

• 临床论著 •

MicroRNA-1 和 PIK3CA 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

赵球 顾永娟 陈亮 章斌 刘翠萍 郭人花

【摘要】 目的 本研究旨在探讨 miR-1 和 PIK3CA 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达及其临床意义。方法 利用 RT-qPCR 法检测 55 例 NSCLC 组织及其癌旁正常组织中 miR-1 和 PIK3CA 的表达,并用 Western-blot 法检测 NSCLC 组织及其正常组织中 PI3K 蛋白的表达变化。结果 miR-1 在 NSCLC 原发灶中的表达明显低于在癌旁和正常组织中的表达($P=0.0122$),PIK3CA 在 NSCLC 原发灶和癌旁组织中的表达都明显高于在正常组织中的表达($P=0.0446, P<0.0001$),且 PIK3CA 在原发灶中的表达明显高于在癌旁组织中的表达($P=0.0029$);miR-1 和 PIK3CA 在术后 1 年内发生/不发生转移癌组织中的表达差异具有统计学意义($P=0.0369, P=0.0061$);PIK3CA 的表达与 NSCLC 组织学类型相关($P=0.0200$),但 miR-1 和 PIK3CA 的表达与患者的年龄、性别、肿瘤的大小及分化程度无明显相关关系($P>0.05$),miR-1 的表达与 PIK3CA 的表达成负相关($r=-0.7096, P<0.05$)。结论 miR-1 的低表达和 PIK3CA 的高表达可能和 NSCLC 的发生及侵袭转移有关,且 miR-1 和 PIK3CA 在 NSCLC 转移过程中相互抑制,可能成为 NSCLC 治疗的新的潜在靶点。

【关键词】 癌,非小细胞肺; 微 RNAs; 肿瘤转移; PIK3CA

Expression and clinical significance of miR-1 and PIK3CA in NSCLC ZHAO Qiu, GU Yong-juan, CHEN Liang, ZHANG Bin, LIU Cui-ping, GUO Ren-hua. Department of Medical Oncology, The People's Hospital of Jiangsu Province, Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: GUO Ren-hua, Email: rhguo@njmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the expression of miR-1 and PIK3CA in NSCLC, and the relationship between miR-1 and PIK3CA expression and clinical pathology of NSCLC. **Methods** The expression of miR-1 and PIK3CA was detected in 55 NSCLC tissues, adjacent cancer tissues and normal tissues by RT-PCR. The expression level of PI3K protein was detected by Western-blot. The correlation between miR-1 and PIK3CA expression was analyzed. **Results** miR-1 expression in cancer tissues was significantly lower than that in adjacent cancer tissues and normal tissues ($P=0.0122$). The expression of PIK3CA in cancer tissues and adjacent cancer tissue was significantly higher than that in normal tissues ($P=0.0446, P<0.0001$), and the positive rate of PIK3CA expression in cancer tissues was significantly higher than that in adjacent cancer tissues ($P=0.0029$). miR-1 and PIK3CA expression in patients with postoperative metastasis within one year was significantly different from patients without postoperative metastasis ($P=0.0369, P=0.0061$ respectively). PIK3CA expression had remarkable correlation with squamous cell carcinoma ($P=0.0200$), but miR-1 and PIK3CA expression had no remarkable correlation with age, sex, tumour size and differentiation ($P>0.05$). miR-1 and PIK3CA expression in NSCLC was negatively correlated ($r=-0.7096, P<0.05$). **Conclusion** The deficiency of miR-1 and PIK3CA expression is positively correlated with carcinogenesis and metastasis of NSCLC. miR-1 and PIK3CA may become a new potential targets for NSCLC treatment.

【Key words】 Carcinoma, non-small-cell lung; MicroRNAs; Neoplasm metastasis; PIK3CA

microRNA 或 miRNA 是指长度约 21~25 nt 的某些特殊的小型非编码 RNA,这些 miRNA 能够识别特定的

目标 mRNA 并在转录后水平通过促进靶 mRNA 的降解和(或)抑制翻译过程而发挥调控基因表达的作用^[1]。微 RNA 参与多种生物学过程,包括细胞的增殖、分化、凋亡、激素的分泌、肿瘤的发生发展及耐药^[2-4]。实验证明人类约 30% 的基因受到微 RNA 的调控,微 RNA 在肿瘤的发生发展过程中起到致癌基因或抑癌基因的作用^[5-7]。microRNA-1(miR-1)特异性表达于心肌与骨骼肌,能够抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[8-9],目前,关

