

• 临床研究 •

维吾尔族妇女子宫颈癌和 CIN 中 miRNA-101 的表达及其与 HPV 的关系*

叶 静, 林 晨, 贡江力, 古力娜尔·库班[△]

(新疆医科大学基础医学院病理学教研室, 乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 探讨维吾尔族妇女宫颈上皮内瘤变(CIN) I ~ III 级和子宫颈癌组织中 miRNA-101 的表达情况, 并分析子宫颈癌中 miRNA-101 与人乳头瘤病毒(HPV)感染的关系。方法 采用锁定核苷酸原位杂交技术(LNA-ISH)检测维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌、CIN I ~ III 级和慢性宫颈炎组织中 miRNA-101 的表达情况, 并对子宫颈鳞状细胞癌中 miRNA-101 与 HPV 感染情况进行相关性分析。结果 miRNA-101 在慢性宫颈炎, CIN I、II、III 及子宫颈癌鳞状细胞中的表达率分别为 80.00%、73.33%、46.67%、26.67% 及 10.00% ($\chi^2 = 36.295, P = 0.000$)。子宫颈鳞状细胞癌中 miRNA-101 与 HPV 结果呈负相关 ($R = -0.767, P = 0.000$)。结论 miRNA-101 参与子宫颈鳞状细胞癌的发生、发展, 并且与 HPV 感染有关, miRNA-101 可作为子宫颈癌筛查及早期诊断的分子指标之一。

关键词:宫颈上皮内瘤样病变; 子宫颈; 肿瘤; 微 RNAs 人乳头瘤病毒

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.27.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)27-2810-02

Expression of miRNA-101 and its relationship with HPV in cervical carcinoma tissue and CIN of Uighur women*

Ye Jing, Lin Chen, Yun Jiangli, Gulinar Kuerban[△]

(Department of Pathology, School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumchi, Xinjiang 830011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of miRNA-101 in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia(CIN) class I - III in Uighur women and to analyze its relation with human papillomavirus(HPV) infection. **Methods** The expression of miRNA-101 was detected using the method of locked nucleic acid(LNA)-modified oligonucleotide in situ hybridization(ISH) with the formalin-fixed paraffin-embedded(FPE) specimens from cervical cancer, chronic cervicitis and CIN class I, II, III. Then the correlation between the expression of miRNA-101 and HPV infection in cervical cancer was analyzed. **Results** The expressin rates of miRNA-101 in chronic cervicitis, CIN I, II, III and cervical cancer were 80.00%, 73.33%, 46.67%, 26.67% and 10.00% respectively with significant difference among the five groups. miRNA-101 in cervical cancer was correlated with HPV infection ($R = -0.767, P = 0.000$). **Conclusion** miRNA-101 involves in the development and progression of cervical squamous cell cancer and may be related to the HPV infection. miRNA-101 may be used as the molecular marker of screening and early diagnosis in cervical cancer.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia; cervix uteri; neoplasms; microRNAs; human papillomavirus

子宫颈癌一直是新疆地区发病率居首位的妇女恶性肿瘤, 尤其维吾尔族妇女子宫颈癌的收治比例明显高于其他民族, 且发病年龄早, 平均年龄为 45.04 岁(汉族为 50.85 岁)^[1], 晚期患者较多。因此, 寻找有助于子宫颈癌早期诊断的分子标志物是近年来子宫颈癌研究的热点之一。微小 RNA(microRNAs, miRNAs)是一类新发现的内源性非蛋白质编码小 RNA 分子, 有研究发现 miRNA 可作为筛查肿瘤的早期诊断指标之一^[2]。高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是目前公认的子宫颈癌发生的高危因素之一^[3]。而关于 HPV 与 miRNA 之间是否具有相关性说法不一。因此, 本研究应用锁定核苷酸原位分子杂交(LNA-ISH)技术检测新疆维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌、宫颈上皮内瘤变(CIN) I ~ III 级及慢性宫颈炎中 miRNA-101 的表达, 并分析子宫颈鳞状细胞癌中 miRNA-101 与 HPV 之间的关系, 探讨其在子宫颈癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)标本来源: 收集新疆医科大学附属肿瘤医院病理科 2008 年 6 月至 2010 年 6 月维吾尔族妇女子宫颈鳞

状细胞癌、慢性宫颈炎石蜡标本各 30 例, CIN I、II、III 级各 15 例, 均未经放疗、化疗、免疫治疗或近期局部物理治疗。所有组织均经 10% 的甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续切片厚 2 μ m。本研究中子宫颈癌的高危型 HPV 数据来自组织标本所对应的临床病历资料。(2)试剂: miRNA-101 探针为 Exiqon 公司产品; 通用型原位杂交检测试剂盒 MK1031 购自武汉博士德生物工程有限公司; DEPC 购自美国 Amresco 公司。

