

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.03.015

miR-106a 和 miR-24-1 在结肠癌中的表达及意义

李秋娴¹, 王晓华¹, 魏亚明², 黄颖烽³

Expression and Significance of miR-106a and miR-24-1 in Colon Cancer

Li Qiuxian¹, Wang Xiaohua¹, Wei Yaming², Huang Yingfeng³

1. Biochemistry Teaching and Research Section, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China; 2. Department of Blood Transfusion, The First Municipal People's Hospital of Guangzhou, 3. Department of General Surgery

Corresponding Author: Wang Xiaohua, E-mail: xiaoh_wang@126.com; Wei Yaming, E-mail: weiyaming@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-106a and miR-24-1 in both colon cancer and adjacent tissues, and analyze the relationship between the expression of miR-106a, miR-24-1 and c-myc gene. **Methods** To extract RNA from colon cancer tissues and their adjacent ones, detected the mRNA expression of c-myc by RT-PCR. The TaqMan fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression of the miR-106a and miR-24-1 in both colon cancer and adjacent tissues. **Results** The results showed that the expression of miR-106a in cancer tissues was higher than that in the adjacent tissues in the c-myc positive group ($P < 0.05$), and the expression of miR-106a in cancer tissues was also higher than that in the adjacent tissues in the c-myc negative ones ($P < 0.05$). The expression of miR-24-1 showed no difference either between cancer and adjacent tissues, or between positive and negative c-myc control. **Conclusion** The expression of miR-106a in both c-myc positive group cancer tissues and the c-myc negative ones were higher than that in adjacent tissues, miR-106a might be a blood screening target of colon cancer. There was no difference of the expression of miR-24-1 in both the c-myc positive group ones and the c-myc negative ones, which need more research to prove the relation between miR-24-1 and colon cancer.

Key words: Colon cancer; miR-106a; miR-24-1; c-myc

摘要:目的 检测结肠癌与癌旁组织 miR-106a 和 miR-24-1 的表达差异及其与 c-myc 的表达是否具有关联性。**方法** 选临床病理诊断明确的结肠癌患者,手术后取癌组织标本提取 RNA,RT-PCR 检测原癌基因 c-myc 在结肠癌组织与癌旁组织中的表达。TaqMan 荧光定量 PCR 检测结肠癌与癌旁组织 miR-106a 和 miR-24-1 的表达差异。**结果** c-myc 表达阳性的癌组织表达 miR-106a 要明显高于癌旁组织,其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); c-myc 表达阴性的癌组织表达 miR-106a 要高于癌旁组织 ($P < 0.05$),结肠癌组织与癌旁组织 miR-24-1 的表达无差异。**结论** 结肠癌组织 c-myc 阳性组和 c-myc 阴性组表达 miR-106a 均高于癌旁组织,miR-106a 有可能作为结肠癌的筛查目标之一;结肠癌组织 c-myc 阳性组和 c-myc 阴性组表达 miR-24-1 与癌旁组织无差异,还需更多研究证实其与结肠癌的关系。

关键词: 结肠癌; miR-24-1; miR-106a; c-myc

中图分类号: R322.4; R735.3⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)03-0303-04

收稿日期: 2011-06-03; 修回日期: 2011-08-19

基金项目: 广东省医学科研基金资助项目 (A2008517); 广州市科技计划项目 (2008J1-C171)

作者单位: 1. 510182 广州, 广州医学院生物化学与分子生物学教研室; 2. 广州医学院附属市一人民医院输血科, 3. 普外科

通信作者: 王晓华, E-mail: xiaoh_wang@126.com; 魏亚明, E-mail: weiyaming@163.com

作者简介: 李秋娴 (1983-), 女, 硕士在读, 主要从事结肠癌相关基因的研究

0 引言

结肠癌是西方国家常见的恶性肿瘤, 占肿瘤死亡率的第二位。发病率在我国排在第五位, 在广东省居各种肿瘤第三位。近年来, 随着我国生活水平的提高, 结肠癌发病率呈明显上升趋势。尽管对结肠癌的发生、发展和治疗已有较多认识, 但控制转移和复发依然是一大难题。近年来, 很多研究都证实 MicroRNAs (miRNAs) 在肿瘤的发生、发展中起到

