·论著·

miR-551b-3p 在胰腺癌细胞和组织中的表达及其临床意义

郭 欣 吕小慧 吕 行 陈 勇 陈芦斌

摘要:目的 研究 miR-551b-3p 在胰腺癌细胞和组织中的表达,探讨其在胰腺癌发生发展中的临床意义。方法 利用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术分别检测 4 种胰腺癌细胞和正常胰腺导管上皮细胞,以及 76 对胰腺癌组织和癌旁组织中 miR-551b-3p 的表达水平,并对 miR-551b-3p 的表达与胰腺癌患者临床病理学特征进行分析。结果 miR-551b-3p 在 PANC-1、Aspc-1、SW1990 和 Miapaca-2 四种胰腺癌细胞中的相对表达量分别为(0.125±0.012)、(0.179±0.005)、(0.672±0.025)、(0.577±0.019),低于其在正常胰腺导管上皮细胞 HPDE6C-7 中的相对表达量,差异有统计学意义($P<0.05$)。在胰腺癌组织和癌旁组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 值分别为(7.254±0.112)和(3.993±0.098),差异有统计学意义($P<0.001$)。TNM 分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期胰腺癌组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 值分别为(4.343±0.032)、(5.325±0.112)、(6.987±0.098)和(9.132±0.212),差异有统计学意义($P<0.001$)。有淋巴结转移和无淋巴结转移患者的胰腺癌组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 值分别为(8.492±0.021)和(6.676±0.103),差异有统计学意义($P=0.012$)。高、中、低分化胰腺癌组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 值分别为(5.349±0.092)、(6.129±0.112)、(8.454±0.065),差异有统计学意义($P=0.002$)。结论 miR-551b-3p 的表达与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移以及 TNM 分期相关。miR-551b-3p 可能是提示胰腺癌临床进展的潜在标志物。

关键词:胰腺癌;miR-551b-3p;淋巴结转移;临床分期

DOI:10.3969/j.issn.1673-534X.2016.06.010

Expression of miR-551b-3p in pancreatic cancer cells and tissues and its role in progression of pancreatic cancer

GUO Xin, CHEN Lubin. Department of Endoscopic Surgery, 451 Hospital, People's Liberation Army, Xian (710054), China; LV Xiaohui. Department of Gynecology and Obstetrics, Xijing Hospital Affiliated to the Fourth Military Medical University, Xian (710032), China; LV Xing, CHEN Yong. Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital Affiliated to the Fourth Military Medical University, Xian (710032), China

Abstract: Objective This paper intends to analyze the correlation between the expression of miR-551b-3p and the clinicopathological characteristics in pancreatic cancer (PC). **Methods** The expression of miR-551b-3p was analyzed by quantitative real-time PCR (RT-PCR) in pancreatic cancer cells, normal pancreatic ductal epithelial cells, and 76 paired PC samples. The relation between miR-551b-3p expression and clinicopathological characteristics was analyzed. **Results** The relative expression of miR-551b-3p in PC cells were lower than that in normal pancreatic ductal epithelial cells [(0.125±0.012), (0.179±0.005), (0.672±0.025), (0.577±0.019) vs 1, $P<0.05$]. The relative expression of miR-551b-3p in PC tissues was also lower than that in peritumoral tissues [(7.254±0.112) vs (3.993±0.098), $P<0.001$]. The relative expression of miR-551b-3p in tumors with different TNM stages were in stages Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, and Ⅳ, with a significant difference among them [(4.343±0.032), (5.325±0.112), (6.987±0.098), (9.132±0.212), $P<0.001$]. There was a significant difference between the relative expression of miR-551b-3p in PC with lymph node invasion and without lymph node invasion [(8.492±0.021) vs (6.676±0.103), $P=0.012$]. Different differentiation grades showed significantly different expression of miR-551b-3p [(5.349±0.092), (6.129±0.112), (8.454±0.065), $P=0.002$]. **Conclusions** The expression of miR-551b-3p is correlated with the differentiation grade, the TNM stage and the lymph node invasion, which may be a potential biomarker for the progression of PC.

