

miR-21 对宫颈癌组织 Spry2 基因表达的影响

夏 红 杨 翔 杨 丽 褚桂芬
广州市番禺区中心医院 广东广州 511400

[摘 要] 目的 考察 miR-21 对宫颈癌组织 Spry2 基因表达的影响。方法 以手术切除的宫颈癌组织标本为研究对象, 同时保存癌旁正常组织作为对照。采用荧光定量 PCR 分别检测宫颈癌组织中 miR-21 和 SPRY2 的 mi RNA 表达水平; 采用 Western blot 检测宫颈癌组织 SPRY2 的蛋白表达检测。结果 宫颈癌组织中 miR-21 的 mi RNA 表达水平显著高于正常组织 ($P < 0.05$), 而 SPRY2 的 mi RNA 表达水平显著低于正常组织 ($P < 0.05$), WB 检测结果也显示癌组织 SPRY2 的蛋白表达水平显著低于正常组织 ($P < 0.05$)。结论 宫颈癌组织中 miR-21 下调 SPRY2 表达水平, 这可能是促进宫颈癌生长和转移的机制。

[关键词] miR-21; SPRY2; 宫颈癌; 质粒

[中图分类号] R737.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1674-9561 (2017) 02-005-02

[基金项目] 广州市医药卫生科技项目 (编号 20141A011110)

Effect of MicroRNA-21 on Sprouty2 Expression in Human Cervical Carcinoma

Xia Hong, Yang Xiang, Yang Li, Chu Gui-fen (Department of Gynecology, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangdong 511400, China)

[Abstract] Objective To study the effect of microRNA-21 (miR-21) on sprouty2 (Spry2) protein expression in human cervical carcinoma. Method Cervical cancer tissues from surgical resection were applied to detect the expression of miR-21 and Spry2 and normal cervical tissues were used as control. The mi RNA expression levels of miR-21 and Spry2 in cancer and normal cervical tissues were detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Spry2 protein levels in tissues were detected by western blot (WB). Results The expression levels of miR-21 in cervical cancer tissues were significantly higher than those in normal cervical tissues ($P < 0.05$). The mi RNA and protein expression levels of Spry2 in cervical cancer tissues were significantly lower than those in normal cervical tissues ($P < 0.05$). Conclusion Downregulation of Spry2 was controlled by miR-21 in cervical cancer tissues and this may be the mechanism that could promote the growth and invasion of cervical cancer.

[Key words] microRNA-21; sprouty2; Cervical cancer; plasmid

研究表明 miR-21 在肿瘤组织中的表达异常升高, 与肿瘤的发生、转移及耐药等密切相关, 因此有望作为肿瘤治疗的重要靶点^[1, 2]。近年发现 miR-21 在宫颈癌组织和癌细胞的表达也异常升高^[3-5], 但是其如何促进宫颈癌生长、转移等相关机制未见报道。Spry2 是调控细胞生长相关的基因, 其通过作用于细胞的酪氨酸激酶受体, 抑制肿瘤细胞增殖, 是 miR-21 的调控靶点之一^[6]。然而在宫颈癌中 miR-21 是否通过调控 Spry2 表达进而影响宫颈癌的生长和转移尚不清楚。本研究拟观察 miR-21 对宫颈癌组织 Spry2 表达的影响, 以探讨 miR-21 靶控 Spry2 的表达进而影响宫颈癌的生长和转移的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样本: 以广州市番禺区中心医院 2014 年 6 月至 2016 年 6 月手术切除的宫颈癌组织标本 (40 例) 为研究对象, 同时保存癌旁正常组织作为对照。

