

微小 RNA-451 表达和胃癌临床病理特征及预后的关系

荣忠厚 苏忠学 耿文茂 戚国哲 王志意 吴亚光 秦成坤

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院肝胆外科

通信作者:苏忠学,Email:zhonghou1981@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.02.013

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-451 (miR-451) 的表达与胃癌的临床病理特征及预后之间的关系。**方法** 收集 107 例胃癌患者的病理及随访资料,应用实时定量反转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 方法检测肿瘤标本及癌旁组织的 miR-451 的表达量。然后分析 miR-451 的表达量和胃癌患者的各项病理特征,及预后之间的关系。**结果** 与癌旁组织比较,胃癌组织内 miR-451 表达量降低 (0.010 ± 0.007 比 0.014 ± 0.008 , $P < 0.05$); 与无淋巴结转移的胃癌患者比较,淋巴结转移者癌组织 miR-451 表达量降低 (0.008 ± 0.006 比 0.013 ± 0.006 , $P < 0.05$); 与 miR-451 表达上调的胃癌患者比较,miR-451 表达下调者生存时间缩短 (中位生存时间 45 个月比 60 个月, $P < 0.05$)。多因素分析表明,miR-451 的低表达与胃癌患者淋巴结转移及不良预后相关。**结论** miR-451 的低表达与胃癌患者淋巴结转移及不良预后相关。

【关键词】 胃癌; 微小 RNA-451

基金项目: 山东省科技厅科技发展计划基金 (2013GSF11862)

The relations between expression quantity of microRNA - 451 and clinicopathological features and prognosis in gastric cancer Rong Zhonghou, Su Zhongxue, Geng Wenmao, Xian Guozhe, Wang Zhiyi, Wu Yaguang, Qin Chengkun

Department of Hepatobiliary Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China

Corresponding author: Su Zhongxue, Email: zhonghou1981@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relations between expression of microRNA - 451 (miR - 451) and clinicopathological features and prognosis of patients in gastric cancer. **Methods** Pathological data and follow up data of 107 cases in gastric cancer were collected, expression of miR - 451 in tumor tissue and pericarcinous tissue was measured by real - time quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT - qPCR). After that, we analyzed the relations between expression of miR - 451 and clinicopathological features and prognosis; **Results** MiR - 451 showed decreased expression in tumor tissue versus pericarcinous tissue (0.010 ± 0.007 vs. 0.014 ± 0.008 , $P < 0.05$); miR - 451 also showed decreased expression in tumor tissue of the patients with lymphatic metastasis versus the patients without lymphatic metastasis (0.008 ± 0.006 vs. 0.013 ± 0.006 , $P < 0.05$); down - regulation of miR - 451 in the patients showed shorter survival time (median survival time 45 months vs. 60 months, $P < 0.05$); multivariate analysis revealed that down - regulation of miR - 451 was associated with lymphatic metastasis and worse prognosis of the patients in gastric cancer. **Conclusion** Down - regulation of miR - 451 was related to lymphatic metastasis and worse prognosis of the patients in gastric cancer.

【Key words】 Gastric cancer; MicroRNA - 451

Fund program: Science and Technology Development Program of Shandong Province of China (2013GSF11862)

微小 RNA (miRNA, miR) 是近年来新发现的非编码小片段 RNA,能够在转录后水平调控基因的表达。最近的研究结果表明,miRNA 在肿瘤的发生及进展过程中发挥着重要的作用^[1-3]。但是,miR-451 在胃癌组

织中的表达及作用,目前相关研究尚少。本研究旨在探讨胃癌组织中 miR-451 的 mRNA 表达水平与胃癌患者临床病理特征及其与预后的关系,现将结果报道如下。

资料与方法

1. 一般资料:以相同的标准连续选取 2005 年 7 月至 2007 年 12 月我院普外科经胃癌根治手术治疗的胃癌患者 107 例,其中男 91 例,女 16 例,平均年龄 58 岁(22~83 岁)。以电话随访为主,信函及登门拜访辅助相结合的随访方式对术后患者进行远期随访研究。平均随访时间 48 个月(2~60 个月),随访率均超过 80%。根据制定的随访表收集资料包括性别、年龄、手术信息如 TNM 分期、淋巴结转移情况、肿瘤大小、分化程度以及术后转移复发情况、生存时间等(表 1)。

