

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.005

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.005

微小 RNA-9 与 Wnt/ β 连环素在星形细胞肿瘤的表达及其临床意义

李俊芝^{1*}, 王志强^{2*}, 刘铭¹, 张巍¹

(1. 新疆医科大学第一附属医院病理科, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆武警总队医院神经内科, 乌鲁木齐 830091)

[摘要] 目的: 探讨不同级别的星形细胞肿瘤微小RNA-9(miRNA-9, miR-9)和Wnt/ β 连环素(β -catenin) mRNA及其异常表达与临床病理参数的关系。方法: 收集2012至2017年新疆医科大学第一附属医院经手术切除并病理诊断的胶质细胞肿瘤102例, 包括弥漫型星形细胞瘤(II级)36例、间变性星形细胞瘤(III级)36例、胶质母细胞瘤(IV级)30例。采用RT-PCR检测 β -catenin mRNA的异常表达, 用 χ^2 检验、回归分析、SPSS生存分析方法分析其异常表达与星形细胞肿瘤的临床病理参数及其预后的关系。结果: 在II级、III级、IV级星形细胞肿瘤中, 分别有27, 30, 30例miR-9呈高表达; 分别有24, 33, 30例 β -catenin呈高表达。随胶质细胞肿瘤级别的增高, miR-9和 β -catenin mRNA表达水平增高($P<0.05$)。miR-9 mRNA水平的异常表达与患者年龄、肿瘤发病部位及组织学类型差异有统计学意义($P<0.05$); β -catenin mRNA水平的异常表达与组织学类型显著相关($P<0.05$)。星形细胞肿瘤患者预后与miR-9和 β -catenin mRNA水平的异常表达显著相关($P<0.05$)。结论: miR-9, β -catenin mRNA有望成为星形细胞肿瘤的相关预后指标。

[关键词] 微小RNA-9; Wnt/ β 连环素信号通路; 星形细胞肿瘤

Expression of microRNA-9 and Wnt/ β -catenin in astrocyte tumors and its clinical significance

LI Junzhi^{1*}, WANG Zhiqiang^{2*}, LIU Ming¹, ZHANG Wei¹

(1. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 2. Department of Neurology, Xinjiang Armed Police General Team Hospital, Urumqi 830091, China)

Abstract **Objective:** To explore the relationship between the abnormal expression of microRNA-9 (miR-9) and Wnt/ β -catenin mRNA in different levels of astrocytoma and its clinical and pathological parameters. **Methods:** We collected 102 cases glial cell tumor combined by pathological diagnosis of including diffuse astrocytoma 36 cases (grade II), anaplastic astrocytoma 36 cases (grade III), glioblastoma 30 cases (grade IV) during 2012—2017 in First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University. RT-PCR was used to detect the β -catenin abnormal mRNA

* 为共同第一作者。

收稿日期 (Date of reception): 2018-01-22

通信作者 (Corresponding author): 张巍, Email: zwyhr100@163.com

基金项目 (Foundation item): 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2017D01C315)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, China (2017D01C315).

expression. The relationship between the abnormal expression and the clinical and pathological parameters and prognosis of glial cell tumor were analyzed by χ^2 test, regression analysis, survival analysis methods with SPSS.

Results: MiR-9 showed high expression in 27, 30 and 30 cases in grade II–IV astrocytic tumor, respectively. There were 24 cases, 33 cases, and 30 cases showed high expression of β -catenin. With the increase of the tumor level of glial cells, the abnormal expression level of miR-9, β -catenin mRNA was increased ($P < 0.05$). The abnormal expression level of miR-9 mRNA was correlated with the age of the patient, the site of the tumor and histological type ($P < 0.05$). The abnormal expression of β -catenin mRNA level was correlated with histological type ($P < 0.05$). The prognosis of astrocytic tumor patients was correlated with the abnormal expression of miR-9 mRNA and β -catenin mRNA levels ($P < 0.05$). **Conclusion:** MiR-9 and β -catenin mRNA are expected to be the prognostic indicators of astrocyte tumor.

