

文章编号:1000-5404(2013)11-1037-06

论著

miR-29 通过 ITGB1 抑制胃癌侵袭、转移的分子机制

何兵^{1*}, 余松涛^{2*}, 吕沐瀚¹, 吴玉云¹, 胡长江¹, 杨仕明¹ (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院消化内科¹; 400038 重庆, 第三军医大学西南医院肿瘤科²)

[摘要] 目的 观察 miR-29 对胃癌细胞体外侵袭力的影响, 探讨 miR-29 通过 ITGB1 调节胃癌侵袭和转移的具体机制。方法 通过基因芯片筛选胃癌与癌旁组织中差异性表达的 miRNA; 采用生物信息学预测 ITGB1 调控相关 miRNA, 通过比对上述 2 个结果, 筛选出 miR-29; 进一步以 miR-29 慢病毒及 miR-29 mimics 过表达 miR-29 后, 用 Western blot 检测胃癌细胞中 ITGB1 的表达变化; 采用双荧光素酶实验分析 miR-29 与 ITGB1 的作用机制; 采用 Transwell 侵袭实验及划痕实验检测 miR-29 慢病毒感染后细胞体外侵袭能力的变化; qRT-PCR 检测 60 例胃癌患者癌组织和癌旁组织中 miR-29 的表达差异, 并分析 miR-29 的表达与肝癌患者临床病理之间的关系。结果 基因芯片及生物信息学预测发现 miR-29 在胃癌组织里高表达, 同时又可能调控 ITGB1; 双荧光素酶实验证实 miR-29 可以结合在 ITGB1 3'UTR, miR-29 慢病毒及 miR-29 mimics 过表达 miR-29 都能在蛋白水平下调 ITGB1; qRT-PCR 结果显示 miR-29 家族 3 条 miRNA 在胃癌组织中的相对含量均低于癌旁组织[miR-29a: 癌旁 (32.01 ± 10.38), 癌 (14.16 ± 6.25); miR-29b: 癌旁 (26.95 ± 5.05), 癌 (9.82 ± 1.86); miR-29c: 癌旁 (53.56 ± 8.05), 癌 (16.79 ± 1.97), $P < 0.01$]; 进一步统计学分析表明, miR-29a 与淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), miR-29b 在具有远处转移的病例组织中 C/P 比值较无远处转移的病例组织明显降低 ($P < 0.05$)。结论 miR-29 可以在转录后水平调控 ITGB1 的表达, 从而抑制胃癌细胞的侵袭和转移。

[关键词] ITGB1; miR-29; 胃肿瘤; 肿瘤转移

[中图分类号] R394.33; R394.3; R735.2

[文献标志码] A

miR-29 functions as an anti-metastatic microRNA in gastric adenocarcinoma by targeting ITGB1

He Bing^{1*}, Yu Songtao^{2*}, Lyu Muhan¹, Wu Yuyun¹, Hu Changjiang¹, Yang Shiming¹ (¹Institute of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; ²Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the underlying molecular mechanisms of miR-29 regulating ITGB1 in the invasion and migration of gastric adenocarcinoma. **Methods** MicroRNA array was used to screen out miRNAs which were expressed with significant differences in gastric cancer and paracancer tissue. Bioinformatics was employed to predict the miRNAs related to ITGB1 regulation. Gastric cancer cells were infected by lentiviral vectors or transfected with miR-29 mimics to over-express miR-29. Western blotting was used to detect the changes of ITGB1 in gastric cancer cells. Dual luciferase assay was adopted to analyze the mechanism of miR-29 regulating ITGB1. Transwell invasion assay was accomplished to analyze cell invasion ability. The quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was adopted to detect the expression differences of miR-29 in 60 pairs of gastric cancer tissue and adjacent noncancerous tissues. The relationship between the expression and clinical pathological data was analyzed. **Results** MicroRNA array and bioinformatics prediction results supported that miR-29 was in a low expression in gastric carcinoma, and regulated ITGB1. Dual luciferase assay confirmed that miR-29 was bond to the 3' UTR of ITGB1. Western blotting suggested that ITGB1 was down-regulated as miR-29 over-expression. The results of qRT-PCR suggested that the relative expression of miR-29 in gastric cancer tissues was lower than in the adjacent noncancerous tissues

[基金项目] 国家自然科学基金(30900679)

* 同等贡献者

[通信作者] 杨仕明, E-mail: shimingyang@yahoo.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130326.0907.003.html>(2013-03-26)

(miR-29a: 14.16 ± 6.25 vs 32.01 ± 10.38 ; miR-29b: 9.82 ± 1.86 vs 26.95 ± 5.05 ; miR-29c: 16.79 ± 1.97 vs 53.56 ± 8.05 , $P < 0.01$). Statistical analysis showed that the expression of miR-29a was closely related with lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression ratio of miR-29b in gastric cancer tissues to adjacent noncancerous tissues was significantly lower in the tissue with distant metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-29 regulates ITGB1 expression at post-transcriptional level, and then suppresses the invasion and metastasis of gastric adenocarcinoma.

