

miR-451 及 MIF 在大肠癌和大肠腺瘤中的表达及临床意义

汪 伟¹, 孙晓娜¹, 张玉峰¹, 党中勤¹, 牛学恩¹, 刘晓峰^{2*}

(¹河南省中医院, 河南中医学院第二附属医院肝胆脾胃病科, 河南 郑州 450000; ²济南军区总医院消化内科, 山东 济南 250003)

[摘要] **目的:**检测大肠癌及大肠腺瘤组织中 miR-451 及巨噬细胞游走抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF) 的表达水平, 并分析其与大肠癌相关临床病理因素的关系。**方法:**收集 25 对大肠癌组织和大肠癌旁组织, 10 例大肠腺瘤组织, 应用 RT-PCR 方法检测 miR-451 的表达水平(以 U6 为对照), 应用免疫组化检测 MIF 蛋白的表达情况, 并分析二者与大肠癌相关临床病理因素的关系。**结果:**miR-451 在大肠癌及大肠腺瘤组织中明显下调($P < 0.01, P < 0.05$)。其中在大肠癌组织中上调 6 例, 下调 19 例, 下调比率 76%(19/25)。在大肠腺瘤组织中上调 3 例, 下调 7 例, 下调比率 70%(7/10)。MIF 蛋白在大肠癌组织中阳性表达 18 例, 阳性率 72%, 在大肠腺瘤组织中阳性表达 5 例, 阳性率 50%; 癌旁组织阳性表达 8 例, 阳性率 32%, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 并且 miR-451 与 MIF 表达水平与大肠癌的分化相关($P < 0.05$), 与年龄、性别、Dukes 分期、组织类型、浸润深度、淋巴结转移等无明显相关。**结论:**miR-451 在大肠癌组织及大肠腺瘤组织中低表达, 可能通过抑制 MIF 负向调控了大肠癌的发生和发展。

[关键词] 大肠癌; 大肠腺瘤; 微小 RNA; miR-451

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-882-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130705

Expression and clinical significance of miR-451 and MIF in colorectal cancer and colorectal adenoma

Wang Wei¹, Sun Xiaona¹, Zhang Yufeng¹, Dang Zhongqin¹, Niu Xueen¹, Liu Xiaofeng^{2*}

(¹Department of Hepatobiliary and Gastrointestinas, Henan Province Hospital of TCM, Zhengzhou 450000; ²Department of Gastroenterology, the Militray General Hospital of Jinan, Jinan 250003, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the expression of miR-451 and MIF in colorectal cancer and colorectal adenoma and their correlation with clinicopathologic features in colorectal cancer. **Methods:**Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to examine the expression level of miR-451 in 25 cases of colorectal cancer and matched non tumor adjacent tissue and 10 cases of colorectal adenoma tissue specimens. MIF protein was detected by immunohistochemistry (SP method). The relationships among the expression of miR-451, MIF and the clinicopathologic features of colorectal cancer were analyzed. **Results:**The expression level of miR-451 was significantly lower in the tumor tissues and adenoma tissues than that in the adjacent tissues ($P < 0.01, P < 0.05$). There were 6 cases up-regulated and 19 cases down-regulated in colorectal cancer, and the down-regulated rate was 76% (19/25). There were 3 cases up-regulated and 7 cases down-regulated in colorectal adenoma, and the down-regulated rate was 70% (7/10). The positive rate of MIF in colorectal cancer was 72%, the positive rate was 50% in colorectal adenoma and the positive rate was 32% in adjacent tissues. Down-regulated miR-451 expression and up-regulated MIF were associated with the cell differentiation ($P < 0.05$) in colorectal cancer patients. No significant association was found between the expression of miR-451 and MIF with the status of age, gender, Dukes staging system histological type, depth of tumor invasion and lymphatic metastasis. **Conclusion:**Up-regulated miR-451 expression may inhibit MIF expression, and then control colorectal carcinogenesis and the development process.

[Key words] colorectal cancer; colorectal adenoma; microRNA; miR-451

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7):882-886]

[基金项目] 河南省科技攻关项目(122102310614); 郑州金水区技术与开发经费支持项目(金科[2012]23号)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuxf0531@163.com

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一,但其发病机制仍不明确。微小 RNA(microRNA, miRNA)与肿瘤的关系是国内外研究的热点,并已证实部分 miRNA 与肿瘤的发生发展存在着密切的关系。巨噬细胞游走抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 可刺激肿瘤细胞的增殖、分化、浸润、转移、抑制肿瘤细胞凋亡,在肿瘤的发生和进展过程中起着十分重要的作用。microRNA 及 MIF 在新鲜大肠癌组织中的相关研究文献少见,本研究使用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测大肠癌组织、大肠腺瘤组织及大肠癌旁组织中 miR-451 的相对表达量,免疫组化(SP 法)验证 MIF 表达量,并分析二者与大肠癌相关临床因素的关系,为大肠癌发病机制和早期诊断提供新的线索和思路。

