

· 论著 ·

结直肠癌组织中miR-106a、miR-92a、miR-31与其新生血管生成及侵袭转移的关系研究*

姚步月^{1,*} 张笑添² 赵国力² 贾艳梅²

1.山西医科大学汾阳学院生化化学实验室(山西 汾阳 032200)

2.中国医学科学院肿瘤医院山西医院肿瘤科(山西 太原 030013)

【摘要】目的 探究结直肠癌(CRC)癌组织中miR-106a、miR-92a、miR-31与其新生血管生成及侵袭转移的关系。**方法** 选取本院2018年1月至2020年1月诊治的100例结直肠癌患者作为CRC组,另选取同期健康体检者60例作为对照组。全部均行实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测miR-106a、miR-92a、miR-31表达量,采用免疫组化法检测CD34表达,计算微血管密度(MVD);术后随访3年,收集患者肿瘤侵袭转移等资料。分析miR-106a、miR-92a、miR-31与CRC新生血管生成及侵袭转移的关系。**结果** CRC组miR-106a、miR-92a、miR-31表达量及MVD均比对照组高($P<0.05$)。Pearson相关性分析显示,miR-106a、miR-92a、miR-31表达量与CRC患者MVD均呈正相关($P<0.05$)。单因素分析显示,侵袭转移组肿瘤高、中分化程度人数及TNM分期III、IV期人数比未侵袭转移组多,术前miR-106a、miR-92a、miR-31表达量比未侵袭转移组高($P<0.05$)。多元逐步回归分析显示,肿瘤分化程度、TNM分期、术前miR-106a表达量、术前miR-92a表达量、术前miR-31表达量均为CRC患者肿瘤侵袭转移的独立影响因素($P<0.05$)。**结论** 结直肠癌癌组织中miR-106a、miR-92a、miR-31高表达,且与结直肠癌新生血管生成及侵袭转移密切相关。

【关键词】 结直肠癌; 侵袭转移; 血管新生; miR-106a; miR-92a; miR-31

【中图分类号】 R574.63

【文献标识码】 A

【基金项目】 山西省高等学校大学生创新创业训练项目(S20241011401016)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.1.047

Relationship between miR-106a, miR-92a, miR-31 and Neovascularization, Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer Tissues*

YAO Bu-yue^{1,*}, ZHANG Xiao-tian², ZHAO Guo-li², JIA Yan-mei².

1.Biochemical Chemistry Laboratory of Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi Province, China

2.Oncology Department, Chinese Academy of Medical Sciences Cancer Hospital Shanxi Hospital, Taiyuan 030013, Shanxi Province, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between miR-106a, miR-92a, miR-31 and neovascularization, invasion and metastasis in colorectal cancer (CRC). **Methods** 100 patients with colorectal cancer diagnosed and treated in our hospital from January 2018 to January 2020 were selected as CRC group, and another 60 healthy patients during the same period were selected as control group. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression levels of miR-106a, miR-92a and miR-31, and immunohistochemical method was used to detect the expression of CD34, and microvascular density (MVD) was calculated. The data of tumor invasion and metastasis were collected after 3 years of follow-up. The relationship between miR-106a, miR-92a and miR-31 and CRC neovascularization, invasion and metastasis was analyzed. **Results** The expression levels and MVD of miR-106a, miR-92a and miR-31 in CRC group were higher than those in control group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the expression levels of miR-106a, miR-92a and miR-31 were positively correlated with MVD in CRC patients ($P<0.05$). Univariate analysis showed that the number of patients with high and moderate differentiation and the number of patients with TNM stage III and IV in the invasive metastasis group was higher than that in the non-invasive metastasis group, and the preoperative expression levels of miR-106a, miR-92a and miR-31 were higher than those in the non-invasive metastasis group ($P<0.05$). Multiple stepwise regression analysis showed that the degree of tumor differentiation, TNM stage, preoperative miR-106a expression level, preoperative miR-92a expression level, and preoperative miR-31 expression level were all independent influencing factors of tumor invasion and metastasis in CRC patients ($P<0.05$). **Conclusion** miR-106a, miR-92a and miR-31 are highly expressed in colorectal cancer tissues, and are closely related to angiogenesis, invasion and metastasis of colorectal cancer.

