

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00612

· 论 著 ·

miRNA-200c 在上皮性卵巢癌细胞株及肿瘤组织中的表达变化及意义

李林霞¹, 李双弟¹, 杨懿霞¹, 万小平^{2*}

1. 上海交通大学附属上海市第一人民医院妇产科, 上海 200080
2. 国际和平妇幼保健院妇科, 上海 200030

[摘要] **目的** 观察上皮性卵巢癌细胞株及肿瘤组织 microRNA-200c(miR-200c)的表达水平,探讨其可能的临床价值。**方法** 采用 Real-time RT-PCR 技术比较人卵巢癌母细胞系(HO-8910)、卵巢癌高转移能力变异细胞株(HO-8910PM)及 HO-8910 细胞团簇中 miR-141、miR-200c 的表达差异。同法测定上皮性卵巢癌($n=83$)、交界性卵巢肿瘤($n=13$)及正常卵巢组织($n=8$)中 miR-141、miR-200c 的表达,并分析卵巢癌不同临床病理特征下二者的表达差异。**结果** 与 HO-8910、HO-8910PM 相比,HO-8910 细胞团簇中 miR-200c 表达下调($P<0.05$);正常卵巢组织、卵巢交界性肿瘤、卵巢癌中 miR-141、miR-200c 表达依次上调($P<0.05$)。转移性卵巢癌、低分化卵巢癌及透明细胞卵巢癌中 miR-200c 表达下调($P<0.05$)。miR-200c 高表达患者预后优于 miR-200c 低表达者($P<0.05$)。**结论** miR-200c 表达下调与卵巢癌进展相关,可能提示卵巢癌预后不良。

[关键词] 微 RNAs; 卵巢肿瘤; 预后**[中图分类号]** R 737.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0612-05

Changes of miRNA-200c expression in ovarian cancer and its clinical significance

LI Lin-xia¹, LI Shuang-di¹, YANG Yi-xia¹, WAN Xiao-ping^{2*}

1. Department of Obstetrics and Gynecology, First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China
2. Department of Gynecology, International Peace Maternity & Child Health Hospital, Shanghai 200030, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of microRNA-200c (miR-200c) in ovarian cancer cell line and tissues, and to assess its possible clinical value. **Methods** Real-time PCR was used to analyze the expression of miR-200c and miR-141 in HO-8910 (human ovarian cancer cell line), HO-8910PM (highly metastatic ovarian cancer cell line), and HO-8910 cluster cells. We also determined the expression of miR-200c and miR-141 in 83 ovarian cancer tissues, 13 borderline ovarian tumors, and 8 normal ovary tissues; the expression was compared between tumors of different pathological characters. **Results** Expression of miR-200c was down-regulated in HO-8910 cluster cells compared with those in HO-8910 and HO-8910PM cells ($P<0.05$). Expressions of miR-141 and miR-200c were gradually up-regulated from the normal ovary tissue to borderline ovarian tumors, then to ovarian cancer tissues ($P<0.05$). Expression of miR-200c was down-regulated in the metastatic ovarian cancer and ovarian clear cell tumors and undifferentiated ovarian cancer cells ($P<0.05$). Patients with high miR-200c expression had a better prognosis than those with a low expression of miR-200c ($P<0.05$). **Conclusion** The decreased expression of miR-200c is correlated with the progression of ovarian cancer patients, and it is a risk factor of poor prognosis.

[Key words] microRNAs; ovarian neoplasms; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6):612-616]

上皮性卵巢癌是病死率最高的女性生殖系统恶性肿瘤,难以早期发现和易发生转移是导致其高病死率的重要原因。70%以上的患者在诊断时已处于晚期,肿瘤已发生广泛腹腔内或远处转移,5年生存率仅30%^[1]。卵巢癌转移的病理机制尚不明确,一种新近发现的微RNA(microRNA, miRNA)——miR-200可能在这一过程中发挥重要作用^[2-3]。miRNA是一类长度为19~25个核苷酸的非编码小

分子RNA,可参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等多种生命活动。其中,miR-200家族(miR-200a、miR-141、miR-200b、miR-200c、miR-429)是新近发现的肿瘤转移相关miRNA,通过调控上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)影响肿瘤细胞的转移能力^[2]。EMT在卵巢癌转移中可能起重要作用。