1 材料和方法

1.1 材料

取自 2011 年 11 月~2012 年 6 月济南军区总医院普外科手术标本及消化内科内镜下活检取样标本。其中大肠癌、癌旁手术标本 17 例,内镜下活检取样标本 8 例,共 25 例。男 18 例,女 7 例,年龄为 46~85 岁,平均 62 岁,淋巴结转移 7 例,无淋巴结转移 18 例。内镜下活检取样腺瘤标本 10 例,年龄 53~72 岁,平均年龄 65 岁。所有配对标本癌组织经 HE 染色证实均为腺癌,所取正常组织距癌缘>5 cm,HE 染色证实为非癌组织,腺瘤组织经 HE 染色证实为管状绒毛状腺瘤。内镜下活检取样标本临床病理相关因素参考患者手术病理进行相关讨论,部分患者因客观因素未取得手术标本,故采用内镜下活检取样标本进行 RT-PCR 反应。所取新鲜标本于-80℃冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

取 50~100 mg 组织液氮研磨至粉末状,采用美国 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明书方法提取总 RNA,并检测 260 nm 处吸光度值。280 nm 与 260 nm 处吸光度比值范围在 1.8~2.1 为高纯度 RNA,提取的总 RNA 于-70℃保存。

1.2.2 逆转录

采用美国 Invitrogen 公司 SuperScript III First-Strand Synthesis System 试剂说明书方法合成 cDNA 第一链,反转录合成的 cDNA 于-20℃保存。

1.2.3 RT-PCR 检测 miR-451 的表达

采用美国 ABI 公司 SybrGreen PCR Master Mix

(2×)试剂,并按照说明书进行实时定量 PCR,以 U6 为内参。使用 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪,先以 95℃ 10 min 热启动,然后按 95℃ 15 s, 60℃ 1 min 共 40 个循环,最后通过熔解曲线分析扩增产物的特异性。miR-451 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

1.2.4 MIF 蛋白检测用免疫组化(SP 法)

抗 MIF 单克隆抗体购于武汉博士德公司,SP 试剂盒购自福州迈新公司,按试剂盒说明书操作,PBS 替代一抗作阴性对照,已知阳性片作阳性对照。MIF 蛋白阳性表达见于肿瘤细胞的胞质内,呈棕黄色细颗粒,切片中细胞阳性数> 10%为表达阳性,≤ 10%为表达阴性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件包做数据处理,测得 miR-451 相对表达量以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组之间表达差异的比较采用 one-way ANOVA 分析法,两两比较采用 SNK-*q* 检验,MIF 蛋白检测采用 χ^2 检验,Spearman 秩相关检验进行统计学处理。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 miR-451 表达

按照 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪使用说明,采取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法,先制作内参基因 U6 的标准曲线、标准扩增曲线、标准熔解曲线(图 1)及 miR-451 在大肠癌组织、大肠癌旁组织、大肠腺瘤组织中的扩增曲线及熔解曲线(图 2),见扩增曲线良好,熔解曲线一致且唯一,提取 miR-451 质量较好。大肠癌组织和大肠癌旁组织以及大肠腺瘤组织 miR-451 的相对表达量分别为 0.267 ± 0.131 、 0.447 ± 0.232 和 0.288 ± 0.102 ,差异有统计学意义 ($F = 7.097, P < 0.01$)。25 对大肠癌标本中上调 6 例,下调 19 例,下调比例为 76%(19/25)。将各个样本两两比较,发现大肠癌组织与大肠癌旁组织之间存在显著差异($P < 0.01$),大肠腺瘤组织与大肠癌旁组织之间也存在显著差异($P = 0.02$),而大肠癌组织与大肠腺瘤组织之间差异不显著($P = 0.75$)。

2.2 各种组织中 MIF 蛋白的表达

大肠癌组织中 MIF 蛋白表达阳性 18 例,阳性率 72%(18/25); 大肠腺瘤阳性表达 5 例,阳性率 50%(5/10); 癌旁组织阳性表达 8 例,阳性率 32%(8/25),三组比较, $\chi^2 = 8.022, P = 0.018$,差异有统计学意义(图 3)。

