

# miRNA-320d 和 FoxM1 在贲门癌组织中 表达相关性及其临床价值分析

冯帅豪<sup>1,2</sup>, 高社干<sup>1,2</sup>, 陈晓杰<sup>1,2</sup>, 刘怡文<sup>1,2</sup>, 冯笑山<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探究 miRNA-320d 和 FoxM1 在贲门癌组织中的表达相关性及其潜在临床价值。方法 收集 60 例贲门癌与配对癌旁组织,采用荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 miRNA-320d 表达水平及 miRNA-320d 的潜在下游调控靶基因 FoxM1 mRNA 表达水平;采用免疫组化 (IHC) 及 Western blot 法验证 FoxM1 的蛋白表达;随访分析 miRNA-320d 和 FoxM1 对 60 例患者生存期的影响。结果 miRNA-320d 在贲门癌组织中表达水平显著低于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ); FoxM1 在贲门癌组织中 mRNA 及蛋白水平均高表达,且 miRNA-320d 与 FoxM1 在核酸表达水平上呈负相关性;Kaplan-Meier 生存分析显示,高表达 miRNA-320d 的贲门癌患者总生存率 (OS) 高于低表达者 ( $P < 0.01$ );低表达 FoxM1 的贲门癌患者 OS 高于高表达者 ( $P < 0.01$ )。结论 在贲门癌中 FoxM1 是 miRNA-320d 的潜在下游调控靶基因,二者有望作为贲门癌患者的预后分子靶标。

**关键词** 贲门癌;miRNA-320d;FoxM1;预后

**中图分类号** R 735.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)02-0194-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.009

贲门腺癌 (gastric cardia adenocarcinoma, GCA) 是一种在胃贲门部发生的恶性肿瘤,是严重危害人类生命和健康的恶性肿瘤之一,在我国贲门癌高发区,GCA 发病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。由于 GCA 早期缺乏特异症状,诊断困难,绝大多数患者 (约 80%) 确诊时已到中晚期,失去根治手术机会,总的 5 年生存率小于 20%<sup>[2-3]</sup>,出现了“治疗瓶颈”。研究<sup>[4-6]</sup>表明 miRNA 与多种癌的发生发展密切相关,多种 miRNA 在非恶性组织和癌组织存在差异性表达。miR-320d 已被研究<sup>[7-8]</sup>证实是多种恶性肿瘤如大 B 细胞淋巴瘤、结肠癌等的抑癌基因。FoxM1 是叉头框 (forkhead box) 蛋白家族中的一员。FoxM1 主要

通过对细胞周期的调控来刺激细胞增生和有丝分裂的进行,在胚胎发育、组织再生过程中起重要作用<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10-11]</sup>显示 FoxM1 在许多恶性肿瘤内存在着高表达,如乳腺癌、肺癌、胃癌等。然而,到目前为止,尚无 miRNA-320d 及 FoxM1 在贲门癌中功能机制的报道。该研究探讨 miRNA-320d 及靶基因 FoxM1 在贲门癌中的相关作用,为贲门癌的治疗提供新的靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 组织来源** 共包括 60 例贲门癌及配对癌旁组织,其中 30 例收集自 2012 年 4 月~2013 年 3 月河南科技大学第一附属医院肿瘤科收治患者,30 例收集自 2013 年 3 月~8 月安阳肿瘤医院收治患者。

