

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.14.013

# microRNA-194 及 microRNA-497 在结直肠癌患者血清中的表达和临床意义\*

徐菲菲<sup>1,2</sup>, 陈昭华<sup>1,3</sup>, 王亚南<sup>1,3△</sup>

1. 苏州市立医院检验科, 江苏苏州 215002; 2. 常熟市医学检验所, 江苏苏州 215500;  
3. 南京医科大学附属苏州医院检验科, 江苏苏州 215002

**摘 要:**目的 探讨 microRNA-194(miR-194)、microRNA-497(miR-497)在结直肠癌(CRC)患者血清中的表达及临床意义。方法 收集 52 例 CRC 患者(CRC 组)和 22 例健康体检者(对照组)血清标本,采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 miR-194、miR-497 的表达量。结果 CRC 组血清中 miR-194 表达为 1.90(0.86~3.35),明显高于对照组[0.76(0.69~0.93)],CRC 组血清中 miR-497 表达为 1.57(0.62~2.38),高于对照组[0.79(0.36~1.15)],差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。不同年龄、肿块大小、肿瘤分化程度、淋巴结转移情况及 TNM 分期的 CRC 患者 miR-194、miR-497 水平比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 miR-194 和 miR-497 在 CRC 患者血清中表达上升,其异常表达可能与 CRC 的发生有关。

**关键词:**结直肠癌; microRNA-194; microRNA-497; 实时荧光定量聚合酶链反应

**中图分类号:**R735.3+5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2019)14-1997-04

## Expression and clinical value of serum microRNA-194 and microRNA-497 in colorectal cancer\*

XU Feifei<sup>1,2</sup>, CHEN Zhaohua<sup>1,3</sup>, WANG Ya'nan<sup>1,3△</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, Jiangsu 215002, China; 2. Changshu Medicine Examination Institute, Suzhou, Jiangsu 215500, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu 215002, China

**Abstract: Objective** To explore the expression level and clinical value of serum microRNA-194 (miR-194), microRNA-497 (miR-497) in colorectal cancer patients. **Methods** The expression levels of serum miR-194, miR-497 of 52 colorectal cancer patients (colorectal cancer group) and 22 healthy controls (control group) were determined by real-time quantitative PCR and compared. **Results** The relative expression level of serum miR-194 was 1.90(0.86—3.35) in colorectal cancer group, which was higher than 0.76(0.69—0.93) in control group, the relative expression level of serum miR-497 was 1.57(0.62—2.38) in colorectal cancer group, which was higher than 0.79(0.36—1.15) in control group, the differences were significant ( $P<0.05$ ). However, the expression levels of miR-194 and miR-497 had no significant differences in patients with different age, tumor size, differentiation degree and TNM stage ( $P>0.05$ ). **Conclusion** miR-194 and miR-497 highly expressed in the serum of colorectal cancer patients, the abnormal expression might related to the occurrence.

**Key words:** colorectal cancer; microRNA-194; microRNA-497; real-time fluorescent quantitative PCR

结直肠癌(CRC)的发生、发展包含多种影响因素,是一个与多种基因相关的复杂过程。microRNA(miR)是一种非编码单链小 RNA,不具备翻译功能,主要通过负向调控信使 RNA(mRNA)的表达参与多种肿瘤的发生、发展<sup>[1-2]</sup>,但具体机制尚不明确,目前争议较大。有研究报道,miR-194 在 CRC 中表达上调,通过调控肿瘤细胞发生上皮间质转化(EMT),从而发挥其原癌功能<sup>[3]</sup>。也有研究报道 miR-497 与

CRC 的发生、发展密切相关,miR-497 一方面表现为能够促进肿瘤的转移,发挥原癌功能<sup>[4]</sup>,另一方面能够明显抑制肿瘤的生长,起到抑癌作用<sup>[5-6]</sup>。本研究用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CRC 患者血清中 miR-194、miR-497 的表达水平,分析 miR-194、miR-497 与临床病理参数之间的各种关系,探讨血清 miR-194、miR-497 的表达水平在 CRC 临床诊断中的应用价值。

