

- gets, 2008, 12 (3) : 313 - 326
- 6 Alatrakchi N, Kzie M. Regulatory T cells and viral liver disease. *Journal of Viral Hepatitis*, 2009, 16: 223 - 229
- 7 传染病与寄生虫学会. 病毒性肝炎防治方案, 中华传染病杂志. 2001, 19: 52 - 62
- 8 Maloy KJ, Salaun L, Cahill R. CD4⁺ CD25⁺ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine - dependent mechanisms. *J Exp Med*, 2003, 197 (1) : 111 - 119
- 9 Seddiki N, Santner - Nanan B, Martinson J, *et al.* Expression of interleukin (IL) - 2 and IL - 7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*, 2006, 203 (7) : 1693 - 1700
- 10 Liu W, Putnam AL, Xu - Yu Z, *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *J Exp Med*, 2006, 203 (7) : 1701 - 1711
- 11 Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA, *et al.* Autocrine release of TGF - beta by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett*, 2004, 559: 107 - 110
- 12 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1655 - 1669
- 13 Chen W, Jin W, Hardegen N, *et al.* Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ naive T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF - beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 2003, 198: 1875 - 1886
- 14 Von Borhmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*, 2005, 6: 338 - 344
- 15 Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, *et al.* Ito cells are liver - resident antigen - presenting cells for activating T cell responses. *Immunity*, 2007, 26: 117 - 129

(收稿: 2010 - 12 - 09)

(收稿: 2011 - 07 - 05)

miR - 199a 在宫颈癌及宫颈上皮内瘤样病变中的表达及意义

邹阮敏 胡 芝 陈 昊 张丽芳 张文森 薛向阳 黄引平

摘 要 **目的** 探讨 miR - 199a 在宫颈癌及宫颈上皮内瘤样病变 (CIN) 中的表达情况及与宫颈癌各种临床病理特征的关系。**方法** 采用茎环 Realtime RT - PCR 方法检测 48 例宫颈癌、12 例 CIN 及正常宫颈组织中 miR - 199a - 3p 和 miR - 199a - 5p 的表达, 分析 miR - 199a - 3p 和 miR - 199a - 5p 表达与宫颈癌常见的临床病理特征的关系。**结果** 用茎环 Realtime RT - PCR 方法检测 miR - 199a - 3p 和 miR - 199a - 5p 表达的敏感性和特异性良好; miR - 199a - 3p 和 miR - 199a - 5p 在宫颈癌及 CIN 组织中的表达低于非肿瘤组织, 差异性显著 ($P < 0.05$), miR - 199a - 5p/miR - 199a - 3p 表达比值未见明显差异 ($P = 0.219$)。其中 miR - 199a - 5p 的表达与宫颈癌的组织分化程度存在一定相关性。小细胞型 (Ⅲ级) 宫颈癌的 miR - 199a - 5p 表达低于其他组织分化类型的标本 ($P = 0.054$)。miR - 199a - 3p 和 miR - 199a - 5p 的表达与年龄、肿块大小、大体类型、病理类型及 FIGO 分期未见显著相关性 ($P > 0.05$)。**结论** miR - 199a - 3p 和 miR - 199a - 5p 在宫颈癌及 CIN 组织中的表达显著低于正常宫颈组织。miR - 199a - 5p 的表达与肿瘤的分化程度存在一定相关性。miR - 199a 在宫颈癌组织中的异常表达, 可能在宫颈癌的发生和发展过程中发挥重要作用, 有望成为宫颈癌新的治疗靶点。

关键词 miRNA miR - 199a 宫颈癌 宫颈上皮内瘤样病变 (CIN)

Clinical Significance of miR - 199a Expression in Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia. Zou Ruanmin, Hu Zhi, Chen Hao, Zhang Lifang, Zhang Wenmiao, Xue Xiangyang, Huang Yinping. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To explore the expression of miR - 199a in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and study its association with clinicopathologic features of cervical cancer. **Methods** The expression levels of miR - 199a - 3p and miR - 199a - 5p in 48 cervical cancer, 12 CIN and 20 non - tumor tissue specimens were examined by stem - loop real - time RT - PCR. The correlations between the expression levels of miR - 199a - 3p and miR - 199a - 5p and related clinicopathologic features of cervical cancer

基金项目: 温州市科技局资助项目 (Y20090103); 浙江省教育厅基金资助项目 (Y200907403)

