

前列腺癌中微小 RNA-362-3p 的表达及意义

王刚^{1*}, 姚丽霞², 杨涛¹, 彭克楠³, 郭留雄¹, 魏东¹, 谷守义¹, 刘俊江¹

(河北省人民医院 1. 泌尿外科, 2. 老年病二科, 3. 检验科, 河北石家庄 050051)

摘要: 为探索前列腺癌中微小 RNA-362-3p(miR-362-3p)与转移的关系,以前列腺癌组织作为观察组,前列腺增生组织作为对照组,每组 67 例。采用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-362-3p 的表达,免疫组化法检测上皮型粘附素(E-cadherin)和基质金属蛋白酶-11(MMP-11)的表达,Western Blot 法检测基质金属蛋白酶-14(MMP-14)的表达。结果显示:miR-362-3p 在前列腺癌组织中低表达。miR-362-3p 在前列腺癌患者的脉管癌栓、Gleason 分级、转移和不同 TNM 分期的表达存在显著差别。miR-362-3p 与前列腺癌患者的生存时间显著相关,miR-362-3p 分别与 MMP-11、MMP-14 具有显著负相关性,但与 E-cadherin 具有显著正相关性。结果表明,miR-362-3p 可能通过调节细胞粘附和细胞外基质参与前列腺癌转移,可能作为患者的预后标志物。

关键词: 前列腺癌; miR-362-3p; 粘附素; 细胞外基质; 预后

中图分类号:R73 文献标识码:A

Expression and significance of microRNA-362-3p in prostate adenocarcinoma

WANG Gang, YAO Lixia, YANG Tao, PENG Kenang, GUO Liuxiong, WEI Dong,

GU Shouyi, LIU Junjiang

(1. Department of Urology, 2. Department of Geriatrics, 3. Clinical Laboratory, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China)

Abstract: To explore the relationship between microRNA-362-3p (miR-362-3p) and metastasis in prostatic adenocarcinoma, prostatic adenocarcinoma were selected as observation group, and benign prostatic hyperplasia as control group ($n=67$). MiR-362-3p was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR). Expressions of E-cadherin and MMP-11 were detected by immunohistochemistry method, MMP-14 was detected by Western Blotting. Result showed lower expression of miR-362-3p in the prostate adenocarcinoma, expression of miR-362-3p was significantly different in vascular tumor thrombus, gleason classification, metastasis and TNM stages. MiR-362-3p was correlated with survival time. Negative correlation was found between miR-362-3p and MMP-11 or MMP-14. Positive correlation was found between miR-362-3p and E-cadherin. The results suggested miR-362-3p may be involved in progression of prostate adenocarcinoma by regulating cell adhesion and extracellular matrix, and may be a prognostic marker.

Key words: prostate adenocarcinoma; miR-362-3p; adhesin; extracellular matrix; prognosis

前列腺癌是男性生殖系统中常见的肿瘤,病变的发生与基因和遗传因素的改变有关^[1]。微小 RNA(miRNAs)是近年发现的与肿瘤形成和进展有关的因子,通过与靶 mRNA 的 3'UTR 区域结合发挥调控靶基因的作用^[2]。本研究通过在 The Cancer

Genome Atlas (TCGA) 数据库中对前列腺癌中 miRNAs 的差异性表达进行筛选,选择在前列腺癌中异常表达明显、且尚未见报道的微小 RNA-362-3p(miR-362-3p)进行研究,并应用软件预测下游的靶因子,选择与 miR-362-3p 关联性最强的上皮型粘附素(E-cadherin)、基质金属蛋白酶-11(MMP-11)和基质金属蛋白酶-14(MMP-14)作为靶基因,探讨其临床意义及相关性。

收稿日期:2019-12-26;修回日期:2020-3-15

基金项目:2018 年度河北省医学科学研究重点课题计划(20180181);2019 年度河北省医学科学研究课题计划(20190287)。

* 通信作者, E-mail: wangzhenggang5918@163.com.

