

◇ 临床医学研究 ◇

miR-200a 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义

孙晶璐, 李 昊, 尹 玉, 李懿君, 王 弦, 江 燕, 詹鹤琴, 杨 枫

摘要 目的 探讨 miR-200a 在结直肠癌组织中的表达及其与结直肠癌临床病理特征之间的关系。方法 收集结直肠癌患者手术标本 70 例,距癌灶边缘 5 cm 以上切缘的正常黏膜作为对照。运用原位分子杂交技术检测结直肠癌组织及癌旁组织中 miR-200a 的表达水平,分析其与结直肠癌临床病理参数的关系。结果 结直肠癌组织中 miR-200a 的阳性表达率明显高于癌旁正常黏膜 ($P < 0.01$)。miR-200a 表达与肿瘤分化程度呈正相关性 ($r = 0.320$, $P < 0.01$)。在低分化结直肠癌中的表达低于高中分化结直肠癌的表达 ($P < 0.01$)。但与患者年龄、性别、肿块大小、浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期等无显著相关性。结论 miR-200a 在结直肠癌组织中表达上调,并与肿瘤分化程度相关,提示 miR-200a 可能在结直肠癌的发生、发展过程中发挥着重要作用。

关键词 miR-200a;原位分子杂交;结直肠肿瘤

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)06-0797-04

结直肠癌是第三大最常见的恶性肿瘤,在全球范围内,癌症患者死亡病因中结直肠癌位于第二^[1]。结直肠癌的发生发展是多基因、多步骤的复杂过程,深入研究结直肠癌的发病机制对于提高结直肠癌的早期诊断、预后评估及指导治疗均有重要意义。MicroRNAs (miRNAs) 是一类广泛存在于真核生物中,长度为 19~22 个核苷酸的非编码小分子 RNA。miRNAs 通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 互补配对,抑制蛋白合成或诱导 mRNA 降解,从而在转录后水平对目的基因表达进行负性调控^[2]。该研究采用原位分子杂交技术,分析 miR-200a 在结直肠癌组织中的表达差异,探讨其与结直肠癌临床病理参数的关系,为进一步阐明结直肠癌发生、发展的分子机制及寻找潜在的分子标志物提供实验基础及理论

依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 随机选取安徽医科大学第一附属医院病理科存档的 2014 年结直肠癌手术切除标本 70 例,年龄 38~84 岁,中位年龄 59.7 岁。患者术前均未接受放疗或化疗或其他针对肿瘤的治疗。

1.2 试剂来源 地高辛标记的 miR-200a 原位分子杂交探针、原位分子杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;浓缩型 DAB 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 方法 以探针稀释液替代探针作为阴性对照,用已知阳性切片作为阳性对照。切片经常规脱蜡至脱水。3% H_2O_2 室温处理 10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水清洗 3 次,然后切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶,37℃ 或室温消化 3~30 min。原位分子杂交专用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,蒸馏水洗 1 次。胃蛋白酶消化后,用固定液为 1% 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS (pH = 7.2~7.6) 含有 1/1 000 DEPC。室温固定 10 min,蒸馏水洗涤 3 次。按每张切片 20 μ l 加预杂交液,恒温箱 38~42℃ 培养 2~4 h,吸取多余液体,不洗。滴加含有地高辛标记的寡核苷酸探针,每张切片滴加 20 μ l 杂交液,将原位分子杂交专用盖玻片的保护膜揭开后盖在其切片上。恒温箱 38~42℃ 杂交过夜。约 37℃ 水温的 2 $\times$ SSC 洗涤 2 次,每次 5 min;约 37℃ 水温的 0.5 $\times$ SSC 洗涤 1 次,每次 15 min;约 37℃ 水温的 0.2 $\times$ SSC 洗涤 1 次,每次 15 min。滴加封闭液,37℃、30 min,甩去多余液体,不洗;滴加生物素化鼠抗地高辛,37℃、60 min,原位分子杂交专用 PBS 洗涤 4 次,每次 5 min;滴加 SABC,37℃ 20 min,原位分子杂交专用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加生物素化过氧化物酶,37℃ 20 min,原位杂交用 PBS 洗 4 次,每次 5 min;DAB 显色,苏木精复染,酒精脱水,二甲苯透明,封片。

原位分子杂交阳性信号为细胞质中出现明显黄色或棕黄色颗粒。采用半定量积分法判断结果,选择 5 个 400 倍视野,① 以着色细胞占视野细胞总数

2015-03-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81201536);安徽高校省级自然科学基金(编号:KJ2011A160)

