

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.01.008
文章编号: 1005-8982(2018)01-0037-07

临床研究·论著

结肠癌血清 microRNA 表达谱的检测及 临床应用价值*

王亚南¹, 陈昭华², 陈卫昌¹

[1. 苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006; 2. 苏州市立医院
(南京医科大学附属苏州医院), 江苏 苏州 215002]

摘要: 目的 找寻潜在的新型的结肠癌血清 microRNA(miRNA)表达谱, 探讨其临床应用价值。**方法** miRNA 微阵列芯片技术检测结肠癌患者和正常人血清中 miRNA 表达的差异, 并对有差异表达的 miRNA 在 60 例结肠癌患者血清和 60 例正常对照组血清中的表达进行实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)验证。**结果**①芯片杂交结果中共有 87 种 miRNAs 在结肠癌患者血清和正常人血清标本中有差异表达, 其中上调表达有 39 个, 下调表达有 48 个。②qRT-PCR 对 miRNAs 进行验证, 其中 miR-31、miR-141、miR-224-3p、miR-576-5p 和 miR-4669 这 5 个 miR 分子在结肠癌患者中的表达相对于正常对照组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。③miR-31、miR-141、miR-224-3p、miR-576-5p 和 miR-4669 这 5 个 miR 分子组成的 miR-表达谱诊断结肠癌的效率较高(ROC 曲线下面积为 0.992)。**结论** 临床检测结肠癌患者 miR-31、miR-141、miR-224-3p、miR-576-5p 和 miR-4669 循环分子标志物表达谱有助于诊断结肠癌, 有望成为结肠癌患者临床诊疗评估的重要指标。

关键词: 结肠癌; 血清 microRNA; miRNA

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

Detection of serum microRNA profile in colon cancer and its clinical application value*

Ya-nan Wang¹, Zhao-hua Chen², Wei-chang Chen¹

[1. The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China;
2. Suzhou Municipal Hospital (Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical
University), Suzhou, Jiangsu 215002, China]

Abstract: Objective To explore the potential novel serum microRNA(miRNA) profile in colon cancer and discuss its clinical application value. **Methods** The difference of serum miRNA expression between colon cancer patients and healthy people was detected by miRNA microarray chip technology. The differential expression of miRNAs in serum of 60 cases of colon cancer and 60 normal people were validated by qRT-PCR. **Results** A total of 87 miRNAs were differentially expressed in the serum of the colon cancer patients compared to the normal people, among which 39 miRNAs were upregulated and 48 miRNAs were down-regulated. miR-31, miR-141, miR-224-3p, miR-576-5p and miR-4669 expressions in the colon cancer patients were significantly different from those in the normal control group ($P < 0.05$). MicroRNA profile (including miR-31, miR-141, miR-224-3p, miR-576-5p and miR-4669) has a higher efficiency in diagnosis of colon cancer (area under the ROC curve was

收稿日期: 2017-02-17

*基金项目: 苏州市“科教兴卫”青年科技项目(No: KJXW2014017)

[通信作者]陈卫昌, E-mail: weichangchen@126.com; Tel: 0512-67781310

0.992). **Conclusions** Clinical detection of expression profile of circulating molecular markers miR-31, miR-141, miR-224-3p, miR-576-5p and miR-4669 in colon cancer patients is useful for the diagnosis of colon cancer. It is expected to be an important index for evaluation of clinical diagnosis and treatment in patients with colon cancer.

Keywords: colon cancer; serum microRNA; expression profile

结肠癌 (colon cancer) 的发生发展受多种因素的影响, 是个多基因相关、多步骤的复杂过程。microRNA (miRNA) 是一种长度为 19 ~ 24 个核苷酸, 进化上高度保守的内源性非编码单链小 RNA, 广泛存在于动植物中。自 1993 年 LEE 等^[1] 在秀丽隐杆线虫研究中发现了第一个 miRNA-let4 以来, 截至 2011 年 miRbase 已收录 140 个物种的 15 000 条 miRNAs 基因位点和 17 000 条不同的 miRNAs 序列^[2]。目前有关研究^[3-6] 表明, miRNA 的异常表达与结肠癌的发生发展有着密切联系。本技术利用 miRNA 微阵列芯片技术检测结肠癌患者血清和正常人血清中 miRNA 表达的差异, 并对有差异表达的 miRNA 进行实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 验证, 以找寻潜在的新型的结肠癌血清 miRNA 表达谱。

