

· 肿瘤与转化 ·

前列腺癌患者癌组织中 miR-21 表达水平及与预后的关系分析

杨秋香, 邓 实, 郭良芳, 杨清荣

[摘要] 目的 分析前列腺癌患者癌组织中 miRNA-21(miR-21)表达水平及与预后的关系。方法 回顾性分析 2011 年 1 月—2012 年 6 月四川大学华西医院 76 例前列腺癌行手术切除患者资料,采用特异性 Taq-Man 探针实时定量 PCR 法检测患者切除前列腺癌组织及癌旁前列腺组织 miR-21 表达水平,分析其与患者预后的关系。结果 miR-21 在前列腺癌组织中相对表达量为(2.68±0.54),明显高于癌旁组织的(1.14±0.42)($t=19.62, P<0.05$);前列腺癌患者 miR-21 高表达者 57 例(75%),低表达者 19 例(25%),2 组 TNM 分期、Gleason 评分、复发转移比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),而年龄、前列腺体积、血清前列腺特异抗原水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);miR-21 表达量低组平均生存期 32.5 个月,miR-21 表达量高组平均生存期 24.8 个月,经 Kaplan-Meier 生存分析显示,2 组差异有统计学意义($P=0.019$)。结论 miR-21 在前列腺癌患者癌组织中具有高表达现象,对前列腺癌的诊断及预后评价具有指导意义。

[关键词] 前列腺癌;miR-21

[中图分类号] R737.25

[文献标志码] B

[文章编号] 2095-3097(2018)03-0134-04

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2018.03.002

The expression level of miR-21 in patients with prostate cancer and its relationship with the prognosis

Yang Qiuxiang, Deng Shi, Guo Liangfang, Yang Qingrong

(Department of Urology/Urology Research Institute, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the expression level of miRNA-21 (miR-21) in cancer tissues of patients with prostate cancer and its relationship with the prognosis. **Methods** The data of 76 patients with prostate cancer undergoing surgical resection in the West China Hospital of Sichuan University from January 2011 to June 2012 were analyzed retrospectively. The expression levels of miR-21 in cancer tissues and paracancerous normal prostate tissues were detected by specific TaqMan probe real-time quantitative PCR method, and the relationship with the prognosis was analyzed. **Results** The relative expression of miR-21 in prostate cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues [(2.68±0.54) vs (1.14±0.42)] ($t=19.62, P<0.05$). MiR-21 was highly expressed in 57 cases (75%) and lowly expressed in 19 cases (25%). There were significant differences between the two groups in TNM stage, Gleason score, recurrence and metastasis ($P<0.05$), while there were no significant differences in age, prostate volume and serum prostate-specific antigen level ($P>0.05$). The average survival time of group with low expression level of miR-21 and group with high expression level of miR-21 was 32.5 months and 24.8 months, respectively. The Kaplan-Meier survival analysis showed that the difference between the two groups was significant ($P=0.019$).

Conclusion miR-21 is highly expressed in prostate cancer tissues, which can indicate the prognosis.

[Key words] Prostate cancer; miR-21

近年,前列腺癌发病率已高居我国男性泌尿系统疾病首位,内分泌治疗和根治性手术是该恶性肿瘤主要治疗方式,但两种方式皆可因治疗后癌灶转移复发导致治疗失败,故探索前列腺癌发病机制,寻

找指示前列腺癌预后的标志物十分必要^[1-3]。此前,国际上将前列腺特异抗原(prostate-specific antigen, PSA)>4 ng/mL 作为前列腺癌筛查指标,但临床应用中发现,当 PSA 值处于 4~10 ng/mL 时,难以区分前列腺良恶性病变,PSA 诊断的特异性、敏感性并不够理想^[4-5]。随着分子生物学技术的发展,微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, microRNA)为肿瘤标志

[基金项目] 四川省科技厅科研课题(2017SZ0149)

[作者单位] 610041 四川 成都,四川大学华西医院泌尿外科/泌尿外科研究所(杨秋香,邓 实,郭良芳,杨清荣)

