

PTEN、PI3K 和 miR-21 在胃癌中的表达及相关性研究

唐敏, 童仕伦

(武汉大学人民医院胃肠外科, 湖北 武汉 430060)

摘要:目的 探讨第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白基因 (PTEN)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 和 miR-21 在胃癌中的表达及相互关系。方法 收集 77 例胃癌患者手术切除的胃癌组织及胃黏膜组织标本, 应用荧光定量 RT-PCR 及 Western blotting 技术检测 miR-21、PTEN 和 PI3K 蛋白的表达水平, 并分析 miR-21 与 PTEN/PI3K 信号通路之间的关系, 以及与临床病理参数之间的相关性。结果 胃癌组织中 miR-21 及 PI3K 蛋白的表达水平均明显高于胃黏膜组织 ($P < 0.05$), PTEN 蛋白的表达水平则明显降低 ($P < 0.05$); 胃癌组织中 PTEN 蛋白的表达与肿瘤浸润深度、分化、TNM 分期、淋巴转移有关 ($P < 0.05$), PI3K 蛋白的表达与肿瘤淋巴转移和 TNM 分期有关 ($P < 0.05$); 胃癌组织中 PTEN 蛋白的相对表达水平与 miR-21 和 PI3K 蛋白表达呈负相关 ($r = -0.428, P < 0.05$; $r = -0.517, P < 0.05$)。结论 miR-21 可能通过抑制 PTEN, 激活 PI3K 信号通路参与胃癌的发生发展。

关键词: 胃癌; 第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白基因; 磷脂酰肌醇 3-激酶; miR-21

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.11.020

Expressions of PTEN, PI3K and miR-21 in gastric cancer and their correlations

TUO Min, TONG Shilun

(Department of Gastrointestinal Surgery, The People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and miR-21 in gastric cancer (GC) and normal gastric tissues and their correlation. **Methods** Using Western blotting and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), we examined the expression of PTEN, PI3K and miR-21 in 77 cases of gastric cancer tissues and paired normal gastric tissues. **Results** Compared with normal gastric tissues, the gastric cancer tissues showed a significantly higher expression of miR-21 ($t = 16.7685, P < 0.05$) and PI3K ($t = 11.3991, P < 0.05$), but significantly lower PTEN expression ($t = 18.3813, P < 0.05$). The expression of PTEN protein in gastric cancer was highly correlated with the degree of differentiation, invasion depth, lymph node metastasis and TNM stage ($P < 0.05$). PI3K protein expression was associated with TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). PTEN protein expression was negatively correlated with the expression of miR-21 ($r = -0.428, P < 0.05$) and PI3K protein ($r = -0.517, P < 0.05$) in gastric cancer tissues. **Conclusions** miR-21 promotes gastric carcinogenesis via inhibiting PTEN expression which in turn upregulating the expression of PI3K in gastric cancer cells.

Key words: Gastric cancer; PTEN; PI3K; miR-21

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 它的发生与发展受到多因素、多步骤、多基因的影响。miRNA 是一类具有调控功能的非编码小分子 RNA, 其大小约 22~28 个核苷酸。近年来, 研究发现, 作为一种原癌基因或抑癌基因, miRNA 在肿瘤形成和发展中起着关键作用, 通过转录后抑制, miRNA 可以调控目标蛋白的翻译, 诱导目标蛋白转录停止或降解^[3], 因此, miRNA 在癌症中的作用逐渐成为近年来研究的热点。其中, miRNA-21 (下文简称 miR-21) 在肿瘤的研究中最受关注。研究发现, 多种人

类肿瘤细胞中过表达 miR-21, miR-21 特异性地识别并结合到目标 mRNA 的 3' 非翻译区, 结果降解目标 mRNA 或导致目标 mRNA 翻译抑制, 从而对基因转录后表达进行调控, 并参与调节许多重要的细胞活动^[4]。第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因 (PTEN) 可能是 miR-21 的靶基因^[5]。到目前为止, PTEN 是首个被发现的具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 大部分肿瘤的发生发展、侵袭和转移与其突变或缺失密切相关^[6]。在肿瘤组织中 PTEN 的表达下调或者缺失突变, 可激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路, 从而导致肿瘤的发展和侵袭转移^[7]。目前, 关于胃癌中

