广州医科大学

博士学位论文



**miR-146a 异常表达及其单核苷酸多态位点**

**rs2910164 与胃癌易感性的相关研究**

专 业 名 称：内科学

研 究 方 向：肿瘤发生机制与诊断 博士学位研究生：麦 艾

导 师： 蒋义国 教授杨巧媛 副教授

广州医科大学化学致癌研究所 广东省环境致癌医学重点实验室呼吸疾病国家重点实验室

二 0 一四年四月

**本课题受如下基金资助**

|  |  |
| --- | --- |
| **国家自然科学基金项目 （批准号 81172633）** | **负责人：蒋义国** |
| **国家自然科学基金项目 （批准号 30972443）** | **负责人：蒋义国** |
| **教育部高校博士点基金项目（博导类）**  **（批准号 20114423110002）** | **负责人：蒋义国** |
| **广东省自然科学基金重点项目（批准号 9251018201000004）** | **负责人：蒋义国** |
| **广东省高校高层次人才项目（批准号 2010-79 号）** | **负责人：蒋义国** |

2

目 录

[结 论](#_Toc686114835) 5

**[Abstract](#_Toc686114836)** 5

[前 言](#_Toc686114837) 9

[一、 材 料](#_Toc686114838) 11

[二、 方 法](#_Toc686114839) 12

[结论](#_Toc686114840) 16

[一、 材 料](#_Toc686114841) 18

[二、 方 法](#_Toc686114842) 19

[结论](#_Toc686114843) 25

[一、 材 料](#_Toc686114844) 26

[二、 方 法](#_Toc686114845) 27

[结论](#_Toc686114846) 38

[参考文献](#_Toc686114847) 39

[参考文献](#_Toc686114848) 42

**miR-146a异常表达及其单核苷酸多态位点**

**rs2910164与胃癌易感性的相关研究**

博士研究生：麦 艾

导 师：蒋义国 教授杨巧媛 副教授

广州医科大学化学致癌研究所广东省环境致癌医学重点实验室呼吸疾病国家重点实验室

**中文摘要**

**背景与目的**

胃癌是全球最常见的癌症之一，仅次于肺癌、乳腺癌和肠癌，居第四位，而且超过70%的病例出现在发展中国家，其中50%以上的病例出现在东亚地区。此外，胃癌也是世界上因癌症导致男女两性死亡的第二大原因之一。在亚洲，胃癌是位于乳腺癌和肺癌之后的第三大最常见癌症，居癌症死因的第二位，仅次于肺癌。尽管近年来胃癌的发病率与死亡率在许多国家呈下降的趋势，但它仍然是各地区突出的公共卫生问题之一。因此，在不久的将来，胃癌仍为人类疾病最大的经济负担之一。尽管目前胃癌的治疗手段都比较先进，各种辅助化疗的发展在一定程度上提高了临床的治疗效果，然而，伴有淋巴结转移的晚期胃癌预后仍然很差。因此，有学者认为，一些基因可能有助于胃癌向恶性潜能转化，但具体要鉴别哪些基因可以预测胃癌的预后和复发仍然需要更深入的研究。

microRNAs(微小RNA, miRNAs)是一种成熟的内源性、非编码的单链小分子、高度保守的RNAs，于转录后水平发挥作用，通过干扰靶mRNA切割或抑制翻译来调控基因的表达。已经有研究证实，miRNA长度为21～25个核苷酸，在多种人类疾病中发挥作用并参与几乎所有的生物学进程，包括疾病的发展、细胞分化、增殖与死亡。研究发现，miRNA的异常表达与实体癌（其中包括胃癌）

1

的发生、发展和预后都有密切联系，这提示miRNA可以作为肿瘤抑制基因或癌基因而存在。而且，胃癌的发生、发展是一个集遗传、环境及生活习惯等多因素、多机制、多步骤的演进过程，其中，基因多态性是决定胃癌个体易感性和临床转归的一个重要因素。目前，有学者认为出现在miRNA或其结合部位的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是导致miRNA遗传变异的的异常源头，从而导致癌症易感性的差别。基因组内特定核苷酸位置上存在两种不同的碱基，其中最少一种在群体中的频率不小于1%，这种基因组的单个位点上的碱基的差异称为SNPs，它是存在于人群体中每个个体的基因序列细微差别，在整个人类基因组中分布相当广泛，其具有的生物学功能，可以通过影响成熟miRNA的二级结构、表达水平及其与靶基因的识别，使miRNA的调控网络发生异常，进而与肿瘤的发生发展密切相关。虽然大多数SNPs并不影响基因的功能，但一些特定区域的SNPs可以使人容易罹患疾病或影响对药物的敏感性。miRNA基因序列中的SNPs与癌症易感性关系的研究，开启了探索癌症发展分子生物学机制的新途径。

研究表明，在许多不同类型的癌症中，如肝癌、前列腺癌、乳头状甲状腺癌和乳腺癌中均发现miR-146a异常表达，这可能在癌症的发生发展中充当一种新的调节器的作用。有报道认为，miR-146a中一种G/ C多态现象rs2910164是影响乳头状甲状腺癌中miR-146a表达的原因，这同样也与肝细胞癌、前列腺癌、乳头状甲状腺癌和乳腺癌患病风险有关系。然而，由于胃癌中miR-146a的表达同时具有上调和下调作用，故此miR-146a与胃癌之间的关系仍然具有争议性。因此，本实验致力于验证胃癌组织和细胞系中miR-146a的表达，找出多态现象

rs2910164与胃癌患病风险之间的特征性关系，从而有助于确定miR-146a在胃癌中的确切作用。

本实验发现，在人胃癌组织中的miR-146a呈下调表达，这与胃癌细胞中得出的结果一致。携带miR-146a变异GC/ CC基因型的个体与携带野生型GG基因型的个体相比，前者患胃癌的风险要低于后者；此外，从G碱基到C碱基的突变，可以导致胃癌病人中成熟miR-146a表达的上升。上述结果均表明miR-146a在胃癌病人中发挥肿瘤抑制基因的作用，由此提供证据证明了miR-146a的SNP

rs2910164可能在胃癌的预后中发挥重要的作用。

2

**方** 法

1. **收集胃癌标本**本病例组选取2009年7月至2013年3月在江西省南昌大学第一附属医院及广州医学院附属肿瘤医院接受手术治疗，并经临床资料和病理组织学检查确诊的胃癌患者417例，并对每病例收集配对的癌组织和非癌组织。男

264例，女153例，平均年龄（51.53±12.57）岁。其中H. pylori阳性患者有119

例（占28.54%），H. pylori阴性患者有298例（占71.46%）；138例患者有吸烟史

（占33.09%）；76例患者有胃癌家族史（占18.23%）。

2. **收集非癌症对照样本** 同期从南昌疾控中心获得了相同地区的420例健康对照者，并同时收集其血液样本。男250例，女170例，平均年龄（44.87±7.49）岁。其中H. pylori阳性患者有104例（占24.76%），H. pylori阴性患者有316 例

（占75.24%）；119例患者有吸烟史（占28.33%）；58例患者有胃癌家族史（占

13.81%)。

3. **细胞培养实验** 对人的胃上皮细胞系(GES-1)和6种胃癌细胞系(AGS, BGC-823, HGC-27, MKN-28, MKN-45 and SGC-7901)进行培养。

4. **RNA的提取与miR-146a的检测实验** 用TRIzol分别提取组织与细胞中的总

RNA，并获得相应的cDNA，运用qRT-PCR测出样本中miR-146a与miR-146a

前体的含量。

5. **miR146a的瞬时转染实验** 选miR-146a表达水平最低的AGS细胞作转染实验，用miR-146a mimic和NC对AGS细胞进行12孔板的转染，测定转染效率。

6. **细胞增殖实验** 转染24小时后的AGS细胞按每孔0.5×10 4个细胞的密度接种于96孔板中，孵育24小时后，用CCK-8试剂按试剂盒检测其增殖能力。

7. **克隆形成实验** 转染24小时后的AGS细胞按每孔1000个细胞的密度接种于新的6 cm培养皿中孵育10天，进行克隆形成分析。

8. **细胞周期分析** 收集转染24小时后的AGS细胞经过相应的处理，通过流式细胞仪对细胞的DNA含量进行分析。

9. **血液样本的DNA分离及基因分型** 应用QuickGene DNA全血试剂盒（富士，东京，日本）来提取全血样本中的基因组DNA，并用7500实时PCR系统（Applied

Biosystems)对miR-146a SNP (rs2910164, G/C)进行基因分型工作。

10. **统计学分析** 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。病例组与对照组之间基

3

本情况的比较采用χ2检验；采用χ2检验计算*Hardy-Weinberg*平衡吻合度，分析对照组人口学特征和各位点基因型频率的观察值与预期值，评估其代表性；以多因素*Logistic*回归法计算表示胃癌发病相对风险度的比值比（odds ratio, OR）及其95%可信区间（confidence interval, CI）。*P* <0.05为差异有统计学意义。

**结 果**

1. **病例组与对照组的一般资料无统计学差异**病例组（417例）与对照组（420例）在性别(*P* = 0.261)、年龄（*P* = 0.292）、H. *pylori*的感染状态(*P* = 0.217)、居住地（*P* = 0.103）、胃癌家族史(*P* = 0.082)、吸烟史(*P* = 0.135)等方面无统计学差异（*P*值均大于0.05）。

2. **胃癌标本中miR-146a呈低表达**随机抽取的53例胃癌标本中，相对于配对正常组织，50例（94.3%）胃癌组织中miR-146a的表达降低，组间差异有统计学意义（*P* <0.01）。

3. **胃癌细胞系中miR-146a呈低表达** 与人的正常胃上皮细胞系（GES-1）相比，六种来源于胃癌的细胞系（AGS, BGC-823, HGC-27, MKN-28, MKN-45和SGC-7901）中的miR-146a均呈现明显的低表达（*P*值均小于0.05）。

4. **miR146a的瞬时转染实验**选miR-146a表达水平最低的AGS细胞作转染实验，发现转染了miR-146a mimic的细胞与单纯转染NC或未转染（Mock组）的

AGS细胞比较，miR-146a的表达水平呈明显的上调（*P* <0.01）。

*5.* **miR146a对细胞增殖能力的改变**转染24小时后的AGS细胞，通过CCK-8法发现转染miR-146a mimic的细胞增殖率明显低于NC对照组细胞（*P* <0.01）。克隆形成实验中，miR-146a mimic转染组AGS细胞的克隆形成率低于对照组（*P*

< 0.05）。

6. **细胞周期** 通过流式细胞仪分析转染24小时后的AGS细胞，显示转染

miR-146a mimic的细胞更多集中在G0/ G1期（*P* <0.05）。

7. **不同rs2910164基因型与胃癌患病风险的关系**携带rs2910164 GC和CC基因型的个体患胃癌的风险比GG纯合子携带者低约0.605倍(95%CI, 0.368-0.912; *P* = 0.011)；此外，C等位基因与G等位基因比较，前者与胃癌的发生呈显著的低相关性(OR = 0.611; 95% CI, 0.504-0.922; *P* = 0.008)。

4

8. **不同rs2910164基因型与胃癌易感性的关系** 分层分析后发现，rs2910164 的

GC/CC基因型携带者患淋巴结转移的风险明显低于GG纯合子携带者（OR = 0.527; 95%CI: 0.360-0.791; *P* = 0.005）；此外，Ⅲ/ Ⅳ期的胃癌病人中，GC/ CC基因型携带者的患癌风险低于GG纯合子携带者(OR = 0.622; 95% CI: 0.423-0.917; *P* = 0.023)。

9. **多态位点rs2910164的G/ C基因变异对miR-146a表达的影响** mir-146a SNP

rs2910164的不同基因型胃癌病人中，GG、GC和CC基因型的分布分别是30

（46.15%）、26 (40.00%)和9例(13.85%). 与rs2910164 GG基因型相比，GC、CC

和GC/ CC基因型携带者均表现出较高的成熟mir-146a表达水平（*P*均小于0.01）；但是，上述三种基因型携带者与GG基因型的病人相比，组间pri-miR-146a的表达水平没有统计学差异（图4B, 均*P*> 0.05）。

结 论

1．miR-146a通过抑制胃癌细胞的增殖和克隆形成能力，在胃癌中发挥肿瘤抑制基因的作用。

2. miR-146a多态位点rs2910164 C等位基因携带者的胃癌易感性相对低于G 纯

合子携带者。

3．miR-146a多态位点rs2910164 C等位基因的携带者中成熟miR-146a的表达高于G纯合子携带者。

**关键词**

胃癌；microRNA；miR-146a；单核苷酸多态性（SNP）；胃癌易感性

5

**MiR-146a rs2910164 G/C polymorphism is associated with gastric cancer risk through aberrant exprssion of miR-146a**

**Ph. D Candidate: Ai Mai Mentor: Professor. Yiguo Jiang**

**Vice Professor. Qiaoyuan Yang Institute for Chemical Carcinogenesis**

**Guangdong Medical Key Laboratory of Chemical Carcinogenesis State Key Laboratory of Respiratory Diseases,**

**Guangzhou Medical University**

**Abstract**

**Background and object**

Gastric cancer (GC) is the fourth most common cancer in the world with more than 70% of cases occur in the developing world. More than 50% of cases occur in Eastern Asia. GC is the second leading cause of cancer death in both sexes worldwide. In Asia, GC is the third most common cancer after breast and lung and is the second most common cause of cancer death after lung cancer. Although the incidence and mortality rates are slowly declining in many countries of Asia, GC still remains a significant public health problem. Therefore, gastric cancer is becoming one of the biggest economic burden among diseases in the nearly future. Despite the advances in current therapeutic approaches of gastric cancer, the development of adjuvant chemotherapy, which improve the clinical therapeutic effect in some way. On the contrary, the prognosis of gastric cancer still remains poor in those advanced cases with lymph node metastasis. Therefore, some reporters believed that some genes seem to contribute to the malignant potential of gastric cancer, but it remains extremely important that the identification of the precise factors which predict the prognosis and

6

Recurrence of gastric cancer.

MicroRNAs (miRNAs) are a family of mature, 21- to 25- nucleotide-long small noncoding and highly conserved RNA genes products that regulate gene expression by base pairing with target mRNAs at the 3'-untranslated region, leading to mRNA cleavage or translational repression. It has been suggested that miRNAs are involved in various biological processes, including the development of disease, cell differentiation, cell proliferation and cell death. Moreover, recent evidence has revealed that the change of miRNAs expression play critical roles during tumorigenesis, development and prognosis of solid cancers, including gastric cancer, which indicated that miRNAs could act as tumor suppressors or oncogenes.

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) is the most common type of genetic variation in the human genome and contribute to human phenotypic differences.

Polymorphisms in human miRNA genome lesions could modify the biological processes by influencing the processing and/ or target selection of miRNAs, which are implicated in cell cycle regulation, and thereby play critical roles in carcinogenesis.

Currently, some researchers believed that the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in miRNA or it's binding sites were the abnormal source of genetic variation, which contribute to cancer susceptibility. There were two different nucleotide on specific position in the genome, whose frequency was no less than 1% in the population. The difference of a single nucleotide of this genomic was known as SNPs, which has a specific biology, can regulate the expression of miRNA and effect its regulatory functions, thus has significant association of the tumor development. SNPs are the minor differences in gene sequence which present in each individual human

Population and fairly well distributed throughout the human genome. Otherwise, most SNPs do not affect the function of the gene, but the SNPs in some specific area can make people susceptible to disease or affect the sensitivity of the drug. Recently, the association between SNP in miRNA sequence and cancer risk opened up an avenue to explore novel molecular mechanism of cancer development.

MiR-146a has been found aberrantly expressed in various types of cancer during the past decades, it probably acted as a novel regulator in cancer development and

7

Progression. The level of miR-146a is regulated by a single nucleotide polymorphism (SNP). Recently, some researchers reported that the G / C polymorphism (rs2910164) in miR-146a, was the reason which affecting the expression of miR-146a in papillary thyroid carcinoma. Likewise, it was also associated with the risk of hepatocellular carcinoma, prostate carcinoma, papillary thyroid carcinoma and breast cancer.

However, the relation between miR-146a and gastric cancer is still controversial, as expression of miR-146a has been found both up- and down- regulated in gastric cancer. Therefore, we focus on confirming the expression of miR-146a in gastric cancer tissues and cell lines, and characterized the association between rs2910164 polymorphism and gastric cancer risk, which may be useful for identifying the exact role of miR-146a in gastric cancer.

In our study, we found miR-146a is down-regulated in human gastric cancer tissues as well as in gastric cancer cells. Individuals with variant GC/CC genotype of miR-146a were in decreased risk for gastric cancer compared with those carrying wild GG genotype. In addition, the G-to-C change resulted in increased expression of mature miR-146a in gastric cancer patients. These results indicated a role for miR-146a as a tumor suppressor in gastric cancer and provided evidence that miR-146a SNP rs2910164 might play an important role in the prognosis of gastric cancer.

**Methods**

1. **Collected gastric specimens:** Our study recruited 417 patients whose clinical datas and histopathologically confirmed to be gastric cancer from July 2009 to March 2013 in the First Affiliated Hospital of Nanchang University (Nanchang, China) and Cancer Center of Guangzhou Medical University (Guangzhou, China). Cancerous and paired non-cancerous tissues were obtained from underwent gastric cancer surgery patients and immediately snap frozen in liquid nitrogen.

2. **Collected non-cancer samples:** 420 healthy people were recruited from Nanchang CDC over the same area, simultaneously, collecting their blood samples.

