

结直肠癌中microRNA-625表达的临床意义

刘楠启, 孟胜男, 刘莹

■背景资料

结直肠癌发病率及死亡率在近几十年间快速升高, 肿瘤进展决定在很大程度上决定了患者的预后生存时间, 特异性标志物的确定有助于肿瘤的治疗及预后的评估, miRNA-625即是本研究待确定的标志物。

刘楠启, 刘莹, 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001

孟胜男, 中国医科大学药学院药剂教研室 辽宁省沈阳市 110001

刘楠启, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81173123

作者贡献分布: 课题设计与试剂提供由刘莹与孟胜男完成; 研究过程、数据分析及论文写作由刘楠启完成。

通讯作者: 刘莹, 副教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学生物化学与分子生物学教研室。

yingliucmu@gmail.com

电话: 024-23256666

收稿日期: 2013-08-10 修回日期: 2013-09-16

接受日期: 2013-09-20 在线出版日期: 2013-10-18

Clinical significance of microRNA-625 expression in colorectal cancer

Nan-Qi Liu, Sheng-Nan Meng, Ying Liu

Nan-Qi Liu, Ying Liu, Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Sheng-Nan Meng, Department of Pharmaceutics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81173123

Correspondence to: Ying Liu, Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, 92 Beier Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yingliucmu@gmail.com

Received: 2013-08-10 Revised: 2013-09-16

Accepted: 2013-09-20 Published online: 2013-10-18

Abstract

AIM: To analyze the association of expression of microRNA-625 (miR-625) with clinicopathological characteristics and survival in patients with colorectal cancer (CRC).

METHODS: The expression level of miR-625 was determined by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) in 78 human colorectal cancer tissue specimens and matched tumor-adjacent colorectal tissue specimens. The association of miR-625 expression with clinicopathological characteristics and survival in CRC patients was then analyzed.

RESULTS: Compared with tumor-adjacent normal mucosal specimens, miR-625 was significantly down-regulated in CRC tissue specimens (2.748 vs 0.769, $P = 0.021$). MiR-625 expression was decreased in CRC cell lines HCT116 and SW480 compared with Caco-2 cell line, which has a lower metastatic potential (0.634, 0.941 vs 2.048, both $P < 0.05$). Lower expression of miR-625 was positively associated with advanced lymph node metastasis, liver metastasis and overall survival (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Our results suggest that miR-625 may serve as an efficient clinical biomarker and a potential therapeutic target for the inhibition of metastasis in CRC.

© 2013 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: miR-625; Colorectal cancer; qRT-PCR

Liu NQ, Meng SN, Liu Y. Clinical significance of microRNA-625 expression in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(29): 3158-3162 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3158.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i29.3158>

摘要

目的: 了解microRNA-625(miR-625)在结直肠癌组织中的表达情况及其与肿瘤临床病理参数及生存率的相关性。

方法: 应用定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术检测78对结直肠癌及癌旁正常组织以及结直肠癌细胞系中miR-625的表达, 统计学分析其表达水平与肿瘤临床病理参数及生存率的关系。

结果: 结直肠癌组织及癌旁正常黏膜组织中miR-625表达水平分别为 0.769 ± 0.372 和 2.748 ± 0.923 , 癌组织中表达显著下调, $P = 0.021$ 。结直肠癌细胞系HCT、SW480中miR-625表达水平分别为0.634和0.941, 表达水平与低转移潜能细胞系Caco-2中表达水平具显著差异, $P < 0.05$ 。

■同行评议者

刘炳亚, 研究员, 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海消化外科研究所

miR-625的低表达与晚期淋巴结转移, 肝转移密切相关, P 值均 <0.05 。随访数据提示miR-625低表达结直肠癌患者5年生存率较低。

结论: 结直肠癌组织及肿瘤细胞系中miR-625低表达, 其低表达与结直肠癌侵袭转移密切相关, 且提示较差的预后。

© 2013年版权归归世登出版集团有限公

关键词: miR-625; 结直肠癌; qRT-PCR

核心提示: 应用定量PCR的方法检测结直肠癌肿瘤组织及对应癌旁组织以及3种肿瘤细胞系中miR-625的表达, 研究结果提示miR-625的下调与肿瘤的侵袭转移特性密切相关, 且低表达导致更差的预后。

