

· 临床研究 ·

MicroRNA-144 在结肠癌中的表达水平及临床意义

张广钰, 钟 漓, 田小林, 戴 凌[△], 朱袞嘉, 蒋志庆

(桂林医学院附属医院胃肠外科, 广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨 microRNA-144 在结肠癌中的表达水平及其与临床病理特征的相关性。方法 提取 38 例结肠癌及其正常结肠黏膜组织标本的总 RNA, 采用逆转录实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)方法检测 microRNA-144 的表达量, 并分析其与临床分期、分化程度、淋巴结转移等临床病理特征的关系。结果 癌与癌旁正常结肠黏膜组织比较, microRNA-144 在癌组织中高表达, 相对表达量的中位数是 2.30。其表达与 TNM 分期($P < 0.05$)、分化程度($P < 0.05$)相关, 受试者工作特征(ROC)曲线分析显示, 以相对表达量 1.70 为临界点时, microRNA-144 作为评价结肠癌细胞分化程度, 敏感性为 88%, 特异性为 61.5%。结论 microRNA-144 在结肠癌中的异常表达可能与结肠癌的发生、发展有关。

关键词: microRNA-144; 结肠癌; 细胞分化; 淋巴结转移

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.22.010

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)22-2594-03

Clinical significance of microRNA-144 expression in colon tumor

Zhang Guangyu, Zhong Li, Tian Xiaolin, Dai Ling[△], Zhu Xijia, Jiang Zhiqing

(Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-144 and its association with clinic-pathological features in colon tumor. Methods The expression levels of microRNA-144 in 38 colon tumors and their matched non-tumor adjacent tissue specimens were detected by using stem-loop real-time reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-qPCR), and their correlation with clinic-pathologic features of colon tumor was analyzed. Results Expression levels of microRNA-144 were significantly higher in tumor tissues than in adjacent normal tissues($P < 0.05$), the median of comparative expression level was 2.30. The expression of microRNA-144 was associated with TNM stage($P < 0.05$) and cell differentiation($P < 0.05$). ROC curve of microRNA-144 about cell differentiation and resulted in a diagnostic sensitivity of 88% and specificity of 61.3%. Conclusion The level of microRNA-144 expression may be a valuable adjuvant parameter in forecasting the poorly differentiated colon tumor.

Key words: microRNA-144; colon tumor; cell differentiation; lymphatic metastasis

结肠癌是临床上常见的消化道恶性肿瘤, 其发生、发展是多基因相关、多步骤的, 寻找结肠癌发生、发展的诱导和促进基因, 为结肠癌的诊断、治疗及其预后提供理论支持^[1]。成为关注热点的 microRNA 作为一种非编码小分子 RNA, 具有广泛调节基因表达的功能, 参与细胞增殖、分化、凋亡等多种重要细胞活动的调控^[2]。近年来, 研究发现 microRNA 具有癌基因和抑癌基因的作用, 从而参与肿瘤的发生、发展^[3-4]。本文通过逆转录实时荧光定量聚合酶链反应(real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 38 例结肠癌中 microRNA-144 的表达水平, 探讨其与结肠癌及其临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 桂林医学院 2011 年 6 月至 2012 年 4 月实施手术治疗的结肠癌患者 38 例, 其中, 男 21 例, 女 17 例, 患者中位年龄 59 岁, 术前未行放、化疗等治疗, 组织病理类型的判断标准参照 WHO 病理分期标准。每例标本留取肿瘤组织及对应 7 cm 以上的癌旁正常结肠黏膜组织, 每例都经病理切片检查证实, 离体后 5 min 内置于液氮中保存。Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Oligo dT、dNTPs、SYBR Mastermix 等购自 Takara 公司; 引物由上海 Invitrogen 生物技术有限公司合成。

1.2 RNA 提取 取液氮保存的结肠癌组织及癌旁正常结肠黏膜组织标本, 在液氮中碾碎至粉末, 加 1 mL Trizol 裂解 10 min 收集上清液于 EP 管中, 加氯仿 200 μ L 充分混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清 200 μ L 转移到新的去 RNA 酶的 EP 管中, 加等量异丙醇颠倒混匀放置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液加 1 mL 70% 的乙醇颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去乙醇, 干燥, 用 DEPC 处理过的蒸馏水溶解。采用日本 Malcom 极微量光谱光度计 e-spect 测所提 RNA 浓度, OD 260/280 在 1.8~2.0 之间的用于检测。

