

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.010

miR-450a-5p 在浆液性卵巢癌中的表达及临床意义*

洪 甲¹ 姚 丽² 张佳瑞² 任 拼² 王姝妹² 兰 森² 李艳红^{1△} 张 伟^{2△}

(1 第四军医大学唐都医院妇产科 陕西 西安 710038; 2 第四军医大学唐都医院病理科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:检测 miR-450a-5p 在浆液性卵巢癌中的表达情况,并分析 miR-450a-5p 的表达与浆液性卵巢癌临床病理特征之间的关系,探讨其在浆液性卵巢癌发生、发展中的意义。**方法:**采用实时荧光定量 PCR 技术,检测 101 例浆液性卵巢癌组织及对照 50 例正常输卵管伞端组织中 miR-450a-5p 的表达情况,并分析 miR-450a-5p 表达水平与临床病理特征之间的关系。实验数据采用统计学软件进行分析。**结果:**miR-450a-5p 在浆液性卵巢癌组织中的表达量显著低于正常输卵管组织对照组($P < 0.01$)。miR-450a-5p 的表达水平与浆液性卵巢癌临床病理特征之间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**miR-450a-5p 可能作为抑癌基因,在卵巢癌的发生、发展中发挥重要作用,进一步的研究有望为浆液性卵巢癌的早期诊断及个体化治疗提供新的理论依据。

关键词:浆液性卵巢癌;输卵管伞端组织;miR-450a-5p;实时荧光定量 PCR

中图分类号:737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)17-3240-04

The Expression and Clinical Significance of miR-450a-5p in Serous Ovarian Cancer*

HONG Jia¹, YAO Li², ZHANG Jia-ru², REN Pin², WANG Shu-mei², LAN Miao², LI Yan-hong^{1△}, ZHANG Wei^{2△}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Pathology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of miR-450a-5p in serous ovarian cancer, and analyze the correlation of its expression with clinicopathological features and investigate the significance of miR-450a-5p in ovarian cancer carcinogenesis and development. **Methods:** Quantitative real-time PCR was used to assess the expression of miR-450a-5p in 101 serous ovarian cancer tissues and 50 normal fimbria of fallopian tube tissues, and the results were assessed with statistic analysis. **Results:** The expression of miR-450a-5p in serous ovarian cancer tissues down-regulated significantly than that in normal fimbria of fallopian tube tissues ($P < 0.01$). There was no significant difference for expression of miR-450a-5p with clinicopathological features in serous ovarian cancer ($P > 0.05$). **Conclusion:** miR-450a-5p may play an important role as a tumor-suppressor in the occurrence and development of serous ovarian cancer and may provide new basic theories for the earlier diagnosis and target treatment of serous ovarian cancer.

Key words: Serous ovarian cancer; Fimbria of fallopian tube; miR-450a-5p; Real-time fluorescent quantitative PCR

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3240-04

前言

卵巢上皮性癌是妇科常见的恶性肿瘤之一, 占所有卵巢癌的 75%-90%^[1], 其中浆液性腺癌又占全部卵巢上皮性癌的 60-70%^[2]。上皮性癌由于早期无明显症状, 且缺乏有效的筛查及早期诊断方法, 70% 以上患者就诊时已届晚期^[3], 5 年存活率低于 30%^[4,5], 死亡率居所有女性生殖道恶性肿瘤的首位, 故被称为“沉默的杀手”。近年来, 肿瘤标记物的检测使卵巢癌的诊断水平有所提高。上皮性卵巢癌病人血清 CA125 水平明显升高, 手术和化疗有效者 CA125 水平很快下降, 是临床上最常用的辅助检查之一。但是在其他非卵巢恶性肿瘤如乳腺癌、肺

癌、胃癌等消化道恶性肿瘤以及一些良性疾病, 如子宫内膜异位症、盆腔炎、卵巢囊肿、胰腺炎、肝炎、肝硬化等血清 CA125 水平也有不同程度升高, 使其特异性受到一定限制。