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2014年1月至2016年6月确诊为前列腺癌的患者67例为研究对象。纳入标准:①术后病理确诊为前列腺癌,并符合WHO中的标准;②首诊患者。排除标准:①多原发癌;②术前行放、化疗。年龄55~86岁,中位年龄67岁。留取术后的肿瘤组织作为观察组。同期,选择前列腺增生的组织67例为对照组,年龄56~84岁,中位年龄68岁。均留取病变组织的新鲜冻存标本(-80℃保存)和石蜡包埋组织。二组在年龄的比较中无明显差别。研究经医院伦理委员会批准,家属均签订知情同意书。

1.2 miR-362-3p 的检测

检测前列腺癌和前列腺增生组织中 miR-362-3p 的表达。应用实时荧光定量 qRT-PCR 法进行检测。引物由江苏楚天生物科技公司合成。上游:5'-GATGACACTGAGGCTGAG-3', 下游:5'-ACGTGCACTTCGTCCGCTT-3' 内参为 U6, 上游:5'-GGAA-CAGAGAAAGATTAGC-3', 下游:5'-TTGGAATTCACG AATTCCG-3'。提取总 RNA, cDNAs 由 TaqMan MicroRNA 合成, 试剂购自江苏楚天生物科技公司。循环参数:95℃ 10 min, 1 个循环;95℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 31 个循环, 72℃ 延伸 6 min。60℃ 进行信号采集, 记录 Ct 值。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示结果。 $\Delta\Delta Ct = [Ct_{目的基因(未知样品)} - Ct_{对照(未知样品)}] - [Ct_{目的基因(校正样品)} - Ct_{对照(校正样品)}]$ 。

1.3 免疫组化的检测

免疫组化 SP 法检测 E-cadherin 和 MMP-11 表达。简略步骤为:石蜡包埋前列腺癌组织, 4 μm 切片, DAB 显色, 以黄色和黄褐色为阳性。E-cadherin 阳性部位是细胞膜, MMP-11 阳性部位是细胞质和/或细胞膜, 选择 5 个显色最明显的 400 倍视野进行计数, 计算阳性率并取平均值。

1.4 Western Blot 法

应用 Western Blot 法检测前列腺癌组织中 MMP-14 的表达, 以 MMP-14 与 GAPDH 比值表示 MMP-14 的相对表达量。

1.5 统计学方法

应用 SPSS17.0 软件进行数据分析。实验中计量资料应用均数±标准差表示, 两组间的比较应用独立样本的 *t* 检验。相关分析行 Pearson 相关分析。行 K-M 生存分析, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 两组中 miR-362-3p 表达

见图 1 显示实时荧光定量 PCR 的扩增曲线, 如表 1 所示, miR-362-3p 在观察组中的表达显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

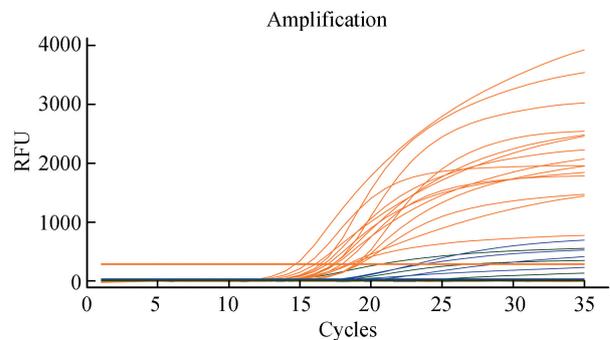


图 1 miR-362-3p 的表达扩增曲线

表 1 两组中 miR-362-3p 表达的比较

组别	miR-362-3p	<i>t</i>	<i>P</i>
对照组	1.51±0.39	5.11	0.002
观察组	1.15±0.34		

(*n* = 67)

2.2 观察组不同临床特征分组患者术后组织中 miR-362-3p 表达

MiR-362-3p 在脉管癌栓、Gleason 分级、转移和不同 TNM 分期的表达中有统计学差别 ($P < 0.05$), 而在不同年龄、神经累犯的表达中无统计学差别 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 观察组中 miR-362-3p 表达的生存分析

观察组均进行术后 3 年 (36 月) 的随访, 方式为电话、门诊及家访等形式, 截止时间点 2019 年 6 月 30 日。其中生存 30 例, 死亡 34 例, 失访患者 3 例。死亡患者确诊后的生存时间 7~36 个月, 生存中位数为 20 个月。生存分析显示 miR-362-3p 与生存时间有关 ($\chi^2 = 6.31, P = 0.001$)。见图 2。

