

【临床研究】

(1. 新乡医学院第三附属医院妇产科, 河南 新乡 453003)

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2018)08-0690-04

作者简介:王志景(1983-),女,河南濮阳人,学士,主治医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究。

微小 RNA(microRNA,miR)是一类长度约 18 ~ 22 个核糖核苷酸的非编码 RNA,在动物和植物中均存在,可特异性与 mRNA 结合,发挥转录后调控作用。近年来,miR 在肿瘤发生、发展中的作用越来越受到重视,而且其在肿瘤中的作用也逐渐被阐明。miR-144-3p 在多数肿瘤中呈低表达,它可以通过多种途径调控肿瘤的增殖、浸润^[1-2]。本研究拟通过检测 miR-144-3p 及其靶基因 NFE2L2 在宫颈癌及癌旁组织中的表达,分析 miR-144-3p 在宫颈癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集新乡医学院第三附属医院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月手术切除的 15 例宫颈癌患者的癌组织标本和癌旁组织标本,均经病理诊断证实为宫颈鳞状细胞癌。患者术前未接受过放射治疗或化学治疗。患者年龄 37 ~ 69 (55.5 ± 9.5) 岁,根据世界卫生组织细胞分化标准分级^[3]分为:高分化 7 例,中分化 6 例,低分化 2 例;临床分期按国际妇产科联盟(international federation of gynecology and obstetrics,FIGO)分期标准^[4]分为:I 期 6 例,Ⅱ期 3 例,Ⅲa 期 2 例,Ⅲb 期 2 例,Ⅳ期 2 例;有淋巴结转移者 8 例,无淋巴结转移者 7 例。

1.2 主要试剂与仪器 RNA 提取试剂盒、miR 反转录试剂盒、荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)试剂盒、电化学发光(electrochemi-luminescence,ECL)试剂盒及羊抗兔二抗均购自上海碧云天生物工程有限公司,兔抗人 NFE2L2 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;NanoDropD-1000 微量核酸定量仪购自美国 Thermo 公司,7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学技术预测 miR-144-3p 的靶基因 通过 mirBase、TargetScan 和 DIANA TOOLS 等生物信息网站预测发现,NFE2L2 是 miR-144-3p 的靶基因,本研究进一步检测 NFE2L2 在宫颈癌和癌旁组织中的相对表达量。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测宫颈癌及癌旁组织中 miR-144-3p 和 NFE2L2 mRNA 表达 分别取 -80 ℃ 保存的手术切除癌组织和癌旁组织约 2 g,加入液氮研磨,从研磨碎的组织中提取总 RNA,具体步骤按照试剂盒说明书进行。提取完成后测定总 RNA 浓度及完整性。取 1 μg 总 RNA,反转录成 cDNA,具体操作步骤按说明书进行。采用 Primer

Premier 5.0 软件设计 has-miR-144-3p 的引物序列,并由上海英骏公司合成。has-miR-144-3p:5'-GCGC-TACAGTATAGATGATGTAC-3'; U6: 5'-UUCACGAA-UUUGCGUGUCAU-3;NFE2L2 正义链为 5'-ACACG-GTCCACAGCTCATC-3',反义链为 5'-TGTCAATCAA-ATCCATGTCTCTG-3';内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GADPH)正义链为 5'-CTTCATTGACCTCAACTAC-3',反义链为 5'-GCCATCCACAGTCTTCTG-3'。根据 SYBR Green 法进行荧光定量 PCR,每孔设置 3 个复孔,以 2^{-ΔΔCt}法计算基因的相对表达水平。

