

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.12.010

文章编号: 1005-8982(2016)12-0044-05

论著

微小 RNA Let-7/Lin28 调节环与 鼻咽癌血管新生的关系研究

李鹏

(湖北省襄阳市中心医院 耳鼻喉科,湖北 襄阳 441021)

摘要:目的 探讨微小 RNA Let-7/Lin28 调节环与鼻咽癌促血管生成因子的关系,并研究这一关系的作用机制。**方法** 选取 2012 年 4 月-2014 年在湖北省襄阳市中心医院耳鼻喉科就诊的鼻咽癌患者 54 例。另选取同期 40 例慢性鼻炎患者和 32 例健康者作为对照组。采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测组织中 Lin28A、Lin28B 及 Let-7a miRNA 相对表达量,ELISA 检测血清中血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维生长因子 (bFGF) 及内皮抑素 (ES) 水平,蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 H-Ras/PTEN/PI3K/Akt 通路蛋白表达情况,分析 miRNA Let-7a/Lin28 调节环与血管新生因子的关系。**结果** RT-PCR 检测发现鼻咽癌患者 Lin28A miRNA 和 Lin28B miRNA 相对表达量均高于慢性鼻炎组和健康对照组 ($P < 0.05$),而 Let-7a miRNA 的相对表达量低于上述两组 ($P < 0.05$);ELISA 检测结果发现鼻咽癌患者组 VEGF、bFGF、ES 表达量均高于慢性鼻炎组和健康对照组 ($P < 0.05$);Western blot 检测发现鼻咽癌患者组病理组织中 H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 表达量高于慢性鼻炎患者组和健康对照组 ($P < 0.05$),而 p-PTEN 表达量低于上述两组 ($P < 0.05$);相关性分析发现, Lin28A、Lin28B miRNA 与 VEGF、bFGF、H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 呈正相关 ($P < 0.05$),Let-7a miRNA 与 VEGF、bFGF、H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** miRNA Lin28/Let-7 调节环与血管新生有一定的关联性,而这一关联性可能与激活 Ras/PI3K/PTEN/Akt 通路有关。

关键词: Lin28A;Lin28B;Let-7a;促血管生成因子;H-Ras/PTEN/PI3K/Akt

中图分类号: R739.6

文献标识码: A

Relationship between miRNA Let-7/Lin28 feedback loop and nasopharyngeal angiogenesis

Peng Li

(Department of ENT, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang, Hubei 441021, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between miRNA Let-7/Lin28 feedback loop and nasopharyngeal pro-angiogenesis factors, and to study the mechanism of its effect. **Methods** From April 2012 to 2014, 54 cases of nasopharyngeal carcinoma (NPC) therapied in ENT in Xiangyang Central Hospital were selected, and 40 cases of chronic rhinitis patients and 32 healthy subjects were selected as control groups. Expressions of Lin28A, Lin28B and Let-7a miRNA relative were detected by RT-PCR, and the levels of VEGF, bFGF and ES in serum were detected by ELISA. Expressions of protein in H-Ras/PTEN/PI3K/Akt pathway were detected by western blotting, and relationship between miRNA Let-7a/ Lin28 feedback loop and angiogenesis factors was analyzed. **Results** Expression levels of Lin28A miRNA, Lin28B miRNA in NPC patients were relatively higher than the other two groups, and the relative expression of Let-7a miRNA was less than the other two groups ($P < 0.05$). ELISA test found that expressions of VEGF, bFGF, ES in NPC patients were higher than the control groups ($P < 0.05$). Expressions of H-Ras, p-PI3K and p-Akt in NPC patients pathology tissue were higher than the other two groups ($P < 0.05$), and expression of p-PTEN was less than the above two groups ($P < 0.05$). The correlation analysis showed that

Lin28A, Lin28B miRNA were positively correlated with VEGF, bFGF, H-Ras, p-PI3K and p-Akt ($P < 0.05$), and Let-7a miRNA was negatively correlated with VEGF, bFGF, H-Ras, p-PI3K and p-Akt ($P < 0.05$). **Conclusions** miRNA Lin28/Let-7 feedback loop has certain correlation with angiogenesis, and this association may related to the activation of Ras/PI3K/PTEN/Akt pathway.

