

miRNA-200b 在肾癌患者血清中的异常表达及其临床意义

张涛¹, 张正彪², 阿力木·热合曼¹, 张云宇¹, 邵齐¹, 木拉提·马合木提¹

1. 新疆医科大学第二附属医院泌尿外科, 新疆 乌鲁木齐 830063;

2. 新疆乌鲁木齐市友谊医院泌尿外科, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘要: **目的** 检测微小核糖核酸(microRNA, miR)-200b 在肾癌患者血清中的表达状况,同时研究 miR-200b 与肾癌患者临床病理特征之间的关联,为进一步的深入研究奠定基础。**方法** 以 2014 年 1 月至 2015 年 12 月初次就诊并诊断为肾细胞癌的患者(术后病理证实为肾癌)35 例为肾癌组,35 例健康体检者(各项指标均正常)为健康对照组。收集肾癌组患者术前血清样本及健康对照组对象的血清样本,利用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测和对 miR-200b 在两组对象血清中的相对表达量,分析肾癌患者临床病理特征和 miR-200b 相对表达量之间的关系。**结果** 肾癌患者 miR-200b 相对表达量为 3.24 ± 1.72 ,健康对照患者相对表达量为 7.39 ± 3.58 ,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。与健康对照组比较,35 例肾癌中有 29 例(82.86%) miR-200b 表达下调。肾癌患者的性别、年龄、肾癌组织类型、肾肿瘤大小、TNM 分期和其血清中 miR-200b 相对表达量无相关性(P 均 > 0.05)。**结论** miR-200b 在肾癌患者血清中低表达,提示其可能与肾癌的发生发展相关。

关键词: 肾癌; 血清; 微小核糖核酸-200b; 临床病理特征

中图分类号: R 737.11 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)11-1474-03

肾细胞癌(renal cell carcinoma),简称肾癌,是泌尿系统三大肿瘤之一,占到全身肿瘤的 3%,是比较常见的一种肾脏恶性肿瘤,而且最近十年来肾癌的发病率和病死率呈现比较明显的上升趋势^[1-3]。目前早期肾癌缺乏症状和体征,就诊时往往已经到晚期,缺乏有效的治疗方法。早期肾癌主要通过手术治疗,但手术治疗后 3 年内约 1/3 的患者出现肿瘤复发,其结果是低于 10% 的 5 年存活率,此外大约四分之一诊断为肾癌的患者就诊时往往发现全身多发转移^[4]。所以,探索能对肾癌患者进行早期诊断的肿瘤生物标记物,成为当前研究的热点。很多国外研究已经证实微小核糖核酸(microRNA, miR)是机体处于正常状态下以及病理状态下细胞的重要分子成分^[5]。miRNA 研究领域中 miRNA 与肿瘤的相关研究已成为主流方向。miR-200b 目前已经发现在胃癌、结直肠癌、乳腺癌等肿瘤中异常表达^[6-8],有关 miR-200b 与肾癌方面的研究很少。本研究探讨 miR-200b 在肾癌患者血清中的表达水平,同时探讨 miR-200b 与肾癌患者临床病理特征之间的关联,旨在为后期进一步研究提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取我院 2014 年 1 月至 2015 年 12 月初次就诊并诊断为肾细胞癌的患者(术后病理证实为肾癌)35 例为肾癌组,其中男性 27 例,女性 8 例;年龄(50 ± 13)岁。选取同一时间我院健康体检中心的健康体检者(各项指标均正常)35 例做为健康对照组,男性 26 例,女性 9 例;年龄(48 ± 12)岁。两组对象年龄、性别比较差异无统计学意义(P 均 < 0.05)。肾癌组和健康对照组所有对象均在抽取血标本前被详细告知本次研究项目,同意并签署知情同意书。本研究通过了新疆医科大学第二附属医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 血清标本采集 肾癌组(在行手术前)和健康对照组均采集空腹血液样本,两组在 5 h 内采集到的血液样本均进行以下处理:3 000 rpm 离心 10 min, 4 °C,收集上层血清后保存于 -80 °C 冰箱中待用。

1.2.2 总 RNA 的提取 遵循 mirVana™ PARIS™ Kit (Ambion, USA)说明书进行操作提取总 RNA。流程如下:提取 300 μl 血清,混入 300 μl 的变性液待混匀后,将 acidic phenol: chloroform 滴入,接着进行离心,离心后在上清液中滴入无水乙醇,给予多次的离心与洗脱,洗脱液 60 μl 加热到 95 °C 后来洗脱 RNA,这时

