

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.006>

结肠癌组织中 microRNA-340 与 ROCK1 的表达及其临床意义

陈芳, 崔红霞, 眭怡群, 戴晓晓, 侯燕, 涂健, 张永胜

(苏州大学附属第二医院病理科, 江苏 苏州 215000)

[摘要] 目的: 探讨microRNA-340(miR-340)与rho相关卷曲螺形成蛋白激酶1(rho associated-coiledcoil forming protein kinase, ROCK1)在结肠癌组织中的表达及二者的相互关系。方法: 采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测41例结肠癌组织及其癌旁正常黏膜组织中miR-340及ROCK1 mRNA的表达水平, 同时采用蛋白质印迹法检测组织RohA/ROCK通路的表达, 分析miR-340及ROCK1与大肠癌患者临床病理参数之间的关系。结果: 结肠癌组织miR-340的相对表达量为 0.757 ± 0.056 , 低于癌旁正常黏膜组织的 1.290 ± 0.082 , 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 结肠癌组织ROCK1的相对表达量为 1.551 ± 0.078 , 高于癌旁正常黏膜组织的 0.823 ± 0.059 , 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结直肠癌组织的ROCK1, ROCK2及RhoA表达水平分别为 0.455 ± 0.038 , 0.385 ± 0.033 , 0.852 ± 0.075 , 正常黏膜组织分别为 0.185 ± 0.021 , 0.102 ± 0.011 , 0.401 ± 0.044 , 癌组织均高于正常组织, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结肠癌组织中miR-340和ROCK1的表达与性别、年龄、发病部位、浸润深度、肿瘤分化程度无关($P > 0.05$), 而与淋巴结转移及TNM分期有关($P < 0.05$)。Pearson相关分析结果示: 结肠癌组织中miR-340与ROCK1表达呈负相关($r = -0.509$, $P < 0.001$)。结论: miR-340在结肠癌组织中表达下调, ROCK1表达上调, 二者与淋巴结转移及TNM分期密切相关。miR-340可能通过抑制ROCK1表达发挥抑癌作用。

[关键词] microRNA-340; rho相关卷曲螺形成蛋白激酶1; 结肠癌

Expression and clinical significance of microRNA-340 and ROCK1 in tissues of colon cancer

CHEN Fang, CUI Hongxia, SUI Yiqun, DAI Xiaoxiao, HOU Yan, TU Jian, ZHANG Yongsheng

(Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou Jiangsu 215000, China)

Abstract **Objective:** To explore the expression of microRNA-340 and rho associated-coiledcoil forming protein kinase (ROCK1) in tissues of colon cancer and its clinical significance. **Methods:** A total of 41 tissue specimens of colon cancer and adjacent normal tissues were chosen clinically. Quantitative real-time PCR were used to detect the different expression of miR-340 and ROCK1 mRNA in tissues. Western blotting assay was used to detect the expression of RohA/ROCK pathway. **Results:** miR-340 mRNA decreased significantly in colon cancer tissue (0.757 ± 0.056) compared with the adjacent normal tissue (1.290 ± 0.082), and the difference had statistical

收稿日期 (Date of reception): 2019-05-26

通信作者 (Corresponding author): 张永胜, Email: t2fcze@163.com

significance ($P < 0.05$). ROCK1 mRNA increased significantly in colon cancer tissue (1.551 ± 0.078) compared with the adjacent normal tissue (0.823 ± 0.059), and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). The expression levels of ROCK1, ROCK2 and RhoA in colorectal cancer tissues were 0.455 ± 0.038 , 0.385 ± 0.033 and 0.852 ± 0.075 , and the normal mucosal tissues were 0.185 ± 0.021 , 0.102 ± 0.011 and 0.401 ± 0.044 , respectively. Those in the cancer tissues were higher than normal tissues, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The expression levels of miR-340 and ROCK1 were not associated with gender, age, locations, depth of tumor invasion and tumor differentiation ($P > 0.05$). However, the expression levels of miR-340 and ROCK1 were associated with TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis revealed that the expression of miR-340 had a close negative correlation with ROCK1 in colon cancer ($r = -0.509$, $P < 0.001$). **Conclusion:** The low expression of miR-340 and high expression of ROCK1 are closed associated with TNM stage and lymph node metastasis. miR-340 may act as oncogene via targeting ROCK1 in colon cancer.

