

Relationship between Plasma miRNA-181 and PTEN and Pathological Staging in Colorectal Cancer

Weiqliang Guo, Fengping He*, Tao Zhang, Dingyun Li, Liang Huang, Zhanzhong Ma, Hong Chen, Yulan Liu, Weijuan Chen, Zhuoran Chen

Affiliated Yuebei People's Hospital, Shantou University Medical College, Guangdong Province, Shantou Guangdong
Email: *watering@aliyun.com

Received: May 11th, 2020; accepted: May 27th, 2020; published: Jun. 2nd, 2020

Abstract

Objective: To investigate the relationship between plasma microRNA (miRNA)-181 and tension protein homolog gene (PTEN) and pathological staging of colorectal cancer, and to explore the diagnosis significance for colorectal cancer. **Methods:** A total of 120 cases of colorectal cancer and 100 cases of healthy subjects were included in the study. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of miRNA-181 and PTEN genes in the plasma and tissues of colorectal cancer patients, and immunohistochemistry was used to detect the expression of PTEN protein in the tissues of colorectal cancer patients, and to analyze the relationship between the expression of miRNA-181 and PTEN protein and the pathological stage of colorectal cancer. The growth and proliferation capacity of miRNA-181 and PTEN in CRC cell line SW 1116 were studied by 4-Methylcyclohexanone assay (MTT) and cell colony formation assay. **Results:** Compared with the normal control group, the plasma level of miRNA-181 in colorectal cancer patients was significantly increased (0.58 ± 0.23 vs 3.28 ± 0.46) vs ($P < 0.01$), and the plasma level of PTEN gene in colorectal cancer patients was significantly decreased (5.37 ± 1.34 vs 0.26 ± 0.21) ($P < 0.01$). The positive expression rate of PTEN protein in colorectal cancer tissues was significantly decreased (100% vs 36.67%) ($P < 0.001$). With the increase of malignant degree of staging, the relative expression level of miRNA-181 increased, and the expression level of PTEN gene and protein decreased, with statistically significant differences between groups ($P < 0.01$, $P < 0.001$). The MTT showed that CRC cell line SW1116 in the miRNA-181 group at different times increased the Growth rate, while the cell growth in the PTEN group lagged behind ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$). The cell colony formation experiment showed that the proliferation ability of CRC cell line SW1116 in the miRNA-181 group was enhanced, while the proliferation capacity of cells in the PTEN group was weakened ($P < 0.001$). **Conclusion:** The abnormal expression of miRNA-181 and PTEN in CRC plasma and tissues is closely related to the pathological stage of colorectal cancer, And miRNA-181 has important clinical significance in the auxiliary diagnosis and prognosis monitoring of colorectal cancer.

*通讯作者。

文章引用: 郭伟强, 何凤屏, 张涛, 李定云, 黄亮, 马占忠, 陈红, 刘玉兰, 陈伟娟, 陈卓然. 结直肠癌血浆中 microRNA-181 和 PTEN 基因与病理分期的关系[J]. 医学诊断, 2020, 10(2): 56-65. DOI: 10.12677/md.2020.102009

Keywords

Colorectal Cancer, microRNA-181, Tension Protein Homolog Gene (PTEN)