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院妇产科 (邹阮敏、张文森、黄引平); 325000 温州医学院定理临床学院妇瘤科 (胡芝); 325035 温州医学院微生物学与免疫学教研室 (陈昊、张丽芳、薛向阳)

通讯作者: 薛向阳, 电子信箱: wzxy@yahoo.cn; 黄引平, 电子信箱: yphuangp@126.com

(age, tumor size, general type, pathological type, tissue differentiation, FIGO stage) were further analyzed. **Results** The stem-loop RT realtime-PCR was sensitive and specific enough to detect miR-199a-3p and miR-199a-5p. Expression of miR-199a-5p and miR-199a-3p in cervical cancer and CIN tissues was obviously lower than that in the non-tumor tissue specimens ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in ratio of the miR-199a-5p / miR-199a-3p expression ($P = 0.219$). Expression of miR-199a-5p was associated with tissue differentiation in cervical cancer. The expression of miR-199a-5p in low differential cervical cancer was lower than that in middle- and high-differential tissues ($P = 0.054$). No significant association was found between miR-199a-5p and miR-199a-3p levels and other clinicopathologic features of cervical cancer, such as age, size of tumor, general type, pathological type, FIGO stage. **Conclusion** Expression levels of miR-199a-3p and miR-199a-5p in cervical cancer and CIN tissues are significantly lower than in normal cervical tissues. Low-regulated expression of miR-199a-5p was associated with tissue differentiation of cervical cancer. These data indicated that miR-199a may play an important role in the development of cervical cancer and be a novel potential therapeutic target for cervical cancer.

Key words miRNA; miR-199a; Cervical cancer; Cervical intraepithelial neoplasia (CIN)

microRNA (miRNA) 是一类短的 (~22nt)、内源性的、在转录后水平调控基因表达的非编码 RNA^[1]。许多肿瘤已发现 miRNA 失调表达,在肿瘤的发生发展中起着关键的调控作用^[2]。宫颈癌是女性发病率占第2位的恶性肿瘤。miRNA 与宫颈癌的相关研究迄今仅约20篇文献报道。最近发现 miR-199a 在肿瘤组织存在明显差异表达,提示参与肿瘤发生发展。但 miR-199a 在不同癌组织存在上调/下调不一致表达现象^[3~6]。在宫颈癌研究中不同学者研究结果也不一致^[7,8]。另外,miR-199a 与宫颈癌诸多临床病理特征的关系少有研究。为此,本研究通过茎环 Realtime RT-PCR 检测 48 例宫颈癌组织、12 例宫颈上皮内瘤样病变 (CIN) 及 20 例正常宫颈组织 miR-199a-3p 和 miR-199a-5p 的表达,并分析其表达与宫颈癌临床病理特征的关系,探讨在宫颈鳞癌发生、发展中可能的调控作用及临床意义。

材料与方法

1. 实验材料: Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTPs、SYBR Mastermix 等购自 Toyobo; 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

2. 标本采集: 48 例宫颈鳞癌组织取自温州市第二人民医院 2009 年 1~9 月间的手术患者,均未行放、化疗。患者年龄 31~72 岁,中位年龄 49.6 岁。肿瘤直径 <4cm 19 例, ≥4cm 29 例。肿瘤类型: 外生型 19 例,内生型 15 例,溃疡型 10 例,颈管型 4 例。病理分级: G₁ 10 例, G₂ 14 例, G₃ 24 例。临床分期: 按国际妇产科联盟 (FIGO) 的分期标准, I 期 8 例, II 期 26 例, III~IV 期 14 例。12 例 CIN 患者年龄 28~61 岁,中位年龄 47.3 岁。其中 CIN I 级 2 例, CIN II 级 5 例, CIN III 级 5 例。另取同期年龄匹配的子宫肌瘤手术的正常宫颈组织 20 份做对照。标本离体后 30min 内置于液氮保存。宫颈癌、CIN 诊断及常规病理资料由两位病理医师盲法阅片后提供。

3. 总 RNA 的提取: 取液氮保存的组织标本,在液氮中碾碎至粉状,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, DEPC 处理水溶解 RNA。为增加小 RNA 得率,将异丙醇沉淀步骤改为 -20℃ 沉淀 2h 以上。检测 RNA 溶液 OD260 及 OD280 吸光值,计算 RNA 浓度和纯度, OD260/OD280 比值 >1.8 方可用于检测。1% 琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

