

MicroRNA-326 在脑胶质瘤中的表达及其临床意义

刘志军,刘红林,陈小兵
(河南大学淮河医院,河南 开封 475000)

摘要: [目的] 探讨 microRNA-326(miR-326)在脑胶质瘤中的表达及其临床意义。[方法] 用 qRT-PCR 检测福尔马林固定、石蜡包埋(FFPE)的 89 例胶质瘤和 20 例正常脑组织病理标本。应用 SPSS16.0 分析 miR-326 的表达水平与临床病理学特征之间的相关性。[结果] 脑胶质瘤 (3.824 ± 1.7011) 和正常脑组织 (6.135 ± 1.2897) 中 miR-326 的表达水平有显著性差异 ($P < 0.001$)。miR-326 的表达与肿瘤直径 ($P = 0.029$)、WHO 分级 ($P < 0.001$) 和 KPS 评分密切相关 ($P < 0.001$); 与患者的年龄 ($P = 0.518$) 和性别 ($P = 0.501$) 无显著性相关。MiR-326 低表达与胶质瘤患者的生存率降低密切相关 ($P < 0.001$)。胶质瘤的 WHO 分级增高、肿瘤直径 $> 3\text{cm}$ 、KPS 评分 < 80 分及 miR-326 低表达均是影响胶质瘤患者预后的危险因素 ($P < 0.05$)。[结论] miR-326 在胶质瘤组织中呈低表达,其可能可成为预测胶质瘤发生发展及预后的生物标志物。

关键词: 胶质瘤; microRNA-326; 预后

中图分类号: R739.41 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2015)11-0957-04
doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.11.A014

The Expression of MicroRNA-326 in Gliomas and its Clinical Significance

LIU Zhi-jun, LIU Hong-lin, CHEN Xiao-bing
(The Affiliated Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression and clinical significance of microRNA-326 (miR-326) in gliomas. [Methods] The expression of miR-326 in 89 samples with glioma and 20 samples with normal brain tissue was detected by QRT-PCR, which were treated with formalin fixed, paraffin embedding. The correlation of miR-326 expression level and clinical pathological parameters was analyzed by SPSS16.0. [Results] The expression of miR-326 was significantly lower in glioma tissues (3.824 ± 1.7011) than that in normal brain tissues (6.135 ± 1.2897) ($P < 0.001$). The expression of miR-326 was significantly correlated with tumor diameter ($P = 0.029$), WHO grade ($P < 0.001$) and KPS score ($P < 0.001$), and did not correlate with age ($P = 0.518$) and gender ($P = 0.501$). The lower expression of miR-326 was significantly associated with lower survival in patients with glioma. Tumor diameter greater than 3cm, KPS score less than 80 points, advanced WHO grade and low expression of miR-326 were the independent risk factors predicting poor prognosis for glioma patients ($P < 0.05$). [Conclusions] miR-326 is down-regulated in glioma tissues. MiR-326 might be a biomarker for predicting carcinogenesis and prognosis for glioma.

Key words: glioma; microRNA-326; prognosis

脑胶质瘤发生于神经外胚层,是神经系统最常见的恶性肿瘤,约占人类神经系统肿瘤的 30%,脑恶性肿瘤的 80%^[1],其呈浸润性生长、生长迅速、术后复发率高、患者生存期短、死亡率高、预后差^[2]。脑恶性胶质瘤缺乏有效的诊断与治疗靶点,是目前神

经系统恶性肿瘤的治疗难点^[3]。

MicroRNA(miRNA)是长约 22 个核苷酸的内源性非编码小 RNA,广泛存在于真核生物中,其进化相对保守,具有时序性和组织特异性,miRNA 通常与靶 mRNA 的 3'非翻译区 (3'UTR) 结合,导致靶 mRNA 的翻译抑制或者降解,在转录后水平负调控靶基因表达^[4]。近年来,研究发现 miRNA 在脑恶性