**1.2 试剂与方法** miRNA 提取试剂盒及 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;反转录试剂盒及荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒均购自南京 Vazyme 生物科技有限公司;羊抗兔 FoxM1 购自英国 Abcam 公司;GAPDH 多克隆内参一抗、羊抗兔二抗购自北京康为世纪生物科技有限公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 qRT-PCR 法检测** 用 miRNA 提取试剂盒提取 60 例配对贲门癌组织中 miRNA,采用分光光度计测定 miRNA 浓度和纯度,采用特异的 miRNA-320d 引物进行逆转录,同时以 U6 为内参;采用 TRIzol 法提取 60 例配对贲门癌组织中总 RNA,采用分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度,Oligo dT 作为通用引物进行基因 FoxM1 的逆转录反应,同时以 GAPDH 为内参,引物设计: FoxM1 F: 5'-AG-CAGTCTCTTACCTTCC-3', R: 5'-CTGGCAGTCTCTG-GATAA-3'; GAPDH F: 5'-CTCTGGTAAAGTGGATAT-TGT-3', R: 5'-GGTGAATCATATTGGAACA-3',反应体系: cDNA 2 μl、引物 2 μl、2 × SYBR Green Master Mix 10 μl、无菌蒸馏水 6 μl;反应程序: 95 °C 预变性 15 min、95 °C 变性 10 s、62 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 32 s,共进行 40 个循环。每个样本重复 3 次。

**1.3.2 Western blot 法检测** 使用 RIPA 蛋白裂解

2016-11-28 接收

基金项目: 2016 年度河南省科技创新人才计划项目

作者单位: <sup>1</sup> 河南科技大学临床医学院, 洛阳 471003

<sup>2</sup> 河南科技大学第一附属医院、河南科技大学肿瘤研究所、河南省肿瘤表观遗传重点实验室, 洛阳 471003

作者简介: 冯帅豪,男,硕士研究生;

冯笑山,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: doctor-feng09@163.com

液提取已研磨的 60 例配对贲门癌组织蛋白,置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。配制凝胶,利用 BCA 定量法制备  $30\ \mu\text{g}$  蛋白样品于  $20\ \mu\text{l}$  上样体系,进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后 5% 脱脂牛奶封闭,一抗 (FoxM1,  $1:1\ 000$ )  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜,二抗 (羊抗兔,  $1:3\ 000$ ) 室温孵育 2 h, TBST 缓冲液洗膜后, ECL 显影。以 GAPDH 为内参,每个样品重复 3 次。用 Image Lab 软件分析蛋白条带总灰度值,检测表达差异。

**1.3.3 IHC 法检测** 将免疫组化切片  $60^{\circ}\text{C}$  烤片 2 h 后,入二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,自来水冲洗 2~3 遍,放入柠檬酸溶液中微波修复抗原, PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 3 min;于组织上滴加 1 滴 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,室温孵育 10 min, PBS 冲洗;然后滴加正常非免疫动物血清,室温孵育 10 min;除去血清,加一抗 (FoxM1 抗体,  $1:200$ )  $4^{\circ}\text{C}$  过夜;次日室温复温 45 min,滴加二抗,室温孵育 20 min,滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液后滴加 DAB 溶液,镜下观察着色程度,再用苏木精复染 10 min,自来水冲洗后 1% 盐酸酒精分化、返蓝,脱水透明干燥,封片。结果判断, FoxM1 蛋白的阳性结果主要在细胞核染色。阳性标准:在高倍镜下 ( $\times 400$ ) 对每张切片随机选择 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,共计 500 个。着色强度:无色 0 分,淡棕色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分;计算每张切片阳性细胞百分率,阳性细胞分级  $< 25\%$  为 1 分,  $26\% \sim 50\%$  为 2 分,  $51\% \sim 75\%$  为 3 分,  $> 75\%$  为 4 分。2 项得分相乘,并取 5 个高倍视野的平均值,得到范围是 0~12 分的分数,按分数分为 4 个等级:阴性 (0~1 分)、弱阳性 (2~4 分)、阳性 (5~8 分)、强阳性 (9~12 分),  $> 2$  分视为阳性结果。

**1.4 统计学处理** 采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间数据的差异采用双侧样本的 Student's *t* 检验。miRNA-320d 和

FoxM1 的核酸水平相关性分析采用 Pearson 相关性分析。临床病理与 FoxM1 蛋白表达水平之间的关系分析采用 Fisher 精确检验。miRNA-320d 和 FoxM1 的表达与各组贲门癌患者之间的生存关系研究采用 Kaplan-Meier 分析。