3. **Cell culture:** All cells were maintained at 37℃in a humidified incubator

8

Containing 5% CO2 and treated with celastrol in complete medium, including human gastric epithelial cell line (GES-1) and six gastric cancer cell lines (AGS, BGC-823, HGC-27, MKN-28, MKN-45 and SGC-7901).

4. **RNA extraction and the detection of miR-146a:** Total RNA from tissue samples and cell lines was obtained with the TRIzol®isolation reagent, and the total RNA were reverse transcribed to synthesize cDNA. qRT-PCR method was used to quantify mature miR-146a and pri-miR-146a.

5. **Transient miRNA-146a transfection:** AGS cell was chosen to do the transfection experiments which has the lowest expression of miR-146a. AGS cells in 12-well plates were transfected with miR146a precursor (miR-146a mimic) or scrambled pre-miR negative control (miR-146a mimic NC), then measured the transfection efficiency.

6. **Cell proliferation assay**: Transfected AGS cells were plated in 96-well plates (0.5

×104 cells per well）at 24h after transfection and cultured in normal conditions. After incubation for 24h, CCK-8 reagent was added to detect cell proliferation.

7. **Colony formation assay:** After transfected for 24h, AGS cells were trypsinized, counted and placed onto the fresh 60mm plates, density of 1000 cells per plate. The colony formation rate was calculated after culturing for 10 days.

8. **Cell cycle analysis:** AGS cells were harvested at 24h after transfection and fixed in

70% ice-cold ethanol, treated with RNAse A, stained with 50mg/ml propidium iodide and 0.1mg/ml RNase A for DNA content analysis by flow cytometry with a FACS Calibur system (Becton Dickinson, Franklin, NJ). The percentage of cell population in each phase was calculated with FlowJo FACS analysis software (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

9. **DNA isolation and genotyping:** Genomic DNA was extracted by QuickGene DNA

Whole blood kit (Fujifilm, Tokyo, Japan) from the whole blood sample according to the manufacturer's recommended protocol by QuickGene-810 isolation system (Fujifilm). For miR-146a SNP (rs2910164, G/C), genotyping work was performed using Taqman Allelic Discrimination (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with a commercially available primer probe set and an Applied Biosystems 7500

9

Real-time PCR system (Applied Biosystems). In order to ensure the quality of genotyping, sequencing was done for 10% of randomly selected samples with high DNA quality, and the results were> 98% concordant.

10. **Statistical analysis:** Biostatistical analyses were performed using SPSS 17.0.

*Student's t-test*, *one-way ANOVA*, orχ*2-test* was using to test the difference among groups. Pearson'sχ*2-test* was used to compare the the basic situation between the case group and the control group. Goodness-of-fitχ2 analysis was used to test the Hardy-Weinberg equilibrium, to analysis the observed and expected values between demographic characteristics and genotype frequencies in the control group, which to assess their representativeness. To assess the association of the SNP with the risk of gastric cancer, we estimated odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) using the unconditional multivariate logistic regression model. *P* <0.05 was considered statistically significant.

**Results**

1. **No statistically difference in general datas between case group and control group:** There were no statistically differences between two groups, such as case group (417 cases) and control group (420 cases). The investigate factors including sex (*P* = 0.261), age (*P* = 0.292), the infection status of H. *pylori* (*P* = 0.217), the residence (*P* = 0.103), the family history of gastric cancer (*P* = 0.082), the smoking history (*P* = 0.135).

2. **Low expression of miR-146a in gastric cancer tissue samples:** Specimens were randomly selected in 53 gastric cancer patients, in which there were significant differences of miR-146a expression between gastric cancer tissues and pairing adjacent normal tissue. Moreover, 50 gastric cancer tissue samples in this study were compared with pairing adjacent normal tissue, which the former showed significantly lower expression (*P* <0.01).

3. **Low expression of miR-146a in gastric cancer cells:** It showed a significantly lower expression of miR -146a in six cell lines deriving from gastric cancer, such

10

As AGS, BGC-823, HGC-27, MKN-28, MKN-45 and SGC-7901, which

Comparing with normal human gastric epithelial cell line (GES-1).

4. **Transient miR-146a transfection:** AGS cells was selected for the next transfection studies because of its lowest miR-146a expression levels among these six human gastric cancer cell lines. Significantly up-regulated effect on miR-146a expression level in AGS cells by transfection of miR-146a mimic was observed, compared with mimic NC-transfected or untransfected (mock) AGS cells.

5. **AGS cells proliferation were changed by miR-146a:** After transfected for 24 hours, the proliferation rate of AGS cells with miR-146a over-expression was determined via CCK-8 assay. Compared to mimic NC group, the cell proliferation in miR-146a mimic transfected group was at a significantly lower rate (*P* <0.01). The colony formation assay yielded similar results. miR-146a mimic transfected AGS cells showed lower colony-forming efficiency compared with controls (*P* <0.05).

6. **Cell cycle analysis:** After transfected for 24 hours, we measured cell cycle distribution by flow cytometry. AGS transfected with miR-146a mimic resulted in a higher percentage of cells in G0/ G1 phase (*P* <0.05) and lower fraction in S phase (*P* <0.01), compared with NC group.

7. **The relationship between different rs2910164 genotype and the risk of gastric cancer:** After adjustments were made for potential covariates, carriers of the rs2910164 GC (*OR* = 0.719; 95% CI, 0.461-1.003; *P* = 0.031) or CC genotype (*OR* = 0.185; 95% CI, 0.111-0.508; *P* = 0.005) exhibited a statistically significant decreased risk of gastric cancer compared with the carriers of the rs2910164 GG genotype. Subjects carried rs2910164 GC and CC genotypes exhibited a 0.605-fold decreased risk (95% CI, 0.368-0.912; *P* = 0.011) compared to GG homozygotes carriers. Furthermore, the C allele displayed a significantly low correlation with the occurrence of gastric cancer compared to the G allele (*OR* = 0.611; 95% CI, 0.504-0.922; *P* = 0.008).

**8. The relationship between different rs2910164 genotype and gastric cancer**

11

**Prognosis:** After the stratified analyses, significant decreased risk of lymph node metastasis (OR = 0.527; 95% CI, 0.360-0.791; *P* = 0.005) was found in carriers of the rs2910164 GC/ CC genotype compared with the GG homozygotes carriers. We also found that the reduction of gastric risk was associated with GC/ CC genotype

Tended to be more pronounced in patients in stage Ⅲ/ Ⅳ (*OR* = 0.622, 95% CI,

0.423-0.917, *P* = 0.023) compared to those in stage Ⅰ/Ⅱ.

9. **Impact of rs2910164 G/C polymorphism variant on miR-146a expression:** In different genotypes of the miR-146a polymorphism rs2910164, the distribution of the GG, GC, and CC genotypes was 30 (46.15%), 26 (40.00%), and 9 (13.85%), respectively. Compared to carriers of rs2910164 GG genotype, GC, CC and GC/ CC genotype carriers exhibited higher expression levels of mature miR-146a (*P* <0.01). However, the expression levels of pri-miR-146a didn't have significant difference in the groups.

**Conclusions**

1. The cell proliferation and colony formation in AGS cells had been inhibited by increasing the expression of miR-146a, which proved that miR-146a might serve as a tumor suppressor gene in gastric carcinogenesis.

2. Carriers of the rs2910164 C allele should have less risk in suffering from gastric cancer and lymph node metastasis than G allele carriers.

3. The mature miR-146a expression in the rs2910164 C allele carriers were higher than those of the G allele carriers.

**KEy words**

Gastric cancer; microRNA; miR-146a; Single nucleotide polymorphisms (SNP); The risk of desease

12

**英文缩略词表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **缩略语** | **英文全称** | **中文名称** |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism | 限制性片段长度多态性 |
| RISC | RNA-induced silencing complex | 沉默复合物 |
| PTC | Papillary thyroid carcinoma | 乳头状甲状腺癌 |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid | 乙二胺四乙酸 |
| OR | Odds Ratios | 优势比（比数比） |
| CI | Confidence Interval | 可信区间 |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism | 单核苷酸多态性 |
| RNA | Ribonucleic Acid | 核糖核酸 |
| dNTP | Deoxyribonucleoside triphosphate | 脱氧核糖核苷三磷酸 |
| mRNA | Message ribonucleic acid | 信使核糖核酸 |
| EDTA | Ethylenediaminotheraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| PBS | Phosphate buffer solution | 磷酸盐缓冲液 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| qRT-PCR | Quantitative reverse transcript-polymerase chain  reaction | 定量逆转录-聚合酶链反应 |
| RNasin | Ribonucleotidase inhibitor | 核糖核酸酶抑制剂 |

13

**miR-146a异常表达及其单核苷酸多态位点**

**rs2910164与胃癌易感性的相关研究**

前 言

胃癌是世界上常见的恶性肿瘤，是严重危害人们健康的疾病之一。据近年资料统计，全球每年新发胃癌病例87万例，占所有新发癌症病例的9%，仅次于肺癌、乳腺癌和肠癌，居第四位。每年约有64万人因胃癌死亡，居癌症死因的第二位。特别是在东亚地区[1]，全球大约有三分之二的胃癌病人及死亡病例出现在发展中国家地区，其中包括中国[2]。因此，从中国收集到的病例资料表明，在不久的将来，胃癌将成为人们疾病最大的经济负担之一[3]。尽管目前胃癌的治疗手段都比较先进，包括手术切除、激素治疗、放疗及化疗等技术，但胃癌仍然是世界上因癌症所致死亡的第二种最常见的原因[4, 5]。胃癌的高发生率和低生存率主要是因为缺乏有效的早期筛查指标以及有效的治疗手段。虽然在过去的几十年里，位于贲门外胃癌的发病率及死亡率有所下降，但仍有相当一部分这种病人在获得诊断时已经是疾病的晚期了，因此，手术切除已不是首选的治疗。此外，不同的生物学特性，会导致每一个胃癌病人不同的临床分型、不同的愈合及不同的治疗反应，而引起这些差异的部分原因可能是某些宿主遗传方面的差异。也就是说，虽然很多人会接触到相同的危险因素，但最终发展成为胃癌的仅仅占了少数，提示个体对胃癌存在着遗传易感性。胃癌的遗传易感性分：（1）强遗传易感性，即家族性胃癌，见于某些患有遗传性癌综合征的家系，仅占胃癌患者约5%～

10%；（2）弱遗传易感性，见于散发性胃癌，由许多微效基因共同作用并在某些环境因素作用下经历复杂而漫长的过程所产生的一个总效应，约占90%以上。慢性萎缩性胃炎、幽门螺杆菌感染患者和胃癌高发区居民中仅有少数患者发生胃癌，提示个体遗传易感性在胃癌发生中起到了重要作用。这可能与机体对各种慢性损伤的反应有明显个体差异有关，这些差异可为广泛存在于各种相关基因中的基因多态性，即能够影响某些基因表达的基因多态性作为遗传因素之一的也可能影响到胃癌的发生。因此有学者认为，一些基因似乎有助于胃癌向恶性潜能转化，

14

但具体要鉴别哪些基因可以预测胃癌的预后和复发仍然是本研究方向的重点。

microRNAs(微小RNA, miRNA)是一种成熟的、长度为21～25个核苷酸、非编码的单链小分子RNA基因产物，通过与靶基因miRNA的3’非翻译区域的碱基配对来调节基因的表达，从而导致mRNA的切割或翻译抑制[6-9]。有研究认为，至少约有30%以上的人类基因是受到miRNA的调控，miRNA几乎参与到各种生物学过程中，包括细胞增殖，细胞凋亡，应激性及脂肪代谢[10]。此外，最近有研究证实，miRNA表达的改变与实体肿瘤的发生、发展和预后有密切关系，其中包括胃癌，即提示miRNA可以作为肿瘤抑制基因或癌基因参与肿瘤的基因调控[11-16]. Hou等[17]的研究结果表明，miR-146a在胃癌中表达下调，并对细胞增殖与凋亡过程起调控作用。另有报道证实，由于表皮生长因子受体（EGFR）及NF-κB在肿瘤及癌症进展中的作用已经是肯定的，miR-146a通过下调其靶基因——EGFR和白细胞介素-1受体相关激酶1（IRAK1）的表达，后者为NF-κB的上游基因，从而抑制胰腺癌的侵袭和转移[18-20], Kogo等[21]首次从临床的角度报道了miR-146a 在胃癌中的意义。另有文献报道[16] miR-146a 前体

（pre-miR-146a）的种子序列G/ C可调节成熟miR-146a的水平，从而影响甲状腺癌、前列腺癌、肝癌、乳腺癌等的患癌风险。

基因多态性是人类基因组中同一位置的基因或DNA序列具有不同类型，在人群中具有一定的分布频率。单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms,

SNPs）主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性，是人类基因组中最常见的基因多态性，是我们人体差异的最基本因素，这些差异形成了不同的基因型，决定了人们患有疾病的不同风险和对药物的不同反应。因此，它是人类可遗传的变异中最常见的一种。基因组中蛋白编码基因序列的SNPs与肿瘤的相关性已有大量报道，但基因组中的非编码序列，如miRNA等的遗传变异与肿瘤易感性的研究仍处于起步阶段。人miRNA基因组的遗传多态位点可能会通过影响miRNA的表达水平及其与靶基因的结合来改变miRNA的生物学功能，从而在细胞增殖、生长及凋亡的过程及致癌作用中发挥重要作用[22,23]。最近的研究表明，miRNA基因序列中的SNPs可以影响成熟miRNA的二级结构和表达水平，从而影响其在肿瘤发生发展过程中的调控作用，为肿瘤形成的分子生物学机制方面研究开启了一条新的途径。成熟的miRNA是由较长的初级转录物

15

经过一系列核酸酶的剪切加工而产生的，初级转录物称为miRNA转录本（primary miRNA, pri-miRNA）。pri-miRNA 长度从几百到几千个碱基不等，带有5‘帽子和

3'polyA尾巴，以及1到数个发夹茎环结构。Pri-miRNA经剪切产生约70个碱基的

miRNA前体，（即miRNA precusor, pre-miRNA）。pre-miRNA为单一发夹结构，

5’带有磷酸基团，3’有两个突出碱基，并带有3’羟基。pre-miRNA经进一步剪切，形成长度约为22个碱基的单链miRNA成熟体（mature miRNA）。

有研究发现在过去的十几年里，各种不同的癌症中miR-146a呈异常表达，这可能在癌症的发生发展过程中起到一种新的调节作用[24, 25]，而miR-146a的表达水平与其基因遗传变异SNP位点密切相关。最近，Hu等[26]对miRNA序列进行了常见SNPs的筛选并鉴别出四个SNPs位点（rs2910164, rs2292832, rs11614913和rs3746444），分别位于miR-146a，miR-149, miR-196a2和miR-499几个pre-miRNA区域。其中的G/ C SNP (rs2910164)位于pre-miR-146a的种子序列内，已有报道发现SNP rs2910164可以调节甲状腺乳头状癌中miR-146a的表达，因此，该miRNA在肝细胞癌、前列腺癌、甲状腺乳头状癌和乳腺癌的患病风险中具有重要作用[15,16,27-29]。然而，由于在胃癌病人中同时发现miR-146a上调和下调的表达，因此，miR-146a与胃癌之间的关系仍然具有争议性[18, 19, 21]。本研究首先检测胃癌组织和胃癌细胞株中miR-146a的表达，通过病例-对照研究分析miR-146a rs2910164多态位点与胃癌发病风险的相关性，以期为确定miR-146a在胃癌中的作用提供依据。

本研究结果表明，miR-146a在胃癌组织与胃癌细胞株中表达水平降低，携带miR-146a SNP rs2910164变异型GC/ CC基因型个体的胃癌发病风险低于携带野生型GG基因型的个体；此外，G/ C突变会导致胃癌病人中成熟miR-146a表达的上升。这些结果提示miR-146a在胃癌发生发展中具有肿瘤抑制基因的作用，miR-146a SNP rs2910164位点与胃癌易感性密切相关。

16

第一部分 miR-146a基因在胃癌组织及胃癌细胞株中的表达

**第一部分miR-146a基因在胃癌组织及胃癌细胞株中的表达**

胃癌是亚洲地区最常见的恶性肿瘤之一，辅助化疗的发展在一定程度上提高了临床效果，然而，进展期及伴有淋巴结转移的胃癌预后仍较差。许多基因似乎与胃癌的恶性潜能有关，然而，如何准确鉴别与胃癌预后及复发相关的因素仍是至关重要。microRNAs(微小RNA, miRNA)是一种成熟的、长度为21～25个核苷酸、非编码的单链小分子RNA基因产物，具有调节细胞增殖、分化与凋亡的一系列生物学功能；此外，miRNA功能失调在癌症的发展及致癌过程中发挥关键作用。

研究发现癌症发生发展过程中涉及大量miRNA的表达异常，以胃癌为例，有研究报道的包括表达升高的miR-17、miR-18a、miR-20a、miR-21、miR-93、miR-96、miR-106a、miR-200b、miR-335和miR-451以及表达下调的miR-24、miR-29c、miR-132、miR-145、miR-155、miR-375、miR-433和miR- 494[30]。关于miR-146a的报道也有不少，miR-146a与许多癌症的发生密切相关，如肝癌、前列腺癌、甲状腺癌和乳腺癌等[15,16,29,31]。然而，miR-146a的表达与胃癌之间的关系存在着很大争议，因为既有研究报道miR-146a在胃癌中的表达升高，也有报道miR-146a在胃癌中存在表达下调的情况[18, 19, 21]。因此，我们在本次实验中采用探针法定量PCR检测miR-146a在临床胃癌组织和胃癌细胞系当中的表达情况。

