

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.06.0814

• 短篇论著 •

## 促胃液素高表达大肠癌组织中 microRNA 表达差异分析

茆家定\*, 杨光, 吴佩

皖南医学院弋矶山医院胃肠二科, 芜湖 241001

**[摘要]** **目的** 运用基因芯片技术筛选促胃液素(GAS)高表达的大肠癌组织中差异表达的微RNA(miRNA)。**方法** 运用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测71例大肠癌患者癌组织标本中GAS的含量,分析大肠癌组织中GAS表达水平与临床病理特征的关系。选择GAS表达强阳性(高表达组)与阴性(对照组)的患者各4例,对其癌组织进行miRNA芯片分析,并采用qPCR验证差异表达的miRNA。**结果** GAS含量 $\geq 50.00$  pg/g(阳性表达)的患者17例(23.9%),其余54例(76.1%)GAS表达阴性。癌组织中GAS表达水平与其分化程度、Dukes分期及组织学类型有关( $P$ 均 $< 0.05$ )。GAS高表达组(GAS含量 $> 200.00$  pg/g)中与对照组癌组织相比发生显著变化的miRNA共236个,与对照组比较,在高表达组中表达上调的miRNA共159个,表达下调的miRNA的数目为77个。筛选出GAS高表达组中的3倍以上表达差异的miRNA 24个,其中上调17个、下调7个;分别选择表达上调和下调的miRNA各3个进行qPCR验证,验证结果与芯片分析结果基本一致。**结论** GAS高表达大肠癌组织中miRNA的表达存在显著变化,差异表达miRNA可能是治疗GAS高表达大肠癌的潜在靶点。

**[关键词]** 结直肠癌;促胃液素类;微RNAs;芯片分析技术**[中图分类号]** R 735.34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)06-0814-05

## Profiling analysis of differential expression of microRNA in colorectal cancer tissues with high expression of gastrin

MAO Jia-ding\*, YANG Guang, WU Pei

Department of Gastrointestinal Surgery (II), Yijishan Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China

**[Abstract]** **Objective** To screen the differentially expressed microRNAs (miRNAs) in colorectal cancer tissues with high expression of gastrin (GAS) by gene chip technique. **Methods** The level of GAS in tumor tissues from 71 patients with colorectal cancer was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the relationship between positive expression of GAS and clinicopathological features was analyzed. Human colorectal cancer tissues with high positive GAS expression (high-expression group,  $n=4$ ) or negative GAS expression (control group,  $n=4$ ) were analyzed by miRNA microarray, and the selected differentially expressed miRNAs were validated by qPCR. **Results** There were 17 cases (23.9%) with GAS content  $\geq 50.00$  pg/g (positive GAS expression), while the remaining 54 cases (76.1%) had negative GAS expression. The expression level of GAS was related to the degree of differentiation, Dukes stage and histological type ( $P < 0.05$ ). There were 236 miRNAs had significant differential expression in the high-expression group (GAS content  $> 200.00$  pg/g) compared with the control group, of which 159 miRNAs were up-regulated and 77 were down-regulated. A total of 24 miRNAs were screened out, which differentially expressed more than 3 folds in the high-expression group, with 17 up-regulated and 7 down-regulated. Three up-regulated or down-regulated miRNAs were selected for qPCR verification, and the results were consistent with the microarray analysis. **Conclusion** The miRNAs are differentially expressed in the colorectal cancer tissues with high expression of GAS, and they would be potential targets for the treatment of the colorectal cancer with high GAS expression.

**[收稿日期]** 2017-05-10 **[接受日期]** 2017-06-10**[基金项目]** 安徽省自然科学基金(1408085MH148),皖南医学院弋矶山医院人才引进基金(YR201406),皖南医学院自然科学基金(WK2012zf02)。Supported by Natural Science Foundation of Anhui Province (1408085MH148), Talent Introduction Science Fund of Yijishan Hospital (YR201406), and Natural Science Foundation of Wannan Medical College (WK2012zf02).**[作者简介]** 茆家定,博士,副教授、主任医师,硕士生导师。

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 0553-5739107, E-mail: maojiading0205@sina.com

[Key words] colorectal carcinoma; gastrins; microRNAs; gene chip

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(6): 814-818]

