

论著·临床研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.019

# 结直肠癌患者血浆中 miR-141-3p 及其靶基因的表达变化及相关性分析\*

张 同,施承民,徐 玉,舒 若,曾玉剑,孙 亮,田 衍,肖博凯,李 庆,王昆华,罗华友<sup>△</sup>

(昆明医科大学第一附属医院/云南省消化病研究所/云南省消化道疾病防治工程技术研究中心  
胃肠与疝外科,昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 探讨 miR-141-3p 及其靶基因在结直肠癌患者血浆中的表达,及其与临床病理和治疗预后的关系。**方法** 收集结直肠癌患(试验组)者手术前后的血浆和健康志愿者(对照组)血浆各 150 例,利用实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测血浆中 miR-141-3p、磷酸酶与张力蛋白同源物(PTEN)、转化生长因子Ⅱ型受体(TGF-β2)和 p53 的表达水平,统计分析其与结直肠癌病理特征和手术疗效的相关性。**结果** 手术前与对照组比较,试验组血浆中 miR-141-3p 和 p53 的表达显著上升( $P<0.01$ ),而 PTEN 和 TGF-β2 的表达则显著下降( $P<0.01$ )。手术后,试验组血浆中 miR-141-3p 和 p53 的表达显著下调( $P<0.05$ ),而 PTEN 和 TGF-β2 的表达则显著上调( $P<0.05$ )。miR-141-3p 的表达水平与结直肠癌肿瘤分化和浸润程度、TNM 分期及转移等有显著相关性( $P<0.05$ )。miR-141-3p 高表达患者的术后复发率较高、生存率也较差( $P<0.05$ )。**结论** 血浆 miR-141-3p 在结直肠癌临床诊断和治疗预后中有潜在应用价值。

**[关键词]** 结直肠肿瘤;miR-141-3p;血浆;消化系统外科手术;靶基因

**[中图法分类号]** R735.3      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2019)01-0076-04

## Correlation analysis and expression parameters of miR-141-3p and its target genes in the plasma of colorectal cancer patients\*

ZHANG Tong,SHI Chengmin,XU Yu,SHU Ruo,ZENG Yujian,SUN Liang,TIAN Yan,  
XIAO Bokai,LI Qing,WANG Kunhua,LUO Huayou<sup>△</sup>

(Department of Gastrointestinal and Hernia Surgery,the First Affiliated Hospital of Kunming  
Medical University/Yunnan Institute of Digestive Diseases/Yunnan Engineering Technology Center of  
Digestive Disease,Kunming,Yunnan 650032,China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expressions of miR-141-3p and its target genes in the plasma of patients with colorectal cancer, and the relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods** Plasma of 150 colorectal cancer patients (the experimental group) before and after surgery and 150 healthy volunteers (the control group) were collected. The expression of miR-141-3p, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN), transforming growth factor-β2 (TGF-β2) and p53 in plasma were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Its correlation with the clinicopathological characteristics and surgical efficacy of colorectal cancer was statistically analyzed. **Results** Compared with the control group, the expression of miR-141-3p and p53 in the experimental group significantly increased ( $P<0.01$ ), while the expression of PTEN and TGF-β2 significantly decreased ( $P<0.01$ ). After operation, the expression of miR-141-3p and p53 was significantly down-regulated ( $P<0.05$ ), while the expression of PTEN and TGF-β2 was significantly up-regulated ( $P<0.05$ ). The expression of miR-141-3p was significantly correlated with the tumor differentiation and invasion, TNM stages and metastasis ( $P<0.05$ ). Patients with miR-141-3p high expression showed a higher recurrence rate ( $P<0.05$ ) and a worse survival rate ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Plasma miR-141-3p showed potential value in clinical diagnosis and prognosis of colorectal cancer.

