

hsa-mir-96 在膀胱尿路上皮癌中的表达及临床意义

汪 翼¹, 罗红梅², 杨罗艳³

(1. 南华大学附属第二医院泌尿外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学组胚教研室;
3. 中南大学湘雅二医院泌尿外科)

摘要: **目的** 探讨 hsa-mir-96 在膀胱尿路上皮癌的表达及其与膀胱尿路上皮癌病理分级及临床分期的关系。**方法** 采用 Real-time PCR 方法检测 33 例膀胱尿路上皮细胞癌及 9 例癌旁正常膀胱组织中 hsa-mir-96 的表达情况, 并分析其与膀胱尿路上皮细胞癌病理分级及临床分期的关系。**结果** hsa-mir-96 在膀胱尿路上皮细胞癌中的表达明显高于癌旁正常膀胱组织 ($P < 0.01$)。其表达与膀胱尿路上皮细胞癌的病理分级、临床分期密切相关, 随病理分级、临床分期的增高其表达也升高, 但与性别无关。**结论** hsa-mir-96 可能参与了膀胱尿路上皮细胞癌的发生、发展过程。

关键词: hsa-mir-96; 微小 RNA; 膀胱尿路上皮癌; 癌旁正常膀胱组织

中图分类号: R737.1 **文献标识码:** A

Expression of hsa-mir-96 in Human Bladder Urothelium Carcinoma and Its Clinical Significance

WANG Yi, LUO Hongmei, YANG Luoyan

(Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of hsa-mir-96 in human bladder urothelium carcinoma with tumor grade. **Methods** To evaluate the expression of hsa-miR-96 in bladder urothelial carcinoma, Real-time PCR was performed in 33 cases of bladder urothelial carcinomas and 9 cases of adjacent normal bladder tissues. The comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$) method was used to determine the fold-difference in the expression of hsa-miR-96 in different bladder urothelial carcinoma tissues relative to the adjacent normal bladder tissues. **Results** The expression of hsa-miR-96 was higher in bladder urothelial carcinoma than in adjacent normal bladder tissues ($P < 0.01$). Moreover, analysis of hsa-miR-96 expression in tumors of different clinical stages and pathological classification demonstrated that the expression of hsa-miR-96 was higher in T2-T4 stages than Ta-T1 stages, and the expression hsa-miR-96 was higher in pathological grade II-III than grade I ($P < 0.01$). However, there was no significant difference between gender ($P > 0.05$). **Conclusions** These results showed that hsa-miR-96 might be involved in the process of occurrence, development, and infiltration of bladder urothelium carcinomas.

Key words: hsa-miR-96; microRNA; bladder urothelium carcinomas; adjacent normal bladder tissues

近年来, miRNA 与肿瘤的关系备受关注, 研究发现 miRNA 可调节肿瘤细胞增殖和凋亡, 并参与细胞自我更新和分化过程, 有些 miRNA 分子还可作为

原癌基因或抑癌基因调控肿瘤的发生与发展。本研究采用 Real-time PCR 检测了 hsa-miR-96 在膀胱尿路上皮癌及癌旁正常组织中的表达情况, 以探讨 hsa-miR-96 对膀胱尿路上皮癌的发生、发展过程的影响。

收稿日期: 2011-08-30

基金资助: 湖南省教育委员会基金 (10C1164)。

通讯作者: 罗红梅, 联系电话: 0734-8281388, E-mail: hongmeiluo1225

@yahoo.com.cn.

1 材料与方法

1.1 取材

收集中南大学湘雅二医院 2009 年 4 月~2010 年 9 月泌尿外科手术所得膀胱尿路上皮细胞癌,并经湘雅二医院病理科确诊的新鲜标本 33 例,其中男性 20 例,女性 13 例;年龄 25~77 岁,平均年龄 59.6 岁;TNM 临床分期诊断标准:Ta~T1 期 12 例,T2~T3 期 21 例;WHO 病理分级,I 级 11 例,II~III 级 21 例。对照组癌旁正常膀胱黏膜组织 9 例于术中同时留取。新鲜组织收集后立即放入液氮灌中保存,实验前取出,于冰上操作,用完后立即重新置入液氮灌中,防止组织中 RNA 降解。

1.2 试剂

miRNeasy Mini Kit(#217004)购于 Qiagen 公司,miRNA Q-PCR Detection Kit(#R0101L)购于 Gene-Copoeia 公司。

1.3 基因资料及引物

Sanger microRNA 序列数据库(miRBase)检测基因 hsa-mir-96 获得资料如下:Accession MIMAT0000095;Sequence 9-UUU GGC ACU AGC ACA UUU UUG CU-31(<http://www.mirbase.org/>)。

Invitrogene 公司设计提供的引物资料如下:hsa-mir-96 引物:正向特异性引物 5'-TTT GGC ACT AGC ACA TT-3',反向特异性引物 5-TTT GGC ACT AGC ACA TT-3'。U6 内参基因引物:正向特异性引物 5-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3,反向特异性引物 5-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3。