\* 基金项目:江苏省苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2014017)。

作者简介:徐菲菲,女,技师,主要从事临床检验研究。△ 通信作者,E-mail:wangyn1980@163.com。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择苏州市立医院本部住院的 52 例 CRC 患者纳入 CRC 组,所有患者均经过病理检测确诊,且未接受过任何手术治疗、放疗、化疗。其中男 30 例,女 22 例;年龄 36~84 岁,平均(65.13±11.06)岁,<60 岁 15 例,60~70 岁 18 例,>70 岁 19 例;肿块大小≤4 cm 24 例,>4 cm 28 例;低分化 8 例,中高分化 44 例;有淋巴结转移 24 例,无淋巴结转移 28 例;TNM 分期 I~II 期 24 例,III 期 23 例,IV 期 5 例。另选取 22 例体检健康者纳入对照组,其中男 12 例,女 10 例;年龄 51~65 岁,平均(60.64±3.32)岁。所有研究对象自愿加入本研究,并签署知情同意书,本

研究经过本院伦理委员会批准后进行。

1.2 仪器与试剂 主要应用的仪器包括仪博日科技公司的 LifePro 普通 PCR 仪,美国 ABI 公司 PCR System 7500 扩增仪,德国 Eppendorf 公司的 Eppendorf 高速冷冻离心机、超低温冰箱,上海瑞仰公司的生物安全柜。主要试剂包括天根公司的 Trizol 试剂、总 RNA 提取试剂、RNase Free ddH<sub>2</sub>O、miRcute miR cDNA 第一链合成试剂盒、miRcute miR RT-PCR 检测试剂盒(SYBR Green)。RT-PCR 使用的引物见表 1,引物由天根公司定制,公司对引物序列保密。在 60℃进行退火。miR-194 和 miR-497 的产物片段均为 80 bp,miR-16 的产物片段为 79 bp。

表 1 RT-PCR 使用的引物信息

| miR 种类  | 前向引物目录号             | 后向通用引物                                                |
|---------|---------------------|-------------------------------------------------------|
| miR-194 | CD201(TIANGEN)      | miRcute miR RT-PCR 检测试剂盒(SYBR Green TIANGEN FP401) 自带 |
| miR-497 | CD2010441(TIANGEN)  | 同上                                                    |
| miR-16  | CD201-0235(TIANGEN) | 同上                                                    |

1.3 方法

1.3.1 标本采集 在 CRC 患者术前和健康体检者体检时采集 3 mL 空腹静脉血于一次性真空采血管中,以 3 000 r/min 离心 5 min,分离血清,取 1 mL 血清于-80℃保存。

1.3.2 标本总 RNA 的提取 在 250 μL 血清中加入 750 μL Trizol,并将其充分振荡混匀,再按照说明书进行 RNA 的提取。选用总 RNA 吸光度比值(A<sub>260/280 nm</sub>)为 1.8~2.2 的标本。

1.3.3 miRNA3'末端加 Poly(A)处理及反转录反应 按照 miRcute miR cDNA 第一链合成试剂盒的说明书进行操作。miRNA3'末端加 poly(A)处理反应体系一共 20 μL,总 RNA、大肠杆菌 Poly(A)、10×聚合酶缓冲液、5×rATP 溶液、无 RNA 酶双蒸水分别为 2.0、0.4、2.0、4.0、11.6 μL。将上述反应液混匀后,进行瞬时离心,在 37℃孵育 60 min。按照反转录试剂盒的说明书进行操作。反转录反应体系一共 20 μL,Poly(A)反应液、10×反转录引物、10×反转录缓冲液、超纯三磷酸腺嘌呤脱氧核苷酸、核糖核酸酶抑制剂、定量反转录酶、无 RNA 酶双蒸水分别为 2.0、2.0、2.0、1.0、1.0、0.5、11.5 μL,充分混合所有反应液,离心,置于 37℃反应 60 min,然后取 cDNA 保存于-20℃。

1.3.4 RT-PCR 反应体系及条件 总反应体系一共 20 μL,2×miRcute miR 预混剂(含 SYBR、ROX)、前向引物、后向引物(10 μmol/L)、miR 第一链 cDNA、50×ROX 参比染料、双蒸水分别为 10.0、0.4、0.4、2.0、2.0、5.2 μL。先 94℃预变性 2 min;然后选择 94℃20 s、60℃34 s,进行 43 个循环,并且记录下各个标

本的荧光信号在到达阈值时相对应的循环数(Ct 值),其内参物为 miR-16。要求归一化处理目标基因,以此来确保样品量与目标基因的量的一致性。结果采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法进行计算分析。将 10 μL 扩增产物置于 25 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳,观察并拍摄结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理及统计分析。选择单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验法来进行正态分布检验,若符合正态性分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,选择成组设计的两样本 t 检验进行组间比较;若不符合正态性分布,以 M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>)表示,选择非参数 Wilcoxon 秩和检验进行组间比较。以 P<0.05 为差异有统计学意义。采用 Graphpad Prism 软件进行溶解曲线作图。

