抗[15]的耐药机制之一。然而 ROS 如何激活 EGFR 仍需要进一步的研究。

参考文献

1 Reinehr R, Häussinger D. CD95 death receptor and epidermal growth factor receptor(EGFR) in liver cell apoptosis and regeneration[J]. Arch Biochem Biophys,2012,518(1):2~7.

2 Kimura C, Watanabe K, Iwasaki A, et al. The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset pre-eclamptic women and fetal growth restriction[J]. J Matern Fetal Neonatal Med,2013,26(5):491-496.

3 栾焕玲,孙蕾娜,董 娜,等. 非小细胞肺癌中 EGFR 和 K-ras 基因突变与蛋白表达相关性的研究[J]. 中国癌症杂志, 2010,20(7):486-491.

4 Kim S, Grandis JR, Rinaldo A, et al. Emerging perspectives in epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer[J]. Head Neck,2008,30(5):667-674.

5 Dietz A, Boehm A, Mozet C, et al. Current aspects of targeted therapy in head and neck tumors[J]. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology,2008,265 suppl 1(1 Supplement):3-12.

6 Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways[J]. Carcinogenesis,2010,31(1):37-49.

7 Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe[J]. Clin Cancer Res,2009,15(2):425-430.

8 Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer[J]. Nat Rev Cancer,2003,3(4):276-285.

9 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. Nature,2002,420(6917):860-867.

10 Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward?[J]. Biochem J,2007,401(1):1-11.

11 窦东伟,李裕波,苏 卡,等. 肝组织石蜡切片 8-OHdG 免疫组化方法的研究[J]. 广西医科大学学报, 2011,28(3):352-354.

12 熊珊珊,石英英,石汉平. 活性氧与肿瘤研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014,21(13):1045-1048.

13 Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, et al. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas[J]. Pathol Oncol Res,2006,12(2):87-91.

14 Frank GD, Mifune M, Inagami T, et al. Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta[J]. Mol Cell Biol,2003,23(5):1581-1589.

15 覃扬达,司勇锋. 鼻咽癌生物治疗临床研究进展[J]. 中国临床新医学, 2014,7(7):670-674.

[收稿日期 2016-01-05][本文编辑 刘京虹]

肝癌患者中 microRNA-378 与 FOXO1 基因表达的相关关系研究

覃 彬, 刘 顺, 仇小强, 曾小云, 郭雪峰, 张国强, 陈洁华, 谢志春

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81402756); 广西教育厅高校科研项目(编号:YB2014067)

作者单位: 530021 南宁,广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室
作者简介: 覃 彬(1989-),男,在读硕士研究生,研究方向:肝癌分子流行病学。E-mail:381541004@qq.com
通讯作者: 谢志春(1963-),男,医学博士,博士研究生导师,教授,研究方向:病毒性肝炎防治。E-mail:357154887@qq.com

[摘要] **目的** 研究 microRNA-378a-3p(miRNA-378)与 FOXO1 基因在肝癌中的表达情况及两者表达的相关性。**方法** 提取 8 例肝癌患者癌组织及其相对应癌旁组织标本的总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 分别检测 miR-378 和 FOXO1 基因的相对表达量,通过独立样本 t 检验比较癌及癌旁组织中 miR-378、FOXO1 基因表达的差异,并通过双变量相关分析探索癌组织中两者之间的相关关系。**结果** 肝癌组织中 miR-378 和 FOXO1 基因的表达量均明显低于癌旁组织中的表达($P=0.0106$ 和 $P=0.000623$),两者相对表达量在肝癌组织中呈正相关关系($r=0.541$,$P=0.031$)。**结论** 肝癌组织中 miR-378 与 FOXO1 基因的表达较癌旁组织明显降低,miR-378 与 FOXO1 基因的异常表达及其相互作用网络在肝癌发生发展中可能具有重要的意义。

[关键词] 肝癌; miR-378; FOXO1

［中图分类号］ R 735.7 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1674 - 3806(2016)05 - 0375 - 05
doi:10.3969/j.issn.1674 - 3806.2016.05.03

The study on the correlation between microRNA-378 and FOXO1 gene expressions in the patients with hepatocellular carcinoma

