

miR-143 及其前体转录本在宫颈鳞癌组织中的表达

吴敏云¹, 胡 芝², 张 晶³

(1.衢州市人民医院, 浙江 衢州 324000; 2.温州市中心医院, 浙江 温州 325000;

3.浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: [目的] 探讨 miR-143 及其前体转录本在宫颈鳞癌中的表达及与临床病理特征的关系。[方法] 采用 Real-time PCR 方法检测 48 例宫颈鳞癌及 20 例正常宫颈组织中 miR-143 的表达, 分析 miR-143 与其前体转录本表达间的相关性, 以及 miR-143 表达与宫颈鳞癌临床病理特征的关系。[结果] 用 Real-time PCR 能有效检测 miR-143 及其前体转录本; miR-143 及其前体转录本在宫颈鳞癌组织中的表达均显著低于正常宫颈组织 ($P<0.05$), Spearman 相关分析显示, miR-143 前体转录本表达和 miR-143 表达呈明显正相关 ($r=0.723$, $P=0.000$)。不同组织分化程度的宫颈鳞癌 miR-143 表达存在显著差异 ($P=0.005$), 小细胞型宫颈鳞癌的 miR-143 表达明显低于其他组织分化类型的标本。miR-143 的表达在不同年龄、肿块大小、大体类型及 FIGO 分期间未见显著差异 ($P>0.05$)。[结论] 前体转录本减少是 miR-143 表达下调的重要原因。miR-143 在宫颈鳞癌组织中的异常表达, 可能在宫颈鳞癌的发生和发展过程中发挥重要作用, 有望成为宫颈鳞癌新的预后指标及治疗靶点。

主题词: microRNA; miR-143; 宫颈肿瘤; 鳞状细胞癌

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)05-0373-05

Expression of miR-143 and Its Primary Transcript in Squamous Cell Carcinoma of Cervix

WU Min-yun¹, HU Zhi², ZHANG Jing³

(1. Quzhou People's Hospital, Quzhou 324000, China; 2. Wenzhou Central Hospital, Wenzhou 325000, China; 3. Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expressions of miR-143 and its primary transcript (pri-miR-143) in squamous cell carcinoma of cervix and the relationship of miR-143 with clinicopathologic features of squamous cell carcinoma of cervix. [Methods] The expressions of miR-143 in 48 cases with squamous cell carcinoma of cervix and 20 normal cervical tissue specimens were examined by real-time PCR. The correlation between the expressions of miR-143 and pri-miR-143 was analyzed. The relationship of the expression of miR-143 and clinicopathologic features of squamous cell carcinoma were explored. [Results] The real-time PCR could sensitively and specifically detect the expressions of miR-143 and pri-miR-143. Expressions of miR-143 and pri-miR-143 in squamous cell carcinoma of cervix were obviously lower than those in normal cervical tissue ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that the expression of miR-143 was positively associated with the expression of pri-miR-143 ($r=0.723$, $P=0.000$). The level of miR-143 was significantly different in squamous cell carcinoma of cervix with different histological grades ($P=0.005$). The expressions of miR-143 in small cell type of squamous cell carcinoma of cervix was significantly lower than that in the other type one. No significant difference was found in miR-143 expression in squamous cell carcinoma of cervix with ages, tumor sizes, general types, and FIGO stages ($P>0.05$). [Conclusion] Primary transcription reduction is an important reason for down-regulation of miR-143 expression. miR-143 might play an important role in the carcinogenesis and progress of squamous cell carcinoma of cervix and may be a novel potential therapeutic target for squamous cell carcinoma of cervix.

Subject words: microRNA; miR-143; cervical neoplasms; squamous cell carcinoma

宫颈癌的发生发展是一个多基因参与、涉及多

步骤的复杂生物学过程。虽然已明确人乳头状瘤病毒 (HPV) 感染为宫颈癌的重要致病因素, 但许多 HPV 阳性的妇女并不发展成为宫颈癌^[1]。近年来备受关注的一类长度约 22 个核苷酸的内源性非编码

基金项目: 温州市科技计划项目 (Y20100255)