## 2 结果

**2.1 60 例配对贲门癌组织中 miRNA-320d 和 FoxM1 的核酸水平表达** RT-PCR 检测结果显示, 60 例配对贲门癌组织中 miRNA-320d 的相对表达量为  $(1.137 \pm 0.101)$ , 明显低于癌旁组织  $(2.042 \pm 0.116)$ , 差异有统计学意义 ( $t = 5.885, P < 0.0001$ ), 见图 1A; 贲门癌组织 FoxM1 mRNA 的相对表达量为  $(5.812 \pm 0.533)$ , 明显高于癌旁组织  $(2.591 \pm 0.265)$ , 差异有统计学意义 ( $t = 5.412, P < 0.001$ ), 见图 1B; 贲门癌组织中 miRNA-320d 和 FoxM1 核酸水平的相关性分析结果呈负相关性 ( $r = -0.419, P = 0.001$ ), 见图 1C。

**2.2 FoxM1 在配对贲门癌组织中蛋白水平表达** Western blot 结果显示:在 30 例贲门癌组织中, FoxM1 蛋白的相对表达量  $(0.242 \pm 0.027)$  高于癌旁组织的相对表达量  $(0.170 \pm 0.020)$ , 差异有统计学意义 ( $t = 2.144, P = 0.036$ ), 见图 2。

IHC 结果显示:60 例配对贲门癌组织中,癌组织阳性表达 41 例,癌旁组织中阳性表达 27 例,在贲门癌组织中的表达阳性率高于癌旁组织,差异有统计学意义 ( $P = 0.016$ ); FoxM1 与贲门癌患者临床病理因素的关系见表 1, FoxM1 的表达阳性率在贲门癌组织大小及贲门癌临床分期中差异有统计学意义 ( $P = 0.024, P = 0.039$ )。第 7、13、27 例组织中的 FoxM1 特异性表达情况见图 3, FoxM1 在贲门癌组织中的染色得分为  $(4.82 \pm 0.36)$  分,明显高于癌旁组织  $(2.17 \pm 0.23)$  分,差异有统计学意义 ( $t = 6.246, P < 0.001$ )。

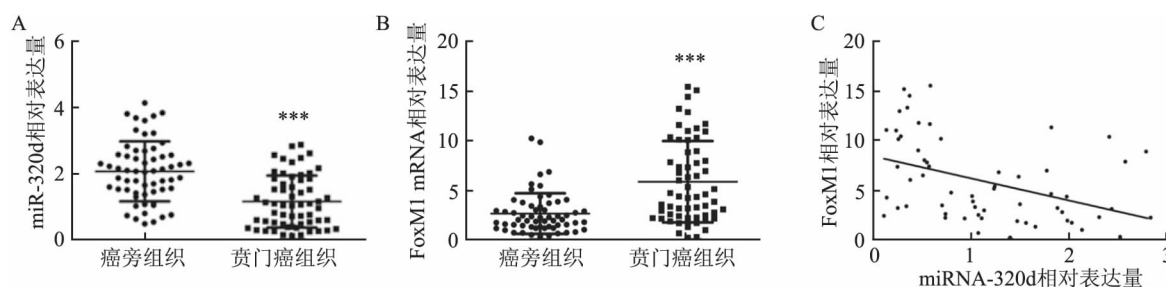


图 1 miRNA-320d 和 FoxM1 在 60 例配对贲门癌组织中的核酸水平表达情况

A: miRNA-320d 的核酸水平表达; B: FoxM1 的 mRNA 水平表达; C: miRNA-320d 与 FoxM1 的相关性分析; 与癌旁组织比较: \*\*\*  $P < 0.001$

