

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.10.004

miR-146b 在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系*

陶嘉楠^{1,2}, 王学红^{2△}, 马臻祺², 张宏琳^{1,2}

1. 青海大学研究生院, 青海西宁 810016; 2. 青海大学附属医院消化内科, 青海西宁 810000

摘要:目的 探讨 miR-146b 在胃癌组织及配对癌旁组织中的表达水平及其与临床病理特征的关系。方法 采用实时荧光定量 PCR 法测定 40 例首诊胃癌患者胃癌组织和配对癌旁组织中 miR-146b 的表达水平, 并分析其表达水平的变化与临床病理特征的关系。结果 miR-146b 在胃癌组织中的相对表达水平明显低于配对癌旁组织, 差异有统计学意义($P<0.01$); 不同年龄、肿瘤分化程度、临床分期、是否有淋巴结转移胃癌患者胃癌组织 miR-146b 相对表达水平比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 miR-146b 在胃癌组织中的表达明显下调, 可能为胃癌的诊断与靶向治疗提供依据。

关键词:miR-146b; 胃癌; 临床病理特征

中图法分类号:R735.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)10-1310-04

Expression of miR-146b in gastric cancer and its relationship with clinicopathological characteristics*

TAO Jianan^{1,2}, WANG Xuehong^{2△}, MA Zhenqi², ZHANG Honglin^{1,2}

1. Graduate School of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China; 2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810000, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of miR-146b in gastric cancer tissues and its relationship with clinicopathological characteristics. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR was used to determine the relative expression levels of miR-146b in gastric cancer tissues and paracancer tissues of 40 patients diagnosed with gastric cancer for the first time, and the relationship between the change of miR-146b expression level and clinicopathological characteristics was analyzed. **Results** The relative expression level of miR-146b in gastric cancer tissues was lower than that in paired paracancer tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). There were statistically significant differences in the relative expression levels of miR-146b in gastric cancer tissues of patients with different age, tumor differentiation degree, clinical stage and whether there was lymph node metastasis or not ($P<0.05$). **Conclusion** The expression level of miR-146b was significantly down-regulated in gastric cancer tissues, which may provide evidence for the diagnosis and targeted therapy of gastric cancer.

Key words:miR-146b; gastric cancer; clinicopathological characteristics

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 早期症状隐匿, 明确诊断时常常处于癌症进展期, 导致预后不佳。目前胃癌在全球常见癌症中排名第五, 是导致癌症相关死亡的第三大原因^[1]。我国是全球胃癌高发区, 据世界卫生组织统计, 2018 年全球胃癌的发病例数已超 103 万, 我国约占 44%, 总死亡人数超过 78 万, 其中约一半为中国人^[2]。胃癌的发生是一个复杂的过程, 其发生机制尚不明确。近年来许多研究发现, 微小 RNA(miRNA)在胃癌的发生、发展中起着重要的作用^[3], 多种 miRNA 在胃癌组织和癌旁组织中的表达水平有明显差别, 其表达水平的上调或下调常

常与胃癌的临床病理特征有关^[4-6]。miR-146b 在肿瘤发生、发展中发挥着双重作用, 相关研究发现, miR-146b 在恶性胶质瘤^[7]、肺癌^[8]、肝癌^[9]、胰腺癌^[10]、结直肠癌^[11]等恶性肿瘤中发挥抑癌基因的作用, 而在甲状腺癌^[12]中却发挥着促癌基因的作用。本研究检测胃癌患者 miR-146b 在胃癌组织及癌旁组织中的表达水平, 探讨其在胃癌组织中的表达情况及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 11 月至 2021 年 9 月在青海大学附属医院行胃镜检查并经病理检查证实为胃癌的 40 例患者作为研究对象。纳入标准: (1) 经胃

* 基金项目: 青海省科技厅资助项目(2019-SF-L3)。

作者简介: 陶嘉楠, 男, 硕士研究生在读, 主要从事消化内科临床研究。 △ 通信作者, E-mail: Lindawang0710@hotmail.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220418.1349.006.html\(2022-04-20\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220418.1349.006.html(2022-04-20))

