

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.009

肿瘤防治专题

# 结直肠癌患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路和预后的关系分析

胡立宏, 潘雪峰, 关佳恒, 张倩, 郑国宝

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20210613)

作者单位: 471031 洛阳, 中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院肿瘤科

通信作者: 郑国宝, E-mail: zhengguobao123@126.com

**【摘要】目的** 研究结直肠癌(CRC)患者血清微小 RNA(miR)-21-5p、miR-377-3p 表达及与 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白(catenin)通路及预后的关系。**方法** 选取 2017 年 1 月—2018 年 1 月中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院肿瘤科收治的 CRC 患者 92 例作为 CRC 组, 医院同期健康体检者 60 例作为健康对照组。检测血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达量及 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路指标 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、细胞周期素 D1(Cyclin D1)mRNA 表达量。Pearson 相关分析 miR-21-5p、miR-377-3p 与 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达的相关性。比较不同临床病理特征 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达差异。Kaplan-Meier 曲线及 Logrank 检验分析不同血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达 CRC 患者预后的差异。多因素 Cox 回归分析 CRC 患者预后的影响因素。**结果** 与健康对照组比较, CRC 组患者血清 miR-21-5p、Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达量显著升高, miR-377-3p 表达量显著降低( $t/P = 29.202/ <0.001$ 、 $52.006/ <0.001$ 、 $45.973/ <0.001$ 、 $39.196/ <0.001$ 、 $23.119/ <0.001$ 、 $38.120/ <0.001$ )。血清 miR-21-5p 与 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达呈正相关( $r/P = 0.404/ <0.001$ 、 $0.410/0.002$ 、 $0.529/ <0.001$ 、 $0.378/ <0.001$ )。miR-377-3p 与 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达呈负相关( $r/P = -0.347/0.007$ 、 $-0.408/ <0.001$ 、 $-0.450/ <0.001$ 、 $-0.419/ <0.001$ )。TNM 分期 III ~ IV 期和伴淋巴结转移 CRC 患者血清 miR-21-5p 表达明显高于 TNM 分期 I ~ II 期和无淋巴结转移患者, 而血清 miR-377-3p 表达明显低于 TNM 分期 I ~ II 期和无淋巴结转移患者, 差异具有统计学意义( $t/P = 19.741/ <0.001$ 、 $18.534/ <0.001$ 、 $11.799/ <0.001$ 、 $17.639/ <0.001$ )。血清 miR-21-5p 高表达患者 3 年生存率低于低表达患者( $\chi^2/P = 17.700/ <0.001$ )。miR-377-3p 低表达患者 3 年生存率低于高表达患者( $\chi^2/P = 21.380/ <0.001$ )。多因素 Cox 回归分析显示, 肿瘤 TNM 分期 III ~ IV 期、伴淋巴结转移、miR-21-5p 升高是 CRC 患者预后的独立危险因素[OR(95% CI) = 1.875(1.322 ~ 2.662)、1.662(1.163 ~ 2.374)、1.847(1.366 ~ 2.500)], miR-377-3p 升高是 CRC 患者预后的独立保护因素[OR(95% CI) = 0.518(0.363 ~ 0.739)]。**结论** CRC 患者血清 miR-21-5p 表达升高, miR-377-3p 表达降低, 两者可通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路促进 CRC 的肿瘤进展, 可作为辅助评估 CRC 患者预后的肿瘤标志物。

**【关键词】** 结直肠癌; 微小 RNA-21-5p; 微小 RNA-377-3p; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; 预后

**【中图分类号】** R735.3<sup>+</sup>5; R735.3<sup>+</sup>7

**【文献标识码】** A

## Expression of serum miR-21-5p, miR-377-3p in patients with colorectal cancer and the relationship between Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway and prognosis

Hu Lihong, Pan Xuefeng, Guan Jiaheng, Zhang Qian, Zheng Guobao. Department of Oncology, The 989 Hospital of the Joint Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Henan Province, Luoyang 471031, China

Corresponding author: Zheng Guobao, E-mail: zhengguobao123@126.com

Funding program: Henan Medical Science and Technology Research Program(LHGJ20210613)

**【Abstract】Objective** To study the expression of serum microRNA(miR)-21-5p, miR-377-3p in patients with colorectal cancer(CRC) and their correlation with Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and prognosis. **Methods** From January 2017 to January 2018, 92 patients with CRC admitted to the Oncology Department of the 989th Hospital of the Joint Service Support Force of the Chinese People's Liberation Army were selected as the CRC group, and 60 patients undergoing physical examination in the hospital during the same period were selected as the health control group. Detection of serum miR-21-5p, miR-377-3p expression and Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway indicators Wnt3a  $\beta$ -MRNA expression levels of catenin, c-myc, and cyclin

