

• 论 著 •

代谢综合征相关子宫内膜癌 miRNA 表达谱差异研究*

史咏梅¹, 伍碧梅¹, 唐明慧², 李超容³

(1. 珠海国际旅行卫生保健中心, 广东珠海 519000; 2. 珠海市中中西医结合医院, 广东珠海 519000; 3. 江门市第二人民医院, 广东江门 529030)

摘要:目的 分析子宫内膜癌(EC)患者合并与未合并代谢综合征(MS)的内膜组织 miRNA 表达谱差异,为研究 MS 相关 EC 疾病发生机制提供依据。**方法** 收集合并 MS 的 EC 和未合并 MS 的 EC 病灶内膜各 3 例,1 例正常内膜组织对照。提取总 RNA,利用 miRNA 基因芯片检测 miRNA 表达谱差异。**结果** 两组患者内膜组织与正常内膜组织间均有差异表达的 miRNA,其中合并 MS 者与正常内膜组织间存在 51 个 miRNA 差异表达,其中 15 个表达上调,36 个表达下调。未合并 MS 者与正常内膜组织间存在 9 个 miRNA 差异表达,其中 3 个表达上调,6 个表达下调。两种患者子宫内膜癌组织间存在 10 个 miRNA 差异表达,其中 4 个表达上调,6 个表达下调。**结论** 合并 MS 与未合并 MS 的 EC 组织间 miRNA 的表达差异可能与 MS 相关的 EC 发病机制相关,两组患者间差异表达的 miRNA 可为进一步研究子宫内膜癌发生的分子机制提供依据。

关键词:子宫内膜癌; 代谢综合征; miRNA 芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.24.011 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)24-3388-03

Study on the difference of expressions of microRNAs in endometrial carcinoma combined with the metabolic syndrome*

SHI Yongmei¹, WU Bimei¹, TANG Minghui², LI Chaorong³

(1. International Travel Health-Care Center of Zhuhai, Zhuhai, Guangdong 519020, China;
2. Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhuhai Guangdong 519020, China;
3. The Second People's Hospital of Jiangmen, Jiangmen, Guangdong 529030, China)

Abstract: **Objective** To study miRNA expression patterns in endometrial carcinoma(EC) combined with the Metabolic Syndrome(MS) and non-combined with MS in order to explore the role of the microRNAs in EC combined with the MS. **Methods** Three fresh-frozen samples of endometrial carcinoma Combined with MS and 3 cases of non-Combined with MS and 1 case of normal endometrium were collected. Total RNA was extracted from samples and miRNA microarray was used to evaluate the difference of expression spectrum of miRNA. **Results** There were different expression of miRNA among the two groups of endometrium and normal endometrium. There were 51 miRNA different expressions between EC combined with the MS and the normal endometrium, and among them there are 15 upregulated miRNA and 36 downregulated miRNA. There were 9 miRNA different expressions between EC non-combined with the MS and the normal endometrium, and there are 3 upregulated miRNA and 6 downregulated miRNA among them. 10 different miRNA were revealed between the two type of EC, and there are 4 upregulated miRNA and 6 downregulated miRNA among them. **Conclusion** Different expressions of miRNA between EC Combined and non-Combined with MS may provide insights into their roles in the progression of EC. The study of miRNA contributes to elucidate the molecular mechanism of endometrial carcinoma.

Key words: endometrial neoplasms; metabolic syndrome; miRNA array

子宫内膜癌(EC)是最常见的妇科肿瘤,占妇科三大恶性肿瘤的 20%~30%,严重威胁女性健康,绝经后妇女高发,近年来其发病率逐年上升并有年轻化趋势。代谢综合征(MS)是包括糖耐量降低、糖尿病、中心性肥胖和脂代谢紊乱等多种代谢异常簇集发生在同一个体的临床状态;越来越多的研究表明,MS 除了与乳腺癌、前列腺癌及结直肠癌等多种肿瘤有关,更是与 EC 也有一定的关联性,但具体发生机制仍不明了。miRNA 通过与靶基因 mRNA 作用,影响其蛋白表达水平,从而参与机体发育及肿瘤发生发展过程。本研究通过研究合并与未合并 MS 的 EC 内膜组织 miRNA 表达谱差异,探讨 miRNA 在两种患者肿瘤发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取珠海市中西医结合医院和江门市第二人民医院妇科手术患者 6 例为实验组,平均年龄(57.3±3.7)岁,均经术后病理切片诊断为子宫内膜癌,其中 3 例为合并 MS 患者,平均年龄(59.1±4.6)岁,另 3 例未合并 MS,平均年龄(55.7±2.1)岁。良性子宫内膜组织标本取自 1 例子宫肌瘤切除子宫手术患者内膜组织。术中子宫离体后迅速切除子宫内膜癌病灶组织或正常内膜组织,生理盐水冲洗,保存于液氮中。各取等重内膜组织样本混匀后为该组实验样本进行 RNA 提取。

