

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000053

结直肠癌组织中 miRNA 的差异表达研究

严秀蕊, 王立斌, 李玉奎, 杨银学

(宁夏医科大学总医院宁夏人类干细胞研究所, 银川 750004)

【摘要】目的:寻找并鉴定在结直肠癌及癌旁正常组织中差异表达的 miRNA,为进一步阐明其在结直肠癌发生、发展机制中的作用奠定实验基础。**方法:**收集 10 例新鲜的结直肠癌及癌旁正常组织,抽提总 RNA,利用 miRNA 芯片技术寻找结直肠癌及癌旁正常组织中差异表达的 miRNA,并通过 real-time PCR 技术进行验证。**结果:**与结直肠癌旁正常组织相比,结直肠癌组织中上调 2.3 倍以上的 miRNA 有 32 个,下调 2 倍以上的 miRNA 有 10 个;real-time PCR 结果与 miRNA 芯片结果较吻合。**结论:**筛选得到结直肠癌 miRNA 差异表达谱,其可能与结直肠癌的发生、发展相关。

【关键词】miRNA 芯片;结直肠癌;microRNAs**【中图分类号】**R735.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-09

Differential expression of microRNAs in human colorectal cancer tissues

Yan Xiurui, Wang Libin, Li Yukui, Yang Yinxue

(Ningxia Human Stem Cell Institute, General Hospital of Ningxia Medical University)

【Abstract】Objective: To identify the differentially expressed microRNAs(miRNAs) in human colorectal cancer tissues and to make further study on the function of miRNA in pathogenesis and development mechanism of colorectal cancer. **Methods:** Total RNA was extracted from 10 samples fresh colorectal cancer tissues and normal adjacent tissues and the differentially expressed miRNAs were detected by miRNA array. Real-time PCR was applied to verify the reliability of miRNA array results. **Results:** miRNA array results showed that 32 miRNAs were up-regulated more than 2.3 folds and 10 miRNAs were down-regulated more than 2 folds in colorectal cancer tissues compared with those in normal adjacent colorectal tissues. And the real-time PCR results were in accordance with the miRNA array results. **Conclusion:** The miRNA differential expression profile of colorectal cancer is obtained, which might relate with the pathogenesis and development of colorectal cancer.

【Key words】miRNA array; colorectal cancer; microRNAs

结直肠癌是一种常见的高危害消化道恶性肿瘤,是发病率和致死率均居前列的恶性肿瘤,严重影响人们的生活质量^[1]。在我国结直肠癌的发病率也呈逐年上升的趋势,然而对于结直肠癌发生发展的分子机制目前尚不清楚。microRNA(miRNA)是一类长度在 22 nt 左右的内源非编码小 RNAs,广泛存在于动植物、病毒等多种有机体中^[2-3],多项研究表明,miRNA 能够通过作用于相应靶 mRNA,调控癌基因和抑癌基因的表达,参与到肿瘤细胞增殖、

分化、迁移、新血管生成、蛋白裂解以及细胞凋亡等多种生物程序的调控中^[4],决定着肿瘤细胞的恶性特征。本研究采用 miRNA 芯片技术筛选结直肠癌与癌旁正常组织差异表达的 miRNA,并对差异表达的 miRNA 进行 real-time PCR 验证,为进一步研究 miRNA 在结直肠癌发生、发展中的作用机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集宁夏医科大学总医院结直肠外科 2011 年 1 月 1 日至 2011 年 12 月 31 日经手术切除的结直肠癌标本 24 例。男 12 例,女 12 例。患者年龄 45~80 岁,中位年龄 58 岁,肿瘤分级采用世界卫生组织 1990 年的分级标准分为:高分化 5 例,中分化 14 例,低分化 5 例。肿瘤分期根据国际抗癌联盟 1997

作者介绍:严秀蕊,Email:yanxiurui-2007@sina.com,

研究方向:结直肠肿瘤干细胞。

通信作者:杨银学,Email:fybqsh674@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81260309);宁夏自然科学基金资助项目(编号:NZ13152);宁夏医科大学校级资助项目(编号:XZ2011001)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000053.html

