



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.027
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4084.shtml

· 简要论著 ·

直肠癌中差异表达的 microRNA 及其与预后因子的关系

赵本和

(山东潍坊市市立医院 普通外科, 山东 潍坊 261000)

摘要

目的: 检测直肠癌组织中差异表达的 microRNA (miRNA), 并分析其与预后因子的关系。

方法: 选 20 例直肠癌患者手术所得癌组织标本与癌旁组织, 用 q-PCR 方法筛选在癌组织与癌旁组织中有差异表达的 miRNA 以及相关的预后因子。

结果: 筛选得到 26 个在直肠癌组织中有差异表达的 miRNA, 其中 15 个 miRNA 表达上调, 11 个表达下调。相关分析显示, 下调的 miR-4770、miR-4790-5p 与 CK20 表达呈负相关; 上调的 miR-182、miR-125a-5p、miR-126 与 p53 表达呈正相关、miR-143 和 k-ras 呈负相关、miR-9 与 vilin 基因呈负相关 (均 $P < 0.05$)。

结论: 直肠癌组织中差异表达的 miRNA 与预后因子密切相关, 可作为直肠癌诊断或预后判断的生物标记。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1437-1439]

关键词

直肠肿瘤; 微 RNAs; 基因表达调控

中图分类号: R735.3

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是长度约 19~25 个核苷酸的高度保守的小片段非编码 RNA, 能够与靶 mRNA 的 3' 非转译区区碱基不完全或完全配对, 并在转录后水平通过降解靶 mRNA 或抑制翻译过程而发挥负调控基因表达的过程^[1], 与细胞的分化、增殖、凋亡密切相关^[2]。直肠癌是我国危害极大的恶性肿瘤之一, 发病率高且呈现出居高不下的趋势。同时, 有研究^[3-5]表明 miRNA 对直肠癌疾病的发生起着重要的影响。本研究通过筛选直肠癌组织与癌旁正常组织中具有表达差异的 miRNA, 并分析筛选出的 miRNA 与直肠癌患者预后基因的关系, 以期对肠癌肿瘤诊断和预后评价标志物提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所收集的标本取自于 2012 年 9 月—

2013 年 9 月潍坊市市立医院普通外科直肠癌切除手术的 20 例患者。取手术中癌组织和癌旁组织作为标本。所有患者经手术病理诊断证实为直肠癌, 术前均未接受化疗、放疗及其关于对肿瘤的特殊治疗。术中切除原发灶后即刻取癌组织, 所取癌旁组织距离肿瘤边缘相距至少 2 cm。收集均征得患者本人的知情同意。其中男 12 例, 女 8 例。临床病理分期诊断分为 I~IV 期。其中 I 期患者 1 例, II 期患者 8 例, III 期患者 10 例, IV 期患者 1 例。检测所用的试剂盒及芯片购自广州复能基因有限公司。

1.2 方法

使用 TRIzol 常规方法抽提组织中 RNA, 采用琼脂糖凝胶电泳判断 RNA 完整性, 根据 A_{260}/A_{280} 判断 RNA 纯度, 只有 $28\text{ S}/18\text{ S} \geq 2.0$ 且 A_{260}/A_{280} 为 1.9~2.1 为合格 RNA。miRNA 的 cDNA 合成采用特异性茎环引物, 反转录相关操作按照试剂盒说明书操作。q-PCR 严格按试剂盒操作说明进行, PCR 反应条件: 95 °C 变 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火和延伸 60 s, 共 40 个循环。检测 20 对组织中全基因组芯片上差异表达的 miRNA, 并检测所筛选的 miRNA 与直肠癌预后相关的指标血管内皮生长因子 (VEGF)^[6-7]、细胞角蛋白 20

收稿日期: 2014-04-28; 修订日期: 2014-09-08。

作者简介: 赵本和, 山东潍坊市市立医院副主任医师, 主要从事腹部肿瘤方面的研究。

通信作者: 赵本和, Email: zhaobenhe1212@163.com

(CK20)^[8]、p53^[9]、k-ras^[10]、vilin 的关系，获得数据为反应结束后计算后的各反应管内的 Ct 值， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量差异表达倍数。采用 U6 做参考基因， $\Delta Ct = Ct_{gene} - Ct_{U6}$ ， $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (瘤组织) - ΔCt (正常组织)。

1.3 统计学处理

应用 dchip 软件分析不同样本和不同 miRNA 之间的聚集性^[11]。实时荧光定量 PCR 检测结果采用 SPSS 19.0 软件分析，数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，在差值数据符合正态分布下组间比较采用配对 t 检验，miRNA 与临床指标间的相关分析采用 Spearman 秩相关分析。

