

miRNA-324-3p 及其靶基因 WNT2B 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义*

刘超¹ 李果¹ 刘勇¹ 粟忠武¹ 任舒灵¹ 邓腾波¹ 田勇泉¹ 邱元正¹

[摘要] 目的:探讨 miRNA-324-3p 及其靶基因 WNT2B 在鼻咽癌组织中的表达和临床意义。方法:qRT-PCR 技术检测 miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 的相对表达量,Western blot 技术检测 WNT2B 蛋白在 39 例鼻咽癌组织及 21 例鼻咽非肿瘤上皮组织中的表达,分析其表达水平与鼻咽癌临床病理特征的关系。结果:在鼻咽癌组织中 miRNA-324-3p 的相对表达量显著下调($P < 0.01$),WNT2B mRNA 和蛋白的相对表达量则显著上调(均 $P < 0.01$)。鼻咽癌组织中 miRNA-324-3p 与 WNT2B mRNA 及蛋白的表达呈负相关,WNT2B mRNA 与蛋白的表达呈正相关(均 $P < 0.05$)。miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 及蛋白的表达均与鼻咽癌患者 T 分级、临床分期及淋巴结转移密切相关(均 $P < 0.05$),而与患者的性别、年龄无明显相关性(均 $P > 0.05$)。结论:鼻咽癌组织中 miRNA-324-3p 的表达下调,WNT2B 的表达上调,两者可能存在相互关系,共同介导鼻咽癌的发生、发展。

[关键词] 鼻咽肿瘤;miRNA-324-3p;WNT2B;基因

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.21.013

[中图分类号] R739.6 **[文献标志码]** A

The expression and significance of miRNA-324-3p and WNT2B in nasopharyngeal carcinoma

LIU Chao LI Guo LIU Yong SU Zhongwu REN Shuling
DENG Tengbo TIAN Yongquan QIU Yuanzheng

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Otolaryngology Major Disease Research Key Laboratory of Hunan Province, Changsha, 410008, China)

Corresponding author: QIU Yuanzheng, E-mail: xyqyz@hotmail.com

Abstract Objective: To investigate the expression and significance of miRNA-324-3p and its target gene WNT2B in tissue specimens of nasopharyngeal carcinoma (NPC) specimens. **Method:** qRT-PCR was used to detect the expression of miRNA-324-3p and WNT2B mRNA, and Western blot was applied to assay the expression of WNT2B protein in 39 cases of NPC specimens and 21 cases of non-carcinoma epithelium. The relationship between their expression levels and clinicopathological characteristics and their correlation with clinical pathological parameters was analyzed. **Result:** The expression of miRNA-324-3p was significantly down-regulated/decreased but WNT2B mRNA/protein increased obviously in NPC specimens ($P < 0.01$). A negative correlation between miRNA-324-3p and WNT2B was spotted ($P < 0.05$). The expression levels of these markers were closely correlated with T stage, clinic stage and cervical lymph node metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion:** The loss of miRNA-324-3p and ectopic WNT2B might co-induce the initiation and progression of NPC.

Key words nasopharyngeal carcinoma; miRNA-324-3p; WNT2B; gene

鼻咽癌是中国南部高发的头颈部恶性肿瘤,其主要治疗手段为放疗。尽管放疗技术逐步改进,但晚期鼻咽癌患者 5 年生存率并没有明显提高^[1]。不同水平分子如 miRNA、基因、蛋白等的改变参与肿瘤的恶性生物学进展^[2]。我们前期筛选获得鼻咽癌放疗抵抗相关 miRNA 表达谱,并在体外细胞

学研究中发现其中鼻咽癌放疗抵抗相关的 miRNA-324-3p 能靶向 WNT2B 参与鼻咽癌放疗抵抗的调控^[3-4]。因此,本研究在前期基础上分别采用 qRT-PCR 及 Western blot 技术检测 miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 和蛋白在鼻咽癌组织中的表达水平,探讨其表达与鼻咽癌临床病理特征之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

所有标本来自我院 2011-10—2012-10 期间门诊收治的鼻咽肿块患者,均经病理诊断证实,其中鼻咽癌标本 39 例,鼻咽非肿瘤组织标本 21 例。鼻咽癌患者均为低分化鳞状细胞癌,取材前未经放疗及其他治疗,男 28 例,女 11 例;年龄 25~71 岁,