Keywords: Lin28A; Lin28B; Let-7a; angiogenic factor; H-Ras/PTEN/PI3K/Akt

鼻咽癌是我国南方较为常见的一种恶性肿瘤,采用调强放疗为主的综合治疗可以取得较为理想的效果^[1]。但是临床发现,鼻咽癌诊断时多处在晚期,且出现淋巴转移。因此早诊断、早治疗是鼻咽癌患者延缓生存期的重要前提保证^[2]。miRNA Let-7 家族在恶性肿瘤中表达下降,而 Lin28A、Lin28B 则升高。目前,已有临床报道证实^[3],miRNA Let-7/Lin28 与鼻咽癌的发生、发展有一定的关联性,而癌症的发生、发展,尤其是淋巴转移与血管新生有着密切关系。那么鼻咽癌患者 miRNA Let-7/Lin28 与血管新生是否具有相关性以及这一相关性的作用机制如何值得研究^[4]。本研究旨在探讨 miRNA Let-7/Lin28 与促血管生成因子的关联性,以及这一关系的作用机制,以期揭示 miRNA 与鼻咽癌淋巴转移的关系,进而为分子的靶向治疗提供一定的实验基础依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2012 年 4 月 -2014 年在湖北省襄阳市中心医院耳鼻喉科就诊的鼻咽癌患者 54 例。所有患者经病理组织活检证实为鼻咽癌,其中,男性 43 例,女性 11 例,年龄 33~69 岁,平均(47.1 ± 6.9)岁。根据中国鼻咽癌临床分期委员会“2008 年鼻咽癌分期诊断标准”将 54 例患者分为:初诊患者 40 例,其中 I 期 12 例,II 期 15 例,III~IV 期 13 例;14 例出现淋巴转移。另选取 72 例疑有肿瘤患者,经病理组织活检分为慢性咽炎患者和健康者并作为对照组。慢性咽炎组:40 例,其中,男性 31 例,女性 9 例,年龄 32~68 岁,平均(46.5 ± 6.4)岁。健康对照组:32 例,其中,男性 25 例,女性 7 例,年龄 34~70 岁,平均(47.3 ± 6.8)岁。所有患者均签订知情同意书,并经医院伦理委员会同意批准执行。

1.2 方法

1.2.1 病理标本收集 所有研究对象在局部麻醉下行内镜辅助鼻咽活检术,取部分所采集病理组织标本以多聚甲醛固定进行病理学检查,其余组织放入已消毒的离心管,置入液氮中,于 -80℃ 冰箱中冷冻保存备用。

1.2.2 血清标本采集 所有研究对象在入选后均采取空腹肘静脉血 3 ml 并立即分离血清,置于 -40℃ 冰箱冷冻中备用,统一测定。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 Lin28A、Lin28B 及 Let-7a miRNA 将冷冻活检的部分鼻咽组织以液氮吹打使细胞破裂,Trizol 法抽提细胞中的总 RNA,采用紫外分光光度计判定 RNA 的纯度并以 $\lambda 260 \text{ nm}$ 的光吸收值作为定量,逆转录合成 cDNA 作为 PCR 模板,设计靶基因 Lin28A、Lin28B 及 Let-7a miRNA 以及内参 U6snRNA 的正反向引物(引物的正反序列见表 1),以 cDNA 模板合成引物,进行 PCR 反应,琼脂糖电泳进行有效性验证,将有效的 cDNA 模板、Lin28A、Lin28B 及 Let-7a miRNA 以及内参 U6snRNA 进行 RT-PCR,严格按照 SYBR Green(TOYOBO 公司,日本)说明书进行操作,在 LightCycler™(Roche 公司)PCR 仪上进行扩增反应,数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 求得目的基因相对于内参基因的相对表达量。 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 。 $\Delta\Delta Ct$ 表示正常鼻咽组织与鼻咽癌组织中差异程度。

1.2.4 血管新生指标检测 检测的血管新生指标有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及血管内皮抑素(Endostatin, ES)。采用酶联免疫法(ELISA)进行检测,严格执行说明书操作。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 H-Ras/PTEN/PI3K/Akt 通路 将冷冻活检的部分鼻咽组织取出,通入液氮研磨使细胞充分破裂,将破碎的组织装入玻璃混匀器中,按照 100(1/10 ng 加入适量裂解液,含 PMSF),冰上孵育 30 min,然后 4℃ 离心机,以 12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,置入 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。组织总蛋白经考马斯亮蓝进行定量。组织蛋白质样品加入 1/4 倍量 5 × SDS 上样缓冲液进行混匀,煮沸变性 6 min 左右,10% SDS-PAGE115V 进行电泳,210 mA 恒流 1 h 40 min 湿转至硝酸纤维膜(NC 膜)上。5%脱脂奶粉 TBST 缓冲液室温封闭 3 h,加抗 H-Ras-21、PTEN、

