

Expression of microRNA-224 in Cholangiocarcinoma and Its Clinicopathological Significance

Xiaolei Wang, Xiaofang Liu

Qingdao University Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai Shandong
Email: 2268140853@qq.com, liu634@263.net

Received: Apr. 5th, 2018; accepted: Apr. 18th, 2018; published: Apr. 25th, 2018

Abstract

Objective: To investigate the difference of miR-224 expression in cholangiocarcinoma and paracancerous tissues and to explore its clinicopathological significance. **Methods:** The expression of miR-224 in 30 cases of cholangiocarcinoma and its paracancerous tissues was analyzed by RT-PCR. The relationship between miR-224 and clinicopathological data was analyzed by statistical analysis. **Results:** The expression level of miR-224-5p in cholangiocarcinoma was significantly higher than that in paracancerous tissue ($P < 0.0001$). The expression level of miR-224-5p in cholangiocarcinoma was correlated with the pathophysiological behavior of tumor. That is, the relative expression level of miR-224-5p in patients with lymph node metastasis was significantly higher than that in patients without lymph node metastasis ($P < 0.05$). The relative expression of miR-224-5p in stage III and IV cholangiocarcinoma was significantly higher than that in stage I and II ($P < 0.05$). **Conclusion:** Micro-224 is a potential tumor promoter in cholangiocarcinoma, which may regulate the occurrence and development of cholangiocarcinoma and be used as a molecular marker for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma.

Keywords

Cholangiocarcinoma, miR-224, Clinicopathology

microRNA-224在胆管癌患者中的表达及其临床病理学意义

王小磊, 刘小方

青岛大学附属烟台毓璜顶医院, 山东 烟台
Email: 2268140853@qq.com, liu634@263.net

摘要

目的: 探讨miR-224在胆管癌组织和癌旁组织中的表达差异及其临床病理学意义。**方法:** 利用RT-PCR技术检测30例胆管癌患者癌组织及癌旁组织中miR-224的表达, 并运用统计学方法分析其与临床病理资料之前的关系。**结果:** 胆管癌组织中miR-224-5p的表达水平明显高于癌旁组织中的表达水平($P < 0.0001$), 其表达水平高低与肿瘤病理生理学行为相关, 即有淋巴结转移的患者癌组织中的miR-224-5p的相对表达量明显高于无淋巴结转移的患者($P < 0.05$); III期与IV期胆管癌患者癌组织中miR-224-5p的相对表达量明显高于I期与II期患者($P < 0.05$)。**结论:** micro-224在胆管癌中具有潜在的癌基因作用, 可能调控肿瘤的发生发展, 有望成为胆管癌诊治的分子标志物。

关键词

胆管癌, miR-224, 临床病理

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胆管癌是肝胆外科常见的一种病死率极高的高度侵袭性恶性肿瘤, 且近年来, 其发病率及死亡率呈逐年升高的趋势[1]。胆管癌起源于胆管上皮细胞, 因起病隐匿, 进展迅速, 早期诊断困难, 对常规放射治疗和化疗不敏感, 手术切除率低, 术后复发率高, 故临床上大多数胆管癌患者在确诊时已处晚期从而失去进行根治性手术的机会[2]。因此, 临床上迫切需要找寻一种新的强有力的评估胆管癌发生发展的分子标志物以期达到判断患者预后及进行肿瘤靶向治疗的目的以提高患者生存质量或术后生存期。

MicroRNA (微小 RNA, miRNA)是一种包含大小约为 21~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 它广泛参与各种病理和生理过程的调节, 在细胞的增值、凋亡、分化、个体发育等方面发挥着巨大作用, 且与肿瘤的发生和发展密切相关[3]。近年来多项研究结果表明: 多种 MicroRNA 在胆管癌中异常表达并起到癌基因或抑癌基因的作用[4]。miR-224 作为 microRNA 的一种亚型, 已有研究发现其在多种恶性肿瘤中存在异常表达并参与肿瘤的发生发展[5]。但关于其在胆管癌中的表达及与患者临床病理学意义, 目前尚未见报道。因此, 本研究通过探讨 miR-224 在胆管癌组织和癌旁组织中的表达差异及其临床病理学意义, 以期胆管癌预后判断提供新思路, 为其精准医疗提供新靶标。

