

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.06.024

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220124.1940.015.html\(2022-01-26\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220124.1940.015.html(2022-01-26))

结肠癌组织 miR-21 与 PDCD4 的表达情况及临床意义

郭美¹,王兵²,周恒花³,王萍^{1△}

(上海交通大学医学院附属第九人民医院:1.消化科;2.普外科;3.病理科,上海 200011)

[摘要] **目的** 观察 miR-21 与程序性死亡因子 4(PDCD4)在结肠癌组织中的表达情况并探讨二者关系。**方法** 采用免疫组织化学检测 78 例结肠癌患者及癌旁组织中 PDCD4 蛋白表达情况;实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测组织 miR-21 和 PDCD4 mRNA 的表达,并分析二者之间相关性;采用苏木素-伊红(HE)染色判定结肠病变程度及性质。收集患者临床数据信息并分析其与 miR-21 和 PDCD4 mRNA 表达之间的关系。**结果** 免疫组织化学结果显示,70 例(89.74%)结肠癌组织中 PDCD4 蛋白低表达或无表达。qRT-PCR 显示,72 例(92.31%)结肠癌组织中 miR-21 表达水平较癌旁组织高,68 例(87.18%)PDCD4 mRNA 表达水平较癌旁组织低。miR-21 和 PDCD4 mRNA 表达在淋巴结是否转移中比较,差异有统计学意义($P<0.05$),但二者表达无相关性($P>0.05$)。**结论** miR-21 高表达或 PDCD4 低表达可能与结肠癌发生有关。

[关键词] 结肠癌;miR-21;PDCD4;免疫组织化学;实时荧光 PCR;相关性
[中图法分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)06-1011-04

Study on the expression of miR-21 and PDCD4 in patients with colon cancer and its clinic significance

GUO Mei¹,WANG Bing²,ZHOU Henghua³,WANG Ping^{1△}

(1. Department of Gastroenterology;2. Department of General Surgery;3. Department of Pathology,Shanghai Ninth People's Hospital,Shanghai Jiao Tong University School of Medicine,Shanghai 200011,China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of miR-21 and programmed death factor 4 (PDCD4) in patients with colon cancer and explore their relationship. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of PDCD4 in cancer tissues and adjacent normal tissues of 78 patients with colon cancer. The real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-21 and PDCD4 mRNA in tissues,and the correlation between them was analyzed. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to determine the degree and nature of colon lesions. The clinical data of patients were collected and their relationship with the expression of miR-21 and PDCD4 mRNA was analyzed. **Results** Immunohistochemical results showed that 70 cases (89.74%) of colon cancer tissues had low or no expression of PDCD4 protein. qRT-PCR showed that the expression level of miR-21 in colon cancer tissues of 72 cases (92.31%) was higher than that in adjacent tissues,and the expression level of PDCD4 mRNA in 68 cases (87.18%) was lower than that in adjacent tissues. The expressions of miR-21 and PDCD4 mRNA were compared in lymph node metastasis,the difference was statistically significant ($P<0.05$),but there was no correlation between them ($P>0.05$). **Conclusion** High expression of miR-21 or low expression of PDCD4 may be related to the occurrence of colon cancer.

[Key words] colon cancer;miR-21;PDCD4;immunohistochemistry;real-time fluorescence PCR;correlation

作者简介:郭美(1974—),主治医师,本科,主要从事消化道肿瘤发病机制研究。△ 通信作者,E-mail:lily7410@163.com。

miR-21 广泛表达于各种恶性肿瘤中,其表达增高可见于多种恶性肿瘤,包括肺、乳腺、胃、前列腺、结肠及头面部肿瘤等^[1-4]。程序性死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 为一种抑癌基因,在食管、胃、结肠和胰腺等消化道相关肿瘤中表达下降。miR-21 通过下调 PDCD4 表达,干扰细胞凋亡,从而促进肿瘤生长,这一通路已被广泛接受,但关于二者在结肠癌发生和转移中的关系却鲜有报道。本研究分析结肠癌组织中的 miR-21、PDCD4 的表达情况及其相互关系,并对二者组织表达情况和患者临床病理参数进行探讨,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2010 年 1 月至 2013 年 12 月本院经结肠镜检查病理确诊为结肠癌的 78 例患者为研究对象,其中男 58 例,女 20 例,年龄 27~85 岁,平均(61.65±13.50)岁,所有患者行手术切除、同时留取距离癌灶 5 cm 以上的正常组织送检。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

将收集的结肠癌组织及癌旁正常组织放入 10% 多聚甲醛固定,脱水及包埋后行苏木素-伊红(HE)染色,后由两位本院病理科医师读片。通过免疫组织化学方法检测结肠癌组织及正常组织中 PDCD4 蛋白表达情况,采用 S-P 法:常规石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度无水乙醇水化,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次;抗原修复,PBS 洗涤 3 次;滴加 3% 过氧乙酸阻断组织内源性过氧化酶活性 10 min(常温条件下),再使用 PBS 漂洗 3 次;滴加羊血清封闭液,室温孵育 30 min;弃去玻片血清,滴加 1:200 的兔抗人 PDCD4 多克隆抗体(美国 Abcam 公司),放置于 4℃ 冰箱,孵育过夜;次日,PBS 漂洗 3 次,滴加即用型生物素标记的二抗,室温孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次;滴加即用型 SP 溶液,室温孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次;结束后,DAB 显色 1~5 min,苏木素复染 120 s,自来水冲洗 10~20 min,晾干,中性塑胶封片,出现棕黄色颗粒即为阳性。每例标本均用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 miR-21 及 PDCD4 mRNA

