

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.019

非小细胞肺癌组织中 miR-19b 与 miR-20a 的表达及临床意义*

林铿强 石 琴 何 峰 陈 群[△] 许德新

(福建医科大学教学医院福州肺科医院 福建 福州 350008)

摘要 目的:检测 miR-19b 与 miR-20a 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达,探讨两者与肺癌临床病理的关系。**方法:**选择我院 NSCLC 肺癌患者 50 例,使用 Real-time RT-PCR 法对其癌组织及癌旁正常组织中 miR-19b 和 miR-20a 的含量进行检测,并利用 2^{-(-△△CT)}法处理结果,分析与临床病理资料的关系。**结果:**相对于内参 U6,miR-19b 基因在 NSCLC 组织中的表达量明显低于癌旁正常组织,而 miR-20a 基因在 NSCLC 组织中的表达量明显高于癌旁正常组织,差异具有统计学意义($P<0.05$);在 NSCLC 组织标本中,miR-19b 基因表达量在临床分期 I-II 的标本中明显高于临床分期 III,而 miR-20a 基因表达量在临床分期 I-II 的标本中明显低于临床分期 III,差异均具有统计学意义($P<0.05$);miR-19b 基因表达量在肿瘤病理低分化组织中明显低于肿瘤病理高分化组织,而 miR-20a 基因表达量在肿瘤病理低分化组织中明显高于肿瘤病理高分化组织,差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论:**miR-19b 低表达和 miR-20a 高表达与 NSCLC 的临床分期、病理分级具有密切关系,早期检测有助于 NSCLC 诊断和治疗。

关键词:miR-19b;miR-20a;非小细胞肺癌;Real-time RT-PCR

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)36-7073-03

Expression and Clinical Significance of miR-19b and miR-20a in Non-Small Cell Lung Cancer*

LIN Keng-qiang, SHI Qin, HE Feng, CHEN Qun[△], XU De-xin

(Fuzhou Pulmonary Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350008, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expressions of miR-19b and miR-20a in the tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC) and to explore the relationships between the expressions of miR-19b and miR-20a and the pathology. **Methods:** 50 patients with NSCLC in our hospital were selected, and 2^{-(-△△CT)} method was used for quantitative analysis on the relationships of the expressions of miR-19b and miR-20a in the tissues of the carcinoma and the adjacent normal lung with the pathological characteristics. **Results:** With the reference of U6, the expression of miR-19b in NSCLC tissues was lower than that of the adjacent normal tissues, while the expression of miR-20a in NSCLC tissues was higher than that of the adjacent normal tissues, and the differences were statistically significant ($P<0.05$); the expression of miR-19b in the I-II clinical stage was higher than that of the III, while the expression of miR-20a in the I-II clinical stage was lower than that of the III, and the differences were statistically significant ($P<0.05$); the expression of miR-19b in the low pathological grade was lower than that of the high pathological grade, while the expression of miR-20a was higher, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** It is indicated that the low expression of miR-19b and the high expression of miR-20a should be closely related to the clinical stages and the pathological types of NSCLC, which would be helpful to the diagnosis and treatment of NSCLC by early detection.

Key words: miR-19b; miR-20a; Non-small cell lung cancer; Real-time RT-PCR

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)36-7073-03

前言

肺癌是一种严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤,其发病率不断升高,并且病死率较高,预后效果差^[1]。按组织类型分型肺癌包括小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),主要以 NSCLC 为主,占 80%以上^[2]。有研究表明,NSCLC 患者术后 5 年生存率低于 15%^[3]。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种含 18 个到 24 个

核苷酸的小的内源性非编码调控 RNA,经与目标 RNA 结合而影响特定基因蛋白的表达,人体中的 miRNA 类似致癌或抑癌基因在多种肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用^[4,5]。本研究通过检测我院 50 例 NSCLC 患者非癌组织及癌旁正常组织中 miR-19b 和 miR-20a 中的含量,从而探讨两者与肺癌临床病理的联系。

1 资料与方法

* 基金项目:福州市卫生局科技计划项目(榕卫人[2013]150 号)