2. 资料与方法

2.1. 一般资料

2.1.1. 研究对象

选取青岛大学附属烟台毓璜顶医院肝胆胰外科 2015 年 09 月至 2017 年 10 月实施手术治疗的远端胆管癌患者组织标本 30 例, 患者年龄分布为 58~73 岁, 平均年龄 65.30 ± 4.324 岁, 男女比例 3:2。所有入选患者此前均未接受过放、化疗, 临床病理资料完整, 且均为经病理组织学确诊的初诊初治患者。纳入

患者中术后病理提示中低分化者 10 例, 高分化者 20 例, 其中标记淋巴结阳性者 16 例, 阴性 14 例, 所有患者均按照美国癌症联合委员会(AJCC)的第 8 版远端胆管癌分期系统[6]进行 TNM 分期: 0 期即 TisN0M0, I 期即 T1N0M0, II 期即 T1N1M0、T2N0M0、T2N1M0、T3N0-1M0, III 期即 T1-3N2M0、T4 任何 NM0, IV 期任何 T 任何 NM1 (Tis 表示原位癌, T1 指侵及胆管深度小于 5 mm, T2、T3 分别表示侵及深度为 5~12 mm、大于 12 mm, T4 表示肿瘤侵及腹腔动脉干、肠系膜上动脉和/或肝总动脉; N0 表示无区域淋巴结转移, N1、N2 分别指 1~3 枚、大于或等于 4 枚区域淋巴结转移; M0 表示无远处转移, M1 指有远处转移)。所选患者中 I 期、II 期 21 例, III 期、IV 期 9 例, 这其中有 23 例患者行传统的胰十二指肠切除术, 1 例患者行保留幽门的胰十二指肠切除术, 2 例行胆管-空肠吻合术, 3 例行姑息性肿瘤局部切除加胆肠内引流术, 1 例行剖腹探查加 T 型管引流术。入选患者及家属术前均签署知情同意书, 同意使用其术后组织标本用于本次科学研究, 且通过医院医学伦理委员会批准。

2.1.2. 实验试剂和仪器

Trizol 试剂液购自上海普飞生物科技有限公司; 逆转录引物及 microRNA PCR 引物均购自广州锐博生物科技有限公司, 逆转录酶试剂盒购自美国 promega 公司。主要仪器有: FLUKO 公司 F6/10 超速匀浆机, Thermo 公司 Nanodrop2000/2000C 分光光度计, 瑞士 Roche 公司 LightCycler480 Real time PCR 仪。

2.2. 实验方法

2.2.1. 总 RNA 抽提

将待研磨的组织样品-80°C 冰箱中取出, 无菌刀片于干冰上将组织样品切割成约 3 mm × 3 mm × 3 mm 大小, 置于装有 1 mL Trizol 裂解液的 EP 管中。用超细匀浆机进行组织研磨; 研磨后 4°C, 5000 rpm 离心 3 min, 弃沉淀, 吸取上清液至新 EP 管中; 每管加入 200 μ L 氯仿, 用手上下颠倒 EP 管 15 s, 室温静置 10 min; 于 4°C、12,800 rpm 离心 15 min 后吸取上层液体至新 EP 管, 加入等体积预冷的异丙醇, 混匀后 4°C 静置 10 min; 于 4°C、12,800 rpm 离心 12 min 后弃上清后加入 1 mL、75% 乙醇(用 DEPC 水新鲜配制), 洗涤沉淀; 然后于 4°C、11,800 rpm 离心 5 min, 弃去大部分上清后再次于 4°C、11,800 rpm 离心 5 min, 弃去上清, 室温下干燥; 待 RNA 沉淀基本透明时, 加入 RNase-free 水至完全溶解, 用分光光度计分析测定所抽提 RNA 的浓度及质量。所抽提的总 RNA 置于-80°C 下保存。