年的 TNM 分期,为 I 期 4 例,II 期 9 例,III 期 8 例,IV 期 3 例。于术后 30 min 内采集结直肠癌组织,同时取癌旁正常组织作为对照(距肿瘤边缘>5 cm),迅速置于液氮中保存。所有患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 miRNeasy Mini Kit(货号:217004)购自 QIAGEN 公司;荧光定量检测试剂盒(货号:K0221)及反转录试剂盒(货号:K1621)购自 Fermentas 公司;miRNA 芯片由北京博奥生物有限公司完成;所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 组织总 RNA 的提取 迅速从液氮中取出组织样本,在电子天平中称重约 0.3~0.5 g,放入用液氮预冷的研钵中进行研磨,边研磨边加液氮,至组织块磨成粉末状,将粉末转至 1.5 ml 离心管中,按照 RNA 提取试剂盒操作步骤提取总 RNA。

1.3.2 miRNA 芯片杂交及数据分析 芯片杂交及数据分析实验均由北京博奥生物有限公司完成。芯片实验采用人 miRNAV 18.0 芯片及相应的检测试剂盒,该芯片包括 1 887 个人类 miRNA。具体步骤:100 ng 总 RNA 经 Cy3 荧光标记后,在安捷伦杂交仪中与 miRNAV 18.0 芯片杂交 20 h(55 °C,20 r/min),随后芯片利用 GE 洗脱液 1 和 GE 洗脱液 2 室温各洗 5 min,最后用芯片扫描仪进行扫描。为保证结果的重复性和可靠性,作者将 10 例不同病人来源的肿瘤组织样本及相对的正常组织样本的 RNA 分别等量混合,分别用 3 张芯片重复进行实验。

1.3.3 逆转录反应 按照逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应,RNA 的量为 200 ng,加入特异性逆转录引物(1 μmol/L)1 μl,加无菌水至总体积为 12 μl,65 °C 孵育 5 min,放置冰上预冷 2 min。加入 5 × 5 × RT 4 μl,RiboLock RNase 抑制剂 1 μl,10 mmol/L dNTP 2 μl,RevertAid M-MuLV 反转录酶 1 μl,至总体积为 20 μl,25 °C 5 min,42 °C 60 min,70 °C 5 min,置-20 °C 保存备用(部分逆转录引物序列见表 1)。

1.3.4 Real-time PCR 采用 SYBR green 法检测成熟 miRNA 的表达水平。miRNA 的 cDNA 合成采用特异性颈环引物,反转录相关操作按照试剂盒说明书操作。20 μl RT-PCR 反应体系:1 μl 模板(逆转录产物),1 μl 引物混合物(10 μmol/L),10 μl 2 × SYBR green,8 μl 水。反应条件:95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,40 个循环;60 °C~95 °C 绘制溶解曲线,以 U6 为内参基因,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (C_t 代表循环阈值)表示基因的表达量,以结直肠癌周围正常组织作对照(部分引物序列见表 1)。

$$\Delta\Delta Ct = (C_{t\text{目的基因}} - C_{tU6})_{\text{结直肠癌组织}} - (C_{t\text{目的基因}} - C_{tU6})_{\text{正常组织}}$$

1.4 统计学方法

应用 SPSS 11.0 统计软件处理数据,real-time PCR 数据为计量资料,采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

表 1 部分用于 miRNA real-time PCR 的引物

Tab.1 Some primers used to perform real-time PCR

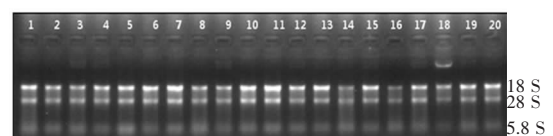
of microRNAs	
引物	引物序列(5' → 3')
miR-18a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGATACGACetactct
miR-18a-F	CGTTAAGGTGCATCTAGTGCAGA
miR-96-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGATACGACagcaaa
miR-96-F	GCTTTGGCACTAGCACATTTTT
miR-363-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGATACGACtacaga
miR-363-F	CGAATTGCACGGTATCCATCT
miR-99a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG
miR-99a-F	CACTGGATACGACcacaag
General primers R	CGAACCCGTAGATCCGATCTT GTGCAGGGTCCGAGGT
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

注:小写部分提取 miRNA 最后 6 个碱基互补的序列;只有这 6 个碱基是专门为 miRNA 准备的,而引物的其他碱基序列都是通用的,这一大段额外增加的茎环结构固定序列是为了提高 PCR 的熔解温度