Keywords: Colorectal Cancer; Invasion and Metastasis; Angiogenesis; miR-106a; miR-92a; miR-31

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)作为胃肠外科常见恶性肿瘤之一,其发病隐匿,在全球恶性肿瘤死亡原因中高居第3位^[1]。恶性肿瘤一种基本生物学特征为血管新生能力,血管新生过程亦是肿瘤生长、侵袭及转移的关键环节^[2]。CRC属于实体肿瘤,其新生血管丰富,具有活跃血管生成能力及转移能力两大特征。因此,对CRC血管新生情况进行评估有助于指导患者治疗及评价预后。近些年研究指出,miRNA在肿瘤发生发展中具有重要作用,并与其预后密切相关^[3-4]。国内外研究发现,miR-106a、miR-92a、miR-31在CRC癌组织中异常表达,并与肿瘤转移、预后存在一定联系;miR-92a和肿瘤血管新生存在一定关联;miR-31异常表达可致使肿瘤相关基因失活或激活,促进肿瘤侵袭转移^[5-7]。然而,目前临床关于三种癌基因与CRC患者肿瘤相关指

标的联系研究报道较少。基于此,本研究探究CRC癌组织中miR-106a、miR-92a、miR-31与其新生血管生成及侵袭转移的关系。现报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象 选取本院2018年1月至2020年1月诊治的100例结直肠癌患者作为CRC组。

纳入标准:经病理活检证实为CRC;初次确诊;行根治性手术治疗;术前未行放疗及其他抗肿瘤治疗;资料齐全。排除标准:合并其他系统恶性肿瘤;合并结直肠其他类型病变;存在凝血机制异常;术后3年失访。另选取同期健康体检者60例作为对照组,其正常结直肠黏膜组织标本来自本院消化内镜中心。CRC

【第一作者】 姚步月,女,实验师,主要研究方向:疾病生化与分子研究。E-mail: y632355450y@163.com

【通讯作者】 姚步月

组男、女各有54例、46例；年龄38~79(58.96±7.41)岁。对照组男、女各有35例、25例；年龄33~81(59.47±6.92)岁。两组一般资料相比无差异($P>0.05$)，可匹配。

1.2 方法

1.2.1 处理标本，提取RNA CRC组取手术切除的癌组织标本，对照组取内镜中心提供的正常结肠黏膜组织标本，在标本中将1mL Trizol(invitrogen公司)加入，采用经典方法提取总RNA。将适量CRC癌组织标本及内镜中心提供的正常结肠黏膜组织标本放在多聚甲醛中，以便行石蜡包埋。

1.2.2 cDNA逆转录合成 通过RNA电泳证实RN未降解，对所提取的RNA浓度进行测定。1μL Oligo dT18(10pmol)加入2μg RNA，混匀后进行5min 65℃水浴，后立即拿出放在冰上，依次加入5μL 5×缓冲液、2.5μL 10 mmol/L dNTPs、1.0μL 200 U/μL 逆转酶(MMLV)、0.5μL 400 U/μL RNA酶抑制剂，最后加DEPC水至总体积25μL。反应条件：37℃ 1h，95℃ 5min。逆转录产物保存于-80℃冰箱待检。

