

miR-105-1 在原发性肝细胞癌中表达的研究

吴庭苗^{1,2}, 马雨水², 卢改霞², 秦珊珊², 赵腊梅², 吕中伟^{1,2}

摘要 目的 定量分析 miRNA-105-1 (miR-105-1) 在原发性肝细胞癌 (HCC) 及癌旁正常组织中表达水平的差异。方法

取患者手术新鲜组织标本 (10 对 T-N 配对组织和另外 40 例原发性肝癌组织) 提取 RNA, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测标本中 miR-105-1 基因表达量。并下载公共基因表达数据库 (GEO) 芯片数据加以验证, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算得到。结果 实验结果表明在 10 对配对的 HCC 组织中的 miR-105-1 的表达量显著低于癌旁正常组织, 差异有统计学意义 ($P=0.046$)。在 50 个 HCC 组织的表达量显著低于 10 个癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P=0.031$)。GEO 数据库芯片 GSE22058-GPL10457 中包含 96 个配对的 HCC 与癌旁正常组织, miR-105-1 在 HCC 中下调, 差异有统计学意义 ($P=0.035$)。GSE21362 中包含 73 个配对的 HCC 与癌旁正常组织, miR-105-1 在 HCC 中也是下调的, 差异有统计学意义 ($P=0.042$)。结论 miR-105-1 在原发性肝癌患者中较正常人群表达量低, 可能是 HCC 患者发生发展的重要分子之一, 并可以作为判断预后的一个指标和治疗的一个新靶点。

关键词 miR-105-1; 肝细胞癌; 表达

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)04-0542-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.017

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一类多因素异质性疾病, 近年来发病率不断升高, 由于缺乏早期诊断及有效的治疗方法, 已成为人类重要的死亡原因之一^[1-2]。miRNAs 是一类长约 18~25 个核苷酸的非编码 RNA, 可以调节 mRNA 的表达从而有效地调节各种生理过程, 包括细胞的增殖、迁移、分化和凋亡等, 每一个 miRNA 可以调节数百个或多个相应 mRNA 的 3'UTR 区^[3]。

miRNA-133、miRNA-143、miRNA-192、miRNA-

21 等已被证实为肝癌的发生发展密切相关^[4]。在许多肿瘤中如乳腺癌、前列腺癌、胶质瘤和胃癌等肿瘤中 miR-105 较正常组织表达量的差异已被学者发现^[5-8]。因此, 深入研究 miR-105 在不同肿瘤中的表达及作用有着重要的意义。Shen et al^[9] 研究发现 miR-105 在肝癌组织中低表达。其他学者并未对 miR-105 在肝癌中的表达有过报道。该文旨在研究 miR-105-1 在 HCC 中表达水平, 并用 GEO 数据库 (gene expression omnibus) 进行验证分析。

1 材料与方法

1.1 标本来源 经上海市第十人民医院伦理委员会同意, 经患者及家属签署知情同意书, 收集上海市第十人民医院 2001 年~2009 年 10 对癌组织-癌旁组织 (tumor-non-tumor, T-N) 配对的手术新鲜组织标本以及另外 40 个肝癌新鲜组织标本液氮低温保存, 年龄 41~76 岁, 中位年龄 59 岁, 肿瘤组织均经两位有经验的病理医师证实为 HCC。所有患者术前未行放化疗及其他治疗。

1.2 实验试剂 TRIzol、Real-time PCR 扩增仪 (美国 Invitrogen 公司); Prime ScriptTM RT-PCR 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); DEPC 水 (美国 Sigma 公司); 无水乙醇、氯仿、异丙醇 (上海联试化工试剂有限公司); 实时荧光定量 PCR 引物 (上海华大基因公司); 无 RNAase 枪头及 EP 管 (美国 Axygen 公司); 微量移液器、电动移液器 (美国 Eppendorf 公司)。所有实验操作按照使用说明书推荐的条件和步骤进行。