p-PI3K、p-Akt 单抗(鼠抗人,1:500)。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后与结合辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000)室温孵育 1 h,TBS 洗膜 3 次,每次 10 min,最后采用发光试剂盒 ECL 反应,X 胶片曝光显影。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据用单因素方差分析,Western blot 图片用 Image J4.2 进行扫描灰度值。用 pearson 相关性分析指标相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	Tm(°C)	长度 /bp
Lin28A	5'-TGATGCAGTTGGTCGCTGATGGCA-3'	58	189
	5'-AGCCCAATGCCCTCTCTGAGGGCCT-3'		
Lin28B	5'-ATGCGGAGCTGCAGCAGGATACTATG-3'	57	119
	5'-CTAGCGCGCTATGTGCACATTGCATG-3'		
Let-7a	5'-CAGGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT-3'	58	77
6 UsmRNA	5'-CACTTCCCAACCAAAATCTTCAAAG-3'	60	94

正反向引物均购自美国 ABI 公司

2 结果

2.1 RT-PCR 检测结果

研究结果显示,鼻咽癌患者 Lin28A miRNA、Lin28B miRNA 相对表达量均高于慢性鼻炎组、健康对照组($P < 0.05$),而 Let-7a miRNA 的相对表达量低于上述两组($P < 0.05$),见表 2。

2.2 血管新生因子测定结果

血清研究结果显示,鼻咽癌患者组 VEGF、bFGF、ES 表达量均高于慢性鼻炎组、健康对照组($P < 0.05$),见表 3。

2.3 Western blot 检测结果

检测结果显示,鼻咽癌患者组病理组织中 H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 表达量高于慢性鼻炎患者组、健康对照组($P < 0.05$),而 p-PTEN 表达量低于上述两组($P < 0.05$),见表 4 和附图。

表 2 RT-PCR 检测 Lin28A、Lin28B 及 Let-7a miRNA 相对量的结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Lin28A miRNA	Lin28B miRNA	Let-7a miRNA
健康对照组	32	2.23 ± 0.61	2.21 ± 0.43	1.49 ± 0.31
慢性鼻炎组	40	2.75 ± 0.56	3.49 ± 0.69 ¹⁾	1.27 ± 0.29 ¹⁾
鼻咽癌组	54	3.64 ± 0.87 ²⁾	4.58 ± 0.76 ²⁾	0.83 ± 0.24 ²⁾
F 值		10.41	21.36	8.93
P 值		0.019	0.000	0.027

注:1)与健康对照组比较, $P < 0.05$;2)与慢性鼻炎组比较, $P < 0.05$

表 3 不同组别血管新生因子结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

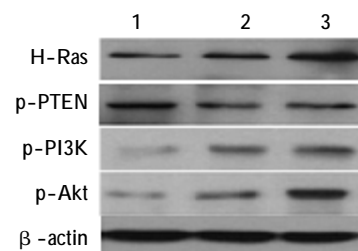
组别	例数	VEGF/(pg/ml)	bFGF/(pg/ml)	ES/(ng/L)
健康对照组	32	25.47 ± 6.13	12.65 ± 2.89	31.69 ± 4.65
慢性鼻炎组	40	31.32 ± 9.60 ¹⁾	19.20 ± 3.53 ¹⁾	32.32 ± 6.31
鼻咽癌组	54	50.43 ± 10.12 ²⁾	30.33 ± 4.18 ²⁾	76.62 ± 6.33 ²⁾
F 值		19.47	10.71	8.83
P 值		0.000	0.014	0.031

注:1)与健康对照组比较, $P < 0.05$;2)与慢性鼻炎组比较, $P < 0.05$

表 4 Western blot 检测 H-Ras/PTEN/PI3K/Akt 通路蛋白灰度值比情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	H-Ras	p-PTEN	p-PI3K	p-Akt
健康对照组	0.345 ± 0.023	0.462 ± 0.017	0.126 ± 0.015	0.107 ± 0.013
慢性鼻炎组	0.449 ± 0.031 ¹⁾	0.298 ± 0.021 ¹⁾	0.212 ± 0.020 ¹⁾	0.237 ± 0.019 ¹⁾
鼻咽癌组	0.824 ± 0.044 ²⁾	0.253 ± 0.024 ²⁾	0.351 ± 0.027 ²⁾	0.428 ± 0.026 ²⁾
F 值	13.58	18.32	12.36	19.38
P 值	0.010	0.009	0.011	0.007