Keywords miR-340; rho associated-coiledcoil forming protein kinase; colon cancer

结肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,近年来其发病率、病死率呈逐步上升趋势^[1],从基因学角度寻找特异性的诊治靶点服务于临床一直是广大医学工作者的研究重点。人类基因组计划的实施与完成使得既往被忽视的非编码RNA受到重视,微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度为21~25个核苷酸内源性的非编码RNA,广泛存在于真核生物细胞之中。它能够识别靶基因mRNA的3'端非编码区域并与之结合,从而促进mRNA的降解,发挥负调控靶基因的作用^[2],进而广泛参与细胞增殖、分化、凋亡、代谢等生理病理活动。因miRNA广泛分布于循环系统,且含量稳定,是一种理想的生化标志物,在肿瘤性疾病研究领域取得了较大进展,越来越多的研究^[3-5]表明:miRNA在肿瘤的发生、发展及转移中发挥重要作用。部分学者采用基因芯片技术对结肠癌的差异表达miRNA做了总结,miR-340为众多差异表达基因中的一员,是一种促癌基因,与乳腺癌^[6]、卵巢癌^[7]、骨肉瘤^[8]等肿瘤关系密切。我们通过生物信息学分析发现miR-340和rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1(rho associated-coiledcoil forming protein kinase, ROCK1)之间存在靶向结合位点。ROCK1是Rho家族编码的一个主要功能蛋白,ROCK1与肝癌^[9]、肾癌^[10]、膀胱癌^[11]等肿瘤关系密切,但在结肠癌中,ROCK1和miR-340的相互作用及其对疾病的影响尚不得知。本研究拟采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测结肠癌组织及其对应癌旁正常黏膜组织中miR-340及ROCK1的表达差异,以及分析上述分子与结肠癌临床病理参数之间的关系,探讨结肠癌发病、转移的分子机制,为临床

治疗结肠癌提供实验依据。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2016年1月至2018年3月在苏州大学附属第二医院确诊的结肠癌患者41例,术前均未行放疗及化疗,其中男22例,女19例,年龄(67.9 ± 0.23)岁,术后组织病理学诊断为结肠癌。所有患者的TNM分期均依据美国癌症联合委员会/国际抗癌联盟结肠直肠癌TNM分期系统(第7版)进行。本研究获得苏州大学附属第二医院医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.2 细胞、试剂与仪器

TRIzol[®] Reagent购于美国Invitrogen公司, SuperquickRT cDNA第一链合成试剂盒购自北京康为世纪科技有限公司, All-in-One[™] miRNA RT-qPCR检测试剂盒购于美国Gene Copoeia公司, TapMan Reverse Transcription Reagents, SYBRGreen PCR Master Mix购自美国Applied Biosystems公司。miR-340, ROCK1, U6, GAPDH引物序列购自上海生物工程有限公司。DU800型分光光度计购自德国Beckman公司, 7500 Fast荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。MiRcute miRNA I购于北京天根生化科技有限公司。蛋白质抽提试剂盒购自南京建成生物科技有限公司; ROCK1, ROCK2, RhoA以及内参GAPDH的一抗与二抗购自Abcam中国官网。