[Key words] ITGB1; miR-29; gastric cancer; metastasis

Supported by the National Science Foundation of China (30900679). He Bing and Yu Songtao are the first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Yang Shiming, E-mail: shimingyang@yahoo.com

胃癌是全世界最常见的消化道恶性肿瘤之一,胃癌患者的5年生存率低下,复发率高。外科手术是目前治疗胃癌的主要手段,但是手术不能解决胃癌转移及术后复发的的问题。胃癌的侵袭和转移是一个复杂的主动过程,细胞粘附是肿瘤转移的重要环节之一,而癌细胞表面的粘附分子受体在肿瘤细胞迁移、浸润和转移中发挥重要作用。整合素是一类重要粘附分子,尤其是整合素 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$, ITGB1)在肿瘤细胞的侵袭和转移过程中起到了重要作用。ITGB1可以促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的分泌和活化,降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[1],使肿瘤细胞同质粘附下降,从而促使肿瘤细胞易于从瘤体上脱落^[2],并使肿瘤细胞异质性粘附增强,通过介导细胞与细胞或细胞与细胞基质之间的粘附,导致肿瘤与周围组织的粘附^[3]。

虽然ITGB1在胃癌的侵袭和转移过程中起到重要作用,但是在胃癌细胞中调节ITGB1的分泌机制还不清楚。近年来研究发现的一种内源性、单链、非编码的小RNA分子,即微小RNA(microRNA, miRNA),通过负性调控靶基因的表达,在多种疾病生理及病理过程中起着重要的作用。一些miRNA被证实与肿瘤的发生、发展及转移密切相关^[4],如miR-9可以促进乳腺癌的转移,肺癌中let-7的表达显著减少^[5]。最近文献报道miR-124可以结合到ITGB1的3'UTR,从而抑制口腔鳞状细胞癌的侵袭能力,miR-183通过抑制ITGB1的表达,抑制HeLa细胞的侵袭、转移^[6-7]。但是在胃癌细胞中ITGB1是如何被调控的还不清楚。我们推测还有其他miRNA参与ITGB1转录后调控。因此,我们通过基因芯片检测胃癌组织以及癌旁组织miRNA的差异,结合生物信息学预测结果,初步筛选到miR-29是可能调控ITGB1的同时又在胃癌组织里低表达的miRNA。在此基础上,本研究探讨miR-29在胃癌组织和对应的癌旁正常胃黏膜组织中的表达差异及其与临床病理特征的关系,miR-29对ITGB1的表达调控及其对胃癌细胞生物学特性的影响,以期研究胃癌转移

机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 主要材料

3株胃腺癌细胞BGC-823、MKN-28、SGC-7901均为本实验室保存。60例胃癌标本来源于2011年4-12月在第三军医大学西南医院普外科住院的胃癌患者。患者中男性38例,女性22例,平均年龄54.9岁,所有患者签署了知情同意书并经病理诊断为胃癌,均为首诊、首治,入选前未行放疗化疗,所有病例分别取癌组织(C组)和癌旁组织(P组,距癌组织距离 > 5 cm),保存方法参照文献^[8],胃癌分期采用TNM分期。

1.2 试剂与仪器

miR-29慢病毒(上海吉凯基因化学有限公司),miR-29 mimics(广州市锐博生物科技有限公司),Trizol、逆转录试剂盒及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒(TaKaRa公司,日本),miR-29及U6特异RT及PCR引物(广州市锐博生物科技有限公司),双荧光素酶试剂盒(Promega公司,美国),DMEM高糖培养基与胎牛血清(HyClone公司,美国), $8 \mu\text{m}$ 带基质胶Transwell小室(Corning公司,美国),miR-29慢病毒(LV-miR-29)及对照(LV-NC,上海吉凯公司)。

1.3 细胞培养

人胃腺癌BGC-823、MKN-28、SGC-7901细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液,于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养,2~3 d传代。

