

胃癌组织内 miR-29a 与 VEGF-A 表达的相关性研究

李学成¹, 卢斌², 王宗华³, 何凤², 胡春燕², 刘志鹏¹, 邹利全¹,
熊晓峰¹, 杨帆², 陈陵¹

(1. 中国人民解放军第 324 医院, 重庆 400020; 2. 第三军医大学新桥医院, 重庆 400037; 3. 第三军医大学护理学院, 重庆 400038)

摘要: [目的] 观察 miR-29a 和血管内皮生长因子-A(VEGF-A)在胃癌病人血清及组织中的表达, 分析两者表达相关性。[方法] 采用荧光实时定量 PCR 技术检测 50 例胃癌患者血清中 miR-29a, 采用 ELISA 技术检测血清 VEGF-A 的表达, 利用免疫组化法检测 113 例胃癌组织(57 例 miR-29a 高表达组及 56 例 miR-29a 低表达组)中 VEGF-A 的表达, 并分析两者表达相关性; 利用生物信息学预测 miR-29a 与 VEGF-A 3'UTR 结合位点。[结果] 胃癌患者血清中 miR-29a 与 VEGF-A 的表达呈现明显负相关 ($R^2=0.56, P<0.0001$); 胃癌组织中 miR-29a 低表达组 VEGF-A 表达阳性率明显高于 miR-29a 高表达组 ($74.32\% \pm 7.98\%$ vs $34.37\% \pm 6.59\%$, $P<0.001$); VEGF-A 3'UTR 序列可能有 miR-29a 稳定的结合位点。[结论] miR-29a 是一个潜在的抑癌 miRNA, 可能是通过抑制 VEGF-A 的表达而发挥抑癌作用。

关键词: 胃肿瘤; miR-29a; 血管内皮生长因子-A

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)01-0038-04

Expression of miR-29 and Its Relationship with Vascular Endothelial Growth Factor-A(VEGF-A) in Gastric Cancer

LI Xue-cheng¹, LU Bing², WANG Zong-hua³, et al.

(1. No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China; 2. Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Nursing School, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of miR-29a and its relationship with vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A) in gastric cancer tissues and serum. [Methods] The expression of serum miR-29a and VEGF-A in 50 cases with gastric cancer were detected by real-time PCR and ELISA, respectively. The expression of VEGF-A in 113 gastric cancer tissues (57 cases with miR-29a high expression, 56 cases with miR-29a low expression) were detected immunohistochemically, and the expressions between serum and tissues miR-29a or VEGF-A in gastric cancer were analyzed. The miR-29a binding site on VEGF-A 3'UTR sequence was analyzed by bioinformatic predictions program. [Results] The expression of miR-29a and VEGF-A in the serum of patients with gastric cancer was significantly negative correlation ($R^2=0.56, P<0.0001$). The expression of VEGF-A in low miR-29a expression group of gastric cancer tissues was significantly higher than that in high miR-29a expression group ($74.32\% \pm 7.98\%$ vs $34.37\% \pm 6.59\%$, $P<0.001$). VEGF-A 3'UTR sequence might have stable binding site with miR-29a. [Conclusion] By suppressing VEGF-A expression, miR-29a is probably a potential tumor suppressing miRNA.

Subject words: gastric neoplasms; miR-29a; vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A)

胃癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤, 在我国其发病率高居各类肿瘤之首。尽管在过去的数十年中, 在胃癌的诊断和治疗方面有了很大的进展, 但是其 5 年生存率仍然很低, 因此, 寻找有效的早期诊断

指标及治疗靶标是胃癌治疗一个亟待解决的难题^[1]。miRNAs 是新近发现的一类重要的基因表达调控分子, 已证实在肿瘤的发生发展及侵袭转移中发挥重要的作用。miR-29a 是新近发现可在多种肿瘤中起到抑癌基因作用的 miRNA 分子^[2,3]。我们的前期研究也发现, miR-29a 在胃癌患者血清及胃癌组织中表达均明显低于正常人^[4,5], 且 miR-29a 可抑制胃癌组织内微血管的形成, 从而抑制胃癌发生及发展^[6]。

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5158; CSTC2011AC5024; CSTC2011jjA0878; CSTC2011jjA0882; CSTC2012jjA1736)

通讯作者: 陈陵, 主治医师, 博士; 中国人民解放军第 324 医院消化内科, 重庆市江北区建新东路 29 号(400020), E-mail: lingcong_008@126.com。

