

· 论 著 ·

# miRNA-625<sup>\*</sup> 在膀胱尿路上皮癌中的表达

徐 锋<sup>1</sup>, 韩从辉<sup>2</sup>, 刘有黄<sup>1</sup>, 高建平<sup>1</sup>, 张征宇<sup>1</sup>, 葛京平<sup>1</sup>, 位志峰<sup>1</sup>, 程 文<sup>1</sup>

[摘要] 目的 探讨 miRNA-625<sup>\*</sup> 在膀胱尿路上皮癌中的差异表达。方法 常规提取新鲜膀胱尿路上皮癌与正常膀胱黏膜组织中总 RNA; 使用分光光度计测定 RNA 在 260 nm、280 nm 和 230 nm 的吸光值, 以计算浓度并评估纯度; 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度及完整性; 以 RT-PCR 方法检测标本中 miRNA-625<sup>\*</sup> 的表达情况。结果 RNA 质量检测合格后, miRNA-625<sup>\*</sup> 经 RT-PCR 验证与 miRNA 芯片分析结果一致。与正常膀胱黏膜上皮组织相比, 膀胱尿路上皮癌中 miRNA-625<sup>\*</sup> 表达显著上调 ( $P < 0.05$ )。结论 miRNA-625<sup>\*</sup> 在膀胱尿路上皮癌中表达上调, 可作为膀胱尿路上皮癌诊断和预后判断的分子标志物。  
[关键词] miRNA-625<sup>\*</sup>; 膀胱尿路上皮癌; 微小 RNA  
[中图分类号] R737.14 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.02.003

## Expression of miRNA-625<sup>\*</sup> in urothelial carcinoma of the bladder

XU Feng<sup>1</sup>, HAN Cong-hui<sup>2</sup>, LIU You-huang<sup>1</sup>, GAO Jian-ping<sup>1</sup>, ZHANG Zheng-yu<sup>1</sup>, GE Jing-ping<sup>1</sup>, WEI Zhi-feng<sup>1</sup>, CHENG Wen<sup>1</sup>.  
1. Department of Urology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Urology, the Central Hospital of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221009, China

[Abstract] Objective To detect the miRNA-625<sup>\*</sup> expression in urothelial carcinoma of the bladder (BUC). Methods BUC and normal bladder mucosa tissues were collected and the total RNA was extracted routinely. Measuring the absorption value of RNA at 260 nm, 280 nm, and 230 nm by NanoDrop ND-1000 in order to calculate RNA Quantification and Quality Assurance. RNA Integrity and gDNA contamination Test by Denaturing Agarose Gel Electrophoresis. The miRNA-625<sup>\*</sup> expression was detected by using real-time quantitative polymerase chain reaction. Results RNA Quantification and RNA Integrity were qualified for the follow-up experiment, the miRNA-625<sup>\*</sup> finding was confirmed by real-time RT-PCR and the expression was significantly up-regulated in BUC tissues than those in normal bladder mucosa ( $P < 0.05$ ). Conclusion The expression level of miRNA-625<sup>\*</sup> is significantly up-regulated in BUC, and it may be used for prediction of prognosis and as for targeted treatment of BUC.  
[Key words] miRNA-625<sup>\*</sup>; urothelial carcinoma of the bladder; miRNA

我国泌尿系恶性肿瘤最常见的是膀胱癌, 其中约 90% 为膀胱尿路上皮癌。多发性、高复发率、高进展率是膀胱癌的特点<sup>[1]</sup>, 16% ~ 25% 复发的肿瘤恶性程度增加, 所以膀胱癌的早期诊断和复发检测十分重要。目前理想的膀胱肿瘤标志物仍未发现。膀胱癌的发病机理尚未完全阐明, 现认为与多层次、多基因的网络紊乱有关<sup>[2]</sup>。研究证明, 微小 RNA (miRNA) 与多种肿瘤的发生、发展密切相关, 具有类似致癌基因的功能<sup>[3-4]</sup>。本研究旨在探讨膀胱尿路上皮癌组织中 miRNA 的变化, 为阐明膀胱尿路上皮癌发生的分子机制及临床诊断和预后判断的分子标志物提供新的依据。