QIN Bin, LIU Shun, QIU Xiao-qiang, et al. Department of Epidemiology, Public Health College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, *China*

［**Abstract**］ **Objective** To study the expressions of miR-378 and FOXO1 in hepatocellular carcinoma(HCC) and the correlation of the expressions between miR-378 and FOXO1 genes. **Methods** Matched normal and cancerous tissues from 8 patients with HCC were examined for miR-378 and FOXO1 expressions using real-time quantitative PCR. Independent-Samples T test was used to test the significance of the means of the expressions of miR-378 and FOXO1 between normal and cancerous tissues. The correlation of the expressions between miR-378 and FOXO1 in cancerous tissues was detected by bivariate correlation analysis. **Results** The expressions of miR-378 and FOXO1 in HCC cancerous tissues were both significantly lower than those in adjacent tissues($P = 0.0106$ and $P = 0.000623$). The expression of miR-378 was positively correlated with that of FOXO1($r = 0.541$, $P = 0.031$) in cancerous tissues. **Conclusion** The expressions of miR-378 and FOXO1 in HCC tissues are significantly lower than those of the adjacent tissues. The abnormal expressions of miR-378 and FOXO1 and their interaction network may play a vital role in HCC development.

［**Key words**］ Hepatocellular carcinoma; miR-378; FOXO1

MicroRNA(miRNA)是一类长度约为22nt的小分子非编码RNA,由具有发夹结构的约70～90个碱基大小的单链RNA前体(pre-miRNA)加工形成。miRNA能够与靶mRNA的3′末端非翻译区(3′UTR)部分(靶序列)互补结合,使mRNA降解或介导其翻译抑制,来调节基因的表达,在各种生命活动过程中发挥着重要作用[1]。miRNA涉及了细胞的发育、分化、增殖、凋亡等多种生物学功能,参与多种疾病的发病机制[2,3],在肿瘤的发生发展过程中被认为担当了癌基因或抑癌基因的作用。研究表明miR-378与结直肠癌[4~6]、胃癌[7]、鼻咽癌[8]和口腔癌[9]发生及肿瘤的生长相关,可发挥抑癌基因的功能,但在肝癌中的作用仍未明确。通过生物信息学软件预测发现,FOXO1为miR-378的一个靶基因,而该基因是PI3K/AKT信号通路中一个重要的下游分子,与肿瘤发生密切相关[10]。本研究通过检测miR-378和FOXO1在肝癌中的表达情况,初步探讨两者表达及相互作用与肝癌发生的关系,旨在为肝癌诊治提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 标本收集　收集2015-07～2015-09广西医科大学第一附属医院肝胆外科手术患者共8例标本包括肝癌组织和配对癌旁组织共16份,术前均未作放疗、化疗、免疫治疗等抗肿瘤治疗,均经病理诊断为原发性肝癌。所有标本手术切除后,分装置入液氮中保存备用。

1.2 总RNA抽提　分别取肝癌和癌旁标本各100 mg,研磨成组织浆,按Trizol总RNA提取试剂说明书步骤操作,采用TriZol试剂(Invitrogen life technologies)一步法提取总RNA,使用NanoDrop® ND-1000测定RNA浓度和纯度,用变性琼脂糖凝胶电泳来检测RNA的质量。

1.3 miR-378和FOXO1表达量检测　分别以U6和管家基因GAPDH为miR-378和FOXO1内参,采用实时荧光定量PCR(q-PCR)方法检测其表达。茎环引物及q-PCR引物均购自英骏生物技术有限公司,引物见表1。测定过程与条件如下:(1)逆转录反应。以茎环法逆转录反应构建miR-378的cDNA,而FOXO1的cDNA构建与常规方法相同。茎环法逆转录反应以600 ng/μl的总RNA 2 μl,dNTP(2.5 mM each)2 μl,10X RT Buffer 2 μl,RT特异引物(1 uM)0.3 μl,MMLV反转录酶(200 U/μl)0.2 μl,RNA酶抑制剂(40 U/μl)0.3 μl,无RNA酶水11.2 μl构建20 μl体系,混匀后将上述体系在PCR扩增仪进行RT反应,反应条件为16 ℃ 30 min,42 ℃ 40 min,85 ℃ 5 min,反应结束后,将其放在冰上待用或-20 ℃保存待用。(2)q-PCR检测。采用10 μl体系,cDNA 2 μl,2×Master Mix 5 μl,10 uM的PCR特异引物F 0.5 μl,10 uM的PCR特异引物R 0.5 μl,加水至总体积为10 μl;反应条件为95 ℃10 min,40个PCR循环[95 ℃,10 s;60 ℃,60 s(收集荧光)]。为了建立PCR产物的熔解曲线,扩增反应结束后,按95 ℃,10 s;60 ℃,60 s;95 ℃,15 s方法从60 ℃缓慢加热到99 ℃(仪器自动进行-Ramp Rate为0.05 ℃/s)。每个样本每个指标的检测均设3个副孔,结果以平均值计算。

