

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.015

· 临床研究 ·

## 结直肠癌患者血清、粪便和癌组织中 miR-21、miR-217、miR-29b 和 miR-92a-1 的检测及其临床意义

邓嘉秋, 冯德魁, 吕生辉, 马国辉, 邹江, 赖志亨, 王宏, 陈小莉 (海南省中医院 肛肠科, 海南 海口 570203)

**[摘要]** **目的:** 探讨结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)患者血清、粪便和癌组织中 miR-21、miR-217、miR-29b 和 miR-92a-1 的表达水平及其临床意义。**方法:** 收集2016年7月至2017年5月在海南省中医院就诊的63例CRC患者, 根据CRC有无远处转移将患者分为无转移组( $n=35$ )和转移组( $n=28$ ); 另选取同期体检的30例健康志愿者纳入对照组。采集所有受试者的血清、粪便及CRC组织, 用RT-PCR检测标本中 miR-21、miR-217、miR-29b 和 miR-92a-1 的表达水平, 并进行比较分析。**结果:** CRC患者血清中 miR-21、miR-217、miR-29b 和 miR-92a-1 表达水平显著高于对照组(均  $P<0.05$ ), 以转移组中表达水平最高( $P<0.05$ )。CRC患者粪便中 miR-21、miR-217 和 miR-92a-1 表达水平显著高于对照组(均  $P<0.05$ ), 无转移组 miR-217 表达水平显著低于转移组( $P<0.05$ ), 而 miR-21、miR-29b 和 miR-92a-1 在无转移组和转移组的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。无转移组CRC组织中 miR-21、miR-29b 和 miR-92a-1 均明显低于转移组(均  $P<0.05$ ), 而 miR-217 表达水平显著高于转移组( $P<0.05$ )。**结论:** miR-21、miR-217、miR-29b 和 miR-92a-1 在CRC患者的血清、粪便和癌组织中异常表达, 多种 miRNAs 的联合检测有利于对CRC的发生、诊治和预后的评估。

**[关键词]** 结直肠癌; miR-21; miR-217; miR-29b; miR-92a-1; 血清; 粪便; 诊断; 预后

**[中图分类号]** R735.3; R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)01-0085-04

## Expression of miR-21, miR-217, miR-29b and miR-92a-1 in blood serum, feces and cancer tissues of colorectal cancer patients and their clinical significance

DENG Jiaqiu, FENG Dekui, LYU Shenghui, MA Guohui, ZOU Jiang, LAI Zhiheng, WANG Hong, CHEN Xiaoli (Proctology Department, Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou 570203, Hainan, China)

**[Abstract] Objective:** To study the expressions of miR-21, miR-217, miR-29b and miR-92a-1 in the blood serum, feces and cancer tissues of colorectal cancer (CRC) patients and to explore their clinical significance. **Methods:** A total of 63 CRC patients treated in Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine from July 2016 to May 2017 were involved in this study. Based on metastasis or not, the patients were divided into non-metastasis group ( $n=35$ ) and metastasis group ( $n=28$ ). Meanwhile, another 30 health volunteers were included in the control group. Feces and blood samples were collected from all subjects and tumor tissues were harvested from CRC patients. Reverse transcription-polymerase chain reaction was employed to measure the expression level of miR-21, miR-217, miR-29b and miR-92a-1 in all samples. **Results:** Expression of serum miR-21, miR-217, miR-29b and miR-92a-1 in CRC patients was significantly higher than those in control subjects (all  $P<0.05$ ) with the highest level in metastasis group ( $P<0.05$ ). Expressions of miR-21, miR-217 and miR-92a-1 in the feces of CRC patients were significantly higher than those of controls (all  $P<0.05$ ); and the expression in non-metastasis group was significantly lower than that in metastasis group ( $P<0.05$ ), but there was no obvious difference in expression levels of miR-21, miR-29b and miR-92a-1 between the non-metastasis group and the metastasis group ( $P>0.05$ ). The expression levels of miR-21, miR-29b and miR-92a-1 in CRC tissues of non-metastasis group was significantly lower than that of metastasis group (all  $P<0.05$ ) while the expression of miR-217 was remarkably higher than that of the metastasis group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** miR-21, miR-217, miR-29b and miR-92a-1 were abnormally expressed in the blood serum, feces and tumor tissues of CRC patients, and the combined detection of multiple miRNAs is beneficial for evaluating the occurrence, diagnosis and prognosis of CRC.