**[Key words]** colorectal neoplasms; miR-141-3p; plasma; digestive system surgical procedures; target gene

结直肠癌是世界范围内病死率较高的消化道恶性肿瘤之一。近年来,小分子非编码 RNA(microR-

\* 基金项目:云南省消化病研究所内设机构项目(2016NS0085);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项面上项目[2017FE467(-038)];云岭学者项目(YLXL20170002)。 作者简介:张同(1988—),住院医师,硕士,主要从事胃肠外科研究。 <sup>△</sup> 通信作者,E-mail:1677546296@qq.com。

NA,miR)在癌症调控方面的研究报道逐渐增多。miR在血浆中稳定存在,并在外周血差异性表达。miR-141-3p作为miR-200家族的一员,被报道参与了食管癌<sup>[1]</sup>、原发性肝细胞癌<sup>[2]</sup>、前列腺癌<sup>[3]</sup>、胶质瘤<sup>[4]</sup>、癔痕瘤<sup>[5]</sup>、胃癌<sup>[6]</sup>和结肠癌<sup>[7]</sup>等肿瘤形成过程。有研究报道miR-141-3p在结直肠癌肿瘤组织中的表达下调<sup>[8-9]</sup>,也有研究报道miR-141-3p在结直肠癌肿瘤组织中的表达上调<sup>[10]</sup>。磷酸酶与张力蛋白同源物(PTEN)<sup>[1,11]</sup>、转化生长因子Ⅱ型受体(TGF-β2)<sup>[12-13]</sup>和肿瘤抑制蛋白p53<sup>[4]</sup>分别被报道为miR-141-3p的靶基因。本研究比较分析miR-141-3p及其靶基因在结直肠癌患者血浆中的表达差异,以及手术前后的表达变化,旨在为结直肠癌的早期诊断和治疗预后提供参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2011年12月至2014年12月本院接受手术治疗的结直肠癌患者150例作为试验组,术前均未行放疗或化疗等治疗,癌组织经镜检确诊为腺癌。同时选取150例健康志愿者作为对照组。试验组患者的平均年龄为(55.21±7.84)岁,其中男48例,女62例。对照组健康志愿者的平均年龄为(53.02±5.97)岁,其中男53例,女57例。所有对象均自愿签署知情同意书。两组年龄和性别比较,差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 手术方法及术后随访 试验组结直肠癌患者均采用腹腔镜和开腹结直肠癌根治术进行治疗<sup>[14-15]</sup>。术后3年平均每3个月随访1次,记录患者肿瘤复发、远处转移和死亡等情况。

1.2.2 血浆标本采集 静脉抽取结直肠癌患者手术前血液,手术后第7天血液<sup>[16]</sup>和健康志愿者血液各2 mL。血液标本转入乙二胺四乙酸(EDTA)采血管,室温静置待血液完全凝固后,离心分离血浆。收集血浆至新的离心管,-80℃保存备用。

1.2.3 血浆总RNA提取及反转录 各取400 μL上述血浆标本,按miRNeasy Serum/Plasma kit试剂盒(Qiagen)的方法步骤抽提血浆中的总RNA,利用荧光分光光度计(Thermo Fisher)测定血浆RNA浓度。提取的RNA置于-80℃保存备用。参照Taq-Man miRNA反转录试剂盒(Applied BioSystems)的说明反转录cDNA。

1.2.4 miR-141-3p及其靶基因检测 参照GoTaq® qPCR Master Mix试剂盒(Promega)说明配置反应液,在ABI 7500实时荧光定量PCR(RT-qPCR)仪(Applied BioSystems)上对上述合成的cDNA进行RT-qPCR检测。每个反应重复3次。miR-141-3p及其靶基因的引物序列见表1。以U6小环RNA作为内参<sup>[6,8]</sup>,结果采用2<sup>-△△Ct</sup>相对定量法<sup>[17]</sup>计算。分别按miR-141-3p、PTEN、TGF-β2和p53的相对表达水