### 1 材料与方法

基金项目: 国家自然科学基金 (30772278)  
作者单位: 1. 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院泌尿外科; 2. 221009 江苏徐州, 江苏省徐州市中心医院泌尿外科

1.1 材料 收集 2010 - 2011 年我科手术切除的新鲜标本, 10 例正常膀胱黏膜上皮组织 (取材于尿道下裂和输尿管膀胱再植手术) 和 40 例膀胱尿路上皮癌标本 (6 例为膀胱全切术后迅速剖开膀胱, 于癌肿中心取材, 另 34 例膀胱镜活检取材), 取材后冲去污物, 转存液氮中备用。标本均经病理证实为正常膀胱尿路上皮组织和膀胱尿路上皮癌组织。  
1.2 主要试剂及仪器 Trizol 试剂 (美国 vitrogen 公司), ND-1000 分光光度计 (美国 NanoDrop 公司), miRNA-625<sup>\*</sup> 试剂盒 (丹麦 Exiqon 公司), Gene-Pix 4000B 芯片扫描仪, 反转录试剂盒及荧光定量 RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司), PCR 仪 (美国 ABI 公司)。  
1.3 方法  
1.3.1 总 RNA 抽提 超声匀浆后按照 Trizol 试剂说明书的步骤, 逐步提取出膀胱黏膜上皮组织和膀胱尿路上皮癌组织中的总 RNA。使用 ND-1000 分光光度计测定 RNA 在 260 nm、280 nm 和 230 nm 的

吸光值计算浓度并评估纯度,并以琼脂糖凝胶电泳进一步检测总 RNA 质量。

**1.3.2 miRNA 芯片杂交及数据处理** 采用 miRNA-625\* 试剂盒,按照说明书进行。使用 GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片,芯片图像的原始荧光强度数据由 GenePix pro V6.0 软件完成分析,并对数据进行分析运算。

**1.3.3 cDNA 合成** 用反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA,总体积 20  $\mu$ l,包括 dNTP(2.5 mM)2  $\mu$ l、10 $\times$  转录缓冲液 2  $\mu$ l、反转录特异引物(1  $\mu$ M)0.5  $\mu$ l、总 RNA 1  $\mu$ g、MMLV 反转录酶(10 U/ $\mu$ l)2  $\mu$ l、RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu$ l)0.3  $\mu$ l、无 RNA 酶水补足至 20  $\mu$ l,于 PCR 扩增仪进行反应。反应条件为:16  $^{\circ}$ C,30 min;42  $^{\circ}$ C,42 min;85  $^{\circ}$ C,5 min。反应结束后,将其放在冰上待用或 -20  $^{\circ}$ C 保存。

**1.3.4 RT-PCR<sup>[5]</sup>** 以 RT-PCR 检测 miRNA-625\* 的表达,miRNA-625\* 及内参 U6 的引物探针由 Exiqon 公司合成(表 1),两者均按以下程序进行:95  $^{\circ}$ C,3 min 后;以 95  $^{\circ}$ C,15 s;60  $^{\circ}$ C,20 s;72  $^{\circ}$ C,20 s;78  $^{\circ}$ C,20 s 共 40 个循环。为建立产物的熔解曲线,扩增反应结束后按 95  $^{\circ}$ C,15 s;60  $^{\circ}$ C,20 s;72  $^{\circ}$ C,20 s;99  $^{\circ}$ C,15 s 延续,再从 72  $^{\circ}$ C 缓慢加热到 99  $^{\circ}$ C(自动进行,缓变率为 2%)逐渐变性进行溶解曲线分析。用 U6 为内参基因,测定循环阈值(cycle threshold,Ct),通过 Light Cycler 软件获得各样本中 miRNA-625\* 的

Ct 值,并计算样本中 miRNA-625\* 的含量。

表 1 用于 miRNA-625\* 的 RT-PCR 引物

引物	引物序列(5'→3')
U6	上游引物 GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT
	下游引物 CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT
miRNA-625*	上游引物 GCGGCAGACTATAGAACTTT
	下游引物 CAGTGCGTGTCTGTGA