**[Key words]** colorectal cancer (CRC); miR-21; miR-217; miR-29b; miR-92a-1; blood serum; feces; diagnosis; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(1): 85-88. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.015]

**[基金项目]** 海南省医药卫生科研资助项目(No.15A200024)。Project supported by the Medical and Health Scientific Research Program in Hainan Province(No.15A200024)

**[作者简介]** 邓嘉秋(1973-),女,大学本科,副主任医师,主要从事肛肠外科疾病的中西医治疗研究

**[通信作者]** 邓嘉秋(DENG Jiaqiu, corresponding author), E-mail: reshengyingjia12@163.com

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是临床上一种发病率较高的消化道肿瘤<sup>[1]</sup>。CRC早期的治疗效果较为理想、预后较好,因此寻找筛查和诊断CRC的方法极为重要。目前,采用的方法多为大便隐血试验、肿瘤标志物检测、肠镜等,存在敏感性特异性较差或创伤性较大的问题<sup>[2]</sup>。miRNA是一种调控DNA转录的非编码RNA。近年来的研究<sup>[3]</sup>证实,miRNA与肿瘤的发生、发展等存在密切关系。本研究通过检测与CRC相关性较高的4种miRNA(miR-21, miR-217、miR-29b和miR-92a-1)在CRC患者血清、粪便和癌组织中的表达水平,旨在探讨其在CRC发生、进展和预后评估中的临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

收集2016年7月至2017年5月在海南省中医院

肛肠科收治的63例CRC患者,其中男28例、女35例,年龄32~75岁,平均(59.37±9.46)岁。纳入标准:(1)患者符合美国国家综合癌症网(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)公布的2017版《NCCNCRC诊治指南》中的诊断标准<sup>[4]</sup>;(2)患者在入院前未接受过相关放、化疗或靶向治疗;(3)患者既往无肠道慢性病史,如炎症性肠病、肠易激综合征等;(4)患者影像学检查资料完整;(5)患者了解本次研究内容,自愿参与并签署知情同意书。排除标准:(1)合并有其他器官系统严重疾病、恶性肿瘤等患者;(2)患者既往有腹部手术史;(3)标本收集不齐的患者;(4)不愿参与本次试验的患者。所有入组患者根据影像检查结果有无远处转移,分为无转移组(35例)及有转移组(28例)。另外,将同期体检的30例健康者纳入对照组。3组受试者的一般资料比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ;表1),具有可比性。

表1 3组受试者的一般资料比较[n(%)]

Tab. 1 Comparison of general information of three groups of subjects [n (%)]

Data	Control group (n=30)	Non-metastasis group (n=35)	Metastasis group (n=28)	F	P
Age( <i>t</i> /a)	58.83±8.36	59.94±9.16	59.02±8.93	0.148	0.862
Gender					
Male	18(60.00)	19(54.29)	16(57.14)	0.216	0.898
Female	12(40.00)	16(45.71)	12(42.86)		
Complication					
Hypertension	14(46.67)	12(34.29)	10(35.71)	1.195	0.550
Diabetes	9(30.00)	11(31.43)	12(42.86)	1.320	0.517
Dyslipidemia	10(33.33)	13(37.14)	9(32.14)	0.195	0.907

### 1.2 主要试剂和仪器

粪便RNA提取试剂盒购自Omega公司,miRNA cDNA Synthesis试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒购自TaKaRa公司,RNeasy Mini Kit试剂盒购自Qiagen公司。Nano Drop2000微量分光光度计为Thermo Scientific公司产品,RT-PCR ABI7900仪为Applied Biosystem公司产品。

### 1.3 检测样本的处理

1.3.1 血清 抽取各受试者3 ml静脉血,置于抗凝管内,经3 000×g离心10 min后收集血清,按照RNeasy Mini Kit试剂盒说明书提取样本中的总RNA,运用Nano Drop2000微量分光光度计对RNA标本进行定量定性。若RNA标本的 $D_{260}/D_{280}<2.0$ ,则重新提取RNA。将合格的RNA标本置于-80℃冰箱中待用。