Keywords microRNA-9; Wnt/ β -catenin signal pathway; gliomas

胶质瘤在中枢神经系统原发肿瘤中较为常见, 约占颅内原发肿瘤的50%。目前胶质瘤的联合治疗策略包括手术和放化疗。然而, 神经胶质瘤患者的预后较差, 尤其是胶质母细胞瘤患者预后最差, 平均存活期仅约14.6个月^[1]。因此需要新的治疗策略以延长患者的生存期, 分子治疗及靶向药物的应用是临床亟待解决的问题。

微小RNA(microRNA, miR)为长度21~25个核苷酸的非编码RNA。miRNA能识别特定的目标mRNA, 并在转录后水平通过促进靶mRNA的降解和/或抑制翻译过程, 发挥负调控基因表达的作用。目前研究^[2]显示: miR在多种肿瘤的发生发展中发挥重要作用, 与肿瘤的发生发展、侵袭、迁移密切相关。有研究^[3]认为: miR-9在小鼠和人等哺乳动物神经胶质细胞中表达, 是脑组织表达较为丰富的miR之一, 可能参与胶质瘤的发生发展过程, 在胶质瘤的恶变过程中发挥重要作用, 但其作用机制尚不完全清楚。

Wnt/ β 连环素(β -catenin)信号通路在胶质细胞瘤发生发展中发挥重要作用^[4]。MiR-9作为一类转录后调控因子, 通过参与信号通路靶基因的调控, 调节多种信号通路, 最终影响细胞的生长、增殖、凋亡等基本生物学行为。目前关于miR-9及Wnt/ β -catenin信号通路对星形细胞肿瘤的发展和预后的研究甚少。因此, 本研究拟通过检测miR-9与 β -catenin信号通路在星形细胞肿瘤中的表达, 进而探讨miR-9与Wnt/ β -catenin的表达与临床病理学特征及预后的相关性。此种基于肿瘤遗传学和分子生物学的研究将有助于临床有效的靶向治疗的筛选和明确星形细胞肿瘤分子生物学改变, 为临床提供较为重要的线索和依据。

1 对象与方法

1.1 对象

纳入2012至2017年新疆医科大学第一附属医院经病理学确诊的胶质细胞肿瘤石蜡组织标本102例, 2例肿瘤患者周围正常脑组织标本作为阴性对照。其中汉族患者44例, 维吾尔族患者58例; 男46例, 女56例, 年龄10~75(中位45)岁。肿瘤分布以额叶多见, 颞叶、岛叶、丘脑等部位均可发病。所有标本均根据《2016年的WHO中枢神经系统肿瘤》分类标准重新分类和诊断。本研究经新疆医科大学第一附属医院医学伦理委员会审核批准, 患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR

用RNA提取试剂盒(美国Qiagen公司)分离总RNA, 并按照说明书进行常规量化。 β -catenin的引物序列由上海欧易生物医学科技有限公司获取, 并合成相对应的引物。切取5片约10 μ m的石蜡组织标本, 按照试剂盒步骤提取总RNA, β -actin作为 β -catenin的内参。

1.2.2 随访

获取随访资料患者为84例, 总生存期是从患者手术日开始计算, 死亡或者到最后随访时间为终止时间。平均随访时间为34.4个月。

1.3 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件进行分析, 计数资料用 χ^2 检验和确切概率法进行组间比例。生存率分析采用log-rank检验, 多因素回归分析采用Cox回归

分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-9 与 β -catenin 在星形细胞肿瘤的表达情况

II~IV级的星形细胞肿瘤中, miR-9分别有27例(27/36, 75%)、30例(30/36, 83.3%)、30例(30/30, 100.0%)显示高表达; 随星形细胞肿瘤级别的增高, miR-9 mRNA相对表达量显著增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1); mRNA相对定量分别为 1.98 ± 0.56 , 2.84 ± 0.48 , 3.84 ± 0.35 。II~IV级星形细胞肿瘤中 β -catenin分别有24例(24/36, 66.7%), 33例(33/36, 91.7%), 40例(30/30, 100.0%)显示高表达; 星形细胞肿瘤级别越高, β -catenin mRNA异常表达水平也随之增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2); mRNA相对定量分别为 1.80 ± 0.46 , 2.70 ± 0.38 , 3.67 ± 0.64 。