D1. Pearson correlation analysis miR-21-5p, miR-377-3p, and Wnt3a  $\beta$ -Correlation between expression of Catenin, c-myc, and Cyclin D1 mRNA. To compare the differences in the expression of miR-21-5p and miR-377-3p in serum of CRC patients with different clinical and pathological characteristics. Kaplan Meier curve and Logrank test were used to analyze the difference in prognosis of patients with CRC with different serum miR-21-5p and miR-377-3p expressions. Multivariate Cox regression analysis was used to analyze the prognostic factors of patients with CRC. **Results** Compared with the healthy control group, the expression levels of serum miR-21-5p, Wnt3a,  $\beta$ -catenin, c-myc, and Cyclin D1 mRNA were increased, while the expression level of miR-377-3p was decreased in the CRC group ( $t/P = 29.202/ < 0.001$ ,  $52.006/ < 0.001$ ,  $45.973/ < 0.001$ ,  $39.196/ < 0.001$ ,  $23.119/ < 0.001$ ,  $38.120/ < 0.001$ ). Serum miR-21-5p was positively correlated with the expression of Wnt3a,  $\beta$ -catenin, c-myc, and Cyclin D1 mRNA ( $r/P = 0.404/ < 0.001$ ,  $0.410/0.002$ ,  $0.529/ < 0.001$ ,  $0.378/ < 0.001$ ), while miR-377-3p was negatively correlated with the expression of Wnt3a,  $\beta$ -catenin, c-myc, and Cyclin D1 mRNA ( $r/P = -0.347/0.007$ ,  $-0.408/ < 0.001$ ,  $-0.450/ < 0.001$ ,  $-0.419/ < 0.001$ ). The serum miR-21-5p expression level in CRC patients with TNM stage III-IV and lymph node metastasis was significantly higher than that in patients with TNM stage I-II and without lymph node metastasis, while the serum miR-377-3p expression level was significantly lower ( $t/P = 19.741/ < 0.001$ ,  $18.534/ < 0.001$ ,  $11.799/ < 0.001$ ,  $17.639/ < 0.001$ ). The 3-year survival rate of patients with high serum miR-21-5p expression was lower than that of patients with low expression ( $\chi^2/P = 17.700/ < 0.001$ ), while the 3-year survival rate of patients with low miR-377-3p expression was lower than that of patients with high expression ( $\chi^2/P = 21.380/ < 0.001$ ). Multivariate Cox regression analysis showed that tumor TNM stage III-IV, lymph node metastasis, and elevated miR-21-5p were independent risk factors for CRC prognosis [ $OR(95\% CI) = 1.875 (1.322 - 2.662)$ ,  $1.662 (1.163 - 2.374)$ ,  $1.847 (1.366 - 2.500)$ ], while elevated miR-377-3p was an independent protective factor [ $OR(95\% CI) = 0.518 (0.363 - 0.739)$ ]. **Conclusion** In patients with CRC, the expression of miR-21-5p in serum increases and the expression of miR-377-3p decreases, both can be regulated by Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway promotes tumor progression in CRC and can be used as a tumor marker to assist in evaluating the prognosis of patients with CRC.

**【Key words】** Colorectal cancer; miR-21-5p; miR-377-3p; Wnt/ $\beta$ -catenin pathway; Prognosis

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的恶性肿瘤,全球每年 CRC 新发病例达 180 万,死亡例数达 86 万<sup>[1]</sup>。CRC 的治疗以手术治疗、放化疗为主,特别是新辅助化疗能使肿瘤降期降级,提高肿瘤切除率<sup>[2]</sup>。但仍有许多患者存在化疗耐药或抵抗的问题<sup>[3]</sup>。故寻找能够评估 CRC 预后的肿瘤标志物具有重要意义。微小 RNA (microRNA, miR) 是长度介于 22 ~ 25 nt 的 RNA 分子,参与细胞分裂、代谢及物质运输等生理过程,其表达失调参与恶性肿瘤的发生与发展<sup>[4]</sup>。miR-21-5p 是一种具有肿瘤促进作用的 miRNA,其能够在转录后水平调控 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 (catenin) 通路,促进肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[5]</sup>。miR-377-3p 是具有肿瘤抑制作用的 miRNA,其表达下调能增加 Cullin-1 mRNA 的稳定性,激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,促进肺癌肿瘤增殖、侵袭和转移<sup>[6]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的过度激活是 CRC 发生发展的重要机制, $\beta$ -catenin 活化入核后能够诱导下游靶基因如 c-myc, 细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 等的表达,促进 CRC 的恶性增殖和转移<sup>[7]</sup>。本研究通过检测 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达,研究两者与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路及预后的关系,现报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2017 年 1 月—2018 年 1 月中国

