

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.017

· 短篇论著 ·

miR-370 和 EGFR 在肺癌中的表达及其临床意义

Expression of miR-370 and EGFR in lung cancer and its clinical significance

刘馨, 兰敏, 陈晓群, 黄尤光, 李佳, 王熙才(昆明医科大学第三附属医院 肿瘤研究所, 云南 昆明 650118)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-370 和 EGFR 在肺癌组织中的表达及其与患者临床病理特征的关系。**方法:** 收集 45 例肺癌及对应的正常肺组织标本, 采用 qPCR 检测 miR-370 和 EGFR mRNA 的表达, 用双荧光素酶检测系统检测共转染野生型及突变型 EGFR 3' UTR 质粒和 miR-370 mimics 后的荧光强度。分析 miR-370 和 EGFR 的相关性及其与肺癌患者临床病理特征的相关性。**结果:** miR-370 在肺癌组织中的中位(P25, P75)表达水平显著低于正常肺组织[0.153(0.119, 3.068) vs 0.875(0.026, 6.145), $P < 0.05$], EGFR 在肺癌组织中的表达水平显著高于正常肺组织[2.974(1.728, 2.975) vs 2.081(0.897, 4.873), $P < 0.05$], 两者水平呈负相关($r = -0.361$, $P < 0.01$)。双荧光素酶检测显示 EGFR 3' UTR 可与 miR-370 结合。miR-370 表达与肺癌患者的年龄、性别、地域、肿瘤分期、肿瘤大小和淋巴结转移等无相关性($P < 0.05$)。**结论:** 在肺癌组织中 miR-370 低表达、EGFR 高表达, 两者的表达水平呈负相关, miR-370 表达水平与患者肿瘤分期、病理类型等临床病理特征无相关性。

[关键词] 微小 RNA-370(miR-370); 表皮生长因子受体(EGFR); 肺癌

[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)01-0094-04

肺癌是目前我国发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一^[1], 5 年生存率仅有 18% 左右^[2]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种受体酪氨酸激酶, 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)治疗对伴有 EGFR 突变的晚期肺癌患者有部分疗效, 但大部分患者在服药 1 年左右将不可避免的出现获得性耐药的问题。因此, 研发新的治疗方法成为当前亟需解决的问题。miR-370 位于人类 14 号染色体长臂^[3], 成熟的 miR-370 长度为 21 个核苷酸^[4]。有研究发现, miR-370 可作用于多种靶基因参与肿瘤的演变过程, 包括肝癌^[5]、胃癌^[6]、卵巢癌^[7]等, 而其在肺癌中的表达水平及其作用机制目前尚无定论^[8-9]。本研究通过网站预测发现 EGFR 可能是 miR-370 的潜在靶点, 收集肺癌患者新鲜肺组织标本, 采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测肺癌组织中 miR-370 和 EGFR 的相对表达水平, 同时以双荧光素酶检测系统检测 miR-370 是否能结合 EGFR 3' UTR, 旨在探讨 miR-370 和 EGFR 在肺癌组织及正常肺组织中的表达差异、两者的相关性以及 miR-370 与患者临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2015 年 5 月至 2015 年 12 月在昆明医科大学第三附属医院胸外科行手术的 45 例肺癌组织标本, 在 15 min 内完成取材, 分别取癌组织(在肿瘤中心取材, 避免坏死部分)和正常组织(在离肿瘤边缘

最远端取材)标本, 置于 RNA later 溶液中保存于 -80 °C。所有患者术前均未行任何抗肿瘤治疗。

1.2 细胞株及主要试剂

293T 细胞购自上海吉玛公司。RNA later 购自 Ambion 公司, 总 RNA 提取试剂盒及 cDNA 合成试剂盒购自大连宝生物公司, miR-370 引物及检测试剂盒购自上海吉玛制药技术有限公司, TransStart Top Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司, 双荧光素酶报告系统购自美国 Promega 公司。