17

广州医科大学博士学位论文

**材料与方法**

# 一、 材 料

## （一） 临床样本

本研究由广州医科大学及南昌大学伦理审查委员会批准。本研究把2009 年

7月至2013年3月在南昌大学第一附属医院及广州医学院肿瘤中心，经临床及

组织病理学确诊为胃癌的53例病人纳入研究，而术前接受了放疗或化疗的病人则被排除在本研究之外。从接受胃癌手术的病例中收集配对的癌组织和癌旁组织，配对的癌旁组织是从距离肿瘤中心组织3 cm外的位置处取样，组织分离后立即置液氮中保存备用。患者的相关个人信息和临床资料均来自临床住院病历和病理学记录，参与本实验的患者均签署了由广州医科大学及南昌大学审查委员会出示的知情同意书。

## （二） 细胞株

Zhi ku quan 20150807

本实验使用的细胞株购自湘雅中心实验室的细胞研究中心（长沙，中国），

包括人的胃上皮细胞株(GES-1)和6种胃癌细胞株(AGS, BGC-823, HGC-27, MKN-28, MKN-45和SGC-7901)。

## （三） 主要试剂

F12k培养基（美国Gibco公司）

DMEM培养基（美国Gibco公司）胎牛血清（杭州四季青）

胰蛋白酶（美国Gibco公司）

DMSO（美国Gibco公司）

TRIzol细胞裂解液（美国Invitrogen公司）

ReverTra Ace qPCR RT kit (日本TOYOBO公司) TaqMan MicroRNA assay (美国Applied Biosystems公司)

## （四）主要溶液配制

1×DMEM培养基：取450 ml DMEM培养基，加入50 ml胎牛血清和5 ml

18

第一部分 miR-146a基因在胃癌组织及胃癌细胞株中的表达

100×青链霉素，充分混匀后取4 ml加入6 cm培养皿并放入培养箱，测试3天无细菌生长后方可使用，4℃保存。

1×F12 k培养基：取450 ml F12k培养基，加入50 ml胎牛血清和5 ml 100×

青链霉素，充分混匀后取4 ml加入6 cm培养皿并放入培养箱，经测试3天无细菌生长方可使用，4℃保存。

10000 u/ ml双抗溶液：取2瓶100万国际单位/瓶链霉素和5瓶40万国际单位/瓶青霉素盐，分别加入200 ml无菌去离子水中，-20℃储存备用。

PBS磷酸盐缓冲液：混合8.0 g NaCl、0.2g KCl、0.2g KH2PO4、3.49 g Na2HPO4·12H 2O，用d3H2O充分溶解后定容至1000 ml，分装后高压灭菌，4℃保存备用。

0.02%EDTA: EDTA 0.2 g、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、K2HPO4 0.2 g 、

Na2HPO4·12H 2O 2.89 g，溶于1 L三蒸水中，分装后高压灭菌，4℃保存备用。

0.25%胰蛋白酶：用已灭菌的PBS溶解0.5 g胰蛋白酶粉末于烧杯中，用PBS溶液定容至200 ml。4℃放置过夜，用0.22μm滤器过滤除菌，分装后-20℃储存备用。

Zhi ku quan 20150807

胰酶消化液：将0.25%胰蛋白酶和0.02%EDTA等体积混匀，4℃保存备用。

细胞冻存液：DMEM培养液（或F12k培养基）、小牛血清、DMSO按7:2:1

的体积比例混匀，4℃保存备用。

0.1%（V/V）焦炭酸二乙酯（DEPC）处理水：加100μl DEPC于100 ml三蒸水中混匀，室温过夜，高压灭菌后，置4℃冰箱保存。

75%乙醇：75 ml无水乙醇，用0.1% DEPC水定容至100 ml，混匀，室温保存。

95%乙醇：95 ml无水乙醇，用0.1% DEPC水定容至100 ml，混匀，室温保存。

## （五） 主要仪器和设备

MDF-290AT超低温冰箱（日本Sanyo公司）MCV-13BSU超净工作台（日本Sanyo公司）MCO-175 CO2培养箱（日本Sanyo公司）SM-F123制冰机（日本Sanyo公司）

19

广州医科大学博士学位论文

YDS-30-125液氮罐（中国河南）

CU 420型电热恒温水浴箱（中国江苏）

ND-1000紫外可见光分光光度计(美国Nanodrop Technologies公司) YX-400A不锈钢双层立式电热蒸汽消毒器（中国上海）

MSE微型离心机（日本Sanyo公司）

ML-902定时恒温磁力搅拌器（中国上海浦江分析仪器厂）XDS-1倒置生物显微镜（重庆光学仪器厂）

7500实时定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司) ECLIPSE TE300荧光显微镜（日本Nikon公司 ）

超纯水制备系统（[广州艾威仪器科技有限公司](http://www.baidu.com/link?url=k7sgGJqjJ4zBBpC8yDF8xDh8vibi0FZyIHYWbI1PPRqwN5EwSmpbgxxnAyfq-SGuUo7Z06KzwJW)）

100-1000μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）20-200μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）10-100μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）2-20μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）

0.5-10μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）

Zhi ku quan 20150807

0.1-2.5μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）

# 二、 方 法

## （一） 细胞培养方法

细胞复苏：从液氮罐中取出细胞在含10%胎牛血清的培养基中，置入温度为

37℃恒温水浴箱中快速融化，800 rpm离心5分钟，弃掉上清，含5%CO2，饱和湿度的恒温培养箱中培养，过5小时后换液。后隔天观察，换液。待其融合度达到80%左右时，用0.25%的胰蛋白酶液进行消化，每周传代1～2次，传代后第

3天换液。

细胞换液：无菌条件下倒掉并用枪头吸出旧的培养液，用1×PBS清洗细胞

2～3次，每次用量3～5 ml，轻轻摇晃培养皿后，将液体全部吸出，如此反复2～

3次，再加入适量新的培养液，放入温度为37℃，含5%CO2，饱和湿度的培养箱中继续培养。

20

第一部分 miR-146a基因在胃癌组织及胃癌细胞株中的表达

细胞传代培养：细胞生长至80%～90%汇合度时传代，用移液器吸去培养瓶内旧培养液，1×PBS充分洗涤后，用0.25%胰酶消化至大部分细胞变圆后，用移液器反复吹打成单细胞悬液，计数后以5×105个/ ml密度接种至新的6 cm培养皿中。

细胞计数：用枪头轻轻地反复吹打细胞，制成细胞悬液，按l: l的比例向离心管中加入新培养基，充分混匀；将洁净的计数板平放在显微镜台上，盖上盖玻片，从计数板边缘轻轻加1滴细胞悬液到细胞计数板上，使其填满计数板与盖片之间的空隙，镜下分别计数四角大方格内的细胞数，按下列公式计算：

细胞数（个/ ml）＝(四大格细胞总数/4)×稀释倍数×104

细胞冻存：待细胞长至80%～90%汇合度后，用移液器吸去培养皿内的旧培养液，用1×PBS充分洗涤后，待0.25%胰蛋白酶将细胞消化至大部分细胞变圆后，加入含有胎牛血清的完全培养基终止消化，用移液器反复吹打制成单细胞悬液，细胞计数后用1000 rpm转速，离心5分钟，弃去上清，以106个细胞/ ml的比例加入冻存液，充分混匀后分装入无菌冻存管中密封，标注细胞系名称、冻存人和日期等信息。先置于4℃，30分钟，然后-20℃，30分钟，再在-80℃过夜，最后置于液氮（-180℃）罐中保存。

## （二） 组织和细胞总**RNA**提取以及**RNA**浓度测定及质量鉴定

当细胞培养至对数生长期（一般为第三、四代细胞），按照Trizol细胞裂解液说明书提取总RNA。

1. 预处理：取组织块50～100 mg放入组织匀浆器，加入300μl的Trizol试剂，将组织磨匀，移入1.5 ml的EP管中再补加700μl Trizol试剂，室温放置5分钟。提取细胞总RNA，以6 cm培养皿为例，弃掉旧培养基，加入1 ml 的

Trizol试剂，室温放置5分钟，移液器反复吹打后移入1.5 ml EP管。

2. 三相分离：按照每1 ml Trizol裂解液加入200μl的氯仿，盖好管盖，用手剧烈震摇15秒，室温静置10分钟，放入4℃预冷的离心机中，离心10分钟，12000 g。

3. RNA沉淀：用枪头吸取上层水相（约200μl）至一新的1.5 ml EP管中，按照每1 ml Trizol裂解液加入500μl异丙醇后混匀，室温放置10分钟，放入离心机中离心，4℃，12000 g，10分钟。

21

广州医科大学博士学位论文

4. RNA洗涤：倒除上清后加入1 ml75%的乙醇，上下颠倒混匀，放入4℃的离心机中以7500 g的速度离心5分钟。

5. RNA第二次洗涤：倒除上清后加入1 ml 95%的乙醇，放入4℃的离心机中离心5分钟，7500 g。

6. RNA溶解：弃掉上清，倒置在超净工作台中，干燥10分钟至乙醇完全挥发，然后加入20μl DEPC水溶解，轻轻吹打数次，置于56℃温育器中温育10分钟助溶。

7. RNA分装储存：加入1μl RNasin，调整RNA浓度为250 ng/μl，分装后转入

-70℃超低温冰箱储存，或立即用于逆转录。

8. RNA浓度及质量测定：取2μl RNA样品，以Rnase-free H2O调零，Rnase-free

H2O作为空白对照，使用ND-1000紫外可见光分光光度计测量RNA样品的浓度值，以及OD260/ OD280值和OD260/ OD230值。两项比值均为2左右的样品被认为可用于下一步实验。

## （三） 逆转录与实时定量**PCR**

1. miRNA逆转录反应体系制备：

1)制备RT master Mix

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 体积（μl） |
| DNTPs (100/ um) | 0.075 |
| RT Enzyme (50 u/ μl) | 0.5 |
| 10 × RT buffer | 0.75 |
| RNease inhibitor (20 u/ μl) | 0.095 |
| Rnease-Free d3H2O | 2.08 |
| 合计 | 3.5 |

2)每个样品逆转录反应吸取3.5μl RT master Mix至200μl PCR管中，加入RNA

样品2.5μl，枪头混匀，瞬时离心；

3）每管加入1.5μl RT Primer，枪头混匀，瞬时离心，冰育5 min；

4）于热循环仪上进行逆转录反应：

22

第一部分 miR-146a基因在胃癌组织及胃癌细胞株中的表达

反应条件：Stage 1: 16℃30min；

Stage 2: 42℃温育30min; Stage 3: 85℃变性5min; Stage 4: 4℃∞

2. qPCR反应体系制备：

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 体积（μl） |
| Taqman 2× Universal PCR Master Mix，No UNG | 5 |
| Taqman MicroRNA Assay （20×） | 0.5 |
| CDNA from RT reaction | 0.67 |
| Nuclease-free H2O | 3.83 |
| 合计 | 10 |

ABI 7500实时定量PCR仪上反应：95℃10 min，95℃15s，60℃1 min, 45 cycles。

## （四） 统计学分析

各实验组数据均以均数±标准差（MEAM±SD）表示，采用SPSS 16.0统计软件进行分析。满足正态分布且方差齐同的两组间的比较，采用独立样本的*t*检验；三组以上的比较采用方差分析，组间两两比较方差齐同时采用单因素

（*ANOVA*）检验；分布不满足正态时采用非参数检验；*P* <0.05定为差异显著性水平。

23

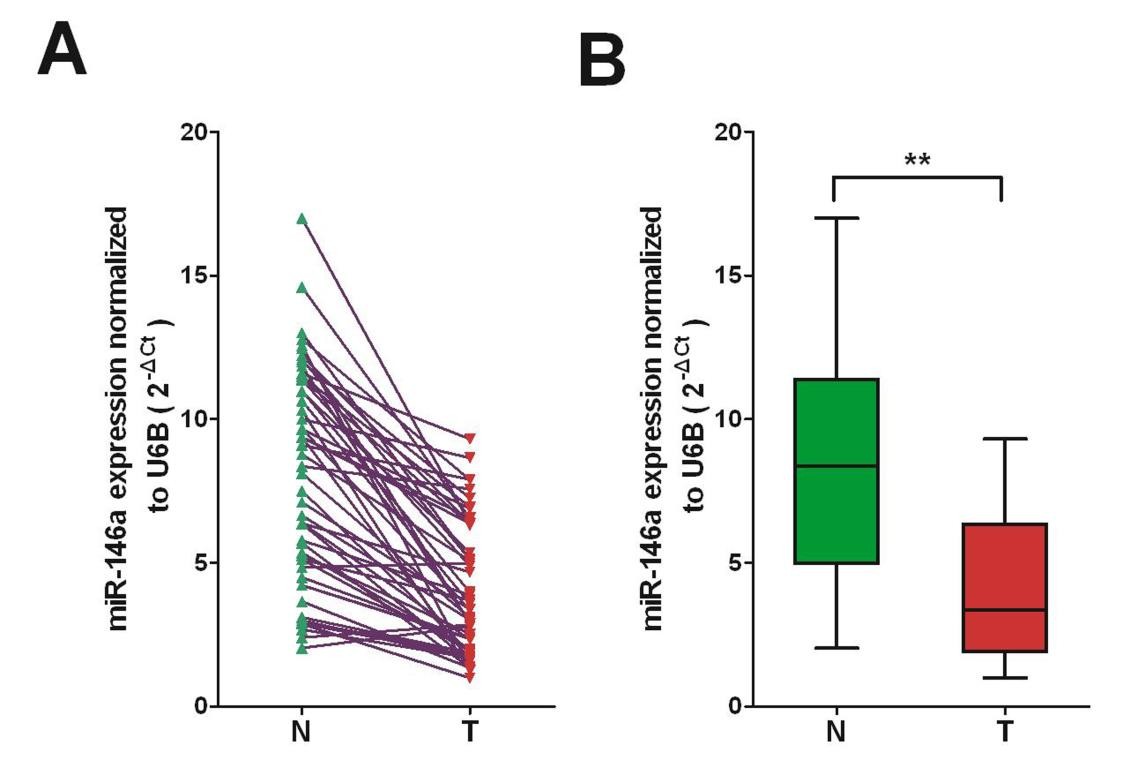
广州医科大学博士学位论文

**结 果**

## （一） 胃癌组织样本中**miR-146a**的表达

应用实时定量PCR（qRT-PCR）方法，对53例胃癌病人的胃癌组织与配对邻近正常组织中miR-146a的表达进行检测。从本实验结果可以看出，两组中的miR-146a表达水平存在显著性差异，即50例胃癌标本（94.3%）与配对的临近正常组织比较，mir-146a在前者中呈现出明显低表达，并且两者中位数的差异为

2.4倍（*P* <0.01），该结果表明胃癌病例组织中常见miR-146a表达的下降（图1）。



**图 1** **.** miR-146a**在胃癌组织中的表达**

A. 53例胃癌组织与相应癌旁组织中的miR-146a表达情况的比较（T， 胃癌组织；N， 癌旁组织）

B. miR-146a在53例胃癌组织和癌旁组织当中的表达情况（水平线代表各组的中位数）

## （二） 胃癌细胞中**miR-146a**的表达

为了进一步验证miR-146a是否在胃癌中呈下调表达，本实验选择了六种来源于胃癌的细胞株（AGS, BGC-823, HGC-27, MKN-28, MKN-45 和SGC-7901），

并对其中miR-146a的表达进行检测。实验结果与我们事先的假设一致，即与人

24

### 第一部分 miR-146a基因在胃癌组织及胃癌细胞株中的表达

的正常胃上皮细胞株（GES-1）相比，所有的这六种胃癌细胞株中miR-146a均呈现明显的低表达（图2）。



**图 2** **.** **miR-146a在胃癌细胞株中的表达**

miR-146a在六株来源于胃癌的细胞当中的表达水平（\**P* <0.05, \*\**P* <0.01, 以正常胃上皮细胞GES-1为对照）

本次实验结果提示，与正常组织与细胞比较，miR-146a在胃癌组织及细胞中均呈下调表达，我们推测其可能作为一种肿瘤抑制基因而存在。

25

广州医科大学博士学位论文

**讨论**

尽管近十年来，胃癌的发生率和死亡率在不断地下降，然而在世界范围内，胃癌仍处于常见恶性肿瘤的第四位，而在恶性肿瘤的死亡原因中排第二位，仅次于肺癌。据统计，每年全球新发胃癌病例约934000例，其中约有三分之二的胃癌病例发生在发展中国家，而中国的胃癌病例就占了其中的42%[32]。胃癌发病率低的地区通常也伴随较低的幽门螺旋杆菌(helicobacterpylori, HP)感染率，如美国HP感染率低于20%，而胃癌发病率高的国家，HP感染率高于70%。一项前瞻性研究揭示HP感染者患胃癌的危险性较非HP感染者患胃癌的危险性增加