但目前仍缺乏早期筛查卵巢癌的有效手段, 因此亟需寻找新的早期诊断卵巢癌或有效治疗卵巢癌的方法。

MicroRNAs(miRNAs)是内源性非编码小 RNA, 在转录后水平调控基因的表达, 参与了细胞的增殖, 分化, 代谢, 凋亡等生物进程, 与多种肿瘤的发生发展密切相关^[6]。根据调控靶基因不同, miRNAs 可作为抑癌基因或癌基因参与肿瘤发生、转移、耐药等病理进程^[7,8]。目前 miRNAs 与卵巢癌的关系也有报道, 但作用机理尚不十分明确。近年来国外学者研究发现, 浆液性卵巢

* 基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金(HG3310); 陕西省科技攻关课题(2007K09-09);

陕西省科学技术研究发展计划项目(2014K11-01-01-25)

作者简介: 洪甲(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事妇科肿瘤的分子机制研究,

E-mail: hongjia252525@163.com

△ 通讯作者: 李艳红(1970-), 女, 副教授, 主要从事妇科肿瘤的机制研究, E-mail: yhli2003@hotmail.com

张伟(1966-), 男, 教授, 主要从事肿瘤病理学的机制研究, E-mail: w_zhang66@yahoo.com

(收稿日期: 2013-12-29 接受日期: 2014-01-24)

癌起源于输卵管上皮^[9]。本课题组前期以正常输卵管上皮组织为对照,经 miRNA 芯片筛选,发现 miR-450a-5p 在卵巢癌组织中表达量显著下调。本实验采用实时荧光定量 PCR 技术在大样本中检测 miR-450a-5p 的表达差异情况,并分析 miR-450a-5p 表达水平和卵巢癌临床病理特征之间的关系,从分子水平探讨浆液性卵巢癌的发病机制,有望为早预防、早发现、早治疗卵巢癌提供更新的理论基础。

1 资料与方法

1.1 资料

选取 2009 年至 2013 年第四军医大学唐都医院妇科手术切除的浆液性卵巢癌石蜡标本,HE 染色后,经资深病理科专家判读,选取癌组织 > 50% 的蜡块用于本实验研究,共计 101 例。患者年龄 23-82(54.3±10.2)岁,术前均未经过放化疗。根据手术病理分期(FIGO,2006 年)选取 I-II 期 24 例,III-IV 期 77 例。根据 WHO 分级:高-中分化 10 例,低分化 91 例。正常人输卵管组织选自 2012 年至 2013 年于第四军医大学唐都医院妇科因良性病变切除输卵管的病人,输卵管组织主要来源于伞端,切除的伞端组织经福尔马林固定石蜡包埋,行 HE 染色,经资深病理科专家判读,选取上皮组织大于 > 50% 的 HE 染色片,并调取相应伞端蜡块 50 例,最大年龄 70 岁 1 人,最小年龄 20 岁 2 人,30-40 岁 16 人,40-50 岁 12 人,20-30 岁 11 人,50-60 岁 7 人,60-70 岁 1 人。样本收集征得病人及家属知情同意。

1.2 方法

所有石蜡包埋组织样本的总 RNA 均用 QIAGEN 公司的 miRNeasy FFPE Kit (50) 试剂盒提取,提取后的总 RNA 应用 nanodrop2000 检测浓度和纯度,A260/A280 比值在 1.8~2.1 者方可用于反转录实验。总 RNA 提取后立即行反转录实验或