1.3 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-105-1 表达水平将研磨好的 HCC 和癌旁组织标本置于无酶 EP 管内, 按照说明书步骤用 TRIzol 提取收集细胞、肝癌组织及癌旁组织中的总 RNA, 按日本 TaKaRa 公司 PrimeScriptTM RT-PCR 试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA, 将 cDNA 保存于 -20℃。使用 Real-time PCR 扩增仪, 按日本 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq Kit 进行实验, 反应条件为步骤 1: 95℃ 预变性 2 min, 1 次循环; 步骤 2: PCR 反

2016-12-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81371595)

作者单位: ¹安徽医科大学上海临床学院核医学科, 上海 200072

²上海市第十人民医院核医学科, 上海 200072

作者简介: 吴庭苗, 男, 硕士研究生;

吕中伟, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: heyixue163@163.com

应 95 °C、30 s, 最佳退火温度 72 °C、10 s 收集荧光; 步骤 3: 熔解曲线分析 95 °C、15 s、65 °C、5 s、95 °C、15 s 荧光采集模式 40 次循环。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因表达的相对定量。上述实验重复 3 次。

1.4 基因数据来源及分析 GSE22058-GPL10457 和 GSE21362 数据集分别来自 GEO 数据库 (<http://www.Ncbi.Nlm.nih.gov/geo>)。GEO 是一个公共功能基因组数据存储库, 其支持 MIAME 兼容的数据提交并接受基于阵列和基于序列的数据, 提供了一些工具来帮助用户查询和下载的实验和策划的基因表达谱。GSE22058-GPL10457 数据库由 Julja Burchard 提交, 包括 96 个配对的 HCC 与癌旁正常组织样本; GSE21362 数据库由 Akira Myomoto 提交, 包括 73 个配对的 HCC 与癌旁组织。分别分析两个芯片数据, 分析癌组织和癌旁组织 miR-105-1 的差异表达。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理。miR-105-1 的表达量用 $\bar{x} \pm s$ 表示。独立样本用 t 检验进行组间差异分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-105-1 在 10 对 T-N 配对的表达情况 利用 RT-qPCR 检测 10 对 T-N 配对的癌和癌旁组织 miR-105-1 的含量, 结果显示 miR-105-1 在癌组织中的表达大部分是下调的(7 下调, 3 个上调, 图 1)。

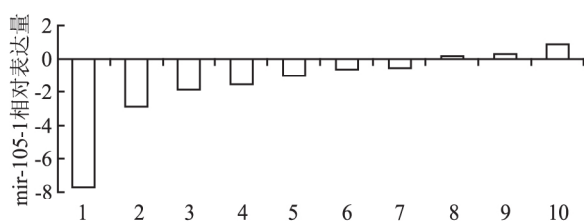


图 1 RT-qPCR 法检测 10 对 T/N 配对的 miR-105-1 含量

1~10: 分别表示 miR-105-1 在 10 对 T/N 配对的组织中的相对表达量

2.2 miR-105-1 在 10 对 T-N 配对的表达量及 50 个肝癌组织中的表达量 在 10 对 T-N 配对的 HCC 组织中的 miR-105-1 的表达量显著低于于癌旁正常组织(0.39 ± 0.04 vs 0.91 ± 0.13), 差异有统计学意义($P = 0.046$) (图 2A)。在 50 个 HCC 组织的表达量显著低于 10 个癌旁组织(0.46 ± 0.01 vs 0.91 ± 0.13), 差异有统计学意义($P = 0.031$) (图 2B)。

2.3 GEO 数据分析 在 GEO 数据分析中, GEO 数据库芯片 GSE22058-GPL10457 中包含 96 个配对的 HCC 与癌旁正常组织, miR-105-1 在 HCC 中下调(0.15 ± 0.01 vs 0.29 ± 0.03), 差异有统计学意义($P = 0.035$) (图 3A)。GSE21362 中包含 73 个配对的 HCC 与癌旁正常组织, miR-105-1 在 HCC 中也是下调的(1.26 ± 0.08 vs 2.06 ± 0.12), 差异有统计学意义($P = 0.042$) (图 3B)。