平将结直肠癌患者划分为高值组和低值组,其中相对表达水平大于或等于平均值的患者归为高值组,相对表达水平小于平均值的患者归为低值组。

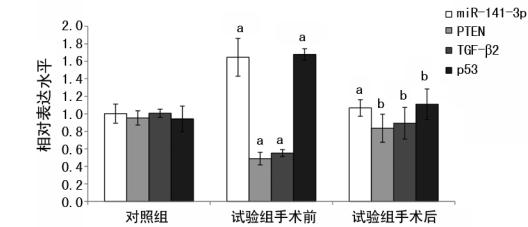
表 1 用于 RT-qPCR 检测用的引物序列

引物名称	引物序列
miR-141-3p	正向 5'-GCGGCGGTAACACTGTCTGG-3'
	反向 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
PTEN	正向 5'-TGGATTCTGACTTAGACTTGACCT-3'
	反向 5'-GGTGGGTTATGGTCTTCAAAAGG-3'
TGF-β2	正向 5'-GTAGCTCTGATGAGTGCAATGAC-3'
	反向 5'-CAGATATGGCAACTCCCAGTG-3'
p53	正向 5'-CGAAAGAAGACAGGCAGACTTTTCG-3'
	反向 5'-GAAGGTAAGGATAGGTCGGCGGTTTC-3'
U6	正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	反向 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.3 统计学处理 采用SPSS17.0软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用t检验,多组数据的比较采用单因素方差分析;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 $\chi^2$ 检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆 miR-141-3p 及其靶基因在手术前后的表达水平变化 在实施手术前,试验组血液中miR-141-3p的表达水平显著高于对照组,靶基因p53的表达水平也显著上升,而PTEN和TGF-β2的表达水平则显著低于对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。手术后,试验组miR-141-3p和p53的表达水平显著下调(P<0.05),而PTEN和TGF-β2的表达水平显著上调(P<0.05),见图1。



a: P<0.01,与对照组比较;b: P<0.05,与对照组比较  
图 1 两组血液中 miR-141-3p、PTEN、TGF-β2 和 p53 的表达水平

2.2 血浆 miR-141-3p 及其靶基因的表达与结直肠癌临床病理特征的关系 血浆中miR-141-3p、PTEN、TGF-β2和p53的表达水平与结直肠癌患者的性别、年龄和肿瘤发生部位等无显著相关性(P>0.05)。miR-141-3p与肿瘤分化程度、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移和远处转移有显著相关性(P<0.05)。PTEN和TGF-β2均与肿瘤分化程度、浸润深度和淋巴结转移有关(P<0.05)。p53与结直肠癌浸润深度、肿瘤大小和远处转移有关(P<0.05),见表2。

表 2 结直肠癌临床病理特征与 miR-141-3p、PTEN、TGF-β2 和 p53 的相对表达水平

项目	<i>n</i>	miR-141-3p	<i>P</i>	PTEN	<i>P</i>	TGF-β2	<i>P</i>	p53	<i>P</i>
性别			0.283		0.203		0.514		0.185
男	66	1.577±0.537		0.525±0.269		0.569±0.289		1.708±0.626	
女	84	1.715±0.559		0.453±0.234		0.533±0.217		1.648±0.615	
年龄(岁)			0.565		0.782		0.189		0.143
≥60	69	1.694±0.614		0.479±0.245		0.501±0.284		1.626±0.617	
<60	81	1.597±0.587		0.499±0.286		0.601±0.293		1.729±0.620	
发生部位			0.764		0.691		0.204		0.112
结肠	91	1.635±0.439		0.505±0.198		0.498±0.259		1.754±0.634	
直肠	59	1.656±0.514		0.472±0.172		0.604±0.263		1.602±0.617	
分化程度			0.041		0.047		0.034		1.168
未+低	63	1.897±0.589		0.402±0.195		0.476±0.285		1.611±0.611	
中+高	87	1.395±0.495		0.575±0.249		0.626±0.229		1.744±0.614	
浸润深度			0.027		0.046		0.027		0.023
浆膜	116	1.341±0.514		0.579±0.267		0.438±0.195		1.394±0.181	
肌层	34	1.951±0.572		0.399±0.193		0.664±0.293		1.961±0.293	
TNM 分期			0.044		0.127		0.344		0.086
I+II	71	1.873±0.554		0.549±0.267		0.518±0.219		1.539±0.602	
III+IV	79	1.419±0.514		0.429±0.193		0.584±0.221		1.816±0.647	
肿瘤大小(cm)			0.087		0.167		0.362		0.002
<5	64	1.480±0.515		0.443±0.202		0.529±0.211		1.440±0.519	
≥5	86	1.812±0.586		0.535±0.217		0.573±0.244		1.915±0.658	
淋巴结转移			0.038		0.032		0.033		0.247
有	65	1.911±0.582		0.389±0.181		0.474±0.237		1.599±0.637	
无	85	1.381±0.516		0.589±0.293		0.628±0.196		1.756±0.654	
远处转移			0.043		0.116		0.246		0.011
是	51	1.876±0.537		0.420±0.232		0.525±0.237		1.401±0.511	
否	99	1.416±0.496		0.557±0.252		0.577±0.218		1.954±0.616	

