

miR-185 与 PKM2 在胃癌中的表达及临床意义

石宇雄, 郭智维, 缪莉, 谭志琴

(解放军第一六九医院 湖南师范大学附属湘南医院感染控制科, 湖南 衡阳 421002)

摘要: **目的** 研究 miR-185 与 PKM2 在胃癌组织中的表达及其临床意义。 **方法** 采用原位杂交和免疫组化技术检测胃癌组织与癌旁正常胃粘膜组织中 miR-185 与 PKM2 的表达情况, 分析 miR-185 与 PKM2 之间的相关性以及与胃癌患者临床病理参数的关系。 **结果** 原位杂交检测显示, 在 126 例胃癌组织中 miR-185 阳性表达率为 38.10%, 与正常对照组 56.38% 比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.36, P = 0.000$)。免疫组化结果显示, 在 126 例胃癌组织中 PKM2 阳性表达率为 63.49%, 与正常对照组 43.59% 比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.74, P = 0.006$)。相关性分析显示, 在胃癌组织中 miR-185 的表达与 PKM2 的表达呈负相关 ($r = 0.09, P = 0.006$); III ~ IV 期胃癌患者 miR-185 的高表达率明显低于 I ~ II 期胃癌患者 ($P = 0.001$), 且有淋巴结转移者 miR-185 的高表达率也明显低于无淋巴结转移者 ($P = 0.003$); 而 PKM2 在 III ~ IV 期胃癌患者的高表达率明显高于 I ~ II 期胃癌患者 ($P = 0.002$), 且在淋巴结转移者 PKM2 的高表达率也明显高于无淋巴结转移者 ($P = 0.006$), 但是 miR-185 与 PKM2 在胃癌患者中的表达与患者的年龄、性别、组织分化程度以及 T 分期无明显相关性。 **结论** miR-185 在胃癌组织中低表达, PKM2 在胃癌组织中高表达可能是肿瘤细胞发生浸润转移的重要生物学标志。

关键词: 胃癌; miR-185; PKM2; 临床意义

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

Expression of miR-185 and PKM2 in Gastric Cancer and its Clinical Significance

SHI Yuxiong, GUO Zhiwei, MIU Li, et al

(Department of Disease Control and Prevention, the 169th Hospital of PLA)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of miR-185 and PKM2 in gastric cancer and its clinical significance. **Methods** In situ hybridization and immunohistochemistry were used to detect the expression of miR-185 and PKM2 in gastric cancer and normal stomach tumour specimens, respectively. The correlations among the miR-185, PKM2, and clinicopathological parameters of gastric cancer patients were analyzed. **Results** In situ hybridization showed that the positive rate of miR-185 was 38.10% in gastric cancer, and 56.38% in normal stomach tumour specimens, the difference was statistically significant ($\chi^2 = 14.36, P = 0.000$). Immunohistochemistry showed that the positive rate of PKM2 was 63.49% in gastric cancer, and 43.59% in normal stomach tumour specimens, the difference was statistically significant ($\chi^2 = 7.74, P = 0.006$). The correlation analysis indicated that the expression of miR-185 had a negative correlation with that of PKM2 in gastric cancer ($P < 0.01$). The positive rate of miR-185 in III ~ IV stage gastric cancer was strongly lower than in I ~ II stage ($P = 0.001$), the expression of miR-185 was also lower with lymph node metastasis than without lymph node metastasis in gastric carcinoma ($P = 0.003$). The positive rate of PKM2 in III ~ IV stage gastric cancer was strongly higher than in I ~ II stage ($P = 0.002$), the expression of PKM2 was also higher with lymph node metastasis than without lymph node metastasis in gastric carcinoma ($P = 0.006$). However, there were no significant difference between different age, gender, histological grade as well as T stage group ($P > 0.05$). **Conclusion** The low expression of miR-185 and the high expression of the PKM2 protein may be important biological markers for malignant transformation in gastric cancer.

Key words: gastric cancer; miR-185; PKM2; clinical significance

miRNAs 是一类在真核生物中广泛表达的非编码小 RNA 分子,与靶 mRNA 以碱基互补配对规律结合,使 mRNA 降解或翻译抑制,在转录后调控基因的表达,从而参与调控生物体一系列生理病理过程^[1]。研究表明,miRNAs 调控重要的细胞过程,包括增殖、凋亡、分化以及新陈代谢等,并且参与人类多数疾病的发生发展,包括肿瘤^[2]。研究显示 miR-185 在多种不同类型肿瘤组织或细胞中表达下调,且对肿瘤细胞具有抑制作用^[3-4]。PKM2 是糖酵解过程中的关键限速酶,其功能是催化其底物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)产生丙酮酸。研究显示,PKM2 在多种恶性肿瘤中高表达,如胃癌、乳腺癌以及肝癌等,并且能促进有氧糖酵解与肿瘤的发生^[5-7]。本研究前期通过在线预测软件发现 PKM2 是 miR-185 的预测靶基因,目前对于 miR-185 与 PKM2 在胃癌的表达及作用尚未完全阐明,本文旨在探讨两者在胃癌中的表达及临床意义。

