

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.03.011  
文章编号: 1005- 8982 (2017) 03- 0055- 04

临床研究·论著

## 扁桃体恶性肿瘤中 microRNA-21 和 98 的表达及临床意义\*

王云<sup>1</sup>, 吴雪<sup>1</sup>, 李晶<sup>1</sup>, 柏青杨<sup>2</sup>, 赵治明<sup>1</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院附属第二医院 耳鼻喉头颈外科, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;  
2. 齐齐哈尔医学院 病理实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:目的** 初步探讨 microRNA-21 (miRNA-21) 和 miRNA-98 在扁桃体恶性肿瘤的发生、发展及转移中的作用和临床意义。**方法** 应用实时荧光定量聚合酶链反应检测 53 例扁桃体恶性肿瘤组织, 50 例扁桃体炎症组织及 20 例正常组织中 miRNA-21 和 miRNA-98 的表达水平, 并分析其不同临床病理指标下的表达。**结果** miRNA-21 在扁桃体恶性肿瘤组织中的表达量高于扁桃体炎症组织及正常组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。恶性肿瘤组织中 miRNA-21 的表达量与临床分期和淋巴结转移有关, 与病理分级无关。miRNA-98 在扁桃体恶性肿瘤组织中的表达量低于扁桃体炎症组织及正常组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 扁桃体恶性肿瘤的发生、发展及转移可能与 miRNA-21 和 miRNA-98 的表达密切相关。

**关键词:** miRNA-21; miRNA-98; 扁桃体恶性肿瘤; 淋巴结转移  
**中图分类号:** R739.64 **文献标识码:** A

## Expressions of microRNA-21 and microRNA-98 in malignant tumors of tonsils and clinical significance\*

Yun Wang<sup>1</sup>, Xue Wu<sup>1</sup>, Jing Li<sup>1</sup>, Qing-yang Bai<sup>2</sup>, Zhi-ming Zhao<sup>1</sup>

(1. Department of Otorhinolaryngology, the Second Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China; 2. Pathology Laboratory, Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role and clinical significance of the expressions of microRNA-21 (miRNA-21) and microRNA-98 (miRNA-98) in development and progression of malignant tonsillar tumors. **Methods** The expressions of miRNA-21 and miRNA-98 were detected by qRT-PCR in the 53 specimens of tonsillar neoplasms and 50 specimens of inflammatory tonsillar tissues and 20 specimens of normal mucosa. The expressions of miRNA-21 and miRNA-98 in the tonsillar neoplasms were analyzed with different clinicopathological parameters. **Results** The expression of miRNA-21 in the malignant tonsillar tumors was significantly higher than that in the inflammatory tonsillar tissues and normal mucosa ( $P < 0.05$ ). There were positive correlations between miRNA-21 expression and both TNM staging and lymph node metastasis; but not pathological grade. The expression of miRNA-98 in the malignant tonsillar neoplasms was significantly lower than that in the inflammatory tonsillar tissues and normal mucosa ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expressions of miRNA-21 and miRNA-98 may be correlated with the development and progression of malignant tonsillar neoplasms.

**Keywords:** miRNA-21; miRNA-98; malignant tonsillar neoplasm; lymph node metastasis

收稿日期: 2016-03-28

\* 基金项目: 齐齐哈尔医学院科研基金 No. QY2015L-06

[通信作者] 赵治明, E-mail: yuenhao2001@163.com; Tel: 18646632303

MicroRNA (miRNA) 是近年来倍受国内外学者关注的研究热点。其是一类普遍存在动植物体内的非编码小分子 RNA, 通过调节靶 mRNA 的降解或翻译抑制, 从而对基因进行转录后表达调控, 在恶性肿瘤的发生、发展过程中起着类似于癌基因或抑癌基因的作用<sup>[1-3]</sup>。随着肿瘤分子生物学的迅猛发展, 许多恶性肿瘤的发生、发展被证实与 miRNA 的表达异常有关, 尤其头颈部恶性肿瘤组织中 miRNA 拥有自己独特的表达特征、生物标记及其靶基因<sup>[4-6]</sup>, 但 miRNA 在扁桃体恶性肿瘤中的有关研究在国内尚未见报道。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2011 年 1 月 - 2015 年 11 月齐齐哈尔医学院附属第二医院 53 例扁桃体恶性肿瘤组织 (其中 41 例为鳞状细胞癌, 9 例为淋巴瘤, 3 例为腺癌)、50 例扁桃体炎症组织及 20 例咽部正常组织的石蜡标本。实验组及对照组病例临床资料完整, 术前未接受放化疗和激素治疗。恶性肿瘤组织中男性 49 例, 女性 4 例; 年龄 35~78 岁, 平均 59 岁。病理分级高分化例 18, 中分化例 14, 低分化例 21。TNM 分期 (UICC2002): I 期 8 例, II 期 23 例, III 期 15 例, IV 期 7 例。实验组伴颈淋巴结转移者 14 例, 无淋巴结转移者 39 例。