[通讯作者] 杨清荣, E-mail: wangqianwq1221@163.com

物的发现提供新思路, microRNA 为 18~26 个碱基大小的非编码单链 RNA, 可对靶基因发挥调控作用, 参与人类癌症发生发展过程^[6]。microRNA-21 (miR-21) 属于 microRNA 家族成员之一, 目前发现, 其在肺癌、甲状腺乳头状癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌等多种癌组织中表达异常现象^[7]。作者通过特异性 TaqMan 探针实时定量 PCR 法探讨 miR-21 在前列腺癌患者癌组织及癌旁组织中的表达情况, 并分析其与患者临床预后的关系, 为前列腺癌诊治提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料 选取 2011 年 1 月—2012 年 6 月四川大学华西医院 76 例行前列腺癌手术切除患者资料。纳入标准: ①临床诊断符合世界卫生组织有关前列腺癌诊断标准^[8], 均行前列腺癌根治性手术治疗, 每例术中均获得 2 份前列腺组织, 术后病理检测确定为 1 份属于前列腺癌灶组织, 1 份属于癌旁正常前列腺组织; ②术前均未接受放化疗、内分泌治疗等保守方式治疗者; ③相关病理资料及随访资料完整者。排除标准: ①合并其他恶性肿瘤者; ②复发性前列腺癌者; ③术后接受放化疗等方式治疗者; ④合并急性感染、高血压、糖尿病、肺结核、风湿病等其他疾病者。76 例患者均为男性, 年龄 47~75 (58.89±6.74) 岁。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 从 -80 °C 冰箱取出经病理切片证实为前列腺癌癌组织和癌旁正常前列腺组织的标本 2~3 mm³, 冷冻匀浆后加入 1 mL TRIzol 试剂 (购自美国 Invitrogen 公司), 遵照说明书提取总 RNA, 再使用 20 μL 焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水 (购自美国 Amersco 公司) 溶解提取总 RNA; 总 RNA 提取完毕后, 采用 NanoVue 分光光度计 (购自美国 GE 公司) 检验获得 RNA 样品纯度和质量, 吸光度处于 1.8~2.0 之间为达标样品, 进行后续反转录。

1.2.2 反转录获得 cDNA 取一个 200 μL 去 RNA 酶微量离心管 (Eppendorf, EP) (购自美国 Invitrogen 公司), 依次加入 5 μL RNA (总 RNA 量最多 5 μg)、2 μL microRNA 特异性引物 (5×)、1 μL 10 mM dNTP Mix、2 μL DEPC 水, 总量 10 μL, 标记为 Mix1; 另取一个 50 μL 去 RNA 酶 EP 管, 依次加入 2 μL 10×RT 反转录缓冲液、4 μL 25 mM 镁离子、2 μL 0.1M dTT、1 μL RNaseout 40 u/μL、1 μL SuperScript RT (200 U/μL) 和 Mix1, 共 20 μL 反应液, 置入聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (德国 Eppendorf 公司), 调试程序为 16 °C 处理 30 min、50 °C 处理 30 min、85 °C 处理 5 min, 反应后获得 cDNA 模板, 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2.3 实时定量 PCR 扩增检测 miR-21 表达量采用特异性 TaqMan 探针 RT-PCR 进行检测, miR-21 引物和探针由美国 Invitrogen 公司设计 (引物序列为其专利, 不提供具体碱基序列), U6 作为内参基因, miR 碱基序列为: 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'。准备 8 μL 超纯水、1 μL 特异性引物 (20×)、10 μL PCR Master Mix、1 μL cDNA 模板, 总体积 20 μL, 置于 RT-PCR 仪。设置如下反应步骤: ①95 °C, 120 s; ②95 °C 保持 10 s 退火, 60 °C 保持 30 s 延伸。进行 40 个循环, 重复实验 3 次。仪器软件获得 CT 值, 经 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ^[9] 计算 miR-21 在前列腺癌组织及癌旁组织中的表达量。

1.3 观察指标 ①分析 miR-21 在前列腺癌组织及癌旁组织中的表达情况; ②以前列腺癌患者癌灶组织与癌旁正常组织 miR-21 表达量比值为 2 作为临界值^[10], 将患者分为 miR-21 高表达组和低表达组, 分析表达量与临床病理的关系; ③采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 miR-21 表达量与患者生存的关系。