收稿日期: 2012-10-19; **修回日期:** 2012-12-02

但 miR-29a 抑制微血管形成的具体分子机制尚不清楚。血管内皮生长因子 A(VEGF-A)是血管生成过程中的关键分子,可促进内皮细胞渗透、激活、存活、增殖、浸润和迁移,从而与肿瘤血管生成和淋巴管形成密切相关,阻断 VEGF 信号途径可抑制肿瘤的生长和转移^[7,8]。本研究拟检测胃癌病人血清及组织中 miR-29a 与 VEGF-A 的表达,并进行相关性分析,探讨 miR-29a 抑制胃癌组织内微血管形成的具体分子机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象及标本采集

免疫组化所用样本来自中国人民解放军 324 医院 2005~2010 年胃癌手术切除病例 113 例,纳入及排除标准详见参考文献[5]。胃癌患者血清样本来自 2012 年 3 月至 6 月收治的胃癌患者 50 例,其中男性 28 例,女性 32 例,年龄在 35~68 岁,高分化 15 例,中分化 17 例,低分化 18 例。病人入院后次日早晨 6 点空腹采集外周静脉血 5ml,经 3 000r/min 离心 10min 收集上层血清,置于-80℃冰箱待检。

1.2 主要试剂

TaKaRa RNAsiso RNA 抽提试剂、逆转录试剂盒及 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司;U6 及 miR-29a 特异性 RT-PCR 引物套装购自广州锐博公司;免疫组化 SP 试剂盒购自北京中杉公司;鼠抗人 VEGF-A 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;VEGF-A ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司;实时荧光定量 PCR 仪(7500 系统)购自美国 ABI 公司;酶标仪(9602A)购自南京普朗医疗器械公司。

1.3 方法

1.3.1 ELISA 法检测胃癌患者血清中 VEGF-A 的浓度

操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μ l,待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ l,然后再加待测样品 10 μ l(样品最终稀释度为 5 倍)。封板后置 37℃温预 30min;洗涤液洗板 5 次,拍干;每孔加入酶标试剂 50 μ l,空白孔除外,37℃温预 30min 后,洗涤 5 次;每孔加入显色剂 A 50 μ l,再加入显色剂 B 50 μ l,轻轻震荡混匀,37℃避光显色 15min,加入终止液 50 μ l,终止反应;以空白孔调零,450nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。

1.3.2 real-time PCR 检测胃癌患者血清中 miR-29a 表达

以 U6 管家基因为内参,校正器参考文献方法^[9],选用 SGC-7901 细胞系。按照 TaKaRa RNAsiso 试剂操作手册,提取细胞总 RNA,并测定 mRNA 浓度;TaKaRa RT 逆转录试剂盒合成 cDNA 后行 real-time PCR 检测,在 20 μ l 反应体系中加入:SYBR Green PCR Master Mix 10 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,cDNA 1 μ l,ddH₂O 8 μ l;设置条件为:94℃ 3min,94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 40s,40 个循环,72℃延伸 3min。

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行结果分析,将不同标本的 RQ 值($RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$)进行比较。 ΔC_t =目的基因 C_t 值-内参照基因 C_t 值, $\Delta\Delta C_t$ =待测标本的 ΔC_t -校正器 ΔC_t ,详见参考文献[5]。

1.3.3 免疫组化法检测胃癌组织中 VEGF-A 表达

免疫组化法检测 miR-29a 高表达及低表达组中 VEGF-A 的表达情况,分组信息详见参考文献[5]。胃癌患者术后立即收集标本经甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 厚度切片后行免疫组化。免疫组化染色采用 SP 法,严格按照试剂盒说明书进行,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定标准^[10],VEGF-A 阳性反应着色均定位于细胞胞浆或细胞膜内,呈棕黄或棕褐色者被认为阳性细胞,取 4 个不同的 200 倍视野观察,计算 VEGF-A 阳性细胞率。

1.3.4 生物信息学预测 miR-29a 与 VEGF-A 3'UTR 结合位点

采用常见的靶标基因预测软件 Targetscan 及 RNAhybrid 预测 miR-29a 与 VEGF-A 的 3'UTR 结合位点。在线预测网站分别为 <http://www.targetscan.org/> 及 <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>。