### 1.2 材料与试剂

试剂 Trizol (美国 invitrogen 公司), 焦碳酸二乙酯处理水 (上海基尔顿生物科技有限公司), 氯仿、异丙醇、无水乙醇、液氮、蒸馏水等 (北京国药集团有限公司), SYBR Green 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒、逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司), RNase I (立陶宛 Fermentas 公司), PCR 引物 (上海剑钝生物科技有限公司), Real-time 检测仪 (美国 ABI 公司, 型号: ABI-7300)。所有的试剂购回来后按说明书保存。RNA 提取过程中所需的离心管、枪头等耗材经过 0.1% 焦碳酸二乙酯水浸泡过夜, 121℃ 灭菌 30 min, 烘干后备用。

### 1.3 实验方法

总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR: 严格按照分离试剂盒操作说明书提取扁桃体恶性肿瘤组织、扁桃体炎症组织及正常组织中总 miRNA。应用 miRNA 逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。应用 miRNA 检测试剂盒定量检测分析不同组织中 miRNA-21 和 miRNA-98 的表达水平<sup>[7]</sup>。循环阈值 (Ct) 比较法分析

各组织中 miRNA 的相对表达量, 以 U6 作为内参照。实验重复 3 次<sup>[8-9]</sup>。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组比较用 *t* 检验, 多组比较用方差分析, 数据满足正态性及方差齐性, 两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 的质量和纯度

总 RNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在紫外线下观察到 3 条带: 2 条明亮的带分别对应于 28 S 和 18 S RNA, 暗一点的带则对应于 5 S RNA。总 RNA 经过电子核酸分光光度计测定, OD260/OD280 比值为 1.8~2.0, 表明所提取的总 RNA 样品较纯, 而且没有降解, 可用于 miRNA 表达的检测。见图 1。

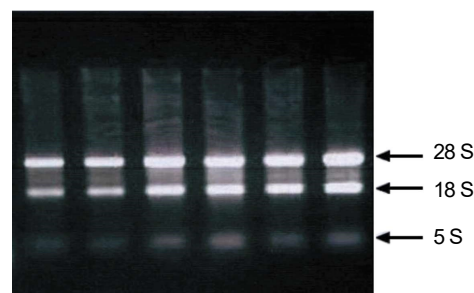


图 1 总 RNA 凝胶电泳

### 2.2 miRNA-21 和 miRNA-98 在扁桃体恶性肿瘤的相对表达量

用特异引物对 miRNA-21 和 miRNA-98 进行扩增, 同时以 Let-7a 作为内参, miRNA-21、miRNA-98 和 Let-7a 的溶解曲线均为单峰曲线, 产物单一, 显示引物特异性比较好, 无特异性扩增和引物二聚体干扰。见图 2。

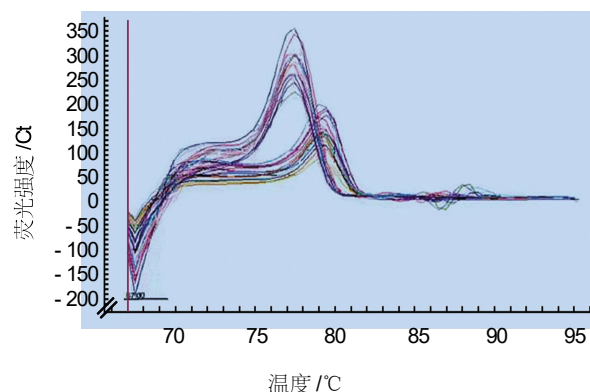


图 2 miRNA-21、miRNA-98 及 Let-7a 的溶解曲线

miRNA- 21、miRNA- 98 及 Let- 7a 扩增产物的扩增曲线中可见明显的对数扩增前期、对数扩增期和平台期,说明 PCR 产物丰富,引物敏感性较高。见图 3。

