

结直肠癌组织 miR34a 启动子区甲基化状态的临床意义探讨

袁航 屠世良

【摘要】目的 探讨结直肠癌组织 miR34a 启动子区甲基化状态的临床意义。方法 收集 48 例行根治性切除术的结直肠癌患者的癌组织及癌旁正常组织,采用甲基化特异性 PCR(MSP)法检测 miR-34a 启动子区 CpG 岛甲基化状态,分析其与患者临床特征及预后的关系。结果 结直肠癌组织与癌旁正常组织中 miR-34a 启动子区甲基化率分别为 47.9%、43.8%,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结直肠癌组织 miR-34a 启动子区甲基化状态与患者性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤最大直径、远处转移等均无关(均 $P > 0.05$);与淋巴结转移、TNM 分期等均有关(均 $P < 0.05$)。结直肠癌组织 miR-34a 启动子区甲基化患者总生存率、无病生存率均低于非甲基化患者(均 $P < 0.05$)。远处转移是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素($P < 0.05$),但 miR-34a 启动子区甲基化状态不是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素($P > 0.05$)。结论 结直肠癌组织 miR-34a 启动子区甲基化状态与患者淋巴结转移、TNM 分期及预后有关,可能参与肿瘤进展转移过程的调控。

【关键词】结直肠癌 miR-34a 启动子区 CpG 岛 甲基化

Clinical significance of miR-34a promoter methylation status in colorectal cancer YUAN Hang, TU Shiliang, Department of Coloproctologic Surgery, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China

【Abstract】Objective To investigate the clinical significance of miR-34a promoter methylation status in colorectal cancer. Methods Methylation-specific polymerase chain reaction(MSP) was used to detect the methylation level of CpG island in the promoter region of miR-34a in colorectal cancer and adjacent tissues of 48 patients who underwent radical resection in our hospital. The correlation between the methylation level and clinical characteristics and prognosis was analyzed. Results The methylation rates of the promoter of miR-34a in colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues were 47.9% and 43.8% respectively ($P > 0.05$). The methylation status was not related to age, sex, location of tumors, maximum diameter of tumors and distant metastasis (all $P > 0.05$), while was correlated with lymph node metastasis and TNM staging (both $P < 0.05$). The overall survival (OS) rate and disease-free survival (DFS) rate of patients with methylation were lower than those of patients with non-methylation(both $P < 0.05$). Distant metastasis was an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer ($P < 0.05$), but the methylation status of miR-34a was not($P > 0.05$). Conclusion The CpG methylation of miR-34a is associated with lymph node metastasis, the staging and the prognosis of colorectal cancer patients. It may be involved in the regulation of the progression and metastasis of colorectal cancer.

【Key words】Colorectal cancer miR-34a Promoter CpG island Methylation

结直肠癌是常见、多发的恶性肿瘤之一。近年来,总发病率呈明显递增趋势。一项流行病学调查报告显示,结直肠癌发病率位居所有肿瘤的第 5 位,5 年生存率较低^[1]。因此,早期发现并给予个体化综合治疗具有重要意义^[2]。microRNA(以下简称 miRNA)是一类 20~25 个碱基的小

分子非编码 RNA,广泛存在于真核生物中。目前发现 miRNA 异常表达与肿瘤的发生、发展有着密切关系。关于 miRNA 的作用机制研究成为当前肿瘤发生机制研究的热点。与其他基因一样,肿瘤细胞中 miRNA 的表达受到包括 DNA 甲基化修饰在内的表观修饰等多种机制的调控,且在多种肿瘤中 miRNA 基因甲基化状态的改变与肿瘤临床表型及预后有关。由于不同组织来源的肿瘤存在特征性的 miRNA 表达谱,其甲基化状态也存在特异性^[3]。目前关于结直肠癌中相关 miRNA 的 CpG 岛甲基化状态的研究仍较为少见。miR-34a 是近年来发现的、具有抑癌基因样功能的重要调控因子^[4]。有研究对结直肠癌组织中

