

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.31.020

microRNA-221 在胃癌中的表达及临床意义 *

王义民 王怡肿 王瑞峰 王立国 陶 娜

(哈尔滨医科大学附属第四医院消化内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:研究 microRNA-221 及 E-cadherin 在胃癌组织中的表达及其临床意义。**方法:**选取哈尔滨医科大学附属四院 2014 年-2016 年收治的胃癌患者 50 例,分别取胃癌及癌旁正常组织作为研究组及对照组。分别应用实时荧光定量 PCR 及免疫组织化学方法检测其中 microRNA-221 及 E-cadherin 的表达。**结果:**microRNA-221 在胃癌组织中的表达较正常组织显著增高($P<0.05$), E-cadherin 在胃癌组织中的阳性表达率较正常组织显著降低。胃癌组织中 microRNA-221 的表达与患者的 TNM 分期、淋巴结转移及远处转移具有显著相关性($P<0.05$), E-cadherin 的表达与患者淋巴结转移及远处转移具有显著相关性($P<0.05$)。胃癌患者中 E-cadherin 阴性表达者 microRNA-221 的相对表达量明显高于 E-cadherin 阳性表达者($P<0.05$)。**结论:**microRNA-221 在胃癌组织中呈高表达, E-cadherin 在胃癌组织中呈低表达,二者在胃癌组织中的表达呈负相关。microRNA-221 可能通过影响上皮细胞间充质转化影响胃癌的浸润与转移。

关键词: 胃癌; microRNA-221; E-cadherin

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)31-6088-04

Expressions of MicroRNA-221 and E-cadherin in Gastric Cancer and their Relationship with Clinical Significance*

WANG Yi-min, WANG Yi-chong, WANG Rui-feng, WANG Li-guo, TAO Na

(Department of Digestive, The fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expressions and clinical significances of microRNA-221 and E-cadherin in the gastric cancer. **Methods:** The tumor tissues and adjacent normal tissues from 50 cases of patients with gastric cancer from the fourth affiliated hospital of Harbin medical university from 2014 to 2016 were selected as the study group and the control group respectively. The expressions of microRNA-221 and E-cadherin in both groups were examined by real-time RT-PCR and immunohistochemistry. **Results:** The expression of microRNA-221 in the gastric cancer samples was significantly higher than that of the adjacent normal samples($P<0.05$). The positive expression rate of E-cadherin in the gastric cancer tissues was obviously lower than that of the adjacent normal tissues. The expression of microRNA-221 in the gastric cancer was obviously associated with the TNM stage, lymph node metastasis and distant metastasis ($P<0.05$). E-cadherin expression was significantly associated with the lymph node metastasis and distant metastasis of gastric cancer ($P<0.05$). The expression of microRNA-221 in which had negative expression of E-cadherin was obviously higher than that with positive expression of E-cadherin in the gastric cancer($P<0.05$). **Conclusions:** The expression of microRNA-221 was high and expression of E-cadherin was low in the gastric cancer which might be associated with the invasion and metastasis of gastric cancer. microRNA-221 might participate in the invasion and metastasis of gastric cancer by Epithelial-mesenchymal transition.

Key words: Gastric cancer; MicroRNA-221; E-cadherin

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)31-6088-04

前言

microRNAs 作为单链、非编码小分子 RNA 能够在 RNA 干扰途径发挥作用,并且通过诱导靶基因降解或阻碍其翻译进一步起调节作用^[1]。microRNAs 通常以不完全碱基互补配对的方式与结合靶向基因,因而单个 miRNA 可结合多种靶基因参与影响翻译过程,进而调节多种细胞进程^[2]。microRNAs 在细胞的凋亡、增殖及分化等多种生物学行为中发挥着重要的调节作

用^[3-5],类似抑癌基因或癌基因的作用^[6,7]。microRNAs 表达谱分析显示 microRNAs 在人类多种癌症中存在特异性表达^[8-11]。此外, microRNAs 所在基因区在肿瘤发生发展中易受基因的扩增、缺失及易位影响^[8]。microRNAs 在肿瘤的发生发展中起着关键作用,因此对不同 microRNAs 表达及靶目标的研究可能对肿瘤的诊断及治疗具有重要意义。

在许多亚洲国家中,胃癌在导致死亡的癌症中占据第 2 位,包括中国、日本及朝鲜。世界范围内胃癌导致的死亡占恶性

* 基金项目:哈尔滨医科大学创新基金项目(2016LCZX35)

作者简介:王义民(1987-),硕士研究生,住院医师,主要研究方向:胃癌的基础和临床研究, E-mail: yiminms@126.com, 电话: 13796022186