*基金项目:国家自然科学基金(No:81372426, No:81202128, No:81172558);高等学校博士学科点专项科研基金课题(No:20120162120049);中南大学自由探索计划青年教师助推基金(No:2012QNZT099);湖南省博士生创新项目基金(No:CX2013B108);中南大学贵重仪器设备开放共享基金(No:CSUZC2014048)

¹中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科 耳鼻咽喉重大疾病研究湖南省重点实验室(长沙,410008)

通信作者:邱元正, E-mail: xyqyz@hotmail.com

平均 45.3 岁。根据 2008 年国内鼻咽癌分期标准进行分级分期, $T_1N_0M_0$ 5 例、 $T_1N_1M_0$ 4 例、 $T_1N_2M_0$ 6 例、 $T_2N_0M_0$ 4 例、 $T_2N_1M_0$ 3 例、 $T_2N_2M_0$ 5 例、 $T_2N_3M_0$ 3 例、 $T_3N_0M_0$ 1 例、 $T_3N_1M_0$ 1 例、 $T_3N_2M_0$ 2 例、 $T_3N_3M_0$ 3 例、 $T_4N_0M_0$ 1 例、 $T_4N_1M_0$ 1 例; I 期 5 例、II 期 11 例、III 期 15 例、IV 期 8 例。非肿瘤组织标本来自 21 例健康人鼻咽部炎症或正常上皮组织。所有新鲜组织标本均在活检后立即用盐水清除其表面血迹,置入 1.5 ml EP 管后放入液氮罐。上述所有标本的收集均获得患者知情同意,并经过中南大学湘雅医院医学伦理学委员会审查通过。

1.2 主要试剂及来源

TRIzol[®] reagent (Invitrogen, 美国); GAPDH、小鼠抗人 β -Actin 单克隆抗体、SuperQuickRT cDNA 第一链合成试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司); U6、All-in-One[™] miRNA qRT-PCR 检测试剂盒 (GeneCopoeia Inc, 美国); TaqMan Reverse Transcription Reagents、SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, 美国); 兔抗人 WNT2B 单克隆抗体 (Bioss Inc, 美国); 二喹啉甲酸 (BCA) 试剂盒, RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 qRT-PCR 检测技术 按 TRIzol[®] reagent 试剂说明书提取新鲜组织 RNA, 并采用 SuperQuick-RT cDNA 第一链合成试剂盒将其逆转录成互补 DNA (cDNA)。miRNA-324-3p 采用 All-in-One[™] miRNA qRT-PCR 检测试剂盒进行 qRT-PCR 反应, 以 U6 作为内参照; WNT2B mRNA 采用 Taq-Man Reverse Transcription Reagents 和 SYBR-Green PCR Master Mix 进行 qRT-PCR 反应, 以 GAPDH 作为内参照。qRT-PCR 反应条件: 98°C 2 min 变性, 95°C 15 s, 62.5°C 40 s, 共 40 个循环。引物由广州锐博生物科技有限公司设计及合成, 其中 WNT2B mRNA 上游引物: $5'-\text{TGGCGTG-CACTCTCAGATTT}-3'$, 下游引物: $5'-\text{GA-CAAGATCAGTCCGGGTGG}-3'$; GAPDH 上游引物: $5'-\text{TCCAAAATCAAGTGGGGCGA}-3'$, 下游引物: $5'-\text{AGTAGAGGCAGGGATGATGT}-3'$ 。以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值表示 miRNA-324-3p 及 WNT2B mRNA 的相对表达量。

1.3.2 Western blot 检测技术 参考课题组前期报道^[5], 即取碾碎后的鼻咽癌或非肿瘤组织加入 4°C 预冷 RIPA 裂解液 200 μl (1 ml 裂解液内加入 10 ml PMSF) 提取蛋白, 分装于 -80°C 超低温冰箱保存。BCA 法测定各样品蛋白浓度。取 50 g 蛋白以 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-