1.4 PCR

采用 Real-time PCR 法,检测 hsa-mir-96 在膀胱尿路上皮细胞癌组织表达情况。新鲜组织 25~100 mg 冰上匀浆,加入氯仿 140 μ L,振摇后离心,转移上清加 500 μ L 无水乙醇,上下颠倒混匀数次,以 Spin column 管收集上述样本(包括絮状沉淀)总体积约 700 μ L,放置于 2 mL 收集管,离心后弃去穿流液,重复此步骤 1 次,取 700 μ L Buffer RWT 至 Spin column 离心后弃去穿流液,取 500 μ L Buffer RPE 至 Spin column,离心后弃去穿流液,取 500 μ L Buffer RPE 至 Spin column,离心 2 min 以干燥内膜,转移 Spin column 至 1.5 mL 收集管,加入 50 μ L RNase-free water 至内膜上,离心 1 min 以溶解 RNA。

基因组 DNA 的去除:

Total RNA $\rightarrow$ 10 $\times$ reaction buffer $\rightarrow$ RiboLockTM

Ribonuclease Inhibitor $\rightarrow$ DEPC-treated Water $\rightarrow$ DNase I,孵育 30 min 后加入 1 μ L 25 mmol 的 EDTA,65 $^{\circ}$ C 10 min 使酶失活。

MiRNA-PolyA 标记与 RT 反应及 miRNA-定量 PCR 检测(按试剂盒进行操作)。

1.5 统计学处理

使用 SPSS16.0 统计软件包处理数据。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析,LSD 检验,比较 miR-96 在不同临床分期和病理分级膀胱尿路上皮细胞癌中表达的差异, $P < 0.05$ 视为有统计学差异。性别间比较以及癌组织和正常组织比较,均采用独立样本 Student's test 检验、 $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

2 结 果

Real Time PCR 法检测结果显示,膀胱尿路上皮细胞癌中 hsa-mir-96 的表达明显比正常膀胱黏膜表达高($P < 0.01$,表 1),且表达量与肿瘤的临床分期及病理分级关系密切,随着临床分期和病理分级的增高而增高($P < 0.01$,表 1)。另外 hsa-mir-96 在膀胱尿路上皮癌中的表达与性别无关($P > 0.05$)(表 2)。

表 1 hsa-mir-96 在膀胱尿路上皮细胞癌组织及癌旁正常膀胱组织中表达的比较(RQ 值为目的基因 mRNA 相对含量)
Table 1 Expression of hsa-mir-96 in different groups of bladder urothelial carcinomas and adjacent normal bladder tissues (RQ: relative amount of mRNA of target genes)

组 别	<i>n</i>	hsa-mir-96 (RQ)
癌组织	33	5.59 $\pm$ 2.534
病理分级 I	11	3.14 $\pm$ 0.376
病理分级 II~III	22	6.82 $\pm$ 2.225 ^b
临床分期 Ta~T1	12	3.20 $\pm$ 0.448
临床分期 T2~T4	21	6.95 $\pm$ 2.186 ^c
癌旁正常膀胱组织	9	1.52 $\pm$ 0.612 ^a

a:与癌组织组比较, $P < 0.01$;b:与癌组织病理分级 I 比较, $P < 0.01$;c:与癌组织临床分期 Ta~T1 比较, $P < 0.01$ 。相对定量以含量最低的样本为标准,其余各样本的含量均为相对该样本的倍数,具体方法参见参考文献[1]

3 讨 论

肿瘤是一类典型的“多基因病”,其基本特征是基因表达调控异常和细胞恶性增生,其发生、发展是由于参与调控细胞分化、增殖及凋亡的基因发生

表2 hsa-mir-96在不同性别膀胱尿路上皮细胞癌组织中表达的比较(RQ值为目的基因mRNA相对含量)

Table 2 Expression of hsa-mir-96 in different gender groups of bladder urothelial carcinomas (RQ: relative amount of mRNA of target genes)

性别	n	hsa-mir-96 (RQ)
男	20	5.19 ± 2.663
女	13	6.17 ± 2.473

组间比较, $P > 0.05$

突变后引起细胞增殖调控失衡的结果。microRNA (简称 miRNA) 又称微小 RNA, 是真核生物细胞中固有的一类不编码蛋白的小分子, 长度为 18 ~ 25 nt, 通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译, 从而实现对基因进行转录后表达的调控。miRNA 可调节肿瘤细胞增殖和凋亡, 参与细胞自我更新和分化, 可作为生物标记物, 应用于肿瘤诊断、预后评估和靶向治疗, 有些 miRNA 分子还可作为原癌基因或抑癌基因调控肿瘤^[2-3]。例如, 对胃癌的研究中发现, miR-34、miR-27a、miR-21 为高表达。miR-34 可以抑制 p53 突变的人胃癌细胞生长; miR-21 参与了胃癌细胞的增殖和侵袭过程; 抑制 miR-27a 的表达水平后, 胃癌细胞的增殖明显降低, 研究结果提示了 miRNAs 与胃癌的发生、发展密切相关^[4-6]。

hsa-miR-96 的基因序列为 5'-AAU CAU GUG CAG UGC CAA UAU G-3', 长度为 21nt, 位于人类 7 号染色体上^[7]。通过生物信息学分析发现, 在 hsa-mir-96 的前体序列中, 物种间存在多个位点核苷酸的多态性, 且位于前体的茎环结构区, 但成熟体的序列却十分保守 (>99% 序列相同), 因此猜测 miR-96 可能是进化过程中保留下来的具有肿瘤抑制功能的重要分子。