结直肠癌血浆中microRNA-181和PTEN基因与病理分期的关系

郭伟强, 何凤屏*, 张涛, 李定云, 黄亮, 马占忠, 陈红, 刘玉兰, 陈伟娟, 陈卓然

广东省汕头大学医学院附属粤北人民医院, 广东 汕头

Email: *watering@aliyun.com

收稿日期: 2020年5月11日; 录用日期: 2020年5月27日; 发布日期: 2020年6月2日

摘要

目的: 研究结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)患者血浆和癌组织中microRNA-181和张力蛋白同源物基因(PTEN)的表达及其与临床分期, 并探讨CRC在结直肠癌中的诊断价值。**方法:** 选择120例结直肠癌患者及100例健康体检者为对照。采用实时荧光定量PCR技术检测结直肠癌患者血浆中miRNA-181和PTEN基因、以及组织中miRNA-181的表达, 采用免疫组织化学技术检测结直肠癌患者血浆和组织PTEN蛋白的表达, 并分析miRNA-181和PTEN蛋白表达与结直肠癌病理分期的关系。采用四甲基偶氮唑盐法和细胞集落形成实验研究miRNA-181和PTEN在CRC细胞株SW 1116生长和增殖能力。**结果:** 与正常对照组比较, 结直肠癌患者血浆中miRNA-181明显升高(0.58 ± 0.23 vs 3.28 ± 0.46 ($P < 0.01$)), 血浆中PTEN基因明显下降(5.37 ± 1.34 vs 0.26 ± 0.21) ($P = 0.01$)。与癌旁正常结直肠粘膜组织比较, 结直肠癌组织PTEN蛋白阳性表达率明显降低(100% vs 36.67%) ($P < 0.001$); 随着分期恶性度的升高, miRNA-181相对表达量增加, PTEN基因和蛋白的表达下降, 各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$)。四甲基偶氮唑盐法显示miRNA-181组在不同时间的CRC细胞株SW 1116生长速度加快, PTEN组细胞生长落后($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。平板克隆形成实验显示miRNA-181组在CRC细胞株SW 1116增殖能力增强, PTEN组细胞增殖能力减弱($P < 0.001$)。**结论:** miRNA-181和PTEN在CRC血浆和组织中的异常表达与结直肠癌病理分期密切相关, miRNA-181对结直肠癌的辅助诊断和预后监测具有重要的临床意义。

关键词

结直肠癌, miRNA-181, 张力蛋白同源物基因(PTEN)

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)是世界上最常见的三大恶性肿瘤之一[1]。近年来, 随着我国人民的

生活节奏加快以及饮食结构的改变, CRC 发病率呈明显上升趋势, 且年轻化[2]。临床上常用血清标志物 CEA、CA-199、CA-242 联合检测作为对疾病的诊断, 但是, 此三种肿瘤标志物联检的灵敏度仅为 33%~56% 左右[3]。因此, 发现一种敏感性及特异性高的标志物显得尤为重要。MicroRNA (miRNA) 是一类长 18~24 个核苷酸的非编码小分子单链 RNA。miRNA 通过完全或部分碱基配对与靶分子 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合, 降解或抑制 mRNA 的翻译, 从而抑制靶基因的表达[4]。miRNA 在肿瘤的发生发展过程中起到调控靶基因的重要作用[5]。PTEN 是肿瘤抑制基因, 具有脂质和蛋白双重磷酸活性, 在细胞生长、增殖、生存、凋亡、血管生成、细胞迁移和侵袭等方面发挥重要作用[6]。PTEN 在肿瘤中表达下调或者发生缺失突变时, 可激活 PI3K/Akt 信号通路, 从而引起肿瘤的发生发展、侵袭和转移[7]。

有研究提出 miRNA 不仅在肿瘤组织内稳定表达, 而且能稳定存在于血清、血浆、全血中[8] [9], 可作为一种无创的肿瘤诊断标志物。Li 等研究发现 CRC 患者血清和血浆 miRNA-181 的表达明显上调[10], 但是, 其发病机制仍不明确。本文通过研究 miRNA-181 和 PTEN 与病理分期的相关性, 为临床上治疗和预后监测提供实验依据。

2. 资料与方法

2.1. 研究对象

选取 2017 年 1 月至 2019 年 6 月在粤北人民医院胃肠外科住院并病理诊断证实为结直肠癌的患者 120 例, 其中男 68 例, 女 52 例, 年龄 47~70 岁, 平均年龄 55.6 岁。所有的患者术前均未接受放射治疗、化学药物、免疫治疗。纳入标准: ① 病理确诊为结直肠癌的患者; ② 未经任何放疗、化疗等治疗的患者。排除标准: ① 合并有其他恶性肿瘤病史; ② 家族遗传性息肉病患者。根据美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)/国际抗癌联盟(the International Union Against Cancer, UICC)的结直肠癌 TNM 分期标准[11]: I 期 10 例, II 期 18 例, III 期 48 例, IV 期 44 例; 另取同期健康体检者 100 例作为对照, 年龄 45 岁~65 岁, 平均年龄 52.28 岁, 男 50 例, 女 50 例。两组人群年龄差异无统计学意义。本研究经汕头大学医学院附属粤北人民医院伦理委员会批准, 所有研究对象均签约知情同意书。

2.2. 试剂及仪器

总 RNA 提取试剂盒(货号 19022511)、反转录试剂盒(货号 S160112173047)及实时荧光定量 PCR 试剂盒(货号 0000175157)购自上海生工生物工程股份有限公司。miRNA-181 与内参 U6 上下游引物购自广州锐博生物有限公司(货号 0000170405); PTEN 表达检测用的引物和内参也需要说明。实时荧光定量 PCR 检测使用 BIO-RAD CFX96 型仪器(美国 BIO-RAD 公司)。