系列研究发现卵巢癌中存在miR-200表达异

[收稿日期] 2011-03-04 **[接受日期]** 2011-05-09**[作者简介]** 李林霞,副主任医师. E-mail: cybllx@sh163.net

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64076782, E-mail: wanxiaoping1961@126.com

常^[3-6],但其与卵巢癌转移的关系及临床病理意义尚不明确。本研究采用实时定量 PCR 方法比较人卵巢癌细胞系(HO-8910)、卵巢癌高转移能力变异细胞株(HO-8910PM)及 HO-8910 细胞团簇中 miR-141、miR-200c 的表达差异;同法测定上皮性卵巢癌、交界性卵巢肿瘤及正常卵巢组织中 miR-141、miR-200c 的表达,并分析其与卵巢癌分级、分期、转移等临床病理指标和预后的关系,探讨其可能的临床价值。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 人卵巢癌细胞系 HO-8910(母细胞系)、HO-8910PM(高转移潜能变异株)购自中国科学院上海细胞所;细胞培养液 DMEF/F12、进口血清及胰蛋白酶为美国 Gibco 公司产品,购自上海志立生物公司。细胞培养液 M199/MCDB105(1:1)购自美国 Sigma 公司。TRIzol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品,购自上海晶美生物公司。miRNA 反转录试剂盒和 miRNA real-time PCR Universal master mix 为 ABI 公司产品,购自上海吉泰生物公司。miR-200c、miR-141 引物及 miR-200c、miR-141 TaqMan[®] miR assay 试剂盒为 ABI 公司产品,购自上海吉泰生物公司。

1.2 标本来源及一般资料 收集自 2003~2008 年于我院手术治疗的上皮性卵巢癌 83 例、卵巢交界性肿瘤 13 例,患者术前均无放、化疗史;并收集 2009 年 6~8 月因子宫肌瘤等行手术治疗的 8 例患者的正常卵巢组织作为对照。83 例卵巢肿瘤患者手术时中位年龄 54.5 岁;Ⅰ期 24 例,Ⅱ期 18 例,Ⅲ期 40 例,Ⅳ期 1 例。病理分型:浆液性癌 44 例,黏液性癌 8 例,子宫内膜样癌 9 例,透明细胞癌 17 例,未分化癌 5 例。采取临床标本获患者知情同意并经上海市第一人民医院医学伦理委员会批准。所有标本于液氮中冻存备用。

1.3 细胞贴壁及立体培养 HO-8910、HO-8910PM 细胞贴壁培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液的普通培养皿中,置 37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱。HO-8910 细胞立体培养:于普通 6 孔培养板的基底部预铺一层 1.5% 的琼脂糖胶,每孔加入 1×10⁶ HO-8910 细胞及相应含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱中培养,最初 24 h 内每 2 h 轻轻震荡 1 次持续 5 min。培养 5 d,每 2~3 d 换液 1/3~1/2,肉眼及镜下观察细胞团簇形成。

1.4 细胞及组织样本总 RNA 抽提 以 TRIzol-氯仿-异丙醇法提取细胞总 RNA;组织样本由液氮中

取出后,即于加入适量 TRIzol 试剂的 50 ml 离心管中匀浆后,再以氯仿及异丙醇抽提。以 D₂₆₀/D₂₈₀ 比值=1.8~2.1 为纯的 RNA。

1.5 实时定量 PCR 测定 miRNA 表达 根据 TaqMan miRNA 反转录试剂盒说明书,以 15 μl 体系分别进行 miR-141、miR-200c 反转录,以 20 μl 体系进行实时定量 PCR。反应条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 15 s、60℃ 60 s,45 个循环。所有样品均重复 3 次,阴性对照以 DEPC 水为模板。计算方法:以 Folds = 2^{-ΔΔCt} 表示,计算公式如下: ΔΔCt = (Ct_{miR-200c} - Ct_{U6})_{实验组} - (Ct_{miR-200c} - Ct_{U6})_{对照组} 或 ΔΔCt = (Ct_{miR-141} - Ct_{U6})_{实验组} - (Ct_{miR-141} - Ct_{U6})_{对照组}。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,采用 One-Way ANOVA 及 *q* 检验或秩和检验进行比较。Log-rank 法分析 miRNA 表达水平与患者预后的关系。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 不同转移潜能卵巢癌细胞株中 miR-200c、miR-141 的表达 实时定量 PCR 结果(图 1)表明:3 组间 miR-141 表达差异无统计学意义。与 HO-8910、HO-8910PM 相比,miR-200c 在 HO-8910 细胞团簇中表达明显下调,差异有统计学意义(*P*<0.05),而 HO-8910、HO-8910PM 细胞间 miR-200c 表达无差异。