收稿日期:2015-03-04;修回日期:2015-06-08
通讯作者:刘红林,E-mail:13592116850@139.com

胶质瘤中的表达与其生物学行为有关,其在实体肿瘤中的表达对肿瘤诊断、治疗及预后预测有一定帮助。有学者对于脑胶质瘤的研究中发现,microRNA-326(miR-326)在胶质瘤中呈低表达,其可结合MAPK信号通路的重要基因NOB1的3'UTR而抑制其表达,从而促进肿瘤细胞凋亡,抑制增殖、侵袭及转移^[5]。有学者在对结肠癌的研究^[6]发现,福尔马林固定,石蜡包埋(FFPE)组织并不影响标本中miRNA的表达;FFPE标本可成为研究miRNA在临床病理标本中表达的新选择。本研究通过检测FFPE组织中的miR-326的表达,并分析其与脑胶质瘤临床因素的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2005年1月至2008年1月在河南大学附属淮河医院就诊行手术治疗,并具有5年随访资料的脑恶性胶质瘤患者89例,记录患者性别、年龄、WHO分级、肿瘤直径和KPS评分(Table 1)。根据肿瘤miR-326表达水平,以均值为界点,将病例分为两组;miR-326低表达组,即miR-326表达水平低于均值;miR-326高表达组,即miR-326表达水平高于均值。

Table 1 Relationship between miR-326 expression and clinicopathological features of gliomas

Characteristics	N	miR-326 expression		χ^2	P
		High	Low		
Age(years)				0.592	0.518
≥55	38	20	18		
<55	51	31	20		
Gender				0.045	0.501
Male	41	23	18		
Female	48	28	20		
Tumor size(cm)				5.499	0.019
<3	53	25	28		
≥3	36	26	10		
WHO grade				64.122	<0.001
I	33	32	1		
II	19	16	3		
III	22	3	19		
IV	15	0	15		
KPS				28.218	<0.001
<80	29	5	24		
≥80	60	46	14		

1.2 标本选择

选取病理科保存患者的病理蜡块,同时选取同期在我院行颅脑外伤手术时切除的脑组织病理蜡块20例,每例标本均切10μm厚度的标本进行miR-326检测。病理切片HE染色后,经两名经验丰富的病理科医师进行鉴定,明确所选切片的性质。

1.3 miR-326提取及qRT-PCR检测

将明确有肿瘤细胞存留的胶质瘤FFPE标本和正常脑组织FFPE标本经过脱蜡处理。应用Trizol法提取标本中总RNA,应用紫外分光光度计测定样品在波长260nm和280nm处的吸光度比值来确定其纯度和浓度。并计算OD260/280,鉴定RNA的纯度,确保OD值在1.8~2.1。应用PureLink FFPE Total RNA Isolation试剂盒(购自上海浩然生物技术有限公司)分离microRNA。应用Taqman MicroRNA Assays(Applied Biosystems)检测miR-326的表达水平。用TaqMan microRNA逆转录试剂盒(购自上海浩然生物技术有限公司),将miR-326逆转录成cDNA。应用qRT-PCR进行miR-326扩增,应用ABI Prism 7500检测系统进行数据分析。内参设置为U6。所有实验均进行至少3次。

1.4 随访

以门诊或入院复查、电话等随访方式进行患者预后随访。随访截止日期为2015年1月。

1.5 统计学处理

应用SPSS16.0统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间定量资料比较应用t检验,miR-326与临床病理特征的相关性分析应用 χ^2 检验。应用Kaplan-Meier法分析生存率,胶质瘤患者生存率的单因素分析应用Log-rank检验,多因素分析采用Cox比例风险回归模型。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-326在胶质瘤组织中呈低表达

qRT-PCR检测结果显示,与正常脑组织中miR-326的表达水平相比,胶质瘤组织中miR-326表达水平下降(6.135 ± 1.290 vs 3.824 ± 1.701 , $P < 0.001$)。根据WHO胶质瘤分级,各级miR-326表达水平为:WHO I级(33例)为 5.385 ± 0.686 ,WHO II级(19例)为 4.489 ± 0.531 ,WHO III级(22例)为 $2.773 \pm$

0.466,WHO IV级(15例)为 1.087 ± 0.543 ,提示随WHO分级升高,miR-326表达水平呈下降趋势($P<0.001$)(Figure 1)。

2.2 miR-326 表达与胶质瘤临床病理特征的相关性

胶质瘤病理组织中 miR-326 表达水平为 3.824 ± 1.701 。将所有资料分为两组:miR-326 高表达组 51 例(胶质瘤病理组织 miR-326 表达高于平均水平 3.824 者)和 miR-326 低表达组 38 例(胶质瘤病理组织 miR-326 表达低于平均水平 3.824 者)。

