

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.015

miR-221 在结直肠癌中的表达及意义

王剑平¹, 孙 凯², 雷尚通², 吴承堂²

Expression Pattern and Significance of microRNA-221 in Colorectal Carcinoma

WANG Jian-ping¹, SUN Kai², LEI Shang-tong², WU Cheng-tang²

1. Department of General Surgery, The 95th Clinical Department of Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Putian 351100, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Southern Hospital of Southern Medical University

Corresponding Author: SUN Kai, E-mail: sunkai9602@sina.com

Abstract: Objective To investigate the microRNA-221 (miR-221) expression pattern and relationship with clinicopathological features in colorectal carcinoma. **Methods** Total RNAs of thirty colorectal carcinoma and adjacent non-tumorous specimens, from Nanfang Hospital were isolated. The miR-221 expression was detected by real-time RT-PCR and Northern-blot analysis respectively. The relationship between the expression of miR-221 and clinicopathological features was analyzed. **Results** The expression of miR-221 was significantly up-regulated in colorectal carcinoma than that in the adjacent non-tumorous tissues (2.041 ± 1.401 vs. 0.806 ± 0.341 , $P < 0.01$). The result was confirmed by Northern blot analysis, and a significant positive correlation between two detective methods was found ($r^2 = 0.948$, $P < 0.01$). Moreover, miR-221 expression was positively related to advanced TNM stage ($P = 0.032$) and local invasion ($P = 0.021$). **Conclusion** The over-expressed miR-221 might play a role in the development and progression of colorectal carcinoma, as a biomarker for prognosis. The real-time RT-PCR assay was an accurate, rapid and less-expensive method compared with routine Northern blot analysis.

Key words: Colorectal carcinoma; microRNA-221; Real-time RT-PCR; Northern blot

摘要:目的 探讨 micorRNA-221(miR-221)在结直肠癌与癌旁组织中差异表达状况及其与临床病理特征之间的关系。**方法** 选取南方医院经手术切除的原发性结直肠癌标本 30 例,常规抽提肿瘤及对照癌旁组织中总 RNA,应用 Real-time RT-PCR 检测标本中 miR-221 表达状况,并以 Northern blot 进行验证。**结果** 30 例结直肠癌与癌旁组织相比,miR-221 表达明显上调(2.041 ± 1.401 vs. 0.806 ± 0.341),差异具有统计学意义($P < 0.01$),且 Real-time RT-PCR 与 Northern blot 检测结果具有高度相关性($r^2 = 0.948$, $P < 0.01$);miR-221 表达水平与肿瘤 TNM 分期($P = 0.032$)以及浸润深度($P = 0.021$)有关。**结论** miR-221 在结直肠癌中表达上调并可能参与了结直肠癌的发生发展,miR-221 有望成为结直肠癌患者预后判断的潜在标志物;Real-time RT-PCR 相比较 Northern blot 是一种较精确的 miRNA 定量检测方法,具有样本需求量少、操作流程简化、高效性等优点。

关键词: 结直肠癌;microRNA-221;Real-time RT-PCR;Northern blot

中图分类号:R735.3⁺5;R735.3⁺7 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)11-1276-04

0 引言

近年研究表明微小 RNA (microRNA, miRNA)对生物体生长发育和分化调控起着重要作用,

而其失衡表达亦可促进多种肿瘤的发生发展^[1]。miR-221 是新近发现的一种 miRNA,其在多种恶性肿瘤中表达上调,在肿瘤演进中可能通过转录后基因沉默机制 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 而发挥类似“癌基因”的作用^[2]。迄今,有关 miR-221 在结直肠癌中表达的研究除我们前期的工作外,尚未见其他文献报道。本实验拟采用 Real-time RT-PCR 观察结直肠癌与毗邻癌旁组织中 miR-221 差异表达状况并分析其表达水平与临床病理特征之间的关系,旨在探讨 miR-221 在结直肠癌发生发展中的作用。