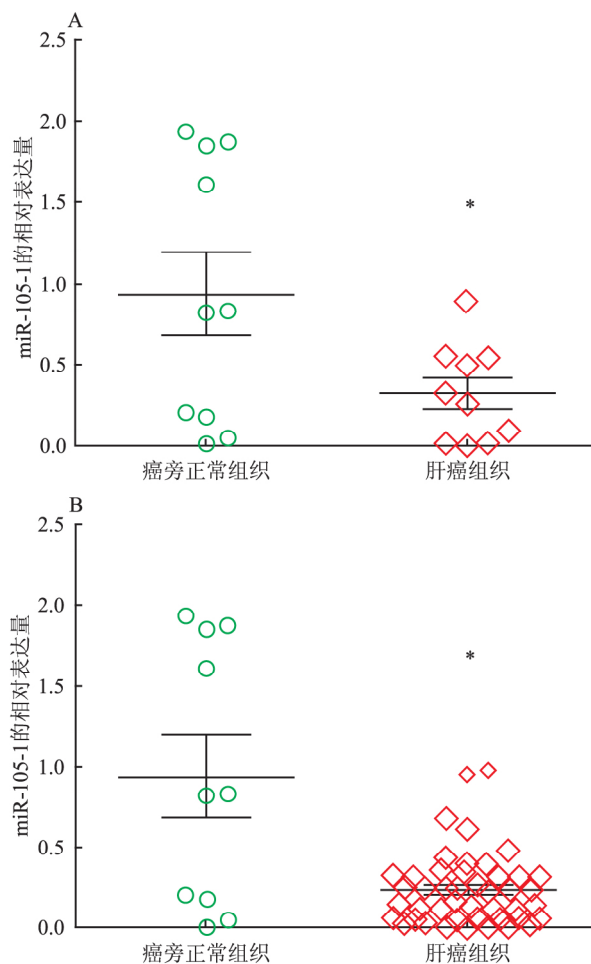


图 2 miR-105-1 在肝癌组织和癌旁正常组织的表达量

A: miR-105-1 在 10 个配对的肝癌组织和癌旁正常组织的表达量; B: miR-105-1 在 10 个癌旁正常组织和 50 个肝癌组织中的表达量; 与癌旁正常组织比较: * $P < 0.05$

3 讨论

原发性 HCC 的病因及分子发病机制尚不清楚, 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒可能是其重要病因之一^[10]。目前 AFP 检测是较为公认的诊断及疗效观察指标, 但在某些良性肝疾病中也会出现 AFP 不同程度的升高, 还有一些原发性肝癌 AFP 并不高, 所

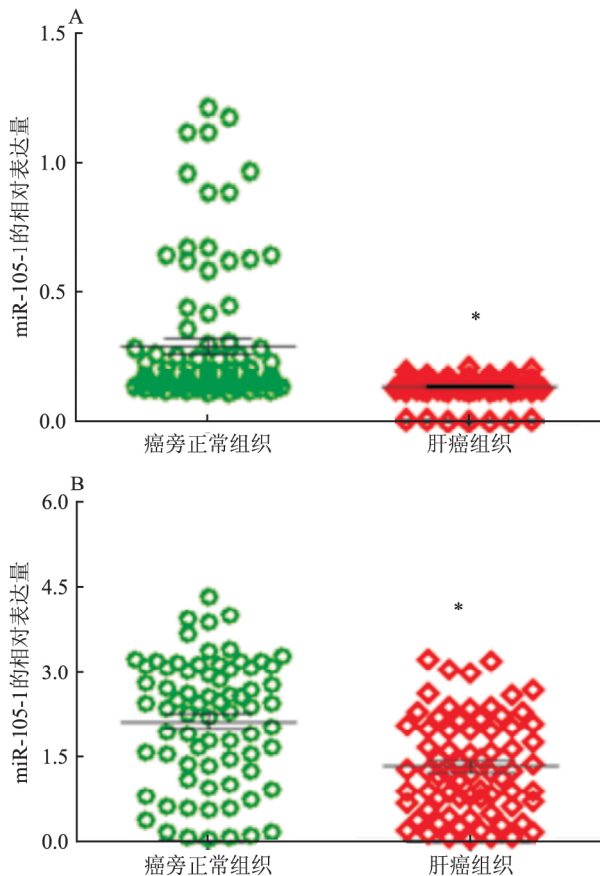


图3 两种数据集中的肝癌组织与癌旁正常组织 miR-105-1 表达
 A: GSE22058-GPL10457 数据集; B: GSE21362 数据集; 与癌旁正常组织比较: * $P < 0.05$