1 材料与方法

1.1 组织样本 126 例胃癌组织芯片包括 78 例正常组织标本,病例年龄 31~78 岁,平均年龄 54±13 岁。病理学分类按照 WHO 胃癌组织学分类和分级标准^[8]。病理诊断结果经两名以上病理学专家确诊。

1.2 主要试剂 原位杂交检测试剂盒与 Elivision™ Plus 二步法免疫组化试剂盒均购自武汉博士德公司,DAB 显色剂购自福州新迈公司,地高辛标记的 miR-185 探针序列购自美国 Exiqon 公司,has-miR-185:5'-agtgtgagtctaccattgccaaa-3'PKM2 单克隆抗体购自 CST 公司,PKM2 克隆号(AT4M3)。

1.3 方法

1.3.1 原位杂交检测胃癌组织与正常胃组织中 miR-185 表达 组织芯片脱蜡至水;3%胃蛋白酶消化 15~20 min,水洗后 4%甲醛固定;按 miRNA 探针说明,探针用无酶水稀释,稀释终比例为 1:600,先用预杂交液于 55℃ 预杂交 2 h 后再用地高辛标记的 miR-185 探针于 55℃ 进行杂交过夜;次日用不同浓度 SSC 缓冲液依次洗涤;室温封闭 30 min;生物素化鼠抗地高辛室温孵育 2 h;镜下进行 DAB 显色并控制显色时间;苏木素复染细胞核,充分水洗,中性树胶封片保存。

1.3.2 免疫组化检测胃癌组织与正常胃组织中

PKM2 表达 采用 Elivision™ Plus 二步法。组织芯片脱蜡至水;按需要对切片进行高压修,冷却后 PBS 液洗涤;加一抗,室温下孵育 4℃ 过夜,PBS 洗涤;加生物素标记的二抗,室温下孵育 10 min,PBS 洗涤;加链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶溶液,室温下孵育 10 min,PBS 洗涤;镜下进行 DAB 显色并控制显色时间,苏木素复染细胞核,充分水洗,中性树胶封片保存。

1.3.3 免疫组化和原位杂交结果分析 miR-185 与 PKM2 呈棕黄色颗粒的阳性信号定位于胃粘膜上皮细胞与胃癌细胞的胞质与胞核中。结合阳性信号的染色强度和分布范围进行半定量,按下述标准进行判断^[8]:在高倍光镜下观察 5 个具有代表性的视野对阳性染色细胞进行统计:①+/-,阳性染色细胞数低于 10%;②+~+++,阳性染色细胞数在 10%~50%之间;③++++,阳性染色细胞数高于 50%。显微摄像后运用病理图像分析系统对光密度值进行检测,结果进行统计分析。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计数资料采用例(%)表示,采用 χ^2 检验,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,相关性分析用 Spearman 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-185 与 PKM2 在胃癌组织中的表达情况

原位杂交结果显示(图 1),miR-185 在 126 例胃癌组织中阳性表达 48 例,阳性率为 38.10%,在 78 例正常胃黏膜组织中阳性表达 51 例,阳性率为 65.38%,两者相比,差异具有统计学意义($\chi^2=14.36,P=0.000$);免疫组化结果显示(图 1),PKM2 在 126 例胃癌组织中阳性表达 80 例,阳性率为 63.49%,在 78 例正常胃黏膜组织中阳性表达 34 例,阳性率为 43.59%,两者比较,差异具有统计学意义($\chi^2=7.74,P=0.006$)。

2.2 miR-185 与 PKM2 在胃癌中的表达与临床病理参数的关系 统计分析显示(表 1),miR-185 与 PKM2 表达与胃癌患者性别、年龄、组织分化程度以及 T 分期无显著相关性($P>0.05$),但是 miR-185 在 I~II 期胃癌患者中的表达高于 III~IV 胃癌患者($P=0.001$),即 miR-185 在胃癌患者中的表达随着临床分期的增高而降低度。PKM2 在 I~II 期胃癌患者中的表达低于 III~IV 胃癌患者($P=0.002$),即 PKM2 在胃癌患者中的表达随着临床

