

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.014.010
文章编号: 1005-8982 (2018) 014-0052-04

新进展研究·论著

MicroRNA-590-5p、microRNA-103、microRNA-34c-5p、 Dicer 及 BRMS-1 基因在肺癌中的表达研究*

陈莹¹, 张若冰¹, 杨凯云², 谭慧², 平妮娜¹, 吴锡南¹, 何越峰¹

(1. 昆明医科大学 公共卫生学院, 云南 昆明 650500; 2. 昆明医科大学第三附属医院
胸心外科, 云南 昆明 650118)

摘要: **目的** 探讨 microRNA-590-5p (miR-590-5p)、miR-103、miR-34c-5p、Dicer 及 BRMS-1 在肺癌中表达及相互间关系。**方法** 选取 47 例肺癌患者的癌组织及癌旁正常组织, 利用 Trizol 提取总 RNA, 实时荧光定量聚合酶链反应检测基因的相对表达量。**结果** 肺癌组织与癌旁正常组织 miR-103、miR-34c-5p、Dicer 及 BRMS-1 基因表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-34c-5p 与 P53 呈正相关 ($P < 0.05$), miR-103 与多药耐药相关蛋白呈正相关 ($P < 0.05$), Dicer 与 miR-34c-5p、miR-103 及 miR-590-5p 呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** 在肺癌组织中 Dicer 基因表达与 miR-34c-5p 呈负相关, 可能通过抑制癌基因的表达, 抑制肺癌的发生。

关键词: 肺癌; miR-590-5p; miR-103; miR-34c-5p; Dicer

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Expressions of miR-590-5p, miR-103, miR-34c-5p, Dicer and BRMS1 genes in lung cancer*

Ying Chen¹, Ruo-bing Zhang¹, Kai-yun Yang², Hui Tan², Ni-nan Ping¹, Xi-nan Wu¹, Yue-feng He¹
(1. Public Health Institute of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China; 2.
Department of Thoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University,
Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective To investigate the miR-590-5p, miR-103, miR-34c-5p, and Dicer and BRMS1 gene expressions in lung cancer and to explore relationships among them. **Methods** The lung cancer tissues and the paracancerous tissues of 47 patients were collected. The total RNA was extracted by TRIZOL. qRT-PCR was used to detect the relative expressions of the genes. **Results** There were significant differences in the expressions of miR-103, miR-34c-5p, and Dicer and BRMS1 genes between the lung cancer tissues and the adjacent tissues ($P < 0.05$). The expressions of miR-34c-5p and P53 was positively correlated ($P < 0.05$). The expression of miR-103 was positively correlated to multidrug resistance-associated protein ($P < 0.05$). Dicer was negatively correlated with miR-34c-5p, miR-103 and miR-590-5p ($P < 0.05$). **Conclusions** Dicer gene expression is negatively associated with the expression of miR-34c-5p in lung cancer tissues. The expression of miR-34c-5p may inhibit the occurrence and

收稿日期: 2016-10-11

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81460491)

[通信作者] 何越峰, Email: heyuefeng@kmmu.edu.cn

development of lung cancers through inhibition of oncogenes.