刘楠启, 孟胜男, 刘莹. 结直肠癌中microRNA-625表达的临床意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(29): 3158-3162 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/3158.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i29.3158>

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一, 最近几十年间其发病率和死亡率显著升高^[1]。目前, 尽管外科手术技术和药物化疗手段均有了长足的进步, 结直肠癌患者的5年生存率依然主要取决于肿瘤的进展^[2]。因此, 寻找肿瘤特异性生物学标记分子以期达到检测肿瘤治疗效果及预测肿瘤预后成为目前研究的重点。

MicroRNA(miRNA)是一类小分子量, 内源性非编码的RNA分子, 广泛存在于真核生物中, 进化上相对保守, miRNA通过降解mRNA或抑制翻译达到转录后调控目的基因表达的功能^[3]。近来研究证实miRNA可起到肿瘤抑制因子或原癌基因的作用, 在多种肿瘤生物和病理学进程中发挥重要作用。异常的miRNA表达可能成为恶性肿瘤诊断和预后的潜在标志物^[4]。

研究发现miR-625在多种肿瘤中异常表达^[5,6], 目前国内尚没有miR-625与结直肠癌相关性方面的报道, 本研究旨在了解结直肠癌组织及肿瘤细胞系中miR-625表达情况, 并研究其表达与肿瘤临床病理参数以及生存率的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-01/2007-08在本院胃肠外科接受手术治疗的78例结直肠癌患者, 其中男42例, 女36例, 年龄62岁 \pm 10.23岁, 所有病例术前均未行放

疗或化疗, 术后经病理确诊, 详细临床病理参数如表1所示。同时收集距肿瘤边缘 >10 cm的78例癌旁正常组织作为对照。所有受试对象均参加每3月一次的随访计划, 随访采用电话随访的方式与患者或家属取得联系, 计算平均生存期和生存率。标本的制备与分析获得本院伦理委员会批准并在委员会监督下进行, 所有受试对象均知情同意。本研究选取SW480、HCT116和Caco-2 3种结直肠癌细胞系, 使用包含血清的培养基, 37 °C, 50 mL/L CO₂条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取: 细胞系及石蜡包埋组织样本的总RNA提取使用TRIzol(Invitrogen公司)试剂和RecoverAll全核酸提取试剂盒(ABI公司)。所得RNA经紫外分光光度计检测260 nm波长处的光密度值, 计算RNA浓度。 $A_{260/280}$ 决定RNA纯度, 比值在1.8-2.1之间说明质量较好。RNA样本立即放入-80 °C冰箱保存或者立即进行逆转录。

1.2.2 定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析miRNA-625的表达: 取包含miRNA的RNA样本40-500 ng, 先经多聚腺苷酸聚合酶加poly A, 继而应用One Step PrimeScript miRNA cDNA合成试剂盒(TAKARA公司)行逆转录得到cDNA。定量PCR反应使用SYBR Premix Ex Taq试剂盒, 应用Primer Premier 6.0自行设计miRNA特异性上游引物, 下游引物试剂盒提供。使用U6作为内参照, 两者上游引物序列如下: 5'-CCAGGGGAAAGTTCTATAGTCC-3'(miR-625)和5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'(U6)。相对表达量以U6 snRNA的表达量为标准, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析。

统计学处理 数据分析采用SPSS17.0软件包, 计量资料以mean \pm SD表示, miR-625表达量比较采用配对资料 t 检验, 生存分析应用Kaplan-Meier法, 生存率比较采用Log-rank检验。所有检验结果以 $P<0.05$ 为差异具统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌、癌旁正常组织以及细胞系中miR-625表达结果 定量PCR反应扩增产物特异, 无引物二聚体或其他非特异性产物, 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算得出, miR-625在结直肠癌组织和正常组织中的相对表达量分别为 (0.769 ± 0.372) 和 (2.748 ± 0.923) , 差异具有统计学意义($P=0.021$)。此外, 3种CRC细胞系检测结果显示, HCT116、

■研发前沿

目前国内外研究者报道多种miRNA在众多肿瘤组织及细胞系中的表达情况, 亟待解决miRNA发挥作用的具体机制。

■ 相关报道

Wang等研究者发现miR-625在胃癌中表达显著下调, 体内体外实验均提示miR-625具有抑制肿瘤侵袭及转移的能力, 且提出整合素偶联激酶(integrin linked kinase, ILK)是miR-625作用靶点. Korpai等研究发现miR-200家族成员具有抑制肿瘤细胞迁移和上皮间质转化的能力, 其作用靶点为ZEB1和ZEB2.

