

• 临床检验研究论著 •

miR-200b 在结直肠癌组织中的表达情况及临床意义

杜叶平, 吴 洁, 武春梅, 苗晋华[△]

(中国人民解放军第二六四医院检验科, 山西太原 030001)

摘 要:目的 探讨 miR-200b 在结直肠癌组织中的表达情况及其与患者临床病理特征的关系。方法 采用实时定量 PCR 分析结直肠癌组织与癌旁正常组织中 miR-200b 的表达的差异;按 $\Delta\Delta CT$ 法对目的基因进行相对定量,结直肠癌组织中的 miR-200b 表达低于相应癌旁正常结直肠组织,则视为低表达,反之则为高表达;将 80 例结直肠癌组织按 miR-200b 表达情况分为高表达和低表达,分析 miR-200b 的表达情况与患者临床资料、病理参数之间的关系。结果 结直肠组织中 miR-200b 表达水平明显低于癌旁正常组织($P<0.01$);结直肠癌组织 miR-200b 的低表达率在不同性别、年龄、肿瘤部位患者间的差异均无统计学意义($P>0.05$);miR-200b 的表达水平降低与组织学分级、TNM 分期、血清 CEA 水平密切相关。结论 miR-200b 很可能会成为结直肠癌早期诊断及预后判断的指标。

关键词:结直肠肿瘤; 微 RNAs; 聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.014 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)16-2095-02

Expression and clinical significance of miR-200b in colorectal cancer

Du Yeping, Wu Jie, Wu Chunmei, Miao Jinhua[△]

(Department of Clinical Laboratory, the 264th Hospital of PLA, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:Objective To study the expression of miR-200b in colorectal cancer and its correlation with clinical features and pathological characters. **Methods** To detect the expression of miR-200b in colon cancer tissues and corresponding normal tissues by qPCR, and relatively quantify the level of target gene by $\Delta\Delta CT$ method. The expression level of miR-200b in colorectal cancer tissue is lower than corresponding adjacent normal colorectal tissue, which is regarded as a low expression, otherwise is regarded as high expression. 80 colorectal cancer tissue samples were judged as high expression or low expression, then the comparison of miR-200b expression were did among patients with different clinical features and pathological parameters. **Results** miR-200b expression level in the colorectal cancer tissue was significantly lower than the corresponding adjacent normal colorectal tissue($P<0.01$). Decreased miR-200b expression rates of colorectal cancer tissue showed no significant difference in different clinical features, such as sex, age and tumor site($P>0.05$). However, the decreased expression rates of miR-200b were obviously related with pathological grade of colorectal cancer, TNM stages and serum CEA level. **Conclusion** miR-200b may become a new tumor marker in the early diagnosis and prognosis of colorectal cancer.

Key words: colorectal neoplasms; microRNAs; polymerase chain reaction

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发病率及病死率在世界范围内呈逐年上升趋势^[1]。人群中结直肠癌的发病率为 5%,5 年存活率从 40% 上升到了 60%^[2]。目前,肿瘤的确诊在很大程度上依赖于病理形态学,但是在形态学相似的肿瘤其潜在的分子生物学变化和致瘤潜能不同,因此肿瘤的预后也不相同。miRNA 的发现为肿瘤研究提供了新的思路。Lee 等^[3]在秀丽隐杆线虫中发现能够按时序调控胚胎后期发育的第一个 miRNA 分子 lin-4。此后,大量的研究逐渐证实,miRNA 是一类广泛存在于动植物体内,长度为 18~23 bp 的内源性非编码小分子 RNA,其通过与靶 mRNA 3' 端相结合导致 mRNA 降解或翻译受抑制从而调节基因的表达^[4]。研究发现,miR-200 家族包含有 miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-429、miR-141,miR-200b 在胃癌^[5]、肝癌^[6]、卵巢癌^[7]、乳腺癌^[8]、膀胱癌^[9]组织中均呈现表达下调,而且 miR-200b 家族在上皮间质转化中发挥重要作用,可抑制癌细胞增殖和迁移。为进一步研究 miR-200b 在结直肠癌发生发展过程中的重要作用,笔者以结直肠癌手术标本为研究对象,从 mRNA 水平检测 miR-200b 在结直肠癌组织中的表达情况,通过分析结直肠癌的病程进展与 miR-200b 表达水平的相关性,探讨 miR-200b 在结直肠癌发