2 结果

2.1 miR-194、miR-497、miR-16 溶解曲线 miR-194、miR-497、miR-16 的溶解曲线均为尖锐的单峰,出现峰的温度分别为 78.05、78.10、78.51℃。见图 1~3,引物具有特异性,产物稳定正确,数据可靠。

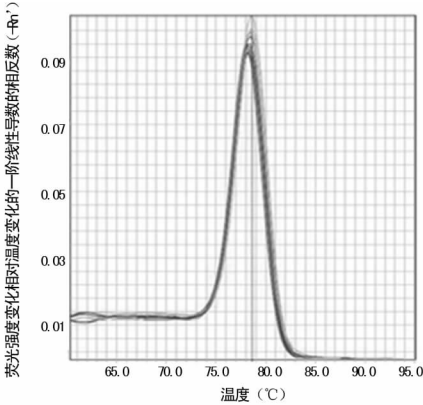


图 1 miR-16 溶解曲线

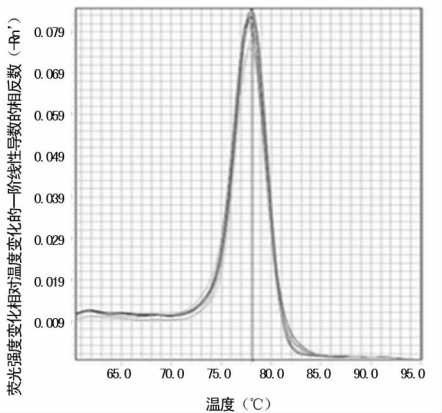


图 2 miR-194 溶解曲线

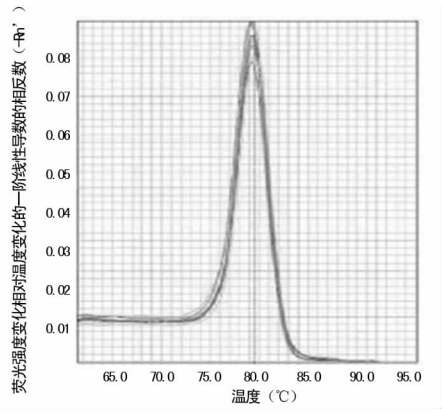


图 3 miR-497 溶解曲线

**2.2 RT-PCR 检测 miR-16 的表达水平** 对照组血清 miR-16 的 Ct 值为  $30.38 \pm 0.67$ , CRC 组 miR-16 的 Ct 值为  $29.96 \pm 0.96$ , 差异无统计学意义 ( $t = 2.47, P > 0.05$ ), 由此可知 miR-16 在两组中均表达稳定, 可作为内参基因来定量检测 miR。

**2.3 RT-PCR 检测 miR-194、miR-497 的表达水平** CRC 组血清中 miR-194 表达为  $1.90(0.86 \sim 3.35)$ , 明显高于对照组  $[0.76(0.69 \sim 0.93)]$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 同样, CRC 组血清中 miR-497 表达为  $1.57(0.62 \sim 2.38)$ , 高于对照组  $[0.79(0.36 \sim 1.15)]$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.4 不同临床病理参数的 CRC 患者血清 miR-194、miR-497 表达差异** 不同年龄、肿块大小、肿瘤分化程度、淋巴结转移情况及 TNM 分期的 CRC 患者 miR-194、miR-497 水平比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

| 表 2 不同临床病理参数的 CRC 患者血清 miR-194、miR-497 表达差异 [ $M(P_{25} \sim P_{75})$ ] |                 |                 |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| 临床病理参数                                                                  | miR-194 相对表达水平  | miR-497 相对表达水平  |
| 年龄(岁)                                                                   |                 |                 |
| <60                                                                     | 1.75(0.93~2.80) | 1.74(0.82~2.67) |
| 60~70                                                                   | 1.87(0.40~2.44) | 1.72(0.34~2.40) |
| >70                                                                     | 1.15(0.62~1.95) | 1.02(0.61~1.94) |
| 肿块大小(cm)                                                                |                 |                 |

