

宫颈癌组织中 microRNA-506 表达及临床病理意义

朱小晖, 张申华

[摘要] 目的:探讨宫颈癌组织中微小 RNA (microRNA, miR)-506 表达与临床病理参数的关系。方法:采用茎环实时荧光逆转录聚合酶链反应检测 46 例宫颈癌组织及相应的癌旁组织中 miR-506 表达,根据其表达情况对临床病理参数进行分析。Transwell well 方法检测转染 miR-506 寡核苷酸对 HeLa 细胞运动和侵袭影响,Western blot 方法检测 E-cadherin 和 vimentin 表达。结果:46 例宫颈癌组织中 miR-506 相对表达量显著低于癌旁组织 ($P < 0.01$)。在 III/IV 期宫颈癌组织中 miR-506 相对表达量明显低于 I/II 期宫颈癌组织 ($P < 0.01$);在低分化癌组织中相对表达量明显低于中高分化癌组织 ($P < 0.01$)。且 miR-506 在有淋巴结转移组相对表达量明显低于无淋巴结转移组 ($P < 0.01$);但在患者年龄、绝经与否和肿瘤直径间 miR-506 相对表达量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR-506 转染组 HeLa 细胞运动和侵袭均明显低于未转染组 ($P < 0.01$),miR-506 转染组抑制 HeLa 细胞 vimentin 表达,而促进 E-cadherin 表达。结论:宫颈癌组织中存在 miR-506 低表达,miR-506 表达缺失可能与宫颈癌的肿瘤生长和侵袭发展相关,在宫颈癌预后判断中可能有一定价值。

[关键词] 子宫肿瘤;微小 RNA-506;病理学特征;侵袭;转移

[中图分类号] R 737.77 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.03.015

The expression of microRNA-506 in cervical cancer and its clinical significance

ZHU Xiao-hui, ZHANG Shen-hua

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First People's Hospital of Tianmen, Tianmen Hubei 431700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of microRNA (miR)-506 in cervical cancer and its clinically pathological significance. **Methods:** The expressions of miR-506 in cervical cancer tissues and corresponding paracarcinoma tissues in 46 patients were detected using stem ring real-time reverse transcription polymerase chain reaction, the clinically pathological data were analyzed according to the miR-506 expression situation. The migration and invasion of HeLa cells transfected with miR-506 were detected using Transwell, and the E-cadherin and vimentin protein expressions were detected using Western Blot. **Results:** The expression of MiR-506 in cervical cancer tissue was significantly lower than that in paracarcinoma tissues ($P < 0.01$). The expression of MiR-506 in type III/IV cervical cancer tissue was significantly lower than that in type I/II cervical cancer tissue ($P < 0.01$). The expression of MiR-506 in low differentiation cervical cancer tissue was significantly lower than that in high differentiation cervical cancer tissue ($P < 0.01$). The expression of MiR-506 in patients with lymph node metastasis was significantly lower than that in patients without lymph node metastasis ($P < 0.01$). The differences of the MiR-506 expressions in different ages, menostasis and tumor diameters were not statistically significant ($P > 0.05$). The migration and invasion of HeLa cells transfected with miR-506 was significantly lower than those in HeLa cells non-transfected with miR-506 ($P < 0.01$). The expressions of vimentin and E-cadherin in HeLa cells transfected with miR-506 were inhibited and promoted, respectively ($P < 0.01$). **Conclusions:** The expression of miR-506 in cervical cancer is low, which may be associated with tumor growth and development of cervical cancer, the miR-506 has certain value in judging the prognosis of cervical cancer.

[Key words] cervical neoplasms; microRNA-506; pathological characteristics; invasion; migration

宫颈癌是女性中排名第三的恶性肿瘤,人乳头状瘤病毒与基因突变被认为与宫颈癌发生密切相关^[1]。近年来宫颈癌发病率逐步增高,尽管放化疗联合应用提高了患者短期生存率,但 5 年生存率仅提高 3%,因此,明确宫颈癌的发生分子机制,对提高靶向治疗有重要的临床意义。微小 RNA