Key words: Pancreatic cancer; MiR-551b-3p; Lymph node invasion; TNM stage

作者单位:710054 陕西西安,解放军第 451 医院全军内镜中心(郭欣,陈芦斌);710032 陕西西安 第四军医大学附属西京医院妇产科(吕小慧),肝胆外科(吕行,陈勇)

通信作者:陈芦斌,Email:aa175893204@126.com

胰腺癌(PC)是恶性程度较高的恶性肿瘤之一[1],因其较强的侵袭性和早期转移能力,在中国肿瘤相关死亡中位列第四[2-3]。流行病学研究提示,胰腺癌的发病率在中国呈逐年升高趋势[4]。由于胰腺癌高度恶性的潜能和缺乏有效的早期症状,多数患者就诊时已有局部浸润或远处转移,此时以手术为主的综合治疗并不能显著改善预后[5]。因此,早期发现胰腺癌的恶性进展并加以干预,是改善预后的一种有效办法[6]。

微小核糖核酸(microRNA,miRNA)是一类普遍存在于动植物体内高度保守的非编码单链 RNA,可通过与 mRNA 的 3′非编码区完全或不完全结合来调控靶基因的转录和翻译功能,从而影响肿瘤细胞的生物学行为[7-8]。miR-551b-3p 在多种恶性肿瘤中发挥着重要作用,与肿瘤的恶性进展密切相关[9-10]。本研究通过分析 miR-551b-3p 与胰腺癌细胞和胰腺癌患者的临床病理学特征的相关性,初步发现了 miR-551b-3p 在胰腺癌进展中的作用,为进一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本 收集 2013 年 6 月至 2015 年 2 月期间解放军第 451 医院确诊的胰腺癌患者的肿瘤组织和癌旁组织,所有组织标本均经病理检查证实,且患者术前均未接受放射治疗或化学治疗。临床标本共 76 对(肿瘤组织和癌旁组织),其中男性 45 例,女性 31 例;有淋巴结转移 41 例,无淋巴结转移 35 例;TNM 分期Ⅰ期 15 例,Ⅱ期 21 例,Ⅲ期 29 例,Ⅳ期 11 例;高分化 14 例,中分化 35 例,低分化 27 例。所有组织标本于术后经生理盐水清洗后即放入液氮中冷却 1 h,随后放入 -80 ℃冰箱中长期保存。

1.1.2 细胞 人胰腺癌细胞株 PANC-1、Aspc-1、SW1990 和 Miapaca-2 以及人正常胰腺导管上皮细胞 HPDE6C-7 购自中科院上海生命科学研究院细胞研究所。

1.1.3 主要试剂 RPMI1640 培养基和 DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,10%胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,miRNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒、聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自美国 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 miRNA 抽提 常规培养细胞,按照抽提试剂盒说明书提取细胞或组织总的 miRNA,应用紫外分光光度计测定 miRNA 的纯度和浓度,测定 A260 和 A280 吸光值,计算 A260/A280,正常范围为 1.8～2.1。

1.2.2 RT-PCR 按照反转录试剂盒说明书对 miRNA 加尾并进行 cDNA 合成,反应条件为 37 ℃ 60 min、100 ℃ 1 min、4 ℃ 5 min。按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 检测,每个样品均设置 3 个复孔,反应条件为 95 ℃ 15 min、58 ℃ 30 s、65 ℃ 30 s,共 40 个循环。利用 Thermo480 实时定量 PCR 仪检测,U6 作为内参,细胞的结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 代表相对表达量,组织的结果以 Ct 值反映 cDNA 的起始含量,起始含量越高则 Ct 值越低,相对表达量越高。

1.3 统计学处理

利用 SPSS18.0 软件进行统计学处理,结果以均数±标准差表示,两样本均数之间比较采用 t 检验,多样本均数之间采用方差分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-551b-3p 在胰腺癌细胞中的表达

