的 3' 非编码区(3'UTR)上,导致

靶基因 mRNA 降解或翻译抑制,在转录后水平上对基因表达进行负性调控,从而发挥抑制或者促进肿瘤的作用^[2]。由于 miRNA 在肿瘤与正常组织有着不同的表达谱,所以他不但可以作为肿瘤的诊断指标,还可帮助判断肿瘤患者的预后^[3]。近年有研究表明 miR-105 参与了肿瘤的演进过程,但其在胃癌中的表达状况国内外尚未见报道。本研究采用涵盖了现已知最广的 miRNA 表达谱芯片,对胃癌中 miRNA 的表达进行分析,并应用实时荧光定量 PCR 方法对芯片结果中表达异常增高的 miR-105 进行检测,旨在为进一步探讨 miRNA 与胃癌发生、发展的关系提供新的思路。

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D201120)

作者简介:胡晓薇(1982-),女,硕士,主要研究方向:肿瘤内科的临床与基础研究,电话:1321461785, E-mail:zhyy0809@163.com

△ 通讯作者:吴瑾, E-mail:wu_jin@163.com

(收稿日期:2013-12-08 接受日期:2013-12-30)

1 材料与方法

1.1 病例标本

33 例胃癌组织标本均取自 2011 年 08 月至 2012 年 04 月在我院胃肠外科进行胃癌手术患者的手术切除标本,其中男性患者 23 例(69.70%),女性患者 10 例(30.30%),年龄 41-76 岁,平均年龄 58.12 岁。癌旁组织在距离肿瘤远端 5cm 处切取正常胃组织作为正常对照组。所有病例术前均为接受化疗或放疗。

1.2 主要试剂

Trizol Reagent (Invitrogen 公司),miRcute miRNA 第一链合成试剂盒 (TIANGEN 公司),miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒 (TIANGEN 公司),miRCURY™ LNA Array (v.16.0) (Exiqon 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 组织标本于手术离体后,经适量生理盐水漂洗后迅速放至液氮中冷冻,并于 -80℃ 冰箱中长期保存。

1.3.2 RNA 提取 低温下研磨 100 mg 组织,加入 1mL trizol,在冰上充分匀浆后按试剂盒说明进行 miRNA 提取。将提取的 miRNA 空气中自然晾干后加入 20 μ L DEPC 溶液溶解,存于 -80℃ 冰箱备用或进行下一步实验。

1.3.3 miRNA 的荧光标记 将 miRCURY™ Hy3™/Hy5™ Power labeling kit (Exiqon)试剂盒内试剂配置反应液:1 μ L 的总 RNA,1 μ L 的 CIP buffer,0.5 μ L 的 CIP,用水补足至 2 μ L,充分混匀、孵育,对 RNA 进行 Hy3 荧光标记。

1.3.4 miRNA 的芯片杂交 采用 miRCURY™ LNA Array16.0 (Exiqon)按说明书配置杂交反应液:荧光标记好的 miRNA 样品 12.5 μ L,2 $\times$ Hybridization buffer 90 μ L,Nuclease-free Buffer 77.5 μ L,混匀、孵育后与探针进行杂交。杂交后用 Wash buffer kit 清洗。

1.3.5 芯片扫描及数据分析 应用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪 (Axon Instruments, Foster City)来扫描 miRNA 芯片的荧光强度,并保存图像。扫描后保存的图像用 GenePix Pro 6.0 软件(Axon)生物芯片扫描分析仪进行数字转化,采用中位数归一化法计算标准值。

1.3.6 实时荧光定量 PCR 应用 miRcute miRNA 第一链合成试剂盒,吸取 1 μ L 提取后的 miRNA 液体,按照说明书进行 miRNA 的逆转录合成 cDNA。采用 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒,以 U6 作为内参,进行 miRNA 定量检测 miR-105 在各组织中的表达情况。内参 U6 及 miR-105 的引物分别为 5'-ACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCC-3',5'-GGTCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT-3'。实时荧光定量反应体系为 20 μ L,包括:1 μ L 的 cDNA,101 μ L 的 miRcute miRNA premix (含 SYBR 和 ROX),0.4 μ L 的 Forward primer,0.4 μ L 的 Reverse primer,8.2 μ L 的 ddH₂O,每孔重复三次。反应条件为:94℃ 预变性 2 min;然后以 94℃ 20 s,60℃ 34 s 和 60℃ 34 s 进行 45 个循环反应。扩增反应在荧光定量 PCR 仪 -Light Cycler 2.0 上进行。以标准品 U6 作为内参照,用其拷贝数作为校正基数。Ct (cycle threshold) 值表示目的基因出现指数增长时的最低循环数。每个标本每个 miRNA 均重复三次,取其平均值。用同样本中 miRNA 的 Ct 值减去相应 U6 的 Ct 值得到该 miRNA 的 Δ Ct 值。胃癌组织中 miRNA 的表达量最终以 2 $^{-\Delta\Delta$ Ct 法来计算, $\Delta\Delta$ Ct=实验组 Δ Ct-对照组 Δ Ct。