2.4 前列腺癌组织 miR-362-3p 与 E-cadherin、MMP-11 的相关性

如图 3A 所示, E-cadherin 表达部位是在癌细胞的细胞膜, 呈棕黄色, E-cadherin 在前列腺癌中的阳性率范围 3~55%, 平均 21.4%。相关分析显示 miR-362-3p 与 E-cadherin 呈正相关性 ($r = 0.59, P = 0.013$) (见图 3B)。

表 2 不同临床特征观察组术后组织中 miR-362-3p 表达的比较

临床特征	n	miR-362-3p	F 或 t	P
年龄			1.02	0.263
<60 岁	20	1.20±0.42		
≥60 岁	47	1.12±0.33		
Gleason 总分			4.70	0.008
2~6 分	18	1.31±0.25		
7(3+4)分	29	1.20±0.27		
7(4+3)分	21	1.11±0.41		
8~10 分	9	0.92±0.38		
神经累犯			1.23	0.103
无	40	1.11±0.39		
有	27	1.22±0.36		
转移			5.29	0.003
无	47	1.28±0.37		
有	20	0.90±0.36		
脉管癌栓			2.83	0.023
无	46	1.23±0.32		
有	21	0.99±0.30		
TNM 分期			3.01	0.011
I~II 期	36	1.29±0.37		
III~IV 期	31	1.01±0.33		

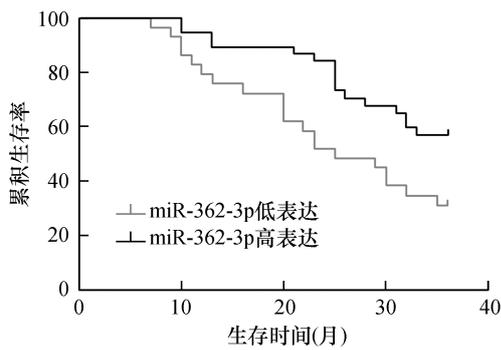


图 2 miR-362-3p 生存分析图

2.5 前列腺癌组织 MMP-11 的表达, 及与 miR-362-3p 相关性

如图 4A 所示, MMP-11 表达部位是在癌细胞的细胞质和细胞膜, 呈棕黄色, MMP-11 在前列腺癌中的阳性率范围 10~70%, 平均 39.0%, 相关分析显示 miR-362-3p 与 MMP-11 呈负相关性 ($r = -0.50, P = 0.019$)。见图 4B。

2.6 前列腺癌中 miR-362-3p 与 MMP-14 的相关性

如图 5 所示, Western Blot 法检测 MMP-14 在前列腺癌中表达, 结果显示, MMP-14 在癌组织中的表达较高, 范围是 0.9~3.8, 平均 2.1。相关分析显示