4. 茎环 RT-qPCR 检测 miR-199a 表达: 根据已报道的茎环 RT-qPCR 方法,以 U6 作为内参,分析 miR-199a-5p、miR-199a-3p 表达^[9,10]。表 1 为相关分析的引物序列。1μg 总 RNA 分别以 miR-199a-5p 和 miR-199a-3p 茎环反转录引物进行反转录。为准备定量 PCR 内参模板 cDNA,用相同的总 RNA 标本以 U6 RT 引物为反转录引物进行反转录。反转录反应体系为 1 μg 总 RNA, 50nmol/L miRNA 茎环 RT 引物 (或 U6 RT 引物), 2U RNase inhibitor, 5U M-MLV 反转录酶、0.5μmol/L dNTP。反应条件为: 16℃ 30min, 42℃ 30min, 75℃ 15min, 反应结束后 -20℃ 保存。以 15μl 反应体系进行 Real-time 定量 PCR。miRNA 检测反应体系包括: 1μl RT 产物, 1× SYBR Green I Mastermix, 0.5μmol/L miRNA 特异前向引物、0.5μmol/L 反向引物。Real-time 定量 PCR 条件为: 95℃ 10min 后, 95℃ 15s, 60℃ 1min, 40 循环。Real-time 定量 PCR 使用 Applied Biosystems 7500 仪器进行。所有样品做 3 复孔。PCR 产物经 8% PAGE 电泳分析。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的域值时所经历的循环数即 Ct 值,以 U6 作为内参照,采用定量 PCR 中的相对定量法,以 $N = 2^{-\Delta Ct}$ 表示目的 miRNA 的表达相对于内参的变化倍数,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{U6}}$ 。为增加数据直观性,所有数据均放大 1000 倍。

5. 统计学处理: 由于 miR-199a-5p 和 miR-199a-3p 的表达数据呈非正态分布,故以中位数和四分位数间距表示。采用 SPSS 16.0 统计软件的非参数秩和检验进行统计处理。两组间差异分析采用 Mann-Whitney U 检验,3 组及以上差异表达分析采用 Kruskal-Wallis H 检验,取 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 miRNA 茎环 RT 实时 PCR 检测相关引物序列

引物		序列	PCR (bp)
miR - 199a - 5p	RT stem - loop primer	5' - TCAACTGCTGTCCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGAACAGGT - 3'	66
	Forward primer	5' - TCCAGCTGGGCCCACTGTTCACTAC - 3'	
	reverse primer	5' - GTGTCGTGGAGTCGGCAATTC - 3'	
miR - 199a - 3p	RT stem - loop primer	5' - TCAACTGCTGTCCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACCAATG - 3'	66
	Forward primer	5' - ACACCAGCTGGGTACAGTAGTCTGCACA - 3'	
	reverse primer	5' - GTGTCGTGGAGTCGGCAATTC - 3'	
U6	RT stem - loop primer	5' - CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT - 3'	101
	Forward primer	5' - GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT - 3'	
	reverse primer	5' - CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT - 3'	

结 果

1. 宫颈鳞癌、CIN 及正常宫颈组织 miR - 199a - 5p 及 miR - 199a - 3p 的表达: 如 miR - 199a - 5p 和 miR - 199a - 3p 及 U6 的 realtime PCR 产物溶解曲线均为单峰, 8% PAGE 电泳显示 PCR 产物为单一条带, 说明茎环 RT - PCR 扩增相应的目的基因(图 1)。以 U6 为内参, 宫颈鳞癌组织中 miR - 199a - 5p 和 miR - 199a - 3p 的相对表达量 (N = 2 - ΔCt) 分别为 0.68 (0.43, 1.97) 和 2.91 (1.90, 6.55), CIN 组织分别为 0.87 (0.56, 1.94) 和 3.87 (1.99, 7.26), 正常宫颈组织分别为 2.80 (1.75, 4.43) 和 12.92 (6.23, 17.95) (图 2)。采用非参数秩和检验, 宫颈鳞癌及 CIN 与正

常宫颈组织的 miR - 199a - 5p 和 miR - 199a - 3p 表达差异有显著性 (P 均 < 0.05), 宫颈鳞癌与 CIN 组织的 miR - 199a - 5p 和 miR - 199a - 3p 表达差异无显著性 (P 值分别为 0.566 和 0.679), 提示同一前体起源的 miR - 199a - 5p 与 miR - 199a - 3p 在从正常宫颈向 CIN 及宫颈癌转变过程中表达下调。进一步分析 miR - 199a - 5p 与 miR - 199a - 3p 表达比值发现, miR - 199a - 5p/miR - 199a - 3p 表达比值在宫颈鳞癌、CIN 及正常宫颈组织分别为 0.25 (0.22, 0.28)、0.26 (0.22, 0.30) 及 0.24 (0.21, 0.27), 差异无统计学意义 (P = 0.219)。