通讯作者: 胡 芝, 副主任医师, 硕士; 温州市中心医院西院区妇科, 浙江省温州市鹿城 (325000); E-mail: xjgts@sina.com。

收稿日期: 2013-03-04; **修回日期:** 2013-04-16

微小 RNA,即 miRNA(microRNA),通过碱基配对调控 mRNAs 的翻译和稳定性,沉默编码基因的表达,调控细胞的分化、生长、发育、增殖、代谢、凋亡等功能^[2]。近年来的研究表明,miR-143 是与肿瘤发生发展密切相关的 miRNA^[3-8]。但迄今,miR-143 及其前体转录本(pri-miR-143)在宫颈鳞癌组织中表达少有研究。为此,本研究采用定量 PCR 技术检测了 48 例宫颈鳞癌组织中 miR-143 和 pri-miR-143 的表达,分析两者表达的相关性,及 miR-143 表达水平与临床病理特征的关系,探讨 miR-143 失调表达机制及在宫颈鳞癌发生、发展中可能的调控作用和临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本采集及保存

2011 年 2 月至 10 月收集温州市中心医院妇瘤科 48 例宫颈鳞癌患者宫颈组织标本,所有标本均在未行放、化疗前取材。患者年龄 32~68 岁,中位年龄 52 岁。17 例患者肿瘤直径<4cm,31 例患者≥4cm。大体类型:外生型 23 例,内生型 13 例,溃疡型 9 例,颈管型 3 例。组织分化程度:角化性大细胞型(Ⅰ级)16 例,非角化性大细胞型(Ⅱ级)14 例,小细胞型(Ⅲ级)18 例。根据宫颈癌 FIGO(2009)分期,Ⅰ期 8 例,Ⅱ期 26 例,Ⅲ期和Ⅳ期 14 例。另取同期因子宫肌瘤行子宫全切除标本的正常宫颈组织 20 例作对照。所有标本离体后 20min 内液氮保存。宫颈癌的诊断及常规病理资料由两位病理科医生盲法阅片后提供。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取

组织标本液氮研磨后,按 Trizol 试剂(购自 In-

vitrogen 公司)说明书抽提样品总 RNA,DEPC 处理水溶解。抽提的总 RNA 标本按 DNase I(购自 Takara 公司)说明书去除可能污染的 DNA,酚-氯仿重新抽提后,再以 DEPC 处理水溶解,分光光度计测定 260nm 及 280nm 吸光值,确定 RNA 溶液浓度和纯度。取 2~5μg 总 RNA 以 1%琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 miR-143及 pri-miR-143表达分析

以 U6 作为内参,分析 miR-143 表达,以 GAPDH 作为内参,分析 pri-miR-143 表达。相关分析的引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成(Table 1)。为分析 miR-143 表达,1μg 总 RNA 分别以 miR-143 茎环 RT 引物及 U6 特异 RT 引物进行逆转录;为分析 pri-miR-143 表达,1μg 总 RNA 分别以 pri-miR-143 特异 RT 引物及 Oligo dT 进行逆转录。反应体系为 1μg 总 RNA、50nmol/L RT 引物、2U RNase inhibitor、5U M-MLV 逆转录酶、0.5μmol/L dNTP。miR-143 的 RT 反应条件为:16℃ 30min,42℃ 30min,75℃ 15min,其他 RT 反应的条件为 42℃ 60min,75℃ 15min,反应结束后-20℃保存。以 15μl 反应体系进行 Real-time 定量 PCR。miR-143 检测反应体系包括:1μl RT 产物,1×SYBR Green I Master-mix,0.5μmol/L 特异 miR-143 前向引物、0.5μmol/L 特异 miR-143 反向引物。Real-time 定量 PCR 条件为:95℃ 10min 后,95℃ 15s,60℃ 1min,40 个循环。Real-time 定量 PCR 使用 Applied Biosystems 7500 仪器进行。所有样品做 3 复孔。PCR 产物经 4%琼脂糖电泳分析。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数即 Ct 值,以 U6 或 GAPDH 作为内参照,采用定量 PCR 中的相对定量

