

miR-21 在结直肠癌中的表达及价值研究

雷佳

昆明医科大学海源学院 云南昆明

【摘要】目的 探讨 miR-21 在结直肠癌细胞中的表达，为结直肠癌诊疗提供新的治疗靶点。**方法** 购自结直肠癌细胞株 DLD1 细胞，通过荧光定量 PCR 检测检测结直肠癌细胞株中 miR-21 表达水平，以正常细胞株作为对照，比较不同细胞株中 miR-21 表达差异，并完成荧光染色。**结果** 研究组结直肠癌细胞中 miRNA-21 mRNA 表达水平高于对照组细胞表达水平 ($P < 0.05$)；实时荧光 PCR 结果表明：观察组荧光面积较大，且以红色为主，对照组表达水平较低，红色荧光面积较小。**结论** 在结直肠癌细胞株中，miR-21 为高表达，且与对照细胞株相比存在明显的差异性，有望成为结直肠癌治疗新靶点。

【关键词】 Micro RNA-21；结直肠癌

【基金项目】 云南省教育厅科学研究基金项目（2020J1261）

Expression and value of miR-21 in colorectal cancer

Jia Lei

Haiyuan College of Kunming Medical University Kunming, Yunnan

【Abstract】 Objective: To investigate the expression of miR-21 in colorectal cancer cells and provide a new therapeutic target for the diagnosis and treatment of colorectal cancer. **Methods** The expression level of miR-21 in DLD1 cells, a colorectal cancer cell line, was detected by fluorescent quantitative PCR. The expression difference of miR-21 in different cell lines was compared with that in normal cell lines, and fluorescence staining was completed. **Results** The expression level of miRNA-21 mRNA in colorectal cancer cells in the study group was higher than that in the control group ($P < 0.05$); The results of real-time fluorescent PCR showed that the fluorescent area of the observation group was large and mainly red, while the expression level of the control group was low and the red fluorescent area was small. **Conclusion** In colorectal cancer cell lines, miR-21 is highly expressed and has significant differences compared with the control cell lines, which is expected to become a new therapeutic target for colorectal cancer.

【Keywords】 Micro RNA-21; colorectal cancer

引言

结直肠癌在消化道肿瘤中极为常见，其发病率一直居高不下，其发病原因主要有：家族遗传因素；肠道良性腺瘤发生恶变；饮食中缺少精纤维，脂肪与碳水化合物过多，不利于排便，使得致癌物质大量滞留在肠道中，给肠粘膜造成刺激，使其发生癌变；直肠息肉或溃疡性结肠癌诱发^[1]。虽然患者可以通过健康饮食、定期检查来进行结直肠癌，但结直肠癌具有大部分癌症所具有的早期症状隐匿特征，因此临床很难在早期发现癌变。影像学也是诊断结直肠癌的常用方法，诸如 MRI、CT、超声等均被广泛用于结直肠癌的诊断，

其诊断准确率一比较高，但是这些方法毕竟是间接获得图像，并不是直接对病理结果进行观察，因此可能出现漏诊或误诊的结果。而随着科学技术与医疗技术的发展，临床研究发现 microRNA 表达失调是结直肠癌最普遍的特征，临床可以通过检测肿瘤标本物水平来了解肿瘤的发生和发展状态。miR-21 是最常见的癌基因之一，其残余对结直肠癌的发生、发展、转移，临床多以其检测结果作为筛查结直肠癌、评判结直肠癌治疗效果的参考依据。因此，本研究以结直肠癌细胞株为对象，探讨 miR-21 在结直肠癌细胞中的表达，报道如下。

1 资料与方法

1.1 细胞资料

结直肠癌细胞株 DLD1 细胞与正常对照细胞, 将购置的细胞放置在含有 10.0%胎牛血清中 RPMI-1640 培养基中, 置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中, 随机将其放置在 4 个试管中, 备用。

1.2 仪器与设备

荧光定量 PCR 仪, 型号: Step one plus, 购自

于美国 ABI 公司; 倒置显微镜, 型号 CKX31, 购自于日本 NIKON 公司; 逆转录试剂盒与 rRT-PCR 试剂盒, 购自于大连 Takara 公司; α -MEM 培养基, 购自于美国 Hyclone; CO₂ 恒温细胞孵育箱, 购自于美国 Thermo 公司; 引物设计美国 Invitrogen 生物技术有限公司。