(microRNA, miR) 在调控肿瘤增殖、侵袭和转移中均发挥重要作用,最近研究^[2-3]表明,miR-506 具有抑制肝癌、卵巢癌等肿瘤细胞生长的作用。也有研究^[4-5]发现,miR-506 在乳腺癌中可抑制乳腺癌细胞的上皮-间质转换,在结肠癌中低表达可导致化疗耐药。目前 miR-506 在宫颈癌组织中意义不明,本研究采用茎环逆转录实时荧光聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测 46 例宫颈癌组织及相应的癌旁组织中 miR-506 表达,分析 miR-506 和临床病理参数的关系,探讨 miR-506 在宫颈癌发生中的作用。

[收稿日期] 2015-01-24

[作者单位] 湖北省天门市第一人民医院 妇产科,431700

[作者简介] 朱小晖(1981-),男,主治医师。

[通信作者] 张申华,副主任医师。E-mail:3686013@qq.com

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本采自2012年2月至2014年5月经我科行手术治疗的宫颈癌患者46例,术后均经病理确诊。患者年龄28~73岁。按国际妇产科联盟肿瘤分期I期9例,II期12例,III期14例,IV期11例;有淋巴结转移18例。患者术前均未接受放、化疗或激素等治疗。癌组织取肉眼所见的肿瘤组织,而癌旁组织取距离肿瘤边缘2 cm的良性组织,所取标本离体后置于液氮罐内迅速冷冻后置-80℃保存。

1.2 实验试剂 Trizol试剂购自美国Invitrogen公司, RNA提取试剂盒购自百泰克生物有限公司,逆转录试剂盒及RT-PCR荧光染料Sybergreen购自Takara生物有限公司, miR-506特异性引物购自广州锐博生物有限公司。Matrigel基质胶购自BD公司, 8 μm的Transwell购自Milipore公司, E-cadherin和vimentin抗体购自Cell Signal生物公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参抗体购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA的提取 取液氮保存的宫颈癌组织及癌旁组织标本约100 mg, 采用液氮研磨法将组织磨成粉末, 然后加入约1 mL的Trizol裂解组织试剂, 接Trizol试剂说明书提取总RNA。紫外分光光度仪检测RNA溶液D260/D280比值, 计算RNA浓度及纯度, D260/D280比值在1.8~2.1者认为具有较高的纯度, 用于进一步实验检测。

1.3.2 RT-PCR检测 miR-506 取1 μg总RNA行逆转录, 反应条件为: 42℃ 60 min, 70℃ 10 min。miR-506茎环逆转录引物购自广州锐博生物, 上游引物5'-GCC CTG GAA TGT AAA GAA GT-3', 下游引物为5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3', U6内参的上游引物5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3', 下游引物R: 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'; PCR扩增条件为: 95℃变性5 min, 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 35个循环。所有反应均设3个复孔, 记录每个反应管中标本的Ct值, 实验结果采用RT-PCR中的相对定量法进行分析, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示宫颈癌组织 miR-506 表达量相对于对照组表达量的变化倍数, 其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-506} - Ct_{U6})_{宫颈癌} - (Ct_{miR-212} - Ct_{U6})_{宫颈癌旁组织}$ 。

1.3.3 miR-506寡核苷酸脂质体介导转染 实验分对照组和 miR-506 转染组, 对照组不做转染, 而

miR-506 转染组采用100 nmol/L的 miR-506 寡核苷酸, 在细胞长到80%融合度时, 吸出培养液, 换成含脂质体2000的100 nmol/L的 miR-506 寡核苷酸继续孵育6 h, 然后换10%完全培养基继续培养48 h, 细胞消化后做迁移、侵袭和蛋白提取实验。

1.3.4 细胞迁移侵袭实验 采用BD公司8 μm的Transwell趋化小室, 上室置入 1×10^5 的Hela细胞, 下室放置1 mL完全培养液, 让细胞迁移, 侵袭24 h。然后用棉签刮去未发生迁移和侵袭的细胞, 0.1%结晶紫染色细胞, 显微镜下计数细胞数, 每组实验重复3次。