1.2.3 miR-106a、miR-92a、miR-31实时荧光定量聚合酶链反应(Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 内参照为U6，应用ABI公司生产的Universal PCR Mater Mix试剂盒在ABI Prism 7300型实时荧光定量PCR仪上测定，以cDNA为模板扩增miR-106a、miR-92a、miR-31及U6基因。miR-106a上游引物为 5'-GCGGAAAAGTGCTTACAGTGC-3'，下游引物 5'-CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT-3'；miR-92a上游引物为 5'-ACAGGCCGGGACAAGTGCAATA- 3'，下游引物5'-GCTGTCAACGATACGCTCAGTAAC-3'；miR-31上游引物为 5'-ACGCGGCAAGATGCTGGCA- 3'，下游引物 5'-CAGTGCTGGGTCCGAGTGA-3'；U6上游引物为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3'，下游引物 5'-CGCTTACGAATTTGCGTGTCTAT-3'。反应条件：95℃ 10 min，95℃ 30s，59℃ 60s，共40个循环。miR-106a、miR-92a、miR-31及U6扩增各循环荧光信号应用实时荧光定量PCR仪采集，通过SDS1.4软件分析其 $\Delta\Delta Ct$ 值及相对表达量(relative quantity, RQ)， $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.4 检测CD34，计算微血管密度(microvessel density, MVD)将进行石蜡包埋处理的标本采用免疫组化法测定CD34，检测试

剂盒由福州迈新生物技术开发有限公司生产，严格按试剂盒说明要求操作。CD34标记血管内皮细胞，将染色呈棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞膜作为1个血管记数。2名病理医师分别对每张免疫组化切片进行计数；首先在低倍显微镜下明确3个血管着色最密集处，再在高倍视野下计算微血管，取3个视野平均值作为MVD；若2人计数相差>10%则重新计数；肿瘤内的硬化区域、肿瘤细胞稀少区域内的微血管不进行计数。

1.2.5 治疗及资料收集 全部患者均行CRC根治性手术治疗，术后参照2010版卫生部结肠直肠癌诊疗规范进行治疗，临床病理资料参照UICC第6版标准评估。

1.3 观察指标 (1)比较两组miR-106a、miR-92a、miR-31及MVD。(2)分析miR-106a、miR-92a、miR-31表达量与CRC患者MVD的关系。(3)分析CRC患者肿瘤侵袭转移的单因素。(4)分析CRC患者肿瘤侵袭转移的多因素。

1.4 统计学方法 借助软件SPSS 25.0处理数据。计数资料用n(%)描述，行 χ^2 检验；符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述，行t检验；相关性分析采用Pearson相关性分析；影响因素分析采用多元逐步回归分析；以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结 果

2.1 两组miR-106a、miR-92a、miR-31及MVD比较 CRC组miR-106a、miR-92a、miR-31表达量及MVD均比对照组高($P<0.05$)。见表1。

2.2 miR-106a、miR-92a、miR-31表达量与CRC患者MVD的关系分析 Pearson相关性分析显示，miR-106a、miR-92a、miR-31表达量与CRC患者MVD均呈正相关($P<0.05$)。见表2。

2.3 CRC患者肿瘤侵袭转移的单因素分析 术后随访3年，CRC患者中经增强CT、结肠镜检查等复查确诊侵袭转移者26例。单因素分析显示，侵袭转移组肿瘤高、中分化程度人数及TNM分期III、IV期人数比未侵袭转移组多，术前miR-106a、miR-92a、miR-31表达量比未侵袭转移组高($P<0.05$)。见表3。

2.4 CRC患者肿瘤侵袭转移的多因素分析 将上述有差异的指标(肿瘤分化程度、TNM分期、术前miR-106a表达量、术前miR-92a表达量、术前miR-31表达量)作为自变量，以CRC患者有无肿瘤侵袭转移作为因变量，经多元逐步回归分析显示，肿瘤分化程度、TNM分期、术前miR-106a表达量、术前miR-92a表达量、

表1 两组miR-106a、miR-92a、miR-31及MVD对比

组别	miR-106a表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	miR-92a表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	miR-31表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	MVD
CRC组(n=100)	2.27±0.62	1.03±0.31	3.24±0.75	7.27±2.03
对照组(n=60)	1.41±0.44	0.65±0.11	2.28±0.47	4.59±1.12
t值	9.411	9.146	8.914	9.396
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表2 miR-106a、miR-92a、miR-31与CRC患者MVD的关系分析