注:1)与健康对照组比较, $P < 0.05$;2)与慢性鼻炎组比较, $P < 0.05$



1:健康对照组;2:慢性鼻炎组;3:鼻咽癌组

附图 Western blot 检测 H-Ras/PTEN/PI3K/Akt 通路蛋白表达情况

表 5 相关性分析结果

相关系数 r	VEGF	bFGF	ES	H-Ras	p-PTEN	p-PI3K	p-Akt
Lin28A miRNA	0.558 [†]	0.462 [†]	0.117	0.523 [†]	-0.623 [†]	0.449 [†]	0.458 [†]
Lin28B miRNA	0.515 [†]	0.442 [†]	0.109	0.486 [†]	-0.514 [†]	0.463 [†]	0.567 [†]
Let-7a miRNA	-0.479 [†]	-0.412 [†]	0.112	-0.639 [†]	0.555 [†]	-0.547 [†]	-0.522 [†]

注:† $P < 0.05$

2.4 相关性分析

表 5 相关性分析显示, Lin28A、Lin28B miRNA 与 VEGF、bFGF、H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 呈正相关 ($P < 0.05$), 与 p-PTEN 呈负相关 ($P < 0.05$); Let-7a miRNA 与 VEGF、bFGF、H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 呈负相关 ($P < 0.05$), 与 p-PTEN 呈正相关 ($P < 0.05$)。

3 讨论

鼻咽癌是我国南方较为常见的一种恶性肿瘤, 采用调强放疗为主的综合治疗方法是目前非常有效的方式之一, 但是该病隐匿性较高、转移倾向较为强烈, 大约有 75% 的患者发现鼻咽癌时在晚期, 其局部已发生淋巴结转移, 因此尽早诊断是临床治愈该病的关键点^[6]。临床研究结果显示^[6], 该病与编码区基因有关, 其非编码区基因与鼻咽癌的发生发展有一定的联系, 特别是一类高度保守的非编码单链小分子 RNA, 约有 50% 左右的 miRNA 定位于肿瘤相关基因区域, 染色体出现异常时 miRNA 的基因拷贝数出现变化, 研究证实^[7] miRNA 参与了肿瘤发生发展的每一个环节。有报道指出 miRNA 经过长期保存、反复冻融后仍然可以稳定存在, 其在肿瘤患者循环中的表达谱相对于正常人具有显著性差异^[8]。因此 miRNA 具有稳定、不易降解、高效、易得等特点, 可以作为肿瘤标志物。在多种人类癌症中, Let-7 miRNA 家族的表达发生明显的改变, 其调控多种癌相关基因表达情况, 具有“抑癌基因”的功能^[9]。Lin28 是广泛表达于恶性肿瘤细胞中的 RNA 结合蛋白, 研究证实其为 Let-7 生物合成的重要负向调节因子, 也有研究证实, Lin28 反过来成为 Let-7 的主要作用靶点, 两者构成了调控癌症发生发展的“双向负反馈调节环”^[10]。黄孝文等^[11]已经有研究证实, 鼻咽癌患者组织中存在 Lin28 表达上调, 而 Let-7a 表达下调。本研究也证实鼻咽癌患者组织中存在 Lin28A、Lin28B 均出现上调, 而 Let-7a 出现下调, 与黄孝文所研究的基本一致。这也说明鼻咽癌患者存在 Lin28/Let-7 调节环的表达异常。但需要指出的是黄等并未探讨 Lin28/Let-7 调节环与血管新生的关系以及关联性的作用机制。

恶性肿瘤的主要临床特征表现在癌细胞容易侵袭周围组织以及发生远处转移, 而其转移主要是通过新生血管和淋巴管进行转移^[11]。新生血管已经被证实为肿瘤细胞的转移通道, 其中 VEGF 和 bFGF

是促血管新生作用最强且特异性最高的两种因子, 具有促进血管内皮细胞增殖、迁移, 从而促进新生血管的形成, 而新生血管的形成成为癌细胞的转移提供通道以及营养支持, 进一步促进癌细胞的增殖和扩散^[12]。通过本研究显示, 鼻咽癌患者血清中 VEGF、bFGF 的表达量高于慢性鼻炎组、健康对照组。促血管生成与抗血管生成共同构成一个复杂的网络体系。研究显示^[13], ES 增高的恶性肿瘤患者出现远处转移增加的现象, 其原因是 ES 的增高间接的反映出血管新生因子的表达量也明显增加, 因此本研究也发现, 鼻咽癌患者血清中 ES 含量明显高于慢性鼻炎组、健康对照组。