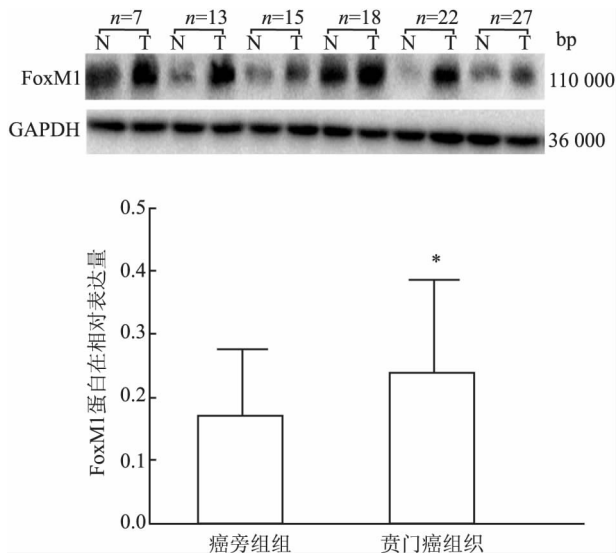


图2 FoxM1在30例配对贲门癌组织中蛋白水平表达  
N:癌旁组织;T:贲门癌组织;与癌旁组织比较:\* P < 0.05

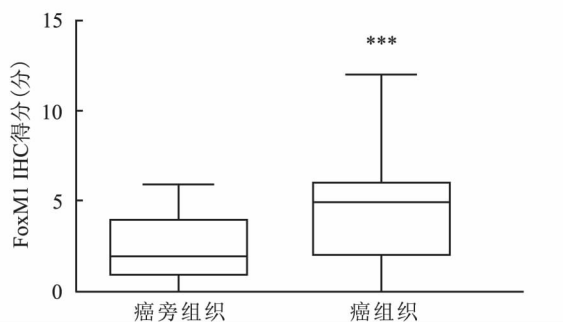
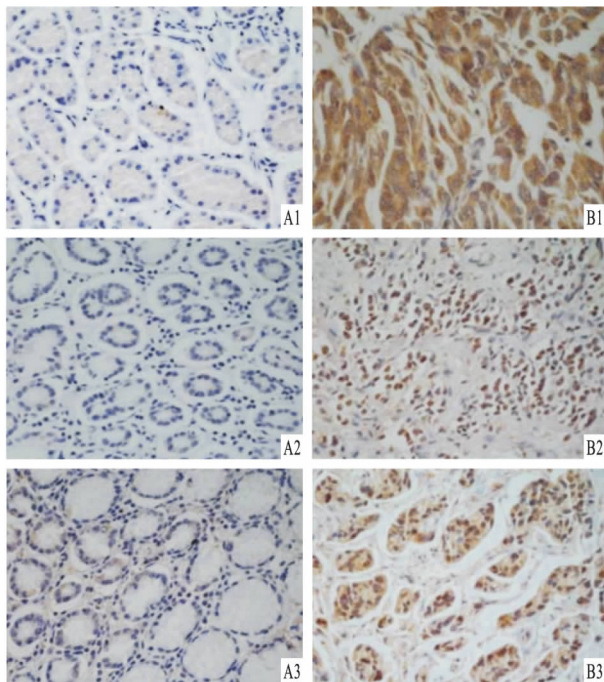


图3 免疫组化检测 FoxM1 在配对贲门癌组织中的表达 ×400  
A:癌旁组织;B:癌组织;1:第7例样本;2:第13例样本;3:第27例样本;与癌旁组织比较:\*\*\* P < 0.001

表1 FoxM1与贲门癌患者临床病理因素的关系(n)

项目	n	FoxM1		P 值
		+	-	
癌旁组织	60	27	33	0.016
贲门癌组织	60	41	19	
年龄(岁)				
<60	19	10	9	0.134
≥60	41	31	10	
性别				
男	44	29	15	0.754
女	16	12	4	
组织大小(cm)				
<5	27	14	13	0.024
≥5	33	27	6	
分化程度				
低	29	22	7	0.274
中高	31	19	12	
淋巴结转移				
无	10	4	6	0.059
有	50	37	13	
TNM 分期				
I ~ II	12	5	7	0.039
III ~ IV	48	36	12	