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.08.094

基金项目:国家自然科学基金(81172217);江苏省兴卫工程重点人才基金(RC201157)

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院肿瘤科(赵球、顾永娟、郭人花),心胸外科(陈亮、章斌),组织库(刘翠萍)

通讯作者:郭人花,Email:rhguo@njmu.edu.cn

于 miR-1 在肺癌中的作用机制研究较少,新近的研究表明,miR-1 在肺癌细胞中的表达较低,转染 miR-1 后能够逆转肺癌细胞 A549 和 H1299 的致瘤特性(包括生长、复制、迁移及肿瘤形成等),相反 miRNA-1 缺失会导致肿瘤细胞生长,提示 miR-1 在肺癌的发生、发展过程中发挥重要的抑癌基因的作用^[10-11]。但是,目前尚未阐明 miR-1 在 NSCLC 发病及预后中的作用机制。PIK3CA 癌基因编码 PI3K 的 P110 催化亚单位,激酶活性增强,能持续刺激下游 Akt,此信号通路在 NSCLC 发展的早期阶段起到非常重要的作用^[12]。本试验旨在研究 miR-1 和 PIK3CA 与 NSCLC 发生发展以及浸润转移的关系,以期为 NSCLC 的预后判断及靶向治疗等提供科学资料。

资料与方法

一、一般资料

收集南京医科大学第一附属医院心胸外科 2010 年 1 月至 2012 年 2 月行手术治疗的 NSCLC 病例 55 例,每例包括肿瘤原发灶组织、癌旁组织和正常组织,癌旁组织距离原发灶组织 2 cm,正常组织距离原发灶组织 5 cm。55 例中男 38 例,女 17 例;鳞状细胞癌 16 例,腺癌 39 例;伴淋巴结转移 20 例;肿瘤分级为 I 级 12 例,II/III 级 43 例;术后 pTNM 分期 I/II 期、III/IV 期分别为 40 例和 15 例;术后 1 年内出现转移 11 例。所有患者术前均未接受任何化疗或放疗治疗。

二、试剂

Trizol 总 RNA 提取试剂盒购自美国普飞生物公司;TaKaRa RNA 反转试剂盒、SYBR 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;Taqman miR-1 探针试剂盒购自美国 ABI 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天公司;兔抗 PI3K 多克隆抗体购自美国 Abgent 公司;二抗 HRP 标记的抗兔 IgG 购自上海 MR Biotech 公司。上游引物:5'-CCACGACCATCATCAGGTGAA-3',下游引物:5'-CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT-3'(PIK3CA),所有引物均由上海英俊生物工程有限公司提供。

三、RT-PCR 试验检测 miRNA-1 和 PIK3CA 的表达

按照试剂盒的操作说明提取 NSCLC 癌组织、癌旁组织和正常组织总 RNA,取 100 mg 组织,加入 1 ml Trizol 试剂,匀浆,然后加入 0.2 ml 氯仿,振荡 20 s,室温静置 5 min。12 000 r/min 离心 10 min,取上清;加入 500 μ l 异丙醇,轻轻混匀,室温静置 10 min。12 000 r/min 离心 10 min,弃上清。加入 1 ml 的 75% 乙醇,轻轻摇匀,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱过夜充分沉淀,离心,弃上清,然后晾干,加入 50 μ l DEPC 水溶解。然后进行 RT 反应。

在 10 μ l 反应体系中加入 2 μ l 总 RNA,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,接着 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min,再立即冰浴,0 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。然后设计引物,进行 RT-PCR 反应,在 5 μ l PCR 反应体系中加入 1 μ l cDNA,扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;PCR 反应:95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,循环 40 次。

四、Western-blot 试验检测 PI3K、Akt、P-Akt 蛋白的表达

取 NSCLC 原发灶和正常组织 100 mg 置于研磨器中,加入液氮,碾磨碎转至 1.5 ml EP 管中,每管加入 500 μ l PMSF 的 RIPA 裂解液,12 000 r/min 离心 10 min 后取上清。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。25 μ g 蛋白进行 6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳至蛋白分离之后,利用半干式转膜法将蛋白转至 PVDF 膜,室温牛奶封闭 1 h,加兔抗 PI3K 多克隆抗体, Akt 和 P-Akt 单克隆抗体(1:1000)4 $^{\circ}$ C 过夜,加 HRP 标记的抗兔 IgG 室温孵育 1 h,采用 Alpha 凝胶成像系统曝光成像。