PI3K 信号通路、PTEN, miR-21 表达及其相互关系的研究较少。在本研究中,我们检测了 miR-21、PTEN 和 PI3K 在胃癌组织中的表达,并分析了 miR-21、PTEN 和 PI3K 与胃癌患者临床病理特征之间的关系,可能为临床治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从 2014 年 1 月—2016 年 1 月,共收集了武汉大学人民医院胃肠外科手术切除的胃癌及胃黏膜组织标本 77 例。其中男 47 例(61%),女 30 例(39%),年龄 29 ~ 77 岁,中位年龄 54 岁。标本的直径约 0.5 cm,取自于手术的新鲜标本先用液态氮冻存,然后转移至 -80 °C 冰箱保存待用。所有肿瘤组织学标本均为腺癌。患者在术前、术中无肿瘤治疗。胃黏膜组织标本取自于 >5 cm 的肿瘤边缘。标本取自同一患者不同部位,患者年龄、性别构成都是相同的,不用进行统计学比较。

1.2 荧光定量 RT-PCR 法检测 miR-21 表达水平

(1)总 RNA 的提取及 cDNA 的合成:用 TRIzol 法提取总 RNA,用紫外吸收法测定 RNA 浓度和纯度,然后用分光光度计 ND1000 进行 RNA 量化。以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA[试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司],反转录在 37 °C 下进行 60 min,85 °C 5 s,完成后获得 cDNA,冰上冷却后 -20 °C 保存备用;(2)引物的设计:引物根据 miR-21, U6 cDNA 序列设计,miR-21 的产物长度 85 bp, U6 的产物长度 70 bp,所有的 PCR 引物都是从美国 GeneCopoeia 公司购买;(3)荧光定量 PCR:按 25 μ L 反应体系依次加入:PCR Master Mix 12.5 μ L、cDNA 1 μ L、上游引物 1 μ L、下游引物 1 μ L、灭菌去离子水至 25 μ L,反应参数为:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火延伸 34 s,40 个循环,反应用 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪,从美国 Bio-Rad 公司购买,测定每个样品 miR-21, U6 的 Ct 值,为了减少操作中的误差,所有样品均作了复孔;(4)miR-21 相对表达值的计算运用双标准曲线法。

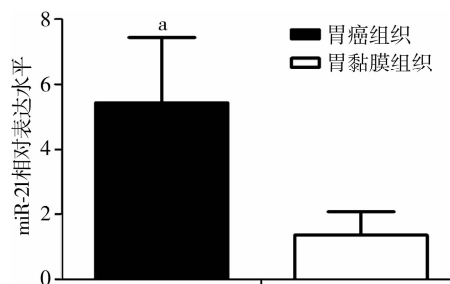
1.3 Western blotting 法检测 PTEN 蛋白和 PI3K 蛋白的相对表达水平 取每个患者的胃癌组织约 50 ~ 100 mg,抽提组织蛋白,蛋白样本浓度用考马斯亮蓝检测。蛋白质样品在电泳前按照 5:1 比例添加 6 $\times$ loading buffer,煮沸 5 min 后就可应用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳:配制 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,有 5% 积层胶和 10% 分离胶,电泳的条件 90 V、30 min,120 V、90 min。转膜的条件:4 °C 条件下 27 V 湿转 10 h。5% 脱脂奶粉(TBS 溶解)室温下封闭 1 h,然后添加稀释后的一抗(按 1:100 稀

释鼠抗人 PTEN 抗体,按 1:200 稀释鼠抗人 PI3K 抗体,按 1:3 000 稀释鼠抗人 GAPDH 抗体),室温孵育 1 h,4 °C 环境下过夜,后用 TBST 液漂洗 6 次,每次 5 min 后加入稀释好的二抗(1:1 500),室温孵育 1 h。TBST 漂洗 5 min $\times$ 6 次。用滤纸吸干膜表面水分,使用 Odyssey V3.0 扫描成像系统获得蛋白质图像条带。相对灰度值的分析运用 Quantity one 扫描软件。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 版统计软件进行数据分析,获得的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据在分析前需行正态性检验,如果数据呈正态分布或经转换后数据呈正态分布,则用 t 检验分析两组间数据,若检验后数据不符合正态性,则采用秩和检验,运用 χ^2 检验分析计数资料,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织标本中 miR-21 的表达结果 在胃癌及胃黏膜组织中 miR-21 的相对表达水平分别为 (5.44 ± 2.01) 、 (1.36 ± 0.72) ,在胃癌组织中 miR-21 的表达明显高于胃黏膜组织($t = 16.7685$, $P < 0.05$),见图 1。