作者简介:林铿强(1968-),男,本科,主任医师,从事胸部肿瘤外科方面的研,E-mail:569852341@qq.com

△ 通讯作者:陈群(1965-),男,本科,主任医师,从事胸部肿瘤诊断治疗的方面研究

(收稿日期:2014-05-06 接受日期:2014-05-30)

1.1 一般资料

选择 2011 年 1 月到 2013 年 12 月在我院住院非小细胞肺癌患者 50 例作为研究对象,其中男 32 例,女 18 例,年龄(44~87)岁,平均年龄(57.6 ± 9.2)岁,所有患者根据胸部 CT、气管镜和肿瘤标志物进行诊断。且均进行外科肿瘤切除手术,标本通过病例学证实为 NSCLC 患者,且将癌组织标本作为病例组。所有患者术前、术中均为使用放疗以及免疫治疗方法。另外取所有患者癌旁正常肺组织作为对照组。切除癌组织及癌旁正常肺组织后应立刻放入 RNAlater 保存,并在 -80°C 下进行保存备用。

1.2 miRNA 的提取及 Real-time RT-PCR

分别取非小细胞肺癌组织标本及癌旁正常组织标本各 50 mgRNA,加入生理盐水 300 μL ,匀浆器匀速离浆后使用 Trizol 法提取总 RNA(试剂盒来自 Invitrogen 公司)。实时荧光定量 PCR 反应选择 SYBR Primer-Script RT-PCR kit miRNA 定量扩增反应体系(来自 TAKARA 公司),检测仪器采用实时定量 PCR 仪(Roche Molecular Biochemicals LightCycler-GmbH D-68298,德国)。检测 miR-19b 和 miR-20a 的表达,而内参则使

用 U6RNA。Real-time RT-PCR 反应条件: 95°C 下预变性 3min,接着以 95°C 10s、 58°C 20s、 72°C 30s 进行 45 个循环,除了扩增 miR-19b 和 miR-20a,还扩增了 U6RNA。

1.3 数据处理方法

本次研究所得数据采用 Excel 建立数据库并利用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,利用 $2(-\Delta\Delta\text{CT})$ 法对结果进行处理,其中 $\Delta\Delta\text{CT}$ = 病例组 (CTmiRNA-CTU6RNA) - 对照组 (CTmiRNA-CTU6RNA),得到病例组相对于对照组的表达量,统计方法包括:一般统计学描述,t 检验,其中检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-19b、miR-20a 基因的表达

miR-19b、miR-20a 以及 U6RNA 在反应体系中都得到了有效的扩增,另外溶解曲线均表现为单峰。相对于内参,miR-19b 基因在 NSCLC 组织中的表达量明显低于癌旁正常组织,而 miR-20a 基因在 NSCLC 组织中的表达量明显高于癌旁正常组织,差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 1。

表 1 两组 miR-19b 和 miR-20a 基因的表达($n=42, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Expressions of miR-19b and miR-20a in the two groups($n=50, \bar{x} \pm s$)

指标 Index	病例组 Case group	对照组 Control group	$2(-\Delta\Delta\text{CT})$
miR-19b	0.3021 ± 0.1071	1.2024 ± 0.0942	0.9145 ± 0.1069
miR-20a	3.7842 ± 0.1214	0.4521 ± 0.1005	3.3521 ± 0.1120

注:与对照组相比, $aP<0.05$ 。

Note: compared with the control group, $aP<0.05$

2.2 miR-19b 和 miR-20a 基因表达与临床病理学特征的关系

在 NSCLC 组织标本中,miR-19b 基因表达量在临床分期 I-II 的标本中明显高于临床分期 III,而 miR-20a 基因表达量在临床分期 I-II 的标本中明显低于临床分期 III,差异均就有统计学意义(均 $P<0.05$);miR-19b 基因表达量在肿瘤病理低分化组

