

## 卵巢癌患者组织中 miR-135b 的表达及临床意义\*

刘 青, 邓慧敏, 周林涛, 周义文, 黄 荣

(南方医科大学深圳医院检验医学中心, 广东深圳 518100)

**摘要:**目的 探讨 miR-135b 在卵巢癌组织中的表达及意义。方法 选取 2015 年 1 月~2017 年 12 月在解放军第一七四医院和南方医科大学深圳医院接受手术的卵巢病变患者的卵巢组织, 包括 28 例卵巢癌组织和 10 例卵巢良性肿瘤组织, 所有的组织均经过病理确认。运用荧光定量 PCR(RT-PCR)的方法检测 28 例卵巢癌及 10 例卵巢良性肿瘤组织中 miR-135b 的表达水平, 并分析其与卵巢癌患者年龄、组织学类型、分化程度、临床分期及淋巴结转移的关系。结果 ①28 例卵巢癌组织中 miR-135b 的表达量( $1.90 \pm 0.53$ )与 10 例卵巢良性肿瘤组织中 miR-135b 表达量( $1.45 \pm 0.45$ )比较, 差异有统计学意义( $t=2.03, P<0.05$ ); ②19 例 $\geq 50$  岁卵巢癌患者组织中 miR-135b 的表达量( $1.97 \pm 0.51$ )和 20 例浆液性囊腺癌组织中 miR-135b 的表达量( $1.96 \pm 0.50$ )分别与 9 例 $< 50$  岁卵巢癌患者组织中 miR-135b 的表达量( $1.77 \pm 0.57$ )和 8 例黏液性腺癌组织中 miR-135b 的表达量( $1.77 \pm 0.61$ )比较, 差异均无统计学意义( $t=0.743 \sim 0.846$ , 均  $P<0.05$ )。20 例中低分化组织中 miR-135b 的表达量( $2.05 \pm 0.54$ ), 17 例临床分期 III~IV 期组织中 miR-135b 的表达量( $2.10 \pm 0.46$ )和 15 例有淋巴结转移的组织中 miR-135b 的表达量( $2.10 \pm 0.53$ )均分别高于 8 例高分化组织中 miR-135b 的表达量( $1.55 \pm 0.25$ ), 11 例临床分期 I~II 组织中 miR-135b 的表达量( $1.60 \pm 0.49$ )和 13 例无淋巴结转移的组织中 miR-135b 的表达量( $1.68 \pm 0.44$ )比较, 差异均有统计学意义( $t=5.036 \sim 7.517$ , 均  $P<0.05$ )。结论 miR-135b 在卵巢癌组织中高表达, miR-135b 的表达水平与卵巢癌的分化程度、临床分期和淋巴结转移有关。

**关键词:** 卵巢癌; miR-135b; 荧光定量 PCR; 临床分期

中图分类号: R737.31; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)02-032-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.009

