

膀胱尿路上皮癌石蜡包埋组织中miR-20a的表达与复发的相关性分析



任海林¹, 李晓娜², 陈国俊¹, 索吉明¹, 孙 岩³, 王 健¹

Correlation Analysis of miR-20a Expression and Relapse in Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue of Urothelial Carcinoma of Bladder

REN Hailin¹, LI Xiaona², CHEN Guojun¹, SUO Jiming¹, SUN Yan³, WANG Jian¹

1. Department of Urology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Qinghai; 3. Tianjin Institute of Urinary Surgery

Corresponding Author: WANG Jian; E-mail: urologychaina@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the feasibility of extracting microRNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue of bladder urothelial carcinoma (UC), and analyze the correlation among miR-20a expression, clinicopathologic feature and the relapse. **Methods** The expression levels of miR-20a in freshly frozen (FF) and FFPE tissues from 50 cases of bladder UC were detected by quantitative real-time PCR. The expression levels of miR-20a in FFPE tissue from 181 cases of bladder UC and its correlation with the relapse in different years were analyzed. **Results** The expression of miR-20a were closely correlated in FFPE and FF tissue ($r=0.792, P<0.001$). The expression levels of miR-20a in FFPE tissue in different years were stable ($P>0.05$). The expression of miR-20a was closely correlated with clinicopathological features. The relapse rate of patients with high expression of miR-20a was significantly higher ($P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of miR-20a in FF and FFPE tissue of bladder UC were consistency and reliable, hence, it is feasible to extract and study the microRNA in FFPE tissues. The role of miR-20a was correlated with its expression level, and a high expression level is the independent factor of postoperative relapse.

Key words: Bladder neoplasms; miR-20a; Formalin-fixed paraffin-embedded tissue; Relapse

摘要: 目的 探讨膀胱尿路上皮癌(膀胱癌)石蜡包埋组织中提取microRNA的可行性, 分析miR-20a在膀胱癌石蜡包埋组织中的表达情况与临床病理特征及术后复发的关联性。**方法** 荧光定量RT-PCR法检测50例新鲜膀胱癌组织和对应的石蜡包埋组织中miR-20a基因表达的相关性, 分析不同年度间181例石蜡包埋膀胱癌组织中miR-20a基因的表达, 并与患者术后复发进行相关性分析。**结果** 石蜡包埋膀胱癌组织与新鲜冷冻组织中miR-20a的表达密切相关 ($r=0.792, P<0.001$); 不同年度间石蜡组织的miR-20a表达稳定, 差异无统计学意义。miR-20a表达量与肿瘤临床特征明显相关, 高表达患者其术后复发明显增高 ($P<0.05$)。**结论** 石蜡包埋膀胱癌组织与新鲜冷冻组织中miR-20a的表达有一致性, 用石蜡组织提取microRNA是可行的, 膀胱癌细胞中miR-20a的作用与其表达量相关, 高表达是术后复发的独立因素。

关键词: 膀胱肿瘤; miR-20a; 石蜡包埋组织; 复发

中图分类号: R737.14 文献标识码: A

0 引言

现阶段用于microRNA(miRNA)的基因检测多源于新鲜组织, 由于新鲜组织的获得和长期无破

坏保存都不易, 因此不能满足相关研究的需要。本课题前期研究发现在新鲜膀胱尿路上皮细胞癌(膀胱癌)组织中miR-20a明显高表达^[1-2]。本研究期望通过研究膀胱癌石蜡包埋组织中miR-20a的表达, 探索石蜡包埋组织中提取miRNA的可行性, 并回顾性分析miR-20a表达与膀胱癌术后复发之间是否存在相关性。

收稿日期: 2013-04-02; 修回日期: 2013-07-17
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30700834); 青海大学附属医院中青年科研基金项目 (ASRF-2011-14)
作者单位: 1.810001 青海西宁, 青海大学附属医院泌尿外科; 2.青海省人民医院检验科; 3.天津市泌尿外科研究所

通信作者: 王健, E-mail: urologychaina@hotmail.com
作者简介: 任海林 (1973-), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事泌尿系肿瘤研究

1 资料与方法

1.1 资料

调取2010年50例膀胱癌的新鲜冷冻（-80℃）保存样品，同时将这50例组织进行石蜡包埋处理，另取5例经输尿管镜取石患者的正常膀胱黏膜石蜡组织作为对照，其中男3例、女2例，年龄25~75岁。比较石蜡包埋与新鲜冷冻组织miRNA表达的相关性。调取2001年2月~2005年2月间临床随访资料完整的181例膀胱尿路上皮癌的石蜡包埋组织，另取这5年间20例经输尿管镜取石患者的正常膀胱黏膜石蜡包埋组织作为对照，其中男15例、女5例，年龄25~75岁。患者术前均未行放疗、化疗与免疫治疗，均行膀胱部分切除术或经尿道膀胱肿瘤电切术、术后均行膀胱灌注吡柔比星或羟基喜树碱治疗，无全身放化疗患者。181例膀胱尿路上皮癌石蜡包埋组织中男120例、女61例，年龄22~85岁、平均65.2岁。组织病理分级按照WHO（2004年）分级标准，其中高分化103例、低分化78例，见表1。