2.3. 实验方法

2.3.1. 标本采集

静脉采集各组外周血 3 ml, EDTA 抗凝, 3000 r/min 离心 15 min, 取血浆放入干净 Eppendorf 管中, 在 10℃ 13000 r/min 离心 5 min, 去除细胞碎片, 处理好的血浆于-80℃冰箱保存, 以备用于 RNA 提取, 该步骤在 2 h 内完成。

取结直肠原发肿瘤组织及癌旁正常肠粘膜组织(取材部位距离肿瘤边缘至少 5 cm), 离体 10 min 内放入液氮保存。取液氮保存结直肠组织约 500 mg, 研磨至极细碎末状, 加入 1 ml Trizol, 用于提取总 RNA。

2.3.2. 血浆总 RNA 提取

冻存的血浆标本复温, 严格按照 RNA 提取试剂说明书提取血浆总 RNA。使用紫外分光光度仪测定

提取 RNA 的浓度及纯度, 其 A260/A280 比值应在 1.8~2.1 之间, 计算 RNA 浓度用于进一步实验。

2.3.3. 反转录反应

应用反转录试剂盒中的特异性反转录引物并按照说明书逐步合成 cDNA, 反转录体系 20 μ L, 反转录条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 4 $^{\circ}$ C 保存反转录产物。

2.3.4. real-time PCR 反应

实时荧光定量 PCR 反应体系和反应条件参照试剂盒说明书进行操作。

2.3.5. 结直肠癌细胞培养及转染

将人结直肠癌细胞株 SW1116 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 10 mL, 800 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃去上清液, 重悬后将细胞加入 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞融合至 80%~90% 时传代。

四甲基偶氮唑盐(4-Methylcyclohexanone, MTT)法检测细胞增殖[11]: 分别以每孔 103 细胞密度将 3 组细胞接种于 96 孔培养板, 以培养液为空白对照, 分别培养 1, 2, 3, 4 天。每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h 后终止培养, 弃去培养液, 加入二甲基亚砷(DMSO), 振荡、室温孵育 10 分钟后, 测定波长 493 nm 处各孔吸光度(A)值。以时间为横坐标, 以 A 值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

平板克隆形成实验: 以 100、200、400 个细胞的密度分别将 3 组细胞接种于培养皿中, 静止培养 2 周。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时(\geq 50 个细胞的为一个克隆), 终止培养, 弃去培养液。平板克隆形成率 = 形成克隆数/接种细胞数 \times 100%。

2.4. 免疫组织化学结果的判断

PTEN 试剂盒(含兔抗人 PTEN 多克隆抗体及二抗)购自上海钰博生物科技有限公司。免疫组织化学(SP 法)染色严格按说明书, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照。免疫组化试剂购自福建迈新生物公司, 奥林巴斯光学显微镜购自日本奥林巴斯(OLYMPUS)公司。PTEN 以细胞核呈现棕黄色颗粒为阳性结果, 免疫组织化学结果判定由两名中级职称以上病理医师负责诊断。

2.5. 统计学处理

运用 SPSS17.0 软件对数据进行分析, 计量数据采用均数 \pm 标准差表示, 两组组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 结直肠癌患者血浆中 miRNA-181 和 PTEN 的表达水平

经实时荧光定量 PCR 检测, 结果显示结直肠癌患者血浆中 miRNA-181 明显增高, 为 3.28 ± 0.46 , 对照组为 0.58 ± 0.23 ; PTEN 明显下降, 为 0.26 ± 0.21 , 对照组为 5.37 ± 1.34 , 通过 *t* 检验, 差异具有统计学意义, 分别为 $P = 0.01$ 和 $P = 0.001$, 详见图 1。

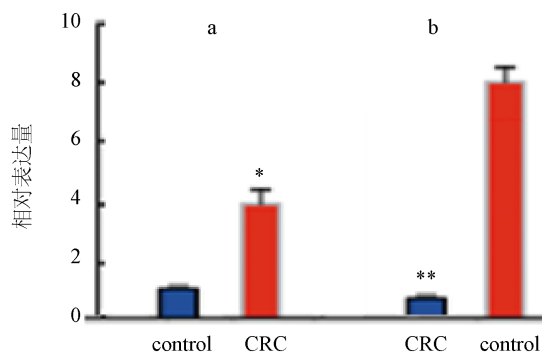
3.2. 结直肠癌组织中 PTEN 蛋白表达

结直肠癌患者组织中 PTEN 蛋白明显下降, 阳性表达率明显降低, 与癌旁正常组织(对照组)比较(见图 2), 36.67% vs 100%, 比较差异有统计学意义($P < 0.001$)。

