

microRNA-212 在胃癌中的表达及临床意义

蒋佩佩, 胡畅远, 武文一, 邵欢义, 薛向阳, 沈 贤, 朱冠保

(温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要: [目的] 比较 *microRNA-212* (*miR-212*) 在胃癌组织和正常胃黏膜组织中的表达情况, 并探讨其与临床病理特征之间的关系。[方法] 应用茎环 RT-qPCR 方法检测 22 例胃癌及癌旁正常胃黏膜组织标本中 *miR-212* 的表达。[结果] *miR-212* 在胃癌及正常胃黏膜组织中的相对表达量分别为 1.439 和 1.000, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而且, 胃癌组织中 *miR-212* 的表达与肿块位置、分化程度、淋巴结转移以及 TNM 分期有关 ($P < 0.05$)。[结论] *miR-212* 的表达可能在胃癌发生发展过程中发挥重要作用。

关键词: *miRNA*; *miR-212*; 胃肿瘤

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)04-0246-04

Expression of *microRNA-212* in Gastric Cancer and Its Clinical Significance

JIANG Pei-pei, HU Chang-yuan, WU Wen-yi, et al.

(The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of *microRNA-212* (*miR-212*) in gastric cancer and its relationship with clinicopathological characteristics. [Methods] The expression levels of *miR-212* in 22 specimens of gastric carcinoma tissue and their matched non-tumor adjacent tissue specimens were examined by stem-loop real-time RT-PCR. [Results] The expression levels of *miR-212* in gastric carcinoma tissue and normal gastric tissue were 1.439 and 1.000 respectively, with significant difference ($P < 0.05$). Also, the expression levels of *miR-212* related to the position of tumor, degree of differentiation, lymph node metastasis and TNM staging ($P < 0.05$). [Conclusion] The expression of *miR-212* might play a key role in the carcinogenesis and progress of gastric cancer.

Subject words: *miRNA*; *miR-212*; gastric neoplasms

microRNA(miRNA)是近年来新发现的一类内源性非编码小RNA,通常在转录后水平调控高效的基因表达^[1],在肿瘤的发生发展过程中起着癌基因或抑癌基因的作用^[2]。miRNA可通过与靶mRNA的3'-UTR互补配对,指导mRNA切割、降解;也可通过与靶mRNA的不完全配对,沉默其表达,从而参与调控细胞的分化、生长、增殖和凋亡等^[3-6]。最近报道发现 *microRNA-212* (*miR-212*) 的表达与视网膜母细胞瘤^[7]、胰腺癌^[7]、胃癌^[8]等相关。但迄今为止, *miR-212* 表达与胃癌的相关性少有研究。因此,本研究通过茎环 RT-qPCR 方法比较胃癌及正常胃黏膜组织

标本中 *miR-212* 的表达,并分析其与临床病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTPs、SYBR Mastermix 等试剂(日本 Toyobo 公司);引物(上海英骏生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标本来源

2008~2009 年在温州医学院附属第一医院胃肠外科行手术治疗的胃癌患者 22 例。术前均未行放、化疗等治疗,年龄 51~77 岁,中位年龄 64 岁。组织病

基金项目:温州市科技局(H20100028)

通讯作者:朱冠保,科主任,主任医师,教授;温州医学院附属第一医院胃肠外科;浙江省温州市鹿城区府学巷 2 号(325000); E-mail: ZGBWMC@yahoo.com.cn。

收稿日期:2012-03-20;修回日期:2012-03-25

理类型的判断标准参照 WHO 胃癌的病理学分类。每例标本留取肿瘤组织及对应的距肿瘤 5cm 以上的癌旁正常胃黏膜组织 (经组织病理切片证实),离体后 10min 内置于液氮中保存待作后续分析。

1.2.2 总 RNA 的提取

取液氮保存的胃癌组织及癌旁正常胃黏膜组织标本,在液氮中碾碎至粉状,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。为增加小 RNA 得率,将室温下异丙醇孵育 5min 改为-20℃异丙醇沉淀 2h 以上;然后用 80%乙醇冲洗、DEPC 处理过的蒸馏水溶解并保存于-80℃冰箱中。采用德国 EPPENDORF 公司分光光度仪(Biophotometer)检测 RNA 溶液 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,计算 RNA 浓度和纯度,若 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值>1.8,即合乎实验 RNA 浓度和纯度。并且用 1%琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.3 miR-212 表达检测