2.3倍。就全球而言，HP感染情况存在地域差异，其中以亚洲和东欧人群的感染率较高，而西欧、北欧以及北美居民的HP感染率相对较低[33]。一项对移居美国的日本移民进行的流行病学调查显示，由日本向美国移民的人群胃癌患病危险居于原居住国人群和移居国人群之间，虽然第一代移民仍趋于保持其较高的危险性，而在美国出生的日本移民后裔的患病风险则逐渐降低并不断接近美国人群的水平，此结果提示环境因素在胃癌的发生中有较大的影响作用。同时也有研究表明，大约10%胃癌患者呈现家族聚集现象，胃癌患者一级亲属患胃癌的危险性是对照组的3倍[34]。这说明胃癌的发生不光与环境因素有关，与遗传因素同样也有着密切联系。

miRNA是基因转录后表达调控的研究热点，它是一类长度为21～25 nt的非编码单链小分子核苷酸，源于生物自身基因组。位于细胞核内的rniRNA基因在

Ⅱ型RNA聚合酶(RNA polymeraseⅡ, PolⅡ)作用下先产生初级miRNA (pri-miRNA)，接着pri-miRNA在胞核内被Drosha酶复合体切割为发夹状miRNA前体(pre-miRNA)，pre-miRNA又被exportin-5转运至胞浆，在胞浆中由Dicer酶复合体进一步切割为双链rniRNA [35]，然后其中一条链降解，另一条遂形成成熟

miRNA. miRNA可与RNA诱导沉默复合体(RNA-iduced silencing complex, RISC)选择性结合，成熟单链miRNA在RISC介导下通过碱基互补结合于同源基因mRNA，并降解或抑制该mRNA翻译，从而调控该基因的表达[19]。人类基因组中约有1/ 3的基因是受miRNA调控网络调控的[36]。近年来，随着miRNA在肿瘤领域的研究突飞猛进，大量资料也已经表明miRNA是与人类肿瘤息息相关的。有研究结果发现，let-7在非小细胞肺癌细胞中明显下调表达并负性调节RAS 基

26

### 第一部分 miR-146a基因在胃癌组织及胃癌细胞株中的表达

因，miR-17-92在肺癌中尤其是小细胞肺癌中明显表达上调[37]；miR-34在胃癌、肺癌和乳腺癌等六种肿瘤中都呈现高表达[38]。Feng等[39]通过研究发现，miR-126在胃癌组织中的表达显著降低，并且与肿瘤大小、淋巴结转移以及TNM分期等临床病理特征呈明显负相关；并且进一步通过向胃癌细胞株SGC-790l中转染miR-126模拟物，发现癌细胞增殖、浸润、转移能力明显受到抑制，细胞周期分析显示miR-126模拟物导致癌细胞G0／G1期阻滞；还发现并证实衔接蛋白Crk受miR-126负性调节。上述均提示miR-126通过抑制Crk发挥抑癌作用。miRNA与肿瘤相关性的研究对于帮助人类了解肿瘤的生物学机制，并为miRNA在肿瘤的预防、临床诊断和治疗上的应用提供了新的思路。

本次研究我们选择2009年7月至2013年3月经南昌大学第一附属医院及广

州医学院肿瘤中心严格筛选确诊为胃癌的53例病人作为研究对象，采用探针法定量PCR比较病人的胃癌组织与癌旁组织的miR-146a表达水平。我们发现其中有50例胃癌标本（94.3%）与其配对的癌旁组织比较，mir-146a在胃癌组织中呈现明显的低表达（两者中位数的差异为2.4 倍，*P* < 0.01）。为了进一步确认miR-146a是否在胃癌中呈低表达，我们选择了六株来源于胃癌的细胞（AGS, BGC-823, HGC-27, MKN-28, MKN-45 和SGC-7901）和一株正常胃上皮细胞

（GES-1）。并以GES-1为对照，对六株胃癌细胞中miR-146a的表达水平进行检测。实验结果与临床样本中得到的结果一致，即与GES-1相比，所有的这六种胃癌细胞株中miR-146a均呈现明显的低表达，其中以在AGS细胞中的表达下调最为明显。根据这些结果，我们推测miR-146a可能作为一种肿瘤抑制基因而存在。

27

结**论**

本研究通过对临床样本胃癌组织和癌旁组织中miR-146a表达水平的检测，并在同样来自胃癌的六株细胞中验证我们的结果，得出以下结论：

1. 胃癌组织中miR-146a的表达水平明显低于配对的正常组织，提示miR-146a

在胃癌组织中呈下调表达。

2. miR-146a在胃癌细胞株AGS、BGC-823、HGC-27、MKN-28、MKN-45 和

SGC-7901中均呈下调表达，其中以在AGS细胞中的表达下调最为明显。

3. miR-146a在胃癌中可能作为一种肿瘤抑制基因而存在。

28

### 第二部分 上调**miR-146a**表达对胃癌细胞的影响及其机制

miRNAs作为一类新的癌基因或者抑癌基因，它们的表达失调与多种肿瘤的发生发展有着密切的联系。近年来，miRNA的表达与胃癌的关系越来越受到关注，已有研究证实了miR-7、miR-25、miR-27a、miR-93和miR-375等参与了胃癌的发生发展过程。Ding等[40]利用miRNA芯片技术发现miR-375在胃癌组织中表达明显下调，通过靶向JAK2进而抑制胃癌细胞的增殖。

前期研究过程中，我们通过对比胃癌组织和癌旁组织，胃癌细胞和正常细胞的miR-146a的表达水平，我们发现在胃癌组织和胃癌细胞中，miR-146a的表达水平是明显下调的。Kogo等[21]首次从临床的角度报道了miR-146a在胃癌中的意义。另有文献报道[16,28,31]miR-146a前体（pre-miR-146a）的种子序列G/ C可调节成熟miR-146a的水平，从而影响甲状腺癌、前列腺癌、肝癌、乳腺癌等的患癌风险。结合这些已发表的文献，我们可以推测miR-146a在胃癌发生过程中可能发挥抑癌基因的作用。为了印证我们的推论，我们利用瞬时转染的方法，向miR-146a表达水平最低的AGS细胞中导入miR-146a的模拟物（mimic），通过观察上调miR-146a的表达对AGS胃癌细胞生物学功能的影响，探讨miR-146a通过何种途径抑制胃癌的发生发展。

29

**材料与方法**

# 一、 材 料

## （一） 细胞株

本实验使用的细胞系购自湘雅中心实验室的细胞研究中心（长沙，中国），包括人的胃上皮细胞(GES-1) 和胃癌细胞株（AGS）。

## （二） 主要试剂

F12k培养基（美国Gibco公司）胎牛血清（杭州四季青）胰蛋白酶（美国Gibco公司）

DMSO（美国Gibco公司）

脂质体LipofectamineTM2000（美国Invitrogen公司）

化学修饰的miRNA 模拟物与FAM 标记的非特异性序列阴性对照（美国

Applied Biosystems公司)

TRIzol细胞裂解液（美国Invitrogen公司）

ReverTra Ace qPCR RT kit (日本TOYOBO公司) TaqMan MicroRNA assay (美国Applied Biosystems公司)

Opti-MEM培养基（美国Invitrogen公司）低熔点琼脂糖（美国sigma公司）

细胞增殖检测试剂盒Cell Counting Kit-8（日本Dojindo公司）碘化丙碇PI（美国sigma公司）

## （三） 主要溶液配制

1×F12k培养基：取450 ml F12k培养基、50 ml胎牛血清和5 ml 100×双抗，充分混匀后取4 ml加入6 cm培养皿并放入CO2培养箱，经测试3天无菌落生长方可使用，4℃保存。

10000 u/ ml双抗溶液：取2瓶100万国际单位/瓶链霉素和5瓶40万国际单位/瓶青霉素盐，分别加入200 ml无菌去离子水，-20℃储存备用。

磷酸盐缓冲液：取8.0 g NaCl、0.2 g KCl、0.2 g KH2PO4、3.49 g Na2HPO4·12H 2O，用三蒸水充分溶解后定容至1000 ml，分装后灭菌，4℃保存备

30

用。

0.02%EDTA: EDTA 0.2g、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、K2HPO4 0.2 g 、

Na2HPO4·12H 2O 2.89 g，溶于1 L三蒸水中，分装后高压灭菌，4℃保存备用。

0.25%胰蛋白酶：用已灭菌的PBS溶解0.5 g胰蛋白酶粉末于烧杯中，定容至200 ml。4℃放置过夜，用0.22微米过滤器过滤除菌，分装后-20℃储存备用。

胰酶消化液：将0.25%胰蛋白酶和0.02%EDTA等体积混匀，4℃保存备用。细胞冻存液：F12k培养基、小牛血清、DMSO按7:2:1的体积比例混匀，4 ℃

保存备用。

5×Tris-硼酸缓冲液（5×TBE）：称取Tris碱54 g、硼酸27.5g，用少量三蒸水溶解，加入20 ml 0.5M EDTA（pH 8.0），混匀，最后定容至1000 ml，室温放置。

0.1%（V/V）焦炭酸二乙酯（DEPC）处理水：加100μl DEPC于100 ml三蒸水中混匀，室温过夜，高压灭菌后，置4℃冰箱保存。

75%乙醇：75 ml无水乙醇，用0.1% DEPC处理水定容至100 ml，混匀，室温保存。

95%乙醇：95 ml无水乙醇，用0.1% DEPC处理水定容至100 ml，混匀，室温保存。

1.2%和0.7%的低熔点琼脂糖：分别称量1.2 g和0.7 g低熔点琼脂糖，溶于

100 ml的d3H2O中，经高压灭菌后，至于50℃环境中储存。

## （四） 主要仪器和设备

MDF-290AT超低温冰箱（日本Sanyo公司）MCV-13BSU超净工作台（日本Sanyo公司）MCO-175 CO2培养箱（日本Sanyo公司）SM-F123制冰机（日本Sanyo公司）

YDS-30-125液氮罐（中国河南）

CU 420型电热恒温水浴箱（中国江苏）

ML-902定时恒温磁力搅拌器（中国上海浦江分析仪器厂）

ND-1000紫外可见光分光光度计(美国Nanodrop Technologies公司) YX-400A不锈钢双层立式电热蒸汽消毒器（中国上海）

31

MSE微型离心机（日本Sanyo公司）

XDS-1倒置生物显微镜（重庆光学仪器厂）

Synergy 2 microplate reader全自动酶标仪（美国BioTek Instruments公司）

7500实时定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司) ECLIPSE TE300荧光显微镜（日本Nikon公司 ）

超纯水制备系统（[广州艾威仪器科技有限公司](http://www.baidu.com/link?url=k7sgGJqjJ4zBBpC8yDF8xDh8vibi0FZyIHYWbI1PPRqwN5EwSmpbgxxnAyfq-SGuUo7Z06KzwJW)）100～1000μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）20～200μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）10～100μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）2～20μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）0.5～10μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）0.1～2.5μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）

# 二、 方 法

## （一） 细胞培养方法

细胞复苏：从液氮罐中取出AGS细胞在含10%胎牛血清的F12培养基中，置入温度为37℃恒温水浴箱中快速融化，800 rpm，离心5分钟，弃上清，新的培养基重悬，转至6 cm培养皿中，移入饱和湿度的恒温培养箱中培养，过5小时后换液。后隔天观察，换液。待其融合度达到80%左右时，用胰蛋白酶液消化，每周传代1～2次，传代后第3天换液。

细胞换液：倒除并用枪头吸出旧的培养液，用灭菌1×PBS清洗细胞2～3次，每次用量3～5 ml，轻轻摇晃培养皿后，将液体全部吸出，如此反复2～3次，再加入适量新的培养液，放入温度为37℃，含5%CO2，饱和湿度的培养箱中继续培养。

细胞传代：细胞生长至80%～90%汇合度时，用移液器吸去培养瓶内旧培养液，PBS充分洗涤后，用0.25%胰酶消化后，用移液器反复吹打成单细胞悬液，计数后以5×105个/ ml密度接种至新的6 cm培养皿中。

细胞计数：用移液器轻轻地反复吹打细胞，制成单细胞悬液，按l: l的比例向离心管中加入新培养基，充分混匀；将洁净的计数板平放在显微镜台上，盖上

32

盖玻片，从计数板边缘轻轻加1滴细胞悬液到细胞计数板上，镜下分别计数四角大方格内的细胞数，按下列公式计算：

细胞数（个/ ml）＝(四大格细胞总数/4)×稀释倍数×104

细胞冻存：待细胞处于对数生长期，用移液器吸去培养皿内的旧培养液，用

1×PBS充分洗涤后，待0.25%胰蛋白酶将细胞消化至大部分细胞变圆后，加入含有胎牛血清的完全培养基终止消化，用移液器反复吹打制成单细胞悬液，细胞计数后，1000 rpm，离心5分钟，弃去上清，以106个细胞/ ml的比例加入冻存液，充分混匀后分装入无菌冻存管中密封，标注细胞系名称、冻存人和日期等信息。先置于4℃，30分钟，然后-20℃，30分钟，再在-80℃过夜，最后置于液氮罐中保存。

## （二） 组织和细胞总**RNA**提取以及**RNA**浓度测定及质量鉴定

当细胞培养至对数生长期，按照Trizol细胞裂解液说明书提取总RNA。

1. 预处理：提取细胞总RNA，以6 cm培养皿为例，弃掉旧培养基，加入1 ml

的Trizol试剂，室温放置5分钟，移液器反复吹打后移入1.5 ml EP管。

2. 三相分离：加入200μl的氯仿，盖好管盖，剧烈震摇15秒，室温静置10分钟，4℃离心10分钟，12000 g。

3. RNA沉淀：用枪头吸取上层水相至一新的1.5 ml EP管中，按照每1 ml Trizol裂解液加入500μl异丙醇后混匀，室温放置10分钟，放入4℃离心机中离心，12000 g，10分钟。

4. RNA洗涤：去除上清后加入1 ml 75%乙醇，上下颠倒混匀，放入4℃的离心机中以7500 g的速度离心5分钟。

5. RNA第二次洗涤（可选）：倒除上清后加入1 ml95%的乙醇，放入4℃的离心机中离心5分钟，7500 g。

6. RNA溶解：弃掉上清，倒置在超净工作台中，干燥十分钟至乙醇完全挥发，然后加入20μl DEPC水溶解，转入56℃温育器中温育10分钟助溶。

7. RNA分装储存：加入1μl RNasin，调整RNA浓度为250 ng/μl，分装后转入

-70℃超低温冰箱储存，或立即用于逆转录。

8. RNA浓度及质量测定：取2μl RNA样品，调零后以Rnase-free H2O作为空白对照，使用ND-1000紫外可见光分光光度计测量RNA样品的浓度值，以

33

及OD260/ OD280值和OD260/ OD230值。两项比值均为2左右的样品被认为可用于下一步实验。

## （三） 逆转录与实时定量**PCR**

1. 探针法miRNA逆转录反应体系制备：

1)制备RT master Mix；

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 体积（μl） |
| DNTPs (100/ um) | 0.075 |
| RT Enzyme (50 u/ μl) | 0.5 |
| 10 × RT buffer | 0.75 |
| RNease inhibitor (20u/ μl) | 0.095 |
| Rnease-Free d3H2O | 2.08 |
| 合计 | 3.5 |

2)每个样品逆转录反应吸取3.5μl RT master Mix至PCR管中，加入RNA

样品2.5μl，枪头混匀，瞬时离心；

3）每管加入1.5μl RT Primer，枪头混匀，瞬时离心，冰育5 min；

4）于热循环仪上进行逆转录反应：

反应条件：Stage 1: 16℃30 min; Stage 2: 42℃温育30 min; Stage 3: 85℃变性5 min; Stage 4: 4℃∞

2. 探针法qPCR反应体系制备：

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 体积（μl） |
| Taqman 2× Universal PCR Master Mix，No UNG | 5 |
| Taqman MicroRNA Assay （20×） | 0.5 |
| CDNA from RT reaction | 0.67 |
| Nuclease-free H2O | 3.83 |
| 合计 | 10 |

34

在ABI 7500实时定量PCR仪上反应：95℃10 min，95℃15s，60℃1 min, 45 cycles. 以U6为内参基因。

## （四） **miR-146a**模拟物的瞬时转染

1. 实验分组：模拟物实验组（mimic）、模拟物阴性对照组（NC）和转染试剂阴性对照组（mock）。

2. 以六孔板为例，待AGS细胞汇合度约为30%～40%左右，细胞状态良好即可进行转染：

1）制备模拟物稀释液：吸取10μm/ L的miR-146a模拟物和随机序列模拟物12.5μl 各自加入237.5μl opti-MEM，轻轻吹打混匀；

2)制备lipo-2000稀释液：吸取5μl lipofectamine-2000，加入245μl opti-MEM

培养基，轻轻吹打混匀，室温孵育5 分钟；

3)取模拟物稀释液和lipo-2000稀释液各250μl混匀，室温孵育20分钟，使模拟物与lipofectamine-2000充分混合，形成mimic/ lipofectamine-2000复合物。

3. 用PBS将带转染细胞洗净，加入2 ml无血清无抗生素的F12k培养基，每孔加入500μl mimic/ lipofectamine-2000复合物，轻轻混匀。

4. 将六孔板放入37℃二氧化碳孵育箱中培养4～6小时后，更换新的含有10%胎牛血清的F12k培养基。通过流式细胞术检查带有FAM标记的随机序列模拟物转染组，评价转染效率。

5. 调整模拟物的用量以及转染时间，优化转染体系使得转染效率达到80%以上，转染效率达标后进行下游实验。本研究的模拟物转染浓度最终确定为50 nmol/ L，转染时间为4小时。