1.3.3 Western blot 检测宫颈癌及癌旁组织中 NFE2L2 蛋白表达 取手术切除的宫颈癌和癌旁组织 2 cm × 1 cm × 1 cm,将组织块剪碎成 2 mm × 1 mm × 1 mm 大小,置于 1 ~ 2 mL 匀浆器中球状部位,加入 400 μL 去污剂裂解液(含苯甲基磺酰氟)在冰上匀浆,尽量将组织碾碎。在冰上裂解 30 min,裂解时反复振荡,用移液器将裂解液移至 1.5 mL 离心管中,于 4 ℃ 下 12 000 r · min⁻¹离心 5 min,取上清液分装于 0.5 mL 离心管中,-20 ℃ 冰箱保存。用 Brady Buffer 法测定总蛋白浓度,调整浓度一致后,煮沸 10 min。取 50 μg 总蛋白质在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,转膜后一抗[Tris Buffered saline Tween(TBST)缓冲液 1 : 1 000 稀释]孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 1 h,ECL 法显色,凝胶成像系统分析条带吸光度值。蛋白相对表达量为目标条带吸光度值与内参吸光度值的比值。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;miR-144-3p 表达量与临床资料相关性采用单因素方差分析或 *t* 检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-144-3p mRNA 在宫颈癌及癌旁组织中表达比较 宫颈癌和癌旁组织中 miRNA-144-3p mRNA 的相对表达量分别为 0.56 ± 0.20 和 1.04 ± 0.33,宫颈癌组织中 miR-144-3p mRNA 的表达量低于癌旁组织,差异有统计学意义(*t* = -8.38,*P* < 0.05)。

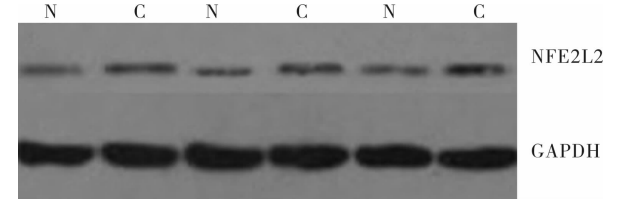
2.2 miR-144-3p mRNA 在宫颈癌组织中的表达与临床病理特征关系 结果见表 1。miR-144-3p mRNA 在宫颈癌组织中的表达和患者年龄无关(*P* >

0.05),与细胞分化程度、临床分期和淋巴结是否转移有关($P<0.05$)。

表 1 miR-144-3p mRNA 表达量与宫颈癌临床特征的关系
Tab.1 Relationship between the expression of miR-144-3p mRNA and clinical characteristic cervical cancer ($\bar{x}\pm s$)

临床特征	<i>n</i>	miR-144-3p 相对表达量	<i>F/t</i>	<i>P</i>
年龄				
<60 岁	9	0.53±0.21	0.11	0.75
≥60 岁	6	0.60±0.18		
细胞分化程度				
高分化	7	0.68±0.14	25.31	0.00
中等分化	6	0.54±0.12		
低分化	2	0.21±0.07		
临床分期				
<Ⅲ a	11	0.63±0.15	14.81	0.00
≥Ⅲ b	4	0.21±0.07		
淋巴结转移				
有	8	0.45±0.19	8.77	0.01
无	7	0.66±0.15		

2.3 NFE2L2 mRNA 及蛋白在宫颈癌和癌旁组织中的表达 NFE2L2 蛋白的表达见图 1。NFE2L2 mRNA 在宫颈癌组织和癌旁组织中的相对表达量分别为 4.41 ± 1.61 和 0.88 ± 0.10 ,NFE2L2 蛋白在宫颈癌组织和癌旁组织中的相对表达量分别为 0.29 ± 0.04 和 0.15 ± 0.03 ;NFE2L2 mRNA 及蛋白在宫颈癌组织中的相对表达量明显高于癌旁组织,差异均有统计学意义($t=216.31$ 、 -10.97 , $P<0.05$)。



N:癌旁组织;C:宫颈癌组织。
图 1 NFE2L2 蛋白在宫颈癌和癌旁组织中的表达 (Western blot)
Fig.1 Expression of NFE2L2 protein in cervical cancer tissue and paracancerical tissue(Western blot)

3 讨论

宫颈癌的发生和发展受多种因素的影响,目前认为其与早婚早孕、性生活紊乱、经济状况和环境因素等有关^[5]。近年来,随着分子生物学的发展,宫颈癌的研究进入到分子和基因水平。研究发现,基因调控着宫颈癌的发生和发展^[6-7],而这些基因的转录和翻译也受到多方面因素的调控。其中,miRNA 的调控是转录后调控的重要方法。