1.4 qRT-PCR检测

用Trizol提取细胞或组织总RNA,以其为模板,逆转录成cDNA,再按照qRT-PCR试剂盒(DRR037A)SYBR Green法步骤进行PCR扩增,qRT-PCR扩增程序: 95°C 预变性30 s, 95°C 变性10 s, 55°C 退火45 s,以U6作为内参,扩增40个循环周期,每个标本3个复孔。

1.5 Western blot检测

用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓度,经5%的浓缩胶和8%的分离胶SDS-PAGE电泳,每孔上样量为 $40 \mu\text{g}$ 总蛋白。浓缩胶60 V电泳1 h,分离胶100 V电泳2 h,常规湿法转膜90 min,5%的脱脂奶粉封闭2 h,免疫抗体反应(稀释比例,一抗ITGB1 1:1 000, β -actin 1:500, GAPDH 1:1 000;二抗:山羊抗鼠1:5 000,山羊抗兔1:7 000)。ECL化学发光,凝胶成像系统显影。

1.6 双荧光素酶实验

委托艾晶公司构建重组 pMIR-Report-ITGB1 3'UTR 质粒后,用 Spe I 和 Hind III 进行双酶切电泳鉴定。将萤火虫荧光素酶报告质粒 pMIR-Report 及海肾荧光素酶报告质粒 pRL-TK 转染 HEK293 后,将 ITGB1 的 3'UTR 序列克隆至 pMIR-Report 的 MCS 位点,转染 miRNA mimics 前体 RNA 序列及阴性对照后,检测萤火虫荧光素酶的活性。ITGB1 3'UTR 序列上 miR-29 结合位点的突变设计为:AUUUUGUUAAUGUCUGGUGCUU 突变成 AUUUUUGUUAAUGUCAUCACGUU(下划线代表突变部分),突变后,以 pMIR-Report-ITGB1 3'UTR 为对照,再次进行双荧光素酶检测。

1.7 Transwell 体外侵袭实验

采用 Coning 公司 8 μm 规格带基质胶的 Transwell 小室,以含 10% 胎牛血清的培养基作为趋化剂,Transwell 小室的下室中加 500 μL 趋化剂,上室中加入 100 μL 无血清培养基[含细胞(2.0~3.0) × 10⁵个],放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养 48 h 后,用棉签刮除上室底部基质胶,用 PBS 漂洗上表面 3 次,-20 °C 预冷的 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,PBS 洗涤 3 次,取出小室风干,然后用 0.1% 结晶紫染色 30 min。每组在显微镜下随机选取 3 个视野并计数细胞。每组重复 3 次。

1.8 划痕实验

将各组细胞接种于 6 孔培养板,每组设 3 个复孔,待生长至 100% 融合,用 10 μL 无菌移液器枪头沿培养板底部呈“1”字形划痕,用 PBS 洗掉脱落细胞,倒置显微镜下记录划痕区相对距离,然后放入培养箱培养 48 h,每隔 12 h 显微镜下观察划痕修复情况 1 次,实验重复 3 次。

1.9 miRNA 芯片分析

将胃癌及对应的癌旁正常组织送上海康成生物公司做 microRNA 基因芯片分析,检测 2 种组织 miRNA 表达差异。

1.10 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验或非参数秩和检验,多组间比较采用单因素方差分析,数据均在 SPSS 13.0 统计软件中进行分析。

2 结果

2.1 miRNA 芯片分析筛选胃癌与癌旁表达差异的 miRNA

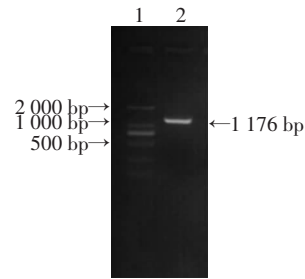
miRNA 芯片分析结果显示,有 475 条 miRNA 在胃癌与对应癌旁组织中表达具有明显差异。

2.2 TargetScan 和 MiRanda 预测可能调控 ITGB1 的靶基因 miRNA

进一步采用生物信息学技术对 ITGB1 调控 miRNA 进行预测,并与基因芯片的结果进行对比分析,发现 miR-29 是可能调控 ITGB1 的同时又在胃癌组织里低表达的 miRNA。

