

miR-548e-3p 在结直肠癌中的表达及意义

台维龙¹ 曹宇生¹ 梁浩源¹ 黄许森^{2(通讯作者)}

(1.右江民族医学院 广西百色 533000;

2.右江民族医学院附属医院 胃肠外科 广西百色市 533000)

【摘要】目的:利用生物信息学研究miR-548E-3p的差异,并利用实验验证miRNA在结直肠癌中的作用。方法:利用癌症基因组图谱数据库(The Cancer Genome Atlas, TCGA)下载结直肠癌的miRNA数据,并利用limma R包筛选mir-548e-3p在结直肠癌中的表达情况。通过转染miR-548e-3p抑制物48小时后提取蛋白样本,利用western blot实验检测抑制物组和对照组中E钙黏蛋白以及N钙黏蛋白的水平变化;通过转染6小时后将SW620以及HCT116细胞消化转移至划痕小室中,待继续转染24小时后观察细胞之间的距离变化。本研究还检测7例结直肠癌患者的癌和远端正常组织之间miR-548e-3p的表达。结果:mir-548e-3p在TCGA结直肠癌中高表达。在抑制物组检测E钙黏蛋白的表达水平高于正常对照组,且N钙黏蛋白表达水平低于正常对照组。抑制物组的细胞迁移速度明显低于正常对照组。患者癌组织的miR-548e-3p的表达水平明显高于正常肠道组织。结论:mir-548e-3p在结直肠癌中发挥致癌作用,其检测有利于判断结直肠癌的迁移和侵袭能力。

【关键词】miRNA;结直肠癌;E钙黏蛋白;N钙黏蛋白

Expression and significance of miR-548e-3p in colorectal cancer

Tai Weilong 1 Cao Yusheng 1 Liang Haoyuan 1, Huang Xusen 2 (corresponding author)

(1. Youjiang Medical College for Nationalities, Guangxi Baise 533000

2. Department of gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise City, Guangxi 533000)

[Abstract] Objective: To study the difference of miR-548E-3p and to verify the role of miRNA in colorectal cancer. Methods: The miRNA data of colorectal cancer was downloaded using the Cancer Genome Atlas database (The Cancer Genome Atlas, TCGA) and the expression of mir-548e-3p in colorectal cancer was screened using the limma R package. Protein samples were extracted 48 hours after transfection of miR-548e-3p inhibitor, including the levels of E cadherin and N; SW 620 and HCT116 cells were transferred to the nick compartment 6 hours after transfection, and the distance between cells was observed 24 hours after further transfection. This study also examined the expression of miR-548e-3p between carcinoma and distal normal tissues from seven colorectal cancer patients. Results: mir-548e-3p was highly expressed in TCGA colorectal cancer. The expression level of E cadherin was higher than that of the inhibitor group, and N cadherin was lower than that of normal controls. The cell migration speed of the inhibitor group was significantly lower than that in the normal control group. The expression level of miR-548e-3p in patient cancer tissue was significantly higher than that in normal intestinal tissue. Conclusion: mir-548e-3p plays an oncogenic role in colorectal cancer, and its detection is beneficial to determine the migration and invasion ability of colorectal cancer.

[Key words]: MiRNA; colorectal cancer; E cadherin; N cadherin

1.引言

2020年,中国的结直肠癌死亡人数为286162例,占比30.60%^[1]。同时,在中国的结直肠癌的发病率也较高,仅次于食管癌和胃癌在消化道肿瘤的发病率^[2]。由于结直肠癌早期由于症状不明显,通常为腹痛、大便性状的改变等^[3]。据统计,在中国2012年到2015年这四年期间确诊的结直肠癌患者的5年生存率仅为56.9%^[4]。我国结直肠癌年龄标化发病率(世界标准人口)已达23.7/10万,其中男性发病率为28.1/10万,女性为19.4/10万^[2,5]。

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类由内源基因编码的,长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子,它们是基因表达的转录后调控因子^[6]。单个miRNA已被证明可以调节多个基因的表达,同时,单个基因的表达也可以被多个miRNA调控^[7]。因此,自20多年前被发现以来,miRNA已被确认为是与正常生理和疾病,例如癌症、肌肉疾病和神经变性疾病等疾病的发病机制相关的,其还是复杂生物过程中的关键调控因子^[8]。