1.3.5 Western blot检测 E-cadherin 和 vimentin 采用铺满Hela细胞的6孔板作转染, 于100 nmol/L的 miR-506 寡核苷酸或无效干预寡核苷酸转染后48 h提取蛋白, 未做任何处理组作对照组, 取50 μg蛋白做10% SDS-PAGE电泳, 转膜采用聚二氟乙烯膜, 采用5%脱脂奶粉封闭2 h, TBST洗膜3次, 每次15 min, 然后加入兔抗人 E-cadherin (1:100) 和 vimentin (1:150) 及内参抗体 GAPDH (1:1000) 4℃摇床过夜。TBST洗膜后加入相应HRP标记的二抗(1:2000), 室温孵育2 h, 然后采用化学发光试剂盒进行发光显影。

1.4 统计学方法 采用 $t(t')$ 检验。

2 结果

2.1 宫颈癌及癌旁组织中 miR-506 表达量比较 46例宫颈癌组织中 miR-506 相对表达量为 (0.913 ± 0.356) , 而癌旁组织 miR-506 相对表达量为 (1.261 ± 0.323) , 宫颈癌组织中 miR-506 的相对表达量明显低于癌旁组织($\bar{d} \pm s_d = -0.348 \pm 0.03, t = 78.68, P < 0.01$)。

2.2 临床病理参数与宫颈癌组织中 miR-506 表达的关系 患者不同临床分期及组织学分级中, miR-506 表达量不同, 其中III期、IV期中 miR-506 的相对表达量均明显低于I期和II期($P < 0.01$); 在低分化癌组织中相对表达量明显低于中高分化癌组织($P < 0.01$)。而且 miR-506 表达还与淋巴结转移密切相关, 有淋巴结转移组 miR-506 的相对表达量明显低于无淋巴结转移组($P < 0.01$)。miR-506 表达在宫颈癌患者年龄、绝经与否及肿瘤直径间差异均无统计学意义($P > 0.05$) (见表1)。

2.3 miR506抑制Hela细胞增殖、侵袭及上皮-间质转换相关蛋白表达 通过脂质体2000转染浓

表 1 宫颈癌患者临床病理参数与 miR-506 表达关系($\bar{x} \pm s$)

临床病理参数	n	miR-506 相对表达量	t	P
年龄/岁				
<40	26	0.947 ± 0.351	0.36	>0.05
≥40	20	0.908 ± 0.384		
肿瘤直径/cm				
<2.5	23	0.931 ± 0.412	0.57	>0.05
≥2.5	23	0.856 ± 0.476		
绝经				
是	19	0.926 ± 0.537	0.47	>0.05
否	27	0.851 ± 0.522		
肿瘤分期				
I/II	21	1.265 ± 0.669	4.60*	<0.01
III/IV	25	0.565 ± 0.215		
病理级别				
G ₁ + G ₂	26	1.179 ± 0.522	3.92	<0.01
G ₃	20	0.637 ± 0.377		
淋巴结转移				
否	28	1.339 ± 0.433	6.92	<0.01
是	18	0.546 ± 0.273		

* 示 t' 值

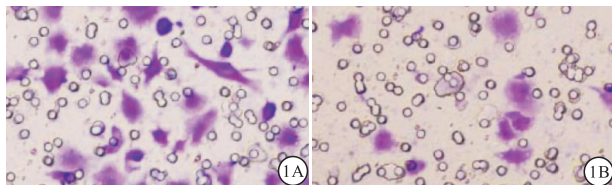


图 1 Transwell 检测细胞 miR-506 寡核苷酸转染后 HeLa 细胞运动 (SP)

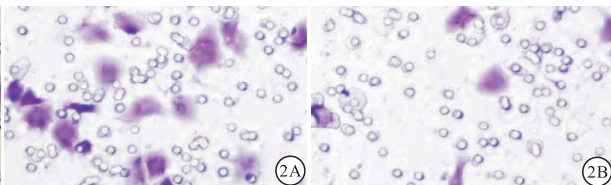


图 2 Transwell 检测细胞 miR-506 寡核苷酸转染后 HeLa 细胞侵袭 (SP)