Keywords: lung cancer; miR-590-5p; miR-103; miR-34c-5p; *Dicer*

MicroRNA (miRNA) 是非编码小分子 RNA, 长度约为 22 nt, 其被证实参与细胞的发育、代谢, 以及细胞的死亡、凋亡等多种生物活动。近 10 年来研究证明, miRNA 介导肿瘤的发生、发展^[1]。肺癌是发病率、致死率高的疾病, 多项研究发现正常组织和癌组织中 miRNAs 表达存在差异, 部分 miRNAs 与肿瘤的发生、发展相关。miRNAs 对肺癌的进展有影响^[2-3]。研究显示 *miR-34c-5p* 和 *miR-103* 均可提高细胞的存活率, 并促进细胞的增殖, *miR-34c-5p* 属于 *miR-34c* 家族的一员, 在多种肿瘤中呈低表达, 而 *Dicer* 蛋白属于 RNase III 家族, 与 miRNA 和 siRNA 的功能密切相关, 是 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 的重要组成部分, 并且可以影响细胞分化^[3-4]。*BRMS-1* 可通过调节细胞间缝隙连接信号转导及抑制癌基因的表达抑制癌转移^[2, 5]。本文采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR), 检测肺癌组织和癌旁组织中 *miR-590-5p*、*miR-103*、*miR-34c-5p*、*Dicer* 及 *BRMS-1* 的表达量及相互关系, 分析其与组织类型、临床指标的关系, 探讨其在肺癌发生、发展过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2010 年 1 月 -2011 年 1 月于昆明医科大学附属第三医院住院患者的手术切除的肺癌组织及癌旁正常组织, 癌旁正常组织离癌组织 >5 cm, 将选取的组织分为肺癌组织组和正常组织组, 每组样本 47 例。其中鳞癌 15 例、腺癌 32 例。患者均为汉族; 年龄 32~71 岁, 平均 (54.91 ± 9.62) 岁; 男性 32 例, 女性 15 例; 吸烟 29 例 (62%); 饮酒 22 例 (47%); 低分化 18 例, 中分化 28 例, 高分化 1 例。32 例腺癌的免疫组织化学指标如下, GST π: 5 例阴性 (-), 15 例弱阳性 (+), 9 例阳性 (++) , 3 例强阳性 (+++); PgP: 7 例阴性 (-), 14 例弱阳性 (+), 9 例阳性 (++) , 2 例强阳性 (+++); TOPO II: 6 例阴性弱阴性 (-), 20 例弱阳性 (+), 6 例阳性 (++) ; 肺耐药蛋白: 2 例阴性 (-), 14 例弱阳性 (+), 13 例阳性 (++) ,

3 例强阳性 (+++); 与多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP): 4 例阴性 (-), 13 例弱阳性 (+), 15 例阳性 (++) ; P53: 9 例阴性 (-), 15 例弱阳性 (+), 7 例阳性 (++) , 1 例强阳性 (+++); Ki67: 5% ~ 90% 平均数为 32.67%。本实验均取得患者知情同意。

1.2 方法

癌旁正常组织取下后 10 min 内放入预先装有 RNA later (美国 Ambion 公司) 溶液的试管中, 先 4℃ 浸泡 8 h, 然后放入 -80℃ 冰箱中长期保存。通过查阅病理切片记录确认组织病理类型。

1.3 RNA 的提取和定量

利用 Trizol (美国 Invitrogen 公司) 提取总 RNA, NCode™ VILO™ miRNA cDNA Synthesis Kit 和 EXPRESS SYBR® GreenER™ miRNA qRT-PCR Kit (美国 Invitrogen 公司, A11193-052) 进行逆转录, 以上按说明书步骤操作。引物序列如下, *miR-590-5p*: CAGGAGCTTATTCATAAAAAGTGCAG; *miR-34c-5p*: AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC; *miR-103*: CAGCATTGTACAGGGCTATGA; *BRMS1*: TGCAGCGGAGCCTCAAG 与 TCACATCCAGACAG AAGCCCT; *Dicer*: TGGGTCCTTTCTTTGGACTG 与 CTGGTTTGCAGAGTTGACCA。miRNA 下游引物为试剂盒提供, 利用 ABI7900HT (美国 ABI 公司) 对 5 个 RNA 进行 qRT-PCR, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 数据经过对数转化后为正态分布, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验, 相关分析采用 Spearman 法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基因的表达特征

两组 *miR-103*、*miR-34c-5p*、*Dicer* 及 *BRMS-1* 基因表达水平比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 其中肺癌组织组 *miR-103*、*Dicer* 较正常组织组低, 表达下调; 肺癌组织组 *BRMS-1*、*miR-34c-5p* 较正常组织组高, 表达上调。见附表。