1.3 RT-qPCR

肿瘤组织及距离肿瘤边缘至少5 cm的正常

黏膜组织被切除后, 立即经生理盐水冲洗, 去除结缔组织并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。所有标本收集完毕后行PCR检测。按照TRIzol[®] Reagent试剂盒提取组织RNA。采用分光光度计检测样本在260 nm及280 nm处的吸光度值, 计算RNA浓度及纯度。然后采用SuperquickRT cDNA第一链合成试剂盒将RNA转录成为cDNA, 反应条件为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。miRNA-340采用All-in-One[™] miRNA RT-qPCR检测试剂盒进行RT-qPCR反应, 以U6为内参照。ROCK1 mRNA检测采用TapMan Reverse Transcription Reagents, SYBRGreen PCR Master Mix试剂盒进行RT-qPCR反应, 以GAPDH为内参照。RT-qPCR的反应条件均为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共35个循环。miR-340序列: 正向引物为5'-CAAGATGCGTGAGAATGCGT-3', 反向引物为5'-CCGTGACTGTATGTGGCGTAGT-3'。ROCK1序列: 正向引物为5'-AGCCTACAGATCACTAGCAAT-3', 反向引物为5'-TGTGGTACTGATGCTCTCCACG-3'。U6序列: 正向引物为5'-CTCGCTTCGGCAGCAGCACA-3', 反向引物为5'-ACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。GAPDH序列: 正向引物为5'-ACGTCACGAAGTACTAGCAAT-3', 反向引物为5'-TGTGTGCATGAGTCTCTCCACG-3'。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示miR-340及ROCK1的相对表达量。

1.4 蛋白质印迹实验

采用蛋白质抽提试剂盒对所得组织样本提取总蛋白, BCA法定量, 并采用 $5\times$ Buffer缓冲液溶解, 浓度为 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。组装电泳槽, 配置电泳所需浓缩胶与分离胶, 所得蛋白以 $10\mu\text{g}$ /通道为点样量进行SDS-聚丙烯酰胺电泳, 电泳条件: 40 V 预电泳30 min, 60 V 电泳30 min, 80 V 电泳60 min。电泳后, 不同分子质量大小的条带被分离胶区分开来。将分离胶的条带通过电转印转移至羟甲基纤维素膜, 行抗体孵育, 先采用5%的脱脂牛奶封闭非特异性条带, 再加入一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, ROCK1, ROCK2, RhoA, GAPDH的一抗使用浓度分别为1:2 000, 1:2 500, 1:2 000, 1:3 000, 稀释液为3%的脱脂牛奶; PBST液清洗后加入二抗, 二抗的使用浓度均为1:2 500, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。ECL显色, 暗室显影, 采用图像分析软件Image J分析蛋白表达量。目的蛋白表达量=目的蛋白灰度值/

内参GAPDH灰度值。

1.5 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行数据分析。所有实验均重复3次并采集数据, 计量资料的表达形式为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$), 两组比较采用独立样本 t 检验, 计数资料用构成比(%)表示, 两组率的比较采用卡方检验, 相关分析采用Pearson相关分析法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-340 和 ROCK1 在结肠癌组织及其癌旁正常黏膜组织中的表达

RT-qPCR检测结果表明: 结肠癌组织miR-340的相对表达量为 0.757 ± 0.056 , 低于癌旁正常黏膜组织(1.290 ± 0.082), 差异有统计学意义($t=6.523$, $P<0.001$; 图1A), 结肠癌组织ROCK1的相对表达量为 1.551 ± 0.078 , 高于癌旁正常黏膜组织(0.823 ± 0.059), 差异有统计学意义($t=7.376$, $P<0.001$)。

2.2 RhoA/ROCK 信号通路在结肠癌组织及其癌旁正常黏膜组织中的表达

蛋白质印迹法检测结果表明: 结直肠癌组织的ROCK1, ROCK2及RhoA表达水平分别为 0.455 ± 0.038 , 0.385 ± 0.033 , 0.852 ± 0.075 , 正常黏膜组织分别为 0.185 ± 0.021 , 0.102 ± 0.011 , 0.401 ± 0.044 , 癌组织均高于正常组织, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图2)。

2.3 miR-340 和 ROCK1 的表达与结肠癌临床病理特征的关系

结肠癌组织中miR-340和ROCK1的表达与性别、年龄、发病部位、浸润深度、肿瘤分化程度无关($P>0.05$), 而与淋巴结转移及TNM分期有关($P<0.05$, 表1)。