1.3 RT-qPCR 体系及其反应条件 表 1 为所用逆转引物的序列。按所用逆转录试剂盒说明书 20 μ L 的体系, 1 μ g RNA 模板分别以 microRNA-144 和 U6(作为内参, 分析 microRNA-144 的表达)引物进行逆转录, 反应条件: 42 $^{\circ}$ C 60 min。取样进行 qPCR, 反应体系: 1 μ L RT 产物(终浓度为 5 ng)、2 * SYBR Green I Mastermix 12.5 μ L、0.5 μ mol/L microRNA 特异前向引物、0.5 μ mol/L 通用的反向引物, 所有样品做 3 个复孔。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 7 min 后, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。其余 cDNA 存放于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱。qPCR 反应后随即分别取 6 个样品各 1 μ L 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳检测目标产物(图 1)。Real-time 定量 PCR 使用的 Agilent Technologies stratagene Mx3005p 仪器。所得 Ct 值, 以 U6 为内参, 用

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析来表示 microRNA-144 癌组织相对于癌旁正常组织的变化倍数。

表 1 microRNA-144 RT-qPCR 检测相关引物序列

| 引物 | 序列 |
|--------------|---|
| microRNA-144 | forward 5'-GCT GGG ATA TCA TCA TAT ACT G-3' |
| | reverse 5'-CGG ACT AGT ACA TCA TCT ATA CTG-3' |
| U6 | forward 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3' |
| | reverse 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3' |

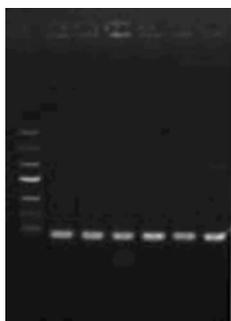


图 1 qPCR 产物电泳图

1.4 统计学处理 microRNA 的表达数据以中位数和 95% 可信区间(95%CI)表示。受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线分析采用 SPSS13.0 统计软件行非参数秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结肠癌及其相应癌旁正常结肠黏膜组织中的 microRNA-144 的表达情况 qPCR 结果显示,内参 U6 的 Ct 值没有明显变异,结肠癌组织中的 microRNA-144 的 Ct 值明显低于相应的癌旁正常结肠黏膜组织,表明 microRNA-144 在结肠癌组织中表达上调。38 例结肠癌患者癌组织与癌旁正常结肠黏膜组织的 microRNA-144 的相对表达量 $N(N = 2^{-\Delta\Delta Ct})$,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 microRNA-144 在结肠癌及癌旁组织中的表达情况

| 类型 | 相对表达量 N(95%CI) | P |
|---------|-----------------|----------|
| 结肠癌组织 | 2.27(1.85~2.62) | <0.000 1 |
| 结肠癌癌旁组织 | 1.28(1.12~1.54) | |

2.2 结肠癌组织中 microRNA-144 表达与临床病理特征的关系 结肠癌组织中 microRNA-144 的表达与肿瘤的分化程度相关,高分化组的表达量低于中、低分化组的表达量($P < 0.05$),中分化组表达量与低分化组的表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);结肠癌组织中 microRNA-144 的表达水平与临床 TNM 分期有显著相关性($P < 0.05$),I~II 期结肠癌组织中 microRNA-144 表达量低于 III~IV 期($P < 0.05$);结肠癌组织中 microRNA-144 的表达与淋巴结的转移情况无相关性($P > 0.05$);结肠癌组织中 microRNA-144 的相对表达量与其他临床病理因素如性别、年龄、肿瘤的大小无明显相关性($P > 0.05$),见表 3。

2.3 采用 ROC 曲线分析 microRNA-144 评价结肠癌细胞分化程度及 TNM 分期的特异性和敏感性 microRNA-144 比较不同分化程度的 ROC 曲线下面积为 0.800(95%CI=0.661~

0.939, $P = 0.003$),比较不同 TNM 分期的 ROC 曲线下面积为 0.820(95%CI=0.675~0.965, $P = 0.001$),提示 microRNA-144 适合作为评价细胞分化程度和结肠癌 TNM 分期的判断标准(图 2)。以 microRNA-144 相对表达量 1.70 作为评价临界值,区分高分化结肠癌的敏感性和特异性分别为 88.0%和 61.5%,区分 TNM 分期的敏感性和特异性分别为 87.5%和 64.3%。