人民解放军联勤保障部队第九八九医院肿瘤科收治的 CRC 患者 92 例作为 CRC 组。CRC 组患者均无明显诱因,其中男 52 例,女 40 例,年龄 36 ~ 78 ( $57.54 \pm 8.78$ ) 岁;合并基础疾病:高血压 14 例,糖尿病 7 例;CRC 家族史 2 例;肿瘤最大径: < 2 cm 25 例, 2 ~ 5 cm 32 例, > 5 cm 35 例;肿瘤位置:结肠 60 例 (升结肠及横结肠 31 例,降结肠及乙状结肠 29 例),直肠 32 例 (上段 10 例,下段 22 例);肿瘤 TNM 分期: I ~ II 期患者 34 例, III ~ IV 期 58 例;肿瘤分化程度:高分化 25 例,中分化 34 例,低分化 33 例;伴淋巴结转移 58 例。医院同期健康体检者 60 例作为健康对照组:男 36 例,女 24 例,年龄 35 ~ 77 ( $55.94 \pm 7.87$ ) 岁。2 组受试者性别、年龄比较,差异无统计学意义 ( $P$  均 > 0.05)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过 (LQ989HS-20160911C),受试者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准:①经 HE 染色及免疫组化染色等组织病理学检查确诊为 CRC;②患者均为初次诊治,住院前无肿瘤治疗史;③患者体能状态良好,卡氏 (Karnofsky, KPS) 评分 > 70 分,无严重的肝肾等脏器功能衰竭。(2) 排除标准:①合并其他器官肿瘤;②合并败血症、肺炎等感染性疾病,类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病;③临床病理及随访资料不完整;④入组前接受放化疗。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达量及外周血 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路检测:健康对照组体检时及 CRC 组入院后留取空腹肘静脉血 5 ml,平均分为 2 份,每份 2.5 ml,一份室温条件下应用台式高速离心机(购自德国艾本德公司,型号 5810)离心留取上清液即血清,采用 Trizol 法提取血清总 RNA,保存于 -80℃ 冰箱,用于 miR-21-5p、miR-377-3p 检测。另一份全血标本应用 EDTA 抗凝,按照 EasySep 人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离试剂盒(购自北京诺为生物技术有限公司)说明书提取 PBMC,采用 Trizol 法提取 PBMC 中总 RNA(一步法逆转录试剂盒),用于 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路检测。微量分光光度计(购自美国赛默飞公司,型号 Narodrop2000)检测所有样本总 RNA 纯度,OD260/OD280 比值介于 1.8~2.1。将总 RNA 逆转录为 cDNA 后应用荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(购自美国 ABI 公司,型号:ABI7500)进行荧光定量 PCR 反应(2×SYBR Green PCR Master mix 试剂盒购自北京索莱宝科技公司)。总反应体系 20  $\mu$ l,包括 2×SYBR Green10  $\mu$ l,逆转录产物 2  $\mu$ l,双蒸水 6  $\mu$ l,正反向引物各 1  $\mu$ l。miR-21-5p、miR-377-3p 反应条件:95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,70℃ 延伸 30 s,共 35 次循环。Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 次循环。miR-21-5p、miR-377-3p 以 U6 为内参,Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 以 GAPDH 为内参,根据  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 miR-21-5p、miR-377-3p、Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 的表达量。引物序列见表 1。根据血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达量的中位数 2.03、0.92 为临界值,分为 miR-21-5p 高表达( $n=44$ )和低表达( $n=48$ ),miR-377-3p 高表达( $n=47$ )和低表达( $n=45$ )。

1.3.2 治疗方法及随访: CRC 患者的临床治疗参考“中国结直肠癌诊疗规范(2015 版)”<sup>[8]</sup>进行,包括手术治疗和化疗。手术治疗:对于 T1N0M0 分期 CRC 予以局部切除,T2~4N0M0 的 CRC 患者予以根治性切除联合区域淋巴结清扫。自术后 8 周内开始,II 期伴有高危因素、III 期 CRC 患者接受术后辅助化疗,采用 XELOX 3 周方案,具体方案为:第 1 天:奥沙利铂(艾恒,江苏恒瑞医药股份有限公司),130 mg/m<sup>2</sup>,静脉滴注,维持 2 h 以上;第 1~14 天:卡培他滨片(希罗达,上海罗氏制药有限公司),1 000 mg/m<sup>2</sup>,口服,每天 2 次。单次治疗疗程为 3 周,完成 8 个疗程。IV 期 CRC 患者化疗方案同上。患者自明确病理诊断后开始随访,随访以电话和门诊复查为主。连续随访 3 年,术后第 1 年每 3 个月随访 1 次,术后第 2、3 年每半年随访 1 次。随访内容为患者血清肿瘤标志物、胸腹盆腔 CT 及电子肠镜等检查,并记录生存时间,即自病理确诊日至末次随访日或患者死亡日。随访截止至随访时间结束(2021 年 1 月 31 日)或患者死亡。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。符合正态性分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较采用独立样本  $t$  检验(或校正  $t$  检验),多组间比较采用单因素方差分析;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较用独立样本  $\chi^2$  检验。采用 Pearson 相关分析血清 miR-21-5p、miR-377-3p 与 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达的相关性;Kaplan-Meier 生存曲线及 Logrank 检验分析不同血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达 CRC 患者预后的差异。单因素及多因素 Cox 回归分析 CRC 患者预后的影响因素。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组血清 miR-21-5p、miR-377-3p 及 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路指标比较 与健康对照组比较,CRC 组血清 miR-21-5p、Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 的表达