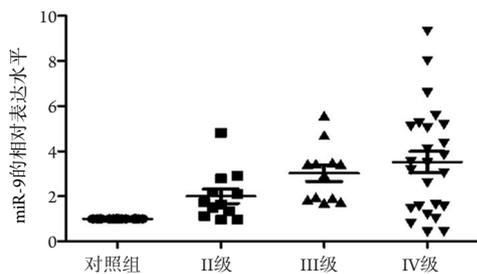


图1 miR-9在各组中mRNA的相对表达量

Figure 1 Relative mRNA expression of miR-9 in each group

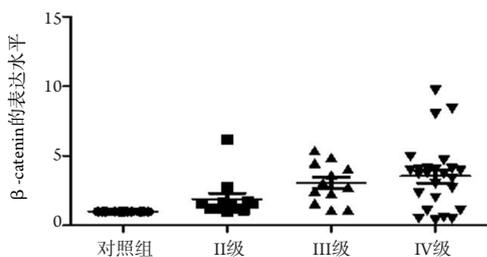


图2 β -catenin在各组中mRNA的相对表达量

Figure 2 Relative mRNA expression of β -catenin in each group

2.2 MiR-9 与 β -catenin 在星形细胞肿瘤中表达的相关性

MiR-9和 β -catenin在星形细胞肿瘤中均高表达, miR-9的异常表达率越高, 则 β -catenin的表达

率越高, 两者具有正相关性($P = 0.002$, $r = 0.608$; 表1)。

表1 miR-9与 β -catenin在星形细胞肿瘤中表达的相关性

Table 1 Correlation between miR-9 and β -catenin expression in astrocytes tumor

miR-9	β -catenin		合计	χ^2	P
	+	-			
+	84	3	87	59.774	<0.001
-	3	12	15		
合计	87	15	102		

+: 与对照组相比高表达; -: 对照组相比低表达。

+: high expression compared with the control group; -: low expression compared with the control group.

2.3 MiR-9 和 β -catenin 的表达与临床病理参数的关系

MiR-9 mRNA高表达与患者年龄, 肿瘤组织学类型及肿瘤发生部位有关, 差异有统计学意义($P < 0.05$); β -catenin mRNA高表达与肿瘤的组织学类型相关, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 患者的民族、性别与miR-9 mRNA高表达均无明显相关(均 $P > 0.05$); 患者的年龄、性别、民族、发病部位均与 β -catenin mRNA高表达均无明显相关(均 $P > 0.05$, 表2)。

2.4 MiR-9 和 β -catenin mRNA 高表达及临床病理参数与星形细胞肿瘤患者预后关系

本研究随访时间为1个月~5年(平均2.2年)。其中84例存活, 18例死于本病。MiR-9 mRNA高表达与低表达患者5年生存率分别为0%, 58%, 差异有统计学意义($P < 0.001$); β -catenin mRNA高表达与低表达患者5年生存率分别为0%, 80%, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。对miR-9 mRNA, β -catenin mRNA、组织学亚型($P = 0.215$)、患者年龄($P = 0.302$)、部位($P = 0.927$)、民族($P = 0.623$)、性别($P = 0.538$)、放化疗($P > 0.05$)进行单因素logistic预后分析, 结果显示: miR-9 mRNA, β -catenin mRNA高表达与其预后相关; Cox多因素回归分析结果显示: miR-9 mRNA, β -catenin mRNA高表达患者预后较差, 提示miR-9, β -catenin是影响星形细胞肿瘤患者预后的有用因素($P < 0.05$; 图3, 4)。

表2 MiR-9与 β -catenin mRNA表达情况与患者临床病理参数的关系Table 2 Relationship between miR-9, β -catenin mRNA expressions and patients' clinicopathological parameters

因素	n	miR-9			β -catenin		
		高表达	低表达	P	高表达	低表达	P
肿瘤级别				0.016			<0.001
II	36	27	9		24	12	
III	36	30	6		33	3	
IV	30	30	0		30	0	
年龄/岁				0.005			0.376
≤ 45	34	24	10		28	6	
>45	68	63	5		59	9	
性别				0.100			0.444
男	46	42	4		40	6	
女	56	45	11		47	9	
肿瘤部位				0.048			0.295
额颞叶	64	58	6		56	8	
其他	38	29	9		31	7	
民族				0.132			0.279
汉族	44	40	4		36	8	
维吾尔族	58	47	11		51	7	

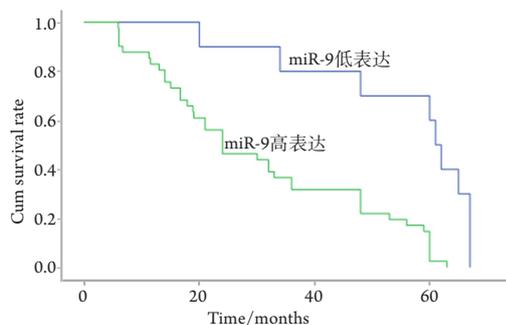
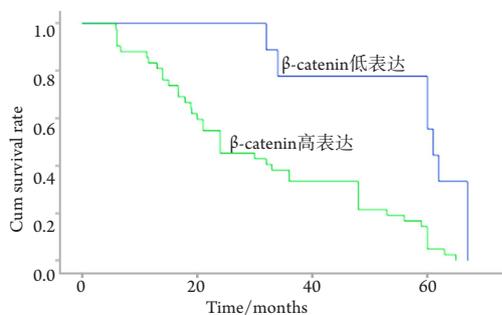