1.3 方法

结直肠癌细胞株 DLD1 细胞与正常对照细胞, 加入地塞米松 (DEX) 及细胞培养基, 完成细胞的培养, 将细胞放置在 37°C、5%的 CO₂ 培养箱中, 每天换液 1 次; 待细胞融合 80.0%以上后加入胰酶进行细胞消化及传代, 取第三代成骨细胞系, 备用。

在冻存的细胞标本中取结直肠癌细胞株 DLD1 细胞与正常对照细胞, 滴入 1mL 的 Trizol 试剂。①总 RNA 的提取。向细胞中加入氯仿 200 μ L, 振荡 15s 后进行 15min 离心, 速度 4500rpm; 去除上清, 加入预冷乙醇 1mL, 常温下干燥 7min; A260 吸光值下完成总 RNA 测定。提取后, 以紫外分光光度仪进行 RNA 纯度与浓度的测定, 以琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 完整性的检测。

②根据试剂盒相关要求合成 cDNA, 结构中具有特异性茎环的 RT 引物源自定量 PCR 试剂盒, 引物序列为: 5'-GTCGTATCCAGTGGTCCGAGTGATT CGCACTGGATACGACTCAACATC-3' 与 5'-GTCGTA TCCAGTGGTCCGAGTGATTTCGCACTGGATA CGACTCACAGT-3', 抑制剂为 1 μ L 的 ribonuclease, 反转录引物为 50nmol/L, RNA 模板为 2.5 μ L, 加热到 70°C, 进行热变性, 5 分钟后给予冰浴, 在冷却 2 分钟后再加入 1 μ L 的 10mmol/L dNTP 混合液/0.5 μ L 的抑制剂、2 μ L 的 1mol/L MLV-RT 缓冲液以及 0.5 μ L 的 1 mmol/L M-MLV, 在 16°C 30 分钟、42°C 20 分钟以及 85°C 5 分钟的反应条件下进行反转录反应。

③以荧光 PCR 仪及相关试剂盒进行 PCR 实时定量检测, 反应体系为 0.03mL, 3 μ L 的 10x 缓冲液、1 μ L 的 cDNA、3 μ L 的 25mmol/L 氯化镁溶液、上游引物

0.33 μ mol/L 和下游引物 0.33 μ mol/L, 3.6 μ L 的 2.5mmol/L dNTP, 1.5U 的 rYaq 聚合酶。反应条件为: 循环 40 个, 预变性 94°C 3 分钟、94°C 20 秒、60°C 40 秒。内参选择 U6, 以 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法来测定结直肠癌细胞株 DLD1 细胞中 miR-21 的相对表达量。 $-\Delta\Delta C_t$ 为 (miR-21·C_t-U6·C_t) 结直肠癌细胞株 DLD1 细胞- (miR-21·C_t-U6·C_t) 正常对照细胞^[2]。

1.3 统计学方法

在 SPSS 19.0 版统计学软件中纳入本研究中所有研究对象的临床数据, 计数资料采用 n (%) 表示, 行 χ^2 检验, 计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行 t 检验, 通过统计分析后结果若为 P<0.05, 那么便意味着差异存在统计学意义。

2 结果

研究组结直肠癌细胞中 miRNA-21 mRNA 表达水平高于对照组细胞表达水平 (P<0.05); 实时荧光 PCR 结果表明: 观察组荧光面积较大, 且以红色为主, 对照组表达水平较低, 红色荧光面积较小, 见表 2 和图 1。