2 结果

2.1 总 RNA 提取及质量鉴定

按照 QIAGEN 公司的 RNA 提取说明书分别提取 10 例结直肠癌样本及结直肠正常样本的总 RNA,其总 RNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 之值均在 1.8~2.0 之间。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳条带清楚,符合 miRNA 芯片的质量要求(图 1)。



单数为结直肠癌组织;双数为结直肠正常组织

图 1 结直肠癌组织及正常组织总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoregram of total RNA of the colorectal cancer tissues and normal tissues

2.2 miRNA 芯片结果分析

将 10 例结直肠癌组织及正常结直肠组织的 RNA 分别等量混合进行 miRNA 芯片杂交。结果显示在结直肠癌及其相邻的正常结直肠组织中共发现 293 个差异表达的 miRNA,其中,表达上调的 166 个(其中 2.3 倍以上的 32 个),表达下调的 127 个(其中 2 倍以上的 10 个)。具体见表 2 和表 3。

2.3 Real-time PCR 与 miRNA 芯片结果比较

为检测芯片结果的真实可靠性,从芯片结果中选取 9 个表达上调(miR-17、miR-18a、miR-18b、miR-21、miR-29b、miR-

96、miR-130b、miR-552、miR-592)和6个表达下调(miR-1、miR-133b、miR-145、miR-363、miR-99a、miR-486)的 miRNA,

表 2 结直肠癌组织中差异表达上调 2.3 倍以上的 miRNA 列表
Tab.2 List of up-regulated miRNA for more than 2.3 folds in colorectal cancer tissues

miRNA名称	差异倍数	miRNA名称	差异倍数
hsa-miR-592	7.524 871 0	hsa-miR-135a ^a	2.938 509 7
hsa-miR-622	5.764 109 0	hsa-miR-17	2.922 269 3
hsa-miR-18b	5.668 321 6	hsa-miR-141 ^a	2.876 060 7
hsa-miR-18a	5.660 198 0	hsa-miR-130b	2.823 839 4
hsa-miR-501-3p	5.599 323 0	hsa-miR-K12-12 ^a	2.805 359 0
hsa-miR-552	5.152 094 4	hsa-miR- H6 ^a	2.721 798 2
hsa-miR-1290	4.656 349 0	hsa-miR-494	2.719 422 3
hsa-miR-17 ^a	3.932 550 4	hsa-miR-29b-1 ^a	2.687 465 4
hsa-miR-7	3.894 176 5	hsa-miR-663	2.665 016 2
hsa-miR-96	3.828 044 0	hsa-miR-20 ^a	2.633 813 9
hsa-miR-424	3.673 376 3	hsa-miR-19 ^a	2.591 888 0
hsa-miR-221	3.600 232 8	hsa-miR-1972	2.491 519 2
hsa-miR-183	3.553 175 0	hsa-miR-93	2.391 813 3
hsa-miR-224	3.434 613 0	hsa-miR-4257	2.388 053 4
hsa-miR-1246	3.363 254 3	hsa-miR-505 ^a	2.362 489 2
hsa-miR-483-5p	2.968 716 0	hsa-miR-21	2.324 489 0

注:a,1个 miRNA 前体的 2 个臂分别加工产生 miRNA 时则表达水平较低的 miRNA

表 3 结直肠癌组织中差异表达下调 2 倍以上的 miRNA 列表
Tab.3 List of down-regulated miRNA for more than 2 folds in colorectal cancer tissues

miRNA名称	差异倍数	miRNA名称	差异倍数
hsa-miR-133b	0.217 555 981	hsa-miR-145 ^a	0.340 185 309
hsa-miR-1	0.217 903 422	hsa-miR-218	0.381 767 795
hsa-miR-145	0.274 173 262	hsa-miR-486-5p	0.398 469 621
hsa-miR-99a	0.316 533 664	hsa-miR-195	0.416 909 260
hsa-miR-363	0.338 373 337	hsa-miR-497	0.470 901 311