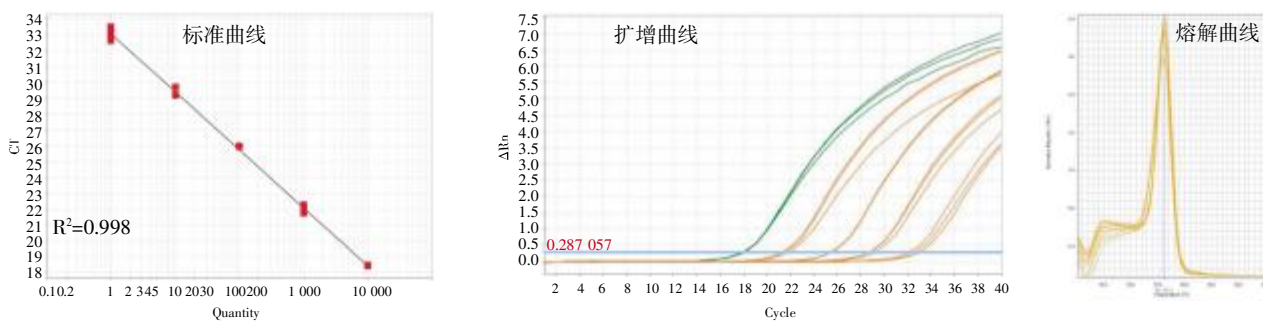


图1 内参基因 U6 的标准曲线、标准扩增曲线和标准熔解曲线

Figure 1 Standard curve of reference gene U6, standard amplification curve and standard melting curve

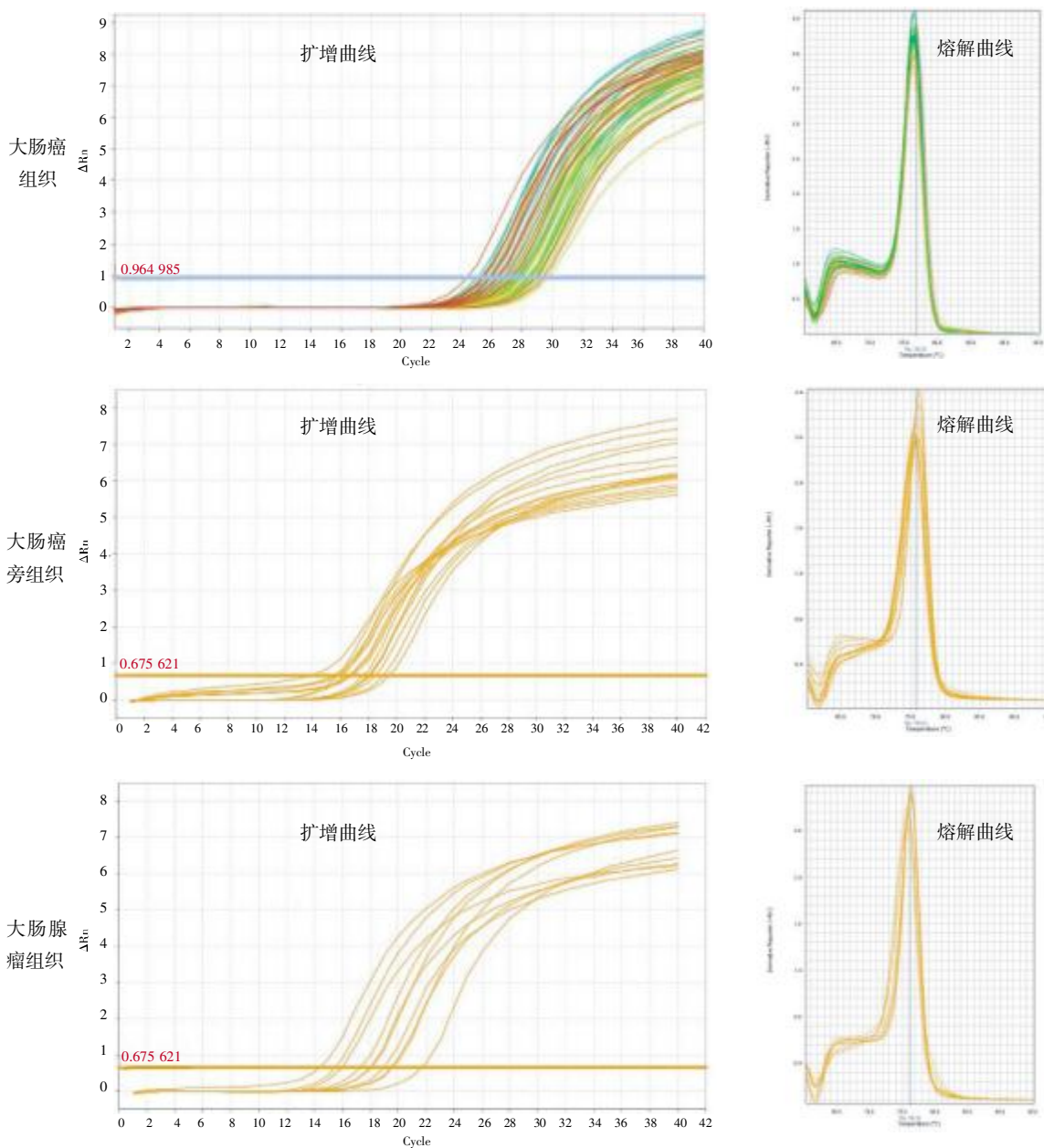
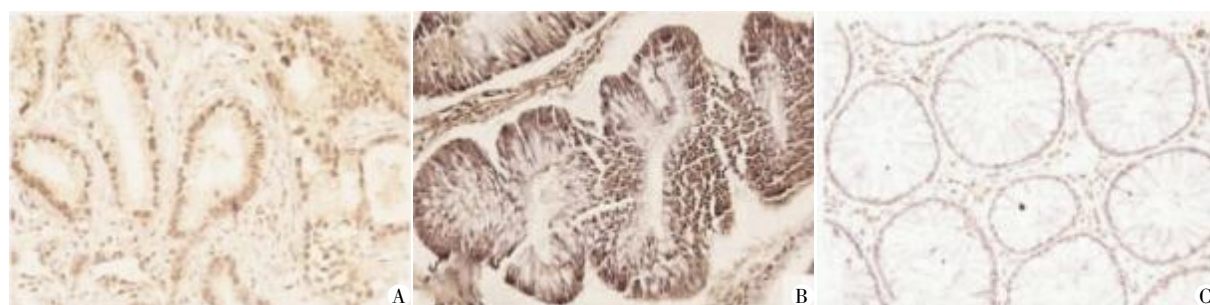


