

· 论 著 ·

大肠癌中 miRNA-20a 的表达与 TNM 分期和淋巴结转移相关性研究

马群英¹, 江美玲¹, 马凤丽¹, 李 钊¹, 许岸高^{2△}

(1. 南方医科大学附属南方医院胃肠科, 广州 510515; 2. 惠州市第一人民医院/惠州市医学研究所 516001)

摘要:目的 分析 miRNA-20a 在大肠癌中的表达及其与临床病理特征的关系。方法 选择 52 例肠癌患者的手术标本(癌组织及其癌旁组织)提取总 RNA, 采用 TaqMan 探针逆转、实时定量 PCR 检测 miRNA-20a 在大肠癌及其癌旁正常组织中的表达量, 并分析其与临床病理特征关系。结果 肠癌组织 miRNA-20a 表达量为 2.05(0.046~10.274), 与癌旁正常组织相比显著上调($Z=-3.597, P=0.000$); miRNA-20a 的表达与 TNM 分期($T=3.223, P=0.001$)相关, TNM 分期越高, miRNA-20a 表达越高; miRNA-20a 也与淋巴结转移相关($Z=-2.141, P=0.037$), 淋巴结转移患者 miRNA-20a 表达增加。miRNA-20a 表达与性别、年龄、肿瘤位置和组织分化无关。结论 miRNA-20a 表达上调可能与大肠癌的发生及其转移有关。

关键词: 肠肿瘤; miRNA-20a; TNM 分期

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.36.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)36-3809-03

A correlation research of the expression of miRNA-20a and TNM staging in colorectal cancer and the lymph node metastasis

Ma Qunying¹, Jiang Meiling¹, Ma Fengli¹, Li Zhao¹, Xu Angao^{2△}

(1. Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Huizhou Medicine Institute, the First Hospital of Huizhou, Huizhou, Guangdong 516001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of miRNA-20a in colorectal cancer and its relation with clinical pathology features. **Methods** Total RNA were extracted from 52 paired colorectal cancer(CRC) tissues and para cancer normal tissues which were excised surgically. miRNA-20a was detected by real time PCR with TaqMan probe. Then, the clinical significance of miRNA-20a was analyzed. **Results** The expression level of miRNA-20a in CRC tissues was 2.05(0.046-10.274), which was significantly higher than para cancer normal tissues($Z=-3.597, P=0.000$); and the expression of miRNA-20a was correlated with TNM staging($T=3.223, P=0.001$), tissues with higher TNM stages expressed higher miRNA-20a. miRNA-20a levels were also related to lymph node invasion($Z=-2.141, P=0.037$), tissues with positive node invasion expressed higher miRNA-20a. No significant correlation was found between miRNA-20a and gender, age, tumor site and tissue differentiation. **Conclusion** The upregulation of miRNA-20a might play a role in tumorigenesis and metastasis of colorectal cancer.

Key words: intestinal neoplasms; miRNA-20a; TNM staging

大肠癌是世界上第三大肿瘤,也是导致肿瘤性死亡的第三大原因,其年新发病例大约为 100 万,年病死人数超过 50 万^[1]。近年来,由于中国人民生活方式、饮食结构、环境因素等的改变,大肠癌的发病率及病死率呈逐年上升趋势。因而对大肠癌发生、发展机制的进一步研究,以寻求新的诊断及治疗靶标十分必要。microRNAs(miRNAs)是近年来发现的长约 21~25 nt 单链 RNA,它通过与靶 mRNA 不完全互补配对抑制蛋白翻译,在基因表达调控包括肿瘤形成和发展中扮演重要角色^[2],它的出现让人们看到了大肠癌的诊断和治疗的新曙光。本文通过探针法逆转、实时定量 PCR 检测 52 例肠癌中 miRNA-20a 的表达,分析其与分期及其临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择惠州中心医院 52 例大肠癌患者外科手术切除的新鲜肠癌组织及其相应癌旁正常组织,术后经病理检查确诊。组织获得后立即置于-80℃超低温冰箱。所有患者术前均未行放疗、化疗与免疫治疗。其中,男 25 例,女 27 例;年龄 28~84 岁,平均 59.9 岁。TNM 分期以美国癌症联合委员会(AJCC)/国际抗癌联盟(UICC)结直肠癌 TNM 分期系统(第 6 版)为标准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 TRIzol 试剂购自 Invitrogen, miRNA-20a RT Primer, miRNA-20a Real time, U6 RT Primer, U6 Real time, 2×PCR TaqMan Universal PCR, TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit 均购自 ABI 公司。