2.4 结肠癌组织中 miR-340 与 ROCK1 表达的关系

Pearson相关分析结果示: 结肠癌组织中miR-340与ROCK1表达呈负相关($r=-0.509$, $P<0.001$; 图3)。

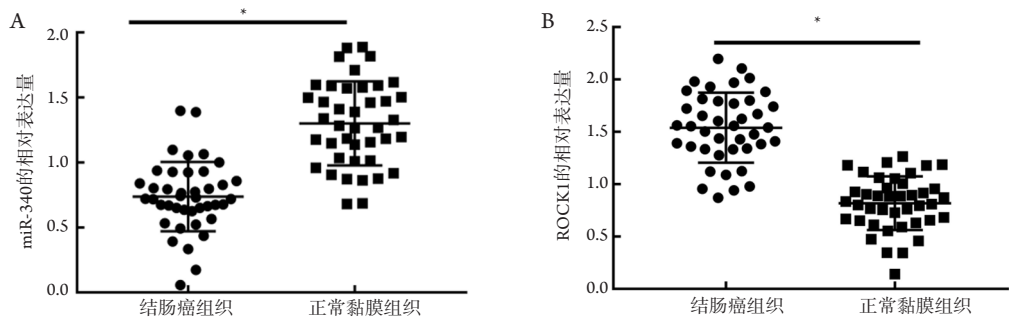


图1 RT-qPCR检测miR-340和ROCK1在结肠癌及其癌旁正常黏膜组织中的表达

Figure 1 Expression of miR-340 and ROCK1 in colon cancer and adjacent normal mucosa detected by RT-qPCR

与正常黏膜组织比较, * $P < 0.001$ 。

Compared with the normal mucosa, * $P < 0.001$.

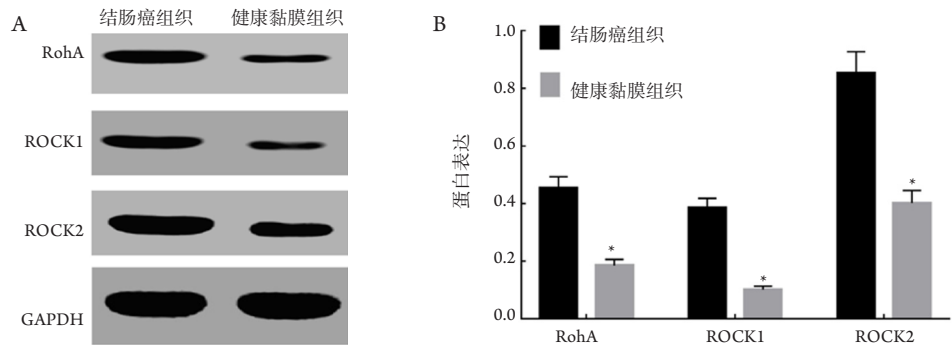


图2 蛋白质印迹法检测RohA/ROCK信号通路在结肠癌及其癌旁正常黏膜组织中的表达

Figure 2 Expression of RohA/ROCK signaling pathway in colon cancer and adjacent normal mucosa detected by Western blotting

与正常黏膜组织比较, * $P < 0.05$ 。

Compared with the normal mucosa, * $P < 0.05$.

表1 miR-340的表达水平与大肠癌临床病理资料的关系

Table 1 Relationship between miR-340 and the clinicopathological data of colorectal cancer

临床及病理特点	<i>n</i>	miR-340含量	<i>t</i>	<i>P</i>	ROCK1含量	<i>t</i>	<i>P</i>
性别			1.473	0.149		0.887	0.381
男	22	0.783 ± 0.012			1.524 ± 0.072		
女	19	0.791 ± 0.022			1.543 ± 0.064		
年龄/岁			1.050	0.300		1.749	0.088
<69	16	0.795 ± 0.015			1.529 ± 0.052		
≥69	25	0.786 ± 0.032			1.553 ± 0.036		
浸润深度			1.924	0.062		1.016	0.316
未达浆膜	9	0.761 ± 0.051			1.578 ± 0.058		
浆膜及以上	32	0.783 ± 0.022			1.612 ± 0.095		

