

结肠癌组织中miR-155表达在预测复发转移中的价值及其与血清CEA的相关性



黄少军¹, 汪晶晶², 江 华¹, 曹红亮³

Value of miR-155 Expression in Forecast of Recurrence or Metastasis and Its Correlation with Serum CEA Levels after Operation

HUANG Shaojun¹, WANG Jingjing², JIANG Hua¹, CAO Hongliang³

1.Department of Medical Laboratory, Hospital Affiliated to Hubei University of Arts and Science,Xiangyang 441021,China,2.Department of Pediatrics, 3.Department of General Surgery

Corresponding Author: CAO Hongliang,E-mail:sunflower71978@126.com

Abstract: Objective To analyze the correlation between miR-155 expression and serum CEA levels in colon carcinoma, and to explore its value in forecast of recurrence and metastasis after operation. **Methods** miR-155 expressions in 84 specimens of colon carcinoma and their matched adjacent tissues were examined by RT-PCR, and preoperative serum CEA levels were tested at the same time. The follow-up visit lasted for 2 years after operation and serum CEA levels were tested every two months. **Results** miR-155 expression was 4.03 ± 2.95 in colon carcinoma, which was significantly higher than that in adjacent normal tissues ($P<0.05$). miR-155 expression in colon carcinoma was significantly and positively correlated with preoperative serum CEA levels($P<0.01$). miR-155 expression in colon carcinoma was significantly and negatively correlated with the time of serum CEA re-increasing after operation($P<0.01$). miR-155 expression in recurrence and metastasis group was significantly higher than that in non-recurrence or metastasis group($P<0.05$). The time of serum CEA re-increasing was significantly correlated with recurrence and metastasis after operation. **Conclusion** miR-155 expression is up-regulated obviously in colon carcinoma. Detection of miR-155 expression and serum CEA levels before and after operation together can offer more accurate information for diagnosis and prognosis of colon carcinoma, especially for recurrence and metastasis after operation.

Key words:Colon carcinoma; microRNAs; miR-155; CEA; Recurrence; Metastasis

摘 要: 目的 分析结肠癌组织中miR-155表达与血清CEA的相关性,探讨miR-155表达在预测复发转移中的价值。**方法** 收集84例结肠癌标本及对应的癌旁组织,检测肿瘤组织及癌旁组织中miR-155的表达水平,同时检测患者术前血清CEA水平。对患者进行2年的随访,随访期间每两月检测一次血清CEA。**结果** 与癌旁组织比较,miR-155在结肠癌组织中表达显著增高($P<0.05$);癌组织中miR-155的表达与术前血清CEA水平呈明显正相关($P<0.01$);癌组织中miR-155的表达与术后CEA水平再次增高的时间呈明显的负相关($P<0.01$);复发转移组癌组织中miR-155表达水平为 6.06 ± 3.73 倍,显著高于未复发转移组癌组织中miR-155表达水平 3.62 ± 2.55 倍($P<0.05$);术后血清CEA水平再次增高的时间与术后肿瘤的复发转移明显相关($P<0.05$)。**结论** 结肠癌组织中miR-155表达显著上调,联合检测结肠癌组织中miR-155表达与术前术后血清CEA水平可以为临床诊断、预后判断提供更准确的信息,尤其在预测术后肿瘤的复发转移中有重要的价值。

关键词:结肠癌; microRNAs; miR-155; CEA; 复发; 转移

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A

0 引言

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,随着生活水平的提高和环境的恶化,发病率已呈逐年上升

的趋势。尽管治疗方法有了很大的进步,但总体死亡率仍然很高。肿瘤的侵袭和转移是患者死亡的主要原因之一。资料显示临床上约有50%的大肠癌患者虽然经过有效的治疗,但最终仍然死于肿瘤的侵袭和转移^[1]。癌胚抗原(CEA)在结肠癌预后判断、疗效观察以及复发和转移的监测中是最常用的肿瘤标志物。本课题组前期研究发现miR-155在结肠癌组织中表达增高,可能作为原癌基因参与结肠癌的发生、发展,与结肠癌的侵袭、转移

收稿日期: 2013-05-30; 修回日期: 2013-11-14
基金项目: 襄阳市科技局基金资助项目(2010GG3A8)
作者单位: 1.441021湖北襄阳,湖北文理学院附属医院检验科, 2.儿科, 3.普外科
通信作者: 曹红亮, E-mail: sunflower71978@126.com
作者简介: 黄少军(1979-),男,硕士,主管技师,主要从事肿瘤的分子诊断研究