生发展过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 80 例于 2009 年 10 月至 2012 年 6 月在本医院进行手术治疗的经病理确诊为结肠癌的患者,收集其手术中切除癌的组织及相应癌旁正常组织标本,进行实验-对照研究。选取的患者术前均未接受任何化疗、放疗及其他针对肿瘤的相关治疗,男 44 例,女 36 例;年龄 41~85 岁,平均 60 岁,>60 岁的 65 例,≤60 岁的 15 例。癌旁正常组织取自距肿瘤边缘至少 5 cm 以外部位,均经病理检查确认为正常组织。所有标本切除后用生理盐水漂洗干净,于-70℃冰箱保存备用。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪为美国 ABI 公司 Step-One™ Real-Time PCR 仪。Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒及 U6 RNA 购自日本 TaKaRa 公司,Fast SYBR Green Master Mix 及 PCR 相关耗材购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取 用 Trizol 试剂提取组织总 RNA;所有溶液加二乙基焦磷酸胺(DEPC)至浓度为 0.1%,振荡混匀,37℃过夜,然后高压(103.4 kPa、20 min)灭菌分解 DEPC。所

有操作均在超净工作台上进行,超净工作台使用紫外线消毒 20 min。取 100 mg 组织置于预冷过的研钵中,在液氮中研磨成粉末,待液氮挥发后加入 1 mL Trizol,静置 5 min;将研磨好的组织转移到 1.5 mL Ep 管中,加入 200 μ L 氯仿,振荡混匀,室温静置 2~3 min;12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清,加入 500 μ L 异丙醇,振荡混匀,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 20 min;12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,弃上清,向沉淀中加入 1 mL 预冷的 75%乙醇(DEPC 水制备)洗涤 1 次 RNA 沉淀,弃上清,稍微晾干,RNA 略显透明;充分溶解于 20 μ L 无 RNA 酶水中,保存于-70 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.2 反转录反应 反转录反应严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.3 qPCR 步骤 PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C,变性 10 min,94 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 30s,70 $^{\circ}$ C 30s,共 40 个循环。用 ABI 公司自带的 Step-One PCR 系统分析软件分析,采用 U6 RNA 作为内参,进行归一化处理,按 $\Delta\Delta$ CT 法对目的基因进行相对定量。结直肠癌组织中的 miR-200b 相对表达量低于相应癌旁正常结直肠组织视为低表达,反之则为高表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件对数据进行处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间连续变量比较采用 *t* 检验;不同临床、病理资料患者间的肿瘤组织 miR-200b 低表达率的比较采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-200b 在结直肠癌组织和癌旁正常组织中的表达水平 60 例患者结直肠癌组织 miR-200b 的相对表达量为 2.11 $\pm$ 1.48,对应的癌旁正常组织为 15.37 $\pm$ 6.27,差异有统计学意义(*P*<0.01)。

2.2 miR-200b 表达水平与患者临床资料的关系 结直肠癌组织 miR-200b 的低表达率在不同年龄、性别、肿瘤部位的患者之间比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 80 例癌组织的 miR-200b 表达水平与 临床资料的关系						
临床资料	<i>n</i>	miR-200b 表达(<i>n</i>)		低表达率 (%)	χ^2	<i>P</i>
		—	+			
年龄						
≤60 岁	15	11	4	73.33	0.414	0.52
>60 岁	65	42	23	63.61		
性别						
男	44	32	12	72.73	0.720	0.396
女	36	23	13	63.89		
肿瘤部位						
结肠	32	21	11	65.63	0.242	0.622
直肠	48	34	14	70.83		

+:高表达;—:低表达。

2.3 miR-200b 表达水平与患者临床病理特征的关系 结直肠癌组织 miR-200b 低表达率在组织学分类上的差异无统计学意义(*P*>0.05);但在腺癌分级中,分化级别越低,miR-200b 低表达率越高(*P*<0.05)。TNM 分期为 III+IV 期患者的 miR-200b 低表达率高于 I+II 期患者(*P*<0.05);血清 CEA>5 μ g/L 患者结肠癌组织的 miR-200b 低表达率高于血清 CEA

≤ 5 μ g/L 的患者(*P*<0.05),见表 2。

表 2 80 例癌组织 miR-200b 的表达水平与临床病理特征的关系						
临床病理特征	<i>n</i>	miR-200b 相对表达量		低表达率 (%)	χ^2	<i>P</i>
		—	+			
组织学分类与分级						
腺癌	68	47	21	69.12	0.029*	0.866*
高分化	12	5	7	41.66	7.966	0.019
中分化	37	25	12	67.57		
低分化	19	17	2	89.47		
鳞癌	12	8	4	66.67	—	—
TNM 分期						
I+II	29	18	11	62.07	5.052	0.025
III+IV	51	43	8	84.31		
CEA(μg/L)						
≤5	25	15	10	60.00	4.364	0.037
>5	55	45	10	81.82		