2.2.2. 逆转录获取 cDNA

每 1 nmol 引物加入 RNase-free 水 200 μ L, 涡旋振荡充分溶解后瞬时离心, 配成终浓度为 5 μ M 的引物储存液。取 5 μ M 的 RT 引物储存液 1 μ L, 加入 79 μ L 的 RNase-free 水配制成 62.5 nM 的 RT 引物工作液; PCR 引物按照 5 μ M 的浓度使用。将 2 μ L 逆转录引物(0.5 μ g/ μ L)和 2.0 μ g 总 RNA 加入到 PCR 小管中, 补 RNase-Free 水至 11 μ L; 混匀后离心, 70°C 温浴 10 min; 之后立即置于冰水混合物中冰浴, 使逆转录引物和模板退火。在上述混合物中按以下比例: 5 × RT buffer 5 μ L、10 mM dNTPs 2 μ L、Rnasin 0.4 μ L、M-MLV-Rtase 1 μ L、RNase-Free 水 2.6 μ L, 在冰浴中进行反应体系(25 μ L 体系)配制, 混匀, 短暂离心。上述体系在 42°C 水浴反应 1 h, 然后在 70°C 水浴 10 min 使 RT 酶失活, 将得到的 RT 产物-cDNA 置于-20°C 保存备用。

2.2.3. RT-PCR 检测

按下列比例配置反应体系(12 μ L 体系): SYBR premix ex taq6.0 μ L、上游引物 0.5 μ L、下游引物 0.5 μ L、模板 1.0 μ L、RNase-Free 水 4.0 μ L; RNA PCR 12 μ L 反应体系: SYBR premix ex taq6.0 μ L、引物 mix0.3 μ L、模板 0.6 μ L、RNase-Free 水 5.1 μ L。两步法进行 Real-Time PCR, 并制作溶解曲线。

MiR-224-5p RT 引物序列:

5,-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACGGAAC-3,
上游引物序列: 5,-ACACTCCAGCTGGGCAAGTCACTAGTGGTCCGTT-3,
下游引物序列: 5,-TGGTGTCTGGAGTCG-3,;

U6:

上游引物序列: 5,-CTCGCTTCGGCAGCACA-3,
下游引物序列: 5,-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3,。

U6 用作内参, 倍数变化计算采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法进行分析来表示 miRNA-224 的表达水平。

2.3. 统计学方法

采用软件 GraphPad Prism 6.0 进行数据分析, 胆管癌患者癌组织与癌旁组织中 miR-224 表达差异的比较、胆管癌组织中 miR-224 相对表达量与胆管癌患者临床病理特征之间的关系用 X^2 检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. miR-224-5p 和内参 U6 引物的检测

miR-224-5P 和 U6 在部分胆管癌组织中的扩增曲线如图 1(a)所示, miR-224-5P 和 U6 的溶解曲线(如图 1(b)和图 1(c))均为单峰, 提示 miR-224-5P 和 U6 的产物均为单一产物。

3.2. miR-224-5p 在胆管癌组织与癌旁组织中的表达水平

RT-PCR 的结果显示, 胆管癌组织中的 miR-224-5p 的相对表达量为 (10.23 ± 0.8861) , 癌旁组织中的相对表达量为 (0.4734 ± 0.04018) 。胆管癌组织中 miR-224-5p 的表达水平明显高于癌旁组织中的表达水平。 $P < 0.0001$, 提示两者之间的差异具有统计学意义(图 2, 将 $2^{-\Delta Ct}$ 扩大 10^6 倍作图)。