RT-PCR 结果表明,在胰腺癌细胞株和正常的胰腺导管上皮细胞内均检测到 miR-551b-3p 表达。在 PANC-1、Aspc-1、SW1990 和 Miapaca-2 四种胰腺癌细胞株中,miR-551b-3p 的相对表达量分别为(0.125±0.012)、(0.179±0.005)、(0.672±0.025)、(0.577±0.019),均显著低于正常胰腺导管上皮细胞内的表达(表达量设定为 1,$P<0.05$)。

2.2 miR-551b-3p 在肿瘤组织和癌旁组织的表达

RT-PCR 结果表明,在 76 对标本中,在胰腺癌组织和癌旁组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 平均值分别为(7.254±0.112)和(3.993±0.098),miR-551b-3p 在胰腺癌组织中的表达显著低于癌旁组织($P<0.001$)。在有淋巴结转移和无淋巴结转移患者的胰腺癌组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 平均值分别为(8.492±0.021)和(6.676±0.103),差异有显著统计学意义($P=0.012$)。

TNM 分期Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期和Ⅳ期的患者 miR-551b-3p的 ΔCt 平均值分别为(4.343±0.032)、(5.325±0.112)、(6.987±0.098)和(9.132±0.212),各组间差异有统计学意义($P<0.001$);相应癌旁组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 平均值分别为(3.918±0.015)、(4.023±0.027)、(4.102±0.032)、(4.094±0.019),差异无统计学意义($P>0.05$)。高、中、低分化胰腺癌组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 平均值分别为(5.349±0.092)、(6.129±

0.112)、(8.454 ± 0.065),各组间差异有统计学差异(P = 0.002);相应癌旁组织中 miR-551b-3p 的 ΔCt 平均值分别为(3.877 ± 0.015)、(3.989 ± 0.032)、(4.121 ± 0.041),差异无统计学意义(P>0.05)。详见表 1。

表 1 miR-551b-3p 在胰腺癌组织中的表达

分组	ΔCt	P
淋巴结侵袭		
有	8.492 ± 0.021	0.012
无	6.676 ± 0.103	
TNM 分期		
Ⅰ期	4.343 ± 0.032	<0.001
Ⅱ期	5.325 ± 0.112	
Ⅲ期	6.987 ± 0.098	
Ⅳ期	9.132 ± 0.212	
分化程度		
高	5.349 ± 0.092	
中	6.129 ± 0.112	0.002
低	8.454 ± 0.065	

2.3 miR-551b-3p 的表达与胰腺癌患者临床病理学特征的关系

以胰腺癌组织 miR-551b-3p 平均表达水平为临界值(ΔCt = 7.254),将所有患者分为高表达(ΔCt<7.254)和低表达(ΔCt > 7.254)。分析显示,miR-551b-3p表达与胰腺癌患者的年龄、性别、肿瘤部位和大小无关(P>0.05),而与淋巴结侵袭、肿瘤分化程度和 TNM 分期相关(P<0.05)。见表 2。

表 2 胰腺癌患者 miR-551b-3p 表达水平与临床病理学特征的关系/例

临床指标	样本数	miR-551b-3p		P
		高表达(n = 37)	低表达(n = 39)	
年龄(岁)				
<60 岁	38	16	22	0.545
≥60 岁	38	21	17	
性别				
男	45	19	26	0.122
女	31	18	13	
肿瘤部位				
胰头	41	22	19	0.231
胰体尾	35	15	20	
肿瘤大小				
<2 cm	33	18	15	0.497
≥2 cm	43	19	24	
病理分化				
高分化	14	10	4	
中分化	35	22	13	0.009
低分化	27	5	22	
淋巴结侵袭				
有	41	17	24	0.022
无	35	20	15	
TNM 分期				
Ⅰ期	15	7	8	<0.001
Ⅱ期	21	14	7	
Ⅲ期	29	13	16	
Ⅳ期	11	3	8	