### Expression and Clinical Significance of miR-135b in Tissues of Patients with Ovarian Cancer

LIU Qing, DENG Hui-min, ZHOU Lin-tao, HOU Yi-wen, HUANG Rong

(Center for Clinical Laboratory Medicine,

Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Guangdong Shenzhen 518100, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and significance of miR-135b in ovarian cancer tissues. **Methods** The ovarian tissue of patients with ovarian disease who underwent surgery from the 174th Hospital of the People's Liberation Army and the Shenzhen Hospital of Southern Medical University from January 2015 to December 2017, including 28 ovarian cancer tissues and 10 ovarian benign tumor tissues, were selected. The tissues were confirmed by pathology. The expression levels of miR-135b in 28 ovarian cancer tissues and 10 ovarian benign tumor tissues were detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR), and analyzed its relationship with age, histological type, degree of differentiation, clinical stage and lymph node metastasis of patients with ovarian cancer. **Results** ①The expression of miR-135b in 28 ovarian cancer tissues ( $1.90 \pm 0.53$ ) was different from that in 10 ovarian benign tumor tissues ( $1.45 \pm 0.45$ ) and they had statistical difference ( $t=2.03, P<0.05$ ). ②The expression of miR-135b in tissues of 19 patients with ovarian cancer aged  $\geq 50$  years ( $1.97 \pm 0.51$ ) and the expression of miR-135b in 20 cases of serous cystadenocarcinoma tissues ( $1.96 \pm 0.50$ ), compared separately with the expression of miR-135b ( $1.77 \pm 0.57$ ) in 9 cases of ovarian cancer patients  $< 50$  years old and the expression of miR-135b in 8 cases of mucinous adenocarcinoma tissues ( $1.77 \pm 0.61$ ), and the difference was not statistically significant ( $t=0.743 \sim 0.846$ , all  $P<0.05$ ). The expression of miR-135b in 20 cases of moderately poorly differentiated tissues ( $2.05 \pm 0.54$ ), the expression of miR-135b in the clinical stage III~IV stage of 17 cases ( $2.10 \pm 0.46$ ) and the miR-135b of 15 cases with lymph node metastasis expression level ( $2.10 \pm 0.53$ ), compared separately with the expression of miR-135b in 15 well-differentiated tissues ( $1.55 \pm 0.25$ ), the expression of miR-135b in 11 clinically staged I~II tissues ( $1.60 \pm 0.49$ ) and 13 tissues without lymph node metastasis miR-135b Expression level ( $1.68 \pm 0.44$ ), the differences had statistically significant ( $t=5.036 \sim 7.517$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** miR-135b was highly expressed in ovarian cancer tissues. The expression level of miR-135b is related to the differentiation degree, clinical stage and lymph node metastasis of ovarian cancer.

**Keywords:** ovarian cancer; miR-135b; real-time PCR; clinical staging

\* 基金项目: 深圳市宝安区医疗卫生基础研究项目(2017JD009)。

作者简介: 刘 青(1983—), 女, 本科, 学士学位, 主管技师, 主要从事临床免疫学研究, E-mail: liuqing\_0325@126.com。

卵巢癌在女性生殖器恶性肿瘤中的发生率占第3位,但其死亡率却居第1位<sup>[1]</sup>,卵巢癌转移是卵巢癌高复发与高死亡率的主要原因。miR-135b在不同癌症中发挥癌基因功能,与宫颈癌、前列腺癌<sup>[2]</sup>、子宫内膜癌<sup>[3]</sup>等多种恶性肿瘤发生及进展有关。LI等<sup>[4]</sup>人构建过表达 miR-135b 的肝癌细胞株,通过尾静脉注入小鼠,观察肿瘤转移。与对照组相比,过表达 miR-135b 的肿瘤细胞的侵袭能力显著增加,表明 miR-135b 不仅可以促进肿瘤细胞的生长,还能促进肿瘤细胞的侵袭转移。然而 miR-135b 在卵巢癌中的作用未见报道,在此研究中,采用 RT-PCR 法检测 miR-135b 在卵巢癌组织和卵巢良性肿瘤组织中的表达,并分析其与卵巢癌患者年龄、组织学类型、分化程度、临床分期及淋巴结转移的关系。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 1 月~2017 年 12 月在解放军第一七四医院和南方医科大学深圳医院接受手术的卵巢病变患者的卵巢组织,包括 28 例卵巢癌组织(20 例浆液性囊腺癌,8 例黏液性腺癌),所有组织均通过病理确认并储存在-80℃以备后用。所有患者手术前均未经激素和放化疗治疗,且未并发其它肿瘤。年龄 38~67 岁,平均年龄  $55.6 \pm 5.1$ , $\geq 50$  岁 19 例, $< 50$  岁 9 例。FIGO 临床分期:I 期 4 例,II 期 7 例,III 期 11 例,IV 期 6 例;15 例有淋巴结转移,13 例无淋巴结转移;高分化 8 例,中低分化 20 例。同期收集 10 例卵巢良性肿瘤组织(浆液性囊腺瘤,黏液性囊腺瘤,畸胎瘤,卵巢纤维瘤,卵泡膜细胞瘤)作为对照组,所有组织均经病理证实为良性,-80℃中保存备用。年龄 30~65 岁,平均年龄  $50.2 \pm 5.8$ 。