3.3. 结直肠癌患者组织中 miRNA-181 和 PTEN 蛋白表达与病理特征及临床分期的关系

根据不同分期 miRNA-181 和 PTEN 值分别为 T I: $2.26 + 1.09$ 和 43%、T II: $3.17 + 1.83$ 和 37%、T III:

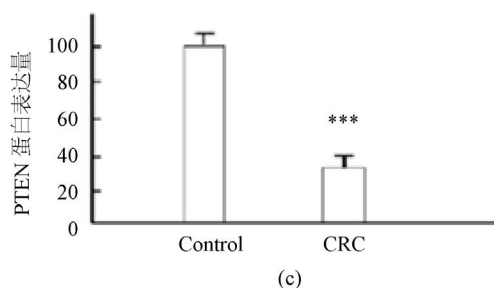
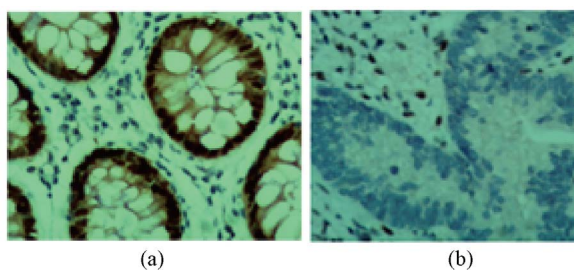
5.04 + 2.06 和 18% 和 T IV: 7.38 + 2.45 和 11%。随着肿瘤分期恶性度的增加 miRNA-181 表达逐步升高, 而 PTEN 蛋白表达逐步降低, 各组间比较采用方差分析, T I 期与 T II 期间、T III 期间、T IV 期间比较差异, 具有统计学意义($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$), 结果详见表 1。



(a)为 miRNA-181 在结直肠癌患者血浆中的表达水平与对照组比较, $*P < 0.01$; (b)为 PTEN 在结直肠癌患者血浆中的表达水平与对照组比较, $**P < 0.001$ 。

Figure 1. Expression of miRNA-181 和 PTEN in CRC patients and control group

图 1. miRNA-181 和 PTEN 在结直肠癌患者血浆中的表达水平。



(a)为 PTEN 蛋白在癌旁对照组的组织中的表达(免疫组化, 400 \times); (b)为 PTEN 蛋白在 CRC 组的组织中的表达(免疫组化, 400 \times); (c)为两组的 PTEN 蛋白阳性表达量, $***P = 0.00$ 。

Figure 2. Expression of PTEN protein CRC patients and control group

图 2. PTEN 蛋白在结直肠癌组和癌旁对照组的组织中表达

3.4. miRNA-181 和 PTEN 基因在结直肠癌患者血浆和癌组织中的相关分析

miRNA-181 和 PTEN 基因在结直肠癌患者血浆中的表达之间存在着良好线性负相关的关系($r = -0.736, P = 0.05$)。miRNA-181 和 PTEN 基因在血浆的表达与在组织中蛋白的表达分别呈正相关, 分别为

$r = 0.627$ 和 $r = 0.714$, $P = 0.05$ 。

Table 1. Relationship between miRNA-181 and PTEN protein in CRC tissue and clinicopathological characteristics TNM
表 1. CRC 组织中 miRNA-181 和 PTEN 蛋白表达与临床病理特征及 TNM 分期的相关性

临床病理特征	例数(n)	miRNA-181 表达水平	P 值	PTEN 蛋白阳性表达率	P 值
性别					
男	36	7.18 ± 2.24	0.681	30%	0.734
女	24	6.84 ± 2.18		32%	
年龄					
<40 岁	8	6.94 ± 2.19	0.258	36%	0.695
41~59 岁	35	7.13 ± 2.25		35%	
>60 岁	17	7.22 ± 2.36		30%	
临床 TNM 分期					
I 期	4	2.26 ± 1.09	0.012	43%	0.001
II 期	8	3.17 ± 1.83		37%	
III 期	28	5.04 ± 2.06		18%	
IV 期	20	7.38 ± 2.45		11%	
淋巴结转移					
有	46	7.66 ± 2.63	0.011	15%	0.001
无	14	2.89 ± 1.06		46%	
病理分级					
未 + 低分化	28	7.88 ± 2.71	0.009	12%	0.000
中 + 高分化	32	2.67 ± 1.04		45%	