## （五） 细胞增殖能力的检测

1. 按5000个/ 孔的密度将AGS细胞接种于96孔板，24小时后按照步骤（四），以模拟物终浓度50 nmol/ L的条件进行瞬时转染。每组各设置5个复孔。

2. 转染24小时后，按照体积比1: 10的比例（CCK-8:培养基）配置混合液，移除旧培养基，加入配置好的混合液110μl，二氧化碳培养箱避光孵育1～4小时。

3. 设定全自动酶标仪检测波长为450 nm，参比波长为600 nm，测定各孔的吸

35

光值。

4. 计算细胞活力：细胞活力（%）=(ODtreat - ODblank) /（ODcontrol - ODblank）×

100%。其中，ODtreat代表各个处理组的吸光度值，ODcontrol为对照组的吸光度值，ODblank为无细胞，仅含转染试剂孔的吸光度值。

## （六） 平板克隆形成实验

1. AGS细胞接种于六孔板，按照步骤（四）进行转染。

2. 胰酶消化处于对数生长期的细胞，PBS重悬制成单细胞悬液。

3. 于6 cm培养皿中接种1000个AGS细胞，待10天后出现肉眼可见克隆时终止实验。

4. 用0.1%结晶紫染色后计数，计算大于50个细胞的克隆个数并计算克隆形成率。克隆形成率=（克隆数/接种细胞数）×100%。

## （七） 细胞周期检测

1. 细胞处理：将AGS细胞种于六孔板后，用无血清培养基培养24小时后，按照步骤（四）进行转染。

2. 细胞收集：转染24小时后，倒除旧培养基，加入适量胰蛋白酶消化细胞。待大部分细胞变园后加入含血清的培养基终止消化，分别收集细胞到相应离心管中，1000 rpm，离心5分钟。

3. 洗涤：弃去上清，用预冷的PBS重悬细胞，1000 rpm，离心5分钟，吸去上清。

4. 固定：再加入0.5 ml PBS重悬细胞，吹打混匀后，加70%预冷乙醇过夜。

5. 透化：加2 ml预冷的0.1% Triton-X-100，将细胞洗涤2次。

6. 染色：加入终浓度为200μg/ ml的Rnase A，37℃孵育30分钟。冰育终止反应，再加入终浓度为20μg/ ml的PI，避光，37℃孵育30分钟。

7. 上机：激发光波长采用488 nm，发射光波长为530 nm，收集红色荧光，分析PI荧光的直方图。

## （八） 统计学分析

各实验组数据均以均数±标准差（MEAM±SD）表示，采用SPSS 16.0统计软件进行分析。满足正态分布且方差齐同的两组间的比较，采用独立样本的*t* 检

36

验；三组以上的比较采用方差分析，组间两两比较方差齐性同时采用单因素

（*ANOVA*）检验；不满足正态分布时采用非参数检验；差异显著性水平*P* <0.05。

37

**结果**

我们从六种人胃癌细胞株中选择miR-146a表达水平最低的AGS细胞进行下一步的研究。本实验对转染了miR-146a模拟物（mimic）的AGS细胞进行观察，发现与单纯转染阴性对照模拟物（NC组）或未转染（Mock组）的AGS细胞比较，mimic组miR-146a的表达水平呈明显的上调（图3A, *P* <0.01），这一结果证实了miR-146a模拟物的功能。为了进一步验证miR-146a的肿瘤抑制基因功能，本实验还进行了细胞增殖实验与克隆形成实验。



**图3** **A.模拟物转染组、随机序列转染组和对照组细胞中miR-146a表达水平的比较**

## （一） 上调**miR-146a**表达水平使**AGS**细胞增殖能力受抑制

通过CCK-8测定法对转染了miR-146a模拟物的AGS细胞的增殖率进行测定，发现miR-146a 模拟物转染组细胞的增殖率明显低于NC组（图3B, *P* <0.01）。显然，上调miR-146a的水平使胃癌细胞的增殖能力受到抑制。

38



**图 3** **B.** miR-146a**表达上调对细胞增殖的影响**

## （二） 上调**miR-146a**水平使**AGS**细胞克隆形成的能力下降

用0.1%结晶紫对转染了miR-146a模拟物的AGS细胞进行染色后，计算大于50个细胞的克隆个数并计算克隆形成率。miR-146a模拟物转染组AGS细胞的克隆形成率低于NC组（图3C, *P* <0.05），即上调miR-146a 的水平使胃癌细胞的克隆形成能力下降。



**图3** **C. miR-146a表达上调阻止AGS细胞平板克隆形成**

## （三） 上调**miR-146a**表达水平可导致**AGS**细胞**G1**期阻滞

此外，为探讨miR-146a究竟是通过何种途径影响AGS细胞的增殖能力，我们还通过流式细胞仪对AGS细胞周期的分布进行测定，如图3D与3E所示，转

39

染miR-146a模拟物与转染NC的AGS细胞比较，有更多的细胞集中在G0/ G1期（*P* <0.05），S期只有少部分细胞（*P* <0.01）；而两组在G2/ M 期的细胞比例方面无统计学差异。以上结果显示miR-146a是通过抑制G1/ S期的转换来抑制

AGS细胞的生长，再次证实了miR-146a在胃癌中可能是一种肿瘤抑制基因。



**图3** **D. miR-146a表达上调导致AGS细胞G0/ G1期阻滞**

**\**P* <0.05, \*\**P* <0.01, 与随机序列转染组相比**



**图3** **E.细胞周期分布的代表结果图**

40

**讨论**

人类miR-146a基因位于第5号染色体，初级转录产物(pri-miR-146a)被剪切加工形成含茎一环结构的miR-146a前体(pre-miR-146a)，由胞核运送至胞质，再次被剪切处理形成miR-146a成熟体。在细胞内存在着miRNA的复杂调控网络，一般一个miRNA有多个靶基因，而一个mRNA可能受到多个miRNA的调节，因此要想完全弄清楚miRNA在肿瘤发生发展过程中的确切作用，是十分困难的。已有的研究表明，miR-146a通过靶向不同通路的某些关键基因参与多种类型的癌症发生和发展，包括甲状腺乳头状癌、前列腺癌和胃癌等。然而，miR-146a在这个过程中究竟是上调还是下调还得取决于癌症的类型。通常在肿瘤中高表达的miRNAs都充当着类癌基因的角色，其作为癌基因或类癌基因已被广泛研究，如miR-378的高表达影响肿瘤发展进程，促进肿瘤生长[41]；miR-191在肝细胞癌的发生过程中发挥着类癌基因的作用等[42]。另一方面，也发现一些具有类抑癌基因样功能的miRNA，在肿瘤细胞当中低表达，而受其调控的癌基因表达上调，原癌基因功能增强，从而促进肿瘤形成。miRNA作为抑癌基因的功能是在2002年首次被发现的，miR-15a和miR-16a的缺失是引起慢性淋巴细胞性淋巴瘤发生的重要原因，并在随后的研究中逐渐发现在肿瘤组织中缺失的miR-15a和miR-16a是类抑癌基因[43]，前列腺癌中超过80%的患者miR-15a和miR-16a的表达水平比正常人低。就miR-146a来说，有报道利用基因芯片和qPCR的方法，首次证实了miR-146a的表达在肿瘤组织中比在非肿瘤组织中上调[44-46]。然而，在胰腺癌和前列腺癌中miR-146a的表达是下调的[25, 47]。另外Hou等[17]研究发现，在四种胃癌细胞系(MKN-28, SGC-7901, MKN-45, BGC-823细胞)中miR-146a是下调的，miR-146a的低表达可以导致肿瘤体积增大及增加肿瘤的恶性程度。目前很难说miR-146a在肿瘤进展过程中究竟是起癌基因作用还是抑癌基因作用。

越来越多的证据表明，miR-146a通过靶向不同通路的某些关键基因进而参与到癌症发生发展进程中。然而，miR-146a在这个过程中究竟是上调还是下调还得取决于癌症的类型。有文献报道在甲状腺乳头状癌和宫颈癌中miR-146a表达上调[22, 23]，而在胰腺癌和前列腺癌中miR-146a的表达是下调的[20]。本次研究显示胃癌组织中的miR-146a的表达水平相较于癌旁组织明显下调，结果与前人

41

的报道一致[38, 39]。为了验证我们的结论，我们向miR-146a表达水平最低的AGS细胞系瞬时转染miR-146a的模拟物，利用taqman探针实时定量检测miR-146a的成熟体在AGS细胞转染模拟物前后的表达情况，我们发现在上调miR-146a的表达后24 h, AGS细胞的增殖能力和平板克隆形成能力均明显受到抑制。我们进一步的流式细胞检测结果显示miR-146a能够抑制细胞由G1期向S期过渡，从而抑制AGS细胞的生长，再次证实了miR-146a在胃癌中可能是一种肿瘤抑制基因。Carleton等人[45]研究发现细胞周期失控与肿瘤的发生是密切相关的。细胞周期的调控失调是肿瘤发生过程中的一个重要环节，延长细胞周期不但可以减弱细胞的增殖能力，同时，细胞G0/ G1期的延长还有助于受损基因的修复。以上实验结果均提示miR-146a在胃癌的发生发展过程中可能作为肿瘤抑制基因发挥作用。

42

结**论**

本研究通过瞬时转染miRNA模拟物对AGS细胞中的miR-146a表达水平进行上调，探讨其表达水平改变对AGS细胞生物学功能的影响。我们得出以下结论：

1. 上调miR-146a表达水平可使AGS细胞的增殖和克隆形成能力受抑制，从而降低胃癌细胞的恶性程度。

2. 上调miR-146a表达水平可导致AGS细胞G1期阻滞，从而抑制AGS细胞的生长，证明miR-146a在胃癌中可作为一种肿瘤抑制基因而存在。

43

**第三部分胃癌病人及对照组人群中miR-146a的多态位点**

**rs2910164基因变异与胃癌易感性的相关性**

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)是发生在人类基因组上的一种最常见的遗传变异，已有很多研究表明发生在蛋白编码基因上的SNPs可以影响蛋白质的功能，可以通过调控miRNA的表达及影响其调控功能，继而影响个人对癌症的易感性[46-48]。基因组内特定核苷酸位置上存在两种不同的碱基，其中最少一种在群体中的频率不小于1%，这种基因组的单个位点上的碱基的差异称为SNPs. SNPs是存在于人群体中每个个体的基因序列细微差别，在整个人类基因组中分布相当广泛。虽然大多数SNPs并不影响基因的功能，但一些特定区域的SNPs可以使人容易罹患疾病或影响对药物的敏感性。尽管人们现在已经意识到miRNA调控网络在人类肿瘤发生发展过程中起到了重要作用，但是人们对发生在miRNA基因上的SNPs的生物学功能却是知之甚少。

大量的研究发现基因序列改变将会影响miRNA的生物合成和/或者miRNA靶基因的选择。以Calin等人[49]的研究为例，他们发现在miR-16-1前体下游7bp左右的一个位点突变，最终导致了miR-16-1成熟体的表达量急剧下降。另外还有一项研究发现，由RNA错误剪切产生的在miR-376成熟体序列上的突变最终导致miR-376靶向新的目的基因[50]。最新的一项研究发现位于miR-125a前体序列上第八个位点的SNP能够明显阻碍miR-125a成熟体的产生[25]。这些结果提示SNP对于miRNA的成熟和功能会产生重要影响。已有研究确认一个G>C基因多态性（rs2910164）存在于miR-146a基因上，这个位于miR-146a前体茎环结构上的SNP能够导致miR-146a前体上由G: U变为C: U的错配。在本次研究中，我们希望通过胃癌易感性来评估这个位于miR-146a前体上的SNP的生物学作用。

44

基因变异与胃癌易感性的相关性

**材料与方法**

# 一、 材 料

## （一） 临床资料

本研究由广州医科大学及南昌大学审查委员会批准。在本病例对照研究中，共有

417例胃癌病例和420例非癌症对照病例。本研究把2009年7月至2013年3月在南昌大学第一附属医院及广州医学院肿瘤中心，经临床及组织病理学确诊为胃癌的病人纳入研究，而术前接受了放疗或化疗的病人则被排除在本研究之外。从接受胃癌手术的病例中收集配对的癌组织和非癌组织，配对的非癌组织是从距离肿瘤组织3 cm外的位置处取样，马上把标本保于液氮中。所有的临床数据均来自临床和病理学记录，对照组的非癌症病例选择的标准包括没有胃肠道癌症和其他疾病的个人史。最后，从南昌疾控中心获得了相同地区的420例健康对照者，并同时收集其血液样本。对照组

和病例组均在年龄（±5岁）、性别和居住地方面对应收集资料，本研究中的所有个体均不考虑是否为汉族人群。参与本实验的每位个体均签署了由广州医科大学及南昌大学审查委员会出示的知情同意书。

## （二） 主要试剂

TRIzol细胞裂解液（美国Invitrogen公司）

ReverTra Ace qPCR RT kit (日本TOYOBO公司) TaqMan MicroRNA assay (美国Applied Biosystems公司)

TaqMan Pri-miRNA assay (美国Applied Biosystems公司) QuickGene DNA (日本富士公司)

## （三） 主要溶液配制

PBS磷酸盐缓冲液：混合8.0 g NaCl、0.2 g KCl、0.2 g KH2PO4、3.49 g Na2HPO4·12H 2O，用d3H2O充分溶解后定容至1000 ml，分装后高压灭菌，4℃保存备用。

## （四） 主要仪器和设备

MDF-290AT超低温冰箱（日本Sanyo公司）

45

MCV-13BSU超净工作台（日本Sanyo公司）

SM-F123制冰机（日本Sanyo公司）YDS-30-125 液氮罐（中国河南）CU 420型电热恒温水浴箱（中国江苏）

ND-1000紫外可见光分光光度计(美国Nanodrop Technologies公司) YX-400A不锈钢双层立式电热蒸汽消毒器（中国上海）

MSE微型离心机（日本Sanyo公司）

XDS-1倒置生物显微镜（重庆光学仪器厂）

7500实时定量PCR仪（美国Applied Biosystems公司）超纯水制备系统（[广州艾威仪器科技有限公司](http://www.baidu.com/link?url=k7sgGJqjJ4zBBpC8yDF8xDh8vibi0FZyIHYWbI1PPRqwN5EwSmpbgxxnAyfq-SGuUo7Z06KzwJW)）QuickGene-810隔离系统（日本富士公司）

Taqman等位基因鉴别仪(美国Applied Biosystems公司) 100～1000μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）20～200μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）10～100μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）2～20μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）0.5～10μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司）0.1～2.5μl微量可调移液器（德国Eppendorf公司

# 二、 方 法

## （一） 流行病学资料收集

使用统一的健康状况调查表对研究对象进行流行病学资料收集，调查内容包括一般人口学特征，吸烟史以及家族史等。吸烟者定义为每天吸烟至少一支并持续半年以上者。由经过培训的专业人员逐一对研究对象进行逐一访问调查。填表工作由高年资医生和研究生组成的调查小组完成，统一填报标准，剔除名字、性别、住址、住院号和病理号相同的调查表，进一步确认后录入电脑。

## （二） 诊断依据

临床分期：采用2010年国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会（UICC/AJCC）推

46

基因变异与胃癌易感性的相关性

荐的TNM分期标准，将胃癌分为五期：0期、Ⅰ期（包括ⅠA、ⅠB 2个亚期）、Ⅱ期、

Ⅲ期（包括ⅢA、ⅢB 2个亚期）、Ⅳ期。

组织分型：根据2000年WHO组织学分类标准，将胃腺癌分为包括乳头状腺癌、管状腺癌（根据其分化程度又分为高分化、中分化与低分化3种）、粘液腺癌和粘液癌（即印戒细胞癌）。

## （三） 组织总**RNA**提取以及**RNA**浓度测定及质量鉴定

当细胞培养至对数生长期，按照Trizol裂解液说明书提取总RNA。

预处理：取组织块50～100 mg放入组织匀浆器，加入300μl左右的Trizol细胞裂解液，将组织磨匀，移入1.5 ml的EP管中再补加700μl Trizol试剂，室温放置5分钟，移液器反复吹打混匀。

三相分离：按照每1 ml Trizol裂解液加入200μl的氯仿的比例加入氯仿，盖好管盖，用手剧烈震摇15秒，室温静置10分钟，放入4℃预冷的离心机中，12000 g离心

10分钟。

RNA沉淀：用枪头将上层水相（约200μl）转移至一新的1.5 ml EP管中，按照每1 ml Trizol裂解液加入500μl异丙醇的比例加入异丙醇后混匀，室温放置10分钟，放入离心机中离心，4℃，12000 g，离心10分钟。

RNA洗涤：倒除上清后加入1 ml 75%的乙醇，上下颠倒混匀，放入4℃的离心机中以7500 g的速度离心5分钟。

RNA第二次洗涤：倒掉上清后加入1 ml 95%的乙醇，再次放入4℃的离心机中离心5分钟，7500 g。

RNA溶解：弃掉上清，倒置在超净工作台中，干燥10分钟至乙醇完全挥发，然后加入20μl DEPC水，轻轻用枪头吹打数次，置于56℃温育器中温育10分钟助溶。

RNA分装储存：加入1μl RNasin，调整RNA浓度为250 ng/μl，分装后转入-70℃超低温冰箱储存，或立即用于后续实验。

RNA浓度及质量测定：取2μl RNA样品，以Rnase-free H2O调零，Rnase-free H2O作为空白对照，使用ND-1000紫外可见光分光光度计测量RNA样品的浓度，以及OD260/ OD280值和OD260/ OD230值。两项比值均为2左右的样品被认为可用于下一步实验。

## （四） 逆转录与实时定量**PCR**

47

1. miRNA逆转录反应体系制备：

1）制备RT master Mix

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 体积（μl） |
| DNTPs (100/ um) | 0.075 |
| RT Enzyme (50u/ μl) | 0.5 |
| 10 × RT buffer | 0.75 |
| RNease inhibitor (20u/ μl) | 0.095 |
| Rnease-Free d3H2O | 2.08 |
| 合计 | 3.5 |

2）每个样品逆转录反应吸取3.5μl RT master Mix至200μl PCR管中，加入RNA

样品2.5μl，枪头混匀，瞬时离心；

3）每管加入1.5μl RT Primer，枪头混匀，瞬时离心，冰育5 min；

4）于热循环仪上进行逆转录反应：

反应条件：Stage 1: 16℃30min；

Stage 2: 42℃温育30min; Stage 3: 85℃变性5min; Stage 4: 4℃∞

2. qPCR反应体系制备：

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 体积（μl） |
| Taqman 2× Universal PCR Master Mix，No UNG | 5 |
| Taqman MicroRNA Assay （20×） | 0.5 |
| CDNA from RT reaction | 0.67 |
| Nuclease-free H2O | 3.83 |
| 合计 | 10 |