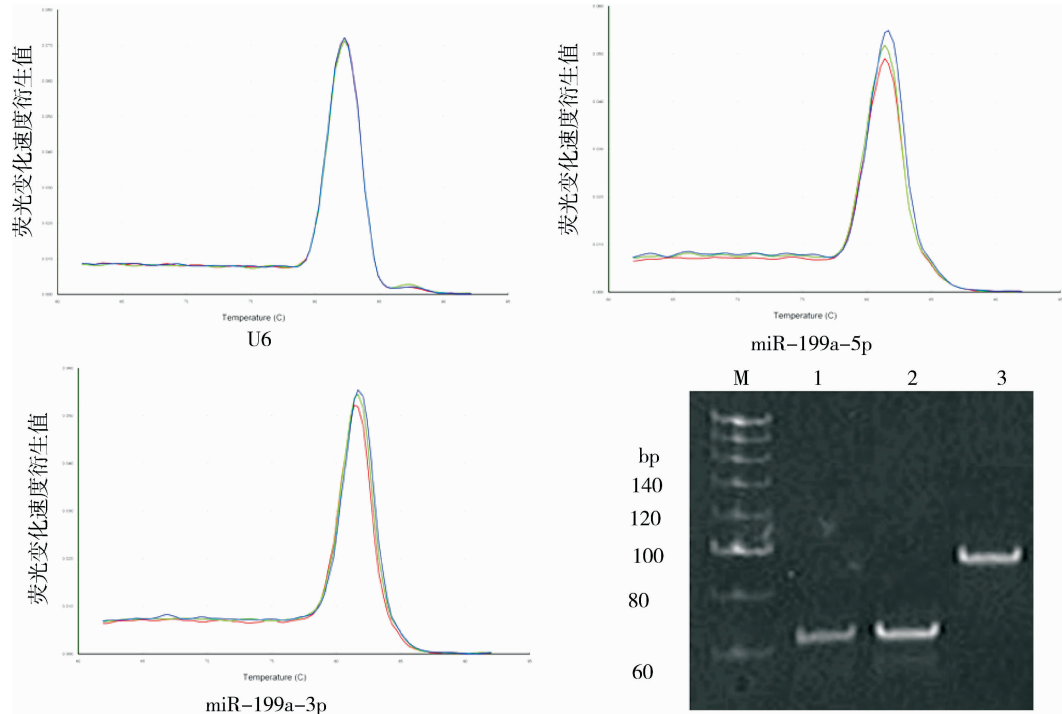


图 1 miR - 199a - 3p、miR - 199a - 5p 及 U6 内参 Real - time PCR 溶解曲线和 8% PAGE 电泳图
右下角的图为 8% PAGE 电泳。M. DNA 相对分子质量标记, 泳道 1、2、3 分别为 miR - 199a - 3p、miR - 199a - 5p 和 U6

