

80例结肠癌患者血浆、组织中 microRNA 100/200c 表达水平与临床病理的相关性

Correlation Between Clinical Pathology and Expression Levels of MicroRNA 100/200c in Plasma and Tissues of Patients with Colon Cancer // CHEN Qing-ming, ZHANG Jie-min, LIU Cui-yan, et al.

陈庆明, 张洁民, 刘翠燕, 高 林

(武威市人民医院, 甘肃 武威 733000)

摘 要: [目的] 研究结肠癌患者血浆、组织中小分子非编码 RNA (microRNA, miRNA) 100/200c 表达水平与临床病理的相关性。[方法] 用实时定量 PCR 方法测定确诊为结肠癌的 80 例患者血浆 miRNA 100、结肠癌组织中 miRNA 200c 表达水平并与其在正常人群血浆及癌旁正常组织中的表达进行比较。[结果] 结肠癌患者血浆中 miRNA 100 的表达水平显著性低于正常人群 ($P=0.014$), 结肠癌组织中 miRNA 200c 表达量显著性低于癌旁正常组织 ($P=0.0002$); 结肠癌患者血浆中 miRNA 100 相对表达量与肿瘤分化程度、发生转移、临床分期显著性相关 ($P<0.05$), 且 miRNA 100 表达高低与患者的肿瘤直径、临床分期、淋巴结转移相关 ($P<0.05$); 结肠癌组织中 miRNA 200c 表达量与发生转移、临床分期显著性相关 ($P<0.05$), miRNA2000 表达高低与肿瘤直径大小相关 ($P<0.05$)。[结论] 与在正常组织或血浆中相比, miRNA 100/200c 在结肠癌中表达量降低, 与肿瘤远处转移、淋巴结转移、临床分期等病理参数密切相关。

关键词: 结肠肿瘤; microRNA; 临床病理学

中图分类号: R735.3*5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2017)05-0417-03

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.05.B012

随着社会环境、生活方式(饮食习惯, 缺乏运动)的改变, 结肠癌的发病率和死亡率均呈上升趋势, 发病率和死亡率均高于世界平均水平^[1,2]。小分子非编码 RNA (microRNA, miRNA) 即一类不参与蛋白质编码的短序列 RNA (≤ 40 nt)。MiRNA 参与细胞增殖、分化、合成代谢等一系列生命活动的调控过程, 有研究报道 miRNA 的表达异常可能与癌症的发生息息相关^[3]。本研究旨在分别探究结肠癌患者血浆中 miRNA100 表达水平及组织中 miRNA 200c 表达水平与其临床病理之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集武威市人民医院 2014 年 2 月至 2016 年 2 月收治的 80 例经外科手术切除并经病理确诊为结肠癌的癌组织及距结肠癌远端至少 5cm 的癌旁组

织。80 例患者中男性 47 例, 女性 33 例, 平均年龄 59.8 ± 4.4 岁; 原发部位: 左半结肠 39 例, 右半结肠癌 41 例; 肿瘤 < 5 cm 54 例, ≥ 5 cm 26 例; T_1+T_2 12 例, T_3+T_4 68 例; 低分化 15 例, 高分化 65 例; 有远处转移 8 例; 有淋巴结转移 42 例。TNM 分期参考美国癌症联合委员会(AJCC)的结肠癌分期系统, I~II 期 44 例, III~IV 期 36 例。另选取 20 名年龄、性别相匹配的, 同期在我院进行体检的人群为正常对照组。

1.2 纳入、排除标准

纳入标准: ①所有病例在术前均未进行放疗、化疗等干扰实验结果的治疗方式。②病例资料完整, 均与家属签署知情同意书。该研究获得医院伦理委员会批准。排除标准: 不符合纳入标准的均予以排除。

1.3 方 法

所有患者均在行外科切除术前采集静脉血 5.0ml 左右, 抗凝, 离心后收集上层血浆; 正常对照组采取同样的方法获得血浆, 于 -80°C 冰箱保存。获取的组织标本立即放于液氮保存, 采用 RT-PCR 检测结肠癌组织或癌旁正常组织中 miRNA 200c 表达水平。

采用 mir-Vana miRNA 分离提取试剂盒 (mir-

通讯作者: 陈庆明, 副主任医师, 学士; 甘肃省武威市人民医院病理科, 甘肃省武威市凉州区新城区宣武街北侧 (733000); E-mail: cqm.ww@163.com