表 3 结肠癌中 microRNA-144 表达和临床病理因素的相关性

| 临床病理因素 | n | microRNA-144 的表达 | P |
|----------|----|------------------|-------|
| 年龄(岁) | | | |
| <55 | 11 | 2.40(1.93~2.80) | 0.430 |
| ≥55 | 27 | 2.27(1.67~2.73) | |
| 性别 | | | |
| 男 | 21 | 2.13(1.70~2.60) | 0.113 |
| 女 | 17 | 2.53(1.97~2.87) | |
| 肿块大小(cm) | | | |
| <5 | 8 | 2.40(1.95~3.02) | 0.542 |
| ≥5 | 30 | 2.30(1.72~2.75) | |
| 分化程度 | | | |
| 中低分化 | 25 | 2.60(2.03~2.93) | 0.002 |
| 高分化 | 13 | 1.93(1.40~2.27) | |
| 淋巴结转移 | | | |
| 有 | 25 | 2.27(1.70~2.70) | 0.805 |
| 无 | 13 | 2.33(1.90~3.03) | |
| TNM 分期 | | | |
| I~II 期 | 5 | 1.27(1.00~1.60) | 0.001 |
| III 期 | 9 | 2.00(1.83~2.37) | |
| IV 期 | 24 | 2.57(2.27~2.90) | |

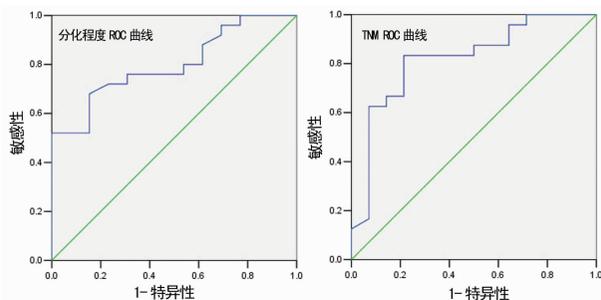


图 2 microRNA-144 表达与结肠癌患者分化程度和 TNM 分期的 ROC 曲线

3 讨 论

结肠癌是世界上第 3 大常见肿瘤,因结肠癌导致的死亡率排名第 2 位,约 50%的结肠癌患者在确诊时已发生远处转移,是一种恶性程度非常高的肿瘤,手术治疗依然是结肠癌的主要治疗方式之一。随着使用抗 EGFR 和抗 VEGF 的分子靶向治疗的应用及化疗的进展,晚期结肠癌患者的中位生存期已经由 6 个月增高至 2 年^[5]。随着对结肠癌分子水平研究的深入,对 microRNA 在结肠癌的研究越来越多。

microRNA 可调节 30% 的人类基因。成熟的 microRNA 一般有 19~25 个碱基,这些碱基与 3'端非编码区的 mRNA(3' UTR)结合而抑制转录进而影响基因的表达^[6]。目前,已有研究证实,microRNA 通过参与基因调控影响蛋白表达水平而影响结肠癌的进展,而且,不同的 microRNA 在结肠癌的作用不同,甚至相同的 microRNA 在不同类型的结肠癌中的表达也不相同,有些 microRNA 充当癌基因作用,有些 microRNA 充当抑癌基因的作用^[7]。microRNA 在许多肿瘤中都发现有表达,如乳腺癌、脑癌、肺癌、胰腺癌、甲状腺癌等^[7]。microRNA-144 在结肠癌患者的粪便和血液中高表达^[8-9],然而其在结肠癌患者组织中的表达情况国内外尚没有文献报道,因此本课题选 microRNA-144 作为研究对象。本研究显示,microRNA-144 在结肠癌组织中的表达量明显增高,在分析 microRNA-144 表达与结肠癌临床病理因素的相关性中发现,microRNA-144 表达水平与结肠癌组织的分化程度相关,而且与结肠癌肿瘤患者的 TNM 分期相关。microRNA-144 在中低分化组中的表达水平高于高分化组,提示 microRNA-144 主要在结肠癌的进展阶段起作用,而在结肠癌的发生起始阶段可能以其他因素起作用为主。进一步的 ROC 曲线分析显示,microRNA-144 高分化结肠癌的敏感性和特异性分别为 88%和 61.5%(图 2)。因此,microRNA-144 可以作为结肠癌肿瘤分化程度的一个辅助诊断标准。