注: 检测结直肠癌组织 miRNA-181 的相对表达水平($\bar{x} \pm s$): 检测结直肠癌组织 PTEN 蛋白阳性表达率用%来表示。

3.5. miRNA-181 对 CRC 细胞株 SW1116 细胞增殖能力的影响

采用 MTT 法检测 CRC 细胞株 SW1116 细胞转染 miRNA-181 mimic 组和对照组, 正如图 3 所示: 转染 miRNA-181 mimic 组不同时间的细胞生长水平明显高于对照组, 各组间比较差异有统计学意义(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

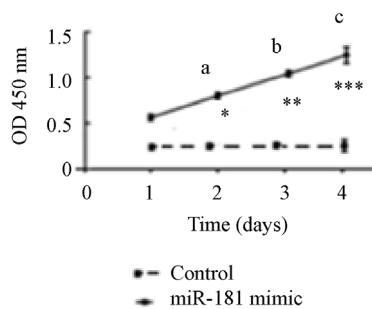
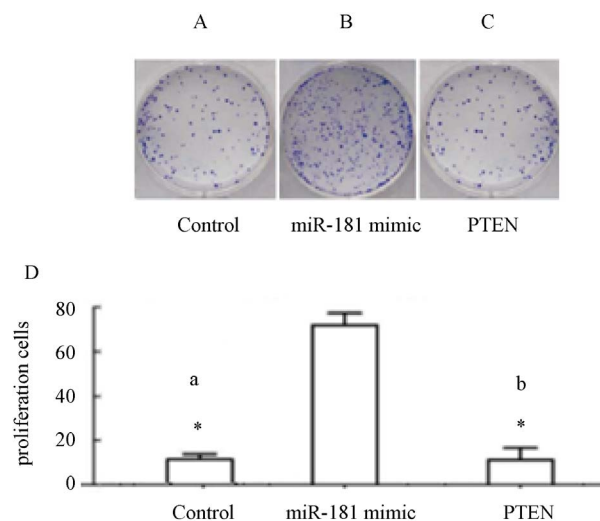


图 3 表示转染 miRNA-181 mimic 组不同时间的细胞生长水, 各组间比较差异有统计学意义(a: * $P < 0.05$, b: ** $P < 0.01$, c: *** $P < 0.001$)。

Figure 3. SW 1116 cells from CRC cell line of transforming the cell growth of the miRNA-181 mimic at different times were detected by MTT method

图 3. 采用 MTT 法分别检测 CRC 细胞株 SW 1116 细胞在不同时间转染 miRNA-181 mimic 的细胞生长情况

细胞集落形成实验显示:在转染 miRNA-181 mimic 组的细胞克隆生长速度加快于对照组和转染 PTEN 基因组(图 4(A)~(C)), 转染 miRNA-181 mimic 组的细胞克隆形成率达到 78%, 明显高于对照组(19%), 两组比较差异具有统计学意义(* $P < 0.01$), 见图 4(D)。



(A) 表示阴性对照组(脂质体转染法, 100×); (B) 表示 miRNA-181 mimic 转染组(脂质体转染法, 100×); (C) 表示 PTEN 组(脂质体转染法, 100×); (D): 各组细胞克隆形成率比较, 与 miRNA-181 mimic 转染组比较, a, * $P = 0.01$, b, * $P = 0.01$ 。

Figure 4. Cell colony formation experiments showed SW 1116 cells Cell cloning growth rate in miRNA-181 mimic transfection group

图 4. 细胞集落形成实验显示 SW 1116 细胞在 miRNA-181 mimic 转染组的细胞克隆生长速度

3.6. PTEN 和 miRNA-181 mimics 转染对 CRC 细胞株 SW1116 细胞增殖能力的影响

采用 MTT 法检测 CRC 细胞株 SW1116 细胞转染 PTEN 组和 miRNA-181mimic 转染组的细胞生长情况, miRNA-181 mimic 转染组的细胞生长水平明显高于 PTEN 组(* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.000$) (见图 4(B))。

在细胞集落形成实验中发现, 图 4(D)可见 PTEN 组抑制 SW1116 细胞增殖, 细胞克隆生长明显落后于 miRNA-181 mimic 转染组, PTEN 组细胞克隆生长率只有 19%, 而 miRNA-181 mimic 转染组的细胞克隆生长率达到 78%, 明显高于 PTEN 组, 两组比较差异有统计学意义(* $P < 0.01$)。