1.4 统计学处理 本研究所有数据经核实无误后输入 Excel 软件中建立数据库, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 计数资料用百分比表示, 采用 χ^2 检验, 计量资料用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用 *t* 检验, 并用 Kaplan-Meier 分析 miR-21 表达于生存的关系, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 在前列腺癌组织及癌旁组织中的表达分析 实时定量 PCR 分析 76 份前列腺癌组织和 76 份癌旁正常前列腺组织 miR-21 相对表达量发现, miR-21 在前列腺癌组织中相对表达量为 (2.68±0.54), 明显高于癌旁组织的 (1.14±0.42) ($t=19.62, P<0.05$), 图 1, 说明 miR-21 在前列腺癌患者癌组织中具有高表达现象, 提示 miR-21 对前列腺癌具有诊断价值。

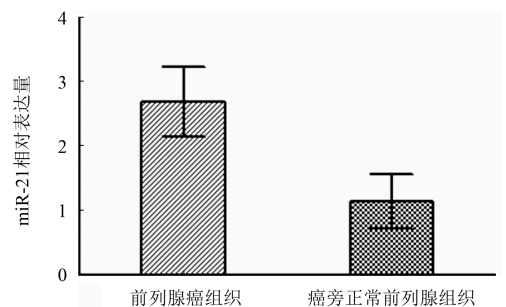


图 1 miR-21 在前列腺癌组织及癌旁组织中的表达分析

2.2 miR-21 与前列腺癌患者病理特征的关系分析 前列腺癌患者 miR-21 高表达者 57 例 (75%), 低表达者 19 例 (25%)。2 组 TNM 分期 ($\chi^2=9.444, P=$

0.002)、Gleason 评分($\chi^2 = 5.197, P = 0.023$)、18 个月内复发转移比较($\chi^2 = 10.321, P = 0.001$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而年龄($\chi^2 = 0.439, P = 0.508$)、前列腺体积($\chi^2 = 0.179, P = 0.672$)、血清 PSA 水平比较($\chi^2 = 0.441, P = 0.506$), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表 1。

表 1 miR-21 与前列腺癌患者病理特征的关系分析

项 目	n	miR-21	
		高表达 (n=57)	低表达 (n=19)
年龄	≤65 岁	39	11
	>65 岁	37	8
前列腺体积(mL)	≤25	25	7
	>25	51	12
TNM 分期	I ~ II 期	33	14
	III ~ IV 期	43	5
Gleason 评分	≤6 分	24	10
	≥7 分	52	9
血清 PSA 水平 (ng/mL)	≤10	35	10
	>10	41	9
18 个月内复发转移情况	有	22	0
	无	54	19

2.3 前列腺癌患者 miR-21 表达量与预后 miR-21 表达量低组平均生存期 32.5 个月, miR-21 表达量高组平均生存期 24.8 个月, 经 Kaplan-Meier 生存分析显示, 2 组差异有统计学意义 ($P = 0.019$), 图 2。

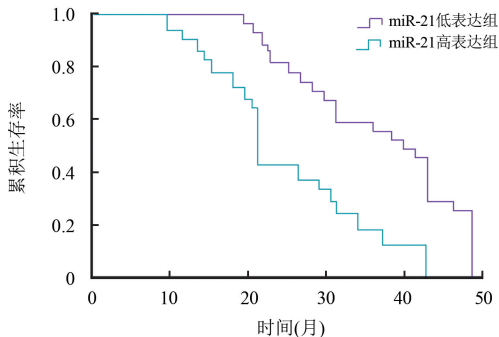


图 2 前列腺癌患者组织 miR-21 表达量与生存的关系分析

3 讨论

随着分子生物学技术的发展, 人们发现 microRNA 在癌症发病过程中发挥关键作用, 不断扮演着抑癌基因或原癌基因角色, 且不同癌症 microRNA 表达谱并不相同^[11-12]。miR-21 属于 microRNA 大家族中的一种, 长约 18~24 bp, 被发现时间较早, 能够特异性识别并结合 mRNA 3' 非翻译区, 发挥抑制或降解靶 mRNA, 发挥转录后调控作用, 多表达于人体细胞和组织中, 参与细胞增殖、分化、凋亡、调控癌症等过程。目前研究显示, 其在多种癌症组织中具有过量表达趋势, 如肺癌、肝癌、胃癌、胰腺癌、结直肠癌等, 但有关前列腺癌相关的研究相对较少^[13]。本研究检测 miR-21 在前列腺癌患者癌组织中表达情况, 并分析其与患者预后的关系, 发现 miR-21 在前列腺癌

