

## miR-155 在结肠癌组织中表达的临床病理意义

邹中辉, 陈天进, 何培生

**[摘要]** **目的:**探讨结肠癌组织及细胞株中 microRNA-155 (miR-155) 表达的临床病理意义。 **方法:**采用 RT-qPCR 检测 40 例结肠癌组织及癌旁组织、结肠癌细胞株中 miR-155 的 mRNA 的表达, 并对其临床病理指标进行分析, 分析抑制 miR-155 表达对结肠癌细胞增殖、克隆形成及凋亡影响。 **结果:**RT-qPCR 检测结果表明 40 例结肠癌组织中 miR-155 相对表达量明显高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ )。不同分化结肠癌细胞 miR-155 相对表达量差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中低分化结肠癌细胞中表达均高于中、高分化结肠癌细胞 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。miR-155 的异常高表达与病人肿瘤较大、分化程度差、淋巴结发生转移情况及远处有转移均有关 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ), 而与年龄和性别无关 ( $P > 0.05$ )。抑制 miR-155 可明显抑制结肠癌细胞增殖、克隆形成。 **结论:**结肠癌组织中高表达 miR-155 可以作为预测恶性程度、淋巴转移的有效指标, miR-155 在结肠癌病人的临床靶向治疗中具有一定的价值。

**[关键词]** 结肠肿瘤; 微小 RNA-155; 淋巴结转移

**[中图分类号]** R 735.35 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.05.013

## Clinical significance of the miR-155 expression in colon cancer tissue

ZOU Zhong-hui, CHEN Tian-jin, HE Pei-sheng

(Department of General Surgery, Three Gorges Center Hospital, Kaixian Chongqing 404100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the miR-155 expressions in colon cancer tissue and cell strain, and its clinical significance. **Methods:** The expressions of miR-155 mRNA in 40 cases of colon cancer tissue and adjacent carcinoma tissues, and cell strains were detected using RT-qPCR, and the clinical pathological indicators were analyzed. The effects of the inhibiting miR-155 expression on the proliferation, colony-formation and apoptosis of colon cancer cells were analyzed. **Results:** The results of RT-qPCR showed that the miR-155 mRNA expression in colon cancer tissues was significantly higher than that in adjacent carcinoma tissues ( $P < 0.01$ ). The difference of the expression of miR-155 in different differentiated colon cancer cells was statistically significant ( $P < 0.05$ ), and the expression of miR-155 in low-differentiated colon cancer cells was higher than that in medium and high-differentiated colon cancer cells ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ). The abnormally high expression of miR-155 was related to the big tumor size, poor differentiation degree, lymph node metastasis and distant metastasis ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ), but which was not related to the age and gender ( $P > 0.05$ ). Inhibiting the expression of miR-155 could inhibit the cell proliferation and colony-formation of colon cancer cells. **Conclusions:** The miR-155 high expression in colon cancer tissues can be used as an effective predictor of malignant degree and lymph node metastasis. The miR-155 has a certain value in the clinical targeted therapy of colon cancer.

**[Key words]** colon neoplasms; miRNA-155; lymph node metastasis

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 其发生与多步骤基因突变及表型改变有关<sup>[1]</sup>, 是遗传改变(基因突变、基因扩增等)和后天改变(异常的 DNA 甲基化, 染色质修饰等)积累的结果, 从而诱导结肠上皮细胞转化为结肠腺癌细胞<sup>[2]</sup>。尽管目前诊断技术进步, 很多结肠癌诊断在早期, 但仍有大约三分之一病人诊断时有转移, 而复发率高达 40%<sup>[3]</sup>。系统性化疗目前对结肠癌取得一定效果,

报道临床有效反应率在 40% ~ 60%<sup>[4]</sup>。但临床仍有一定病人对治疗无反应, 因此, 寻找新的有效治疗靶点具有重要的意义。

microRNA(miRNA)是一类长 19 ~ 25 个核苷酸的单链非编码小片段 RNA 调控分子, 成熟的 miRNA 在与靶 mRNA 3' 端非翻译区(3'-UTR) 完全或不完全匹配结合, 诱导靶 mRNA 降解或阻遏其翻译, 在转录后水平沉默基因的表达, 参与调节细胞生长发育、分化、凋亡<sup>[5]</sup>。越来越多的研究证实, 正常组织与肿瘤组织中 miRNA 的表达存在显著的差异<sup>[6]</sup>。本研究探讨结肠癌组织中 miR-155 表达与临床病理指标关系, 并分析可能机制, 为结肠癌治疗提供新的依据。

