

MicroRNA-137 在胰腺癌中的表达及临床意义*

喻超, 肖杰, 江建新, 潘耀振, 黎志鹏, 张宏, 孙诚谊**

(贵阳医学院附院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 检测 MicroRNA-137(miR-137)在胰腺癌中的表达并探讨其临床意义。方法: 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 miR-137 在 17 例临床胰腺癌组织及相配对的癌旁组织中的表达,同时,检测 8 株不同胰腺癌细胞系和 2 株正常胰腺上皮细胞中 miR-137 的表达,并分析 miR-137 的表达水平与胰腺癌临床病理参数之间的关系。结果: miR-137 在胰腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$); miR-137 在胰腺癌细胞系中的表达水平明显低于正常胰腺上皮细胞($P < 0.05$); miR-137 表达水平在临床 I~II 期胰腺癌组织明显高于 III~IV 期胰腺癌组织($P < 0.05$),在无淋巴转移的胰腺癌组织明显高于有淋巴转移的胰腺癌组织($P < 0.05$)。结论: miR-137 低表达与胰腺癌的发生发展相关,可能成为胰腺癌基因诊断和治疗的新靶点。

[关键词] 胰腺肿瘤; 肿瘤分期; 淋巴转移; 微小 RNA

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)02-0117-04

The Expression of MicroRNA-137 in Pancreatic Cancer and Its Clinical Significance

YU Chao, XIAO Jie, JIANG Jianxin, PAN Yaozhen, LI Zhipeng, ZHANG Hong, SUN Chengyi

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To detect microRNA-137 (miR-137) expression in pancreatic carcinoma, and to investigate its clinical significance. **Methods:** Real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect miR-137 expression in 17 cases of pancreatic carcinoma tissues and matched paracancerous tissues, 8 pancreatic cancer cell lines and 2 normal pancreatic epithelial cell lines; the relationship between the expression level of miR-137 in pancreatic cancer and pancreatic cancer clinical pathological parameters was analyzed. **Results:** Expression level of miR-137 in pancreatic cancer tissue was significantly lower than that of adjacent tissues ($P < 0.05$). Expression level of miR-137 in pancreatic cancer cell lines was significantly lower than that in normal cell lines ($P < 0.05$). The expression level of miR-137 in the I~II stage pancreatic cancer tissue was significantly higher than that in III~IV stage pancreatic carcinoma ($P < 0.05$), that in pancreatic cancer without lymph node metastasis was significantly higher than that of pancreatic cancer with lymph node metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion:** MiR-137 is related to the occurrence and development of pancreatic cancer. It may be a new target of gene diagnosis and therapy of pancreatic cancer.

[Key words] pancreatic neoplasms; neoplasm staging; lymphatic metastasis; microRNA

胰腺癌因早期极易发生侵袭转移且缺乏特异性的诊断指标,大多数患者发现时多属晚期^[1-2]。胰腺癌的发病原因尚不清楚,近年来研究显示,胰腺癌的发展是一个多步骤、多因素参与的过程,其

中基因、分子水平改变在胰腺癌的发生及发展过程中扮演着重要的作用^[3-4]。因此寻找新的基因靶点可能是早期诊断和治疗胰腺癌的重要手段之一。MicroRNA(miRNA)在真核生物中普遍存在,是一

* [基金项目] 国家国际科技合作专项资助(2014DFA31420); 国家自然科学基金资助项目(81160311); 贵州省科技厅项目[黔科合(2010)3149]; 贵州省科技厅联合基金计划项目[黔科合 LH 字(2014)7129]

** 通信作者 E-mail: chengyisun@medmail.com.cn

网络出版时间:2015-02-12 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150212.1633.014.html>

种非编码的小分子 RNA,其大小为 19~23 个核苷酸序列,主要作用是参与靶基因的转录后调控。miRNA 的异常表达与肿瘤的发生进展密切相关,被认为是一组新的致癌或抑癌基因^[5]。本研究将采用 qRT-PCR 检测 miR-137 在胰腺癌组织及胰腺癌细胞系中的表达水平,并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

胎牛血清购自美国 Gibco 公司, RT 试剂盒、PCR 相关试剂购自于宝生物(大连)工程有限公司;miR-137 和内参 U6 的 RT 及 PCR 引物的设计及合成由广州锐博生物有限公司完成(表 1);荧光 PCR 检测系统购自 BIO-RED 公司。

