

miRNA-21 及 PTEN 在肺腺癌组织中的表达及意义

莫俊贤¹, 洗磊²

(1.广西医科大学第七附属医院胸心外科, 广西 梧州 543000;

2.广西医科大学第二附属医院胸心外科, 广西 南宁 530007)

摘要:目的 观察肺腺癌组织中 miRNA-21 的表达情况,为 miRNA-21 成为新的肺腺癌靶点基因提供临床依据。方法 收集自 2017 年 6 月~2019 年 6 月广西医科大学第二附属医院共 53 例肺腺癌患者的癌组织、配对癌旁组织以及 12 例非癌肺组织。采用实时荧光定量 PCR 法 (qPCR) 检测其 miRNA-21 和 PTEN 的表达情况,并分析二者的相关性。结果 肺腺癌组织中 miRNA-21 表达高于癌旁组织和非癌肺组织,其中 III~IV 期患者中高于 I~II 期患者;肺腺癌组织中 PTEN 低于癌旁组织和非癌肺组织,其中 III~IV 期患者中低于 I~II 期患者,差异有统计学意义 ($P<0.05$); miRNA-21 和 PTEN 的表达呈负相关 ($r=-0.663$, $P<0.05$)。结论 miRNA-21 在肺腺癌组织中抑制了 PTEN 的表达,miRNA-21 极有可能成为肺腺癌的治疗靶点。

关键词:肺腺癌;miRNA-21;PTEN;实时荧光定量 PCR

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.09.022

文章编号:1006-1959(2020)09-0077-03

Expression and Significance of miRNA-21 and PTEN in Lung Adenocarcinoma

MO Jun-xian¹, XIAN Lei²

(1.Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the Seventh Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Wuzhou 543000, Guangxi, China;

2.Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, Guangxi, China)

Abstract: Objective To observe the expression of miRNA-21 in lung adenocarcinoma tissues and provide a clinical basis for miRNA-21 to become a new target gene for lung adenocarcinoma. Methods From June 2017 to June 2019, 53 cases of lung adenocarcinoma patients' cancer tissues, paired paracancerous tissues and 12 cases of non-cancer disease lung tissues were collected from the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of miRNA-21 and PTEN, and to analyze the correlation between the two. Results The expression of miRNA-21 in lung adenocarcinoma tissues was higher than that in paracancerous tissues and non-cancerous lung tissues. Among them, stage III to IV patients were higher than those in stage I to II patients; PTEN in lung adenocarcinoma tissues was lower than that in paracancerous tissues and noncancerous lung tissues. Among them, the patients in stage III to IV were lower than those in stage I to II, the difference was statistically significant ($P<0.05$); the expression of miRNA-21 and PTEN was negatively correlated ($r=-0.663$, $P<0.05$). Conclusion miRNA-21 inhibits the expression of PTEN in lung adenocarcinoma tissues. miRNA-21 is very likely to be a therapeutic target for lung adenocarcinoma.

Key words: Lung adenocarcinoma; miRNA-21; PTEN; Real-time fluorescence quantitative PCR

近年来,肺癌的发病率一直高居各种恶性肿瘤中首位,并呈上升趋势,每年在全球范围内造成近 200 万人死亡,其中腺癌已成为肺癌中最常见的病理类型^[1]。虽然针对不同靶点基因的多种靶向药物的广泛应用,使得肺腺癌的患者五年生存率有所上升,但总体生存率依然不高,因此寻找潜在的新的基因靶点有助于进一步改善患者预后。miRNA 是近年来新发现的广泛存在于真核生物中的一类非编码小分子 RNA,长度约为 18~25 个核苷酸,其参与许多细胞生物学过程中的发育、代谢、生存、分化、增殖、凋亡和免疫应答等过程^[2]。相关研究结果表明^[3-5],在胃癌、前列腺癌、乳腺癌等患者中,miRNA 能够调控抑癌基因第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10, PTEN)的表达,然而在肺腺癌患者中的 miRNA 与 PTEN 关系研究相对较少。本研究采