1.3.2 粪便 取患者的新鲜粪便样品(从患者体内排出到送检不超过30 min)50 mg左右,按照粪便

RNA提取试剂盒操作指南进行操作。从粪便样品中提取、纯化RNA, RNA样本的筛选标准与血清样本相同,将符合标准的RNA样本置于-80℃冰箱中待用。

1.3.3 CRC组织 根据肉眼观察CRC组织,切取肿瘤中心的新鲜组织约50 mg,于匀浆器中混匀,按照RNeasy Mini Kit试剂盒说明书方法提取、纯化RNA,将符合标准的RNA标准置于-80℃冰箱中待用。

### 1.4 RT-PCR检测血清、粪便和癌组织中miR-21、miR-217、miR-29b和miR-92a-1NA的表达

各取1 μg从CRC患者血清、粪便和组织中提取RNA,按照miRNA cDNA Synthesis试剂盒说明书步骤进行逆转录,反应条件为37℃ 30 min,85℃ 5 s,4℃暂存。得到反转录产物后,用SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒说明书步骤及RT-PCR仪对所有样本中miR-21、miR-217、miR-29b和miR-92a-1的水平进行测定。通过逆转录体系进行反应,首先将5 μl cDNA加入RNA当中,扩增至20 μl,递减的扩张40

个循环:94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 60 s,72 °C 7 min之后,分析实验数据,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 测定目标miRNA的相对表达水平。实验重复3次。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间采用One-Way ANOVA进行比较,两组间采用独立样本 $t$ 检验,非正态分布数据组间采用Mann-Whitney  $U$ 检验;计数资料采用频数(百分比)的形式表示,组间采用卡方检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 4种miRNA在CRC患者血清中高表达

RT-PCR检测结果(表2)显示,转移组和无转移组CRC患者血清中miR-21、miR-217、miR-29b和miR-92a-1表达水平显著高于对照组(均 $P<0.05$ )。

### 2.2 4种miRNA在CRC患者粪便中的表达

RT-PCR检测结果(表3)显示,CRC患者粪便中miR-21、miR-217和miR-92a-1表达水平显著高于对照组(均 $P<0.05$ ),但miR-29b差异无统计学意义( $P>0.05$ );无转移组CRC患者的miR-217的表达水平显著低于转移组( $U=5.881, P<0.01$ ),而无转移组miR-21、miR-29b和miR-92a-1分别和转移组比较差异无统计学意义( $t=1.256, 1.344, 1.156$ ;均 $P>0.05$ )。

表2 4种miRNA在受试者血清中的表达

Tab.2 Expression of four miRNAs in blood serum of included subjects

mRNA	Control group ( $n=30$ )	CRC group ( $n=63$ )	Metastasis group ( $n=28$ )	Non-metastasis group ( $n=35$ )	$F$	$P$
miR-21	1.374±0.231	5.326±1.695*	7.427±1.342* <sup>△</sup>	3.265±0.883*	3.011	0.039
miR-217	1.485±0.218	5.326±1.268*	7.593±2.013* <sup>△</sup>	3.284±0.762*	3.222	0.037
miR-29b	2.381±0.673	6.984±1.265*	8.583±2.164* <sup>△</sup>	5.321±1.036*	3.398	0.035
miR-92a-1	1.938±0.361	5.235±1.026*	6.421±1.273* <sup>△</sup>	3.204±0.673*	3.716	0.032

\* $P<0.05$  vs Control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs Non-metastasis group

表3 4种miRNA在受试者粪便中的表达

Tab.3 Expression of four miRNAs in feces of included subjects

mRNA	Control group ( $n=30$ )	CRC group ( $n=63$ )	Metastasis group of CRC( $n=28$ )	Non-metastasis group of CRC( $n=35$ )	$F$	$P$
miR-21	5.694±0.374	8.265±1.365*	7.932±1.545*	8.584±1.264*	3.763	0.032
miR-217	3.482±0.716	6.265±1.584*	7.831±1.842* <sup>△</sup>	5.482±1.326*	4.200	0.028
miR-29b	1.384±0.535	1.536±0.321*	1.525±0.316	1.573±0.427	1.589	0.067
miR-92a-1	2.394±0.237	4.985±0.802*	5.025±0.842*	4.882±0.781*	3.779	0.032