织中明显低于肿瘤病理高分化组织,而 miR-20a 基因表达量在肿瘤病理低分化组织中明显高于肿瘤病理高分化组织,差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$);另外非小细胞肺癌组织中的 miR-19b 和 miR-20a 基因表达与肿瘤的性别、年龄、单发及多发没有关系,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 2 非小细胞肺癌中 miR-19b 和 miR-20a 基因表达量与临床病理学特征的关系($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relationship of the expressions of miR-19b and miR-20a with the pathological features of non-small cell lung cancer($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征 Pathological features		N	miR-19b	t	P	miR-20a	t	P
性别 Gender	女 Male	18	0.3001 ± 0.0952	0.109	0.914	3.7912 ± 0.0942	1.737	0.089
	男 Female	32	0.3035 ± 0.1110			3.7402 ± 0.1025		
年龄(年) Age(years)	≤ 50	17	0.3032 ± 0.0961	0.077	0.939	3.7789 ± 0.1035	1.034	0.306
	>50	33	0.3055 ± 0.1022			3.7497 ± 0.0898		
肿瘤数 Tumor quantity	单发 Unifocal	36	0.3051 ± 0.1018	0.155	0.878	3.7402 ± 0.1065	1.717	0.092
	多发 Multifocal	14	0.3002 ± 0.0968			3.7969 ± 0.1002		
临床分期 Clinical stages	I-II	35	0.3581 ± 0.1120	2.603	0.012	3.4711 ± 0.1014	16.564	0.000
	III	15	0.2708 ± 0.1001			3.9734 ± 0.0902		
病理分级 Pathological types	低 Low	16	0.2709 ± 0.1024	2.623	0.012	3.9865 ± 0.1035	16.623	0.000
	高 High	34	0.3568 ± 0.1105			3.4821 ± 0.0985		

3 讨论

肺癌的病死率非常高,全世界每年大概有 130 万人因肺癌死亡,且约占所有癌症死亡总数的三分之一,是一种严重危害人类生命的肺原发性恶性肿瘤^[6]。肺癌的发生发展过程中受到多种因素影响,是比较复杂的多阶段过程,目前其机制尚未明确^[7]。而由于分子生物学的高速发展,miRNA 逐渐引起了人们的注意,特别是其与肿瘤的关系,使人们从分子水平上更好地了解肺癌^[8]。miRNA 是一类长度为 18 个到 24 个核苷酸的非编码小 RNA 分子,通过 Drosha 剪切路径产生,一般位于基因的内含子中,但其也能出现在一些非编码的基因的外显子和基因间^[9]。其调控作用主要是通过抑制靶基因来实现,在细胞的增殖、凋亡、肿瘤的发生、激素分泌以及人体的发育等多种生理及病理过程中具有非常重要的作用^[10,11]。人类肿瘤与 miRNA 的异常表达有着密切关系,在肿瘤的发生发展过程中具有癌基因或抑癌基因的作用^[12,13]。有专家认为,miRNA 可通过细胞周期性依赖性方式来调节转录和翻译过程,其异常表达可造成细胞增殖及凋亡紊乱,从而可能有助于促进肿瘤的发生发展^[14]。目前有研究显示,在肺癌患者及大多数细胞株中部分 miRNA 基因可异常表达^[15]。NSCLC 在肺癌中占到 80%以上,约占全世界癌症死亡总数的 1/6,有研究表明,NSCLC 的发病机制与 miRNA 有关^[16]。目前已发现一些 miRNA,如 miR-145、miR-142-5p 以及 miR-34c 对肺癌具有一定抑制作用^[17]。本研究通过检测 NSCLC 患者非癌组织及癌旁正常组织中 miR-19b 和 miR-20a 基因表达含量,从而探讨两者与肺癌临床病理的联系。

miR-20a 属于 miR-17-92 基因簇,可在多数肺癌细胞株中大量表达,加入外源 miR-20a 能明显促进肺癌细胞的生长,其可能具有致癌基因的作用,从而导致肿瘤血管形成以及肿瘤的生长与转移^[18,19]。另外有研究显示 miR-19b 具有调控抑癌基因的作用,因而能抑制肿瘤细胞的增生^[20]。本研究结果显示,miR-19b 基因在 NSCLC 组织中的表达量明显低于癌旁正常组织,而 miR-20a 基因在 NSCLC 组织中的表达量明显高于癌旁正常组织,提示 miR-20a 在 NSCLC 组织中的高表达对 NSCLC 的发生可能具有促进作用,而 miR-19b 在 NSCLC 组织中的低表达也可能与 NSCLC 的发生有关。另外本研究显示 NSCLC 临床分期越高,miR-19b 基因表达量越低,而 miR-20a 基因表达量越高;而肿瘤病理分级越低即分化程度越高,miR-19b 基因表达量越高,而 miR-20a 基因表达量越低,提示两者在癌组织中的表达与临床分期和病理分级密切相关,故 miR-19b 和 miR-20b 在一定程度上可以作为 NSCLC 的肿瘤标志物。