1.2 试剂和仪器 CFX96 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-rad 公司,ARKTIK96 PCR 仪购自 Thermo 公司;RNA 提取试剂盒,miRNA 逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒均购自杭州博日公司。RT-PCR 的引物设计:使用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计 U6 和 has-mir-135b 的引物序列:U6:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAA-3',has-mir-135b-5p: 5'-CCTGGCTTTTCATTCCTATGTGA-3'。引物由华大公司合成,干粉离心后用 DEPC 配成水溶液,浓度为  $20 \mu\text{mol/L}$ ,放入-20℃冰箱备用。

## 1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取和纯度检测:依据 RNA 提取试剂盒说明书从卵巢良性肿瘤组织和卵巢癌组织中提取总 RNA。纯度检测:紫外分光光度计检测总 RNA 纯度, $A_{260}/A_{280}$  的比值 1.80:2.20,说

明制备的 RNA 较纯,无蛋白质污染。

1.3.2 miRNA 逆转录和 RT-PCR 检测 miR-135b:按 miRNA 逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒说明书(一步法)对样本总 RNA 进行逆转录扩增。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示基因的相对表达水平,实时 PCR 总体系为  $25 \mu\text{l}$ 。 $2.5 \mu\text{l}$   $10 \times \text{RT-PCR Buffer}$ (含  $30 \text{ mmol/L}$  的  $\text{Mg}^{2+}$ ), $4.0 \mu\text{l}$  dNTPMixture ( $2.5 \text{ mmol/L}$ ), $1 \mu\text{l}$  RNase inhibitor( $40 \text{ U}/\mu\text{l}$ ), $1 \mu\text{l}$  上游特异性引物( $5 \mu\text{mol/L}$ ), $1 \mu\text{l}$  下游特异性引物( $5 \mu\text{mol/L}$ ), $0.5 \mu\text{l}$  AMV reverse transcriptase, $0.5 \mu\text{l}$  Taq DNA polymerase,RNase free  $\text{H}_2\text{O}$ 。反应条件: $95^\circ\text{C}$  30s, $95^\circ\text{C}$  5 min, $60^\circ\text{C}$  30s,总共 40 个循环,检测各模板的  $C_t$  值。

1.4 统计学分析 用 SPSS20.0 软件包进行数据处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用  $t$  检验,多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 卵巢癌组织和卵巢良性肿瘤组织中 miR-135b 的表达分析 运用 RT-PCR 检测 28 例卵巢癌组织中 miR-135b 的表达量( $1.90 \pm 0.53$ ),与 10 例卵巢良性肿瘤组织中 miR-135b 的表达量( $1.45 \pm 0.45$ )比较,差异具有统计学意义( $t = 2.03$ , $P = 0.021$ )。

2.2 卵巢癌患者不同临床病理特征间 miR-135b 表达的差异分析 见表 1。

表 1 卵巢癌组织中 miR-135b 表达与不同临床病理特征间差异( $\bar{x} \pm s$ )