Table 1 Primer sequences for the detection of miR-143 and its pri-miRNA

Primer		Sequence	Product (bp)
miR-143	RT stem-loop primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGCTACA-3'	61
	Forward primer	5'-GTTCGTGGGTGAGATGAAGCACTG-3'	
	Reverse primer	5'-GTGTCGTGGAGTCGGCAATTC-3'	
U6	RT primer	5'-CGCTTCACGATTTTGCGTGTCA-3'	85
	Forward primer	5'-CGGCGGTACATATACTAAAAT-3'	
	Reverse primer	5'-CGCTTCACGATTTTGCGTGTCA-3'	
pri-miR-143	RT primer	5'-CGCCACAGGCCACCAGAGCGGAGCA-3'	114
	Forward Primer	5'-AACTTCCCCAGCATCACAAGTGGCTG-3'	
	Reverse primer	5'-GCGCAGCGCCCTGTCTCCCA-3'	
GAPDH	Forward primer	5'-CAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAA-3'	101
	Reverse primer	5'-GGGTGGAATCATATTGGAACATGT-3'	

法,以 $N=2^{-\Delta Ct}$ 表示目的基因的表达相对于内参的变化倍数,其中 $\Delta Ct=Ct_{\text{目的基因}}-Ct_{\text{内参}}$ 。为增加数据直观性,所有数据均放大 1 000 倍。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计处理和统计图表制作。由于 Real-time 数据呈非正态分布,故表达数据以中位数和四分位数间距表示。采用 Spearman 相关分析 miR-143 与 pri-miR-143 表达的相关性,采用 Mann-Whitney *U* 检验(两组)和 Kruskal-Wallis *H* 检验(多组)进行组间比较,取 $P<0.05$ 为假设检验有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 miR-143 及其前体在宫颈鳞癌及正常宫颈组织中的表达

miR-143、pri-miR-143、U6 及 GAPDH 的 Real-time PCR 产物溶解曲线均为单峰 (Figure 1),说明 RT-PCR 能特异检测 miR-143 及 pri-miR-143。以 GAPDH 为内参,pri-miR-143 在宫颈鳞癌组织相对表达量为 0.37 (0.23~0.74),在正常宫颈组织为 1.50 (0.94~2.39)(Figure 2A)。以 U6 为内参,miR-143 在宫颈鳞癌组织相对表达量为 2.89 (2.07~5.04),在正常宫颈组织为 11.75 (9.14~24.34) (Figure 2B)。采用 Mann-Whitney *U* 检验,miR-143 及 pri-miR-143 在宫颈鳞癌和正常宫颈组织表达两者差异均有显著性 ($P<0.05$)。采用 Spearman 相关分析 pri-miR-143 表达和 miR-143 表达相关性,结果显示,pri-miR-143 表达和 miR-143 表达明显相关($r=0.723, P=0.000$)(Figure 3)。

2.2 miR-143 表达水平与宫颈鳞癌临床病理特征关系

不同组织分化程度的宫颈鳞癌中 miR-143 表达水平差异有显著性($P=0.005$)。小细胞型(Ⅲ级)宫颈鳞癌 miR-143 的表达明显低于其他组织分化类型的标本。miR-143 的表达水平在不同年龄、肿块大小、大体类型及 FIGO 分期间无显著差异($P>0.05$)(Table 2)。