3 讨论

miRNA 由 miRNA 基因转录形成初始的 miRNA,随后经过一系列细胞内酶的作用,剪接为成熟的 miRNA[11]。其后可通过与靶 mRNA 分子的互补配对结合,进而影响 mRNA 的稳定性和翻译过程,从而调控基因的表达[12]。一种 miRNA 可调控多种基因的表达,多种 miRNA 也可调控一种基因的表达。miRNA 与肿瘤的关系十分密切,起到类似癌基因或抑癌基因的功能,从而调控肿瘤的多种生物学行为[13]。miRNA 的表达在不同肿瘤中具有组织特异性,每种肿瘤有其特异的 miRNA 表达谱[14]。若 miRNA 在某种肿瘤中表达下调,则这些 miRNA 可能正性调节肿瘤细胞的某些生物学行为,如促进凋亡、抑制增殖等,从而发挥抑癌基因的作用;若 miRNA 表达上调,则可能负性调控细胞凋亡,进而发挥癌基因的作用[15]。

Chen 等通过高通量芯片技术发现在胃癌组织中 miR-551b-3p 呈低表达状态,并发挥抑癌基因作用[9]。另有研究表明,miR-551b-3p 在胃癌组织中表达显著降低,并通过调控 PRL-3 基因的表达影响肿瘤细胞的侵袭和迁移能力[10]。Swierniak 等[16]的研究发现,在乳头状甲状腺癌中 miR-551b-3p 呈高表达状态,并与肿瘤的发生发展密切相关。上述研究表明 miR-551b-3p 在肿瘤中表达的特异性。本研究发现,在胰腺癌组织中 miR-551 呈低表达,低于癌旁组织中的表达。miR-551b-3p 在有淋巴结侵袭患者的胰腺癌组织中的表达低于无淋巴结侵袭的患者,表明 miR-551b-3p 的表达能负性调控胰腺癌的淋巴结侵袭。miR-551b-3p 在Ⅰ~Ⅳ期胰腺癌组织中的表达水平逐渐降低,并且在高、中、低分化胰腺癌组织中的表达亦呈逐渐降低趋势,表明

miR-551b-3p可能与胰腺癌的恶性进展呈负相关，即miR-551b-3p在胰腺癌中可能发挥抑癌基因的作用，负性调控肿瘤细胞的生长。临床病理学特征的分析提示，miR-551b-3p与胰腺癌患者的年龄、性别、肿瘤部位和大小无关，而与肿瘤的病理分化程度、淋巴结侵袭和TNM分期相关，与RT-PCR结果一致，也证明了miR-551b-3p在胰腺癌中的抑癌基因作用。

综上所述，miR-551b-3p的表达在胰腺癌的不同发展阶段存在差异，并与肿瘤的恶性行为相关，提示miR-551b-3p可能是一个新发现的在胰腺癌发生发展过程中起重要作用的分子，可能发挥抑癌基因作用，并可能成为提示胰腺癌临床进展的潜在标志物。

参 考 文 献

1 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 胰腺癌诊治指南(2014)[J]. 中华普通外科杂志，2015，30：73-79.

2 胡应霞，张海蓉. 微小RNA与胰腺癌关系研究进展[J]. 医学研究生学报，2014，27：435-438.

3 姚汝铖，郑军，邢荣春. 微小RNA在胰腺癌中的研究进展[J]. 中华普外基础与临床杂志，2012，19：911-915.

4 黄陈，裘正军，江弢，等. 沉默STAT3基因对人胰腺癌细胞体内生长能力的影响[J]. 中华普通外科杂志，2011，26：324-327.

5 孟庆才，古宏晨，黄新余. 微小RNA在胰腺癌诊疗中的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志，2014，41：837-840.

6 潘峰，闻洋，马士杰，等. 血浆miRNA表达谱与胰腺癌相关性的研究[J]. 南京医科大学学报：自然科学版，2012，32：1541-1544.

