

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.35.005

miR-29b 和 Tiam1 在结肠癌中的表达及其临床意义*

舒若,田衍,曾玉剑,罗华友,李颖[△]

(昆明医科大学第一附属医院胃肠与疝外科,昆明 650032)

[摘要] **目的** 检测结肠癌组织和癌旁正常组织中 microRNA-29b(miR-29b)、Tiam1 的表达并探讨其与结肠癌临床分期和淋巴结转移的关系。**方法** 收集 30 例结肠癌组织和癌旁组织标本,利用实时荧光定量 PCR 检测 miR-29b、Tiam1 mRNA 的表达,并对二者进行相关性分析及其与临床病理的关系。**结果** miR-29b 在结肠癌组织(0.50 ± 0.27)比其在癌旁组织(1.00 ± 0.00)中的表达低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 Tiam1 mRNA 在结肠癌组织(4.22 ± 2.13)比其在癌旁组织(1.00 ± 0.00)中的表达高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-29b 与 Tiam1 mRNA 水平呈显著负相关($r = -0.869, P < 0.01$)。Ⅲ和Ⅳ期结肠癌组织中 miR-29b (0.23 ± 0.08)的表达水平明显低于Ⅰ和Ⅱ期结肠癌($0.69 \pm 0.18, P < 0.05$),而Ⅲ和Ⅳ期结肠癌组织中 Tiam1 mRNA(6.10 ± 1.86)的表达水平明显高于Ⅰ和Ⅱ期结肠癌($2.97 \pm 1.15, P < 0.05$)。miR-29b 在有淋巴结转移结肠癌组织的表达明显低于无淋巴结转移者,Tiam1 mRNA 表达与其相反。**结论** miR-29b 和 Tiam1 可以成为结肠癌潜在的诊断标志物。

[关键词] 结肠肿瘤;miR-29b;T 淋巴细胞浸润转移诱导因子;聚合酶链反应

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)35-4459-04

Expression of miR-29b and Tiam1 in colorectal cancer and their clinical significances*

SHU Ruo, TIAN Yan, ZENG Yujian, LUO Huayou, LI Ying[△]

(Department of Gastrointestinal and Hernia Surgery, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression levels of microRNA-29b (miR-29b) and Tiam1 in colorectal cancer tissues and cancer adjacent normal tissues and investigate their relationship with colonic cancer clinical stages and lymph node metastasis. **Methods** Thirty cases of colorectal cancer tissues and cancer-adjacent tissues samples were collected. The expressions of miR-29b and Tiam1 mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (q-PCR). The correlation between miR-29b and Tiam1, as well as their correlations with the clinical pathology were analyzed. **Results** The expression level of miR-29b in colorectal cancer tissues was significantly lower than that in the cancer-adjacent tissues, the difference was statistically significant [(0.50 ± 0.27) vs. $(1.00 \pm 0.00), P < 0.05$], while the expression level of Tiam1 mRNA in the colorectal cancer tissues was significantly higher than that in the cancer-adjacent tissues [(4.22 ± 2.13) vs. $(1.00 \pm 0.00), P < 0.05$]. Moreover, the miR-29b expression level was negatively correlated with the Tiam2 mRNA expression level ($r = -0.869, P < 0.01$). Furthermore, the expression level of miR-29b in the stage Ⅲ and Ⅳ colorectal cancer tissues was significantly lower than that in stage Ⅰ and Ⅱ [(0.23 ± 0.08) vs. $(0.69 \pm 0.18), P < 0.05$], while the expression level of Tiam1 mRNA in the stage Ⅲ and Ⅳ of colorectal cancer tissues was significantly higher than that in the stage Ⅰ and Ⅱ [(6.10 ± 1.86) vs. $(2.97 \pm 1.15), P < 0.05$]. In addition, the expression level of miR-29b in colorectal tissues with lymph node metastasis was obviously lower than that in colorectal tissues without lymph node metastasis, while the expression level of Tiam1 mRNA showed contrary results. ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-29b and Tiam1 might be the potential diagnostic markers.