结肠癌组织及癌旁正常组织放置-80℃ 冰箱保存,按照 RNA 提取盒(加拿大 Applied Biosystems 公司),使用 qRT-PCR 检测 mRNA 水平。取 5 μL 逆转录得到的 cDNA,按照反应盒(加拿大 Applied Biosystems 公司)进行扩增。ACTB 为内参。PCR 引物

如下:miR-21 上游引物,5'-TGA GAC TGA TGT TGA CTG TTG AA-3',下游引物 5'-TGT CAG ACA GCC CAT CGA C-3';ACTB 上游引物:5'-CCC AGC ACA ATG AAG ATC AA-3',下游引物 5'-ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3'。扩增条件为:95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环;PDCD4 上游引物:5'-AAA GGG AAG GTT GCT GGA TAG-3',下游引物为 5'-CCA CCT CCT CCA CAT CAT ACA-3'。扩增条件为:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 20 s,40 个循环。每个标本重复 3 次,取平均值为 CT 值,ΔCT 值=目标基因 CT 值-内参基因 CT 值;以正常组织为对照组,ΔΔCT=ΔCT 标本-ΔCT 对照。

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,比较采用 *t* 检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验;采用斯皮尔曼等级相关系数分析相关性,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床特征及 HE 结果

78 例手术患者中肿瘤占据肠腔一周者 5 例,占据肠腔周径>1/2 的 25 例,≤1/2 的 48 例;高分化肿瘤 9 例,中分化肿瘤 52 例,低分化肿瘤 17 例;浸润深度:T1~T2 共 18 例,T3~T4 共 60 例;淋巴结转移 72 例,无淋巴结转移者 6 例。

2.2 PDCD4 在结肠癌组织的表达情况

镜下观察结肠癌组织中 PDCD4 蛋白主要表达于细胞核及细胞质中。78 例结肠癌组织中 70 例(89.74%)PDCD4 蛋白低表达或无表达,而癌旁组织表达呈强阳性。

2.3 结肠癌组织 miR-21 和 PDCD4 mRNA 表达情况

与癌旁组织比较,结肠癌组织 PDCD4 mRNA 表达水平较低,miR-21 表达水平较高,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 结肠癌组织 miR-21 和 PDCD4 mRNA 表达情况(*n*=78, $\bar{x} \pm s$)

项目	结肠癌组织	癌旁组织	<i>t</i>	<i>P</i>
miR-21	3.91±2.11	0.76±0.81	12.309	<0.001
PDCD4 mRNA	0.85±0.80	2.54±1.22	10.231	<0.001

2.4 miR-21 与 PDCD4 mRNA 表达与结肠癌临床病理特征关系

72 例(92.31%)结肠癌组织中 miR-21 表达水平

较癌旁组织高,68例(87.18%)PDCD4 mRNA表达水平较癌旁组织低。miR-21和PDCD4 mRNA表达情况在性别、年龄、分化程度、TNM分期中比较,差异

无统计学意义($P>0.05$);但二者表达在淋巴结是否转移中比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 miR-21与PDCD4 mRNA表达与结肠癌临床病理特征关系($n=78$)

项目	<i>n</i>	miR-21				PDCD4 mRNA			
		C<N	C>N	χ^2	<i>P</i>	C<N	C>N	χ^2	<i>P</i>
性别				0.20	0.65			1.24	0.27
男	58	4	54			52	6		
女	20	2	18			16	4		
年龄				3.10	0.21			0.99	0.61
≤45岁	9	2	7			7	2		
>45~60岁	22	1	21			20	2		
>60岁	47	3	44			41	6		
分化程度				4.09	0.13			0.45	0.80
高分化	9	2	7			8	1		
中分化	52	4	48			46	6		
低分化	17	0	17			14	3		
TNM分期				0.39	0.53			0.06	0.80
T1~T2	18	2	16			16	2		
T3~T4	60	4	56			52	8		
淋巴结转移				14.52	<0.001			16.86	<0.001
转移	72	1	71			66	6		
未转移	6	5	1			2	4		

C:结肠癌组织;N:癌旁组织。

2.5 结肠癌组织 miR-21 和 PDCD4 mRNA 表达水平的相关性

结肠癌组织 miR-21 与 PDCD4 mRNA 无表达相关性($r=0.006,P>0.05$)。

3 讨 论

miR-21 与炎症、肿瘤密切相关,且参与肿瘤细胞代谢过程,影响多个肿瘤抑制基因及信号通路,其中包括 p53、PDCD4^[5]、PTEN^[6]、RECK^[7]、TPM1、Maspin^[8]及转化生长因子-β(TGF-β)信号通路和细胞凋亡相关基因^[9]等。有研究发现,高表达 miR-21 的 HCT-116 结肠癌细胞中,PDCD4、TGF-βR2 和 PTEN 的表达水平均受到明显抑制,而细胞克隆形成能力明显强于正常对照组,在干细胞体外增殖培养中存在类似的现象^[10]。