镜和病理活检首次确诊为胃癌；(2)术前未经放化疗、分子靶向治疗、中医药抗癌治疗等；(3)自愿参与该项研究,并签署知情同意书。排除标准:(1)合并其他脏器原发恶性肿瘤者；(2)肝、肾功能衰竭者；(3)近 1 个月使用抑酸药、抗菌药物者。在行胃镜检查时,用胃镜活检钳钳取癌组织及癌旁组织各 1 块,其中癌旁组织取自距离癌组织边缘大于 5 cm 的胃组织,立即放入冻存管内,并于-80℃冰箱保存。设计表格,记录患者年龄、性别、内镜下肿瘤最大径、肿瘤部位、肿瘤分化程度、临床分期等一般资料。40 例患者中男 33 例,女 7 例;年龄 33~74 岁,中位年龄 59 岁;临床分期Ⅰ~Ⅱ期 14 例,Ⅲ~Ⅳ期 26 例,分期标准参照国际抗癌联盟/美国癌症联合会(UICC/AJCC)制定的 TNM 分期标准(第 8 版)。本研究经青海大学附属医院伦理委员会批准及监督。

1.2 仪器与试剂 研磨仪(低温型)、离心管、TIP 头均购自 Servicebio 公司;台式高速冷冻型微量离心机购自 DragonLab 公司;荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司;超净工作台购自苏净安泰公司;超微量分光光度计购自 Thermo 公司;标准试剂型纯水仪购自青岛富勒姆科技有限公司;RNA 提取液、逆转录试剂盒均购自 Servicebio 公司;miRNA 通用引物和特异性引物由青海赛斯克生物科技有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 抽提 (1)取匀浆管,加入 1 mL 的 RNA 提取液,置冰上预冷;(2)取 100 mg 组织,加入匀浆管中;(3)于匀浆仪充分研磨直至无可见组织块;(4)12 000 r/min 离心 10 min,取上清液;(5)加入 250 μL 三氯甲烷,颠倒离心管 15 s,充分混匀,静置 3 min;(6)4℃下 12 000 r/min 离心 10 min;(7)将 400 μL 上清转移到一新的离心管中,加入 0.8 倍体积的异丙醇,颠倒混匀;(8)-20℃放置 15 min;(9)4℃下 12 000 r/min 离心 10 min,管底的白色沉淀即为 RNA;(10)吸除液体,加入 75%乙醇 1.5 mL 洗涤沉淀;(11)4℃下 12 000 r/min 离心 5 min;(12)将液体吸除干净,将离心管置于超净台上吹 3 min;(13)加入 15 μL 无 RNA 酶的水溶解 RNA;(14)55℃孵育 5 min;(15)使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 质量浓度及纯度;仪器空白调零后取 2.5 μL 待测 RNA 检测吸光度值;(16)将 RNA 进行适当比例的稀释,使其最终质量浓度为 100~500 ng/μL。

1.3.2 逆转录和实时荧光定量 PCR 检测 从细胞中提取总 RNA,用于逆转录反应,反应条件:25℃ 5 min,42℃ 30 min,85℃ 5 s。接着进行 PCR 扩增,反应条件:预变性 95℃ 10 min,变性 95℃ 15 s,退火 60℃ 30 s,共 40 个循环。miR-146b 正向引物为 5'-ACACTCCAGCTGGGTGAGAACTGAATTCCAT-3',反向引物为 5'-CTCAACTGGTGTCGTG-GAGTCGGCAATTTCAGTTGAGCAGCCTAT-3';

内参基因 U6 正向引物为 5'-CTCGCTTCGGCAG-CACA-3',反向引物为 5'-AACGCTTCACGAATTT-GCGT-3'。采用相对定量法(ΔΔCt 法)计算各基因的相对表达量,表达倍数=2^{-ΔΔCt}。在实验过程中,为了减少误差,将每个标本重复检测 3 次后取平均 Ct 值作为最终值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 进行数据统计分析,首先对数据进行正态性检验,结果发现本研究计量数据并不满足正态分布,故采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。假设检验时,配对样本比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验,两独立样本比较采用 Mann-Whitney *U* 检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织和配对癌旁组织中 miR-146b 相对表达水平比较 对 40 例胃癌组织和配对癌旁组织中 miR-146b 的表达水平进行荧光定量 PCR 检测,结果显示 miR-146b 在胃癌组织中的相对表达水平为 0.690(0.463,1.135),低于配对癌旁组织中的 1.115(0.683,1.593),差异有统计学意义($Z=-2.635, P=0.008$)。