2.3 双荧光素酶及 Western blot 验证 miR-29 直接靶向 ITGB1 的 3'UTR

2.3.1 双荧光素酶实验 进一步进行 DNA 测序,证实 ITGB1 3'UTR 片段成功插入 pMIR-report 的多克隆位点。见图 1。



1:DNA 标准;2:pMIR-Report-ITGB1 3'UTR

图1 Spe I 和 Hind III 双酶切鉴定 pMIR-Report-ITGB1 3'UTR 质粒

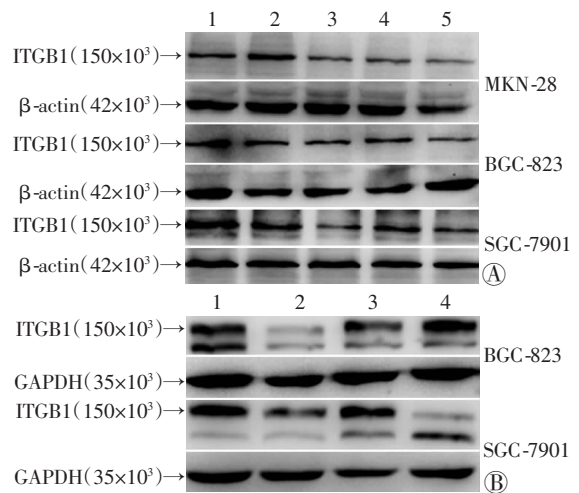
转染 miR-29a、miR-29b、miR-29c mimics 后,均能显著下调萤火虫荧光素酶的表达($P < 0.01$)。为进一步确认 miR-29 调控 ITGB1 是通过结合于 ITGB1 3'UTR 相应核苷酸的结合位点而发挥对 ITGB1 蛋白的抑制作用,我们进一步进行了双荧光素酶突变实验。突变 pMIR-Report-ITGB1 3'UTR 上 miR-29 的结合位点后,以 pMIR-Report-ITGB1 3'UTR 为对照,再次进行双荧光素酶检测,结果显示,miR-29 家族 3 条 miRNA 对萤火虫荧光素酶的抑制能力均显著减弱($P < 0.01$)。见表 1。

表1 双荧光素酶实验检测 miR-29 对 ITGB1 3'UTR 突变前后活性的影响($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	3'UTR 突变前	3'UTR 突变后
阴性对照	197.54 ± 8.96	227.07 ± 1.03
miR-29a	102.30 ± 8.04 ^b	193.72 ± 5.65 ^a
miR-29b	91.34 ± 9.67 ^b	212.62 ± 15.18 ^a
miR-29c	92.51 ± 8.51 ^b	173.96 ± 8.82 ^a

a: $P < 0.01$, 与 3'UTR 突变前比较;b: $P < 0.01$, 与阴性对照比较

2.3.2 Western blot 检测 采用 miR-29 mimics 分别转染 3 株胃癌细胞,过表达 miR-29 后,ITGB1 在 3 株胃癌细胞的表达水平均明显降低,用 miR-29 慢病毒过表达 miR-29 后得到相似的结果。见图 2。



A: miR-29 mimics 过表达 miR-29 1: 空白对照;2: 阴性对照;3: miR-29a;4: miR-29b;5: miR-29c; B: miR-29 慢病毒过表达 miR-29 1: LV-NC;2: miR-29a;3: miR-29b;4: miR-29c

图2 Western blot 检测在不同胃癌细胞中 miR-29 mimics 及 miR-29 慢病毒过表达 miR-29 对 ITGB1 蛋白表达水平的影响

2.4 miR-29 对胃癌细胞体外侵袭能力的影响

LV-miR-29 感染 BGC-823 细胞后,Transwell 侵袭实验结果显示:与感染空载慢病毒相比,miR-29a、miR-29b、miR-29c 感染后均能降低胃癌细胞的穿膜能力(图 3)。体外划痕实验结果表明,LV-miR-29 感染的 BGC-823 细胞的迁移能力明显低于感染空载慢病毒(图 4)。