+:高表达;-:低表达;* :与鳞癌比较;-:无数据。

3 讨 论

近年来大样本研究报道结直肠癌手术切除后 5 年生存率为 28.49%,伴淋巴结转移者 5 年生存率为 20.2%^[10]。其病死率之所以很高,很大程度是由于缺乏有效的早期诊断方法,临床确诊时多为进展期结直肠癌,而目前对该期结直肠癌无理想治疗方法。因此,进一步从基因水平探索其发病机制不仅有助于结直肠癌的早期诊断及预后评估,而且可能为结直肠癌的防治提供一条新的思路。Kurashige 等^[11]发现,miR-200 家族可能扮演着一种抑癌基因或肿瘤抑制基因的角色,miR-200b 可能通过靶向调节 ZEB2 抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移。Nanna 等^[12]发现,miR-200b 可通过结合 ZFH1B 基因的 3' UTR 来调节表达水平,进一步研究发现外源的 miR-200b 可抑制 ZFH1B 基因的表达,而抑制内源 miR-200b 可导致 ZFH1B 蛋白表达水平升高。

本研究显示,miR-200b mRNA 在 60 例癌旁正常组织中均有表达,而与相应癌旁正常组织相比,miR-200b 在结直肠癌组织中表达下调。进一步对患者病理资料及临床病理特征分析发现 miR-200b 在不同年龄、性别及肿瘤部位患者结直肠癌组织中的表达情况无明显差异。而在组织学分级上,随着分化级别的降低 miR-200 表达降低;不同 TNM 分期的患者,III+IV 期的表达明显低于 I+II 期。CEA 作为肿瘤标志物早已用于临床诊断,本文通过分析 miR-200b 表达率在不同血清 CEA 水平患者间的差异,发现血清 CEA>5 μ g/L 的结直肠癌患者的 miR-200b 低表达率较高,说明 miR-200b 的表达减少或缺失可能是导致结直肠癌发生、发展的重要因素之一。miR-200b 的进一步研究还可能会为临床化疗药物的选择和治疗提供理论依据。研究其与患者预后的关系,可以为临床诊疗提供更多的依据。

参考文献

[1] Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, et al. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal Cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(4):1069-1075. (下转第 2098 页)

2.2 冷沉淀融化后不同放置时间 FⅧ和 vWF 抗原水平的变化 见表 2,冷沉淀融化后随着放置时间的延长,FⅧ和 vWF 抗原水平均明显降低($P<0.05$)。

表 2 冷沉淀融化后不同放置时间 FⅧ含量和 vWF 抗原的变化($\bar{x}\pm s$)

时间	FⅧ(IU/袋)	vWF 抗原(%)
0 h	94.48±8.25	81.08±7.87
6 h	63.64±5.48*	62.75±4.52*
12 h	55.59±6.12*	57.44±4.49*
24 h	43.22±3.58*	37.05±2.54*

*: $P<0.05$,与 0 h 比较。

3 讨 论

本实验表明,冷沉淀融化后随着放置时间的延长,PT、TT、FIB 无明显改变;而随着放置时间的延长,APTT 明显延长,FⅧ和 vWF 抗原水平亦降低。经过 12 h 后,FⅧ水平为 0 h 时的 58.84%,24 h 后为 0h 时的 45.75%,与文献[2]报道基本一致。目前,国内对冷沉淀中的 vWF 研究较少,本实验显示经过 12 h 后,vWF 抗原为 0 h 时的 70.84%,24 h 后为 45.70%。vWF 抗原半衰期在 12~24 h 之间,有待进一步的研究证实。PT 和 APTT 分别是外源性凝血因子(Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ、Ⅰ、Ⅴ)凝血功能紊乱和内源性凝血因子(Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ)活性异常的筛选试验,本实验结果表明 FⅧ含量的降低导致 APTT 的延长。

成分输血广泛的应用于临床,冷沉淀作为临床常用的成分血液制品,具有止、凝血和促进创伤组织修复的功能。冷沉淀制备完成至临床应用的过程应尽量保护其中含有的凝血因子和 vWF 不受破坏。这对于确保冷沉淀的临床输血疗效,防止无效输注有着极其重要的意义。冷沉淀中含有浓集的 FIB、FⅧ和纤维连接蛋白,以及其他多种凝血因子。冷沉淀适量输入患者体内后可补充患者血循环中 FⅧ等凝血因子含量,缩短凝血时间,纠正凝血因子缺乏而导致的凝血异常,有效控制手术中的大出血,尤其是对预防和治疗血友病患者的外科手术出血有显著效果^[3]。冷沉淀可用于治疗儿童和成人甲型血友病,补

