

不同起源胶质瘤中 microRNA-210 表达差异及其与星形胶质细胞肿瘤级别的相关性

张敬宁¹, 赖年升², 张 帅³, 成宜军⁴, 徐 幸³, 蔺玉昌^{3*}

(¹南京医科大学附属无锡第二人民医院保健科, 江苏 无锡 214002; ²皖南医学院附属第一医院神经外科, 安徽 芜湖 241001; ³南京医科大学附属无锡第二人民医院神经外科, 江苏 无锡 214002; ⁴南京医科大学附属脑科医院神经科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 microRNA-210(miR-210)在星形胶质细胞肿瘤和少突胶质细胞肿瘤中的表达差异及意义。方法:将组织标本分为正常脑组织、少突胶质细胞肿瘤、星形胶质细胞肿瘤 3 组,星形胶质细胞肿瘤再分为 A[毛细胞型星形细胞瘤(WHO I 级)]、B[弥漫性星形细胞瘤(WHO II 级)]、C[间变性星形细胞瘤(WHO III 级)]、D[胶质母细胞瘤(GBM, WHO IV 级)]4 个亚组。采用实时定量 PCR 方法检测各组中 miR-210 的表达水平。统计学分析 miR-210 的表达和星形胶质细胞肿瘤级别的相关性。结果:miR-210 在各级别星形胶质细胞肿瘤中的表达水平依次为 D> C> A 和 B,除 A、B 组间外,其他组间的差异都具有统计学意义 ($P < 0.001$),星形胶质细胞肿瘤级别越高,miR-210 表达水平越高;然而 miR-210 在少突胶质细胞肿瘤中呈低表达 ($P < 0.05$),且间变性少突胶质细胞瘤中表达量低于少突胶质细胞瘤中的表达量。结论:miR-210 在不同起源、不同级别胶质瘤中的表达水平不同,可以作为不同起源胶质瘤病理检查的辅助鉴别手段,也可作为星形胶质细胞肿瘤恶性进展的生物学标志物。

[关键词] 胶质瘤;星形胶质细胞肿瘤;少突胶质细胞肿瘤;microRNA-210

[中图分类号] R739.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-950-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140718

Correlation between microRNA-210 expression and grades of astrocytoma

Zhang Jingning¹, Lai Niansheng², Zhang Shuai³, Cheng Yijun⁴, Xu Xing³, Lin Yuchang^{3*}

(¹Department of Health, Wuxi Second People's Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214002; ²Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001; ³Department of Neurosurgery, Wuxi Second People's Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214002; ⁴Department of Neurosurgery, Nanjing Brain Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the significance and different expressions of microRNA-210 in astrocytic tumors and oligodendroglial tumors. **Methods:**Tissue samples were divided into three groups including the normal brain tissue group, the oligodendroglial tumor group and the astrocytic tumor group. The astrocytic tumors were divided into four groups including group A [pilocytic astrocytoma (WHO grade I)], B [diffuse astrocytomas (WHO grade II)], C [anaplastic astrocytomas (WHO grade III)] and D [glioblastoma (GBM, WHO grade IV)]. The expression of miR-210 was examined by real-time quantitative RT-PCR. The correlation between the expression of miR-210 and the astrocytic tumors was analyzed by Spearman correlation test. **Results:**The expression level order of miR-210 was group D> group C> group B and group A. There was statistically significant difference between groups except group A and B ($P < 0.001$). The grade of astrocytic tumor and the expression of miR-210 had positive correlation. However, the expression level of miR-210 in anaplastic astrocytomas was lower than in oligodendroglial tumor, and was low in oligodendroglial tumor ($P < 0.005$). **Conclusion:**Since expression of miR-210 showed significant differences in different origins and different grades, it can be used as an auxiliary identification method for the histopathologic examination of glioma from different origins, or as a biomarker for the observation of the progression of astrocytic tumor as well.

[基金项目] 无锡市医院管理中心医学科研联合攻关项目(YGZXL1309)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yuchanglin123@126.com

[Key words] glioma; astrocytic tumor; oligodendroglial tumor; microRNA-210

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07):950-954]