3 讨论

近年来发现,miRNA 可作为肿瘤抑制或促进因子参与肿瘤的发生过程。miR-143 与肿瘤的关系首先在结肠肿瘤中报道^[3]。除此以外,miR-143 低表达还

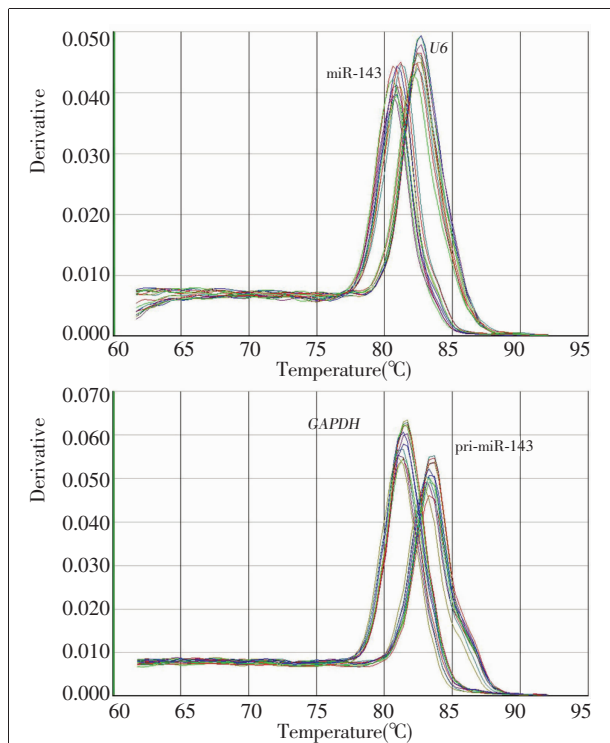
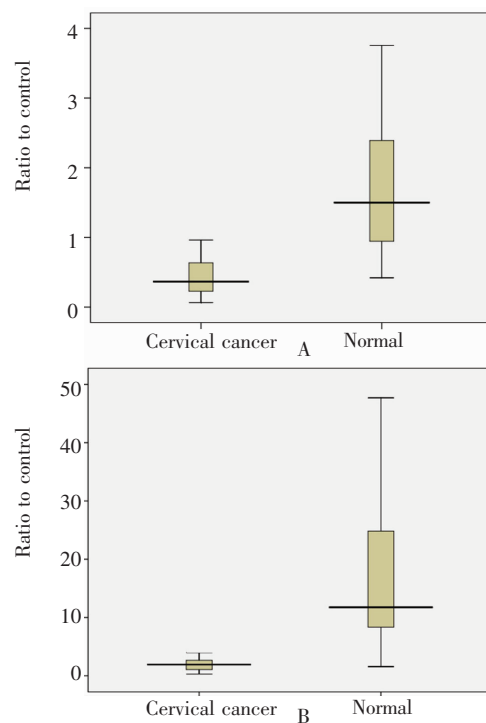
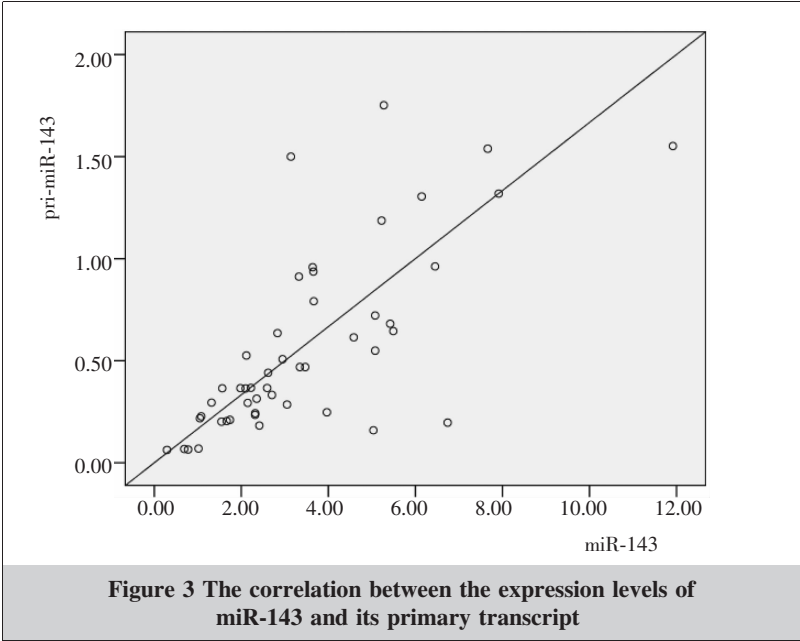


Figure 1 The melting-curves of miR-143, pri-miR-143, U6 and GAPDH



A:The levels of pri-miR-143 expression;
B:The levels of miR-143 expression.

Figure 2 The levels of miR-143 and pri-miR-143 in the specimens of squamous cell carcinoma of cervix and normal cervix tissues



Clinicopathologic features	n	Relative expression of miR-143*	P
Age(years)			
<40	10	2.17(1.42~3.02)	0.328
40~60	23	3.14(1.76~5.13)	
>60	15	3.05(2.32~5.07)	
Tumor size(cm)			
<4	17	3.35(2.22~4.58)	0.486
≥4	31	2.70(1.88~5.08)	
General type			
Exophytic form	23	3.47(2.45~5.18)	0.457
Entophytic type	13	2.31(1.66~3.05)	
Ulcerative type	9	2.35(1.73~4.58)	
Endocervical type	3	2.61(2.38~3.84)	
Pathological type			
Keratinizing large cell type	16	5.07(2.61~6.52)	0.005
Non-keratinizing large cell type	14	3.33(2.31~3.66)	
Small cell type	18	2.12(1.23~2.92)	
FIGO stage			
I	8	2.31(1.37~2.64)	0.193
II	26	3.19(2.01~5.18)	
III+IV	14	3.13(2.38~5.08)	

*:Median of relative expression, with 25th~75th percentile in parentheses, N=2^{-ΔΔCt}.

