

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.007

新疆妇女宫颈病变组织 miR-146a/133b 的表达及临床意义*

马丽¹, 马彩玲^{1△}, 卢畅², 陈艳霞¹

(1. 新疆医科大学第一附属医院妇科/新疆重大疾病医学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院病理科, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的 探讨 miR-146a/133b 在新疆维、汉民族宫颈组织中的差异性表达及其临床意义。方法 采用 RT-qPCR 法检测 miR-146a/133b 在石蜡包埋的宫颈炎、宫颈上皮内瘤变(CIN)和宫颈癌组织中的相对表达量, 分析其在宫颈癌发生、发展中的临床意义。结果 与宫颈炎组织比, CIN 和宫颈癌组织 miR-146a/133b 的表达水平显著升高($P < 0.05$), 且随宫颈病变的加重, 两者的表达水平逐渐升高, 宫颈癌组织中维、汉民族 miR-146a 存在差异性表达($P < 0.05$)。结婚年龄小于 20 岁、肿瘤直径大于或等于 4 cm、有 HPV 感染的宫颈癌组织中 miR-146a/133b 呈高表达($P < 0.05$)。结论 miR-146a/133b 参与宫颈癌的发生、发展, 可能成为宫颈癌病情预测及评估新的分子标志物。

[关键词] 宫颈肿瘤; 维吾尔族; miR-146a; miR-133b; 乳头状瘤病毒**[中图分类号]** R737.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)27-3765-03

The expression and clinical significance of miR-146a/133b in Xinjiang women with cervical lesion*

Ma Li¹, Ma Cailing^{1△}, Lu Chang², Chen Yanxia¹

(1. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University/State Key Lab Incubation Base of Xinjiang Major Diseases Research, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

[Abstract] **Objective** To explore the different expression and clinical significance of miR-146a/133b in cervical tissue in uygur and Han women in Xinjiang. **Methods** The relative expression of miR-146a/133b in paraffin embedding tissues of cervicitis, CIN and cervical cancer was detected by the RT-qPCR. And analyzed the clinical significance in the development of cervical cancer. **Results** Compared with cervicitis, the expression of miR-146a/133b increased significantly in CIN and cervical cancer ($P < 0.05$). With the cervical lesion was aggravating, the expression level increased. In cervical cancer tissue, the expression of miR-146a were different between Uygur and Han women ($P < 0.05$). Marriage age < 20 years old, tumor diameter ≥ 4 cm, with HPV infection in cervical cancer tissue, miR-146a/133b had high expression ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-146a/133b are involved in incidence and development of cervical cancer, they may become new prognostic and evaluating molecular markers in cervical cancer.

[Key words] uterine cervical neoplasms; uygur; miR-146a; miR-133b; papilloma virus

宫颈癌是仅次于乳腺癌, 严重威胁着女性健康的恶性肿瘤。新疆维吾尔族妇女宫颈癌的现状是发病率高(459/10万~527/10万), 晚期宫颈癌比例高及病死率高(15.78/10万)^[1-2]。宫颈癌的发生、发展和转归是一个多阶段、多基因参与的复杂过程。miRNA 是约 19~24 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA, 通过诱导降解或抑制靶 mRNA 的翻译, 参与细胞增殖^[3-4]、分化^[5]、肿瘤生长^[6]和转移^[7]等生命活动。本研究旨在探讨 miR-146a/133b 在新疆维、汉妇女宫颈组织中的差异性表达及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 样本取自 2010 年 9 月至 2013 年 9 月新疆医科大学第一附属医院病理科保存的维吾尔族及汉族宫颈石蜡组织共 180 例, 包括宫颈炎(对照)35 例, 宫颈上皮内瘤变(CIN) I 级 31 例, CIN II 级 37 例, CIN III 级 41 例, 宫颈癌 36 例。各组内维吾尔族、汉族年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 试剂与仪器 miRNeasy FFPE Kit(德国 QIAGEN 公

