

张佳佳, 赵剑, 刘冬梅, 等. miR-21 与 CCL20 在结直肠癌微环境中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. 中南医学科学杂志, 2025, 53(6): 1019-1022.

DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2025.06.019

· 临床医学 ·

miR-21 与 CCL20 在结直肠癌微环境中的表达及其与临床病理特征的关系

张佳佳¹, 赵剑², 刘冬梅¹, 韩冰¹

1. 辽宁电力中心医院, 辽宁沈阳 110004; 2. 辽宁省肿瘤医院, 辽宁沈阳 110004

[摘要] 目的 探究 miR-21 与 CCL20 在结直肠癌微环境中的表达及其与临床病理特征的关系。方法 选择结直肠癌 (CRC) 患者 96 例, 取肿瘤组织和癌旁正常组织, 检测样本中 CCL20 mRNA 和蛋白表达情况、miR-21 表达情况, 并比较不同病理特征患者 CCL20 和 miR-21 的表达差异。采用免疫组化和原位杂交对样本中的 CCL20 和 miR-21 进行定位, 比较其差异。结果 与癌旁正常组织相比, CRC 肿瘤组织中 CCL20 (mRNA 和蛋白) 和 miR-21 表达水平均显著上调 ($P < 0.05$)。CCL20 mRNA、蛋白及 miR-21 的表达水平均在中晚期患者的肿瘤组织中显著高于早期患者 (均 $P < 0.05$)。细胞定位结果显示, CCL20 主要在肿瘤微环境中的浸润免疫细胞 (如巨噬细胞/淋巴细胞) 中呈强阳性, 而在肿瘤细胞中表达较低; miR-21 主要在肿瘤相关成纤维细胞中呈强阳性, 在肿瘤细胞中亦表达较低。结论 miR-21 和 CCL20 在 CRC 组织中均显著上调, 与 CRC 分期和分化相关; CCL-20 主要表达于浸润免疫细胞, miR-21 主要表达于肿瘤相关成纤维细胞。

[关键词] miR-21; CCL20; 结直肠癌; 肿瘤微环境

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

Expression of miR-21 and CCL20 in the colorectal cancer microenvironment and their correlation with clinicopathological characteristics

ZHANG Jiajia¹, ZHAO Jian², LIU Dongmei¹, HAN Bing¹

1. Liaoning Electric Power Central Hospital, Shenyang 110004, Liaoning, China; 2. Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110004, Liaoning, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of miR-21 and CCL20 in the colorectal cancer microenvironment and their correlation with clinicopathological characteristics. **Methods** Ninety-six patients with colorectal cancer (CRC) were selected. Tumor tissues and adjacent normal tissues were collected. The expression of CCL20 mRNA and protein, as well as miR-21, was detected and compared among patients with different pathological features. Immunohistochemistry and in situ hybridization were used to localize CCL20 and miR-21, and their differences were compared.

Results Compared with adjacent normal tissues, the expression levels of CCL20 (mRNA and protein) and miR-21 were significantly upregulated in CRC tumor tissues (all $P < 0.05$). The expression levels of CCL20 mRNA, protein, and miR-21 were significantly higher in tumor tissues of patients with advanced stages than in those with early stages (all $P < 0.05$). Cellular localization showed that CCL20 was strongly positive in infiltrating immune cells (such as macrophages and lymphocytes) within the tumor microenvironment but weakly expressed in tumor cells; miR-21 was strongly positive in tumor-associated fibroblasts but weakly expressed in tumor cells.

Conclusion miR-21 and CCL20 are significantly upregulated in CRC tissues and are associated with CRC stage and differentiation. CCL20 is mainly expressed in infiltrating immune cells, whereas miR-21 is mainly expressed in tumor-associated fibroblasts.

[KEY WORDS] miR-21; CCL20; colorectal cancer; tumor microenvironment

microRNA (miRNA) 是一类长度约为 19 ~ 25 个核苷酸的内源性非编码 RNA 分子, 参与基因表达的转录后调控^[1-2], 其通过与 RNA 诱导沉默复合物结合介导调控功能^[3-4], 在转录后水平广泛影响基因

表达。自 miRNA 被发现以来, 其表达异常与肿瘤发生发展的关系一直是研究热点。近年研究表明, miRNA 的失调在多种癌症的发生、进展及预后中具有关键作用, 例如在乳腺癌中抑制特定 miRNA 可降

[收稿日期] 2025-02-10

[修回日期] 2025-09-22

[基金项目] 白求恩公益基金会资助项目 (HSKY-017)