48

基因变异与胃癌易感性的相关性

瞬时离心后置于ABI 7500实时定量PCR仪上反应：95℃10 min，95℃15s，60℃1 min, 45 cycles。

## （五） **DNA**的分离及纯度鉴定

根据QuickGene-810隔离系统（富士）制造商推荐的协议，本实验应用QuickGene

DNA全血试剂盒（富士，东京，日本）来提取全血样本中的基因组DNA。具体方法如下：取15 ml的研磨器，放入5 ml血块，加4.5 ml溶血试剂（约血块体积的1/ 3），研磨至无血块存在，移至15 ml离心管中，2500 rpm，离心10分钟；弃上清，再加l0

ml溶血试剂洗l遍，2500 rpm，离心10分钟，洗至无明显红色：弃上清，加l ml溶血试剂，移至2 ml EP管中，2500 rpm离心10分钟。继续弃上清，加l ml细胞裂解液，分别加10μ1的蛋白酶K(20 mg/ m1)，37℃水浴过夜；第二天在通风柜内每管加l ml（等体积）的平衡酚，上下颠倒混匀，6000 rpm离心10分钟：重复上面步骤一次：吸取上清于另一个2 ml EP管中，再加等体积氯仿/异戊醇，上下颠倒混匀，6000 rpm离心10分钟吸取上清1.5 ml于另一EP管中，加100 ul的3 M NaAc（约1/ 10），轻轻混匀，再加等体积预冷的异丙醇，上下颠倒混匀，可见白色絮状物，10000 rpm离心5分钟后弃上清，加200～500 ul无水乙醇，轻轻振摇，10000 rpm离心5分钟，去酒精后，风干（大约2小时）；加TE约30至50 ul，-20℃冰箱保存。最后使用37℃水浴溶解DNA，取99μ1双重蒸馏水到0.5 ml EP管中，取1μ1 DNA到EP管中。紫外分光光度法测定DNA的浓度(OD260)和纯度(OD260/ OD280)，稀释分装置，-20℃冰箱保存备用。

## （六） 基因分型

应用Taqman等位基因鉴别仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，通过市面销售的引物探针组和应用生物系统公司7500实时PCR系统(Applied Biosystems)对miR-146a SNP (rs2910164, G/ C)进行基因分型工作。为了保证基因分型的质量，随机选择10%高质量DNA的样本进行测序，得出的结果有98%以上的相似性。

## （七） 统计学分析

各实验组数据均以均数±标准差（MEAM±SD）表示，采用SPSS 16.0统计软件进行分析。满足正态分布且方差齐同的两组间的比较，采用独立样本的*t*检验；三组以上的比较采用方差分析，组间两两比较方差齐同时采用单因素（*ANOVA*）检验。对照

49

组的基因型分布采用*x*2检验计算*Hardy*–*Weinberg*平衡，比较人口学特征和不同基因型在病例与对照之间分布频率的差异。基因型和胃癌的关系以比值比（odds ratio, OR）和95%可信区间（confidenceinterval, CI）表示，野生型基因组设为对照。采用相加模式（additive model）的非条件*Logistic*回归分析，并校正了性别、年龄、HP感染状态和吸烟等状况。*P* <0.05为差异有统计学意义。

50

基因变异与胃癌易感性的相关性

**结果**

## （一） 胃癌病例组和对照组间基本特征的比较

本研究的417例胃癌病例和420例非癌症对照病例的基本特征见表1。病例组平均年龄为（51.53±12.57）岁，对照组平均年龄为（44.87±7.49）岁。表1显示，病例组和对照组在年龄、性别、幽门螺杆菌感染状态、居住地、胃癌家族史和吸烟情况等基本人群特征方面的构成差异均无统计学意义（均*P*> 0.05），说明病例组和对照组人群基本特征相似，可比性好。

**表1** **研究对象的基本特征比较**

| 变量 病例, n (%) 对照, n (%) P 值\* | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 年龄 (mean ± SD) | 51.53 ± 12.57 | 44.87 ± 7.49 | 0.292 |
| 性别 |  |  |  |
| 男 | 264 (63.31) | 250 (59.52) |  |
| 女 | 153 (36.69) | 170 (40.48) | 0.261 |
| 幽门螺杆菌感染状态 |  |  |  |
| 幽门螺杆菌阴性 | 298 (71.46) | 316 (75.24) |  |
| 幽门螺杆菌阳性 | 119 (28.54) | 104 (24.76) | 0.217 |
| 居住地 |  |  |  |
| 农村 | 186 (44.60) | 164 (39.05) |  |
| 城区 | 231 (55.40) | 256 (60.95) | 0.103 |
| 胃癌家族史 |  |  |  |
| 无 | 341 (81.77) | 362 (86.19) |  |
| 有 | 76 (18.23) | 58 (13.81) | 0.082 |
| 吸烟状况 |  |  |  |
| 不吸烟 | 279 (66.91) | 301 (71.67) |  |
| 吸烟 | 138 (33.09) | 119 (28.33) | 0.135 |
| \* 分类变量（性别、幽门螺杆菌感染状态、居住地、胃癌家族史和吸烟状况）的 P 值由卡方检验  得出，连续变量（年龄）的 P 值由 t 检验得出。 | | | |

## （二） **miRNA-146a**的多态性**rs2910164**基因位点**G> C**与胃癌易感性之间的关联分析

本次研究包含417例确诊为胃癌的病人和420例年龄、性别和居住地匹配的非肺癌对照组。miRNA-146a SNP位点rs2910164几个基因型的分布频率在对照组符合*Hardy-Weinberg*平衡定律（*x*2 = 0.015, *P* = 0.908），说明该人群具有群体代表性。

51

由表2中可以看出病例组的rs2910164位点的基因频率分布为：GG占45.80%，GC占47.24，CC占6.96；对照组的rs2910164位点的基因频率分布为：GG占33.33%，GC占48.33%，而CC占18.34%，两组基因型频率间的差异有统计学意义（*P* = 0.031; *P* =

0.005)。经过调整潜在的协变量后（即按照年龄、性别、HP感染状态、居住地、家族史和吸烟史进行修正），进行*Logistic* 回归分析显示，rs2910164的GC (OR = 0.719; 95%

CI, 0.461-1.003)或CC (OR = 0.185; 95% CI, 0.111-0.508)基因型携带者与rs2910164的

GG基因型携带者相比，前者可以显著降低胃癌的患病风险，即携带rs2910164 GC 和

CC基因型的个体与GG纯合子携带者相比，前者的患癌风险会降低约0.605倍(95% CI, 0.368-0.912; *P* = 0.011)。此外，G等位基因在病例组中的分布频率明显高于C等位基因，差异有统计学意义(OR = 0.611; 95% CI, 0.504-0.922; *P* = 0.008)，提示miRNA-146a多态

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **基因型** | **病例组(%)** | **对照组\* (%)** | **调整OR#（95%CI）** | ***P*值** |
| GG | 191 (45.80) | 140 (33.33) | 1.00 | - |
| GC | 197 (47.24) | 203 (48.33) | 0.719 (0.461-1.003) | 0.031 |
| CC | 29 (6.96) | 77 (18.34) | 0.185 (0.111-0.508) | 0.005 |
| GC + CC | 226 (54.20) | 280 (66.67) | 0.605 (0.368-0.912) | 0.011 |
| G 等位基因 | 579 (69.42) | 483 (57.50) | 1.00 | - |
| C 等位基因 | 255 (30.58) | 357 (42.50) | 0.611 (0.504-0.922) | 0.008 |

性rs2910164的C等位基因携带者，个体胃癌发病风险低于G等位基因携带者。**表2** miRNA-146a**的rs2910164G> C多态性与胃癌发生风险之间的相关分析**

\*对照组rs2910164位点的基因型分布符合*Hardy–Weinberg*分布（*x*2 = 0.015, *P* = 0.908)；

**#** 按照年龄、性别、HP感染状态、居住地、家族史和吸烟史修正。

## （三） **miRNA-146a**的**rs2910164**位点**G>C**基因多态性与胃癌患者其它临床特征的分层分析

为了进一步明确rs2910164不同基因型频率在具有不同临床特征的病人中是否存在差异，我们进行了多因素回归分层分析（表3）。分层后发现，rs2910164 的GC/ CC基因型携带者与GG纯合子携带者相比，前者淋巴结转移的风险明显低于后者（OR = 0.527; 95% CI, 0.360-0.791; *P* = 0.005），这结果显示携带rs2910164 C等位基因的胃癌个体大部分表现为一种延迟的淋巴结转移。此外，我们还发现，Ⅲ/Ⅳ期的胃癌病人与Ⅰ/Ⅱ期的胃癌病人相比，往往体内与降低胃癌患病风险的GC/ CC基因型明显少于纯合子GG基因型(OR = 0.622, 95% CI, 0.423-0.917, *P* = 0.023)。而rs2910164多态性

52

基因变异与胃癌易感性的相关性

位点G> C与胃癌其他临床特征（如肿瘤大小、组织细胞类型、肝转移情况、血管及淋巴侵袭等）之间不存在相关关系（均*P*> 0.05）。

表3 miRNA-146a的rs2910164位点G>C基因多态性与胃癌患者一般特征的分层分析

| 变量 基因型 调整 OR# P值 | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| GG GC/CC (95%CI) | | | | |
| 年龄 |  |  |  |  |
| >60 y | 59 | 81 | 1.00 | - |
| ≤60 y | 132 | 145 | 0.807 (0.533-1.215) | 0.275 |
| 性别 |  |  |  |  |
| 男 | 124 | 140 | 1.00 | - |
| 女 | 67 | 86 | 1.134 (0.756-1.672) | 0.522 |
| HP感染状态 |  |  |  |  |
| H. pylori (-) | 132 | 166 | 1.00 | - |
| H. pylori (+) | 59 | 60 | 0.805 (0.523-1.242) | 0.319 |
| 肿瘤大小 |  |  |  |  |
| ≤3 cm | 95 | 118 | 1.00 | - |
| >3 cm | 96 | 108 | 0.899 (0.614-1.330) | 0.611 |
| 组织细胞类型 |  |  |  |  |
| 高分化 | 60 | 76 | 1.00 | - |
| 中分化 | 76 | 92 | 0.944 (0.611-1.500) | 0.838 |
| 低分化 | 45 | 49 | 0.857 (0.513-1.449) | 0.578 |
| 印戒细胞 | 10 | 9 | 0.716 (0.219-1.855) | 0.491 |
| 淋巴结转移 |  |  |  |  |
| 无 | 87 | 138 | 1.00 | - |
| 有 | 104 | 88 | 0.527 (0.360-0.791) | 0.005 |
| 肝转移 |  |  |  |  |
| 无 | 76 | 110 | 1.00 | - |
| 有 | 115 | 116 | 0.691 (0.465-1.022) | 0.065 |
| 血管侵袭 |  |  |  |  |
| 无 | 88 | 117 | 1.00 | - |
| 有 | 103 | 109 | 0.803 (0.538-1.176) | 0.241 |
| 淋巴侵袭 |  |  |  |  |
| 无 | 101 | 129 | 1.00 | - |
| 有 | 90 | 97 | 0.840 (0.575-1.255) | 0.381 |
| 临床分期 |  |  |  |  |
| Ⅰ / Ⅱ | 85 | 128 | 1.00 | - |
| Ⅲ / Ⅳ | 106 | 98 | 0.622 (0.423-0.917) | 0.023 |

**#** 依照年龄、性别、HP感染状态、居住地、胃癌家族史和吸烟状况调整

53

## （四） **rs2910164**位点的**G/ C**基因变异对**miR-146a**表达的影响

为了探讨mir-146a SNP rs2910164的多态位点变异是否会影响mir-146a的表达，我们从带有mir-146a SNP rs2910164多态性的不同基因型胃癌病人中收集了65例肿瘤样本，并且GG、GC和CC基因型的分布分别是30 (46.15%)、26 (40.00%)和9例(13.85%). 与rs2910164 GG基因型相比，GC杂合子基因型携带者表现出较高的mir-146a表达水平（图4A, *P* = 0.008）；而rs2910164 CC基因型携带者则表现出更高的mir-146a表达水平（图4A, *P* = 0.001）；此外，携带rs2910164 GC/ CC基因型与

GG基因型的病人相比，表现出更高的成熟miR-146a表达水平（图4A, *P* = 0.002）。但是，上述三种基因型携带者与GG基因型的病人相比，pri-miR-146a的表达水平没有统计学差异（图4B, 均*P*> 0.05）。



**图 4** **.多态位点rs2910164不同基因型的胃癌病人中成熟miR-146a和pri-miR-146a表达水平的比较**

A. 65例不同基因型胃癌病人中的miR-146成熟体表达情况

B. 65例不同基因型胃癌病人中的初级miR-146a的表达情况

上述的实验结果表明，在GC/ CC基因型携带者中，可能是由于从pri-miR-146a到其成熟形式的过程出现异常，从而导致成熟miR-146a的表达增高，即C等位基因的携带者中成熟miR-146a的表达增高。因此，同时也验证了携带rs2910164 C等位基因的患者其胃癌的易感性低于G等位基因的携带者。

54

基因变异与胃癌易感性的相关性

**讨论**

与其他人类恶性肿瘤相似，胃癌的发生是一个多基因、多步骤的复杂过程。既往的研究表明，大约有10%的胃癌患者呈现家族聚集现象。根据统计，胃癌患者一级亲属患胃癌的危险性是对照组的3倍，由此可知，胃癌的家族聚集性表明胃癌的发生与遗传因素有密切联系。但是，慢性萎缩性胃炎、幽门螺杆菌感染患者以及胃癌高发区居民中仅有少数患者最终发生胃癌，这可能与机体对各种慢性损伤的反应有明显个体差异有关，提示我们个体的易感性在胃癌发生中起到了重要作用，这种个体胃癌易感性的差异在近年的胃癌研究中引起了更多的关注。这些个体差异性可广泛存在于各种相关基因的基因多态性中，是决定胃癌个体易感性和临床转归的一个重要因素，其中单核苷酸多态性(singlenucleotide polymorphism, SNP)占所有已知基因多态性的90%以上[51, 52]。基因多态性是人类基因组中同一位置的基因或DNA序列中具有的不同基因型，在人群中具有一定的分布频率。从本质上来说，基因多态性是来源于基因组的变异。生物群体中的基因多态性十分普遍，按照研究的先后顺序，一般分为三大类：

DNA片段长度多态性、DNA重复序列多态性、SNP。其中的SNP主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性，是人类基因组中最为常见的基因多态性，是我们人类个体差异的最基本因素，这些差异形成了不同的基因型，决定了人们患有疾病的不同风险和对药物的不同反应。它是人类可遗传的变异中最常见的一种。占所有己知多态性的90%以上。SNP在人类基因组中广泛存在，平均每50～1000个碱基对中就有1个，估计其总数可达300万个甚至更多。SNP所表现的多态性只涉及到单个碱基的变异，这种变异可由单个碱基的转换(transition)或颠换

（transversion）所引起，也可由碱基的插入或缺失所致。但通常所说的SNP并不包括后两种情况。理论上讲，SNP既可能是二等位多态性，也可能是3个或4个等位多态性，但实际上，后两者非常少见，几乎可以忽略。因此，通常所说的SNP都是二等位多态性的。这种变异可能是转换(CT，在其互补链上则为GA)，也可能是颠换（CA，

GT，CG，AT）。转换的发生率总是明显高于其它几种变异，具有转换型变异的SNP约占2/ 3，其它几种变异的发生几率相似。在基因组DNA中，任何碱基均有可能发生变异，因此SNP既有可能在基因序列内，也有可能在基因以外的非编码序列上。总的来说，位于编码区内的SNP (codingSNP, cSNP)比较少，因为在外显子内，其变异

55

率仅仅只有周围序列的1/ 5。

有研究发现在过去的十几年里，各种不同的癌症中miR-146a呈异常表达，这可能在癌症的发生发展过程中起到一种新的调节作用，而miR-146a的表达水平是通过SNP来调节的。既然miR-146a及其靶基因在癌症中发挥着重要作用，那么发生在miR-146a基因位点上的基因突变将通过诸多通路影响肿瘤的易感性。越来越多的人开始探索将miRNA基因位点的基因突变作为肿瘤易感性的特异标志物。最近，Yang 等

[27]对miRNA序列进行了常见SNPs的筛选并鉴别出四种SNP（s

Rs2910164, rs2292832,

rs11614913和rs3746444），分别位于miR-146a，miR-149, miR-196a2和miR-499几个pre-miRNA区域。其中的G/ C多态性位点(rs2910164)是近年来研究的热点，其位于pre-miR-146a的种子序列内。已有报道提出SNP rs2910164可以调节甲状腺乳头状癌中miR-146a的表达，因此，该基因在肝细胞癌、前列腺癌、甲状腺乳头状癌和乳腺癌的患病风险中具有重要作用，提示将miR-146a rs2910164多态性应用于提示多种恶性肿瘤的高风险，但是目前这类结果都不稳定[15,16,28,29]。而且，该位点SNP与胃癌发生的相关性研究报道不多，而且结论尚有争议。现有的2篇文献报道显示，在日本人群中rs2910164 C等位基因与胃癌的发生相关（CC比GG: OR=1.30, 95%CI = 1.02-1.66; CC/ CG比GG: OR=1.57, 95%CI = 1.09-2.27）[53]。然而，Zeng等[54]在中