脑胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤, 占所有颅内肿瘤的 40%~50%。它具有侵袭性生长、高病死率、高复发、预后差等特点, 平均生存时间少于 15 个月^[1]。根据世界卫生组织(WHO)2007 年的分类, 脑胶质瘤分为星形胶质细胞肿瘤、少突胶质细胞肿瘤和室管膜细胞肿瘤^[2]。对于不同起源的胶质瘤, 分子生物学的研究有助于其诊断和治疗。

microRNAs (miRNAs) 是一类由 17~27 个核苷酸组成的内源性非编码小 RNA, 许多真核微生物都有表达, 最早在线虫体内发现^[3]。miRNAs 通过结合目的基因 mRNA 3' 非编码区, 使目的基因 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译^[4]。已发现胶质瘤中许多 miRNA 表达异常, 涉及到细胞生长、分化、增殖、细胞周期调节、凋亡、侵袭及血管生成等^[5]。miR-210 被证实多种肿瘤中呈高表达, 如乳癌、肝癌、非小细胞肺癌、胰腺癌等^[6]。miR-210 在胶质母细胞瘤中也呈高表达^[1], 但毛细胞型星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变性星形细胞瘤和少突胶质细胞肿瘤中 miR-210 的表达及差异性还未见报道。本研究应用实时定量 PCR 技术, 检测各级别星形胶质细胞肿瘤和少突胶质细胞肿瘤中 miR-210 的表达水平, 以探讨 miR-210 与不同级别、不同起源胶质瘤之间的关系, 为分子生物学病理诊断和 miRNAs 靶点治疗提供方向。

1 对象和方法

1.1 临床资料

选取 2009 年 1 月~2012 年 12 月在南京医科大学附属无锡第二人民医院神经外科接受治疗的 68 例原发性胶质瘤患者, 根据 2007 年 WHO 的分类标准^[2]: 其中星形胶质细胞肿瘤 46 例[毛细胞型星形细胞瘤 (WHO I 级) 7 例, 弥漫性星形细胞瘤 (WHO II 级) 9 例, 间变性星形细胞瘤 (WHO III 级) 11 例, 胶质母细胞瘤 (WHO IV 级) 19 例], 少突胶质细胞肿瘤 22 例, 其中 II 级 9 例, III 级 13 例。患者术前都未进行放、化疗。另取因颅脑损伤行颅内减压和癫痫手术的 10 例正常脑组织作为对照, 所有标本均经过清洗去除出血、坏死和电灼的组织, 置于液氮中速冻, 保存于 -80℃ 冰箱中备用。本研究经南京医科大学伦理委员会审核并批准, 同时经过患者及家属的同意。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

取冻存的组织标本, 应用 TRIzol 法提取总 RNA, 使用 NanoDrop ND-2000 分光光度仪检测总 RNA 的浓度和纯度, $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比在 1.8~2.0 为符合要求。

1.2.2 实时定量 PCR

取总 RNA 3~4 μg 用 MMLV 逆转录酶 (美国 Promega 公司) 和 Hairpin-itTM miRNAs qPCR Quantitation Kit 的特异性引物 (上海吉玛公司) 逆转录成特异性 cDNA。cDNA 稀释 3 倍, 取 4 μl cDNA 为模板, 应用 Hairpin-itTM miRNAs qPCR Quantitation Kit, 以 U6B 为内参, 加入 DNA Engine Opticon 2 实时定量 PCR 仪 (美国 MJ 公司), 检测 miR-210 的表达水平。实验重复 3 次, 实验后得到的数据运用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 的方法进行分析。

1.3 统计学分析

数据应用 SPSS18.0 进行分析, 不同组间 miR-210 表达水平比较利用 ANOVA 检验, 两两比较采用 LSD 检验, miR-210 和肿瘤病理级别的相关性分析采用 Spearman 秩相关分析。 $P \leq 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-210 在星形细胞肿瘤中的表达水平

通过 Real-time PCR 分别检测毛细胞型星形细胞瘤 (WHO I 级)、弥漫性星形细胞瘤 (WHO II 级)、间变性星形细胞瘤 (WHO III 级)、胶质母细胞瘤 (WHO IV 级) 及正常对照。结果显示: 5 组都有 miR-210 的表达, 但表达水平不同, 星形胶质细胞肿瘤 miR-210 表达水平明显高于正常脑组织 ($P < 0.001$, 图 1)。

以正常脑组织为对照组, 经 ANOVA 分析及 LSD 两两比较表明, 除毛细胞型星形细胞瘤和弥漫性星形细胞瘤之间差异没有统计学意义 ($P = 0.416$) 外, 其余各组间差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.2 miR-210 和星形胶质细胞肿瘤病理级别的相关性分析