石蜡标本总RNA提取试剂盒购自美国ABI公司；miR-20a和内参U6反转录引物，miR-20a和U6的引物和荧光探针混合体系，2×PCR TaqMan® Universal PCR，TaqMan® MicroRNA反转录试剂盒均购自ABI公司。

1.2 方法

1.2.1 基因表达的检测 每份石蜡包埋组织切取20 μm厚度5片，二甲苯和乙醇脱蜡后，蛋白酶50℃消化3 h，按试剂盒说明书提取总RNA。核

表1 石蜡包埋组织中miR-20a表达与临床病理的分析
Table1 Clinicopathological parameters for patients with bladder transitional cell carcinoma and their associations with the levels of miR-20a (*P*-value was calculated by χ^2 test)

Parameter	Variables	Low levels miR-20a	High levels miR-20a	<i>P</i>
Age(years)				0.879
≤60	72	49	23	
≥61	109	73	36	
Gender				0.795
Male	120	81	39	
Female	61	40	21	
Tumor No.				0.018
Single	95	72	23	
Multiple	86	51	35	
Tumor size				0.009
<3 cm	91	71	20	
≥3 cm	90	54	36	
Tumor grade				0.000
High	103	93	10	
Low	78	33	45	
Tumor stage				0.000
Ta-T1	122	99	23	
T2a-T2b	59	27	32	
Relapse				0.000
Yes	65	30	35	
No	116	95	21	

酸定量仪检测并调整RNA浓度。新鲜组织总RNA的提取按常规方法进行^[1]。按microRNA反转录试剂盒说明书，以提取的总RNA为模板，用miR-20a和U6反转录引物（5×TaqMan® Gene Expression Assay Mix）反转录合成miR-20a和U6第一链，反应条件：16℃ 30 min，42℃ 30 min，85℃延长5 min；然后按2×PCR TaqMan® Universal PCR试剂盒说明，以miR-20a和U6第一链为模板，用miR-20a和U6荧光探针（10×TaqMan® Gene Expression Assay Mix）为引物扩增；反应条件：95℃预变性10 min，95℃变性15 s，60℃延长60 s，共计40个循环。以上荧光PCR检测均在7900HT型荧光定量PCR仪（ABI公司）操作完成，检测方法为相对定量分析2^{-ΔΔCt}法，每次实验每个样品至少设立3个重复，重复3次实验。

1.2.2 随访 术后前两年每3月随访一次，第三年开始每6月随访一次，随访内容包括尿常规、尿脱落细胞、泌尿系B型超声、膀胱镜检查等。随访时间截止2010年12月31日。

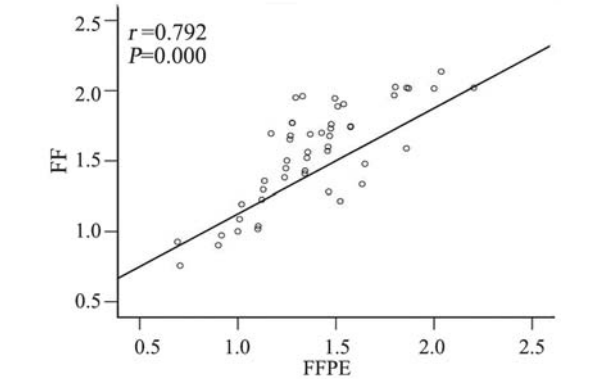
1.3 统计学方法

采用SPSS11.5软件对数据进行统计处理。新鲜组织与石蜡包埋组织中miR-20a分析比较用Wilcoxon秩和检验；不同年度间组织miR的表达用Kruskal-Wallis H检验；miR-20a表达与临床病理特征的分析采用 χ^2 检验；分析复发率由Kaplan-Meier法评估，用Cox回归进行多因素分析，Log rank法检验单因素对复发率影响的差异，以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-20a在膀胱肿瘤中的表达