2.5 60 例胃癌与癌旁标本 miR-29 表达水平及其与临床病理特征的关系

收集 60 例胃癌、癌旁组织标本,采用 qRT-PCR 检测胃癌及癌旁组织中 miR-29 家族的 3 条 miRNA 的表达水平。采用 SGC-7901 细胞中 miR-29 表达水平作为校正。qRT-PCR 检测结果显示 miR-29 家族 3 条 miRNA 在胃癌组织中的相对含量均低于癌旁组织[miR-29a:癌旁(32.01 ± 10.38),癌(14.16 ± 6.25);miR-29b:癌旁(26.95 ± 5.05),癌(9.82 ± 1.86);miR-29c:癌旁(53.56 ± 8.05),癌(16.79 ± 1.97), $P < 0.01$]。进一步分析 miR-29 在胃癌和对应癌旁组织中相对表达含量的比值(C/P)与性别、年龄、淋巴结转移、远处转移、TMN 分期、肿瘤直径、浸润深度、分化程度的关系(表 2),结果显示 miR-29a 在有淋巴结转移的病例组织中 C/P 比值较无淋巴结转移的病例组织明显降低($P < 0.05$);miR-29b 在有远处转移的病例组织中 C/P 比值较无远处转移的病例组织明显降低($P < 0.05$);miR-29c 也可能与肿瘤的远处转移有关,但差异无统计学意义($P = 0.148$)。

表 2 miR-29 在胃癌和癌旁组织中 C/P 比值与临床病理特征的关系

临床病理参数	miR-29a		miR-29b		miR-29c	
	C/P	P 值	C/P	P 值	C/P	P 值
性别		0.721		0.115		0.145
男	0.99 ± 0.40		0.37 ± 0.047		0.40 ± 0.06	
女	0.70 ± 0.14		0.93 ± 0.35		0.54 ± 0.08	
年龄(岁)		0.693		0.429		0.456
≥60	0.99 ± 0.37		0.74 ± 0.35		0.41 ± 0.08	
<60	0.66 ± 0.16		0.49 ± 0.06		0.48 ± 0.06	
淋巴结转移		<0.01		0.404		0.552
有	0.60 ± 0.07		0.67 ± 0.20		0.47 ± 0.06	
无	1.40 ± 0.09		0.41 ± 0.08		0.41 ± 0.08	
远处转移		0.949		0.019		0.148
有	0.89 ± 0.24		0.43 ± 0.05		0.41 ± 0.05	
无	0.87 ± 0.31		1.16 ± 0.59		0.58 ± 0.10	
TMN 分期		0.965		0.345		0.278
I/II	1.20 ± 0.65		0.39 ± 0.07		0.49 ± 0.06	
III/IV	0.69 ± 0.11		0.68 ± 0.20		0.38 ± 0.06	
肿瘤直径(cm)		0.180		0.197		0.814
<5	1.06 ± 0.38		0.68 ± 0.20		0.46 ± 0.05	
≥5	0.58 ± 0.14		0.40 ± 0.08		0.43 ± 0.09	
浸润深度		0.898		0.681		0.357
未穿透浆膜	0.97 ± 0.40		0.46 ± 0.06		0.50 ± 0.08	
穿透浆膜	0.74 ± 0.17		0.74 ± 0.29		0.41 ± 0.05	
分化程度		0.741		0.141		0.720
低分化	0.96 ± 0.30		0.46 ± 0.06		0.44 ± 0.06	
中、高分化	0.55 ± 0.07		0.91 ± 0.47		0.47 ± 0.07	

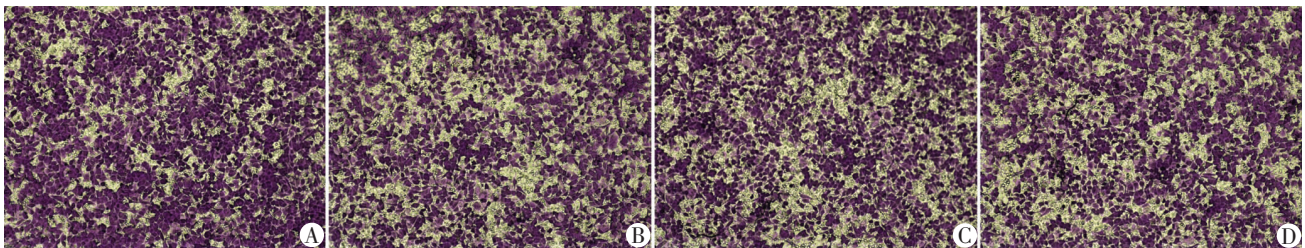


图 3 Transwell 侵袭实验检测 miR-29 慢病毒对 BGC-823 细胞穿膜能力的影响 (结晶紫 × 100)