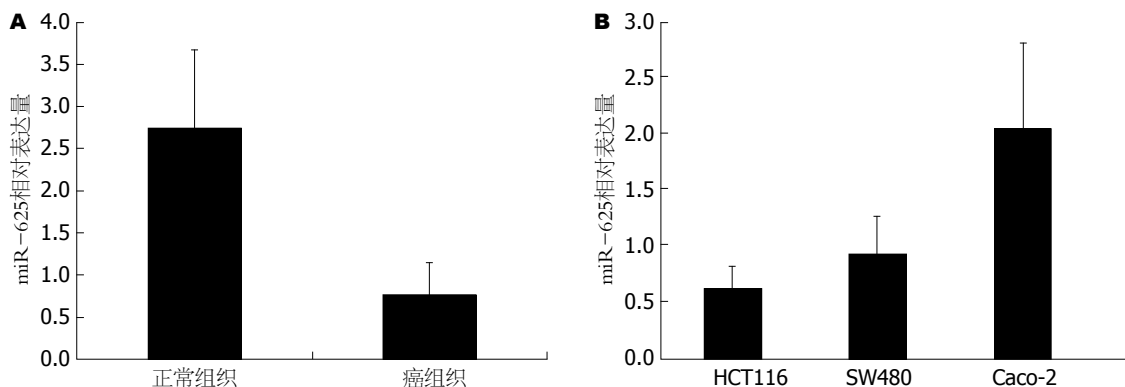


图1 结直肠癌组织与癌旁正常组织中以及细胞系中miR-625表达水平. A: 癌组织与癌旁正常组织miR-625表达水平对比; B: HCT116、SW480及Caco-2细胞系miR-625表达水平.

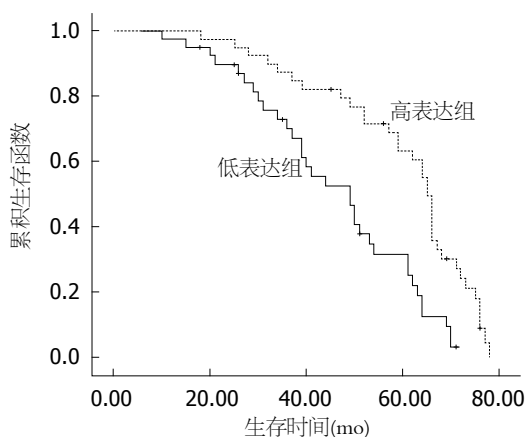


图2 结直肠癌患者miR-625高表达组及低表达组生存曲线.

SW480中miR-625表达水平显著低于低转移潜能的Caco-2细胞系, $P < 0.05$ (图1).

2.2 miR-625表达与肿瘤临床病理参数相关性分析 结直肠癌78例患者miR-625表达水平与肿瘤病理参数分析结果显示, 其低表达与肿瘤淋巴结及肝脏转移情况密切相关, 具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表2).

2.3 miR-625表达水平与患者生存时间的关系 miR-625表达与患者预后的关系 78例结直肠癌患者依照miR-625表达水平的均值0.769分为高表达组和低表达组, 每组均39例. 低表达组5年生存率25.6%, 平均生存时间46.025 mo \pm 2.781 mo (95%CI: 40.575-51.475), 高表达组5年生存率59.0%, 生存时间59.863 mo (95%CI: 54.718-65.009), 生存曲线如图2所示.