注:^a $P < 0.05$ 。

图 1 胃癌及癌旁胃黏膜组织中 miR-21 的表达

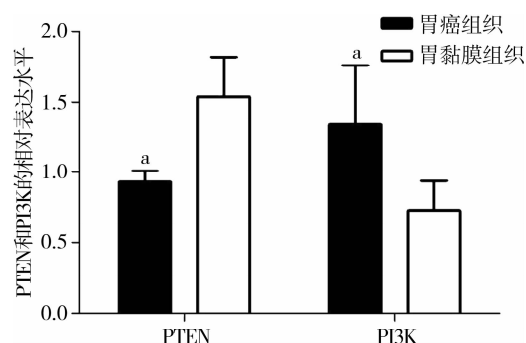
2.2 组织标本中 PTEN、PI3K 蛋白的表达结果

胃癌和胃黏膜组织 PTEN 蛋白的相对表达水平分别为 (0.93 ± 0.08) 、 (1.54 ± 0.28) ,胃癌组织中 PTEN 蛋白的表达显著低于胃黏膜组织,两组比较差异有统计学意义($t = 18.3813$, $P < 0.05$);在胃癌和胃黏膜组织中 PI3K 蛋白的相对表达水平分别为 (1.34 ± 0.42) 、 (0.73 ± 0.21) ,胃癌组织中 PI3K 蛋白的表达明显高于胃黏膜组织,差异有统计学意义($t = 11.3991$, $P < 0.05$),见图 2。

2.3 胃癌组织中 PTEN、PI3K 蛋白的表达与患者临床病理特征间的关系 胃癌组织中 PTEN 蛋白的相对表达与患者的年龄、性别无关,与肿瘤浸润深度、分化程度、淋巴转移、TNM 分期相关,两者间相

表1 胃癌组织中 PTEN、PI3K 蛋白的表达与患者各临床病理特征间的关系

临床病理特征	例数	PTEN			PI3K		
		$\bar{x} \pm s$	t 值	P 值	$\bar{x} \pm s$	t 值	P 值
年龄/岁							
<65	41	1.01 ± 0.11	0.970 9	>0.05	1.33 ± 0.54	0.453 9	>0.05
≥65	36	1.03 ± 0.06			1.39 ± 0.62		
性别							
男	47	0.89 ± 0.09	1.262 6	>0.05	1.37 ± 0.44	0.460 7	>0.05
女	30	0.92 ± 0.11			1.31 ± 0.69		
分化程度							
低分化	58	0.49 ± 0.32	14.033 7	<0.05	1.41 ± 0.77	0.436 6	>0.05
中/高分化	19	1.57 ± 0.17			1.32 ± 0.81		
TNM 分期							
I/II	33	1.54 ± 0.27	12.079 1	<0.05	0.93 ± 0.76	5.707 2	<0.05
III/IV	44	0.51 ± 0.43			1.87 ± 0.68		
浸润深度							
T1/T2	28	1.68 ± 0.39	10.640 9	<0.05	1.35 ± 0.53	0.210 1	>0.05
T3/T4	49	0.37 ± 0.58			1.42 ± 0.64		
淋巴结转移							
N0/N1	20	1.74 ± 0.63	9.064 6	<0.05	0.87 ± 0.83	5.569 0	<0.05
N2/N3	57	0.36 ± 0.57			1.92 ± 0.67		



注: ^a $P < 0.05$ 。

图2 胃癌和胃黏膜组织中 PTEN、PI3K 蛋白的表达

比差异有统计意义($P < 0.05$);PI3K 蛋白的表达水平与患者年龄、性别、肿瘤浸润深度、分化程度无关,而与肿瘤 TNM 分期及淋巴结转移相关,两者间相比差异有统计意义($P < 0.05$),见表1。