[Key words] colorectal neoplasms; miR-29b; Tiam1; polymerase chain reaction

结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,每年约有 600 000 例患者死于结肠癌^[1-2]。尽管在诊断和治疗上取得重大进展,但结肠癌的病死率仍然很高^[3]。转移

是恶性肿瘤的主要生物学行为,也是影响治疗效果和预后的主要原因之一^[4-5]。许多研究表明, microRNA 在癌症进展和转移中发挥重要作用^[6-7]。microRNA

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学联合专项面上项目[2017FE467(-038)];云南省卫计委内设机构项目(2017NS002,2017NS003)。

作者简介:舒若(1976—),主治医师,本科,主要从事胃肠与疝外科工作。 [△] 通信作者,E-mail:873405755@qq.com。

表 1 基因引物序列

基因	上游序列	下游序列
miR-29b	GCGCTAGCACCATTGAAAT	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
Tiam1	AAGACGTACTCAGGCCATGTCC	GACCCAAATGTGCGAGTCAG
U6	CGATACAGAGAAGATTAGCATGGC	
GAPDH	CACTGGCGTCTTACCACCAT	GTGCAGGAGGCATTGCTGAT

是一类片段小的非编码 RNA,能够通过抑制翻译而减少特定靶基因的表达^[8-10]。其中相关研究报道 Mi-croRNA-29b (miR-29b)在结肠癌中低表达,并在癌症转移中发挥重要作用^[11-12]。同时发现 T 淋巴瘤浸润转移诱导因子 1(T lymphoma invasion and metas-tasis including factor 1, Tiam1)是一个鸟嘌呤核苷酸交换因子,能够选择性地激活类似 Rho GTP 酶^[13],在结肠癌中高表达,并且在癌症转移中起着至关重要的作用^[14-15]。生物信息学和分子生物学实验表明 miR-29b 可与 Tiam1 mRNA 的 3'-UTR 结合,直接抑制癌细胞中 Tiam1 的转录后表达,提示 miR-29b 可能 Tiam1 的直接靶基因^[16]。但目前综合分析 miR-29b 和 Tiam1 在结肠癌的表达及其意义鲜有报道。本研究通过检测结肠癌组织和癌旁组织中 miR-29b、Tiam1 mRNA 表达,分析二者相关性,并且观察它们与结肠癌病理特征的关系,以探讨结肠癌的发病机制和发现潜在的药物治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2015 年 6 月至 2017 年 3 月手术切除的结肠癌组织标本及癌旁正常组织(距离癌组织大于 5 cm),手术切除的新鲜标本置于 -80 °C 冰箱保存。标本共计 30 例,其中男 16 例,女 14 例;年龄 42~80 岁,平均(66.87±8.13)岁。参考全国结肠癌协作组结肠癌诊治规范及 AJCC/UICC 的 TNM 分期标准对结肠癌组织进行诊断和分期(I~II 期 18 例,II~IV 期 12 例)^[17]。所有受试者均已签署知情同意书,本研究通过本院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-29b、Tiam1 mRNA 表达水平 提取总 RNA:按照 Trizol 试剂说明书取约 50 mg 组织提取总 RNA,RNase-Free H₂O 溶解 RNA,微量分光光度计检测 RNA 浓度及纯度,然后反转录合成 cDNA,-80 °C 保存备用。采用 Taqman RT-PCR kit 进行 PCR 扩增,检测 miR-29b 以 U6 为内参基因,检测 Tiam1 mRNA 表达水平以 GAPDH 为内参基因。反应体系在 ABIQ6 型实时荧光定量 PCR 仪上进行,测定每个样品的 Ct 值。基因的表达以相对含量 = 2^{-ΔΔCt} 的形式呈现。基因引物序列见表 1。

1.2.2 蛋白免疫印迹检测 Tiam1 的表达 分别取约

250 mg I、II、III、IV 期的结肠癌组织加入 RIPA lysis buffer 提取总蛋白。然后将各样品放入 4 °C 离心机中 12 000 g 离心 15 min,收集上清液。利用 BCA protein assay kit 确定蛋白浓度。为了检测 Tiam1 在不同分期结肠癌组织中的表达,各取 80 μg 的蛋白在 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,75 V 下反应 2 h,然后转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。向 PVDF 膜加入 Tiam1 一抗(Abcam)在 4 °C 过夜孵育后,再加入二抗孵育 2 h,最后加入电化学发光(ECL)发光液在 Alpha Innotech 曝光成像分析。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参蛋白。