PAGE) 电泳。蛋白电泳分离后转膜至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗为兔抗人 WNT2B 单克隆抗体, 4°C 孵育过夜; 漂洗后以辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 45 min。洗膜后, 经化学发光剂显影曝光摄片。以小鼠抗人 β -Actin 单克隆抗体检测 β -Actin 含量作为内参。采用 FluorChemFC2 凝胶成像分析系统对条带进行半定量灰度分析。以 WNT2B/ β -Actin 灰度值之比表示 WNT2B 蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 t 检验, 均为双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析采用 Spearman 秩相关分析法。

2 结果

2.1 miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 及蛋白的表达

miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 在鼻咽癌组织、非肿瘤组织中的相对表达量分别为 0.688 ± 0.413 、 1.351 ± 0.435 及 1.035 ± 0.419 、 0.280 ± 0.108 , 均差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$); WNT2B 蛋白在鼻咽癌组织、非肿瘤组织中的相对表达量分别为 1.003 ± 0.352 、 0.303 ± 0.120 , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。上述结果提示, 在鼻咽癌组织中存在 miRNA-324-3p 的表达下调及 WNT2B 的表达异常增高。

2.2 miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 及蛋白表达强度的相关性分析

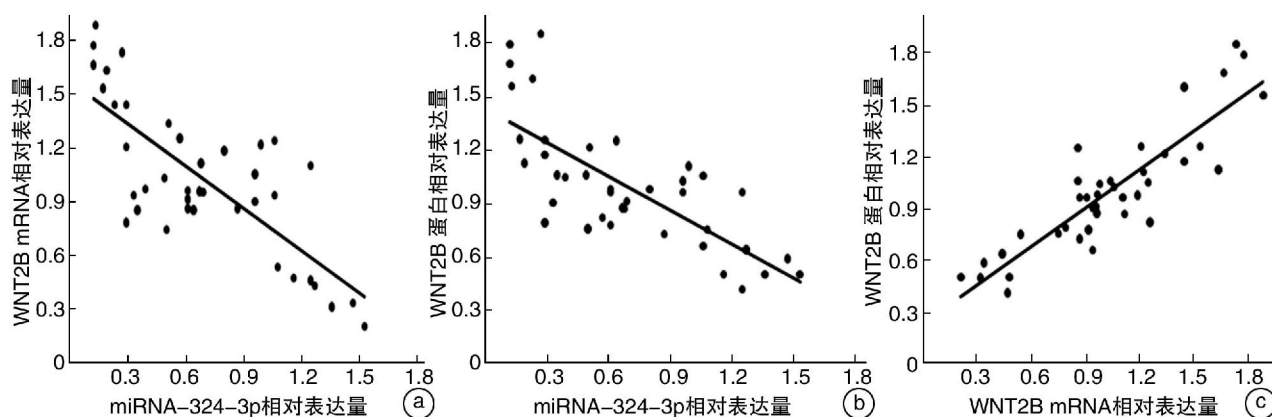
miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 及蛋白在鼻咽癌组织中的表达具有相关性。即 miRNA-324-3p 的低表达, 多同时伴有 WNT2B mRNA 及 WNT2B 蛋白的高表达, 两者呈负相关 ($r = -0.697$ 、 -0.770 , 均 $P < 0.01$, 图 1a、1b), WNT2B mRNA 及 WNT2B 蛋白的表达呈正相关 ($r = 0.838$, $P < 0.01$, 图 1c)。该结果亦进一步证实了我们前期在细胞学研究中发现 miRNA-324-3p 可靶向调控 WNT2B 的结果。

2.3 miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 及蛋白的表达水平与鼻咽癌临床病理特征之间的关系

miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 及蛋白的表达与鼻咽癌临床病理特征之间的关系见表 1。提示 miRNA-324-3p 的低表达及 WNT2B 的过表达与鼻咽癌的恶性生物学行为有一定的相关性。

3 讨论

miRNA 是一类长度为 18~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA, 其主要通过结合靶基因 mRNA 3' 非翻译区抑制其翻译, 或通过 RNA 诱导沉默复合体直接降解靶基因 mRNA, 从而在转录后水平调控靶蛋白的表达, 影响多种恶性肿瘤的发生、发展



a: WNT2B mRNA 与 miRNA-324-3p 表达的相关性分析; b: WNT2B 蛋白与 miRNA-324-3p 表达的相关性分析;
c: WNT2B 蛋白与 mRNA 表达的相关性分析。