新鲜组织和石蜡组织中miR-20a的表达都明显升高，石蜡组织和新鲜组织之间的表达存在明显相关性（*r*=0.792，*P*=0.000），见图1；不同年度间石蜡组织的miR-20a表达稳定，相对表达量中位数均在1.4附近，差异无统计学意义（*H*=22.636，*P*=0.533），见图2，可见miR-20a的2^{-ΔΔCt}值的中位数均在1.4附近。为定量分析miR-20a表达量对临床病理特征的影响，我们将miR-20a的2^{-ΔΔCt}值≥1.5定为高表达，<1.5为低表达；石蜡组织中miR-20a表达与临床病理的相关分析，见表1；将表1用Cox多因素回归分析，结果显示：肿瘤分期、肿瘤分化、miR-20a高表达3个因素是术后复发的独立因素，见表2。



miR-20a was significantly associated between the FF and their corresponding FFPE tissues.(FF:freshly frozen,FFPE:formalin-fixed paraffin-embedded)

图1 miR-20a在石蜡组织和新鲜组织之间表达的相关性分析

Figure1 Correlation analysis of miR-20a expression between fresh frozen and FFPE tissue samples

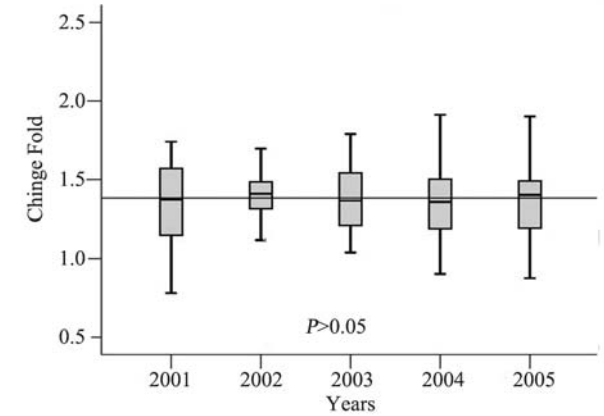


图2 miR-20a在不同年度石蜡组织之间表达的一致性分析

Figure2 The consistency analysis of expression levels of miR-20a in different years in FFPE tissues

表2 影响术后复发因素的Cox回归分析结果

Table2 Multivariate Cox regression analysis of overall relapse factors

Parameter	P	Hazard ratio	95% CI
G2G3/G1	0.000	7.903	2.998-17.685
(T _a -T ₁)/(T _{2a} -T _{2b})	0.001	1.627	0.711- 5.212
High expressed miR-20a	0.000	2.944	1.320- 9.857

2.2 miR-20a表达与肿瘤复发之间的关系

随访时间6~60月，平均随访35.7月，181例患者中共有65例复发，复发率为35.91%。其中高表达miR-20a的56例患者中有35例复发，复发率为62.50%，平均复发时间为13.11月；Log rank法检验miR-20a低表达和高表达之间差异有统计学意义（P=0.000），见图3。

3 讨论

miRNA是由DNA转录产生的非编码小RNA

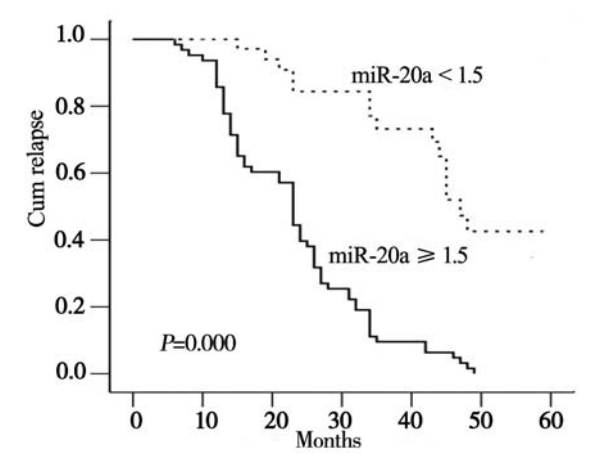


图3 miR-20a表达与复发的相关分析

Figure3 The correlation analysis of miR-20a expression and relapse

序列，由约18~25个核苷酸组成，不翻译成蛋白质，通过碱基互补的方式结合到靶信使RNA (mRNA)的3'非翻译区，从而抑制其翻译，但不影响其转录^[3]。通过转录后基因沉默效应调控多种抑癌基因或癌基因的表达，起促癌和抑癌的双向作用。微阵列研究证实，每个miRNA可以调控上百个基因的表达，即一个miRNA能靶向作用于上百个mRNA，而且多个miRNA也能作用于同一个mRNA^[4]，传统上新鲜组织一直是miRNA检测来源的“金标准”，但在研究实践中，新鲜组织大量获取和无破坏的长期保存相对困难，且新鲜组织的临床资料相对不完整。临床资料比较完整的病例其病理材料大部分都是石蜡包埋组织，而且获取和保存相对容易，因此研究人员开始探索在石蜡组织中提取miRNA，国内外已有研究认为石蜡包埋组织处理过程对miRNA自溶、交联、断裂的影响较小^[5-6]。本研究也认为石蜡包埋组织中miRNA可被提取并通过荧光PCR法精确定量，miRNA在新鲜组织与石蜡组织间具有良好的相关性，不同年度间石蜡组织的miRNA表达也基本稳定，具有可比性。本研究证实经石蜡包埋组织提取miRNA是可行的，石蜡包埋处理及长期存放对组织中miRNA的研究无明显影响。通过临床资料完整的、数量丰富的石蜡包埋组织对miRNA进行研究，将进一步揭示miRNA的生物学作用。

