

• 论 著 •

microRNA-21、microRNA-135b 和 microRNA-141 在结肠癌组织中的表达及相关性

邱嘉华

(广东省深圳市龙华区人民医院消化内科, 广东深圳 518000)

摘要:目的 探析结肠癌组织中 microRNA-21、microRNA-135b 和 microRNA-141 表达水平。方法 入选该院 2013 年 5 月至 2014 年 4 月结肠癌手术切除标本 40 例, 采自结肠癌组织及近癌切端结肠癌旁健康组织, 进行实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR), 检测结肠癌组织及结肠癌旁健康组织中的 microRNA-141、microRNA-135b、microRNA-21 表达水平; 依据国内外相关文献, 将性别、年龄、淋巴结转移、肿瘤分期系统 (TNM)、分化程度列为相关因素, 评估其与结肠癌组织中 microRNA-141、microRNA-135b、microRNA-21 表达水平的相关性。结果 结肠癌组织中 microRNA-141、microRNA-135b、microRNA-21 表达水平显著高于结肠癌旁健康组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 结肠癌组织 microRNA-141、microRNA-135b、microRNA-21 表达水平与结肠癌是否发生淋巴结转移、TNM 分期等指标密切相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 结肠癌组织中 miRNA-141、miRNA-135b、miRNA-21 表达水平过高, 与结肠癌是否发生淋巴结转移、TNM 分期密切相关。

关键词:结肠癌组织; 微小 RNA; 淋巴结转移

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)17-2424-03

The expression of microRNA-21, microRNA-135b and microRNA-141 in colon cancer tissue and their correlation

QIU Jiahua

(Department of Digestive Medicine, People's Hospital of Longhua District of Shenzhen City in Guangdong Province, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level of microRNA-21, microRNA-135b and microRNA-141 in colon cancer tissue. **Methods** Totally 40 cases of colon cancer specimen from surgical resection in our hospital from May 2013 to April 2014 were selected, 40 healthy colon tissues from people who entered our hospital at the same period for physical examination were selected. The expression level of microRNA-21, microRNA-135b and microRNA-141 were determined using real time PCR. Chosed sex, age, lymph node metastasis, TNM staging, differentiation degree as related factors by literatures published in home and abroad, assessed the correlation between the level of microRNA-141, microRNA-135b, microRNA-21 and its expression in colorectal cancer. **Results** The expression level of microRNA-21, microRNA-135b and microRNA-141 in colon cancer tissues were remarkably higher than those in healthy tissues, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of microRNA-141, microRNA-135b and microRNA-21 in colon cancer tissues were closely related to the occurrence of lymph node metastasis, progression and stage of colon cancer, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of microRNA-21, microRNA-135b and microRNA-141 are upregulated in colon cancer tissue, which is highly correlated with the lymphatic metastasis and progressiveness of colon cancer.

Key words: colon cancer tissue; miRNA; lymphatic metastasis

结肠癌的发病情况位列我国恶性肿瘤的第 3 位, 仅次于肺癌和胃癌, 临床常见发病群体为中年男性^[1]。近年来, 研究显示结肠癌的发病、进展、转移和侵袭等病理过程与 microRNA (miRNA) 水平密切相关。结肠癌组织中 miRNA 的表达及病理机制, 是结肠癌诊断和治疗的新依据。有研究显示, 结肠癌组织中 miRNA-141、miRNA-135b、miRNA-21 出现过度表达情况, 且与结肠癌是否发生淋巴结转移、进展程度密切相关^[2]。探析结肠癌组织中 miRNA 的表达及病理机制, 以及与结肠癌进展转移情况的相关性具有重要的临床价值, 故笔者对本院 2013 年 5 月至 2014 年 4 月收治的结肠癌手术患者结肠癌组织 miRNA 的表达水平进行检测, 并探讨其与结肠癌转移进展情况的相关性, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 选取本院 2013 年 5 月至 2014 年 4 月 40 例结肠癌手术切除标本, 年龄 52~70 岁, 其中男 29 例, 女 11 例,