2.3 贲门癌组织中 miRNA-320d 和 FoxM1 的相对表达情况与临床病理特征的关系 贲门癌组织中 miRNA-320d 和 FoxM1 的表达与临床病理特征的关系见表2。miRNA-320d 和 FoxM1 在不同临床分期及病理特征中表达水平不同。miRNA-320d 在 ≥5 cm 肿瘤组织中相对表达量 (0.80 ± 0.16) 低于 <5 cm 肿瘤组织中的相对表达量 (1.35 ± 0.20), 差异有统计学意义 (P = 0.037)。随着临床分期进展, FoxM1 表达有上升的趋势, 其中 FoxM1 在 III ~ IV 期中的相对表达量为 (6.27 ± 0.58), 明显高于 I ~ II 期 (3.97 ± 1.21), 差异有统计学意义 (P = 0.029); FoxM1 在 ≥5 cm 肿瘤组织中相对表达量 (7.07 ± 0.81) 高于 <5 cm 肿瘤组织中的相对表达量 (4.55 ± 0.63), 差异有统计学意义 (P = 0.030); 其表达与患者性别、年龄无明显相关性。

2.4 miRNA-320d 和 FoxM1 在贲门癌中的表达与患者的预后关系情况 随访 50 个月, miRNA-320d 高表达的患者预后明显好于 miRNA-320d 低表达的患者 (P = 0.014); FoxM1 阴性表达的患者预后明显好于 FoxM1 阳性表达的患者 (P = 0.042)。见图4。

### 3 讨论

贲门癌的发生、发展是一个多基因改变的过程, 多种癌基因和抑癌基因的表达失常或失衡, 导致细胞失控增殖, 在肿瘤发生、发展和转归上起关键作

表2 miRNA-320d 和 FoxM1 的相对表达与贲门癌临床病理因素的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	n	miRNA-320d 相对表达量	P 值	FoxM1 相对表达量	P 值
癌旁组织	60	2.04 ± 0.12	<0.001	2.59 ± 0.27	<0.001
贲门癌组织	60	1.14 ± 0.10		5.81 ± 0.53	
年龄(岁)					
<60	19	1.03 ± 0.19	0.478	5.11 ± 0.74	0.485
≥60	41	1.19 ± 0.12		6.22 ± 0.72	
性别					
男	44	1.10 ± 0.12	0.495	5.64 ± 0.62	0.658
女	16	1.25 ± 0.19		6.29 ± 1.08	
组织大小(cm)					
<5	27	1.35 ± 0.20	0.037	4.55 ± 0.63	0.030
≥5	33	0.80 ± 0.16		7.07 ± 0.81	
分化程度					
低	29	0.95 ± 0.13	0.081	5.04 ± 0.76	0.140
中高	31	1.30 ± 0.15		6.48 ± 0.74	
淋巴结转移					
无	10	1.26 ± 0.25	0.585	5.92 ± 1.69	0.789
有	50	1.11 ± 0.11		5.79 ± 0.55	
TNM 分期					
I ~ II	12	1.47 ± 0.22	0.094	3.97 ± 1.21	0.030
III ~ IV	48	1.05 ± 0.11		6.27 ± 0.58	