表 3 miR-141-3p 及其靶基因的表达与复发率和生存率的关系

组别	<i>n</i>	复发数 ( <i>n</i> )	复发率 (%)	<i>P</i>	死亡数 ( <i>n</i> )	生存率 (%)	<i>P</i>
miR-141-3p				0.033			0.016
高值组	78	26	22.00		16	86.00	
低值组	72	13	6.00		5	96.00	
PTEN				0.016			0.165
高值组	71	12	9.62		7	92.31	
低值组	79	27	18.75		14	89.58	
TGF-β2				0.012			0.146
高值组	72	12	8.51		7	93.62	
低值组	78	27	18.87		14	88.68	
p53				0.030			0.073
高值组	80	15	19.23		15	88.46	
低值组	70	24	8.33		6	93.75	

2.3 高值组和低值组结直肠癌患者复发率和生存率比较 miR-141-3p 低值组患者的复发率低于高值组

( $P<0.05$ ),生存率也优于高值组( $P<0.05$ )。PTEN 和 TGF-β2 高值组患者的复发率低于低值组( $P<0.05$ ),生存率优于低值组。p53 低值组患者的复发率低于高值组( $P<0.05$ ),生存率优于高值组,见表 3。

3 讨 论

研究 miR 与靶基因之间的相互调控关系,可以了解结直肠癌的发生机制,为诊断和治疗提供新的靶点<sup>[9,11]</sup>。目前,miR 在结直肠癌研究方面已有较多的报道<sup>[18]</sup>,例如 miR-21<sup>[19]</sup>、miR-106a<sup>[16]</sup>、miR-155<sup>[20]</sup>和 miR-141-3p<sup>[8,10]</sup>等。但 miR-141-3p 在结直肠癌患者血浆中表达的报道较少,其靶基因及其与结直肠癌临床病理和治疗预后相关性的报道几乎没有。而在其他癌症报道中,miR-141-3p 可能与 PTEN、TGF-β2 和 p53 等存在直接的相互作用<sup>[1,4,12]</sup>。

本研究结果显示,试验组结直肠癌患者手术前血浆中 miR-141-3p 的表达显著高于对照组,p53 的表达与之类似,而 PTEN 和 TGF-β2 的表达显著低于对照

组( $P<0.01$ )。这与它们分别在胃癌和食管癌等癌症中的表达情况一致<sup>[7,21-23]</sup>。试验组结直肠癌患者手术后,再次检测其血浆中 miR-141-3p、PTEN、TGF- $\beta$ 2 和 p53 的表达水平,结果表明,术后 miR-141-3p 的表达水平比术前显著降低( $P<0.01$ ),p53 的表达与之类似,术后 PTEN 和 TGF- $\beta$ 2 的表达水平比术前显著升高( $P<0.05$ )。这说明在结直肠癌患者血浆中,miR-141-3p 与抑癌基因 p53 的表达规律基本一致,呈正相关,而与 PTEN 和 TGF- $\beta$ 2 的表达水平则呈负调控关系。这与之前在其他肿瘤组织中报道的结果基本一致<sup>[1,4,12]</sup>。这些结果说明 miR-141-3p、PTEN、TGF- $\beta$ 2 和 p53 可能参与了结直肠癌的发生、发展过程。

本研究进一步分析了 miR-141-3p 及其靶基因的表达水平与结直肠癌临床病理特征的关系。结果显示,miR-141-3p 与多种临床病理特征有显著相关性,包括肿瘤分化、浸润、分期和转移等。PTEN 和 TGF- $\beta$ 2 主要与肿瘤分化、浸润和淋巴结转移有关( $P<0.05$ )。而 p53 则与结直肠癌浸润深度、肿瘤大小和远处转移有关( $P<0.05$ )。按相对表达水平分组分析后发现,miR-141-3p 和 p53 低表达组的术后复发率低,生存率高;PTEN 和 TGF- $\beta$ 2 高表达组的术后复发率低,生存率高。以上分析表明,结直肠癌患者血浆中 miR-141-3p 及其靶基因具有作为生物标志物的潜力<sup>[18]</sup>,可能有助于结直肠癌的早期诊断、辅助治疗和评估预后。

参考文献

[1] JIN Y Y, CHEN Q J, XU K, et al. Involvement of microRNA-141-3p in 5-fluorouracil and oxaliplatin chemoresistance in esophageal cancer cells via regulation of PTEN[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 422(1): 161-170.

