文章编号:1000-5404(2014)23-2377-03

论著

# Ascl2和microRNA-200家族在结肠癌组织和癌旁组织中的定量表达及二者的相关性分析

李姗姗,钟小莉,尚阳阳,潘 琼,叶 钧,汪荣泉 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 探讨Ascl2与MicroRNA-200家族在结肠癌(colorectal cancer,CRC)组织及癌旁组织中的表达及二者的相关性。**方法** 采用实时定量PCR检测50例结肠癌患者的结直肠癌组织及其癌旁组织中Ascl2与MicroRNA-200家族表达,用SPSS 18.0统计软件进行统计分析。**结果** Ascl2在癌组织中的表达显著高于癌旁组织($P<0.01$),除了MicroRNA-429在癌组织中的表达与癌旁组织相比无统计学差异($P=0.2139$),MicroRNA-200家族成员在癌组织中的表达都显著低于癌旁组织($P<0.05$);且Ascl2和MicroRNA-200家族成员在癌组织中表达都呈负相关($r<-0.5$,$P<0.05$)。**结论** 发现与正常结直肠黏膜组织相比,Ascl2在结直肠癌组织中表达增高,MicroRNA-200家族表达降低,它们在结直肠癌组织中的表达呈现负相关。

[关键词] 结肠癌;Ascl2;MicroRNA-200家族
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.35 [文献标志码] A

# Quantitative expression of Ascl2 and microRNA-200 in colorectal cancer and their peri-cancerous mucosa and their correlation

Li Shanshan, Zhong Xiaoli, Shang Yangyang, Pan Qiong, Ye Jun, Wang Rongquan (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of Ascl2 and microRNA-200 family members in colorectal cancer and their peri-cancerous mucosa tissues and determine their correlations. **Methods** The expression of Ascl2 mRNA and microRNA-200 family members in 50 colorectal cancer samples and their peri-cancerous mucosa was detected by real time-PCR. Statistical analysis was performed by SPSS 18 statistical software. **Results** The mRNA expression level of Ascl2 was significantly higher in cancerous samples than the corresponding peri-cancerous mucosa ($P<0.01$), while the levels of microRNA-200 family members were significantly lower in cancerous samples than the peri-cancerous mucosa ($P<0.05$), except that no difference was found in microRNA-429 expression between the 2 tissue samples ($P=0.2139$). The expression level of Ascl2 was negatively correlated with those of microRNA-200 family members ($r<-0.5$, $P<0.05$). **Conclusion** The expression level of Ascl2 is increased, while those of microRNA-200 family members are decreased in colorectal cancer tissues when compared with the corresponding peri-cancerous tissues. And the expression levels are negatively correlated.

[**Key words**] colon cancer; Ascl2; microRNA-200 family

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81200268, 81201685). Corresponding author: Wang Rongquan, Tel: 86-23-68754124, E-mail: rongquanw@hotmail.com

Ascl2(achaete scute-like 2,Ascl2)是一个碱性/螺旋一环一螺旋转录因子,已证实其控制正常成体肠隐窝干细胞"命运"[1]。Ascl2经RNA干扰后可导致结肠癌细胞增殖能力下降及EMT逆转[2],近来多个研究发现,Ascl2作为Wnt信号的靶分子,在结肠癌细胞中高表达[3-4],过表达Ascl2可增加结肠癌患者发生肝转移的可能[5],MicroRNA-200家族包括MicroRNA-200a,MicroRNA-200b,MicroRNA-200c,MicroRNA-141和MicroRNA-429等5个成员,MicroRNA-200c调节ZEB1的表达进而调控EMT发生,从而抑制结肠癌的发生[6],MicroRNA-200家族在多种肿瘤细胞中均表达下调,抑制肿瘤细胞的侵袭及迁移[7-9],MicroRNA-200家族在肿瘤发展及胚胎发育阶段可以决定上皮及间皮间的转化[10-11],已有研究证实Ascl2和MicroRNA-200家族均与EMT的发生相关[2,5,8-9],我们前期研究已经发现在LS174T细胞中,Ascl2和MicroRNA-200家族呈负调控关系[12],但是关于其研究始终停留在细胞学水平,组织学上的研究甚少,因此,我们将通过检测Ascl2与MicroRNA-200家族在结肠癌组织和癌旁组织中的表达从而探讨Ascl2和

