

# miRNA-29c 表达水平与胃癌生物学特征的关系

张 靖, 李 伟, 田 戩, 黄 卫, 王东旭(中国人民解放军第二五四医院消化内科, 天津 300142)

**【摘要】** 目的 探讨微小 RNA-29c(miRNA-29c)表达水平与胃癌生物学特征的关系。方法 采取实时定量聚合酶链反应检测胃癌组织、正常胃上皮组织、正常胃上皮细胞系 GES-1、胃癌细胞系 SGC-7901 与 BGC-823 中 miRNA-29c 的表达水平。结果 miRNA-29c 在胃癌组织、正常胃上皮组织相对表达量分别为 (0.71±0.32)、(1.21±0.34), 比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); miRNA-29c 在 GES-1、SGC-7901、BGC-823 细胞系的相对表达量分别为 (1.03±0.07)、(0.62±0.11)、(0.32±0.12)。miRNA-29c 表达水平与肿瘤直径、Ming 分型、TNM 分期、淋巴结转移密切相关 ( $P<0.05$ ), 与患者性别、年龄和肿瘤组织分化程度、浸润程度无关 ( $P>0.05$ )。转染 miRNA-29c 模拟物可抑制 BGC-823 细胞的增殖, 增加细胞凋亡率; 减少 G0/G1 期细胞, 增加 S 期细胞。结论 miRNA-29c 表达水平与胃癌生物学特征具有密切的联系, 可能参与了胃癌的浸润与转移。miRNA 检测在胃癌患者预后判断方面具有一定的应用价值。

**【关键词】** 胃癌; 微小 RNA-29c; 生物学特征

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.17.039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)17-2431-02

胃癌具有较为复杂的发病、浸润、转移机制<sup>[1]</sup>。胃癌患者的预后通常与肿瘤的临床分期、发病部位、组织类型、生物学特征等密切相关。微小 RNA(miRNA)是一类大小约为 22 bp 的内源性、非编码小 RNA, 可通过与 mRNA 的 3' 非转录区完全或者不完全互补进行特异性结合, 抑制 mRNA 的翻译, 并且参与了细胞增殖、分化、代谢等重要过程<sup>[2]</sup>。miRNA 在正常组织与肿瘤组织中具有不同的表达水平, 而且不同类型的肿瘤、或处于不同进展期的肿瘤, 也具有不同的表达水平。miRNA 的异常表达与肿瘤发生、浸润、转移及临床分期等有着密切的联系<sup>[3]</sup>。本研究分析了 miRNA-29c 表达水平与胃癌生物学特征的关系, 旨在探讨 miRNA-29c 对胃癌生物学特征的影响。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2011 年 1 月至 2012 年 12 月于本院经组织病理学检查确诊的胃癌患者 50 例, 男 34 例、女 16 例; 年龄小于 60 岁 24 例, 大于或等于 60 岁 26 例; 肿瘤直径小于 10 cm 30 例, 大于或等于 10 cm 20 例; 临床 Ming 分型包括浸润型 22 例, 膨胀型 28 例; 分化程度包括高分化 8 例, 中分化 18 例, 低分化 24 例。临床 TNM 分期包括 I~II 期 20 例, III~IV 期 30 例; 淋巴结转移分型包括 N0~N1 20 例, N2~N3 30 例; 浸润程度分型包括 T1~T2 15 例, T3~T4 35 例。

**1.2 主要试剂** 正常胃上皮细胞系 GES-1、胃癌细胞系 SGC-7901 与 BGC-823 由中国科学院上海生化细胞研究所提供。RNeasy mini 试剂盒、一步法逆转录聚合酶链反应(PCR)试剂盒、QuantiTect SYBR Green PCR 试剂盒购自德国 Qiagen 公司。miRNA-29c 模拟物与阴性对照由上海吉玛制药技术有限公司所提供。

## 1.3 方法

**1.3.1 miRNA-29c 表达检测** 采集患者胃癌组织标本和距离病灶 5.0 cm 以上的正常胃上皮组织标本, Trizol 法提取组织标本总 RNA, 采用逆转录 PCR 试剂盒进行逆转录处理, 采用 QuantiTect SYBR Green PCR 试剂盒进行 miRNA-29c 检测<sup>[4-5]</sup>。相同方法检测不同细胞系 miRNA-29c 表达水平。