附表 两组基因的表达特征 ($n=47, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-590-5p	miR-103	miR-34c-5p	Dicer	BRMS-1
肺癌组织组	6.53 ± 3.39	3.63 ± 2.10	8.60 ± 2.97	4.67 ± 2.34	5.64 ± 2.57
正常组织组	5.77 ± 3.53	7.49 ± 1.75	6.90 ± 3.28	6.76 ± 2.73	2.37 ± 2.33
<i>t</i> 值	1.048	9.519	2.602	3.942	6.161
<i>P</i> 值	0.149	0.000	0.005	0.000	0.000

2.2 肺癌组织 RNA 与免疫组织化学指标的相关性

miR-34c-5p 与 P53 呈正相关 ($r=0.402, P=0.034$), *miR-103* 与多药耐药相关蛋白呈正相关 ($r=0.563, P=0.020$), *Dicer* 与 P53 呈负相关 ($r=-0.381, P=0.040$)。

2.3 两组 miRNAs 与 mRNA 的相关性

正常组织组中 *Dicer* 与 *miR-590-5p*、*miR-103* 及 *miR-34c-5p* 呈负相关 ($r=-0.382$ 、 -0.369 和 -0.403 , $P=0.041$ 、 0.034 和 0.023), 而肺癌组织组中均未发现有相关性。

3 讨论

随着越来越多关于 miRNAs 的研究, 发现 miRNAs 在生物代谢过程中和病理过程中起着重要作用^[6-7]。miRNA 可影响大多数目标基因表达, 近几年来大量的 miRNA 被定义为致癌基因或抑癌基因, 比如 *miR-335*、*miR-206* 及 *miR-126* 在乳腺癌中视为癌转移的标志, 宫颈癌中 *miR-126*、*miR-143* 及 *miR-145* 和肺癌中的 *miR-451* 被视为致癌基因^[7-9]。miRNA 成熟过程通常是由基因组转录出初始转录 pri-miRNA, 再由 *Dicer* 等组成的复合物切割形成成熟 miRNA 并加入 RISC 复合物, 行使其生物学功能^[10-11]。*miR-590-5p* 在宫颈癌、肝癌组织中表达下调^[10], 而本次研究发现肺癌组织中的 *miR-590-5p* 表达与癌旁正常组织比较无差异。*miR-103* 在结肠直肠癌中为致癌基因^[11-12], 而本研究证实 *miR-103* 在肺癌组织中表达下调。*miR-34c-5p* 基因的研究甚少, 本研究发现肺癌组织与癌旁正常组织中 *miR-34c-5p* 表达量有差异, 在肺癌组织中表达上调。有研究显示 *Dicer* 在乳腺癌、口腔鳞状上皮细胞癌以及其他不同癌组织中表达异常^[13-16]。本研究中 *Dicer* 在肺癌组织中表达下调。*BRMS-1* 被证实存在乳腺癌、黑色素瘤、卵巢癌及鼻咽癌中表达下调, 且可能与癌细胞的入侵、转移和患者的预后有关^[17-18]。而在肺癌组织中 *BRMS-1* 表达上调, 其原因需进一步研究。

本文肺癌组织中 RNA 与免疫组织化学指标的关系相关性研究发现, *miR-34c-5p* 和 P53 呈正相关; *miR-103* 和 MRP 呈正相关, *Dicer* 与 P53 呈负相关。肺癌组织和正常组织 miRNAs 与 mRNA 的相关性研究发现, 正常组织中 *Dicer* 与 *miR-590-5p*、*miR-103* 和 *miR-34c-5p* 均呈负相关, 而肺癌组织中未发现有相关性。本研究提示癌组织与正常组织的 4 种基因表达量有差异, *miR-103* 和 *Dicer* 在肺癌组织中表达下调, *miR-34c-5p* 及 *BRMS-1* 表达上调。*Dicer* 在前体基因转录为成熟基因过程中起到重要作用, 推测肺癌组织中 *Dicer* 表达下调的原因, *miR-34c-5p* 抑制 *Dicer* 基因的表达, 可能由于 *miR-34c-5p* 结合在 *Dicer* 的位点上, 使 *Dicer* 基因降解, 而降低基因表达。