[作者简介] 张佳佳, 硕士, 副主任医师, 研究方向为肿瘤早筛, E-mail 为 lndlzxyzzj@163.com。

低肿瘤细胞增殖、迁移及肿瘤生长能力^[5]。值得注意的是,多种 miRNA(如 miR-21)被证实可靶向调控不同癌症中的趋化因子^[6]。其中,趋化因子 20(chemokine 20, CCL20)通过与其受体 CCR6 相互作用,在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的进展和转移过程中发挥重要作用^[7]。近期研究发现, CCL20 是 miR-21 的靶基因,二者相互作用影响其生物学功能^[8],但该调控关系依赖于两者在同一细胞内的共定位。因此,明确 miR-21 与 CCL20 在结直肠癌组织中的表达模式及细胞分布具有重要研究意义。本研究旨在阐明 miR-21 及其靶基因 CCL20 在结直肠癌肿瘤微环境中的表达特征、细胞定位及其与临床病理特征的关系,以探索其在该肿瘤发生发展中的潜在生物学功能。

1 资料和方法

1.1 病例选择

选择 2020 年 1 月—2024 年 5 月本院接受手术治疗的结直肠癌患者 96 例,男性 58 例,女性 38 例,手术时年龄(63.58±8.41)岁;原发肿瘤位于结肠和直肠各 48 例;肿瘤浸润程度早期 T1 17 例、T2 25 例,中晚期 T3 33 例、T4 21 例;淋巴结阳性 54 例、阴性 42 例;AJCC 分期早期 I 期 33 例、II 期 15 例,中晚期 III 期 35 例、IV 期 13 例;病理分级早期 G1 8 例、G2 40 例,中晚期 G3 44 例、G4 4 例。纳入标准:确诊结直肠癌;接受手术治疗,并取得病灶及周围癌旁正常组织样本;术前未接受过任何癌症治疗,包括手术、放疗、化疗、免疫治疗等;所有患者均知情同意进行组织取样。排除标准:其他恶性肿瘤病史;严重心、肝、肾功能不全或其他重大系统性疾病;免疫缺陷或自身免疫性疾病;组织样本质量不合格(如污染或降解);临床资料不完整。本研究方案已经过医院伦理审批通过。

1.2 主要仪器和试剂

总 RNA 提取试剂盒(mirVana miRNA 分离试剂盒)、BCA 蛋白检测试剂盒(Pierce)、microRNA 原位杂交试剂(PrimeFlow™ RNA 检测试剂盒,货号 88-18005-204)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;反转录试剂盒(货号 RR036Q)购自日本 TaKaRa Bio 公司;CCL20 ELISA 试剂盒(货号 RK00207)购自爱博泰克生物科技公司;RIPA 裂解液及 CCL20 IHC 试剂盒(货号 KHC0407)购于武汉三鹰生物公司;SSC 缓冲液购于生工生物公司;内源性碱性磷酸酶封闭液(20X)购于碧云天生物技术公司。

1.3 样本处理

手术切除的组织标本经液氮快速冷冻后于 -80 °C 保存,所有操作均在无核酸酶条件下进行;病灶癌旁正常组织取自同一切除样本的邻近未受影响区域,所有组织均由经验丰富的医师评估,确保肿瘤组织中肿瘤区域占比≥70%。

1.4 miR-21 和 CCL20 mRNA 表达的检测

样本经预处理后,采用 miRNA 专用试剂盒提取总 RNA;通过分光光度法与琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 质量检测;合格样本使用反转录试剂盒合成 cDNA。所有操作依据试剂盒说明书进行。随后通过荧光实时 PCR 对 CCL20 mRNA 和 miR-21 进行定量分析。引物序列 miR-21 正向 5'-CCTGCCTGAG-CACCTCGTGC-3',反向 5'-GACTGTGACGACTAC-CCCAA-3',扩增产物 75 bp;CCL20 正向 5'-ATC-CAAAACAGACTTGGGTGAA-3',反向 5'-TCCATTC-CAGAAAAGCCACA-3',扩增产物 89 bp;退火温度均为 60 °C。

1.5 CCL20 蛋白表达水平的检测

取样本组织,采用 RIPA 裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂)充分裂解以获得总蛋白提取物,经离心(12 000×g,4 °C,15 min)去除沉淀后,使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测上清液中总蛋白水平。随后使用三明治型酶联免疫吸附试验(ELISA)测定不同组织裂解液中的 CCL20 蛋白水平,全部操作按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.6 CCL20 和 miR-21 细胞定位的检测