1.2.3 观察指标 记录并统计所有参与者临床分期和是否出现淋巴结转移。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件包进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,采用 Pearson 相关系数等分析数,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-29b 与 Tiam1 mRNA 的表达 miR-29b 在结肠癌组织(0.50±0.27)比其在癌旁组织(1.00±0.00)中的表达低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 Tiam1 mRNA 在结肠癌组织(4.22±2.13)比其在癌旁组织(1.00±0.00)中的表达高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 miR-29b 与 Tiam1 mRNA 的相关性分析 将 miR-29b 与 Tiam1 mRNA 在结肠癌组织与癌旁组织中的表达进行相关性分析,结果显示二者表达呈显著负相关($r = -0.869, P < 0.01$),见图 1。

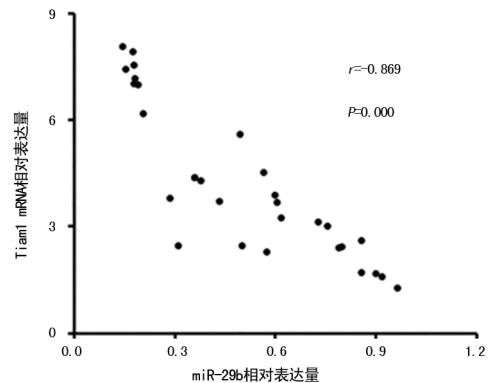


图 1 miR-29b 与 Tiam1 mRNA 表达的相关性

2.3 miR-29b、Tiam1 mRNA 表达与结肠癌主要临床病理特征的关系 在不同临床分期中,miR-29b 和

Tiam1 mRNA 的表达水平表现出不同的趋势。随着临床分期的进展,miR-29b 表达呈下降的趋势,其中 III 期、IV 期结肠癌组织中 miR-29b 的相对表达量为 0.23 ± 0.08 ,明显低于 I 期和 II 期结肠癌 ($0.69 \pm 0.18, P < 0.05$)。随着临床分期的进展,Tiam1 mRNA 表达呈上升的趋势,其中 III 期、IV 期结肠癌组织中 Tiam1 mRNA 的相对表达量为 6.10 ± 1.86 ,明显高于 I 期和 II 期结肠癌 ($2.97 \pm 1.15, P < 0.05$)。并且利用蛋白免疫印迹检测 Tiam1 在不同分期结肠癌组织中的蛋白表达也显示 III 期、IV 期结肠癌组织中 Tiam1 蛋白的相对表达量明显高于 I 期和 II 期结肠癌组织中的表达(图 2)。另外,miR-29b 和 Tiam1 mRNA 表达还显示出与淋巴结转移的密切联系,miR-29b 在有淋巴结转移结肠癌组织的表达明显低于无淋巴结转移者 ($P < 0.05$),而有淋巴结转移结肠癌组织中 Tiam1 mRNA 表达水平明显高于无淋巴结转移者 ($P < 0.05$),见表 2。

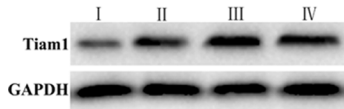


图 2 Tiam1 蛋白在不同分期结肠癌组织中的表达

表 2 miR-29b、Tiam1 mRNA 表达水平与结肠癌临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

项目	n	miR-29b	P	Tiam1	P
临床分期					
I ~ II	18	0.69 ± 0.18	< 0.05	2.97 ± 1.15	< 0.05
III ~ IV	12	0.23 ± 0.08		6.10 ± 1.86	
淋巴结转移					
有	13	0.24 ± 0.09	< 0.05	5.96 ± 1.85	< 0.05
无	17	0.70 ± 0.17		2.90 ± 1.14	

3 讨 论

结肠癌的发生是一个多因素、多阶段和多基因改变协同作用的过程,其发生的分子基础包括癌基因和抑癌基因的表达失调^[18]。研究结肠癌的发病机制,如分子遗传学和生物学的改变,在将来有希望能够改善患者的预后。但是,不幸的是,大多数患者死于其转移性^[19]。因此,研究结肠癌的发生和转移都尤为重要。