[基金项目] 国家自然科学基金(81200268,81201685)
[通信作者] 汪荣泉,电话:(023)68754124,E-mail:rongquanw@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1107.003.html (2014-11-06)

MicroRNA-200家族在结直肠癌组织中的表达异常及二者之间的相关性,从而提供Ascl2和MicroRNA-200家族成员之间在体联系,为Ascl2可能调控MicroRNA-200家族成员提供现实的可能依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集第三军医大学西南医院消化科内镜室和普外科2014年2月至2014年6月临床资料完整的结直肠癌标本50例(内镜下活检标本27例;手术标本23例)。其中男性23例,女性27例,平均年龄56(43~69)岁。所有病例术前皆未行放疗、化疗或其他针对肿瘤的治疗。50例正常对照的结肠组织取自上述结肠距癌缘5 cm以上,本研究得到西南医院临床医学伦理委员会的批准,并征得所有患者及其家属的知情同意。

### 1.2 结肠癌组织及其癌旁组织中RNA提取

新鲜组织标本迅速标记后放入液氮中保存。用TRIzol试剂(TaKaRa公司)提取总RNA,-80 ℃冰箱保存备用。RNA样本经测定光密度值后,得到合格的可用于检测的RNA。

### 1.3 实时定量PCR检测Ascl2 mRNA和MicroRNA-200家族成员的表达

RNA质量检测合格后,采用PrimeScript™ RT reagent Kit(TaKaRa公司提供)进行cDNA合成,所需引物如表1,Ascl2反应条件为:42 ℃,2 min;37 ℃,15 min;85 ℃,5 s,MicroRNA-200b反应条件为:42 ℃,2 min;42 ℃,40 min;85 ℃,5 s。最后采用实时定量PCR检测Ascl2 mRNA和MicroRNA-200家族成员的表达,所需引物如表1,反应条件为:95 ℃,2 min;95 ℃,5 s;60 ℃,20 s;40个循环;最后从65 ℃缓慢升温到95 ℃(每2秒升高0.5 ℃)。实验结果采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法进行分析处理,为下一步统计Ascl2和MicroRNA-200家族在结直肠癌组织和正常组织的表达及二者之间的相关性作基础。

**表1 PCR引物序列片段长度**

| | 序列 | 片段大小(bp) |
|---|---|---|
| U6 | 5′-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3′ | 23 |
| MicroRNA-200a | 5′-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGTCGGCAA TTGCACTGGATACGACACATCGT-3′ | 55 |
| MicroRNA-200b | 5′-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGTCGGCAA TTGCACTGGATACGACTCATCAT-3′ | 55 |
| MicroRNA-200c | 5′-TCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGTCGGCAA TTGCACTGGATACGACTCCATC-3′ | 53 |
| MicroRNA-141 | 5′-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGTCGGCAA TTGCACTGGATACGACCCATCT-3′ | 54 |
| MicroRNA-429 | 5′-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGTCGGCAA TTGCACTGGATACGACACGGTTT-3′ | 55 |
| U6 | 上游引物5′-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3′ | 25 |
| U6 | 下游引物5′-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3′ | 23 |
| Ascl2 | 上游引物5′-CCTTTCTCACGACCTCCTTC-3′ | 20 |
| Ascl2 | 下游引物5′-AACTGCGTACCTTGCTTTGG-3′ | 20 |
| MicroRNA-200a | 上游引物5′-GGGGTAACACTGTCTGGTAG-3′ | 20 |
| MicroRNA-200a | 下游引物5′-TGCGTGTCGTGGAGTC-3′ | 16 |
| MicroRNA-200b | 上游引物5′-GGGGTAATACTGCCTGGT-3′ | 18 |
| MicroRNA-200b | 下游引物5′-TGCGTGTCGTGGAGTC-3′ | 16 |
| MicroRNA-200c | 上游引物5′-GGTAATACTGCCGGGTAAT-3′ | 19 |
| MicroRNA-200c | 下游引物5′-CAGTGCGTGTCGTGGAGT-3′ | 18 |
| MicroRNA-141 | 上游引物5′-GGGGTAACACTGTCTGGTAA-3′ | 20 |
| MicroRNA-141 | 下游引物5′-TGCGTGTCGTGGAGTC-3′ | 16 |
| MicroRNA-429 | 上游引物5′-GGGGGTAATACTGTCTGGT-3′ | 19 |
| MicroRNA-429 | 下游引物5′-TGCGTGTCGTGGAGTC-3′ | 16 |