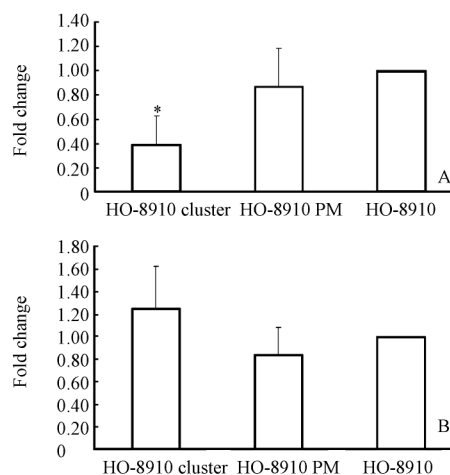


图 1 miR-200c(A)和 miR-141(B)在 HO-8910 团簇、HO-8910、HO-8910PM 细胞中的表达

Fig 1 Expression of miR-200c(A) and miR-141(B) in HO-8910 cluster cells, HO-8910, and HO-8910PM cells

* *P*<0.05 vs HO-8910; *n*=3, $\bar{x} \pm s$

2.2 卵巢肿瘤及正常卵巢组织中 miR-200c、miR-141 的表达 结果(图 2)表明:正常卵巢组织、卵巢交界性肿瘤、卵巢癌组织中 miR-200c、miR-141 表达

依次上调:miR-200c在正常卵巢、交界性卵巢肿瘤、卵巢癌中相对表达倍数中位数分别为1.13、54.97、98.52($P=0.004$);miR-141分别为1.26、117.37、260.37($P=0.001$)。

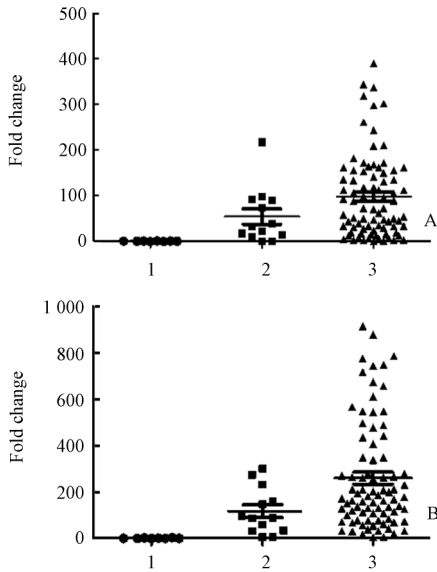


图2 上皮性卵巢癌和正常卵巢组织中 miR-200c(A)、miR-141(B)的表达

Fig 2 Expression of miR-200c(A) and miR-141(B) in ovarian cancer, borderline ovarian cancer, and normal ovarian tissues

1: Normal ovary; 2: Borderline ovarian tumor; 3: Ovarian cancer

2.3 卵巢癌不同分期 miR-200c、miR-141 的表达 结果(图3)表明:miR-200c在I期、II期和III~IV期卵巢癌中相对表达倍数分别为148.34、119.89、29.94。与I~II期相比,III~IV期卵巢癌表达下降($P<0.001$)。miR-141在I期、II期、III~IV期卵巢癌中相对表达倍数分别为179.36、290.92、294.74,差异无统计学意义。

2.4 卵巢癌不同病理类型 miR-200c、miR-141 的表达 miR-200c在卵巢癌不同病理类型中的表达相对倍数中位数分别为:浆液性卵巢癌97.79,黏液性卵巢癌161.79,子宫内膜样癌143.69,透明细胞癌65.92,低分化卵巢癌33.14;差异具有统计学意义($P=0.026$,图4)。结果提示:miR-200c在低分化卵巢癌和透明细胞卵巢癌中表达下调。miR-141在卵巢癌不同病理类型中的相对表达倍数中位数分别为:浆液性卵巢癌301.71,黏液性卵巢癌166.25,子宫内膜样癌323.72,透明细胞癌219.69,低分化卵巢癌71.51;各组间差异无统计学意义。