司), 逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR Mix(美国 Thermo 公司), miR-146a, miR-133b 特异 RT 引物、PCR 引物及 U6 PCR 引物(上海生工公司)。核酸蛋白测定仪 Nanodrop 1000(Thermo Scientific, 美国), iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detector System (BIO RAD, 美国), PCR 仪 C1000 Thermal Cycler(BIO RAD, 美国), 凝胶成像仪 Universal Hood II(BIO RAD, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 提取总 RNA 遵循 RNeasy FFPE Kit 说明, 经二甲苯脱蜡、蛋白酶 K 消化组织、DNeasy I 去除 DNA、离心柱吸附 RNA、无 RNA 酶水洗脱, 得到总 RNA。检测 RNA 溶液吸光度, 计算 RNA 浓度和纯度, 1% 琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 完整性。

1.3.2 逆转录反应 逆转录反应体系 20 μ L: 包括总 RNA 200 ng, Buffer 4.0 μ L, dNTP 2.0 μ L, RNase Inhibitor 1.0 μ L, M-MuLV 逆转录酶 1.0 μ L, 逆转录引物 1.0 μ L, 加 Water 至 20.0 μ L。反应条件: 42.0 $^{\circ}$ C 60 min, 70.0 $^{\circ}$ C 5 min, -20.0 $^{\circ}$ C 保存 cDNA。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160278); 新疆重大疾病医学重点实验室开放课题(SKLIB-XJMDR-2012-5)。作者简介: 马丽(1989-), 硕士, 主要从事宫颈恶性肿瘤研究。△ 通讯作者, E-mail: hymcl@sina.com。

表 1 引物序列

目的片段	逆转录引物	正向引物	反向引物
miR-146a	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA ACC C-3'	5'-AGC AGT GAG AAC TGA ATT CCA T-3'	5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
miR-133b	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT AGC TG-3'	5'-CTT TGG TCC CCT TCA ACC A- 3'	5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
U6	Oligo(dT)(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'	5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'

1.3.3 实时荧光定量 PCR 反应 荧光定量 PCR 反应体系 25.0 μL :包括 2 \times SYBR Green I Master mix 12.5 μL ,正向引物 1.0 μL ,反向引物 1.0 μL ,逆转录产物 3.0 μL ,Water 7.5 μL 。反应条件:95.0 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,95.0 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,52.8 $^{\circ}\text{C}$ (miR-146a)/59.2 $^{\circ}\text{C}$ (miR-133b)/60.0 $^{\circ}\text{C}$ (U6) 30 s 40 个循环,55.0~95.0 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 81 个循环。每个标本设 3 个复孔,设阴性对照。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定域值时所经历的循环数即 Ct 值,以 $n=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示 miR-146a/133b 的表达水平,计算 $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{Ct}_{\text{miR-146a/133b}}-\text{Ct}_{\text{U6}})$ 宫颈鳞癌组-(平均 $\text{Ct}_{\text{miR-146a/133b}}$ -平均 Ct_{U6}) 宫颈炎组。见表 1。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。miR-146a/133b 荧光定量结果经对数变换(lnX),采用 $\bar{x}\pm s$ 统计描述,方差齐性采用 t 检验和单因素方差分析计算两组及多组间的表达差异,方差不齐采用 Mann-whitney 检验和 Kruskal-Wallis 检验分析两组及多组间的表达差异。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-146a/133b 在宫颈组织中的表达分析 在宫颈炎、CIN 和宫颈癌 3 组中随宫颈病变的加重,miR-146a/133b 的表达水平逐渐升高,CIN 和宫颈癌组的表达水平显著高于宫颈炎组($P<0.05$)。宫颈癌组中维、汉民族 miR-146a 的表达水平差异有统计学意义($P_{\text{miR-146a}}=0.038, P_{\text{miR-133b}}=0.050$)。见表 2、3。

表 2 miR-146a 实时荧光定量结果分析($\bar{x}\pm s$)

组别	汉族	维吾尔族	t/χ^2	P
宫颈炎	1.892 \pm 1.135	2.248 \pm 1.445	-0.787	0.437
CIN 1	3.623 \pm 1.593	3.373 \pm 1.000	0.454	0.653
CIN 2	3.654 \pm 0.923	3.769 \pm 0.718	-0.381	0.706
CIN 3	3.695 \pm 1.664	3.807 \pm 1.400	-0.229	0.820
宫颈癌	3.937 \pm 1.274	5.248 \pm 1.874	-2.070 ^a	0.038
F/χ^2	6.104	10.738 ^b		
P	<0.001	0.030		