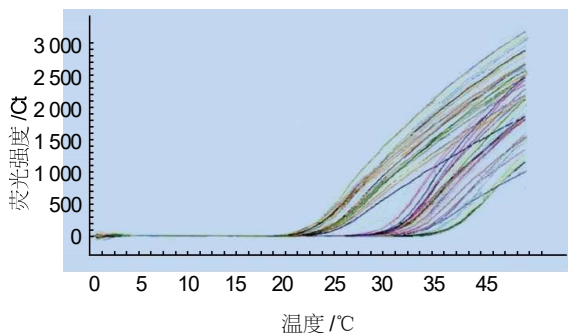


图 3 miRNA-21、miRNA-98 及 Let-7a 的扩增曲线

3 组 miRNA- 21、miRNA- 98 比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),与正常组织和炎症组织比较,恶性肿瘤组织中 miRNA- 21 的表达量升高,而 miRNA- 98 降低。两两比较中,恶性肿瘤组织中 miRNA- 21 表达量与炎症组织比较,差异有统计学意义 ( $t = 48.481, P = 0.000$ ),恶性肿瘤组织中的 miRNA- 21 的表达量与正常组织比较,差异有统计学意义 ( $t = 38.742, P = 0.000$ )。炎症组织与正常组织 miRNA- 21 的表达量比较,差异有统计学意义 ( $t = 2.302, P = 0.023$ )。miRNA- 98 在扁桃体恶性肿瘤组织中的表达量与扁桃体炎症组织、正常组织比较,差异有统计学意义。恶性肿瘤组织与炎症组织 miRNA- 98 比较,差异有统计学意义 ( $t = 38.978, P = 0.000$ )。恶性肿瘤组织与正常组织 miRNA- 98 表达量比较,差异有统计学意义 ( $t = 27.791, P = 0.000$ )。炎症组织与正常组织 miRNA- 98 表达量比较,差异无统计学意义 ( $t = 1.479, P = 0.142$ )。见表 1。

### 2.3 miRNA-21 表达水平与临床病理特征的关系

miRNA- 21 在扁桃体恶性肿瘤组织中呈高表达,其与患者的性别、年龄及肿瘤的病理分级比较,差

表 1 不同组织中 miRNA-21 和 miRNA-98 的相对表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miRNA- 21	miRNA- 98
恶性肿瘤组织 ( $n=53$ )	1.975 $\pm$ 0.145	0.814 $\pm$ 0.096
炎症组织 ( $n=50$ )	0.892 $\pm$ 0.073 <sup>†</sup>	1.914 $\pm$ 0.182 <sup>†</sup>
正常组织 ( $n=20$ )	0.823 $\pm$ 0.099 <sup>†</sup>	1.858 $\pm$ 0.137 <sup>†</sup>
F 值	1431.032	865.930
P 值	0.000	0.000

注:† 与恶性肿瘤组织比较,  $P < 0.05$

异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );而与肿瘤的临床分期和淋巴结转移情况比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。恶性肿瘤组织中,临床分期 III、IV 期 miRNA- 21 的表达量高于 I、II 期,颈淋巴结转移组 miRNA- 21 的表达量亦高于无淋巴结转移组。见表 2。

表 2 临床病理特征与 miRNA-21 表达水平的关系

临床病理特征	例数	miRNA- 21 ( $\bar{x} \pm s$ )	t/F 值	P 值
性别				
男	49	1.977 $\pm$ 0.003	0.011	0.992
女	4	1.974 $\pm$ 0.568		
年龄				
<60 岁	23	1.976 $\pm$ 0.052	0.020	0.984
$\geq 60$ 岁	30	1.974 $\pm$ 0.543		
临床分期				
I、II 期	31	1.603 $\pm$ 0.108	11.137	0.000
III、IV 期	22	1.978 $\pm$ 0.137		
病理分级				
高分化	18	1.896 $\pm$ 0.189	0.086	0.918
中分化	14	1.912 $\pm$ 0.116		
低分化	21	1.914 $\pm$ 0.112		
颈淋巴结转移				
无	39	1.597 $\pm$ 0.137	8.320	0.000
有	14	1.986 $\pm$ 0.183		