利用 Spearman 秩相关分析表明, miR-210 表达和星形胶质细胞肿瘤病理级别呈正相关 ($r = 0.553$,

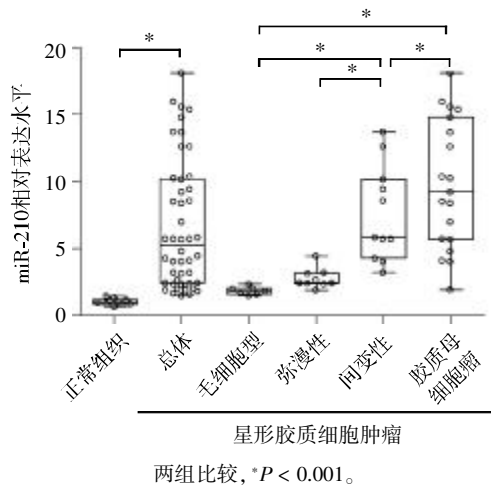


图1 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法分析 miR-210 在正常组和各级别星形胶质细胞肿瘤中的相对表达情况

Figure 1 Expressions of miR-210 in the normal group and different grades of astrocyte tumor were analyzed by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method

$P < 0.001$); 而与其他相关病理特征(年龄、性别和 KPS 评分)之间的相关关系没有统计学意义(表 1)。

2.3 miR-210 在少突胶质细胞肿瘤中的表达水平

通过 Real-time PCR 分别检测不同级别少突胶质细胞肿瘤和正常对照。结果显示 miR-210 在少突胶质细胞肿瘤中也表达,但相对于正常组织表达量明显减少,少突胶质细胞肿瘤相对表达水平为 $0.50 \pm 0.28 (P < 0.001, \text{图 } 2)$; 且不同级别少突细胞胶质

表 1 各级别星形胶质细胞肿瘤中 miR-210 的相对表达水平和相关病理特征的关系

Table 1 Expression levels and related pathological features of miR-210 in different grades astrocyte tumor

临床病理特征	n	miR-210 表达水平	P 值
性别			0.75
男	25	6.89 ± 5.28	
女	21	6.43 ± 4.33	
年龄(岁)			0.50
< 55	22	6.17 ± 4.30	
≥ 55	24	7.15 ± 5.30	
WHO 分级			<0.001
I	7	1.84 ± 0.28	
II	9	2.86 ± 0.83	
III	11	8.65 ± 3.59	
IV	19	15.34 ± 1.63	
KPS(分)			0.45
< 90	26	7.16 ± 4.97	
≥ 90	20	6.05 ± 4.67	

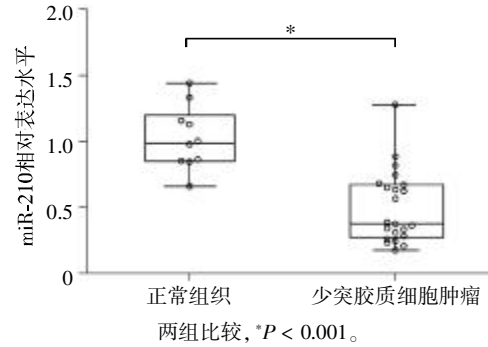


图 2 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法分析 miR-210 在正常组和少突胶质细胞肿瘤中的相对表达情况

Figure 2 Expression of miR-210 in normal group and oligodendroglial tumor were analyzed by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method

瘤中表达也存在差异, II 级少突细胞胶质瘤中 miR-210 表达高于 III 级少突胶质细胞瘤 ($P = 0.042, \text{表 } 2$), 差异有统计学意义。

2.4 miR-210 在同级别的星形胶质细胞肿瘤和少突胶质细胞肿瘤中的表达差异

II 级星形胶质细胞肿瘤中 miR-210 表达明显高于 II 级少突胶质细胞肿瘤, III 级星形胶质细胞肿瘤中 miR-210 表达也高于 III 级少突细胞胶质瘤, 且星形胶质细胞肿瘤中 miR-210 含量明显高于正常脑组织, 而少突胶质细胞肿瘤 miR-210 表达量低于正常脑组织(图 3)。

3 讨论

神经胶质瘤发展的各个环节都伴随 miRNAs 的

表 2 各级别少突胶质细胞肿瘤中 miR-210 的相对表达水平和相关病理特征的关系

Table 2 Expression levels and related pathological features of miR-210 in different grade oligodendroglial tumor

临床病理特征	n	miR-210 表达水平	P 值
性别			0.581
男	14	0.53 ± 0.29	
女	8	0.46 ± 0.27	
年龄(岁)			0.910
< 55	13	0.51 ± 0.29	
≥ 55	9	0.50 ± 0.26	
WHO 分级			0.042
II	13	0.60 ± 0.29	
III	9	0.36 ± 0.19	
KPS(分)			0.442
< 90	10	0.45 ± 0.24	
≥ 90	12	0.54 ± 0.30	