平均 (60.3 ± 3.4) 岁。全部标本均经病理学诊断证实, 病例的临床病理资料完整, 患者术前均未进行生物疗法、放疗、化疗等其他疗法。

1.2 标本采集 标本均采自近癌切端结肠癌旁健康组织、结肠癌组织, 标本离体后即刻放置 -196 °C 液氮速冻, 后放置 -80 °C 环境下存放。

1.3 方法 (1) 提取组织总 RNA: 所用实验物品均去 RNase 处理后, 取 50~100 mg 置于 -80 °C 环境下, 随即放置到苯酚变性缓冲液 1 mL 的手动玻璃匀浆器内进行冰浴 (冰浴中匀浆充分); 将冰浴后所得组织匀浆液转移至 1.5 mL 的艾本德微量离心管内, 室温下置放 5 min, 完全分离核蛋白复合体, 随后将氯仿 0.2 mL 加入, 摇匀 15 s, 配平, 冰盒内置放 2~3 min, 离心 15 min, 1 200 r/min, 分离 RNA。(2) RNA 沉淀: 吸取上层水相, 向另一艾本德微量离心管内转移, 兑入异丙醇 0.5 mL, 充分混匀后 -20 °C 置放 0.5 h, 离心 15 min, 1 200 r/s,

RNA 沉淀。(3)RNA 清洗:除去上清液后兑入 1 mL 75% 乙醇,混匀震荡,离心 5 min,7 500 r/s;共清洗 2 次。(4)RNA 再溶解:除去乙醇,将艾本德微量离心管室温干燥 5~10 min,挥发乙醇,将 0.1% 的焦碳酸二乙酯处理水 20~30 μ L 溶解 RNA 沉淀,采集 3 μ L 检测其纯度及水平,采集 4.5 μ L 检测 RNA 的完整性,其余用于合成 cDNA 第一链。(5)血浆提取 RNA 制备洗液:提取 RNA,进行 mirVanaTMPARISTMKit 法提取。(6)RNA 定量:miRNA 逆转录、聚合酶链反应(PCR)扩增,定量分析 PCR 结果;实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 miRNA 表达,应用荧光定量法计算。(7)评估结肠癌组织中 miRNA-141、miRNA-135b、miRNA-21 表达水平的相关影响因素:将性别、年龄、淋巴结转移、TNM 分期、分化程度共 5 项列为影响因素,分析与结肠癌组织中各型 RNA 表达水平的相关性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件分析,计量资料进行 *t* 检验,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料进行 χ^2 检验。对结肠癌 miRNA 表达水平的相关因素采用 Logistic 回归分析,以结肠癌 miRNA 表达水平作为因变量,患者一般资料作为自变量,多分类变量分别设置亚变量, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结肠癌组织、结肠癌旁健康组织中 miRNA 表达水平比较 结肠癌组织中 miRNA-21、miRNA-141、miRNA-135b 表达水平显著高于结肠癌旁健康组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 结肠癌组织及结肠癌旁健康组织中 miRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	miRNA-21	miRNA-141	miRNA-135b
结肠癌组织	40	8.50 \pm 4.11	0.19 \pm 0.07	0.10 \pm 0.03
结肠癌旁健康组织	40	4.12 \pm 2.20	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
<i>t</i>		5.94	14.31	16.00
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

2.2 相关性分析 结肠癌组织中 miRNA-141、miRNA-135b、miRNA-21 表达水平与淋巴结转移、肿瘤分期系统(TNM)分期情况密切相关,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 结肠癌组织 miRNA-141、miRNA-135b、miRNA-21 表达水平相关性分析($\bar{x} \pm s$)