表 1 胃癌临床病理特征和 miR-451 表达量的关系

临床病理特征	病例数	miR-451 表达量($\bar{x} \pm s$)	P 值
性别			
男	91	0.009 6 ± 0.006 8	>0.05
女	16	0.010 7 ± 0.006 6	
年龄			
≤50 岁	42	0.009 2 ± 0.005 4	>0.05
>50 岁	65	0.010 6 ± 0.006 3	
胃癌分期			
I~II 期	49	0.011 2 ± 0.003 8	>0.05
III~IV 期	58	0.009 8 ± 0.004 7	
淋巴结转移			
无	48	0.013 3 ± 0.005 5	<0.05
有	59	0.008 2 ± 0.006 1	
肿瘤分化			
高-中分化	46	0.009 2 ± 0.003 1	>0.05
低分化	61	0.008 2 ± 0.005 3	
肿瘤大小			
≤5 cm	65	0.009 8 ± 0.004 2	>0.05
>5 cm	42	0.009 3 ± 0.005 5	

注:miR-451;微小 RNA-451

2. RNA 的提取及 miR-451 检测:(1) miRNA 的提取:选取福马林固定石蜡包埋的病理标本,厚 4 μm 切片 6~8 张,经过脱水、染色后,在显微镜下用注射器针头将组织刮下,放于盛放有 250 μl 蛋白酶混合液的 Ep 管中混匀。按照 RNA 提取试剂盒的说明书操作,收集得到纯净 miRNA 冷冻保存。(2) 实时定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)反应:提取后的 miRNA 浓度测定,无 RNA 酶水稀释到 2 mg/L。Ep 管中加入预混反应液后,用 PCR 仪(Eppendorf 7500,德国 Eppendorf 公司)反转录生成 cDNA。按照 RT-qPCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司)说明书操作,每个 Ep 管中加入 miR-451 引物(Genecopeia 公司)2.5 μl,2 × SYBR Premix Ex Taq II 12.5 μl,Uni-miR qPCR Primer(10 μmol/L) 1 μl,加入无 RNA 酶水到 23 μl,最后加入 miR-451 cDNA 2 μl。用 PCR 仪(Bio-rad 公司)进行定量 PCR 反应。(3) 记录并分析每个样本的循环阈值(Ct),先计算出

$\Delta Ct = (Ct_{miR-451} - Ct_{U6})$,再利用公式: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算相对定量。每例样本重复 2 次,取平均值。

3. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 和 GraphPad Prism 5.0 统计软件分析。肿瘤组织及癌旁组织的 miR-451 表达量比较,以及 miR-451 的表达与肿瘤临床病理特征关系的分析,应用 Student *t* 检验。生存分析运用 Log-rank 法,应用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。应用多因素 Cox 回归分析预后相关因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 胃癌组织中 miR-451 的表达和临床病理特征间的关系:与癌旁组织比较,胃癌组织内 miR-451 表达量降低(0.010 ± 0.007 比 0.014 ± 0.008, $P < 0.05$)。胃癌组织 miR-451 表达和淋巴结转移有相关性,与无淋巴结转移的胃癌患者比较,淋巴结转移者癌组织 miR-451 表达量降低(0.008 ± 0.006 比 0.013 ± 0.006, $P < 0.05$,表 1)。但是,miR-451 的表达与患者的年龄、性别、肿瘤分期以及分化程度均无相关性(表 1)。

2. miR-451 表达和胃癌患者预后的关系:miR-451 表达与胃癌患者的术后生存时间运用 Kaplan-Meier 法进行分析,结果表明,与 miR-451 表达上调的胃癌患者比较,miR-451 下调者生存时间缩短(中位生存时间 45 个月比 60 个月, $P < 0.05$)。多因素 Cox 回归分析表明,miR-451 的表达[风险比(HR) = 2.078, $P < 0.05$]和淋巴结转移(HR = 1.615, $P < 0.05$)是胃癌患者的独立预后因素(表 2)。

表 2 胃癌患者预后的多因素分析

临床病理特征	分组	生存时间		
		HR	95% CI	P 值
miR-451 表达	高/低	2.078	1.780~4.135	<0.01
性别	男/女	1.232	0.921~1.436	>0.05
年龄	≤50 岁/>50 岁	0.968	0.902~1.004	>0.05
分期	I~II/III~IV	1.458	1.002~2.122	>0.05
淋巴结转移	有/无	1.615	1.234~1.985	<0.05
肿瘤分化	高-中分化/低分化	1.001	0.895~1.326	>0.05
肿瘤大小	≤5 cm/>5 cm	1.781	1.385~2.991	>0.05

注:HR;风险比;95% CI;95% 可信区间;miR;微小 RNA

讨 论

在本研究中,我们发现,在胃癌组织中,miR-451 表达量降低了,而且这一变化与胃癌患者淋巴结转移及生存时间缩短相关,从而推测,miR-451 可能为抑瘤性 miRNA,其表达增高,可能抑制胃癌患者淋巴结转移,以及提高生存时间,改善胃癌患者的预后。