作者单位:安徽医科大学病理学教研室,合肥 230032

作者简介:孙晶璐,女,硕士研究生;

李 昊,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: li-hao3402@aliyun.com

尹 玉,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: aydy-inyu@aliyun.com

的多少来计分:阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为1分,阳性细胞数 $10\% \sim 25\%$ 为2分,阳性细胞数 $25\% \sim 50\%$ 为3分,阳性细胞数 $\geq 50\%$ 为4分;②按着色细胞染色强度记分:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。两项积分相乘,积分为 $0 \sim 2$ 分表示阴性(-),积分为 $3 \sim 4$ 分表示弱阳性(+),积分为 $5 \sim 8$ 分表示阳性(++),积分为 $9 \sim 12$ 分表示强阳性(+++)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件包进行分析。各样本资料差异的统计学处理采用非参数秩和检验。

2 结果

2.1 miR-200a 在结直肠癌组织与正常结直肠黏膜组织的表达 原位分子杂交结果显示,70例结直肠癌组织中 miR-200a 阳性表达率为 74.3% ($52/70$),70例癌旁正常结直肠黏膜组织中 miR-200a 阳性表达率为 7.1% ($5/70$)。miR-200a 在结直肠癌组织中的表达显著高于正常结直肠黏膜组织 ($P < 0.01$),见表1、图1。

表1 miR-200a 在结直肠癌组织和正常结直肠黏膜组织中的表达情况 ($n = 70$)

项目	miR-200a(n)				阳性率 (%)	Z 值	P 值
	-	+	++	+++			
结直肠癌组织	18	20	15	17	74.3	58.36	0.000
正常结直肠黏膜组织	65	1	2	2	7.1		

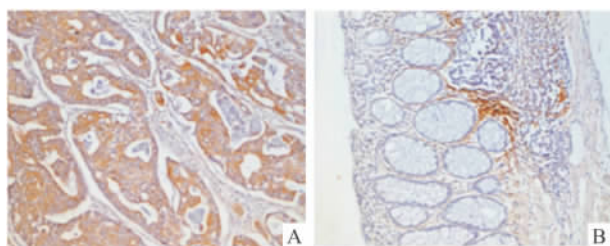


图1 结直肠癌及正常结直肠黏膜组织中 miR-200a 的表达 DAB $\times 100$
A: 结直肠癌组织; B: 正常结直肠黏膜组织

2.2 结直肠癌组织中 miR-200a 的表达与结直肠癌临床病理参数间的关系 原位分子杂交结果显示,miR-200a 在结直肠癌中的表达与患者性别、年龄、肿块大小、浸润深度、淋巴结转移、TMN 分期均无显著相关性。miR-200a 在高中分化、低分化的结直肠癌组织中的阳性率为 85.2% 、 37.5% 。miR-200a 在低分化结直肠癌组织中的表达明显低于高、

中分化的结直肠癌组织,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表2 结直肠癌组织中 miR-200a 的表达与临床病理参数间的关系

项目	n	miR-200a(n)				阳性率 (%)	P 值
		-	+	++	+++		
性别							
男	44	12	14	7	11	72.7	0.572
女	26	6	6	8	6	76.9	
年龄(岁)							
<60	27	9	7	3	8	66.7	0.622
≥ 60	43	9	13	12	9	79.1	
肿块大小(cm)							
<5	45	11	11	13	10	75.6	0.626
≥ 5	25	7	9	2	7	72.0	
分化程度							
高、中	54	8	18	14	14	85.2	0.008
低	16	10	2	1	3	37.5	
浸润深度							
T1~T2	21	6	6	7	2	71.4	0.344
T3~T4	49	12	14	8	15	75.5	
淋巴结转移							
无	37	8	15	8	6	78.4	0.395
有	33	10	5	7	11	69.7	
分期							
I~II	37	8	15	8	6	78.4	0.395
III~IV	33	10	5	7	11	69.7	