[收稿日期] 2016-06-29

[基金项目] 重庆市万州区科学技术项目(201403023)

[作者单位] 重庆市三峡中心医院 普外二科, 重庆 开县 404100

[作者简介] 邹中辉(1983 -), 男, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 何培生, 主任医师. E-mail: 841450676@qq.com

## 1 材料与方法

1.1 材料 收集 2013 年 10 月 1 日至 2014 年 5 月 1 日我院普外科 40 例结肠癌组织及距癌组织边缘 >5 cm 的正常结肠组织,标本切除后立即放入液氮,备 RNA 提取使用。所有病人术前未进行放、化疗等抗肿瘤治疗,所有标本均经术后病理确诊。本组 40 例结肠癌病人中男 29 例,女 11 例,年龄 17 ~ 70 岁。结肠癌的分期执行照 2010 年第七版国际抗癌协会制定的 TNM 分期标准。

1.2 主要试剂和细胞 总 RNA 提取试剂盒购于百泰克生物科技有限公司,逆转录试剂盒及 RT-qPCR-SYBR Green I 检测试剂盒购于 TAKARA 公司。miR-155 抑制寡聚核苷酸(Inhibitor)及内参引物 U6 购自广东锐博生物有限公司,脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司。高分化 HT29、中分化 SW620 和低分化 lovo 结肠癌细胞购自中国医学科学院肿瘤细胞库。

1.3 RNA 提取及 RT-qPCR 用 Trizol 从结肠癌组织样本中提取总 RNA,浓度及纯度用分光光度计检测,后按照试剂盒说明将 RNA 反转录为 cDNA。RT-qPCR 中 miR-155 引物序列及内参引物 U6 由广东锐博生物有限公司合成。每个实验重复 3 次。取 2  $\mu$ g RNA 行 RT-qPCR,按试剂盒说明,逆转录实验条件为:37  $^{\circ}$ C 作用 60 min,85  $^{\circ}$ C 作用 5 s。Q-PCR 实验步骤为:95  $^{\circ}$ C,30 min 解聚模板 DNA,60  $^{\circ}$ C 条件下 30 s 使引物与模板 DNA 结合,68  $^{\circ}$ C 条件下 10 s 扩增模板 DNA,反应共计 40 个循环,70  $^{\circ}$ C 条件下延伸 10 min 后结束反应。miR-155 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta Ct = Ct_{miR155} - Ct_{U6}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{癌} - \Delta Ct_{癌旁}$ 。

1.4 脂质体 2000 转染 miR-155a Inhibitor 待低分化结肠癌细胞 lovo 于 6 孔板 80% 融合度时,采用脂质体 2000 转染 lovo 细胞,参考试剂盒说明,miR-155a Inhibitor 核苷酸终浓度为 50 nmol/L,转染时间 5 h,然后将培养基换为完全培养基继续培养。

1.5 MTT 检测细胞增殖 结肠癌细胞系细胞转染 miR-155 Inhibitor 或阴性对照(negative control, NC) 24 h 后,消化细胞,用含 10% 胎小牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 1 000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200  $\mu$ L。分别在培养时间点 1、2、3、4 d 对细胞进行检测。每孔加 20  $\mu$ L 的噻唑蓝(MTT)溶液(5 nmg/mL 用 PBS 配制, pH = 7.4)20  $\mu$ L。继续孵育 4 h 后终止培养,小心吸弃孔

内培养上清液。每孔加 150  $\mu$ L DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分融解。选择 570 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔吸光度值,记录结果,以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.6 克隆形成实验 结肠癌细胞系细胞转染 miR-155 Inhibitors 或 NC 24 h 后,消化细胞,用含 10% 胎小牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,常规消化细胞并计数,将细胞以 500 个/孔接种于 6 孔板中,轻轻晃动培养板,使细胞分散均匀后,继续在细胞培养箱内培养。每 5 天换液一次,连续培养 12 d,培养板底部肉眼明显可见细胞克隆形成。吸净培养板中的培养基,用 PBS 溶液清洗 2 次。每孔加入 4% 多聚甲醛 2 mL,固定 30 min;吸弃甲醛,PBS 清洗 2 次;每孔中加入 0.1% 结晶紫溶液 2 mL,染色 20 min;ddH<sub>2</sub>O 清洗 3 次以上,自然风干。以大于 50 个细胞计为 1 个克隆,计数细胞克隆形成情况。