分析 miR-326 的表达与临床病理参数相关性发现,miR-326 表达与肿瘤直径($P=0.029$)、WHO 分级($P<0.001$)和 KPS 评分($P<0.001$)密切相关;但与患者年龄($P=0.518$)、性别($P=0.501$)无关(Table 1)。

2.3 miR-326 表达与胶质瘤患者预后的相关性

全组 89 例患者中位生存期 39.20 个月,miR-326 低表达组 38 例患者中位生存期 22.82 个月,miR-326 高表达组 51 例患者中位生存期 41.41 个月。

Kaplan-Meier 分析结果显示,miR-326 高表达组患者生存率明显高于 miR-326 低表达组($P<0.001$)(Figure 2)。

单因素分析检验结果显示,胶质瘤直径 $>3\text{cm}$ 、KPS 评分 <80 分、WHO 分级增高和 miR-326 低表达均是影响胶质瘤患者预后的因素(P 均 <0.001)。Cox 比例风险回归模型分析结果显示,胶质瘤直径大于 3cm 、KPS 评分 <80 分、WHO 分级增高和 miR-326 低表达均是影响胶质瘤患者预后的因素(Table 2)。

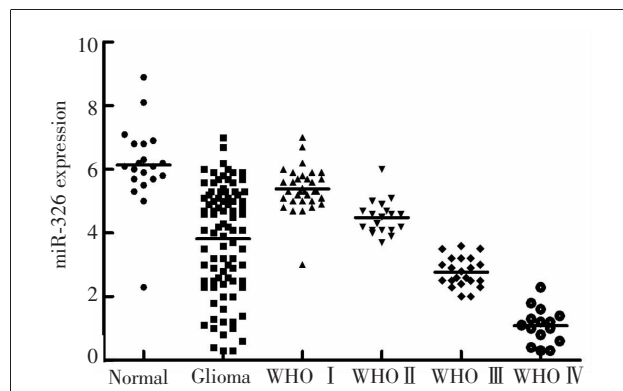


Figure 1 miR-326 expression in patients with gliomas

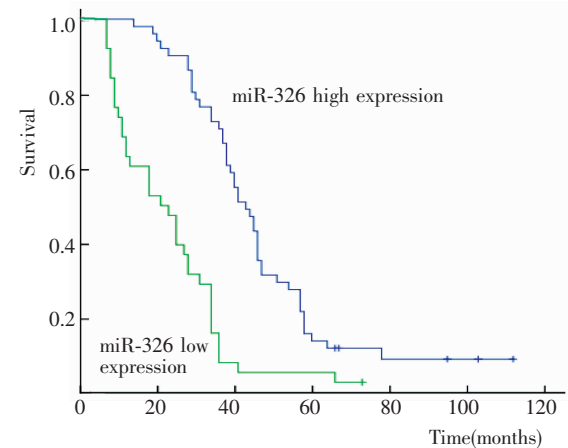


Figure 2 The survival curves of glioma patients with different miR-326 expression

Table 2 Univariate and multivariate analyses of different prognostic parameters in patients with gliomas by Cox regression analysis

Index	Multivariate analysis			Univariate analysis		
	RR	95%CI	P	RR	95%CI	P
Age	1.013	0.636~1.615	0.955	1.336	0.756~2.013	0.780
Gender	1.098	0.693~1.739	0.690	1.613	0.703~1.902	0.780
WHO grade	1.822	1.176~2.823	0.007	1.946	1.263~3.806	<0.001
Tumor size	0.241	0.105~0.551	0.001	0.391	0.143~0.771	<0.001
KPS	0.051	0.015~0.179	<0.001	0.096	0.033~0.201	<0.001
miR-326 expression	1.784	1.358~2.717	0.005	2.077	1.751~3.219	<0.001

3 讨 论

脑胶质瘤是神经系统最常见的恶性肿瘤。手术、放疗和化疗等治疗在一定程度上可延长脑胶质瘤患者的生存期,然而其 5 年生存率仍较低。目前脑胶质

瘤的临床诊治中缺乏有效的预测胶质瘤发生发展的生物学标志物。我们通过对 89 例脑胶质瘤组织及 20 例正常脑组织进行 miR-326 检测发现,miR-326 在肿瘤组织中低表达,且随着肿瘤分级的增高,其表达水平持续下降;且肿瘤直径越大,miR-326 表达水平越低;KPS 评分与 miR-326 表达水平呈正相关。