保存于 -70℃ 冰柜中。反转录实验所用试剂 miScript II RT Kit (50) 购于 QIAGEN 公司,将提取的总 RNA 严格按试剂盒说明书反转录为 cDNA,所得 cDNA 立即行实时荧光定量 PCR 反应或保存于 -20℃ 冰柜中。实时荧光定量 PCR 所用试剂 miScript SYBR Green PCR Kit (200),Hs_miR-450_1 miScript Primer Assay、Hs_RNU6-2_1 miScript Primer Assay 均购自于 QIAGEN 公司。所用 PCR 仪为 ABI7500 fast PCR 仪,购于美国 ABI 公司。将样本 cDNA 及对照 cDNA 于 ABI7500 fast PCR 仪上行实时荧光定量 PCR 检测相对表达量,相对表达量的计算方法采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,即以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示肿瘤组织 miR-450a-5p 表达量相对于对照组表达量的变化倍数,其中 $\Delta\Delta CT = (CT_{miR-450a-5p} - CT_{U6})_{肿瘤} - (CT_{miR-450a-5p} - CT_{U6})_{正常伞端对照}$ 。以上操作严格按照 PCR 反应说明书执行,设置阴性对照控制污染,每孔设置三个重复,用 RNU6-2 进行归一化。

1.3 数据处理

miR-450a-5p 的表达数据以均数±标准差表示。采用 SPSS 13.0 统计软件的独立样本 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-450a-5p 在浆液性卵巢癌和正常输卵管伞端组织中的表达情况

miR-450a-5p 在浆液性卵巢癌组织中的表达水平显著低于正常输卵管伞端组织,下调倍数:5.82 倍,即在浆液性卵巢癌组织中的表达量 1.00(0.300-3.34)显著低于正常输卵管伞端组织中的表达量 5.82(1.95-17.39), $P < 0.01$,具有统计学意义(图 1、2,表 1)。

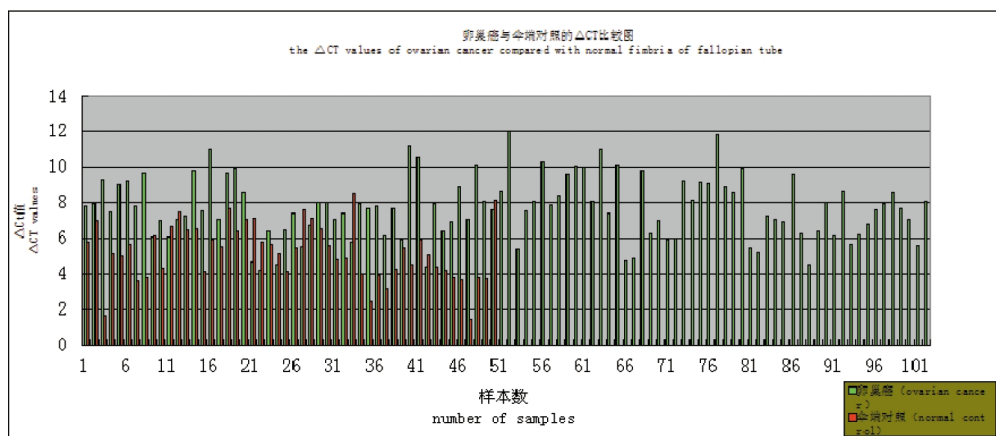


图 1 绿色为卵巢浆液性癌的 ΔCT 值,红色为正常输卵管伞端组织的 ΔCT 值,计算相对表达量的方法采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。将所有数据经统计学软件 SPSS 13.0 分析,独立样本的 t 检验, $P < 0.01$,具有统计学意义。

Fig.1 Green: the ΔCT values of the serous ovarian cancer. red: the ΔCT values of normal fimbria of fallopian tube. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method used to measure the relative expression level. the statistical software SPSS 13.0 used to analyse the values, the t-test was statistically significant, $P < 0.01$.

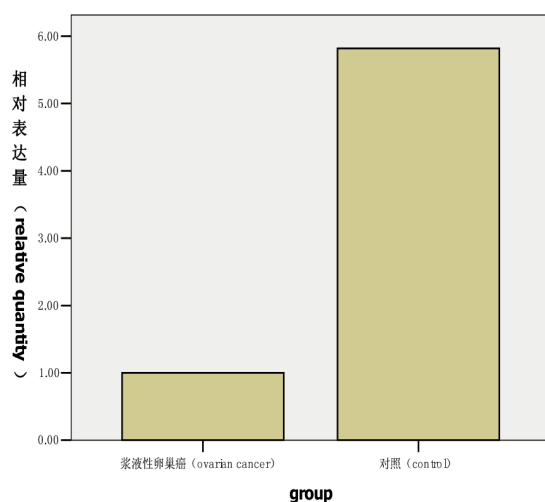
表 1 浆液性卵巢癌与伞端对照中 miR-450a-5p 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression level of miR-450a-5p in serous ovarian cancer compared to normal fimbria of fallopian tube(Mean±SD)