MiRNAs 能够特异性地与 mRNA 的 3'非编码区域结合,降解 mRNA,从而抑制靶基因的蛋白表达,属于转录后调控的重要组成部分。在肿瘤的发生和发展中,多种 miRNAs 发挥重要作用,其中有的 miRNA 发挥癌基因作用,能够促进肿瘤的生长、增殖和浸润,而有的 miRNA 发挥抗肿瘤作用,抑制肿瘤的生长和转移^[8]。

miR-144-3p 在多种生理和病理过程中均发挥重要的作用。miR-144-3p 在脂质代谢尤其是胆固醇的逆行转运中发挥重要作用^[9],在多种肿瘤的发展和转移中也发挥重要作用。有研究发现,miR-144-3p 在脑胶质细胞瘤瘤体组织和细胞系中的表达量均明显降低,且其表达和预后相关;miR-144-3p 的表达量越低,患者的中位生存率越短,多因素回归分析证实,miR-144-3p 的低表达水平是预后差的独立危险因素;通过生物信息学预测这可能是通过抑制卷曲蛋白 7 来实现的^[10]。miR-144-3p 在胰腺癌肿瘤组织和细胞系 PANC-1 中的表达均明显降低,而脯氨酸富含蛋白 11 (proline-rich protein 11, PRR11)的表达量明显升高;在细胞中的研究发现,用 miR-144-3p 类似物能够使细胞周期阻滞在 S 期而抑制细胞的增殖,并诱导细胞凋亡,而用其抑制剂能够逆转 miR-144-3p 的作用;荧光素酶活性检测发现,miR-144-3p 能够直接和 PRR11 的 3'非翻译区相结合,从而抑制其发挥作用^[11]。细胞实验证实,miR-144-3p 能够抑制激活蛋白-1 转录因子的亚基 FOSB 基因的表达,从而抑制胰腺癌细胞的增殖、浸润和转移^[12]。在肾癌细胞中的研究发现,miR-144-3p 的表达量均明显降低;miR-144-3p 能够抑制细胞的增殖和进展,而且能够抑制上皮-间质转化从而抑制细胞的浸润^[13]。而在肾透明细胞癌中的研究发现,miR-144-3p 的高表达能够促进肿瘤的增殖和浸润,手术后患者的 miR-144-3p 表达水平较术前明显降低^[14-15]。本研究发现,miR-144-3p 在宫颈癌组织中的表达量明显低于癌旁组织,而且与肿瘤的淋巴结转移有关。

NFE2L2 是调控细胞内氧化-还原机制的重要转录因子,由 NFE2L2 基因编码,在体内生理及病理过程中发挥重要的调节作用^[16]。NFE2L2 的突变会导致体内氧化-还原系统失衡,在多种肿瘤的发生和发展中起重要作用。在恶性黑色素瘤的研究中发现,NFE2L2 的表达增高和 Keleh 样环氧氯丙烷相关蛋

白-1 表达降低在转移癌患者中更多见,而且可能与上皮-间质转化有关^[17]。而在乳腺癌患者的研究中发现,NFE2L2 mRNA 低表达患者的预后较差^[18]。有研究发现,NFE2L2 在宫颈鳞状细胞癌组织的表达量明显高于宫颈上皮内瘤变和正常宫颈组织;体外实验发现,抑制 NFE2L2 的表达后,肿瘤细胞的增殖和浸润明显受到抑制^[19]。本研究结果证实,宫颈癌组织中 NFE2L2 的表达量明显高于癌旁组织。

本研究证实,宫颈癌组织中 miR-144-3p 的表达量明显降低,且和患者的转移及浸润程度有关,说明 miR-144-3p 可能作为判断宫颈癌恶性程度的指标;而 NFE2L2 在宫颈癌组织中的表达量明显升高,提示 miR-144-3p 的低表达降低了其对 NFE2L2 的抑制作用,进而促进肿瘤的发生,但是其具体的机制尚需要进一步通过分子生物学方式进行验证。

参考文献:

[1] CAO J,HAN X,QI X,*et al.* TUG1 promotes osteosarcoma tumorigenesis by upregulating EZH2 expression via miR-144-3p[J]. *Int J Oncol*,2017,51(4):1115-1123.