2.2 胃癌组织中 miR-146b 的表达水平和临床病理特征的关系 不同年龄、肿瘤分化程度、临床分期和是否有淋巴结转移胃癌患者胃癌组织 miR-146b 相对表达水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),而不同性别、肿瘤部位、肿瘤最大径和是否有血行转移胃癌患者胃癌组织 miR-146b 相对表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 胃癌组织中 miR-146b 的表达水平和临床病理特征的关系[$M(P_{25}, P_{75})$]

项目	<i>n</i>	miR-146 相对表达量	<i>P</i>
性别			0.656
男	33	0.670(0.450,1.120)	
女	7	0.820(0.470,1.160)	
年龄(岁)			0.031
<60	21	0.850(0.585,1.235)	
≥60	19	0.560(0.420,0.850)	
肿瘤最大径(cm)			0.683
<5	18	0.720(0.538,1.105)	
≥5	22	0.420(0.420,1.160)	
肿瘤部位			0.631
贲门	8	0.605(0.330,1.068)	
胃体	23	0.710(0.470,1.090)	
胃窦	9	0.850(0.525,1.175)	
分化程度			0.028
低分化	17	0.560(0.420,0.635)	
中分化	14	0.865(0.668,1.168)	
高分化	9	1.030(0.510,1.420)	

续表 1 胃癌组织中 miR-146b 的表达水平和临床病理特征的关系[$M(P_{25}, P_{75})$]

项目	<i>n</i>	miR-146 相对表达量	<i>P</i>
淋巴结转移			0.035
有	28	0.585(0.420,1.000)	
无	12	0.940(0.610,1.270)	
血行转移			0.595
有	10	0.560(0.403,1.168)	
无	30	0.720(0.523,1.053)	
临床分期			0.023
I ~ II 期	14	0.940(0.648,1.403)	
III ~ IV 期	26	0.580(0.420,0.920)	

3 讨 论

miR-146b 是 miR-146 家族的成员之一,该家族包括 miR-146a 和 miR-146b 2 个成员,二者的结构很接近,区别仅仅在于 3'-末端 2 个核苷酸序列不同,因此它们的作用相似^[13],均发挥着转录后基因沉默子的作用,参与调节炎症反应和细胞周期调控。miR-146b 由 miR-146b 基因编码,该基因定位于人类第 10 号染色体^[14],miR-146b 前体约由 73 个核苷酸组成,并包含一个茎环状结构,分别从其 5'端臂和 3'端臂加工为成熟的 miR-146b-5p 和 miR-146b-3p^[15]。miR-146b 的作用机制十分复杂,目前仍不甚清楚,研究较为成熟的机制是 miR-146b-表皮生长因子受体(EGFR)途径,该途径是在研究 miR-146b 与恶性胶质瘤发生的关系时发现。KATAKOWSKI 等^[16]研究发现,恶性胶质瘤患者 10 号染色体 10q24-26 区域经常缺失,而 miR-146b 基因恰好在这个区域内,所以导致了肿瘤细胞中 miR-146b 的表达水平明显下降,并且还发现 miR-146b 与人胶质母细胞瘤细胞 EGFR 的 mRNA 3'-非翻译区(3'-UTR)结合,从而抑制了 EGFR 的表达,使得肿瘤增殖能力和侵袭性减弱。

张效通^[17]研究发现,miR-146b 在膀胱癌组织中低表达,并通过生物信息学研究发现,miR-146b 可以与含半胱天冬酶募集结构域的膜相关鸟苷酸激酶蛋白 3(CARMA3)mRNA 的 3'-UTR 结合,抑制下游蛋白的表达,从而抑制膀胱癌增殖、侵袭、转移,提示 miR-146b 在膀胱癌中发挥抑癌基因的作用。申翠苹^[18]研究发现,miR-146b 可抑制宫颈癌细胞系 Caski 的增殖、侵袭和黏附能力,使细胞周期阻滞。闫美娜^[19]研究发现,miR-146b 可以明显抑制卵巢癌细胞的迁移、侵袭能力,但是同时促进卵巢癌细胞增殖,增加了其对化疗的敏感性。MITSUMURA 等^[20]发现,下调或消融小鼠体内 miR-146b 可引起小鼠造血系统恶性肿瘤,可能机制是 miR-146b 通过抑制激活核因子- κ B 的表达,从而导致炎症和肿瘤的发生。郑建^[21]研究显示,miR-146b 在早期和中晚期甲状腺乳头状癌(PTC)组织中均呈明显高表达,同时随着肿瘤分期

