

miR-192与ZEB2在结直肠癌中的表达及其临床意义

吴巍芸 周宇

广东医学院附属医院消化内科, 广东 湛江 524001

[摘要] **背景与目的:** 微小RNA(microRNA, miRNA)是一类具有重要调控作用的非编码小分子RNA, 在多种疾病的发生、发展中起重要作用。本研究通过检测结直肠癌(colorectal cancer, CRC)组织中miR-192及E盒结合锌指蛋白2(zinc finger E-box binding homeobox 2, ZEB2) mRNA、蛋白表达, 分析miR-192的异常表达与CRC的临床病理特征的关系及与ZEB2的相关性。**方法:** 选择CRC组织和癌旁组织(距肿瘤边缘 ≥ 5 cm)各30例, 结直肠腺瘤组织25例, 正常结直肠组织15例。实时定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)法检测上述各组中miR-192及ZEB2 mRNA表达; 蛋白质印迹法(Western blot)检测ZEB2蛋白表达; 对CRC组织中miR-192与临床病理特征关系及前者与ZEB2的相关性进行分析。**结果:** CRC组miR-192表达明显下调, ZEB2 mRNA和蛋白表达明显上调, 分别与癌旁组、结直肠腺瘤组及正常组相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); miR-192的表达下调与CRC的淋巴结转移($P = 0.021$)和远处转移($P = 0.023$)相关。在CRC组织中, miR-192与ZEB2蛋白的表达呈显著的负相关关系($r = -0.365$, $P < 0.05$)。**结论:** miR-192在CRC组织中的表达下调与肿瘤的转移有关, 且可能通过ZEB2参与CRC的发生、发展过程。

[关键词] 微小RNA; 结直肠癌; E盒结合锌指蛋白2; 临床意义

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.07.005

中图分类号: R735.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)07-0507-05

The expression and clinical significance of microRNA-192 and ZEB2 in colorectal cancer WU Wei-yun, ZHOU Yu (Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524001, China)

Correspondence to: ZHOU Yu E-mail: ahdg2005@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** MicroRNA(miRNA) is a class of small non-coding RNA playing an important regulatory role in many diseases. In this study, we explore the levels of miR-192 and zinc finger E-box binding homeobox 2 (ZEB2) in CRC, the clinical significance of miR-192 and the correlation between the expression of miR-192 and ZEB2 protein. **Methods:** The expression levels of miR-192 and ZEB2 mRNA in 30 colorectal carcinoma samples, 30 corresponding cancer-adjacent tissue samples (from the edge of tumor ≥ 5 cm), 25 colorectal adenoma samples, and 15 normal tissue samples were quantified using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). ZEB2 protein expression was determined using Western blot. The relationship between the miR-192 and clinicopathological factors, miR-192 and ZEB2 protein expression was analyzed. **Results:** Significant upregulation of miR-192 expression and reduction of ZEB2 mRNA and protein expression were identified in CRC tissues, compared to cancer-adjacent tissues, colorectal adenoma samples, and normal tissues ($P < 0.05$). Low miR-192 levels were significantly associated with lymph node ($P = 0.021$) and distant metastasis ($P = 0.023$). An inverse relationship between miR-192 and ZEB2 protein expression was identified in CRC group ($r = -0.365$, $P < 0.05$). **Conclusion:** MiR-192 downexpression was correlated with CRC metastasis. MiR-192 may play a role in the development and progression of CRC through ZEB2.

[Key words] MicroRNA; Colorectal cancer; Zinc finger E-box binding homeobox 2; Clinical significance