手术切除样本经福尔马林固定、石蜡包埋后,制备 4 μm 切片并贴附于载玻片。切片经清洗封闭后,采用 CCL20 IHC 试剂盒进行免疫组化染色以定位 CCL20,以未加一抗的样本作为阴性对照。miR-21 检测通过 microRNA 原位杂交(PrimeFlow™ RNA 检测试剂盒)完成,操作严格遵循说明书,以 U6 snRNA 探针作为阳性对照,以 scrambled 探针(不与内源 miRNA 互补)作为阴性对照,确保定位结果特异性。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同临床特征 CRC 患者 CCL20 mRNA 和蛋白表达的比较

与癌旁正常组织相比,肿瘤组织中 CCL20

mRNA 和蛋白表达均显著增加 ($P < 0.05$)。与早期肿瘤组织相比,中晚期肿瘤组织中 CCL20 mRNA 和蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1 不同临床特征 CRC 患者 CCL20 mRNA 和蛋白表达的比较

指标	CCL20 mRNA		CCL20 蛋白/($\mu\text{g/L}$)	
	癌旁正常组织	肿瘤组织	癌旁正常组织	肿瘤组织
浸润程度				
T1+T2	4.55 \pm 1.15	11.33 \pm 4.12 ^a	1.93 \pm 0.76	4.56 \pm 1.80 ^a
T3+T4	4.38 \pm 0.98	16.07 \pm 3.98 ^{ab}	1.72 \pm 0.58	7.81 \pm 2.25 ^{ab}
AJCC 分期				
I+II	4.21 \pm 1.08	13.64 \pm 3.85 ^a	1.85 \pm 0.69	4.88 \pm 1.95 ^a
III+IV	4.88 \pm 0.85	15.47 \pm 4.54 ^{ab}	1.77 \pm 0.73	7.92 \pm 2.05 ^{ab}
病理分级				
G1+G2	4.42 \pm 0.79	12.46 \pm 3.46 ^a	1.79 \pm 0.61	4.77 \pm 1.70 ^a
G3+G4	4.61 \pm 1.10	16.13 \pm 4.74 ^{ab}	1.83 \pm 0.75	8.03 \pm 2.30 ^{ab}

注:a 为 $P < 0.05$, 与癌旁正常组织比较; b 为 $P < 0.05$, 分层间比较。

2.2 不同临床特征 CRC 患者 miR-21 表达的比较

与癌旁正常组织相比,CRC 肿瘤组织中 miR-21 表达增加 ($P < 0.05$)。与早期肿瘤组织相比,中晚期肿瘤组织中 miR-21 表达升高 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2 不同临床特征 CRC 患者 miR-21 表达的比较

指标	癌旁正常组织	肿瘤组织
浸润程度		
T1+T2	1.09 \pm 0.44	1.36 \pm 0.78 ^a
T3+T4	1.16 \pm 0.38	2.75 \pm 2.33 ^{ab}
AJCC 分期		
I+II	1.03 \pm 0.41	2.04 \pm 1.42 ^a
III+IV	1.15 \pm 0.36	2.63 \pm 1.33 ^{ab}
病理分级		
G1+G2	1.08 \pm 0.47	2.10 \pm 0.94 ^a
G3+G4	1.13 \pm 0.39	2.57 \pm 1.15 ^{ab}

注:a 为 $P < 0.05$, 与癌旁正常组织比较; b 为 $P < 0.05$, 分层间比较。

2.3 CCL20 和 miR-21 的细胞定位

癌旁正常组织中,CCL20 主要在黏膜上皮细胞和正常间充质细胞中呈现阳性信号,且间充质细胞中弱于黏膜上皮细胞。miR-21 在癌旁正常组织的黏膜上皮细胞和正常间充质细胞中信号均较弱。尽管 CCL20 和 miR-21 在 CRC 组织中的总体表达量显著上升,但免疫组化和原位杂交结果显示,CCL20 的阳性信号在肿瘤细胞区域较弱,在间充质区域的巨噬细胞或淋巴细胞等浸润免疫细胞中较强。miR-21 探针的阳性反应也仅限于 CRC 肿瘤组织的间充

质区域,特别是肿瘤相关成纤维细胞,而在 CRC 细胞中未观察到 miR-21 阳性,或观察到呈弱表达。在阴性对照中未检测到信号,与 U6 snRNA 互补的探针原位杂交在大多数核中呈阳性。