**1.3.2 BGC-823 增殖测定** 将  $1 \times 10^4$  个 BGC-823 细胞接种

于 96 孔培养板中, 待细胞贴壁后, 以浓度为 50.0 nmol/L 的 miR-29c 模拟物与阴性对照转染细胞, 于转染 24、48、72 h 后测定吸光度值。

**1.3.3 细胞周期与凋亡测定** 采用流式细胞仪进行细胞周期和凋亡测定。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS14.0 软件进行数据处理与统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料以百分率表示, 组间比较采用卡方检验。  $P<0.05$  为比较差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miRNA-29c 表达水平检测** 胃癌组织及正常胃上皮组织 miRNA-29c 相对表达量分别为 (0.71±0.32)、(1.21±0.34), 胃癌组织 miRNA-29c 表达水平低于正常胃上皮组织 ( $t=7.452, P<0.05$ )。GES-1、SGC-7901、BGC-823 细胞系 miRNA 相对表达量分别为 (1.03±0.07)、(0.62±0.11)、(0.32±0.12)。

**2.2 miRNA-29c 表达水平与胃癌临床及病理特征的关系** miRNA-29c 表达水平与肿瘤直径、Ming 分型、TNM 分期、淋巴结转移有关 (*t* 值分别为 6.217、6.703、6.313、6.014,  $P<0.05$ ), 与患者性别、年龄和肿瘤组织分化程度、浸润程度无关 (*t* 值分别为 0.341、0.302、0.612、0.317,  $P>0.05$ ), 见表 1。

表 1 miRNA-29c 表达水平与胃癌临床及病理特征的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 临床及病理特征  | miRNA-29c 表达量 | 临床及病理特征  | miRNA-29c 表达量 |
|----------|---------------|----------|---------------|
| 性别       |               | Ming 分型  |               |
| 男        | 0.81±0.23     | 浸润型      | 0.42±0.13     |
| 女        | 1.04±0.54     | 膨胀型      | 0.99±1.12     |
| 年龄(岁)    |               | TNM 分期   |               |
| <60      | 0.85±0.35     | I~II 期   | 0.53±0.23     |
| ≥60      | 0.64±0.43     | III~IV 期 | 0.88±0.42     |
| 肿瘤直径(cm) |               | 淋巴结转移    |               |

续表 1 miRNA-29c 表达水平与胃癌临床及病理特征的关系( $\bar{x} \pm s$ )

| 临床及病理特征 | miRNA-29c 表达量 | 临床及病理特征 | miRNA-29c 表达量 |
|---------|---------------|---------|---------------|
| <10     | 0.56±0.32     | N0~N1   | 0.61±0.43     |
| ≥10     | 0.89±0.61     | N2~N3   | 0.82±0.07     |
| 分化程度    |               | 浸润程度    |               |
| 高       | 0.62±0.23     | T1~T2   | 0.77±0.21     |
| 中       | 0.61±0.34     | T3~T4   | 0.81±0.18     |
| 低       | 0.71±0.11     | —       | —             |

注：—表示无数据。

**2.3 miRNA-29c 对 BGC-823 细胞的影响** miRNA-29c 模拟物转染 BGC-823 细胞后,可有效抑制细胞增殖,增加细胞凋亡率,见表 2。经 miRNA-29c 模拟物转染后,BGC-823 细胞中 G0/G1 期细胞明显减少,S 期细胞明显增多,说明大量细胞被阻滞在 S 期,见表 3。

表 2 miRNA-29c 对 BGC-823 细胞增殖与凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别             | 转染 24 h   | 转染 48 h   | 转染 72 h   | 凋亡率       |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                | 吸光度值      | 吸光度值      | 吸光度值      | (%)       |
| miRNA-29c 模拟物组 | 0.44±0.02 | 0.58±0.06 | 0.88±0.05 | 4.89±1.13 |
| 空白组            | 0.52±0.08 | 0.92±0.11 | 1.42±0.11 | 1.89±0.88 |
| 阴性对照组          | 0.47±0.06 | 0.81±0.10 | 1.55±0.11 | 1.24±0.53 |