图 1 鼻咽癌组织中 miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 及蛋白表达强度的线性相关分析

表 1 miRNA-324-3p、WNT2B mRNA 及蛋白的相对表达量与鼻咽癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	相对表达量		
		miRNA-324-3p	WNT2B mRNA	WNT2B 蛋白
性别				
男	28	0.72±0.46	1.03±0.46	1.00±0.37
女	11	0.61±0.25	1.05±0.31	1.01±0.32
年龄/岁				
<45	19	0.73±0.39	1.06±0.37	1.01±0.30
≥45	20	0.65±0.44	1.02±0.47	1.00±0.40
T 分级				
T ₃ 、T ₄	9	0.48±0.30	1.31±0.32	1.31±0.34
T ₁ 、T ₂	30	0.75±0.43 ¹⁾	0.95±0.41 ¹⁾	0.91±0.30 ²⁾
临床分期				
Ⅲ、Ⅳ	23	0.47±0.28	1.24±0.34	1.20±0.30
I、II	16	1.01±0.36 ³⁾	0.74±0.35 ³⁾	0.72±0.19 ³⁾
淋巴结转移				
有	28	0.54±0.32	1.17±0.32	1.10±0.28
无	11	1.07±0.38 ⁵⁾	0.69±0.46 ⁵⁾	0.76±0.40 ⁴⁾

与 T₃、T₄ 比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 Ⅲ、Ⅳ 比较, ³⁾ $P < 0.05$; 与有淋巴结转移比较, ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

及生物学行为^[6-7]。本实验关注的 miRNA-324-3p 来源于人类染色体 17p13.1, 最先由 Kim 等^[8] 从哺乳动物神经元中克隆出来。有研究表明其可靶向调控血管紧张素 I (II) 代谢通路从而促进肾纤维化^[9], 然而有关其在肿瘤中作用的报道甚少。Ferretti 等^[10] 报道 miRNA-324-3p 在髓母细胞瘤中表达下调, 可能发挥着类似抑癌基因的作用。我们课题组前期研究表明 miRNA-324-3p 在鼻咽癌放疗抵抗细胞中的表达显著下降, 并在细胞水平证实 miRNA-324-3p 参与调控鼻咽癌放疗抵抗性^[3-4]。本研究进一步发现鼻咽癌组织中 miRNA-324-3p 的表达量较非肿瘤组织显著下调, 并与患者 T 分级、临床

分期、淋巴结转移等临床病理特征密切相关, 表明其作为抑癌因子参与调控鼻咽癌的发生、发展。

miRNA 主要是通过影响靶基因的转录及翻译从而在肿瘤中发挥作用, 我们前期的实验提示 WNT2B 是 miRNA-324-3p 的靶基因^[3]。WNT2B 作为 Wnt 信号通路的重要组成部分, 在人体内广泛存在, 参与胚胎早期发育, 调节细胞分化、增殖及生长^[11], 其异常表达可参与调控多种恶性肿瘤的生物学行为^[12]。WNT2B 表达上调可经 WNT/ β -catenin/TCF 信号通路参与胃癌及结肠癌的发生^[13]; 沉默 WNT2B 的表达可经 caspase-9/BCL2/BCL-xL 通路增强卵巢癌细胞化疗敏感性及经 EMT/p-AKT 通路抑制其转移^[14]; 而有关其在鼻咽癌中的作用笔者仅见于课题组的前期报道^[3]。本研究中 WNT2B mRNA 及蛋白的表达在鼻咽癌组织中异常增高, 且其高表达与患者 T 分级、临床分期、淋巴结转移密切相关, 提示 WNT2B 可能在调控鼻咽癌的恶性生物学行为中发挥了一定作用。同时, Spearman 秩相关分析表明: miRNA-324-3p 与 WNT2B mRNA 及蛋白表达水平均呈显著负相关, 这进一步在组织学中证实了 miRNA-324-3p 对 WNT2B 的靶向调控作用。

总的来说, miRNA-324-3p 及 WNT2B 在鼻咽癌组织中差异表达具有相关性, 并与鼻咽癌多种临床病理特征相关, 这为后续研究 miRNA-324-3p 及其靶基因 WNT2B 在鼻咽癌恶性生物学行为中的调控作用提供了基础。

参考文献

- [1] LEE A W, SZE W M, AU J S, et al. Treatment results for nasopharyngeal carcinoma in the modern era: the Hong Kong experience[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 61: 1107-1116.