(收稿日期:2017-02-11 接受日期:2017-03-07)

肿瘤引起死亡的 10%。在东亚国家,胃癌因其高发生率及高死亡率受到广泛重视^[12]。尽管已知胃癌的细胞周期调控层面存在异常,但其分子病理学并不完全明了^[13]。最近研究显示在胃癌中存在 microRNAs 的差异表达^[14]。本研究主要探讨了 microRNAs 在胃癌中的表达及其在胃癌浸润转移中的意义。

1 材料和方法

1.1 标本

选取 2014 年 6 月 -2016 年 6 月在哈尔滨医科大学附属第四医院消化科及普外科胃癌患者 50 例,病理诊断为胃腺癌。患者年龄为 28-70 岁,其中男性患者 28 例,女性患者 22 例,且手术治疗前患者均未行放化疗。分别取胃癌组织及癌旁正常组织(距离胃癌组织>3 cm)作为研究组及对照组。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取、逆转录反应及检测 胃癌组织及癌旁正常胃组织标本经手术切除取出后立即放入液氮,并储存于 -80℃ 冰箱。总 RNA 提取、逆转录反应及实时定量 PCR:取约 100 mg 标本组织,加入 1 mL Trizol(购于美国 Gibco 公司),采用匀浆仪进行匀浆后抽提总 RNA,再将 RNA 溶于 20 μL 的 DEPC 水中,采用逆转录试剂盒(Thermo Fisher 公司)对 RNA 进行逆转录得到 cDNA。PCR 反应条件:95℃ 变性 20 s,然后 60℃ 20 s 和 70℃ 1 s 进行 40 个循环。miRNA-221 探针引物:5'-GAAACCCAGCAGACAATGTAGCT-3';U6 内参:5'-CTCG-CTTCGGCAGCACA-3' 以及 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 使用 ABI 公司的 7500 型号 Real-TimePCR 仪器,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析。

1.2.2 免疫组化检测 E-cadherin 的表达 实验中将癌旁正常胃部组织作为染色的阳性对照,将 PBS 代替一抗作为阴性对照。主要实验步骤:石蜡切片后脱蜡至水,用 3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶封闭用正常山羊血清工作液,加入 E-cad 作为一抗,4℃ 过夜,生物素化二抗,37℃ 孵育 15 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素孵育,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。

1.3 结果判定

选择 U6 为内参,所做的实验标本均做 3 次平行实验,阴性对照 DNase/RNase-free water 为模板,检测各模板的 Ct 值。对于 miRNA 的相对含量的测定是依据 ΔC_t 表示, ΔC_t 的值为检测样本的 Ct 值减去内参的 Ct 值,公式如下: $\Delta C_t = Ct(miRNA) - Ct(U6)$ ^[15]。

E-cadherin 表达阳性的细胞定位于细胞膜及细胞质。定义阳性细胞表达 >80%,即为 E-cadherin 表达正常,阳性细胞 <80%则为 E-cadherin 表达下调即为低表达。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 P 值 <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 microRNA-221 及 E-cadherin 在胃癌组织中的表达水平

miRNA-221 在胃癌中的相对表达量为 2.58 ± 0.31 ,高于癌旁正常组织 0.91 ± 0.12 ,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

E-cadherin 在胃癌组织及癌旁正常组织的阳性表达率分别是 38.00%(19/50)、76%(38/50),差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

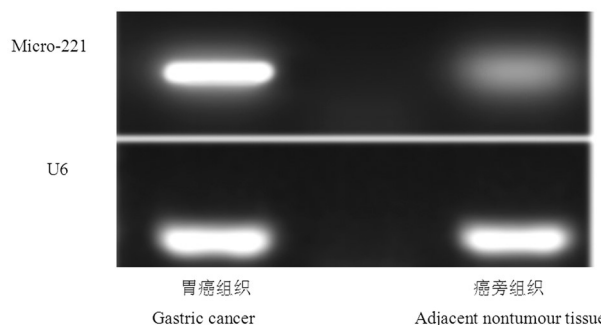


图 1 胃癌组织、癌旁组织中 microRNA-221 的基因表达

Fig.1 Expression of microRNA-221 in the normal tissue from the stomach tissues and gastric cancer tissues detected by RT-PCR