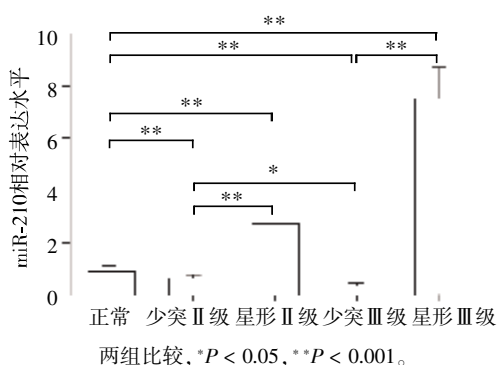


图 3 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法分析 miR-210 在正常组、II、III 级少突胶质细胞和星形细胞肿瘤中的相对表达情况

Figure 3 Expression of miR-210 in normal group and II, III oligodendroglial tumor and astrocyte tumor were analyzed by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method

改变。到目前为止,miRNAs 在肿瘤中的研究文章达到数以千计,在人脑胶质瘤中也有数以百计^[7]。研究证实 miRNA 在肿瘤组织或细胞中的表达,如 miR-9、miR-10b 和 miR-15b 在胶质瘤中呈高表达;miR-128、miR-451 和 miR-218 在胶质瘤中呈低表达^[8-11]。miRNAs 的改变可作为了解肿瘤及胶质瘤诊断和进展的生物学标记^[12-13]。手术之后,传统的放化疗结合 miRNA 治疗可以提高治疗效果和减低肿瘤复发^[10]。人工 miRNAs 通过溶细胞单纯性疱疹病毒已经成功用于阻止黑色素瘤的特定靶点,开启了 miRNA 治疗的先河^[14]。神经胶质瘤中,miR-21 抑制物联合 5-氟尿嘧啶(5-FU)可以促进肿瘤细胞凋亡,减低肿瘤细胞迁移;反之在应用替莫唑胺(TMZ)治疗后的 U87MG 细胞系中,过表达的 miR-21 可以降低细胞凋亡^[15]。

miR-210 是低氧环境诱导增加的 miRNA^[16],同时在细胞分裂、增殖^[17],DNA 修复、代谢^[18],细胞迁移、侵袭及血管生成^[10]等方面发挥着重要作用。许多肿瘤中,miR-210 的过表达预示着不良的预后,比如乳癌、胰腺癌等^[19-20]。但在食管鳞状细胞癌中 miR-210 呈低表达^[21]。

新近研究表明:miR-210 的作用和调节的信号通路甚多。在胰腺癌中,miR-210 作用于 HIF-1 α 通路,而 HIF 通路主要在细胞低氧环境下生存和细胞内的稳态有关^[22]。心肌细胞缺氧时,miR-210 表达增高,通过 Akt 和 p53 依赖通路在低氧条件下发挥细胞保护作用^[23],而高表达的 p53 和 Akt 通过野生型 MEFs 促进 miR-210 表达。miR-210 在成骨细胞分化中通过抑制 TGF- β /激活素通路的激活素 A 受体-1b(AcvR1b)发挥作用^[24]。在炎症机制中,miR-210 可

以抑制脂多糖(LPS)介导的促炎症因子,转染 miR-210 模拟体(mimics)的细胞可以明显抑制 LPS 介导的促炎症因子的表达;而转染 miR-210 抑制物(inhibitor)的细胞可以促进 LPS 介导的促炎症因子的表达^[25]。同时 miR-210 还可以抑制 WNT 通路,从而抑制脂肪的生成,主要是通过结合转录因子 7 类似物-2(Tcf7l2),而 Tcf7l2 通过作用 WNT 通路的下游基因发挥作用^[26]。

恶性肿瘤的治疗一直是个难题。miRNA 发挥作用一般都有明确靶点,往往可以作为 miRNA 治疗肿瘤的靶点。鉴于 miR-210 在肿瘤的多种生物学作用,已有研究提示 miR-210 的直接靶点有很多,比如:液泡膜蛋白-1(VMP1)、三磷酸甘油脱氢酶-1 类似物(GPD1L)、琥珀酸脱氢酶复合物(SDHD)、铁-硫簇蛋白(ISCU)、COX10 等^[6]。当然,miR-210 的研究还不完善,许多新的功能和新的作用还有待发现。