1.4 统计学分析

将上述得到的数据均应用 SPSS16.0 统计软件进行分析。用两样本均数 T 检验方法分析胃癌组织与相应癌旁正常胃黏膜组织中 miR-105 的表达水平之间的差异。

2 结果

2.1 miRNA 芯片结果

用 GenePix Pro 6.0 软件(Axon)将荧光信号转化为数据,标准化后分析发现:相对于癌旁胃正常组织,胃癌组织中表达上调大于两倍且 P<0.05 的 miRNA 共有 31 个,如 miR-105、miR-548n、miR-214*、miR-4309 等;下调大于两倍且 P<0.05 的 miRNA 共有 20 个,如 miR-31、miR-1275、miR-26b*、miR-744 等(图 1)。

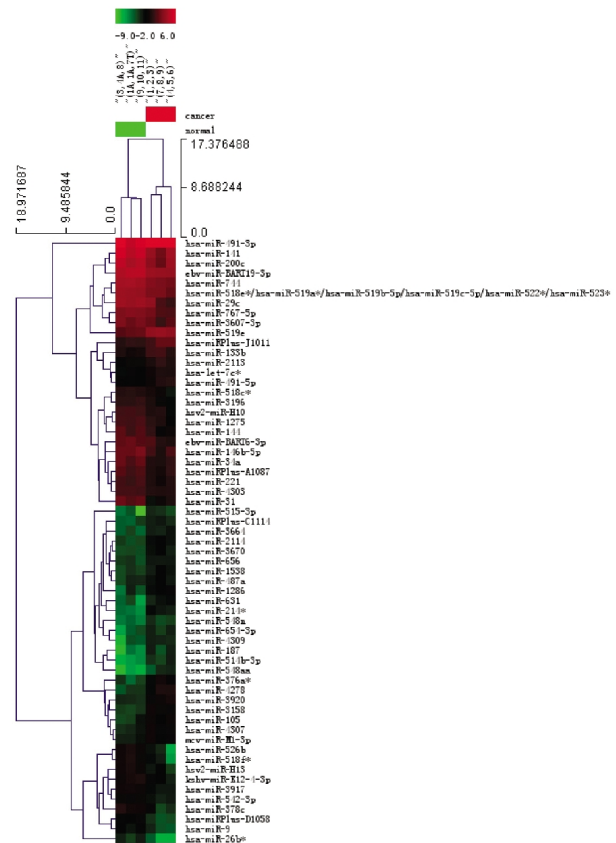


图 1 miRNA 芯片聚类图

Fig. 1 Hierarchical Clustering of miRNA chip

2.2 实时荧光定量 PCR 结果

2.2.1 溶解曲线 由于不同序列或长度的 PCR 产物溶解的温度也不同,因此所得到的峰值也不同。本实验应用实时荧光定量 PCR 方法检测各组织 miR-105 在胃癌组织及相应癌旁正常胃黏膜组织对照组的表达情况,所得溶解曲线均显示为单峰,说明引物的特异性良好(图 2,图 3)。

2.2.2 扩增曲线 Ct 值与反应体系中目的 cDNA 的试剂拷贝数呈反比,其值越低,则表明试剂拷贝数越高。本实验显示,所有组织中 miRNA 的扩增曲线均呈指数增长,并均达到平台期,为典型的倒 S 型曲线,表明扩增效率较高(图 4,图 5)。

2.2.3 定量结果分析 miR-105 在胃癌组织与癌旁正常胃黏膜组织中的表达存在显著差异,胃癌组织中 miR-105 的表达水平较癌旁正常胃黏膜组织明显上调,改变有显著统计学意义。