microRNA-144 可作为结肠癌肿瘤分化程度的一种辅助指标,其表达量的上调在诊断结肠癌的分化程度方面有较高的敏感性。本研究与大部分研究结果一致,目前发现有 35 种 microRNA 在结肠癌中有表达量的改变。然而,对于 microRNA 在肿瘤中的表达有一些截然不同的观点,有些 microRNA 发现与分化程度呈正相关,而同样关于该 microRNA 的研究则发现与分化程度呈负相关,有学者认为这主要是因为在校体内的位置不同所致,也有研究发现在不同位置很少同时检测到 microRNA 升高^[9]。本研究表明,不同的分化程度、不同的临床 TNM 分期均对 microRNA-144 产生影响。

本实验结果显示,microRNA-144 在结肠癌组织中的表达量高于正常的结肠癌组织中的表达量,且随着 TNM 分期而发生改变,提示 microRNA 可作为一种肿瘤的进展指标。有学者曾作过该方面的研究,其机制为 microRNA 导致肿瘤癌基因或抑癌基因发生了转化^[10]。但本研究对肿瘤的进展未作进一步深入研究。对 microRNA 作为一种临床治疗效果预测的分子标志,有许多研究曾报道^[11]。本课题组目前对 microRNA-144 过表达患者的临床治疗效果以及预后情况正在作进一步研究。

参考文献:

[1] Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of mi-

(上接第 2593 页)

- [7] 杨玉琪,方路,段呈玉,等.浅析中医药治疗延缓艾滋病病程进展的意义[J].云南中医中药杂志,2012,33(10):7-9.
- [8] 徐小元,李文刚.艾滋病抗病毒治疗药物的合理选择[J].中华医学杂志,2006,86(44):3097-3098.
- [9] Rinaldo CR,Liebmann JM. Prolonged suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viremia in persons with advanced disease results in enhancement of CD4 T cell reactivity to microbial antigens but not to

croRNAs in cancers[J]. Mol Cancer,2007,6:60-65.

- [2] Gabriely G,Wurdinger T,Kesari S,et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators[J]. Mol Cell Biol,2008,28(17):5369-5380.
- [3] Wang R,Wang ZX,Yang JS,et al. MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14) [J]. Oncogene,2011,30(23):2644-2658.
- [4] Kent OA,Chivukula RR,Mullendore M,et al. Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway[J]. Genes Dev,2010,24(24):2754-2759.
- [5] Douillard JY,Siena S,Cassidy J,et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study[J]. J Clin Oncol,2010,28(31):4697-4705.
- [6] Lee I,Ajay SS,Yook JI,et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites[J]. Genome Res,2009,19(7):1175-1183.
- [7] Slaby O,Svoboda M,Michalek J,et al. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application[J]. Mol Cancer,2009,8:102-115.
- [8] Kalimutho M,Del VBG,Di Cecilia S,et al. Differential expression of miR-144 as a novel fecal-based diagnostic marker for colorectal cancer[J]. J Gastroenterol,2011,46(12):1391-1402.
- [9] Slattery ML,Wolff E,Hoffman MD,et al. MicroRNAs and colon and rectal cancer: differential expression by tumor location and subtype [J]. Genes Chromosomes Cancer,2011,50(3):196-206.
- [10] Schepeler T,Reinert JT,Ostenfeld MS,et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer[J]. Cancer Res,2008,68(15):6416-6424.
- [11] Hummel R,Hussey DJ,Haier J. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types[J]. Eur J Cancer,2010,46(2):298-311.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-22)

HIV-1 antigens[J]. J Infect Dis,1999,179(2):329-336.

- [10] 江雪艳译,卢洪洲审校. HAART 进展[J]. 世界感染杂志,2007,7(2):176-177.
- [11] Mocroft A,Kirk O. Anaemia is an independent predictive marker for clinical prognosis in HIV-infected patients from across Europe[J]. Euro SIDA Study Group AIDS,1999,13(8):943-950.

(收稿日期:2013-01-23 修回日期:2013-04-27)