续表1

临床及病理特点	<i>n</i>	miR-340含量	<i>t</i>	<i>P</i>	ROCK1含量	<i>t</i>	<i>P</i>
淋巴结转移			18.530	<0.001		54.780	<0.001
有	17	0.642 ± 0.021			1.932 ± 0.027		
无	24	0.791 ± 0.028			1.237 ± 0.047		
TNM分期			18.630	<0.001		47.530	<0.001
I, II	25	0.792 ± 0.019			1.793 ± 0.018		
III, IV	16	0.546 ± 0.062			1.383 ± 0.037		
分化程度			1.907	0.064		1.114	0.272
低分化	8	0.793 ± 0.025			1.568 ± 0.022		
中高分化	33	0.762 ± 0.044			1.593 ± 0.062		

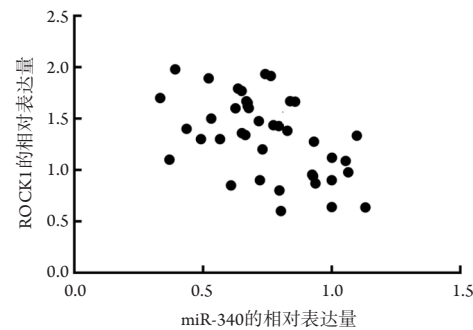


图3 结肠癌组织中miR-340与ROCK1表达的关系
Figure 3 Relationship between miR-340 and ROCK1 expression in colon cancer tissues

3 讨论

广泛存在于真核生物细胞中的miRNA通过与靶基因mRNA的3'端非编码区域结合,从而促进mRNA的降解,发挥负调控靶基因的作用,并能广泛参与机体各类生理及病理过程。研究^[12]表明:miRNA能够参与结肠癌发生、发展与转移等过程。miR-340与多种肿瘤的发生、进展、转移及愈合密切相关。miR-340在胃癌中发挥原癌基因的作用,其在胃癌组织中的表达明显升高,且miR-340的高表达与胃癌的低分化、预后不良相关,过表达miR-340能显著促进胃癌SGC-7901和BGC823细胞增殖,减少细胞凋亡^[13]。在非小细胞肺癌中,miR-340的表达较瘤旁正常组织显著减少,miR-340的低表达与非小细胞肺癌的高临床分期、淋巴结转移呈正相关。有研究表明,通过抑制Bcl-2, cyclin D1和MMP-2的表达,miR-340能够显著抑制肝癌细胞的增殖和侵袭能力^[14],同时过表达miR-340能

够逆转肝癌细胞对顺铂的化疗抵抗^[15]。在前列腺癌中,miR-340的表达被上调,过表达miR-340能够有效抑制前列腺癌细胞在裸鼠体内的生长和转移^[16]。而本研究首次证实,miR-340在结肠癌组织中的表达明显高于癌旁正常黏膜组织。同时,笔者分析了miR-340的表达与结肠癌患者的临床资料,发现miR-340的含量在无淋巴结转移及TNM分期为I, II期的患者中表达高,而在有淋巴结转移及TNM分期为III, IV期的患者中表达降低,差异具有统计学意义。以上研究结果证明miR-340在结肠癌中发挥抑癌基因作用,与其在肝癌和前列腺癌中的作用相一致。

ROCK1是RohA/ROCK信号通路的关键成员之一,该通路与多种肿瘤的发生、发展密切相关。一般情况下RhoA激活后会激活ROCK1与ROCK2,再进一步通过磷酸化或其他作用模式激活下游分子MLCP, CPI, MAP-2等,从而参与细胞分化和迁移能力的调控。ROCK蛋白受到抑制时也会负反馈调节RhoA,降低RhoA的表达。在肾透明细胞癌组织中,ROCK1的表达高于癌旁正常组织^[10]。在结肠癌细胞系中,ROCK1的表达明显增加,沉默ROCK1基因的表达能够抑制细胞增殖和侵袭^[17]。本研究首次证明结肠癌组织中ROCK1的表达明显高于癌旁正常黏膜组织,且ROCK1的含量在无淋巴结转移及TNM分期为I, II期的患者中表达低,而在有淋巴结转移及TNM分期为III, IV期的患者中表达升高。上述结果说明ROCK1在结肠癌中发挥原癌基因的作用。研究^[18]表明:在骨肉瘤细胞中,miR-340通过直接作用于ROCK1基因,从而发挥抑制肿瘤细胞增殖与转移的作用。因此推测在结肠癌细胞中,miR-340可能通过抑制ROCK1来发