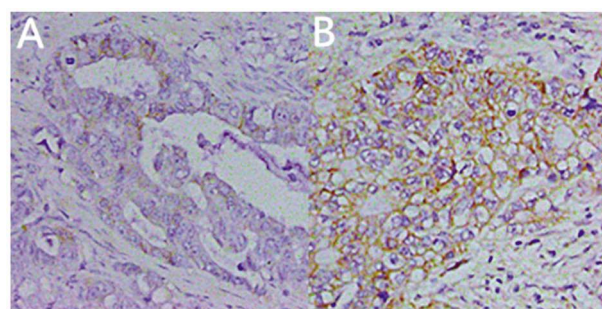


图 2 E-cadherin 在胃癌组织(A)、癌旁组织(B)中的表达($\times 200$)

Fig.2 Expression of E-cadherin in the normal tissue from the stomach tissues and gastric cancer tissues detected by immunohistochemistry($\times 200$)

2.2 microRNA-221 及 E-cadherin 的表达与胃癌中临床病理特征的关系

胃癌组织中 microRNA-221 的表达与患者性别、年龄及肿瘤分化程度均无明显相关性,miRNA-221 在 I-II 期及 III-IV 期患者中的相对表达量分别为 2.10 ± 0.13 及 3.11 ± 0.35 ;在淋巴结转移与非转移患者中的相对表达量分别为 2.96 ± 0.32 及 2.14 ± 0.20 ;在胃癌远处转移与非远处转移患者中相对表达量为 2.96 ± 0.32 及 2.06 ± 0.15 ,与患者的 TNM 分期、淋巴结转移及远处转移具有显著相关性($P < 0.05$)。E-cadherin 在淋巴结转移及淋巴结非转移患者的阳性率分别为 22.73%(5/22)及 92.86%(26/28);在远处转移及非转移患者中阳性率分别为 26.32%(5/19)及 83.87%(26/31),其表达与患者淋巴结转移及远处转移具有显著相关性($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 胃癌组织中 microRNA-221 及 E-cadherin 表达的相关性

胃癌患者中 E-cadherin 阴性表达者 microRNA-221 的相对表达量明显高于 E-cadherin 阳性表达者,差异具有统计学意义,见表 2。

3 讨论

上皮间质转化导致细胞之间粘附的减弱和丧失,引起肿瘤的浸润和转移。E-cadherin 对肿瘤侵袭转移影响较大,也是上皮间充质转化(EMT)的关键分子,E-cadherin 表达下调和/或功能丧失都可启动上皮间质转化,从而导致肿瘤发展和转移^[16]。肿

瘤的侵袭能力的强弱与 E-cadherin 的表达呈负相关,E-cadherin 表达水平下降可由于基因突变、E-cadherin 启动子的甲基化或染色体丢失等引起。此外,E-cadherin 介导的细胞间黏附着许多蛋白参与。本研究中,胃癌中 E-cadherin 的表达阳性率

相对降低,且 E-cadherin 在胃癌中的表达与患者的淋巴结转移及远处转移具有显著相关性,证实 E-cadherin 在胃癌的浸润转移中发挥了一定的作用。

表 1 E-cadherin、microRNA-221 的表达与胃癌临床病理特征的关系

Table 1 Correlation of the Expressions of E-cadherin and microRNA-221 with the clinical pathological features of gastric cancer

Clinical features		n	Degree of E-cad		P	MicroRNA-221 (Δ Ct)	P
			+	-			
Gender	Male	28	17	11	>0.05	2.61± 0.36	>0.05
	Female	22	14	8		2.49± 0.15	
Age(years)	≤ 60	26	16	10	>0.05	2.42± 0.18	>0.05
	>60	24	15	9		2.71± 0.23	
TNM	I-II	23	15	9	>0.05	2.10± 0.13	<0.05
	III-IV	27	16	9		3.11± 0.35	
Lymphatic metastasis	Yes	22	5	17	<0.05	2.96± 0.32	<0.05
	No	28	26	2		2.14± 0.20	
Distant metastasis	Yes	19	5	4	<0.05	3.23± 0.42	<0.05
	No	31	26	15		2.06± 0.15	
Dgree of Pathologic	High/middling	20	12	10	>0.05	2.33± 0.21	>0.05
	Low	30	19	13		2.87± 0.31	

表 2 胃癌组织中 microRNA-221 及 E-cadherin 表达的相关性

Table 2 Correlation of the Expression of miR-221 with the expression of E-cadherin in the gastric cancer