2.5 卵巢癌有无转移对 miR-200c、miR-141 表达的影响 83例卵巢癌中59例发生转移。有、无转移卵巢肿瘤组织 miR-200c表达相对倍数中位数分别为:

无转移132.79,有转移84.58;差异有统计学意义($P=0.029$)。结果(图5)表明:与无转移肿瘤相比,转移卵巢肿瘤 miR-200c表达下调。miR-141在无转移卵巢癌中表达中位数为205.13,在有转移卵巢癌中为282.85,两者间差异无统计学意义。

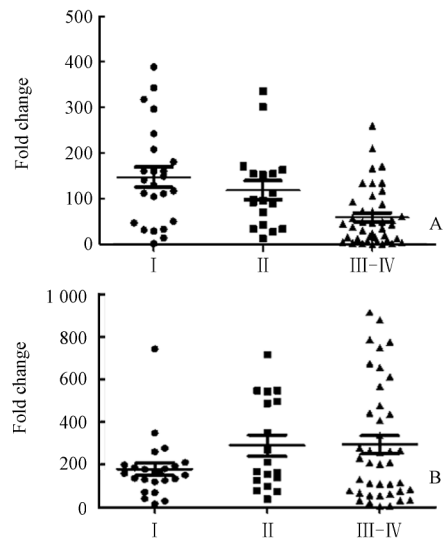


图3 上皮性卵巢癌不同分期 miR-200c(A)、miR-141(B)的表达

Fig 3 Expression of miR-200c(A) and miR-141(B) in different stages of ovarian cancer

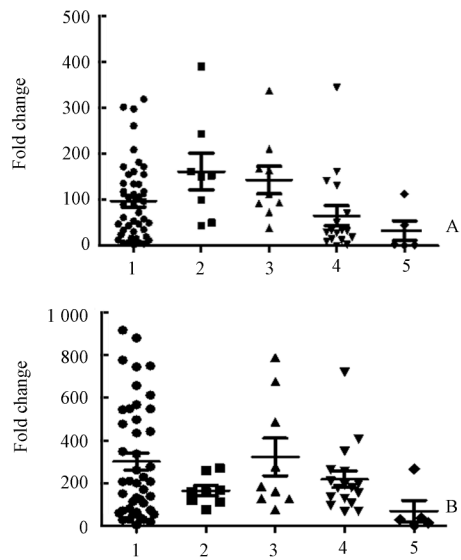


图4 卵巢癌不同病理类型 miR-200c(A)和 miR-141(B)的表达

Fig 4 Expression of miR-200c(A) and miR-141(B) in different pathological ovarian cancers

1: Serous; 2: Mucinous; 3: Endometrial; 4: Clear cell; 5: Undifferentiated tumor

2.6 卵巢癌预后与 miR-200c、miR-141 的表达 83

例卵巢癌患者中,共随访 80 例。随访时间截止为 2009 年 10 月。Kaplan-Meier 生存分析(图 6)表明:miR-200c 高表达患者其预后优于 miR-200c 低表达患者($P < 0.05$)。miR-141 表达与卵巢癌预后无相关。

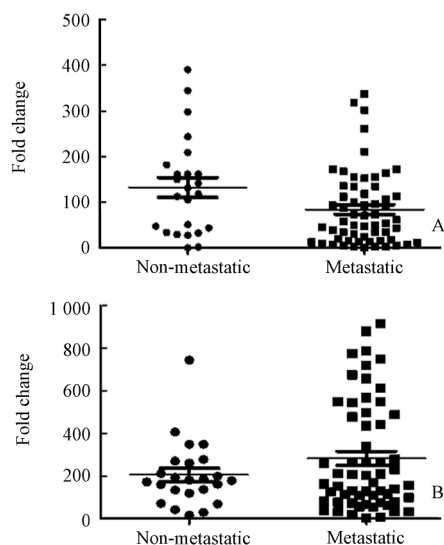


图 5 有、无转移卵巢癌组织 miR-200c(A)和 miR-141(B)的表达

Fig 5 Expression of miR-200c(A) and miR-141(B) in metastatic and non-metastatic ovarian cancer