表 1 各项指标的引物序列

Tab. 1 Primer Sequence

引物	上游引物	下游引物
miR-21-5p	5'CGATGTGGGAAGCTGGGTTACTA-3'	5'ATCATTTCCATGACGGCCTGT-3'
miR-377-3p	5'CCATTGCTCAGCTCAAAGTGG-3'	5'GGGACGAGTAATTCCTTTCCCT-3'
Wnt3a	5'AGCTACCCGATCTGGTGGTC-3'	5'CAAACCTCGATGTCCTCGCTAC-3'
$\beta$ -catenin	5'AAGCCAAGGACTGTCTGAACG-3'	5'GGGACGAGTAATTCCTTTCCCT-3'
c-myc	5'ATGGCCATTACAAAGCCG-3'	5'TTCTGGAGTAGCAGCTCCTAA-3'
Cyclin D1	5'ATGGCGCAGTCTATTAACATCAC-3'	5'CAGTGGGACGAGTAATTCCTTTCC-3'
U6	5'GCTGGACCAGATGTATGTCCC-3'	5'ATCATTTCCATGACGGCCTGT-3'
GAPDH	5'AATAGAGCTGCTTCGCCTAGA-3'	5'GAGGTGGTTCATACTGAGCAAG-3'

量升高, miR-377-3p 表达量降低, 差异具有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ ), 见表 2。

2.2 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的相关性 CRC 患者血清 miR-21-5p 与 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达呈正相关( $P$  均  $< 0.01$ )。血清 miR-377-3p 与 Wnt3a、 $\beta$ -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达呈负相关( $P$  均  $< 0.01$ ), 见表 3。

表 3 血清 miR-21-5p、miR-377-3p 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的相关性

Tab. 3 Serum miR-21-5p, miR-377-3p, and Wnt/ $\beta$ -Correlation of Catenin Pathway

参 数	miR-21-5p		miR-377-3p	
	$r$ 值	$P$ 值	$r$ 值	$P$ 值
Wnt3a	0.404	$< 0.001$	-0.347	0.007
$\beta$ -catenin	0.410	0.002	-0.408	$< 0.001$
c-myc	0.529	$< 0.001$	-0.450	$< 0.001$
Cyclin D1	0.378	$< 0.001$	-0.419	$< 0.001$

2.3 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与临

床病理特征的关系 TNM 分期 III ~ IV 期和伴淋巴结转移 CRC 患者血清 miR-21-5p 表达明显高于 TNM 分期 I ~ II 期和无淋巴结转移患者, 而血清 miR-377-3p 表达明显低于 TNM 分期 I ~ II 期和无淋巴结转移患者, 差异具有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。不同性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤位置及分化程度 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达比较, 差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ), 见表 4。

2.4 血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与 CRC 临床预后后的关系 CRC 患者随访 3 年无失访, 死亡 29 例, 3 年总生存率为 68.48% (63/92)。按各表达分组汇总其生存资料以建立 Kaplan-meier 生存曲线(图 1), 并进行生存率比较(Logrank 检验)。患者 3 年总生存率 miR-21-5p 低表达及 miR-377-3p 高表达分别高于 miR-21-5p 高表达及 miR-377-3p 低表达患者, 差异具有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。见表 5。

2.5 Cox 回归分析 CRC 患者预后的影响因素 以 CRC 患者预后为因变量(1 = 死亡, 0 = 存活,  $t$  = 生存时间), 以上述结果中  $P < 0.05$  指标 TNM 分期(III ~ IV

表 2 健康对照组与 CRC 组血清 miR-21-5p、miR-377-3p 及 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Serum miR-21-5p, miR-377-3p, and Wnt in the healthy control group and CRC group/  $\beta$ -Comparison of Catenin pathway indicators

组 别	例数	miR-21-5p	miR-377-3p	Wnt3a mRNA	$\beta$ -catenin mRNA	c-myc mRNA	Cyclin D1 mRNA
健康对照组	60	1.10 $\pm$ 0.21	2.14 $\pm$ 0.20	0.77 $\pm$ 0.15	0.65 $\pm$ 0.11	0.58 $\pm$ 0.09	0.62 $\pm$ 0.14
CRC 组	92	2.06 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.18	3.26 $\pm$ 0.42	2.63 $\pm$ 0.39	2.12 $\pm$ 0.36	2.01 $\pm$ 0.55
$t$ 值		29.202	38.120	52.006	45.973	39.196	23.119
$P$ 值		$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$

表 4 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与临床病理特征的关系

Tab. 4 Relationship between the expression of miR-21-5p, miR-377-3p and clinical pathological characteristics in serum of CRC patients

