

结肠癌患者手术前后血浆miR-21表达水平变化及其临床意义



刘洁¹, 彭微¹, 吴稚晖², 刘怀¹, 宋海鹏¹, 邓征浩³, 徐筱红¹

Plasma miR-21 Expression in Colon Cancer Patients Before and After Operation and Its Clinical Significance

LIU Jie¹, PENG Wei¹, WU Zhihui², LIU Huai¹, SONG Haipeng¹, DENG Zhenghao³, XU Xiaohong¹

1. Department of Basic Medical, Hu'nan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412000, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, The Central Hospital of Zhuzhou City, Zhuzhou 412000, China; 3. Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410000, China

Abstract: Objective To investigate the expression of plasma miR-21 in patients with colon carcinoma before and after operation and its clinical significance. **Methods** The plasma miR-21 expression and its relationship with clinical pathological parameters were measured by quantitative real-time PCR(qRT-PCR). In addition, the expression levels of plasma miR-21 in colon cancer patients were measured one week before operation, one week and one month after the operation. **Results** The plasma miR-21 expression in 40 colon cancer patients before operation had significant difference compared with control group($P<0.05$), related to the degree of tumor differentiation, clinical stage, lymph node metastasis and distant metastasis($P<0.05$), but age or sex($P>0.05$). The plasma miR-21 expression one week and one month after the operation were significantly decreased, compared with that before operation($P<0.05$). **Conclusion** The plasma miR-21 expression may be used as a potential biomarker for colon cancer, to be a new effective auxiliary method for the diagnosis and prognosis of colon cancer patients.

Key words: miR-21; Colon cancer; Quantitative real-time PCR(qRT-PCR)

摘要: 目的 探讨结肠癌患者手术前后血浆miR-21表达水平变化及其临床意义。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应法(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测结肠癌患者与健康对照组血浆中miR-21的表达情况, 以及与临床病理参数的关系; 另外检测结肠癌患者手术前一周、手术后一周和术后一月血浆中miR-21的表达水平变化。**结果** 40例结肠癌患者手术前血浆中miR-21表达水平较对照组差异具有统计学意义($P<0.05$); 并与肿瘤的分化程度、临床分期、淋巴结转移及远处转移有关($P<0.05$), 而与年龄和性别无相关性($P>0.05$); 与术前相比, 术后一周和一月血浆中miR-21的表达明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 结肠癌患者血浆中miR-21的表达情况, 可作为结肠癌潜在的生物标志物, 有望成为一种新的有效辅助诊断结肠癌及判断预后的方法。

关键词: miR-21; 结肠癌; 实时荧光定量聚合酶链反应法

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A

0 引言

结肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 在我国其发病率与死亡率有逐年上升的趋势, 严重危害人们的健康与生命。微小RNA(microR-

NAs, miRNAs)是内源性的非编码小RNA, 对基因表达进行转录后的负向调控, 大量研究证明miRNA与多种肿瘤的发生发展存在密切关系。miR-21在多种肿瘤中的表达均出现显著异常, 揭示它作为一个致癌miRNA, 在肿瘤的发生和发展中起着重要的作用。多项研究表明miR-21在大肠癌组织中表达上调, 恶性程度越高的癌组织中表达量越高。孙建斌等^[1]研究发现大肠癌组与良性大肠疾病组和健康对照组血浆miR-21表达差异具有

收稿日期: 2014-09-09; 修回日期: 2015-04-18

基金项目: 湖南省卫生厅科研基金课题(B2013-067)

作者单位: 1. 412000 株洲, 湖南中医药高等专科学校基础医学部; 2. 412000 株洲, 株洲市中心医院心胸外科; 3. 410000 长沙, 中南大学湘雅医学院病理学系

作者简介: 刘洁(1981-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事消化道肿瘤分子病理研究

统计学意义。国外多项研究提示^[2-3]结肠癌患者组织中miR-21高表达,与临床分期、淋巴结转移及远处转移相关。本实验用实时荧光定量方法对结肠癌患者术前一、术后一周、术后一月血浆中miR-21表达进行动态检测,并观察其表达与肿瘤的分化程度、TNM分期、淋巴结转移和远处转移是否有关系。本研究旨在揭示结肠癌患者血浆中miR-21的表达情况,提示其检测可成为有效的辅助诊断结肠癌及判断其预后的分子标志。