项目	指标	<i>n</i>	miRNA-135b	miRNA-21	miRNA-141	<i>t</i> ₁ , <i>P</i> ₁	<i>t</i> ₂ , <i>P</i> ₂	<i>t</i> ₃ , <i>P</i> ₃
性别	男	29	0.10 \pm 0.03	8.50 \pm 4.11	0.19 \pm 0.07	0.86, 0.40	0.01, 0.99	0.39, 0.70
	女	11	0.09 \pm 0.04	8.49 \pm 4.12	0.18 \pm 0.08			
年龄	≤ 60 岁	22	0.10 \pm 0.06	8.51 \pm 4.10	0.18 \pm 0.07	0.56, 0.58	0.01, 0.99	0.48, 0.64
	> 60 岁	18	0.09 \pm 0.05	8.50 \pm 4.11	0.19 \pm 0.06			
淋巴结转移	是	16	0.11 \pm 0.04	8.50 \pm 4.11	0.19 \pm 0.07	4.19, 0.00	2.47, 0.01	8.63, 0.00
	否	24	0.07 \pm 0.02	6.03 \pm 2.19	0.06 \pm 0.02			
TNM	I~II 期	25	0.11 \pm 0.06	9.03 \pm 4.15	0.21 \pm 0.09	2.55, 0.02	2.59, 0.01	5.97, 0.00
	III~IV 期	15	0.07 \pm 0.01	6.02 \pm 2.20	0.07 \pm 0.01			
分化程度	中高分化	30	0.09 \pm 0.03	8.52 \pm 4.11	0.20 \pm 0.07	0.84, 0.41	0.01, 0.99	0.38, 0.71
	低分化	10	0.08 \pm 0.04	8.51 \pm 4.10	0.19 \pm 0.08			

注:*t*₁, *P*₁ 为 miRNA-135b 同项目间比较;*t*₂, *P*₂ 为 miRNA-21 同项目间比较;*t*₃, *P*₃ 为 miRNA-141 同项目间比较。

3 讨 论

miRNA 在线虫至人的多种真核生物中广泛存在,miRNA 基因的转录和其他基因同步,数百个核苷酸共同组成 miRNA 基因转录产物 pri-miRNA,在蛋白复合物的作用下,pri-miRNA 可对少数核苷酸进行删除,生成 miRNA 前体,结构类似发夹^[3-6];在解旋酶、ATP、Dicer 酶的共同作用下,miRNA 前体可分裂为成熟的 miRNA 21~25 bp^[7-8],在不同类型病变、细胞不同生长时期、不同生物体内 miRNA 的表达模式具有差异性,在基因表达中发挥重要作用,其作用机制尚在研究中^[9]。

本研究探析结肠癌组织及患者血浆中 miRNA 的表达水平,结果显示结肠癌组织中 miRNA-141、miRNA-135b、miRNA-21 表达水平显著高于结肠癌旁健康组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);结肠癌组织 miRNA-141、miRNA-135b、miRNA-21 表达水平与结肠癌是否发生淋巴结转移、TNM 分期等指标密切相关,差异有统计学意义($P < 0.05$),与姜训训等^[10]的研究结果大体一致,miRNA-21 在结肠癌中呈现高表达状态,参与癌细胞的转移及浸润,其调控的靶基因包括磷酸酯酶-张力蛋白同源物、原肌球蛋白 1、乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂、程序性细胞死亡因子等,可通过抑制 PDCD4 的表达对癌细胞的转移浸润产生影响;miRNA-135b 是 LEMD1 的第一个内含子区域,该基因在结肠癌中呈现高表达状态^[11-12],通过异常激

活 Wnt/ β -catenin 通路而促使肠黏膜过度增生且生成腺瘤性息肉;而 miRNA-141 为 miR-200 家族的热门基因,可引发上皮间质转化,促使上皮细胞转变为间充质细胞表型或成纤维细胞进而推动肿瘤的进展及转移。

综上所述,结肠癌组织中 miRNA-141、miRNA-135b、miRNA-21 表达水平过高,与结肠癌是否发生淋巴结转移、TNM 分期密切相关。

参考文献

[1] 曹红亮,黄少军,刘爱华,等. miR-155 在结肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华消化外科杂志,2013,12(6): 173-174.