患者癌组织中具有高表达现象, 且表达情况与前列腺癌患者 TNM 分期、Gleason 评分、复发转移和生存期均有关。

研究发现, 大约 50% 的 microRNA 定位于癌症基因组位置, 通过调控多种靶基因发挥抑癌或原癌基因作用, 而 miR-21 主要定位于染色体 17q23.2 位置, 位于常见 FRA17B 断裂位点内, 此位点被发现是肺癌、结肠癌、乳腺癌过量扩增位点, 且与人类 TMEM49 基因发生部分重叠编码, 故 miR-21 在此位点上调表达, 可导致癌症发生^[14]。本研究 miR-21 在前列腺癌组织中高表达, 证明其在前列腺癌中表达情况与多种癌症类型过表达一致, miR-21 与前列腺癌的发生发展关系密切。张聪等^[15]分析 miR-21 在前列腺癌组织和良性前列腺增生组织中表达情况, 发现 miR-21 在前列腺癌组织中表达水平高于良性前列腺增生组织, 认为 miR-21 参与前列腺癌的发生发展, 与本研究论点一致。此外, miR-21 还参与雄激素非依赖性前列腺癌进展, 主要与 miR-21 能够在转录过程直接调控前列腺癌雄激素受体表达, 促进雄激素分泌, 进而促进前列腺癌细胞不断增殖有关^[16]。

miR-21 不仅可在前列腺癌组织中高表达, 而且与前列腺癌手术治疗患者预后疗效密切相关。miR-21 高表达组的 TNM 分期多为 III ~ IV 期, Gleason 评分 ≥7 分, 18 个月内复发转移率高, 生存期短, 且与低表达组差异显著, 说明 miR-21 表达与前列腺癌进展程度、组织学分级、癌灶复发转移和生存期密切相关。肿瘤 TNM 分期越高, Gleason 评分越高, 预示肿瘤恶性程度越高, 即便给予根治性手术切除, 仍有较高复发转移风险, 降低生存期; 而 miR-21 表达则可指示患者预后, 能够为后期辅助治疗方案的制定提供参考, 提高治疗成功率。目前有关 miR-21 表达与前列腺癌治疗预后的报道并不多, 仅张聪等^[15]证实, miR-21 与前列腺癌手术治疗患者术前 Gleason 评分相关。抑制肿瘤细胞 miR-21 表达, 其细胞核内 AR、AKT、mTOR 等蛋白均呈下调表达趋势, 可抑制前列腺癌细胞增殖, 故 miR-21 有望成为前列腺癌新的基因治疗靶点。

总之, miR-21 在前列腺癌组织中高表达, 可能参与该癌症的发生发展过程, miR-21 表达与前列腺癌手术治疗患者的 TNM 分期、Gleason 评分、复发转移和生存期密切相关, 说明其可指示预后疗效。但临床应用组织学标本检验 miR-21 表达情况, 受限于样本取样, 并不适于广泛推广, 后期还需探究血清 miR-21 水平在前列腺癌患者中的表达及与预后的关系, 及分析 miR-21 如何影响前列腺癌的生物调节机制, 方可利于抗癌技术发展, 任重而道远。

综上所述,林芝巴宜区中老年人群高血压的患病率处于较高水平,政府相关部门要引起重视,在防治工作中需要结合本地区特点采取多种措施,建立防控体系,降低本地区高血压发病率。