国人群中得到不同的结论，他们的研究结果表明rs2910164 G等位基因与胃癌的发生相关（CG比CC: OR=1.55, 95%CI = 1.07-2.22; GG比CC: OR = 1.62, 95%CI = 1.01-2.58;

GG/ GC比CC: OR=1.58, 95%CI = 1.12-2.22）。基于此原因，我们通过本次病例对照研究再次验证，提示携带GC/ CC的rs2910164变异基因型的个体面临胃癌的风险要明显低于携带野生型（GG）的个体，也就是说这个发生在miR-146a基因位点上的单核苷酸多态性可能通过提高miR-146a的表达进而发挥抑癌作用。更重要的是，我们通过分层分析发现这个SNP与胃癌的淋巴结转移和肝转移有重要关联。这也提示miR-146a具有潜在的肿瘤抑制基因功能，可以作为胃癌转移的潜在治疗靶点。

发生在miRNAs基因位点的SNP会导致miRNAs成熟体的的表达水平或者生物学功能改变，进而影响到个体的肿瘤易感性。近期有部分文献报道发生在miRNA前体上的序列突变会影响miRNAs的成熟体产生[13,25-27]. Shen等人[28]发现在乳腺癌细胞系中miR-146a前体序列上的G-C突变导致miRNAa成熟体表达增加。我们的研究表明发生在miR-146a前体序列上的G-C突变也能导致胃癌组织中miR-146a成熟体表达

56

基因变异与胃癌易感性的相关性

降低，这与前人的研究结果一致。然而，个体因素和基因变异似乎并不影响初级miR-146a （pri-miR-146a）。这说明G/C多态性并不会对miR-146a基因的转录产生影响。因此，G/C多态性是通过扰乱pri-miR-146a的成熟过程进而调节miR-146a的表达。我们的结果说明单核苷酸多态性可能通过调节miRNA的生物合成进而发挥具有深远意义的生物学功能。

尽管在这个独立的样本中，我们研究的miR-l46a rs2910164单核苷酸多态性和胃癌发生风险之间的关系是有统计学意义的，但本次研究仍然有一些局限性。首先，我们能够收集到的样本数有限，很难将我们在本次研究中得到的结论外推至其他地区；其次，在对miR-l46a的研究中只有一个SNPs被包括在内，其他一些重要的SNPs可能被忽视或者被观察到的SNPs可能是rs2910164 SNPs连锁平衡中有联系的其他多态性。最后，胃食管反流、饮酒是众所周知的胃癌诱因，在我们研究中还没有包括这些信息的相关研究，也没有进行进一步的分析。因此，更多的关于胃食管反流和饮酒的与胃癌关联的数据进一步研究是必要的。

综上所述，我们本次研究说明miR-146a低表达在胃癌的发生发展过程中发挥了重要作用，miR-146a rs2910164通过影响miR-146a的成熟进程从而降低胃癌的易感性。我们相信本研究能为发现胃癌的预防和治疗新方法提供新的视角。

57

结**论**

1. miR-146a多态位点rs2910164 C等位基因携带者的胃癌易感性相对低于G纯合子携带者。

2. 多态性rs2910164基因位点G> C与胃癌其他临床特征（如肿瘤大小、组织细胞类型、肝转移情况、血管及淋巴侵袭等）之间不存在相关关系。

3. miR-146a多态位点rs2910164 C等位基因的携带者中成熟miR-146a的表达高于

G纯合子携带者。

58

参考文献

[1] Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer [J]. World J Gastroenterol. 2006; 12(3): 354-362.

[2] Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: global pattern of the diseaseand an overview of environmental risk factors [J]. Best Pract Res Clin Gastroentero. 2006; 20(4): 633-649.

[3] Sun XD, Mu R, Zhou YS, et al. Analysis of mortality rate of stomach cancer and its trend in twenty years in China [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2004; 26(1): 4-9.

[4] Chen PY, Meister G. microRNA guided posttranscriptional gene regulation [J]. Biol Chem. 2005; 386(12): 1205-1218.

[5] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer. 2006; 6(4): 259-269.

[6] Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale [J]. Cancer Res. 2006; 66(15): 7390-7394.

[7] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nat Rev Cancer. 2006; 6(11): 857-866.

[8] Iwai N, Naraba H. Polymorphisms in human pre-miRNAs [J]. Biochem Biophy Res Commu. 2005; 331(13): 1439-1444.

[9] Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(9): 300-3305.

[10] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. Expression of micro-RNA 146 suppresses NF-kB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells [J]. Oncogene. 2008; 27(42): 5643-5647.

[11] Li L, Chen XP, Li Y. MiR-146a and human disease [J]. Scandi J Immu. 2010; 71(8): 227-231.

[12] Yu J, Li A, Hong SM, et al. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasms [J]. Clin Cancer Res. 2012; 18(4): 981-992.

[13] Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, et al. A common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(20): 7269-7274.

[14] Xu T, Zhu Y, Wei QK, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis. 2008; 29(11): 2126-2131.

[15] Hu Z, Liang J, Wang Z, et al. Common genetic variants in premicroRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women [J]. Hum Mutat. 2009; 30(1): 79-84.

[16] Xu B, Feng NH, Li PC, et al. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo [J]. Prostate. 2010; 70(5): 467-472.

[17] Hou Z, Xie L, Yu L, et al. MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis [J]. Med Oncol. 2012; 29(2): 886-892.

[18] Tchernitsa O, Kasajima A, Schafer R, et al. Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression [J]. J Pathol. 2010; 222(3):

59

310-319.

[19] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell. 2004; 116(2): 281-297.

[20] Li Y, Vandenboom TG, Wang Z, et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells [J]. Cancer Res. 2010; 70(4): 1486-1495.

[21] Kogo R, Mimori K, Tanaka F, et al. Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases [J]. Clin Cancer Res. 2011; 17(13): 4277-4284.

[22] Jazdzewski K, Boguslawska J, Jendrzejewski J, et al. Thyroid hormone receptor beta (THRB) is a major target gene for microRNAs deregulated inpapillary thyroid carcinoma (PTC) [J]. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96(3): 546--553.

[23] Wang X, Tang S, Le SY, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth [J]. PLoS One. 2008; 3(7): e2557.

[24] Xu B, Wang N, Wang X, et al. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer [J]. Prostate. 2012; 72(11): 1171-1178.

[25] Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA [J]. Hum Mol Genet. 2007; 16(9): 1124-1131.

[26] Hu Y, Liu CM, Qi L, et al. Two common SNPs in pri-miR-125a alter the mature miRNA expression and associate with recurrent pregnancy loss in a Han-Chinese population [J]. RNA Biol. 2011; 8(5): 258-264.

[27] Yang Q, Jie Z, Ye S, et al. Genetic variations in miR-27a gene decrease mature miR-27a level and reduce gastric cancersusceptibility [J]. Oncogene. 2014; 33(2): 193-202.

[28] Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ ovarian cancer diagnosis [J]. Carcinogenesis. 2008; 29(10): 1963-1966.

[29] Xu T, Zhu Y, Wei QK, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis. 2008; 29(11): 2126-2131.

[30] He W, Li Y, Chen X, et al. miR-494 acts as an anti-oncogene in gastric carcinoma by targeting c-myc [J]. J Gastroenterol Hepatol. 2014.

[31] Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, et al. A common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(20): 7269-7274.

[32] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin. 2005; 55(5): 74-108.

[33] Nyren O. Is Helicobacter pylori really the cause of cancer [J] Semin Cancer Biol. 1998, 8(4): 275-283.

[34] Chen JD, Keams S, Porter T, et a1． MET mutation and familial gastric cancer． J Med Genet, 2001, 38(8): E26.

[35] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase ⅢDrosha initiates microRNA processing [J].

60

Nature. 2003;425(6956):415-419.

[36] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. Cell. 2005; 120(1): 15-20.

[37] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation [J]. Cancer Res. 2005; 65(21): 9628-9632.

[38] Yu S, Chen H, Chang G, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer [J]. Cancer Cell. 2008; 13(1): 48-57.

[39] Feng R, Chen X, Yu Y, et al. miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer [J]. Cancer Lett. 2010; 298(1): 50-63.

[40] Ding L, Xu Y, Zhang W, et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2 [J]. Cell Res. 2010; 20(7): 784-793.

[41] Lee DY, Deng Z, Wang CH, et al. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104(51): 20350-20355.

[42] Elyakim E, Sitbon E, Faerman A, et al. hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy [J]. Cancer Res. 2010, 70(20): 8077-8087.

[43] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(24): 15524-15529.

[44] Xu B, Wang N, Wang X, et al. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer [J]. Prostate. 2012; 72(11): 1171-1178.

[45] Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation [J]. Cell Cycle. 2007 Sep 1; 6(17): 2127-2132.

[46] Teo MT, Landi D, Taylor CF, et al. The role of microRNA-binding site polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for bladder cancer and breast cancer and their impact on radiotherapy outcomes [J]. Carcinogenesis. 2012; 33(3): 581-586.

[47] Blitzblau RC, Weidhaas JB. MicroRNA binding-site polymorphisms as potential biomarkers of cancer risk [J]. Mol Diagn Ther. 2010; 14(6): 335-342.

[48] Varol N, Konac E, Gurocak OS, et al. The realm of microRNAs in cancers [J]. Mol Biol Rep. 2011; 38(2): 1079-1089.

[49] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia [J]. N Engl J Med. 2005; 353(17): 1793-1801.

[50] Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, et al. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs [J]. Science. 2007; 315(5815): 1137-1140.

[51] Bornschein J, Rokkas T, Selgrad M, et al. Gastric cancer: clinical aspects, epidemiology and molecular background [J]. Helicobacter. 2011; 16 Suppl 1: 45-52.61

[52] González CA, Agudo A. C arcinogenesis, prevention and early detection of gastric cancer: where we are and where we should go [J]. Int J Cancer. 2012; 130(4): 745-753.

[53] Okubo M, Tahara T, Shibata T, et al. Association between common genetic variants inpre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population [J]. Helicobacter. 2010; 15(6): 524-531.

[54] Zeng Y, Sun QM, Liu NN, et al. Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinesepopulation [J]. World J Gastroenterol. 2010; 16(28): 3578-83.

62

**综述**

microRNA在肿瘤中的作用及其单核苷酸多态性位点

（SNP）与癌症风险间的相关性

microRNAs(miRNA)是一种成熟的、小的、非编码单链、高度保守的RNAs，于转录后水平发挥作用，通过干扰靶向的miRNA切割或抑制翻译来调控基因的表达。已经有研究证实，miRNA是存在于真核细胞中的一类长度为21～24个核苷酸的内源性非编码小分子RNA，可通过与靶miRNA的3’UTRs(untranslated regions)近乎完全互补结合在转录后水平使其降解，或者与之不完全互补结合在翻译水平抑制蛋白合成，从而在基因表达中发挥重要的调节作用[1]。因此，在多种人类疾病中miRNA发挥一定的基因调节作用并参与几乎所有的生物学进程，包括早期发育，细胞增殖、分化、凋亡、死亡，脂肪代谢以及疾病的发展、分化、增殖与细胞死亡[2, 3]。许多研究表明[4]，

miRNA通过调控与免疫相关的基因表达来影响免疫系统的发育与功能，从而参与自身免疫性疾病、炎症和肿瘤等免疫相关性疾病的发生发展。

miRNA在细胞核及细胞质中首先被转录为长的、初始的片段（pri-miRNAs），然后经过一系列的过程生成成熟的miRNA，其过程分三步：（1）细胞核中的miRNA基因生成原始转录片段（pri-miRNAs）；（2）经RNA内切酶ⅢDrosha剪切及一系列复杂的过程，生成70 nt长度的miRNA前体（pre-miRNAs）；（3）pre-miRNAs被转运到细胞质，在这里它们被Dicer酶切割成成熟的miRNA[5,6]。成熟的miRNA能够通过核酸序列互补识别特定的目标miRNA，使之降解或抑制其翻译，从而抑制蛋白质的合成，达到调节基因表达的目的。有研究认为[7]，miRNA调节着人类三分之一的基因，参与机体多种生理病理的过程。因此，MicroRNA对细胞进程的调控功能，尤其是对肿瘤等疾病进程的调控功能研究已发展为生物医学最热门的研究领域之一。不同类型的肿瘤有不同组合的表达异常的miRNA表达谱，提示肿瘤miRNA表达

谱具有组织特异性；肿瘤miRNA具有癌基因和抑癌基因的作用[8]；多个miRNA与肿瘤的发生、病理分级、临床分期，肿瘤的激素状态及激素分泌，肿瘤的耐药性及预后等相关[9]。与正常细胞相比，肿瘤细胞中大量miRNA存在表达差异。目前已发现至

63

少3种不同的机制：①miRNA定位在肿瘤相关基因组区域中。Calin等[10]对186个人类miRNA在染色体上的定位与肿瘤发生相关性进行研究，发现半数以上的miRNA定位于与肿瘤发生相关的染色体区域和脆性位点，如杂合性缺失区、纯合性缺失区、扩增区、断裂点区、靠近癌基因或抑癌基因的部位。miRNA在其中发挥类似于癌基因或抑癌基因的作用。②miRNA表达的表观遗传调控。细胞恶性转化的表观遗传标志包括DNA整体甲基化水平低、CpG岛过甲基化和组蛋白修饰失调等。表观遗传改变会影响miRNA的表达。在乳腺癌细胞中，抑制组蛋白去乙酰化酶作用会引起miRNA水平广泛而迅速的改变[11]。用5-氮杂脱氧胞苷和组蛋白去乙酰化酶抑制物4-苯丁酸联合作用于膀胱癌细胞，在313个miRNA中的17个表达上调超过治疗前3倍，其中miRNA-127表达水平变化最大[12]。③miRNA加工相关基因及其蛋白的异常变化。上述机制可独立发挥作用，也可协同作用，其中染色体组改变、基因突变、外在修饰因素等均可导致miRNA表达的变化。miRNA和miRNA之间的黏合性也可因突变或多态性受影响，并使转录过程受干扰。

miRNA的生物学行为与肿瘤发生的关系十分密切，在肿瘤的发生中起到补充、丰富肿瘤的发生机制的作用。许多miRNA基因位于与疾病相关的基因位点的附近，而且在癌症发生过程中有差异表达，这些认识表明miRNA参与调控包括癌症在内的多种疾病[13-15]。有研究证实，miRNA的异常表达与实体癌（其中包括胃癌）的发生、发展和预后都有联系，这提示miRNA可以作为肿瘤抑制基因或癌基因，肿瘤中既有

miRNA表达的上调，也有miRNA表达的下调，前者通过抑制某些抑癌因子的表达发挥着促进癌细胞增殖的作用；而后者会导致肿瘤细胞的转移侵袭能力增加，患者预后不良，生存率下降，这些现象提示某些miRNAs具有抑癌作用。miRNA通过形成过程中量和质的改变发挥致癌基因或抑癌基因绝然不同的功能。过表达的miRNA常常出现在肿瘤细胞基因扩增区域，而低表达的miRNA常出现在基因缺失区域，后者导致抑癌基因的上调[16]，而前者导致肿瘤抑制物水平的下调[17]。研究发现存在于人类乳腺、结肠、肾、肺、前列腺、膀胱肿瘤中的217个miRNA表达普遍下降[18]。然而，另一份对存在于乳腺、结肠、肺、前列腺、胰腺、胃肿瘤的228个miRNA的研究显示：有26种miRNA表达上调，只有17种表达下调[19]；miRNA-143, miRNA-145在结肠癌、直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、官颈癌和淋巴瘤中的表达下调[20, 21]。早期乳腺癌miRNA-9甲基化状态下表达水平下调[22]。此外，肿瘤细胞的侵犯、转移以及血管

64

生成等同样受miRNA的调控。有一系列的报道指出在各种癌细胞中许多miRNA分子的表达都有显著的降低[23-25]，但也有很少的miRNA分子表达是上调的[26, 27]。因此，虽然特殊的miRNA在某种癌症可上调[28]，但普遍的miRNA下调是人类恶性肿瘤的共同特征，发挥着表型转变的因果作用[29]。此外，大量的证据表明，在癌症中miRNA的表达是失调能力的，是被其他机制抑制的，其基因座是通过遗传和表观遗传缺陷来体现出来的。因此，miRNA作为一种特殊的标志，可以作为肿瘤分类和临床预后[30]。

miRNA-146（miRNA-146a和miRNA-146b）是近年来研究较多、较广泛的miRNA之一。其中人类miRNA-146a定位于第5号染色体LOC285628基因上，miRNA-146a成熟序列位于第二外显子上[31]。miRNA-146在不同物种间的序列高度保守，提示其在生物体的生理、病理过程中可能发挥重要的作用，如炎症、免疫和肿瘤的发生、发展。

Ghani等[32]发现造血干细胞(hsc)中，miRNA-146功能缺陷，将会导致巨噬细胞产生减少。Nakasa等[33]发现miRNA-146在类风湿关节炎患者关节滑膜组织的表达较对照组增高。近年研究表明，miRNA-146a同样参与肿瘤的发生发展相关的许多重要生物学过程，包括增殖、凋亡、转移，miRNA-146a在不同的肿瘤中起着不同的生物学功能。例如，EB病毒潜在膜蛋白1(latent membrane protein 1, LMP l)可以诱导miR-146a的表达，EB病毒和多种肿瘤相关，提示miR-146a的异常表达与肿瘤发生密切相关[34]。分别有学者研究证实，miR-146a在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)､子宫颈癌、乳腺癌和胰腺癌中高表达，而在前列腺癌中低表达。