用实时荧光定量 PCR(qPCR)法检测 miRNA-21 与 PTEN 在肺腺癌患者的肺癌组织、癌旁组织(距离癌组织>5 cm)、非癌肺组织中的表达情况,进一步证实肺腺癌中 miRNA-21 与 PTEN 的关系,以期能为 miRNA-21 成为肺腺癌的靶点基因提供临床实验证据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集自 2017 年 6 月~2019 年 6 月广西医科大学第二附属医院通过手术切除的未经术前放、化疗的原发性肺腺癌 53 例,以及同期患肺部良性疾病切除的非癌肺组织标本 12 例,其中支气管扩张 3 例,炎性假瘤 6 例,结核球 3 例。肺癌患者男 33 例,女 20 例,年龄 39~78 岁,平均年龄(55.32 ± 8.91)岁;非肺癌患者男 8 例,女 4 例,年龄 28~65 岁,平均年龄(46.78 ± 13.13)岁。肺癌患者与非肺癌患者性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会同意,并同患者的家属签署相关知情同意书。

作者简介:莫俊贤(1988.3-),男,广西梧州人,博士研究生,主治医师,主要从事肺癌的精准治疗研究

1.2 方法

1.2.1 资料收集 肺腺癌患者取手术切除的肿瘤组织以及其相对应的距离癌组织边缘>5 cm 的癌旁组织,非肺癌患者组中取相应病变组织标本。所有标本均在离体后 30 min 内放置-80℃冰箱中保存。

1.2.2 qPCR 检测 miRNA-21 及 PTEN mRNA 的表达 使用 mRNA 提取试剂盒(购自 TIGEN 公司)按照说明书步骤严格在低温环境下提取标本的总 mRNA,用分光仪根据 D260/D280 的比值来评估所提取 mRNA 的质量,并通过测定值计算 mRNA 的浓度。将提取的 mRNA 根据浓度稀释配比后采用逆转录试剂盒(TIGEN 公司)逆转录成 cDNA。最后采用 SuperReal 荧光定量预混试剂增强版(TIANGEN 公司)qPCR 技术检测标本中的 miRNA-21 及 PTEN mRNA 的表达量,引物及内参均由武汉金开瑞生物工程有限公司设计并合成。miRNA-21 forward:5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3';reverse:5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'。PTEN forward:5'-ACCCACCACAGCTAGAACTT-3';reverse:5'-GGGAATAGTTACTCCCTTTTGTGTC-3'。GAPDH 引物序列:forward:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3',reverse:5'-GAAGATGGTGTGGGATTTC-3'。反应条件:95℃预变性 2 min,94℃变性 20 s,53℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环,内参基因为 GAPDH。所有试验均独立重复 3 次,反应结束后,保存溶解曲线、扩增曲线及对应 Ct 值(达到阈值循环数)。mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,计算公式为: $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{目的基因}} - \Delta Ct_{\text{对照组目的基因}}$; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因的相对表达量。

1.3 观察指标 分析不同组织中 miRNA-21 及 PTEN

mRNA 的表达情况、比较肺腺癌患者不同临床特征 miRNA-21 及 PTEN mRNA 的表达情况及肺腺癌组织中 miRNA-21 与 PTEN 的表达的相关性。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用 *t* 检验,两指标间的相关性经 Spearman 秩相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织中 miRNA-21 及 PTEN 的 mRNA 表达情况 肺腺癌组织中的 miRNA-21 表达量高于癌旁组织和非癌肺组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);但癌旁组织与非癌肺组织 miRNA-21 表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。肺腺癌组织中的 PTEN 表达量低于癌旁组织和非癌肺组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);但癌旁组织与非癌肺组织 PTEN 表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 不同组织中 miRNA-21 及 PTEN mRNA 的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miRNA-21 mRNA	PTEN mRNA
肺腺癌组织	53	5.92±0.22 [*]	4.38±0.46 [#]
癌旁组织	53	4.03±0.28	6.77±0.66
非癌肺组织	12	3.80±0.43	6.98±0.38