收稿日期:2011-02-17;修回日期:2011-08-02

基金项目:广东省自然科学基金博士启动项目(8451051501000390);广东省医学科研基金资助项目(B2010190);南方医科大学南方医院院长基金资助项目(2008C005)

作者单位:1. 351100 福建莆田,南京军区福州总医院九五临床部普通外科;2. 南方医科大学南方医院普通外科

通信作者:孙凯, E-mail: sunkai9602@sina.com

作者简介:王剑平(1978-),男,硕士在读,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤的基础与临床研究

1 资料与方法

1.1 组织来源

30 例结直肠癌及对照癌旁组织标本取自南方医院 2008 年 9 月—2009 年 5 月间手术患者,术后均经病理证实。其中男 16 例,女 14 例;年龄 32~74 岁,平均(52.5±11.8)岁;结肠癌 12 例,直肠癌 18 例。完善相关病理资料,包括肿瘤细胞分化程度、浸润深度、TNM 分期(NCCN 2009 版)、CEA 水平等。癌旁组织取自距离癌组织 5 cm 的肠黏膜,另切取距离癌组织 10 cm 以上肠黏膜作为健康对照。全部病例术前均未接受化疗或放疗。标本采集后迅速放至液氮中冷冻, -80℃ 保存。

1.2 引物设计与合成

由 miRBase 数据库(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)查找基因序列,使用软件 Primer-Express 2.0 进行引物与探针的设计。内参照 RNU6B 上游引物为 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',下游引物为 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3',扩增产物长 96 bp; miR-221 上游引物 5'-CAG CAT ACA TGA TTC CTT GTG A-3',下游引物为 5'-CTT TGG TGT TTG AGA TGT TTG G-3',扩增产物长 73 bp。上述引物均由上海生工合成。

1.3 Real-time RT-PCR 检测标本中 miR-221 表达

常规 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)抽提总 RNA,DEPC 水溶解沉淀,核酸蛋白分析仪(Beckman Coulter, USA)测定 RNA 浓度,根据 RNA 在 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \geq 1.8$ 及甲醛变性凝胶电泳 28 S、18 S RNA 条带比值 ≥ 1.5 鉴定 RNA 纯度及完整性。参照文献^[3]应用茎环法行 miR-221 定量检测;取总 RNA 1 μg 加入无菌蒸馏水 12 μl ,混匀后 72℃ 培养 5 min 以打开 RNA 二级结构,随后立即置于冰上,以防止 RNA 复性再次恢复二级结构;在另一去 RNase 的 PCR 管中配置以下反应液: dNTP mixture 2.0 μl 、RNase 抑制剂 0.5 μl 、miR-221 反转录引物 0.5 μl 、RNU6B 反转录引物 0.5 μl 、5× buffer 4.0 μl 、M-MLV 反转录酶 0.5 μl (Promega 公司);配好后加入到刚才含总 RNA 的溶液中混匀,42℃ 培养 60 min,所得 cDNA 置于 -20℃ 保存。构建 miR-221 和 RNU6B 的 Real-time RT-PCR 反应体系: cDNA 5.0 μl 、Primers 1.0 μl 、SYBR Green 荧光染料 10 μl 、无菌蒸馏水 8.0 μl ;反应条件:95℃ 变性 10 min;95℃ 15 s、65℃ 30 s、72℃ 30 s,共 40 个循环;循环结束后 72℃ 延伸 10 min,每个标本均作复管 PCR 反应(试剂购自 TOYOBO 公司,PCR 仪采用 ABI PRISM® 7300)。采用 RNU6B 作为内参照,以 RNU6B 拷贝数作为

校正基数,通过 Light Cycler 软件直接获得各样本中 miR-221 的 Ct(cycle threshold)值,与同样本中 RNU6B 的 Ct 值相减,即获得该样本中 miR-221 的 ΔCt 值;由于以 Real-time RT-PCR 定量 RNA 时,受到不同 RNA 样本存在不同反转录效率的限制,遂再以正常肠黏膜 ΔCt 值作为校正,得出 $-\Delta\Delta\text{CT}$ 值,按目的基因表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算各样本中 miR-221 确切含量。以上实验均至少重复三次。