4. 讨论

由于 miRNA-181 在多种恶性肿瘤组织中的表达具有促癌基因的活性, 主要通过下游靶分子转录后水平调控发挥生物效应[12]。miRNA-181 的表达与肺癌、肝癌等恶性肿瘤的发病有密切关系[13], 特别是 miRNA-181 在调控肿瘤细胞侵袭和迁移这一方面起到至关重要的作用。国外学者研究发现 miRNA-181 在 CRC 患者血浆中水平升高, 肿瘤切除后水平明显下降[14], 但是目前 CRC 的发病机制仍未清楚。为了进一步研究 miRNA-181 在 CRC 中的作用机制, 本研究采用实时荧光定量 PCR 技术检测 CRC 患者血浆和组织中 miRNA-181 的表达, 发现血浆 miRNA-181 与 CRC 病理分期、淋巴结转移和远处转移有关, 随着肿瘤恶性度的升高, miRNA-181 表达逐步增高, 尤其是在淋巴结转移的 CRC 中表达明显增高, 其表达水平还与分化程度相关, 低分化肿瘤组织中 miRNA-181 表达水平高于高分化者(见表 1 和图 1)。同时

还发现 CRC 患者血清中 miRNA-181 的表达与癌组织中的 miRNA-181 表达呈正相关($r = 0.627$)。国外学者也发现 miRNA-181 表达水平与治愈率和生存率呈负相关[14], 上述的研究结果表明了血浆 miRNA-181 的表达水平在 CRC 的发展及恶性转化过程中发挥重要作用, 可作为 CRC 患者预后评价的指标[13][14]。

miRNA 通过与靶基因的结合共同发挥作用, 实现对肿瘤发生发展的调控[15]。miRNA-181 以 PTEN, RECK, TIMP-3, SPRY1、PI3K/AKT、Wnt/ β -catenin 等为作用的靶点, 调节 CRC 细胞的生长及凋亡、侵袭和转移及耐药, 认为 PTEN 是 miRNA-181 的靶基因, miRNA-181 高表达能促进恶性肿瘤细胞的侵袭和转移[16]。国外 Qing 学者等[17]采用敲除 PTEN 基因发现增加 CRC 细胞的恶性程度, 促进了 CRC 细胞的侵袭和转移。Rebersek 等[18]研究结直肠癌患者的 PTEN 基因突变在肿瘤 T1-TIII 分期患者居多, 且 PTEN 野生型患者的预后较好, 中位生存期明显高于突变患者, 肿瘤浸润深度是影响预后的独立危险因素。

PTEN 基因是目前发现的具有磷酸激酶活性的抑癌基因, 人类许多恶性肿瘤中存在着 PTEN 功能的失活, 并与肿瘤进展有密切相关[19]。我们采用免疫组织化学 SP 法检测结直肠癌组织 PTEN 蛋白的表达, 发现与癌旁正常组织(对照组)比较差异有统计学意义($P = 0.001$), 提示 PTEN 蛋白表达下调在结直肠癌的发生过程中起到极为不良的事件。Lu 等研究[20]发现环状 RNA (circ-FBXW7)的上调, 降低了 PTEN 的表达, 诱导抑制肿瘤细胞的生长、增殖、迁移、侵袭。因此, PTEN 蛋白的表达水平下调提示在一定的程度上促进细胞恶性转化和肿瘤转移。结合本研究结直肠癌临床病理资料分析发现, 随着病情进展, 结直肠癌组织细胞分化程度降低, PTEN 蛋白的表达呈下降趋势, 提示 PTEN 蛋白的表达直结肠癌组织细胞分化相关。近期 Salvatore 等研究[21]表明 PTEN 下调上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的活性, 抑制 PI3K-Akt 通路的作用, 通过改善细胞和细胞间质的相互作用, 减弱肿瘤细胞的侵袭性。本研究结果也显示, 有淋巴结转移组 PTEN 蛋白表达率(15%)明显低于淋巴结转移组(46%), $P < 0.001$ 。在 T 分期的 I 期→IV 期 CRC 组织 PTEN 蛋白表达逐步下降($P < 0.001$)。以上结果表明在高侵袭、高转移性的 CRC 组织中的表达明显降低或无表达, 提示 PTEN 表达的下调可能是肿瘤的侵袭程度和转移增加的主要原因之一, 促进 CRC 发展和转移的作用。本研究结果还显示 PTEN 基因在血浆的表达与免疫组织化学中 PTEN 蛋白的表达是一致的, 呈正相关($r = 0.714$, $P = 0.05$), 两者分别在结直肠癌患者血浆和组织中的表达水平明显低于健康对照组, 体现出 PTEN 基因和 PTEN 蛋白的表达水平越低、结直肠癌细胞增殖越活跃、分化程度越低, 恶性程度就越高、并伴随着淋巴结及远处器官转移(见表 1 和图 1)。因此, PTEN 基因在一定程度上反映 CRC 细胞的侵袭和转移能力等生物学行为特征。总之, 随着病情进展, 患者的生存率下降, 预示着患者预后极差, 上述研究结果与文献报道基本一致[22]。