| 临床特征              | n  | miR-135b 表达量    | t 值   | P 值   |
|-------------------|----|-----------------|-------|-------|
| 年龄(岁)             |    |                 |       |       |
| $\geq 50$         | 19 | $1.97 \pm 0.51$ | 0.846 | 0.366 |
| $< 50$            | 9  | $1.77 \pm 0.57$ |       |       |
| 组织学类型             |    |                 |       |       |
| 浆液性囊腺癌            | 20 | $1.96 \pm 0.50$ | 0.743 | 0.396 |
| 黏液性腺癌             | 8  | $1.77 \pm 0.61$ |       |       |
| 分化程度              |    |                 |       |       |
| 高分化               | 8  | $1.55 \pm 0.25$ | 6.104 | 0.020 |
| 中低分化              | 20 | $2.05 \pm 0.54$ |       |       |
| 临床分期              |    |                 |       |       |
| $< \text{III}$    | 11 | $1.60 \pm 0.49$ | 7.517 | 0.011 |
| $\geq \text{III}$ | 17 | $2.10 \pm 0.46$ |       |       |
| 淋巴结转移             |    |                 |       |       |
| 无                 | 13 | $1.68 \pm 0.44$ | 5.036 | 0.034 |
| 有                 | 15 | $2.10 \pm 0.53$ |       |       |

不同年龄、不同组织学类型 miR-135b 的表达量比较,差异均无统计学意义( $t = 0.743 \sim 0.846$ ,均  $P > 0.05$ );不同的分化程度、临床分期和是否有淋巴结转移 miR-135b 的表达量比较差异均有统计学意义( $t = 5.036 \sim 7.517$ ,均  $P < 0.05$ )。

3 讨论 近几年,对于非编码 RNA 在各种生理过程和病理过程中的作用研究持续增加,短链非编码 RNA(如 siRNAs, microRNAs)的研究不断深入,他们在生命活动中的重要意义逐渐被揭示。成熟的 microRNA 通过与 mRNA 的 3'-UTR 互补

结合而参与基因翻译及以后的调控,导致转录抑制,阻碍蛋白翻译或降解靶 mRNA。最新研究报道小囊泡及外泌体(exosomes)可通过胞膜融合产生内吞作用,其内可能含有 mRNA 和 miRNA,被传送到其他细胞并发挥功能,这种 miRNAs 的细胞间转移方式,可作为一种新的基因交流机制。miRNA-mRNA 间可产生类 siRNA 作用裂解靶 mRNAs,通常 miRNA 只能调控其 1.5~4 倍量的靶 mRNA 表达,因此只有表达量充裕的 miRNA,才拥有充足的与靶基因结合的位点,充当调控机制中“闸门”的作用<sup>[5]</sup>。miRNA 与 mRNA 间的调控机制参与肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡和转移等多方面生物学过程<sup>[6,7]</sup>。

已经发现多种 miRNA 在卵巢癌的发生发展中扮演着重要的角色。例如,miR-182 在卵巢癌组织中高表达,且体外通过靶向作用于 FOXO3, MTTs1 等肿瘤抑制因子促进卵巢癌细胞的侵袭和转化<sup>[8]</sup>,同时体内促进卵巢癌细胞在小鼠体内进行转移<sup>[9]</sup>。CHENG 等<sup>[10]</sup>人发现 miR-199 通过抑制 CD44 的表达抑制卵巢癌细胞的侵袭与转移,同时减轻癌细胞的耐药性。这些结果说明 miRNA 在卵巢癌的发生发展过程中发挥重要作用。

miRNA-135 分子簇在识别靶 mRNA 关键区域时可共享其类似序列,尤其是在种子序列区,miRNA-135a 与 miRNA-135b 作为一个家族共同参与调控靶 mRNA<sup>[11]</sup>。miR-135b 基因位于染色体 1 号长臂的 3 区 2 号带的第 1 个亚带(1q32.1),它在各种肿瘤中升高,例如骨肉瘤、淋巴瘤、结肠癌和前列腺癌等。miR-135b 在非小细胞肺癌中,通过激活 Hippo 信号通路和靶向 LZTS 促进肿瘤转移。我们的初步研究发现 miR-135b 在卵巢癌组织中高表达,与卵巢良性肿瘤组织比较结果有差异( $P<0.05$ ),并且其与卵巢癌分化程度、临床分期和淋巴结转移有关。这些研究结果提示 miR-135b 在卵巢癌中高表达,可能发挥癌基因功能。