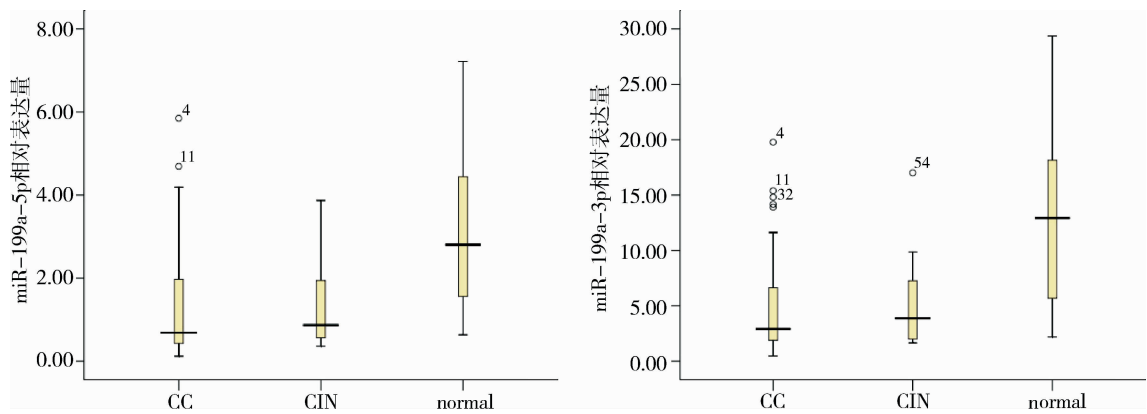


图2 宫颈鳞癌、CIN及正常宫颈组织中miR-199a-3p及miR-199a-5p表达水平
图中数字代表该组数据中变异较大的标本

2. 不同临床病理特征的宫颈鳞癌组织中miR-199a-5p与miR-199a-3p表达:不同病理分级的宫颈鳞癌组织中miR-199a-5p的表达存在一定差异($P=0.054$),宫颈鳞癌G₃组织中miR-199a-5p的表达量低于G₁、G₂组织;而miR-199a-3p在不

同病理分级的宫颈鳞癌组织中差异不显著($P=0.107$);不同年龄、肿瘤直径、肿瘤类型及临床分期的宫颈鳞癌组织中miR-199a-5p、miR-199a-3p表达量的比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)(表2)。

表2 宫颈癌中miR-199a-5p与miR-199a-3p表达和临床病理因素的相关性分析

临床病理因素		<i>n</i>	miR-199a-5p的表达*	<i>P</i>	miR-199a-3p的表达*	<i>P</i>
年龄	<40岁	9	0.83(0.60,1.96)	0.395	3.32(2.51,7.27)	0.394
	40~60岁	25	0.58(0.34,1.89)		2.53(1.40,6.07)	
	>60岁	14	0.63(0.53,1.98)		2.92(1.93,6.38)	
肿瘤直径	<4cm	19	0.68(0.43,1.88)	0.712	2.73(1.87,7.06)	0.728
	≥4cm	29	0.82(0.47,1.97)		3.32(1.90,6.46)	
肿瘤类型	外生型	19	0.63(0.40,1.74)	0.675	2.84(1.74,6.60)	0.685
	内生型	15	0.87(0.57,1.92)		4.22(2.57,5.95)	
	溃疡型	10	0.61(0.45,1.63)		2.50(1.89,6.48)	
	颈管型	4	1.76(1.03,2.71)		6.35(4.55,8.99)	
病理分级	G ₁	10	0.76(0.58,2.88)	0.054	3.42(2.50,9.74)	0.107
	G ₂	14	0.85(0.64,1.97)		3.86(2.53,6.44)	
	G ₃	24	0.55(0.38,1.44)		2.32(1.54,5.56)	
临床分期	I期	8	1.19(0.65,2.17)	0.539	5.41(2.61,8.70)	0.542
	II期	26	0.75(0.44,1.73)		3.01(1.93,5.81)	
	III~IV期	14	0.60(0.42,2.00)		2.69(1.72,7.15)	

* miR-199a-3p及miR-199a-5p的表达水平以中位数和四分位间距表示

讨 论

miRNA(microRNA)是近年来在多种真核细胞和病毒中发现的一类非编码蛋白的短序列(21~23个核苷酸)RNA片段,其转录前体(Pri-miRNA)在核内被RnaseⅢ核酸酶Drosha加工成约70个核苷酸长的发夹状的RNA,在Exportin5的帮助下从核内进入胞质,然后在Dicer酶的作用下,单链的miRNA进入一个核糖蛋白复合体miRNP。miRNA通过与靶基因的3'UTR区互补配对,指导miRNP复合体对靶基因

mRNA进行切割或者翻译抑制,起着调控基因功能的作用,在肿瘤的发生过程中可作为肿瘤抑制或促进因子发挥枢纽调控效应^[1, 11, 12]。

miR-199a是座落于DNM2基因16号内含子的miRNA,前体结构中的miR-199a-5p为通常称谓的miR-199a,而miR-199a-3p即为miR-199a*。最近研究显示,miR-199a-5p和miR-199a-3p在许多肿瘤组织存在明显差异表达。但不同的肿瘤组织miR-199a-5p、miR-199a-3p存在上调/下调

不一致表达现象。Ichimi T 等^[3]研究发现, miR - 199a - 3p 在膀胱癌组织中表达明显下调, 发挥抑癌的效应, 其靶基因为 Keratin7 (KRT7)。Murakami 等^[6]的结果显示 miR - 199 - 5p、miR - 199a - 3p 在肝细胞癌中的表达低于正常组织, 且表达水平与肝细胞癌的分化程度呈负相关。Nam EJ 等^[4]的研究也发现严重卵巢癌组织中 miR - 199a 表达下调与预后相关。但 Song G 等^[5]的研究显示胃癌组织 miR - 199a 表达上调。不同肿瘤组织 miR - 199a - 5p 及 miR - 199a - 3p 表达不一致可能的原因之一是 miR - 199a 和染色体重构复合体 SWI/SNF 的亚单位 Brm 通过 Egr1 双负反馈环导致不同类型肿瘤 miR - 199a 表达的不一性^[13]。但是在宫颈癌组织, 不同学者的研究结果也不一致。