图2 目的基因 miR-451 在大肠癌组织、大肠癌旁组织和结肠腺瘤组织中的扩增曲线及熔解曲线

Figure 2 Target gene miR-451 in colorectal carcinoma, colorectal cancer adjacent tissues and colorectal adenoma in the amplification curve and melting curve



A:大肠癌组织;B:大肠腺瘤组织;C:大肠癌旁组织。

图 3 MIF 在大肠癌、大肠腺瘤组织、大肠癌旁组织中的表达情况(×400)

Figure 3 MIF expressions in colorectal cancer, colorectal adenomas and colorectal cancer adjacent tissues (×400)

2.3 癌组织中 miR-451 及 MIF 表达水平与其病理因素的相关性

将 25 对大肠癌标本术后病理资料完整收集整

理后,分析癌组织中 miR-451 及 MIF 与其病理因素的相关性,可见 miR-451 及 MIF 与大肠癌的分化程度相关($P < 0.05$,表 1)。

表 1 大肠癌组织中 miR-451 及 MIF 的表达与大肠癌相关病理因素之间的关系

Table 1 The relationship between the expression of miR-451 and MIF in colorectal cancer tissues and colorectal cancer related pathological factors

临床相关病理因素	n	miR-451 的表达		MIF 的表达	
		相对表达量	P 值	阳性率(%)	P 值
性别					
男	18	0.281 ± 0.164		77.78	
女	7	0.278 ± 0.141	0.973	57.14	0.302
年龄(岁)					
≥60	8	0.224 ± 0.101		62.50	
< 60	17	0.306 ± 0.171	0.227	76.47	0.468
分型					
肿块型	4	0.195 ± 0.031		50.00	
溃疡型	18	0.307 ± 0.171		77.78	
浸润型	3	0.229 ± 0.956	0.375	66.67	0.268
组织类型					
中高分化	19	0.316 ± 0.163		84.21	
低分化	6	0.168 ± 0.027	0.041	33.34	0.016
Dukes 分期					
A~B	18	0.307 ± 0.172		66.67	
C~D	7	0.211 ± 0.071	0.063	85.71	0.341
淋巴结转移					
有	7	0.211 ± 0.071		100.00	
无	18	0.307 ± 0.172	0.063	61.11	0.052
远处转移					
有	2	0.197 ± 0.015		100.00	
无	23	0.287 ± 0.160	0.443	69.57	0.435
CEA					
正常	20	0.220 ± 0.077		70.00	
升高	5	0.295 ± 0.168	0.346	80.00	0.656