【参考文献】

- [1] 中国高血压防治指南修订委员会.中国高血压防治指南2010[J].中华高血压杂志,2011,19(8):701-742.
- [2] 张彦博.高原疾病[M].西宁:青海人民出版社,1982:340.
- [3] 胡以松,姚崇华,王文志,等.2002年中国部分民族高血压患病情况[J].卫生研究,2006,35(5):573-575.
- [4] 中国肥胖问题工作组.中国成人超重与肥胖症预防控制指南(试行)2003版[J].营养学报,2004,26(1):1-4.
- [5] Regidor E, Banegas JR, Gutiérrez-fisac JL, et al. Special theme: cardiovascular disease socioeconomic position in childhood and cardiovascular risk factors in older Spanish people (2003) [J]. Int J Epidemiol, 2004, 33(4):723-730.
- [6] 廖海江,梅家模,张昆照,等.农村中老年居民高血压危险因素研究[J].中国慢性病预防与控制,1999,7(6):256-258.
- [7] 陈国华,许坚,叶真,等.城乡居民高血压患病情况及影响因素研究[J].浙江预防医学,2013,25(7):11-13.
- [8] 李克明,饶克勤,孔灵芝,等.中国居民2002年营养与健康状况调查[J].中华流行病学杂志,2005,26(7):478-483.
- [9] 蒋磊,胡学军,杨丽辉,等.拉萨市区中老年人饮食结构及日常运动量的调查分析[J].西藏科技,2006,(5):4-6.
- [10] 赵兴山,翟金金,赵一飞,等.西藏高海拔地区居民高血压患病率、治疗率及控制率现状研究[J].心肺血管病杂志,2017,36(3):150-154.
- [11] Sun SF. Epidemiology of hypertension on the Tibetan Plateau [J]. Hum Biol, 1986, 58(4):507-515.
- [12] Dong C, Ge P, Ren X, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension among adults in rural north-western China: a cross-sectional population survey [J]. J Int Med Res, 2013, 41(4):1291-1300.
- [13] Liu L. Cardiovascular diseases in China [J]. Biochem Cell Biol, 2007, 85(2):157-163.
- [14] Tripathy V, Gupta R. Blood pressure variation among Tibetans at different altitudes [J]. Ann Hum Biol, 2007, 34(4):470-483.

(收稿日期:2017-04-14 本文编辑:常青云)

(上接第136页)

【参考文献】

- [1] Chuang KY, Chuang YC, Ho YS. Global influence of cancer statistics articles [J]. Curr Sci, 2015, 109(9):1552-1554.
- [2] 郭琼,严彬,南小新,等.miRNA-29b在前列腺癌中的表达及意义[J].医学临床研究,2015,32(1):42-44.
- [3] 张永生,张立平,刘西林,等.快速免疫组化技术在前列腺穿刺组织冰冻切片诊断中的应用[J].中国基层医药,2015,22(11):1700-1703.
- [4] Kotb S, Mosharafa A, Essawi M, et al. Circulating miRNAs 21 and 221 as biomarkers for early diagnosis of prostate cancer [J]. Tumor Biol, 2014, 35(12):12613-12617.
- [5] Guo YF, Li FH, Xie SW, et al. Value of contrast-enhanced sonographic micro flow imaging for prostate cancer detection with t-PSA level of 4-10 ng/mL [J]. Eur J Radiol, 2012, 81(11):3067-3071.
- [6] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and function in cancer [J]. Trends Mol Med, 2006, 12(12):580-587.
- [7] Ohno R, Uozaki H, Kikuchi Y, et al. Both cancerous miR-21 and stromal miR-21 in urothelial carcinoma are related to tumour progression [J]. Histopathology, 2016, 69(6):993-999.
- [8] 《临床泌尿外科杂志》编辑部.欧洲泌尿学会更新前列腺癌诊疗指南[J].临床泌尿外科杂志,2006,21(5):399-400.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [10] 刘凤林,王新锋,王兴武,等.非小细胞肺癌组织 miRNA-21 表达及预后相关性研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(18):1397-1399.
- [11] 单保恩,刘丽华. MicroRNA: 癌症诊治新靶点 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(6):603-609.
- [12] 刘田. microRNA 在甲状腺癌中的研究进展 [J]. 蚌埠医学院学报, 2014, 39(3):417-419.
- [13] Shibuya H, Iinuma H, Shimada R, et al. Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer [J]. Oncology, 2010, 79(3/4):313.
- [14] Abue M, Yokoyama M, Shibuya R, et al. Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer [J]. Int J Oncol, 2015, 46(2):539-547.
- [15] 张聪,曹立宇,尹玉,等.前列腺癌组织中 miR-21 的表达及临床意义 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(12):1365-1367.
- [16] Ribas J, Lupold SE. The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts and their implication in prostate cancer [J]. Cell Cycle, 2010, 9(5):923-929.

(收稿日期:2018-01-29 本文编辑:常青云)