1.1.2 主要试剂与仪器: Trizol (Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (Promega 公司), SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen 公司), ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System, BioPhotometer plus 艾本德核酸蛋白测定仪, 兔抗人 SPRY2 一抗 (Cell Signaling 公司), HRP 标记的内参抗体 GAPDH (上海康诚生物)。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 检测 miR-21 和 Spry2 的 mi RNA 表达: 利用 qRT-PCR 检测宫颈癌组织和癌旁正常组织 miR-21 和 Spry2 的 mi RNA 表达, 简要过程如下: 按照 Trizol 说明书方法提取宫颈癌组织和癌旁正常组织总 RNA, 去基因组后对总 RNA 纯度和完整性进行检测; 参照逆转录试剂盒说明书方法将 mi RNA 逆转录为 cDNA; PCR 反应条件为 50℃ 2min, 95℃ 2min, 95℃ 15s, 60℃ 32s, 40 个循环, 反应体系为 20μl, 每个样品重复检测 3 次。mi RNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

1.2.2 Western Blot 检测 Spry2 的蛋白表达: 按照 RIPA 裂解液使用说明提取癌组织总蛋白, 采用 Western Blot 检测 Spry2 的蛋白表达, 简要过程如下: 按 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明对提取的组织样品总蛋白含量进行测定; 采用 SDS-PAGE 电泳后再将蛋白转移印至 PVDF 膜; PVDF 膜经 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 小时, TBST 洗膜 5min/3 次, 然后加入适量 SPRY2 一抗稀释液 (按 1:1000 稀释使用)

和内参 GAPDH 稀释液 (按 1:10000 稀释使用), 至摇床 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 5 min, 三次。

1.3 统计学分析

数据以 Mean±SD 表示, 两组均数间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 所有数据采用 GraphPad prism 5 自带统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 宫颈癌组织高表达 miR-21

宫颈癌组织中 miR-21 的 miRNA 表达水平显著高于正常组织, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。(见 Fig 1)

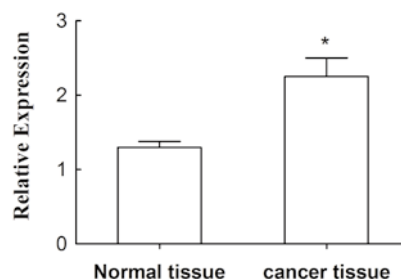


Figure 1 mi RNA expression of miR-21 in cervical cancer tissue and normal tissue. * $P < 0.05$ VS. normal tissue.

2.2 Spry2 在宫颈癌组织表达显著降低

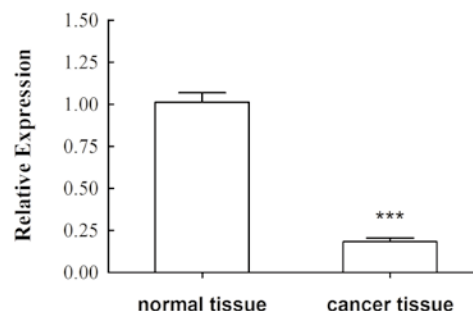


Figure 2 mi RNA expression of Spry2 in cervical cancer

tissue and normal tissue. * $P < 0.001$ VS. normal tissue.

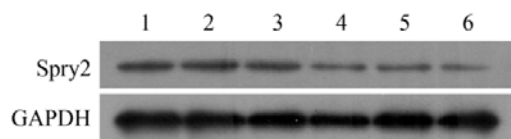


Figure 3 Protein expression of Spry2 in cervical cancer tissue and normal tissue. Line 1-3 from normal tissue and line 4-6 from cancer tissue.

PCR 结果显示 Spry2 的 miRNA 表达在宫颈癌组织中明显低于正常组织, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 结果见 Figure 2。WB 检测结果显示癌组织中 Spry2 蛋白的表达水平显著低于正常组织 ($P < 0.001$), 结果如 Figure 3 所示。上述结果提示, 宫颈癌组织中 Spry2 基因表达受抑制。