Group	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	P
Serous ovarian cancer n=101	7.72±1.74	0.00±1.74	1.00(0.300-3.34)	
Normal fimbria of fallopian tube n=50	5.27±1.58	-2.54±1.58	5.82(1.95-17.39)	<0.01

表 2 浆液性卵巢癌中 miR-450a-5p 的表达水平与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)Table 2 The relationship between the expression level of miR-450a-5p in serous ovarian cancer and clinicopathological features in patients($\bar{x} \pm s$)

	n	Average $\Delta CT(\pm s)$	P values
age			
≤50 years	29	7.83± 1.95	0.70
> 50 years	72	7.69± 1.66	
lymphatic metastasis			
yes	41	7.81± 1.71	0.11
no	60	7.68± 1.76	
FIGO stage			
I ~II	24	7.82± 2.00	0.53
III ~IV	77	7.69± 1.65	
pathological grading			
high-middle	10	7.79± 1.54	0.90
low	91	7.72± 1.77	
CA-125 values			
≤200 U/mL	34	7.38± 1.76	0.15
> 200 U/mL	67	7.91± 1.71	

图 2 MiR-450a-5p 在浆液性卵巢癌中显著性低表达 ($P < 0.01$)Fig.2 MiR-450a-5p significantly down-regulated in serous ovarian cancer ($P < 0.01$)

2.2 浆液性卵巢癌中 miR-450a-5p 的表达水平与临床病理分类关系

所有浆液性卵巢癌样本按临床病理资料分类, 分类后的 ΔCT 值按独立样本 t 检验, 进行统计学分析。从年龄、淋巴结转移、临床分期、病理分化、CA125 值分类比较, 所有 P 值均 > 0.05 , 没有统计学意义。见表 2。

3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统肿瘤中致死率最高的恶性肿瘤, 若能早发现, 约有 70% 的患者经过治疗可达完全缓解。因此, 寻找卵巢癌的早期筛查、早期诊断、早期治疗方法已成为目前研究的热点问题。

miRNAs 是一类长度为 22~24 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 研究表明, miRNA 调节人类近 30% 的基因表达^[11]。在动物体内 miRNA 主要通过与靶基因 3'-UTR 区不完全配对, 抑制靶基因 mRNA 翻译或降解靶基因, 参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生命活动^[12]。miRNAs 表达的上调或下调, 在肿瘤的发生发展中通过调节癌基因或抑癌基因, 从而影响肿瘤组织的生物学特性。近年来, 有学者报道 miRNA 与卵巢癌的转移、复发^[13-15]及耐药^[16,17]相关。之前卵巢癌的对照多选用正常的卵巢组织, 然而正常卵巢组织间质成份多, 上皮含量很少; 也有学者用正常人卵巢细胞系、不同分期及不同级别的癌组织为对照^[18-20], 以此为基础发现了一些与卵巢癌相关的 microRNAs。近年来有大量研究报道认为大多数浆液性卵巢癌起源于输卵管伞端^[21,10], 且已有老鼠的动物模型模拟了这一学说^[22], 因此选取正常人输卵管上皮组织为对照可能更为科学。最近文献^[23,24]显示, 国外已有学者采用输卵管上皮作为对照研究卵巢癌的发病机理。本实验选伞端为对照, 另一个原因也是基于伞端组织易于取材, 且上皮细胞含量较其它输卵管部分丰富。