综上所述,miR-19b 低表达和 miR-20a 高表达与 NSCLC 的临床分期、病理分级具有密切关系,早期检测有助于 NSCLC 诊断和治疗。

参考文献(References)

[1] Wang J, Zhao YC, Lu YD, et al. Integrated bioinformatics analyses identify dysregulated miRNAs in lung cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci., 2014, 18(16): 2270-2274
[2] Han HS, Jo YN, Lee JY, et al. Identification of suitable reference genes for the relative quantification of microRNAs in pleural effusion [J].

Oncol Lett, 2014, 8(4): 1889-1895
[3] Xue W, Dahlman JE, Tammela T, et al. Small RNA combination therapy for lung cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(34): 3553-3561
[4] Qi Z, Yang DY, Cao J. Increased micro-RNA 17, 21, and 192 gene expressions improve early diagnosis in non-small cell lung cancer [J]. Med Oncol, 2014, 31(9): 195
[5] Cornett AL, Lutz CS. Regulation of COX-2 expression by miR-146a in lung cancer cells [J]. RNA, 2014, 20(9): 1419-1430
[6] Tutar Y. Editorial: "miRNA and Cancer; Computational and Experimental Approaches" [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2014, 15(5): 429
[7] Meza-Sosa KF, Pérez-García EI, Camacho-Concha N, et al. MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4 [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e103987
[8] Edmonds MD, Eischen CM. Differences in miRNA expression in early stage lung adenocarcinomas that did and did not relapse [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101802
[9] Xue Z, Wen J, Chu X, et al. A microRNA gene signature for identification of lung cancer [J]. Surg Oncol, 2014, 23(3): 126-131
[10] Liu R, Liu X, Zheng Y, et al. MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel [J]. Oncol Lett, 2014, 8(5): 2193-2200
[11] Cheng T, Hu C, Yang H, et al. Transforming growth factor- β -induced miR-143 expression in regulation of non-small cell lung cancer cell viability and invasion capacity in vitro and in vivo [J]. Int J Oncol, 2014, 45(5): 1977-1988
[12] Wang F, Chan LW, Law HK, et al. Exploring microRNA-mediated alteration of EGFR signaling pathway in non-small cell lung cancer using an mRNA:miRNA regression model supported by target prediction databases [J]. Genomics, 2014, 9(14): 181-185
[13] Zhong K, Chen K, Han L, et al. microRNA-30b/c inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting Rab18 [J]. BMC Cancer, 2014, 9(14): 703
[14] Jeong HC. Clinical Aspect of MicroRNA in Lung Cancer [J]. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2014, 77(2): 60-64
[15] Del Vescovo V, Grasso M, Barbareschi M, et al. MicroRNAs as lung cancer biomarkers [J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(4): 604-620
[16] Ye LP, Hu J, Liang L, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for simultaneous sensitive detection of multiple microRNAs in lung cancer cells [J]. Chem Commun (Camb), 2014, 50(80): 11883-11886
[17] Leidinger P, Backes C, Blatt M, et al. The blood-borne miRNA signature of lung cancer patients is independent of histology but influenced by metastases [J]. Mol Cancer, 2014, 30(13): 202
[18] Sanfilorenzo C, Ilie MI, Belaid A, et al. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54596
[19] Akbas F, Coskunpinar E, Aynaci E, et al. Analysis of serum micro-RNAs as potential biomarker in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Exp Lung Res, 2012, 38(6): 286-294
[20] Wu C, Cao Y, He Z, et al. Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer [J]. Tohoku J Exp Med, 2014, 232(2): 85-95