表 1 miR-137、U6RT 及 PCR 引物序列

Tab.1 miR-137, U6RT and PCR primer sequences

引物设计	按 5'→3'顺序
miR-137 RT 引物	ctcaactggtgtctgtggatcggcattcagttgagcgaccatg
miR-137 上游引物	ttattgcttaagaatacgcgtag
miR-137 下游引物	gctgtcaacgatacgtctacgtaacg
U6 RT 引物	cgcttcacgaatttgcgtgcat
U6 上游引物	ttcgtgaagcgttccatattt
U6 下游引物	tactgtgcgtttaagcacttgc

1.2 胰腺癌组织标本

选取 2013 年 1 月~2014 年 3 月住院并接受手术治疗的 17 例胰腺癌患者的胰腺癌组织和癌旁对应无瘤组织,全部标本均经组织学确诊,离体后 30 min 内置于液氮罐冻存。实验标本的获取均获得患者本人及家属同意,所有实验过程均由伦理委员会证实符合伦理学规范。

1.3 细胞系与细胞培养

8 株胰腺癌细胞系:AsPC-1, BxPc-3, Capan-1, Capan-2, CFPAC-1, PANC-1, MIA PaCa-2 and SW1990 购于美国模式培养物集存库,常规培养;人胰腺导管上皮(HPDE)细胞(来源:Ontario Cancer Institute, Ontario, Canada),原代人正常胰腺上皮细胞(normal epithelia,来源:上海睿星生物公司),10%胎牛血清的 CS-C 的培养基,37℃、5.0% CO₂ 培养箱内培养。

1.4 MiR-137 表达

TRIzol 法提取组织及细胞总 RNA,检测 RNA 的 OD_{260/280} 值为 1.8~2.0 为 RNA 样品合格。按公司提供的 qRT-PCR 反应步骤,采用两步法 PCR 扩增标准程序上机操作,实验结果采用 2^{-ΔΔCt} 法分析。计算方法:待测样品相对值 = 2^{-ΔΔCt}; ΔΔCt = ΔCt 待测样品 - ΔCt RNU6B; Ct = Ct 阴性对照 - Ct 待测样品。目的基因的浓度除以管家基因的浓度的比值,即为此样品基因的校正后的相对含量。

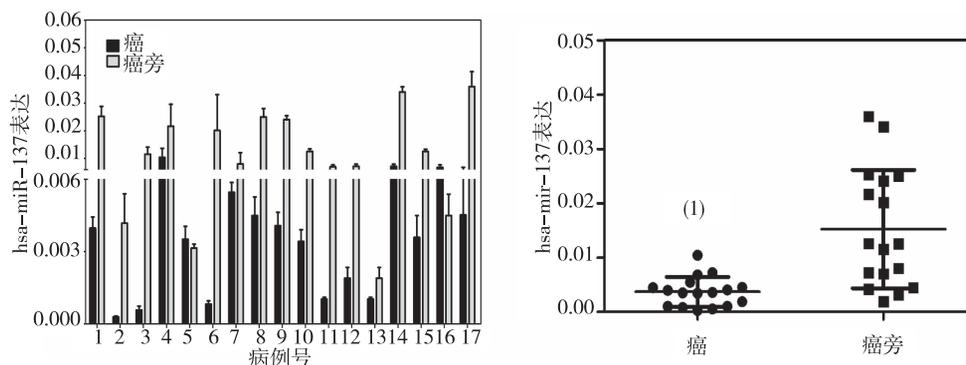
1.5 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用 Dunnett *t* 检验,不同处理组间差异采用单因素方差分析,*P* < 0.05 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌组织及癌旁无瘤组织 miR-137 的表达

17 对人胰腺癌组织和癌旁组织(所有癌组织标本都经术后病理诊断证实为胰腺癌);采用 qRT-PCR 检测发现 miR-137 在 15 例胰腺癌组织中低表达,而相对应的癌旁无瘤组织中高表达,综合分析显示 miR-137 在胰腺癌组织中低表达,而癌旁无瘤组织中高表达(*P* < 0.01。见图 1)。



(1) 与癌旁组比较, *P* < 0.01

图 1 miR-137 在胰腺癌组织和相对应的癌旁无瘤组织的表达

Fig.1 miR-137 expression in pancreatic cancer tissues and corresponding adjacent tissues