质粒构建: 合成 EGFR 3' -UTR 野生型(EGFR wt)、突变型(EGFR mut)片段(吉玛公司), Hsa-miR-370-3P inhibitor 片段作为阳性参照, 将以上片段通过酶切位点 *Sac I/Xho I* 克隆入 pmiRGLO 萤火虫荧光素酶表达载体得到 pmiRG-EGFR-UTR-wt, pmiRG-EGFR-UTR-mut 和 pmiRG-miR-370-inhibitor-PC 3 个质粒。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81460358); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(No. 2017FE467(-189), 2014FB066); 云南省卫生科技计划项目(No. 2017NS201, 2014NS023)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81460358), the Special Fund of Yunnan Science and Technology Department Combination with Kunming Medical University [No.2014FB066, 2017FE467(-189)], and the Yunnan Provincial Health Science and Technology Program (No. 2017NS201, 2014NS023)

[作者简介] 刘馨(1976-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤靶向治疗研究, E-mail: liuxinkm@126.com

[通信作者] 王熙才(WANG Xicai, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤靶向治疗研究, E-mail: wangxc2005323@126.com

1.3 网站预测EGFR是否是miR-370的靶基因

进入 FINDTAR3 网站 (<http://bio.sz.tsinghua.edu.cn/>), 在 microRNA 数据库中限定人源“Homo sapiens”, microRNA 限定为“hsa-miR-370-3p”, 在基因搜索栏中限定基因为“EGFR”, 基因序列号为“NM_005228”, 进行搜索后得到相应结果。

1.4 双荧光素酶实验检测miR-370与EGFR的结合

运用双荧光素酶实验体系检测 miR-370 与 EGFR 是否有结合, 将 1×10^5 个 293T 细胞种于 24 孔板, 24 h 后, 以 Lipofectamine™ 2000 介导 250 ng 质粒 (pmiRG-EGFR-UTR-wt, pmiRG-EGFR-UTR-mut 或者 pmiRG-miR-370-inhibitor-PC) 与 20 nmol/L miR-370 mimic 或 miR-NC 进行共转染, 转染 48 h 后, 用双荧光素酶报告系统检测细胞的荧光素酶活性。

1.5 qPCR检测肺癌组织中miR-370和EGFR表达水平

按 TaKaRa 总 RNA 提取试剂盒说明书提取组织总 RNA, 用核酸蛋白检测仪检测总 RNA 的浓度和纯度, 凝胶电泳检测 RNA 完整性。miR-370 cDNA 合成按照吉玛技术有限公司 cDNA 合成说明书操作, 反应条件: 25°C 30 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min。EGFR cDNA 参照 TaKaRa 公司 cDNA 合成说明书操作, 反应条件: 25°C 5 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min。miR-370 PCR 扩增按照吉玛制药技术有限公司说明书操作, miR-370 上游引物为 5'-TAGCCTGCTGGGGTGGAA-3', 下游为 5'-TATGGTTTTGACGACTGTGTGAT-3'; U6 上游引物为 5'-ATTGGAACGATACAGAGAA-GATT-3', 下游为 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'。反应条件: 95°C 3 min; 95°C 12 s; 62°C 40 s, 共 30 个循环。EGFR PCR 扩增按照北京全式金生物科技有限公司说明书操作, EGFR 上游引物为 5'-GCCTC-CAGAGGATGTTCAATAA-3', 下游为 5'-TGAGGGC AATGAGGACATAAC-3'; RPS13 上游引物为 5'-GTT-GCTGTTCGAAAGCATCTTG-3', 下游为 5'-AATATC-GAGCCAAACGGTGAA-3'。反应条件: 94°C 30 s; 94°C 5 s; 60°C 30 s, 共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示 miR-370 与 EGFR 相对表达水平。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析, 统计描述以中位数 (P25, P75) 表示, 组间差异性比较用 Wilcoxon 配对符号秩检验进行统计分析, 相关性分析用 Spearman 方法。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR (NM_005228) 可能是 miR-370 的潜在靶基因
通过 <http://bio.sz.tsinghua.edu.cn/> 网站预测发现,

miR-370 与 EGFR 之间有多个结合位点, 提示 EGFR (NM_005228) 可能是 miR-370 一个潜在的靶基因。

双荧光素酶检测结果显示, 相较于 miR-NC 而言, miR-370 mimics 与阳性参照 pmiRG-miR-370-inhibitor-PC 共转明显抑制了的荧光强度 ($P < 0.01$), 与野生型 EGFR 3' UTR 质粒 pmiRG-EGFR-UTR-wt 共转出现了类似的荧光减弱 ($P < 0.01$), 而与突变型 pmiRG-EGFR-UTR-mut 共转荧光强度未出现明显变化。以上结果提示, miR-370 可以结合 EGFR 的 3' UTR。