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.18.2019-1995

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2014KYA024)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院(杭州医学院附属人民医院)肛肠外科

通信作者:屠世良,E-mail:yuanhang1981@126.com

表达有差异的 miRNA 基因进行生物信息学分析,结果发现 miR-34a 的启动子区域或周围有 CpG 岛^[9]。本研究对结直肠癌组织 miR-34a 启动子区 CpG 岛甲基化状态的临床意义作一探讨,现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2011 年 7 月至 2012 年 7 月在本院行根治性切除术的 48 例结直肠癌患者为研究对象,收集其结直肠癌组织及癌旁 5cm 以上的正常黏膜组织。其中男 28 例,女 20 例;年龄 29~75[62.5(54.3,72.0)]岁。所有患者术前未行放化疗;其病理诊断经 2 位病理科医生独立诊断明确,病理分期依据美国国立综合癌症网络指南公布的 TNM 分期标准。本研究经医院医学伦理委员会审查通过,所有患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 结直肠癌组织及癌旁正常组织离体后尽快分块,每块 150~200mg,液氮冷冻后置-80℃冰箱内备用。按照组织 DNA 抽提试剂盒说明书(北京天根生化公司)抽提结直肠组织基因组 DNA,并测定浓度。

1.2.2 miR34-a 启动子区甲基化检测 采用甲基化特异性 PCR(MSP)法。通过在线 Meth-Primer 软件(<http://www.urogene.org/methprimer/>)设计甲基化、非甲基化序列的引物(其信息见表 1^[9]),以亚硫酸氢钠修饰后的 DNA 为模板进行 PCR 扩增:95℃预变性 10min,94℃ 15s,共 40 个循环;55℃ 30s,72℃ 40s,再 72℃延伸 10min。非甲基化扩增体系的退火温度提高至 56℃,其他步骤相同。扩增产物为 2.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外光照射显带。RT-PCR:取 1~2μl 甲基化修饰型 DNA 进行 PCR,扩增产物为 2.5%琼脂糖凝胶电泳,然后紫外光照射显带,确定与引物互补的 DNA 序列甲基化状态。对 PCR 产物进行电泳,并根据电泳条带情况进行判定:(1)甲基化特异性引物扩增出目的条带,而非甲基化特异性引物未扩增出条带,为甲基化;(2)非甲基化特异性引物扩增出目的条带,而甲基化引物未扩增出条带,为非甲基化;(2)对引物均能扩增出目的条带的半甲基化,判断为甲基化。

表 1 miR-34a 甲基化引物信息

miR-34a 基因状态	序列	产物 长度(bp)
甲基化	上游:5'-GAGTTTGTAAATTGTGAGTGTGC-3' 下游:5'-CATTATAAATCCCAACCAATACG-3'	198
非甲基化	上游:5'-AGTTTGTAAATTGTGAGTGTGTGA-3' 下游:5'-ACCAATTATAAATCCCAACCAATACA-3'	199

1.3 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件。计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用 log-rank 法比较不同 miR-34a 启动子区甲基化状态的结直肠癌患者总生存率、无病生存率。结直肠癌预后危险因素的分析采用 Cox 比例风险回归模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织与癌旁正常组织中 miR34-a 启动子区甲基化率比较 结直肠癌组织与癌旁正常组织中 miR34-a 启动子区甲基化率分别为 47.9%(23/48)、43.8%(21/48),差异无统计学意义($P > 0.05$),检测所得电泳图见图 1。

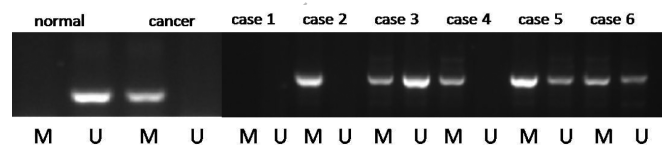


图 1 结直肠癌组织与癌旁正常组织中 miR34-a 启动子区甲基化状态检测电泳图(M:甲基化;U:非甲基化)