3 讨论

miR-451 作为一个多功能 miRNA, 在近年国内外的研究中显示与血液系统疾病^[1]、心血管疾病^[2]、

肺动脉高压慢性缺氧疾病^[3]、神经发育^[4]及肿瘤^[5]的发生等过程都有着密切的联系。众多的科学家通过使用基因芯片、RT-PCR、原位杂交等技术探讨了 miR-451 在不同疾病中的作用机制和靶点, 为揭示

miR-451 与肿瘤之间的关系提供了理论和方法学的基础。但 miR-451 与消化系统疾病的关系研究极少,目前国内外文献中鲜有 miR-451 与大肠癌及大肠腺瘤相关性的报道,并且未见在大肠癌及大肠腺瘤新鲜组织标本中的实验。一般认为绝大部分大肠癌起源于腺瘤,大肠腺瘤与大肠癌的发生有着密切的关系,故将大肠腺瘤性息肉看作是癌前病变,因此研究大肠腺瘤组织中 miRNA 的表达,对肿瘤的发生、发展过程也有着十分重要的意义。从分子生物学水平上来说,传统的“腺瘤—腺癌”途径表现为分阶段的癌基因突变激活及抑癌基因失活,从而导致肿瘤的发生^[6]。而在国内外的部分研究中发现一些特定的 miRNA 能够准确区分两大类大肠组织:正常—炎性息肉和腺瘤—腺癌。Wang 等^[7]在研究中展示了 42 个 miRNA 的表达对大肠黏膜上皮转化和演进的动态过程。因此 miRNA 的表达与大肠癌不同阶段病变相关,对大肠癌的发病机制可能有一定的预示作用。

RT-PCR 是一种高敏感、高特异的检测核酸分子的定性方法,能对核酸分子进行精确的定量。将之用于新鲜大肠癌组织中 miR-451 的研究,比用于石蜡包埋组织和细胞株具有更高的敏感性和特异性。因此本研究通过 RT-PCR 技术对新鲜大肠癌组织、大肠腺瘤组织与癌旁组织中 miR-451 进行相对表达量验证,结果证实了 miR-451 在大肠癌组织与癌旁组织中及大肠腺瘤组织与癌旁组织中的表达存在显著差异 ($P < 0.05$),而大肠癌组织与大肠腺瘤组织中的差异不显著 ($P > 0.05$)。miR-451 在大肠癌组织及大肠腺瘤组织中明显低表达,并通过与大肠癌临床相关因素分析发现 miR-451 与大肠癌的分化程度相关 ($P < 0.05$)。

Bandres 等^[8]在体外实验中提出 miR-451 通过抑制致癌基因 MIF 调节细胞的增殖。MIF 可能是 miR-451 的作用靶点之一, MIF 可刺激肿瘤细胞的增殖、分化、浸润、转移以及抑制肿瘤细胞凋亡,因此在肿瘤的发生和进展过程中均起着十分重要的作用,并且已有关于 MIF 促进恶性肿瘤细胞浸润和转移的报道^[9]。本次研究通过免疫组化法验证 MIF 蛋白表达情况,发现 MIF 在大肠癌中的阳性表达明显高于癌旁组织 (72% vs 32%, $P < 0.05$),并分析其与大肠癌临床相关因素分析发现其与大肠癌分化程度

相关 ($P < 0.05$),与肿瘤的浸润程度及淋巴转移无明显相关性,或许与样本例数较少有关。今后将进一步扩大样本例数,验证 miR-451 的作用靶点并分析其与临床因素的相关性。研究 miR-451 基因转录的调控机制以及其变化所带来的生物学效应,将有利于进一步明确 miR-451 在大肠癌中的作用机制,并为利用 miR-451 在大肠癌中进行早期临床诊断、治疗及预后评估提供新的思路和方法。

[参考文献]

- [1] Bruchova, Votavova H, Yoon D, et al. MiR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(4): 686-693
- [2] Bostjancic E, Zidar N, Glavac D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction [J]. *Dis Markers*, 2009, 27(6): 255-268
- [3] Caruso P, MacLean MR, Khanin R, et al. Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(4): 716-723
- [4] Zhang Z, Chang H, Li Y, et al. MicroRNAs: potential regulators involved in human anencephaly [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(2): 367-374
- [5] Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF27 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7): 2152-2159
- [6] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development [J]. *N Engl J Med*, 1988, 319(9): 525-532
- [7] Wang S, Wang L, Zhu T, et al. Improvement of tissue preparation for laser capture microdissection: application for cell type-specific miRNA expression profiling in colorectal tumor [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 163
- [8] Bandres E, Bitarte N, Arias F, et al. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(7): 2281-2290
- [9] He XX, Chen K, Yang J, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer [J]. *Mol Med*, 2009, 15(1-2): 1-10

[收稿日期] 2013-03-18