1.2 方法 所有液体试剂均需经 0.1% DEPC 处理或用 DEPC 水配置。(1)二甲苯脱石蜡, 梯度乙醇脱水; (2)3% H_2O_2 室温作用 10 min; (3)胃蛋白酶(成分为 1 000 μ L 纯净水、100 μ L HCl、10 μ L 浓缩胃蛋白酶)37 $^{\circ}$ C 消化 30 min, 0.5 mol/L TBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次; (4)杂交, 每张切片 20 μ L 杂交液(浓度为 1:200), 将原位杂交专用盖玻片盖于组织上, 切片置于杂交仪内, 37 $^{\circ}$ C 孵育 14~16 h; (5)37 $^{\circ}$ C 2 $\times$ 柠檬酸缓冲液(SSC), 5 min $\times$ 2 次, 洗去部分非特异性结合的探针; (6)滴加封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 甩去多余液体, 不洗; (7)滴加碱性磷酸酶标记小鼠抗地高辛(用 0.5 mol/L TBS 按 1:200 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min; (8)BCIP/NBT 显色: 按 1:20 的比例

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区教育厅高校科研计划重点项目(XJEDU2009123)。 [△] 通讯作者, Tel: (0991)4361759; E-mail: gulnark@

用 0.01 mol/L TBS(pH9.5) 稀释,混匀,显色液加至标本上,室温显色 10 min,充分水洗,核固红复染 5~15 min,水洗,水溶性封片剂封片。用已知阳性片做阳性对照,用 PBS 替代 miRNA-101 抗体作为阴性对照。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计数资料率的比较采用 χ^2 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

miRNA-101 定位于子宫颈上皮细胞细胞质,阳性表达为细胞质着色呈紫蓝色。miRNA-101 在慢性宫颈炎中表达为阳性,细胞质弥漫性着色呈紫蓝色(封 3 图 1);在 CIN I~III 级中 miRNA-101 阳性表达呈逐渐下降趋势(封 3 图 2);而在子宫颈鳞状细胞癌中 miRNA-101 为阴性表达,癌巢中未见有蓝紫色的阳性表达颗粒,因有核固红,故组织呈现红色(封 3 图 3)。阴性对照组全部为阴性。miRNA-101 在慢性宫颈炎,CIN I、II、III 及子宫颈鳞状细胞癌中的阳性表达率分别为 80.00%(24/30)、73.33%(11/15)、46.67%(7/15)、26.67%(4/15)及 10.00%(3/30),差异有统计学意义($\chi^2=36.295, P=0.000$)。在子宫颈鳞状细胞癌中 HPV 阳性率为 86.67%(26/30),其 miRNA-101 表达与 HPV 呈负相关($r=-0.767, P=0.000$)。在子宫颈鳞状细胞癌高危型 HPV 阳性 26 例患者中,HPV16 检出率最高,达 73.08%(19/26),明显高于 HPV18(19.23%)及其他亚型(7.69%)($\chi^2=28.500, P=0.000$)。

3 讨 论

本课题组在前期研究中用 miRNA 微阵列芯片,检测维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌及慢性宫颈炎组织中差异表达的 miRNA,发现在维吾尔族妇女宫颈癌中有 12 个 miRNA 表达下调,其中 miRNA-101 下调最明显,并用 RT-PCR 方法验证了芯片检测结果^[4]。miRNA-101 是一类单链核糖核酸的负调控基因表达的非编码小 RNA。miRNA-101 前体是一个茎环状结构,大约有 70 个核苷酸,在 Dicer 的作用下,剪切为 21~24 个核苷酸的成熟 miRNA-101。在多种肿瘤中 miRNA-101 的表达下调,如胃癌^[5]、结肠癌^[6]、前列腺癌^[7]、非小细胞肺癌^[8]、肝细胞性肝癌^[9]等。

本研究发现,miRNA-101 在慢性宫颈炎上皮组织中阳性率最高,在 CIN I~III 级中表达呈阶梯样下降,而在子宫颈鳞状细胞癌中阳性率最低,即在子宫颈由癌前病变发展到子宫颈癌的过程中 miRNA-101 表达逐步降低。这与国外大多数文献报道相一致,提示 miRNA-101 的表达失调可能与子宫颈癌的发生有关。Hiroki 等^[10]在 miRNA 与子宫内浆液性腺癌的研究中发现,miRNA-101 表达下调,转染 miRNA-101 或前体 miRNA-101 到子宫内浆液性腺癌的细胞株中,细胞生长受抑制。Friedman 等^[11]对膀胱移行细胞癌中 miRNA-101 的表达进行研究,发现 miRNA-101 抑制膀胱移行癌细胞株中的细胞增殖和集落形成。