2.方法

2.1 TCGA数据库下载miRNA数据集

TCGA数据库是免费的癌症研究参考数据库。通过TCGA数据库中下载结直肠癌的miRNA数据,利用limma R包筛选mir-548e-3p在结直肠癌中的表达情况。

2.2 检测miR-548e-3p模拟物和抑制物在结直肠癌细胞系中的表现

我们待细胞代数5代的SW620和HCT116细胞系长到70%左右利用赛默飞转染试剂Lip3000进行转染miR-548e-3p的模拟物和抑制物,待转染24小时后进行提取细胞RNA,利用茎环法进行逆转录,随即进行QPCR检测miR-548e-3p转染效率。

2.3 转染miR-548e-3p抑制物后结直肠癌细胞系的迁移实验

利用miR-548e-3p抑制物转染SW620和HCT116细胞系,待转染细胞长至90%后利用胰蛋白酶消化 3×10^5 个/ml后往划痕插件的每个孔中加入70ul细胞悬液,此过程中避免摇晃,防止细胞分布不均。将细胞在37度和5%CO₂下孵育至少24小时直到细胞在划痕插件的每个孔中长满后用镊子拔除插件,继续培养24小时后检测迁移距离。

2.4 western blot

利用 miR-548e-3p 抑制物转染 SW620 和 HCT116 细胞系, 随即转染 48 小时后利用裂解液提取细胞蛋白进行 western blot 检测 E 钙粘蛋白和 N 钙粘蛋白的表达情况。

2.5 RT-qPCR 检测临床患者癌和癌旁之间 miR-548e-3p 的差异

我们利用收集于自 2022 年 5 月到 2022 年 12 月期间收集于右江民族医学院附属医院的 7 例结直肠癌患者的癌组织标本, 远端正常肠道组织标本 (此次研究已经获得右江民族医学院伦理委员会的批准, 编号为 2023011601)。利用 Trizol 提取并且测量组织 RNA 浓度。

我们使用 miR-548e-3p 和其内参照引物 U6 的上下游引物设计均采用“茎环法”, 其引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。引物序列如下:

miR-548e-3p: F: ACTCCGGAAAAAAGTACTGAGACTAC
R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT
U6: F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
R: CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT

随即利用茎环法对提取的组织总 RNA 提取 miRNA, 利用 qPCR 进行组织 miRNA 的检测。

3.结果

3.1 检测转染效率

利用 limma R 包, 发现 miR-548e-3p 在结直肠癌中高表达 (图 1 A)。通过 RT-qPCR 检测转染模拟物和抑制物后的效率, 发现模拟物转染 miR-548e-3p 后的过表达效率不高, 考虑是因为 miR-548e-3p 在结直肠癌中的表达情况, 反而转染 miR-548e-3p 抑制物后, miR-548e-3p 的抑制效率达到 80% (图 1 B)。且通过 RT-qPCR 发现转染模拟物后, E 钙粘蛋白表达水平下降, 而转染抑制物后 E 钙粘蛋白表达水平明显升高, 这点考虑依旧是和 miR-548e-3p 在结直肠癌中高表达相关 (图 1 C)。

3.2 划痕实验结果

我们发现在转染 miR-548e-3p 抑制物后发现在 SW620 细胞系和 HCT116 细胞系中都发现细胞迁移的距离小于正常对照组 (图 1 D)。

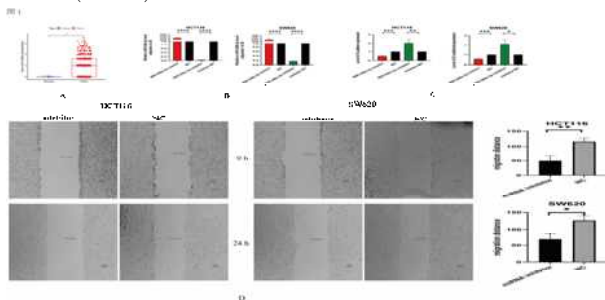


图 1 A: TCGA 数据库中 miR-548e-3p 的表达情况; B: miR-548e-3p 的转染效率检测; C: E 钙粘蛋白 rt-qpcr 检测; D: 迁移实验