密切相关^[2]。但miR-155能否成为一个新的肿瘤标志物以便于为临床提供更多的诊断价值，目前国内鲜有这方面的临床和实验报告，为此，本实验通过分析miR-155与CEA的相关性，探讨miR-155在结肠癌疗效观察预后判断以及复发和转移的监测等方面的价值，为临床寻找一种新的、理想的结肠癌肿瘤标志物提供理论基础和实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2009年3月至2010年12月湖北文理学院附属医院普外科手术切除的原发性结肠癌标本84例，每例均有癌旁组织(取材部位距离肿瘤边缘至少2 cm)。其中男性46例、女性38例，中位年龄为59岁。所有入选病例均经病理确诊，术前均未行放、化疗。切除的标本30 min内放入液氮罐保存，长期保存转至-70℃冰箱。

1.2 试剂与仪器

Trizol RNA提取试剂和反转录(RT)试剂盒购自美国Invitrogen公司，miR-155和U6 snRNA qRT-PCR检测试剂盒均购自上海吉玛制药技术有限公司，PCR扩增仪采用罗氏LightCycler；血清CEA检测采用雅培i2000化学发光仪及雅培原装试剂。CEA升高是指CEA>5 ng/ml。

1.3 组织总RNA的抽取

结肠癌组织及癌旁组织总RNA的提取采用Trizol试剂一步提取法，实验步骤严格按照试剂说明书进行。紫外分光光度仪检测RNA溶液OD₂₆₀、OD₂₈₀的吸光度值，计算RNA浓度和纯度。另外用1%琼脂糖凝胶电泳法检测RNA的完整性。

1.4 反转录反应

由于miRNAs长度仅有20个核苷酸左右，不能用传统的qRT-PCR检测。本实验采用上海吉玛制药技术有限公司提供的miR-155检测试剂盒(Hairpin-it™ miRNAs RT-PCR Quantitation Kit)，内含针对miR-155特异的茎环结构反转录引物。1 μl上述提取的总RNA以此茎环引物进行反转录反应。取特异性茎环引物2 μl，提取的总RNA1 μl，10 mM dNTP混合物1 μl，加灭菌蒸馏水至12 μl，混匀后在65℃加热5 min，迅速置于冰上冷却，瞬时离心后加入5×第一链合成缓冲液4 μl，0.1M DTT2μl和RNaseOUT™核酸酶抑制剂1 μl，混匀后在37℃水域中孵育2 min；在室温下加入M-MLV反转录酶1 μl，轻轻吹打混匀。37℃孵育50 min，最后70℃加热15 min以终止反应。反应结束后反转录产物-20℃保存备用。U6snRNA作为内参，同样进行上述反转录反应，反转录产物-20℃保存备用。

1.5 实时荧光定量PCR

采用上海吉玛制药技术有限公司提供的miR-155检测试剂盒，内含TaqDNA聚合酶，PCR

反应缓冲液和特异的miR-155上下游引物。上游引物为5'-ACGCTCAGTTAATGCTAATCGTGATA-3'，下游引物为5'-ATTCCATGTTGTCCACTGTC TCTG-3'。片段长度84 bp。取2×PCR Buffer 10 μl，miR-155上下游引物(5 μM) 0.36μl,cDNA 2 μl，5 u/μlTaq聚合酶0.2 μl,反应体系为20 μl。反应条件为：95℃ 3 min；95℃20 s，60℃ 50 s共40个循环。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数即Ct值。U6 snRNA作为内参，同样进行上述定量PCR反应，其上游引物为5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3'；下游引物为5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'。片段长度70 bp。采用实时定量PCR中的相对定量法，以 $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示肿瘤组织miR-155表达相对于配对的癌旁组织的变化倍数，其中 $\Delta\Delta Ct=(Ct_{miR155}-Ct_{U6})_{肿瘤}-(Ct_{miR155}-Ct_{U6})_{癌旁}$ 。

1.6 随访

术后患者出院前检测一次血清CEA水平。随访时间定为2年，期间每2月查一次血清CEA水平，血清CEA水平降到最低值后转而升高(持续半年以上)的时间，记为术后血清CEA水平再次增高的时间。术后每6月一次肠镜、胸部X线、B超或腹部CT检查，以确诊患者是否出现复发转移。随访方式主要采取门诊复查、电话访问。随访应不影响患者采取适当的治疗方式。