对转染细胞的体外功能研究表明: miRNA-181 可明显影响肿瘤细胞增殖能力导致细胞周期的变化, 对肿瘤细胞的发展和进程起到促进作用[23]。Cao 等[24]报道采用双荧光素酶报告基因测试表示了 miRNA-181 能够与 3'-UTR 的 VCAM-1 结合调控白介素-17, 通过转染非小细胞肺癌 NSCLC 的细胞株, 促进了非小细胞肺癌细胞的增殖和迁移。本研究通过采用 MTT 法和细胞集落形成实验检测 miRNA-181 mimic 和 PTEN 在 CRC 细胞株 SW1116 的细胞生长和增殖能力水平, 提示了 miRNA-181 有很强的促进 CRC 细胞株 SW1116 细胞的增殖能力(如图 4), 表明 miRNA-181 高表达和 PTEN 低表达均能够明显增加肿瘤细胞的迁移, 这可能是由于 miRNA-181 高表达引起其作用于 PTEN 基因下调所致, 导致增强肿瘤细胞的侵袭和迁移能力[25]。本研究结果显示 miRNA-181 在结直肠癌患者血浆中的表达水平明显高于健康对照组; PTEN 基因在结直肠癌患者血浆中的表达水平明显低于健康对照组。两者在结直肠癌患者血浆的表达呈负相关, 表明 miRNA-181 可能在 CRC 的发展及恶化过程中发挥重要作用。

综上所述, 血浆 miRNA-181 表达水平与 CRC 病理分期有关, 是 CRC 发生发展的重要因素, 可作为一个重要的无创检测指标。miRNA-181 的作用是通过调控 PTEN 基因参与结直肠癌的发生发展、侵袭