2.4 胃癌组织中 miR-21、PTEN、PI3K 的相关性分析 胃癌组织中 PTEN 蛋白相对表达水平与胃癌组织 miR-21 和 PI3K 蛋白表达均呈负相关($r = -0.428, P < 0.05$; $r = -0.517, P < 0.05$);miR-21 相对表达和 PI3K 蛋白表达呈正相关($r = 0.486, P < 0.05$)。

3 讨论

位于 17q23.2 染色体 FRA17B 脆性区域上,作为 miRNAs 家族中的重要一员,具有自主转录单位的 miR-21 逐渐成为近几年的研究热点之一。研究

证明,miR-21 在多种肿瘤细胞和组织中的表达均出现明显异常,并参与调控多种抑癌基因的表达^[8],提示 miR-21 作为一个致癌 miRNA,参与多种肿瘤的发生和发展,并发挥着重要的作用。同时,在对乳腺癌、视神经母细胞瘤及胆管细胞癌等肿瘤的研究中发现,miR-21 调节细胞增殖、凋亡,影响细胞正常功能^[9]。以上的研究均表明,在肿瘤中,miR-21 扮演癌基因类似的生物学角色。在本研究中,通过检测 77 例胃癌患者胃癌组织,正常胃黏膜组织中 miR-21 的表达水平,得出 miR-21 在癌组织中的表达高于正常组织。Huang 等^[10-11]也有类似的报道。PTEN 位于染色体 10q23.3,共含有 8 个内含子和 9 个外显子,是目前发现的第一个拥有磷酸酶活性的抑癌基因,在细胞的生长发育、增殖、凋亡,信号传导中发挥关键作用^[12]。PTEN 已被证实可负性调控 PI3K/Akt 信号通路,也可抑制 ERK/MAPK 相关信号通路,是 miR-21 其中一个重要的靶基因^[13]。目前研究发现,在多种肿瘤组织中 PTEN 的表达是下降或缺失的^[14]。张国欣等^[15]的研究表明,PTEN 蛋白在大肠癌中的表达与肿瘤组织分化程度及淋巴结转移明显相关。Xu 等^[16]也发现,随着肿瘤恶性程度的上升,食管癌中 PTEN 蛋白的表达下降。我们推断,由于 PTEN 基因发生突变,失去对细胞生长负调控,进而导致了肿瘤的产生。在本研究中,我们发现胃癌组织中 PTEN 低表达,其表达水平与肿

瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期有关,并且与 miR-21 和 PI3K 蛋白表达呈负相关。这一结果与熊兵红^[17]在结直肠癌中的研究结果一致。

PI3K 通路是继 Ras 通路后另一个被发现的与肿瘤发生紧密相关的通路,其活性异常不仅与肿瘤细胞的迁移、黏附相关,而且能使细胞发生恶性转化,并参与细胞外基质的降解及肿瘤血管生成。近年对大肠癌、肺癌、胰腺癌等多种肿瘤的研究发现,PI3K 在上述癌组织中表达明显增高,并异常激活 Akt 导致肿瘤的发生发展,PI3K 的过度活化可能是细胞发生癌变的一个必要因素^[18]。在本研究中,PI3K 蛋白在胃癌组织中的表达水平明显高于正常胃黏膜组织,且 PI3K 表达水平与有无淋巴结转移明显相关,肿瘤 TNM 分期越高,PI3K 蛋白表达水平越高,提示 PI3K 信号通路亦参与了胃癌的发生发展,并与胃癌的侵袭转移有关,对评估胃癌预后有一定意义。尹雯^[19]在大肠癌中也得出了类似的结果。现已有的研究证实,PTEN、PI3K 和 miR-21 在消化道肿瘤发生、发展中均起到至关重要的调控作用^[20-21],但这三者在胃癌中的相互关系的研究较少。本研究首次将 miR-21 与 PTEN/PI3K 信号通路联系起来,并观察到胃癌组织中 PI3K 蛋白的相对表达与 PTEN 蛋白呈负相关,与 miR-21 呈正相关,提示 miR-21 可能通过抑制 PTEN 而激活 PI3K 信号通路,从而促进肿瘤细胞转化,并通过其对靶基因的调控,参与肿瘤细胞的侵袭、转移,其具体的机制尚需要进一步的研究来证实。