1.7 统计学方法

应用SPSS13.0统计学软件进行统计学分析，结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组之间计量资料样本比较采用独立样本t检验，率的比较采用卡方检验。双变量计量资料相关性分析用Pearson相关检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-155在结肠癌组织中的表达

miR-155及U6实时定量PCR扩增产物的熔解曲线显示为单峰，说明茎环RT-PCR能扩增相应的目的基因，见图1。定量PCR产物在2.5%琼脂糖凝胶电泳呈单一条带，进一步验证了反应的特异性。结果显示，在84例结肠癌组织中，相对于癌旁组织对照，65例miR-155表达上调，其中24例上调大于4倍，11例上调大于8倍；miR-155在结肠癌中的表达水平($N=2^{-\Delta\Delta Ct}$)为4.03±2.95倍，明显高于对应癌旁组织，见表1。

表1 miR-155、U6在结肠癌和癌旁组织的Ct值
Table1 Ct values of miR-155 and U6 in colon cancer and normal adjacent tissues

	Cases	Ct value of tumor tissue	Ct value of normal mucous membrane	Fold up-regulated	P
miR-155	84	23.57±6.83	28.61±7.03	4.03±2.95	<0.001
U6	84	18.74±5.67	19.33±6.02	1	

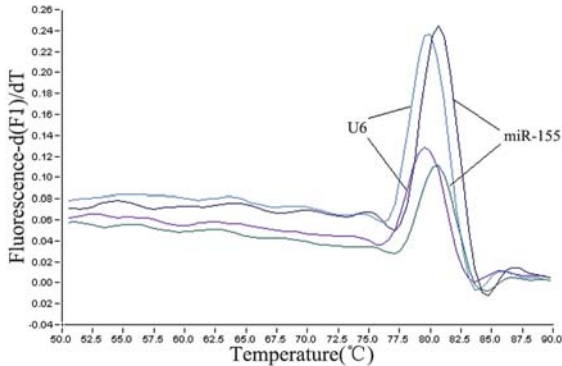


图1 miR-155及U6实时定量PCR扩增产物的的熔解曲线
Figure1 Melting curves of miR-155 and U6 amplification products detected by real-time quantification PCR

2.2 结肠癌组织中miR-155表达与术前血清CEA的相关性

选取癌组织miR-155的表达倍数大于1的65例病例，绘制以术前血清CEA水平的对数值为横坐标，癌组织miR-155的相对表达倍数对数值为纵坐标的散点分布图，见图2。经Pearson相关性分析，癌组织miR-155的表达倍数与血清CEA水平呈正相关($r=0.708$, $t=7.959$, $P<0.01$)。

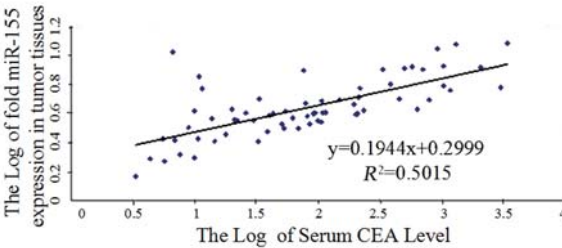


图2 结肠癌组织中miR155表达与术前血清CEA分布散点图
Figure2 Scatter diagram of miR-155 expression and preoperative serum CEA levels in colon cancer tissues

2.3 结肠癌组织中miR-155表达与术后血清CEA再次增高的时间的关系

随访2年内，24例患者术后血清CEA水平出现增高，选取术后血清CEA出现增高的这24例患者，以术后血清CEA水平出现增高的时间为横坐标，癌组织miR-155的表达倍数为纵坐标绘制散点分布图，见图3。经Pearson相关性分析，癌组织miR-155的表达倍数与术后血清CEA水平出现

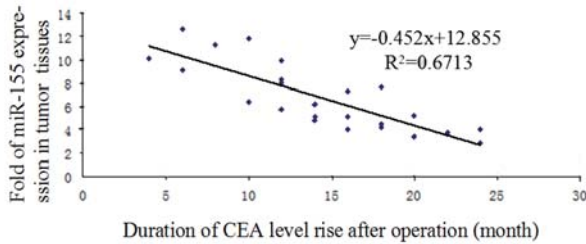


图3 结肠癌组织中miR155表达与术后血清CEA水平出现增高的时间分布散点图
Figure3 Scatter diagram of miR-155 expression in colon cancer tissues and the time of serum CEA levels increasing after operation