1.4 Northern blot 验证差异表达 miR-221 排除假阳性

取总 RNA 20 μg 行甲醛变性凝胶电泳,虹吸法转印至 Hybond-N+ 尼龙膜(Amersham 公司),紫外交联固定后于 68℃ 预杂交 30 min,以 Prime-a-Gene 随机引物标记试剂盒(Promega 公司)行 miR-221 探针标记,3 000 Ci/mmol 的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 大约标记 25 ng 探针,加入杂交液和探针混合液后于 68℃ 杂交过夜,用 $1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ 于 68℃ 洗膜 15 min 共 2 次, -70℃ 条件下放射自显影,miR-221 相对表达量以 miR-221 与 RNU6B 灰度扫描值的比值表示。以上实验均至少重复三次。

1.5 统计学方法

实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,配对设计两两比较采用 *t* 检验;肿瘤临床病理参数与 miR-221 表达水平之间的关系分析采用 Mann-Whitney 检验和 Kruskal-Wallis 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件完成。

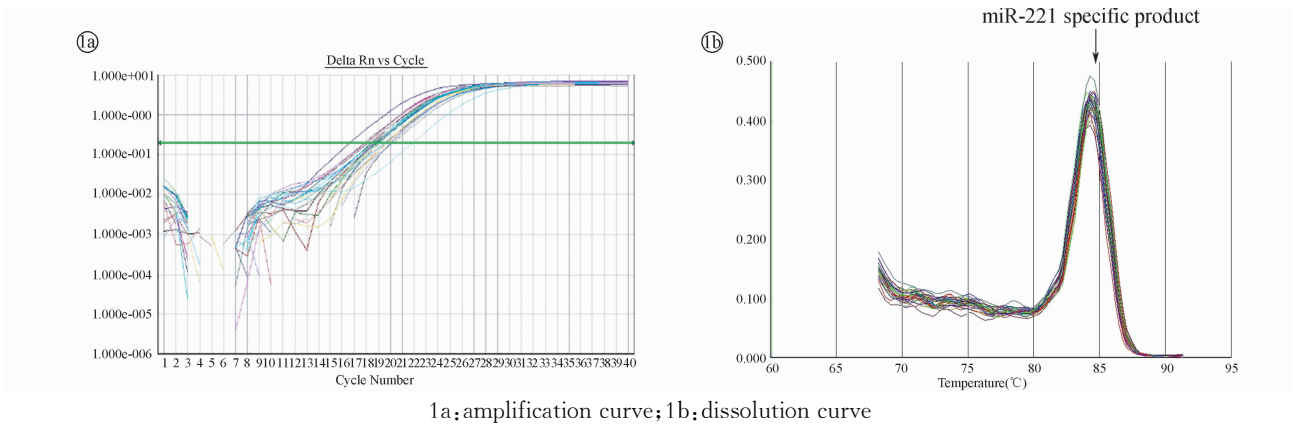
2 结果

2.1 Ct 值判读

根据 Real-time RT-PCR 原理,当目的基因经一定次数的扩增循环而出现指数增长时,其激发的荧光信号即达到一定的设定阈值强度而被 PCR 仪荧光探头采集,仪器即给出此时的扩增循环次数,即目的基因出现指数增长的最低循环数,以 Ct 值表示,其与反应体系中原先目的基因 cDNA 的实际拷贝数直接相关且呈反比,因此以 Ct 值来反映目的基因 cDNA 起始含量,即 Ct 值越低,实际拷贝数越高,从而达到定量检测的目的。本实验显示,所有样本中 miR-221 cDNA 显示指数增长,并达到平台期,其扩增曲线为一组典型的倒 S 型曲线,见图 1a,扩增效率较高。通过设置复孔取平均值,即得到各样本中目的基因扩增的 Ct 值作为 miR-221 定量判定。