Lee JW 等^[7]报道宫颈癌组织 miR - 199a - 5p 及 miR - 199a - 3p 表达上调, 下调 miR - 199a 表达抑制宫颈癌细胞增殖。然而, Pereira PM 等^[8]研究显示, miR - 199a 在宫颈癌组织表达下调。分析其原因, 除了 miR - 199a - Brm 双负反馈调节外, 选择不同内参也是导致不同结果的原因。Lee JW 等采用的是 let - 7a 作为内参, Pereira PM 等采用是 U6 作为内参。已有文献报道 let - 7a 在宫颈癌及非癌组织存在差异表达^[14]。为此, 本研究采用 U6 作为内参进行分析。结果表明 miR - 199a - 3p 和 miR - 199a - 5p 在宫颈癌及 CIN 组织均明显下调表达。提示 miR - 199a - 3p 和 miR - 199a - 5p 作为抑癌基因发挥效应。

由于绝大多数 pre - miRNA 进入胞质后被 Dicer 加工成短暂存在的长度约 22nt 的类似于 siRNA 双链 miRNA。双链 miRNA 解开后, 自于 pre - miRNA 一条臂的成熟 miRNA 进入 RISC 中, 发挥效应。pre - miRNA 的另外一条臂产生一个长度与 miRNA 相同的片段 - miRNA* 常被降解^[1]。本研究结果显示, 不管是宫颈癌、CIN 还是正常宫颈组织 miR - 199a - 5p/miR - 199a - 3p 表达比值均为 0.25 左右, 说明 miR - 199 - 5p 和 miR - 199a - 3p 常同时存在于细胞内, 共同发挥调控效应, 而 miR - 199a - 3p 是更加稳定的 miRNA。其原因及在宫颈癌中的作用机制尚需后续进一步研究。

分析 miR - 199 - 5p 和 miR - 199a - 3p 表达水

平与宫颈癌多种临床病理特征的关系发现, miR - 199 - 5p 表达在不同病理分级的宫颈鳞癌组织存在一定差异 ($P = 0.054$), 与其他临床病理因素未见显著性差异。小细胞型 (Ⅲ级) 宫颈癌的 miR - 199 - 5p 的表达低于于其他细胞分化类型的标本。上述结果表明, miR - 199 - 5p 在宫颈癌组织明显下调表达不但是宫颈癌重要的标志, 而且可辅助指示肿瘤组织的分化程度。

参考文献

- 1 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281 - 297
- 2 Zimmerman AL, Wu S. MicroRNAs, cancer and cancer stem cells. *Cancer Lett*, 2011, 300(1): 9 - 10
- 3 Ichimi T. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int J Cancer*, 2009, 125(2): 345 - 352
- 4 Nam EJ. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2690 - 2695
- 5 Song G. miR - 199a regulates the tumor suppressor mitogen - activated protein kinase kinase 11 in gastric cancer. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(11): 1822 - 1827
- 6 Murakami Y. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non - tumorous tissues. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2537 - 2545
- 7 Lee JW. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2535 - 2542
- 8 Pereira PM. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11780
- 9 Xue X. Identification and characterization of novel microRNAs from *Schistosoma japonicum*. *PLoS One*, 2008, 3(12): e4034
- 10 Chen C. Real - time quantification of microRNAs by stem - loop RT - PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179
- 11 Plasterk RH. Micro RNAs in animal development. *Cell*, 2006, 124(5): 877 - 881
- 12 Zamore PD, B Haley. Ribo - gnome: the big world of small RNAs. *Science*, 2005, 309(5740): 1519 - 1524
- 13 Sakurai K. microRNAs miR - 199a - 5p and - 3p target the Brm subunit of SWI/SNF to generate a double - negative feedback loop in a variety of human cancers. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1680 - 1689
- 14 Zhang Y. Microarray profile of micro - ribonucleic acid in tumor tissue from cervical squamous cell carcinoma without human papillomavirus. *J Obstet Gynaecol Res*, 2009, 35(5): 842 - 849

(收稿: 2011 - 01 - 14)