2.2 结直肠癌组织 miR34a 启动子区甲基化状态与患者临床特征的关系 结直肠癌组织 miR34a 启动子区甲基化状态与患者性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤最大直径、远处转移等无关,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与淋巴结转移、TNM 分期等有关,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 2。

2.3 结直肠癌组织 miR34a 启动子区甲基化与患者预后的关系 本组患者随访时间 15~100[52(42,79)]个月。23 例结直肠癌组织甲基化患者 1、3、5 年生存率分别为 100.0%、69.6%和 34.8%,25 例非甲基化患者 1、3、5 年生存率分别为 100.00%、88.0%和 72.0%。甲基化患者总生存率、无病生存率均低于非甲基化患者,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 2-3。

2.4 结直肠癌预后危险因素分析 经单因素分析发现,肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移、远处转移、miR-34a 启动子区甲基化状态与患者预后有关,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);性别、年龄、肿瘤最大直径、病理组织学类型、分化程度、浸润深度与预后均无关,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。将上述单因素分析结果 $P < 0.05$ 的因素纳入 Cox 比例风险回归模型分析,结果显示远处转移是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素($P < 0.05$),miR-34a 启动子区甲基化状态不是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素($P > 0.05$),见表 3。

表 2 结直肠癌组织 miR34a 启动子区甲基化状态与患者临床特征的关系[例(%)]

临床特征	n	甲基化 (n=23)	非甲基化 (n=25)	χ^2/t 值	P 值
性别					
男	28	16(57.1)	12(42.9)	2.292	>0.05
女	20	7(35)	13(65)		
年龄					
≤60 岁	16	6(37.5)	10(62.5)	1.043	>0.05
>60 岁	32	17(53.1)	15(46.9)		
肿瘤位置					
右半结肠	14	6(42.9)	8(57.1)	0.203	>0.05
左半结肠及直肠	34	17(50.0)	17(50.0)		
肿瘤最大直径					
<3cm	11	4(36.4)	7(63.6)	0.763	>0.05
≥3cm	37	19(51.4)	18(48.6)		
淋巴结转移					
有	18	12(66.7)	6(33.3)	4.057	<0.05
无	30	11(36.7)	19(63.3)		
TNM 分期					
I~II 期	29	10(34.5)	19(65.5)	5.298	<0.05
III~IV 期	19	13(68.4)	6(31.6)		
远处转移					
有	4	3(75.0)	1(25.0)	0.372*	>0.05
无	44	20(45.5)	24(54.5)		

注:*采用连续性 χ^2 检验

表 3 结直肠癌预后危险因素的 Cox 比例风险回归模型分析

项目	β	标准误	P 值	RR 值	95%CI
淋巴结转移	8.842	105.035	0.933	6918.453	0.000~1.763
TNM 分期	-7.915	105.035	0.940	0.000	0.000~9.304
远处转移	3.666	1.152	0.001	39.113	4.089~374.136
miR34a 启动子 区甲基化状态	1.100	0.593	0.064	3.005	0.939~9.613

3 讨论

miRNA 主要通过促进靶 mRNA 的降解或抑制其翻译过程来发挥调控作用,广泛参与细胞增殖、凋亡、代谢及分化等过程。Monzo 等^[9]首次研究表明,结直肠癌及腺瘤性息肉组织中 miR-143、miR-145 表达明显下调,并提出结直肠癌组织中存在特异性 miRNA 表达谱。随后,结直肠癌组织特异性 miRNA 表达谱的测定以及其与患者临床特征的关系成为研究热点。miR-34a 位于人染色体 1p36.23,该位点多伴随着多个基因的缺失或突变,与肿瘤的发生密切相关。在乳腺癌、肺癌组织中,miR-34a 表达常下降或缺失;但关于其在结直肠癌组织中的表达情况,各研究结果尚不统一^[4,7-9]。最近研究发现,miR-34a