($P < 0.01$)。

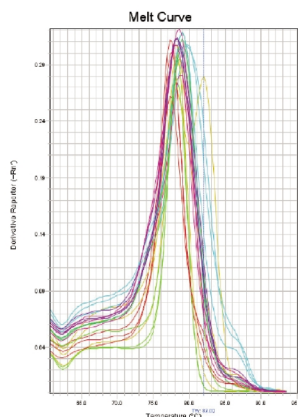


图2 miR-105 溶解曲线

Fig.2 Solubility curve of miR-105

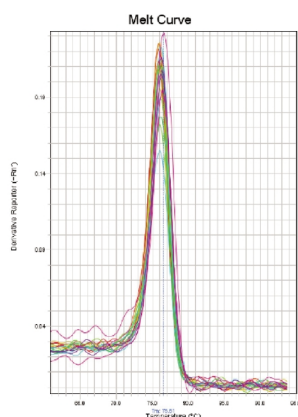


图3 U6 溶解曲线

Fig.3 Solubility curve of U6

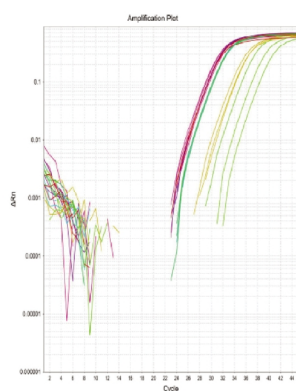


图4 miR-105 扩增曲线

Fig.4 Amplification curve of miR-105

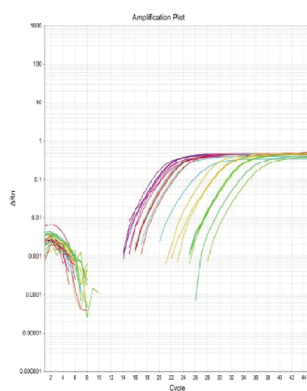


图5 U6 扩增曲线

Fig.5 Amplification curve of U6

3 讨论

胃癌的死亡率及发病率较高,其传统的方法诊断主要依靠胃镜、肿瘤标记物 CEA、CA199 等。而胃镜检查往往由于其为侵入性检查,很多患者难以接受,传统的肿瘤标记物 CEA、CA199 敏感性及其特异性较差,导致胃癌患者在确诊时以多为中晚期,错失最佳治疗时期。因此,探索新的胃癌标记物已成为当前的热点话题之一。在众多的研究方向中,miRNA 作为近年来新发现的小分子 RNA 脱颖而出,并且越来越多的报道证实,它与胃癌的发生、发展密切相关,有望成为胃癌的新的分子诊断标记物及预后的判断指标^[4-7]。

miRNA 是一类短小的表达调控因子,从植物到动物都具有同源性,进化上高度保守,提示 miRNA 可能对生命体的生长、发育及增殖、分化等起着至关重要的调节作用,当其表达异常时,则有可能促进肿瘤的发生、发展^[8]。由 miRNA 介导的基因转录后调控是一种重要的基因表达调控方式,在肿瘤的发生、发展、侵袭和转移等过程中发挥着关键作用,在胃癌中亦是如此^[9]。有学者研究发现 miR-421 在胃癌组织中呈高表达,并且通过抑制其在胃癌细胞 SGC-7901 和 MGC-803 中的表达,可以抑制胃癌细胞的生长,提示 miR-421 与胃癌的形成可能相关,在胃癌中扮演着癌基因的角色^[10]。Liu 等发现在胃癌细胞中 miR-27 表达上调,并且靶向作用于抑制素,使其表达降低,进

而促进了胃癌细胞的生长^[11]。Yoshiyuki Tsukamoto 等应用 miRNA 芯片经过对 22 个胃癌的病例研究发现,相对于正常胃组织,胃癌组织中的 miR-375 表达下调,进一步研究发现下调的 miR-375 对靶基因 PDK1 和 14-3-3zeta 的靶向抑制作用减弱,促进了肿瘤的发生^[12]。此外,Baruch Brenner 等分析比较了 45 对胃癌及相应癌旁正常胃组织的 miRNAs 芯片表达谱,结果显示,miR-451、miR-199a-3p 和 miR-195 可以作为预见胃癌复发的标记物^[13]。miR-21、miR-17-5p、miR-196a-2 和也都分别被证实与胃癌的发生相关,在一定程度上促进胃癌细胞的增殖^[14-17]。本实验采用丹麦 Exiqon 公司的最新版本的第 6 代 miRNA 基因表达谱芯片,该芯片的探针使用了基于 LANTM 专利技术的捕捉探针,与普通 DNA 捕捉探针相比,它的高亲和性更能克服 Tm 值不一致导致 miRNA 杂交亲和力的不同。通过 miRNA 基因表达谱芯片筛查,我们发现相对于癌旁正常胃组织,胃癌组织中有 miRNA 个表达异常,其中上调大于两倍的有 miR-105、miR-548n、miR-214*、miR-4309 等 31 个 miRNA,下调大于两倍的有 miR-31、miR-1275、miR-26b*、miR-744 等 20 个 miRNA。这些 miRNA 在胃癌组织中呈现异常的表达,可能与胃癌的发生存在一定的相关性。