非常重要的作用。miRNAs 是一类调节 mRNA 基因表达为目标的非编码 RNAs,与靶 mRNA 的 3'非翻译区互补配对抑制蛋白质合成,影响细胞的发育、分化、增殖、凋亡和代谢^[1-3]。

miRNAs 是新发现的一类内生性非编码小 miRNAs,通过调节靶 miRNAs 的降解与翻译起着重要的转录后调控作用,是转录后基因表达的重要调控器。miRNAs 在肿瘤细胞的过量表达可能作为致癌基因起作用,在肿瘤细胞的低表达可能与肿瘤的抑制基因有关^[4]。

c-myc 是一个原癌基因,前期研究在结肠癌实体标本中检测到 c-myc 的表达要明显高于正常组织^[5],c-myc 调控着细胞增殖与分化,表现为在增殖旺盛细胞中该基因高表达,而在静止或分化期细胞中低表达^[6]。miR-106a 属于 miR-17 家族,具有致瘤性,在调控正常细胞和肿瘤细胞生长、发展和凋亡中起着重要作用,miR-17 家族的表达与 c-myc 的表达有密切关系^[7],两者具有相互促进作用。miR-106a 在胃癌、大肠癌和淋巴瘤中均被证明其表达量高于正常组织^[8-11]。miR-24-1 则通过抑制 c-myc 和其他细胞基因的表达抑制细胞增殖^[12],miR-24-1 在间叶干细胞中高表达,且其在控制或抑制细胞增殖中起重要作用^[13]。然而它在结肠癌的表达很少见报道。因此本研究通过设立 c-myc 阳性组、c-myc 阴性组与正常大肠组织,检测三组间 miR-24-1 和 miR-106a 的表达是否具有差异,两目的基因的表达是否与 c-myc 的表达具有相关性,以期有助于揭示结肠癌的发病机制及对临床治疗和后续研究有所启示。

1 资料与方法

1.1 资料

病例标本来源于 2008 年 7 月—2010 年 3 月广州医学院附属市一人民医院胃肠外科结肠癌手术癌组织与癌旁组织配对标本。癌组织 14 例,其中男 8 例,女 6 例;中分化腺癌 10 例,黏液腺癌 1 例,腺癌并肠系膜转移 3 例。对应的癌旁组织 5 例,病例中位年龄为 59 岁,所有标本均经临床病理诊断。

1.2 组织总 RNA 提取

1.2.1 将液氮中保存的结肠癌组织与癌旁组织取出,各加入 1 ml Trizol 研磨组织,同时加液氮研磨保证组织始终处于液氮环境,组织研磨充分后转至 1.5 ml 离心管中,混匀,冰上静置 5 min。

1.2.2 加入 0.2 ml 氯仿,上下颠倒 15 次,冰上静置 2 min,离心(4℃,12 000 r/min 离心 15 min)。

1.2.3 离心后液体分为三层,小心吸取上层无色液

体移入一新的 EP 管中。

1.2.4 加入等体积异丙醇(约 0.4 ml),混匀,冰上静置 10 min,离心(4℃,12 000 r/min 离心 10 min)。

1.2.5 弃上清液,沉淀加入 75%乙醇 0.5 ml,漩涡振荡 30 s,离心(4℃,7 500 r/min 离心 5 min),重复此步骤 2 次。

1.2.6 小心弃上清液 管内沉淀在超净台中鼓风静置干燥 3~5 min。

1.2.7 加入 30 μl DEPC 水溶解 (65℃促溶 10~15 min),加入 RNA 酶抑制剂,核酸定量仪测定样品 RNA 的 A₂₆₀:A₂₈₀ 比值均在 1.75~1.90 之间,稀释标化为 300 ng/μl,分装保存于 -70℃冰箱备用。