[2] LIU C Z, YE Z H, MA J, et al. A qRT-PCR and gene functional enrichment study focused on downregulation of miR-141-3p in hepatocellular carcinoma and its clinicopathological significance[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2017, 16(6): 835-849.

[3] LI J Z, LI J, WANG H Q, et al. MiR-141-3p promotes prostate cancer cell proliferation through inhibiting kruppel-like factor-9 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 1381-1386.

[4] ZHOU X, WU W N, ZENG A L, et al. MicroRNA-141-3p promotes glioma cell growth and temozolomide resistance by directly targeting p53 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 71080-71094.

[5] FENG J J, XUE S, PANG Q Y, et al. miR-141-3p inhibits fibroblast proliferation and migration by targeting GAB1 in keloids[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 302-308.

[6] 周欣亮, 赵日暘, 韩晶, 等. miR-141-3p 在胃癌组织和患者血浆中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(10): 1112-1117.

[7] 王亚南, 陈昭华, 严岱红. 血清 microRNA-141 在结肠癌中的表达和临床意义[J]. *临床检验杂志*, 2014, 32(4): 255-258.

[8] YE J, WANG Z, ZHAO J, et al. MicroRNA-141 inhibits tumor growth and minimizes therapy resistance in colorectal cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(3): 1037-1042.

[9] FENG L, MA H Q, CHANG L, et al. Role of microRNA-141 in colorectal cancer with lymph node metastasis[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(5): 3405-3410.

[10] WU P P, ZHU H Y, SUN X F, et al. MicroRNA-141 regulates the tumor suppressor DLC-1 in colorectal cancer [J]. *Neoplasma*, 2015, 62(5): 705-712.

[11] JI J, QIN Y F, REN J, et al. Mitochondria-related miR-141-3p contributes to mitochondrial dysfunction in HFD-induced obesity by inhibiting PTEN[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16262.

[12] LEI K C, LIANG X, GAO Y W, et al. Lnc-ATB contributes to gastric cancer growth through a MiR-141-3p/TGF beta 2 feedback loop[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(3): 514-521.

[13] 周欣亮, 王玉栋, 张难, 等. 胃癌组织 TGF- $\beta$  对 miR-200c/141 表达影响的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(8): 552-556.

[14] 朱玉兵, 万燕青. 腹腔镜与开腹手术治疗大肠癌临床对比探究[J]. *结直肠肛门外科*, 2016, 22(S1): 151-152.

[15] 马玉宝, 朱海林. 腹腔镜与内镜微创术联合治疗大肠癌的疗效观察[J]. *结直肠肛门外科*, 2017, 23(2): 177-180.

[16] 张丽静, 孟丽敏, 樊智彬, 等. 大肠癌患者血浆 miR-106a 的表达及意义[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(3): 354-357.

[17] 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.

[18] 韦皓棠, 陈利生. 粪便 miRNA 检测在结直肠癌诊断中的价值[J]. *结直肠肛门外科*, 2017, 10(5): 565-569.

[19] 熊兵红, 马利, 程勇, 等. miR-21 在大肠癌中的表达及其靶基因探讨[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(3): 281-286.

[20] 张鑫, 陈悦, 张天彪, 等. 大肠癌中 Dicer 与 miRNA-155 表达及临床意义[J]. *临床军医杂志*, 2016, 44(10): 1055-1058.

[21] 卫星, 宋卫东, 牟永平, 等. mTOR 和 PTEN 基因在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *职业与健康*, 2015, 31(8): 1041-1044.

[22] 罗赵鑫, 陈仰新, 罗先桃, 等. VEGF、EGFR、Ki-67 及 p53 的表达与大肠癌浸润转移的相关性[J]. *中国热带医学*, 2015, 15(11): 1369-1371.

[23] HUANG S, WA Q, PAN J, et al. Downregulation of miR-141-3p promotes bone metastasis via activating NF- $\kappa$ B signaling in prostate cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 173.