收稿日期: 2016-10-26; **修回日期:** 2016-11-28

Table 1 RT-PCR primer sequence and annealing temperature

Items	RT primer	Upstream primer	Downstream primer	Annealing temperature (°C)
MiRNA100	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-TTCGCACTGGATACGACCAAGT-3'	5'-GCTCTGAACCCGT-AGA CC-GAAC-3'	5'-GTGCAGGGTCCGAG-GT-3'	60
MiRNA200c	5'-TCGTATCCAGTGCCTGTCTGAGTCGG-CAATTGCACTGG ATACG ACTCCATC-3'	5'-GGTAATACTGCCG-GGTAAT-3'	5'-CAGTGCCTGTCTGTG-GA - GT-3'	60
U6	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'	5'-GCTTCGGCAGCAC-ATATA-CTAAAAT-3'	5'- CGCTTCACGAATTT-GCGTGTTCAT-3'	60

Vana miRNA isolation kit,上海艾博思生物技术有限公司)提取血浆、组织中总 RNA,具体操作步骤严格按照试剂盒说明。紫外检测所提取的 RNA 浓度及纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.8~2.1)。

逆转录反应体系为 20 μl,用 Takara 公司试剂盒进行逆转录。

进行 RT-PCR 所需引物相应序列及退火温度如表 1(Table 1)所示。结肠癌患者血浆、癌组织及癌旁正常组织 cDNA 的合成与扩增严格遵守 Takara 操作说明。miRNA 的相对表达量以 U6 为内参,以公式(2^{-ΔΔCt})进行计算,该计算值与基因表达量呈正比。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件,计数资料用卡方检验进行分析,计量资料采用独立样本 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结肠癌患者血浆 miRNA 100、组织 miRNA 200c 表达水平

经 RT-PCR 检测发现,结肠癌患者血浆中 miRNA 100 的相对表达量显著性低于正常人群 (0.40±0.11 vs 0.77±0.21,P=0.014),结肠癌组织中 miRNA200c 相对表达量显著性低于癌旁正常组织 (1.24±0.63 vs 1.87±0.71,P=0.0002)。

2.2 不同临床病理特征患者血浆 miRNA 100、组织 miRNA 200c 表达水平

肿瘤分化程度低、远处转移、淋巴结转移、Ⅲ~Ⅳ的结肠癌患者血浆中 miRNA 100 相对表达量显著性低于高分化、未发生转移和 I~Ⅱ期的患者 (P<

Table 2 The expression of miRNA 100/200c in patients with different clinical pathological features

Clinical pathological feature	N	MiRNA100	P	MiRNA200c	P
Tumor size (cm)					
<5	54	0.37±0.10	0.436	1.29±0.81	0.510
≥5	26	0.44±0.17		1.71±2.43	
Depth of infiltration					
T ₁ ~T ₂	12	0.44±0.21	0.634	1.82±1.50	0.502
T ₃ ~T ₄	68	0.41±0.13		1.36±1.17	
Tumor differentiation					
Low	15	0.31±0.17	0.031	2.09±1.34	0.572
High	65	0.43±0.15		1.70±0.95	
Distant metastasis					
Yes	8	0.20±0.07	0.017	0.71±0.21	0.049
No	72	0.43±0.15		1.60±0.72	
Lymph node metastasis					
Yes	42	0.32±0.10	0.029	1.23±0.14	0.044
No	38	0.47±0.19		1.63±0.13	
TNM stage					
I~Ⅱ	44	0.46±0.15	0.035	1.60±0.62	0.043
Ⅲ~Ⅳ	36	0.31±0.09		1.26±0.84	

0.05);miRNA 200c 相对表达量在已发生转移、临床分期为Ⅲ、Ⅳ期的患者的结肠癌组织中显著较低 (P<0.05)(Table 2)。

2.3 结肠癌患者血浆 miRNA 100、组织 miRNA 200c 表达高低与临床病理特征的关系

分别以 miRNA 100、miRNA 200c 相对表达量的中位数为界分为高表达和低表达,miRNA 100 表达高低与患者的肿瘤直径、临床分期、淋巴结转移相关 (P<0.05),与浸润深度和远处转移无明显相关性 (P>0.05);miRNA 200c 表达高低与患者的肿瘤直径相关 (P<0.05),但与浸润深度、肿瘤远处转移、淋巴结转移、临床分期均无明显关系 (P>0.05)(Table 3)。

3 讨 论

miRNA 是细胞内巨大复杂的基因调控网络中

Table 3 Relationship between clinicopathology and miRNA 100/200c

Clinical pathological feature	N	MiRNA100		P	MiRNA 200c		P
		High	Low		High	Low	
Tumor size (cm)							
<5	54	28	26	0.027	31	23	0.033
≥5	26	8	18		10	16	
Depth of infiltration							
T ₁ ~T ₂	12	4	8	0.174	7	5	0.531
T ₃ ~T ₄	68	27	41		34	34	
Distant metastasis							
Yes	8	3	5	0.851	2	6	0.279
No	72	36	36		39	33	
Lymph node metastasis							
Yes	42	21	21	0.007	22	20	0.671
No	38	13	25		19	19	
TNM stages							
I ~ II	44	23	21	0.049	23	21	0.873
III ~ IV	36	13	23		19	17	

不可分割的一部分,研究报道 miRNA 在转录后可调控超过人类 1/3 的基因^[4],广泛参与细胞的生理及病理过程。已有研究证实,多种 miRNA 的异常表达与肿瘤的发生、转移、恶化过程存在密切联系。

本研究通过分析结肠癌患者血浆及组织中 miRNA 100/200c 的表达水平与患者临床病理参数之间的关系,也进一步证实 miRNA 100/200c 异常表达与结肠癌密切相关。研究发现:结肠癌患者血浆中 miRNA 100 表达水平显著性低于健康人群,结肠癌组织中 miRNA 200c 的表达量显著性低于癌旁组织;不同肿瘤分期、肿瘤分化程度及转移与否的患者血浆 miRNA 100 相对表达量均存在显著性差异,且 miRNA 100 表达高低与患者的肿瘤直径、临床分期、淋巴结转移相关;miRNA 200c 的相对表达量与远处转移、淋巴结转移、肿瘤分期密切相关,且 miRNA 200c 表达高低与结肠癌患者肿瘤直径相关。该结果与其他文献的报道一致^[5,6]。

MiRNA 100 是在 2002 年由 Mourelatos 等^[7]发现的大小为 22 个核苷酸的 miRNA,近年的研究表明其为双向 miRNA,其既可以表现为抑癌因子又可表现为促癌因子。在宫颈癌、肺癌、乳腺癌及卵巢癌等肿瘤组织中 miRNA 100 显著低表达^[8,9],可通过碱基互补配对与癌基因 mRNA 的编码区结合,抑制后者的翻译或直接对其产生降解作用,进而抑制癌基因的表达。另外,马明等^[10]通过体外实验发现上调 miRNA 100 可靶向抑制结肠癌 HT-29 细胞的增殖

能力,促进其凋亡。本研究结果发现 miRNA 200c 表达与肿瘤远处转移、淋巴结转移有关,然而我们并未发现其表达水平高低与肿瘤远处转移、淋巴结转移有关,分析原因可能是由于样本量较小而造成的,后期还需扩大样本量继续研究。

综上所述,miRNA 100/200c 可能作为抑癌基因存在于结肠癌发展过程中,与正常组织或血浆相比其表达量降低,且与肿瘤远处转移、淋巴结转移、临床分期等病理参数密切相关。

参考文献:

- [1] Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates[J]. Cancer, 2010, 116(3):544–573.
- [2] Chen Q, Lin ZC, Cheng LP, et al. An analysis of incidence and mortality of colorectal cancer in China, 2003–2007[J]. China Cancer, 2012, 21(3):179–182.[陈琼, 刘志才, 程兰平, 等. 2003~2007 年中国结直肠癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(3):179–182.]
- [3] Shen JW, Kang JH. Advances in short-chain non-coding RNA research [J]. Journal of Tongji University (Medical Science), 2011, 32(1):105–110.[沈君炜, 康九红. 短链非编码 RNA 的研究进展 [J]. 同济大学学报 (医学版), 2011, 32(1):105–110.]
- [4] 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.
- [5] Chen P, Xi Q, Wang Q, et al. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer[J]. Med Oncol, 2014, 31(10):1–6.
- [6] Meng LK, Zhong XL, Pan Q, et al. Clinicopathological significance of quantitative expression of miR-200c/141 in colon carcinoma tissue[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2015, 40(12):987–992.[孟令宽, 钟小莉, 潘琼, 等. 结肠癌组织 miR-200c/141 定量表达的临床病理学意义[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(12):987–992.]
- [7] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. Genes Dev, 2002, 16(6):720–728.
- [8] Chen P, Zhao X, Liang M. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 383(1–2):49–58.
- [9] Li C, Gao Y, Zhang K, et al. Multiple roles of microRNA-100 in human cancer and its therapeutic potential[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(6):2143–2159.
- [10] Ma M, Jing GJ, Fu LY. The effect of up-regulating microRNA-100 in colon cancer HT-29 cells on proliferation and apoptosis [J]. Modern Oncology, 2016, 24 (7):1031–1033.[马明, 金国江, 付立业. 上调 microRNA-100 对结肠癌 HT-29 细胞增殖和侵袭的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(7):1031–1033.]