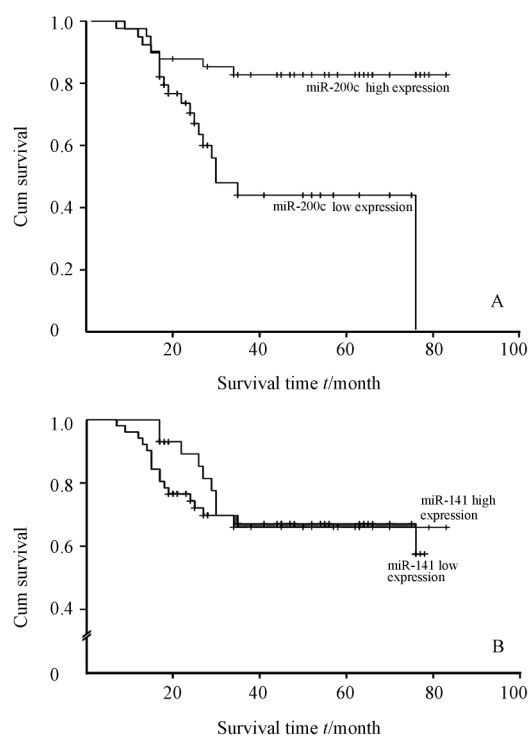


图 6 卵巢癌预后与 miR-200c(A)和 miR-141(B)表达的关系

Fig 6 Relationship of miR-200c(A) and miR-141(B) expression with prognosis of ovarian cancer patients

3 讨论

miR-200 家族成员根据种子序列差异,可以分为两个亚组:第一组包括 miR-200a 和 miR-141,第二组包括 miR-200b、-200c 和 miR-429。本研究在两亚组中分别选取 miR-141、miR-200c 进行观察。miR-200c 可通过调控其靶基因——E-cadherin (E-cad, E-钙粘着蛋白)基因的转录抑制因子 ZEB1 和 ZEB2 的表达而上调 E-cad,从而维持细胞上皮表型,是调控细胞发生 EMT 的关键因子^[2]。上皮间充质转化在卵巢癌转移中起重要作用。因此,miR-200 与卵巢癌临床病理特性尤其是转移的关系值得进一步研究。

本研究发现,与正常卵巢和交界性卵巢肿瘤相比,卵巢癌中 miR-200c 和 miR-141 表达明显升高;但随着肿瘤进展,miR-200c 表达水平随疾病分期升高而下降,并且,在发生转移的卵巢癌中表达低于未发生转移者。结果提示:在卵巢癌发生发展过程中,存在 miR-200c 表达的动态变化。未发生恶性转化的卵巢上皮细胞为间皮细胞表型,表现为 miR-200c 低表达,E-cad 低表达。而肿瘤发生早期,卵巢上皮细胞发生间皮细胞-上皮转化(mesothelial-epithelial transition, Meo-ET),表现为 miR-200c 和 E-cad 高表达。但随着肿瘤进展,肿瘤细胞发生 EMT,获得转移能力并发生转移,此时又表现为 miR-200c 和 E-cad 低表达。最终,在远处转移部位,转移灶肿瘤细胞可能再次发生间充质-上皮转化,此时 miR-200c 表达又再次升高(图 7)^[7]。

我们的推测基于下述实验依据:(1)卵巢癌 EMT 过程受 miR-200 调控^[8];(2)miR-200c 具有“期别特异性下调”现象,仅在肿瘤获得侵袭和转移能力时发生下调^[9];(3)三维立体培养提示具有转移能力的肿瘤细胞可以形成高度极化的细胞团簇,而 miR-200c 过表达可以抑制细胞团簇形成和转移^[10]。本研究也表明,miR-200c 在形成团簇的卵巢癌细胞中表达下调。并且,虽然在腹水中卵巢癌细胞 miR-200c 表达尚不明确,但其靶基因 ZEB2 表达上调^[11]。腹水转移是卵巢癌最常见的转移方式,因而 miR-200 与卵巢癌转移相关。(4)临床病理研究提示 miR-200c 表达的动态变化。