1 资料与方法

1.1 资料

收集株洲市中心医院和湘雅医院经病理诊断为结肠癌的40例患者临床资料,术前均未接受过放化疗及细胞分子靶向治疗。其中男23例、女17例;年龄30~80岁(平均年龄56.14岁)。高分化腺癌10例、中分化16例、低分化14例;TNM分期:I期6例、II期18例、III期11例、IV期5例;有淋巴结转移24例、无淋巴结转移16例;远处转移5例、无远处转移35例。另采集20例健康志愿者外周血标本作为阴性对照。血液标本的采集均获得患者及健康志愿者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血浆标本的处理 抽取20例健康志愿者和40例结肠癌患者手术前一周清晨空腹时外周静脉血5 ml,手术后一周和一月后再次抽取,抽取后加入EDTA抗凝剂,在常温下4 h内处理。血标本在4℃下1 200 g离心10 min,用1.5 ml无核糖核酸酶(RNase)的离心管分装血浆和血细胞,-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 血浆总RNA的提取 每份血标本取400 μl血浆移至另一干净的1.5 ml EP管中,提取RNA前再次离心,离心条件:1 200 g,4℃ 10 min。收集血浆至另一新的EP管中。加入TRIzol试剂,与管中血浆的比例为1:0.8(V:V)。充分混匀,放置冰上15 min,1 200 g,4℃离心10 min,取上清液。用核酸蛋白仪测定RNA的浓度和纯度。

1.2.3 血浆miR-21检测 检测方法为荧光定量PCR法,利用两步法对miR-21进行检测,按照上海吉玛制药技术有限公司Hairpin-it™ miRNAs qPCR Quantitation Kit试剂盒说明进行反转录反应。荧光定量PCR,对目的miRNAs使用一般通用的反转录条件进行转录。95℃ 30 s、95℃ 10 s、55℃ 15 s、72℃ 20 s,循环40次,所有标本检测3次,扩增U6作为内参基因。

1.3 统计学方法

采用SPSS15.0统计软件进行处理。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示miR-21的表达量,表达水平用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示。术前、术后一周、术后一月miR-21的表达水平采用配对t检验,miR-21与结肠癌临床病理特征之间的相关性采用独立样本t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术前miR-21在结肠癌患者与健康对照组血浆中的表达比较结果

qRT-PCR检测结果显示40例结肠癌患者术前血浆中miR-21的表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 结肠癌患者与健康对照组血浆中miR-21的表达水平分析 ($\bar{x}\pm s$)

Table1 Plasma miR-21 expression in colon cancer patients and healthy controls ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Expression of miR-21	P
Healthy control	0.98±0.032	
Colon cancer	8.34±1.932	0.026

Notes: $P<0.05$, healthy control group vs. colon cancer group

2.2 miR-21在40例结肠癌手术患者血浆中的动态变化

qRT-PCR检测miR-21在40例结肠癌患者手术前一周、手术后一周和术后一月血浆中的表达,结果显示与术前相比,术后一周和一月血浆中miR-21的表达明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表2。miR-21的下降水平以手术后第一周最为明显,术后一周至术后一月下降较缓慢。

表2 miR-21在术前一、术后一周和术后一月相对表达值配对比较分析 ($n=40$)

Table2 Comparison of miR-21 expression one week before operation, one week and one month after operation ($n=40$)

Time	$\bar{x}\pm s$	t	P
One month after operation vs. one week before operation	-6.16±1.322	-29.471	0.022
One week after operation vs. one week before operation	-4.60±1.564	-18.602	0.034
One month after operation vs. one week after operation	-1.56±0.987	-9.994	0.064

2.3 miR-21的表达与临床病理参数的关系。

qRT-PCR检测miR-21在40例结肠癌患者手术前一周的表达与肿瘤的分化程度、临床分期、淋巴结转移及远处转移有关,而与年龄、性别无相关性,见表3。

表3 miR-21的表达与各临床病理参数的关系

Table3 Relationship between miR-21 expression and clinicopathological parameters

Clinical data	n	Expression of miR-21 ($\bar{x} \pm s$)	P
Age(years)			0.338
≥50	28	8.80±1.817	
<50	12	7.76±1.641	
Gender			0.502
Male	23	8.57±1.357	
Female	17	8.13±1.418	
Differentiated degree			
Well	10	4.69±1.234	0.032*
Moderate	16	8.61±1.270	
Poor	14	15.29±1.419	0.041**
Clinical stages			0.027
I - II	24	5.47±1.336	
III - IV	16	14.38±1.273	
Lymphatic metastasis			0.030
No	25	6.01±1.337	
Yes	15	14.94±1.148	
Distant metastasis			0.044
No	35	7.25±1.279	
Yes	5	16.29±1.429	