和转移, 为 CRC 的辅助诊断提供一个检测指标, 也为结直肠癌基因治疗的一个新靶点[26]。

基金项目

广东省重大科技专项资金项目(2013A022100011), 广东省韶关市卫生计生科研项目(编号 Y19021)。

参考文献

- [1] Lindsay, C.R., Shaw, E.C., Blackhall, F., *et al.* (2018) Somatic Cancer Genetics in the UK: Real-World Data from Phase I of the Cancer Research UK Stratified Medicine Programme. *ESMO Open*, **3**, e000408. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000408>
- [2] Weinberg, B.A. and Marshall, J.L. (2019) Colon Cancer in Young Adults: Trends and Their Implications. *Current Oncology Reports*, **21**, 3. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0756-8>
- [3] Pesta, M., Kucera, R., Topolcan, O., *et al.* (2019) Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, **11**, pii: E864. <https://doi.org/10.3390/cancers11060864>
- [4] Ali Syeda, Z., Langden, S.S.S., Munkhzul, C., *et al.* (2020) Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, pii: E1723. <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>
- [5] Muhammad, S., Tang, Q., Wei, L., *et al.* (2019) miRNA-30d Serves a Critical Function in Colorectal Cancer Initiation, Progression and Invasion via Directly Targeting the GNA13 Gene. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **17**, 260-272. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6902>
- [6] Wang, W., He, Y., Rui, J., *et al.* (2019) miR-410 Acts as an Oncogene in Colorectal Cancer Cells by Targeting Dickkopf-Related Protein 1 via the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Oncology Letters*, **17**, 807-814. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9710>
- [7] Chai, C., Song, L.J., Han, S.Y., *et al.* (2018) MicroRNA-21 Promotes Glioma Cell Proliferation and Inhibits Senescence and Apoptosis by Targeting SPRY1 via the PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **24**, 369-380. <https://doi.org/10.1111/cns.12785>
- [8] Bastaminejad, S., Taherikalani, M., Ghanbari, R., *et al.* (2017) Investigation of MicroRNA-21 Expression Levels in Serum and Stool as a Potential Non-Invasive Biomarker for Diagnosis of Colorectal Cancer. *Iranian Biomedical Journal*, **21**, 106-113. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijb.21.2.106>
- [9] Sazanov, A.A., Kiselyova, E.V., Zakharenko, A.A., *et al.* (2017) Plasma and Saliva miR-21 Expression in Colorectal Cancer Patients. *Journal of Applied Genetics*, **58**, 231-237. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0379-9>
- [10] Li, Z., Wang, H., Xu, Z., *et al.* (2016) Expression and Mechanism of microRNA-181a on Incidence and Survival in Late Liver Metastases of Colorectal Cancer. *Oncology Reports*, **35**, 1403-1408. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4546>
- [11] Sun, W., Li, J., Zhou, L., *et al.* (2020) The c-Myc/miR-27b-3p/ATG10 Regulatory Axis Regulates Chemoresistance in Colorectal Cancer. *Theranostics*, **10**, 1981-1996. <https://doi.org/10.7150/thno.37621>
- [12] Ding, L., Lan, Z. and Xiong, X. (2018) The Dual Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, pii: E2791. <https://doi.org/10.3390/ijms19092791>
- [13] Pop-Bica, C., Pinteau, S. and Cojocneanu-Petric, R. (2018) MiR-181 Family-Specific Behavior in Different Cancers: A Meta-Analysis View. *Cancer and Metastasis Reviews*, **37**, 17-32. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9714-9>
- [14] Peng, Q., Yao, W., Yu, C., *et al.* (2019) Identification of microRNA-181 as a Promising Biomarker for Predicting the Poor Survival in Colorectal Cancer. *Cancer Medicine*, **8**, 5995-6009. <https://doi.org/10.1002/cam4.2520>
- [15] Gao, G., Bian, Y., Qian, H., *et al.* (2018) Gambogic Acid Regulates the Migration and Invasion of Colorectal Cancer via microRNA-21-Mediated Activation of Phosphatase and Tensin Homolog. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **16**, 1758-1765. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6421>
- [16] Jiang, C., Fang, X., Zhang, H., *et al.* (2017) Triptolide Inhibits the Growth of Osteosarcoma by Regulating microRNA-181a via Targeting PTEN Gene *in Vivo* and *in Vitro*. *Tumor Biology*, **39**, 1010428317697556. <https://doi.org/10.1177/1010428317697556>
- [17] Qin, Y., Huo, Z., Song, X., *et al.* (2018) miRNA-106a Regulates Cell Proliferation and Apoptosis of Colon Cancer Cells through Targeting the PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Oncology Letters*, **15**, 3197-3201. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7715>
- [18] Rebersek, M., Mesti, T., Boc, M., *et al.* (2019) Molecular Biomarkers and Histological Parameters Impact on Survival and Response to First-Line Systemic Therapy of Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Radiology and Oncology*, **53**, 85-95. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0013>
- [19] Kotelevets, L., Scott, M.G.H. and Chastre, E. (2018) Targeting PTEN in Colorectal Cancers. *Advances in Experimental*

Medicine and Biology, **1110**, 55-73. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02771-1_5

- [20] Lu, H., Yao, B., Wen, X., *et al.* (2019) FBXW7 Circular RNA Regulates Proliferation, Migration and Invasion of Colorectal Carcinoma through NEK2, mTOR, and PTEN Signaling Pathways *in Vitro* and *in Vivo*. *BMC Cancer*, **19**, Article No. 918. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6028-z>
- [21] Salvatore, L., Ceglie, M.A., Loupakis, F., *et al.* (2019) PTEN in Colorectal Cancer: Shedding Light on Its Role as Predictor and Target. *Cancers (Basel)*, **11**, pii: E1765. <https://doi.org/10.3390/cancers11111765>
- [22] Zhang, X., Li, X., Tan, F., *et al.* (2017) STAT1 Inhibits MiR-181a Expression to Suppress Colorectal Cancer Cell Proliferation through PTEN/Akt. *Journal of Cellular Biochemistry*, **118**, 3435-3443. <https://doi.org/10.1002/jcb.26000>
- [23] Yang, L., Ma, Y., Xin, Y., *et al.* (2018) Role of the microRNA 181 Family in Glioma Development. *Molecular Medicine Reports*, **17**, 322-329. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7895>
- [24] Cao, Y., Zhao, D. and Li, P. (2017) MicroRNA-181a-5p Impedes IL-17-Induced Non-small Cell Lung Cancer Proliferation and Migration through Targeting VCAM-1. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **42**, 346-356. <https://doi.org/10.1159/000477389>
- [25] Liu, J., Ke, F., Chen, T., *et al.* (2020) MicroRNAs That Regulate PTEN as Potential Biomarkers in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **146**, 809-820.
- [26] Wu, Y., Song, Y., Xiong, Y., *et al.* (2017) MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **43**, 945-958. <https://doi.org/10.1159/000481648>