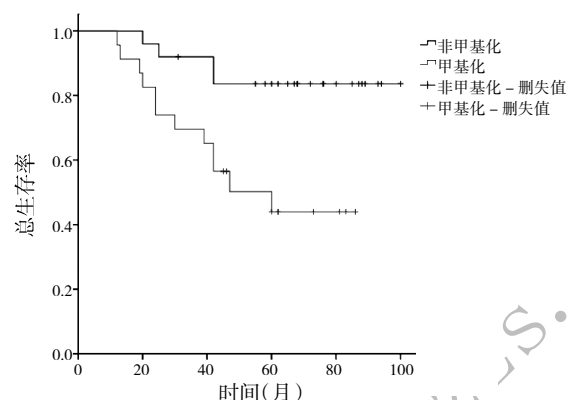


图 2 结直肠癌组织 miR34a 启动子区甲基化与非甲基化患者总生存率的曲线

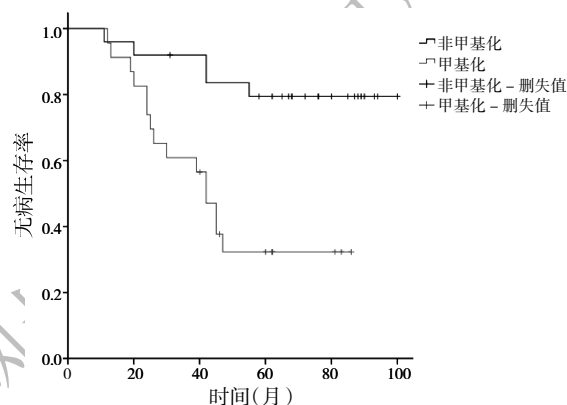


图 3 结直肠癌组织 miR34a 启动子区甲基化与非甲基化患者无病生存率的曲线

在其启动子区具有 p53 蛋白结合位点,是 p53 直接下游靶基因,受 p53 激活转录,通过调控细胞周期相关蛋白(cyclinE2、cdk6 等)的表达,使细胞周期阻滞于 G1 期,或通过抑制下游 BCL-2 靶基因来诱导细胞的凋亡^[10]。Hiroshi 等^[9]在大肠癌细胞系 HCT116 和 RKO 中,观察到 miR-34a 有抑制肿瘤细胞增殖的作用。

甲基化是表观遗传修饰的主要方式之一。DNA 甲基化在调控细胞正常发育、基因表达模式及基因组的稳定性中起着重要作用。DNA 甲基化主要发生于 CpG 二核苷酸的胞嘧啶上。这些常在基因上游调控区的启动子区高度聚集的 CpG 二核苷酸,称为 CpG 岛。在人类许多肿瘤中,都能发现不同程度的 CpG 岛异常甲基化现象,表现为基因组整体甲基化下调,抑癌基因调控区域甲基化上调^[11]。本研究检测结果发现,部分患者结直肠癌组织 miR-34a 甲基化较高,但与癌旁正常组织比较差异无统计学意义,可能与本研究样本量较小有关。进一步研究发现,结直肠癌组织中 miR-34a 基因 CpG 岛甲基化状态与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移等有关,与患者预后无关。甲基化状态与预后呈相关性,提示甲基化状态的改变可能参与肿瘤增殖转移过程,并影响预后。DNA 甲基化修饰

可能调控肿瘤细胞中相关 miRNA 的表达。Satio 等^[12]较早发现 DNA 甲基化可能会影响 miRNA 的表达,同时指出 DNA 甲基化和组蛋白修饰调控 miR-127 的表达,且甲基化与组蛋白修饰间存在一定的协同作用;miRNA 不仅参与表观遗传的调控(DNA 甲基化),还受到 DNA 甲基化等表观遗传影响。有研究报道 miR-34a 在宫颈癌、食管癌、肝癌等多种肿瘤组织中呈 CpG 岛高甲基化状态,且高甲基化所致的表达沉默或下调可能导致下游靶标增殖或凋亡相关癌蛋白高表达,从而促进肿瘤的发生、发展^[5,13-16]。有研究在结直肠癌中也发现了一些相关 miRNA 存在甲基化调节机制^[17]。某研究表明,结直肠癌中 miR-34a 低表达者,其启动子区甲基化水平较高,两者呈负相关^[18]。本研究 Cox 比例风险回归模型分析结果显示,仅远处转移是预后的独立预测因子,miR-34a 启动子区 CpG 岛甲基化状态尚不能作为独立预测因子;这可能与样本量较小有关,也可能是 miR-34a 与下游靶分子形成交叉网络作用,而非独立作用。以上猜想仍需后续机制研究进一步验证。