目前，与消化系统肿瘤相关的miRNA的研究成为近年的研究热点，寻找消化系统肿瘤相关miRNA分子并阐明其作用机制，将可能丰富消化系统肿瘤的病因学和分子病理学理论。miRNA表达谱在消化系统肿瘤细胞与正常组织细胞中存在明显差异，说明miRNA在消化系统肿瘤诊断、治疗和预后等方面可能有重要意义。从miRNA水平探讨消化系统肿瘤可能的发病机制、分子分型、诊断和预后等问题．有助于更全面了解消化系统肿瘤的发生发展过程。然而对miRNA在消化系统肿瘤中的作用机制的研究还处于初期阶段，miRNA究竟在消化系统肿瘤发生、发展过程中如何发挥调节作用，还需进一步深入研究。在食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、大肠癌等肿瘤中均证实有特定miRNA的异常表达，它们在消化系统肿瘤的诊断、预后等方面起到重要的作用。文献报道，部分miRNA可以作为胃癌的诊断标记物或者预后因子。Chan等[35]采用定量PCR的方法对37例胃癌病人的癌组织和相应正常组织的miR-2l表达水平进

65

行测定，并对miR-2l的临床相关性进行统计学分析，结果发现miR-2l在92%(34/37)

的胃癌样本中过表达。

编码miRNA 的基因内存在单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,

SNP），这些SNP具有特定的生物学，可以调控miRNA的表达及影响其调控功能，进而与肿瘤的发生发展密切相关[36-38]。基因组内特定核苷酸位置上存在两种不同的碱基，其中最少一种在群体中的频率不小于1%，这种基因组的单个位点上的碱基的差异称为SNPs. SNPs是存在于人群体中每个个体的基因序列细微差别，在整个人类基因组中分布相当广泛。虽然大多数SNPs并不影响基因的功能，但一些特定区域的SNPs可以使人容易罹患疾病或影响对药物的敏感性。有学者认为出现在miRNA或其结合部位的单核苷酸多态性（SNP）是导致遗传变异的的异常源头，从而促成癌症的易感性。为了进一步研究miRNA序列中的SNP与癌症风险间的关系，因此开启了探索癌症发展的分子生物学机制新的途径。

研究表明，一些SNPs的存在对miRNA功能发挥有着显著的影响，依据其影响调控靶基因方式的不同分为三类：（1）SNPs位于编码miRNA的区域，这些SNPs课通过三种方式影响miRNA的调节功能产生作用，即：调控pri-miRNA转录、影响pri-miRNA到pre-miRNA的加工及成熟、影响miRNA与靶基因结合；（2）SNPs存在于miRNA结合的DNA序列中这些SNPs可以通过减少miRNA的结合位点或导致错误的miRNA结合位点，从而影响miRNA与靶序列结合的亲和力，导致调控的失常

[39,40]；（3）SNPs位于miRNA的加工成熟相关的基因中。miRNA从转录到发挥调控功能要经过复杂的生物学加工过程：miRNA基因的初级转录产物（pri-miRNA）在细胞核中被RNaseⅢDrosha切割成为前体miRNA（pre-miRNA）。在最初的剪切后，pre-miRNA在转运蛋白exportin-5的作用下由核内转运到胞质中，然后由另一种RNaseⅢDicer进一步切割产生成熟的miRNA。这些成熟的miRNA与其他蛋白质一起组成RISC（RNA-induced silencing complex）复合体，从而引起靶mRNA的降解或者翻译抑制，在这个过程中有众多的生物分子参与miRNA的成熟过程。这些基因中的SNPs也同样会影响到miRNA生物学功能的发挥，进而与多种肿瘤的发生及预后相关[41]。

与其他人类恶性肿瘤相似，胃癌的发生是一个多基因、多步骤的复杂过程。胃癌的发生与遗传因素密切相关，虽然环境因素也是影响胃癌发生的主要因素，但个体胃癌易感性的差异在近年的胃癌研究中引起了更多的关注。在胃癌患者基因组DNA中，

66

基因多态性广泛存在，这些多态性基因可独自或与环境因素共同决定个体对胃癌的易感性[42]，而个体基因型可在疾病任何时期，通过血标本中提取的DNA来检测，具有取材方便，检测客观等优势。基因多态性是决定胃癌个体易感性和临床转归的一个重要因素，其中SNP所占有已知基因多态性的90%以上[43, 44]。编码基因序列中的SNPs与胃癌的相关性已有大量报道，但基因组中的非编码序列，如microRNA遗传变异与肿瘤易感性的研究仍处于起步阶段。研究表明，miRNA序列中的SNPs可影响成熟

miRNA的二级结构、表达水平和及其与靶基因的识别，使miRNA调控网络发生异常，从而影响其对肿瘤发生发展的调控作用[45, 46]。人miRNA基因组的多态性病变可能会通过影响miRNA靶基因的选择来改变其生物学进程，从而在细胞周期的调节以及致癌作用中发挥重要作用[47,48]。而且最近的研究表明，miRNA序列中的SNPs可以影响成熟miRNA的二级结构和表达水平，从而影响其在肿瘤发生发展过程中的调控作用，为肿瘤形成的分子生物学机制方面研究开启了一条新的途径。有关SNP的作用机制的研究有许多争议，主要包括两个方面，一是通过改变mRNA及蛋白的产量水平[49]；二是通过改变mRNA的构象、蛋白的折叠及细胞定位，进而影响基因功能的发挥[50]。有研究发现在过去的十几年里，各种不同的癌症中miR-146a呈异常表达，这可能在癌症的发生发展过程中起到一种新的调节作用[51-53]，而miR-146a 的表达水平是通过

SNP来调节的。最近，Yang等[54]对miRNA序列进行了常见SNPs的筛选并鉴别出四种SNPs（rs2910164, rs2292832, rs11614913和rs3746444），分别位于miR-146a，miR-149, miR-196a2和miR-499几个pre-miRNA区域。其中的G/ C多态性位点

（rs2910164）是近年来研究的热点，其位于pre-miR-146a的种子序列内，已有报道提出SNP rs2910164可以调节甲状腺乳头状癌中miR-146a的表达，因此，该基因在肝细胞癌、前列腺癌、甲状腺乳头状癌和乳腺癌的患病风险中具有重要作用[55-58]。然而，该位点SNP与胃癌发生的相关性研究报道不多，现有的2篇文献报道显示，在日本人群中rs2910164 C等位基因与胃癌的发生相关（CC比GG: OR = 1.30, 95%CI = 1.02-1.66; CC/CG比GG: OR = 1.57, 95%CI = 1.09-2.27）[59]。然而，Zeng等[60]在中

国人群中得到不同的结论，他们的研究结果表明rs2910164 G等位基因与胃癌的发生相关（CG比CC: OR=1.55, 95%CI = 1.07-2.22; GG比CC: OR = 1.62, 95%CI = 1.01-2.58;

GG/ GC比CC: OR = 1.58, 95%CI = 1.12-2.22）。因此，上述两个研究的争议结论尚需等后续的研究进一步证实。

67

miRNA的单核苷酸多态性影响基因功能的研究已成为目前研究的热点，miRNA相关的SNPs对miRNA的生物学功能有着潜在的影响，这是由于SNPs处于miRNA行使功能关键的部位，通过分子流行病学的研究积累，可以对肿瘤的发生有较好的预见作用，从而有利于肿瘤的预防甚至是预后的判断。从现有文献检索的结果来看，SNP对胃癌细胞的生长、增殖、凋亡和细胞周期的影响的研究仍处于空白，因此，与胃癌相关miRNA的SNPs研究还有待于更多的研究去深入探讨以阐明其对生化和细胞水平的作用，为全面了解胃癌的发病机制提供科学依据。

参考文献

[1] Llave C, Xie Z, Kasschau KD, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA [J]. Science. 2002; 297(5589): 2053-2056.

[2] Esquela-Kerscher A, S1ack FT. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]． Nat Rev Cancer. 2006; 6: 259-269.

[3] Hwang HW, Mendell TT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis [J]． Br J Cancer. 2006; 94: 776-780.

[4] Okada H, Kohanbash G, Lotze MT. MicroRNAs in immune regulation--opportunities for cancer immunotherapy [J]. Int J Biochem Cell Biol. 2010; 42(8): 1256-1261.

[5] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing [J]. Nature. 2003; 425(6956): 415- 419.

[6] Lu J Getz G Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. Nature. 2005; 435(7043): 834-838.

[7] Hobert O. Generegulation by transcriptionfactorsand microRNAs [J]. Science. 2008; 319(5871): 1785-1786.

[8] Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]． N Engl J Med. 2005; 353: 1768-1771.

[9] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer. 2006; 6: 857-866.

[10] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al． Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic reions involved in cancers [J]． Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(9): 2999-3004．

[11] Scott GK, Mattie MD, Berger CE, et al． Rapidalteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition [J]． Cancer Ras. 2006; 66(3): 1277-1281．

[12] Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of micmRNAs-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells [J]． Cancer Cell. 2006; 9(6): 435- 443．

[13] Bannerjee D, Slack F. Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression [J]. Bioessays. 2002; 24: 119-129.

[14] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are freguently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(9): 2999-3004. [15] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. Cancer Res. 2004; 64:

68

3753-3756.

[16] Calin GA, Croce CM．MicroRNA—cancer connection: the beginning of a new tale [J]．Cancer Res. 2006; 66: 7390-7394．

[17] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS．MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells [J]．Cancer Res. 2005; 65: 6029-6033．

[18] Lu J, Getz G, Miska EA, et al．MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]．Nature. 2005;435: 824-838．

[19] Volinia S, Calin GA, Lju CG, et al．A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]．Proc Natl Acad Sci USA.2006; 103: 2257-2261．

[20] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al．MieroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]．Cancer Res. 2005; 65 (16): 7065-7070．

[21] Michael MZ, O'Connor SM, Van Hoist Pellekaan NG, et al．Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]．Mol Cancer Res. 2003; 1(12): 882-891．

[22] Lehmann U, Hascmeier B, Christgen M, et al．Epigenetie inactivation of microRNA gene in human breast cancer[J]．J Pathol. 2008; 214(1): 17-24．

[23] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature. 2004; 431: 350-355.

[24] Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific mi! croRNA regulates insulin secretion [J]. Nature. 2004; 432:226-230.

[25] Calin GA, Dunitru CD, Shimizu M, et al. Freguent deletions and downregulation of micro-RNA genes miR15 and miR 16 at 13g14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(15): 524-15, 529.

[26] Metzler M, Wilda M, Busch K, et al. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma [J]. Genes Chromosomes Cancer. 2004; 39:167-169.

[27] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. Nature. 2005; 435:828-833.

[28] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103:2257-2261.

[29] Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer [J]. Oncogene. 2008; 27:1788-1789.

[30] Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way [J]. Cell. 2009; 136: 586-591.

[31] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue[J]. Arthritis Rheum. 2008; 58(5):1284-1292.

[32] Ghani S, Riemke P, Schonheit J, et al. Macrophage development from HSCs requires PU.1-coordinated microRNA expression [J]. Blood,2011,118(8):2275-2284.

[33] Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, et al. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Rheum. 2011; 63(6):1582-1590.

[34] Cameron JE, YinQ, Fewell C, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways [J]. J Virol. 2008; 82(4): 1946-1958.

[35] Chan SH, Wu CW, Li AF, et al．miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and

Its clinical association [J]．Anticancer Res. 2008; 28(2A): 907-9l1．

[36] Teo MT, Landi D, Taylor CF, et al. The role of microRNA-binding site polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for bladder cancer and breast cancer and their impact on radiotherapy

69

Outcomes [J]. Carcinogenesis. 2012; 33(3):581-586.

[37] Blitzblau RC, Weidhaas JB.

MicroRNA binding-site polymorphisms as potential biomarkers of cancer risk [J]. Mol Diagn Ther. 2010; 14(6): 335-342.

[38] Varol N, Konac E, Gurocak OS, et al. The realm of microRNAs in cancers [J]. Mol Biol Rep. 2011; 38(2): 1079-1089.

[39] Chen K, Song F, Calin GA, et al. Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology [J]. Carcinogenesis, 2008; 29(7): 1306-1311.

[40] Wu WK, Lee CW, Cho CH, et al. MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game [J]. Oncogene. 2010; 29(43): 5761-571.

[41] Song FJ, Chen KX. Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: big effects on cancer [J]. Chin J Cancer. 2011; 30(6): 381-391.

[42] Zhao XJ, Li H, Chen H, et a1. Expression of E-cadherin in and beta-catenin in human esophageal squamous cell carcinoma: relationship with prognosis[J]．World J Gastrocnteral. 2003; 9(2): 225-232．

[43] Bornschein J, Rokkas T, Selgrad M, et al. Gastric cancer: clinical aspects, epidemiology and molecular background [J]. Helicobacter. 2011;16 Suppl 1:45-52.

[44] González CA, Agudo A. Carcinogenesis, prevention and early detection of gastric cancer: where we are and where we should go [J]. Int J Cancer. 2012; 130(4): 745-753.

[45] Landi D, Gemignani F, Landi S. Role of variations within microRNA-binding sites in cancer [J]. Mutagenesis. 2012; 27(2): 205-210.

[46] Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(20):7269-7274.

[47] Jazdzewski K, Boguslawska J, Jendrzejewski J, et al. Thyroid hormone receptor beta (THRB) is a major target gene for microRNAs deregulated inpapillary thyroid carcinoma (PTC) [J]. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96: 546-553.

[48] Wang X, Tang S, Le SY, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth [J]. PLoS One. 2008; 3: e2557

[49]刘娟妮， 张中冕， 陈琛， 等. ERCC1、P27~(kip1)、CyclinE 在胃癌组织中的表达及其临床意义

[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(5): 540-543.

[50]刘越， 吕社民. 单核苷酸多态性影响基因功能的机制[J].生命的化学, 2008, 28(2)：214-216.

[51] Xu B, Wang N, Wang X, et al. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer [J]. Prostate. 2012; 72: 1171-1178.

[52] Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA [J]. Hum Mol Genet. 2007; 16: 1124-1131.

[53] Hu Y, Liu CM, Qi L, et al. Two common SNPs in pri-miR-125a alter the mature miRNA expression and associate with recurrent pregnancy loss in a Han-Chinese population [J]. RNA Biology. 2011; 8: 258-264.

[54] Yang Q, Jie Z, Ye S, et al. Genetic variations in miR-27a gene decrease mature miR-27a level and reduce gastric cancersusceptibility [J]. Oncogene. 2012.

[55] Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis [J]. Carcinogenesis. 2008; 29: 1963-1966.

[56] Xu T, Zhu Y, Wei QK, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the

70

Risk for hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis. 2008; 29: 2126-2131.

[57] Hu Z, Liang J, Wang Z, et al. Common genetic variants in premicroRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women [J]. Hum Mutat. 2009; 30: 79-84.

[58] Xu B, Feng NH, Li PC, et al. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo [J]. Prostate. 2010; 70: 467-472.

[59] Okubo M, Tahara T, Shibata T, et al.

Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population [J]. Helicobacter. 2010;15(6): 524-531.

[60] Zeng Y, Sun QM, Liu NN, et al. Correlation between pre-miR-146a C/

G polymorphism and gastric cancer risk in Chinesepopulation [J]. World J Gastroenterol. 2010;16(28):3578-83.

71

**在校期间完成与发表的论文**

[1] Gao L, Mai A, Li X, Lai Y, Zheng J, Yang Q, Wu J, Nan A, Ye S, Jiang Y.

LncRNA-DQ786227-mediated cell malignant transformation induced by benzo(a) pyrene. Toxicol Lett. 2013 Nov 25;223(2):205-10. doi: 10.1016/j. toxlet.2013.09.015. Epub 2013

Sep 29.

[2] Yang Q, Zhang S, Wang J, Hu W, Mai A, Peng B, Jie Z, Jiang Y. Genetic variation of miR-146a alters the risk of gastric cancer through aberrant exprssion of mature miR-146a. (Under review, Familiar Cancer, FAME-D-13-00139)

72

致**谢**

三年的求学生涯在导师、亲友和同学、同事的多方大力支持下，辛苦却也收获满囊。博士论文的完成为我开启一扇做学问的窗口。

这次毕业论文能够得以顺利完成，并非我一人之功劳，是所有指导过我的老师，帮助过我的同学和一直关心支持着我的家人对我的教诲、帮助和鼓励的结果。我要在这里对他们表示深深的谢意！

首先，要感谢我的指导老师——蒋义国老师和杨巧媛老师，没有您们的悉心指导就没有这篇论文的顺利完成。您们严谨的教学态度、做研究全力以赴的精神、以及对研究生的提携及照顾，令我获益良多且深受感动。

再者，感谢南昌大学附属第一医院揭志刚教授、广州医科大学附属肿瘤医院胡伟明主任医师和金启萌同学在标本收集方面提供的帮助。

感谢各位课题组老师及同门兄弟姐妹们多方的指导与帮忙，对于本研究进行所需的种种支持与协助，使个人的论文得以如期完成，在此致上最诚挚的谢意！

最后，感谢我的家人，没有你们，就没有我的今天，你们的支持与鼓励，永远是支撑我前进的最大动力。

衷心感谢论文评阅和答辩委员会的所有专家！感谢所有帮助过我的人！

73

**学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

**学位论文知识产权权属声明**

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医科大学及附属单位。广州医科大学及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医科大学及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名： 日期： 年 月 日导师签名： 日期： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的说明**

1、学校可以保留本学位论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。送交学位论文时间选择（请在下面相应栏内打“√”）：

①答辩后即可送：是否

②延迟一年后送：

③延迟二年后送：

④延迟三年后送：

论文作者签名： 日期： 年 月 日导师签名： 日期： 年 月 日

74