**1.4 统计学处理** 数据分析以 SPSS 13.0 统计软件完成。实验所得数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 RNA 质量鉴定结果** 电泳后观察到 28S、18S、5.8S(5S),特别是 28S 清晰的带型。分光光度法检测 RNA 浓度,OD260/OD280 的比值在 1.92~2.05 之间,OD260/OD230 的比值在 1.90~2.25 之间。显示所提取的 RNA 的浓度及纯度均适用于后续实验研究。

**2.2 miRNA-625\* 的 RT-PCR 验证结果** 采用荧光定量 RT-PCR 方法检测,显示产物的溶解曲线呈单峰,引物的特异性较好(图 1、2),说明本研究芯片结果真实可靠。

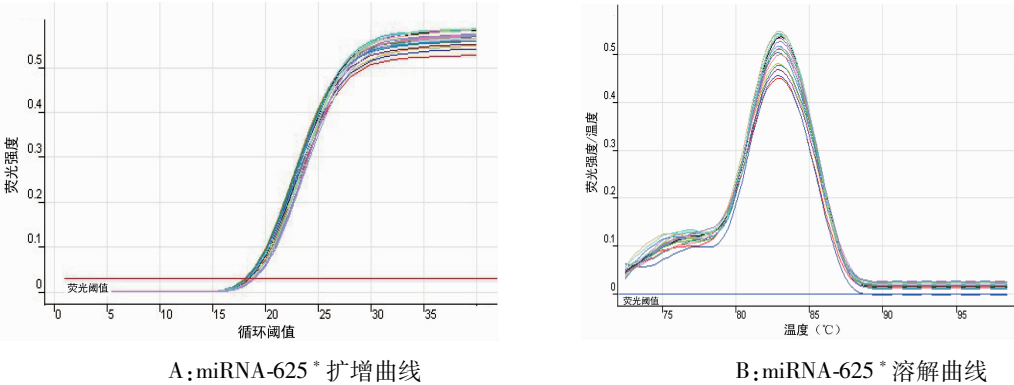


图 1 miRNA-625\* 的 RT-PCR 结果

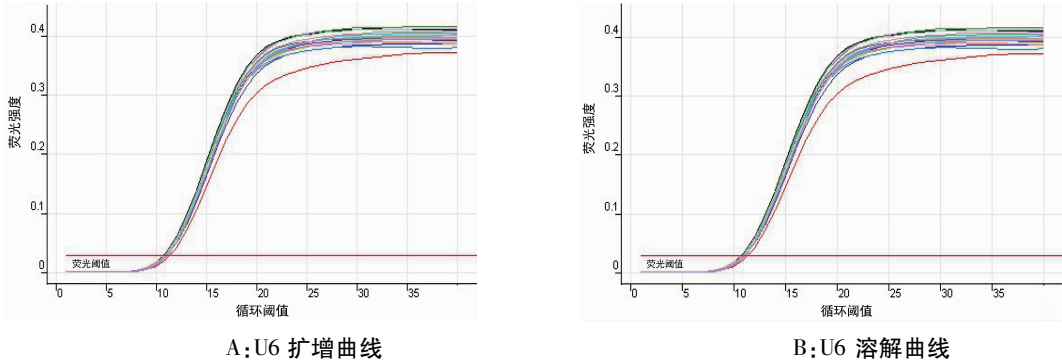


图 2 U6 的 RT-PCR 结果

**2.3 定量分析结果** miRNA-625\* 在膀胱尿路上皮癌和正常膀胱黏膜组织中表达水平分别为  $(3.206 \pm 1.034)$  和  $1.000$ , 差异具有统计学意义  $(P < 0.05)$ 。

### 3 讨论

miRNA 是一类长约 19 ~ 25 个核苷酸的非编码单链 RNA, 广泛存在于植物和动物中, miRNA 与其靶 mRNA 的 3'-UTRs (3'非编码区) 特异性结合而介导翻译水平的调控, 也可引起 mRNA 降解来负调控靶基因, 参与包括细胞凋亡、细胞分化、细胞增殖、生长发育等多种生理病理过程<sup>[6-7]</sup>。虽然对于 miRNA 的生物学功能还尚未完全了解, 但已有研究表明 miRNA 调控 30% 的人类基因表达<sup>[8]</sup>。有令人信服的证据表明, miRNA 参与了包括肺癌、胰腺癌、乳腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、肝癌及白血病等多种肿瘤的发生、发展过程。miRNA 可通过抑制抑癌基因而发挥致癌性作用, 也可以通过抑制原癌基因发挥抑癌性作用<sup>[9]</sup>。很多研究证实了在肿瘤的形成过程中存在 miRNA 的异常表达或缺失。miRNA 的表达具有组织和时期特异性, 不同肿瘤具有不同的 miRNA 表达谱, 这种特异性表达谱将有助于临床上对肿瘤的诊治及预后评估。Veerla 等<sup>[10]</sup> 研究发现 miRNA 的表达与膀胱癌的分期有关, miRNA-10a 在浅表性膀胱癌中呈高表达, miRNA-222、miRNA-125b 在肌层浸润性膀胱癌中具高表达; miRNA-452 在淋巴结阳性患者中亦呈高表达, 并认为 miRNA-452 亦能成为一种预测膀胱癌患者预后的指标。而 miRNA-625\* 在膀胱尿路上皮癌恶性转化中的作用研究国内外均未见报道, 本研究发现, miRNA-625\* 在膀胱尿路上皮癌中的表达显著上调, 提示 miRNA-625\* 可能在膀胱尿路上皮癌中起一定的致癌作用。

Saito 等<sup>[11]</sup> 发现 miR-127 位于 CpG 岛内, 在膀胱癌细胞系 T24 中低表达, 经 5-Aza-CdR 及 PBA 处理后可引起 miR-127 的高表达, 并使其靶基因 BCL6 表达降低, 从而为 miRNA-625\* 针对 miRNA 的膀胱癌治疗提供了线索。有学者研究显示 miRNA-143 在膀胱癌中表达降低, 恢复 miRNA-143 的表达可引起 COX-2 表达下调, 从而抑制细胞增殖和迁移<sup>[12]</sup>。由此可看出, miRNA 及其调节相应靶基因作用的紊乱导致了肿瘤的发生和发展, 也给 miRNA-625\* 及其靶基因的功能和作用机制分析提供了一定的理论