本研究结果显示,miR-326 低表达组的 3 年和 5 年生存率较 miR-326 高表达组明显降低。多因素分析显示,肿瘤直径、WHO 分级、KPS 评分及 miR-326 的表达水平均是影响脑胶质瘤患者的独立预后因素。

MicroRNA 之间相互关联,具有协同调控作用。

一个 miRNA 能够调控多个靶基因的表达,然而一个 miRNA 也可受到多个 miRNA 的协同调控^[7]。Ferretti 等^[8]对于小脑神经元祖细胞及肿瘤细胞的研究发现 miR-326 在肿瘤组织中呈低表达,其通过抑制 Hedgehog 信号通路关键基因 *Smo* 的表达抑制信号通路的激活,从而抑制肿瘤细胞的增殖。Du 等^[9]对于多发性硬化的致病机制的研究中发现,miR-326 可结合辅助性 T 细胞 17(TH-17)分化抑制因子 *Ets-1* 的 3'UTR,并抑制 *Ets-1* 的表达,从而促进 TH-17 的分化^[9]。Karsy 等^[10]对多形性胶质细胞瘤(GBM)的研究发现,包括 miR-326 在内的多个 microRNA 有望成为胶质瘤诊断、治疗及预后预测的生物标志物。Kefas 等^[11]研究发现,miR-326 在多形性胶质瘤组织中呈低表达,其可调节 Notch-1 的表达,进而影响胶质瘤细胞的凋亡、侵袭力和增殖能力。我们的研究也发现,与正常脑组织 miR-326 的表达水平相比,脑胶质瘤组织中的 miR-326 表达水平较低,与其他学者研究相符。Wang 等^[12]发现,miR-326 表达下调和 WHO 分级是影响胶质瘤患者预后的独立危险因素,而肿瘤直径和 KPS 评分并非其影响因素。而本研究的结果显示,肿瘤直径和 KPS 评分同样是影响胶质瘤患者预后的独立危险因素,提示胶质瘤的预后因素仍需进一步分析。

综上所述,miR-326 在胶质瘤组织中的表达下调可作为预测胶质瘤患者临床预后的独立危险因素。WHO 分级越高的胶质瘤组织中,miR-326 的表达水平越低。MiR-326 有望成为预测胶质瘤发生发展及预后的生物标志物。

参考文献:

- [1] Edwards LA, Woolard K, Son MJ, et al. Effect of brain- and tumor-derived connective tissue growth factor on glioma invasion[J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(15):1162-1178.
- [2] Sathornsumetee S, Rich JN, Reardon DA. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma[J]. Neurol Clin, 2007, 25(4):1111-1139.
- [3] Zhou WN, Chen ZP. Current status and future direction of management for glioma patient in China[J]. China Cancer, 2005, 14(2):10-13.[周旺宁, 陈忠平.我国胶质瘤诊断治疗现状和努力方向 [J]. 中国肿瘤, 2005, 14(02):10-13.]
- [4] Floyd SK, Bowman JL. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants[J]. Nature, 2004, 428(6982): 485-486.
- [5] Zhou J, Xu T, Yan Y, et al. MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in glioma by targeting the Nin one binding protein (NOB1) [J]. PLoS One, 2013, 8(7):e68469.
- [6] Oue N, Anami K, Schetter AJ, et al. High miR-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer [J]. Int J Cancer, 2014, 134(8):1926-1934.
- [7] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.
- [8] Ferretti E, De Smaele E, Miele E, et al. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells[J]. EMBO J, 2008, 27(19): 2616-2627.
- [9] Du C, Liu C, Kang J, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis[J]. Nat Immunol, 2009, 10(12): 1252-1259.
- [10] Karsy M, Arslan E, Moy F. Current progress on understanding micrornas in glioblastoma multiforme[J]. Genes Cancer, 2012, 3(1):3-15.
- [11] Kefas B, Comeau L, Erdle N, et al. Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells[J]. Neuro Oncol, 2010, 12(11):1102-1112.
- [12] Wang S, Lu S, Geng S, et al. Expression and clinical significance of microRNA-326 in human glioma miR-326 expression in glioma [J]. Med Oncol, 2013, 30(1):373.