2 结 果

2.1 基因芯片结果筛选及聚类分析

根据 20 例直肠癌患者检测结果数据进行分析。在 $P < 0.05$ 的条件下，共筛选出 96 个直肠癌组织特异性表达的 miRNA，其中 29 个 miRNA 在患者癌组织表达上调，67 个 miRNA 表达下调。进一步提高筛选条件，从 96 个基因中选择 26 个相对定量变化 > 1.6 倍且 $P < 0.01$ 的条件的 miRNA，其中 15 个 miRNA 表达上调，11 个表达下调。配对 t 检验结果表明，26 个 miRNA 中，以 miR-1、miR-145、miR-4799-5p、miR-4790-5p 在癌组织与癌旁组织中的差异最大 (表 1-2)。

采用 dchip 软件进行聚类分析，聚类分析的结果表明，miRNA 可以分为三大类，hsa-miR-143、hsa-miR-99a、hsa-miR-99b、hsa-miR-363 为一大类；hsa-miR-4510、hsa-miR-22* 等其余 11 个基因在瘤组织中的相对表达量变化相似；其余为第三类 (图 1)。同时，20 名患者中，8 个属于临床 II 期直肠癌患者的基因相对表达量总体差异最小。所有个体距离较近，说明患者基因检测水平离散度很小。

2.2 差异表达的 miRNA 与预后因子的关系

VEGF、CK20、p53、k-ras、vilin 在癌组织与癌旁组织表达的检测数据如下 (表 3)。

相关分析显示，下调的 miR-4770、miR-4790-5p 与 CK20 呈负相关；上调的 miR-182、miR-125a-5p、miR-126 与 p53 表达呈正相关；上调的 miR-143 和 k-ras 呈负相关；上调 miR-9 与 vilin 基因呈负相关 (均 $P < 0.05$) (表 4)。

表 1 15 个相对表达量上调的 miRNA

miRNA	倍比变化	P
hsa-miR-1	90.41698	0.001
hsa-miR-145	40.98817	0.001
hsa-miR-96	33.85144	0.001
hsa-miR-137	22.04425	0.001
hsa-miR-99b	16.73723	<0.001
hsa-miR-99a	8.614205	<0.001
hsa-miR-143	8.329618	0.001
hsa-miR-9	5.714397	<0.001
hsa-miR-125a-5p	5.287096	<0.001
hsa-miR-363	4.493856	<0.001
hsa-miR-100	4.000224	0.001
hsa-miR-125b	3.78075	0.001
hsa-miR-451	2.730915	0.001
hsa-miR-126	1.729297	0.001
hsa-miR-182	1.616387	0.001

表 2 11 个相对表达量下调的 miRNA

miRNA	倍比变化	P
hsa-miR-22*	0.284998	0.001
hsa-miR-4510	0.274703	0.001
hsa-miR-378i	0.272766	0.001
hsa-miR-4443	0.272763	0.001
hsa-miR-4469	0.267141	0.001
hsa-miR-4684-3p	0.261747	<0.001
hsa-miR-4699-5p	0.257632	<0.001
hsa-miR-4668-5p	0.241748	<0.001
hsa-miR-4770	0.231409	<0.001
hsa-miR-4790-5p	0.201019	<0.001
hsa-miR-4799-5p	0.192587	<0.001

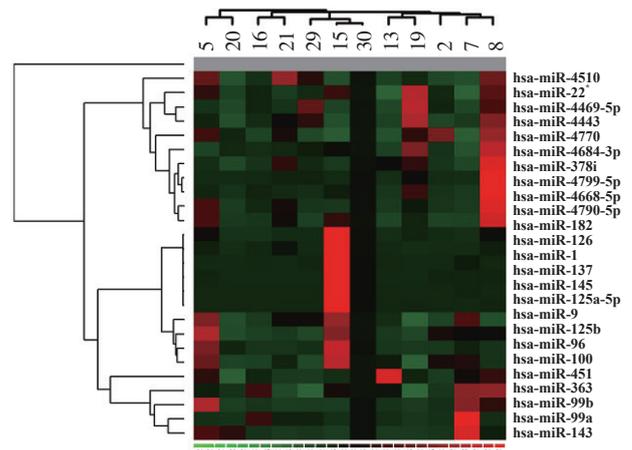


图 1 个体直肠组织中 miRNA 的聚类图

表 3 各预后因子在直肠癌组织及癌旁组织中的差异表达情况

因子	倍比变化	P
VEGF	40.41248	0.006
CK20	16.23657	0.032
p53	12.1340	0.011
k-ras	9.06932	0.001
vilin	6.73463	<0.001

表 4 CK20、p53 与部分微小 RNA 的相关性分析

mRNA	miRNA	相关系数	P
CK20	miR-4770	-0.610	0.046
	miR-4790-5p	-0.627	0.039
p53	miR-182	0.671	0.024
	miR-125a-5p	0.695	0.002
	miR-126	0.893	0.000
k-ras	miR-143	-0.645	0.032
VEGF	miR-4770	-0.821	0.008
vilin	miR-9	-0.793	0.000