五、统计学分析

数值资料采用均数 \pm 标准差比较($\bar{x} \pm s$)表示。数据处理采用 Graphpad 5 软件,采用单因素方差分析比较 miR-1 和 PIK3CA 在 NSCLC 原发灶、癌旁和正常组织中的表达差异;采用 q 检验比较两两组间的表达差异;临床病理参数观察值比较采用非配对 t 检验;相关分析数据处理采用 Stata 软件,应用线性相关分析分析 miR-1 和 PIK3CA 在 NSCLC 组织中的表达相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. NSCLC 组织中 miR-1 和 PIK3CA 的表达:miR-1 和 PIK3CA 在 NSCLC 组织中的表达情况见表 1。miR-1 在 NSCLC 原发灶中的表达明显低于在癌旁和正常组织中的表达($P = 0.0122$,见图 1),PIK3CA 在 NSCLC 原发灶和癌旁组织中的表达都明显高于在正常组织中的表达($P = 0.0446$, $P < 0.0001$),且 PIK3CA 在原发灶中的表达明显高于在癌旁组织中的表达($P = 0.0029$,见图 1)。miR-1 在 11 例术后 1 年内发生转移的 NSCLC 组织中较未发生转移者表达明显下降($P = 0.0369$),而 PIK3CA 则明显上升($P = 0.0061$),PIK3CA 在 16 例鳞状细胞癌中的表达明显高于其他腺癌组织($P = 0.02$),但 miR-1 和 PIK3CA 的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、分级、分期及淋巴结转移无明显关系($P > 0.05$,见表 1),miR-1 的表达与 PIK3CA 的表达呈负相关($r = -0.7096$, $P < 0.05$,见图 1)。

2. NSCLC 组织中 PI3K、Akt 和 P-Akt 蛋白的表达:PI3K、Akt 和 P-Akt 蛋白在 NSCLC 正常组织中的表达

表1 NSCLC组织中miR-1和PIK3CA的表达与临床病理因素的关系

临床病理参数	miR-1			PIK3CA		
	例, (%)	$\bar{x} \pm s$	P值	例, (%)	$\bar{x} \pm s$	P值
年龄			0.1455			0.2474
<65岁	30(54.5)	0.000 882 ± 0.002 168		30(54.5)	0.0976 ± 0.1650	
≥65岁	25(45.5)	0.000 328 ± 0.000 646		25(45.5)	0.0492 ± 0.1363	
性别			0.5010			0.2977
男	38(69.1)	0.000 882 ± 0.002 168		38(69.1)	0.0976 ± 0.1650	
女	17(30.9)	0.000 328 ± 0.000 646		17(30.9)	0.0492 ± 0.1363	
肿瘤大小			0.8492			0.8557
<3 cm	20(36.4)	0.000 673 ± 0.002 313		20(36.4)	0.0933 ± 0.1701	
≥3 cm	35(63.6)	0.000 462 ± 0.001 308		35(63.6)	0.1029 ± 0.1864	
组织学类型			0.2392			0.0200
鳞状细胞癌	16(29.1)	0.000 156 ± 0.000 322		16(29.1)	0.1693 ± 0.2396	
腺癌	39(71.9)	0.000 571 ± 0.001 269		39(71.9)	0.0437 ± 0.0762	
淋巴结转移			0.4408			0.1297
有淋巴结转移	35(63.6)	0.000 551 ± 0.001 567		35(63.6)	0.0375 ± 0.0668	
无淋巴结转移	20(36.4)	0.000 952 ± 0.002 038		20(36.4)	0.0166 ± 0.0179	
复发和转移			0.0369			0.0061
出现复发和转移	11(20.0)	0.000 500 ± 0.001 097		11(20)	0.2545 ± 0.2719	
未出现复发和转移	44(80.0)	0.001 682 ± 0.003 716		44(80)	0.0821 ± 0.1516	
肿瘤分级			0.4452			0.0972
I级	12(21.8)	0.000 248 ± 0.000 317		12(21.8)	0.0858 ± 0.2133	
II/III级	43(78.2)	0.000 529 ± 0.001 239		43(78.2)	0.2206 ± 0.1916	
肿瘤分期			0.1108			0.2927
I/II期	40(72.7)	0.001 102 ± 0.002 750		40(72.7)	0.1258 ± 0.1940	
III/IV期	15(27.3)	0.000 473 ± 0.001 147		15(27.3)	0.0636 ± 0.1011	