2.2 miR-370在肺癌组织中低表达

qPCR 检测结果 (图 1) 显示, miR370 在肺癌组织和正常肺组织中的表达均为非正态分布, 其中位数 (P25, P75) 分别为 0.153 (0.119, 3.068) 和 0.875 (0.026, 6.145)。经 Wilcoxon 符号秩检验进行统计学分析结果显示, miR-370 在癌组织中的表达水平显著低于正常肺组织 ($Z = -2.286, P < 0.05$)。

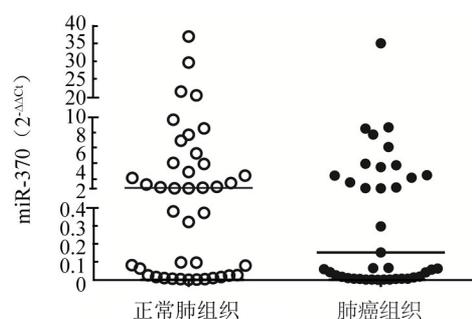


图 1 miR-370 在肺癌组织和正常肺组织中的表达

2.3 EGFR在肺癌组织中高表达

qPCR 检测结果 (图 2) 显示, EGFR 在肺癌组织和正常肺组织中的表达也呈非正态分布, 其中位数 (P25, P75) 分别为 2.974 (1.728, 2.975) 和 2.081 (0.897, 4.873)。经 Wilcoxon 配对符号秩和检验统计分析结果显示, EGFR 在肺癌组织中的表达水平显著高于正常肺组织 ($Z = -3.087, P < 0.05$)。

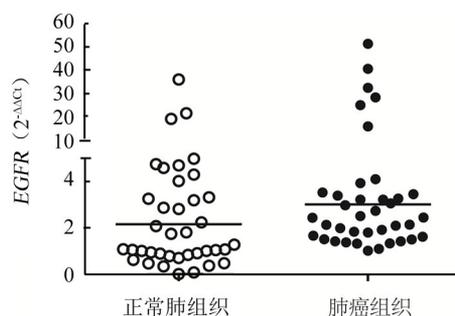


图 2 EGFR 在肺癌组织和正常肺组织中的表达

2.4 miR-370和EGFR在肺癌组织中表达呈负相关

miR-370和EGFR在肺癌组织和正常肺组织中的表达均为非正态分布的定量资料,用Spearman进行两个基因的相关性分析结果(图3)提示,在肺癌组织中miR-370的表达水平与EGFR呈负相关($r=-0.361$, $P<0.01$)。

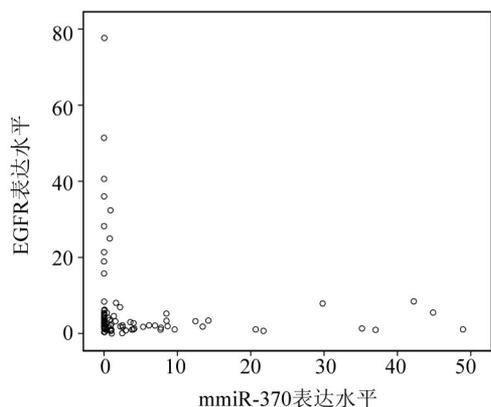


图3 MiR-370与EGFR表达呈负相关

2.5 miR-370的表达水平与患者临床病理参数无相关性

肺癌组织中miR-370的表达水平与患者各临床

病理特征进行相关性分析结果(表1)显示,miR-370的表达水平与患者的年龄、性别、地域、肿瘤分期、肿瘤大小和淋巴结转移等临床病理参数无相关性(均 $P>0.05$)。