1.2 方法 总 RNA 提取:采用 ABI 试剂盒提取各组混合样

* 基金项目:江门市科技计划项目(2013019)。
作者简介:史咏梅,女,副主任技师,主要从事肿瘤学基础方面的研究。

本中的总 RNA。紫外线分光光度计检测提取的总 RNA 纯度,琼脂糖变性凝胶电泳检测其完整性。基因芯片检测:采用 Affymetrix 的 Genechip miRNA 2.0 基因芯片平台进行表达谱检测。取分离纯化的总 RNA 用 Genisphere FlashTag 标记试剂盒对 miRNA 进行生物素标记。

1.4 统计学处理 使用激光扫描仪采集杂交图像,对杂交图像进行数字化转换。每个探针位置重复读取 3 次取平均值,然后计算病灶病变组织与正常组织检测信号的比值,两者比值>2.0 为表达差异显著。

2 结 果

2.1 实验组与对照组比较 被检测出明显差异表达的 miRNA 共有 60 个,其中 18 个上调,42 个下调。两实验组之间有 10 个 miRNA 差异表达,其中 4 个表达上调,6 个表达下调。

2.2 合并 MS 患者内膜病灶组织与正常内膜组织 miRNA 表达差异 扫描结果显示,在合并代 MS 患者内膜与正常内膜组织间存在 51 个表达差异的 miRNA,其中 15 个表达上调,36 个表达下调。表达上调最多的为 miRNA-205,表达下调最明显的是 miRNA-424。见表 1。

表 1 合并 MS 患者病灶组织与正常子宫内膜组织 miRNA 表达比较

miRNA 名称	与对照比值	miRNA 名称	与对照比值
miR-205	15.20	miR-424	0.11
miR-499	8.54	miR-542-5p	0.15
miR-200b	4.68	miR-542-3p	0.18
miR-429	4.42	miR-144	0.21
miR-200a	3.56	miR-204	0.29
miR-138	2.25	miR-136	0.35
miR-135a	2.11	miR-376a	0.39
miR-203	1.89	miR-377	0.42

2.3 未合并 MS 患者内膜病灶组织与正常内膜组织 miRNA 表达差异 未合并 MS 患者内膜与正常子宫内膜组织间存在 9 个表达差异的 miRNA,其中 3 个表达上调,6 个表达下调。表达上调最多的为 miRNA-10a,表达下调最明显的是 miRNA-449a。见表 2。

表 2 未合并 MS 患者病灶组织与正常内膜组织 miRNA 表达比较

上调 miRNA 名称	与对照比值	下调 miRNA 名称	与对照比值
miR-10a	3.46	miR-449a	0.027
miR-183	3.32	miR-449b	0.034
miR-29a	2.76	miR-424	0.12
		miR-204	0.22
		miR-377	0.34
		miR-503	0.37

2.4 合并 MS 与未合并 MS 内膜癌组织 miRNA 表达差异 在两个患者子宫内膜癌组织间存在 10 个表达差异的 miRNA,其中 4 个表达上调,6 个表达下调。表达上调最多的为 miRNA-499a,表达下调最明显的是 miRNA-100。见表 3。

表 3 合并 MS 患者病灶组织与未合并 MS 者 miRNA 表达比较

上调 miRNA 名称	与对照比值	下调 miRNA 名称	与对照比值
miR-449a	50.5	miR-100	0.21
miR-449b	44.7	miR-424	0.24
miR-18a	4.2	miR-126	0.32
miR-187	3.8	miR-503	0.35
		miR-29a	0.36
		miR-41-2	0.42