表1 miRNA-378a 和 FOXO1 基因表达 RT-PCR 检测相关引物序列

基因名称	引物类型	序列
U6	茎环引物	5′-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3′
	F	5′-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3′
	R	5′-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3′
miR-378	茎环引物	5′-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGTC-GGCAATTGCACTGGATACGACGCCTTC-3′
	GSP	5′-GGGGTCTGGACTTGGAGTCA-3′
	R	5′-CAGTGCGTGTCGTGGAG-3′
GAPDH	F	5′-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3′
	R	5′-GAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3′
FOXO1	F	5′-CCACCACTCTATCATCCTCATT-3′
	R	5′-TTGGCTGTAGTTGCCTCTTTA-3′

注:GSP 是对应 miRNA 的特异引物

1.4 统计学方法 FOXO1 以与内存比值进行相对表达量计算,即使用管家基因 GAPDH 作为内参,以样品待测基因的表达值除以此样品内参的值,最终得到的比值为样品的待测基因相对含量。miR-378 采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行相对表达量计算,$\triangle\triangle Ct = (Ct_{miR-378} - Ct_{U6})$ 癌组织 $-(Ct_{miR-378} - Ct_{U6})$ 癌旁组织。应用 SPSS13.0 统计软件分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-378 在肝癌及癌旁组织中的表达 肝癌组织中的 miR-378 相对表达量值为(0.32±0.302),对应癌旁组织相对表达量为(0.73±0.248)(癌组/癌旁组=0.44),两者比较差异有统计学意义($t=-2.947$, $P=0.0106$),miR-378 在肝癌中呈低表达。见图1。

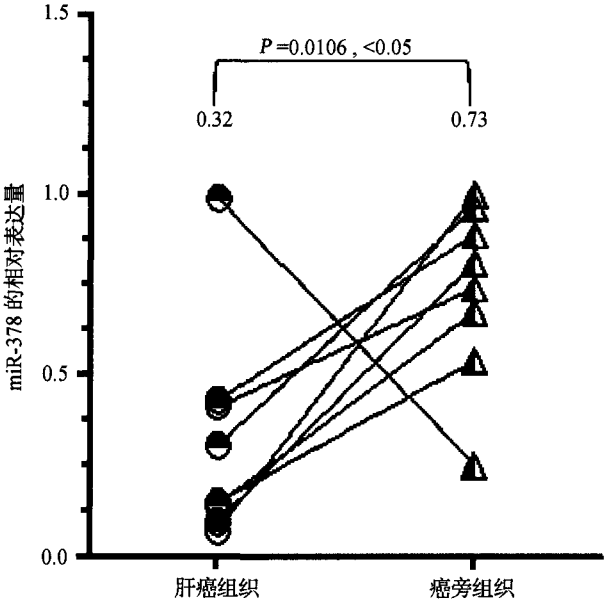

图1 miR-378 在肝癌和癌旁组织中的表达关系图

2.2 FOXO1 在肝癌及癌旁组织中的表达 肝癌组织中 FOXO1 的相对表达量为(0.0119±0.0084),而在相对应的癌旁组织的相对表达量为(0.0535±0.0255)(癌组/癌旁组=0.222),两者比较差异有统计学意义($t=-4.385$, $P=0.000623$),FOXO1 在肝癌组织中呈低表达。见图2。