肺癌被视为威胁人类健康最常见的肿瘤之一, 缺乏早期诊断方法, 使其在世界范围内是病死率最高的肿瘤^[19]。本研究得到了 miRNAs、mRNA 与肺癌之间关系的流行病学数据, 但研究中对 *Dicer* 仅限于关联研究, 可进一步进行机制方面的深入探索。本次研究的意义在于通过对 mRNA 与 miRNAs 关系的探究, 明确肺癌组织 miRNAs 表达异常与 mRNA 转运异常表达有关, 对阐明 miRNAs 转录调控和 miRNAs 表达调控机制有重要的意义, 接下来应从机制研究入手, 深度研究 *Dicer* 对 *miR-34c-5p* 及 *miR-103* 基因的影响及其机制。

参考文献:

- [1] OROM U A, NIELSEN F C, LUND A H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation[J]. Mol Cell, 2008, 30(4): 460-471.
- [2] ZHANG W C, LIU J, XU X, et al. The role of microRNAs in lung cancer progression[J]. Med Oncol, 2013, 30(3): 675-683.
- [3] SAITO M, SCHETTER A J, MOLLERUP S, et al. The association of microRNA expression with prognosis and progression in the early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(7): 1875-1882.
- [4] MALLETER M, JACQUOT C, RONSSEAU B, et al. miRNAs, a

- potential target the treatment of non-small-cell lung carcinomas[J]. *Gene*, 2012, 506(2): 355-359.
- [5] LORIO M V, CROCE C M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact[J]. *Clin Oncol*, 2009, 27(34): 5848-5856.
- [6] LOPEZ-SERRA P, ESTELLER M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer[J]. *Oncogene*, 2012, 31(13): 1609-1622.
- [7] NEGRINI M, CALIN G A. Breast cancer metastasis: a microRNA story[J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(2): 203.
- [8] WANG X, TANG S, LE S Y, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): DOI: 10.1371/journal.pone.0002557.
- [9] WANG X C, TIAN L L, JIANG X Y, et al. The expression and function of miRNA-451 in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2011, 311(2): 203-209.
- [10] ZHENG Z M, WANG X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(11-12): 668-677.
- [11] CHEN H Y, LIN Y M, CHUNG H C, et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(14): 3631-3641.
- [12] GENG L, SUN B, GAO B, et al. MicroRNA-103 promotes colorectal cancer by targeting tumor suppressor DICER and PTEN[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(1): 8458-8472.
- [13] FABER C, HORST D, HLUBEK F, et al. Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer[J]. *Eur J Canc (Oxford, England: 1990)*, 2011, 47(9): 1414-1419.
- [14] JAKYMIW A, PATEL R S, DEMING N, et al. Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells[J]. *Genes Chromosome Canc*, 2010, 49(6): 549-559.
- [15] CHIOSEA S, JELEZCOVA E, CHANDRAN U, et al. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(5): 1812-1820.
- [16] LILIANA P CANTINI, LOURDES M ANDINO, CHRISTOPHER C ATTAWAY, et al. Identification and characterization of Dicer1e, a Dicer1 protein variant, in oral cancer cells[J]. *Molecular Cancer* 2014, 13(1): 190-205.
- [17] BALGKOURANIDOU I, CHIMONIDOU M, MILAKI G, et al. Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(8): 2054-2062.
- [18] CUI R X, LIU N, HE Q M, et al. Low BRMS1 expression promotes nasopharyngeal carcinoma metastasis in vitro and in vivo and is associated with poor patient survival[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 376.
- [19] 曾龙剑, 吴锡南, 杨凯云, 等. miR-10b、miR-18b 及 miR-130b 在肺癌中的表达研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(10): 28-31.

(李科 编辑)