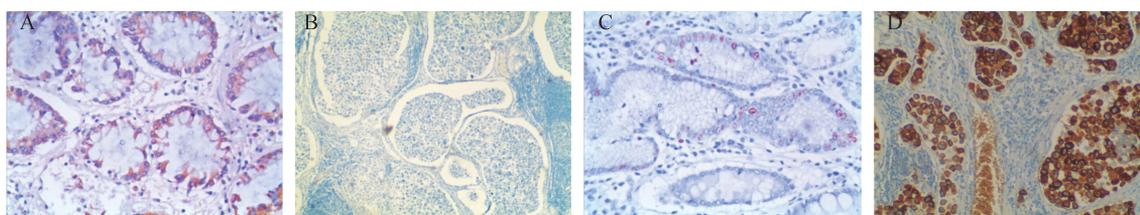


图 1 原位杂交检测 miR-185 和 PKM2 在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达(400×) A: miR-185 癌旁正常组织中的表达; B: miR-185 在胃癌组织中的表达; C: PKM2 在癌旁正常组织中的表达; D: PKM2 在胃癌组织中的表达

分期的增高而增高。miR-185 在有淋巴结转移的胃癌患者中表达也明显低于无淋巴结转移者 ($P = 0.003$), 而 PKM2 在有淋巴结转移的胃癌患者中的表达却明显高于无淋巴结转移者 ($P = 0.006$)。结果均表明 miR-185 与 PKM2 在胃癌中的表达改变与患者肿瘤恶性程度相关。

表 1 miR-185 与 PKM2 表达水平与胃癌患者临床病理参数之间的关系

临床病理参数	例数	miR-185 表达			PKM2 表达		
		低	高	P	低	高	P
年龄(岁)							
<60	73	44	29	0.4	24	49	0.32
≥60	53	34	19		22	31	
性别							
男	70	46	27	0.453	26	44	0.87
女	56	32	21		20	36	
组织分化程度							
高中分化	32	24	8	0.058	10	22	0.48
低分化与其他类型	94	54	40		36	58	
T 分期							
T1~T2	71	40	31	0.1	21	50	0.07
T3~T4	55	38	17		25	30	
临床分期							
I~II	51	23	28	0.001	27	24	0.002
III~IV	75	55	20		19	56	
淋巴结转移							
有	88	62	26	0.003	39	49	0.006
无	38	16	22		7	31	

2.3 miR-185 与 PKM2 在胃癌组织中的相关性分析
经 Spearman 等级相关分析发现,在胃癌组织中 miR-185 与 PKM2 的表达呈负相关($r = 0.09, P = 0.006$)。

3 讨 论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,也是全球癌症死亡的第二大原因,调查显示,将近一半的胃癌发生在中国人,总体 5 年生存率大约为 20%^[9],其中

大部分患者在确诊时已为晚期阶段,因而失去了根治手术的机会。由于缺乏早期有效的诊断指标以及治疗策略的局限性,导致了疾病的不良预后。因此,预测肿瘤侵袭与转移的高效、新型生物标志物的鉴定对改善患者的结局具有重要意义。

大量的研究证实 miRNAs 在肿瘤中异常表达并类似癌基因或抑癌基因样作用^[10-11]。目前越来越多的研究发现,miRNA 在肿瘤中的表达还与肿瘤的临床复发、转移以及患者生存密切相关。由于 miRNAs 在肿瘤患者的组织与血清中特异性表达模式和调控潜能,其可作为恶性肿瘤诊断与预后的潜在生物标志物。miR-185 位于 22q11.21 染色体。研究发现 miR-185 在多种恶性肿瘤中低表达并且通过靶向调控不同的基因发挥抑癌基因样作用,包括有结肠癌、肝癌、上皮性卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌^[12-16]。miR-185 在结肠癌中下调 RhoA 与 Cdc42 表达抑制肿瘤细胞的增殖^[12]。miR-185 在乳腺癌中下调 cMet 表达,抑制肿瘤细胞的增殖^[15]。miR-185 在前列腺癌中靶向雄激素受体抑制肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭^[16]。Akçakaya 等^[17]研究显示,miR-185 在结肠癌中的表达与患者的转移和不良预后相关。miR-185 在三阴乳腺癌中低表达与患者的淋巴结转移、临床分期、总生存期以及无病生存期相关^[18]。miR-185 在肝癌中低表达与患者的高复发和低生存率相关^[13]。本次研究发现,miR-185 在胃癌组织中低表达,并且 miR-185 低表达与胃癌患者的临床分期和淋巴结转移相关。miR-185 的表达随着临床分期演进而下调。