充纤维蛋白原,治疗血管性血友病、凝血因子缺乏症等。冷沉淀还用于促进创伤、烧伤伤口愈合,防止伤口感染,阻止弥散性血管内凝血发展,以及恶性肿瘤切除手术和腹腔镜手术,以减少出血、促进愈合和防止粘连^[4]。体内 vWF 水平异常与缺血性疾病密切相关^[5],临床上输注冷沉淀是补充 vWF 的常见手段,冷沉淀中 vWF 应得到最大程度的保存^[6]。冷沉淀是血管性血友病替代治疗的最理想的品血液制品。

本研究表明,冷沉淀在 37℃水浴快速融化后,应尽快给患者输注或局部应用,否则随着放置时间的延长可导致 FⅧ和 vWF 水平降低,影响冷沉淀的输注疗效。冷沉淀如果在融化后有纤维蛋白析出或因为各种原因不能及时输注,则当废弃。这对于进一步规范临床合理使用冷沉淀,充分发挥其治疗效果具有重要意义。

参考文献

[1] 杨江存,李芒会,于青,等.新鲜冰冻血浆融化后不同放置时间凝血因子的变化[J].中国输血杂志,2005,18(3):211-212.
[2] 张远鹏,罗红林,王丽.凝血因子Ⅷ在 FFP 制备过程中受时间和温度的影响[J].江苏大学学报:医学版,2001,11(1):82.
[3] Mathews V,Srivastava A,Nair SC,et al. Haemostasis with cryoprecipitate in patients undergoing surgery for severe von Willebrand disease[J]. Natl Med J India,2000,13(4):188-190.
[4] 陈长荣,洪素云,陈苹,等.2 种方法制备冷沉淀的质量分析[J].中国输血杂志,2008,21(12):928-929.
[5] Klukowska A,Windyga J,Batorova A. Clinical efficacy of a novel VWF-containing FVIII concentrate, Wilate(?), in the prophylaxis and treatment of bleeding episodes in previously treated haemophilia A patients[J]. Thromb Res,2011,127(3):247-253.
[6] Bowyer AE, Shepherd F, Kitchen S, et al. A rapid, automated VWF ristocetin cofactor activity assay improves reliability in the diagnosis of Von Willebrand disease[J]. Thromb Res,2011,127(4):341-344.

(收稿日期:2013-03-18)

(上接第 2096 页)

[2] Wang CJ,Zhou ZG,Wang L,et al. Clinicopathological significance of microRNA-31,-143 and -145 expression in colorectal Cancer[J]. Dis Markers,2009,26(1):27-34.
[3] Lee RC,Feinbaum RL,Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell,1993,75(5):843-854.
[4] Stark A,Brennecke J,Bushati N,et al. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3' UTR evolution[J]. Cell,2005,123(6):1133-1146.
[5] Kurashige J,Kamohara H,Watanabe M,et al. MicroRNA-200b regulates cell proliferation,invasion,and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma[M]. Ann Surg Oncol,2012,19(Suppl 3):S656-S664.
[6] Tryndyak VP,Ross SA,Beland FA,et al. Down-regulation of the microRNAs miR-34a,miR-127, and miR-200b in rat liver during hepatocarcinogenesis induced by a methyl-deficient diet[J]. Mol Carcinog,2009,48(6):479-487.
[7] Hu X,Macdonald DM,Huettner PC,et al. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian Cancer[J]. Gy-

necol Oncol,2009,114(3):457-464.
[8] Gregory PA,Bert AG,Paterson EL,et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. Nat Cell Biol,2008,10(5):593-601.
[9] Wszolek MF,Rieger-Christ KM,Kenney PA,et al. A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype[J]. Urol Oncol,2011,29(6):794-801.
[10] Al-Ahwal MS,Shafik YH,Al-Ahwal HM. First National survival data for colorectal Cancer among Saudis between 1994 and 2004: what's next[J]. BMC Public Health,2013,13(1):73.
[11] Kurashige J,Kamohara H,Watanabe M,et al. MicroRNA-200b regulates cell proliferation,invasion, and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma[M]. Ann Surg Oncol,2012,19(Suppl 3):S656-S664.
[12] Christoffersen NR,Silahtaroglu A,Orom UA,et al. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B[J]. RNA,2007,13(8):1172-1178.

(收稿日期:2013-04-03)