增高的时间呈明显负相关($r=-0.819$, $t=5.4920$ 和 $P<0.01$)。

2.4 癌组织中miR-155表达及术后血清CEA水平再次增高的时间与术后肿瘤复发或转移的关系

随访2年内，获知结论（是否复发转移）的病例为68例，其中出现复发或转移（与病患死亡无关）有19例，复发转移率为27.94%。其中肝转移7例(10.29%)，肺转移2例(2.94%)，淋巴结转移5例(7.35%)，吻合口复发2例(2.94%)，腹（盆）腔转移3例(4.41%)。复发转移组癌组织中miR-155表达水平为 6.06 ± 3.73 倍，未复发转移组癌组织中miR-155表达水平为 3.62 ± 2.55 倍，两组比较差异有统计学意义 ($P=0.0144<0.05$)，见图4。术后血清CEA水平出现增高时间 ≤ 24 月的24例患者中有11例复发转移，阳性率为45.8%；术后血清CEA水平出现增高的时间 >24 月的44例患者中有8例复发转移，阳性率为18.2%；两者比较差异有统计学意义 ($\chi^2=5.89$, $P<0.05$)，见表2。

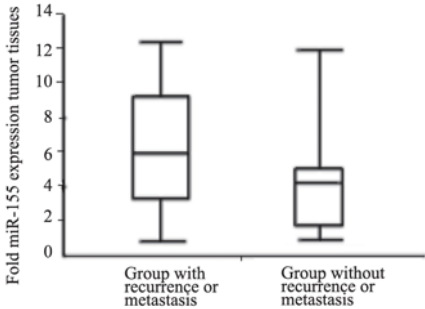


图4 miR-155在术后复发转移组和未复发转移组结肠癌组织中的表达

Figure4 miR-155 expressions in group with recurrence or metastasis and group without recurrence or metastasis in colon cancer tissue after operation

表2 术后血清CEA水平再次增高的时间与术后肿瘤复发或转移的关系

Table2 Correlation between the time of serum CEA level increasing again after operation and tumor recurrence or metastasis

Duration (month)	Recurrence and metastasis		Total	Rates(%)
	with	without		
≤ 24	11	13	24	45.8
>24	8	36	44	18.2
Total	19	49	68	27.9

3 讨论

结肠癌的发生发展是癌基因激活和抑癌基因失活共同作用的结果，其确切的发病机制尚未完全清楚。近年发现，miRNAs与恶性肿瘤密切相关，主要通过与目标miRNA分子的3'端非编码区域特异结合来抑制转录后的翻译。约52%调控miRNAs的编码基因位于肿瘤相关基因位点和染色体区域^[3]。因此miRNAs可能成为诊断肿瘤的新的分子标志和判断肿瘤治疗及预后的分子靶点^[4-5]。

miR-155是最早被证实有促癌作用的microRNA分子之一，其在乳腺癌^[6]、肺癌^[7]、结肠癌^[8]、胰腺癌^[9]和肝癌^[10]等多种肿瘤中表达上调。此外，高表达的miR-155与肺癌和胰腺癌的预后有关^[11]。

本研究利用茎环qRT-PCR技术检测miR-155在结肠癌组织中的表达水平。结果显示，在84例结肠癌组织中，miR-155在结肠癌中的表达水平为4.03±2.95倍，明显高于对应正常黏膜组织。说明miR-155在结肠癌组织中的表达明显上调，提示miR-155与结肠癌的发生、发展密切相关。国内Wang等^[12]采用miRNA微阵列分析和Q-RT-PCR两种方法检测结肠癌中的miRNA表达，也得出了相同的结论。Bakirtzi等^[8]通过动物实验证实，沉默miR-155不仅可以阻止肿瘤细胞团的形成，还可以减慢肿瘤细胞的生长速度，进一步证实miR-155参与了结肠癌的发生、发展过程。

本实验通过随访发现，结肠癌组织中miR155表达与术后肿瘤的复发或转移密切相关，由此可以认为miR-155表达水平越高，术后肿瘤复发或转移的几率就越高，患者的预后就越差。研究提示检测结肠癌组织中miR-155的表达对预测术后肿瘤的复发或转移有重要价值。目前miR-155在肿瘤浸润转移中的具体作用机制尚未完全阐明，国外学者对此进行了诸多研究。Kong等^[13]研究证实肿瘤转化生长因子通过miR-155作用于RhoA蛋白，参与了乳腺癌细胞的转移。Gironella等^[14]研究认为，miR-155在胰腺癌异常高表达，可能是通过抑制TP53INP1的mRNA功能，导致其表达下降，从而促进肿瘤细胞增殖，抑制肿瘤细胞的凋亡。这些作用机制是否同样存在于结肠癌中有待进一步实验证明。miR-155的出现为结肠癌转移的预防和治疗提供了新的研究方向。