2.2 PCR 产物的特异性

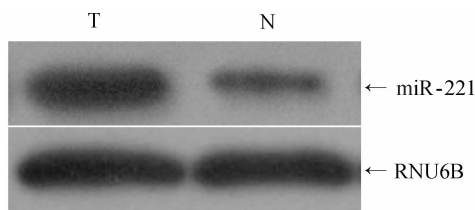
由于不同序列或长度 PCR 产物在不同的温度下溶解,因此可观察到不同的峰值;只有当特异性 PCR



1a; amplification curve; 1b; dissolution curve

图 1 Real-time RT-PCR 检测 miR-221 的表达

Figure 1 Real-time RT-PCR analysis detecting miR-221 expression in colorectal carcinoma



T: the patient's tumor; N: non-tumorous tissue (N)

图 2 Northern blot 检测 miR-221 在结直肠癌及癌旁组织中表达

Figure 2 Northern blot analysis of miR-221 expression in colorectal carcinoma and adjacent non-tumorous tissue

产物形成时,于熔解曲线图中可见单一的峰;而 T_m 主要依赖于片段长度、序列组成、GC 含量和反应中 Mg^{2+} 浓度等因素。本研究中 miR-221 的 PCR 产物为 73 bp,其对应的 T_m 为 $(84.26 \pm 0.56)^\circ C$,熔解温度均一,峰的形状也较锐利,见图 1b。

2.3 miR-221 在结直肠癌中表达状况

应用 Real-time RT-PCR 检测显示 miR-221 在结直肠癌较癌旁组织中表达明显上调 2.53 倍 $(2.041 \pm 1.401 vs. 0.806 \pm 0.341)$,差异具有统计学意义 $(P < 0.01)$;而以 Northern blot 检测 miR-221 及 RNU6B 在结直肠癌及癌旁组织表达的相对含量,见图 2,同样显示 miR-221 在结直肠癌较癌旁组织中表达明显上调 $(1.908 \pm 1.344 vs. 0.753 \pm 0.471)$;以 Real-time RT-PCR 与 Northern blot 分别检测标本中 miR-221 表达,两者结果具有高度相关性 $(r^2 = 0.948, P < 0.01)$ 。

2.4 miR-221 表达水平与结直肠癌临床病理特征之间的关系

miR-221 表达水平与肿瘤 TNM 分期 $(P = 0.032)$ 及浸润深度 $(P = 0.021)$ 有关,而与性别、年龄、肿瘤部位、分化程度、CEA 水平无关,见表 1。

表 1 miR-221 表达水平与结直肠癌临床病理特征之间的关系

Table 1 Relationship between miR-221 expression and clinicopathological features in colorectal carcinoma

Clinicopathological variables	Cases	miR-221 ($\bar{x} \pm s$)	P
Gender			
Male	16	2.154 ± 1.620	
Female	14	1.800 ± 0.714	0.096
Age(years)			
≤50	11	1.898 ± 0.976	
>50	19	2.145 ± 1.457	0.605
Tumor location			
Colon	12	1.935 ± 0.577	
Rectum	18	2.037 ± 1.033	0.586
TNM stage			
I + II	11	1.185 ± 0.392	
III + IV	19	2.658 ± 1.437	0.032
Tumor invasion			
T1 + T2 + T3	23	1.275 ± 0.445	
T4	7	2.833 ± 1.498	0.021
Differentiation			
Well or moderate	16	2.168 ± 1.128	
Poor	14	1.974 ± 0.824	0.767
CEA($\mu g/L$)			
≤5	10	2.020 ± 0.321	
>5	20	2.213 ± 0.647	0.429

3 讨论

近来研究证实,许多位于人类基因组的某些相对脆弱区域(fragile region)的 miRNA 可通过对其相应靶基因的功能调控而在肿瘤的发生发展中发挥重要作用,miRNA 与肿瘤调控关系逐渐成为研究热点^[4-5]。本研究分别应用 Real-time RT-PCR 和 Northern blot 技术平台分析 miR-221 在结直肠癌