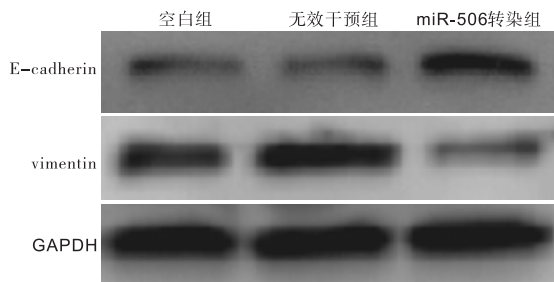


图 3 Western blot 检测 miR-506 寡核苷酸对 HeLa 细胞影响

度为 100 nmol/L 的 miR-506 寡核苷酸, 每组重复 3 癌组织中 miR-506 存在低表达, 在 III/IV 期宫颈癌组织中 miR-506 相对表达量明显低于 I/II 期宫颈癌组织; 在低分化癌组织中相对表达量明显低于中高分化癌组织。miR-506 在宫颈癌组织中与患者年龄及肿瘤大小无关, 提示 miR-506 与宫颈癌病理学参数密切相关。

侵袭、转移是宫颈癌不断发展并危及患者生命的重要因素, 容易导致患者死亡。而上皮-间质转换是恶性肿瘤细胞发生侵袭转移的重要病理步骤之

次, 结果发现对照组细胞迁移数为 (37.0 ± 2.6), 明显高于 miR-506 转染组细胞迁移数的 (13.3 ± 1.5) ($t = 13.68, P < 0.01$) (见图 1), 细胞侵袭实验显示对照组为 (22 ± 3.0), 显著高于 miR-506 转染组细胞的 (13 ± 1.0) ($t = 4.93, P < 0.01$) (见图 2)。表明 miR-506 抑制 HeLa 细胞的运动和侵袭。而 Western blot 结果提示 miR-506 抑制 HeLa 细胞 vimentin 表达, 但促进 E-cadherin 表达 (见图 3)。

3 讨论

研究肿瘤生长的分子机制对肿瘤治疗有重要意义, 目前研究^[6]发现, 多种 miR 在调控肿瘤发生、发展及侵袭和转移中均发挥重要作用, 异常表达与恶性肿瘤发生有关, 而恶性肿瘤发生发展过程中伴随着众多表达的异常变化^[7]。宫颈癌是女性中常见的恶性肿瘤, 高度恶性, 容易复发, 可切除率低。宫颈癌组织中存在 miR 表达异常, 且 miR-506 在多种肿瘤中发挥抑癌作用^[8], 但 miR-506 在宫颈癌中的作用机制并不完全清楚。本研究结果表明, 在宫颈

—^[9]。本研究结果表明, miR-506 在有淋巴结转移组相对表达量明显低于无淋巴结转移组。Gli3 转录因子在恶性肿瘤生长及浸润, 转移中发挥重要作用, 可促进结肠癌细胞增殖、侵袭和转移, Gli3 调控众多信号通路^[10], 包括 Wnt/β-catenin, AKT 和 ERK。miR 一般通过靶向调控 mRNA 调节基因表达, 目前研究^[11]表明, miR-506 可在宫颈癌中调节 Gli3 表达, 也有报道^[4] miR-506 可通过靶向调节 Snail2 的表达, 抑制 EMT 和肿瘤侵袭转移。我们研究发现 miR-506 可以抑制宫颈癌细胞侵袭和迁移, 上调 E-cadherin, 而下调 vimentin, 提示 miR-506 可以逆转宫颈癌细胞上皮-间质转换, 抑制癌细胞侵袭和转移。

总之, 本研究结果表明, 宫颈癌组织中存在 miR-506 低表达, 且 miR-506 低表达与患者淋巴结转移、肿瘤组织学分级差有关。miR-506 过表达可抑制宫颈癌细胞侵袭和迁移, 提示 miR-506 在宫颈癌组织中发挥抑癌作用。Gli3 转录因子是 miR-506 调控靶蛋白, 但 miR-506 是否通过其他蛋白调节机

制调控宫颈癌细胞的恶性行为,参与宫颈癌的发生发展,有待于进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] DUENAS-GONZALEZ A, SERRANO-OLVERA A, CETINA L, *et al.* New molecular targets against cervical cancer [J]. *Int J Womens Health*, 2014, 6:1023.
- [2] WANG Y, CUI M, SUN BD, *et al.* MiR-506 suppresses proliferation of hepatoma cells through targeting YAP mRNA 3'UTR [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(9):1207.
- [3] LIU G, SUN Y, JI P, *et al.* MiR-506 suppresses proliferation and induces senescence by directly targeting the CDK4/6-FOXMI axis in ovarian cancer [J]. *J Pathol*, 2014, 233(3):308.
- [4] ARORA H, QURESHI R, PARK WY. miR-506 regulates epithelial mesenchymal transition in breast cancer cell lines [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e64273.
- [5] TONG JL, ZHANG CP, NIE F, *et al.* MicroRNA 506 regulates expression of PPAR α in hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(22):3560.
- [6] XIE H, LEE L, SCICLUNA P, *et al.* Novel functions and targets of miR-944 in human cervical cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2015,

136(5):230.