PDCD4 蛋白是蛋白激酶 B(AKT)/磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路下游重要的靶点之一。越来越多的研究发现 PDCD4 蛋白可以通过影响肿瘤细胞增殖、体外转移和抑制凋亡能力发挥其抗肿瘤功能。ZHANG 等^[11]

研究提示 PDCD4 蛋白下调侵袭相关蛋白 AKT 和 MAP4K1 的表达和基因转录活性,激活转移抑制蛋白如 E-cadherin 和 TIMP2 的释放。进一步研究表明,高 miR-21 表达水平会引起 PDCD4 mRNA 低表达水平。PDCD4 低表达者肿瘤体积较大,且较易发生远处和淋巴结远转移^[12],提示 miR-21 可能通过降低 PDCD4 的表达促进肿瘤生长和转移。此外,有研究表明 miR-21 可通过 miR-21-PDCD4-AP-1 反馈环路增强肝癌细胞的侵袭和转移能力^[13]。本研究中发现结肠癌组织中 PDCD4 mRNA 表达水平较低,且明显低于癌旁组织,而 miR-21 则呈高表达。但本研究中未观察到二者之间的相关性,可能需要纳入更多的结肠癌病例进行分析。此外,PDCD4 是否影响结肠癌细胞的增殖和转移能力,还有待深入研究。另外,本研究观察到淋巴结转移和未转移患者的 miR-21 和 PDCD4 mRNA 的表达均存在差异,二者是否与淋巴转移有密切关系或与本研究纳入病例过少有关,有待进一步扩大样本量予以验证。

综上所述,miR-21 和 PDCD4 表达与患者的年

龄、性别、肿瘤分化程度、TMN 分期等临床病理特征无关,说明在结肠癌发生、发展及转移等过程中,存在多条信号通路,而 miR-21 作用的 PDCD4 在其中未必占据主要地位,也有可能与本研究的样本量不足有关,尚待今后进一步观察。本研究证实了 miR-21 和 PDCD4 在结肠癌组织中的表达情况及其相应趋势,说明二者和结肠癌的发生相关。

参考文献

- [1] CAMERLINGO R, MICELI R, MARRA L, et al. Conditioned medium of primary lung cancer cells induces EMT in A549 lung cancer cell line by TGF- β 1 and miRNA21 cooperation [J]. PLoS One, 2019, 14(7):e0219597.
- [2] 陈筱雪, 孙斌, 黎昌学. microRNA-21、caspase-3、caspase-9 在舌鳞状细胞癌中的表达水平[J]. 实用口腔医学杂志, 2019, 35(5):701-705.
- [3] 肖焄. microRNA-21 在胃癌研究中的进展[J]. 重庆医学, 2018, 47(20):2733-2736.
- [4] 李庆军, 周进学, 杨楠木, 等. 微小 RNA-21 在肝癌组织的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(6):1140-1142.
- [5] FAN B, JIN Y, ZHANG H, et al. MicroRNA-21 contributes to renal cell carcinoma cell invasiveness and angiogenesis via the PDCD4/c-Jun (AP-1) signalling pathway [J]. Int J Oncol, 2020, 56(1):178-192.
- [6] 刘洁, 彭微, 刘怀, 等. miR-21 作用于 PTEN 与结肠癌化疗疗效关系[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(7):1040-1042.
- [7] LIN J, LIU Z W, LIAO S S, et al. Elevation of long non-coding RNA GAS5 and knockdown of microRNA-21 up-regulate RECK expression to enhance esophageal squamous cell carcinoma cell radio-sensitivity after radiotherapy[J]. Genomics, 2020, 112(3):2173-2185.
- [8] HUANG S X, FAN W Y, WANG L, et al. Maspin inhibits MCF-7 cell invasion and proliferation by downregulating miR-21 and increasing the expression of its target genes[J]. Oncol Lett, 2020, 19(4):2621-2628.
- [9] 梁云微, 连相尧, 党春艳, 等. microRNA-21 在食管癌细胞增殖、迁移和凋亡中的作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(2):845-851.
- [10] YU Y, KANWAR S S, PATEL B B, et al. MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGF- β R2) in colon cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2012, 33:68-76.
- [11] ZHANG N, DUAN W D, LENG J J, et al. STAT 3 regulates the migration and invasion of a stem-like subpopulation through microRNA-21 and multiple targets in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2015, 33(3):1493-1498.
- [12] ZHU S, WU H, WU F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis[J]. Cell Res, 2008, 18(3):350-359.
- [13] 袁志明, 林泽旭, 陈一峰, 等. 长链非编码 RNA TUSC7 对人恶性黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(4):408-412.

(收稿日期:2021-08-22 修回日期:2021-11-23)