大肠癌的发生是一个多因素、多阶段、多基因的过程,涉及大量肿瘤相关基因结构改变与表达异常。近年来研究已证实部分大肠癌的发生与促胃液素(gastrin, GAS)表达异常有关,部分大肠癌细胞能够通过自主产生和分泌 GAS 并作用于自身细胞膜受体发挥生物学效应,但其具体分子机制仍不清楚<sup>[1-4]</sup>。研究发现微 RNA(microRNA, miRNA)参与调控大肠癌的发生、发展、侵袭、转移和血管生成等过程<sup>[5-6]</sup>。本研究运用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 2014 年 1 月—2015 年 12 月我科 71 例患者大肠癌组织中的 GAS 含量,并利用 miRNA 芯片技术检测 GAS 高表达组和 GAS 阴性组 miRNA 的表达差异,探讨相关差异表达 miRNA 在 GAS 调节大肠癌生长中的作用及其相互关系。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 收集大肠癌手术切除标本共 71 例,均经病理检查确诊,手术前未行放化疗。其中男 38 例,女 33 例;年龄 32~71 岁,平均(52±10)岁。肿瘤部位:结肠癌 39 例、直肠癌 32 例。大体分型:溃疡型 37 例、隆起型 28 例、浸润型 6 例。分化程度:高分化腺癌 25 例、中分化腺癌 27 例、低分化腺癌 19 例。组织学类型:乳头状腺癌 19 例、管状腺癌 33 例、黏液腺癌 8 例、印戒细胞癌 5 例、未分化腺癌 6 例。Dukes 分期:A、B 期 32 例,C、D 期 39 例。本研究通过皖南医学院弋矶山医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 试剂及仪器 人 GAS ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司,TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,RNeasy 微型试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,miRCURY™芯片、miRCURY Array Power 标记试剂盒和缓冲液试剂盒购自丹麦 Exiqon 公司。GenePix 4000B 芯片扫描仪、GenePix pro V6.0 荧光信号处理软件均为美国 Axon 公司产品。

1.3 ELISA 检测大肠癌组织中 GAS 的含量 取新鲜大肠癌组织及癌旁组织各 400 mg,其中 200 mg 液氮保存用于后期 RNA 的提取。另 200 mg 加

400 μL 单去污剂裂解液(含 PMSF)于匀浆器中进行匀浆,提取上清液于-20 ℃保存,按照 ELISA 试剂盒操作说明检测 71 例大肠癌组织中 GAS 的含量。GAS 含量≥50.00 pg/g 为阳性表达,>200.00 pg/g 为强阳性表达。

### 1.4 样本总 RNA 的提取及 miRNA 芯片杂交

1.4.1 样本总 RNA 的提取和纯化 选择 GAS 表达强阳性(高表达组)和 GAS 表达阴性(对照组)大肠癌患者的癌组织及相应的癌旁组织标本各 4 例,取 50 mg 冻存组织,用干净的剪刀尽可能将其碎解后放置于匀浆器中的 1~2 mL 的球形部位,切取过程严格按照无 RNA 酶的标准执行。使用生物粉碎机(美国 BioSpec 公司)碎解预先冻存的组织,再使用 Mini-Bead-Beater-16 研磨珠均质器(美国 Biopec 公司)进行均质化处理,然后使用 RNeasy 微型试剂盒纯化得到总 RNA。使用 NanoDrop-1000 全波长紫外/可见光扫描分光光度计(美国 Thermo 公司)测定各标本总 RNA 浓度及纯度,各项指标合格后选用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法观察到 5S、18S 及 28S RNA 无明显降解,说明抽提 RNA 的质量和纯度符合基因芯片的检测要求。

1.4.2 芯片杂交 按照 miRCURY Array Power 本标记试剂盒使用说明制备标记反应液并进行 miRNA 芯片杂交。本研究采用的是丹麦 Exiqon 公司提供的第 6 代芯片,该芯片含 1 891 个捕获探针,涵盖人类、小鼠的所有 miRNA 以及这些物种有关的病毒 miRNA,此外该芯片还包含 miRBase 数据库未收录的 66 个 miRNA。

1.4.3 miRNA 序列扫描及分析 使用 GenePix 4000B 芯片扫描仪对所有 16 例标本的 miRNA 进行扫描,利用扫描仪配套的 GenePix pro V6.0 荧光信号处理软件对原始数据进行运算,取每种探针重复 4 次的平均值与本底荧光强度相减,通过中位数标准法获得方便分析的标准数据,计算出包括标准化信号值及样本间 miRNA 表达量比值等数据。最后筛选出不同组别间表达上调或下调超过 3 倍的 miRNA,所得结果按基因表达相似程度进行分层聚类。