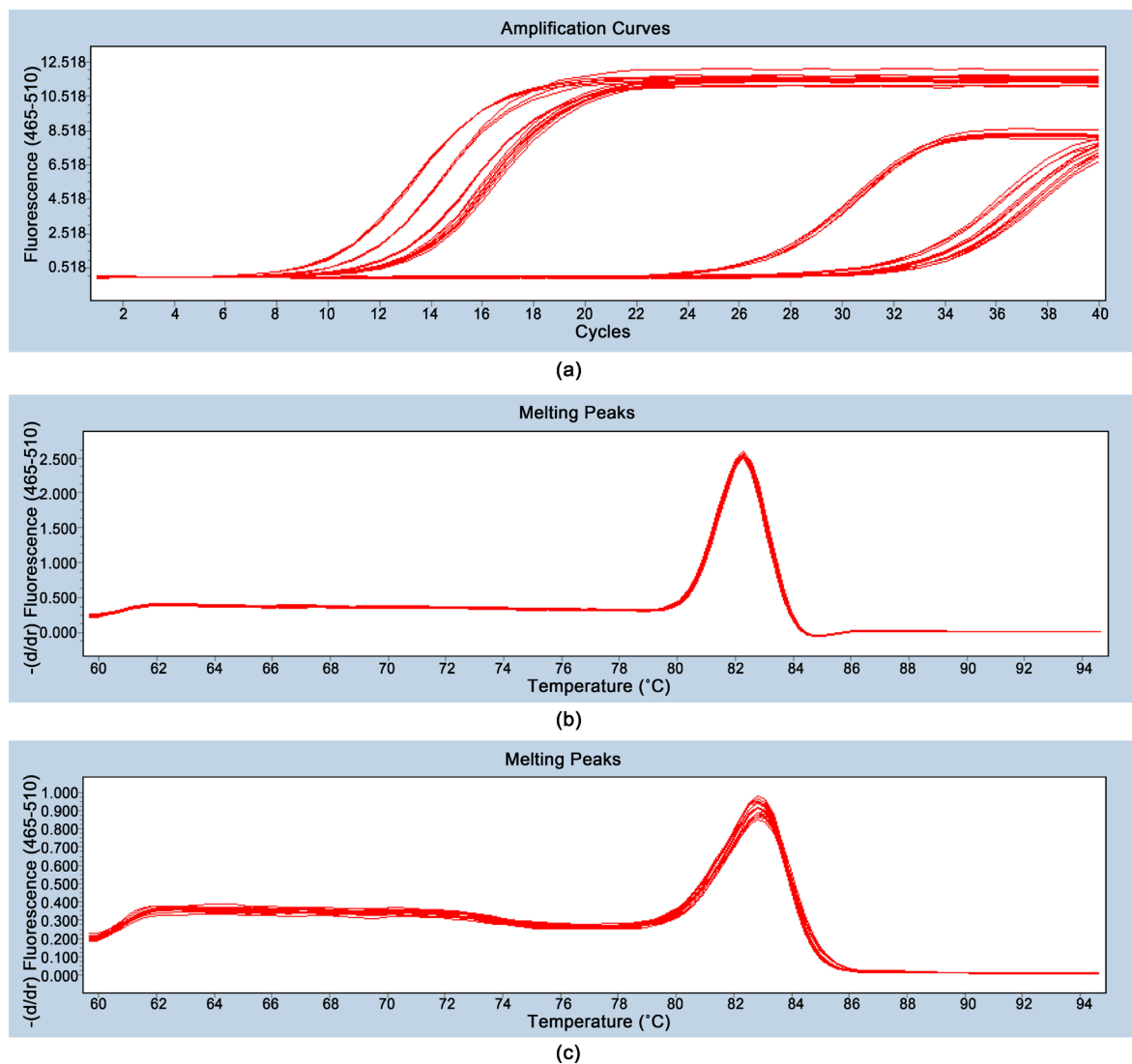
3.3. miR-224-5p 的表达与胆管癌患者临床病理学特征的关系

根据 RT-PCR 结果, 分析胆管癌组织中 miR-224-5p 的表达与胆管癌患者临床病理特征(年龄、性别、分化程度、有无淋巴结转移、病理分期)的关系, 显示胆管癌组织中 miR-224-5p 的表达水平与患者有无淋巴结转移密切有显著相关性, 有淋巴结转移的患者癌组织中的 miR-224-5p 的相对表达量明显高于无淋巴结转移的患者($P < 0.05$); 另外, 发现 miR-224-5p 的表达水平与患者的 TNM 病理分期密切相关, III 期与 IV 期胆管癌患者癌组织中 miR-224-5p 的相对表达量明显高于 I 期与 II 期患者($P < 0.05$)。胆管癌组织中 miR-224-5p 的相对表达量与其他患者年龄、性别以及肿瘤的分化程度等临床病理因素无显著相关关系($P > 0.05$) (详见表 1, $2^{-\Delta Ct}$ 扩大 10^6 倍进行数据分析)。

4. 讨论

近年来, microRNAs 在肿瘤领域的研究越来越宽泛, 越来越深入。miRNAs 通过碱基配对原则与靶 mRNA 的 3'端互补结合, 参与转录后的基因调控, 其表达失控与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关, 具有广泛的生物学效应[7]。在肿瘤组织中存在与正常组织不同的具有特征性的 microRNA 表达谱, 而这些 microRNA 在肿瘤患者中的表达变化均可以通过实验室测定。因此, MicroRNAs 可能成为肿瘤诊断和监测疾病进展的新的分子标志以及判断肿瘤预后的分子靶点, 将有助于肿瘤诊治[8]。