图3 miR-9 mRNA高表达与低表达患者的生存曲线

Figure 3 Survival curve of patients with miR-9 mRNA high and low expression

图4 β -catenin mRNA高表达与低表达患者的生存曲线Figure 4 Survival curve of patients with β -catenin mRNA high and low expression

3 讨论

MiR-9在小鼠和人等哺乳动物神经胶质细胞中表达,是脑组织表达较为丰富的miRNA之一。在不同类型的肿瘤中,miR-9的表达水平有所不同。研究^[5-9]显示:miR-9在神经母细胞瘤、髓母细胞瘤、胃腺癌和卵巢癌中表达下调;而在其他肿瘤,如胆管癌中,其表达上调,且在结肠癌、乳腺癌中的表达显著高于癌旁对照组。MiR-9在不同肿瘤组织中发挥不同作用。

在本研究中,miR-9 mRNA在高级别星形细胞瘤中的表达显著高于低级别星形细胞瘤及对照组,提示miR-9 mRNA表达上调可能参与肿瘤的发生发展,并在胶质细胞肿瘤的恶变过程中发挥重要作用。

本研究结果显示:miR-9异常表达与患者的年龄有关,>45岁的患者异常表达率远大于 ≤ 45 岁的患者;且维吾尔族患者发病中位年龄更趋向年轻化。

研究^[8-9]显示:miR-9在结肠癌、乳腺癌表达显著高于癌旁对照组,且淋巴结转移患者miR-9表达增高,提示miR-9可能作为原癌基因,与结肠癌及乳腺癌的增殖、转移密切相关。有研究^[10]发现:

miR-9可促进胶质瘤细胞干细胞的增殖能力, 增强肿瘤细胞迁徙和侵袭能力。本研究结果也显示: miR-9高表达患者的5年生存率显著低于miR-9低表达患者; 且miR-9 mRNA异常表达相对定量越高, 患者预后越差, 这与上述研究结果一致。本研究Cox分析结果显示: miR-9高表达是胶质细胞肿瘤独立的预后因素, 推测miR-9mRNA异常表达可能参与胶质瘤的发生发展过程, 进而在胶质细胞肿瘤的恶变过程中发挥重要作用。

在人体多种肿瘤中, β -catenin与多种肿瘤细胞的分化、转移及预后有关。 β -catenin是细胞黏附过程和信号转导通路中的关键因子。Wnt信号通路中 β -catenin靶基因的异常激活, 与人类多种肿瘤的发生发展密切相关^[11-12]。

武文浩等^[13]研究表明: β -catenin在胶质瘤中的表达阳性率随肿瘤恶性程度的增高而增高。另有研究^[14]发现: 虽然随肿瘤级别的增加, β -catenin蛋白表达强度增强, 但其mRNA与蛋白表达并不同步, mRNA水平在正常脑组织和不同级别胶质瘤中的表达无明显差异。但本研究结果显示: β -catenin mRNA水平在高级别胶质瘤(III, IV级)中的mRNA表达显著高于低级别胶质瘤(II级)及对照组正常脑组织, 且其表达水平随胶质细胞肿瘤级别的增高而增加, 差异有统计学意义。因此, β -catenin的表达一定程度上与胶质细胞肿瘤的起源、发生、发展有相关性。

本研究结果表明: β -catenin mRNA高表达与患者的年龄相关, 年龄>45岁的患者更易出现 β -catenin mRNA高表达; 随着患者年龄增大, β -catenin mRNA异常表达也随之增高, 且在新疆维吾尔族患者中更为多见, 推测新疆胶质细胞肿瘤的发生可能与新疆特殊的地域、生活习惯、饮食习惯等有一定关系。而miR-9表达异常与民族、性别之间差异没有统计学意义。

β -catenin的高表达可能影响胶质细胞瘤的发生发展和侵袭、增殖。临床上对 β -catenin与恶性肿瘤分化程度、转移及预后的关系有较大的争议。 β -catenin的异常表达是恶性肿瘤中常见的事件之一。有研究^[15]指出: 髓母细胞 β -catenin是一个重要的独立预后影响因子, β -catenin核表达阳性率越高, 患者预后越好。 β -catenin不仅在乳腺癌肿瘤细胞核高表达^[16], 并与患者的不利预后密切相关。在胶质细胞肿瘤不同级别之间^[4], β -catenin基因及蛋白的表达与其恶性程度呈正相关, 与患者预较差的预后呈正相关, 差异有统计学意义。本研究结果显示: 与 β -catenin mRNA低表达患者相