1.4 统计学分析

数据采用 SPSS 13.0 统计学软件进行 t 检验及 Pearson 相关性分析,组间比较差异情况, $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

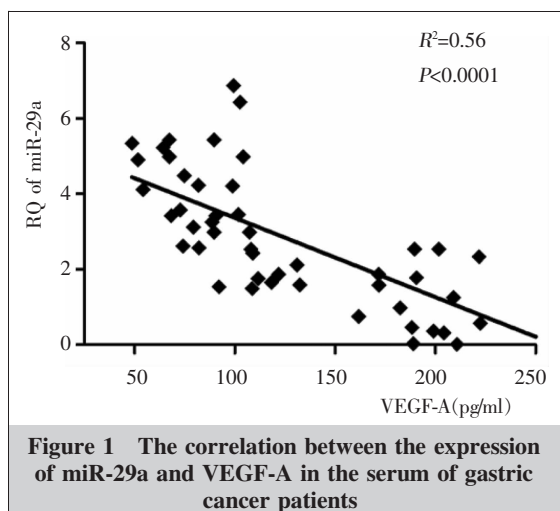
2.1 胃癌患者血清内 miR-29a 与 VEGF-A 表达相关性

采用 real-time PCR 法检测胃癌患者血清中 miR-29a 的表达水平,结果发现胃癌患者血清中 miR-29a 相对表达量最低为 0.02,最高为 6.87,平均

值为 2.68 ± 1.47 ; 采用 ELISA 法检测患者血清中 VEGF-A 表达, 发现 VEGF-A 浓度最低为 48.76 pg/ml , 最高位 291.76 pg/ml , 平均值为 $132.867 \pm 63.72 \text{ pg/ml}$ 。以 miR-29a 相对表达量作为 Y 轴, VEGF-A 的表达量作为 X 轴, 采用 Pearson 相关性分析 (Figure 1)。结果发现 VEGF-A 的表达量与 miR-29a 相对表达量成显著负相关 ($R^2=0.56, P<0.0001$)。

2.2 胃癌组织中 miR-29a 与 VEGF-A 表达相关性

根据 miR-29a 表达水平, 以胃癌组织中 miR-29a 相对表达量平均值为界, 将 113 例胃癌组织分为 miR-29a 高表达及低表达组^[5]。进一步采用免疫组化法检测 miR-29a 高表达及低表达组织中 VEGF 的表达。结果发现, 113 例胃癌组织中, 低表达 miR-29a 的 56 例样本中 VEGF-A 平均表达阳性率为 $74.32\% \pm 7.98\%$, 而高表达 miR-29a 的 57 例样本中 VEGF-A 的平均表达阳性率为 $34.37\% \pm 6.59\%$ (Figure 2)。以上结果显示 miR-29a 高表达组的 VEGF-A 的表达明显高于 miR-29a 低表达组 ($P<0.001$)。

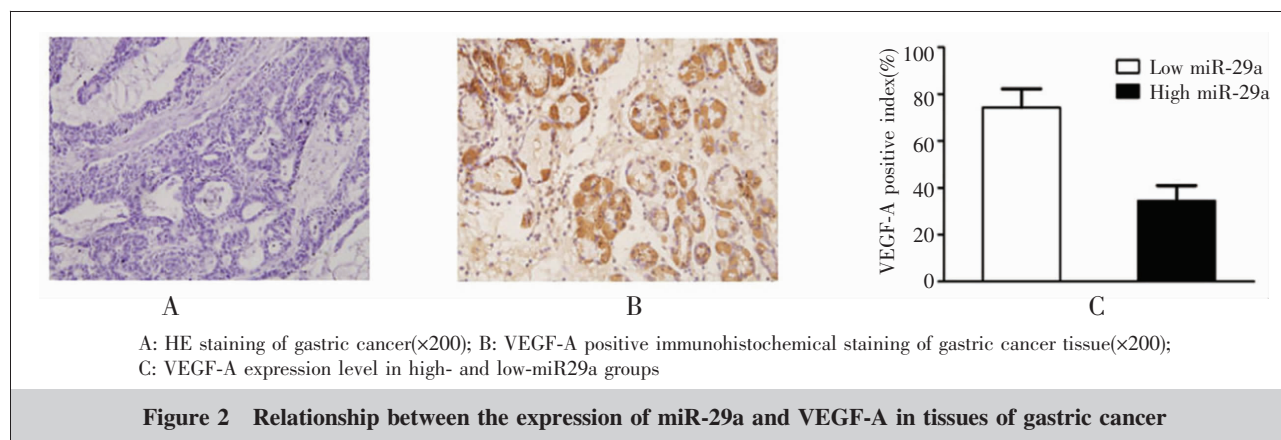
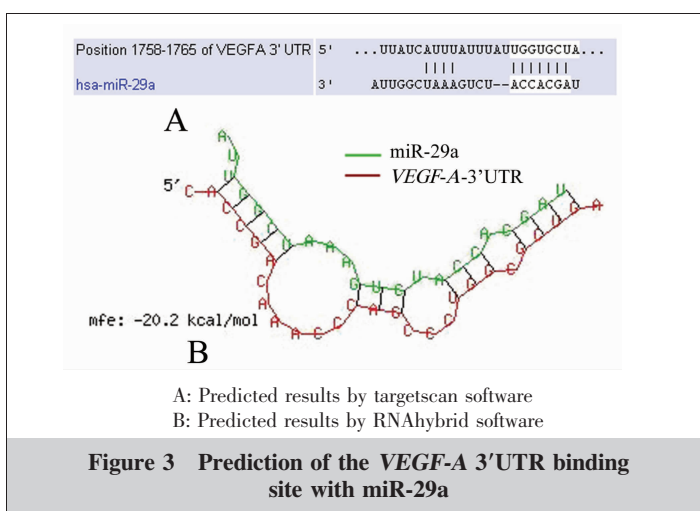