最近几年,许多研究表明 microRNAs 通过绑定不同的 mRNAs 在肿瘤发生和转移中发挥重要作用^[20]。到目前为止,在结肠癌中已有许多异常表达的 microRNAs,如 miR-21、miR-124 和 miR-29b 等,并且这些 microRNAs 在结肠癌的发生和进程中起着至关重要的作用^[21-23]。本研究对 30 例结肠癌组织和癌旁正常组织研究发现,结肠癌组织中 miR-29b 表达下降,同时 Tiam1 过表达,二者呈显著负相关。结合相关文献报道及生物信息学分析,推测肠道正常组织

miR-29b 对 Tiam1 的表达呈负向调控。在各种致癌因子的刺激下,miR-29b 对 Tiam1 的负向调控相对较弱,从而使 Tiam1 的表达在病理状态下增加,影响肿瘤的微环境,从而进一步诱导和促进肿瘤细胞的转移。本研究发现,与癌旁正常组织相比,Tiam1 在结肠癌组织中的表达升高,并且 TNM 分期 I 和 II 期结肠癌组织中 miR-29b 的表达水平明显高于 III 和 IV 期结肠癌 ($P < 0.05$),而 TNM 分期 I ~ IV 期结肠癌组织中 Tiam1 表达有上升趋势,即 I 和 II 期结肠癌组织中 Tiam1 mRNA 的表达水平明显低于 III 和 IV 期结肠癌 ($P < 0.05$)。该结果说明 miR-29b 和 Tiam1 可能成为结肠癌临床分期的指标。另外,miR-29b 在有淋巴结转移结肠癌组织的表达明显低于无淋巴结转移者,Tiam1 mRNA 表达与其相反。LIU 等^[14]研究发现 Tiam1 在转移性结肠癌细胞系(LoVo 和 SW620)中的表达明显高于原发性结肠癌细胞系(LS174T, SW480, HCT116, LST, HRT 和 Hee8693)的表达,这说明 Tiam1 基因与转移性结肠癌密切相关。WANG 等^[16]还发现 miR-29b 能够通过下调 Tiam1 和抑制上皮间质转化从而抑制结肠癌细胞的生长和转移。

本文结果提示结肠癌中 miR-29b 表达下降并且伴随 Tiam1 表达上调可能是结肠癌的发病机制之一,miR-29b 和 Tiam1 可以成为结肠癌潜在的诊断标志物。

参考文献

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide; sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5):E359-386.
- [2] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [3] OLIPHANT R, NICHOLSON GA, HORGAN PG, et al. Deprivation and colorectal cancer surgery: longer-term survival inequalities are due to differential postoperative mortality between socioeconomic groups [J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(7):2132-2139.
- [4] PECQUEUX M, LIEBETRAU I, WERFT W, et al. A comprehensive microRNA expression profile of liver and lung metastases of colorectal cancer with their corresponding host tissue and its prognostic impact on survival [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10):E1755.
- [5] YU L N, ZHANG Q L, LI X, et al. Tiam1 transgenic mice display increased tumor invasive and metastatic potential of colorectal cancer after 1,2-dimethylhydrazine treatment [J]. PLoS One, 2013, 8(9):e73077.
- [6] LI J, DU L, YANG Y, et al. MiR-429 is an independent prognostic factor in colorectal cancer and exerts its anti-apoptotic function by targeting SOX2 [J]. Cancer Lett, 2013, 329(1):84-90.
- [7] SCHETTER A J, LEUNG S Y, SOHN J J, et al. MicroR-