1 资料与方法

1.1 研究对象

芯片筛选 miRNAs 标本来源, 收集苏州市立医院住院的结肠癌患者血清样本 3 例, 其中, 男性 1 例, 女性 2 例, 且其均未接受任何手术治疗、放疗或者化疗, 但均经病理学检查确诊。组织病理类型的判断参照 WHO 病理分期。3 例健康对照血清来自医院体检者。收集苏州市立医院住院的结肠癌患者血清样本 60 例, 其中, 男性 30 例, 女性 30 例, 且其均未接受任何手术治疗、放疗或者化疗, 但均经病理学检查确诊。组织病理类型的判断参照 WHO 病理分期。60 例健康对照血清来自医院体检者。具体资料见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 血清标本处理 在结直肠癌患者术前、结肠息肉患者术前和正常人体检时用一次性真空采血管采集空腹静脉血 5 ml, 3 000 r/min, 离心 5 min, 分离血清, 取 1 ml 血清离心后于 -80℃ 保存。

1.2.2 miRNA 芯片检测 3 例结肠癌患者血清和 3 例正常人血清标本送至中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所进行 miRNA UniTag™ 微阵列芯片 (无标记 miRNA 芯片分析方法) 检测^[7]。结果经过数据分析, 根据改变倍数 ≥ 1.5 且 $P < 0.05$ 筛选与正常人血清相

表 1 结肠癌患者临床资料

临床病理参数	例数	临床病理参数	例数
年龄		分化程度	
<60 岁	21	高分化	12
60~70 岁	22	中分化	40
>70 岁	17	低分化	8
性别		TNM 分期	
男性	30	II	21
女性	30	III	27
肿块大小		IV	12
直径 ≤ 4 cm	35	淋巴结转移	
直径 > 4 cm	25	有	33
		无	27

比在结肠癌患者中有差异表达的 miRNA。

1.2.3 qRT-PCR 检测 miRNA 的表达 血清 RNA 抽提, 吸取血清 250 μ l 与 Trizol 750 μ l 于 2 ml 离心管中, 充分震荡混匀。按说明书操作进行 RNA 提取。紫外分光光度仪测定总 RNA 的吸光度 (A260/280 nm) 比值, 取比值在 1.8 ~ 2.2 的标本用于后续试验。miRNA 3' 末端加 Poly (A) 处理及逆转录反应按照 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒说明书 (天根公司) 操作进行。qRT-PCR 按照 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒说明书 (天根公司) 操作。总反应体系为 20 μ l, 包括 2 \times miRcute miRNA Premix (含 SYBR、ROX) 10 μ l, 10 μ mol/L 正向、反向引物各 0.4 μ l, miRNA 第一链 cDNA 2 μ l, 50 \times ROX 参比染料 1.6 μ l, ddH₂O 5.6 μ l。循环参数: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 20 s, 60℃ 34 s, 共 43 个循环。以 miR-16 作为内参照^[8], 对目标基因进行归一化处理, 确保以相等数量的样品比较目标基因的量。实验设 3 个复孔。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[9] 计算。取 10 μ l qRT-PCR 扩增产物, 用 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果用百瑞凝胶成像仪观察并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。采用单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验法对数据进行正态分

布检验, 因数据不符合正态分布, 计量资料以中位数和四分位数间距, 组间数据比较采用 Wilcoxon 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以手术切除的结肠癌组织病理报告为金标准, 绘制血清 miRNAs 诊断结肠癌的 ROC 曲线, 计算 ROC 曲线下面积及渐进 95% 可信区间。

2 结果

2.1 结肠癌患者血清中 miRNA 的芯片表达谱

芯片杂交结果经过数据分析, 根据改变倍数 ≥ 1.5 且 $P < 0.05$ 筛选与正常人血清相比在结肠癌患者中有差异表达的 miRNA。共有 87 种 miRNA 在结肠癌患者血清和正常人血清标本中差异有统计学意义, 其中上调表达有 39 个, 下调表达有 48 个。