2.2 MiR-137 表达水平与临床病理关系

分析 miR-137 在胰腺癌中的表达与患者临床病理特征关系发现:miR-137 在不同年龄、性别、吸烟情况、CA-199、肿瘤大小、肿瘤部位、肿瘤分化程度及远处转移情况胰腺癌患者表达的差异无统计学意义;而不同术后临床分期及淋巴转移情况患者的表达差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。见表 2。

表 2 miR-137 相对表达量与胰腺癌患者临床病理的关系

Tab. 2 Relationship of miR-137 relative expression levels with clinical pathology in pancreatic cancer

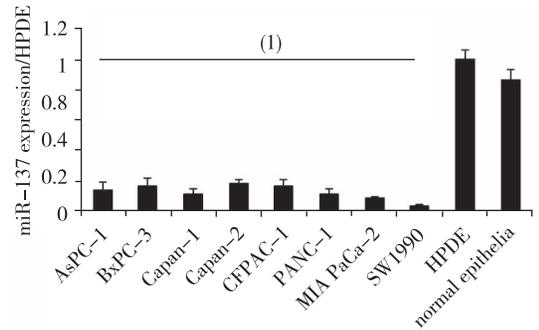
临床特征	<i>n</i>	miR-137 相对表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
性别	男	9 0.056 1 ± 0.020 5	0.125	0.902
	女	8 0.048 2 ± 0.018 9		
年龄	≥55	7 0.054 7 ± 0.044 5	1.454	0.167
	<55	10 0.032 4 ± 0.011 9		
吸烟情况	是	10 0.064 6 ± 0.030 1	0.097	0.832
	否	7 0.051 3 ± 0.034 5		
CA199(ng/ml)	≥37	11 0.050 4 ± 0.032 8	0.417	0.420
	<37	6 0.040 2 ± 0.012 6		
肿瘤大小(cm)	≥3	5 0.046 5 ± 0.034 9	0.388	0.703
	<3	12 0.032 3 ± 0.018 1		
肿瘤部位	胰头	11 0.051 7 ± 0.012 2	-1.147	0.266
	胰体尾	6 0.021 2 ± 0.008 3		
临床分期	I~II	4 0.073 2 ± 0.012 1	0.680	0.017
	III~IV	13 0.034 6 ± 0.008 6		
分化程度	高~中分化	5 0.054 1 ± 0.011 2	0.493	0.629
	中低~未分化	12 0.044 3 ± 0.009 7		
淋巴转移情况	有	11 0.812 6 ± 0.021 7	0.178	0.046
	无	6 0.427 2 ± 0.015 2		
远处转移情况	有	4 0.042 1 ± 0.019 8	0.541	0.597
	无	13 0.037 0 ± 0.007 6		

2.3 MiR-137 在胰腺癌细胞系及正常胰腺上皮细胞中的表达

qRT-PCR 检测显示:miR-137 在所有胰腺癌细胞中表达比正常胰腺细胞(HPDE、normal epithelia)中低, $P < 0.05$,差异具有统计学意义,且发现分化、增殖、侵袭能力不同的胰腺癌细胞 miR-137 表达不同(图 2)。

3 讨论

miRNA 作为非编码小分子 RNA,主要是通过通过对靶基因的转录后调控实现对机体细胞各方面生物学行为的影响,miRNA 与人肿瘤的发生发展、肿



(¹)与 HPDE 及 normal epithelia 比较, $P < 0.05$

图 2 miR-137 在胰腺癌细胞株和正常胰腺上皮细胞中的表达

Fig. 2 miR-137 expression in pancreatic cancer cell lines and normal pancreatic epithelial cells

瘤药物耐药性及靶向治疗、肿瘤病人生存时间、预后都密切相关^[6]。胰腺癌研究过程中有越来越多的差异性 miRNA 被发现,而不同 miRNA 在其中的表达和作用机理也不同,一些 miRNA 能促进胰腺癌的发生发展,而某些 miRNA 表现为抑制胰腺癌发展^[7];Jong-Kook Park 等^[8]研究发现 miR-132 和 miR-212 在胰腺癌组织中表达增加,过表达的 miR-132 和 miR-212 是胰腺癌的促进因素;而抑制胰腺癌细胞 miR-132 和 miR-212 的表达能抑制胰腺癌的增殖,并且对胰腺癌细胞周期 G2/M 期有阻滞作用。Jiang J 等^[9]也发现,miR-1181 可以抑制胰腺癌细胞干细胞样表型,影响胰腺癌的恶性生物学行为。miR-137 在很多肿瘤中表现为抑制肿瘤发展,如抑制胶质母细胞瘤扩散、减少脑肿瘤干细胞的诱导分化,或抑制黑色素瘤细胞增殖和迁移^[10-11]。