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在我国发病率呈上升态势, 位于恶性肿瘤致死因素的第4位^[1]。CRC的发生、发展经历了正常的结直肠黏膜转化为黏膜过度增生和腺瘤的形成, 并演变至癌及癌的浸润与转移等复杂过程, 在此过程中涉及多种基因异常改变。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码小分子RNA, 参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移、血管生成和多药耐药等过程, 在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用^[2-4]。已有报道, miR-192在多种肿瘤中表达异常^[5-7]。我们先前的研究发现, miR-192模拟物转染结直肠癌SW480和SW620细胞后, E盒结合锌指蛋白2(zinc finger E-box binding homeobox 2, ZEB2) mRNA及蛋白的表达明显下调, 细胞的迁移和侵袭能力下降; 双荧光素酶报告基因检测也显示ZEB2基因3'-UTR存在miR-192的结合位点, 说明miR-192可能参与CRC的发生、发展过程^[8]。但miR-192与CRC临床病理特征的关系未见进一步研究, 本实验通过检测miR-192及其靶基因ZEB2在CRC中的表达和2者的相关性, 分析其临床意义, 为阐明CRC发生、发展的分子机制提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集广东医学院附属医院2012年3月—2013年5月结直肠癌手术切除标本30例, 每例标本分别取结直肠原发肿瘤组织及癌旁组织(距肿瘤边缘 ≥ 5 cm, 且术后病理证实无癌组织侵犯), 患者术前均未接受化疗或放疗。肠镜下活检的结直肠腺瘤组织25例, 健康人体格检查肠镜下获取正常结直肠组织15例。新鲜标本离体后迅速置于液氮中, 于 -80 °C保存。本研究遵循伦理学标准并得到本院伦理委员会批准及受试者的知情同意。

1.2 主要试剂

RNAiso Plus、One Step PrimeScript® miRNA cDNA Synthesis Kit、PrimeScript® RT Master Mix

(Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)均购自宝生物工程(大连)有限公司。miR-192、U6、ZEB2、 β -actin引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。兔抗人ZEB2抗体购自美国Santa Cruz公司。小鼠抗人 β -actin抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔或羊抗小鼠IgG二抗、超敏ECL化学发光试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 实时定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测各组miR-192和ZEB2 mRNA的表达

用RNAiso Plus提取组织的总RNA。按照One Step PrimeScript® miRNA cDNA Synthesis Kit及PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)试剂盒说明书分别进行miR-192及ZEB2的逆转录。反应所得的cDNA再使用SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)试剂盒进行PCR。miR-192以U6作为内参。ZEB2以 β -actin作为内参。qRT-PCR引物序列如下, miR-192上游引物: 5'-CTGACCTATGAATTGACAGCC-3'; U6上游引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACCA-3'; miRNA下游引物Uni-miR qPCR Primer包含在逆转录试剂盒中; ZEB2上游引物: 5'-TCTGCGACATAAATACGA-3', ZEB2下游引物: 5'-GAGTGAAGCCTTGAGTGC-3'; β -actin上游引物: 5'-GGCGGCAACACCATGTACCCT-3', β -actin下游引物: 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'。PCR反应条件为: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 60 °C退火延伸20 s, 扩增40个循环。目的基因与内参基因的Ct值比较后(Δ Ct), miR-192及ZEB2 mRNA的相对表达量用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

1.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测组织ZEB2蛋白的表达

用细胞裂解液裂解组织, 提取总蛋白。采用SDS-PAGE电泳分离, 电转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, ZEB2抗体(1:500)及 β -actin抗体(1:1000)温育过夜, TBST液漂洗后, 加入HRP标记的羊抗兔或羊抗小鼠IgG二抗(1:1000)室温温育1 h。TBST液漂洗后, 加入

ECL发光液，X光压片显影。Quantity One软件计算并分析ZEB2蛋白相对表达水平。

1.5 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行分析。4组间比较采用单因素方差分析，miR-192的表达与结直肠癌临床病理参数之间的关系分析采用 χ^2 检验，miR-192表达量与ZEB2蛋白表达的相关性采用Pearson相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-192 在各组组织中的表达

分别与癌旁组、结直肠腺瘤组及正常组比较，CRC组miR-192表达下调，差异有统计学意义(分别为 $P=0.021$ 、 $P=0.016$ 、 $P=0.023$)；癌旁组、结直肠腺瘤组及正常组3组间相互比较，miR-192的表达差异均无统计学意义(分别为 $P=0.835$ 、 $P=0.698$ 、 $P=0.839$ ，图1)。