### 1.4 统计学处理

统计学分析以SPSS 18.0统计软件进行处理。计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用成对样本t检验分析Ascl2与MicroRNA-200家族成员在癌组织与癌旁组织间表达差异;采用相关性分析方法分析Ascl2与MicroRNA-200家族成员在癌组织中表达的相关性。

## 2 结果

### 2.1 Ascl2在结直肠癌及癌旁组织的表达

Ascl2 mRNA在癌组织的表达水平为(0.726 4±0.640 3),Ascl2 mRNA癌旁组织的表达水平为(0.099 0±0.119 6),Ascl2在结直肠癌中的表达显著高于癌旁组织($P<0.01$)。

### 2.2 MicroRNA-200家族在结直肠癌及癌旁组织的表达

MicroRNA-200a、MicroRNA-200b、MicroRNA-200c、MicroRNA-141在癌组织的表达水平分别为(0.994 0±0.612 1)、(0.751 8±0.392 6)、(1.277 8±0.814 7)和(1.084±0.715 2),在癌旁组织的表达水平分别为(1.426±1.229)、(1.399±0.859 2)、(1.748±1.411)和(1.633±1.312),它们在癌组织中的表达均明显低于正常癌旁组织($P<0.01$);MicroRNA-429在癌组织表达水平为(1.218±0.717 6),在癌旁组织的表达水平为(1.479±1.378),MicroRNA-429在癌组织与癌旁组织的表达水平无统计学差异($P>0.05$)。

### 2.3 Ascl2与MicroRNA-200家族在结直肠癌组织表达的相关性

Ascl2与MicroRNA-200a、MicroRNA-200b、MicroRNA-200c、MicroRNA-141、MicroRNA-429在癌组织中表达均呈负相关($P<0.05$),相关系数$r$分别为-0.336、-0.285、-0.304、-0.329、-0.283。

## 3 讨论

结直肠癌是胃肠道中最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在全球分别居所有恶性肿瘤的第3位和第4位,在我国其发病率也不断攀升。目前临床上主要通过内镜、B超检查、CT断层摄影磁共振成像、病理活检等一系列检查完成分期分级,手术是目前治疗结直肠癌最为有效的方法,目前尚无特殊靶向化疗药物可以对结直肠癌患者有显著疗效,而且很多患者在发现患病时已经发生了侵袭和转移,错过了手术的最佳时机。假如存在肿瘤的特异性基因标记物及基因靶点,不但可以对早期肿瘤患者进行筛查,做到最大限度的早期治疗,而且可以大大提高已经发生转移患者的生存率,这也是今后全球攻克肿瘤难题的方向。

van-der-Flier等[1]已经证实Ascl2是肠黏膜干细胞(intestinal stem cell,CBC)的命运决定分子,近来又有研究发现在人结肠癌细胞系中干扰Asc12的表达可导致细胞周期G/M期阻滞,抑制结肠癌细胞增殖[5],

我们发现干扰 Ascl2 表达后不但对结肠癌细胞的增殖产生影响,而且还影响结肠癌细胞的侵袭及迁移过程[12],在结肠癌细胞系中 Ascl2 对结肠癌的影响已经被大家认可,但是其在结肠癌患者体内是否与细胞水平一致还不是很清楚。我们的实验发现在结肠癌组织中 Ascl2 的表达显著高于正常对照组织,这一结果与之前已经在细胞水平证实的 Ascl2 在多个结肠癌细胞株高表达一致,为 Ascl2 作为治疗结直肠癌的潜在靶点提供了更有利的临床证据,为以后应用于临床提供了理论基础。