Lin28/Let-7 调节环影响多种基因、蛋白的表达, 主要有 C-myc 基因、Ras 基因、高迁移率组蛋白等。有研究发现^[14], H-Ras 的过表达与鼻咽癌的发生、发展密切相关。有研究显示, Ras 可以通过 Raf/MEK/ERK 和 PI3K/PTEN/Akt 等通路介导肿瘤的发生、发展, 而 PI3K/PTEN/Akt 通路是目前公认的血管新生通路, 该通路上的 PI3K、Akt 蛋白出现磷酸化后将导致 VEGF、bFGF 等促血管生成因子的高表达^[15]。通过 Western blot 证实鼻咽癌患者组织中 H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 表达量高于慢性鼻炎患者组、健康对照组, 而 p-PTEN 表达量低于上述两组, 该结果说明鼻咽癌患者 PI3K/PTEN/Akt 被激活, 导致促血管生成因子高表达。通过 pearson 相关性分析发现, Lin28A、Lin28B miRNA 与 VEGF、bFGF、H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 呈正相关, Let-7a miRNA 与 VEGF、bFGF、H-Ras、p-PI3K 及 p-Akt 呈负相关, 该结果说明 Lin28/Let-7 对鼻咽癌患者 PI3K/PTEN/Akt 及其下游的促血管生成因子有一定的影响。通过本研究显示, Lin28/Let-7 与促血管生成因子具有一定的关联性, 而该关联性可能是由于 PI3K/PTEN/Akt 通路被激活所致。

综上所述, miRNA Lin28/Let-7 调节环与血管新生有一定的关联性, 而该关联性可能与激活 PI3K/PTEN/Akt 通路有关。

参 考 文 献:

- [1] YUAN C, YIP SP, WU VW, et al. Association between genetic polymorphisms and carotid atherosclerosis in patients treated with radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma [J]. Radiation Oncology, 2015, 10(1): 341.
- [2] QI X, LI J, ZHOU C, et al. MicroRNA-320a inhibits cell pro-

- liferation, migration and invasion by targeting BMI-1 in nasopharyngeal carcinoma[J]. FEBS Letters, 2014, 588(20): 3732-3738.
- [3] WANG Y, YANG J, SHENG W, et al. Adenovirus-mediated ING4/PTEN double tumor suppressor gene co-transfer modified by RGD enhances antitumor activity in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. International Journal of Oncology, 2015, 46(3): 1295-1303.
- [4] 黄孝文, 饶丽华, 许胜, 等. 微小 RNA Let-7/Lin28 调节环在鼻咽癌中的表达及意义[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2015, 44(1): 60-63.
- [5] GOODE, B L, ECK M J. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly[J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76(1): 593-627.
- [6] REHFELD F, ROHDE A M, NGUYEN D T, et al. Lin28 and let-7: ancient milestones on the road from pluripotency to neurogenesis[J]. Cell and tissue research, 2015, 21(1): 66-80.
- [7] 赵正军, 莫浩元, 张昌卿, 等. 治疗前外周血管内皮抑素浓度与局部晚期鼻咽癌治疗后远处转移的关系 [J]. 癌症, 2007, 26(11): 1243-1247.
- [8] DENG M, TANG H, ZHOU Y, et al. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cell Sci, 2011, 124(17): 2997-3005.
- [9] LI Q, WU Z, PENG Y, et al. MicroRNA-10b induced by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 promotes the metastasis of human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2010, 299(1): 29-36.
- [10] JI J, WANG X W. A Yin-Yang balancing act of the Lin28/let-7 link in tumorigenesis[J]. J Hepatol, 2010, 53(5): 974-975.
- [11] GONG B, LIU W W, NIE W J, et al. MiR-21/RASA1 axis affects malignancy of colon cancer cells via RAS pathways [J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(5): 1488-1497.
- [12] TSUBAKI M, TAKEDA T, SAKAMOTO K, et al. Bisphosphonates and statins inhibit expression and secretion of MIP-1 α via suppression of Ras/MEK/ERK/AML-1A and Ras/PI3K/Akt/AML-1A pathways [J]. American Journal of Cancer Research, 2015, 5(1): 168-179.
- [13] 周玉贵, 宣世海, 李秀萍, 等. 鼻咽癌患者血清 EGF 和 EGFR 的检测及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 234-237.
- [14] 黄琴, 张清富, 陈莉, 等. 乳腺癌乙酰肝素酶、bFGF、VEGF 的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(2): 180-186.
- [15] 明学志, 尹浩然, 朱正纲, 等. 胃癌组织中 H-ras 和 VEGF 的表达与血管生成的关系及其临床意义 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(5): 357-362.

(张蕾 编辑)