3 讨论

miRNA是一类单链内源性的非编码RNA,某个特定的miRNA可调节多个靶基因,而某个特定的靶基因可以受到多个miRNA的调控。有研究^[10-12]发现,miRNA的表达水平与恶性肿瘤的侵袭和转移相关。miR-370在肝癌细胞株及胃肠道间质瘤等肿瘤中表达下调^[13-14],而在转移性前列腺癌及黑色素瘤组织中则表达增高^[15-16]。关于miR-370在肺癌中的表达也有不同的结论,Chen等^[8]发现miR-370在非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)组织及细胞系中表达显著下调;而Nadal等^[17]则认为miR-370在肺癌组织中高表达。本研究用qPCR检测了45例肺癌患者癌组织和正常组织中miR-370的表达水平,发现miR-370在癌组织中低表达($P<0.05$),与Chen等^[8]的研究结果一致。

表1 肺癌组织中miR-370的表达水平与临床病理参数的关系

临床特征	例数	miR-370相对表达中位数(P25,P75)	r	P
年龄(t/a)			0.076	0.267
≤50	11	0.042(0.005,0.747)		
50~60	18	0.108(0.012,1.850)		
>60	16	1.605(0.048,8.312)		
性别			0.021	0.893
男	24	0.583(0.007,3.752)		
女	21	0.067(0.021,2.064)		
病理类型			0.001	0.995
腺癌	35	0.067(0.014,3.585)		
鳞癌	8	0.929(0.006,2.470)		
其他	2	4.338(0.005,8.671)		
肿瘤分期			-0.080	0.603
I	21	0.153(0.013,8.126)		
II	10	0.181(0.006,1.379)		
III	14	0.297(0.034,1.070)		
肿瘤大小(l/cm)			0.067	0.661
≤3	17	0.067(0.013,1.636)		
3~5	19	0.869(0.014,3.585)		
>5	9	0.747(0.004,8.126)		
淋巴结转移			-0.045	0.770
无	25	0.153(0.0119,5.073)		
有	20	0.181(0.015,1.474)		

有研究^[18-20]发现, NSCLC患者中80%以上伴有EGFR过表达, 60%以上伴有EGFR基因拷贝数的增加, 提示EGFR表达水平上调可能是EGFR影响NSCLC复发转移的理论基础。通过网站预测, 笔者发现EGFR可能是miR-370的靶基因。El-Daly等^[21]研究发现, 上调miR-134和miR-370的表达抑制了EGFR和PIK3CA的表达。本研究结果表明, EGFR在肺癌组织中的表达水平明显高于正常肺组织($P < 0.05$), 与目前大多数研究^[22]结果一致。为探讨miR-370和EGFR在肺癌中的相关性, Spearman分析结果提示肺癌组织中miR-370与EGFR呈负相关($P < 0.05$), 且双荧光素酶实验证实miR-370可以结合EGFR 3'UTR($P < 0.01$), 上述研究结果进一步提示EGFR可能是miR-370潜在的靶基因。miR-370表达与患者的年龄、性别、地域、肿瘤大小、肿瘤分期和淋巴结转移等无相关性($P > 0.05$)。