\* $P<0.05$  vs Control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs Non-metastasis group

### 2.3 4种miRNA在CRC组织中的表达

RT-PCR检测结果(表4)显示,无转移组患者CRC组织中的miR-21、miR-29b和miR-92a-1表达水平明显低于转移组(均 $P<0.05$ ),而miR-217的水平显著高于转移组( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

近年来CRC的发病率逐年上升,已成为仅次于胃癌之后的第二大消化道肿瘤,也是我国三大癌之一<sup>[5]</sup>。CRC若能早期发现、及时治疗,患者术后生存率较高(达90%左右),但晚期肿瘤患者的5年生存率仅为5%<sup>[6]</sup>。该病患者在确诊时往往已经是疾病中晚期,部分患者可能因癌细胞远处转移、自身情况不佳等原因丧失了手术的机会;部分患者晚期肿瘤手术

切除范围较大,可能会对患者的生活质量造成极大的影响<sup>[7]</sup>。CRC的主要临床症状为排便习惯改变、便血等,由于肿瘤位置的不同,亦会出现腹痛、肠道梗阻等相应症状。虽然该病的临床症状较不典型,但大便隐血试验、肠镜等检查能够一定程度上较早地发现疾病,从而降低患者的病死率<sup>[8-9]</sup>。

miRNA是一种长度为21~23个核苷酸的RNA分子,属于非编码RNA的一种,无法翻译形成蛋白质,但其对DNA的转录起到极为重要的调控作用<sup>[10]</sup>。近年来,随着对miRNA与肿瘤关系研究的不断深入,其在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移以及血管生成等过程中的作用被逐渐发现<sup>[11-12]</sup>。有研究<sup>[13]</sup>表明,在CRC患者的外周血中,某些特定的miRNA,包括miR-29a、miR-21、miR-92a等均比健康者有更高的表达。另有



研究<sup>[14]</sup>表明, miR-29a和 miR-92a可以作为CRC的诊  
断标志物之一。本研究结果进一步证明, 上述 miR-  
NA在晚期(即存在转移)CRC患者血清内的表达水  
平明显高于早中期患者, 提示CRC患者血清中的  
miRNA的表达水平与疾病的进展有一定的关系, 能够在  
一定程度上预测患者的预后。王搏等<sup>[15]</sup>的研究结果提  
示, miR-217在CRC标本中存在显著低表达, miR-217  
高表达的患者预后较好, 这与本研究结果相一致。

表4 4种miRNA在转移与非转移CRC组织中的表达  
Tab.4 Expression of four miRNAs in the CRC tissues of  
metastasis and non-metastasis groups

mRNA	Metastasis group( <i>n</i> =28)	Non-metastasis group( <i>n</i> =35)	<i>t</i>	<i>P</i>
miR-21	6.482±2.108*	3.492±1.271	3.964	0.027
miR-217	2.947±0.831*	7.023±1.237	4.598	0.020
miR-29b	6.942±1.834*	3.901±1.276	3.748	0.032
miR-92a-1	7.582±0.974*	3.482±1.831	3.434	0.036

\**P*<0.05 vs Non-metastasis group

近年来的研究<sup>[16-17]</sup>也发现, CRC患者的粪便中由  
于存在大量的脱落肿瘤细胞, 因此在其中可以检测  
出相应miRNA的表达水平。本研究结果表明, CRC  
患者粪便中miR-21、miR-217和miR-92a-1的表达水  
平显著高于健康人群, 且miR-217在转移与未转移患  
者中存在显著差异。研究结果说明检测miRNA在粪  
便中的表达水平, 对诊断CRC有一定的指导意义。

综上所述, 多种miRNA在CRC患者的血液、粪  
便及组织中存在异常表达, 检测多种miRNA的表达水平  
可能有利于对CRC的发生、进展、预后判断和评估。

[参考文献]

[1] MARTINI G, TROIANI T, CARDONE C, et al. Present and future  
of metastatic colorectal cancer treatment: a review of new candidate  
targets[J/OL]. World J Gastroenterol, 2017, 23(26): 4675-4688[2017-  
08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514633/>.  
DOI:10.3748/wjg.v23.i26.4675.