项 目	例数	miR-21-5p	$t/F$ 值	$P$ 值	miR-377-3p	$t/F$ 值	$P$ 值	
性别	男	52	2.03 $\pm$ 0.17	1.813	0.073	0.97 $\pm$ 0.16	1.369	0.174
	女	40	2.10 $\pm$ 0.20			0.92 $\pm$ 0.19		
年龄(岁)	$\geq 60$	49	2.04 $\pm$ 0.17	1.009	0.316	0.98 $\pm$ 0.16	1.597	0.114
	$> 60$	43	2.08 $\pm$ 0.21			0.92 $\pm$ 0.20		
肿瘤直径(cm)	$< 2$	25	2.02 $\pm$ 0.17	1.017	0.366	0.98 $\pm$ 0.18	0.561	0.573
	2 ~ 5	32	2.07 $\pm$ 0.16			0.94 $\pm$ 0.16		
	$> 5$	35	2.08 $\pm$ 0.22			0.93 $\pm$ 0.21		
肿瘤位置	升结肠和横结肠	31	2.02 $\pm$ 0.19	0.969	0.411	0.95 $\pm$ 0.14	1.084	1.084
	降结肠和乙状结肠	29	2.06 $\pm$ 0.18			0.99 $\pm$ 0.16		
	直肠上段	10	2.08 $\pm$ 0.23			0.89 $\pm$ 0.24		
	直肠下段	22	2.11 $\pm$ 0.24			0.92 $\pm$ 0.23		
分化程度	高分化	25	1.98 $\pm$ 0.22	2.666	0.075	0.98 $\pm$ 0.16	1.214	0.302
	中分化	34	2.08 $\pm$ 0.20			0.96 $\pm$ 0.18		
	低分化	33	2.11 $\pm$ 0.25			0.91 $\pm$ 0.20		
TNM 分期	I ~ II 期	34	1.62 $\pm$ 0.13	19.741	$< 0.001$	1.25 $\pm$ 0.15	11.799	$< 0.001$
	III ~ IV 期	58	2.32 $\pm$ 0.21			0.77 $\pm$ 0.24		
淋巴结转移	有	58	2.37 $\pm$ 0.17	18.534	$< 0.001$	0.75 $\pm$ 0.13	17.639	$< 0.001$
	无	34	1.53 $\pm$ 0.23			1.29 $\pm$ 0.16		

表 5 血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与 CRC 临床预后的关系

Tab. 5 Relationship between the expression of miR-21-5p and miR-377-3p in serum and the clinical prognosis of CRC

指标	例数	3 年生存[例(%)]	$\chi^2$ 值	P 值
miR-21-5p	高表达	44 24(54.55)	17.700	<0.001
	低表达	48 39(81.25)		
miR-377-3p	高表达	47 41(87.23)	21.380	<0.001
	低表达	45 22(48.89)		

表 6 多因素 Cox 回归分析 CRC 患者预后的影响因素

Tab. 6 Multivariate Cox Regression Analysis of Factors Influencing the Prognosis of CRC Patients

因素	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
TNM III ~ IV 期	0.629	0.179	12.407	<0.001	1.875	1.322 ~ 2.662
淋巴结转移	0.508	0.182	7.796	0.005	1.662	1.163 ~ 2.374
miR-21-5p 高	0.614	0.154	15.835	<0.001	1.847	1.366 ~ 2.500
miR-377-3p 高	-0.658	0.181	13.179	<0.001	0.518	0.363 ~ 0.739

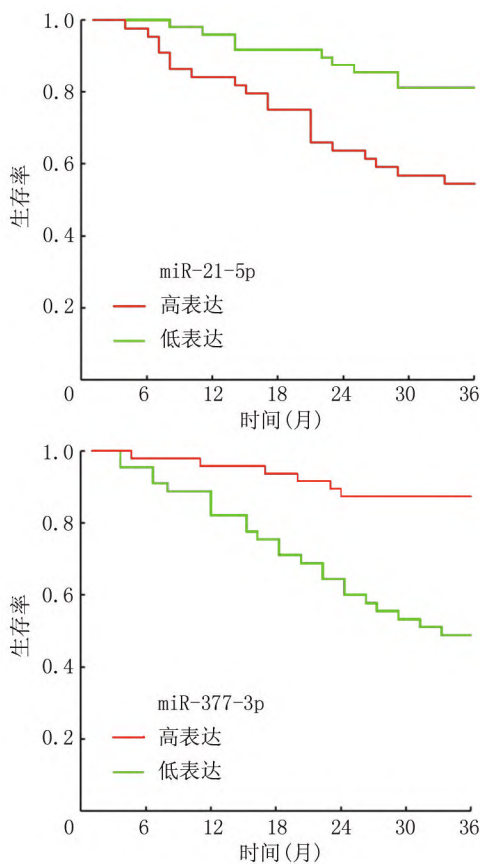


图 1 Kaplan-Meier 曲线分析血清 miR-21-5p、miR-377-3p 对 CRC 患者预后的影响

Fig. 1 Analysis of the Effect of Serum miR-21-5p and miR-377-3p on the Prognosis of CRC Patients by Using the Kaplan Meier Curve

期 vs I ~ II 期)、淋巴结转移(有 vs. 无)、miR-21-5p、miR-377-3p 为自变量进行多因素 Cox 回归分析,结果显示,肿瘤 TNM 分期 III ~ IV 期、伴淋巴结转移、miR-21-5p 升高是影响 CRC 患者预后的独立危险因素,miR-377-3p 升高是影响 CRC 患者预后的独立保护因素( $P$  均 < 0.01),见表 6。