注:与癌旁组织比较,^{*} $P < 0.05$;与非癌组织比较,[#] $P < 0.05$

2.2 肺腺癌患者不同临床特征 miRNA-21 及 PTEN mRNA 的表达情况比较 不同年龄、性别、病理分化程度患者 miRNA-21 和 PTEN 表达分别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);miRNA-21 的表达在Ⅲ~Ⅳ期的肺腺癌患者的表达量高于Ⅰ~Ⅱ期患者,PTEN 的表达在Ⅲ~Ⅳ期的肺腺癌患者的表达量低于Ⅰ~Ⅱ期患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 肺腺癌组织中 miRNA-21、PTEN mRNA 的表达量($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	miRNA-21	t	P	临床特征	n	PTEN	t	P
年龄(岁)					年龄(岁)				
≤60	32	3.73±0.69	0.384	0.703	≤60	32	12.67±1.56	0.255	0.800
>60	21	3.81±0.74			>60	21	12.41±0.86		
性别					性别				
男	33	3.77±0.69	0.671	0.505	男	33	13.24±0.10	0.845	0.402
女	20	3.91±0.83			女	20	12.72±0.37		
病理分化程度					病理分化程度				
低-中分化	29	3.84±0.76	0.153	0.879	低-中分化	29	13.26±0.98	1.250	0.217
高分化	24	3.81±0.74			高分化	24	12.17±1.08		
TNM 分期					TNM 分期				
Ⅰ~Ⅱ期	41	3.52±0.62	2.139	0.037	Ⅰ~Ⅱ期	41	15.83±0.15	13.82	0.000
Ⅲ~Ⅳ期	12	3.97±0.76			Ⅲ~Ⅳ期	12	12.50±0.39		

2.3 肺腺癌组织中 miRNA-21 与 PTEN 的表达的相关性分析 Spearman 秩相关分析结果显示,肺腺癌组织中 miRNA-21 与 PTEN 的表达呈负相关关系($r=-0.663, P<0.05$)。

3 讨论

肺癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,目前肺癌已成为肺癌中最常见病例类型,大部分肺腺癌患者以根治手术治疗为主,其余治疗手段包括化疗、放疗、靶向治疗及生物治疗等为辅助治疗的综合治疗,如近年来 EGFR、ALK 等靶向基因的逐步明确,各种针对靶向基因的靶向药物在世界范围内得到广泛开展,但由于服药后肿瘤细胞的基因突变导致各种耐药性的产生,目前患者的总体的生存率仍偏低^[6,7]。因此,寻找另外的肺癌靶向位点将有助于改善患者的预后。

PTEN 是迄今为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,PTEN 基因编码的蛋白具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶双重特异性磷酸酶活性,与肿瘤发生密切相关^[8]。同时,异常的细胞增殖是肿瘤生物学的一个重要特征,而 miRNA 在调节细胞的增殖、分化、凋亡方面起重要作用^[2]。目前已发现的 miRNAs 约有 700 余种,miRNA-21 是其中一个重要的 miRNA 分子,最近研究发现 miRNA-21 在多种肿瘤组织中的呈现高表达,如乳腺癌、结肠癌、脑膜瘤等^[9-11]。本研究中肺腺癌组织中的 miRNA-21 表达量高于癌旁组织和非癌肺组织,PTEN 表达量低于癌旁组织和非癌肺组织,差异有统计学意义($P<0.05$);但癌旁组织与非癌肺组织 miRNA-21、PTEN 表达量分别比较,差异无统计学意义($P>0.05$),与上述研究一致。但 miRNA-21 和 PTEN 在肺腺癌中的表达水平及两者间的关系的研究报道较少。