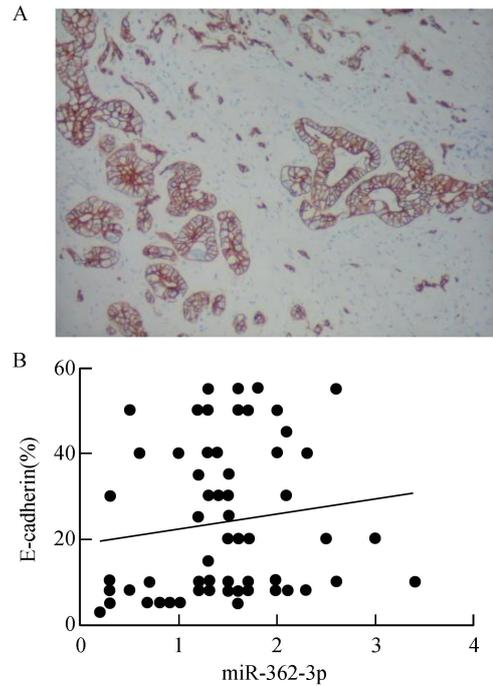


图 3 E-cadherin 在前列腺癌中表达及其与 -cadherin 之间具有相关性

A; E-cadherin 在前列腺癌中表达的免疫组化图 (200×), B; miR-362-3p 与 E-cadherin 之间具有正相关的趋势散点图

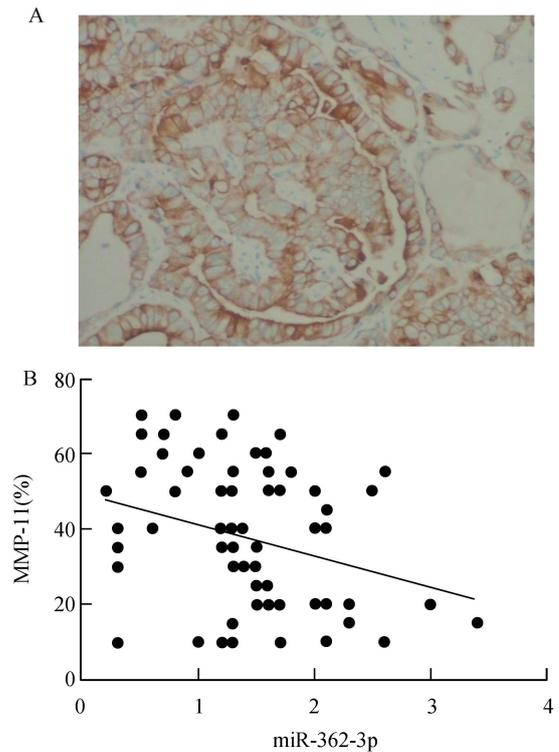


图 4 MMP-11 的表达及其与 miR-362-3p 相关性

A; MMP-11 在前列腺癌中的表达 (400×); B; miR-362-3p 与 MMP-11 之间的相关趋势散点图

miR-362-3p 与 MMP-14 呈负相关性 ($r = -0.49, P =$

0.021)(见图6)。

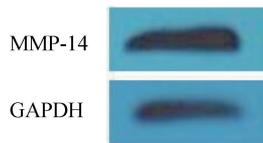


图5 MMP-14在前列腺癌中的表达

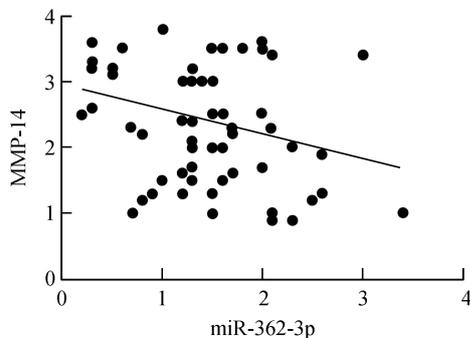


图6 miR-362-3p与MMP-14相关性的散点图

3 讨 论

前列腺癌病变的机理与基因和遗传因素密切相关^[3],涉及到DNA、RNA及蛋白表达的异常调控。miRNAs是近年发现的与肿瘤相关的因子^[4]。其作为非编码单链RNA分子,长度为18-25核苷酸,由前体miRNA剪切产生,与靶基因mRNA的3'-UTR区域的特异性因子结合引起mRNA降解或翻译的抑制,不仅对细胞增殖和凋亡进行调控,还对肿瘤的转移、上皮间质转化有重要的调控作用。我们在基因库中筛选到miR-362-3p是重要的腺癌调控因子,其靶基因有40多个,本研究选择的靶因子均为转移相关的^[5-6]。E-cadherin是细胞粘附因子中的成员,在正常的上皮细胞中高表达,在肿瘤细胞中的表达常下调,对同质型粘附具有重要作用^[7]。MMP-11和MMP-14是基质金属蛋白酶家族中的成员,对细胞外基质和IV型胶原的降解作用强,其异常表达后可以引起肿瘤转移屏障降解,使肿瘤细胞易于离开原发灶形成转移灶,为肿瘤侵袭提供重要的帮助^[8-9]。