表 3 miRNA-29c 对 BGC-823 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别             | G0/G1      | S          | G2/M       |
|----------------|------------|------------|------------|
| miRNA-29c 模拟物组 | 51.23±2.44 | 27.25±2.68 | 20.11±2.35 |
| 空白组            | 63.56±3.16 | 15.37±0.56 | 21.73±3.53 |
| 阴性对照组          | 64.25±3.11 | 15.32±0.59 | 19.51±3.01 |

### 3 讨论

胃癌的发病机制尚未完全明确,多认为与遗传、幽门螺杆菌感染、地理环境等因素有关。随着相关研究的不断深入,miRNA 与细胞分化、生物发育的关系,及其在疾病发生、发展中的重要作用已逐渐被证实<sup>[6]</sup>。有研究显示,miRNA 异常表达与肿瘤具有密切的联系<sup>[7]</sup>。miRNA 一般广泛存在于真核生物中,具有较高的保守性、时序性以及组织特异性<sup>[8]</sup>。miRNA 主要由位于基因内含子区域的核苷酸编码产生,通过与细胞浆中的 Argonaute 蛋白特异性结合,形成 RNA 诱导沉默复合物,也可通过与靶 mRNA 的互补结合,抑制靶 mRNA 的翻译,阻止蛋白质的生成,最终对细胞增殖、分化、凋亡产生一定的影响。已有研究证实,miRNA 与乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌等肿瘤的发生、发展密切相关,但关于 miRNA 与胃癌相关性的研究报道较少<sup>[9]</sup>。

有研究显示,白血病、肺癌、鼻咽癌、神经细胞瘤、横纹肌肉瘤等肿瘤细胞中,miRNA-29c 的表达均出现下调,且表达下调是恶性肿瘤发生、发展的重要原因<sup>[10]</sup>。本研究结果亦证实,胃癌组织及胃癌细胞系中 miRNA-29c 的表达量明显低于正常胃上皮组织和正常胃上皮细胞系。因此,可以推断 miRNA-29c 在胃癌的发生、发展中发挥着一定的作用。此外,本研究结果显示,胃癌肿瘤组织较大、发生淋巴结转移以及临床分期

较晚的患者,miRNA-29c 表达量明显升高。出现这种情况可能是由于肿瘤的发生、发展受多种因素的影响,从而使肿瘤不断发生着变化<sup>[11]</sup>。同时,本研究发现 miRNA-29c 在早期胃癌的表达水平较低,可见 miRNA 可能与胃癌的发生有直接关系。晚期胃癌 miRNA-29c 表达水平相对升高,可能是由于 miRNA-29c 在胃癌发展过程中具有一定的生物学作用。数据还显示,miRNA-29c 模拟物转染 BGC-823 细胞之后,可有效抑制胃癌细胞的增殖,增加细胞的凋亡率;G0/G1 期细胞明显减少,S 期细胞明显增多。可见 miRNA 能够抑制胃癌细胞增殖,加速细胞凋亡。胃癌临床及病理特征分析结果显示,miRNA-29c 表达水平与肿瘤直径、Ming 分型、TNM 分期、淋巴结转移有关,与患者性别、年龄和肿瘤组织分化程度、浸润程度无关。胃癌具有较为复杂的发生、发展、侵袭机制,而 miRNA-29c 可能在其中发挥着一定的作用。miRNA-29c 能够调节多种靶 mRNA,或者通过与其他 miRNA 的协调作用,影响相关蛋白的表达水平或功能<sup>[12]</sup>。miRNA-29c 表达量降低使靶蛋白抑制减弱,从而使靶蛋白出现异常表达,导致胃癌的发生、发展、侵袭和转移<sup>[13-14]</sup>。胃癌组织中 miRNA-29c 表达下调的具体原因尚未完全明确,可能与编码 miRNA-29c 的基因发生突变有关,但需要进一步的研究证实<sup>[15]</sup>。