[2] LAN F,YU H,HU M,*et al.* miR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met[J]. *J Neurochem*,2015,135(2):274-286.

[3] 谢幸. 妇产科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2013:305.

[4] PECORELLI S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium[J]. *Int J Gynaecol Obstet*,2009,105(2):103-104.

[5] SIMONELLA L,HOWARD K,CANFELL K. A survey of population-based utility scores for cervical cancer prevention[J]. *BMC Res Notes*,2014,7:899.

[6] OJESINA A I,LICHTENSTEIN L,FREEMAN S S,*et al.* Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas[J]. *Nature*,2014,506(7488):371-375.

[7] HU Y Y,SUN X W,MAO C C,*et al.* Upregulation of long noncoding RNA TUG1 promotes cervical cancer cell proliferation and migration[J]. *Cancer Medicine*,2017,6(2):471-482.

[8] BOURDON J A,SABER A T,HALAPPANAVAR S,*et al.* Carbon black nanoparticle intratracheal installation results in large and sustained changes in the expression of miR-135b in mouse lung[J]. *Environ Mol Mutagen*,2012,53(6):462-468.

[9] HU Y W,HU Y R,ZHAO J Y,*et al.* An agomir of miR-144-3p ac-

celerates plaque formation through impairing reverse cholesterol transport and promoting pro-inflammatory cytokine production[J]. *PLoS One*,2014,9(4):e94997.

[10] CHENG Z X,SONG Y X,WANG Z Y,*et al.* miR-144-3p serves as a tumor suppressor by targeting FZD7 and predicts the prognosis of human glioblastoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2017,21(18):4079-4086.

[11] LI J,SUN P,YUE Z,*et al.* miR-144-3p induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells by targeting proline-rich protein 11 expression via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *DNA Cell Biol*,2017,36(8):619-626.

[12] LIU S,LUAN J,DING Y. MiR-144-3p targets FosB protooncogene,AP-1 transcription factor subunit (FOSB) to suppress proliferation,migration, and invasion of PANC-1 pancreatic cancer cells[J]. *Oncol Res*,2017,26(5):683-690.

[13] LIU F,CHEN N,XIAO R,*et al.* miR-144-3p serves as a tumor suppressor for renal cell carcinoma and inhibits its invasion and metastasis by targeting MAP3K8[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2016,480(1):87-93.

[14] XIAO W,LOU N,RUAN H,*et al.* Mir-144-3p promotes cell proliferation,metastasis, sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma by downregulating ARID1A[J]. *Cell Physiol Biochem*,2017,43(6):2420-2433.

[15] LOU N,RUAN A M,QIU B,*et al.* miR-144-3p as a novel plasma diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma[J]. *Urol Oncol*,2017,35(1):36,e7-36,e14.

[16] ZOLOTUKHIN P V,DOVZHIK A D,LEBEDEVA U A,*et al.* Testing the concept of the interatomic status of the NFE2L2/AP1 pathway as a systemic biomarker for examination stress[J]. *Mol Diagn Ther*,2014,18(3):355-369.

[17] HINTSALA H R,HAAPASAARI K M,SOINI Y,*et al.* An immunohistochemical study of NFE2L2,KEAP1 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and the EMT markers SNAI2,ZEB1 and TWIST1 in metastatic melanoma[J]. *Histol Histopathol*,2017,32(2):129-136.

[18] WOLF B,GOEBEL G,HACKL H,*et al.* Reduced mRNA expression levels of NFE2L2 are associated with poor outcome in breast cancer patients[J]. *BMC Cancer*,2016,16(1):821.

[19] 焦淑娟,郑士奇,王世雯,等. Nr2 蛋白在维吾尔族妇女宫颈鳞癌中的表达及意义[J]. *新疆医科大学学报*,2016,39(4):411-417.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)