[2] 宋军民,杨超,李震,等. 微小 RNA-155 和 WEE1 在结肠癌中的作用及其表达的相关性[J]. 中华实验外科杂志,2015,32(2):153-155.

[3] 仇剑,李明山. miRNA-141 在结肠癌患者血浆及肿瘤组织中的表达及意义[J]. 中国现代普通外科进展,2015,18(12):938-941.

[4] 刘洁,吴稚晖,刘怀,等. 结肠癌患者血浆 miR-21 表达水平与化疗药物疗效相关性的研究[J]. 实用肿瘤杂志,2015,30(5):423-426. (下转第 2428 页)

致局部中枢神经元细胞的氧摄取障碍,加剧神经元细胞膜的损伤和完整性的破坏^[11-12]。已有的研究探讨了 AD 患者血清中 CRP、IL-6 等指标的变化,但相关研究的样本量较少,临床资料的收集偏移较为严重,可信性不高。

本研究发现,AD 组患者的 CRP 和 IL-6 水平明显高于健康人群,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示相关细胞炎症因子的激活导致的炎症反应,可能参与到了 AD 的发生发展过程中。CRP 和 IL-6 的上升,可以通过影响到神经元轴突末梢的神经递质的摄取、促进氧自由基对于轴突的损伤,进而导致神经元的电传递功能的障碍,促进脑功能的衰退。有研究者通过回顾性分析研究了 82 例样本量的动物模型资料,发现 AD 血清中的 CRP 和 IL-6 可较对照组上升 3~4 倍,且患者的脑功能评分越差,病情预后不佳的患者,其 CRP 和 IL-6 的上升更为明显,这与本研究的结论较为一致^[13-14]。AD 患者的定向力、瞬时记忆及注意力和计算力等认知功能受到了明显的影响,相关功能评分均显著下降,而与此同时患者的生活状态评分有所下降,生活自理能力不足,这与笔者临床上观察到的相关症状较为一致,AD 患者的长期 β 淀粉样蛋白沉淀及因此导致的脑萎缩等,均影响到了患者功能评分。尹秀华等^[14] 研究中并未发现 AD 患者计算力的下降,这与本研究的结论存在一定的差别,考虑到样本量的不足、临床资料的收集偏移及 AD 患者病情严重程度间的差异等,均可能导致了最终结论的差异。相关关系分析可以发现,AD 患者血清中相关炎症因子的表达与患者的脑功能评分具有密切的关系,笔者考虑存在以下机制:(1)CRP 和 IL-6 可以通过促进乙酰胆碱酯酶的激活,抑制神经递质的重新摄取,促进患者神经递质传递的障碍;(2)CRP 和 IL-6 对于脑组织神经元轴突鞘膜的损伤,可以导致脑组织相关功能区域神经组织的损害。

综上所述,AD 患者血清的 CRP、IL-6 水平较高,且与患者的精神症状和日常生活能力密切相关。但本研究对于 CRP、IL-6 的表达与 AD 患者的远期治疗预后的关系研究不足,存在一定的局限性。