2.2 ZEB2在各组组织的表达

分别与癌旁组、结直肠腺瘤组及正常组比较，CRC组ZEB2 mRNA和蛋白表达均明显

升高，差异均有统计学意义(mRNA：分别为 $P=0.037$ 、 $P=0.031$ 、 $P=0.035$ ；蛋白：分别为 $P=0.010$ 、 $P=0.002$ 、 $P=0.049$)；癌旁组、结直肠腺瘤组及正常组3组间相互比较，ZEB2 mRNA和蛋白表达差异均无统计学意义(mRNA：分别为 $P=0.870$ 、 $P=0.688$ 、 $P=0.800$ ；蛋白：分别为 $P=0.522$ 、 $P=0.875$ 、 $P=0.494$ ，图2)。

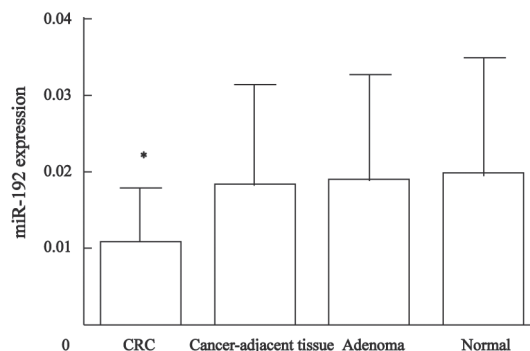


图1 miR-192在各组组织的表达情况

Fig. 1 Differential expression of miR-192 in CRC, cancer-adjacent, adenoma and normal tissues

*: Compared with the other 3 groups, $P < 0.05$.

2.3 miR-192的表达与CRC临床病理参数之间的关系

在30例CRC组织标本中，与相应的癌旁组织比较，有19例的miR-192表达下调，并与淋巴

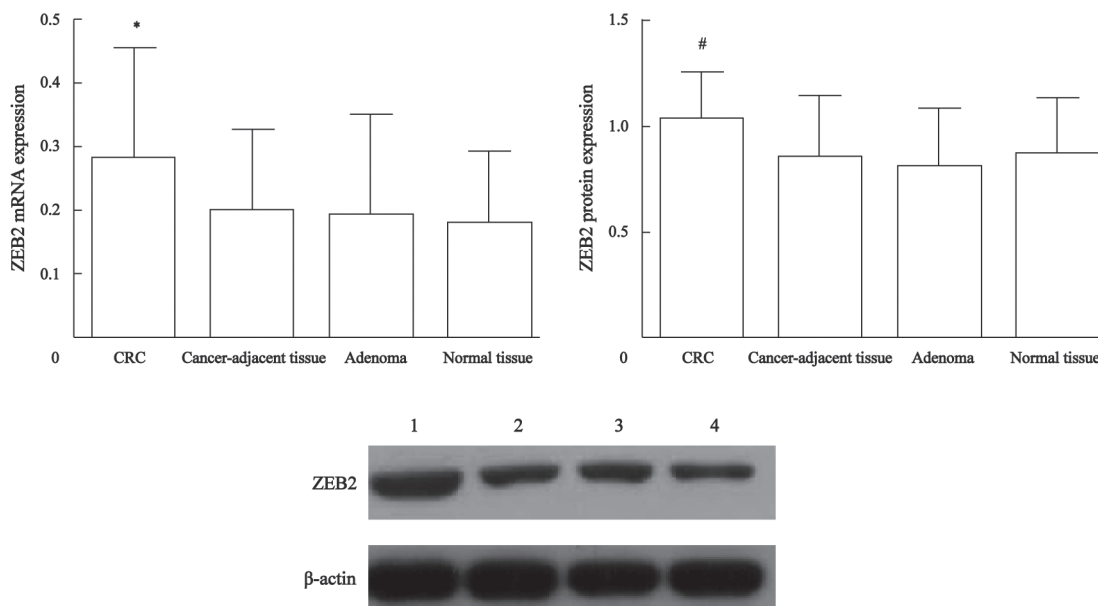


图2 ZEB2 mRNA及蛋白在各组组织的表达情况

Fig. 2 Differential expression of ZEB2 mRNA and protein in CRC, cancer-adjacent, adenoma, and normal tissues