3 讨论

为了探讨 miR-21 对宫颈癌组织 SPRY2 基因表达的影响, 本研究首先采用 RT-PCR 的方法观察了 miR-21 在宫颈癌组织的表达水平, 结果表明在宫颈癌组织中 miR-21 的 miRNA 表达水平显著升高。microRNA (miRNA) 是一类长度约为 18-25 个核苷酸的内源性非编码 RNA, 广泛参与基因转录后调控活动, 其中多数 miRNA 序列具有高度保守的特性^[7, 8]。近年的研究表明许多 miRNA 与肿瘤的发生、发展具有密切联系, 其中最引人关注的是 miR-21^[7]。据报道 miR-21 在多种肿瘤细胞的表达均出现显著异常, 例如在恶性胶质瘤、乳腺癌、胆道癌、胰腺癌、肺癌、直肠癌、卵巢癌、膀胱癌及食管癌细胞或组织中, miR-21 的表达均显著升高, 但是在卵巢癌中 miR-21 的表达却明显降低^[7]。近年研究发现在宫颈癌组织和 Hela 细胞中 miR-21 表达也显著上调^[5], 但是在宫颈癌高、中分化与低分化组织的表达无差异^[9]。另有研究报道宫颈癌 Siha 细胞 miR-21 基因表达与顺铂敏感性相关, miR-21 表达升高会下调 Siha 细胞对顺铂的敏感性^[10]。因此, 本研究结果与已有研究结果相符合, 进一步提示 miR-21 作为宫颈癌诊断、预后判断或治疗靶点具有较高的潜在价值。

miRNA 主要是通过通过与靶 miRNA 3' 非翻译区 (3' UTR) 的碱基配对从而使靶 miRNA 降解或在转录后水平抑制翻译进而调控基因表达^[11]。研究表明 miR-21 的靶基因包括 PDCD4、SPRY1、SPRY2、PTEN、TPM1、RECK 和 BCL2 等^[12]。SPRY2 是信号通路特异性的抑制蛋白 (SPROUTY, SPRY) 家族的成员之一, 通过拮抗酪氨酸激酶受体信号可以抑制肿瘤细胞的增殖和迁移, 最初是在果蝇体内被发现, 近年研究发现 SPRY2 在前列腺癌、乳腺癌和肺癌等组织中表达显著降低, 可能与该类组织 miR-21 高表达有关^[6, 13]。本研究对宫颈癌组织 SPRY2 的 miRNA 和蛋白表达进行了检测, 结果两者表达水平显著降低, 即 SPRY2 在宫颈癌组织的表达受到抑制。有研究发现在多发性骨髓瘤中 miR-21 内源性高表达的骨髓瘤细胞株中, SPRY2 明显低表达, 而反

之则 SPRY2 显著高表达^[14]。结合本研究 miR-21 高表达的结果, 推测 miR-21 可能是导致 SPRY2 在相关肿瘤组织中表达下调的一个负性调控因子。综合, 本研究发现在宫颈癌组织中 miR-21 高表达而 SPRY2 基因却低表达, 猜测这与 miR-21 靶控 SPRY2 基因相关, 提示 miR-21 作为宫颈癌防治中具有较高的研究意义。