了解卵巢癌转移的分子机制对卵巢癌的防治至关重要,但目前与其相关的机制尚未阐明。上皮细胞间质转化(EMT)是一种上皮细胞失去上皮细胞表型进入间质细胞的过程,继而使细胞运动性增加<sup>[12]</sup>。EMT 是上皮肿瘤细胞获得迁移和侵袭的重要生物学过程,在癌症耐药中起着相当重要的作用<sup>[13,14]</sup>,是原位癌发生转移的一种重要机制。因此,能否通过内源性的控制 EMT 过程进行精细地、多靶点的调节抑制卵巢癌细胞的转移,是我们希望达到的目标。本课题下一步的研究计划是通过靶基因预测软件寻找 miR-135b 下游的靶点,特

别是与 EMT 调控相关的基因,分析卵巢癌患者血清中 miR-135b 与肿瘤标志物 CA125 之间的关系,并在细胞水平、动物水平加以验证,开展作用机制方面的研究,为确定 miR-135b 成为肿瘤诊断和治疗的重要生物学指标提供实验基础。

#### 参考文献:

- [1] 陈仲波,朱笈青. 卵巢癌筛查的研究进展[J]. 中国现代医生,2016,54(35):164-168.  
CHEN Zhongbo, ZHU Jianqing. Research progress of ovarian cancer screening[J]. China Modern Doctor, 2016, 54(35):164-168.
- [2] 刘平. miR-135b 在宫颈癌中的表达及临床意义[J]. 河南科技大学学报(医学版),2016,34(3):177-179.  
LIU Ping. Expression and its clinical significance of miR-135b in cervical cancer[J]. J Henan Univ Sci Tech(Med Sci), 2016, 34(3):177-179.
- [3] 乐珍,沈君菁,黄启涛,等. miR-135b 通过靶向 F-EXO1 促进子宫内膜癌细胞的增殖[J]. 南方医科大学学报,2016,36(5):675-680.  
YUE Zhen, SHEN Junjing, HUANG Qitao, et al. MiR-135b promotes proliferation of endometrial carcinoma cells by targeting FOXO1[J]. J South Med Univ, 2016, 36(5):675-680.
- [4] LI Yan, XU Dan, BAO Chun-yang, et al. MicroRNA-135b, a HSF1 target, promotes tumor invasion and metastasis by regulating RECK and EVI5 in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(4):2421-2433.
- [5] HUNTZINGER E, IZAUERLALDE E. Gene silencing by micro RNAs: contributions of translational repression and mRNA decay[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(2):99-110.
- [6] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2):281-297.
- [7] PASQUINELLI A E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(4):271-282.
- [8] LIU Zhaojian, LIU Jinsong, SEGURA M F, et al. MiR-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma[J]. The Journal of Pathology, 2012, 228(2):204-215.
- [9] HUYNH C, SEGURA M F, GAZIEL-SOVRAN A, et al. Efficient in vivo microRNA targeting of liver metastasis[J]. Oncogene, 2011, 30(12):1481-1488.
- [10] CHENG Weiwei, LIU Te, WAN Xiaoping, et al. MicroRNA-199a targets CD44 to suppress the tumorigenicity and multidrug resistance of ovarian cancer-initiating cells[J]. FEBS Journal, 2012, 279(11):2047-2059.
- [11] COFFRE M, KORALOV S B. miRNAs in B cell development and lymphomagenesis[J]. Trends Mol Med, 2017, 23(8):721-736.
- [12] SMITH A, TEKNOS T N, PAN Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2013, 49(4):287-292.
- [13] SATO R, SEMBA T, SAYA H, et al. Concise review: Stem cells and epithelial-mesenchymal transition in cancer: Biological implications and therapeutic targets[J]. Stem Cells, 2016, 34(8):1997-2007.
- [14] HUANG Jing, LI Hongzhong, REN Guosheng. Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (review)[J]. Int J Oncol, 2015, 47(3):840-848.

收稿日期:2018-10-22

修回日期:2018-12-29