1.3 普通 PCR 反转录-聚合酶链式(TAKARA 公司试剂)反应

合成模板 cDNA,所有样品的总 RNA 总量为 600 ng,体系如下:5×RT Reaction Buffer 4 μl,Prime-script RT Enzyme Mix 1 μl,Oligo dT primer 1 μl,Random 6 mers 1 μl,Total RNA 1 μl,无 RNA 酶 H₂O 12 μl,配成 20 μl 体系,反应条件:37℃ 15 min;85℃ 5 s。PCR 反应体系如下:Premix Tap 12.5 μl,cDNA 2 μl,Forward Primer (20 μM) 1 μl,Reverse Primer (20 μM) 1 μl,无 RNA 酶 H₂O 8.5 μl 配成 25 μl 体系,c-myc 引物序列:F:CGACTACGACTCGGTG-CAGCC,R:CCGAGAAGCCGCTCCACATAC。反应条件:94℃,5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃,10 min。2%琼脂糖凝胶电泳后在紫外线下可见 376 bp 处有一条带。

1.4 荧光定量 PCR 反转录(miR-106a,miR-24-1 和内参 U6,TAKARA 公司试剂)反应

用随机抽取的 8 例 c-myc 阳性标本癌组织和 6 例 c-myc 阴性标本癌组织总 RNA 进行反转录反应,合成模板 cDNA,体系如下:5×RT Reaction Buffer 2 μl,Primescript RT Enzyme Mix 0.5 μl,5×TaqMan MicroRNA RT Primer 2 μl(miR-106a,miR-24-1 和内参 U6 对应的 RT 引物),Total RNA 1 μl,无 RNA 酶 H₂O 4.5 μl,配成 10 μl 体系,反应条件:42℃ 15 min;85℃ 5 s。

1.5 TaqMan 荧光定量 PCR 反应(ABI)体系

miR-106a,miR-24-1 和内参 U6 由试剂公司设计合成探针引物,扩增条件均为 95℃ 15 s,60℃ 1 min,体系如下:TaqMan 2×Universal PCR Master Mix 10 μl,Nuclease Free Water 7.67 μl,TaqMan MicroRNA Assays 20×TaqMan Assay 1 μl,RT Product 1.33 μl,配成 20 μl 体系,PCR 条件:95℃ 10 min 预变性,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环,ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上扩增。

1.6 本实验用 $\Delta\Delta Ct$ 值法进行计算分析

将各样本 Ct 值代入： $\Delta\Delta Ct = [目的基因的平均 Ct 值(样本组) - 内参的平均 Ct 值(样本组)] / [(正常组目的基因的平均 Ct 值 - 正常组内参的平均 Ct 值)的均值]$ ，基因相对表达量 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

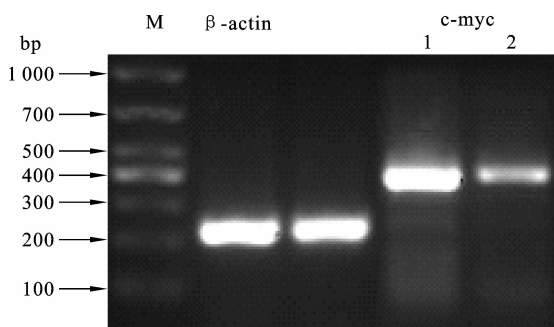
1.7 统计学方法

miR-24-1 和 miR-106a 的基因相对表达量以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS17.0 统计软件的 *t* 检验进行统计处理，取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 c-myc 基因在结肠癌标本中的表达