3.3 Western blot 实验结果

在转染 miR-548e-3p 抑制物 48 小时后, 提取 SW620

细胞系和 HCT16 细胞系中的细胞蛋白后进行 western blot 实验都发现 E 钙粘蛋白表达情况在添加 miR-548e-3p 抑制物组中均升高, 且 N 钙粘蛋白的表达情况均少于正常对照组 (图 2 A)。

3.4 结直肠癌患者 miR-548e-3p 结果

我们通过 RT-qPCR 检测 7 名结直肠癌患者中 miR-548e-3p 的表达情况, 我们发现癌组织中的 miR-548e-3p 高于正常肠道组织 (图 2 B)。

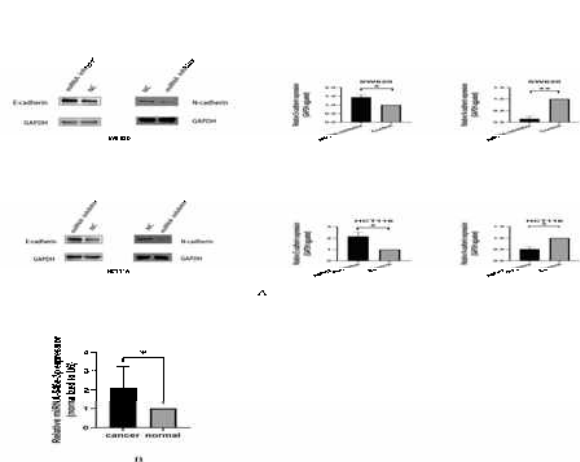


图 2 A: WB 检测 E, N 钙粘蛋白变化; B: 患者癌和远端正常肠道组织中 miR-548e-3p 的表达水平变化

4.讨论

全球结直肠癌总体发病率已经升至第三位, 2020 年全球新发 193 万例。2020 年, 肺癌仍是导致癌症死亡的首要原因, 约占癌症总死亡人数的 18%, 其次是结直肠癌、肝癌、胃癌、女性乳腺癌、食管癌、胰腺癌、前列腺癌、宫颈癌和白白血病。这 10 种癌症导致的死亡, 占到了癌症总死亡人数的 70% 以上。结直肠癌已经升至全球癌症死亡原因的第二位, 2020 年因结直肠癌死亡人数达 93 万例。中国结直肠癌发病率跃居第二位, 2020 年, 中国新发癌症病例约 457 万, 最常见的是肺癌。而结直肠癌是一种在任何年龄都可发病, 源于结肠和直肠的癌症。其发病隐秘, 症状早期多为大便秘性状改变, 腹痛等。目前筛查方法包括: 粪便隐血试验 (FOBT)^[9, 10]; 粪便 DNA 检测^[11]; 结肠镜检查^[12-14]; 其他筛查方法还包括乙状结肠镜筛查、结肠 CT 成像技术、结肠胶囊内筛查等^[15, 16]。

最近, microRNA (miRNA) 已经成为一种新型的癌症特异性生物标志物。miRNA 是较小 (约 22 bp) 的高度保守非编码 RNA^[17]。miRNA 可以由细胞分泌, 在多种体液, 包括血液、唾液和尿液中均可发现 miRNA 的表达, 并且在体液中 miRNA 是可定量的且非常稳定^[18]。MiRNA 作为非侵入性生物标志物正成为包括癌症在内几乎所有人类疾病的理想候选生物标志物^[19, 20], 众多研究揭示 miRNA 可用作诊断和监测疾病^[21]。MiRNA 除了可以提供早期检测肿瘤的发生, 其还与肿瘤的发生、发展密切相关^[22]。MiRNA 在多种肿瘤中异常表达, 目前有研究提示 BACH1 是结直肠癌细胞

miR-330 的潜在下游靶点, miR-330 通过抑制 BACH1 的表达抑制结直肠癌细胞的增殖以及转录后水平^[23]。还与研究表明 miR-519D 和 miR-328-3P 通过直接靶向一个共同的靶点 Ki-67 在乳腺癌中发挥组合抗癌作用, 提示这两种 miRNAs

可能具有成为新型治疗药物的潜力^[24]。

我们经过研究发现一种新的 miRNA 影响结直肠癌的侵袭和转移。但是本研究的不足是 miR-548e-3p 影响结直肠癌侵袭转移的具体机制通路还未清楚。

参考文献:

- [1]CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-91.
- [2]ZHOU J, ZHENG R, ZHANG S, et al. Colorectal cancer burden and trends: Comparison between China and major burden countries in the world [J]. *Chin J Cancer Res*, 2021, 33(1): 1-10.
- [3]JAHANAFROOZ Z, MOSAFER J, AKBARI M, et al. Colon cancer therapy by focusing on colon cancer stem cells and their tumor microenvironment [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4153-66.
- [4]ZENG H, CHEN W, ZHENG R, et al. Changing cancer survival in China during 2003 - 15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *The Lancet Global Health*, 2018, 6(5): e555-e67.
- [5]ARNOLD M, SIERRA M S, LAVERSANNE M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality [J]. *Gut*, 2017, 66(4): 683-91.
- [6]GEBERT L F R, MACRAE I J. Regulation of microRNA function in animals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 21-37.
- [7]FUJIWARA T, YADA T. miRNA-target prediction based on transcriptional regulation [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14 Suppl 2(Suppl 2): S3.
- [8]CHEN X, ZHANG D H, YOU Z H. A heterogeneous label propagation approach to explore the potential associations between miRNA and disease [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 348.
- [9]FORCE U S P S T, BIBBINS-DOMINGO K, GROSSMAN D C, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement [J]. *JAMA*, 2016, 315(23): 2564-75.
- [10]JESS T. Thiopurines for inflammatory bowel disease: time to engage with dermatologists? [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1549-51.
- [11]LADABAUM U, MANNALITHARA A. 860 Cost-Effectiveness of Colorectal Cancer (CRC) Screening With a Multitarget Stool DNA Assay (FIT-DNA) vs. Fecal Immunochemical Testing (FIT) or Colonoscopy [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): S184-S5.
- [12]SHAUKAT A, RECTOR T S, CHURCH T R, et al. Longer Withdrawal Time Is Associated With a Reduced Incidence of Interval Cancer After Screening Colonoscopy [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(4): 952-7.
- [13]INADOMI J M, SOMSOUK M A. Will virtual colonoscopy replace optical colonoscopy for colorectal cancer screening? [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(4): 1384-5; discussion 5-6.
- [14]RUTTER M D, BEINTARIS I, VALORI R, et al. World Endoscopy Organization Consensus Statements on Post-Colonoscopy and Post-Imaging Colorectal Cancer [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 909-25 e3.
- [15]NERAD E, LAHAYE M J, MAAS M, et al. Diagnostic Accuracy of CT for Local Staging of Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2016, 207(5): 984-95.
- [16]LABIANCA R, NORDLINGER B, BERETTA G D, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24 Suppl 6: vi64-72.
- [17]JORGE A L, PEREIRA E R, OLIVEIRA C S, et al. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer [J]. *Einstein (Sao Paulo)*, 2021, 19: eRB5996.
- [18]WAN G, LIM Q E, TOO H P. High-performance quantification of mature microRNAs by real-time RT-PCR using deoxyuridine-incorporated oligonucleotides and hemi-nested primers [J]. *RNA*, 2010, 16(7): 1436-45.
- [19]SCHWARZENBACH H, NISHIDA N, CALIN G A, et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3): 145-56.
- [20]SHI H, XU J, ZHANG G, et al. Walking the interactome to identify human miRNA-disease associations through the functional link between miRNA targets and disease genes [J]. *BMC Syst Biol*, 2013, 7: 101.
- [21]KAWAGUCHI T, KOMATSU S, ICHIKAWA D, et al. Circulating MicroRNAs: A Next-Generation Clinical Biomarker for Digestive System Cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9).
- [22]LIZ J, ESTELLER M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(1): 169-76.
- [23]SHIRJANG S, MANSOORI B, MOHAMMADI A, et al. miR-330 Regulates Colorectal Cancer Oncogenesis by Targeting BACH1 [J]. *Adv Pharm Bull*, 2020, 10(3): 444-51.
- [24]MA H, LIU T, XU Y, et al. MiR-519d and miR-328-3p Combinatorially Suppress Breast Cancer Progression [J]. *Oncol Targets Ther*, 2020, 13: 12987-97.