与膀胱癌^[4]、B 细胞淋巴瘤^[5]、乳腺癌^[7]、前列腺癌^[8]等肿瘤相关。其靶基因涉及抑癌基因 *ERK5*^[8]、*Bcl-2*^[9]、*KRAS*^[10]、DNA 甲基转移酶 *A2*^[11]、大肠癌转移相关基因 (metastasis-associated in colon cancer-1,

MACC1)^[12]、hexokinase 2 己糖激酶^[13]等。为分析 miR-143 表达与宫颈癌发生发展的关系,本研究以 *U6* 为内参,应用 RT-PCR 技术检测了 48 例宫颈癌组织和 20 例正常宫颈组织 miR-143 的表达,与其他报道结果一致^[9,14-16],miR-143 在宫颈癌组织中的表达明显下调,其靶基因有待于进一步研究。分析 miR-143 表达与宫颈鳞癌临床病理特征关系结果发现,miR-143 在小细胞型(Ⅲ级)宫颈癌的表达明显低于其他组织分化类型的标本,且其表达水平越低,生物学恶性程度高,提示 miR-143 可作为辅助宫颈癌预后判断的指标。

成熟的 miRNA 由 RNA 多聚酶 II (pol II) 转录成的 pri-miRNA 经胞核和胞浆 2 次酶切产生^[17]。核内的 Drosha、胞浆内的 Dicer 酶活性和前体转录本含量均影响成熟 miRNA 表达。为探讨 miR-143 下调的机制,我们进一步检测了 miR-143 前体转录本(pri-miR-143)的表达情况,结果发现,与 miR-143 表达一致,pri-miR-143 在宫颈癌组织中亦明显下调。Spearman 相关分析提示 pri-miR-143 表达和 miR-143 表达呈明显正相关。这些结果提示,前体转录本的减少是宫颈癌组织 miR-143 下调表达原因之一。最近已有文献报道,miR-143 启动子区存在多个甲基化位点,这些位点的甲基化参与白血病细胞 miR-143 下调表达^[18]。为此,我们推断出宫颈癌组织 miR-143 下调的原因之一可能同样受甲基化等表观遗传调控。

综上所述,本研究提示,miR-143 在宫颈癌组织中下调表达可能参与了宫颈鳞癌的发生和发展过程,其前体转录本表达减少是 miR-143 下调表达的重要原因。

参考文献:

- [1] Martin CM, Astbury K, O'Leary JJ. Molecular profiling of cervical neoplasia[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006, 6(2): 217-229.
- [2] Gillies JK, Lorimer IA. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(16):2005-2009.
- [3] Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia[J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(12):882-891.
- [4] Puerta-Gil P, Garcia-Baquero R, Jia AY, et al. miR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(5):1808-1815.
- [5] Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, et al. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(12):1914-1920.
- [6] Elia L, Quintavalle M, Zhang J, et al. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(12):1590-1598.
- [7] Jiang S, Zhang LF, Zhang HW, et al. A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells[J]. *EMBO J*, 2012, 31(8): 1985-1998.
- [8] Clape C, Fritz V, Henriquet C, et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice[J]. *PLoS One*, 2009, 4(10):e7542.
- [9] Liu L, Yu X, Guo X, et al. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(3): 753-760.
- [10] Chen X, Guo X, Zhang H, et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2009, 28(10):1385-1392.
- [11] Ng EK, Tsang WP, Ng SS, et al. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(4):699-706.
- [12] Zhang Y, Wang Z, Chen M, et al. MicroRNA-143 targets MACC1 to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2012, 11:23.
- [13] Fang R, Xiao T, Fang Z, et al. MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(27):23227-23235.
- [14] Deftereos G, Corrie SR, Feng Q, et al. Expression of mir-21 and miR-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12):e28423.
- [15] Wang X, Tang S, Le SY, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7):e2557.
- [16] Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, et al. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13):6031-6043.
- [17] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [18] Dou L, Zheng D, Li J, et al. Methylation-mediated repression of microRNA-143 enhances MLL-AF4 oncogene expression[J]. *Oncogene*, 2012, 31(4):507-517.