1.2.2 组织总 RNA 提取 -80℃超低温冰箱保存组织(30 mg),于冰上碾磨器磨碎,加入 1 mL TRIzol 试剂,按说明书操作提取总 RNA, Nanodrip (ND-1000, USA) 检测 RNA 溶液 $A_{260/280\text{ nm}}$ 比值及浓度,取 $A_{260/280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.1 者进一步试验。

1.2.3 cDNA 合成及实时定量 PCR 检测 取 100 ng 总 RNA 按试剂说明书操作逆转录 cDNA;反应条件:16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min。然后按 2×PCR TaqMan Universal PCR 试剂盒说明,以 miRNA-20a 和 U6 第一链为模板,用 miRNA-20a 和 U6 荧光探针为引物扩增。以上荧光 PCR 检测均在 ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, USA) 型荧光定量 PCR 仪操作完成,所有反应设立 3 个复孔,检测方法为相对定量分析 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。根据 Q-Q 图、偏峰度计算和 Kolmogorov-SmiRnov 检验(D 检验)推断数据不符合正态分布,数据均采用非参数检验,数据以中位

△ 通讯作者, Tel:13809667663; E-mail: angao62@21cn.com。

数(25%分位数至 75%分位数)表示。配对资料采用配对资料的 *wilcoxon* 符号秩和检验(*wilcoxon signed-rank test*), miRNAs 与其他临床病理资料的检验组间比较采用 *Mann-whitney* 检验,分析 miRNAs 与等级变量相关关系采用 *Jonchheere-Terpstra* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miRNA-20a 在肠癌组织中高表达 采用 TaqMan 探针法实时定量 PCR 检测 miRNA-20a 表达,以 U6 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析肠癌组织相对癌旁正常组织的相对表达量。miRNA-20a 在 65%(34/52)的肠癌组织中高表达;与癌旁正常组织比较,miRNA-20a 在肠癌组织中的相对表达量为 2.05,高于癌旁正常组织(图 1),差异有统计学意义($Z = -3.597, P = 0.000$)。

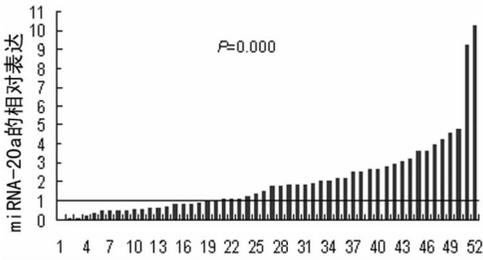


图 1 miRNA-20a 在大肠癌中的表达

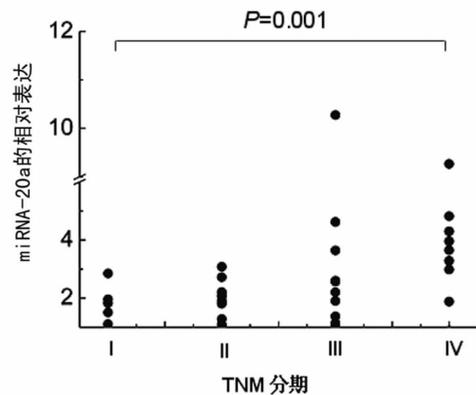


图 2 miRNA-20a 在不同 TNM 分期中的表达

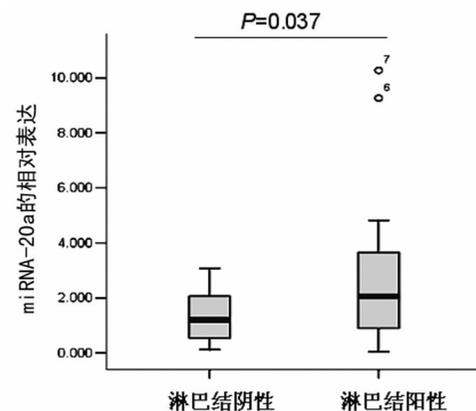


图 3 miR-20 在淋巴结阴/阳性组织中的表达

2.2 miRNA-20a 表达水平与 TNM 分期和淋巴结转移相关 miRNA-20a 的表达在 TNM 不同分期中表达差异有统计学意义($T = 3.223, P = 0.001$)。随着 TNM 分期越高,miRNA-20a 表达越高(图 2,表 1)。有淋巴结转移肠癌组织中 miRNA-20a 表达明显高于无淋巴结转移者($Z = -2.141, P = 0.037$) (图 3,表 1)。miRNA-20a 表达和性别、年龄、肿块位置、组织