Notes: *: comparison between well and moderate differentiation; **: comparison between moderate and poor differentiation

3 讨论

微小RNA (miRNA) 是一类进化上保守、内源性非蛋白质编码的RNA分子, 长约17~25个核苷酸, 能够识别特定的目标mRNA, 并在转录后水平负调控基因^[4]。近年来miRNA的研究已成为肿瘤学诊断和治疗领域的新热点。miR-21基因是最早在人类基因组中检测到的miRNA基因之一, 其在肺癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤、胃癌、胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤、肝癌、胆管癌、结肠癌、前列腺癌中均呈过表达^[5-8], 是实体肿瘤中最常见的过高表达miRNA之一, 在肿瘤的发生发展中可能发挥癌基因的作用^[9]。

外周血循环肿瘤标志物的检测具有微创伤、可重复、可在同一时间点进行多项指标检测等优点, 是肿瘤诊断和随访的理想方法。目前研究已证实miR-21不仅在结肠癌组织呈高表达, 在患者血浆中也呈高表达, 并与临床分期和预后密切相关^[1,10-11]。研究发现血浆miR-21在大肠癌诊断的敏感度和特异性分别为84.5%和74.4%^[12], 因此血浆miR-21可能作为一个潜在的广谱的结肠癌检测的生物标志物, 成为结肠癌诊断的一种新方法。

本研究对结肠癌患者血浆中miR-21表达情况进行术前和术后动态检测, 结果发现在结肠癌患者手术后血浆中miR-21的表达明显降低, 差异有统计学意义。即手术去除肿瘤后, 血浆中miR-21

水平迅速下降。说明miR-21与肿瘤密切相关, 它能促进肿瘤的发生、增殖。

综上所述, qRT-PCR检测结肠癌患者血浆中miR-21的表达对监测其发展、判断其分期、手术效果、复发和转移具有重要作用。血浆miR-21表达可作为结肠癌潜在的生物标志物, 有效的辅助诊断结肠癌及判断其预后。

参考文献:

- [1] Sun JB, Xia L. Detection of plasma circulating miR-21 of colorectal carcinoma patients by a quantitative real-time PCR[J]. Lin Chuang Xue Ye Xue Za Zhi (Shu Xue Yu Jian Yan Ban), 2011, 24(4): 444-7. [孙建斌, 夏琳. 实时荧光定量检测大肠癌患者血浆miR-21的表达[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版), 2011, 24(4): 444-7.]
- [2] Slaby O, Svoboda M, Fabian P, *et al.* Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer[J]. Oncology, 2007, 72(5-6): 397-402.
- [3] Faltejskova P, Besse A, Sevcikova S, *et al.* Clinical correlations of miR-21 expression in colorectal cancer patients and effects of its inhibition on DLD1 colon cancer cells[J]. Int J Colorectal Dis, 2012, 27(11): 1401-8.
- [4] Scott GK, Goga A, Bhaumik D, *et al.* Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125b[J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 1479-86.
- [5] Chan SH, Wu CW, Li AF, *et al.* miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association[J]. Anticancer Res, 2008, 28(2A): 907-11.
- [6] Lu X, Su J, Gao W, *et al.* Expression of microRNA in NSCLC with drug-resistant cell line A549/DDP[J]. Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi, 2010, 17(9): 659-63. [陆晓, 孙婧, 高雯, 等. 非小细胞肺癌耐药细胞株A549/DDP中microRNA表达的初步研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(9): 659-63.]
- [7] Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(4): 918-25.
- [8] Zhong Q, Fang JG, Huang ZG, *et al.* Expression of miRNA in laryngeal squamous cell carcinoma tissues[J]. Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi, 2010, 17(14): 1073-6. [钟琦, 房居高, 黄志刚, 等. 喉鳞状细胞癌组织miRNA表达的初步研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(14): 1073-6.]
- [9] Liang Y, Wu JX. Progress of miR-21 and tumor[J]. Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi, 2012, 19(12): 949-52. [梁燕, 吴建新. miR-21与肿瘤研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(12): 949-52.]
- [10] Basati G, Emami Razavi A, Abdi S, *et al.* Elevated level of microRNA-21 in the serum of patients with colorectal cancer[J]. Med Oncol, 2014, 31(10): 205.
- [11] Masuda S, Izpisua Belmonte JC. Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2014, 106(3): djt457.
- [12] Wang B, Zhang Q. The expression and clinical significance of circulating microRNA-21 in serum of five solid tumors[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(10): 1659-66.

[编辑: 黄园玲; 校对: 杨卉]