2.3 miR-29a 与 VEGF-A 3'UTR 结合位点预测

为进一步探讨 miR-29a 与 VEGF 表达相关性, 我们采用在线预测的方法对 miR-29a 与 VEGF-A 3'UTR 结合位点进行预测, 结果发现, Targetscan 及 RNAhybrid 法均预测到 VEGF-A 3'UTR 内有 miR-29a 稳定结合的位点 (Figure 3)。这提示 VEGF-A 可能是 miR-29a 直接调控的靶基因之一。

3 讨论

miRNAs 作为一类内源性非编码的小 RNAs, 通过与靶基因特异性作用, 在转录或翻译水平调节相关基因表达, 参与发育、增殖、分化及凋亡等多种生物学过程。与肿瘤相关的 miRNAs 由于参与调节肿瘤发生、发展与转移等关键环节而成为近年来的研究热点。其中 miR-29a 在众多实体肿瘤如神经胶质瘤、肝细胞癌、肉瘤、脑肿瘤等中均发现呈现低表达状态, 通过抑制靶基因的表达而作为肿瘤抑制基因



存在,如调节 *Mcl-1*、*B7-H3*、*CDK6* 及 *p53* 等与肿瘤关系密切的靶基因,从而参与肿瘤的发生发展及侵袭转移等^[2,3,11]。本课题组前期在胃癌患者血清及组织中均检测到 *miR-29a* 表达明显低于健康成年人^[4,5],且 *miR-29a* 表达水平与微血管密度(MVD)呈显著负相关^[6],提示 *miR-29a* 表达下调可能是肿瘤转移能力增强的一个标志,其表达不但可作为早期诊断指标,并且可以作为术后判断预后的有用指标。尽管如此,*miR-29a* 抑制胃癌的转移机制及其与 MVD 之间的调控作用机制仍有待进一步研究。