1.5 qPCR 验证差异表达的 miRNA 随机选择 GAS 高表达组大肠癌组织中表达上调或下调 3 倍以上的 miRNA 各 3 个运用 qPCR 验证其表达水平,根据试剂盒说明书进行引物合成以及各样品的目的基因和管家基因的 qPCR 反应,经过与内参基因的比较及转换得到验证基因的差异倍数,分析 qPCR 验证结果与芯片结果是否一致。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件进行数据分析,计数资料的比较采用  $\chi^2$  检验。芯片检测倍数与 qPCR 验证倍数的比较采用配对 *t* 检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 大肠癌组织中的 GAS 含量 71 例大肠癌组织标本中,GAS 含量  $\geq 50.00$  pg/g(阳性表达)者 17 例(23.9%),其中  $>200.00$  pg/g 者 5 例,50.00~200.00 pg/g 者 12 例。大肠癌组织中 GAS 表达水平与分化程度、组织学类型及 Dukes 分期关系密切 (*P* 均  $<0.05$ ),见表 1。

表 1 大肠癌组织中促胃液素(GAS)表达与临床病理的关系

病理特征	N	n(%)	
		阳性组	阴性组
分化程度			
高分化	25	2(8.0)	23(92.0)
中分化	27	5(18.5)	22(81.5)
低分化	19	10(52.6)	9(47.4)
组织学类型			
乳头状腺癌	19	2(10.5)	17(89.5)
管状腺癌	33	5(15.2)	28(84.8)
黏液腺癌、印戒细胞癌和未分化腺癌	19	10(52.6)	9(47.4)
Dukes 分期			
A、B	32	3(9.4)	29(90.6)
C、D	39	14(35.9)	25(64.1)

2.2 GenePix 4000B 芯片扫描分析结果 MiRNA 杂交后表达谱 GenePix 4000B 芯片扫描结果符合标准,信号强度高,背景均一,未见明显缺陷。芯片结果示差异表达 miRNA 共 236 个,其中与对照组相比在 GAS 高表达组中表达上调的 miRNA 159 个,表达下调的 miRNA 77 个。筛选出 GAS 高表达大肠癌组织中差异表达 3 倍以上的 miRNA 24 个,其中上调 17 个、下调 7 个(表 2、图 1)。

表 2 促胃液素(GAS)高表达组与对照组表达差异 3 倍以上的 miRNA

ID	MiRNA 名称	差异表达倍数 <sup>a</sup>
46869	hsa-miR-1258	3.08
148241	hsa-miR-3649	3.17
146048	hsa-miR-5680	3.22
46752	hsa-miR-1270	3.34
146024	hsa-miR-383	3.37
147904	hsa-miR-3148	3.44
46500	hsa-miR-520	3.69
42627	hsa-miR-212-3p	3.77
42667	hsa-miR-302b-5p	3.85
148064	hsa-miR-3926	4.34
17578	hsa-miR-K12-5	4.43
148652	hsa-miR-620	4.52
148216	hsa-miR-3907	4.71
42673	hsa-miR-337-3p	5.02
146069	hsa-miR-1915-5p	5.10
17885	hsa-miRPlus-A1086	5.50
42934	hsa-miR-345-5p	5.54
147631	hsa-miR-4258	-7.08
145976	hsa-miR-663b	-6.17
148577	hsa-miR-3943	-5.33
27568	hsa-miR-744-5p	-4.24
4700	hsa-miR-140-5p	-3.46
147662	hsv2-miR-H6	-3.45
29802	hsa-miR-144-3p	-3.18

<sup>a</sup>: 正值代表上调,负值代表下调

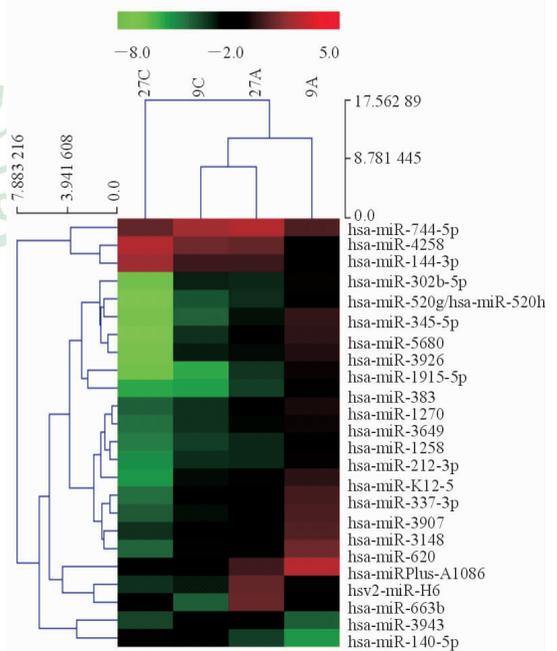


图 1 促胃液素(GAS)高表达组与对照组差异表达 3 倍以上的 miRNA 分层聚类图

9A: GAS 高表达大肠癌组织; 27A: GAS 阴性表达大肠癌组织(对照组); 9C: GAS 高表达癌旁正常大肠黏膜组织; 27C: GAS 阴性表达癌旁正常大肠黏膜组织