本研究肺腺癌组织中的 miRNA-21 呈高表达水平,PTEN 呈低表达水平,且 miRNA-21 与 PTEN 的表达呈负相关关系($r=-0.663, P<0.05$),提示肺腺癌组织中 miRNA-21 的表达上调有可能在某个通路上抑制了 PTEN 的表达,PTEN 的表达降低导致肿瘤细胞凋亡的功能下降,从而促进了肿瘤细胞的增殖和转移。考虑为 miRNA-21 序列与 PTEN 基因 mRNA 3'-UTR 区的互补性结合,导致转录后翻译抑制,从而调控 PTEN 基因的表达,提示 miRNA-21 可能主要在翻译水平调控 PTEN 基因的表达,PTEN 基因可能是 miRNA-21 的靶基因^[12]。本研究进一步发现,miRNA-21 及 PTEN 的表达与临床分期有关,临床分期越晚,miRNA-21 的表达水平越高,而 PTEN 的表达水平越低,但二者表达与患者

的性别、年龄以及病理分化程度无关,提示 miRNA-21 与肺腺癌中的远处转移及侵袭能力可能相关。因此,本研究提示 miRNA-21 可能成为肺腺癌的潜在靶点。

综上所述,在肺腺癌组织中,miRNA-21 与 PTEN 表达水平呈负相关,miRNA-21 的高表达可通过在翻译水平下调 PTEN 的表达,从而促进了肿瘤细胞的增殖和转移,因此 miRNA-21 极有可能成为肺腺癌的潜在治疗靶点。

参考文献:

- [1]Siegel RL,Miller KD,Jemal A.Cancer statistics,2016 [J].CA Cancer J Clin,2016,66(1):7-30.
- [2]Hosseinahli N,Aghapour M,Duijff PHG,et al.Treating cancer with microRNA replacement therapy:A literature review [J].Journal of Cellular Physiology,2018,233(8):5574-5588.
- [3]Hu M,Zhu S,Xiong S,et al.MicroRNAs and the PTEN/PI3K/Akt pathway in gastric cancer (Review) [J].Oncol Rep,2019,41(3):1439-1454.
- [4]Luo B,Kang N,Chen Y,et al.Oncogene miR-106a promotes proliferation and metastasis of prostate cancer cells by directly targeting PTEN in vivo and in vitro [J].Minerva Medica,2018,109(1):24.
- [5]Li N,Miao Y,Shan Y,et al.MiR-106b and miR-93 regulate cell progression by suppression of PTEN via PI3K/Akt pathway in breast cancer[J].Cell Death and Disease,2017,8(5):e2796.
- [6]Liu X,Wang P,Zhang C,et al.Epidermal growth factor receptor (EGFR):A rising star in the era of precision medicine of lung cancer[J].Oncotarget,2017,8(30):50209-50220.
- [7]Du X,Shao Y,Qin HF,et al.ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC) [J].Thorac Cancer,2018,9(4):423-430.
- [8]Naderali E,Khaki AA,Rad JS,et al.Regulation and modulation of PTEN activity [J].Molecular Biology Reports,2018,45(6):2869-2881.
- [9]Han JG,Jiang YD,Zhang CH,et al.A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer[J].Ann Surg Treat Res,2017,92(2):55-66.
- [10]Feiersinger F,Nolte E,Wach S,et al.MiRNA-21 Expression Decreases from Primary Tumors to Liver Metastases in Colorectal Carcinoma[J].PLoS One,2016,11(2):e0148580.
- [11]Katar S,Baran O,Evrans S,et al.Expression of miRNA-21, miRNA-107,miRNA-137 and miRNA-29b in meningioma [J].Clinical Neurology&Neurosurgery,2017(156):66-70.
- [12]Dai L,Chen F,Zheng Y,et al. miR-21 regulates growth and EMT in lung cancer cells via PTEN/Akt/GSK3 β signaling [J].Front Biosci (Landmark Ed),2019(24):1426-1439.

收稿日期:2020-02-18;修回日期:2020-02-25

编辑/肖婷婷