^a:Manny-whitney 检验;^b:Kruskal-Wallis 检验。

2.2 miR-146a/133b 的表达量与宫颈癌临床病理因素的相关性分析 结婚年龄小于 20 岁、产次大于或等于 2 次、肿瘤直径大于或等于 4 cm 的宫颈癌组织中 miR-146a 的表达水平显著高于结婚年龄大于 20 岁、生产 0~1 次、肿瘤直径小于 4 cm 的宫颈癌组织中 miR-146a 表达($P<0.05$)。结婚年龄小于 20

岁、肿瘤直径大于或等于 4 cm 的宫颈癌组织中 miR-133b 的表达水平显著高于结婚年龄大于或等于 20 岁、肿瘤直径小于 4 cm 的宫颈癌组织中 miR-133b 表达($P<0.05$)。有高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染的宫颈癌组织中,miR-146a/133b 的表达水平显著高于无 HPV 感染者。见表 4。

表 3 miR-133b 实时荧光定量结果分析($\bar{x}\pm s$)

组别	汉族	维吾尔族	t/χ^2	P
宫颈炎	2.674 \pm 1.325	2.387 \pm 1.874	0.506	0.616
CIN 1	3.924 \pm 2.064	3.661 \pm 1.022	0.380	0.707
CIN 2	4.051 \pm 1.688	4.352 \pm 0.954	-0.357 ^a	0.721
CIN 3	4.166 \pm 1.379	4.657 \pm 2.050	-0.911	0.368
宫颈癌	4.481 \pm 2.099	6.001 \pm 2.374	-2.028	0.050
F/χ^2	2.556	21.311 ^b		
P	0.043	<0.001		

^a:Manny-whitney 检验;^b:Kruskal-Wallis 检验。

表 4 miR-146a/133b 的表达量与宫颈癌临床特征的相关性分析($\bar{x}\pm s$)

	n	miR-146	miR-133
年龄			
<46 岁	14	4.687 \pm 1.994	5.221 \pm 2.702
\geq 46 岁	22	4.352 \pm 1.447	5.046 \pm 2.093
初潮年龄			
<16 岁	28	4.536 \pm 1.800	5.064 \pm 2.423
\geq 16 岁	8	4.295 \pm 1.121	5.290 \pm 2.016
结婚年龄			
<20 岁	12	5.473 \pm 1.592	6.250 \pm 2.367
\geq 20 岁	24	3.987 \pm 1.490	4.547 \pm 2.110
怀孕次数			
<6 次	32	4.410 \pm 1.708	5.034 \pm 2.357
\geq 6 次	4	5.056 \pm 1.354	5.755 \pm 2.091
生产次数			
0~1 次	14	3.666 \pm 1.675	4.358 \pm 2.231
\geq 2 次	22	5.001 \pm 1.462	5.596 \pm 2.283
肿瘤直径			
<4 cm	23	3.907 \pm 1.550	4.442 \pm 2.153
\geq 4 cm	13	5.499 \pm 1.376	6.304 \pm 2.169

续表 4 miR-146a/133b 的表达量与宫颈癌临床特征的相关性分析($\bar{x} \pm s$)

	n	miR-146	miR-133
病理分级			
高分化	10	5.299±1.608	6.136±2.415
中分化	14	4.702±1.870	5.944±2.010
低分化	12	4.309±1.083	4.798±2.077
病理分类			
鳞癌	33	4.452±1.732	5.140±2.408
腺癌	3	4.814±0.298	4.830±0.846
肌层浸润			
<1/2	10	4.890±1.665	5.903±1.835
≥1/2	26	4.322±1.665	4.811±2.435
淋巴转移			
无	26	4.489±1.811	5.309±2.543
有	10	4.464±1.276	4.609±1.565
宫旁转移			
无	22	4.722±1.537	5.448±1.997
有	14	4.106±1.835	5.591±2.734
血管间隙浸润			
无	24	4.562±1.420	5.294±1.960
有	12	4.323±2.127	4.755±2.963
HPV 感染			
无	5	2.892±1.221	2.892±1.221
有	31	4.739±1.591	5.403±2.234