2.3 qPCR 验证芯片初筛结果 随机选取表达上调或下调 3 倍以上的 miRNA 各 3 个采用 qPCR 进行验证,经过与内参基因的比较及转换得到验证

miRNA 的差异倍数,与芯片分析结果基本一致(图2)。

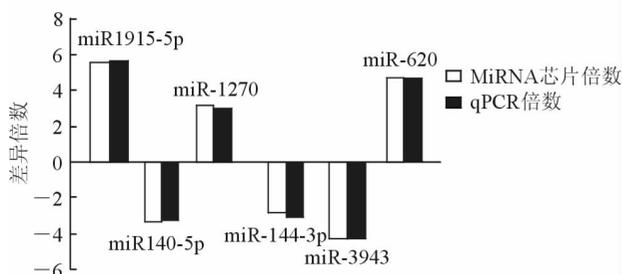


图2 qPCR验证miRNA的差异倍数对比

### 3 讨论

本研究运用ELISA测得71例大肠癌患者癌组织中有17例GAS表达阳性,占总例数的23.9%;且GAS阳性表达程度与分化程度、组织学类型及Dukes分期有关,Dukes C、D期中GAS表达阳性者14例(82.4%),中低分化癌中GAS表达阳性者有15例(88.2%),黏液腺癌、印戒细胞癌和未分化腺癌中GAS表达阳性者10例(58.8%),说明分化较差及分期较晚的大肠癌患者中GAS表达阳性的比例大,这与我们前期研究结果基本一致<sup>[7-8]</sup>。

研究证实不同类型的miRNA在大肠癌的发生、发展中扮演着不同的角色<sup>[9-10]</sup>。MiRNA芯片技术是一种快速有效地分析miRNA表达谱的方法。目前已有学者应用miRNA芯片技术筛选出众多与大肠癌生物学行为和临床特征相关的miRNA<sup>[9-10]</sup>。Ng等<sup>[11]</sup>研究发现miR-17-3p和miR-92在结直肠癌患者中表达明显增加,且miR-92的表达水平可用来鉴别结直肠癌和炎症性肠病或正常人,敏感度89%,特异度70%。由此可见,结直肠癌患者血浆中miR-92的表达水平可作为结直肠癌早期诊断的预警指标。Yamakuchi等<sup>[12]</sup>研究发现miR-34a可通过SIRT1(silent information regulator 1)的3'UTR中miR-34a的结合区域抑制SIRT1表达,导致其乙酰化p53增加,p21和p53上调凋亡调控因子(PUMA)表达增加,从而调节细胞周期和凋亡。在大肠癌组织中miR-34a低表达导致细胞增殖失控。Huang等<sup>[13]</sup>对10对结肠癌组织和癌旁组织进行miRNA芯片分析发现49个表达差异的miRNA,其中miR-95有最强的促进结肠癌细胞增殖的能力,其功能主要是通过抑制下游的靶基因SNX1实现。上述结果提示,miRNA及其靶基因的

异常表达与大肠癌的发生密切相关,特异性miRNA的表达模式可能与肿瘤的特性及预后有关。

本研究结果显示,GAS高表达与GAS表达阴性的大肠癌组织中miRNA的表达存在差异,表达上调的miRNA有159个,表达下调的miRNA共77个。筛选出GAS高表达且与大肠癌发病相关的3倍以上差异miRNA 24个,其中上调17个、下调7个。经检索发现,关于这些miRNA与大肠癌关系的研究并不多见。Pellatt等<sup>[14]</sup>通过miRNA芯片筛选发现miR-663b在人结肠癌和直肠癌中均发挥重要作用,Zhai等<sup>[15]</sup>则发现miR-140-5p可通过抑制Smad2途径和自噬抑制结直肠癌细胞的存活和侵袭,但这两项研究并未探讨相关作用是否与GAS表达水平有关。Song等<sup>[16]</sup>研究发现,miR-148b可通过下调胆囊收缩素2型受体(CCK2R)的表达阻断GAS与CCK2R结合,从而抑制大肠癌HCT-116和HT-29细胞的增殖。然而本研究并未发现miR-148b在GAS高表达与GAS表达阴性患者中存在差异表达,具体原因仍有待进一步探讨。本研究还发现了一些先前研究中尚未报道过的差异表达miRNA,如表达上调的miR-5680和下调的miR-3943,这些miRNA在GAS高表达的大肠癌组织中发挥何种作用值得进一步探讨。