基础。因此, 检测膀胱尿路上皮癌患者 miRNA-625\* 表达水平, 可以为膀胱尿路上皮癌患者的治疗和预后提供判断依据, 并为实现肿瘤靶向治疗提供新靶点。但是 miRNA-625\* 在调控膀胱尿路上皮癌肿瘤发生中的具体分子机制仍不清楚, miRNA-625\* 所调控的下游靶基因信号通路也尚待进一步深入研究。

### 【参考文献】

- [1] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学(上册)[M]. 济南: 山东科技出版社, 2004: 4478.
- [2] Wen CHENG, Zhifeng WEI, Jianping GAO, et al. Effects of combined siRNA-TR and -TERT on telomerase activity and growth of bladder transitional cell cancer BIU-87 cells[J]. Huazhong Univ Sci Technol[Med Sci], 2010, 30(3): 391-396.
- [3] Shell S, Park SM, Radjabi AR, et al. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(27): 11400-11405.
- [4] Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interferencebased therapeutics[J]. Nature, 2009, 457(7228): 426-433.
- [5] 王小红, 王军青, 王志君, 等. HLA-G 在子痫前期患者与正常妊娠胎盘中的差异表达[J]. 东南国防医药, 2010, 12(1): 18-20.
- [6] 徐 锋, 高建平, 程 文. MicroRNA 和肿瘤[J]. 东南国防医药, 2008, 10(6): 436-438.
- [7] 程 文, 高建平, 张征宇, 等. II 级膀胱尿路上皮癌 microRNA 差异表达及意义[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(1): 48-52.
- [8] Gu S, Jin L, Zhang F, et al. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs[J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(2): 144-150.
- [9] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and function in cancer[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(12): 580-587.
- [10] Veerla S, Lindgren D, Kvist A, et al. miRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31[J]. Int J Cancer, 2009, 124(9): 2236-2242.
- [11] Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells[J]. Cancer Cell, 2006, 9(6): 435-443.
- [12] Song T, Zhang X, Wang C, et al. Expression of miR-143 reduces growth and migration of human bladder carcinoma cells by targeting cyclooxygenase-2[J]. Br J Cancer, 2010, 102(5): 883-891.

(收稿日期: 2013-06-20; 修回日期: 2014-01-14)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)