综上所述,miRNA-29c 表达水平与胃癌生物学特征具有密切的联系,可能参与了胃癌的浸润与转移。miRNA 检测在胃癌患者预后判断方面具有一定的应用价值。

### 参考文献

- [1] 丁士刚,王丽.应重视胃癌发病机制的规范研究[J].中华医学杂志,2013,93(16):1201-1202.
- [2] 嵇洪庆,张辉,王杉.微小 RNA 微阵列芯片在肿瘤研究中的应用[J].中华实验外科杂志,2011,28(12):2267-2268.
- [3] 张庆玲,徐锋,程文,等.微小 RNA-29b-1 和微小 RNA-29c 对膀胱癌 T24 细胞增殖的影响[J].中华实验外科杂志,2013,30(10):2129-2132.
- [4] 郑岩松,谢荣臻,石铮. MicroRNA 在人胰腺癌中表达谱的初步研究[J].中国普通外科杂志,2012,21(3):312-316.
- [5] Papakonstantinou N, Ntoufa S, Chartomatsidou E, et al. Differential microRNA profiles and their functional implications in different immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia[J]. Mol Med, 2013, 11(19):115-123.
- [6] He HB, Zhao SH, Li XY. Chromosome mapping of five differently expressed miRNAs in porcine skeletal muscle development(Brief Report)[J]. Archiv Tierzucht, 2010, 53(6):734-736.
- [7] 王霖沛.不同生长方式胃癌的 microRNAs 表达谱及 miR-29c 在胃癌中的意义[D].福建:福建医科大学,2011.
- [8] 黄海燕,陈梅梅,许晓光,等.肾移植受者外周血单个核细胞中 miR-29 与急性排斥反应的相关性研究[J].中华器官移植杂志,2013,34(3):174-177.
- [9] Jonsdottir K, Janssen SR, Da Rosa FC, et al. Validation of expression patterns for nine miRNAs in 204 lymph-node negative breast cancers [J/OL]. PloS one, 2012-11-07 [2014-03-24], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3492447/>.
- [10] Zeng X, Xiang J, Wu M, et al. Circulating(下转第 2434 页)

粘连性肠梗阻以一定程度的肠粘连为发病基础,常见的发病机制包括肠粘连过甚形成锐角,肠袢间紧密粘连成团或固定于腹壁导致肠道严重变窄,肠袢套入粘连带构成环孔,或肠袢以粘连处为支点发生扭转等<sup>[6]</sup>。在急腹症手术后,一旦发生肠管粘连,即使正常饮食也会导致明显的临床症状。此外,腹部手术可导致肠管暴露、腹膜受损,腹腔内出现液性渗出,渗出液凝固形成纤维蛋白膜,严重时发展至纤维粘连,并逐渐变得致密,形成粘连带,对肠管产生压迫、扭曲作用,使肠管内容物通过受阻,最终导致粘连性肠梗阻,严重时甚至导致肠管堵塞<sup>[7]</sup>。本研究中的 60 例患者均有腹部手术史,具有较为典型的粘连性肠梗阻症状,腹部触诊有显著的柔韧感,且肠腔均有积气和积液平面,从而确诊为粘连性肠梗阻。

粘连性肠梗阻一旦发生,需尽快治疗,以消除疼痛感,避免安全隐患。传统的粘连性肠梗阻治疗方法为手术治疗,但手术治疗存在局限性:(1)手术时机的选择相当困难;(2)有一定程度的手术风险和术后发生再次梗阻的风险;(3)患者需住院治疗至少 10 d,医疗费用相对较高<sup>[8]</sup>。本研究采用的西医治疗方法包括禁食,胃肠减压,维持水、电解质及酸碱平衡,肠外营养支持,应用肾上腺皮质激素等。单纯西医治疗的总有效率为 70.0%,而中西医结合治疗的总有效率为 93.3%,高于单纯西医治疗。中西医结合治疗的效果更佳,原因在于大承气汤加减具有促进肠蠕动、抗菌、促进肠道内细菌和内毒素随肠道内容物排出体外、抗炎、抗氧化、稳定线粒体和溶酶体膜、维持机体内稳态、增强免疫功能等作用,可有效弥补单纯西医治疗只能减压、调整营养及电解质平衡、减少消化液分泌、降低炎症反应程度,但对胃肠动力的恢复作用欠佳的不足<sup>[9-13]</sup>。