1.7 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验及 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 miR-155 在不同组织类型及细胞类型中表达情况比较 Q-PCR 检测结果表明 40 例结肠癌组织中 miR-155 相对表达量(1.976  $\pm$  0.386)明显高于癌旁组织(1.114  $\pm$  0.133) ( $t = 13.35, P < 0.01$ )。不同分化结肠癌细胞 miR-155 相对表达量差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中低分化结肠癌细胞 lovo 中表达均高于中、高分化结肠癌细胞( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )(见表 1)。

表 1 miR-155 在不同组织类型及细胞类型中表达情况比较

细胞类型	<i>n</i>	miR-155 相对表达量	<i>F</i>	<i>P</i>
HT29	3	1.017 $\pm$ 0.036 <sup>#</sup>		
SW620	3	1.338 $\pm$ 0.215 <sup>##</sup>	7.61	<0.05
lovo	3	1.768 $\pm$ 0.347		

*q* 检验:与 lovo 细胞比较<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$

2.2 结肠癌组织中 miR-155 表达与临床病理指标关系 高分化结肠癌(包括乳头状腺癌)以推进性的方式生长,其肿瘤浸润的前缘常有较明显的宿主防御性反应,如淋巴细胞增多、纤维组织增生等。低分化的结肠癌则多呈浸润性生长,肿瘤前缘宿主的防御性反应不明显。我们分析 miR-155 表达与 40 例结肠癌病人临床病理指标关系,发现 miR-155 表达情况与病人性别、年龄无关,但与病人肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移情况及远处转移情况有关

( $P < 0.01$ )。在肿瘤越大、分化程度较差、有淋巴结转移中增高,有远处转移病人 miR-155 表达量也明显高于无远处转移病人( $P < 0.01$ ) (见表 2)。

表 2 miR-155 表达与结肠癌临床病理特征的关系比较

临床病理特征	n	miR-155 相对表达量	t	P
性别				
男	29	2.33 ± 0.21	1.59	>0.05
女	11	2.19 ± 0.13		
年龄/岁				
≤55	21	2.25 ± 0.11	1.96	>0.05
>55	19	2.38 ± 0.13		
分化程度				
Well	21	1.91 ± 0.12	10.23 *	<0.01
Poor	19	2.43 ± 0.19		
T 分期				
T <sub>1</sub> ~ T <sub>2</sub>	15	2.07 ± 0.12	4.84 *	<0.01
T <sub>3</sub> ~ T <sub>4</sub>	25	2.38 ± 0.28		
Ns 分期				
N <sub>0</sub>	22	2.12 ± 0.13	6.78	<0.01
N <sub>1-2</sub>	18	2.42 ± 0.16		
M 分期				
M <sub>0</sub>	23	1.96 ± 0.13	8.50 *	<0.01
M <sub>1</sub>	17	2.46 ± 0.22		

\* 示 t' 值

2.3 抑制 miR-155 表达可明显抑制结肠癌细胞增殖、克隆形成 MTT 实验结果表明 24 h 后抑制 miR-155 可明显抑制结肠癌细胞增殖( $P < 0.01$ ) (见表 3), 而克隆形成实验也表明抑制 miR-155 可抑制结肠癌细胞 lovo 克隆形成 (见图 1), 表明 miR-155 在结肠癌细胞中发挥促进肿瘤细胞增殖作用。

表 3 MTT 实验检测抑制 miR-155 对结肠癌细胞 lovo 增殖影响

分组	n	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	3	0.460 ± 0.008	0.687 ± 0.012	1.159 ± 0.022	1.657 ± 0.012
miRNA 无效干预组	3	0.457 ± 0.007	0.727 ± 0.007	1.213 ± 0.019	1.657 ± 0.007
miR-155 抑制组	3	0.463 ± 0.006	0.567 ± 0.006	0.943 ± 0.015	1.260 ± 0.037
F	—	0.879	484.848	291.323	494.227
P	—	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01
MS 组内	—	0.000	0.000	0.000	0.001