血清CEA是目前应用最广泛的肿瘤标志物之一，在结肠癌、直肠癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌及其他恶性肿瘤有不同程度的阳性率，以在结、直肠癌患者中升高最显著。术后血清CEA动态检测对结直肠癌术后复发转移的监测有重要意义^[15]。实验研究发现结肠癌组织中miR-155表达与血清CEA呈明显正相关性，与术后血清CEA出现增高的时间呈明显负相关，这提示在结肠癌发生、发展过程中，癌组织中miR155表达越高，其血清CEA水平就越高，术后血清CEA再次增高的时间就越短；同时本实验还发现术后血清CEA水平再次增高的时间越短，肿瘤越容易出现复发或转移。联合检测结肠癌组织中miR155表达与术前术后血清CEA水平可以为临床疗效观察、预后判断提供更加准确的信息，尤其在预测

术后肿瘤的复发转移中有重要的价值。

参考文献：

[1] Saletti P,Cavalli F,*et al.* Metastatic colorectal cancer[J].Cancer Treat Rev,2006,32(7):557-71.

[2] Cao HL,Huang SH,Liu AH, *et al.* Expression of miR-155 and its clinical significance in tissues of colonic cancer[J].Zhonghua Xiao Hua Wai Ke Za Zhi,2013,12(6):440-2.[曹红亮,黄少军,刘爱华,等. miR-155在结肠癌组织中的表达及其临床意义[J].中华消化外科杂志,2013,12(6):440-2.]

[3] Zhong X,Coukos G,Zhang L.miRNAs in human cancer[J]. Methods Mol Boil,2012,822:295-306 .

[4] Garzon R,Fabbri M,Cimmino A,*et al.*MicroRNA expression and function in cancer[J].Trends Mol Med, 2006,12(12):580-7.

[5] Jemal A,Siegel R,Ward E,*et al.*Cancer statistics,2008[J].CA Cancer J Clin,2008,58(2):71-96.

[6] Zheng SR,Gun GL,Zhang W, *et al.*Clinical significance of miR-155 expression in breast cancer and effects of miR-155 ASO on cell viability and apoptosis[J].Oncol Rep,2012,27(4):1149-55 .

[7] Qin AD,Zhou Y,Sheng MX,*et al.*Effects of MicroRNA-155 on the growth of human lung cancer cell line 95D in vitro[J].Zhongguo Fei Ai Za Zhi,2011,14(7):575-80.[秦安东,周涯,盛美霞,等. MicroRNA-155对人肺癌95D细胞生长的影响[J].中国肺癌杂志,2011,14(7):575-80.]

[8] Bakirtzi K,Hatzia Apostolou M,Karagiannides I,*et al.*Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and -155 and Akt,promotes tumor growth in mice,and is increased in human colon tumors[J]. Gastroenterology,2011,141(5):1749-61.

[9] Ryu JK,Hong SM,Karikari CA,*et al.*Aberrant microRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma[J].Pancreatology,2010,10(1):66-73.

[10] Xie Q,Chen X,Lu F,*et al.*Aberrant expression of microRNA 155 may accelerate cell proliferation by targeting sex-determining region Y box 6 in hepatocellular carcinoma[J].Cancer,2012,118(9): 2431-42.

[11] Greither T,Grochola LF,Udelnow A,*et al.*Elevated expression of microRNAs 155,203,210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival[J].Int J Cancer,2010,126(1):73-80.

[12] Wang XY,Wu MH,Liu F, *et al.*Differential miRNA expression and their target genes between NGX6-positive and negative colon cancer cells[J]. Mol Cell Biochem,2010,345(1-2):283-90.

[13] Kong W,Yang H,He L,*et al.*MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA[J].Mol Cell Biol,2008,28(22):6773-84.

[14] Gironella M,Seux M,Xie MJ,*et al.*Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155,and its restoration inhibits pancreatic tumor development[J].Prec Nail Acad Sci U S A,2007,104(41):16170-5.

[15] Zhou LS, Li DP, Wang B, *et al.*The relative parameters of liver metastasis of colorectal carcinoma after surgery[J]. Zhongguo Ai Zheng Za Zhi,2006,16(5):394-5.[周立生,李大鹏,王斌,等.结直肠癌术后肝转移相关因素分析[J].中国癌症杂志,2006,16(5):394-5.]

[编辑：安 凤；校对：邱颖慧]