的增加,其表达水平有升高的趋势,提示其在 PTC 中发挥着促癌基因的作用。因此,miR-146b 不是单纯发挥着促癌或抑癌作用,在不同的恶性肿瘤中其作用不同,甚至完全相反。在大多数恶性肿瘤中 miR-146b 发挥抑癌基因的作用,在少数恶性肿瘤(如甲状腺乳头状癌等)中发挥促癌基因的作用。本研究结果发现,miR-146b 在胃癌组织中表达下调,推测其发挥抑癌基因的作用。

miR-146b 作用的下游重要靶点之一是 EGFR。LIU 等^[22]研究了 miR-146b 是否能致敏对 EGFR 的靶向药物即酪氨酸激酶抑制剂(TKI)耐药的肺癌细胞,结果发现 miR-146b 异位表达增强的肺癌细胞发生了 TKI 诱导的细胞凋亡,推测 miR-146b 可能是克服 TKI 耐药的有用工具,这也从侧面反映了 miR-146b 在肺癌中亦通过作用于 EGFR 发挥抑癌作用。CHOU 等^[23]研究发现,miR-146b 的异常表达与甲状腺乳头状癌(PTC)的侵袭性和预后相关,推测 miR-146b 的关键作用是作为一种致癌监管分子,监测细胞转化及肿瘤复发。

本研究结果发现,不同年龄、肿瘤分化程度、临床分期和是否有淋巴结转移患者胃癌组织 miR-146b 的表达水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。miR-146b 通过复杂的细胞信号网络来调控下游的分子,其参与胃癌发生、发展的机制十分复杂,需要进行大量的生物信息学分析及基础研究才有可能逐步解析其作用机制。本研究的局限性在于研究对象均为青藏高原世居者,受海拔和高原低氧的影响,研究结果的代表性可能不强,无法排除低氧对 miR-146b 表达的影响,仍需多地区、多中心、大样本量的研究,以消除地域因素的影响,使得试验结果更具代表性,以便为胃癌的诊断与治疗提供新的方法。

参考文献

[1] OSAC F, MGC F, MMGBC E, et al. Comparison and applicability of molecular classifications for gastric cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2019, 77: 29-34.

[2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[3] SUGARNIYA S, VARINDER J, CLEMENTS J A, et al. Emergence of microRNAs as key players in cancer cell metabolism [J]. Clin Chem, 2019, 65(9): 9-10.

[4] 刘东涛, 杨志娟, 丁波, 等. 微小 RNA-4286 调控肌醇多聚磷酸-4-磷酸酶 I 型对胃癌细胞系 HGC-27 生长、迁移及侵袭的影响 [J]. 解剖学报, 2021, 52(3): 405-409.

[5] CHEN G, LI Y, REN Z, et al. Clinical significance of microRNA-155 regulated autophagy and apoptosis by targeting gene Rictor/Fos in gastric cancer progression [J]. Nanosci Nanotech Let, 2020, 12(4): 525-535.

[6] 陈德薇,张新星.微小 RNA-645 靶向 IFIT2 对幽门螺杆菌感染胃癌细胞增殖和侵袭的影响[J].临床肿瘤学杂志,2021,26(4):315-321.

[7] XIA H,QI Y,NG S S,et al. microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs[J]. Brain Res,2009,1269(8):158-165.

[8] HAN Q,CHENG P,YANG H,et al. miR-146b reverses epithelial-mesenchymal transition via targeting PTP1B in cisplatin-resistance human lung adenocarcinoma cells[J]. J Cell Biochem,2019,24(7):1-12.

[9] LI C,MIAO R,LIU S,et al. Down-regulation of miR-146b-5p by long noncoding RNA MALAT1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer growth and metastasis [J]. Oncotarget,2017,8(17):28683-28695.

[10] LIN F,WANG X,JIE Z,et al. Inhibitory effects of miR-146b-5p on cell migration and invasion of pancreatic cancer by targeting MMP16 [J]. J Huazhong U Sci Med, 2011,31(4):509.

[11] ZHU Y,WU G,YAN W,et al. miR-146b-5p regulates cell growth,invasion,and metabolism by targeting PDHB in colorectal cancer[J]. Am J Cancer Res,2017,7(5): 1136.

[12] AL-ABDALLAH A,JAHANBANI I,MEHDAWI H, et al. The stress-activated protein kinase pathway and the expression of stanniocalcin-1 are regulated by miR-146b-5p in papillary thyroid carcinogenesis [J]. Cancer Biol Ther,2020,21(5):1-12.