A: Differential expression of ZEB2 mRNA in CRC, cancer-adjacent, adenoma, and normal tissues. *: $P < 0.05$, compared with the other 3 groups, respectively; B: Differential expression of ZEB2 protein in CRC, cancer-adjacent, adenoma, and normal tissues. #: $P < 0.05$, compared with the other 3 groups, respectively; C: Representative example of ZEB2 protein levels in CRC, cancer-adjacent, adenoma, and normal tissues; 1: CRC; 2: Cancer-adjacent tissue; 3: Adenoma; 4: Normal tissue.

结转移($P=0.021$)及远处转移($P=0.023$)显著相关(表1)。

2.4 miR-192与ZEB2蛋白表达的相关性分析

Pearson相关性分析显示, 在CRC组织中, miR-192表达下调与ZEB2蛋白的高表达呈负相关($r=-0.365$, $P<0.05$, 图3)。

表1 MiR-192的表达与结直肠癌临床病理参数的关系

Clinicopathological features	MiR-192		P value
	Downregulation	Upregulation	
Age/year			
<60	9	5	1
≥60	10	6	
Gender			
Male	8	7	0.45
Female	11	4	
Location of tumors			
Colon	11	6	1
Rectum	8	5	
Diameter/cm			
<5	13	4	0.132
≥5	6	7	
Differentiation			
High	8	3	0.466
Middle/low	11	8	
Lymphatic metastasis			
Positive	13	2	0.021*
Negative	6	9	
Distal metastasis			
Positive	14	3	0.023*
Negative	5	8	
Stage			
T ₁₋₂	7	5	0.712
T ₃₋₄	12	6	
Serum CEA level			
<5	8	4	1
≥5	11	7	

*: $P<0.05$.

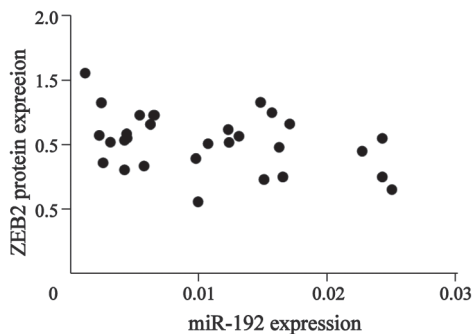


图3 结直肠癌组织中miR-192和ZEB2表达的相关性

Fig. 3 Correlation between miR-192 expression and ZEB2 protein levels in CRC tissues

MiR-192 expression showed a strong negative correlation with ZEB2 levels.

3 讨 论

miRNA是一类非编码小分子RNA, 可通过形成RNA诱导沉默复合物, 与靶mRNA的3'-非编码区完全或不完全互补结合, 促进靶mRNA降解或抑制其转录后翻译, 从而在病理生理过程中发挥作用^[9]。miRNA在多种肿瘤组织中表达异常, 而在一种肿瘤组织中也存在多种miRNA表达异常^[10-12]。miRNA作为调控基因表达的分子, 通过与下游靶基因的作用, 调控着肿瘤的发生、发展, 在肿瘤的演变过程扮演着非常重要的角色。因此, 深入研究miRNA在肿瘤中的调控机制, 以期寻找药物作用靶点, 为基因治疗肿瘤提供理论基础。

miRNA-192在恶性肿瘤中起着重要的作用, 其表达异常在多种肿瘤中得到证实。研究发现, 与正常肺组织相比, miR-192在肺癌组织中表达下调, 在体外实验中, 过表达miR-192通过作用于*RBI*基因可以抑制肺癌细胞的增殖和促进凋亡^[5]。Khella等^[13]的研究发现, 过表达miR-192可以抑制肾癌细胞的迁移及侵袭能力。本研究小组曾发现, miR-192模拟物转染结直肠癌SW480和SW620细胞后, 细胞的迁移和侵袭能力下降^[8]。本研究结果显示, CRC组织中miR-192的表达下调, 显著低于非肿瘤组织, 而在癌旁组织、结直肠腺瘤和正常组织中, miR-192的表达差异无统计学意义, 说明miR-192下调与CRC的发生、发展有关。本研究也发现, miR-192的低表达与淋巴结转移及远处转移有关, 提示miR-192可能参与CRC的进展过程。