3 讨 论

miR-146a 基因位于 5 号染色体长臂 3 区 4 带(5q34),其在宫颈癌组织中表达增高,可能起到促进肿瘤细胞生长的作用^[8]。miR-133b 基因位于 6 号染色体短臂 1 区 2 带 2 号次亚带(6p12.2),通过靶向作用于转录因子 Sp1 抑制胃癌细胞的增殖和侵袭^[9];负向调节 CXCR4 促进结肠癌细胞的侵袭和转移^[10]。

本研究发现宫颈病变组织中 miR-146a/133b 的表达量显著高于宫颈炎组,且宫颈癌组中维吾尔族 miR-146a 的表达量显著高于汉族,提示 miR-146a 的表达可能存在民族差异。miR-146a/133b 在结婚年龄、产次方面存在差异表达,过早的性生活,早月经阴道分娩、多次阴道分娩对宫颈的创伤及妊娠对内分泌的改变都是宫颈发生病变的危险因素。有研究提出 miR-146a 在结肠癌组织中表达显著下调,与肿瘤增殖情况相一致,且表达量与患者肿瘤大小密切相关^[11]。肿瘤直径是宫颈癌临床分期的重要指标之一,其直接反应了宫颈病变的严重程度。本研究中 miR-146a/133b 的表达量与肿瘤直径显著相关,但未显示与年龄、初潮年龄、孕次、病理类型、病理分级、肌层浸润深度、淋巴转移、宫旁转移和淋巴血管间隙浸润有关。

持续的高危型 HPV 感染是宫颈癌的危险因素。有报道提出转染 HPV16 E5 基因后 HaCaT 细胞中 miR-146a 的表达显著升高^[12]。另有研究发现 HPV16 E6 使 SiHa 细胞和转染

pEGFP-N1-16E6 的 C33A 细胞中的 miR-92 上调,促进宫颈癌细胞的生长、转移和侵袭^[13]。Zheng 等^[14]发现高危型 HPV E6/E7 与转录因子如 E2F、c-Myc 等的相互作用促进了 miR-NA 的表达。本研究发现 miR-146a 在 HPV 阳性的宫颈癌组织中高表达,与 Gocze 等^[15]的结果一致,由此推测 miR-146a 和 HPV 对宫颈癌的发病起协同作用。

综上所述,在宫颈病变组织中 miR-146a/133b 的表达显著高于宫颈炎组,且随宫颈病变的进展而表达上调,表达水平与结婚年龄、产次、肿瘤直径、是否感染 HPV 相关,miR-146a 的表达可能存在民族差异。miR-146a/133b 可能成为宫颈癌病情预测及评估的新的分子标志物。

参考文献

- [1] 玛依努尔·尼牙孜,李丽,陈凤,等.新疆维吾尔族女性人乳头瘤病毒感染与宫颈癌相关性的流行病学调查[J].临床肿瘤学杂志,2011,16(4):322-325.
- [2] 姜淑清,王涛,士送爱,等.新疆策勒县宫颈癌的流行病学调查研究[J].中国实用妇科与产科杂志,2006,20(5):379-381.
- [3] Viticchiè G, Lena AM, Latina A, et al. MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines[J]. Cell Cycle, 2011, 10(7):1121-1131.
- [4] Shatseva T, Lee DY, Deng Z, et al. MicroRNA miR-199a-3p regulates cell proliferation and survival by targeting caveolin-2[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 16):2826-2836.
- [5] Kawasaki H, Taira K. Retraction: hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells[J]. Nature, 2003, 426(6962):100.
- [6] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7):2257-2261.
- [7] Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(2):202-210.
- [8] Wang X, Tang S, Le SY, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. PLoS One, 2008, 3(7):e2557.
- [9] Qiu T, Zhou X, Wang J, et al. MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer[J]. FEBS Lett, 2014, 588(7):1168-1177.
- [10] Duan FT, Qian F, Fang K, et al. miR-133b, a muscle-specific microRNA, is a novel prognostic marker that participates in the progression of human colorectal cancer via regulation of CXCR4 expression[J]. Mol Cancer, 2013, 12:164.
- [11] 曾长青, 黄良祥, 郑羽, 等. miR-146a 在结肠癌中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(3):396-400.
- [12] Greco D, Kivi N, Qian K, et al. Human (下转第 3771 页)