### 3 讨论

miRNA 对机体非常重要,机体需要用精密的调控系统来调节 miRNA。机体可以通过几个 miRNA 的精组合来调控某个特定基因的表达,也可以通过 1 个 miRNA 的表达来调节多个基因的表达,从而使机体处于一个调节有序的状态。而 miRNA 表达异常则可能会引起疾病包括恶性肿瘤的发生<sup>[10-12]</sup>。恶性肿瘤组织中的 miRNA 也具有严格的组织特异性和时序性,多数肿瘤组织中异常表达的 miRNA 同样能在外周血中检测到<sup>[13-14]</sup>,而且血清中的 miRNA 能够耐受反复的冻融、酸碱,以及 DNA 酶的处理。这些特性表明,miRNA 可以作为理想的肿瘤生物学靶点,在临床上应用于肿瘤的诊断、预后评估及治疗<sup>[15-17]</sup>。本实验中,miRNA- 21 和 miRNA- 98 在扁桃体恶性肿瘤组织、扁桃体炎症组织和正常组织中的表达量比较,差异有统计学意义。恶性肿瘤组织中 miRNA- 21 的表达量升高,临床分期中 III、IV 期 miRNA- 21 的表达水平高于 I、II 期,颈淋巴结转移组 miRNA- 21 的表达水平高

于非转移组,提示 miRNA-21 的高表达可能与扁桃体恶性肿瘤的发生、侵袭及转移密切相关。而 miRNA-98 在扁桃体恶性肿瘤组织的表达量与炎症组织和正常组织比较,差异有统计学意义,提示 miRNA-98 可能在扁桃体恶性肿瘤的发生、发展中发挥抑癌基因的功能。实验初步证明,miRNA-21 和 miRNA-98 参与扁桃体恶性肿瘤发生、侵袭及转移的调控,可能成为扁桃体恶性肿瘤侵袭转移的重要生物学标志。

综上所述,miRNA 的表达异常可能与扁桃体恶性肿瘤的发生、发展及转移相关,而临床上侵袭和转移正是判断扁桃体癌患者预后的重要指标<sup>[18]</sup>,因此对 miRNA 进行深入、广泛的研究,了解扁桃体恶性肿瘤发生和转移的具体机制,可为临床设计合理可行的治疗方案,并可为恶性肿瘤转移的干预性治疗提供理论依据。

#### 参 考 文 献:

- [1] PANJHA R, APUI J. Micro-RNAs in inflammatory diseases and as a link between inflammation and cancer [J]. *Inflamm Res*, 2013, 624: 343-355.
- [2] ADAMS B D, KASINSKI A L, SLACK F J. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer [J]. *Curr Biol*, 2014, 24: 762-776.
- [3] QIN Q, FURONG W, BAOSHENG L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-201 in cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33: 50-54.
- [4] GABRIELY G, WURDINGER T, KESARI S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 28: 5369-5380.
- [5] SANCHEZ-TILLO E, LIU Y, de BARRIOS O, et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69: 3429-3456.
- [6] XIA H, HUI K M. MicroRNAs involved in regulating epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells as molecular targets for cancer therapeutics [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19: 723-730.
- [7] HAN M, LIU M, WANG Y, et al. Antagonism of miRNA-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN [J]. *PLoS One*, 2012, 7: DOI: 10.1371/journal.pone.0039520.
- [8] BRABLETZ T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells [J]. *Cancer Cell*, 2012, 22: 699-701.
- [9] BAO B, WANG Z, ALI S, et al. Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2011, 307: 26-36.
- [10] BORNACHEA O, SANTOS M, MARTINEZ-CRUZ A B, et al. EMT and induction of miRNA-21 mediate metastasis development in Trp53-deficient tumours [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 434-436.
- [11] ZHANG J G, WANG J J, ZHAO F, et al. MicroRNA-21 (miRNA-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411: 846-852.
- [12] LIU L, JIANG Y, ZHANG H, et al. miR-22 functions as a micro-oncogene in transformed human bronchial epithelial cells induced by anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide [J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24: 1168-1175.
- [13] KHURANA A, LIU P, MELLONE P, et al. HSulf-1 modulates FGF2- and hypoxia-mediated migration and invasion of breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 2152-2161.
- [14] GRINSHUPUN A, BEN-PORATH I, PERETZ T, et al. Tumor, metastasis and what's in between [J]. *Harefuah*, 2013, 152: 30-33.
- [15] GAO D, MITTAL V. Tumor microenvironment regulates epithelial-mesenchymal transitions in metastasis [J]. *Expert Rev Anti-cancer Ther*, 2012, 12: 857-859.
- [16] ALLEN M, LOUISE J J. The role of the microenvironment on the progression of cancer [J]. *J Pathol*, 2011, 223: 162-176.
- [17] ZHU S, WU H, WU F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis [J]. *Cell Res*, 2008, 18: 350-359.
- [18] BRAUN J, HOANGVU C, DRALLE H, et al. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas [J]. *Oncogene*, 2010, 29: 4237-4244.

(童颖丹 编辑)