【参考文献】

- [1]Liang Yan,Wu Jian-xin. Research advances of miR-21 and tumor[J]. Chin J Pre Treat.2012,19(12):949-952.
- [2]Pan X, Wang Z X, Wang R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer[J]. Cancer Biol Ther. 2010, 10(12): 1224-1232.
- [3]Frezza D, De Menna M, Zoppoli P, et al. Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth[J]. Oncogene. 2011, 30(3): 275-286.
- [4]Zhang Wei, Liu Zhen,Hu Xiao-xia,et al. Relation between the abnormal expression of microRNA and HPV-16 E6/E7 genes in patients with cervical cancer[J].J Chin Pract Diagn Ther.2016,30(2):120-123.
- [5]DAI Gui-hong, LI Guo-li, QIAN Hua,et al. Effect of micro RNA-21transfection on PDCD4 expression and cell proliferation incervical cancer cells[J]. Journal of Jiangsu University(MedicineEdition).2013,23(4): 2013(04): 288-291.
- [6]Mason J M, Morrison D J, Basson M A, et al. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling[J]. Trends Cell Biol. 2006, 16(1): 45-54.
- [7]M Pichler, G A Calin. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients [J]. British Journal of Cancer. 2015,113:569-573.
- [8]Simonson B, Das S. MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet[J]. Mini Rev Med Chem. 2015, 15(6): 467-474.
- [9]Han Ying,Li Min, Jin Shao-yan,et al. The studies of microRNA-21 expression in cervical cancer tissues and correlation with cervical malignant degree [J]. Chin J Clin Obstet Gynecol. 2014(01): 66-67.
- [10]Li Juan,Zhou yan-qing,Tan Lin-yu,et al.Dysregulation effect of miR21on cisplatin chemosensitivity in cervical cancer siha cell[J]. Chin J Pre Treat .2015,22(14):1104-1108.
- [11]Lin S, Gregory R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. Nat Rev Cancer. 2015, 15(6): 321-333.
- [12]Buscaglia L E, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21[J]. Chin J Cancer. 2011, 30(6): 371-380.
- [13]Kwak H J, Kim Y J, Chun K R, et al. Downregulation of SPRY2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas[J]. Oncogene. 2011, 30(21): 2433-2442.
- [14]ZHOU Wen-wen, CHENG Shi-tong, LIU Bai-xin,et al. The research of the correlation of miR-21 with SPRY2 expression in multiple myeloma[J]. Chin J Clinicians(Electronic Edition). 2013(21): 9462-9466.

(上接第 4 页)

组明显高于对照组, 对比差异显著 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2: 两组患者治疗后的临床疗效对比 [n(%)]

组别	例数	完全缓解	部分缓解	好转	稳定	进展	总有效率
对照组	30	3	4	7	9	7	23 (76.7%)
研究组	30	9	10	4	5	2	28 (93.3%)
P							<0.05

3 讨论

中医理论中并无“肝癌”这一病名, 根据其临床症状与体征, 常将其归属于“黄疸、痞满、胁痛”等范畴。其病因主要为邪毒侵袭、饮食不节、情志不畅、正气亏损。病机属本虚标实之证, 气血不足、正气亏损为虚, 邪气内侵、血络阻滞为实。“不通则痛”, 癌痛因虚得病, 因实致痛。治疗上以汤药或成药口服的内治法为主, 外治法则以外敷为主。加味双柏散的, 药方主要成分为大黄、侧柏叶、黄柏、薄荷、泽兰, 具有清热解毒、消肿止痛、活血化瘀等功效, 将其用于治疗癌痛, 疗效显著^[4-5]。本研究结果显示, 研究组患者治疗后的疼

痛评分明显低于对照组, 且总有效率明显高于对照组, 提示研究组的止痛及抑瘤疗效优于对照组, 表明肝病膏外治法联合“三阶梯”协同治疗中晚期原发性肝癌的临床疗效优于单纯“三阶梯”治疗。

总之, 肝病膏外治法对中晚期原发性肝癌“三阶梯”协同止痛及抑瘤疗效显著, 值得推广。

【参考文献】

- [1]桂明亮, 潘忠贵, 高冲. 中药外敷治疗中晚期肝癌疼痛疗效观察 [J]. 山西中医, 2014, 30(7):38-38.
- [2]张艳, 严卿莹, 阮善明, 等. 中医联合肝动脉化疗栓塞术治疗中晚期原发性肝癌的 Meta 分析 [J]. 浙江中医药大学学报, 2015(2):84-91.
- [3]周德奇, 周天寒, 汪霞, 等. 癌痛贴穴位贴敷治疗原发性肝癌癌性疼痛的疗效观察 [J]. 医药前沿, 2016, 6(11):325-326.
- [4]刘赞, 田霞, 程琳. 加味双柏散配合三级阶梯止痛法对原发性肝癌疼痛的影响 [J]. 中医药导报, 2016(23):45-48.
- [5]王邦才, 刘帆, 柯春海, 等. 健脾消瘤合剂对中晚期原发性肝癌患者临床疗效及免疫功能影响研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015(3):627-629.