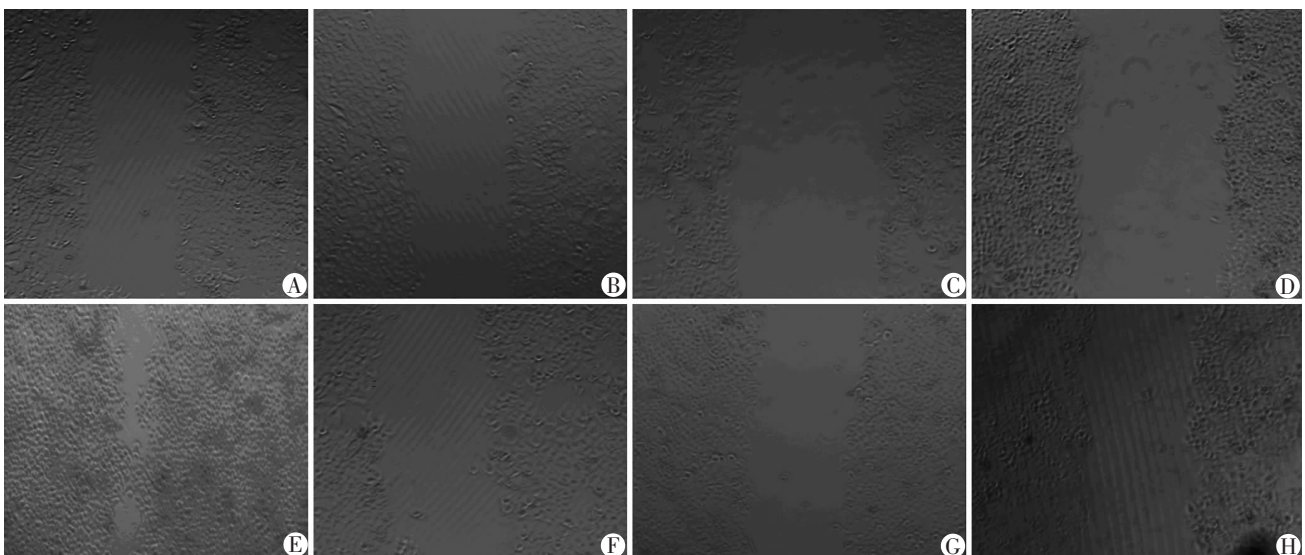


图 4 体外划痕实验鉴定感染 miR-29 慢病毒对 BGC-823 细胞迁移能力的影响 (倒置显微镜 × 100)

3 讨论

肿瘤细胞侵袭、转移过程极其复杂,肿瘤细胞与ECM发生粘附是肿瘤侵袭、转移的第1步^[9]。ITGB1是细胞粘附分子家族中比较重要的一类分子,是介导细胞和ECM相互作用的主要受体,它在恶性肿瘤的发生、发展中异常表达^[10-11],并可以介导肿瘤细胞与ECM或基底膜的粘附作用增强,并促进基质金属蛋白酶(MMPs)的分泌和活化,降解ECM,使癌细胞实现远处转移^[1]。汪雷等^[12]通过免疫组化实验发现ITGB1阳性表达率在胃癌组织中明显高于胃炎组织,并且ITGB1的表达与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和临床分期密切相关。但是ITGB1在胃癌细胞中是如何被调控以及ITGB1与其他癌基因(如c-myc、hTERT)的联系目前还不清楚。

越来越多的miRNA被证实与人类肿瘤的侵袭、转移关系密切,在肿瘤发生过程中起着癌基因或抑癌基因的作用^[13]。文献[14-15]报道miR-29可以广泛抑制纤维蛋白酶原及调控ECM相关基因的表达,从而在抑制肝硬化等疾病的进程中起到重要作用,而纤维蛋白酶原与肿瘤细胞和ECM发生粘附密切相关,提示miR-29可能在抑制肿瘤细胞的侵袭、转移中起关键作用。我们基因芯片结果提示胃癌组织中miR-29低表达,qRT-PCR结果也表明miR-29在胃癌组织中表达水平明显低于癌旁组织,提示miR-29在胃癌中可能是一种抑癌基因。进一步分析miR-29在病例组织中的C/P比值与性别、年龄、淋巴结转移、远处转移、TMN分期、肿瘤直径、浸润深度、分化程度的关系,我们发现miR-29a的表达与淋巴结转移有关,miR-29a在有淋巴结转移的病例组织中C/P比值较无淋巴结转移的病例组织明显降低;miR-29b在具有远处转移的病例组织中C/P比值较无远处转移的病例组织明显降低;miR-29c也可能与肿瘤的远处转移有联系,但差异无统计学意义,可能与样本量的大小及临床患者异质性有关。我们又采用生物信息学网站预测miR-29可能调控ITGB1。因此,在胃癌细胞中miR-29与ITGB1的表达呈负相关趋势,并且功能联系紧密。双荧光素酶实验证明,miR-29调控ITGB1是通过结合在ITGB1 3'UTR而发挥抑制ITGB1表达的作用。我们通过miR-29 mimics过表达胃癌细胞中miR-29,能显著降低ITGB1的蛋白表达水平。采用miR-29慢病毒感染胃癌细胞,过表达miR-29,ITGB1表达也能明显下降,进一步表明miR-29能够调控ITGB1的表达。功能