3 讨论

miRNAs 具有广泛的基因调节功能,可通过对其靶基因的调控作用从而参与多种生物学功能,如细胞生长、凋亡、分化、器官发育等,包括肿瘤的发生发展。目前已发现多种 miRNAs 在肿瘤中存在异常表达,发挥着癌基因或者抑癌基因的作用。结直肠癌中同样存在多种 miRNAs 的表达异常及对肿瘤细胞增殖、周期、转移等的调控作用,如 Let-7a^[3]、miR-21^[4]、miR-143^[5]、miR-24^[6]等。

miR-200 家族是近年来研究的热点,其成员包括 miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429。作为家族重要成员,miR-200a 主要通过调控上皮间质转化过程对肿瘤的发生和侵袭转移起着关键作用,其表达与肿瘤患者的预后也有着重要的关系。研究^[7]表明,在脑膜瘤细胞中,miR-200a 通过降低 β -链蛋白的表达水平,抑制 Wnt 信号通路的活化,从而起到肿瘤抑制基因的作用。研究^[8]显示,miR-200a 通过作用于 ZEB2 和 CTNNB1 抑制鼻咽癌细胞 C666-1 和 CEN-1 的增殖和侵袭。但 miR-200a 在少数肿瘤中表达上调,如研究^[9]显示 miR-200a 和

miR-200b 在大多数胰腺癌中高表达,并且 miR-200a 的高表达与食管腺癌的低生存率相关^[10]。目前关于 miR-200a 在结直肠癌组织中表达情况的报道较少,存在争议。研究^[11]显示 miR-200a 在结直肠癌细胞系中表达上升,Della et al^[12]通过实时定量 PCR 方法证实 miR-200a 在结直肠癌组织中的表达高于对照组,研究^[13]显示高水平的 miR-200a 与 miR-200c 与结直肠癌患者较长的总生存期有关。关于 miR-200a 在结直肠癌中的表达情况及其在肿瘤进展中的具体作用,尚待进一步深入研究。

本研究采用原位分子杂交技术进行检测,显示 miR-200a 在结直肠癌组织中呈高表达模式,即 miR-200a 在结直肠癌组织中的表达水平显著高于癌旁正常结直肠黏膜组织,与研究^[12]的结果是一致的。miR-200a 在结直肠癌组织中表达水平上调的具体机制尚不明确。有研究^[14]显示,miR-200a 的表达受甲基化修饰调控。甲基化是真核细胞中 DNA 正常的修饰方式,其在肿瘤中主要表现为广泛的低甲基化,从而易引起癌基因的激活。推测 miR-200a 在结直肠癌组织中表达量升高可能是由 miR-200a 定位基因的低甲基化所致。

本研究进一步探讨了 miR-200a 表达与结直肠癌临床病理参数间的关系,结果提示 miR-200a 的表达与结直肠癌分化程度存在相关性,即 miR-200a 在高中分化结直肠癌组织中表达水平显著高于低分化,这一结果耐人寻味。根据之前本研究的结果,miR-200a 在结直肠癌组织中呈高表达模式,从理论上推测,分化程度越低的结直肠癌中,miR-200a 的表达水平似乎应该越高。但统计结果与之相反,分析原因,或许是与选取样本的片面有关,提示 miR-200a 可能在结直肠癌的早期阶段起着更重要的作用。查阅文献^[15],研究者曾在六株结直肠癌细胞中检测 miR-200 家族(miR-200b、miR-200a、miR-141)启动子区域 CpG 岛的甲基化程度,结果发现甲基化程度高的细胞株中 miR-200a 表达水平较低,反之,表达水平较高。因此,推测在低分化结直肠癌组织中,甲基化程度升高可能引起 miR-200a 表达水平降低,具体机制尚待进一步验证。

综上所述,与正常结直肠黏膜组织相比,miR-200a 在结直肠癌中呈高表达模式,并且 miR-200a 表达与结直肠癌分化程度存在一定的相关性,提示 miR-200a 可能作为原癌基因参与了结直肠癌的发生发展过程,有望成为结直肠癌早期诊断、预后判断

及个体化治疗的潜在分子标志物。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1):11-30.
- [2] He L, Hannon G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7):522-31.
- [3] Fang W J, Lin C Z, Zhang H H, et al. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in colorectal cancer: a single-centre experience from China [J]. *J Int Med Res*, 2007, 35(5):716-23.
- [4] Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, et al. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(12):4009-16.
- [5] Chen X, Guo X, Zhang H, et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2009, 28(10):1385-92.
- [6] Mishra P J, Song B, Mishra P J, et al. MiR-24 tumor suppressor activity is regulated independent of p53 and through a target site polymorphism [J]. *PLoS One*, 2009, 4(12):e8445.
- [7] Saydam O, Shen Y, Würdinger T, et al. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(21):5923-40.
- [8] Xia H, Ng S S, Jiang S, et al. miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1):535-41.
- [9] Li A, Omura N, Hong S M, et al. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13):5226-37.
- [10] Hu Y, Correa A M, Hoque A, et al. Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(1):132-43.
- [11] Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues [J]. *Mol Cancer*, 2006, 5:29.
- [12] Della Vittoria Scarpato G, Calura E, Di Marino M, et al. Analysis of differential miRNA expression in primary tumor and stroma of colorectal cancer patients [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:840921.
- [13] Diaz T, Tejero R, Moreno I, et al. Role of miR-200 family members in survival of colorectal cancer patients treated with fluoropyrimidines [J]. *J Surg Oncol*, 2014, 109(7):676-83.
- [14] Weber M, Davies J J, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(8):853-62.
- [15] 何楠. miR-200a 及其甲基化在结直肠癌中的作用研究[D]. 南方医科大学, 2013.