保存收集到的 RNA 液于 -80 °C 冰箱中,准备下一步进行反转录(在 2 h 之内)。

1.2.3 实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 特异性反转录引物由上海生工合成,Has-miR-200b 反转录引物序列:下游引物 5'-ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG-3',上游引物 5'-GCC GCG GAA AAG TGC TTA CAG TG-3',5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC TAC CT-3'。Has-U6 反转录引物序列:下游引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3',上游引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。合成目的基因 cDNA 使用反转录试剂盒(Thermo scientific)。定量应用 Maxima SYBR Green qPCR Kit(Thermo scientific)试剂盒,具体步骤严格遵循说明书操作。条件设置:95 °C 孵化 3 min;95 °C,10 s,60 °C,30 s 进行 40 循环。每个样本每种 miRNA 均重复 2 次,最后取其平均 CT 值。同时使用阴控对照。目的基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{实验组}} - \Delta CT_{\text{对照组}}$ 。
 $\Delta CT_{\text{实验组}} = CT_{\text{目标基因,实验组}} - CT_{\text{内参基因,实验组}}$ 。
 $\Delta CT_{\text{对照组}} = CT_{\text{目标基因,对照组}} - CT_{\text{内参基因,对照组}}$ 。
 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示肾癌组相对于对照组目的基因的表达倍数。选用 U6 作为内参基因,对目的基因进行归一化处理。

1.3 统计学方法 所有数据均通过 SPSS 19.0 软件处理。先对基因相对表达量数据进行正态性和方差齐性检验,对不服从正态性分布的数据进行对数转换,转换后其数值服从正态分布规律,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间比较使用成组样本 *t* 检验;计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-200b 在肾癌患者血清中的表达情况 肾癌患者 miR-200b 相对表达量为 3.24 ± 1.72 ,健康对照患者相对表达量为 7.39 ± 3.58 ,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。与健康对照组比较,35 例肾癌中有 29 例(82.86%)miR-200b 表达下调。

2.2 肾癌患者不同临床病理特征下血清中 miR-200b 相对表达量的比较 在收集其血液前未接受任何治疗时,本研究对 35 例肾癌患者不同临床病理特征下血清中 miR-200b 相对表达量的比较结果显示,肾癌患者的性别、年龄、肾癌组织类型、肾肿瘤大小、TNM 分期等临床病理特征和其血清中 miR-200b 表达均无相关性(P 均 > 0.05)。见表 1。

表 1 肾癌患者不同临床病理特征下血清中 miR-200b 相对表达量的比较

项目	例数	miR-200b 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)	<i>P</i> 值
性别			
男	27	1.34 ± 0.41	0.562
女	8	1.48 ± 0.35	
年龄(岁)			
<50	20	1.47 ± 0.43	0.791
≥50	15	1.59 ± 0.27	
Fuhrman 分级			
I ~ II	25	1.63 ± 0.24	0.415
III	10	1.51 ± 0.39	
肿瘤直径(cm)			
<4	24	1.57 ± 0.36	0.693
≥4	11	1.42 ± 0.48	
TNM 分期			
T ₁ ~ T ₂	26	1.37 ± 0.28	0.837
T ₃ ~ T ₄	9	1.45 ± 0.36	

3 讨论

miRNA 是一类短链的小分子非编码 RNA,通过结合靶信使 RNA 的非翻译区,控制影响靶 mRNA 的翻译后的调节,进而来调节多种生物进程。近年来在肿瘤的研究中,miRNA 被认为是可行的肿瘤标记物^[9],miRNA 可能在发挥抑癌基因或者促癌基因的作用^[10],参与调节细胞周期各环节,对细胞增殖、分化、凋亡等生物学过程发挥重要作用^[11-12]。血管内皮生长因子(VEGF)、低氧诱导因子(HIF)等肾癌的多种分子机制都和 miRNA 的调控相关^[13-14]。既往关于肿瘤的 miRNA 研究主要以肿瘤组织及肿瘤旁组织为标本,然而以获取肿瘤标记物为目的的肿瘤组织的取材非常困难,且创伤大,因此不适合用作生物标记物的取材标本。而血清具有抽取便捷、创伤小、能反复操作的优点,在肿瘤标记物检测中可作为理想标本。国外学者研究发现血清 miRNA 可以非常稳定地存在^[15],更为重要的发现是肾癌患者血清中循环 miRNA 的表达水平和肾细胞癌组织具有一致性^[16],这让 miRNA 成为肿瘤标志物的前景变得光明。

miR-200 家族在多种肿瘤中异常表达^[17-22]。然而关于 miR-200b 在肾癌中的表达相关报道很少。本研究采用 RT-qPCR 技术检测到 miR-200b 在肾癌血清中与健康对照组相比明显呈现低表达,提示在肾癌发生发展中 miR-200b 很可能起一个抑癌基因的作用,可能抑制某种已知或者未知的转录因子,导致肾脏例行的转录过程产生变化,从而导致肾癌的发生。循环 miR-200b 的表达水平和临床病理相关参数如年龄、性别、肿瘤直径、Fuhrman 分级、肿瘤直径、TNM 分期无关,表明血清 miR-200b 表达稳定,受其他因素影

响小,miR-200b 表达水平改变可能是促使肾癌发生发展的因素之一,血清 miR-200b 下调有可能发生于肾细胞癌早期,有望作为肾癌早期分子标记物。当然也可能与纳入本研究的病例数较少有关,需要我们进一步扩大实验样本量研究验证。