学实验证明感染了miR-29慢病毒后胃癌细胞的体外侵袭能力减弱,提示miR-29作为一种抑癌基因在胃癌细胞中可能通过ITGB1抑制肿瘤的侵袭与转移。

文献[16]报道,重要的癌基因c-myc、hTERT可以通过多种miRNA调控肿瘤的增殖、转移。Chang等^[17]发现c-myc可以通过作用于miR-29的启动子区域,调控miR-29的表达,而本实验证实miR-29通过与ITGB1 3'UTR结合,抑制ITGB1的表达,从而调控胃癌侵袭、转移。由此,我们推论miR-29可能在ITGB1与癌基因c-myc、hTERT的联系网络中起重要作用。本研究报告了miR-29的高表达可能抑制胃癌的转移及其可能机制,有望为治疗胃癌转移,改善胃癌患者预后提供理论依据。

参考文献:

- [1] Mori H, Lo A T, Inman J L, *et al.* Transmembrane/cytoplasmic, rather than catalytic, domains of Mmp14 signal to MAPK activation and mammary branching morphogenesis *via* binding to integrin β 1 [J]. *Development*, 2013, 140(2): 343-352.
- [2] Ke J J, Shao Q S, Ling Z Q. Expression of E-selectin, integrin beta1 and immunoglobulin superfamily member in human gastric carcinoma cells and its clinicopathologic significance [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(22): 3609-3611.
- [3] Cockburn J G, Richardson D S, Gujral T S, *et al.* RET-mediated cell adhesion and migration require multiple integrin subunits [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(11): E342-E346.
- [4] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [5] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, *et al.* Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-3756.
- [6] Hunt S, Jones A V, Hinsley E E, *et al.* MicroRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1 [J]. *FEBS letters*, 2011, 585(1): 187-192.
- [7] Li G, Luna C, Qiu J, *et al.* Targeting of integrin beta 1 and kinesin 2 alpha by microRNA 183 [J]. *J Biol Chem*. 2010, 285(8): 5461-5471.
- [8] 曹亚玲, 陈陵, 吕沐瀚, 等. miR-149-5p在肝细胞癌中的表达及其临床意义 [J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(7): 628-631.
- [9] Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, *et al.* A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1032-1046.
- [10] Zhao Z S, Li L, Wang H J, *et al.* Expression and prognostic significance of CEACAM6, ITGB1, and CYR61 in peripheral blood of patients with gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 104(5): 525-529.
- [11] Van-den-Broeck A, Vankelecom H, Van-Eijsden R, *et al.* Molecular markers associated with outcome and metastasis in human pancreatic

cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31: 68.

[12] 汪雷, 刘弋. 整合素 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 在胃癌及癌前病变组织的表达及临床意义[J]. *安徽医药*, 2011, 15(9): 1109-1111.

[13] Zhao X, Dou W, He L, et al. MicroRNA-7 functions as an anti-metastatic microRNA in gastric cancer by targeting insulin-like growth factor-1 receptor[J]. *Oncogene*, 2012, 32(11): 1363-1372.

[14] Liu Y, Taylor N E, Lu L, et al. Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats miR-29b regulates several collagens and related genes[J]. *Hypertension*, 2010, 55(4): 974-982.

[15] Roderburg C, Urban G W, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling

reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1): 209-218.

[16] Ma L, Young J, Prabhala H, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(3): 247-256.

[17] Chang T C, Yu D, Lee Y S, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(1): 43-50.