本实验表明,miR-210 在胶质瘤中表达是分化的,两种不同起源的胶质瘤中的表达趋势不同,在星形胶质细胞肿瘤中呈高表达,在少突胶质细胞肿瘤中呈低表达;并且高级别星形胶质细胞肿瘤 miR-210 的表达水平明显高于低级别星形胶质细胞肿瘤。miR-210 可以作为不同起源胶质瘤的病理检查的辅助鉴别手段,同时可以作为星形胶质细胞肿瘤恶性进展的生物学标志物,从而可以预测患者的预后情况。检测人脑胶质瘤组织中 miR-210 表达水平对胶质瘤的病理诊断、恶性程度和患者预后具有重要意义。因此,在后期的实验研究中,可以进一步研究 miR-210 在胶质瘤中的具体作用机制和可能靶点。

[参考文献]

- [1] Yan W,Zhang W,Sun L,et al. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme [J]. Brain Res,2011,1411:108-115
- [2] Louis DN,Ohgaki H,Wiestler OD,et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. Acta Neuropathol,2007,114(2):97-109
- [3] Lee RC,Feinbaum RL,Ambros V. The C.elegans heterochronic gene lin 4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-4[J]. Cell,1993,75(5):843-854
- [4] Visone R,Croce CM. MiRNAs and cancer[J]. Am J Pathol,2009,174(4):1131-1138
- [5] Nikaki A,Piperi C,Papavassiliou AG. Role of microRNAs in gliomagenesis:targeting miRNAs in glioblastoma multiforme therapy[J]. Expert Opin Investig Drugs,2012,21(10):1475-1488

- [6] Hong L, Han Y, Zhang H, et al. miR-210: a therapeutic target in cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(1): 21-28
- [7] Zhang Y, Dutta A, Abounader R. The role of microRNAs in glioma initiation and progression [J]. *Front Biosci*, 2012, 17: 700-712
- [8] Karsy M, Arslan E, Moy F. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme [J]. *Genes Cancer*, 2012, 3(1): 3-15
- [9] Kim Y, Roh S, Lawler S, et al. miR451 and AMPK mutual antagonism in glioma cell migration and proliferation: a mathematical model [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): 20
- [10] Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, et al. An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 35134-35143
- [11] Sun L, Yan W, Wang Y, et al. MicroRNA-10b induces glioma cell invasion by modulating MMP-14 and uPAR expression via HOXD10 [J]. *Brain Res*, 2011, 1389: 9-18
- [12] Huang Y, Yang S, Zhang J, et al. MicroRNAs as promising biomarkers for diagnosing human cancer [J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(6): 670-671
- [13] Wang H, Yuan X, Zhou Z, et al. MicroRNAs might be promising biomarkers of human gliomas [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(4): 833-835
- [14] Anesti AM, Simpson GR, Price T, et al. Expression of RNA interference triggers from an oncolytic herpes simplex virus results in specific silencing in tumour cells *in vitro* and tumours *in vivo* [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(486): 1471-2407
- [15] Ren Y, Kang CS, Yuan XB, et al. Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth *in vitro* [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2010, 21(3): 303-314
- [16] Cicchillitti L, Di Stefano V, Isaia E, et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha induces miR-210 in normoxic differentiating myoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(53): 44761-44771
- [17] He J, Wu J, Xu N, et al. MiR-210 disturbs mitotic progression through regulating a group of mitosis-related genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(1): 498-508
- [18] Xiong L, Wang F, Huang X, et al. DNA demethylation regulates the expression of miR-210 in neural progenitor cells subjected to hypoxia [J]. *Febs J*, 2012, 279(23): 4318-4326
- [19] Toyama T, Kondo N, Endo Y, et al. High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(4): 256-263
- [20] Papaconstantinou IG, Manta A, Gazouli M, et al. Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance [J]. *Pancreas*, 2013, 42(1): 67-71
- [21] Tsuchiya S, Fujiwara T, Sato F, et al. MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1) [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(1): 420-428
- [22] Chen WY, Liu WJ, Zhao YP, et al. Induction, modulation and potential targets of miR-210 in pancreatic cancer cells [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2012, 11(3): 319-324
- [23] Mutharasan RK, Nagpal V, Ichikawa Y, et al. microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(4): 12
- [24] Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, et al. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(13): 2263-2268
- [25] Qi J, Qiao Y, Wang P, et al. microRNA-210 negatively regulates LPS-induced production of proinflammatory cytokines by targeting NF-kappaB1 in murine macrophages [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(8): 1201-1207
- [26] Qin L, Chen Y, Niu Y, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(320): 1471-2164
- [27] Ying Q, Liang L, Guo W, et al. Hypoxia-inducible microRNA-210 augments the metastatic potential of tumor cells by targeting vacuole membrane protein 1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2011, 54(6): 2064-2075
- [28] Puissegur MP, Mazure NM, Bertero T, et al. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(3): 465-478

[收稿日期] 2013-11-27