参照 Xue 等^[9]报道的茎环 RT-qPCR 方法。以 *let-7a* miRNA 作为内参 (通过 *miR-let7a*、*U6*、*miR-191* 和 *miR-103* 四条 microRNA 的比较,发现 *miR-let7a* 在胃癌组织和配对癌旁组织间 ΔCt 为 0.00 ± 0.29 ,变异程度最小^[10]),分析 *miR-212* 表达。表 1 为相关分析的引物序列。1μg 总 RNA 以 *miR-212* 及 *let-7a* 茎环 RT 引物进行逆转录,反应条件为:16℃ 30min,42℃ 30 min,75℃ 15 min,反应结束后-20℃保存。以 15μl 反应体系进行 RT-qPCR。*miRNA* 检测反应体系包括:1μl RT 产物,1×SYBR Green I Mastermix,0.5μmol/L *miRNA* 特异前向引物、0.5μmol/L 通用的反向引物。PCR 条件为:95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。RT-PCR 使用 Applied Biosystems 7500 仪器进行。所有样品做 3 个复孔。PCR 产物经 8%PAGE 电泳分析。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的域值时所经历的循环数即 *Ct* 值,以 *let-7a* 作为内参照,采用定量 PCR 中的相对定量法,以 $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示肿瘤组织 *miRNA* 表达相对于配对的正常组织的变化倍数,其中 $\Delta\Delta Ct=$

$(Ct_{miR-212}-Ct_{let-7a})_{肿瘤}-(Ct_{miR-212}-Ct_{let-7a})_{正常}$ 。

1.3 统计学处理

miR-212 表达数据以中位数和四分位数间距表示。采用 SPSS 16.0 统计软件的非参数 Wilcoxon 符号秩检验 (配对的正常和肿瘤组)、Mann-Whitney *U* 检验和 Kruskal-Wallis *H* 检验进行统计处理。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-212 在胃癌及对应正常胃组织中的表达

miR-212 在胃癌及正常胃组织中的相对表达量分别为 1.439 和 1.000,经分析,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 胃癌组织 miR-212 表达同临床病理特征的关系

由表 2 可见,胃癌组织中 *miR-212* 的表达与肿块位置、分化程度、淋巴结转移以及 TNM 分期有关。胃底部 *miR-212* 相对表达量 (2.334) 比胃体部 (1.439) 和胃窦部 (0.890) 要高 ($P=0.041$)。低分化组的表达量 (0.999) 要低于中高分化组 (2.269),差异有统计学意义 ($P=0.010$)。有淋巴结转移组表达量 (0.903) 低于无淋巴结转移组 (2.043),差异亦有统计学意义 ($P=0.001$)。不同 TNM 分期 *miR-212* 相对表达量亦不同 ($P=0.025$), I、II、III、IV 期分别为 1.996、1.710、0.907 和 0.701。但是,*miR-212* 相对表达量与其他临床病理特征 (如年龄、性别、血型、肿块大小等),未见明显相关 ($P>0.05$)。

3 讨 论

近年来的研究表明,*miRNA* 在肿瘤发生发展中发挥重要作用。它可以通过其存在、缺失和表达水平的改变影响细胞的分化。*miR-212* 基因定位于 17p13 区^[7],此区域中有抑癌基因存在 (如 *p53*),且是公认

表 1 引物序列

miRNA	引物位置	序列
miR-212	RT 引物	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGGCCGTG-3'
	前向引物	5'-ATGGTTTCGTGGGTAACAGTCTCCAGTC-3'
let-7a	RT 引物	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCTATAC-3'
	前向引物	5'-ATGGTTTCGTGGGTGAGGTAGTAGGTTGT-3'
共同反向引物		5'-GCAGGGTCCGAGGTATTC-3'

表 2 胃癌中 *miR-212* 表达和临床病理特征的关系

临床病理特征		例数	<i>miR-212</i> 相对表达量	U/H 值	P 值
年龄(岁)	<60	9	1.335(0.531~3.425)	51.000	0.616
	≥60	13	1.543(0.472~2.746)		
性别	男性	13	1.543(0.472~2.746)	56.000	0.867
	女性	9	1.335(0.531~3.425)		
血型	A 型	6	0.953(0.531~2.090)	3.440	0.329
	B 型	5	1.697(0.899~2.746)		
	AB 型	1	2.269		
	O 型	10	1.276(0.472~3.425)		
肿块大小(cm)	<5	14	1.447(0.733~2.746)	51.000	0.733
	≥5	8	1.380(0.472~3.425)		
肿块位置	胃底部	3	2.334(1.723~3.425)	6.413	0.041
	胃体部	12	1.439(0.472~2.269)		
	胃窦部	7	0.890(0.531~2.746)		
分化程度	中高分化	7	2.269(1.216~2.746)	16.000	0.010
	低分化	15	0.999(0.472~2.090)		
T 分期	T ₁	1	0.999	2.665	0.264
	T ₂	3	2.090(1.619~2.334)		
	T ₃	18	1.276(0.472~3.425)		
淋巴结转移	无	10	2.043(1.543~3.425)	10.000	0.001
	有	12	0.903(0.472~1.842)		
N 分期	N ₁	7	0.899(0.472~1.216)	13.000	0.465
	N ₂	5	1.125(0.531~1.842)		
TNM 分期	I	5	1.996(0.999~2.334)	9.371	0.025
	II	6	1.710(1.216~3.425)		
	III	9	0.907(0.472~2.269)		
	IV	2	0.701(0.531~0.871)		