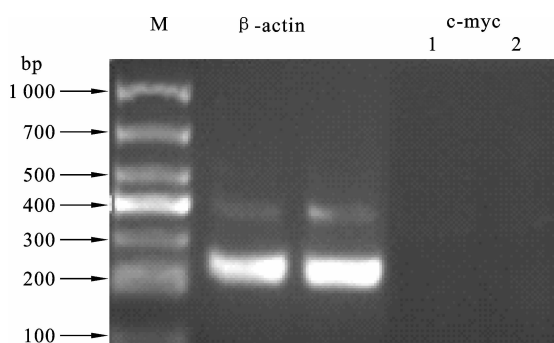
从前期实验结肠癌样本中随机抽取 8 例 c-myc 表达阳性的癌标本，其癌组织和癌旁组织行 RT-PCR，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，样本均于大约 376 bp 处呈现特异性扩增条带，如图 1 所示在紫外线下可见条带的定义为 c-myc 表达阳性，以 β -actin 为内参，其扩增大小为 228 bp；再随机抽取 6 例不表达或低表达 c-myc 的癌组织标本，如图 2 所示。



M: marker; 1: expression in tumor; 2: expression in adjacent tissues

图 1 c-myc 在癌组织和癌旁组织的表达 (c-myc 阳性)

Figure 1 The expression of c-myc in the tumor and the adjacent tissues



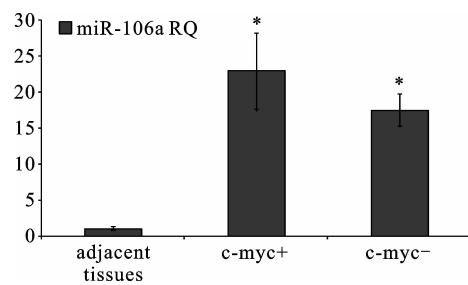
M: marker; 1: expression in tumor; 2: expression in adjacent tissues

图 2 c-myc 在癌组织和癌旁组织的表达 (c-myc 阴性)

Figure 2 The expression of c-myc in the tumor and the adjacent tissues

2.2 miR-106a 在结肠癌标本及癌旁组织中的表达

随机抽取的标本总 RNA 用 TaqMan 荧光定量探针法扩增，实验显示 c-myc 阳性组和癌旁组织表达 miR-106a 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；c-myc 阴性组和癌旁组织表达 miR-106a 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；c-myc 阳性组和 c-myc 阴性组间表达 miR-106a 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 3。



* : compared with adjacent tissues, $P < 0.05$

图 3 miR-106a 在结肠癌标本及癌旁组织的表达

Figure 3 The expression of miR-106a in the tumor and the adjacent tissues

2.3 miR-24-1 在结肠癌标本及癌旁组织的表达

随机抽取的标本总 RNA 用 TaqMan 荧光定量探针法扩增，实验显示 c-myc 阳性组和癌旁组织表达 miR-24-1 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；c-myc 阴性组和癌旁组织表达 miR-24-1 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；c-myc 阳性组和 c-myc 阴性组间表达 miR-24-1 差异也无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 4。

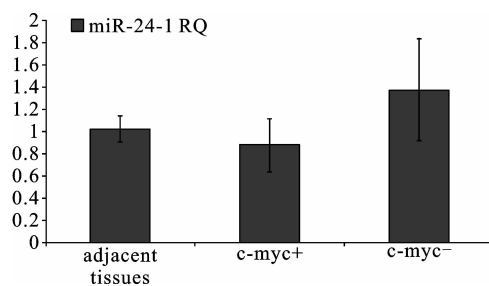


图 4 miR-24-1 在结肠癌标本及癌旁组织的表达

Figure 4 The expression of miR-24-1 in the tumor and the adjacent tissues

3 讨论

大部分的人类肿瘤被发现致癌 miRNAs (如 miR-21, miR-106a 和 miR-155) 的异常表达，重构抑癌 miRNAs 或敲除致癌 miRNAs 序列已经在实验动物模型产生有利的抑癌抗菌素^[14]。可以推断，miR-106a 在肿瘤的发生发展起着重要作用。miR-106a 在胃癌组织中的表达高于正常组织，且 miR-