中表达水平及其与临床病理特征之间的关系;结果显示,miR-221 在结直肠癌较癌旁组织中表达明显上调,且其表达水平与肿瘤 TNM 分期及浸润深度有关,提示 miR-221 可能作为“癌基因”而参与了结直肠癌的始发与演进。既往研究证实 miR-221 可通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinases inhibitors,CDKI)家族中 CDKN1B/p27、CDKN1C/p57 等多个成员的转录后表达,使肿瘤细胞增殖越过周期监测点(check point),促进肿瘤细胞由 G₀/G₁ 期进入 S 期^[6]。值得注意的是,亦有研究报道证实 miR-221 尚可抑制甲状腺乳头状癌中 c-kit 原癌基因的表达,此时 miR-221 似又发挥着“抑癌基因”作用^[7]。究竟是同一种 miRNA 本身即具有双向调控作用,抑或仅是在不同肿瘤或不同时空环境下其作用机制不同还难以确定,且 miR-221 在结直肠癌中的下游调控靶基因亦尚需后继实验进一步明确;而这亦与目前有关 miRNA 的最新认识相一致,即 miRNA 与其靶 mRNA 并不是简单的“一对一”直接线性联系,而是构成复杂的网络调控模式。

由于 miRNA 序列较短,难以通过常规 qRT-PCR 扩增。本实验首先将 miRNA 反转录产物设计成特殊的茎环结构,然后运用 TaqMan 探针进行实时荧光定量检测,建立了一种可以日后临床运用的检测平台,其实验结果经 Northern blot 验证真实可靠。我们体会 Real-time RT-PCR 与传统 RNA 分析方法如 Northern blot 等相比体现了下列优点:(1)样本需求量小:Northern blot 每次实验均至少需要 10~30 μg 总 RNA,而采用 Real-time RT-PCR 仅需 1 μg 总 RNA 即可在一支 Eppendorf 管中完成所有检测项目,这对细针穿刺提取物和外周血中痕量 miRNA 的检测尤有意义;(2)操作流程简化:Real-time RT-PCR 省略了 Northern blot 中电泳、转印、漂洗等繁琐步骤,避免了放射性污染,实验

时间亦大大缩短;(3)高效性:Real-time RT-PCR 将目的 miRNA 进行扩增,并以平均荧光强度作为检测定量,使结果更为精确。因此,本研究亦为今后在临床上开展新的更高效的结直肠癌诊断方法提供了一定的实验依据^[8]。

总之,miR-221 在结直肠癌中表达状况的分析为其发病机制和诊断治疗的研究提供了新的思路和实验基础;而进一步通过细胞学实验观察 miR-221 对结直肠癌细胞生长影响则是我们后续研究内容。

参考文献:

- [1] Bandres E, Agirre X, Bitarte N, et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(11): 2737-2743.
- [2] Motoyama K, Inoue H, Taktuno Y, et al. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(4): 1069-1075.
- [3] Feng J, Wang K, Liu X, et al. The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR[J]. *Gene*, 2009, 437(1-2): 14-21.
- [4] 孙凯,黄晓卉,甄茂川,等.应用液相芯片分析肝细胞癌及癌旁组织小分子 RNA 表达谱差异[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(8): 945-947.
- [5] 孙凯,汪谦.液相芯片技术在小分子 RNA 检测分析中的应用[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(20): 1437-1439.
- [6] Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2008, 27(43): 5651-5661.
- [7] Visone R, Russo L, Pallante P, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14(3): 791-798.
- [8] 曾俊杰,孙凯,吴承堂,等.应用实时荧光定量 PCR 检测结直肠癌与癌旁组织中 miRNA-221 的差异表达状况[J]. *山东医药*, 2010, 50(12): 26-28.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]