### 3 讨论

目前临床上对 CRC 患者预后评估主要根据 TNM 分期、病理分级等指标,但由于肿瘤的异质性,即使相

同肿瘤分期分级的 CRC 患者临床预后差异较大<sup>[8]</sup>。血清肿瘤标志物是肿瘤组织在肿瘤发生发展过程中相关基因异常表达的肿瘤抗原或生物活性物质,可以在血清等体液中检出。目前临床上常用的 CRC 血清肿瘤标志物包括癌胚抗原、糖类抗原 19-9 等,但均存在诊断的敏感度和特异度不高的局限,对 CRC 临床预后评估价值有限<sup>[9-11]</sup>。有研究发现,CRC 患者中存在大量 miRNA 异常表达上调或下调的现象,并通过影响肿瘤细胞中磷脂酰肌醇-3 激酶/AKT 通路, Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的信号传导,参与 CRC 疾病的发生发展<sup>[12-13]</sup>。miRNA 能够被分泌到血清中并被检测到,是理想的血清肿瘤标志物。因此,寻找 CRC 中能影响肿瘤进展及预后的关键 miRNA 及其相应的分子机制,对有针对性制定临床治疗方案和改善预后具有重要意义。

miR-21-5p 编码基因位于 17q23.1,由 RNA 聚合酶 II 转录并剪切成熟,参与构成 RNA 诱导的沉默复合物的形成。近年来发现,miR-21-5p 作为单链 RNA 分子,能够在转录后调控原癌基因和抑癌基因的表达,参与胰腺癌等恶性肿瘤的发生、发展<sup>[14]</sup>,是新的肿瘤标志物。本研究中,CRC 患者血清中 miR-21-5p 表达上调,这与既往学者报道结果一致<sup>[15]</sup>,提示 miR-21-5p 可能作为一种肿瘤促进因子,参与促进 CRC 的肿瘤发生发展。CRC 中 miR-21-5p 的表达升高可能与表观遗传学修饰有关。研究发现,肿瘤发生时 miR-21-5p 的 3' 末端的 2'-羟基位点发生甲基化修饰,导致 miR-21-5p 稳定性增加,miR-21-5p 的表达上调通过进一步抑制程序性细胞死亡因子 4 的表达,促进肿瘤过度增殖<sup>[16]</sup>。He 等<sup>[17]</sup>报道,CRC 癌组织中 miR-21-5p 的表达上调,这与本研究中 CRC 患者血清 miR-21-5p 表达上调一致。笔者分析,CRC 癌组织中 miR-21-5p 的表达升高能够通过外泌体等途径释放到细胞外,从而在血清中被检测到,可能是一种新的 CRC 肿瘤标志物。本研究中合并淋巴结转移 CRC 患者血清 miR-21-5p 水平较高,推测其原因是 miR-21-5p 参与促进 CRC 淋巴结转移的发生。实验研究证实,CRC 肿瘤细胞分泌产生的 miR-21-5p 能够与抑制脐静脉血管内皮及淋巴管

上皮细胞中 Krev 相互作用蛋白 1 的表达,促进血管内皮生长因子的表达,诱导肿瘤血管及淋巴管生成并增加管壁通透性,促进 CRC 肿瘤细胞的血行及淋巴转移<sup>[17]</sup>。本研究中,Wnt/ $\beta$ -catenin 通路各基因表达升高,这与既往研究报道一致<sup>[18]</sup>,提示 CRC 中存在 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路激活的现象。本研究发现,miR-21-5p 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路基因表达呈显著正相关,提示 CRC 中 miR-21-5p 可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,促进 CRC 的肿瘤进展。分析其原因,miR-21-5p 的表达上调能够抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路中的负调控因子磷酸酯酶与张力蛋白同源物的表达,继而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路中 Wnt3a、 $\beta$ -catenin 的表达,促进肿瘤细胞的侵袭和迁移<sup>[19]</sup>。c-myc、Cyclin D1 作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的重要下游效应因子,c-myc 能够抑制 CRC 肿瘤细胞分化及细胞凋亡,而 Cyclin D1 参与促进肿瘤细胞 G1/S 期进行,均导致 CRC 肿瘤过度增殖<sup>[20]</sup>。本研究中,miR-21-5p 表达与 CRC 患者的不良生存预后相关,提示 miR-21-5p 表达升高导致 CRC 患者不良生存预后。推测其原因,可能是 miR-21-5p 的表达升高参与 CRC 肿瘤耐药性的形成。有学者报道,miR-21-5p 过表达的 CRC 肿瘤细胞通过下调蛋白酶体途径基因的表达,增强对拓扑异构酶抑制剂阿霉素和依托泊苷等化疗药物的耐药性形成,导致患者不良预后<sup>[21]</sup>。