参考文献

- [1] Santos A, Pareja H, Sanchis F, et al. Physical activity and Alzheimer disease: A protective association[J]. Mayo Clin Proceedings, 2016, 91(8): 999-1020.
- [2] Desikan RS, Schork AJ, Wang Y, et al. Polygenic overlap between C-reactive protein, plasma lipids, and Alzheimer disease[J]. Circulation, 2015, 131(23): 2061-2069.
- [3] 刘艺丽,胡为民.阿尔兹海默病的治疗进展[J].中国药物与临床,2014,14(1):56-60.
- [4] 郭洪君.阿尔兹海默病患者血浆 C 反应蛋白和转化生长因子 $\beta 1$ 检测分析[J].内蒙古中医药,2014,22(4):81-82.
- [5] 陈紫微,唐霖,刘福和,等.表观遗传修饰在阿尔兹海默病中的研究进展[J].生命科学,2016,32(7):757-765.
- [6] 孙永存,谢莉红. AD 患者脑电图 $\delta + \theta / \alpha + \beta$ 比值与炎症因子的相关性分析[J].西南国防医药,2016,24(10):1199-1201.
- [7] 卢兴平.阿尔兹海默病轴突病变的研究进展[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2013,32(14):6551-6553.
- [8] Mayes J, Tinker-Mill C, Kolosov O, et al. Amyloid fibrils in Alzheimer disease are not inert when bound to copper ions but can degrade hydrogen peroxide and generate reactive oxygen species[J]. J Biol Chem, 2014, 289(17): 12052-12062.
- [9] O' Bryant SE, Waring SC, Hobson V, et al. Decreased C-reactive protein levels in Alzheimer disease[J]. J Geriatr Psychol, 2010, 23(1): 49-53.
- [10] von Könel R, Mills PJ, Mausbach BT, et al. Effect of Alzheimer caregiving on circulating levels of C-reactive protein and other biomarkers relevant to cardiovascular disease risk: A longitudinal study[J]. Gerontology, 2012, 58(4): 354-365.
- [11] 杨楠楠,魏阳,徐倩,等.阿尔兹海默病表观遗传学研究的进展[J].中华医学遗传学杂志,2016,33(2):252-255.
- [12] 熊杰,白生华,徐万清,等.阿尔兹海默病患者血清 C 反应蛋白、载脂蛋白 E 和同型半胱氨酸检测的临床意义分析[J].中国卫生检验杂志,2011,25(8):1987-1989.
- [13] 张真真,苏帆,纪木火,等.术后认知功能障碍生物标记物的研究进展[J].临床麻醉学杂志,2016,32(6):616-620.
- [14] 尹秀华,姜珍,刘天云,等.复合型 AD 大鼠模型脑组织、血清及牙周组织中部分炎症因子的表达[J].实验动物与比较医学,2013,33(6):439-443.

(收稿日期:2017-02-02 修回日期:2017-04-22)

(上接第 2425 页)

- [5] 张丽静,刘博,赵增仁,等.上调 miR-187 表达对人结肠癌细胞株增殖活性的影响[J].中国病理生理杂志,2013,29(11):162-163.
- [6] 张滩,张伟,王辉,等. miRNA-141、miRNA-145 在非小细胞肺癌中的表达及与临床病理的关系[J].西安交通大学学报(医学版),2015,7(3):368-372.
- [7] Christos T, Johannes B, Hamideh R, et al. Serum miR-155 as a potential biomarker of male fertility[J]. Human Rep, 2015, 30(4): 853-860.
- [8] Benjamin C, Onyeagucha M, Mercado-Pimentel J, et al. S100P/RAGE signaling regulates microRNA-155 expression via AP-1 activation in colon cancer[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(13): 2081-2090.

- [9] 冯莉,范志松,常靓,等. miRNA-141 在老年直肠癌患者中的表达及其与临床病理特征的关系[J].中国老年学杂志,2016,36(18):4498-4500.
- [10] 姜训刚,赵科,何向辉. miRNA-21、miRNA-135b、miRNA-141 在结肠癌中的表达及其意义[J].中国普通外科杂志,2014,31(10):175-176.
- [11] 冯君兰,汪昱.血液 miRNA 检测在结直肠癌诊断、预后及化疗疗效评估中的应用进展[J].山东医药,2015,8(11):98-100.
- [12] 马一楠,金迎迎,王亚利,等. miR-141 表达抑制增强结肠癌细胞对 5-Fu 药物敏感性的研究[J].山西医科大学学报,2016,47(6):510-517.

(收稿日期:2017-02-11 修回日期:2017-04-11)