3 讨 论

由于 miRNA 在人类与靶基因的作用方式为不完全结合, 对靶基因发挥负性调控作用, 且分子只有 22 nt 左右, 理论上 miRNA 的靶基因很多, 但准确预测特定的 miRNA 仍较困难。本研究应用芯片技术在直肠癌及正常直肠组织中筛选出表达上调或下调的 miRNA, 讨论了成对的肿瘤和正常直肠组织的 miRNA 及部分基因表达与直肠癌的临床诊断的关系问题。选择只有一小部分的 miRNA, 在本研究中, 通过实时定量 PCR 实验这种技术初步筛选出 96 个 miRNA 差异表达。

本文主要集中在比较癌组织与癌旁组织的 miRNA 表达量以期达到预测诊断能力。同时, 分析临床预后密切相关的 miRNA 是通过相关的 miRNA 的表达与肿瘤亚型或临床参数的相关关系来衡量的。本研究分析了 20 例患者的新鲜组织标本, 差异表达的 26 个 miRNA 中, miR-1、miR-145、miR-4799-5p、miR-4790-5p 在两组间的差异较大, miR-182、miR-22* 的两组差异较小。说明这些 miRNA 有可能成为诊断的分子靶标发现。

已有研究^[7-8]表明 CK20 的表达与淋巴转移相关, 本资料与预后因子的相关分析显示, miR-4770、miR-4790-5p 与 CK20 的表达呈高度负相关; miR-182、miR-125a-5p、miR-126 与 p53 表达呈正相关; miR-143 和 k-ras 呈负相关; miR-9 与 vilin 基因呈负相关。其他差异表达的 miRNA 与本研究的预后因子未发现有关关系, 故有必要对其功能靶基因作进一步的研究。

本文筛选了直肠癌患者癌组织和正常组织具有差异表达的 miRNA, 并找出了部分基因与预后因子的关系, 为进一步直肠癌肿瘤诊断和预后评价标志物提供依据。但其靶基因仍需要更大样本

的验证, miRNA 在直肠癌中的作用机制尚待阐明。相信随着各方面研究的深入和技术的不断进步, miRNA 将在直肠癌的早期有效诊治方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] 陈军莹. miRNA 在肿瘤研究中的进展 [J]. 重庆医学, 2010, 39(22):3035-3038.
- [2] 王科明, 沈群. MicroRNAs 相关的胃癌研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(3):612-614.
- [3] Toyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, et al. MicroRNAs as non-invasive biomarkers for colorectal cancer: review[J]. Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 2014, 111(3):482-494.
- [4] Stiegelbauer V, Perakis S, Deutsch A, et al. MicroRNAs as novel predictive biomarkers and therapeutic targets in colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(33):11727-11735.
- [5] Schee K, Fodstad , Flatmark K. MicroRNAs as biomarkers in colorectal cancer[J]. Am J Pathol, 2010, 177(4):1592-1599.
- [6] Rautenberg T, Siebert U, Arnold D, et al. Economic outcomes of sequences which include monoclonal antibodies against vascular endothelial growth factor and/or epidermal growth factor receptor for the treatment of unresectable metastatic colorectal cancer[J]. J Med Econ, 2014, 17(2):99-110.
- [7] 李林海, 刘辉, 江明万, 等. 结肠癌患者外周血 VEGF-C 和 CK20 mRNA 的表达与淋巴转移的关系 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(2):126-128.
- [8] 李鹏, 张岳枫, 文善云. 结直肠癌患者外周血和淋巴结 CK20 检测的临床意义 [J]. 中南医学科学杂志, 2007, (2):230-234.
- [9] De Oliveira LP, Lopez I, Dos Santos EM, et al. Association of the p53 codon 72 polymorphism with clinicopathological characteristics of colorectal cancer through mRNA analysis[J]. Oncol Rep, 2014, 31(3):1396-1406.
- [10] Dobre M, Com nescu M, Arsene D, et al. K-ras gene mutation status in colorectal cancer: comparative analysis of pyrosequencing and PCR-RFLP[J]. Rom J Morphol Embryol, 2013, 54(3):567-574.
- [11] Corradi L, Fato M, Porro I, et al. A Web-based and Grid-enabled dChip version for the analysis of large sets of gene expression data[J]. BMC Bioinformatics 2008, 9:480. doi: 10.1186/1471-2105-9-480.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 赵本和. 直肠癌中差异表达的 microRNA 及其与预后因子的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1437-1439. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.027

Cite this article as: ZHAO BH. Different expressions of microRNA in rectal cancer and the relationship to prognostic factors [J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(10):1437-1439. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.027