有研究表明, 许多 miRNA 在肿瘤中被发现存在异常表达的现象, 其中 miR-224 颇受关注。miR-224 作为 microRNA 家族其中的一员, 研究发现其在肝癌[9]、胃癌[10]、结直肠癌[11]、胰腺癌[12]、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤[13]、前列腺癌[14]、乳腺癌[15]、宫颈癌[16]、非小细胞肺癌[17]等人类肿瘤中均



注: (a) microRNA-224-5p 与内参 U6 的扩增曲线; (b) U6 的溶解曲线; (c) microRNA-224-5p 的溶解曲线。

Figure 1. Detection of micro-224-5p and U6 primers

图 1. micro-224-5p 和 U6 引物的检测

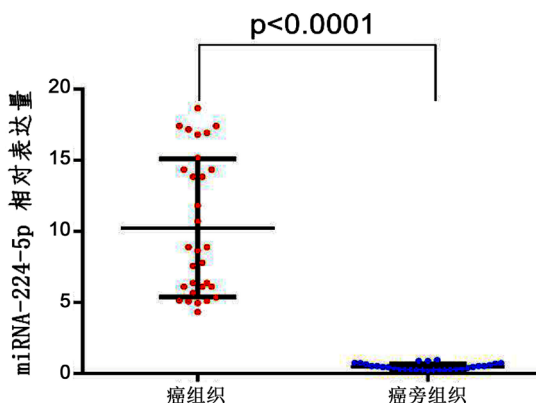


Figure 2. Relative expression of miR-224-5p in cholangiocarcinoma and adjacent tissues

图 2. 胆管癌组织与癌旁组织中 miR-224-5p 的相对表达量

Table 1. Comparison of miR-224-5p expression levels in cancerous tissues of patients with cholangiocarcinoma with different clinicopathological features**表 1.** 不同临床病理特征的胆管癌患者癌组织中 miR-224-5p 表达水平的比较

临床病理特征	例数 n	miR-224-5p 的相对表达量	P 值
年龄			
≤60 岁	17	10.51 ± 1.175	0.4237
>60 岁	13	9.127 ± 1.253	
性别			
男	18	10.44 ± 1.092	0.7794
女	12	9.918 ± 1.547	
分化程度			
中、低分化	10	10.97 ± 1.902	0.5624
高分化	20	9.858 ± 0.9587	
淋巴结转移			
有	16	14.05 ± 0.8406	<0.0001
无	14	5.862 ± 0.2627	
TNM 分期			
I 期、II 期	21	8.520 ± 0.9665	0.0017
III 期、IV 期	9	14.22 ± 1.094	

存在较为显著的异常表达并且以癌基因或者抑癌基因的身份发挥作用, 通过测定其表达变化可能成为一种对恶性肿瘤进行早期诊断和判断预后的新的重要手段。本研究通过选取手术切除的胆管癌癌组织及癌旁组织, 利用 RT-PCR 技术检测患者癌组织及癌旁组织中 miR-224 的相对表达量, 结果发现与癌旁组织相比, miR-224 在癌组织中的表达水平显著上调, 提示 miR-224 在胆管癌中起到潜在癌基因的作用。结合患者的临床病理资料, 运用统计学方法分析 miR-224 的表达与患者临床病理特征之间的关系, 结果显示: miR-224 的表达水平与患者的年龄、性别以及肿瘤的分化程度无相关性, 但是 miR-224 在有淋巴结转移患者中的表达水平比在无淋巴结转移患者中的表达显著升高, 并且患者 TNM 病理分期越晚, miR-224 的表达水平越高。实验结果提示 miR-224 的高表达对于胆管癌患者的预后可能起到消极作用。故推测 miR-224 可能调控着肿瘤的发生发展, 迁移与侵袭。测定 miR-224 的表达量可为胆管癌患者预后的判断提供理论基础和参考, 并且为胆管癌的靶向精准治疗提供新靶点。当然, 本研究同样存在一些不足, 例如所获取的患者病例数较少以及缺少随访等, 对于 miR-224 在胆管癌患者预后中的精确价值无法进一步进行评估。