(下转第 1684 页)

- Cancer, 2007, 7: 187—190.
- [14] O-CHAROENRAT P, LEKSRIKUL P, SAN-GRUCHI S. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter is associated with susceptibility and aggressiveness of head and neck cancer[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118: 2548—2553.
- [15] SHIMIZU Y, KONDO S, SHIRAI A, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2008, 35: 381—389.
- [16] ZHOU G, ZHAI Y, CUI Y, et al. Functional polymorphisms and haplotypes in the promoter of the MMP2 gene are associated with risk of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Hum Mutat*, 2007, 28: 1091—1097.
- [17] MANNELLO F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us[J]. *BMC Med*, 2011, 9: 95—101.
- [18] JUNCKER-JENSEN A, DERYUGINA E I, RIMANN I, et al. Tumor MMP-1 activates endothelial PAR1 to facilitate vascular intravasation and metastatic dissemination [J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 4196—4211.
- [19] LIU L, WU J, WU C, et al. A functional polymorphism (-1607 1G->2G) in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with development and progression of lung cancer[J]. *Cancer*, 2011, 117: 5172—5181.
- [20] CHANG M C, CHEN C A, CHEN P J, et al. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways[J]. *Biochem J*, 2012, 442: 293—302.
- [21] LEE S J, CHO S C, LEE E J, et al. Interleukin-20 promotes migration of bladder cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK)-mediated MMP-9 protein expression leading to nuclear factor (NF-kappaB) activation by inducing the up-regulation of p21(WAF1) protein expression[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 5539—5552.
- [22] 张雄, 金粉淑, 张立国, 等. 白介素 12 基因多态性与恶性肿瘤易感性的 Meta 分析[J]. *中国老年保健医学*, 2013, 3(1): 18—22.
- [23] 刘源, 李燕, 孙月池, 等. 雌激素受体 α 基因 XbaI 位点多态性与骨关节炎易感性相关性的 Meta 分析[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 8(3): 1161—1165.

(收稿日期: 2014-03-17)

(上接第 1678 页)

- [2] YOUSEF M, TRINH H V, ALLMER J. Intersection of microRNA and gene regulatory networks and their implication in cancer[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 15: 445—454.
- [3] LI G, LIU Y, SU Z, et al. MicroRNA-324-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by directly targeting WNT2B[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49: 2596—2607.
- [4] LI G, QIU Y, SU Z, et al. Genome-wide analyses of radioresistance-associated miRNA expression profile in nasopharyngeal carcinoma using next generation deep sequencing[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e84486—e84486.
- [5] 任舒灵, 刘勇, 李果, 等. EphA2 蛋白调控鼻咽癌紫杉醇敏感性的实验研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2013, 19(1): 28—31.
- [6] FARAZI T A, HOELL J I, MOROZOV P, et al. MicroRNAs in human cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 774: 1—20.
- [7] 王苹, 付涛, 王绪锐, 等. 应用微阵列芯片分析喉鳞状细胞癌 miRNA 与正常黏膜表达差异的初步研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, 24(12): 535—538.
- [8] KIM J, KRICHEVSKY A, GRAD Y, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 360—365.
- [9] MACCONI D, TOMASONI S, ROMAGNANI P, et al. MicroRNA-324-3p promotes renal fibrosis and is a target of ACE inhibition[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23: 1496—1505.
- [10] FERRETTI E, DE SMAELE E, MIELE E, et al. Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells[J]. *EMBO J*, 2008, 27: 2616—2627.
- [11] WIDELITZ R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress[J]. *Growth Factors*, 2005, 23: 111—116.
- [12] KATOH M. Differential regulation of WNT2 and WNT2B expression in human cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2001, 8: 657—660.
- [13] KATOH M. Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2001, 19: 1003—1007.
- [14] WANG H, FAN L, XIA X, et al. Silencing Wnt2B by siRNA interference inhibits metastasis and enhances chemotherapy sensitivity in ovarian cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012, 22: 755—761.

(收稿日期: 2014 06 18)