基于静息态 fMRI 的难治性癫痫患者丘脑功能连接研究

季学兵¹, 肖芳¹, 罗艺¹, 魏建林¹, 钱若兵², 牛朝诗², 傅先明²

摘要 目的 利用静息态功能磁共振成像(fMRI)中的功能连接方法,探讨难治性癫痫患者丘脑的功能连接改变及意义。方法 难治性癫痫患者19例,多模态神经影像学检查中颅内均未发现明显致病病灶,发作间期及发作期长程视频脑电图提示双侧大脑半球棘波及棘慢波;同期招募19例健康对照者。采集静息态fMRI数据,分别以左、右丘脑为感兴趣区(ROI)与全脑进行功能连接分析,了解难治性癫痫患者相对于正常对照组功能连接增高和减弱的区域。结果 以左侧丘脑为ROI做功能连接分析,难治性癫痫组与双侧梭状回、右侧舌叶、双侧楔叶及双侧楔前叶的功能连接强度增强,而与双侧尾状核、左侧壳核及左侧杏仁核的功能连接强度减弱;以右侧丘脑为ROI做功能连接分析,难治性癫痫组与双侧距状回、双侧楔前叶及左侧直回的功能连接强度增强,而与双侧壳核、双侧尾状核、双侧杏仁核及右侧脑岛的功能连接强度减弱。结论 难治性癫痫患者静息状态下丘脑功能连接异常,丘脑可能参与了“癫痫网络”的构成。

关键词 癫痫;功能磁共振成像;功能连接;丘脑;癫痫网络

2015-04-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M167);安徽省科技攻关计划项目(编号:1301042201)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹影像科、²神经外科,合肥 230001

作者简介:季学兵,男,副主任医师,责任作者,E-mail:jixuebing@sina.com

中图分类号 R 742.1;R 445.2;R 319

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0800-04

癫痫是一种常见的、反复发作的严重威胁人类身心健康的慢性功能性神经疾病,癫痫的发病机制仍未完全明了;近年来,相关研究^[1]证实颅内存在与癫痫发作相关的“癫痫网络”,“癫痫网络”是指在癫痫的发生发展过程中有多个脑区而不是单一脑区参与引起癫痫的发生,其中丘脑作为组成结构参与了癫痫的发生与发展。该研究基于静息态功能磁共振成像(functional magnetic resonance imaging, fMRI)的功能连接分析方法,探讨难治性癫痫患者丘脑的功能连接改变及其在癫痫发病机制中的意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料

1.1.1 癫痫组 安徽医科大学附属省立医院影像中心2013年8月~2014年6月接诊的难治性癫痫患者19例,其中男13例,女6例;年龄21~32(25.42±5.06)岁。

1.1.2 健康对照组 正常志愿者19例,其中男13例,女6例;年龄21~36(24.74±1.85)岁,排除MRI检查禁忌证、神经及精神系统疾病及药物滥用

Expression of miR-200a in colorectal carcinoma and its clinical significance

Sun Jinglu, Li Hao, Yin Yu et al

(Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of miR-200a in colorectal carcinoma(CRC) and its relationship with clinicopathologic features. **Methods** In situ hybridization for miR-200a was performed in 70 colorectal carcinoma and normal colorectal tissues 5 cm distant from tumors. Analyzed its relationship with clinicopathologic parameters of CRC. **Results** The positive expression rate of the miR-200a in CRC was higher than those in normal colorectal mucosa ($P < 0.01$). The expression of miR-200a was positively correlated with the degree of tumor differentiation ($r = 0.320$, $P < 0.01$); it was lower in the poorly differentiated CRC than the highly and moderately differentiated CRC, but showing no correlation with age, sex, tumor size, depth of tumor invasion, lymph node metastasis and TNM stage. **Conclusion** The expression of miR-200a is up-regulated in CRC, and miR-200a may play an important role in the occurrence and development of CRC.

Key words miR-200a; in situ hybridization; colorectal carcinoma