7 王书艺，焦锋，王理伟. 微小RNA在胰腺癌早期诊断、疗效预测及预后判断中的研究进展[J]. 肿瘤，2013，33：1023-1026.

8 王宇欣，王凯旋，李兆申. MicroRNA与胰腺癌疼痛关系的研究进展[J]. 中华胰腺病杂志，2015，15：214-216.

9 Chen Z, Liu X, Hu Z, et al. Identification and characterization of tumor suppressor and oncogenic miRNAs in gastric cancer [J]. Oncol Lett, 2015, 10: 329-336.

10 Chen Z, Liu X, Liu M, et al. Expression of miR-551b-3p in gastric cancer cell lines and tissues and its clinical significance [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2014, 36: 903-904.

11 杨增俊，陈安. MicroRNAs在胰腺癌研究中的新进展[J]. 国际检验医学杂志，2014，35：1755-1758.

12 新标志物有望微创诊断胰腺癌[J]. 标记免疫分析与临床，2015，22：817.

13 尹健，朱光辉，单远洲，等. miRNA在胰腺癌转移中的研究进展[J]. 肿瘤研究与临床，2015，27：355-357.

14 张美霞，徐细明，余婷婷，等. 肿瘤干细胞与微小RNA的研究进展[J]. 中国医药，2015，10：1723-1725.

15 张伟，陈国栋，贺更生，等. 微小RNA在胰腺癌侵袭转移中的作用及机制[J]. 国际肿瘤学杂志，2014，41：454-457.

16 Swierniak M, Wojcidka A, Czetwertynska W, et al. In-depth characterization of the microRNA transcriptome in normal thyroid and papillary thyroid carcinoma[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98: E1401-E1409.

（收稿日期：2016-05-18）

（本文编辑：林磊）

（上接第342页）

26 Chen WG, Shan GD, Zhang H, et al. Double-balloon enteroscopy in small bowel tumors: a Chinese single-center study[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 3665-3671.

27 Urgesi R, Riccioni ME, Bizzotto A, et al. Increased diagnostic yield of small bowel tumors with PillCam: the role of capsule endoscopy in the diagnosis and treatment of gastrointestinal stromal tumors (GISTs). Italian single-center experience[J]. Tumori, 2012, 98: 357-363.

28 Girelli CM, Porta P, Colombo E, et al. Development of a novel index to discriminate bulge from mass on small-bowel capsule endoscopy[J]. Gastrointest Endosc, 2011, 74: 1067-1074.

29 Barbosa DC, Roupar DB, Ramos JC, et al. Automatic small bowel tumor diagnosis by using multiscale wavelet-based analysis in wireless capsule endoscopy images[J]. Biomed Eng Online, 2012, 11: 1-17.

30 Koornstra JJ. Small bowel endoscopy in familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2012, 26: 359-368.

31 Rokkas T, Niv Y. The role of video capsule endoscopy in the diagnosis of celiac disease: a meta-analysis [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012, 24: 303-308.

32 Kurien M, Evans KE, Aziz I, et al. Capsule endoscopy in adult celiac disease: a potential role in equivocal cases of celiac disease? [J]. Gastrointest Endosc, 2013, 77: 227-232.

33 Atlas DS, Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, et al. Capsule endoscopy in nonresponsive celiac disease [J]. Gastrointest Endosc, 2011, 74: 1315-1322.

34 Culliford A, Daly J, Diamond B, et al. The value of wireless capsule endoscopy in patients with complicated celiac disease[J]. Gastrointest Endosc, 2005, 62: 55-61.

35 Koulaouzidis A, Rondonotti E, Karargyris A. Small-bowel capsule endoscopy: a ten-point contemporary review[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 3726-3746.

36 Parker C, Davison C, Panter S. Tracheal aspiration of a capsule endoscope: not always a benign event[J]. Dig Dis Sci, 2012, 57: 1727-1728.

（收稿日期：2016-05-30）

（本文编辑：林磊）