注:a,1个 miRNA 前体的 2 个臂分别加工产生 miRNA 时则表达水平较低的 miRNA

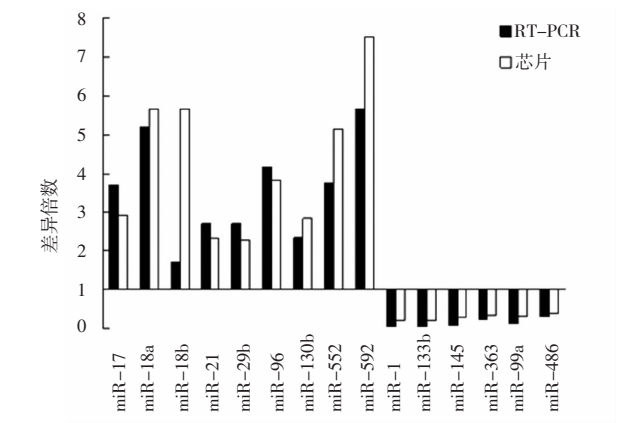


图 2 Real-time PCR 与芯片结果比较
Fig.2 Comparison of results between miRNA microarray and real-time PCR

采用 real-time PCR 技术在 10 例结直肠癌组织样本等量混合的 RNA 及 10 例结直肠正常组织样本等量混合的 RNA 中对芯片结果进行初步验证。结果显示,所选 miRNA 在芯片结果中的表达均与 real-time PCR 表达情况一致(图 2),说明本研究的芯片结果基本真实可靠。

2.4 Real-time PCR 对部分差异表达的 miRNA 进行进一步验证

将上调表达的 miR-18a、miR-96 及下调表达的 miR-99a、miR-363 在 14 例结直肠癌组织及结直肠正常组织样本中进一步进行 real-time PCR 验证,结果显示:miR-18a 在 78.6%(11/14)的肿瘤组织样本中的表达高于癌旁正常组织,差异无统计学意义($t=2.022, P=0.064$)。miR-96 在 92.86%(13/14)的结直肠癌组织样本中的表达高于癌旁正常组织,差异具有统计学意义($t=2.546, P=0.024$)。miR-99a 在 100%(14/14)的结直肠癌组织样本中的表达低于癌旁正常组织,差异具有统计学意义($t=-21.1, P=0.000$)。miR-363 在 100%(14/14)的结直肠癌组织样本中的表达低于癌旁正常组织,差异具有统计学意义($t=-24.8, P=0.000$)。具体结果见表 4 和表 5。

表 4 4 个 miRNAs 在 14 例结直肠癌组织样本中的表达情况
Tab.4 Expression of 4 miRNAs in 14 different colorectal cancer tissues

样本	miRNA 的相对表达情况							
	miR-18a		miR-96		miR-99a		miR-363	
	正常组织	癌组组织	正常组织	癌组组织	正常组织	癌组组织	正常组织	癌组组织
1	1	5.190	1	4.160	1	0.120	1	0.230
2	1	0.900	1	2.030	1	0.370	1	0.320
3	1	2.500	1	1.858	1	0.047	1	0.110
4	1	35.885	1	22.548	1	0.010	1	0.039
5	1	1.149	1	3.656	1	0.260	1	0.032
6	1	17.991	1	9.830	1	0.018	1	0.022
7	1	1.174	1	4.424	1	0.080	1	0.026
8	1	4.604	1	11.694	1	0.161	1	0.454
9	1	8.684	1	53.900	1	0.496	1	0.172
10	1	0.336	1	6.480	1	0.018	1	0.004
11	1	4.056	1	3.926	1	0.063	1	0.044
12	1	2.649	1	39.390	1	0.309	1	0.068
13	1	0.939	1	2.524	1	0.079	1	0.028
14	1	1.395	1	0.219	1	0.072	1	0.114

3 讨论

近年来结直肠癌的发病率和致死率逐年增高,其通常会转移到身体的其他部位从而加重肿瘤的恶化,例如会转移到淋巴结、肝脏、卵巢等^[5]。临床研究表明,在大肠癌发病初期患者没有明显的临床症状,因此常常不能早期诊断,而待症状出现时已是

表 5 4 个 miRNA 在 14 例结直肠癌组织及正常组织中表达水平的分析
Tab.5 Expression of 4 miRNAs in 14 different colorectal cancer tissues and normal tissues