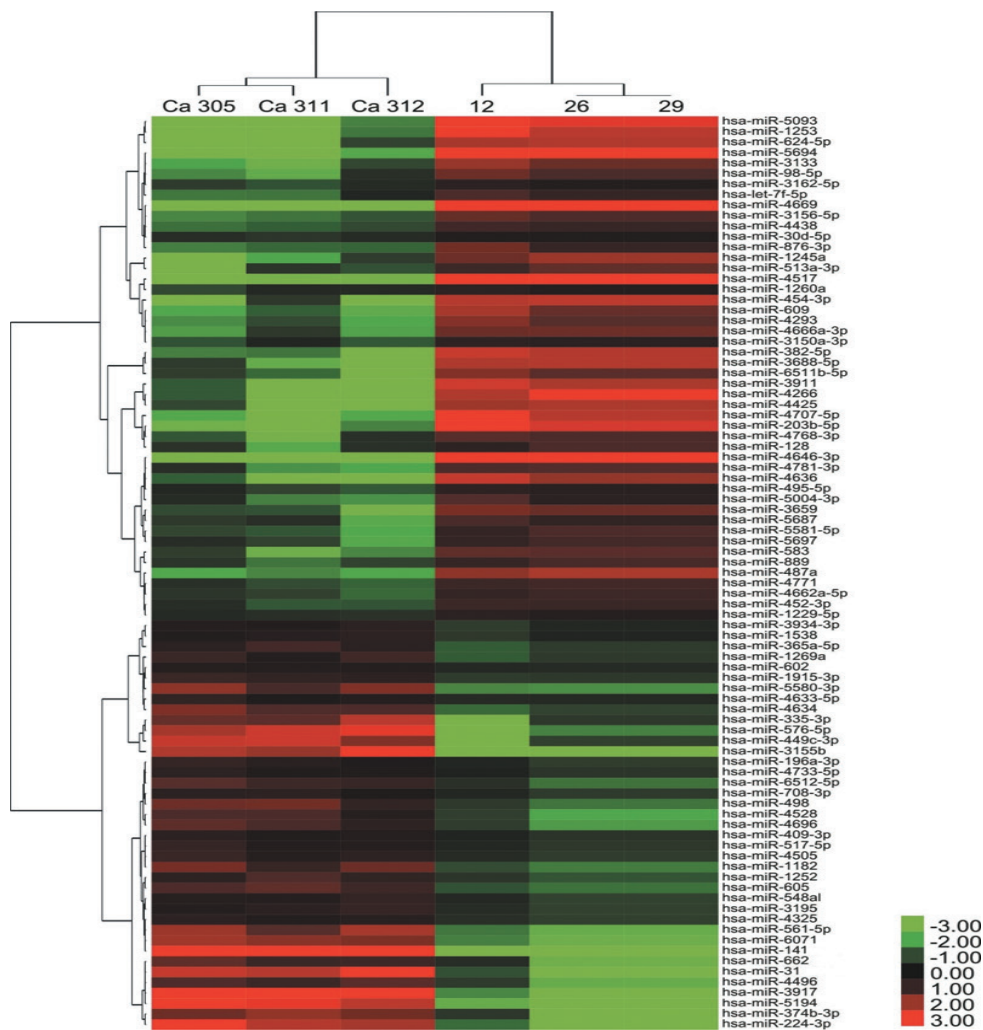
差异表达的 87 种 miRNA 的热图结果见图 1、表 2。

2.2 qRT-PCR 对 miRNAs 进行验证

通过查阅文献, 在芯片筛选出的 87 种差异表达的 miRNA 中有 12 种与结肠癌的细胞分化、转移等相关^[10]。用 qRT-PCR 对这 12 种 miRNA 进行验证。其中 miR-31、miR-141、miR-224-3p、miR-576-5p 和 miR-4669 这 5 个 miR 分子在结肠癌患者中的表达相对于正常对照组差异有统计学意义。结果见图 2、表 3。

2.3 ROC 曲线分析

以手术切除结肠癌组织的病理报告为金标准, 绘制 miR-31、miR-141、miR-224-3p、miR-576-5p 和 miR-4669 及由这 5 个 miR 分子组成的 miR- 表达谱在诊断结肠癌中的 ROC 曲线。见图 3、表 4。