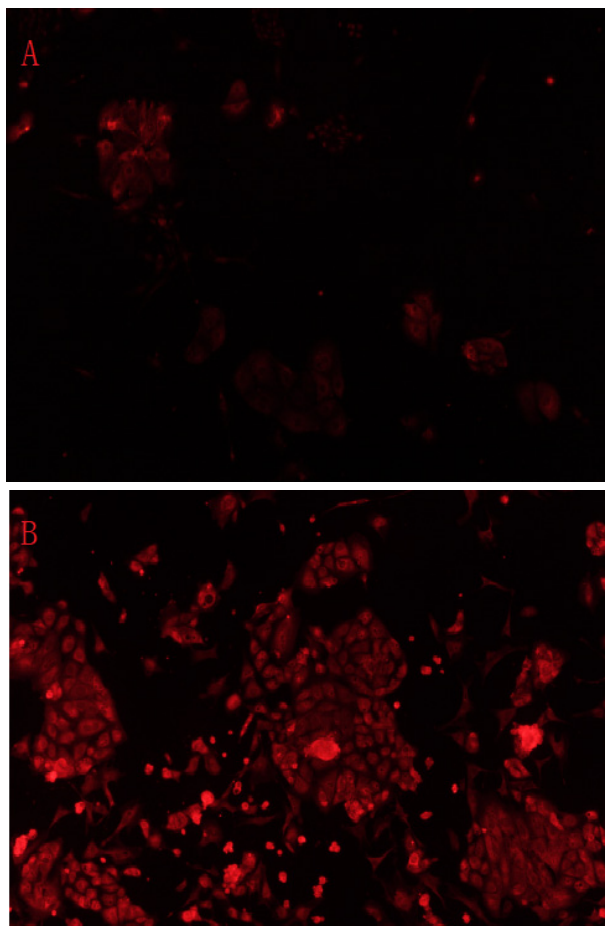
表 1 观察组与对照组 miRNA-34a mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miRNA-34a mRNA
研究组	5.16 \pm 1.07
对照组	0.68 \pm 0.13
t	60.231
P	0.000

3 讨论

结直肠癌是一种在国内及国外均有非常高发病率的恶性肿瘤, 其病变过程较为复杂, 涉及了多种因素, 经过了多个阶段, 与多个基因改变有关, 许多研究证明, 结直肠癌的发生和发展与遗传学中抑癌基因失活及癌基因激活有关, 而 MiRNA 调控失常正是造成抑癌基因失活及癌基因激活的主要原因。作为一类可以调控基因功能的非编码类小分子 RNA, MicroRNA 对 mRNA 中 3' 末端非翻译区有特异性的识别作用, 可以靶向地与其结合, 使 mRNA 降解, 或发生翻译抑制, 经转录后将会有效调节靶基因的表达。临床发现 MicroRNA 对多种人类疾病均有调节作用, 在多种肿瘤组织中均有异常的表达, 其或为抑癌基因存在, 或为癌基因存在, 在表达上有高有低, 参与了肿瘤细胞的产生、增殖、分化。本文研究对象 miR-21 正是一种具有致癌性质的 miRNA, 其是现阶段被发现的唯一一种

在非实体肿瘤和实体肿瘤中均有高表达的 miRNA, miR-21 所发挥的作用与癌基因非常相似, miR-21 高表达意味着肿瘤的发生发展、增殖、侵袭、转移, 甚至在血管生成和药物抵抗方面也产生了非常重要的影响, 促进了肿瘤的一系列生物学行为^[3]。



注: A 图为对照组 miR-21 荧光结果; B 图为研究组 miR-21 荧光结果。

图 1 两组 miR-21 荧光测定结果

作为一种 MicroRNA, miR-21 具有非常鲜明的活跃特性, 在乳腺癌、胰腺癌、肺癌以及结直肠癌等多种恶性肿瘤中均有较高的表达, 并且其表达水平的高低和肿瘤的发展、患者的预后都有密切的联系。本研

究中, 研究组结直肠癌细胞中 miRNA-21 mRNA 表达水平高于对照组细胞表达水平 ($P < 0.05$); 实时荧光 PCR 结果表明: 观察组荧光面积较大, 且以红色为主, 对照组表达水平较低, 红色荧光面积较小, 这无疑证明了 miR-21 高表达与癌变关系密切的论点。

值得注意的是, 在结直肠癌细胞株中, miR-21 为高表达, 且与对照细胞株相比存在明显的差异性, 有望成为结直肠癌治疗新靶点^[4]。

参考文献

- [1] 陈慧, 詹俊, 刘思齐. microRNA-21 和 microRNA-143 在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. 当代医学, 2019, 25(17):7-10.
- [2] 陈菊调, 王成组, 袁国平, 等. miR-21、miR-210 和 miR-92a 联合检测在结直肠癌诊断中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(10):1194-1195+1198.
- [3] 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.
- [4] 梁国刚, 林丽丽, 王豆豆. miR-21 靶向调控 TET1 促进结直肠癌 HCT15 和 HT29 细胞增殖, 侵袭及迁移[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2020, 29(7):750-755.

收稿日期: 2022 年 9 月 30 日

出刊日期: 2022 年 11 月 26 日

引用本文: 雷佳, miR-21 在结直肠癌中的表达及价值研究[J]. 国际临床研究杂志, 2022, 6(9): 26-28

DOI: 10.12208/j.ijcr.20220434

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS