

血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 在结肠癌中的表达及其临床意义

田雯, 陈珑, 马艳华, 李妮, 董春燕

(海南省第三人民医院, 海南 三亚 572000)

摘要: [目的] 探讨结肠癌患者血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 的表达及其临床意义。[方法] 选取收治的 160 例结肠癌患者(结肠癌组)、108 例结肠良性病变(良性病变组)和 60 例健康体检正常者(对照组), 检测各组血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平, 分析其表达与临床病理特征的关系。应用 ROC 曲线分析血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平对结肠癌的诊断价值。Pearson 相关分析血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平的相关性。[结果] 结肠癌组血清 miR-221-3p (3.94 ± 1.08) 表达水平明显高于良性病变组和对照组 (1.51 ± 0.43 , 1.42 ± 0.36) (P 均 < 0.001), 结肠癌组血清 miR-133a-3p 表达水平 (1.85 ± 0.62) 明显低于良性病变组和对照组 (3.18 ± 0.86 , 3.27 ± 0.94) (P 均 < 0.001)。结肠癌患者血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平与 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示, 血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平诊断结肠癌的最佳截断值分别为 2.90、2.26, 两项联合诊断结肠癌的曲线下面积最大 (0.905 , $95\% \text{CI}: 0.844 \sim 0.962$), 其敏感性和特异度为 90.2% 和 84.5% 。相关分析显示结肠癌患者血清 miR-24-3p 与 miR-221 表达水平呈负相关 ($r = -0.742$, $P < 0.01$)。[结论] 结肠癌患者血清 miR-221-3p 表达水平明显升高, 而血清 miR-133a-3p 表达水平明显降低, 两项联合检测对结肠癌诊断具有一定的价值。

关键词: 结肠肿瘤; miR-221-3p; miR-133a-3p; 诊断

中图分类号: R735.3⁵ **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)02-0123-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.02.B009

Expression of Serum miR-221-3p and miR-133a-3p in Patients with Colon Cancer and Its Clinical Significance

TIAN Wen, CHEN Long, MA Yan-hua, LI Ni, DONG Chun-yan

(Third People's Hospital of Hainan Province, Sanya 572000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and clinical significance of serum miR-221-3p and miR-133a-3p in patients with colon cancer. [Methods] One hundred and sixty patients with colon cancer (colon cancer group), 108 patients with benign colon disease (benign lesion group) and 60 healthy subjects (control group) were recruited. The serum miR-221-3p and miR-133a-3p levels were detected by RT-PCR, and their relationship with clinicopathological characteristics were analyzed. The diagnostic value of serum miR-221-3p and miR-133a-3p in colon cancer were analyzed by ROC curve. The correlation between the expression levels of serum miR-221-3p and miR-133a-3p was analyzed by Pearson correlation. [Results] The expression level of serum miR-221-3p in colon cancer group (3.94 ± 1.08) was significantly higher than that in benign lesion group and control group (1.51 ± 0.43 , 1.42 ± 0.36) (all $P < 0.001$). The expression level of serum miR-133a-3p in colon cancer group (1.85 ± 0.62) was significantly lower than that in benign lesion group and control group (3.18 ± 0.86 , 3.27 ± 0.94) (all $P < 0.001$). The expression levels of serum miR-221-3p and miR-133a-3p in patients with colon cancer were correlated with TNM stage, differentiation degree and lymph node metastasis ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the optimal cut-off values of serum levels of miR-221-3p and miR-133a-3p for diagnosis of colon cancer were 2.90 and 2.26, respectively. The area under the curve (AUC) of two combined diagnostic methods for colon cancer was the largest (0.905 , $95\% \text{CI}: 0.844 \sim 0.962$), with sensitivity and specificity of 90.2% and 84.5% , respectively. The correlation analysis showed that the serum levels of miR-221-3p and miR-133a-3p were negatively correlated in patients with colon cancer ($r = -0.742$, $P < 0.01$). [Conclusion] The expression of serum miR-221-3p is increased in patients with colon cancer, while the expression of serum miR-133a-3p is decreased. The combined detection of miR-221-3p and miR-133a-3p is of value in the diagnosis of colon cancer.

Subject words: colon cancer; miR-221-3p; miR-133a-3p; clinical significance; diagnosis

结肠癌是临床上常见的消化道恶性肿瘤之一,

多发于乙状结肠与直肠交汇处, 以男性居多, 其在全球范围内的发病率和病死率呈现升高, 对人类生命健康造成极大的威胁^[1]。结肠癌早期症状不典型, 早期诊断较困难, 大部分患者一经发现即为中晚期, 预

通信作者: 田雯, 主治医师, 学士; 海南省第三人民医院肿瘤内科, 海南省三亚市解放四路 1154 号 (572000); E-mail: zzw19790606@163.com

收稿日期: 2019-05-22; **修回日期:** 2019-08-07

后较差。因而,寻找一种早期诊断结肠癌的生物学标志物显得尤为重要。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)作为一种内源性、非编码小分子 RNA,参与细胞增殖、分化、凋亡和新陈代谢等过程,在多种恶性肿瘤的发生发展中起重要作用^[2-3]。近年来研究发现,miR-221-3p 及 miR-133a-3p 在胃肠道肿瘤中异常表达,参与胃肠道肿瘤的发生发展,有望作为胃肠道肿瘤早期诊断及预后评估的生物学指标^[4-5]。但 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 能否成为诊断结肠癌的新型生物学标志物目前尚未明确。本研究通过分析结肠癌患者血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平与临床病理指标的关系,探讨 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 对结肠癌诊断的价值,旨在为结肠癌的诊断及靶向治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月至 2018 年 12 月海南省第三人民医院肿瘤内科收治的结肠癌患者 160 例(结肠癌组),其中男性 87 例,女性 73 例,年龄 33~79 (57.24±8.15)岁。纳入标准:(1)经消化内镜组织病理活检确诊结肠癌;(2)未经过手术切除及放疗、化疗等治疗;(3)能配合本次研究及病历资料完整者。排除标准:(1)放弃治疗,不愿参与本项研究者;(2)合并其他恶性肿瘤,血液系统疾病、免疫系统疾病及严重肝肾疾病者。160 例结肠癌 TNM 分期 I~II 期 52 例,III~IV 期 108 例;高分化癌 55 例,中低分化癌 105 例;有淋巴结转移 51 例,无淋巴结转移 109 例。选取 108 例结肠良性疾病(结肠息肉 32 例、慢性特异性肠炎 28 例、纤维瘤 26 例、血管瘤 22 例)作为良性病变组,其中男性 63 例,女性 45 例,年龄 28~76 (55.80±9.20)岁。另选取同期来我院健康体检者 60 例作为对照组,男性 36 例,女性 24 例,年龄 30~75 岁(56.30±8.40)岁。三组间一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经我院伦理委员会批准,并与患者或家属签署知情同意书。

1.2 检测方法

1.2.1 引物设计与合成

miR-221-3p 引物:上游:5'-AGACCTGATACTGAGTGAAG-3',下游:5'-GACGTGAGATCGCATAG-3';

miR-133a-3p 引物:上游:5'-GATTATCCGATGACTCGTAG-3',下游:5'-AGTTGACATGATTATGCG-3'。

1.2.2 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 检测

所有患者均于清晨抽取空腹静脉血 5ml 置于未加抗凝剂的肝素离心管中,于室温 2500 r/min 离心 15min,吸取上层血清 400 μ l,加入 1ml 提取剂(Trizol),于-70℃保存。按照总 RNA 快速提取试剂盒说明书从中提取总 RNA。在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain react, RT-PCR)。以 U6 为内参,miRNA 逆转录反应体系 15 μ l: 5 μ l RNA 模板,3 μ l U6 及 miRNA 特异性茎环引物,0.15 μ l 100mmol/L 脱氧核糖核苷酸(dNTPs),1.00 μ l 逆转录酶 (50U/ μ l),10 $\times$ 反转录缓冲液 1.50 μ l,0.19 μ l RNase 抑制剂(20U/ μ l),4.16 μ l 无菌三蒸水。反应条件:16℃ 30min、42℃ 30min、85℃ 5min。扩增反应体系为 20 μ l:1 μ l 引物及探针 Mix (20 $\times$),10 μ l TaqMan 通用混合物溶液 (2 $\times$),1.33 μ l 反转录产物 cDNA,7.67 μ l 无核酸酶的水。扩增条件:95℃预变性 10min,95℃变性 15s,60℃复性 60s 进行 45 个循环。每个反应体系中荧光信号达到设定阈值所经历的循环数即为 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 的相对表达水平,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{U6}$ 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验;两独立样本均数的比较采用成组 t 检验。绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)分析血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平对结肠癌的诊断价值,曲线下面积(area under curve, AUC)比较采用 Z 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 各组血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平比较

结肠癌组血清 miR-221-3p 表达水平明显高于良性病变组和对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);而结肠癌组血清 miR-133a-3p 表达水平明显低于良

性病变组和对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。良性病变组血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平与对照组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$) (Table 1)。

2.2 结肠癌患者血清 miR-221-3p、miR-133a-3p 表达水平与临床病理特征的关系

结肠癌患者血清 miR-221-3p 和 miR-133a-3p 表达水平与 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移有关 ($P<0.05$),而与性别、年龄、病理类型、原发部位、分化程度、肿瘤大小、脉管浸润及浸润深度无关 ($P>0.05$) (Table 2)。

2.3 血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 水平对结肠癌的诊断价值

血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 水平诊断结

Table 1 Comparison of serum levels of miR-221-3p and miR-133a-3p in each group

Group	n	miR-221-3p	miR-133a-3p
Control group	60	1.42±0.36	3.27±0.94
Benign lesion group	108	1.51±0.43	3.18±0.86
Colon cancer group	160	3.94±1.08 ^{ab}	1.85±0.62 ^{ab}
F	—	9.247	8.409
P	—	<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, ^a $P<0.01$; compared with the benign lesion group, ^b $P<0.01$.

肠癌的最佳截断值分别为 2.90、2.26。两项联合诊断结肠癌的 AUC 为 0.905 (95%CI:0.844~0.962),显著高于单项 miR-221-3p (0.816, 95%CI:0.759~0.877) 及 miR-133a-3p (0.783, 95%CI:0.728~0.839), 差异均有统计学意义 ($Z=5.613, 6.102, P$ 均<0.05) (Figure

1); 联合诊断的敏感度和特异性分别为 90.2% 和 84.5% (Table 3)。

2.4 血清 miR-221-3p 与 miR-133a-3p 表达水平的相关性分析

Pearson 相关分析显示, 结肠癌患者血清 miR-221-3p 与 miR-133a-3p 表达水平呈负相关 ($r=-0.742, P<0.01$) (Figure 2)。良性病变组和对照组血清 miR-221-3p 与 miR-133a-3p 水平均无明显相关性 ($r=-0.164, -0.107, P$ 均>0.05)。

3 讨论

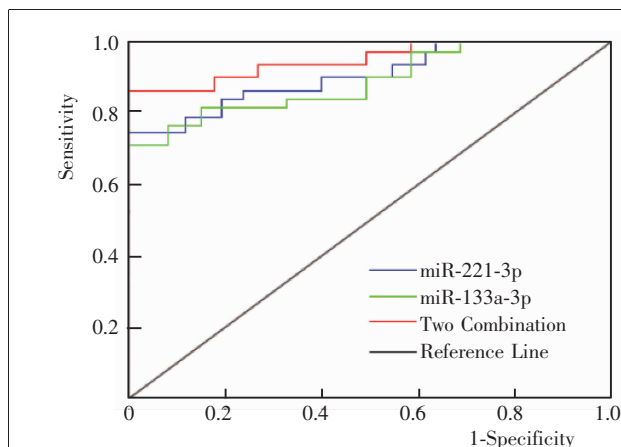
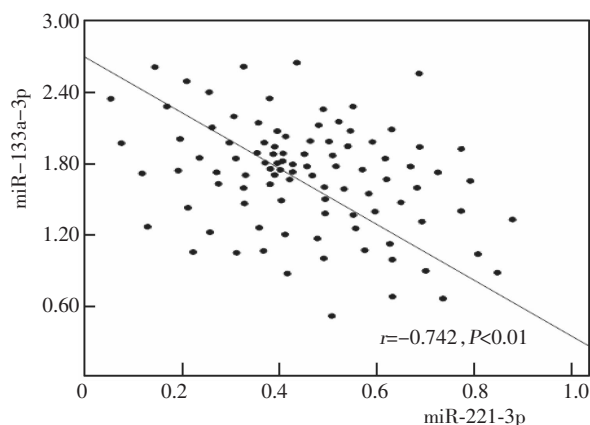
结肠癌是发生于结肠部位的消化系常见恶性肿瘤,其发病隐匿且早期诊断困难,大多数患者诊断时已处于进展期,延误了治疗的最佳时机。因而,寻找一种能早期、准确诊断结肠癌的生物学

Table 2 The relationship between serum levels of miR-221-3p and miR-133a-3p and clinicopathological features in patients with colon cancer

Index	n	miR-221-3p	t	P	miR-133a-3p	t	P
Gender			0.436	0.602		0.397	0.625
Male	87	4.05±1.12			1.90±0.64		
Female	73	3.82±1.04			1.82±0.57		
Age (years)			0.408	0.619		0.352	0.643
<60	101	3.87±1.06			1.88±0.63		
≥60	59	4.02±1.15			1.80±0.58		
Pathological types			0.658	0.437		0.596	0.471
Canal adenocarcinoma	118	3.84±1.03			1.91±0.67		
Mucinous adenocarcinoma	42	4.10±1.21			1.78±0.56		
TNM staging			5.718	<0.001		5.327	<0.001
I ~ II	52	2.63±0.84			2.90±0.81		
III ~ IV	108	5.37±1.72			1.16±0.24		
Primary site			0.264	0.712		0.305	0.680
Left colon	89	3.97±1.10			1.89±0.66		
Right colon	71	3.90±1.07			1.80±0.57		
Degree of differentiation			4.813	0.012		4.648	0.026
Highly differentiated	58	2.75±0.90			2.84±0.79		
Medium to low differentiation	102	5.28±1.68			1.21±0.30		
Tumor size(cm)			0.764	0.328		0.421	0.613
<5	72	3.81±1.02			1.81±0.60		
≥5	88	4.10±1.21			1.87±0.65		
Lymph node metastasis			6.215	<0.001		5.804	<0.001
Yes	50	5.40±1.81			1.12±0.20		
No	110	2.58±0.73			3.04±0.84		
Vascular invasion			1.607	0.115		1.426	0.184
Yes	63	4.16±1.25			1.76±0.53		
No	97	3.75±0.96			1.94±0.70		
Infiltration depth			0.927	0.218		0.835	0.336
T ₁ ~T ₂	24	3.85±1.06			1.92±0.75		
T ₃ ~T ₄	136	4.12±1.20			1.80±0.61		

Table 3 Diagnostic value of serum levels of miR-221-3p and miR-133a-3p in colon cancer

Index	Optimum truncation value	AUC(95%CI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)	Positive likelihood ratio	Negative likelihood ratio	Yoden index
miR-221-3p	2.90	0.816(0.759~0.877)	82.4	78.0	81.3	79.6	3.745	0.226	0.604
miR-133a-3p	2.26	0.783(0.728~0.839)	79.6	76.4	78.5	77.3	3.373	0.267	0.560
Two Combination	—	0.905(0.844~0.962)	90.2	84.5	87.3	88.6	5.819	0.116	0.747

**Figure 1** ROC curve of serum levels of miR-221-3p and miR-133a-3p in diagnosis of colon cancer**Figure 2** The correlation between serum miR-221-3p and miR-133a-3p levels in colon cancer

指标显得尤为重要。miRNA 作为一类内源性表达的非编码小分子 RNA, 主要通过和靶基因 3' 端非编码区的 mRNA 结合而抑制转录进而影响基因的表达, 参与调控细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和分化等过程, 在恶性肿瘤的发生发展中发挥着重要作用^[6]。有研究表明, miRNA 在结肠癌中异常表达, 与结肠癌的发生、发展、转移及预后密切相关, 可作为结肠癌早期诊断和预后判断的新型标志物^[7]。近年来研究证实, miR-221-3p 及 miR-133a-3p 可以通过多种信号通路在恶性肿瘤的发生发展、侵袭、转移及耐药等病理过程中发挥重要作用, 有可能为恶性肿瘤的诊断、治疗和预后判断提供新的靶点和思路^[8-9]。Li 等^[10] 研究显示, miR-221-3p 在胰腺癌中明显上调, 且与患者的远处转移和 TNM 分期相关, 可作为判断胰腺癌病情进展的生物学标志物。Li 等^[11] 研究发现, miR-133a-3p 的异常表达与消化道肿瘤的分化程度和淋巴结转移有关, 可作为一种新的潜在的消化道肿瘤诊断生物标志物。

本研究显示, 结肠癌组血清 miR-221-3p 表达水平明显高于良性病变组和对照组, 血清 miR-133a-3p 表达水平明显低于良性病变组和对照组, 而良性病变组血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平与

对照组比较差异均无统计学意义。提示血清 miR-221-3p 高表达及 miR-133a-3p 低表达可能参与结肠癌的发生发展。本研究显示随着分化程度越来越差、淋巴结转移及 TNM 分期越高, 结肠癌患者血清 miR-221-3p 表达水平明显升高及 miR-133a-3p 表达水平明显下降, 提示血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平与结肠癌较差的临床病理特征有关。分析其原因可能是临床病理特征较差的结肠癌患者病情进展较快, 肿瘤负荷往往较大, 肿瘤组织可抑制更多的抑癌基因进入血液, 同时可促进癌基因表达, 进而导致机体 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 异常表达。Hu 等^[12] 研究发现, miRNA 表达水平与结肠癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移、脉管浸润及远处转移均显著相关, 提示其可能参与了结肠癌的发生发展。Zhang 等^[13] 研究表明, miRNA 表达水平在结肠癌患者中显著升高, 可作为结肠癌患者病情进展和预后评估的潜在生物标志物。

本研究应用 ROC 曲线分析显示, 血清 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达水平诊断结肠癌的最佳截断值分别为 2.90、2.26, 两项联合诊断结肠癌的曲线下面积最大, 其敏感度和特异性较高。相关分析显示, 结肠癌患者血清 miR-221-3p 与 miR-133a-3p 表达

水平呈负相关。这说明 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 可作为诊断结肠癌的非侵入性生物学标志物, 两项联合检测有助于提高诊断结肠癌的敏感度和特异性。Wang 等^[14] 研究显示, 与正常黏膜相比, miR-133a-3p 在腺瘤和癌组织中均显著下调, miR-133a-3p 可作为结直肠癌早期筛查的生物学指标。Tao 等^[15] 研究表明, 高水平的 miR-221-3p 与结肠癌患者较差的生存时间显著相关 (HR=2.416, 95%CI: 1.314~4.445), 检测 miR-221-3p 表达水平可以帮助医生更好地预测结肠癌的预后和指导治疗决策。亦有研究认为, miRNA 表达水平在结肠癌患者中显著升高, 参与了结肠癌的发生和发展, 可能是结肠癌的诊断和预后生物标志物, 并可成为潜在的临床治疗靶点^[16]。

综上所述, 结肠癌患者血清 miR-221-3p 表达水平明显升高, 而血清 miR-133a-3p 表达水平明显降低, 且与 TNM 分期、分化程度及淋巴结转移有关, 有望作为诊断结肠癌的新型生物学标志物, 两项联合检测对结肠癌诊断具有较高的价值。但 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 在结肠癌的研究尚处于初步探索阶段, 且本研究为单中心研究, 有关 miR-221-3p 及 miR-133a-3p 表达异常在结肠癌发生发展中的作用机制及其对结肠癌的诊断价值仍需大样本、多中心的临床试验进一步证实。

参考文献:

- [1] Daly MC, Paquette IM. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) and SEER-Medicare databases; use in clinical research for improving colorectal cancer outcomes[J]. Clin Colon Rectal Surg, 2019, 32(1): 61-68.
- [2] Pereira AL, Magalhães L, Moreira FC, et al. Epigenetic field cancerization in gastric cancer; microRNAs as promising biomarkers[J]. J Cancer, 2019, 10(6): 1560-1569.
- [3] Hao S, Huo S, Du Z, et al. MicroRNA-related transcription factor regulatory networks in human colorectal cancer[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(15): e15158.
- [4] Shi J, Zhang Y, Jin N, et al. MicroRNA-221-3p plays an oncogenic role in gastric carcinoma by inhibiting PTEN expression[J]. Oncol Res, 2017, 25(4): 523-536.
- [5] Zhou GQ, Han F, Shi ZL, et al. miR-133a-3p targets SUMO-specific protease 1 to inhibit cell proliferation and cell cycle progress in colorectal cancer[J]. Oncol Res, 2018, 26(5): 795-800.
- [6] Moustafa AA, Kim H, Albeltagy RS, et al. MicroRNAs in prostate cancer: from function to biomarker discovery[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(10): 817-825.
- [7] Xie B, Zhao R, Bai B, et al. Identification of key tumorigenesis-related genes and their microRNAs in colon cancer[J]. Oncol Rep, 2018, 40(6): 3551-3560.
- [8] Wu Q, Ren X, Zhang Y, et al. MiR-221-3p targets ARF4 and inhibits the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 497(4): 1162-1170.
- [9] Yin Y, Du L, Li X, et al. miR-133a-3p suppresses cell proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12757-12770.
- [10] Li F, Xu JW, Wang L, et al. MicroRNA-221-3p is up-regulated and serves as a potential biomarker in pancreatic cancer [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(3): 482-487.
- [11] Li CY, Liang GY, Yao WZ, et al. Identification and functional characterization of microRNAs reveal a potential role in gastric cancer progression [J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(2): 162-172.
- [12] Hu Y, Yi B, He S, et al. Clinical significance of miR-1826 as a novel prognostic biomarker in colorectal cancer[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2016, 16(9): 1109-1116.
- [13] Zhang H, Wang Z, Ma R, et al. MicroRNAs as biomarkers for the progression and prognosis of colon carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4): 2080-2088.
- [14] Wang X, Chen L, Jin H, et al. Screening miRNAs for early diagnosis of colorectal cancer by small RNA deep sequencing and evaluation in a Chinese patient population [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9(3): 1159-66.
- [15] Tao K, Yang J, Guo Z, et al. Prognostic value of miR-221-3p, miR-342-3p and miR-491-5p expression in colon cancer[J]. Am J Transl Res, 2014, 6(4): 391-401.
- [16] Hosseini M, Khatamianfar S, Hassanian SM, et al. Exosome-encapsulated microRNAs as potential circulating biomarkers in colon cancer [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(11): 1705-1709.