本研究还发现,miR-200c 在透明细胞和低分化卵巢癌细胞中表达明显低于其他病理类型。miR-200c 在肾透明细胞癌中表达明显下调^[12],而卵巢透

明细胞癌和肾透明细胞癌具有一定同源性。这一结果提示了卵巢癌的异质性。而 miR-200c 调控细胞分化和“干性”的特性^[13]可能与其在未分化卵巢癌细胞表达下调相关。虽然 miR-141 和 miR-200c 位于同一染色体,但本研究并未发现两者间表达具有相关性,可能与两者转录后形成成熟 miRNA 时调控机

制不同有关。此外,本研究还表明 miR-141 表达与卵巢癌分期及转移无关,提示 miR-200 不同亚类其生物学功能存在差异。最后,预后分析结果表明,miR-200c 高表达卵巢癌患者预后明显优于低表达患者,提示 miR-200c 可能是卵巢癌潜在的预后评估指标。

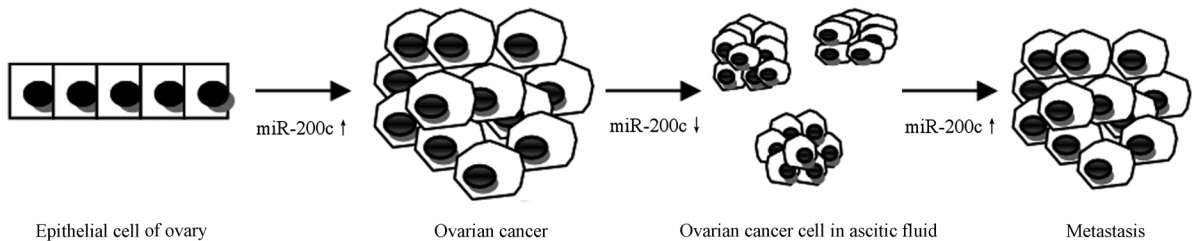


图 7 miR-200c 在卵巢癌发生发展中的动态变化示意图^[7]

Fig 7 Changes of miR-200c expression in the development of ovarian cancer^[7]

综上所述,miR-200c 表达下调与卵巢癌进展相关,并且可能是卵巢癌的不良预后因素之一。

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M J. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59: 225-249.

[2] Gregory P A, Bert A G, Paterson E L, Barry S C, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10: 593-601.

[3] Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw M S, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 9136-9141.

[4] Nam E J, Yoon H, Kim S W, Kim H, Kim Y T, Kim J H, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14: 2690-2695.

[5] Wyman S K, Parkin R K, Mitchell P S, Fritz B R, O'Briant K, Godwin A K, et al. Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries[J]. PLoS One, 2009, 4: e5311.

[6] Yang H, Kong W, He L, Zhao J J, O'Donnell J D, Wang J, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. Cancer Res, 2008, 68: 425-433.

[7] Li S D, Zhang J R, Wang Y Q, Wan X P. The role of microR-

NAs in ovarian cancer initiation and progression[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14: 2240-2249.

[8] Bendoraite A, Knouf E C, Garg K S, Parkin R K, Kroh E M, O'Briant K C, et al. Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition [J]. Gynecol Oncol, 2010, 116: 117-1125.

[9] Olson P, Lu J, Zhang H, Shai A, Chun M G, Wang Y, et al. MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer [J]. Genes Dev, 2009, 23: 2152-2165.

[10] Gibbons D L, Lin W, Creighton C J, Rizvi Z H, Gregory P A, Goodall G J, et al. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression [J]. Genes Dev, 2009, 23: 2140-2151.

[11] Elloul S, Silins I, Trop C G, Benshushan A, Davidson B, Reich R. Expression of E-cadherin transcriptional regulators in ovarian carcinoma [J]. Virchows Arch, 2006, 449: 520-528.

[12] Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, Tanigawa M, Yoshimoto T, Narimatsu T, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c [J]. J Pathol, 2008, 216: 418-427.

[13] Peter M E. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression [J]. Cell Cycle, 2009, 8: 843-852.

[本文编辑] 贾泽军