本研究显示miR-362-3p在前列腺增生和前列腺癌组织中的表达有明显差异,提示miR-362-3p表达下调是肿瘤形成的重要分子事件。前列腺增生为非肿瘤性病变的组织,其组织中miR-362-3p具有一定的表达量,与抑癌基因的作用相似。结果显示

miR-362-3p在有无脉管癌栓和转移的表达中差别有统计学意义,提示miR-362-3p低表达可以促进肿瘤的转移^[10]。Gleason分级和TNM分期是与肿瘤进展和预后有关的指标,本研究发现了miR-362-3p在不同Gleason分级和TNM分期中的表达有差异,提示miR-362-3p异常表达对判断肿瘤的生物行为可能有一定意义。本研究发现了miR-362-3p的表达与生存时间的关系,提示检测miR-362-3p的表达对判断预后有一定意义,即miR-362-3p低表达患者的预后差。MiR-362-3p的作用与较多的下游因子有关,如通过CD82促进胃癌细胞上皮间质的转化^[11],在肾癌中miR-362-3p表达下降并靶向NEMO样激酶基因调节肿瘤的进展^[12]。这些作用与本实验发现的miR-362-3p在前列腺癌中表达的结果较为一致。相关分析显示miR-362-3p与MMP-11、miR-362-3p与MMP-14、miR-362-3p与E-cadherin具有相关性,提示miR-362-3p低表达时可通过改变上述因子的表达进而调节肿瘤的进展,也间接证实了miR-362-3p对MMP-11、MMP-14和E-cadherin的靶向关系,但是其具体靶向关系尚需后续应用双荧光素酶报告基因实验来证实。MiR-362-3p异常表达能促进肿瘤细胞粘附性改变^[13-14],引起细胞间连接的松散,细胞易于离开原发灶出现播散,为肿瘤的转移提供条件。MMP-11和MMP-14高表达时能引起肿瘤细胞周围的基质、基底膜和IV型胶原溶解,使细胞转移的屏障作用减弱或消失,引起肿瘤细胞发生迁移。MiR-362-3p在不同类型肿瘤中的表达作用可能不同^[15]。赵越等^[16]在喉鳞癌中发现miR-362-3p高表达,认为其在鳞癌中具有癌基因样的作用,其作用可能与肿瘤的低氧环境有关,因此miR-362-3p可能仅在腺癌中具有肿瘤抑制的作用。我们在基因数据库的分析中也显示出E-cadherin、MMP-11和MMP-14是miR-362-3p的下游靶基因,与本实验的部分结论具有一致性。E-cadherin是与miR-362-3p关联性最强的因子,提示miR-362-3p对调控粘附的作用更强。MMP-11和MMP-14被活化后其下游调节通路多且复杂^[9]。MMP-14也受控于多种因子^[17-18],MMP-14在MMPs调节网络中可能具有核心调控作用^[19]。miR-362-3p与前列腺癌预后的关系是本研究中的重要发现,但是由于本实验中标本收集的局限性,尚需要后续进行多中心、大样本分析验证后明确。

总之,miR-362-3p在前列腺癌中低表达,与转移指标具有相关性,可能是判断前列腺癌预后的指标。

参考文献:

