

· 论 著 ·

## miR-200b 与癌胚抗原在大肠癌中的表达及其相关性\*

杜叶平, 王海莲, 尹莉莉, 武春梅, 苗晋华<sup>△</sup>

(中国人民解放军第二六四医院检验科, 太原 030001)

**摘要:**目的 探讨 miR-200b 与癌胚抗原(CEA)在大肠癌发生、发展中的表达情况及其表达的相关性。方法 采用实时荧光定量 PCR 方法分析 60 例大肠癌组织及正常组织中 miR-200b mRNA 和 CEA mRNA 表达结果, 分析其与患者临床资料、病理参数之间的关系, 研究大肠癌组织中 miR-200b mRNA 和 CEA mRNA 表达的相关性。结果 大肠癌组织中 miR-200b mRNA 的表达显著低于正常组织, CEA mRNA 显著高于正常组织, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); 患者性别、年龄及肿瘤部位的 miR-200b mRNA 和 CEA mRNA 表达结果比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 不同组织学分级及 TNM 分期中, CEA 呈现过表达状态, 而 miR-200b 呈现表达降低或缺失状态; 大肠癌组织中 miR-200b 和 CEA 的表达具有相关性, 且呈负相关关系( $r = -0.790$ ,  $P < 0.001$ )。结论 miR-200b 在大肠癌组织中呈低表达或表达缺失, 与 CEA 的表达呈一定的负相关关系, 提示 miR-200b 可为肿瘤的诊断和治疗提供新的依据。

**关键词:** 大肠癌; miR-200b; 癌胚抗原; 实时定量 PCR

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.002

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2016)20-2808-03

## The expression of miR-200b and CEA and the correlation between the two factors in colon cancer\*

DU Yeping, WANG Hailian, YIN Lili, WU Chunmei, MIAO Jinhua<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the 264th Hospital of PLA, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

**Abstract:** **Objective** To study the expression of transcription factor miR-200b and CEA and the correlation between the two transcription factors in the process of occurrence and development of colorectal cancer. **Methods** Expression miR-200b and CEA mRNA by real-time PCR in 60 colon cancer tissues and corresponding normal tissues were detected and the results were compared with the clinical features and pathological characters. The relationship between the mRNA expression of miR-200b and CEA in 60 colon cancer tissues was determined. **Results** The expression rate of CEA mRNA was detectable to highly expressed rates in colon cancer tissues than that in matched normal tissues ( $P < 0.01$ ), whereas miR-200b mRNA in the colon cancer tissues was significantly lower than that in the matched normal tissues ( $P < 0.01$ ). There was no significant correlation between miR-200b, CEA mRNA expression and age, sex, tumor location ( $P > 0.05$ ). Loss expression or down regulation expression of miR-200b mRNA was detected, whereas CEA mRNA was detectable to highly expressed in the different histological grade and Dukes stages. The expression of miR-200b mRNA and CEA mRNA were positively correlated with the histological grade in colon cancer. A significant correlation was found between the expression of miR-200b mRNA and CEA mRNA ( $r = -0.790$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Loss or down regulation expression of miR-200b mRNA, whereas CEA is detectable to highly expressed in colon cancer. Negative correlation occurred in miR-200b mRNA and CEA mRNA indicates that miR-200b and CEA provide the new clues of genetic diagnosis and treatment.

**Key words:** colon cancer; miR-200b; CEA; real-time PCR

微小 RNA(miR)是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 小分子, 1993 年发现首个 miR, 其功能特征和作用模式广受关注<sup>[1]</sup>。目前, miR-200 家族包括 miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-429、miR-141, 分别位于第 1、12 号染色体上。国内外研究表明, miR-200b 被认为是一种抑癌基因。癌胚抗原(CEA)最初发现于结肠癌和胎儿肠组织中, 然后有学者发现在大肠癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、甲状腺髓样癌等多种癌症中均有明显表达<sup>[2]</sup>。CEA 作为一个广谱肿瘤标志物, 对大肠癌、乳腺癌和肺癌等的疗效判断、病情发展、监测和预后估计是一个良好的指标, 但其特异性不强, 敏感性不高, 对肿瘤早期诊断作用不明显。现对大肠癌组织中的 miR-200b 和 CEA mRNA 的表达情况及其与临床病理资料的相关性进行研究,