比, β -catenin mRNA高表达患者预后较差, 提示 β -catenin mRNA表达越高, 患者预后越差。

综上所述, miR-9 mRNA, β -catenin mRNA高表达与星形细胞肿瘤患者的预后相关, 肿瘤级别越高, 恶性程度越高; 其高表达可能促进肿瘤细胞的增殖、浸润, 有望成为胶质细胞瘤肿瘤形成和进展过程中较为有价值的生物学指标。miR-9, β -catenin表达水平或可成为监测疾病进展和观测预后的一项指标和可能的治疗靶点, 具有临床应用价值。

参考文献

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(6): 803-820.
2. Kim SM, Woo JS, Jeong CH, et al. Effective combination therapy for malignant glioma with TRAIL-secreting mesenchymal stem cells and lipoxygenase inhibitor MK886[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(18): 4807-4817.
3. Mirzaei H, Masoudifar A, Sahebkar A, et al. MicroRNA: a novel target of curcumin in cancer therapy[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 3004-3015.
4. Pu P, Zhang Z, Kang C, et al. Down-regulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth[J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(4): 351-361.
5. Zhang H, Qi M, Li S, et al. MicroRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(7): 1454-1466.
6. Ferretti E, De Smaele E, Po A, et al. MicroRNA profiling in human medulloblastoma[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(3): 568-577.
7. Raghuvanshi S, Gutti U, Kandi R, et al. MicroRNA-9 promotes cell proliferation by regulating RUNX1 expression in human megakaryocyte development[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(1).
8. Zhu L, Chen H, Zhou D, et al. MicroRNA-9 up-regulation is involved in colorectal cancer metastasis via promoting cell motility[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 1037-1043.
9. Ma L, Young J, Prabhala H, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(3): 247-256.
10. Tan X, Wang S, Yang B, et al. The CREB-miR-9 negative feedback minicircuitry coordinates the migration and proliferation of glioma cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49570.
11. Aktary Z, Bertrand JU, Larue L. The WNT-less wonder: WNT-independent β -catenin signaling[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*,

- 2017, 29(5): 524-540.
12. Ueno K, Hirata H, Hinoda Y, et al. Frizzled homolog proteins, microRNAs and Wnt signaling in cancer[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(8): 1731-1740.
 13. 武文浩, 马俊艳, 万虹, 等. β -catenin和Ki-67在脑干胶质瘤中的表达及意义[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2010, 15(4): 172-174.
WU Wenhao, MA Junyan, WAN Hong, et al. Expression and significance of β -catenin and Ki-67 in brain stem gliomas[J]. *Chinese Journal of Minimally Invasive Neurosurgery*, 2010, 15(4): 172-174.
 14. 李一明, 李维卿, 卢亦成, 等. 大鼠神经干细胞通过Wnt/ β -catenin途径抑制神经胶质瘤生长[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(12): 1277-1281.
LI Yiming, LI Weiqing, LU Yicheng, et al. Rat neural stem cells inhibit C6 glioma cell proliferation through Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2010, 31(12): 1277-1281.
 15. 李俊芝, 古丽那尔·阿布拉江, 苗娜, 等. Wnt通路中Sox17及 β 连环蛋白在少突胶质细胞起源肿瘤中的表达及其临床意义[J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(8): 546-550.
LI Junzhi, Gulinaer-Abulajiang, MIAO Na. The expression and clinical significance of Sox17 and beta-amyloid in the origin of oligodendrocytes in the Wnt pathway[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2014, 43(8): 546-550.
 16. 董晓, 房新志, 柴敏秀, 等. β -catenin与cyclinD1在乳腺癌中的表达及其意义[J]. *新疆医科大学学报*, 2008, 31(5): 541-543.
DONG Xiao, FANG Xinzhi, CHAI Minxiu, et al. Expression and significance of β -catenin and cyclinD1 in breast carcinoma[J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2008, 31(5): 541-543.

本文引用: 李俊芝, 王志强, 刘铭, 张巍. 微小RNA-9与Wnt/ β 连环素在星形细胞肿瘤的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(5): 936-941. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.005

Cite this article as: LI Junzhi, WANG Zhiqiang, LIU Ming, ZHANG Wei. Expression of microRNA-9 and Wnt/ β -catenin in astrocyte tumors and its clinical significance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(5): 936-941. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.005