目前, 对 microRNA-224 的研究还不够深入, 本研究对 microRNA-224 与胆管癌的调控机制及信号通路研究奠定了一定的前期基础。关于 microRNA-224 调控的特定靶基因以及参与胆管癌生物学功能的详细分子机制, 都需要我们进一步完善。

基金项目

山东省自然科学基金项目 (ZR2014HM052) 资助。

参考文献

- [1] Razumilava, N. and Gores, G.J. (2014) Cholangiocarcinoma. *Lancet*, **383**, 2168-2179. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61903-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61903-0)

- [2] Khan, S.A., Toldano, M.B. and Taylor-Robinson, S.D. (2008) Epidemiology, Risk Factors, and Pathogenesis of Cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*, **10**, 77-82. <https://doi.org/10.1080/13651820801992641>
- [3] Sayed, D. and Abdellatif, M. (2011) MicromRNAs in Development and Disease. *Physiological Reviews*, **91**, 827-887. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2010>
- [4] Farazi, T.A., Hoell, J.I., Morozov, P., et al. (2013) MicroRNAs in Human Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **744**, 1-20. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1_1
- [5] Chen, W., Fan, X.M., Mao, L., et al. (2015) MicroRNA-224: As a Potential Target for miR-Based Therapy of Cancer. *Tumor Biology*, **36**, 6645-6652. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3883-3>
- [6] 汤朝晖, 田孝东, 魏妙艳, 等. 美国癌症联合委员会胆道恶性肿瘤分期系统(第 8 版)更新解读[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(3): 248-254.
- [7] Wang, J. and Sen, S. (2011) MicroRNA Functional Network in Pancreatic Cancer: From Biology to Biomarker of Disease. *Journal of Biosciences*, **36**, 481-491. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9083-4>
- [8] Budhu, A., Ji, J. and Wang, X.W. (2010) The Clinical Potential of microRNAs. *Journal of Hematology & Oncology*, **3**, 37. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-37>
- [9] Lan, S.H., Wu, S.Y., Zucchini, R., et al. (2014) Autophagy suppresses Tumorigenesis of Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma through Degradation of microRNA-224. *Hepatology*, **59**, 505-517. <https://doi.org/10.1002/hep.26659>
- [10] Liu, H., Li, P., Li, B., et al. (2014) RKIP Suppresses Gastric Cancer Cell Proliferation and Invasion and Enhances Apoptosis Regulated by microRNA-224. *Tumour Biology*, **35**, 100095-10103.
- [11] Zhang, G.J., Zhou, H., Xiao, H.X., et al. (2013) Up-Regulation of miR-224 Promotes Cancer Cell Proliferation and Invasion and Predicts Relapse of Colorectal Cancer. *Cancer Cell International*, **13**, 104. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-104>
- [12] 邹叶青, 刘川, 贺文凤, 等. 反义 miR-224 对人胰腺癌细胞系 Aspc-1 和 Bxpc-3 侵袭、迁移的影响及机制研究[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(3): 212-217.
- [13] Ni, H., Wang, X., Liu, H., Tian, F. and Song, G. (2015) Low Expression of miRNA-224 Predicts Poor Clinical Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with RCHOP. *Biomarkers*, **20**, 253-257. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1068855>
- [14] Wan, Y., Zeng, Z.C., Xi, M., et al. (2015) Dysregulated microRNA-224/Apelin Axis Associated with Aggressive Progression and Poor Prognosis in Patients with Prostate Cancer. *Human Pathology*, **46**, 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.10.027>
- [15] Feng, X.B., Zhao, L., Gao, S.G., et al. (2016) Increased Fucosylation Has a Pivotal Role in Multidrug Resistance of Breast Cancer Cells through miR-224-3p Targeting FUT4. *Gene*, **578**, 232-241. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.028>
- [16] Wang, F., Shan, S., Li, Y.M., et al. (2016) miR-224-3p Inhibits Autophagy in Cervical Cancer Cells by Targeting FIP200. *Scientific Reports*, **6**, Article ID: 33229. <https://doi.org/10.1038/srep33229>
- [17] 徐志勇, 周建龙, 周娟, 等. MicroRNA-224-5p 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(21): 3463-3467.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2169-8821, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acrpo@hanspub.org