(收稿:2013-02-27;修回:2013-03-22)

(编辑 王红)

经验交流

文章编号:1000-5404(2013)11-1042-01

建立云南地区 11~13⁺⁶周胎儿颈项透明层厚度正常中位数值临床意义

章锦曼^{1*}, 黄 芩^{2*}, 朱宝生¹, 苏 洁¹, 陈 姝¹, 黎冬梅¹, 银益飞¹, 朱 姝¹ (650032 昆明, 云南省第一人民医院遗传诊断中心¹; 650031 昆明, 昆明医科大学教务处²)

[关键词] 颈项透明层; 唐氏综合征; 一站式产前筛查

[中图分类号] R714.51 [文献标志码] B

1992年 Nicolaidis 等^[1]首次提出胎儿颈项透明层这一概念。随颈项透明层厚度(nuchal translucency thickness, NT)增加, 胎儿患唐氏综合征(Down's syndrome, DS)的风险增加^[2]。早孕期血清学产前筛查增加 NT 测量值联合评估胎儿患 DS 风险, 可在设定假阳性率为 5% 时, 将 DS 检出率由 62% 提高到 96%, 因此 NT 测量具有重要的临床意义。11~13⁺⁶周胎儿 NT 值随孕周稍有增加趋势, 不同孕周有不同的正常中位数值。本研究根据我院随访受孕孕妇妊娠结局, 统计了云南地区 11~13⁺⁶周胎儿 NT 正常中位数值, 分析其临床应用价值。

1 资料与方法

研究对象: 选取 2007 年 4 月至 2011 年 10 月到云南省第一人民医院就诊的 1 796 例单胎妊娠孕妇, 体质量 40~96(54.8±8.2)kg, 年龄 17.9~42.7(30.3±4.4)岁。年龄 >35 岁的孕妇占 14.98%(269/1 796)。

研究方法: ①孕 8~13⁺⁶周孕妇知情选择后接受早孕期血清学产前筛查, 孕 11~13⁺⁶周孕妇接受早孕期胎儿超声筛查。②血清学筛查: 3 mL 空腹静脉血低速离心, 分离血清送检。采用芬兰 WALLAC 公司 DELFIA 产前筛查系统, Lifecycle 3.01 T-Risks 风险率计算软件, 得出 DS、18-三体综合征(Edwards syndrome, ES)的相对风险率。③妊娠早期超声筛查: 按英国胎儿医学基金会 11~13⁺⁶周胎儿超声扫查规范, 对头臀长 45~

84 mm 胎儿行 NT、鼻骨、颌面角度、胎心率及三尖瓣血流、静脉导管血流频谱、胎儿身体结构畸形筛查。④早孕期一站式产前筛查风险评估: 将胎儿 NT 测量值加入后到实验室再次评估胎儿为 DS、ES 的风险值, 其风险临界值分别为 1:270 和 1:350。高风险孕妇知情选择绒毛穿刺或羊水穿刺产前诊断。⑤质量控制: 早孕血清学产前筛查参与每年 1 次的中国卫生部室间质评, 每次实验均有室内质控。超声医师每年接受 1 次英国胎儿医学基金会资质审核。

统计学方法: 采用 SPSS 11.5 统计软件中的频数分布、线性回归分析结果。

2 结果

2.1 本地 NT 正常中位数值建立及 NT 与妊娠天数的相关性

1 796 例早孕期一站式产前筛查病例中, 选择了 1 000 例正常妊娠结局的孕妇资料计算本地胎儿 NT 正常中位数值。11~11⁺⁶周 269 例、12~12⁺⁶周 428 例、13~13⁺⁶周 303 例, 以 NT 实测值作为非独立因素, 妊娠天数、孕妇体质量和年龄作为独立因素, 进行线性回归分析, 仅妊娠天数进入方程, 妊娠天数与 NT 值关系的回归方程为 NT = 0.60 + 0.012 × 妊娠天数 ($R^2 = 0.05$)。11~13⁺⁶周 NT 厚度随妊娠天数增加而稍有增加。计算 11~11⁺⁶、12~12⁺⁶、13~13⁺⁶周胎儿 NT 正常中位数值分别为 1.5、1.6、1.8 mm。

2.2 本地 NT 正常中位数计算的 NT 中位数倍数 (MoM) 与 Lifecycle 软件中内嵌正常中位数值计算得出的 NT MoM 值比较

2 组数据差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 本地 NT 正常中位数计算的 NT MoM 较 Lifecycle 软件内嵌正常中位数值计算的 NT MoM 稍低 ($R^2 = 0.19$)。

(下转 1047 页)

[基金项目] 云南省卫生厅科技项目(2010NS003); 云南省应用基础研究-昆明医学院联合专项(2011FB222); 云南省应用基础研究(2011FA030)

* 同等贡献者

[通信作者] 朱 姝, E-mail: zhuzhu_ynkm@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130510.0950.001.html> (2013-05-10)