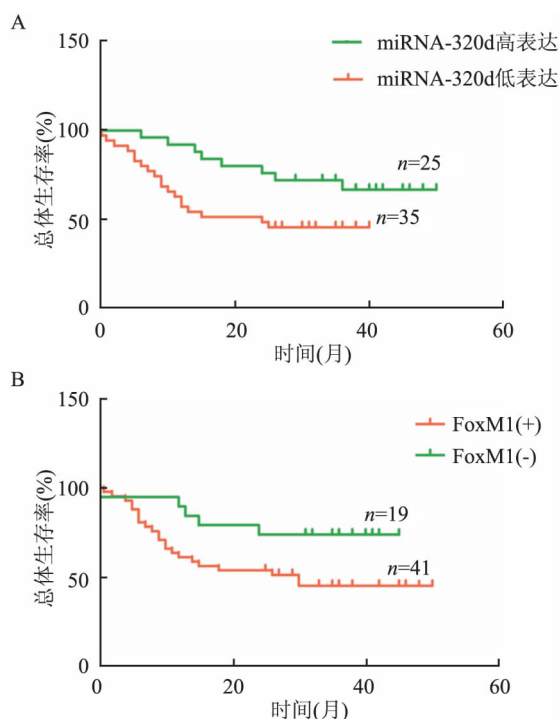


图4 miRNA-320d 和 FoxM1 表达与贲门癌患者预后的关系

A: miRNA-320d; B: FoxM1

用。miRNA 通过调控部分编码蛋白基因的表达,参与细胞活动的调节,调控不同的生物学进度<sup>[12]</sup>。某些特异性 miRNA 参与肿瘤的发生和进展,可作为肿

瘤特异性标志,有利于肿瘤的临床诊断、治疗及预后分析。研究<sup>[13]</sup>证实,miRNA 表达变化及其调控基因在食管癌和胃癌等肿瘤的发生、发展过程中起重要作用,但在贲门癌中的表达及作用机制的相关研究还很少。

本研究通过 qRT-PCR 法对 60 例贲门癌组织和癌旁组织进行检测,证实 miRNA-320d 在贲门癌组织中表达量显著低于在配对癌旁组织中的表达。随访资料显示 miRNA-320d 表达与贲门癌患者的癌组织大小有关系,并且 miRNA-320d 低表达的贲门癌患者预后较差。提示 miRNA-320d 可能作为一种抑癌基因,参与肿瘤的生长和转移。

FoxM1 是 Forkhead 的转录因子家族<sup>[14]</sup>的成员之一,在细胞增殖、凋亡、DNA 损伤和肿瘤形成等许多生理过程中均发挥作用<sup>[15-17]</sup>。本研究通过实验证实 FoxM1 的 mRNA 水平在贲门癌组织中表达高于配对的癌旁组织,并且与 miRNA-320d 表达呈负相关性。Western blot 和免疫组化法证实贲门癌组织 FoxM1 蛋白的表达高于癌旁组织。随访资料显示 FoxM1 的表达与贲门癌患者的癌组织大小及临床分期相关;对预后进行分析显示, FoxM1 阳性表达的患者预后较差。这些结果表明, FoxM1 的抑制是一个有前途的治疗贲门癌的策略。

综上所述,在贲门癌中 miR-320d 可能通过靶向 FoxM1 而抑制贲门癌的生长和侵袭,发挥着抑癌基因的作用,可作为贲门癌分子治疗的有效靶点。为进一步深入研究 miRNA-320d 靶向 FoxM1 调控通路在体内发挥抑癌基因的具体作用,将来需在细胞功能学和动物模型上进一步验证,为探索贲门癌治疗的分子靶点奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 王国清,魏文强,乔友林. 贲门癌筛查和早诊早治的经验[J]. 中国肿瘤, 2011, 20(7): 479-82.
- [2] Lin R, Maeda S, Liu C, et al. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas[J]. Oncogene 2007, 26(6): 851-8.
- [3] Wu W, Bhagat T D, Yang X, et al. Hypomethylation of noncoding DNA regions and overexpression of the long noncoding RNA, AFAP1-AS1, in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. Gastroenterology 2013, 144(5): 956-66.
- [4] Garofalo M, Romano G, Di Leva G, et al. EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers[J]. Nat Med, 2011, 18(1): 74-82.
- [5] Volinia S, Galasso M, Sana M E, et al. Breast cancer signatures