胃癌与其他实体瘤一样,其生长和转移与血管形成密切相关,尤其淋巴结转移是胃癌转移的最重要方式之一。而 VEGF 是已知的最强有力的促血管生成因子,其他血管生成因子的血管生成作用是通过增强 VEGF 的表达及生成作用实现的。研究发现胃癌细胞可通过 VEGF-A 信号通路促进癌旁组织中血管与淋巴管增生,进而利于癌细胞转移^[12];Kondo 等^[13]研究发现 VEGF-A 可协同 Ang-2 促进胃癌血管增生;已有研究证实 VEGF-A 的表达与胃癌组织学类型、淋巴侵袭、淋巴转移、MVD 密切相关^[14]。我们前期实验亦发现 *miR-29a* 表达水平升高可抑制肿瘤组织内 MVD,那么 *miR-29a* 是否是通过调控 VEGF-A 的表达而参与抑制胃癌的血管生成呢?目前胃癌血清及组织中进行 *miR-29a* 与 VEGF-A 两者表达相关性的研究尚未见报道。本研究结果显示,胃癌患者血清中 *miR-29a* 与 VEGF-A 的表达呈现显著负相关,*miR-29a* 高表达的患者其 VEGF-A 则表达水平下调;反之亦然。本研究进一步根据 *miR-29a* 在胃癌组织中的表达,将胃癌组织分为 *miR-29a* 高表达组及低表达组,经免疫组化检测发现,*miR-29a* 高表达的胃癌患者组织中 VEGF-A 阳性细胞数明显低于 *miR-29a* 低表达的胃癌患者,提示 *miR-29a* 抑制肿瘤组织内 MVD 可能是通过抑制 VEGF-A 的表达而实现的。因此,本研究进一步采用生物信息学的方法对 *miR-29a* 作用的靶基因进行预测,结果发现 *miR-29a* 可稳定结合于 *VEGF-A* 3'UTR。这表明 *VEGF-A* 很可能是 *miR-29a* 直接调控的靶基因之一,由此提示 *miR-29a* 可能通过抑制其靶基因 *VEGF-A*,进而抑制肿瘤组织内微血管生成而抑制肿瘤增殖与转移。本研究为后续探讨 *miR-29a* 与 VEGF-A 相互作用,进而参与胃癌生物学行为的具体分子机制提供指导,也为胃癌的分子靶向治疗提

供新的思路 and 依据。

参考文献:

- [1] Giordano A, Cito L. Advances in gastric cancer prevention [J]. World J Clin Oncol, 2012, 3(9): 128-136.
- [2] Xu H, Cheng IY, Guo HF, et al. MicroRNA *miR-29* modulates expression of immunoinhibitory molecule *B7-H3*: potential implications for immune based therapy of human solid tumors [J]. Cancer Res, 2009, 69(15): 6275-6281.
- [3] Kwiecinski M, Elfimova N, Noetel A, et al. Expression of platelet-derived growth factor-C and insulin-like growth factor I in hepatic stellate cells is inhibited by *miR-29* [J]. Lab Invest, 2012, 92(27): 978-987.
- [4] Chen L, Chen XH, Li XC, et al. Expression of *miR-29* in serum of gastric cancer patients and its effect on prognosis [J]. Journal of Molecular Diagnosis and Therapy, 2011, 3(2): 17-20. [陈陵, 陈先华, 李学成, 等. *miR-29* 在胃癌患者血清中的表达及对预后的影响 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(2): 17-20.]
- [5] Chen L, Wang ZH, Li XC, et al. Expression of *miR-29* in gastric cancer and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2011, 18(3): 320-323. [陈陵, 王宗华, 李学成, 等. 胃癌组织中 *miR-29* 的表达及其临床意义. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(3): 320-323.]
- [6] Chen L, Li XC, Wang J, et al. Expression of *miR-29* and its relationship with microvessel density in gastric cancer [J]. Journal of Chinese Oncology, 2011, 17(4): 241-244. [陈陵, 李学成, 王军, 等. *miR-29* 在胃癌中的表达及其与微血管密度的相关性 [J]. 肿瘤学杂志, 2011, 17(4): 241-244.]
- [7] Cao Y, E G, Wang E, et al. VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression [J]. Cancer Res, 2012, 72(16): 3912-3918.
- [8] Ding M, Fu X, Tan H, et al. The effect of vascular endothelial growth factor C expression in tumor-associated macrophages on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast Cancer [J]. Mol Med Report, 2012, 6(5): 1023-1029.
- [9] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haike-Kains B, et al. *miR-29c* and *miR-223* down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification [J]. Blood, 2009, 113(21): 5237-5245.
- [10] Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, et al. Vascular endothelial growth factor D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma [J]. Br J Cancer, 2003, 88(2): 237-244.
- [11] Zhao JJ, Lin J, Lwin T, et al. microRNA expression profile and identification of *miR-29* as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting *CDK6* in mantle cell lymphoma [J]. Blood, 2010, 115(13): 2630-2639.
- [12] Dadras S, Detmar M. Angiogenesis and lymphangiogenesis of skin cancers [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2004, 18(5): 1059-1070.
- [13] Kondo K, Kaneko T, Baba M, et al. VEGF-C and VEGF-A synergistically enhance lymph node metastasis of gastric cancer [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(4): 633-637.
- [14] Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters [J]. Cancer Lett, 2005, 226(1): 85-90.