本研究发现,miRNA-101 在 CIN I、II、III 级中均有表达,且其阳性率呈阶梯样下降,即 miRNA-101 在子宫颈鳞状细胞癌前病变阶段随着病情发展其阳性率逐步下降,提示 miRNA-101 有可能成为新的检测宫颈癌的早期指标之一。这与以往文献报道相似。Hanke 等^[2]研究发现 miRNA-152 可能用于膀胱癌的无创性早期诊断;血清标本中的 miRNA-21 也可作为弥散性巨大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)非损伤性的诊断标记物^[12],而痰液 miRNA-21 水平诊断法可能成为一种有效的肺癌无创检查法^[13]。

本研究通过对维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌临床病例中高危型 HPV 数据的分析,发现高危型 HPV 阳性的子宫颈鳞状细胞癌中 miRNA-101 低表达,在慢性宫颈炎上皮组织中 miRNA-101 高表达。即在高危型 HPV 阳性的子宫颈鳞状细胞癌组织与正常宫颈组织中 miRNA-101 差异表达,提示 miRNA-101 表达改变可能与 HPV 阳性子宫颈鳞状细胞癌的发生有密切关系。本研究中,高危型 HPV 阳性为 26 例,其中,HPV16 检出率最高(73.08%),明显高于 HPV18 及其他亚型,提示维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌高危型 HPV 感染以 HPV16 为主。而关于 miRNA 与 HPV 是否在子宫颈癌发生、发展中起相互作用,国内、外研究者的看法不一。Melar-New 等^[14]的研究发现,高水平的 miRNA-203 抑制高危型 HPV 的扩增,而高危型 HPV 病毒蛋白也能够抑制分化细胞中 miRNA-203 的表达。与此相反,Cai 等^[15]对 HPV31 型复制周期的潜伏期和繁殖期进行 miRNAs 分析,发现的 500 余种细胞 miRNAs 中没有一个是 HPV31 特异的 miRNAs,他们认为 HPV31 及所有亚型的 HPV 均不表达病毒编码的 miRNAs。造成这种截然相反结果的原因可能包括:(1)研究对象的异质性。不同的子宫颈癌组织构成(如组织学类型、病理分期、临床分级)和正常对照宫颈组织来源,均可能导致结论不一致。(2)采用不同的筛选方法及定量方法可能导致结果差异。因此,有必要进行大样本、高通量、标准化的子宫颈癌 miRNA-101 表达谱研究,以明确 miRNA-101 的表达变化与 HPV 阳性子宫颈鳞状细胞癌之间的相关性。所以,探讨高危型 HPV 感染及致癌过程中 miRNA-101 的表达特征及作用机制,对阐明 HPV 致癌机制和探索阻断宫颈癌发生的新策略和新靶点具有极其重要的意义。

综上所述,miRNA-101 参与了维吾尔族妇女子宫颈鳞状细胞癌的发生、发展;miRNA-101 与高危型 HPV 感染有关;miRNA-101 可能作为子宫颈癌筛查以及早期诊断的分子指标。高危型 HPV 与 miRNA-101 在子宫颈癌中的具体作用机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 拉莱·苏祖克,彭玉华,周康,等.新疆不同民族子宫颈癌发病趋势分析[J].新疆医科大学学报,2006,29(7):569-571.
- [2] Hanke M,Hoefig K,Merz H,et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker; microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer[J]. Urol Oncol,2010,28(6):655-661.
- [3] 王雪春,孙蓬明,林芬,等.某地区 HPV 不同亚型感染与宫颈病变的相关研究[J].国际检验医学杂志,2011,32(10):1024-1026.
- [4] 林晨,顾霞,拉莱·苏祖克,等.子宫颈癌组织中 miRNAs 的差异表达[J].中华妇产科杂志,2011,46(2):136-137.
- [5] Wang HJ,Ruan HJ,He XJ,et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion[J]. Eur J Cancer,2010,46(12):295-303.
- [6] Strillacci A,Griffoni C,Sansone P,et al. MiRNA-101 down-regulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells[J]. Exp Cell Res,2009,315(8):1439-1447.
- [7] Chiang CW,Huang Y,Leong KW,et al.(下转第 2815 页)