3 讨论

结直肠癌是目前发病率增长最快的恶性肿瘤之一, 预后不佳严重影响患者生活质量. 近年来, 遗传因素在结直肠癌发生、发展过程中所起到

表1 结直肠癌患者病理资料(n)

病理参数	n
性别	
男	42
女	36
年龄(岁)	
<60	18
≥ 60	60
肿瘤直径(cm)	
<5	40
≥ 5	38
分化程度	
高-中分化	55
低中分化	23
转移情况	
淋巴结转移N0	43
淋巴结转移 N1-N2	35
肝转移	67
无肝转移	11

的作用越来越引起研究者的重视^[7]. 为了最终达到改进临床治疗策略, 改善疾病治疗效果, 非常有必要确定新的结直肠癌诊断、预后以及治疗的分子靶点. 研究发现, 一些miRNA在结直肠癌组织中表达异常^[8-10], 这些小分子量的非编码核苷酸序列可能在肿瘤发生发展过程中发挥肿瘤抑制因子的作用, 这一结果提示对于结直肠癌, miRNA可能作为其诊断和预后的分子标志物.

目前虽有许多人类肿瘤组织中一些miRNA的表达水平的研究^[11,12], 但少见miRNA表达与肿瘤分期分级相关分析, 国内未见miR-625与结直肠癌之间相关性的研究, 此外本研究应用敏感性更高的定量分析手段检测miR-625在结直肠癌组织及细胞系中的表达情况, 并进一步分析

表 2 miR-625表达与结直肠癌临床病理参数的关系

病理参数	n	miR-625表达量	P值
淋巴结转移			0.024
N0	43	1.373 ± 0.673	
N1-N2	35	0.642 ± 0.212	
肝转移			0.015
存在	67	0.723 ± 0.326	
不存在	11	1.543 ± 0.534	

其表达水平与临床病理参数的相关性以及与生存率的关系。

本研究发现, 对比正常癌旁组织和转移潜能相对较低的细胞系, 结直肠癌组织和高转移潜能肿瘤细胞系中miR-625表达水平明显下降, 研究结果与胃癌、乳腺癌及急性淋巴细胞白血病等肿瘤中的研究结果相一致。此外, 统计分析结果显示, miR-625的低表达与结直肠癌的转移特性密切相关, 包括淋巴结转移以及肝脏转移。病例组中, 表达水平相对较高的39例患者有着更高的5年生存率和中位生存时间。依据所得结果, 我们推断miR-625表达下调是影响结直肠癌预后重要的分子机制, 其下调可能参与结直肠癌转移过程。

近年来, miRNA引起了众多学者的关注, 近期更是在肿瘤组织中频发miRNA的异常表达。目前, 已有千余miRNA被发现, 这类保守的非编码小分子在肿瘤发生发展中的作用可能包括: miRNA具有调控特异性mRNA表达的功能, 通过降解目的mRNA或是抑制其翻译达到下调特定基因表达的功能, 目前研究的多数肿瘤组织中miRNA均呈现低表达, 提示miRNA发挥抑制肿瘤发生发展的作用^[13,14]; miRNA可能参与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程, EMT是人体器官发育的正常生理过程, 他赋予细胞侵袭和转移能力, miRNA可负性调控EMT相关基因的表达^[15,16], 使得肿瘤细胞获得更强的侵袭力和转移能力, 这与本研究得出结果相一致。病例组中, miR-625表达量相对较低的患者因肿瘤的转移力更强, 淋巴结及肝脏的转移可能在一定程度上影响了患者的生存率。

尽管本研究纳入足够的样本数量, 为了明确证实miR-625是结直肠癌特异标志物, 还需要大规模的前瞻性研究。此外, 还需要更加深入的机制研究来揭示结直肠癌发生发展过程中miR-625的下调是如何影响到肿瘤的侵袭与转移功能。

总之, 结直肠癌和高转移潜能的细胞系中miR-625表达下调, 其低表达与肿瘤的转移密切相关并导致较差的预后。结果提示miR-625可能成为潜在的结直肠癌转移力特异标志物及治疗靶点。