[2] CHIU H M, HSU W F, CHANG L C, et al. Colorectal cancer screen-  
ing in Asia[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2017, 19(10): 47. DOI:  
10.1007/s11894-017-0587-4.

[3] ZHENG Q, CHEN C, GUAN H, et al. Prognostic role of microR-  
NAs in human gastrointestinal cancer: a systematic review and me-  
ta-analysis[J/OL]. Oncotarget, 2017, 8(28): 46611-46623[2017-08-

20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5542297/>. DOI:  
10.18632/oncotarget.16679.

[4] BENSON A B 3<sup>rd</sup>, VENOOK A P, CEDERQUIST L, et al. Colon cancer,  
version 1.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J/OL].  
J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(3): 370-398[2017-08-23]. [http://  
www.jnccn.org/content/15/3/370.full.pdf?cited-by=yes&legid=jnccn;  
15/3/370](http://www.jnccn.org/content/15/3/370.full.pdf?cited-by=yes&legid=jnccn;15/3/370). DOI: 10.3747/co.20.1341.

[5] 俞希虎, 王磊. 结直肠癌精准医疗的研究现状[J]. 中华实验外科杂志,  
2017, 34(1): 1-4. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2017.01.001.

[6] NASSERI Y, LANGENFELD S J. Imaging for colorectal cancer[J].  
Surg Clin North Am, 2017, 97(3): 503-513. DOI: 10.1016/j.suc.  
2017.01.002.

[7] MOUG S J, BRYCE A, MUTRIE N, et al. Lifestyle interventions  
are feasible in patients with colorectal cancer with potential short-  
term health benefits: a systematic review[J/OL]. Int J Colorectal  
Dis, 2017, 32(6): 765-775[2017-08-23]. [https://www.ncbi.nlm.nih.  
gov/pmc/articles/PMC5432596/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432596/). DOI:10.1007/s00384-017-2797-5.

[8] 瞿爱军, 陈洪, 王贵齐, 等. 三种结直肠癌筛查方法比较研究[J]. 中  
国全科医学, 2016, 19(2): 170-173. DOI:10.3969/j.issn.1007-9572.  
2016.02.010.

[9] 刘荣, 王亚东, 王贵齐, 等. 基于慢病管理的结直肠癌筛查模式探  
讨[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(5): 524-527.

[10] 梁高峰, 何向峰, 陈宝安. miRNA在肿瘤分子诊断和治疗中的研  
究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(9): 57-65.

[11] 朱振浩, 陈家乐, 伍丽青, 等. miRNA参与的血管内皮生长因子及  
其信号通路调控在肿瘤血管生成中作用的研究进展[J]. 广东医  
学, 2016, 37(1): 136-139. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2016.01.031.

[12] 郭婧澜, 叶婷. miRNA在泌尿系统肿瘤发病、诊断及治疗中的作  
用研究进展[J]. 山东医药, 2016, 56(35): 108-111. DOI:10.3969/j.  
issn.1002-266X.2016.35.037.

[13] 刘华, 姜杰, 刘晓英, 等. 微RNA-21和微RNA-146a在结直肠肿瘤  
中的表达及临床意义[J]. 中华消化杂志, 2015, 35(7): 470-475.  
DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2015.07.012.

[14] 付永清, 傅天啸, 刘翔, 等. 结直肠癌特征性微小RNA诊断指纹图  
谱的筛选及临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(2): 495-  
498. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.02.065.

[15] 王搏, 申占龙, 叶颖江, 等. microRNA-217在结直肠癌中的表达  
及临床意义[J]. 中华普通外科杂志, 2015, 30(2): 134-138. DOI:  
10.3760/cma.j.issn.1007-631X.2015.02.014.

[16] 刘芳腾, 欧阳喜, 张官平, 等. 循环miRNA在结直肠癌诊断中的应  
用价值[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(13): 2241-2243. DOI:10.3969/  
j.issn.1006-5725.2016.13.050.

[17] 许安东, 朱云祥, 汤晓飞, 等. 粪便中miRNA-424在结直肠癌诊断  
和筛查中的应用[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(1): 16-19. DOI:  
10.7619/jcmp.201601005.

[收稿日期] 2017-09-24 [修回日期] 2017-10-19  
[本文编辑] 党瑞山