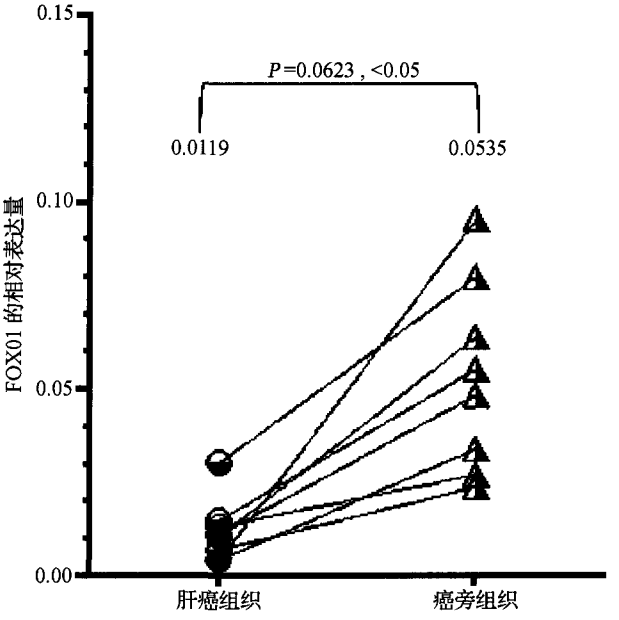

图2 FOXO1 在肝癌和癌旁组织中的表达关系图

2.3 miR-378 表达和 FOXO1 表达的相关关系 利用 miR-378 表达和 FOXO1 表达制作散点图,结果 person 相关检验显示,两者呈正相关($r=0.541$, $P=0.031$)。见图3。

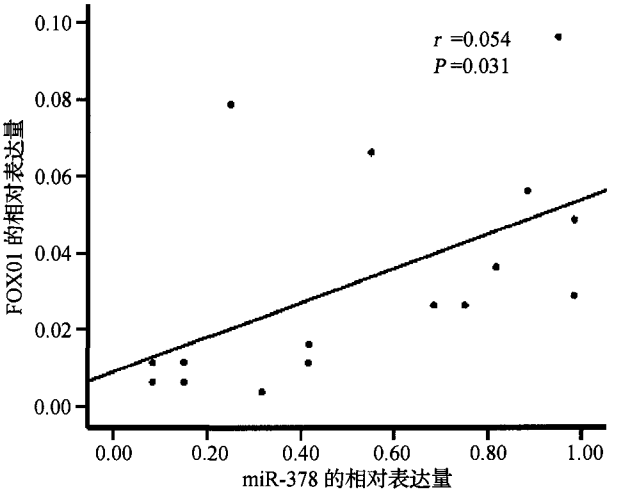

图3 MiR-378 与 FOXO1 表达的相关关系图

3 讨论

3.1 本研究通过荧光定量 PCR 检测 miR-378 和 FOXO1 在肝癌及其相对应癌旁组织中相对表达量,研究结果显示,miR-378 与 FOXO1 在肝癌组织中呈现

低表达状态，且两者呈正相关关系，提示两者相互作用网络可能在肝癌发生发展中发挥重要的作用。本研究发现 miR-378 在各种癌症与细胞中的异常表达均有报道，与细胞的存活、迁移、侵袭、血管生成和肿瘤的生长有关。在结直肠癌细胞系和组织中，miR-378 下调并靶向调节 BRAF 抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡，或直接调节 CDC40，抑制细胞生长和 G1/S 细胞周期转化[5,6]。在胃癌细胞系和组织中，miR-378 下调并抑制 CDK6 和 VEGF 信号通路抑制肿瘤生长[7]。在鼻咽癌中，miR-378 能广泛抑制肿瘤组织中 TOB2 的表达[8]。本研究中，miR-378 在肝癌中呈低表达，与 Li 等的研究结果一致[11]。综合上述研究，提示 miR-378 可能是一个重要的肿瘤抑制因子。