### 3 讨论

miRNA 具有高度的时序性、保守性、组织特异性<sup>[7]</sup>。成熟的 miRNA 诱导靶 mRNA 降解或阻遏其翻译,从而在转录后水平沉默基因的表达,在肿瘤的

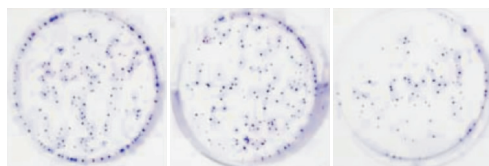


图 1 miR-155 Inhibitor 抑制结肠癌细胞克隆形成

发生、发展中起着重要的调控作用<sup>[8-9]</sup>。通过结肠癌组织 miRNA 表达谱与正常结肠组织 miRNA 表达谱相比较,发现大肠癌相关 miRNA 达几十种之多,有一部分 miRNA 呈现明显的上调,另外一部分呈现明显的下调<sup>[10]</sup>。此现象提示 miRNA 具有促癌和抑癌的作用,这取决于它们在细胞中的表达方式以及在细胞恶性转化进程中的作用。本研究探讨结肠癌组织中 miR-155 表达及临床意义,结果表明结肠癌组织中 miR-155 表达增高,抑制 miR-155 可抑制结肠癌细胞增殖和克隆形成,表明结肠癌中 miR-155 高表达有促进肿瘤进展作用。

miR-155 参与抑郁等精神活动<sup>[11]</sup>,并可抑制机体免疫反应,参与机体炎症反应<sup>[12-13]</sup>。有报道 miR-155 也参与新生血管形成,基因敲除 miR-155 抑制了血管内皮因子诱导的血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成<sup>[14]</sup>。miR-155 参与机体多种肿瘤发生,包括造血系统<sup>[15]</sup>、淋巴系统等<sup>[16]</sup>,而在乳腺癌<sup>[17]</sup>、胃癌<sup>[18]</sup>、黑素瘤<sup>[19]</sup>等恶性肿瘤中也发现 miR-155 表达增高,发挥促进恶性肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭作用。肿瘤细胞也可通过分泌 miR-155 促进周围纤维母细胞向肿瘤相关性纤维母细胞转变,导致恶性肿瘤进展<sup>[20]</sup>。在肿瘤干细胞中,转化生长因子  $\beta$  可导致 miR-155 表达增高,进而促进靶蛋白 TP53INP1 表达抑制,导致肿瘤细胞发生上皮-间质转换,并且肿瘤干性标志物表达增高增加<sup>[21]</sup>。这些结果均表明 miR-155 与恶性肿瘤进展有关,并且在恶性肿瘤细胞转移中可能发挥一定作用。本研究也表明结肠癌中 miR-155 高表达与病人肿瘤分化程度及淋巴结转移等有关,提示结肠癌中 miR-155 也发挥肿瘤增殖和转移重要作用。

miRNAs 一般通过调控靶蛋白表达发挥作用,目前研究报道 miR-155 可靶向作用于 Rb 抑癌蛋白,从而促进恶性肿瘤细胞增殖<sup>[22]</sup>。FOXO3 是重要的生长调控蛋白,具有抑制肿瘤细胞增殖作用,但 FOXO3 也是 miR-155 的作用靶点<sup>[23]</sup>。然而也有报道 miR-155 有促进肿瘤转移作用<sup>[24]</sup>。这些研究结果表明 miR-155 可能在肿瘤组织中调控不同抑癌蛋白表达,miR-155 可能通过抑制 Rb 和 FOXO3 等蛋

