1.43～3.33),表明ERCC1 118 CC是对铂类药物敏感的优势基因型[7]。本研究并没有检测到ERCC1 118 CC基因型与EGFR激活突变有关联,在EGFR突变群体中CC基因型比率略高于野生型群体。

研究[2]表明化疗可显著降低外周血EGFR突变率。本研究的病例多数经历过一线化疗,因此,从外周血浆游离DNA检测到的EGFR总体突变率较低。因回顾性研究的限制,EGFR突变例数较少,使得检验效能降低,难于检测到EGFR突变与ERCC1多态性的相关性。EGFR突变与ERCC1的表达及其SNP三者的关系还需进一步研究。

参考文献:

[1] Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S, *et al*. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957.

[2] Bai H, Wang Z, Chen K, *et al*. Influence of chemotherapy on EGFR mutation status among patients with non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(25): 3077-3083.

[3] 王殿军, 梁乃新, 莫敏俐, 等. 非小细胞肺癌患者EGFR基因突变与ERCC1基因表达水平间的关联[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(1): 56-59.

[4] 李惠, 张树鹏, 谢玲, 等. 非小细胞肺癌组织中EGFR基因突变与ERCC1基因表达的关系[J]. 山东医药, 2012, 52(6): 67-68.

[5] Su D, Ma S, Liu P, *et al*. Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2007, 56(2): 281-288.

[6] Cheng J, Ha M, Wang Y, *et al*. A C118T polymorphism of ERCC1 and response to cisplatin chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(2): 231-238.

[7] Wei S Z, Zhan P, Shi M Q, *et al*. Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis[J]. Med Oncol, 2011, 28(1): 315-321.

[8] 杨卓, 龙美娟, 王斐, 等. 酶切富集联合DHPLC检测肿瘤患者外周血EGFR和KRAS基因突变及其临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(4): 327-332.

[9] Douillard J Y, Shepherd F A, Hirsh V, *et al*. Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: data from the randomized phase Ⅲ INTEREST trial[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(5): 744-752.

[10] Takenaka T, Yano T, Kiyohara C, *et al*. Effects of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) single nucleotide polymorphisms on the prognosis of non-small cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2010, 67(1): 101-107.

[11] Gao R, Reece K, Sissung T, *et al*. The ERCC1 N118N polymorphism does not change cellular ERCC1 protein expression or platinum sensitivity[J]. Mutat Res, 2011, 708(1/2): 21-27.

(**收稿**:2013-08-02;**修回**:2013-09-10)

(编辑　汪勤俭)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2014)02-0186-03

miR-363-3p在胃癌中的表达及其临床意义

陈兆峰[1,2],刘晓光[1],刘　敏[1],刘小军[1],贾　娇[1],姬　瑞[1,2],郭庆红[1,2],周永宁[1,2]　(730000 兰州,兰州大学第一医院消化内科[1],甘肃省胃肠病重点实验室[2])

[**摘要**]　**目的**　探讨miR-363-3p在胃癌中的表达及其与胃癌临床病理特征的关系。**方法**　应用Real-time PCR方法检测7种不同分化程度胃癌细胞株和56例胃癌组织及其对应非癌胃黏膜组织中miR-363-3p的表达,并结合临床资料分析其与胃癌临床病理特征的关系。**结果**　miR-363-3p的表达除AGS高分化胃癌细胞株外,在其余6种胃癌细胞株中均显著低于正常胃黏膜细胞株GES-1($P<0.05$),且胃癌细胞的分化程度越差,其表达量越低;miR-363-3p在胃癌组织中的表达量显著低于非癌胃黏膜组织($P<0.01$);miR-363-3p在高/中分化胃癌组织中的表达显著高于低分化胃癌组织($P=0.035$),不同TNM分期患者miR-363-3p的表达量在Ⅰ/Ⅱ期显著高于Ⅲ/Ⅳ期($P=0.046$),miR-363-3p的表达量在有淋巴结转移的患者中显著低于无淋巴结转移的患者($P=0.021$)。**结论**　miR-363-3p在胃癌细胞和组织中表达明显下调,且与胃癌的分化程度、病理分期及淋巴结转移等密切相关。

[**关键词**]　胃肿瘤;miR-363-3p;临床病理学

[**中图法分类号**]　R394.2;R730.23;R735.2　　[**文献标志码**]　A

[**基金项目**]　"西部之光"人才培养计划(科兰发人字[2012]18号);甘肃省卫生行业科研计划(GSWST09-03);甘肃省自然科学基金(1308RJZA223)

[**通信作者**]　周永宁,电话:(0931)8356872,E-mail:yongningzhou@sina.com

[**优先出版**]　http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131014.1035.013.html(2013-10-14)