PKM2 最初在胚胎组织中表达,而近年来发现 PKM2 在快速增殖的细胞中也高表达,特别是肿瘤组织,对 Warburg 效应及肿瘤发生发展发挥重要的调控作用^[19]。大量的研究发现 PKM2 在多种恶性肿瘤中高表达并且与患者的预后和转移相关。如 PKM2 在肝癌中高表达与患者的不良预后相关^[20]。PKM2 在乳腺癌中高表达与肿瘤的组织学分级和淋巴结转移

相关,并且 PKM2 表达越高,患者的总生存期和无病生存期越短^[21]。PKM2 在口腔鳞癌中高表达与肿瘤的大小、颈淋巴结转移、临床分期以及生存相关,PKM2 表达越高的患者其总生存期和无病生存期越短,并且可作为患者生存的独立预后因子^[22]。本次研究发现,PKM2 在胃癌组织中高表达,并且 PKM2 高表达与胃癌患者的临床分期和淋巴结转移相关。PKM2 的表达随着临床分期演进而增加。相关性分析显示 miR-185 与 PKM2 在胃癌中的表达呈负相关。由此推测,在胃癌组织中 miR-185 低表达与 PKM2 高表达可能是胃癌发生浸润转移的重要生物学标志。本课题组下期拟在此的基础上进一步将样本扩大胃癌患者的血清中检测,以确定两者在胃癌患者的血清中是否具有同样的表达模式,为临床开发新的胃癌检测标志物提供实验依据。

参考文献:

- [1] Esquela-Kerscher A. The lin-4 microRNA: The ultimate micromanager [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(7): 1060-1061.
- [2] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Med*, 2009, 60: 167-179.
- [3] Tang H, Wang Z, Liu X, et al. LRRc4 inhibits glioma cells growth and invasion by miR-185 mediating pathway [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2012, 12(8): 1032-1042.
- [4] Zhang Z, Tang H, Wang Z, et al. MiR-185 Targets the DNA Methyltransferases 1 and Regulates Global DNA Methylation in Human Glioma [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10(1): 124.
- [5] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 230-233.
- [6] Sun Q, Chen X, Ma J, et al. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(10): 4129-4134.
- [7] Yang W, Xia Y, Hawke D, et al. PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis [J]. *Cell*, 2012, 150(4): 685-696.
- [8] Tang H, Deng M, Tang Y, et al. miR-200b and miR-200c as Prognostic Factors and Mediators of Gastric Cancer Cell Progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 5602-5612.
- [9] Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2009, 374(9688): 477-490.
- [10] Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 586-591.
- [11] Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNA in cancer prognosis [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(25): 2720-2722.
- [12] Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. Metastamir: the field of metastasis regulatory microRNA is spreading [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7495-7498.
- [13] Liu M, Lang N, Chen X, et al. miR-185 targets RhoA and Cdc42 expression and inhibits the proliferation potential of human colorectal cells [J]. *Cancer Lett*, 2011, 301(2): 151-160.
- [14] Zhi Q, Zhu J, Guo X, et al. Metastasis-related miR-185 is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma in early stage [J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, 67(5): 393-398.
- [15] Xiang Y, Ma N, Wang D, et al. MiR-152 and miR-185 co-contribute to ovarian cancer cells cisplatin sensitivity by targeting DNMT1 directly: a novel epigenetic therapy independent of decitabine [J]. *Oncogene*, 2014, 33(3): 378-386.
- [16] Imam JS, Buddavarapu K, Lee-Chang JS, et al. MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers [J]. *Oncogene*, 2010, 29(35): 4971-4979.
- [17] Qu F, Cui X, Hong Y, et al. MicroRNA-185 suppresses proliferation, invasion, migration, and tumorigenicity of human prostate cancer cells through targeting androgen receptor [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 377(1-2): 121-130.
- [18] Akçakaya P, Ekelund S, Kolosenko I. miR-185 and miR-133b deregulation is associated with overall survival and metastasis in colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(2): 311-318.
- [19] Tang H, Liu P, Yang L, et al. miR-185 suppresses tumor proliferation by directly targeting E2F6 and DNMT1 and indirectly upregulating BRCA1 in triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(12): 3185-3197.
- [20] Chaneton B, Gottlieb E. Rocking cell metabolism: revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer [J]. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37(8): 309-316.
- [21] Liu AM, Xu Z, Shek FH, et al. miR-122 targets pyruvate kinase M2 and affects metabolism of hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86872.
- [22] Lluo W, Semenza GL. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2012, 23(11): 560-566.

(本文编辑: 蒋湘莲)