3 讨 论

据统计 2012 年 EC 作为妇科生殖道常见恶性肿瘤之一,在发达国家该病发病率已经跃居女性生殖道恶性肿瘤之首。EC 发生发展分子作用机制十分复杂。研究发现,EC 患者常伴有糖尿病、肥胖和脂代谢紊乱等 MS 组成部分,MS 是 EC、乳腺癌、直肠癌等发病的高危因素,胰岛素抵抗是其病理生理学基础和关键环节。miRNA 是一类由 19~25 个核苷酸组成的非编码小分子 RNA,它们通过碱基互补配对与特异的靶 miRNA 结合,从而抑制靶 miRNA 的翻译或直接降解 miRNA,抑制基因的表达,miRNA 也可直接作为癌基因或抑癌基因而发挥作用。对 EC 组织的 miRNA 表达的研究发现,子宫内膜腺癌的 miRNA 的表达与正常组织之间有显著差异^[1]。也有对 I 型和 II 型 EC 的表达进行研究,报道了两者具有各自独特的表达谱,并且与良性子宫内膜组织不同^[2]。本项目研究了伴发与未伴发 MS 的 EC 患者子宫内膜病灶组织 miRNA 的差异化表达,试图探索伴发 MS 患者罹患 EC 的发病机制。

本研究利用 miRNA 芯片通过与正常子宫内膜组织比较,筛选了合并及未合并 MS 的 EC 病灶组织差异表达的 miRNA,同时比较了两者 miRNA 表达谱的差异。其中在合并 MS 患者的内膜癌组织中 miR-205 上调最为显著。miR-205 通常被认为具有抑癌作用,在乳腺癌的研究中发现其作用为抑制肿瘤细胞的增殖和浸润。miR-205 在前列腺癌和乳腺癌中下调明显,而在 EC 和卵巢内膜样癌中上调显著,其通过抑制抑癌基因 JPH4 的表达从而促进 EC 的发生发展。Su 等^[3]报道下调 miR-205 的水平可以减少肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭,以上研究表明 miR-205 在内膜癌的增殖、迁移及侵袭中具有关键意义的作用。本项目研究还发现 miR-429、miR-200a、miR-200b 等 3 个 miR-200 的家族成员明显上调,这三个 miRNA 与 miR-205 均定位于 1 号染色体上,而 EC 患者常存在 1 号染色体基因重排,显示这些 miRNAs 可能存在相互作用。同家族的 miR-542、miR-424 在实验中表现出显著下调,miR-542-3p 可通过靶向环氧化酶 2(COX2)从而引起内膜异位症或者肿瘤,有可能与激素类物质作用相关^[4-5]。

未伴有 MS 的 EC 患者的 miRNA 表达谱与前者有很大差异。表达上调明显的是 miR-10a,下调最明显的是 miR-449a、miR-449b。miR-449 是细胞周期停滞、细胞凋亡和分化的强效诱导剂^[6],它通常被认为通过调节细胞周期调控转录因子 pRB-E2F1 信号途径来抑制致癌基因 CDC25A 的表达从而限制癌细胞的增殖^[7],也可能通过下调组蛋白乙酰基转移酶连续活化 p53 基因而引起细胞凋亡。有研究发现 miR-449 在人类

胃癌组织中降低^[8],其通过与靶基因结合激活 p53 基因从而诱导胃癌细胞凋亡。miR-10a 定位于 17 号染色体短臂 HOXB4 与 HOXB4 基因之间,与肿瘤侵袭性相关,在许多肿瘤中表达异常。miR-10a 作为抑癌基因可靶向抑制 HOX 家族基因^[9],参与造血细胞分化、肿瘤的发生及进展、免疫调节等过程,对于不同肿瘤的作用可能机制不同。

两组 EC 患者内膜 miRNA 表达比较发现,miR-499a 与 499b 表达上调显著,而 miR-100 显著下调。有研究显示 miR-100 在口腔鳞状细胞癌组织及其细胞系内表达下调,通过转染导入外源性 miR-100 后可降低癌细胞的增殖和靶基因表达。也有研究发现 miR-100 在胃癌组织中表达增高^[10],H. pylori 感染的胃癌组织表达高于非 H. pylori 感染者,表达量与患者的 TNM 分期呈正相关,生物信息学预测 HS3ST2 可能是 miRNA-100 的靶基因,其生物学作用不明。合并与未合并 MS 的 EC 患者病灶内膜表达差异的 miRNA 可能是二者组织学分型差别的分子学基础,也有可能是伴发 MS 患者肿瘤细胞发生、发展的重要分子学基础,这些 miRNA 为研究与 MS 相关的子宫内膜癌的预防、诊断及判断预后等提供新的研究思路。