MicroRNAs(miRNAs)是一类普遍存在于动植物体内的长约 19 ~ 25 nt 非编码单链小分子 RNA,通过与靶 mRNA 不完全结合,抑制靶基因的转录或翻译发挥其生物学功能[1-2]。近年研究[3-7]证实多种 miRNA 可能直接参与人类肿瘤(如胰腺癌、结直肠癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、肺癌及淋巴瘤等)的形成,且与肿瘤的发生、转移、耐药等病理进程密切相关。前期我们通过 miRNA 芯片对胃癌组织中存在差异表达的 miRNAs 进行了筛查,结果显示 miR-363-3p 在胃癌组织中表达显著低于癌旁组织,提示 miR-363-3p 可能与胃癌的发生、发展密切相关。据此,本研究拟通过分析 miR-363-3p 与胃癌细胞分化程度及临床病理特征的关系,初步阐明其与胃癌发生、发展的作用关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 9 月至 2011 年 10 月甘肃省武威肿瘤医院接受手术治疗的 56 例胃癌患者作为研究对象。取胃癌及其非癌胃黏膜组织(距离癌灶 5 cm 以上,且经 HE 染色证实均无癌细胞)进行实验研究,其中癌组织 56 例,癌旁组织 56 例,术中取材,立即放入液氮中保存后转入 -80 ℃ 长期保存。TNM 分期以 International Union against Cancer (UICC)/American Joint Committee on Cancer(AJCC)TNM 病理分期第六版为标准。以上患者均保存有完整的临床资料,包括姓名、性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤部位、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移等。56 例患者中,男性 32 例,女性 24 例,年龄 35 ~ 76 岁,中位年龄为 56 岁。患者术前均未接受过放、化疗。

1.2 材料

人胃癌细胞株 HGC-27、BGC-823、MKN-45、MGC-803、SGC-7901、NCI-N87、AGS 及正常胃黏膜上皮永生化细胞株 GES-1 均购于中国科学院上海生命科学研究院。RPMI1640 及 DMEM 培养基购自 Gibco 公司,新生牛血清购自杭州四季青公司,胰蛋白酶购自 Sigma 公司,miRNAs 提取试剂盒、反转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒及其引物均购自 TaKaRa 公司。

1.3 Real-time PCR

用 RNAiso for Small RNA 按照说明书提取总的 Small RNA,应用 One Step Prime Script® miRNA cDNA Synthesis Kit 对提取的 Small RNA 进行 Poly(A)加尾以及 cDNA 合成。本实验用 TaKaRa 公司合成的 has-miR-363-3p qPCR Primer Mix 作为特异性引物。反应条件设置为预变性 95 ℃ 10 s;PCR 反应 95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,循环 40 次;熔解温度 95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,95 ℃ 15 s。组织标本实验结果分析:以 Ct 值反映目的基因 cDNA起始含量,Ct 值越高,目的基因 cDNA 起始含量越低。细胞实验中,用 $N = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示 miR-363-3p 表达在胃癌细胞中相对正常细胞的倍数。

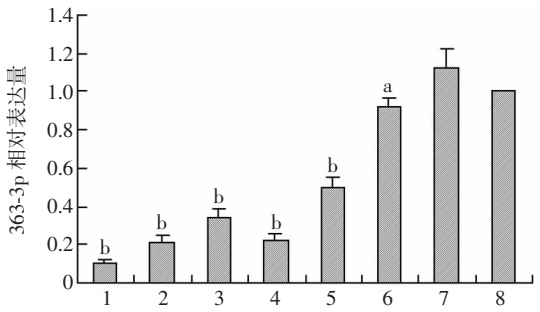
1.4 统计学分析

应用 SPSS 15.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验进行两样本均数之间的比较,多个样本均数之间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 miR-363-3p 在不同分化程度胃癌细胞株中的表达

Real-time PCR 结果显示:AGS 高分化胃癌细胞株中 miR-363-3p 的表达略高于正常胃黏膜细胞株 GES-1($P > 0.05$),其余细胞株中 miR-363-3p 的表达均显著低于 GES-1($P < 0.05$),其表达量与胃癌细胞的分化程度呈正相关性,胃癌细胞的分化程度越差,其表达量越低(图 1)。



1:未分化 HGC-27;2:未分化 MGC-803;3:低分化 MKN-45;4:低分化 BGC-823;5:中分化 SGC-7901;6:高分化 NCl-N87;7:高分化 AGS;8:正常胃黏膜 GES-1;a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与 GES-1 比较

图 1 miR-363-3p 在不同细胞株中的表达

2.2 miR-363-3p 在胃癌组织及非癌胃黏膜组织的表达

Real-time PCR 结果显示:miR-363-3p 在胃癌组织中 ΔCt 值为(6.890 ± 0.309),而非癌胃黏膜组织 ΔCt 值为(2.703 ± 0.892),表明 miR-363-3p 在胃癌组织中的表达显著低于非癌胃黏膜组织(ΔCt 值越高则表明 miR-363-3p 表达越低),差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 miR-363-3p 的表达与胃癌临床病理参数间的关系

胃癌组织 miR-363-3p 表达与分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移有关,与性别、年龄及肿瘤大小无关(表 1)。