挥抑癌基因的作用。但此推论仍需直接的细胞实验进行证实。

综上所述, 本研究证明miR-340在结肠癌组织中表达下调, ROCK1表达上调, 二者与淋巴结转移及TNM分期密切相关。miR-340可能通过抑制ROCK1表达发挥抑癌作用。

参考文献

1. Aykan NF. Red meat and colorectal cancer[J]. *Oncol Rev*, 2015, 9(1): 288.
2. Towler BP, Jones CI, Newbury SF. Mechanisms of regulation of mature miRNAs[J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(6): 1208-1214.
3. Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 441-450.
4. Baranwal S, Alahari S K. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(6): 1283-1290.
5. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 623-631.
6. Wu ZS, Wu Q, Wang CQ, et al. miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met[J]. *Cancer*, 2011, 117(13): 2842-2852.
7. Qu F, Wang X. microRNA-340 induces apoptosis by downregulation of BAG3 in ovarian cancer SKOV3 cells[J]. *Pharmazie*, 2017, 72(8): 482-486.
8. Song L, Duan P, Gan Y, et al. MicroRNA-340-5p modulates cisplatin resistance by targeting LPAATbeta in osteosarcoma[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(5): e6359.
9. Deng Q, Xie L, Li H. MiR-506 suppresses cell proliferation and tumor growth by targeting Rho-associated protein kinase 1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(4): 921-927.
10. Zhang GM, Luo L, Ding XM, et al. MicroRNA-126 inhibits tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in renal cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 2029-2036.
11. Wu D, Niu X, Pan H, et al. MicroRNA-335 is downregulated in bladder cancer and inhibits cell growth, migration and invasion via targeting ROCK1[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5): 4379-4385.
12. Yin G, Zhou H, Xue Y, et al. MicroRNA-340 promotes the tumor growth of human gastric cancer by inhibiting cyclin G2[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 1111-1118.
13. Hou X, Qiao H. Effect of miR-340 on gastric cancer cell proliferation and apoptosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 13108-13113.
14. Yuan J, Ji H, Xiao F, et al. MicroRNA-340 inhibits the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting JAK1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 578-584.
15. Shi L, Chen ZG, Wu LL, et al. miR-340 reverses cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma cell lines by targeting Nrf2-dependent antioxidant pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(23): 10439-10444.
16. Huang K, Tang Y, He L, et al. MicroRNA-340 inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis by targeting the MDM2-p53 pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(2): 887-895.
17. Zhou L, Xu Z, Ren X, et al. MicroRNA-124 (MiR-124) inhibits cell proliferation, metastasis and invasion in colorectal cancer by downregulating rho-associated protein kinase 1 (ROCK1)[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(5): 1785-1795.
18. Zhou X, Wei M, Wang W. MicroRNA-340 suppresses osteosarcoma tumor growth and metastasis by directly targeting ROCK1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437(4): 653-658.

本文引用: 陈芳, 崔红霞, 睦怡群, 戴晓晓, 侯燕, 涂健, 张永胜. 结肠癌组织中microRNA-340与ROCK1的表达及其临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(4): 843-848. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.006

Cite this article as: CHEN Fang, CUI Hongxia, SUI Yiqun, DAI Xiaoxiao, HOU Yan, TU Jian, ZHANG Yongsheng. Expression and clinical significance of microRNA-340 and ROCK1 in tissues of colon cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(4): 843-848. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.006