绿色表示 miRNA 低表达, 红色表示 miRNA 高表达。Ca: 结肠癌血清; T: 正常人血清

图 1 结肠癌患者和正常人血清标本 miRNA 芯片结果热图

表 2 结肠癌患者血清中差异表达的 miRNAs

上调表达的 miRNAs (n=39)		下调表达的 miRNAs (n=48)	
hsa-miR-602	hsa-miR-1182	hsa-miR-4669	hsa-miR-452-3p
hsa-miR-4733-5p	hsa-miR-4634	hsa-miR-4646-3p	hsa-miR-3150a-3p
hsa-miR-409-3p	hsa-miR-5580-3p	hsa-miR-4517	hsa-miR-495-5p
hsa-miR-3934-3p	hsa-miR-374b-3p	hsa-miR-5694	hsa-miR-3162-5p
hsa-miR-1538	hsa-miR-335-3p	hsa-miR-5093	hsa-miR-1260a
hsa-miR-4633-5p	hsa-miR-6071	hsa-miR-1253	hsa-miR-30d-5p
hsa-miR-708-3p	hsa-miR-561-5p	hsa-miR-3911	hsa-miR-1229-5p
hsa-miR-4325	hsa-miR-449c-3p	hsa-miR-4707-5p	hsa-miR-4293
hsa-miR-196a-3p	hsa-miR-224-3p	hsa-miR-4266	hsa-miR-513a-3p
hsa-miR-517-5p	hsa-miR-31	hsa-miR-203b-5p	hsa-miR-3659
hsa-miR-548a1	hsa-miR-5194	hsa-miR-4425	hsa-miR-4666a-3p
hsa-miR-3195	hsa-miR-3917	hsa-miR-624-5p	hsa-miR-3156-5p
hsa-miR-4505	hsa-miR-141	hsa-miR-4636	hsa-miR-876-3p
hsa-miR-365a-5p	hsa-miR-3155b	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-98-5p
hsa-miR-1269a	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-382-5p	hsa-miR-4781-3p
hsa-miR-1915-3p		hsa-miR-3688-5p	hsa-miR-5581-5p
hsa-miR-1252		hsa-miR-487a	hsa-miR-4768-3p
hsa-miR-4528		hsa-miR-1245a	hsa-miR-4438
hsa-miR-6512-5p		hsa-miR-609	hsa-miR-5004-3p
hsa-miR-4696		hsa-miR-3133	hsa-miR-5697
hsa-miR-662		hsa-miR-6511b-5p	hsa-miR-5687
hsa-miR-4496		hsa-miR-583	hsa-let-7f-5p
hsa-miR-605		hsa-miR-4771	hsa-miR-128
hsa-miR-498		hsa-miR-4662a-5p	hsa-miR-889