- [2] Liu L, Wang X, An S, et al. Genetic environment of β -lactamase genes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with lower respiratory tract infection in China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(13):2445-2450.
- [3] Lahlaoui H, Benhaj Khalifa A, Benmoussa M. epidemiology of enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase(ESBL)[J]. *Med Mal Infect*, 2014, 44(9):400-404.
- [4] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[J]. *Clin and Laboratory Standards Institute*, 2013, 129(1):M100-S22.
- [5] 张卓然, 夏梦岩, 倪语星, 等. 微生物耐药的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:240-241.
- [6] Ghafourian S, Bin Sekawi Z, Sadeghifard N, et al. The prevalence of ESBLs producing *klebsiella pneumoniae* isolates in Some major hospitals, Iran[J]. *Open Microbiol J*, 2011, 5:91-95.
- [7] An S, Chen J, Wang Z, et al. Predominant characteristics of CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with lower respiratory tract infection in multiple medical centers in China[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 332(2):137-145.
- [8] Li B, Li M, Qu L, et al. Prevalence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric inpatients with respiratory tract infections at a teaching hospital in China[J]. *Scand J Infect Dis*, 2014, 46(3):200-203.
- [9] Mohamudha Parveen R, Manivannan S, Harish BN, et al. Study of CTX-M type of extended spectrum β -Lactamase among nosocomial isolates of *escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* in South India[J]. *Indian J Microbiol*, 2012, 52(1):35-40.
- [10] Cabral AB, Melo Rde C, Maciel MA, et al. Multidrug resistance genes, including bla(KPC) and bla(CTX)-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2012, 45(5):572-578.
- [11] Chagas TP, Alves RM, Vallim DC, et al. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil[J]. *Braz J Infect Dis*, 2012, 15(5):420-425.
- [12] Shin J, Kim DH, Ko KS. Comparison of CTX-M-14-and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with bacteremia[J]. *J Infect*, 2011, 63(1):39-47.
- [13] Coelho A, González-López JJ, Miró E, et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36(1):73-78.
- [14] Chouchani C, El Salabi A, Marrakchi R, et al. Occurrence of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* harboring chromosomally mediated and plasmid-mediated CTX-M-15 β -lactamase in a Tunisian hospital[J]. *Can J Microbiol*, 2012, 58(9):1099-1103.
- [15] Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, et al. Dissemination of the CTX-M-25 family beta-lactamases among *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and identification of the novel enzyme CTX-M-41 in *Proteus mirabilis* in Israel[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(2):289-295.
- [16] Perez F, Endimiani A, Hujer KM, et al. The continuing challenge of ESBLs[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2007, 7(5):459-469.
- [17] Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, et al. Emergence of *klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2014, 44(3):260-262.
- [18] Novais A, Cantón R, Coque TM, et al. Mutational events in cefotaximase extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(7):2377-2382.

(收稿日期:2015-03-08 修回日期:2015-05-10)

(上接第 3767 页)

- papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e21646.
- [13] Yu Y, Zhang Y, Zhang S. MicroRNA-92 regulates cervical tumorigenesis and its expression is upregulated by human papillomavirus-16 E6 in cervical cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2):468-474.
- [14] Zheng ZM, Wang XH. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses[J]. *Biochim et Biophys Acta*, 2011, 1809(11/12):668-677.
- [15] Gocze K, Gombos K, Juhasz K, et al. Unique microRNA expression profiles in cervical cancer[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(6):2561-2567.

(收稿日期:2015-03-010 修回日期:2015-05-16)