参考文献

- [1] 梁静,张贵宇,马本红,等. 子宫内膜腺癌组织中 miRNA 差异表达谱分析[J]. 山东大学学报,2011,49(8):90-95.
- [2] 薛纪森,张乾,李晓琳,等. 子宫内膜癌 I 型和 II 型 miRNA 表达谱差异的分析[J]. 实用医学杂志,2011,27(22):4051-4054.
- [3] Su N, Qiu H, Chen Y, et al. miR-205 promotes tumor proliferation and invasion through targeting ESRRG in endometrial carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6): 2297-

2302.

- [4] Toloubeydokhti T, Pan Q, Luo X, et al. The expression and ovarian steroid regulation of endometrial microRNAs[J]. *Reprod Sci*, 2008, 15(10):993-1001.
- [5] Cicatiello L, Mutarelli M, Grober OM, et al. Estrogen receptor alpha controls a gene network in luminal-like breast cancer cells comprising multiple transcription factors and microRNAs[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(5): 2113-2130.
- [6] Lize M, Klimke A, Dobbelstein M. MicroRNA-449 in cell fate determination[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(17): 2874-2882.
- [7] Yang X, Feng M, Jiang X, et al. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(20):2388-2393.
- [8] Bou Kheir T, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, et al. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10(1):29.
- [9] Bryant A, Palma A, Jayaswal V, et al. miR-10a is aberrantly overexpressed in nucleophosmin1 mutated acute myeloid leukaemia and its suppression induces cell death[J]. *Mol Cancer*, 2012, 11(1):8.
- [10] 王雨濛. 幽门螺杆菌相关胃疾病中 miRNA100 的表达及意义研究[D]. 蚌埠:蚌埠医学院,2015:1-67.

(收稿日期:2017-05-17 修回日期:2017-08-06)

(上接第 3387 页)

考方法,将有助于诊疗各类细胞免疫功能紊乱导致的疾病,指导临床诊断、治疗及预后。

参考文献

- [1] Li CY, Xiao YZ, Wei P, et al. MicroRNA-155-induced T lymphocyte subgroup drifting in IgA nephropathy[J]. *Int Urol Nephrol*, 2017, 49(2):353-361.
- [2] Wu CL, Wu QY, Du JJ, et al. Calcium-sensing receptor in the T lymphocyte enhanced the apoptosis and cytokine secretion in sepsis[J]. *Mol Immunol*, 2015, 63(2):337-342.
- [3] 巫翠萍,覃西,王华民,等. 慢性乙型肝炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 与 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群的相关研究[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(3):273-277.
- [4] 严健,原永明,张舒,等. CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞亚群在肿瘤患者外周血中检测的临床意义[J]. 检验医学,2013,28(10):40-42.
- [5] 马灿业,李宝金,廖松松,等. 艾滋病合并乙型肝炎后肝硬化患者血清生化指标及 T 淋巴细胞亚群水平变化的临床价值[J]. 广州医科大学学报,2017,45(2):36-38.
- [6] Kogut, M H, Klasing K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: introduction

and overview[J]. *J Appl Poult Res*, 2009, 18(1):103-110.

- [7] 周校长. 对接触有害物质工人免疫学参数的研究[J]. 劳动医学,1994,1(2):41.
- [8] 褚家成,黄春霞,胡燕飞. 原油油气职业卫生标准研究[J]. 中国安全科学学报,2006,16(10):105-111.
- [9] 杨桂英,张学平,冯琴. 油田作业人员 4 项免疫学相关指标调查分析[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(14):1996-1997.
- [10] 吴逸明,李时恩,孟爱民,等. 多环芳烃接触者生物膜损伤指标及 T 淋巴细胞亚群测定[J]. 河南医科大学学报,2000,35(3):227-230.
- [11] Lebranchu Y, Thibault G, Degenne D, et al. Abnormalities in CD4⁺ T lymphocyte subset s in patients with common variable immunodeficiency[J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1991, 61(1):83-92.
- [12] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2012.
- [13] 徐晓琴,陈国红,刘晓燕,等. 江苏地区健康汉族人 T 淋巴细胞免疫表型参考值的建立[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2012,11(32):1616-1620.

(收稿日期:2017-07-12 修回日期:2017-09-15)