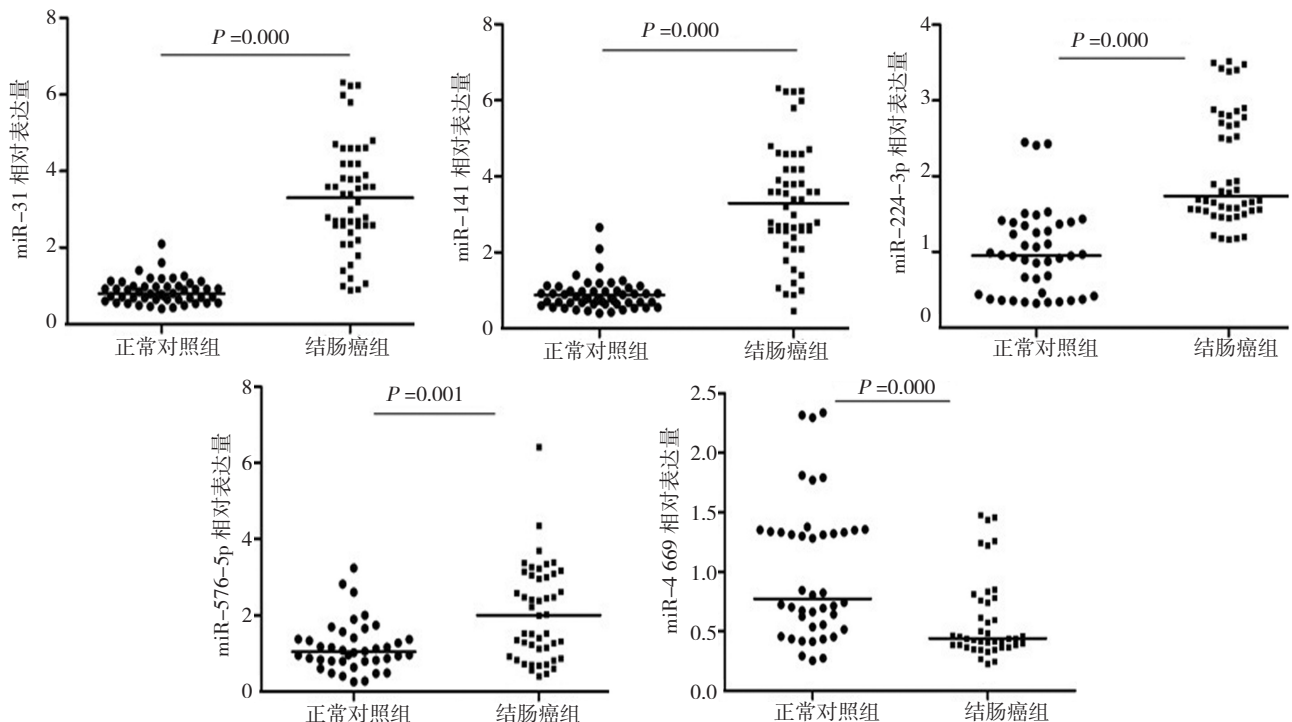


图 2 miRNAs 在结肠癌组和正常对照组血清中的表达

表 3 miRNAs 在结肠癌组和正常对照组血清中的表达

组别	miR-31	miR-141	miR-224-3p	miR-576-5p	miR-4669
结肠癌组	3.30 (2.53~4.20)	3.20 (2.49~4.20)	1.74 (1.55~2.76)	2.01 (0.92~3.05)	0.44 (0.38~0.77)
正常对照组	0.82 (0.64~0.99)	0.79 (0.64~0.98)	0.95 (0.58~1.37)	1.04 (0.79~1.40)	0.77 (0.53~1.24)
Z 值	-8.095	-7.966	-6.826	-3.309	-3.686
P 值	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

注: miRNA 表达水平用中位数和四分位数间距表示

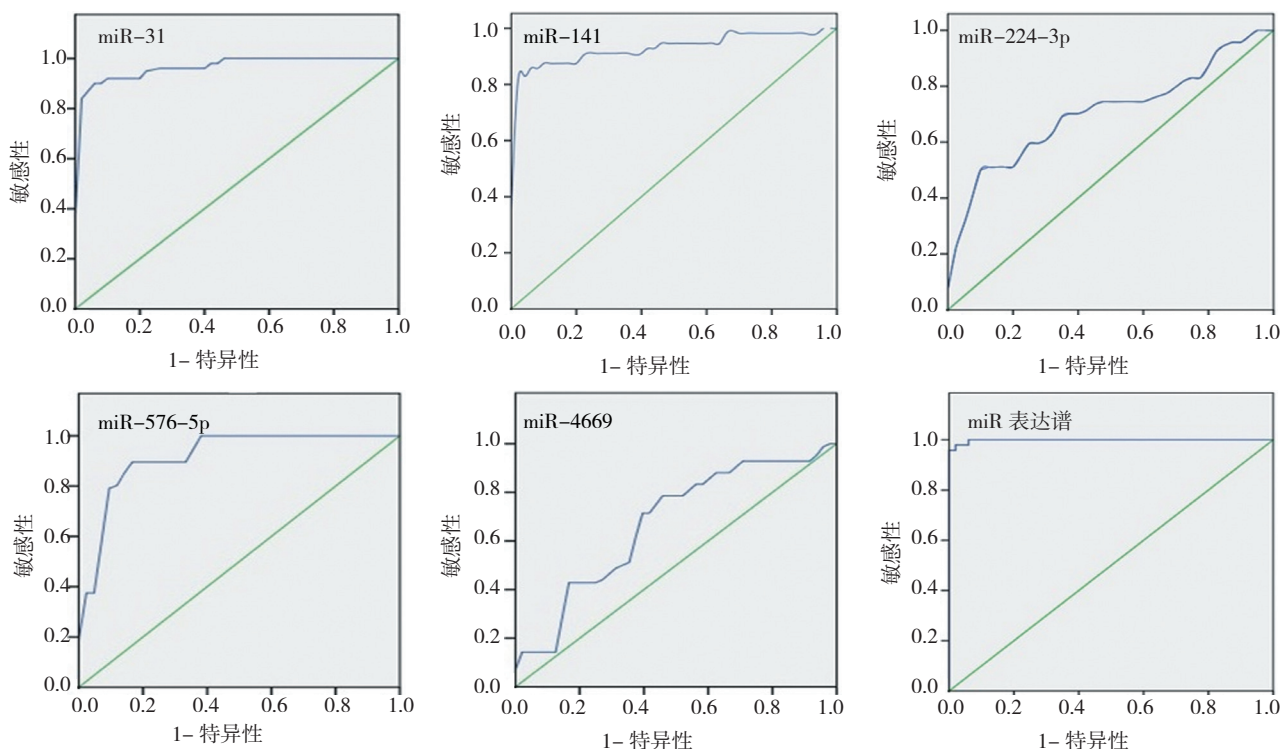


图 3 miRNAs 诊断结肠癌 ROC 曲线

表 4 miRNAs 诊断结肠癌 ROC 曲线下面积及渐进 95% 可信区间

miRNA	曲线下面积	S_0	P 值	95% CI	
				下限	上限
miR-31	0.970	0.015	0.000	0.941	0.998
miR-141	0.933	0.026	0.000	0.881	0.984
miR-224-3p	0.707	0.056	0.001	0.597	0.816
miR-576-5p	0.919	0.03	0.000	0.861	0.977
miR-4669	0.672	0.057	0.005	0.559	0.784
miR 表达谱	0.992	0.002	0.000	0.988	0.996

3 讨论

结肠癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一。结肠癌发展过程主要涉及增生、腺瘤和癌变各阶段, 是一种多步骤、多阶段、多基因参与的疾病。近年来,

miRNA 在结肠癌发生发展中的作用成为人们研究的热点。目前研究表明, miRNA 具有癌基因和抑癌基因的作用。miRNA 微阵列芯片凭借其高通量, 快速检测 miRNA 表达水平的优点, 成为了研究肿瘤发病机制, 早期诊断, 预后判断的新方法。

本技术采用的 UniTag™ 微阵列芯片是中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所开发的非标记 miRNA 芯片检测平台 (涵盖 2 154 个全谱 miRNA, version 19.0), 该平台“基于堆积杂交的通用标签检测方法”可以区分只有 1 个碱基差异的 miRNA 家族成员, 尤其是可以有效排除非活性 pri-miRNA 与 pre-miRNA 前体的交叉杂交信号^[7]。芯片筛选结果显示共有 87 种 miRNA 在结肠癌患者血清和正常人血清标本中有差异表达, 其中上调表达有 39 个, 下调表达有 48 个, 差异均在 1.5 倍以上且差异具有统计学意义。通过查阅文献, 在芯片筛选出的 87 种差异表达的 miRNA 中有 12 种与结肠癌的细胞分化、转移等相关^[10]。用 qRT-PCR 对这 12 种 miRNA 进行验证。其中 miR-31、miR-141、miR-224-3p、miR-576-5p 和 miR-4669 这 5 个 miR 分子在结肠癌患者中的表达相对于正常对照组差异具有统计学意义。

随着分子生物学技术的发展, 与结肠癌有关的 miRNAs 陆续被人们发现。近年来有报道 miR-31 与结肠癌有着密切的关系^[11-12]。YANG 等^[13]发现 miR-31 在结肠癌组织中高表达, 发生淋巴结转移的结肠癌组织中 miR-31 的表达量高于未发生淋巴结转移的结肠癌组织。血液标本获取方便, 对血清中 miRNA 进行检测从而诊断结肠癌及判断预后更适于临床的应用, 可是目前有关 miR-31 在结肠癌血清中的报道并不多见。血清中 miR-31 表达量的增加提示 miR-31 可以作为潜在的肿瘤标记物, 以 miR-31 为靶点的治疗将可能成为治疗结肠癌的另一重要手段。

miR-141 属于 miRNAs 进化保守家族的一员, 是具有上皮组织细胞特异性的微小 RNA。miR-141 作为 miR200 家族的成员之一, 在结直肠癌、乳腺癌和前列腺癌中表达增高。目前对于结肠癌中 miR-141 表达的研究多见于结肠癌组织和结肠癌细胞株, 对于结肠癌血清中 miR-141 的报道很少^[14]。检测结果提示 miR-141 在结肠癌患者血清中高表达。以手术切除结肠部位癌组织的病理报告为金标准, 血清 miR-141 诊断结肠癌的 ROC 曲线下面积为 0.933, 具有较好的诊断效能。

OLARU 等^[15]研究 miRNA 在正常→炎性肠病→结肠癌过程中的作用, 发现 miR-224 在炎性肠病发展的各个阶段都表达上调, 而且结肠癌中 miR-224 的表达水平高于正常黏膜和炎性肠病。进一步研究 miR-224 对结肠癌细胞生物学行为的影响, 结果显示 miR-224 在细胞周期的调控中发挥了重要作用, 其加快了

G₁ 期→S 期的进程, 并且发现这种调控作用是通过影响细胞周期调控因子 p21 实现的。在本文的芯片筛查结果中, miR-224-3p 在结肠癌血清中表达倍数是正常人血清的 5.4 倍。后经过 Real-time PCR 验证, 与芯片结果一致。

BALDEÓN 等^[16]发现, miR-576-5p 在 2 型糖尿病患者的单核细胞中的表达水平升高。同时, 他们还发现 miR-576-5p 与年龄有明显的联系, 而 miR-34c-5p 并没有。miR-576-5p 目前在癌症方面的研究较少。

朱桂璐等^[17]对人乳腺癌 BT474 细胞及 BT474/HER-2 siRNA 细胞 miRNAs 表达谱结果分析, 以 BT474 细胞为对照组, miR-4669 在 BT474/HER-2 siRNA 细胞中表达下调, 提示 miR-4669 在乳腺癌病情进展中可能与 HER-2 相关。目前 miR-4669 在结肠癌中的研究也很少。随着循环 miRNA 研究的深入, 关于 miR-576-3p, miR-4669 在癌症方面的报道也会日益增多。

本研究分析了 miR-31、miR-141、miR-224-3p、miR-576-5p 和 miR-4669 新型 miRNA 循环分子标志物表达谱在结肠癌中的表达, 5 个 miRNA 联合起来组成的 miRNA 循环分子标记物表达谱在诊断结肠癌方面比单个 miRNA 分子的诊断效能更高。miRNA 循环分子标志物表达谱有望成为应用于结肠癌患者临床诊治评估的重要指标。将结肠癌检查的不舒适度减至最轻, 并提高检测的敏感性和特异性, 为实现结肠癌的早期诊断, 预后判断和延长结肠癌患者的生存时间, 提高其生存质量。

参 考 文 献:

- [1] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* hetero-chronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. MiRbase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, (39): 152-157.
- [3] HASHIMOTO Y, AKIYAMA Y, YUASA Y. Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62589.
- [4] IWAYA T, YOKOBORI T, NISHIDA N, et al. Downregulation of miR-144 is associated with colorectal cancer progression via activation of mTOR signaling pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(12): 2391-2397.
- [5] ZHANG G J, XIAO H X, TIAN H P, et al. Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression[J]. *Int J*

- Mol Med, 2013, 31(6): 1375-1380.
- [6] CHIANG Y, SONG Y, WANG Z, et al. MicroRNA-192,-194 and-215 are frequently downregulated in colorectal cancer[J]. Exp Ther Med, 2012, 3(3): 560-566.
- [7] 段德民, 惠利省, 李丽诗, 等. 无标记 microRNA 芯片分析方法的建立与优化 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(5): 479-489.
- [8] HUANG Z, HUANG D, NI S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 127(1): 118-126.
- [9] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_t method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [10] HAGGI M, IDO M, NADIA I, et al. The diagnostic and prognostic role of microRNA in colorectal cancer-a comprehensive review[J]. Journal of Cancer, 2013, 4(3): 281-295.
- [11] CHAOJIE W, ZONGGUANG Z H, LING W, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and-145 expression in colorectal cancer[J]. Dis Markers, 2009, 26(1): 27-34.
- [12] SLABY O, SVOBODA M, FABIAN P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinical pathologic features of colorectal cancer[J]. Oncology, 2007, 72(5/6): 397-402.
- [13] YANG M H, JIANG Y, CHEN N, et al. Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e85353.
- [14] CHENG H Y, ZHANG L N, DAVID E C, et al. Circulating plasma miR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis[J]. PLoS one, 2011, 6(3): e17745.
- [15] OLARU A V, YAMANAKA S, VAZQUEZ C, et al. MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(3): 471-480.
- [16] BALDEÓN R L, WEIGELT K, WIT H D, et al. Type 2 diabetes monocyte microRNA and mRNA Expression: Dyslipidemia associates with increased differentiation-related genes but not inflammatory activation[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129421.
- [17] 朱桂璐, 许成辰, 吴正升, 等. 筛选并初步分析不同 HER-2 水平的人乳腺癌 BT474 细胞内 miRNAs 差异性表达 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(11): 1206-1210.

(张西倩 编辑)