指标	r值	P值
miR-106a表达量	0.513	<0.001
miR-92a表达量	0.586	<0.001
miR-31表达量	0.492	<0.001

表4 CRC患者肿瘤侵袭转移的多因素分析

自变量	β /B	SE	Wald χ^2 值	P	OR(95%CI)	VIF
肿瘤分化程度	0.281	0.127	4.896	0.027	1.324(1.033~1.699)	1.714
TNM分期	0.215	0.087	6.107	0.014	1.240(1.045~1.470)	1.763
术前miR-106a表达量	0.641	0.238	7.254	0.007	1.898(1.191~3.027)	1.825
术前miR-92a表达量	1.059	0.283	14.003	<0.001	2.883(1.656~5.021)	1.969
术前miR-31表达量	0.073	0.025	8.526	0.004	1.076(1.024~1.130)	1.837

表3 CRC患者肿瘤侵袭转移的单因素分析[n(%)]

因素	n	侵袭转移组(n=26)	未侵袭转移组(n=74)	χ^2/t 值	P值
性别				0.193	0.661
男	54	15(57.69)	39(52.70)		
女	46	11(42.31)	35(47.30)		
年龄(岁)		59.83±7.52	58.65±7.34	0.701	0.485
肿瘤位置				0.006	0.939
结肠	66	17(65.38)	49(66.22)		
直肠	34	9(34.62)	25(33.78)		
肿瘤直径(cm)				3.022	0.082
<5	71	15(57.69)	56(75.68)		
≥5	29	11(42.31)	18(24.32)		
肿瘤分化程度				6.127	0.013
低、未分化	59	10(38.46)	49(66.22)		
高、中分化	41	16(61.54)	25(33.78)		
TNM分期				8.636	0.003
I、II	59	9(34.62)	50(67.57)		
III、IV	41	17(65.38)	24(32.43)		
术前miR-106a表达量		3.35±0.86	1.89±0.41	11.431	<0.001
术前miR-92a表达量		1.38±0.40	0.91±0.27	6.684	<0.001
术前miR-31表达量		3.75±0.97	3.06±0.71	3.858	<0.001

术前miR-31表达量均为CRC患者肿瘤侵袭转移的独立影响因素($P<0.05$)。见表4。

3 讨论

随着近些年人民饮食习惯变化及生活水平提升, CRC患病人数及病死人数日益增多。大量研究证实, CRC发生发展是一种复杂过程, 和细胞周期调控基因突变、抑癌基因失活及多种癌基因激活密切相关^[8-9]。因此, 探寻CRC与各种基因的关系对临床CRC诊疗及预后评估意义重大。

miR-106a属于重要的癌基因之一, CRC癌组织中miR-106a可由外泌体进入血管内皮细胞, 促使内皮细胞中miR-106a表达量上升, 进而提升内皮细胞迁移能力, 促进其在体外的新生血管成环能力, 提升新生血管通透性, 促使癌细胞更易穿过血管内膜进入循环系统中, 从而促使肿瘤发生转移^[10]。miR-92a属于促癌基因, 亦为miR-17-92基因簇重要成员之一。有研究指出, miR-92a在CRC癌组织及血浆中呈高表达状态, 对CRC癌细胞活力具有增强作用, 并能促进其集落生成^[11]。当前有学者认为miR-92a参与CRC病变的作用机制可能是利用mTOR信号通路对细胞代谢、生长及分裂进行调节, 亦有学者认为其可能是通过下调凋亡蛋白表达水平来发挥作用^[12]。miR-31作为肿瘤相关热点基因, 在多种肿瘤生长、侵袭及转移中起着重要作用, 并具备胚胎着床等调节功能。有研究指出, miR-31高表达可利用靶向张力蛋白1对肿瘤免疫浸润产生一定影响, 促进CRC细胞恶性生物学行为^[13]。