白,参与调控结肠癌进展。但关于 miRNA-155 家族成员在结肠癌中表达上调的具体作用机制还需要进一步研究。

总之,本研究表明结肠癌组织中 miR-155 表达增高,高表达 miR-155 与病人肿瘤较大、分化程度差、淋巴结发生转移情况及远处有转移均有关,而与年龄、性别均无关。结肠癌组织中 miR-155 可能通过作用抑癌蛋白,从而调控结肠肿瘤进展,miR-155 可能是结肠癌中重要的治疗靶点。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] EGGER G, LIANG G, APARICIO A, *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [J]. *Nature*, 2004, 429 (6990):457.
- [2] LV LV, ZHOU J, LIN C, *et al.* DNA methylation is involved in the aberrant expression of miR-133b in colorectal cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2):907.
- [3] MOHAJERI G, MOHAJERI MR, AFESHAR-MOGHADDAM N, *et al.* The significance of clinicopathological aspects of tumor for the detection of liver micrometastasis in patients with colorectal cancer [J]. *J Res Med Sci*, 2014, 19(5):410.
- [4] BILIR C, ENGIN H, TEMI YB. Effect of gender on coagulation functions: a study in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab, irinotecan, 5-Fluorouracil, and leucovorin [J]. *Adv Hematol*, 2014, 13(5):473.
- [5] OHTSUKA M, LING H, DOKI Y, *et al.* MicroRNA Processing and Human Cancer [J]. *J Clin Med*, 2015, 4(8):1651.
- [6] KEDMI M, SAS-CHEN A, YARDEN Y. MicroRNAs and growth factors: an alliance propelling tumor progression [J]. *J Clin Med*, 2015, 4(8):1578.
- [7] MANSOORI B, MOHAMMADI A, SHIRJANG S, *et al.* MicroRNAs: the new potential biomarkers in cancer diagnosis, prognosis and cancer therapy [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2015, 61(5):1.
- [8] GARG M. Emerging role of microRNAs in cancer stem cells: implications in cancer therapy [J]. *World J Stem Cells*, 2015, 7(8):1078.
- [9] TUTAR L, TUTAR E, ZGUR A, *et al.* Therapeutic targeting of microRNAs in cancer: future perspectives [J]. *Drug Dev Res*, 2015, 76(7):382.
- [10] THOMAS J, OHTSUKA M, PICHLER M, *et al.* MicroRNAs: clinical relevance in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12):28063.
- [11] FONKEN LK, GAUDET AD, GAIER KR, *et al.* MicroRNA-155 deletion reduces anxiety- and depressive-like behaviors in mice [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2015, 63:362.
- [12] LIU J, SHI K, CHEN M, *et al.* Elevated miR-155 expression induces immunosuppression via CD39<sup>+</sup> regulatory T-cells in sepsis patient [J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 40:135.
- [13] PATHAK S, GRILLO AR, SCARPA M, *et al.* MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis [J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(5):e164.
- [14] ZHUANG Z, QIN X, HU H, *et al.* Down-regulation of microRNA-155 attenuates retinal neovascularization via the PI3K/Akt pathway [J]. *Mol Vis*, 2014, 21:1173.
- [15] RANGANATH P. MicroRNA-155 and its role in malignant hematopoiesis [J]. *Biomark Insights*, 2015, 10:95.
- [16] HUSKOVA H, KORECKA K, KARBAN J, *et al.* Oncogenic microRNA-155 and its target PU. 1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas [J]. *Int J Hematol*, 2015, 102(4):441.
- [17] YU DD, LV MM, CHEN WX, *et al.* Role of miR-155 in drug resistance of breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3):1395.
- [18] HAN S, YANG S, CAI Z, *et al.* Anti-Warburg effect of rosmarinic acid via miR-155 in gastric cancer cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9:2695.
- [19] ARTS N, CANE S, HENNEQUART M, *et al.* microRNA-155, induced by interleukin-1, represses the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M) in melanoma cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0122517.
- [20] PANG W, SU J, WANG Y, *et al.* Pancreatic cancer-secreted miR-155 implicates in the conversion from normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts [J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(10):1362.
- [21] LIU F, KONG X, LV L, *et al.* TGF- $\beta$ 1 acts through miR-155 to down-regulate TP53INP1 in promoting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes [J]. *Cancer Lett*, 2015, 359(2):288.
- [22] LIU M, ZHOU K, HUANG Y, *et al.* The candidate oncogene (MCRS1) promotes the growth of human lung cancer cells via the miR-155-Rb1 pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34:121.
- [23] HUANG J, JIAO J, XU W, *et al.* miR-155 is upregulated in patients with active tuberculosis and inhibits apoptosis of monocytes by targeting FOXO3 [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5):7102.
- [24] THOMSEN KG, TERP MG, LUND RR, *et al.* miR-155, identified as anti-metastatic by global miRNA profiling of a metastasis model, inhibits cancer cell extravasation and colonization in vivo and causes significant signaling alterations [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30):29224.

(本文编辑 刘梦楠)