明显低于肿瘤组织,PI3K蛋白在鳞状细胞癌中的表达明显高于腺癌组织,在术后发生转移的组织中的表达明显高于未发生转移的组织(图1)。

讨 论

肺癌是目前世界上最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均居我国城市居民恶性肿瘤之首,每年因肺癌死亡患者超过100万,严重威胁人类的健康和生命^[13]。近几十年来,尽管在肺癌治疗方面取得了很大进展,但肺癌的预后仍然不容乐观,5年生存率不到15%^[14],主要原因是由于出现了复发及转移。因此,我们必须不断深入研究NSCLC发生发展的机制,明确其中的责任基因及信号转导通路,寻找更加精确、有效的分子标志物,以期术后早期干预。

miR-1是近年来发现的一种新的肿瘤抑制因子,已被证明在一些人类恶性肿瘤中表达减弱或缺失。Yan等^[15]研究发现miR-1在横纹肌肉瘤组织及培养的RD

细胞系中表达下调,miR-1能够通过抑制c-Met基因的表达抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖及侵袭。Hudson等^[16]研究发现miR-1在原发性和转移性前列腺癌中的表达明显降低,有望成为前列腺癌复发的预测因子,转染miR-1能够抑制LNCaP前列腺癌细胞系的生长及增殖。miR-1在甲状腺癌原发灶及癌旁组织中的表达较正常组织明显降低,增加外源性miR-1的表达能够抑制甲状腺癌细胞的生长、侵袭及转移^[17]。还有研究发现^[18]miR-1在结肠癌中表达下调,外源性miR-1可以通过抑制Met基因的表达从而抑制结肠癌细胞的增殖和转移。miR-1在原发性肝细胞癌组织中的表达同样明显降低,过表达miR-1可以抑制肝癌细胞的增殖及转移^[18]。本研究通过检测NSCLC原发灶、癌旁组织及正常组织中miR-1基因的表达发现:miR-1在NSCLC原发灶中的表达阳性率明显低于癌旁和正常组织($P < 0.05$),在术后1年内发生转移者中其表达阳性率明显低于未发生转移者($P < 0.05$),但与患者的年龄、性别、

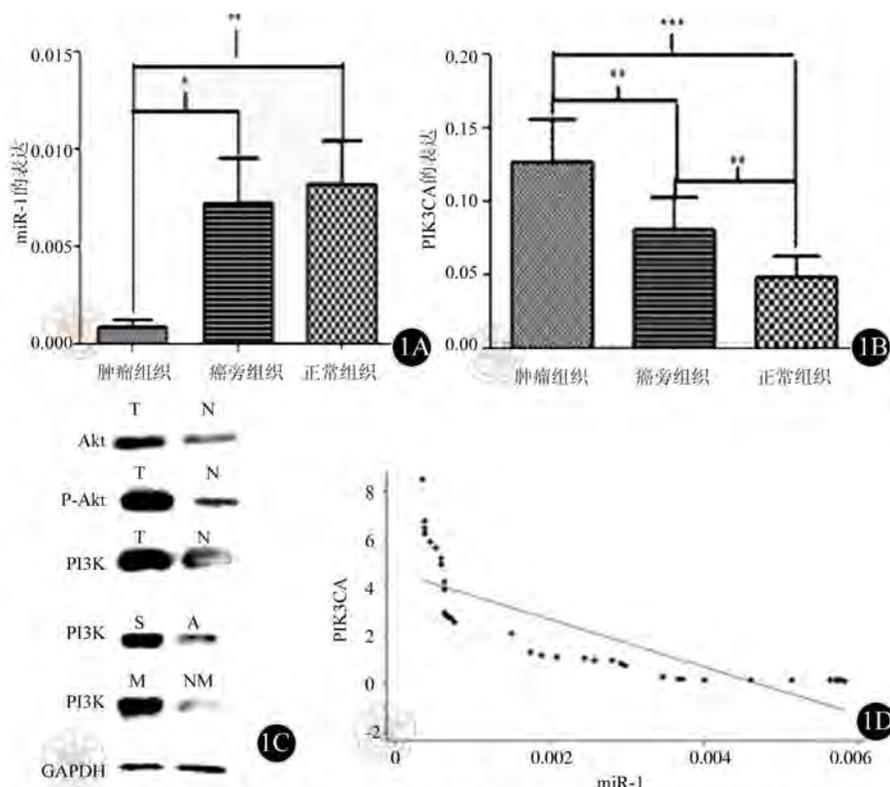


图1 1A: NSCLC组织、癌旁组织及正常组织中miR-1mRNA的相对表达变化; 1B: NSCLC组织、癌旁组织及正常组织中PIK3CA mRNA的相对表达变化; 1C: Western-blot 结果; 1D: miR-1和PIK3CA在NSCLC组织中的表达呈负相关。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.005$; ***: $P \leq 0.0001$; S: 鳞状细胞癌; A: 腺癌; M: 术后1年内发生转移组织; NM: 术后1年内未发生转移组织