的高突变率区^[8]。研究显示 *miR-212* 在不同的癌组织中存在上调/下调不一致表达的现象。Park 等^[7]通过荧光酶报告基因测定法和蛋白质印迹法检测显示,过度表达的 *miR-212* 基因可能是造成胰腺癌的原因之一;Wada 等^[8]应用 miRNA 微点阵方法分析胃癌组织和正常胃组织,发现 *miR-212* 的下调可能通过其靶基因(*MECP2*)与胃癌的发生相关联。而 Incoronato 等^[11]则认为 *miR-212* 对于非小细胞肺癌而言,可能为一种抑癌基因。此外,*miR-212* 还通过 MSK1 和 CREB 调节神经营养索^[12],影响酒精肝的形成^[13]等。但 *miR-212* 表达与胃癌诸多临床病理特征的关系少有研究。

为分析 *miR-212* 与胃癌发生发展的关系,本研究以 *let-7a* 为内参,应用茎环 RT-qPCR 技术检测了 22 例胃癌组织和对应癌旁正常胃黏膜组织中 *miR-212* 的表达,并分析其与诸多临床病理特征的关系。

与其他肿瘤类似,*miR-212* 在胃癌组织的表达高于对应的正常胃黏膜组织,提示 *miR-212* 的表达在胃癌组织中相对于癌旁正常组织出现了上调。推测可能由于受各种外因内因影响,刺激 *miR-212* 表达过度上调,这种上调又提高了 17p13 区域自发突变率或使参与 DNA 修复蛋白水平下降^[14],使细胞采用易错性修复方式或凋亡途径障碍(如 *p53* 突变),因而向癌变方向发展。在分析 *miR-212* 表达水平与胃癌多种临床病理特征的关系中可以发现,胃癌组织中 *miR-212* 与淋巴结转移相关,无淋巴结转移组呈现高表达,有淋巴结转移组则呈现低表达,这种类似负相关的表达提示 *miR-212* 可能抑制了胃癌淋巴结转移。胃癌组织中 *miR-212* 的表达虽然与胃癌细胞分化程度及 TNM 分期相关,但与其分化、分期的恶性程度也呈负相关。这结果与设想的

miR-212 表达与胃癌恶性程度呈正相关有所出入。这种在癌组织和癌旁正常组织中的不同表达,提示 *miR-212* 参与了胃癌的发生发展过程,但参与过程及对肿瘤恶性程度的判断和影响不是简单的单方向的相关。

综上所述,*miR-212* 在胃癌组织中的表达上调,提示了其作为一种促癌因素存在;分化程度低、发生淋巴结转移、肿瘤 TNM 分期靠后 *miR-212* 表达下调,提示 *miR-212* 可能也参与抑制胃癌细胞的分化、侵袭和淋巴结转移。由于常用临床病理特征及对肿瘤恶性程度、手术方案选择、胃癌预后具有重要的指示作用,但其延迟性限制了癌症的早期诊断。*miR-212* 在癌症早期的高表达和晚期的抑制性表达,为胃癌早期诊断和判断预后提供了新思路,以及干预甚至治愈的可能,其确切机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution [J]. *Nature*, 2004, 430(6996): 161–164.
- [2] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): 2257–2261.
- [3] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350–355.
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [5] Plasterk RH. Micro RNAs in animal development [J]. *Cell*, 2006, 124(5): 877–881.
- [6] Poy MN, Spranger M, Stoffel M. MicroRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2007, 9(Suppl 2): 67–73.
- [7] Park JK, Henry JC, Jiang J, et al. miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(4): 518–523.
- [8] Wada R, Akiyama Y, Hashimoto Y, et al. miR-212 is downregulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(5): 1106–1114.
- [9] Xue X, Sun J, Zhang Q, et al. Identification and characterization of novel microRNAs from *Schistosoma japonicum* [J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e4034.
- [10] Wu WY, Xue XY, Chen ZJ, et al. Potentially predictive microRNAs of gastric cancer with metastasis to lymph node [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(31): 3645–3651.
- [11] Incoronato M, Garofalo M, Urso L, et al. miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9): 3638–3646.
- [12] Remenyi J, Hunter CJ, Cole C, et al. Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins [J]. *Biochem J*, 2010, 428(2): 281–291.
- [13] Tang Y, Banan A, Forsyth CB, et al. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2008, 32(2): 355–364.
- [14] Tili E, Michaille JJ, Wernicke D, et al. Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(12): 4908–4913.