为临床提供高特异性和敏感性的实验室数据。报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 随机选取 60 例大肠癌患者, 男 37 例, 女 23 例; 年龄 41~85 岁, 平均年龄 60 岁。标本取自大肠癌组织, 同时采集距癌旁 5 cm 外的癌旁正常组织作为对照。所有标本选自 2010 年 6 月至 2015 年 7 月该院进行手术及内镜治疗的患者, 标本切除后直接用生理盐水漂洗干净, 保存于一 70 °C 冰箱备用。60 例大肠癌患者均经病理确诊, 手术前均未接受任何放疗、化疗, 以及其他针对肿瘤的相关治疗等。

**1.2 仪器与试剂** 美国 ABI 公司 Step One™ Real-Time PCR 仪。美国 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂; GAPDH 引物(Hs002)、miR-200b 与 CEA 引物序列均由日本 TaKaRa 公司

\* 基金项目: 山西省自然科学基金资助项目(2013011043-4)。

作者简介: 杜叶平, 女, 主管技师, 主要从事肿瘤分子生物学研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: miaojh337@163.com。

合成;Fast SYBR Green Master Mix 购自美国 ABI 公司。

**1.3 方法** (1)组织总 RNA 提取:使用 DEPC 处理实验的器械和溶液,采用 Qiagen 公司生产的 RNAlater,该试剂可稳定保护 RNA 避免受 RNase 的降解,保证 RNA 样品质量。组织总 RNA 的提取过程按照说明书严格进行,提取的总 RNA 保存于 -70 °C 冰箱备用。(2)荧光定量 PCR:将组织总 RNA 以通用引物 oligo(dT) 进行逆转录合成 cDNA,使用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒,以 GAPDH 为内参,以癌旁正常组织作为对照标本,每个标本设立 3 个平行管,反应结束后,采用 ABI 公司 Step One™ 软件比较 CT(ΔΔCT) 定量方法进行分析。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件对数据进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较使用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。计数资料组间比较应用  $\chi^2$  检验,采用 Spearman 进行相关性分析。

**2 结 果**

**2.1 2 种组织标本的 miR-200b 和 CEA mRNA 表达水平** 大肠癌组织中 miR-200b 与 CEA mRNA 的表达与正常组织比较,均显著升高,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

**表 1 2 种组织标本的 miR-200b 与 CEA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组织类型	<i>n</i>	miR-200b	CEA
大肠癌组织	60	1.353 ± 0.269*	16.421 ± 4.987*
正常组织	60	12.261 ± 2.240	2.219 ± 1.313

注:与正常组织比较,\*  $P < 0.01$ 。

**2.2 不同临床资料的 miR-200b 和 CEA mRNA 表达水平** 大肠癌患者 miR-200b 和 CEA mRNA 表达呈阳性(+),两者在正常组织的表达呈阴性(-)。大肠癌患者的 miR-200b 阳性表达率为 25.00%,CEA 阳性表达率为 80.81%。见表 2。

**表 2 不同临床资料的 miR-200b 和 CEA mRNA 表达水平**

临床资料	<i>n</i>	miR-200b				CEA			
		阳性 (+)	阴性 (-)	$\chi^2$	<i>P</i>	阳性 (+)	阴性 (-)	$\chi^2$	<i>P</i>
年龄(岁)									
<60	9	3	6	0.087	0.925	8	1	0.030	0.955
≥60	51	12	39			45	6		
性别									
男性	37	10	27	0.015	0.824	33	4	0.069	0.793
女性	23	5	18			20	3		
肿瘤部位									
结肠	38	11	27	0.681	0.654	34	4	0.131	0.718
直肠	22	4	18			19	3		