| 续表 2 不同临床病理参数的 CRC 患者血清 miR-194、miR-497 表达差异 [ $M(P_{25} \sim P_{75})$ ] |                 |                 |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| 临床病理参数                                                                   | miR-194 相对表达水平  | miR-497 相对表达水平  |
| $\leq 4$                                                                 | 2.72(1.38~3.50) | 1.80(0.60~2.46) |
| $> 4$                                                                    | 1.04(0.62~2.34) | 1.01(0.52~1.99) |
| 分化程度                                                                     |                 |                 |
| 低分化                                                                      | 0.72(0.29~1.03) | 1.12(0.45~1.53) |
| 中高分化                                                                     | 1.91(0.63~3.31) | 1.17(0.55~2.39) |
| 淋巴结转移                                                                    |                 |                 |
| 有                                                                        | 1.83(0.76~2.70) | 1.49(0.78~2.21) |
| 无                                                                        | 1.94(0.65~3.41) | 1.24(0.54~2.38) |
| TNM 分期                                                                   |                 |                 |
| I ~ II                                                                   | 2.09(0.65~3.54) | 1.31(0.55~2.39) |
| III                                                                      | 1.90(0.80~2.76) | 1.74(0.44~2.36) |
| IV                                                                       | 1.29(0.60~2.64) | 1.05(0.88~1.33) |

3 讨 论

CRC 发病率处于恶性肿瘤的第 3 位,病死率在男性恶性肿瘤中处于第 4 位,在女性恶性肿瘤中处于第 3 位。随着我国人们生活方式和饮食习惯的改变, CRC 发病率也有所升高, CRC 的好发年龄主要在 41~65 岁。CRC 早期一般不出现明显的临床症状,但随着肿块不断变大,会出现排便习惯和粪便性状的改变,以及便血、腹泻、便秘与腹泻交替、局部腹痛等临床症状,在晚期则会出现贫血、消瘦、乏力等全身症状。CRC 发展过程涉及多个步骤、多个阶段,主要涉及增生、腺瘤和癌变几个阶段。因此,探讨新的生物标志物对于 CRC 早期诊断、评估疗效及改善患者预后具有重要的临床价值<sup>[7]</sup>。

miR 来自细胞核,其基因数可占人类基因总数的 2%~5%,在整个基因组中均有表达。成熟的 miR 与靶 mRNA 的 3'非翻译区(3'-UTR)特异性配对,可以抑制或降解 miR 的表达,从而最终影响蛋白的表达。据报道,miR 参与调控 CRC 的发生、发展<sup>[8-11]</sup>。miR 在 CRC 能够发挥原癌基因的作用,例如 miR-182 在 CRC 细胞中表达较正常组织明显上调<sup>[12]</sup>。同样,miR 可以通过改变信号通路蛋白(如 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白、KRAS、P53、IGF)的表达水平,促进肿瘤发展。另一方面,miR 可发挥抑癌基因的作用,通过抑制 K-Ras 基因的功能,从而抑制 CRC 细胞的恶性增殖<sup>[13]</sup>。

本研究应用 RT-PCR 检测了 miR-194 和 miR-497 在 52 例 CRC 患者和 22 例健康体检者血清中的相对表达水平,分析其与临床病理参数之间的关系,探讨其对 CRC 的临床应用价值。研究结果表明, miR-194 在 CRC 患者血清中的相对表达量为  $1.90(0.86 \sim 3.35)$ ,是健康体检者的近 2 倍。miR-497 在 CRC 患者血清中的相对表达量为  $1.57(0.62 \sim 2.38)$ ,表达上调,以上结果提示这两种 miR 具有较好的

CRC 诊断价值。但其相对表达在不同年龄、肿块大小、分化程度、淋巴结转移情况和 TNM 分期的患者中无明显差异( $P>0.05$ )。

miR-194 可以调节 THBS1 的表达水平,而 THBS1 是一种在 HTC116CRC 细胞株中编码血小板反应蛋白-1(TSP-1)的内生血管再生抑制剂<sup>[14]</sup>。miR-194 可与 THBS1 产生的互补序列相结合,引起 CRC 微血管密度及长短的改变,从而促进血管再生。另外,EMT 在 CRC 进展中发挥着重要作用。据报道,波形蛋白和 E-cadherin 重组蛋白分别是 EMT 过程中重要的上皮细胞标志物和间质细胞表型标志物<sup>[15]</sup>。miR-194 上调了基质金属蛋白酶 2(MMP-2)的明胶降解活性和波形蛋白的表达,从而影响 CRC 的 EMT<sup>[3]</sup>。miR-194 可以下调 E-cadherin 的表达来降低 CRC 细胞之间的黏附,从而提高 CRC 细胞的迁移、侵袭能力<sup>[16]</sup>。