- [7] CHEN XP, CHEN YG, LAN JY, *et al.* MicroRNA-370 suppresses proliferation and promotes endometrioid ovarian cancer chemosensitivity to cDDP by negatively regulating ENG [J]. *Cancer Lett*, 2014, 353(2):201.
- [8] LIU W, GAO G, HU X, *et al.* Activation of miR-9 by human papillomavirus in cervical cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22):11620.
- [9] ZENG T, PENG L, CHAO C, *et al.* miR-451 inhibits invasion and proliferation of bladder cancer by regulating EMT [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11):7653.
- [10] IWASAK H, NAKANO K, SHINKAI K, *et al.* Hedgehog Gli3 activator signal augments tumorigenicity of colorectal cancer via upregulation of adherence-related genes [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(3):328.
- [11] WEN SY, LIN Y, Yu YQ, *et al.* miR-506 acts as a tumor suppressor by directly targeting the hedgehog pathway transcription factor Gli3 in human cervical cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34(6):717.

(本文编辑 马启)

(上接第 324 页)

显著增高,炎症消退后,CRP 显著降低。本研究显示,治疗 1 周后,GSSH 治疗组及对照组 8-iso-PGF_{2 α} 和 CRP 均显著低于治疗前 ($P < 0.01$),且 GSSH 治疗组 8-iso-PGF_{2 α} 及 CRP 均较对照组降低更明显 ($P < 0.01$)。肺功能及血气分析是判断病情、评估疗效的重要的临床指标,广泛应用于临床,能够准确地反映 AECOPD 病情的严重程度。本研究发现 2 组患者在治疗后肺功能及血气分析均有明显好转,且加用还原型谷胱甘肽治疗的观察组 FEV1、FEV1/FVC、PO₂ 和 PCO₂ 等指标均较对照组改善更加显著 ($P < 0.01$)。氧自由基和其他氧化因子引起的氧化应激是炎症反应的重要部分^[10],本研究提示表明,使用还原型谷胱甘肽治疗 AECOPD,可以起到清除氧自由基、降低氧化应激水平、减轻支气管肺组织炎症反应的作用,对 AECOPD 具有重要的辅助治疗价值。

[参 考 文 献]

- [1] GAN G, HU R, DAI A, *et al.* The role of endoplasmic reticulum stress in emphysema results from cigarette smoke exposure [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(4):725.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2007 修订版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2007, 30(1):8.
- [3] 朱迎伟, 刘晓菊, 包海荣, 等. 慢性阻塞性肺病患者氧化应

激及 DNA 损伤的动态研究 [J]. *中华老年医学杂志*, 2010, 29(10):840.

- [4] WIEGMAN CH, MICHAELOUDES C, HAJI G, *et al.* Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(3):769.
- [5] 陈燕, 李桂英. 慢性阻塞性肺疾病氧化应激与肺功能的相关性 [J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(11):1991.
- [6] 王大慧, 卫功元. 谷胱甘肽的应用前景及生产研究现状 [J]. *化学与生物工程*, 2004(3):10.
- [7] MORROW JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(2):279.
- [8] HE H, TAO Y, CHEN X, *et al.* High levels of interleukin-6 and 8-iso-prostaglandin in the exhaled breath condensate and serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease related pulmonary hypertension [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(9):1608.
- [9] HOCKENBERRY MJ, TAYLOR OA, GUNDY PM, *et al.* F2-isoprostanes: a measure of oxidative stress in children receiving treatment for leukemia [J]. *Biol Res Nurs*, 2014, 16(3):303.
- [10] STOLK J, SEERSHOLM N, KALSHEKER N. α 1-antitrypsin deficiency: current perspective on research, diagnosis, and management [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2006, 1(2):151.

(本文编辑 刘梦楠)