综上所述,miR-34a 启动子区甲基化状态与结直肠癌患者淋巴结转移、TNM 分期及预后有关,可能参与肿瘤进展转移过程的调控。

4 参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.DOI:10.3322/caac.21338.
- [2] 王锡山. 中美结直肠癌流行病学特征及防治策略的对比分析[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2017, 6(6):447-453.DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2017.06.002.
- [3] 殷子惠, 马力文. MicroRNA 及其基因甲基化在结直肠癌的临床应用研究进展[J]. 癌症进展, 2014, 12(2):149-153.DOI:10.11877/j.issn.1672-1535.2014.12.02.10.
- [4] 田智丹, 任勇亚, 戚晓红, 等. miR-34a 在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(4):347-350.DOI:10.3969/j.issn.1001-7399.2011.04.002.
- [5] 胡华梅. 食管癌相关 miRNA 基因 DNA 甲基化状态的初步研究[D]. 第三军医大学, 2010.
- [6] Monzo M, Navarro A, Bandres E, et al. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer[J]. Cell Research, 2008, 18(8):823.DOI:10.1038/cr.2008.81.
- [7] Bommer GT, Isabelle G, Ying F, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes[J]. Current Biology, 2007, 17(15):1298-1307.DOI:10.1016/j.cub.2007.06.068.
- [8] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis[J]. Molecular Cell, 2007, 26(5):745-752.DOI:10.1016/j.molcel.2007.05.010.
- [9] Hiroshi T, Naoto T, Masashi I, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(39):15472-15477.DOI:10.1016/j.molcel.2007.05.010.
- [10] He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network[J]. Cancer Research, 2007, 67(23):11099-11101.DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-2672.
- [11] Shen R, Pan S, Qi S, et al. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 in gastric cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394 (4):1047-1052. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.03.121.
- [12] Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells[J]. Cancer Cell, 2006, 9(6):435-443.DOI:10.1016/j.ccr.2006.04.020.
- [13] Dmitri L, Valery T, Alexey E, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer[J]. Cell Cycle, 2008, 7(16):2591-2600.DOI:10.4161/cc.7.16.6533.
- [14] 邵佳, 何爱琴, 张玉泉, 等. miRNA-34 甲基化与卵巢癌临床病理特征及预后的关系[J]. 江苏大学学报(医学版), 2014, 24(6):513-516. DOI:10.13312/j.issn.1671-7783.y140255.
- [15] 胡芝, 胡飞红, 许践刚, 等. 启动子甲基化下调宫颈鳞癌组织 miR-34a 表达[J]. 温州医科大学学报, 2013, 43(5):311-314. DOI:10.3969/j.issn.1000-2138.2013.05.08.
- [16] 林兰, 刘继斌. 肝癌中 CpG 甲基化与 microRNA-34 沉默的研究[J]. 肿瘤基础与临床, 2017, 30(1):19-22.DOI:10.3969/j.issn.1673-5412.2017.01.005.
- [17] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043):834-838.DOI:10.1038/nature03702.
- [18] Siemens H, Neumann J, Jackstadt R, et al. Detection of miR-34a Promoter Methylation in Combination with Elevated Expression of c-Met and β -Catenin Predicts Distant Metastasis of Colon Cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2013, 19(3):710-720.DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-1703.

(收稿日期:2019-07-04)

(本文编辑:陈丹)