综上所述,本研究为 miR-200b 在肾癌发生、发展中机制的研究提供了一个思路,下一步,我们在扩大样本量的同时,将结合生物信息技术,进行深入的机制与功能方面的研究(如下游基因的表达分析等),以期在揭示 miR-200b 在肾癌发生发展中的作用和机制上获益。

参考文献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(5):364.
- [2] Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer[J]. Nat Rev Urol, 2010, 7(5):245-257.
- [3] Azeem K, Kollarova H, Horakova D, et al. Genetic syndromes associated with renal cell carcinoma; a review[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2011, 155(3):231-238.
- [4] Xiao H, Zeng J, Li H, et al. MiR-1 downregulation correlates with poor survival in clear cell renal cell carcinoma where it interferes with cell cycle regulation and metastasis[J]. Oncotarget, 2015, 6(15):13201-13215.
- [5] Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(6):321-333.
- [6] Meng X, Müller V, Milde-Langosch K, et al. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(13):16923-16935.
- [7] Nadal E, Truini A, Nakata A, et al. A Novel Serum 4-microRNA Signature for Lung Cancer Detection[J]. Sci Rep, 2015, 5:12464.
- [8] Xu F, He H, Huang W, et al. Decreased expression of MicroRNA - 200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis[J]. Clin Transl Oncol, 2016, 18(3):283-288.
- [9] Lin XJ, Chong Y, Guo ZW, et al. A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma; a multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-

control study[J]. Lancet Oncol, 2015, 16(7):804-815.

- [10] Servin-González LS, Granados-López AJ, López JA. Families of microRNAs expressed in clusters regulate cell signaling in cervical cancer[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(6):12773-12790.
- [11] Zhu D, Pan CY, Li L, et al. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein α [J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(2):426-436.
- [12] Zhu M, Zhang N, He S, et al. MicroRNA-106a targets TIMP2 to regulate invasion and metastasis of gastric cancer[J]. FEBS Lett, 2014, 588(4):600-607.
- [13] Mathew LK, Lee SS, Skuli N, et al. Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in clear cell renal cell carcinomas enhances HIF2 α activity[J]. Cancer Discov, 2014, 4(1):53-60.
- [14] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma[J]. Nature, 2013, 499(7456):43-49.
- [15] Gilad S, Meiri E, Yagev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. PLoS One, 2008, 3:e3148.
- [16] Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers[J]. Br J Cancer, 2010, 102(7):1174-1179.
- [17] Mastron JK, Siveen KS, Sethi G, et al. Silymarin and hepatocellular carcinoma; a systematic, comprehensive, and critical review[J]. Anti-cancer Drugs, 2015, 26(5):475-486.
- [18] Roy SS, Goungunta VK, Bandyopadhyay A, et al. Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and metastasis of breast cancer[J]. Oncogene, 2014, 33(28):3707-3716.
- [19] Liu YN, Yin JJ, Abou-Kheir W, et al. MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms[J]. Oncogene, 2013, 32(3):296-306.
- [20] Wong CM, Wei L, Au SL, et al. MiR-200b/200c/429 subfamily negatively regulates Rho/ROCK signaling pathway to suppress hepatocellular carcinoma metastasis[J]. Oncotarget, 2015, 6(15):13658.
- [21] Zhu Z, Fang Z, Hu X, et al. MicroRNAs and mesenchymal stem cells; hope for pulmonary hypertension[J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2015, 30(3):380-385.
- [22] Wang B, Li M, Wu Z, et al. Associations between SOX2 and miR-200b expression with the clinicopathological characteristics and prognosis of patients with glioma[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(1):88.

收稿日期:2016-07-27 修回日期:2016-08-15 编辑:王国品

(上接第 1473 页)

- [9] 牛云茜,邓锡伟,罗建方,等. 裸金属支架结合覆膜支架修复主动脉夹层二例报道[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2013, 21(1):62-64.
- [10] Kato N, Hirano T, Shimono T, et al. Treatment of chronic aortic dissection by transluminal endovascular stent-graft placement; preliminary results[J]. J Vasc Interv Radiol, 2001, 12(7):835-840.
- [11] Palma JH, de Souza JA, Rodrigues Alves CM, et al. Self-expandable aortic stent-grafts for treatment of descending aortic dissections[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 73(4):1141-1142.
- [12] 杨帆,罗建方. 覆膜支架远端联合裸金属支架治疗 B 型主动脉

夹层效果的系统评价[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2014, 22(2):114-116.

- [13] 荆全民,王效增,韩雅玲,等. 主动脉夹层合并冠心病的联合介入治疗(附 8 例报告)[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2008, 16(2):66-69.
- [14] Jing Q, Guo L, Wang X, et al. Percutaneous transluminal intervention and antiplatelet therapy following endovascular graft exclusion for Stanford B thoracic aortic dissection[J]. Int J Cardiol, 2013, 165(3):478-482.

收稿日期:2016-07-21 修回日期:2016-08-09 编辑:周永彬