分化程度无关,见表 1。

表 1 大肠癌中 miRNA-20a 的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	miRNA-20a 表达 ¹	Z/T 统计量	P
总例数	52	1.67(0.66~2.72)	-3.597	0.000
性别				
男	25	1.91(0.67~2.66)	-0.156	0.876
女	27	1.51(0.64~3.29)		
年龄(岁)				
<65	35	1.88(0.66~2.72)	-0.458	0.647
≥65	17	1.14(0.73~2.46)		
肿瘤位置 ²				
近端结肠	5	2.72(1.13~3.00)	0.838	0.941
远端结肠及直肠	47	1.51(0.64~2.60)		
组织分化程度				
高分化	16	1.84(0.63~3.02)	-0.216	0.829
高中分化	15	0.89(0.56~1.90)		
中分化	15	2.01(1.09~2.60)		
低分化	6	3.31(0.65~4.23)		
病理 TNM 分期				
I	13	0.92(0.36~1.67)	3.223	0.001
II	15	1.89(0.55~2.34)		
III	16	1.26(0.72~2.59)		
IV	8	3.65(2.43~4.56)		
淋巴结浸润				
阴性	26	1.20(0.53~2.07)	-2.141	0.032
阳性	26	2.05(0.89~3.73)		

1: miRNAs 相对表达的中位数,括号中表示 25%及 75%百分位数;2:以结肠脾曲为界分为近端结肠及远端结肠。

3 讨 论

一种 miRNAs 可以调节多种靶基因,同一靶基因也可通过不同 miRNAs 调节,同时,miRNAs 也可被各种调节因子所调节,miRNAs 调节因子、miRNAs 及其靶基因构成了错综复杂的基因调节网络,而肿瘤中差异表达的 miRNAs 也可通过交叉的网络促进肿瘤的发生、发展。miRNAs 的发现及其研究的深入,为了解复杂的基因网络调控机制开辟了新的领域,也为癌症的早期筛查、诊断、治疗等方面提供新的理论基础及方法。

miRNA-20a 是 miRNA-17-92 家族一员,其在不同肿瘤中作用不同。miRNA-20a 在前列腺癌,尤其是低分化前列腺癌中表达较高^[3-4],前列腺癌细胞系过表达 miRNA-20a 后凋亡减少;miRNA-20a 也可通过调节 Fas 表达增加骨肉瘤细胞转移能力^[5];miRNA-20a 还可调节淀粉样前蛋白促进卵巢癌细胞增殖和侵袭^[6]。以上研究证实 miRNA-20a 具有致癌作用,同时,miRNA-20a 也具有抑癌作用。miRNA-20a 过表达可抑制胰腺癌细胞增殖和转移^[7];miRNA-20a 在乳腺癌细胞中表达降低,可抑制细胞侵袭及转移^[8],乳腺癌术后 miRNA-20a 表达下降^[9],还可通过下调 Cyclin D1 表达而抑制乳腺癌细胞增殖和克隆形成^[10]。因而 miRNAs 在不同基因背景中作用不同,

一种 miRNA 在某一癌症中作用需结合组织表达、生存分析及细胞动物实验等验证,以确定其促癌或抑癌作用,从而为将来临床治疗应用等提供理论指导。

本研究证实 miRNA-20a 在肠癌中表达增加,与癌旁正常组织相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。有研究证实 miRNA-20a 在肠癌组织的高表达^[11-13],与本研究结果一致。同时,本研究结果表明肠癌组织中 miRNA-20a 还与 TNM 分期和淋巴结转移相关,说明 miRNA-20a 可能参与调节大肠癌转移过程。且有文献报道 miRNA-20a 高表达与生存期降低有关^[14];敲低 SW620 细胞中 miRNA-20a 可增加化疗敏感性,而过表达 SW480 中 miRNA-20a 可导致化疗抵抗^[15]。可见,miRNA-20a 在大肠癌中的作用文献报道趋于一致,即 miRNA-20a 在大肠癌中高表达,与患者生存期及化疗抵抗有关,在大肠癌中可能具有促癌作用。