血管新生不仅可为肿瘤生长提供充足养分, 还能成为其转移的重要通道。在CRC侵袭转移中血管新生起着重要作用。有研究指出, miRNA对血管生成因子及蛋白激酶具有靶向调控作用, 可抑制或促进肿瘤血管新生^[14]。Shaker等^[15]报道, CRC患者中miR-106a呈高表达状态。王林刚等^[16]对90例CRC患者进行研究, 发现患者癌组织中miR-92a相对表达量比癌旁组织的明显高。赵芝等^[17]指出, CRC癌组织中miR-31表达量明显高于癌旁组织。本研究中, CRC组miR-106a、miR-92a、miR-31表达量比对照组高, 与上述报道类似, 说明CRC癌组织中miR-106a、miR-92a、miR-31高表达。肿瘤MVD值作为一种定量指标, 可对血管生成活跃程度进行衡量, 亦是血管生成状态的重要反映指标。本研究中, CRC组MVD比对照组高; Pearson相关性分析显示, miR-106a、miR-92a、miR-31表达量与CRC患者MVD均呈正相关, 提示CRC癌组织中新血管生成能力增强, miR-106a、miR-92a、miR-31表达上调会促进肿瘤血管新生。

肿瘤侵袭转移和miRNA存在一定关联。Salgado-García等^[18]指出, miR-106a可通过调控Unc-51样自噬激活酶1影响参与CRC肿瘤细胞增殖、侵袭及转移。张志勇等^[19]报道, CRC癌组织中miR-92a表达上调, 并和肿瘤MVD形成及侵袭转移密切相关。miR-92a对磷酸酶及张力蛋白同源性蛋白表达具有靶向调节作用, 可负性调节PI3K/Akt信号通路中磷酸化蛋白表达, 最终影响肿瘤细胞增殖、侵袭及转移^[20]。孙剑等^[21]报道, CRC癌组织中miR-31表达上调, 与肿瘤侵袭转移有关。miR-31可不完全配对靶向mRNA 3非编码区域, 使其翻译过程被阻断, 靶向mRNA表达下调; 完全配对靶向mRNA 3非编码区域, 特异性阻断靶基因互补区, 发生基因沉默而无法表达^[22]。本研究中, 侵袭转移组肿瘤高、中分化程度人数及TNM分期III、IV期人数比未侵袭转移组多, 术前miR-106a、miR-92a、miR-31表达量比未侵袭转移组高; 进一步回归分析显示, 肿瘤分化程度、TNM分期、术前miR-106a表达量、术前miR-92a表达量、术前miR-31表达量均为CRC患者肿瘤侵袭转移的独立影响因素, 提示CRC恶性程度愈高, TNM分期愈高, 术前miR-106a、miR-92a、miR-31表达量愈高, 患者更易出现侵袭转移。