综上所述,GAS高表达大肠癌组织中miRNA的表达存在差异,部分miRNA可能参与了GAS对大肠癌生长的调控,然而其具体机制仍不清楚。今后,我们拟建立GAS高表达大肠癌细胞模型,在此基础上进一步筛选与GAS对大肠癌发病调控相关的miRNA,并探讨其分子机制。如果能在miRNA水平有效地干预GAS对大肠癌发病的调控,将会为GAS高表达的大肠癌患者的综合治疗寻找新的途径和潜在靶点。

### [参考文献]

- [1] HAN Y M, PARK J M, PARK S H, HAHM K B, HONG S P, KIM E H. Gastrin promotes intestinal polyposis through cholecystokinin-B receptor-mediated proliferative signaling and fostering tumor microenvironment[J]. J Physiol Pharmacol, 2013, 64: 429-437.
- [2] ZYGULSKA A L, FURGALA A, KRZEMIENIECKI K, KASZUBA-ZWOINSKA J, THOR P.

- Enterohormonal disturbances in colorectal cancer patients[J]. *Neoplasma*, 2017, 64: 421-429.
- [3] MARSHALL K M, LAVAL M, ESTACIO O, HUDSON D F, KALITSIS P, SHULKES A, et al. Activation by zinc of the human gastrin gene promoter in colon cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Metallomics*, 2015, 7: 1390-1398.
- [4] PONNUSAMY S, LATTMANN E, LATTMANN P, THIYAGARAJAN T, PADINJARETHALAKAL B N, NARAYANAN R. Novel, isoform-selective, cholecystokinin A receptor antagonist inhibits colon and pancreatic cancers in preclinical models through novel mechanism of action[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35: 2097-2106.
- [5] ZHANG X, XU J, JIANG T, LIU G, WANG D, LU Y. MicroRNA-195 suppresses colorectal cancer cells proliferation via targeting FGF2 and regulating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6: 2631-2640.
- [6] KIJIMA T, HAZAMA S, TSUNEDOMI R, TANAKA H, TAKENOUCHE H, KANEKIYO S, et al. MicroRNA-6826 and -6875 in plasma are valuable non-invasive biomarkers that predict the efficacy of vaccine treatment against metastatic colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37: 23-30.
- [7] MAO J D, WU P, XIA X H, WU J, HUANG H. Correlation between expression of gastrin, somatostatin and cell apoptosis regulation gene *bcl-2/bax* in large intestine carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 721-725.
- [8] MAO J D, WU P, YANG Y L, HU J Q, HUANG W B, XU G Q. Relationship between expression of gastrin, somatostatin, Fas/FasL and caspases in large intestinal carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 2802-2809.
- [9] XIE T, HUANG M, WANG Y, WANG L, CHEN C, CHU X. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in the drug resistance of colorectal cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40 (1/2): 62-76.
- [10] FENG L, MA H, CHANG L, ZHOU X, WANG N, ZHAO L, et al. Role of microRNA-141 in colorectal cancer with lymph node metastasis[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12: 3405-3410.
- [11] NG E K, CHONG W W, JIN H, LAM E K, SHIN V Y, YU J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer; a potential marker for colorectal cancer screening[J]. *Gut*, 2009, 58: 1375-1381.
- [12] YAMAKUCHI M, FERLITO M, LOWENSTEIN C J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13421-13426.
- [13] HUANG Z, HUANG S, WANG Q, LIANG L, NI S, WANG L, et al. MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 2582-2589.
- [14] PELLATT D F, STEVENS J R, WOLFF R K, MULLANY L E, HERRICK J S, SAMOWITZ W, et al. Expression profiles of miRNA subsets distinguish human colorectal carcinoma and normal colonic mucosa [J/OL]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, 7: e152. doi: 10.1038/ctg.2016.11.
- [15] ZHAI H, FESLER A, BA Y, WU S, JU J. Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 19735-19746.
- [16] SONG Y, XU Y, WANG Z, CHEN Y, YUE Z, GAO P, et al. MicroRNA-148b suppresses cell growth by targeting cholecystokinin-2 receptor in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131: 1042-1051.

[本文编辑] 孙岩