目前有关 miR-450a-5p 与肿瘤的研究尚未见文献报道。本实验通过大样本实时荧光定量 PCR 技术的检测, 发现 miR-450a-5p 在浆液性卵巢癌中呈显著性低表达 ($P < 0.01$)。这提示了 miR-450a-5p 可能作为抑癌基因在浆液性卵巢癌的发生、发展、侵袭中发挥了重要作用, 有望为早预防、早发现、早治疗浆液性卵巢癌提供新的理论依据。经过临床病理分组及统计学分析, miR-450a-5p 在年龄、淋巴结转移、临床分期、病理分化、CA125 值各自分组间的差异表达没有统计学意义, 这又提示了是否 miR-450a-5p 作为抑癌基因在浆液性卵巢癌的进展过程中发挥着稳定的抑癌作用, 能否成为治疗浆液性卵巢癌的分子药物! 为此, 我们经过信息生物学软件分析, 已预测出了 miR-450a-5p 的靶基因, 并通过阅读相关文献, 了解到这些预测

的靶基因参与了浆液性卵巢癌的转移、前列腺癌的增殖等机制,因此我们下一步将通过细胞功能学实验、通路分析,揭开 miR-450a-5p 在浆液性卵巢癌中的具体作用机制,发现它的临床应用价值。

参考文献(References)

- [1] 高雯,臧荣余,王雁,等.人类输卵管上皮永生细胞系的建立及鉴定[J].中国癌症杂志,2013,23(4):241-247
Gao Wen, Zang Rong-yu, Wang Yan, et al. Immortalization of human fallopian tube epithelial cells [J]. China oncology, 2013, 23(4): 241-247
- [2] Chen EY, Mehra K, Mehrad M, et al. Secretory cell outgrowth, PAX2 and serous carcinogenesis in the Fallopian tube [J]. J Pathol, 2010, 222(1): 110-116
- [3] Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2006, 95(Suppl 1): S161-S192
- [4] Hanna L, Adams M. Prevention of ovarian cancer [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2006, 20(2): 339-362
- [5] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249
- [6] Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs [J]. Science, 2005, 309(5740): 1519-1524
- [7] Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J]. Cell, 2005, 120(1): 21-24
- [8] Olson P, Lu J, Zhang H, et al. MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer [J]. Genes Dev, 2009, 23(18): 2152-2165
- [9] Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(32): 5284-5293
- [10] Erickson BK, Conner MG, Landen CJ. The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer [J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 209(5): 409-414
- [11] Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. Cell, 2005, 120(1): 21-24
- [12] Tsai LM, Yu D. MicroRNAs in common diseases and potential therapeutic applications [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(1): 102-107
- [13] Laios A, O'Toole S, Flavin R, et al. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer [J]. Mol Cancer, 2008, 7(1): 35-49
- [14] Hu X, Macdonald D M, Huettnner P C, et al. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2009, 114(3): 457-464
- [15] Flavin R, Smyth P, Barrett C, et al. miR-29b expression is associated with disease-free survival in patients with ovarian serous carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19(4): 641-647
- [16] Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 425-433
- [17] Zheng T, Wang J, Chen X, et al. Role of microRNA in anticancer drug resistance [J]. Int J Cancer, 2010, 126(1): 2-10
- [18] Dahiya N, Morin PJ. MicroRNAs in ovarian carcinomas [J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17(1): 77-89
- [19] Nam EJ, Yoon H, Kim SW, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(9): 2690-2695
- [20] Corney DC, Nikitin AY. MicroRNA and ovarian cancer [J]. Histol Histopathol, 2008, 23(9): 1161-1169
- [21] Li J, Fadare O, Xiang L, et al. Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis[J]. J Hematol Oncol, 2012, 5(1): 8-19
- [22] Kim J, Coffey DM, Creighton CJ, et al. High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(10): 3921-3926
- [23] Liu Z, Liu J, Segura MF, et al. MiR-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma [J]. J Pathol, 2012, 228(2): 204-215
- [24] Mcmillen BD, Aponte MM, Liu Z, et al. Expression analysis of MIR-182 and its associated target genes in advanced ovarian carcinoma [J]. Mod Pathol, 2012, 25(12): 1644-1653