- NA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. *JAMA*, 2008,299(4):425-436.
- [8] FILIPOWICZ W, BHATTACHARYYA S N, SONENBERG N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. *Nat Rev Genet*, 2008,9(2):102-114.
- [9] DOENCH J G, SHARP P A. Specificity of microRNA target selection in translational repression [J]. *Genes Dev*, 2004,18(5):504-511.
- [10] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004,116(2):281-297.
- [11] INOUE A, YAMAMOTO H, UEMURA M, et al. MicroRNA-29b is a novel prognostic marker in colorectal cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22 (Suppl 3): S1410-1418.
- [12] BASATI G, RAZAVI A E, PAKZAD I, et al. Circulating levels of the miRNAs, miR-194, and miR-29b, as clinically useful biomarkers for colorectal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016,37(2):1781-1788.
- [13] MICHIELS F, HABETS G G, STAM J C, et al. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion [J]. *Nature*, 1995,375(6529):338-340.
- [14] LIU L, WU D H, DING Y Q. Tiam1 gene expression and its significance in colorectal carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2005,11(5):705-707.
- [15] 陈霞, 张晓波, 邢继强, 等. Tiam1 和 MMP-10 在结肠癌组织中的表达及其与结肠癌浸润转移的关系 [J]. *黑龙江医学科学*, 2011,34(2):58-59.
- [16] WANG B, LI W, LIU H, et al. miR-29b suppresses tumor growth and metastasis in colorectal cancer via downregulating Tiam1 expression and inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell Death Dis*, 2014,5(7):e1335.
- [17] SOBIN L H, FLEMING I D. *TNM Classification of Malignant Tumors*, fifth edition (1997). Union internationale contre le cancer and the American joint committee on cancer[J]. *Cancer*, 1997,80(9):1803-1804.
- [18] 赵公芳, 李旭, 常江, 等. miR-21 在大肠癌与癌旁正常组织中的表达及临床病理意义 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2011,20(10):897-899.
- [19] BUDENHOLZER B. Screening for colorectal cancer[J]. *CMAJ*, 2001,164(7):965-966.
- [20] UEMATSU K, HE B, YOU L, et al. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression[J]. *Oncogene*, 2003,22(46):7218-7221.
- [21] XIA X, YANG B, ZHAI X, et al. Prognostic role of microRNA-21 in colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2013,8(11):e80426.
- [22] ZHANG J, LU Y, YUE X, et al. MiR-124 suppresses growth of human colorectal cancer by inhibiting STAT3 [J]. *PLoS One*, 2013,8(8):e70300.
- [23] POU DYAL D, CUI X, LE PM, et al. A key role of microRNA-29b for the suppression of colon cancer cell migration by American ginseng[J]. *PLoS One*, 2013,8(10):e75034.

(收稿日期:2018-06-11 修回日期:2018-09-16)

(上接第 4458 页)

- [6] 王惠珊, 黄小娜, 蒋竞雄, 等. 中国城市 0~5 岁儿童睡眠时间流行病学调查[J]. *中国儿童保健杂志*, 2006,14(4):354-356.
- [7] 赵妍, 王继林, 甘文玲. 重庆市 0~5 岁儿童睡眠时间及其影响因素的研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2008,23(15):2087-2090.
- [8] IGLOWSTEIN I, JENNI O G, MOLINARI L, et al. Sleep duration from infancy to adolescence: reference values and generational trends[J]. *Pediatrics*, 2003,111(2):302-307.
- [9] 甘文玲, 王继林, 樊欣. 重庆市 0~5 岁儿童睡眠障碍调查分析[J]. *中国妇幼保健*, 2006,21(7):933-936.
- [10] TOUCHETTE E, DIONNE G, FORGET-DUBOIS N, et al. Genetic and environmental influences on daytime and nighttime sleep duration in early childhood [J]. *Pediatrics*, 2013,131(6):e1874-e1880.
- [11] GALLAND B C, TAYLOR B J, ELDER D E. Normal sleep patterns in infants and children: A systematic review of observational studies[J]. *Sleep Med Rev*, 2012,16(3):213-222.
- [12] HISCOCK H, COOK F, BAYER J, et al. Preventing early infant sleep and crying problems and postnatal depression: a randomized trial [J]. *Pediatrics*, 2014,133(2):E346-E354.
- [13] KOUTRA K, VASSILAKI M, GEORGIOU V, et al. Antenatal maternal mental health as determinant of postpartum depression in a population based mother-child cohort (Rhea Study) in Crete, Greece [J]. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 2014,49(5):711-721.
- [14] COOK F, BAYER J, LE H N, et al. Baby business: a randomised controlled trial of a Universal parenting program that aims to prevent early infant sleep and cry problems and associated parental depression [J]. *BMC Pediatr*, 2012,12(1):13.
- [15] 中国婴儿睡眠监测研究组. 婴儿早期喂养方式对睡眠的影响研究 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2012,20(9):779-782.
- [16] JENNI O G, O'CONNOR B B. Children's sleep: an interplay between culture and biology [J]. *Pediatrics*, 2005,115(1 Suppl):204-216.

(收稿日期:2018-05-28 修回日期:2018-08-16)