miR-377-3p 编码基因位于 14q32.31。近年来发现,miR-377-3p 作为一种肿瘤抑制因子,在胃癌等恶性肿瘤中表达下调,是新的肿瘤相关标志物<sup>[22]</sup>。本研究中,CRC 患者血清 miR-377-3p 表达降低,与 Liu 等<sup>[23]</sup>在 CRC 癌组织中 miR-377-3p 表达降低报道一致,提示 miR-377-3p 表达降低参与 CRC 发生。推测其原因,miR-377-3p 表达降低与长链非编码 RNA 的调控有关。研究发现,长链非编码 RNA SNHG1 能够作为分子支架,结合并抑制 miR-377-3p 的表达及功能,激活 miR-377-3p 的直接下游靶点 AKT2,促进肿瘤细胞无限增殖<sup>[24]</sup>。此外,本研究中合并淋巴结转移的 CRC 患者血清 miR-377-3p 表达降低,表明 miR-377-3p 表达降低促进 CRC 肿瘤淋巴结转移。此外,本研究中 III ~ IV 期 CRC 患者血清 miR-377-3p 表达降低更为明显,表明血清 miR-377-3p 越低,CRC 的肿瘤恶性程度越高。有学者发现,卵巢癌中 miR-377-3p 的表达下调导致其直接作用靶点基质金属蛋白酶 16 表达上调,基质金属蛋白酶 16 通过降解肿瘤细胞外基质,促进肿瘤细胞侵袭和淋巴结转移<sup>[25]</sup>。本研究中,miR-377-3p 的表达与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路基因表达呈显著负相关,提示 CRC 患者 miR-377-3p 表达下调可通过激活 Wnt/ $\beta$ -

catenin 通路,促进 CRC 的恶性进展。既往研究证实,CRC 患者肿瘤细胞中 miR-377-3p 的表达降低能导致其下游靶点 X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白 (XIAP) mRNA 稳定性增加,XIAP 作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的正调节因子,能够激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,上调下游靶基因如 c-myc、Cyclin D1 等的表达,促进 CRC 肿瘤增殖和转移<sup>[26]</sup>。因此,推测 miR-377-3p 降低参与促进 CRC 肿瘤进展,可能影响患者的生存预后。本研究证实,血清 miR-377-3p 表达降低与 CRC 患者的不良预后相关。推测其原因,可能是由于 miR-377-3p 作为一种抑癌基因,其表达降低通过激活 Jaccs 相关激酶 2 的表达,增强癌细胞对顺铂等化疗药物的耐药性,进而促进肿瘤的增殖和转移<sup>[27]</sup>。因此,CRC 患者血清 miR-377-3p 的表达降低通过促进 CRC 肿瘤的恶性进展及耐药性形成,导致患者不良预后。

综上所述,CRC 患者血清 miR-21-5p 表达升高,miR-377-3p 表达降低,两者表达与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移有关。CRC 中 miR-21-5p 表达升高,miR-377-3p 降低可能通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,促进 CRC 的肿瘤进展。血清 miR-21-5p 升高,miR-377-3p 降低是影响 CRC 患者不良生存预后的独立危险因素,是 CRC 预后评估的潜在血清肿瘤标志物。但本研究尚存在一定的不足之处,本研究样本量有限,今后需设计多中心大样本临床试验进一步研究。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

胡立宏:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写与修改;潘雪峰:实施研究过程,资料搜集整理;关佳恒、张倩:进行数据处理及统计学分析;郑国宝:提出研究思路,分析试验数据,论文审核

**参考文献**

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] 刘睿,吕雨桐,姜翠红,等.艾迪注射液联合 XELOX 方案对晚期结肠直肠癌患者 Th1/Th2 免疫平衡和血清肿瘤标志物的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22 (5): 872-875, 885. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.05.015.
- [3] Liu R, Lyu YT, Jiang CH, et al. Effect of Aidi injection combined with XELOX regimen on Th1/Th2 immune balance and serum tumor markers in patients with advanced colorectal cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2022, 22 (5): 872-875, 885. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.05.015.
- [3] Cercek A, Dos Santos Fernandes G, Roxburgh CS, et al. Mismatch repair-deficient rectal cancer and resistance to neoadjuvant chemotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26 (13): 3271-3279. DOI: 10.