- [1] 齐旻芳,周雪娟,刘小珍,等. miR-451a 对前列腺癌细胞迁移侵袭能力的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(21): 2076-81.
- [2] 戴金华,廖于峰,冷江涌,等. 前列腺癌患者血清 miR-146a 与 miR-152 的表达水平及临床意义[J]. 中国性科学, 2016, 25(4):7-10.
- [3] 赵春娟,翟庆娜,余振东,等. miR-34a 在前列腺癌血清中的表达意义[J]. 中国男科学杂志, 2011, 25(11):6-9.
- [4] LI Z, HU Y, ZENG Q, et al. Circular RNA MYLK promotes hepatocellular carcinoma progression by increasing Rab23 expression by sponging miR-362-3p[J]. Cancer Cell Int, 2019, 8(1): 211-3.
- [5] SONG L, LIU S, YAO H, et al. MiR-362-3p is downregulated by promoter methylation and independently predicts shorter OS of cervical squamous cell carcinoma[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108944-7.
- [6] CHEN R, XIA W, WANG S, et al. Long noncoding RNA SBF2-AS1 is critical for tumorigenesis of early-stage lung adenocarcinoma [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 7(16):543-53.
- [7] BATLLE E, SANCHO E, FRANCÍ C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells[J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(2):84-9.
- [8] 刘爱东,刘时飞,宋旭东,等. 基质金属蛋白酶 11 和组织蛋白酶 D 在胃腺癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 中国综合临床, 2019, 35(1):22-5.
- [9] 刘爱东,刘扬,张宏伟,等. 胃腺癌中 SOX-18、MMP-2 和 MMP-14 的表达及相关性[J]. 广东医学, 2015, 34(6): 881-4.
- [10] TANOGLU A, BALTA AZ, BERBER U, et al. Downregulated miR-362-3p expression: a potential biomarker of colorectal cancer recurrence[J]. J Am College Surg, 2014, 219(4):81-3.
- [11] ZHANG Q, HUANG F, YAO Y, et al. Interaction of transforming growth factor- β -Smads/microRNA-362-3p/CD82 mediated by M2 macrophages promotes the process of epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells [J]. Cancer Sci, 2019, 110(8): 2507-19.
- [12] ZOU X, ZHONG J, LI J, et al. miR-362-3p targets nemo-like kinase and functions as a tumor suppressor in renal cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 994-1002.
- [13] ZHANG CJ, DU HJ. Screening key miRNAs for human hepatocellular carcinoma based on miRNA-mRNA functional synergistic network[J]. Neoplasma, 2017, 64(6): 816-23.
- [14] SHEN H, LI W, TIAN Y, et al. Upregulation of miR-362-3p modulates proliferation and anchorage-independent growth by directly targeting tob2 in hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(8): 1563-73.
- [15] 揭传,林江飞,肖强胜,等. miR-362-3p 的表达及其靶基因与胆囊癌恶性特征的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(8):998-1006.
- [16] 赵越,孙媛媛,佟雪,等. miR-362-3p 在喉癌组织中的表达及其对喉癌 Hep-2 细胞迁移的影响[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(3):50-3.
- [17] WANG YZ, WU KP, WU AB, et al. MMP-14 overexpression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Tumor Biology, 2014, 35(10):9815-21.
- [18] 姚广裕,林鹏,王军业,等. MMP-14 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(5):26870.
- [19] 钱红,曹桂明,牛国梁,等. MMP-9、MMP-14、MMP-2 和 VEGF-C 在乳腺癌中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2013, 19(3):223-6.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 271 页)

- [9] 李万辉. 血糖、糖化血红蛋白以及单核细胞计数水平与急性脑出血患者不良预后的相关性研究[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(2): 218-21.
- [10] 荣玉婷,汤其强,任明山. 急性脑出血患者血清炎症因子和 C-反应蛋白的动态监测及在病情恶化中的预测价值[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(8):1192-5.
- [11] 金子凡,冯娟. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对原发性急性脑出血患者短期预后的预测作用[J]. 中国脑血管病杂志, 2018, 15(5):236-40.
- [12] 黄伟,郭凤,唐智勇,等. 神经内镜微创手术治疗高血压脑出血短期预后危险因素及其对 IL-2、IL-6、TNF- α 的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13(8):424-5.
- [13] MANGANO K, MAZZON E, BASILE M S, et al. Pathogenic role for macrophage migration inhibitory factor in glioblastoma and its targeting with specific inhibitors as novel tailored therapeutic approach[J]. Oncotarget, 2018, 9(25):579-84.
- [14] 陈宝友,李强,刘爱,等. 脑出血患者血清中一氧化氮、胰岛素样生长因子-1 和巨噬细胞转移抑制因子的表达水平及意义[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(7):1750-1.
- [15] 邵杨凡慧,曹龄之,黄晓红,等. 姜黄素治疗大鼠脑出血后血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 变化的实验研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 23(9):1033-7.
- [16] 霍红艳. 高血压脑出血患者肿瘤坏死因子- α 、血管内皮生长因子、内皮素-1 与其水肿组织的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(15):1842-4.
- [17] 董永军,田德洲,宋飞霞. 脑出血患者血清基质金属蛋白酶 9 和金属蛋白酶组织抑制剂 1 水平变化及其与脑水肿的相关性[J]. 中国医药, 2016, 11(10):1473-6.

(本文编辑:秦旭平)