3.2　FOXO1 基因定位于 13 号染色体 13q14.1，编码 655 个氨基酸，广泛表达于成人的脂肪组织和肝脏组织中[12]。越来越多研究表明，FOXO1 在肿瘤发生发展中充当重要的抑制因子作用。FOXO1 是 PI3K/AKT 信号通路中一个重要的下游分子，而该信号通路被认为是肿瘤发生密切相关的最重要通路之一[10]。FOXO1 上调可拮抗 PI3K/AKT 的活性，在多种肿瘤如间皮瘤[13]、尤文肉瘤[14]、胃癌[15]、口腔癌[16]、乳腺癌[17]、前列腺癌[18]细胞中扮演着肿瘤抑制因子的角色，其抗肿瘤机制可能是通过调控细胞周期、细胞凋亡相关调控因子的表达来实现。最近的研究发现，多种 miRNA 可通过靶向调节 FOXO1，在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。Li 等发现 miR-107 通过靶向作用于 FOXO1，促进胃癌细胞增殖[19]；Hou 等研究发现 miR-196a 通过靶向调节 FOXO1 促进宫颈癌细胞的增殖[20]；miR-96 可通过靶向调节 FOXO1 在前列腺癌和膀胱癌细胞中发挥抗凋亡作用[18]。

3.3　本研究发现 miR-378 和 FOXO1 在肝癌组织中的表达呈正相关关系，提示 FOXO1 可能不是 miR-378 的靶基因。因此，我们推测 miR-378 和 FOXO1 发生关联的可能机制有以下两种：一是 miR-378 通过调节 FOXO1 相关通路上游某个基因的表达而与其发生间接关系；二是 FOXO1 作为转录因子，可能直接调节 miR-378 的转录活性。第二种可能机制已经在与 FOXO1 来自相同家族的 FoxD3 的研究中得到证实。Liu 等[21]研究发现，FoxD3 可以直接结合 miR-137 启动子区从而激活 miR-137 的转录活性，抑制肝癌的生长与转移。而 FOXO1 与 miR-378 相互作用机制如何，有待进一步的研究。

参考文献

1　Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.

2　Ichihara A, Jinnin M, Yamane K, et al. microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris [J]. Br J Dermatol, 2011, 165(5): 1003-1010.

3　Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA [J]. Cell, 2013, 153(3): 516-519.

4　Weng WH, Leung WH, Pang YJ, et al. Lauric acid can improve the sensitization of Cetuximab in KRAS/BRAF mutated colorectal cancer cells by retrievable microRNA-378 expression [J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 107-116.

5　Wang Z, Ma B, Ji X, et al. MicroRNA-378-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells by targeting BRAF [J]. Cancer Cell Int, 2015, 15: 40.

6　Wang KY, Ma J, Zhang FX, et al. MicroRNA-378 inhibits cell growth and enhances L-OHP-induced apoptosis in human colorectal cancer [J]. IUBMB Life, 2014, 66(9): 645-654.

7　Deng H, Guo Y, Song H, et al. MicroRNA-195 and microRNA-378 mediate tumor growth suppression by epigenetical regulation in gastric cancer [J]. Gene, 2013, 518(2): 351-359.

8　Yu BL, Peng XH, Zhao FP, et al. MicroRNA-378 functions as an onco-miR in nasopharyngeal carcinoma by repressing TOB2 expression [J]. Int J Oncol, 2014, 44(4): 1215-1222.

9　Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, et al. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23(4): 1229-1234.

10　Tzivion G, Hay N. PI3K-AKT-FoxO axis in cancer and aging [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(11): 1925.

11　Li LH, Gao Q, Wang XY, et al. miR-378 suppresses HBV-related hepatocellular carcinoma tumor growth by directly targeting the insulin-like growth factor 1 receptor [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2013, 21(8): 609-613.

12　Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation [J]. Cell, 2004, 117(4): 421-426.

13　Tomasetti M, Nocchi L, Staffolani S, et al. MicroRNA-126 suppresses mesothelioma malignancy by targeting IRS1 and interfering with the mitochondrial function [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(15): 2109-2125.

14　Niedan S, Kauer M, Aryee DN, et al. Suppression of FOXO1 is responsible for a growth regulatory repressive transcriptional sub-signature of EWS-FLI1 in Ewing sarcoma [J]. Oncogene, 2014, 33(30): 3927-3938.

15　Park J, Ko YS, Yoon J, et al. The forkhead transcription factor FOXO1 mediates cisplatin resistance in gastric cancer cells by activating phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway [J]. Gastric Cancer, 2014, 17(3): 423-430.