本研究结果显示,对照组患者腹痛及腹胀完全消失时间、肛门排气时间、排便时间、气液平面消失时间分别为(83.2±41.3)、(96.4±30.2)、(98.1±27.5)、(103.4±26.3)h,说明单纯西医治疗肠梗阻,特别是轻症肠梗阻,具有一定的效果。但与试验组相比,对照组上述体征消失时间均有所延长,说明中西医结合治疗的效果更佳,可能与中西医结合治疗所采用的中药能够有效促进肠胃蠕动,进而促进肛门排气、排便有关,但具体的作用机制尚有待进一步研究。

综上所述,中西医结合治疗有效结合了中医和西医的优势,提高了粘连性肠梗阻的治愈率,降低了手术率,缩短了患者住院时间,值得临床推广应用。

参考文献

[1] Choi HK, Chu KW, Law WL. Therapeutic value of gasuglafinin adhesive small bowel obstruction after unsuccessful conservative treatment: a prospective randomized trial [J]. *Ann Surg*, 2002, 236(1): 1-6.

[2] 赵冬雨, 成丽娅, 沈宏, 等. 大承气汤治疗术后粘连性肠梗阻 58 例[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(9): 342-344.

[3] Li B, Luo KY, Shao QH, et al. Clinical observation on prevention of peritoneal cavity adhesions with sodium hyaluronate[J]. *China J Modern Med*, 2004, 14(6): 88-91.

[4] 曾莉, 钱海华, 赵群男, 等. 活血通腑方治疗术后粘连性肠梗阻 56 例临床观察[J]. *南京中医药大学学报*, 2010, 26(3): 178-180.

[5] Sonis S. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities[J]. *J Support Oncol*, 2007, 5(4): 3-10.

[6] 张俊华. 腹部手术后急性粘连性肠梗阻的治疗及预防[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(15): 3787-3788.

[7] 王维钊. 术后早期炎性肠梗阻 32 例中西医结合治疗的临床分析[J]. *右江医学*, 2006, 34(6): 634-635.

[8] 张剑, 胡志前, 王强, 等. 腹腔镜粘连松解术治疗术后反复发作性粘连性肠梗阻[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27(6): 682-684.

[9] 宋先旭, 陈桂莲, 谭立业. 概述中药复方治疗粘连性肠梗阻[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13): 291-293.

[10] 汪彦亚. 大承气汤治疗术后早期炎性肠梗阻 34 例观察[J]. *中医药临床杂志*, 2010, 22(2): 149.

[11] 吕红权, 吴永平, 宋磊, 等. 腹腔镜治疗粘连性肠梗阻 48 例体会[J]. *中国医药指南*, 2009, 7(18): 94-95.

[12] 陈家杰. 经胃管注入泛影葡胺治疗粘连性肠梗阻疗效观察[J]. *中国现代药物应用*, 2009, 3(14): 62.

[13] Ghellai AM, Stucchi AF, Chegini N, et al. Role of transforming growth factor beta-1 in peritonitis-induced adhesions[J]. *J Gastrointest Surg*, 2000, 4(3): 316-323.

(收稿日期: 2014-02-22 修回日期: 2014-04-16)

(上接第 2432 页)

miR-17, miR-20a, miR-29c, and miR-223 combined as non-invasive biomarkers in nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *PLoS one*, 2012-10-08[2014-03-24], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466268/>.

[11] 伊正君, 付玉荣, 李建花, 等. 潜伏结核感染者 CD4<sup>+</sup> T 细胞 miR-29 家族、靶基因 IFN- $\gamma$  的表达及生物信息学分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(7): 632-636.

[12] Hesse JE, Liu L, Innes CL, et al. Genome-wide small RNA sequencing and gene expression analysis reveals a microRNA profile of cancer susceptibility in ATM-deficient human mammary epithelial cells[J/OL]. *PLoS one*, 2013-05-31[2014-03-24], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741392>.

gov/pubmed/23741392.

[13] 马筱秋, 王霖沛, 骆启聪, 等. 微小 RNA-29c 表达水平与胃癌生物学行为的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2013, 35(5): 325-330.

[14] Fang Y, Yu X, Liu Y, et al. miR-29c is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF- $\alpha$  activation[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(10): 1274-1282.

[15] 马筱秋. miR-29b/c 调控 Mcl-1 影响胃癌细胞生物学行为的初步研究[D]. 福建: 厦门大学, 2012.

(收稿日期: 2014-02-15 修回日期: 2014-05-02)