106a 的表达水平与肿瘤发展的阶段、大小、分化、淋巴管及远距离转移和侵袭有关^[8-9]。miR-20a、miR-21、miR-106a、miR-181b 和 miR-203 在确诊的结肠腺癌中高表达^[10]。结肠癌患者 miR-106a 的异常表达与肿瘤的病理学类型和不良预后有关^[15]。c-myc 是原癌基因,如果说 miRNAs 的过量表达是作为致癌基因起作用的,有可能肿瘤的发生发展就是致癌的 miRNAs 激活原癌基因,导致基因突变,从而发生肿瘤。

miR-106a 在本次试验的 c-myc 阳性组与阴性组表达均高于癌旁组织,miRNAs 的过量表达是作为致癌基因起作用的,有可能肿瘤的发生发展就是致癌的 miRNAs 激活原癌基因,导致基因突变从而发生肿瘤,而 miR-106a 与 c-myc 在结肠癌中是否具有相互促进作用,则需要更多的研究。miR-24-1 通过调节 c-myc 的表达来抑制细胞的增殖。c-myc 表达高的时候,miR-24-1 表达是降低的,c-myc 表达低时 miR-24-1 的表达是升高的,但从本次试验的结果看,miR-24-1 的表达在 c-myc 阳性组和 c-myc 阴性组与正常组织表达无差异,原因可能是 miRNAs 的调控作用具有时段性,某些 miRNAs 在肿瘤的发生阶段出现表达异常,但进入肿瘤后期,基因表达回复到基线。是否如此尚需要更多研究证实。

miR-106a 在结肠癌中高表达,在癌旁组织中表达量极低,miR-106a 有可能作为一致癌基因起作用。而 miR-24-1 在结肠癌中的表达与 c-myc 的表达是否有相关性还需要更多研究。

参考文献:

- [1] Zhou H, Guo JM, Lou YR, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA as a marker[J]. *J Mol Med*, 2010, 88(7): 709-717.
- [2] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522-531.
- [3] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 441-450.
- [4] Perera RJ, Ray A. MicroRNAs in the search for understanding human diseases[J]. *Bio Drugs*, 2007, 21(2): 97-104.
- [5] Li QX, Huang YF, Wei YM, et al. Expression of stem cell-associated genes in colorectal cancer and SW620 cell line[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2011, 15(6): 1015-1019. [李秋娴, 黄颖峰, 魏亚明, 等. 干细胞相关因子在大肠癌组织及 SW620 细胞株的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(6): 1015-1019.]
- [6] Habib T, Park H, Tsang M, et al. Myc stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling[J]. *J Cell Biol*, 2007, 179(4): 717-731.
- [7] Wang Z, Liu M, Zhu H, et al. Suppression of p21 by c-myc through members of miR-17 family at the post-transcriptional level[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(5): 1315-1321.
- [8] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. *JAMA*, 2008, 299(4): 425-436.
- [9] Sun F, Wang J, Pan Q, et al. Characterization of function and regulation of miR-24-1 and miR-31[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(3): 660-665.
- [10] Zhao WY, Wang DD, Song MQ, et al. Role of microRNA-223 and its target gene oncogene c-myc in hepatocellular carcinoma pathogenesis[J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2011, 19(2): 114-117. [赵文月, 王冬冬, 宋孟琦, 等. 微小 RNA-223 及其靶基因 c-myc 在肝脏发病中的作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(2): 114-117.]
- [11] Koppers DA, Hwang HC, Jackson AL, et al. Effect of Xpc1 Activation and p27 Loss on Gene Expression in Murine Lymphoma[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e14758.
- [12] Lal A, Navarro F, Maher CA, et al. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements[J]. *Mol Cell*, 2009, 35(5): 610-625.
- [13] Xiao B, Guo J, Miao Y, et al. Detection of miR-106a in gastric carcinoma and its clinical significance[J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 400(1-2): 97-102.
- [14] Tong AW, Nemunaitis J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy[J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(6): 341-355.
- [15] Diaz R, Silva J, Garcia JM, et al. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47(9): 794-802.

[编辑校对: 黄园玲]