16　Huang CY, Chan CY, Chou IT, et al. Quercetin induces growth arrest through activation of FOXO1 transcription factor in EGFR-overexpressing oral cancer cells [J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(9): 1596-1603.

17　Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells [J]. J Biol

Chem, 2009,284(35): 23204 -23216.
18 Fendler A, Jung M, Stephan C, et al. The antiapoptotic function of miR-96 in prostate cancer by inhibition of FOXO1[J]. PLoS One, 2013,8(11): e80807.
19 Li F, Liu B, Gao Y, et al. Upregulation of microRNA-107 induces proliferation in human gastric cancer cells by targeting the transcription factor FOXO1[J]. FEBS Lett, 2014,588(4): 538 -544.
20 Hou T, Ou J, Zhao X, et al. MicroRNA-196a promotes cervical cancer proliferation through the regulation of FOXO1 and p27Kip1 [J]. Br J Cancer, 2014,110(5): 1260 -1268.
21 Liu LL, Lu SX, Li M, et al. FoxD3-regulated microRNA-137 suppresses tumour growth and metastasis in human hepatocellular carcinoma by targeting AKT2[J]. Oncotarget, 2014,5(13): 5113 -5124.

[收稿日期 2016-02-24][本文编辑 杨光和]

课题研究·论著

精子形态与精子动力学参数的相关性分析

毛献宝， 薛林涛， 何 冰， 成俊萍， 黄悦悦， 高 婷

基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号:81360107)；广西卫计委科研课题(编号:Z2014193)

作者单位：530021 南宁,广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心
作者简介：毛献宝(1985 -),男,医学硕士,助理研究员,研究方向:生殖医学。E-mail:gxh_mxb@163.com

[摘要] 目的 探讨精子形态与精子动力学参数之间的关系。**方法** 149例精液标本,采用西班牙SCA计算机辅助精子分析系统(CASA)分析精子动力学参数,同时用Diff-Quik快速染色方法对精子进行形态染色,按《WHO人类精液检查与处理实验室手册》(第5版)标准进行精液常规和精子形态分析。精子形态正常组75例,异常组74例。**结果** 精子形态正常组的曲线速率(VCL)、直线速率(VSL)、平均路径速率(VAP)、精子头侧摆幅度(ALH)和鞭打频率(BCF)均显著高于精子形态异常组($P<0.01$),而两组之间直线性(LIN)、摆动性(WOB)、前向性(STR)差异无统计学意义($P>0.05$)。形态正常精子百分率与VCL、VSL、VAP、ALH、BCF存在显著正相关性($P<0.01$);单纯头部畸形精子百分率与VCL、VSL、VAP、LIN、STR、ALH、BCF存在显著正相关性($P<0.01$);混合畸形精子百分率与VCL、VSL、VAP、LIN、STR、ALH、BCF存在显著负相关性($P<0.01$)。**结论** 精子形态与精子运动速率学参数之间存在一定的相关性,精子形态异常影响精子的运动速率、空间位移程度和运动方式。单纯的精子头部畸形不是影响精子运动速率和空间位移程度的决定性因素。混合畸形可能是影响精子运动能力的主要原因之一。

[关键词] 男性不育； 精子形态； 精子动力学参数； 计算机辅助精子分析
[中图分类号] R 689+.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)05-0379-05
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.05.04

Relationship between sperm motility parameters and sperm morphology *MAO Xian-bao, XUE Lin-tao, HE Bing, et al. Center for Reproductive Medicine and Genetics, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning* 530021, *China*

[Abstract] Objective To investigate the relationships between sperm morphology and sperm motility parameters. **Methods** One hundred and forty-nine semen samples were tested. Sperm motility parameters were analyzed by computer-aided sperm analysis(CASA), and the sperm morphology was observed by Diff-Quik rapid staining. Sperm morphology and motility were classified based on the "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen"(Fifth Edition). Some of the samples were morphologically normal(normal group, $n=75$) and the others were morphologically abnormal(abnormal group, $n=74$). **Results** VCL, VSL, VAP, ALH and BCF were significantly higher in the morphologically normal group than those in the abnormal group($P<0.01$), but there were no significant differences in LIN, WOB and STR between the two groups($P>0.05$). There were significantly posi-