miR-497 属于 miR-15/16/195/424/497 家族,具有高度保守性。miR-497 可干扰细胞周期和细胞转导途径从而影响细胞的生长。有关研究发现,miR-497 可以抑制 Nrdp1 的翻译,而 Nrdp1 可以抑制 CRC 中 ErB3 的磷酸化,促进 CRC 的转移<sup>[4]</sup>。miR-497 又可以通过靶向 VEGFA 抑制 ERK 和 MMP-9 信号通路,抑制细胞生长,从而阻碍癌细胞的转移<sup>[17]</sup>。本研究并未涉及 miR-194 和 miR-497 的调控机制,在之后的研究中有待进一步深入分析。

## 参考文献

- [1] 林剑勇,邓益,斌罗艳,等. 红肺癌组织中 miRNA-449a 的表达及其临床意义[J]. 检验医学与临床,2015,12(3): 314-316.
- [2] 刘旭斌,余德奎,邹汉良,等. MiRNA let-7a 和 miRNA let-7f 早期诊断肝癌的临床价值[J]. 检验医学与临床,2017,14(14):2017-2019.
- [3] CAI H K, CHEN X, TANG Y H, et al. MicroRNA-194 modulates epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer metastasis [J]. Onco Targets Ther, 2017,10:1269-1278.
- [4] JIANG Y, MENG Q, QI J, et al. Mir-497 promotes metastasis of colorectal cancer cells through Nrdp1 inhibition [J]. Tumour Biol 2015,36(10):7641-7647.
- [5] XU Y, CHEN J, GAO C, et al. MicroRNA-497 inhibits tumor growth through targeting insulin receptor substrate 1 in colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2017,14(6): 6379-6386.
- [6] ZHANG N, SHEN Q, ZHANG P. MiR-497 suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer cells by targeting fos-related antigen-1[J]. Onco Targets Ther, 2016,9:6597-6604.
- [7] NGUYEN M T, WEINBERG D S. Biomarkers in colorectal cancer screening[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2016, 14(8):1033-1040.
- [8] FALZONE L, SCOLA L, ZANGHI A, et al. Integrated analysis of colorectal cancer microRNA datasets: identification of microRNAs associated with tumor development [J]. Aging (Albany NY), 2018,10(5):1000-1014.
- [9] PICHLER M, STIEGELBAUER V, VYCHYTILOVA-FALTEJSKOVA P, et al. Genome-Wide miRNA analysis identifies miR-188-3p as a novel prognostic marker and molecular factor involved in colorectal carcinogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2017,23(5):1323-1333.
- [10] MA W, LIU B, LI J, et al. MicroRNA-302c represses epithelial-mesenchymal transition and metastasis by targeting transcription factor AP-4 in colorectal cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2018,105:670-676.
- [11] KWAK B, KIM D U, KIM T O, et al. MicroRNA-552 links Wnt signaling to p53 tumor suppressor in colorectal cancer [J]. Int J Oncol, 2018,53(4):1800-1808.
- [12] 张艳,陈琳,王峰. 血清 miRNA-182 检测在结直肠癌中的诊断价值研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017,38(15): 2025-2027.
- [13] FANG Y, SUN B, LI Z, et al. MiR-622 inhibited colorectal cancer occurrence and metastasis by suppressing K-Ras [J]. Mol Carcinog, 2016,55(9):1369-1377.
- [14] PAULINA T, JANUSZ B. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment [J]. Acta Biochim Pol, 2012,59(4):467-474.
- [15] SCANLON C S, VAN TUBERGEN E A, INGLEHART R C, et al. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition insquamous cell carcinoma[J]. J Dent Res, 2013,92(2):114-121.
- [16] CHRISTINE L C, AUTHOR B P, ELGENE L, et al. EMT, cell plasticity and metastasis [J]. Cancer Metast Rev, 2016,35(4):645-654.
- [17] QIU Y, YU H, SHI X, et al. MicroRNA-497 inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells by targeting vascular endothelial growth factor-A[J]. Cell Prolif, 2016,49(1):69-78.

(收稿日期:2019-01-21 修回日期:2019-04-21)