- for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of miRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 ,109(8) :3024 –9.
- [6] Liu C ,Kelnar K ,Liu B , et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44 [J]. *Nat Med* 2011 ,17(2) :211 –5.
- [7] Wu P Y ,Zhang X D ,Zhu J , et al. Low expression of microRNA-146b-5p and microRNA-320d predicts poor outcome of large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide , doxorubicin , vincristine , and prednisone [J]. *Hum Pathol* ,2014 ,45(8) :1664 –73.
- [8] Zhang H ,Li W ,Nan F , et al. MicroRNA expression profile of colon cancer stem-like cells in HT29 adenocarcinoma cell line [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 ,404(1) :273 –8.
- [9] Zhang B ,Liu L L ,Mao X , et al. Effects of metformin on FOXM1 expression and on the biological behavior of acute leukemia cell lines [J]. *Mol Med Rep* 2014 ,10(6) :3193 –8.
- [10] Madureira P A ,Varshochi R ,Constantinidou D , et al. The forkhead box M1 protein regulates the transcription of the estrogen receptor alpha in breast cancer cells [J]. *J Biol Chem* ,2006 ,281(35) :25167 –76.
- [11] Zeng J , Wang L , Li Q , et al. FoxM1 is up-regulated in gastric cancer and its inhibition leads to cellular senescence , partially dependent on p27 kip1 [J]. *J Pathol* 2009 ,218(4) :419 –27.
- [12] Felekis K ,Touvana E ,Stefanou Ch , et al. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease [J]. *Hippokratia* 2010 ,14(4) :236 –40.
- [13] Fang Y ,Fang D ,Hu J , et al. MicroRNA and its roles in esophageal cancer [J]. *Med Sci Monit* 2012 ,18(3) :RA22 –30.
- [14] Laoukili J ,Kooistra M R ,Brás A , et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability [J]. *Nat Cell Biol* 2005 ,7(2) :126 –36.
- [15] Wang I C ,Meliton L ,Tretiakova M , et al. Transgenic expression of the forkhead box M1 transcription factor induces formation of lung tumors [J]. *Oncogene* 2008 ,27(30) :4137 –49.
- [16] Dai B ,Gong A ,Jing Z , et al. Forkhead box M1 is regulated by heat shock factor 1 and promotes glioma cells survival under heat shock stress [J]. *J Biol Chem* 2013 ,288(3) :1634 –42.
- [17] 周 磊 张萍海 徐 欣 等. 下调叉头转录因子 M1 基因表达对非小细胞肺癌细胞生长与侵袭能力的影响 [J]. *中华医学杂志* 2009 ,89(34) :2424 –8.

## Expression correlation and analysis of clinical value of miRNA-320d and FoxM1 in the carcinoma of gastric cardia tissues

Feng Shuaihao<sup>1,2</sup> , Gao Shegan<sup>1,2</sup> , Chen Xiaojie<sup>1,2</sup> , et al

<sup>1</sup>College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology , Luoyang 471003 ;

<sup>2</sup>Henan Key Laboratory of Cancer Epigenetics , Cancer Institute , The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology , Luoyang 471003 )

**Abstract Objective** To investigate the expression of the miRNA-320d and FoxM1 in the carcinoma of gastric cardia tissues , and their association with the clinical prognosis. **Methods** 60 cases of cardiac carcinoma tissues and matching tissues adjacent to carcinoma were collected , and quantitative real-time PCR was used to examine the expression of miRNA-320d and potential downstream target gene FoxM1 mRNA. The expression of FoxM1 protein was detected by IHC and Western blot. The influence of miRNA-320d and FoxM1 on 60 cases of survival was studied by follow-up analysis. **Results** The expression of miRNA-320d in carcinoma of gastric cardia tissues was significantly lower than that in normal tissues adjacent to carcinoma ( $P < 0.01$ ). The expression of FoxM1 on mRNA and protein levels in cardiac carcinoma tissues was both higher than that in matching tissues adjacent to carcinoma. The expressions of miRNA - 320d and FoxM1 were negatively correlated in nucleic acid level. Kaplan-Meier survival analysis showed that the overall survival (OS) of cardiac carcinoma patients who had high expression of miRNA-320d was higher than that of low expression ( $P < 0.01$ ). The OS of cardiac carcinoma patients who had low expression of FoxM1 was higher than that of high expression ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** FoxM1 is the potential downstream target gene of miRNA-320d in carcinoma of gastric cardia. Both of these are expected as molecular targets in the prognosis of cardiac carcinoma patients.

**Key words** carcinoma of gastric cardia; miRNA - 320d; FoxM1; prognosis