综上所述, 肺癌组织中miR-370呈低表达, 其与EGFR的表达呈负相关, 在肺癌中EGFR可能是miR-370一个潜在的靶基因, 研究结果为开发肺癌治疗新靶点提供了实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29. DOI: 10.3322/caac.21208.
- [3] BENETATOS L, HATZIMICHAEL E, LONDIN E, et al. The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(5): 795-814. DOI: 10.1007/s00018-012-1080-8.
- [4] ILIOPOULOS D, DROSATOS K, HIYAMA Y, et al. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and cpt1alpha and affects lipid metabolism[J]. J Lipid Res, 2010, 51(6): 1513-1523. DOI: 10.1194/jlr.M004812.
- [5] SUN G, HOU Y B, JIA H Y, et al. MiR-370 promotes cell death of liver cancer cells by Akt/FoxO3a signalling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(10): 2011-2019.
- [6] LO S S, HUNG P S, CHEN J H, et al. Overexpression of miR-370 and downregulation of its novel target TGF β -RII contribute to the progression of gastric carcinoma[J]. Oncogene, 2012, 31(2): 226-237. DOI: 10.1038/onc.2011.226.
- [7] LEE H, PARK C S, DEFTERIOS G, et al. MicroRNA expression in ovarian carcinoma and its correlation with clinicopathological features[J]. World J Surg Oncol, 2012, 10(174): 1-10. DOI: 10.1186/1477-7819-10-174.
- [8] CHEN T, GAO F, FENG S, et al. MicroRNA-370 inhibits the progression of non-small cell lung cancer by downregulating oncogene TRAF4[J]. Oncol Rep, 2015, 34(1): 461-468. DOI: 10.3892/or.2015.3978.
- [9] GKIRTZIMANAKI K, GKOUSKOU K K, OLEKSIEWICZ U, et al. TPL2 kinase is a suppressor of lung carcinogenesis[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(16): E1470-1479[2017-07-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3631618/>. DOI: 10.1073/pnas.1215938110.
- [10] CHU K, GAO G, YANG X, et al. MiR-512-5p induces apoptosis and inhibits glycolysis by targeting p21 in non-small cell lung cancer cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48(2): 577-586. DOI: 10.3892/ijo.2015.3279.
- [11] MIRZADEH AZAD F, NAELI P, MALAKOOTIAN M, et al. Two lung development-related microRNAs, miR-134 and miR-187, are differentially expressed in lung tumors[J]. Gene, 2016, 577(2): 221-226. DOI: 10.1016/j.gene.2015.11.040.
- [12] XIAO P, LIU W L. MiR-142-3p functions as a potential tumor suppressor directly targeting HMGB1 in non-small-cell lung carcinoma [J/OL]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10800-10807[2017-07-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4637607/>.
- [13] PAN X P, WANG H X, TONG D M, et al. miRNA-370 acts as a tumor suppressor via the downregulation of PIM1 in hepatocellular carcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(6): 1254-1263.
- [14] HALLER F, VON HEYDEBRECK A, ZHANG J D, et al. Localization and mutation-dependent micro RNA(miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31[J]. J Pathol, 2010, 220(1): 71-86. DOI: 10.1002/path.2610.
- [15] BIAN X, SHEN Y, ZHANG G, et al. Expression of dicer and its related miRNAs in the progression of prostate cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(3): 1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0120159.
- [16] WEI S, MA W. MiR-370 functions as oncogene in melanoma by direct targeting pyruvate dehydrogenase B[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 278-286[2017-07-02]. <http://sciencedirect.com/science/journal/07533322>. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.03.068.
- [17] NADAL E, ZHONG J, LIN J, et al. A MicroRNA cluster at 14q32 drives aggressive lung adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(12): 3107-3117. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3348.
- [18] PEARSON G, ROBINSON F, BEERS GIBSON T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions[J]. Endocr Rev, 2001, 22(2): 153-183. DOI: 10.1210/edrv.22.2.0428.
- [19] BOWERS G, REARDON D, HEWITT T, et al. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells[J]. Oncogene, 2001, 20(11): 1388-1397. DOI: 10.1038/sj.onc.1204255.
- [20] HOGNASON T, CHATTERJEE S, VARTANIAN T, et al. Epidermal growth factor receptor induced apoptosis: potentiation by inhibition of Ras signaling[J]. FEBS Lett, 2001, 491(1/2): 9-15. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02166-4.
- [21] EL-DALY S M, ABBA M L, PATIL N, et al. miRs-134 and -370 function as tumor suppressors in colorectal cancer by independently suppressing EGFR and PI3K signalling[J]. Sci Rep, 2016, 6(24720): 1-11. DOI: 10.1038/srep24720.
- [22] VEALE D. Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 1997, 55(5): 513-516.

[收稿日期] 2017-09-05

[修回日期] 2017-11-10

[本文编辑] 党瑞山