本实验通过 qRT-PCR 检测临床切除的 17 例胰腺癌和癌旁无瘤组织标本中 miR-137 表达,发现 15 例胰腺癌组织中 miR-137 表达水平低于相对应的癌旁无瘤组织,差异具有统计学意义;miR-137 在不同年龄、性别、吸烟情况、CA-199、肿瘤大小、肿瘤部位、肿瘤分化程度及远处转移情况胰腺癌患者表达的差异无统计学意义($P > 0.05$),但不同肿瘤的临床分期及淋巴转移情况患者的表达差异具有统计学意义($P < 0.05$),miR-137 在临床 III~IV 期的胰腺癌组织中表达更低;与无淋巴转移相比,患者术后发现有淋巴转移时 miR-137 的表达低。因此推测,miR-137 低表达可能参与胰腺癌的发生发展。本研究采用 qRT-PCR 检测发现,miR-137 在正常胰腺上皮细胞中高表达,而在胰腺癌细胞株中低表达,这一结果与临床组织验证的结论相一致。

本研究结果提示,miR-137 基因表达异常,可能打破了正常胰腺组织中的某种平衡,胰腺癌组织中 miR-137 基因低表达可能是胰腺癌恶性生物学特性和临床治疗预后差的原因之一。miR-137 可能成为胰腺癌诊断的新指标,可能成为胰腺癌基因治疗的新靶点。

4 参考文献

- [1] Rochefort MM, Ankeny JS, Kadera BE, et al. Impact of Tumor Grade on Pancreatic Cancer Prognosis: Validation of a Novel TNMG Staging System[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013(13): 4322 - 4329.
- [2] Foley K, Zheng L. The Role of the Tumor Microenvironment in Invasion and Metastasis of Pancreatic Cancer[J]. *Journal of Tumor*, 2013(6): 705 - 708.
- [3] Gillen S, Schuster T, Zum Büschenfelde CM, et al. Pre-operative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages[J]. *PLoS medicine*, 2010(4): e1000267.
- [4] Bardeesy N, Depinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002(12): 897 - 909.
- [5] Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007(4): 1424 - 1429.
- [6] Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale[J]. *Cancer Res*, 2006(15): 7390 - 7394.
- [7] Rachagani S, Kumar S, Batra SK. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications[J]. *Cancer Lett*, 2010(1): 8 - 16.
- [8] Park J-K, Henry JC, Jiang J, et al. miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011(4): 518 - 523.
- [9] Jiang J, Li Z, Yu C, et al. MiR-1181 inhibits stem cell-like phenotypes and suppresses SOX2 and STAT3 in human pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2015(2 Pt B): 962 - 970.
- [10] Chen L, Wang X, Wang H, et al. miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2[J]. *Eur J Cancer*, 2012(16): 3104 - 3111.
- [11] Bemis L T, Chen R, Amato C M, et al. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines[J]. *Cancer Res*, 2008(5): 1362 - 1368.
(2015-01-02 收稿, 2015-01-20 修回)
中文编辑: 潘 娅; 英文编辑: 周 凌
- (上接第 116 页)
- [11] Szafranska A, Davison T, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2007(30): 4442 - 4452.
- [12] Wellner U, Schubert J, Burk UC, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2009(12): 1487 - 1495.
- [13] Sureban SM, May R, Qu D, et al. DCLK1 regulates pluripotency and angiogenic factors via microRNA-dependent mechanisms in pancreatic cancer[J]. *PLoS One*, 2013(9): e73940.
- [14] Jiang J, Li Z, Yu C, et al. MiR-1181 inhibits stem cell-like phenotypes and suppresses SOX2 and STAT3 in human pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2015(2 Pt B): 962 - 70.
- [15] Silber J, Lim DA, Petritsch C, et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells [J]. *BMC Med*, 2008(1): 14.
- [16] Liu M, Lang N, Qiu M, et al. miR-137 targets Cdc42 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in colorectal cancer cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2011(6): 1269 - 1279.
- [17] Chen L, Wang X, Wang H, et al. miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2[J]. *European Journal of Cancer*, 2012(16): 3104 - 3111.
(2015-01-02 收稿, 2015-01-23 修回)
中文编辑: 潘 娅; 英文编辑: 周 凌