miRNA通过转录后基因沉默效应不仅决定靶蛋白的转录与否，而且可以精细调节靶蛋白的产量^[7]，同时靶蛋白也对miRNA具有调节作用^[8]，二者相互作用、精细调节细胞的生命活动，以防止如肿瘤等过度增殖性疾病的发生。miRNA在基因组上的分布是成簇的，通过一个共同的启动子被

转录^[9]。miR-20a是mir-17-92基因簇的成员，研究发现miR-20a在许多肿瘤组织中有明显变化^[10]。细胞实验证实抑制miRNA-20后，细胞凋亡增加，推测miRNA-20可能有促癌作用^[11-12]。本研究发现：相对正常组织，miR-20a在膀胱移行细胞癌中的表达升高，这种升高与肿瘤的病理分期、临床分期以及肿瘤大小和直径都密切相关，在Cox多因素分析中，如miR-20a在肿瘤中表达升高超过正常值1.5倍，则患者可能处于一种疾病进展的状态，即容易复发。如表达不到1.5倍，患者可能处于一种疾病静止的状态；因此miR-20a可能在膀胱癌中有双向作用，其抑癌或是促癌效应取决于表达量的多少。已有一项引入数理推论的研究^[13]显示：miRNA的活性调控可能与其各自表达量有重要关系，各自有相应的阈浓度，各调节因子数量的失衡很可能是调节失控的始动因素，并试图建立数学预测模型，本研究也支持了这种可能性。

本研究认为一种miRNA对癌变细胞起抑制或促进作用不但取决于表达的组织，也取决于其表达量的多少。再次证明了miRNA对细胞生命活动的调节是非常精细的。对miRNA的研究不但要定性，而且需要精确的定量，才能进一步明确miRNA的生物学功能。因此下一步的重点是研究其可能的靶基因和靶蛋白，完整地阐明miR-20a的调控机制。

参考文献:

[1] Ren HL, Sun Y, Li SB, *et al.*The correlation of E2F3, miR-17-5p and miR-20a in transitional cell carcinoma of bladder[J]. Zhonghua Mi Niao Wai Ke Za Zhi, 2012, 33(4):264-7.[任海林, 孙岩, 李世斌,等.膀胱尿路上皮癌细胞株E2F3基因与miR-17-5p和miR-20a的相互作用[J].中华泌尿外科杂志, 2012,33(4):264-7.]

[2] HaiLin Ren, Yan Sun, XiaoNa Li, *et al.* Expression of E2F3, miR-

17-5p, miR-20a and their interplay in bladder cancer[J]. Afri J Biotech, 2011,10 (53):11028-32.

[3] Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets[J]. Cell,2003,115(7):787-98.

[4] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. Nature, 2005, 433(7027):769-73.

[5] Zhang X, Chen J, Radcliffe T, *et al.* An Array-based analysis of microRNA expression comparing matched frozen and formalin-fixed paraffin-embedded human tissue samples[J]. J Mole Diagn,2008,10(6):513-9.

[6] Xi Y,Nakajima G,Gavin E, *et al.*Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples[J]. RNA,2007,13(10):1668-74.

[7] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell,2009,136(2):215-33.

[8] Bueno MJ, Gómez de Cedrón M, Laresgoiti U, *et al.* Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling[J]. Mol Cell Biol,2010,30(12):2983-95.

[9] Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G,*et al.* Clustering and conservation patterns of human microRNAs[J].Nucleic Acids Res,2005,33(8):2697-706.

[10] He L, Thomson JM, Hemann MT, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene[J]. Nature, 2005,435(7043):828-33.

[11] Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, *et al.* An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop[J].J Biol Chem,2007,282(4): 2135-43.

[12] Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, *et al.* Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92[J]. Oncogene, 2007,26(41):6099-105.

[13] Aguda BD,Kim Y,Piper-Hunter MG,*et al.*MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92,E2F,and Myc[J].Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,105(50):19678-83.

[编辑：安 风；校对：黄园玲]