**2.2 miR-200b 与 CEA 表达的相关性以及病理参数的关系** 大肠癌腺癌的高分化、中分化、低分化之间的 miR-200b 和 CEA 的表达率,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );且分化越低,miR-200b 表达率也低,CEA 表达率增高;在 TNM I、II 期及 III、IV 期患者中,miR-200b mRNA 表达率:逐渐减低,CEA mRNA

逐渐增高。淋巴转移组织的 miR-200b 表达率低于无转移者,CEA mRNA 表达率则高于无转移者。大肠癌组织的 miR-200b 和 CEA 的 mRNA 表达具有相关性 ( $r = -0.790, P < 0.001$ ),且呈负相关关系 ( $-1 < r < 0$ )。大肠癌组织的 miR-200b 呈低表达或缺失状态,CEA 均呈过表达状态,两者与 TNM 分期密切相关。见表 3。

**表 3 miR-200b 和 CEA 表达的相关性以及病理参数的关系**

病理参数	<i>n</i>	miR-200b				CEA			
		阳性 (+)	阴性 (-)	$\chi^2$	<i>P</i>	阳性 (+)	阴性 (-)	$\chi^2$	<i>P</i>
腺癌	60	15	45			52	8		
高分化	9	2	7	8.245	0.009	6	3	10.678	0.003
中分化	33	12	21			29	4		
低分化	18	1	17			17	1		
TNM 分期									
I、II	32	13	19	6.564	0.007	26	6	8.856	0.004
III、IV	28	2	26			27	1		
淋巴结转移									
有	29	4	25	7.512	0.008	27	2	6.023	0.014
无	31	11	20			26	5		

**3 讨 论**

CEA 是反映肿瘤发生和发展的标志物,在癌症的诊疗中发挥重要作用,具有一定程度的指导意义,但因其缺乏足够的组织特异性和肿瘤特异性,因此在肿瘤的早期诊断、疗效评估和预后判定的应用较为局限<sup>[3]</sup>。

miR 是细胞中的非编码 RNA,在肿瘤的发生、发展中起重要作用,是基因表达的关键调节子,调节多种生物学进程,如细胞分化、细胞周期、细胞增殖与凋亡、血管生成等。最新研究报道,miR 可通过多种方式促进或抑制肿瘤细胞的增殖或转移。国内外研究表明,miR-200b 在胃癌、肝癌、卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌等多种肿瘤中的表达均下调,可抑制癌细胞增殖和迁移<sup>[4-8]</sup>。

本研究采用一系列的实验技术分析 miR-200b 和 CEA 在大肠癌组织和相应的癌旁正常组织中的 mRNA 表达水平,同时研究 miR-200b 和 CEA 的表达情况与大肠癌临床病理参数之间的关系,结果显示,miR-200b 在大肠癌组织呈表达降低或缺失的状态,是导致大肠癌发生、发展的重要因素之一,miR-200b 和 CEA 的表达具有相关性,且呈负相关关系,说明 miR-200b 表达的改变可与 CEA 一样作为大肠癌发生和发展、治疗和预后的潜在指标,而 miR-200b 可能比传统的蛋白分子类肿瘤标志物更加有效,解决传统蛋白标志物抗体在准确定量上的局限性,更好地提供大肠癌患者的个体化诊疗思路,在早期诊断、肿瘤分子分型、药物筛选、预后评估中具有很大的潜力,并在一定程度上为大肠癌的早期诊断、治疗、预后寻求新的思路。

**参 考 文 献**

[1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs(下转第 2812 页)

结果显示,2 种方法检测的敏感性接近,符合实验要求。胶体金免疫层析法检测 PG I、PG II 时,在各自 3 个医学决定水平时其预期偏倚置信区间上限均小于可接受偏倚范围,说明 2 种检测方法具有高度的一致性。

本研究结果表明,2 种 PG 检测方法的敏感性、特异性均以 ELISA 法最高(0.782, 0.823),但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),提示均可用于血清 PG 检测。ELISA 法敏感性最高,但试剂成本较高,实验时间较长,需多台配套仪器,故有条件的大医院可选用此法<sup>[10]</sup>。胶体金免疫层析法是近年来临床应用较多的检测方法,因其操作简便、省时,试剂成本低廉,特异性和敏感性也可满足要求(0.775, 0.85),因此特别适合基层医院或者小标本量的即时检测<sup>[11-12]</sup>。