肿瘤大小、分级、分期等无关 ($P > 0.05$)。miR-1 在 NSCLC 组织中的表达与其他肿瘤相似。

PIK3CA 基因能够编码 PI3K 蛋白 P110 催化亚单位, 激酶活性增强, 持续激活下游 Akt, 活化的 Akt 可磷酸化它的下游分子, 从而促进细胞生长及增殖, 抑制细胞凋亡, 增强细胞运动及侵袭^[19-20]。在本研究中我们发现 PIK3CA 在 NSCLC 组织中表达明显增强, 且在术后 1 年内发生转移的肿瘤组织中的表达较未发生转移者明显增高 ($P < 0.05$), 这就可能持续激活下游 Akt 及相关信号通路, 从而促进细胞的生长发育及运动侵袭, 这可能与 NSCLC 的发生及浸润转移相关。经生物信息学 (MiRBase、targetscan) 数据库查对发现在 PIK3CA mRNA 3' 端非编码区存在着 miRNA-1 结合的位点, 预测 PIK3CA 为 miRNA-1 的靶基因, 结合本研究的结果, 推测 miR-1 在 NSCLC 组织中的低表达可能导致对 PIK3CA 基因表达抑制的减弱, 从而导致 PIK3CA 过量表达, 激活下游 Akt 及相关通路, 促进细胞的生长及侵袭转移, 但具体机制尚待进一步验证。

综上所述, miR-1 的表达减弱或缺失以及 PIK3CA 的表达增强在 NSCLC 的发生发展及浸润转移过程中可能起到重要作用, 可能为 NSCLC 的治疗提供潜在的

靶标。

参 考 文 献

- [1] Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated capping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6: 376-385.
- [2] Mishima T, Akagi I, Miyashita M, et al. Study of microRNA expression profiles of esophageal cancer. J Nippon Med Sch, 2009, 76: 43.
- [3] Lakshminath U, Hart RP. Concise review: microRNA expression in multi-potent mesenchymal stromal cells. Stem Cells, 2008, 26: 356-363.
- [4] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 2999-3004.
- [5] Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, et al. miR-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2009, 49: 1571-1582.
- [6] Ferdin J, Kune JT, Calin GA. Non-coding RNAs: identification of cancer-associated microRNAs by gene profiling. Technol Cancer Res Treat, 2010, 9: 123-138.
- [7] Paranjape T, Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. Gut, 2009, 58: 1546-1554.
- [8] Yang B, Lin H, Xiao J, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. Nature Medicine, 2007, 13: 486-491.
- [9] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of miR-1 and miR-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet, 2005, 38: 228-233.
- [10] Nasser MW, Datta J, Nuovo G, et al. Down-regulation of micro-RNA-1

- (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem*, 2008, 283:33394-33405.
- [11] Hu Z, Chen X, Zhao Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2010, 28:1721-1726.
- [12] West KA, Linnoila IR, Belinsky SA, et al. Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*, 2004, 64:446-451.
- [13] American Cancer Society: Cancer Facts and Figures, 2007, American Cancer Society, Atlanta, GA2007.
- [14] Bozzao C, Varvara D, Piglionica M, et al. Survey of KRAS, BRAF and PIK3CA mutational status in 209 consecutive Italian colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers*, 2012, 27:e366-374.
- [15] Yan D, Dong Xda E, Chen X, et al. miR-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem*, 2009, 284:29596-29604.
- [16] Hudson RS, Yi M, Esposito D, et al. miR-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:3689-3703.
- [17] Leone V, D'Angelo D, Rubio I, et al. MiR-1 is a tumor suppressor in thyroid carcinogenesis targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1 alpha. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96:E1388-1398.
- [18] Li D, Yang P, Li H, et al. miR-1 inhibits proliferation of hepatocarcinoma cells by targeting endothelin-1. *Life Sci*, 2012, 91:440-447.
- [19] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-ser 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem*, 2001, 276:27462-27469.
- [20] Lee HY, Srinivas H, Xia D, et al. Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-4/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathways cooperate to maintain lung cancer cell survival. *J Biol Chem*, 2003, 278:23630-23638.

(收稿日期:2012-12-06)

(本文编辑:张岚)

赵球, 顾永娟, 陈亮, 等. MicroRNA-1 和 PIK3CA 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(8):3367-3371.