Lin 等^[8]在 miR-96 与人类乳腺癌的研究中发现, miR-96 在乳腺癌细胞及乳腺癌组织中的表达, 明显高于正常的乳腺上皮细胞及乳腺组织, 高表达的 miR-96 能诱导乳腺癌细胞的分化, 促进细胞增殖。其作用机理是通过下调细胞周期蛋白依赖激酶 (CDK) 的抑制剂 p27Kip1 和 p21Cip1 及上调 cyclin D1 来促进癌细胞由 G1 期进入 S 期, 从而达到促进乳腺癌细胞增殖的作用。

Yu 等^[9]在 hsa-mir-96 与胰腺癌的关系研究中, 发现 miR-96 在胰腺癌组织的表达水平明显低于正

常胰腺组织。在胰腺癌细胞系 (MIA PaCa-2、PANC-1 和 BxPC-3) 中, miR-96 的表达也明显下调。在体外实验中, 他们用质粒作为载体, 在 MIA PaCa-2 细胞中高表达 miR-96, 结果发现靶基因 K-RAS 的 mRNA 水平不变、而蛋白水平下降。肿瘤细胞的增殖、克隆形成能力、迁移和侵袭能力等生物学行为受到了明显的抑制, 同时肿瘤细胞凋亡增强; 进一步检测了 RAS 下游通路中的两个重要分子 ERK 和 AKT 及其活化形式 phospho-ERK 和 phospho-AKT 的表达也有显著下降, 研究结果表明, miR-96 可能通过抑制 K-RAS 的翻译来调控肿瘤细胞的恶性生物学行为, 促进细胞凋亡而发挥抑癌基因作用。Raf 是 ser/Thr 蛋白激酶, 它的分子中有 3 个高度保守区: CR1、CR2 和 CR3, N 端的 CR1 和 CR2 是该酶的调节区, 调节区内含有 Ras 蛋白结合域。体内许多受体通过酪氨酸的磷酸化反应激活 RAS, 活化的 RAS 进一步激活 Raf, 进而激活 Raf → MEK1 → MAPK/ERK 通路。在探索膀胱尿路上皮细胞癌的诊断标记物的研究中, Yamada 等^[10]发现, 在 100 例膀胱尿路上皮细胞癌患者的尿液样本中, miR-96 和 miR-183 的表达明显高于健康者, 而在术后患者的尿液中, miR-96 和 miR-183 的表达水平显著减少。因此, 推测 miR-96 及 miR-183 在尿液中的表达可以作为膀胱上皮细胞癌的肿瘤标记物。而且, 联合尿脱落细胞学检查, miR-96 可以作为膀胱肿瘤的诊断标记物。

本研究中采用 Real-time PCR 检测 hsa-mir-96 在膀胱癌尿路上皮细胞癌表达情况, 结果发现 hsa-mir-96 在膀胱癌尿路上皮细胞癌的表达较正常膀胱黏膜明显升高 ($P < 0.01$)。同时, hsa-mir-96 在浅表性肿瘤中的表达低于肌层浸润性肿瘤, 且其表达与膀胱尿路上皮癌的病理分级、临床分期密切相关, 并随着临床分期和病理分级的增高而增高 ($P < 0.01$)。以上结果说明 hsa-mir-96 可能参与了膀胱尿路上皮细胞癌的发生、发展及浸润过程, 但 hsa-mir-96 在膀胱肿瘤中的作用机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Livar KJ. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[2] Waldman SA, Terzic A. MicroRNA signatures as diagnostic and therapeutic targets[J]. Clin Chem, 2008, 54(6): 943-944.

[3] Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs[J]. Cancer

- J,2008. 14(I):1-6.
- [4] Chan SH, Wu CW, Li AF, et al. miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association[J]. Anticancer Res,2008,28(2A):907-911.
- [5] Liu T, Tang H, Lang Y, et al. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin[J]. Cancer Lett,2009,273(2):233-242.
- [6] Ji Q, Hao X, Meng Y, et al. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres[J]. BMC Cancer,2008,8:266.
- [7] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. Genes Dev,2002,16(6):720-728.
- [8] Lin HX, Dai T, Xiong HP, et al. Unregulated mir-96 induces cell proliferation in human breast cancer by down-regulating transcriptional factor FOXO3a[J]. PLoS ONE, 2010,5 (12):e15797.
- [9] Yu SN, Lu ZH, Liu CZ, et al. miRNA-96 Suppresses KARS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer[J]. Cancer Res,2010,70(14):6015-6025.
- [10] Yamada Y, Enokida H, Kojima S. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology[J]. Cancer Science,2011,102(3):522-529.