参考文献

- [1] YANG Y,DAI C,CAI Z,et al. The role of miRNAs in cisplatin - resistant hela cells[J]. Bioinformatics Research and Applications, 2015,9096:355-365.
- [2] AHERNE ST,LAO NT. Manipulating miRNA expression to uncover hidden functions[J]. Methods Mol Biol,2017,1509:151-160.
- [3] LOCHHEAD RB,STRLE K,KIM ND,et al. MicroRNA expression shows inflammatory dysregulation and tumor-like proliferative responses in joints of patients with postinfectious lyme arthritis[J]. Arthritis & Rheumatology,2017,69(5):1100-1110.
- [4] LIN L,GAN H,ZHANG H,et al. MicroRNA-21 inhibits SMAD7 expression through a target sequence in the 3' untranslated region and inhibits proliferation of renal tubular epithelial cells[J]. Mol Med Rep,2014,10(2):707-712.
- [5] YANG Y,GUO JX,SHAO ZQ. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion:An experimental study[J]. Asian Pac J Trop Med, 2017,10(1):87-91.
- [6] LI C,SONG L,ZHANG Z,et al. MicroRNA-21 promotes TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer through up-regulating PTEN expression[J]. Oncotarget, 2016,7(41):66989-67003.
- [7] CHEN Q Z,LI Y,SHAO Y,et al. TGF- β 1/PTEN/PI3K signaling plays a critical role in the anti-proliferation effect of tetrandrine in human colon cancer cells[J]. International Journal of Oncology, 2017,50(3):1011-1021.
- [8] LIU J,ZHU H,YANG X,et al. MicroRNA-21 is a novel promising target in cancer radiation therapy[J]. Tumour Biol,2014,35(5):3975-3979.
- [9] LIU RH,NING B,MA XE,et al. Regulatory roles of microRNA-21 in fibrosis through interaction with diverse pathways (Review)[J]. Mol Med Rep,2016,13(3):2359-2366.
- [10] HUANG S,WANG J,LI J,et al. Serum microRNA expression profile as a diagnostic panel for gastric cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2016,46(9):811-818.
- [11] TREECE AL,DUNCAN DL,TANG W,et al. Gastric adenocarcinoma microRNA profiles in fixed tissue and in plasma reveal cancer-associated and epstein-barr virus-related expression patterns[J]. Lab Invest,2016,96(6):661-671.
- [12] LESLIE NR,KRIPLANI N,HERMIDA MA,et al. The PTEN protein;cellular localization and post-translational regulation[J]. Biochem Soc Trans,2016,44(1):273-278.
- [13] SETIA S,NEHRU B,SANYAL SN. Upregulation of MAPK/Erk and PI3K/Akt pathways in ulcerative colitis-associated colon cancer[J]. Biomedecine & Pharmacotherapie, 2014,68(8):1023-1029.
- [14] HERTOGE JD. Tumor suppressors in zebrafish:from TP53 to PTEN and beyond[J]. Adv Exp Med Biol,2016,916:87-101.
- [15] 张国欣,钱忠义,杨丽娟,等. 结直肠腺癌中 PTEN 和 NDRG1 的表达及其与预后的关系[J]. 中华病理学杂志,2017,46(4):240-244.
- [16] XU X,CHEN G,WU L,et al. Association of genetic polymorphisms in PTEN and additional gene-gene interaction with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese han population[J]. Dis esophagus,2016,29(8):944-949.
- [17] 熊兵红. MiR-21 通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路调控结直肠癌侵袭转移的机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2014.
- [18] LIEN EC,DIBBLE CC,TOKER A. PI3K signaling in cancer; beyond AKT[J]. Curr Opin Cell Biol,2017,45:62-71.
- [19] 尹雯. EGFR、PI3K 及 PTEN 蛋白在大肠癌、胃癌和食管癌表达的研究[D]. 大连:大连医科大学,2012.
- [20] 张芬,王志红. PTEN 在胃癌中的研究进展[J]. 安徽医药, 2012,16(11):1691-1693.
- [21] WU YR,QI HJ,DENG DF,et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation, migration, and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in esophageal cancer[J]. Tumour Biol,2016,37(9):12061-12070.

(收稿日期:2017-03-25,修回日期:2017-05-04)