表 1 miR-363-3p 表达与胃癌临床病理参数间的关系

变量	n	miR-363-3p 的表达($\bar{x} \pm s$)	P 值
性别			
男	32	3.786 ± 0.352	0.515
女	24	4.134 ± 0.391	
年龄			
≤50 岁	18	4.046 ± 0.499	0.773
>50 岁	38	3.883 ± 0.308	
肿瘤直径			
≤5 cm	31	3.839 ± 0.373	0.686
>5 cm	25	4.055 ± 0.363	
分化程度			
高/中分化	17	2.010 ± 0.637	0.035
低分化	39	4.837 ± 0.351	
TNM 分期			
Ⅰ/Ⅱ期	27	2.914 ± 0.651	0.046
Ⅲ/Ⅳ期	29	4.941 ± 0.282	
淋巴结转移			
无	6	2.729 ± 0.248	0.021
有	50	5.657 ± 0.139	

3 讨论

MiRNAs是人体的一种内源性基因表达调控因子,它通过负性调控靶基因的表达,对基因活动(生长、分化、凋亡及应激反应等)的各个层面进行调节[8-9]。已证实miRNA与肿瘤关系密切,其广泛参与了肿瘤的发生、转移进程。近期研究发现miR-363-3p在肿瘤的发生、发展进程中伴有重要的角色。Sun等[10]研究显示miR-363在头颈部鳞状细胞癌中表达下调,其可通过调控平足蛋白(PDPN)促进头颈部鳞状细胞癌的侵袭和转移。Han等[11]在肝癌的研究中证实miR-148A-5p和miR-363-3p可以直接抑制c-Myc的表达,当抑制miR-148A-5p和miR-363-3p的表达后,其可通过激活c-Myc诱导加快癌细胞从G_1期进入S期,反之增加二者的表达量时,则会通过抑制c-Myc减缓癌细胞从G_1期进入S期,从而抑制癌细胞的增殖。Qiao等[12]研究显示过表达的miR-335和miR-363可以减少人类神经母细胞瘤细胞的浸润转移能力。另外Georgieva等[13]采用高通量测序技术,发现在子宫肌瘤中miR-363也存在异常表达。

本研究分析了7种不同分化程度胃癌细胞株和56例胃癌组织及其对应非癌胃黏膜组织中miR-363-3p的表达情况,结果显示除AGS高分化胃癌细胞株中miR-363-3p表达略高于正常胃黏膜细胞株GES-1外,在其余6种胃癌细胞株及胃癌组织中miR-363-3p的表达均显著下调,进一步证实了miR-363-3p与胃癌关系密切。同时本研究结果还显示除AGS细胞外,miR-363-3p的表达量与胃癌细胞的分化程度成正比,即胃癌细胞的分化程度越差,miR-363-3p的表达量就越低,而且在分析其与胃癌患者临床病理特征关系时发现,miR-363-3p与胃癌的分化程度、TNM分期及有无淋巴结转移等密切相关,提示miR-363-3p可能在胃癌的发生、发展进程中发挥着重要的作用。本研究结果中miR-363-3p表达在AGS细胞株中略高于正常胃黏膜细胞株GES-1,分析其可能的原因有:①miR-363-3p在高分化胃癌细胞株AGS中的表达量与正常胃黏膜细胞株GES-1相近,由于Real-time PCR技术较灵敏,可能在实验过程中存在一定的实验误差;②miR-363-3p的表达在AGS细胞株中可能存在不同的调控途径。

综上所述,miR-363-3p可能是一个新发现的胃癌发生、发展密切相关的miRNA分子,但关于miR-363-3p参与肿瘤发生、发展的具体分子机制仍不清楚,值得我们进一步深入研究。

参考文献:

[1] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function[J]. Thromb Haemost, 2012, 107(4): 605-610.

[2] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of micro RNA biogenesis, function and decay[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610.

[3] Rachagani S, Kumar S, Batra S K. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications[J]. Cancer Lett, 2010, 292(1): 8-16.

[4] Liu R, Zhang C, Hu Z, *et al*. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(5): 784-791.

[5] Xiong Y, Fang J H, Yun J P, *et al*. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(3): 836-845.

[6] Negrini M, Calin G A. Breast cancer metastasis: a microRNA story[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(2): 203.

[7] Faltejskova P, Svoboda M, Srutova K, *et al*. Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(11): 2655-2666.

[8] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing[J]. Cell, 2003, 113(6): 673-676.

[9] Farazi T A, Hoell J I, Morozov P, *et al*. MicroRNAs in human cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 774: 1-20.

[10] Sun Q, Zhang J, Cao W, *et al*. Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(3): 513-520.

[11] Han H, Sun D, Li W, *et al*. A c-Myc-MicroRNA functional feedback loop affects hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 2013, 57(6): 2378-2389.

[12] Qiao J, Lee S, Paul P, *et al*. miR-335 and miR-363 regulation of neuroblastoma tumorigenesis and metastasis[J]. Surgery, 2013, 154(2): 226-233.

[13] Georgieva B, Milev I, Minkov I, *et al*. Characterization of the uterine leiomyoma microRNAome by deep sequencing[J]. Genomics, 2012, 99(5): 275-281.

(**收稿**:2013-08-07;**修回**:2013-09-07)

(编辑 汪勤俭)