其中,ulian Hamfjord 等通过高通量测序对结直肠癌组织及癌旁结直肠粘膜组织进行了 miRNA 的检测,其结果中 miR-105 表达异常增高,且通过生物信息学预测发现 miR-1051 可能参与了结直肠癌的发生、发展^[18]。此外,Novotny GW 等通过应用 miRNA 表达谱芯片分析发现,miR-105 亦在睾丸癌中表达有所增高^[19]。Sirotkin AV 等人证实了 miR-105 可以参与调节卵巢细胞的增殖和凋亡过程^[20]。还有人发现并证实了 miR-105 的靶基因,如 Sheedy FJ 等人发现在人口腔角质化细胞中,miR-105 可以通过与 TLR2 基因的 3' UTR 区相结合,并降低其蛋白的表达^[21]。如上研究提示:miR-105 在多种肿瘤的发病中起着重要作用。虽 miR-105 在胃癌组织中的表达情况,目前尚未见相关报道,但我们的实验通过 miRNA 芯片分析以及实时荧光定量验证发现,相对于正常胃组织,miR-105 在胃癌组织中亦有高表达,提示 miR-105 可能作为促癌基因,参与胃癌的发生、发展,为胃癌的发病机制的深入研究提供了新的方向。miR-105 有望成为胃癌新的诊断分子标记物及基因治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Liu Zheng-xin. Early know stomach cancer [J]. Cancer Frontier,2011, (1):58-59
- [2] Jin Wu,Jincai Wang,Hongfeng Zhou.An analysis of the relationship of the expression of Cx32 and Cx43 with the invasion and metastasis of Gastric Carcinoma[J]. The International Journal of Integrative Oncology, 2010,4(1):24-31
- [3] Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. MicroRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma [J]. Blood,2010, 115(13):2630-2639
- [4] Wang HJ, Ruan HJ, He XJ, et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion [J]. Eur J Cancer, 2010,46(12):2295-2303
- [5] Wang X, Ling C, Bai Y, et al. MicroRNA-206 is associated with invasion and metastasis of lung cancer[J]. Anat Rec (Hoboken),2011, 294(1):88-92

- [6] Julian Hamfjord, Astrid M. Stangeland, Timothy Hughes, et al. Differential Expression of miRNAs in Colorectal Cancer: Comparison of Paired Tumor Tissue and Adjacent Normal Mucosa Using High-Throughput Sequencing[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34150
- [7] Wang W, Li F, Mao Y, et al. A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma [J]. Hum Genet, 2013, Feb 21. [Epub ahead of print]
- [8] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA, et al. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. Science, 2007, 318(58):1931-1934
- [9] Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA. MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2009, 2(4):361-369
- [10] Jiang Z, Guo J, Xiao B, et al. Increased expression of miR-421 in human gastric carcinoma and its clinical association[J]. J Gastroenterol, 2010, 45(1):17-23
- [11] Liu T, Tang H, Lang Y, et al. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin [J]. Cancer Lett, 2009, 18, 273(2): 233-242
- [12] Yoshiyuki Tsukamoto, Chisato Nakada, Tsuyoshi Noguchi, et al. MicroRNA-375 Is Downregulated in Gastric Carcinomas and Regulates Cell Survival by Targeting PDK1 and 14-3-3 ζ [J]. Molecular and Cellular Pathobiology, 2011, 2010, 70(6):2339-2349
- [13] Baruch Brenner, Moshe B Hoshen, Ofer Purim, et al. MicroRNAs as a potential prognostic factor in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(35):3976-3985
- [14] Negrini M, Nicoloso M S, Calin G A. MicroRNAs and cancer new paradigms in molecular oncology[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(3): 470-479
- [15] Peng S, Kuang Z, Sheng C, et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population [J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(8):2288-2293
- [16] Arora T, Liu B, He H, et al. PIASx is a transcriptional corepressor of signal transducer and activator of transcription 4 [J]. J Biol Chem, 2003, 278(24):21327-21330
- [17] Garzon R, Calin G A, Croce C M. MicroRNAs in cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60:167-179
- [18] Julian Hamfjord, Astrid M. Stangeland, Timothy Hughes, et al. Differential Expression of miRNAs in Colorectal Cancer: Comparison of Paired Tumor Tissue and Adjacent Normal Mucosa Using High-Throughput Sequencing[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34150
- [19] Novotny GW, Belling K, Bramsen JB, et al. MicroRNA expression profiling of carcinoma in situ (CIS) cells of the testis[J]. Endocr Relat Cancer, 2012, Mar 14. Epub
- [20] Sirotkin AV, Lauková M, Ovcharenko D, et al. Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis[J]. J Cell Physiol, 2010, 223(1):49-56
- [21] Sheedy FJ, O'Neill LA. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation [J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(3): 50-55