国内外多个报道 MicroRNA-200 家族低表达于多种肿瘤细胞中,可以通过调控转录抑制因子 ZEB1 和 ZEB2 进而阻止 EMT 的发生[6-9],其中很多实验还证实了 MicroRNA-200 家族在多个结肠癌细胞株中低表达,我们课题组前期也已经证实了 MicroRNA-200 家族在 LS174T 细胞中低表达,但是关于其在在体上的研究很少,我们研究发现 MicroRNA-200a、MicroRNA-200b、MicroRNA-200c、MicroRNA-141 在癌组织中的表达均明显低于正常对照组织;MicroRNA-429 在癌组织中的表达与正常对照组织无显著差异,这一结果与之前已经在分子水平证实的 MicroRNA-200 家族在多个结肠癌细胞株低表达是基本一致的,这样从临床和分子水平均证实 MicroRNA-200 家族与结肠癌的关系,对未来结直肠癌的诊断与治疗有着潜在的临床意义。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间充质细胞转化的现象。在肿瘤的进展和转移中起着重要的作用,有人发现乳腺癌细胞在获得 EMT 转化的同时,也获得了"干性"特征[9]。文献[13]报道 Ascl2 通过抑制 MicroRNA-302b 来抑制 MET 的发生,进而参与调节结肠癌前体细胞"干性",结肠癌细胞中 MicroRNA-200 家族与 EMT 的发生存在下调关系,我们前期研究发现在 LS174T 细胞中干扰 Ascl2 表达后,MicroRNA-200 家族的表达明显上调,细胞侵袭、迁移能力下降[12],之后进一步研究发现 Ascl2 与 MicroRNA-200 家族的启动子内的 E-boxes 结合,但是以上所做的研究仅停留在分子水平,缺乏在体研究依据,所以我们通过在临床收集结肠癌患者,探讨 Ascl2 与 MicroRNA-200 家族在载体水平是否也存在上述关系,我们的实验结果显示 Ascl2 与 microRNA-200a、microRNA-200b、microRNA-200c、microRNA-141、microRNA-429 在癌组织中表达均呈负相关,这与前期细胞水平的研究结果是一致的,我们就在临床上反过来证实了之前在细胞水平 Ascl2 与 MicroRNA-200 家族的调控关系,填补了其在临床上的空白。

总之,本研究阐述了 Ascl2 与 MicroRNA-200 家族在结直肠癌和癌旁组织中的差异表达及它们之间的相关性,但其具体的调控机制包括作用位点和调控通路等还不是完全清楚,对于今后应用于临床还需要更深一步的研究。

**参考文献:**

[1] van-der-Flier L G, van-Gijn M E, Hatzis P, *et al*. Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate[J]. Cell, 2009, 136(5): 903-912.

[2] 田音, 朱蓉, 汪荣泉. Ascl2 表达抑制对结肠癌细胞上皮-间质转化的影响[J]. 解放军医学杂志, 2013, 38(4): 292-296.

[3] Jubb A M, Chalasani S, Frantz G D, *et al*. Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia[J]. Oncogene, 2006, 25(24): 3445-3457.

[4] Jubb A M, Hoeflich K P, Haverty P M, *et al*. Ascl2 and 11p15.5 amplification in colorectal cancer[J]. Gut, 2011, 60(11): 1606-1607.

[5] Stange D E, Engel F, Longerich T, *et al*. Expression of an ASCL2 related stem cell signature and IGF2 in colorectal cancer liver metastases with 11p15.5 gain[J]. Gut, 2010, 59(9): 1236-1244.

[6] Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, *et al*. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis[J]. Gut, 2013, 62(9): 1315-1326.

[7] Uhlmann S, Zhang J D, Schwager A, *et al*. miR-200bc/429 cluster targets PLCgamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(30): 4297-4306.

[8] Hung C S, Liu H H, Liu J J, *et al*. MicroRNA-200a and -200b mediated hepatocellular carcinoma cell migration through the epithelial to mesenchymal transition markers[J]. Ann Surg Oneol, 2013, 20(Suppl 3): S360-S368.

[9] Elson-Schwab I, Lorentzen A, Marshall C J. MicroRNA-200 family members differentially regulate morphological plasticity and mode of melanoma cell invasion[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13176.

[10] Grassian A R, Lin F, Barrett R, *et al*. Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations promote a reversible ZEB1/microRNA (miR)-200-dependent epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J]. J Biol Chem, 2012, 287(50): 42180-42194.

[11] Xiang X, Zhuang X, Ju S, *et al*. miR-155 promotes macroscopic tumor formation yet inhibits tumor dissemination from mammary fat pads to the lung by preventing EMT[J]. Oncogene, 2011, 30(31): 3440-3453.

[12] 朱蓉, 田音, 汪荣泉. Ascl2 RNA 干扰对结肠癌 LS174T 细胞 EMT 相关 microRNA 表达的影响[J]. 重庆医学, 2013, 42(36): 4361-4363, 4367.

[13] Zhu R, Yang Y, Tian Y, *et al*. Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by miRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32170.

(**收稿**:2014-09-01;**修回**:2014-09-18)

(编辑 王 红)