4 参考文献

- Yeoh KG, Ho KY, Chiu HM, Zhu F, Ching JY, Wu DC, Matsuda T, Byeon JS, Lee SK, Goh KL, Sollano J, Rerknimitr R, Leong R, Tsoi K, Lin JT, Sung JJ. The Asia-Pacific Colorectal Screening score: a validated tool that stratifies risk for colorectal advanced neoplasia in asymptomatic Asian subjects. *Gut* 2011; 60: 1236-1241 [PMID: 21402615 DOI: 10.1136/gut.2010.221168]
- Weeks JC, Catalano PJ, Cronin A, Finkelman MD, Mack JW, Keating NL, Schrag D. Patients' expectations about effects of chemotherapy for advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 367: 1616-1625 [PMID: 23094723 DOI: 10.1056/NEJMoa1204410]
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell* 2003; 113: 25-36 [PMID: 12679032]
- Farazi TA, Spitzer JJ, Morozov P, Tuschli T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011; 223: 102-115 [PMID: 21125669 DOI: 10.1002/path.2806]
- Wang M, Li C, Nie H, Lv X, Qu Y, Yu B, Su L, Li J, Chen X, Ju J, Yu Y, Yan M, Gu Q, Zhu Z, Liu B. Down-regulated miR-625 suppresses invasion and metastasis of gastric cancer by targeting ILK. *FEBS Lett* 2012; 586: 2382-2388 [PMID: 22677169 DOI: 10.1016/j.febslet.2012.05.050]
- Si H, Sun X, Chen Y, Cao Y, Chen S, Wang H, Hu C. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 223-229 [PMID: 23052693 DOI: 10.1007/s00432-012-1315-y]
- Dutilh BE, Backus L, van Hijum SA, Tjalsma H. Screening metatranscriptomes for toxin genes as functional drivers of human colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013; 27: 85-99 [PMID: 23768555 DOI: 10.1016/j.bpg.2013.03.008]
- Zhang Y, Wang X, Xu B, Wang B, Wang Z, Liang Y, Zhou J, Hu J, Jiang B. Epigenetic silencing of miR-126 contributes to tumor invasion and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2013; 30: 1976-1984 [PMID: 23900443 DOI: 10.3892/or.2013.2633]
- Mlcochova J, Faltejskova P, Nemecek R, Svoboda M, Slaby O. MicroRNAs targeting EGFR signaling pathway in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 1615-1624 [PMID: 23817698 DOI: 10.1007/s00432-013-1470-9]
- Karaayvaz M, Zhai H, Ju J. miR-129 promotes apoptosis and enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2013; 4: e659 [PMID: 23744359 DOI: 10.1038/cddis.2013.193]
- 张子兰, 贾筱琴. miRNA在肝癌发生与转移中的研究进展. *现代肿瘤医学* 2013; 21: 887-891
- 刘志鹏, 王宗华, 卢斌, 胡春燕, 李学成, 邹利全, 张方征, 陈陵. 腺病毒介导miRNA-29a过表达抑制人胃癌细胞的增殖. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2013; 20: 312-316

■创新盘点

肿瘤细胞中miR-NA表达情况比较复杂, 有些上调, 有些则表达下调, 目前国内尚无结直肠癌中miR625表达研究报道。

■同行评价

本文检测78例结肠直肠癌肿瘤组织及其对应癌旁组织中miR-625的表达,并分析了miR-625表达与结肠癌患者的临床病理参数的关系,表明肿瘤组织中miR625表达与患者生存期相关,与肿瘤是否伴有淋巴结以及肝转移相关。

- 13 Wuchty S, Arjona D, Bauer PO. Important miRs of pathways in different tumor types. *PLoS Comput Biol* 2013; 9: e1002883 [PMID: 23358700 DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002883]
- 14 Druz A, Chen YC, Guha R, Betenbaugh M, Martin SE, Shiloach J. Large-scale screening identifies a novel microRNA, miR-15a-3p, which induces apoptosis in human cancer cell lines. *RNA Biol* 2013; 10: 287-300 [PMID: 23353574 DOI: 10.4161/rna.23339]
- 15 Korpai M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; 283: 14910-14914 [PMID: 18411277 DOI: 10.1074/jbc.C800074200]
- 16 Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008; 22: 894-907 [PMID: 18381893 DOI: 10.1101/gad.1640608]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology], 是一本由来自国内30个省、市、自治区、特别行政区的483位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志,旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章,使其成为一种公众资源,同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文,了解其领域的所有的关键的进展,更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务,为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外,《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾,即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲,包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤,食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学,以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章,为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台,更新知识,为患者康复服务。