虽然大量研究结果显示,miRNA 在正常细胞功能

的发展及维持中起着非常重要的作用。并且,miRNA 表达的改变可能导致癌症的发生及肿瘤的发展。但是,关于 miRNA 表达变化对患者生存时间的影响方面的研究非常少。本研究结果显示,miR-451 的下调与胃癌患者生存时间缩短显著相关,为预测胃癌患者的预后提供了新的参考指标。

另外,通过多因素分析,我们发现,miR-451 的表达和淋巴结转移是胃癌患者的独立预后因素。这一回顾性分析提示,miR-451 可能是监测胃癌复发的预后指标。

新的癌基因巨噬细胞移动抑制因子(MIF)可能是 miR-451 的直接靶基因。MIF 在促进肿瘤生长及侵袭中起作用^[4-5],Takahashi 等^[6]在一项结肠癌的研究中,剔除内源性 MIF,导致了超过 40% 瘤细胞生长的下降。miR-451 能够调节 MIF,这已经在胃肠来源的细胞株体外转染实验以及应用 miR-451 与 MIF 的 3' 端非编码区域(3'-UTR)靶点直接接触的报告基因实验中所证明^[7]。miR-451 的过表达下调了 MIF 的 mRNA 及蛋白的表达水平^[7]。

本研究结果表明,miR-451 可能为抑瘤性 miRNA,miR-451 低表达与淋巴结转移和胃癌患者不良预后相关。miR-451 可能是通过调控 MIF 发挥其抑瘤作用。

参 考 文 献

- [1] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 2999-3004. DOI: 10. 1073/ pnas. 0307323101.
- [2] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Role of microRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(5): 582-588. DOI: 10. 1016/j. bcp. 2008. 06. 007.
- [3] Wang R, Wang ZX, Yang JS, et al. MicroRNA-451 function as a tumor suppressor in human not-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14)[J]. Oncogene, 2011, 30(23): 2644-2658. DOI: 10. 1038/ onc. 2010. 642. Epub 2011 Feb 28.
- [4] Meyer-Siegler KL, Leifheit EC, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells[J]. BMC Cancer, 2004, 4: 34. DOI: 10. 1186/ 1471-2407-4-34.
- [5] Hagemann T, Robinson SC, Thompson RG, et al. Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression, and angiogenesis [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(7): 1993-2002. DOI: 10. 1158/ 1535-7136. MCT-07-0118.
- [6] Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor(MIF) in the mechanism of tumor cell growth [J]. Mol Med, 1998, 4(11): 707-714.
- [7] Na L, Ning J, Rui G, et al. MiR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting MIF and is associated with survival in nasopharyngeal carcinoma[J]. Molecular Cancer, 2013, 12(1): 123. DOI: 10. 1186/ 1476-4598-12-123.

(收稿日期:2015-10-11)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于参考文献中电子文献的著录格式

一、通用格式

作者名(前 3 名, et al.). 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径.

请注意, 电子期刊须标注“[文献类型标志/文献载体标志]”、“获取和访问的路径”。

二、电子文献载体和文献类型标志

请参照 GB 3469《文献类型与文献载体代码》的要求, 电子文献载体类型标志如下: 磁带 MT, 磁盘 DK, 光盘 CD, 联机网络 OL。文献类型标志如下: 普通图书 M, 会议录 C, 汇编 G, 报纸 N, 期刊 J, 学位论文 D, 报告 R, 标准 S, 专利 P, 数据库 DB, 计算机程序 CP, 电子公告 EB。其中会议录包括座谈会、研讨会、学术年会等会议的文集; 专著、论文集当中析出的文献, 著录为[A], 其他未说明文献类型的著录为[Z]。

三、具体示例

- [1] 莫少强. 数字式中文全文文献格式的设计与研究[J/OL]. 情报学报, 1999, 18: 1-6[2001-07-08]. <http://periodical.wanfangdata.com.cn/periodical/qbxb/qbxb99/qbxb9904/990407.htm>.
- [2] Who's Certified[OB/OL]. Evanston(IL): The American Board of Medical Specialists, 2000[2001-05-08]. <http://www.abms.org/newsearch.asp>.
- [3] 萧钰. 出版业信息化迈入快车道[EB/OL]. (2001-12-19)[2002-04-15]. <http://www.creder.com/news/0112190019.htm>.
- [4] Scitor Corporation. Project acheduler[CP/DK]. Sunnyvale, Calif: Scitor Corporation, c1983.
- [5] 陈彪. 帕金森病[M/CD]//贾建平, 张新卿. 神经系统疾病诊治进展. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2005.

本刊编辑部