(上接第 3065 页)

- [6] Ben-Nun A, Altman E, Best LA. Emergency percutaneous tracheostomy in Trauma patients an early experience [J]. Ann Thorac Surg, 2004, 77 (3): 1045 -1047
- [7] MacIntyre NR, Cook DJ, Ely EW Jr, et al. Evidence-based guidelines for weaning and discontinuing ventilatory support: a collective task force facilitated by the American college of chest physicians; the American association for respiratory care; and the American college of critical care medicine[J]. Chest, 2001, 120 (6 Suppl): 375S-395S
- [8] Shan L, Hao P, Xu F, et al. Benefits of Early Tracheotomy: A Meta-analysis Based on 6 Observational Studies [J]. Respir Care, 2013, 58(11):1856-1862
- [9] Shan L, Zhang R, Li LD. Effect of Timing of Tracheotomy on Clinical Outcomes: an Update Meta-analysis Including 11 Trials [J]. Chin Med Sci J, 2013, 28(3):159-166
- [10] Terragni PP, Antonelli M, Fumagalli R, et al. Early vs Late Tracheotomy for Prevention of Pneumonia in Mechanically Ventilated Adult ICU Patients [J]. JAMA, 2010, 303(15):1483-1489
- [11] Wang Fei, Wu You-ping, Bo Lu-long, et al. The timing of tracheotomy in critically ill patients undergoing mechanical ventilation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Chest, 2011, 140(6):1456-1465
- [12] Dunham CM, Ransom KJ. Assessment of early tracheostomy in trauma patients: a systematic review and meta-analysis [J]. Am Surg, 2006, 72 (3): 276-281
- [13] Dasta JF, McLaughlin TP, Mody SH, et al. Daily cost of an intensive care unit day: the contribution of mechanical ventilation[J]. Crit Care Med, 2005, 33:1266-1271
- [14] Brochard L. Noninvasive ventilation for acute respiratory failure [J]. JAMA, 2002, 288(8):932-935
- [15] Cook D, De Jonghe B, Brochard L, et al. Influence of airway management on ventilator associated pneumonia: evidence from randomized trials[J]. JAMA, 1998, 279(10):781-787
- [16] Boles JM, Bion J, Connors A, et al. Weaning from mechanical ventilation[J]. Eur Respir J, 2007, 29(5):1033-1056
- [17] Nieszkowska A, Combes A, Luyt CE, et al. Impact of tracheotomy on sedative administration, sedation level, and comfort of mechanically ventilated intensive care unit patients[J]. Crit Care Med, 2005, 33(11): 2527-2533
- [18] Heffner JE. The role of tracheotomy in weaning [J]. Chest, 2001, 120 (6(suppl)):477S-481S
- [19] Ciaglia P, Firsching R, Syniec C. Elective percutaneous dilatational tracheostomy: a new simple bedside procedure; preliminary report[J]. Chest, 1985, 87(6):715-719
- [20] Antonelli M, Michetti V, Di Palma A, et al. Percutaneous translaryngeal versus surgical tracheostomy: a randomized trial with 1-yr double-blind follow-up [J]. Crit Care Med, 2005, 33 (5): 1015-1020