参考文献:

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Hurst LD. Preliminary assessment of the impact of microRNA-mediated regulation on coding sequence evolution in mammals[J]. *J Mol Evol*, 2006, 63(2): 174-182.
- [3] Pesta M, Klecka J, Kulda V, et al. Importance of miRNA-20a expression in prostate cancer tissue[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3579-3583.
- [4] Li X, Pan JH, Song B, et al. Suppression of CX43 expression by miRNA-20a in the progression of human prostate cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(10): 890-898.
- [5] Huang G, Nishimoto K, Zhou Z, et al. miRNA-20a Encoded by the miR-17-92 Cluster Increases the Metastatic Potential of Osteosarcoma Cells by Regulating Fas Expression[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(4): 908-916.
- [6] Fan X, Liu Y, Jiang J, et al. miRNA-20a promotes proliferation and invasion by targeting APP in human ovarian cancer cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2010, 42(5): 318-324.
- [7] Yan H, Wu J, Liu W, et al. MicroRNA-20a overexpression inhibited proliferation and metastasis of pancreatic carcinoma cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(12): 1723-1734.
- [8] Yu Z, Willmarth NE, Zhou J, et al. microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(18): 8231-8236.
- [9] Schwarzenbach H, Milde-Langosch K, Steinbach B, et al. Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134(3): 933-941.
- [10] Yu Z, Wang C, Wang M, et al. A Cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation[J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(3): 509-517.
- [11] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. *JAMA*, 2008, 299(4): 425-436.
- [12] Yantiss RK, Goodarzi M, Zhou XK, et al. Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2009, 33(4): 572-582.
- [13] Luo X, Burwinkel B, Tao S, et al. MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(7): 1272-1286.
- [14] Valladares-Ayerbes M, Blanco M, Haz M, et al. Prognostic impact of disseminated tumor cells and microRNA-17-92 cluster deregulation in gastrointestinal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(5): 1253-1264.
- [15] Chai H, Liu M, Tian R, et al. miRNA-20a targets BNIP2 and contributes chemotherapeutic resistance in colorectal adenocarcinoma SW480 and SW620 cell lines[J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2011, 43(3): 217-225.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)

(上接第 3808 页)

- [1] Hum, *Reprod*, 2004, 19(1): 41-47.
- [2] Cagnacci A, Tirelli A, Renzi A, et al. Effects of two different oral contraceptives on homocysteine metabolism in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Contraception*, 2006, 73(4): 348-351.
- [3] 郑峥, 唐雪莲, 张犁. 二甲双胍与复方醋酸环丙孕酮对多囊卵巢综合征患者内分泌、糖及脂代谢的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(25): 3496-3498.
- [4] 甄然, 马良坤, 郁琦. 二甲双胍治疗多囊卵巢综合征的新进展[J]. *疑难病杂志*, 2007, 6(1): 55-57.
- [5] 谢铁男, 岳瑛. 多囊卵巢综合征胰岛素抵抗研究进展[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2010, 36(2): 424-428.
- [6] 吕立群, 刘义. 联合应用复方醋酸环丙孕酮和二甲双胍治疗多囊卵巢综合征[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2004, 33(2): 189-191.
- [7] Gambineri A, Pelusi C, Genghini S, et al. Effect of flutamide and metformin administered alone or in combination in dieting obese women with polycystic ovary syndrome[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2004, 60(2): 241-249.
- [8] Rautio K, Tapanainen JS, Ruokonen A, et al. Effects of metformin and ethinyl estradiolcyproterone acetate on lipid levels in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome[J]. *Eur J Endocrinol*, 2005, 152(2): 269-275.
- [9] 谢建萍. 罗格列酮和二甲双胍治疗胰岛素抵抗多囊卵巢综合征的对照研究[J]. *海峡药学*, 2011, 23(9): 84-86.
- [10] 罗文群, 熊员焕, 涂灵. 多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗先兆流产的病因研究[J]. *实用临床医学*, 2011, 12(8): 68-70, 72.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-09-22)