综上所述, 结直肠癌癌组织中miR-106a、miR-92a、miR-31高表达, 且与结直肠癌新生血管生成及侵袭转移密切相关。

参考文献

- [1] 蒋志国, 宋玲玲, 胡春玲. CT三维血管重建联合高分辨率磁共振成像评估结直肠癌新辅助化疗后分期的准确性[J]. 罕少疾病杂志, 2024, 31(7): 104-106.
- [2] 刘少平, 胡亚华, 张海, 等. miR-497抑制人结肠癌细胞血管生成及迁移侵袭能力的研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2021, 30(6): 667-670.
- [3] 陈素华, 马天江, 张智慧, 等. 长链非编码RNA LINC01419调控结直肠癌细胞增殖, 凋亡, 迁移侵袭的机制[J]. 安徽医药, 2022, 26(3): 572-577.
- [4] 李昊, 余昌勇, 秦鲜, 等. circ-0072083靶向miR-142-3p调控结直肠癌细胞增殖, 侵袭和迁移[J]. 河北医药, 2023, 45(4): 509-512, 517.
- [5] Ranjbaran J, Safarpour H, Nomiri S, et al. Experimental validation of in silico analysis estimated the reverse effect of upregulated hsa-miR-106a-5p and hsa-miR-223-3p on SLC44A gene expression in Iranian patients with colorectal adenocarcinoma by RT-qPCR[J]. Cancer Med, 2023, 12(6): 7005-7018.
- [6] 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.
- [7] 张文琴, 都新新, 张一楠, 等. miR-31靶向SATB2对结肠癌上皮细胞HCT116焦亡的促进作用[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(11): 1310-1316.
- [8] 朱文玲, 李雨蒙, 岳思宇. 双能CT联合临床病理特征预测结直肠癌Ki-67表达的价值[J]. 中国CT和MRI杂志, 2024, 22(2): 142-145.
- [9] 王梅, 张琳, 崔发财, 等. MiR-96和miR-424-5p在结直肠癌患者血清中的表达水平及临床意义[J]. 中华全科医学, 2022, 20(5): 828-831.
- [10] Silva CMS, Barros-Filho MC, Wong DVT, et al. Circulating let-7e-5p, miR-106a-5p, miR-28-3p, and miR-542-5p as a promising microRNA signature for the detection of colorectal cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(7): 1493.
- [11] Li L, Zhang J, Peng H, et al. Knockdown of miR-92a suppresses the stemness of colorectal cancer cells via mediating SOCS3[J]. Bioengineering, 2022, 13(3): 5613-5624.
- [12] 仇俊兰, 何素梅, 陈琦, 等. 结直肠癌患者血清中微小RNA-29a, 微小RNA-92a和癌胚抗原的表达及临床意义[J]. 兰州大学学报, 2020, 46(6): 51-55.
- [13] Moloudizargari M, Rahmani J, Asghari MH, et al. The prognostic role of miR-31 in colorectal cancer: the results of a meta-analysis of 4720 patients[J]. Epigenomics, 2022, 14(2): 101-112.
- [14] 梅娟娟, 曹国军, 贺红成, 等. 长链非编码RNA ALMS1-IT1通过调控miRNA-889-3p, ATAD2表达对结直肠癌细胞增殖和迁移的影响[J]. 肿瘤研究与临床, 2021, 33(11): 818-823.
- [15] Shaker OG, Ali MA, Ahmed TI, et al. Association between LINC00657 and miR-106a serum expression levels and susceptibility to colorectal cancer, adenomatous polyposis, and ulcerative colitis in Egyptian population[J]. IUBMB Life, 2019, 71(9): 1322-1335.
- [16] 王林刚, 杜三威, 任家正. miR-92a在结直肠癌组织中表达与肿瘤恶性指标的关系及对预后的预测价值[J]. 实验与检验医学, 2020, 38(5): 1024-1026, 1029.
- [17] 赵芝, 张刚, 李哲丽, 等. 结直肠癌组织LncRNA MEG3, miR-31表达及与病理特征的相关性[J]. 解放军医药杂志, 2022, 34(7): 39-43.
- [18] Salgado-García R, Coronel-Hernández J, Delgado-Waldo I, et al. Negative regulation of ULK1 by microRNA-106a in autophagy induced by a triple drug combination in colorectal cancer cells in vitro[J]. Genes (Basel). 2021, 12(2): 245.
- [19] 张志勇, 丁惠娟, 王伟民. miR-92a表达与结直肠癌病理学特征及MVD形成的关系[J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(3): 399-402.
- [20] Zaki A, Fawzy A, Akel SY, et al. Evaluation of microRNA 92a expression and its target protein bim in colorectal cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2022, 23(2): 723-730.
- [21] 孙剑, 高杨, 康荣基, 等. LINC00261和miR-31在结直肠癌组织中的表达及与临床病理特征的相关性[J]. 临床误诊误治, 2021, 34(11): 44-48.
- [22] Bin H, Mei H, Hui W, et al. The correlation between miR-34a-3p, miR-31, PLEK2 and the occurrence, development and prognosis of colorectal cancer[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2022, 68(1): 192-200.

(收稿日期: 2023-05-25)

(校对编辑: 姚丽娜)