分组	样本数 (n)	miR-18a 相对表达量	t 值	P 值	miR-96 相对表达量	t 值	P 值	miR-99a 相对表达量	t 值	P 值	miR-363 相对表达量	t 值	P 值
癌	14	6.25 ± 2.59	2.022	0.064	11.91 ± 4.28	2.546	0.024	0.15 ± 0.04	-21.1	0.000	0.12 ± 0.04	-24.8	0.000
正常	14	1			1			1			1		

中晚期,这时原发肿瘤切除后复发的概率和肿瘤转移的概率均大大提高,同时伴有明显的对化疗和放疗的耐药性,由此导致高的死亡率。因此,如何在肿瘤前期准确诊断与预防是结直肠癌获得最佳疗效的关键。

miRNA能够调控基因的表达,因此被认为是维持细胞生长增殖平衡的关键调控者。Volinia 等^[6]在研究中发现实体瘤组织和正常组织中 miRNA 的表达存在显著差异,说明 miRNA 可能在肿瘤的发生发展中起到了关键作用。目前已经发现许多 miRNA 在肿瘤中被上调或下调表达,例如 miR-100^[7]、miR-155^[8]、let-7^[9]、miR-145^[10]等,miRNA 的表达异常通常会导致癌基因和抑癌基因的表达失衡,因此诱发肿瘤。除了调控基因的表达外,亦有研究证实 miRNA 本身也可以作为癌基因如 miR-17-92^[11]或抑癌基因如 let-7^[12]而成为肿瘤治疗的靶标。

本研究结果显示,与结直肠癌旁正常组织相比,有 293 个 miRNA 在结直肠癌组织中的表达发生变化,其中 32 个在结直肠癌组织中表达上调 2.3 倍以上,10 个在结直肠癌组织中表达下调 2 倍以上。进一步的实时定量 RT-PCR 结果也已证实在 14 例结直肠癌组织样本中,miR-18a 和 miR-96 在大多数结直肠癌组织样本中均表达上调,而 miR-99a 和 miR-363 在 14 例结直肠癌组织样本中均表达下调,由此说明 miRNA 芯片能够较准确的反映各 miRNA 在肿瘤样本中的表达情况。Hafliadóttir 等^[13]在其研究中已证实 miR-96 在前列腺癌中高表达,其通过负调控 FOXO1 的表达而在前列腺癌细胞的增殖和肿瘤发展中起到重要的作用。Sun 等^[14]在 2013 年也首次证实 miR-363 在向淋巴结转移的头颈部鳞癌组织以及高侵袭能力的肿瘤细胞系中均下调表达且其通过负调控 PDPN 从而影响肿瘤细胞的侵袭和迁移。这些研究报道中 miRNA 的表达趋势与本研究中相一致,由此说明 miR-96、miR-363 等在本芯片结果中差异表达的 miRNA 在结直肠癌的发展过程中也一定起到了重要的调控作用。因此,本项目的实验结果将为进一步研究结直肠癌发生发展过程

中重要 miRNA 的功能奠定实验基础,为结直肠癌的预防、诊断和治疗提供依据。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130.
- [2] Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs: at the root of plant development? [J]. Plant Physiology, 2003, 132(2): 709-717.
- [3] Lim LP, Glasner ME, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes[J]. Science, 2003, 299(5612): 1540.
- [4] Blenkinson C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(1): 106-113.
- [5] Lash RH, Hart WR. Intestinal adenocarcinomas metastatic to the ovaries. a clinicopathologic evaluation of 22 cases[J]. Am J Surg Pathol, 1987, 11(2): 114-121.
- [6] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [7] Zheng YS, Zhang H, Zhang XJ, et al. MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia[J]. Oncogene, 2012, 31(1): 80-92.
- [8] Ling N, Gu J, Lei Z, et al. microRNA-155 regulates cell proliferation and invasion by targeting FOXO3a in glioma[J]. Oncol Rep, 2013, 30(5): 2111-2118.
- [9] Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, et al. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(24): 11612-11620.
- [10] Xu Q, Liu LZ, Qian X, et al. MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(2): 761-774.
- [11] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene[J]. Nature, 2005, 435(7043): 828-833.
- [12] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [13] Hafliadóttir BS, Larne O, Martin M, et al. Upregulation of miR-96 enhances cellular proliferation of prostate cancer cells through FOXO1 [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72400.
- [14] Sun Q, Zhang J, Cao W, et al. Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(3): 513-520.

(责任编辑: 关蕴良)