E-cadherin	Number of cases	MicroRNA-221(Δ Ct)	P
(+)	31	2.07± 0.12	<0.05
(-)	19	3.25± 0.21	

microRNA-221 已被证实在多种癌症中都是重要的致癌 miRNA ,能够抑制多种抑癌基因,这些抑癌基因可以抑制多种恶性增殖。在抑癌基因中,P27 在神经胶质瘤、前列腺癌及肝细胞癌中的作用已被熟知^[17,18]。P27 作为周期蛋白依赖激酶抑制剂能够强力抑制 G₁/S 期的过渡,并在细胞周期停滞中扮演重要角色。Kedde 等报道通过 Pumilio-1 诱导改变 RNA 的结构可对 microRNA-221 结合 P27 的 3' 非翻译区进行有效抑制,该 RNA 抑制蛋白可以抑制转录后的 P27^[19]。此外,研究显示 microRNA-221 还可靶向调节其他几种在癌症中与 microRNA-221 呈负相关表达的抑癌基因,如 TIMP3 及 ARH1^[20]。microRNA-221 也可以激活 P53 信号,同时上调几种 P53 相关基因的表达,如 p21、PTEN 和 CASP3^[21]。然而,根据细胞状况不同,p53 发挥明显不同的作用机制,既可以通过诱导细胞死亡发挥抑癌基因的作用,也可以通过多种机制促进肿瘤生存发挥肿瘤促进物的作用^[22]。血管生成在胃癌的发展过程中是非常重要的。microRNA-221 通过下调血管生成相关肝素生成素,在正常内皮细胞发挥功能性抑制物的作用。Rippe 等报道 microRNA-221 在内皮细胞中表达更高,与内皮型一氧化氮合酶(eNOS)呈负相关。eNOS 与内皮型一氧化氮的产生有关,并作用于内皮细胞的迁移及血管生成^[23]。Dicer 沉默内皮细胞中的 microRNA-221 的过表达会导致 eNOS 的减少。此外,microRNA-221/222 通过结合 ZEB2 的 3' 非翻译区下调 ZEB2,并上调

同源性基因 GAX 的表达进而抑制血管生成,GAX 作为一种抗血管生成抑制因子能够影响内皮细胞生成及迁移^[24]。人类胃癌细胞株 SGC7901 中,microRNA-221 的表达上调,且细胞株浸润能力增强,而转染 microRNA-221 inhibitor 使其表达下降时,细胞株侵袭能力明显下降^[25]。本研究中,microRNA-221 在胃癌组织中的表达上调,且与胃癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移及远处转移具有相关性,表明 microRNA-221 在胃癌的发生发展及浸润转移过程中发挥着重要的作用。microRNA-221 与 E-cadherin 在胃癌组织中的表达具有相关性,提示 E-cadherin 可能通过调节胃癌患者的 EMT 过程进而影响胃癌的浸润与转移。

综上,microRNA-221 在胃癌组织中呈高表达,E-cadherin 在胃癌组织中呈低表达,二者在胃癌组织中的表达呈负相关。microRNA-221 可能通过影响上皮细胞间充质转化影响胃癌的浸润与转移,microRNA-221 有希望作为胃癌的治疗靶点。

参 考 文 献(References)

- [1] Farazi T A, Spitzer J I, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer[J]. Journal of Pathology, 2011, 223(2): 102-115
- [2] Bueno M J, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2011, 1812(5): 592-601
- [3] Fan DN, Tsang FH, Tam AH, et al. Histone lysine methyltransferase, suppressor of variegation 3-9 homolog 1, promotes hepatocellular

- carcinoma progression and is negatively regulated by microRNA-125b[J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 637-647
- [4] Liu Y, Zhou Y, Feng X, et al. Low expression of microRNA-126 is associated with poor prognosis in colorectal cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(4): 358-365
- [5] Bae HJ, Noh JH, Kim JK, et al. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2014, 33(20): 2557-2567
- [6] Liduan Z, Teng Q, Dehua Y, et al. MicroRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1[J]. *Plos One*, 2013, 8(1): e55719-e55719
- [7] Han T S, Hur K, Xu G, et al. MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1 [J]. *Gut*, 2015, 64(2): 203-214
- [8] Li Z, Ying X, Chen H, et al. MicroRNA-194 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells by targeting FoxM1[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(9): 2145-2152
- [9] Qin W, Pan Y, Zheng X, et al. MicroRNA-124 regulates TGF- α -induced epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(3): 1225-1231
- [10] Gwak JM, Kim HJ, Kim EJ, et al. MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 147(1): 39-49
- [11] Su A, He S, Tian B, et al. MicroRNA-221 mediates the effects of PDGF-BB on migration, proliferation, and the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells [J]. *PloS One*, 2013, 8(8): e71309
- [12] Lordick F, Terashima M. Gastric cancer adjuvant therapy [J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2016, 30(4): 581-591
- [13] Subhash V V, Tan S H, Yeo M S, et al. ATM expression predicts Veliparib and Irinotecan sensitivity in gastric cancer by mediating P53 independent regulation of cell cycle and apoptosis [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2016
- [14] Noormohammad M, Sadeghi S, Tabatabaiean H, et al. Upregulation of miR-222 in both *Helicobacter pylori*-infected and noninfected gastric cancer patients[J]. *Journal of Genetics*, 2016: 1-5
- [15] Lawrie C H, Gal S, Dunlop H M, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *British Journal of Haematology*, 2008, 141(5): 672-675
- [16] 田立立, 王艳丽, 黄韧. 肿瘤转移中 E- 钙粘蛋白的调控[J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(3): 81-85
- Tian Li-li, Wang Yan-li, Huang Ren. Regulation of E-cadherin in tumor metastasis[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2012, 20(3): 81-85
- [17] Ajinkya Revandkar, Maria Luna Perciato, Alberto Toso, et al. Inhibition of Notch pathway arrests PTEN-deficient advanced prostate cancer by triggering p27-driven cellular senescence[J]. *Nature Communications*, 2016, 7
- [18] Huang Y, Wu R, Su Z Y, et al. A naturally occurring mixture of tocotrienols inhibits the growth of human prostate tumor, associated with epigenetic modifications of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016, 40
- [19] Kedde M, Van K M, Zwart W, et al. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls microRNA-221 and miR-222 accessibility[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(10): 1014-1020
- [20] Chen Y, Deng G, Majid S, et al. MicroRNAs 221/222 and genistein-mediated regulation of ARHI tumor suppressor gene in prostate cancer[J]. *Cancer Prevention Research*, 2011, 4(1): 76
- [21] Shi J, Zhang Y, Jin N, et al. MicroRNA-221-3p plays an oncogenic role in gastric carcinoma by inhibiting PTEN expression[J]. *Oncology Research*, 2016
- [22] Bisceglie F, Alinovi R, Pinelli S, et al. Autophagy and apoptosis: studies on the effects of bithiosemicarbazone copper (ii) complexes on p53 and p53-null tumour cell lines[J]. *Metallomics*, 2016
- [23] Rippe C, Blimline M, Magerko K A, et al. MicroRNA Changes in Human Arterial Endothelial Cells with Senescence: Relation to Apoptosis, eNOS and Inflammation [J]. *Experimental Gerontology*, 2012, 47(1): 45-51
- [24] Chen Y, Banda M, Speyer C L, et al. Regulation of the expression and activity of the antiangiogenic homeobox gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and microRNA-221 [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2010, 30(15): 3902-3913
- [25] Pu P Y, Jia Z F, Wang G X, et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 1-10

(上接第 6123 页)

- [26] 张晓瑾, 周磊. 不同浓度阿托品制剂治疗屈光不正患者的疗效及安全性[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(11): 106-108
- Zhang Xiao-jin, Zhou Lei. Clinical effect and safety of different concentrations of atropine preparations in the treatment of ametropia[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2016, 36(11): 106-108
- [27] 姚军财, 刘贵忠. 结合人眼对比度敏感视觉特性的视频质量客观评价[J]. *光学精密工程*, 2016, 24(3): 659-667
- Yao Jun-cai, Liu Gui-zhong. Video quality objective assessment combined contrast sensitivity characteristics of human visual system[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2016, 24(3): 659-667
- [28] 张学印, 徐西玲, 贾红艳. 屈光不正性弱视患儿 PVEP 检测结果的相关性分析[J]. *国际眼科杂志*, 2015, 15(9): 1618-1620
- Zhang Xue-yin, Xu Xi-ling, Jia Hong-yan. Correlation analysis between the test results of PVEP in children with ametropic amblyopia [J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2015, 15(9): 1618-1620
- [29] 罗瑜琳, 陶利娟, 杨俊芳, 等. 不同类型弱视儿童立体视觉状况的临床观察[J]. *国际眼科杂志*, 2014, 14(3): 566-568
- Luo Yu-lin, Tao Li-juan, Yang Jun-fang, et al. Clinical research on stereoscopic vision in different types of amblyopic children [J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2014, 14(3): 566-568
- [30] 孙远, 刘泉. 低浓度阿托品治疗近视的临床研究进展[J]. *国际眼科纵览*, 2014, 38(4): 241-244
- Sun Yuan, Liu Quan. Low-concentration atropine treatment for myopia [J]. *International Review of Ophthalmology*, 2014, 38(4): 241-244