## 参考文献

- [1] 杨俊,厉朝喜,戴一扬,等. 三叶因子 1 蛋白与血清胃蛋白酶原在胃溃疡中的表达及其意义[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(22):1540-1543.
- [2] 张慧,郑勇,陈卫刚,等. 肝硬化门静脉高压性胃病患者血清胃蛋白酶原水平变化及意义[J]. 山东医药, 2016, 25(10):44-45.
- [3] Ikeda F, Shikata K, Hata J, et al. Combination of helicobacter pylori antibody and serum pepsinogen as a good predictive tool of gastric cancer incidence: 20-year prospective data from the hisayama study[J]. J Epidemiol, 2016, 84(12):1124-1125.
- [4] Iguchi M, Kato J, Yoshida T, et al. Serum pepsinogen levels can quantify the risk of development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection[J]. Int J Cancer,

2016, 139(5):1150-1156.

- [5] 武良,张德忠,江伟春,等. 血清胃蛋白酶原、甘氨酸脯氨酸二肽氨基肽酶测定在胃癌中的临床意义探讨[J]. 检验医学, 2015, 30(9):911-915.
- [6] 美国临床和实验室标准协会. EP9-A2-用患者样本进行方法比对及偏倚评估: 批准指南[S]. 2 版. Wayne, PA: CLSI, 2012.
- [7] 朱国民,邱峰. 三种血清胃蛋白酶原检测方法在胃癌筛查中的比较分析[J]. 检验医学, 2012, 27(11):961-962.
- [8] 王绍亮,程江. 流式荧光法检测血清胃蛋白酶原 I / II 的应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(13):1839-1840.
- [9] Buyruk A, Osma O, Yilmaz MD, et al. Pepsinogen identification in the middle ear fluid of children with otitis media with effusion[J]. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg, 2016, 26(2):73-78.
- [10] Kishikawa H, Kimura K, Ito A, et al. Predictors of gastric neoplasia in cases negative for helicobacter pylori antibody and with normal pepsinogen[J]. Anticancer Res, 2015, 35(12):6765-6771.
- [11] 乐嫣,项明洁,张华. 血清胃蛋白酶原检测在胃相关疾病中的诊断价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 18(1):12-14.
- [12] 钱磊,陈为军. 血清胃蛋白酶原在胃癌早期诊断中的应用意义及价值评析[J]. 中国实验诊断学, 2016, 21(2):243-245.

(收稿日期:2016-02-16 修回日期:2016-07-21)

(上接第 2809 页)

- with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5):843-854.
- [2] Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system[J]. J Exp Med, 1965, 122(3):467-468.
- [3] Kurashige J, Mima K, Sawada G, et al. Epigenetic modulation and repression of miR-200b by cancer-associated fibroblasts contribute to cancer invasion and peritoneal dissemination in gastric cancer[J]. Carcinogenesis, 2015, 36(1):133-141.
- [4] Dhayat SA, Mardin WA, Khler G, et al. The microRNA-200 family-a potential diagnostic marker in hepatocellular carcinoma? [J]. J Surg Oncol, 2014, 110(4):430-438.
- [5] Meng X, Müller V, Milde-Langosch K, et al. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2016, 29(2):78-

94.

- [6] Rhodes LV, Martin EC, Segar HC, et al. Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer [J]. Oncotarget, 2015, 30(18):16638-16652.
- [7] Khler CU, Bryk O, Meier S, et al. Analyses in human urothelial cells identify methylation of miR-152, miR-200b and miR-10a genes as candidate bladder cancer biomarkers[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 438(1):48-53.
- [8] Vukobrat-Bijedic Z, Husic-Selimovic A, Sofic A, et al. Cancer antigens (CEA and CA 19-9) as markers of advanced stage of colorectal carcinoma [J]. Med Arch, 2013, 67(6):397-401.

(收稿日期:2016-03-20 修回日期:2016-06-26)