以 AFP 的诊断灵敏度及特异性并不理想^[11]。发现新的诊断及治疗特异性标志物非常关键。miRNAs 通过调控靶基因的表达对肿瘤的发生发展有着重要的作用。miRNAs 是判断预后的理想标记物,早期诊断肿瘤标记物及潜在的治疗靶点。在恶性肿瘤中,与 miR-105 有关的肿瘤已有相关报道,Guan et al^[12]发现与正常脑组织相比,胶质瘤中 miR-105 表达水平明显下降,并且 miR-105 表达量与胶质瘤的等级存在一定关联,提示 miR-105 的表达下调可能与神经胶质瘤发生发展及临床预后不良相关,miR-105 有望成为诊治胶质瘤新的生物标志物。在肝癌中 miRNAs 研究广泛,但 miR-105-1 与肝癌相关性研究甚少。Shen et al^[9]在 16 对 T-N 配对的肝癌组织中研究显示 miR-105 在癌组织中的是低表达的,这与本研究结果相同,还显示 miR-105 作为一个潜在的肿瘤抑癌基因,通过抑制 PI3K/AKT 信号通路调控肝癌患者肿瘤的发生发展,在今后可能作为一个潜在的治疗靶点。但一些学者的研究^[6]表明,miR-

105 在恶性肿瘤中的表达并不一直都是下调的,Liu et al^[6]研究发现在胃癌组织中,miR-105 较正常组织是高表达的,这与本研究相反,这可能与肿瘤的种类差异有关,当然在肝癌的低表达是否跟样本数量有关,由于本研究 and Shen et al^[9]的研究所纳入的样本数偏少,本研究将在今后进一步扩大样本量来加以验证。近些年,很多学者对肝癌致病相关的信号通路进行了研究^[13-14],但在肝癌中关于 miR-105 的通路研究较少,可能会成为今后研究的新方向。

在本研究中,通过收集手术中的新鲜肝癌标本及癌旁组织标本,对其进行实时荧光定量 PCR 检测,分别得到 miR-105-1 的表达量,结果显示 miR-105-1 在癌组织中的表达量低于癌旁正常组织。这说明 miR-105-1 较正常组织的低表达可能是导致肝癌发生发展的因子之一,为了进一步验证结果,通过 GEO 数据库分析,GSE22058-GPL10457 和 GSE21362 两个数据集跟本研究结果相似,都出现了 miR-105-1 在肝癌组织中是下调的,因此,根据本研究,可以推测 miR-105-1 可能成为在今后 HCC 诊断及治疗的新的分子标志物。

本研究仍然有很多问题没有得到合理的揭示,如相关分子机制及调控的靶基因等。本课题只在 miRNA 水平上探索表达量的差异,在今后的研究中将进一步扩大样本量,通过过表达、抑制、免疫组织化学、Western blot 对相关信号通路及靶基因进行更深入的研究。在此基础上研究肿瘤的发生、发展及转移的相关机制。并且对患者的预后进行进一步随访分析,对相关基因进行测序,希望能最终找到诊治中晚期 HCC 的新靶点。

综上所述,miR-105-1 可能成为 HCC 诊断及治疗的新的分子标志物,为肿瘤的精准诊断及个体化精准治疗提供依据。本研究初步探讨了 miR-105-1 在 HCC 细胞中的较正常肝细胞生物学表达量差异,为进一步研究 miR-105-1 在肝癌发生发展中的作用及其机制奠定了基础,同时也为今后在 miRNA 的生物学研究提供了一个依据,为 HCC 的分子生物学研究增添了新的方向。

参考文献

[1] Trojan J, Zangos S, Schnitzbauer A A. Diagnostics and treatment of hepatocellular carcinoma in 2016: standards and developments [J]. Visc Med, 2016, 32(2): 116-20.
 [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J].

- CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11–30.
- [3] 金吉春. microRNA 的概述及其研究[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(10): 1109–12.
- [4] Kaur K, Bhatia H, Datta M. MicroRNAs in hepatic pathophysiology in diabetes[J]. World J Diabetes, 2011, 2(10): 158–63.
- [5] Yan W, Li R, Liu Y, et al. MicroRNA expression patterns in the malignant progression of gliomas and a 5-microRNA signature for prognosis[J]. Oncotarget, 2014, 5(24): 12908–15.
- [6] Liu D, Hu X, Zhou H, et al. Identification of aberrantly expressed miRNAs in gastric cancer[J]. Gastroenterol Res Pract, 2014, 2014: 473817.
- [7] Honeywell D R, Cabrita M A, Zhao H, et al. miR-105 inhibits prostate tumour growth by suppressing CDK6 levels [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70515.
- [8] Zhou W, Fong M Y, Min Y, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis [J]. Cancer Cell, 2014, 25(4): 501–15.
- [9] Shen G, Rong X, Zhao J, et al. MicroRNA-105 suppresses cell proliferation and inhibits PI3K/AKT signaling in human hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(12): 2748–55.
- [10] Alavian S M, Haghbin H. Relative importance of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma in EMRO countries and the middle east: a systematic review[J]. Hepat Mon, 2016, 16(3): e35106.
- [11] 徐恩君, 陈秋莉, 李涛, 等. 血清 AFP、AFP-L3 联合检测在原发性肝癌中的诊断价值[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(7): 1066–70.
- [12] Guan Y, Chen L, Bao Y, et al. Identification of low miR-105 expression as a novel poor prognostic predictor for human glioma[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7): 10855–64.
- [13] Lin W, Zhong M, Yin H, et al. Emodin induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through MAPK and PI3K/AKT signaling pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncol Rep, 2016, 36(2): 961–7.
- [14] Cui S X, Shi W N, Song Z Y, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin antagonizes the effects of Sorafenib on human hepatocellular carcinoma through activation of the Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. Oncotarget, 2016, 7(24): 36767–82.

Down-regulated miR-105-1 associated with hepatocellular carcinoma patients

Wu Tingmiao^{1,2}, Ma Yushui², Lu Gaixia², et al

(¹Dept of Nuclear Medicine, Shanghai Clinical College of Anhui Medical University, Shanghai 200072; ²Dept of Nuclear Medicine, Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200072)

Abstract Objective To explore the expression level of miR-105-1 in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods**

Total RNA was extracted from 10 pairs Tumor-Non-tumor (T-N) pairing tissue samples and another 40 HCC tissue samples, real-time quantitative PCR was performed. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to quantify the expression level of miR-105-1. The gene chip data of HCC obtained from the GEO database were used to analyze the expression level of miR-105-1 in liver cancer. **Results** The results showed that the expression of HCC tissues of miR-105-1 was significantly lower than adjacent normal tissues in the 10 T-N paired tissue samples, the difference was statistically significant between the two ($P = 0.046$). Equally, the expression of HCC tissues of miR-105-1 was significantly lower in the 50 HCC tissue samples than that in 10 adjacent normal tissues, the difference was statistically significant ($P = 0.031$). The gene chip from GEO database (GSE22058-GPL10457) including 96 T-N paired HCC tissue samples suggested that miR-105-1 was down-regulated ($P = 0.035$). Another data (GSE21362) including 73 T-N paired HCC tissue samples indicated that miR-105-1 was also down-regulated ($P = 0.042$). **Conclusion** miR-105-1 is an important molecule in the progress of HCC patients. The expression level of HCC patients is lower than healthy people. It might be used as a prognostic indicator and a new target for HCC therapy.

Key words miR-105-1; hepatocellular carcinoma; expression