- 1158/1078-0432.
- [4] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer[J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14 (4): dmm047662. DOI: 10.1242/dmm.047662.
- [5] Liu F, Li T, Zhan X. Silencing circular RNAPTPN12 promoted the growth of keloid fibroblasts by activating Wnt signaling pathway via targeting microRNA-21-5p[J]. *Bioengineered*, 2022, 13 (2): 3503-3515. DOI:10.1080/21655979.2022.2029108.
- [6] Liang K, Liao L, Liu Q, et al. microRNA-377-3p inhibits osteosarcoma progression by targeting CUL1 and regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23 (11): 2350-2357. DOI:10.1007/s12094-021-02633-6.
- [7] Bian J, Dannappel M, Wan C, et al. Transcriptional regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in colorectal cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2125. DOI:10.3390/cells9092125.
- [8] 国家卫生计生委医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2015 版)[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 18(10): 961-973. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2015.10.001. State Health and Family Planning Commission, Oncology Branch of the Chinese Medical Association. Chinese colorectal cancer diagnosis and treatment standard (2015 version) [J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2015, 18(10): 961-973. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2015.10.001.
- [9] 李程, 闫柯, 霍斌亮, 等. 结直肠癌不同病理特征患者化疗前后循环肿瘤 DNA 水平变化及预后预测的列线图模型构建[J]. *疑难病杂志*, 2022, 21 (6): 566-570, 581. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.06.003. Li C, Yan K, Huo BL, et al. Construction of a nomogram model for changes in circulating tumor DNA levels before and after chemotherapy in patients with colorectal cancer with different pathological characteristics and prognosis prediction [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2022, 21 (6): 566-570, 581. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.06.003.
- [10] 高艳红, 李华, 赵金来, 等. 多基因表达与结直肠癌患者病理特征对预后的风险模型构建分析[J]. *疑难病杂志*, 2022, 21 (9): 938-943. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.09.010. Gao YH, Li H, Zhao JL, et al. Analysis of risk model construction of polygene expression and pathological characteristics of patients with colorectal cancer for prognosis[J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2022, 21(9): 938-943. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.09.010.
- [11] Zhu HQ, Wang DY, Xu LS, et al. Diagnostic value of an enhanced MRI combined with serum CEA, CA19-9, CA125 and CA72-4 in the liver metastasis of colorectal cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2022, 20(1): 401-409. DOI:10.1186/s12957-022-02874-x.
- [12] 王璐, 孙小虎, 白静慧, 等. miR-584 下调 CCN2 对结直肠癌 SW1116 细胞增殖、侵袭的影响及机制研究[J]. *疑难病杂志*, 2022, 21(1): 17-23. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.01.004. Wang L, Sun XH, Bai JH, et al. Effect of miR-584 down regulating CCN2 on proliferation and invasion of colorectal cancer SW1116 cells and its mechanism[J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2022, 21(1): 17-23. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.01.004.
- [13] Wang W, Zhang J, Fan Y, et al. MiR-1306-5p predicts favorable prognosis and inhibits proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer cells via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21 (14): 1491-1501. DOI:10.1080/15384101.2022.2054245.
- [14] Mortoglou M, Miralles F, Arisan ED, et al. microRNA-21 regulates stemness in pancreatic ductal adenocarcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (3): 1275. DOI:10.3390/ijms23031275.
- [15] Kudelova E, Holubekova V, Grendar M, et al. Circulating miRNA expression over the course of colorectal cancer treatment [J]. *Oncol Lett*, 2022, 23 (1): 18. DOI:10.3892/ol.2021.13136.
- [16] Liang H, Jiao Z, Rong W, et al. 3'-Terminal 2'-O-methylation of lung cancer miR-21-5p enhances its stability and association with Argonaute 2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48 (13): 7027-7040. DOI: 10.1093/nar/gkaa504.
- [17] He Q, Ye A, Ye W, et al. Cancer-secreted exosomal miR-21-5p induces angiogenesis and vascular permeability by targeting KRIT1 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 576. DOI:10.1038/s41419-021-03803-8.
- [18] Beni FA, Kazemi M, Dianat-Moghadam H, et al. MicroRNAs regulating Wnt signaling pathway in colorectal cancer: Biological implications and clinical potentials [J]. *Funct Integr Genomics*, 2022, 22 (6): 1073-1088. DOI:10.1007/s10142-022-00908-x.
- [19] Chen J, Zhou C, Li J, et al. miR-21-5p confers doxorubicin resistance in gastric cancer cells by targeting PTEN and TIMP3 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41 (4): 1855-1866. DOI:10.3892/ijmm.2018.3405.
- [20] Wang J, Cai H, Liu Q, et al. Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis via suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and EMT [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48 (3): 703-718. DOI: 10.1142/S0192415X20500354.
- [21] Chen JC, Hsieh YY, Lo HL, et al. In vitro and in silico mechanistic insights into miR-21-5p-mediated topoisomerase drug resistance in human colorectal cancer cells [J]. *Biomolecules*, 2019, 9 (9): 467. DOI:10.3390/biom9090467.
- [22] Shi C, Liu T, Chi J, et al. LINC00339 promotes gastric cancer progression by elevating DCPIA expression via inhibiting miR-377-3p [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (12): 23667-23674. DOI:10.1002/jcp.28934.
- [23] Liu WY, Yang Z, Sun Q, et al. miR-377-3p drives malignancy characteristics via upregulating GSK-3 $\beta$  expression and activating NF- $\kappa$ B pathway in hCRC cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119 (2): 2124-2134. DOI:10.1002/jcb.26374.
- [24] Xie M, Zhang Z, Cui Y. Long noncoding RNA SNHG1 contributes to the promotion of prostate cancer cells through regulating miR-377-3p/AKT2 axis [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35 (2): 109-119. DOI:10.1089/cbr.2019.3177.
- [25] Wang H, Qi C, Wan D. MicroRNA-377-3p targeting MMP-16 inhibits ovarian cancer cell growth, invasion, and interstitial transition [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(2): 124. DOI:10.21037/atm-20-8027.
- [26] Huang L, Liu Z, Hu J, et al. MiR-377-3p suppresses colorectal cancer through negative regulation on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by targeting XIAP and ZEB2 [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 156: 104774. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104774.
- [27] Zang R, Qiu X, Song Y, et al. Exosomes mediated transfer of Circ\_0000337 contributes to cisplatin (CDDP) resistance of esophageal cancer by regulating JAK2 via miR-377-3p [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(7): 673237. DOI:10.3389/fcell.2021.673237.

(收稿日期: 2022-12-29)