达率,且 AR 的表达状态与 TNBC 的预后相关,AR 的表达状态在 TNBC 的预后及治疗中可能具有重要的临床意义,AR 可以作为潜在的治疗新靶点,为 TNBC 提供新的治疗策略,从而改善 TNBC 的预后。

参考文献:

- [1] Guillermo C,Jose M,Daniela C,et al. Local recurrence after mastectomy for breast cancer;analysis of clinicopathological,biological and prognostic characteristics[J]. Breast Cancer Res Treat,2007,102(1):61-73.
- [2] Moe RE,Anderson BO. Androgens and androgen receptors;a clinically neglected sector in breast cancer biology [J]. J Surg Oncol,2007,95(6):437-439.
- [3] Higgins MJ,Wolff AC. The androgen receptor in breast cancer:learning from the past [J]. Breast Cancer Res Treat,2010,124(3):619-621.
- [4] Nicolás Diaz-Chico B,Germán Rodríguez F,González A, et al. Androgens and androgen receptors in breast cancer [J]. J Steroid Biochem Mol Biol,2007,105(1/2/3/4/5): 1-15.
- [5] Lin HY,Sun M,Lin C,et al. Androgen-induced human breast cancer cell proliferation is mediated by discrete mechanisms in estrogen receptor- alpha-positive and-negative breast cancer cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009,113(3/4/5):182-188.
- [6] Gerson R,Alban F,Villalobos A,et al. Recurrence and survival rates among early breast cancer cases with triple negative immunophenotype[J]. Gac Med Mex,2008,144 (1):27-34.
- [7] Mise M,Higashide S,Hashimoto K,et al. Clinicopathological features of young patients with triple negative breast cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho,2009,36(10): 1677-1681.
- [8] Agrawal AK,Jelen M,Grzebieniak Z,et al. Androgen re-

- ceptors as a prognostic and predictive factor in breast cancer[J]. Folia Histochem Cytobiol,2008,46(3):269-276.
- [9] Walter S,Peter R,Nadia D,et al. Evaluation of the prognostic significance of androgen receptor expression in metastatic breast cancer[J]. Virchows Arch,2006,449(1): 24-30.
- [10] Brys M. Androgens and androgen receptor;do they play a role in breast cancer[J]. Med Sci Monit,2000,6(2):433-438.
- [11] Park S,Koo JS,Kim MS,et al. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers[J]. Ann Oncol, 2011,22(8):1755-1762.
- [12] Park S,Koo J,Park HS,et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer[J]. Ann Oncol,2010,21 (3):488-492.
- [13] Bieche I,Parfait B,Tozlu S,et al. Quantitation of androgen receptor gene expression in sporadic breast tumors by real-time RT-PCR:evidence that MYC is an AR-regulated gene[J]. Carcinogenesis,2001,22(9):1521-1526.
- [14] Rong H,Shaheenah D,Michelle DH,et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women[J]. Clin Cancer Res,2011,17(7):1867-1874.
- [15] Peters AA,Buchanan G,Ricciardelli C,et al. Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer [J]. Cancer Res,2009,69 (15):6131-6140.
- [16] Rakha EA,El-Sayed ME,Green AR,et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer [J]. Cancer, 2007,109(1):25-32.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)

(上接第 2811 页)

- PKCalpha mediated induction of miRNA-101 in human hepatoma HepG2 cells[J]. J Biomed Sci,2010,17(1):35.
- [8] Zhang JG,Guo JF,Liu DL,et al. MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2 [J]. J Thorac Oncol,2011,6(4):671-678.
- [9] Li S,Fu H,Wang Y,et al. MicroRNA-101 regulates expression of the v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS) oncogene in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,2009,49(4):1194-1202.
- [10] Hiroki E,Akahir J,Suzuki F,et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas[J]. Cancer Sci,2010,101(1):241-249.
- [11] Friedman JM,Liang G,Liu CC,et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2

- [J]. Cancer Res,2009,69(6):2623-2629.
- [12] Lawrie CH,Gal S,Dunlop HM,et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. Br J Haematol,2008,141(5):672-675.
- [13] Xie Y,Todd NW,Liu Z,et al. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer,2010,67(2):170-176.
- [14] Melar-New M,Laimins LA. Human Papillomaviruses modulate expression of MicroRNA 203 upon epithelial differentiation to control levels of p63 proteins[J]. J Virol,2010, 84(10):5212-5221.
- [15] Cai X,Li G,Laimins LA,et al. Human papillomavirus genotype 31 does not express detectable microRNA levels during latent or productive virus replication[J]. J Virol 2006,80(21):10890-10893.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)