ZEB2通过抑制E-cadherin的表达, 激活几种基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP), 包括MMP1、MMP2、MMP14, 诱导细胞发生上皮-基质转化, 促进细胞迁移和侵袭^[14]。有研究发现, ZEB2与CRC的侵袭转移能力相关, 但如何调控ZEB2发挥此作用的机制仍未明了^[15]。Hu等^[16]发现miR-141可以通过调节ZEB2的表达水平来抑制CRC细胞迁移和侵袭。本组资料显示, 分别与癌旁组、结直肠腺

瘤组、正常组比较, ZEB2在CRC组织中表达上调, 而且与miR-192的表达呈负相关。说明在CRC中miR-192可能通过与ZEB2的作用, 调控ZEB2的表达, 从而影响CRC细胞的迁移、侵袭能力。

[参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- [2] LIU L, CHEN L, XU Y, et al. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(2): 236-240.
- [3] SI M L, ZHU S, WU H, et al. MiR-21-mediated tumor growth [J]. Oncogene, 2007, 26 (19): 2799-2803.
- [4] MORIYAMA T, OHUCHIDA K, MIZUMOTO K, et al. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8 (5): 1067-1074.
- [5] FENG S, CONG S, ZHANG X, et al. MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(15): 6669-6678.
- [6] JIN Z, SELARU F M, CHENG Y, et al. MicroRNA-192 and -215 are upregulated in human gastric cancer in vivo and suppress ALCAM expression *in vitro* [J]. Oncogene, 2011, 30(13): 1577-1585.
- [7] CORTE H, MANCEAU G, BLONS H, et al. MicroRNA and colorectal cancer [J]. Dig Liver Dis, 2012, 44(3): 195-200.
- [8] 吴巍芸, 梁坚, 叶石才, 等. MiR-192对结直肠癌细胞ZEB2表达及迁移和侵袭的影响 [J]. 肿瘤, 2014, 34(1): 13-18.
- [9] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [10] CIAFRE S A, GALARDI S, MANGIOLA A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334 (4): 1351-1358.
- [11] LORIO M V, FERRACIN M, LIU C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [12] GUO Y, CHEN Z, ZHANG L, et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2008, 68(1): 26-33.
- [13] KHELLA H W, BAKHET M, ALLO G, et al. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(10): 2231-2239.
- [14] SANCHEZ-TILLO E, SILES L, DE BARRIOS O, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression [J]. Am J Cancer Res, 2011, 1(7): 897-912.
- [15] NAM E H, LEE Y, ZHAO X F, et al. ZEB2-Sp1 cooperation induces invasion by upregulating cadherin-11 and integrin $\alpha 5$ expression [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(2): 302-314.
- [16] HU M, XIA M, CHEN X, et al. MicroRNA-141 Regulates smad interacting protein 1 (SIP1) and inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells [J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(8): 2365-2372.

(收稿日期: 2014-02-18 修回日期: 2014-06-03)

“癌症研究新视野大会” 将于上海举行

由美国癌症研究学会(American Association for Cancer Research, AACR)主办的“癌症研究新视野大会”将于2014年10月9~12日在上海金茂君悦大酒店举行。本届会议主题为“靶向治疗的突破”, 将着重介绍癌症研究的主要领域中最新、最令人振奋的科研成果, 并为世界各地的癌症研究者们提供沟通交流和科学互动的宝贵平台, 推动癌症科学与医学的发展, 促进国际间合作。大会议程覆盖了癌症研究的全部领域, 从基础研究到转化医学, 再到临床, 众多国内外知名专家教授将会呈上一场场精彩演讲。同时我们还会带来AACR 2014全球年会(2014年4月5~9日在圣地亚哥举行)上的精彩内容。更多详情请登陆大会网站www.AACR.com.cn, 联系热线86-21-23123591。