[13] GARCIA A I,BUISSON M,BERTRAND P,et al. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers [J]. EMBO Mol Med,2011,3(5):279-290.

[14] TAGANOV K D,BOLDIN M P,CHANG K J,et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146,an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2006,103(33): 12481-12486.

[15] CHOU C K,LIU R T,KANG H Y. MicroRNA-146b:a novel biomarker and therapeutic target for human papillary thyroid cancer[J]. Int J Mol Sci,2017,18(3):636.

[16] KATAKOWSKI M,ZHENG X,JIANG F,et al. MiR-146b-5p suppresses EGFR expression and reduces in vitro migration and invasion of glioma[J]. Cancer Invest, 2010,28(10):1024-1030.

[17] 张效通. circINTS4/miR-146b/CARMA3 轴调控膀胱癌肿瘤发生的机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2019.

[18] 申翠苹. MiR-146b-5p 对宫颈癌细胞系 Caski 生物学行为的影响及作用机制的初步探讨[D]. 济南:山东大学, 2015.

[19] 闫美娜. miR-146b 在卵巢上皮细胞癌中的作用及机制研究[D]. 苏州:江苏大学,2018.

[20] MITSUMURA T,ITO Y,CHIBA T,et al. Ablation of miR-146b in mice causes hematopoietic malignancy[J]. Blood Adv,2018,2(23):3483-3491.

[21] 郑建. MiR-146b-5p 对甲状腺乳头状癌细胞 TPC-1 相关生物学特性的影响研究[D]. 郑州:郑州大学,2015.

[22] LIU Y,TSAI M F,WU S G,et al. miR-146b-5p enhances the sensitivity of NSCLC to EGFR tyrosine kinase inhibitors by regulating the IRAK1/NF- κ B pathway[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2020,22:471-483.

[23] CHOU C K,CHI S Y,HUANG C H,et al. IRAK1,a target of miR-146b, reduces cell aggressiveness of human papillary thyroid carcinoma[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016,101(11):4357-4366.

(收稿日期:2021-09-16 修回日期:2022-02-23)

(上接第 1309 页)

[7] 李奎,冯健,余丹,等. LncRNA TUG1 和 miR-138-5p 在慢性心力衰竭患者中的表达及意义[J]. 中国动脉硬化杂志,2020,28(3):219-223.

[8] 韩虎魁,李刚,李其勇,等. 血清 LncRNA miR155HG 在慢性心力衰竭患者中的表达及临床意义[J]. 四川医学, 2019,40(4): 325- 329.

[9] ZHANG M,GU H,XU W,et al. Down-regulation of LncRNA MALAT1 reduces cardiomyocyte apoptosis and improves left ventricular function in diabetic rats[J]. Int J Cardiol,2016,203(1):214-216.

[10] 赵智慧,白香花,何金玲,等. Lnc-MALAT1/miRNA-145/BNIP3 信号通路在舒芬太尼预处理对大鼠心肌保护效应中的作用:细胞实验[J]. 中华麻醉学杂志,2020, 40(6):676-680.

[11] 陆强,赵建荣. 长链非编码 RNAMALAT1 在冠状动脉粥样硬化性心脏病患者外周血清中的表达及临床意义[J]. 岭南心血管病杂志,2017,23(5):506-510.

[12] ZHANG J,PAN J,YANG M,et al. Upregulating microRNA-203 alleviates myocardial remodeling and cell apoptosis through downregulating protein tyrosine phosphatase 1B in rats with myocardial infarction[J]. J Cardiovasc Pharmacol,2019,74(5):474-481.

[13] YANG X B,LI X S,LIN Q Y,et al. Up-regulation of microRNA-203 inhibits myocardial fibrosis and oxidative stress in mice with diabetic cardiomyopathy through the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway via PIK3CA [J]. Gene,2019,715:143995.

[14] LI Y,LIU X,DU A,et al. miR-203 accelerates apoptosis and inflammation induced by LPS via targeting NFIL3 in cardiomyocytes[J]. J Cell Biochem,2019,120(4):6605-6613.

[15] ZHU Y,ZHU Y,LIU Y,et al. Long noncoding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 correlates with microRNA-125b/microRNA-146a/microRNA-203 and predicts 2-year restenosis risk in coronary heart disease patients [J]. Biomark Med,2021,15(4): 257-271.

(收稿日期:2021-08-06 修回日期:2022-02-17)