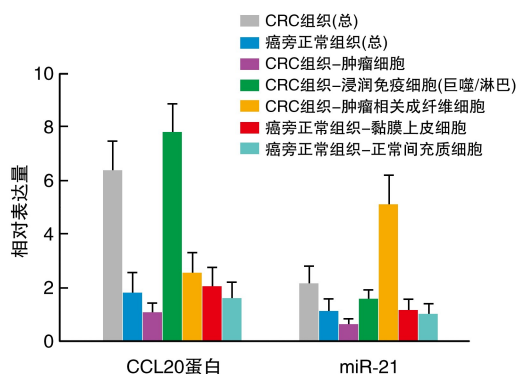


图 1 CCL20 蛋白和 miR-21 在 CRC 组织和癌旁正常组织中表达的细胞定位

3 讨论

miRNA 作为促癌或抑癌因子参与肿瘤发生发展已被多项研究证实^[9-11]。近期研究进一步显示,位于染色体 17p23.2 脆性位点 FRA17B 上的 miR-21 在多种肿瘤中存在显著扩增^[12],且与 CCL20 在肿瘤细胞系中具有相互作用,提示 CCL20 的表达可能受 miR-21 调控^[13]。在结直肠癌组织中的研究也表明,CCL20 与 miR-21 表达均显著上调^[14]。本研究发现,与癌旁正常组织相比,CRC 肿瘤组织中 miR-21 表达升高;中晚期患者肿瘤组织中的 miR-21 表达也显著高于早期患者,这些结果与文献^[15-16]发现一致,进一步支持 miR-21 与 CCL20 的高表达可能共同参与 CRC 侵袭与转移过程。

本研究发现,CRC 组织中 CCL20 和 miR-21 的表达水平均显著上调。定位结果显示,miR-21 主要在间充质区域表达,尤其富集于肿瘤相关成纤维细胞及少数浸润性免疫细胞中,而在 CRC 肿瘤细胞中几乎不表达或呈弱表达。这表明 miR-21 的上调主要来源于肿瘤微环境中的细胞,而非肿瘤细胞本身。既往研究已证实,miR-21 可通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合,抑制靶基因表达并影响后续一系列生物学效应^[17]。结合本研究结果,推测 CRC 细胞可能通过分泌细胞因子或外泌体等信号,诱导周围成纤维细胞高表达 miR-21,从而促进其活化和基质重塑。成纤维细胞分泌的细胞外基质成分和促炎性细胞因子可进一步支持肿瘤细胞的侵袭与迁移,形成恶性循环^[18],加剧肿瘤进展。

本研究进一步发现,CCL20 的强阳性信号主要位于肿瘤微环境中的浸润免疫细胞(如巨噬细胞和淋巴细胞),而在肿瘤细胞中表达较低。这一特征提示 CCL20 的上调并非源于肿瘤细胞,而可能由免疫细胞介导。CCL20 是趋化因子家族的重要成员,其主要功能是通过与 C-C 趋化因子受体 6(CCR6)结合,募集 Th17 细胞、调节性 T 细胞及树突状细胞等进入肿瘤微环境,形成慢性炎症状态^[19-20]。有研究报道,miR-21 可通过抑制多种肿瘤抑制基因(如 PTEN、PDCD4、RECK 等)激活下游核因子- κ B 和信号转导及转录激活蛋白 3(STAT3)信号通路^[9-11],间接促进包括 CCL20 在内的炎症相关因子分泌。由此推测,miR-21 与 CCL20 之间的关系可能并非单纯的靶向抑制,而是通过影响免疫细胞的活化状态与细胞因子网络实现间接调控。与此同时,CCL20 的高表达又可进一步促进免疫细胞浸润,形成持续的促炎微环境,推动 CRC 进展。

综合本研究结果与既往报道,miR-21 与 CCL20 在结肠直肠癌中可能构成重要的炎症调控环节;miR-21 在肿瘤相关成纤维细胞中过度表达,通过改变细胞因子谱促进免疫细胞活化;CCL20 则由这些免疫细胞分泌,进一步招募 CCR6 阳性细胞进入肿瘤微环境,形成正反馈回路,促进肿瘤炎症与转移进程。该机制不仅揭示了间质细胞在 CRC 微环境中的积极作用,也提示 miR-21/CCL20 轴可能参与肿瘤免疫逃逸。未来研究可借助体外共培养和动物模型进一步验证 miR-21 调控 CCL20 的具体分子机制,并探索抑制该通路是否能够逆转肿瘤免疫抑制状态或提高免疫治疗敏感性。

综上所述,miR-21 和 CCL20 在 CRC 组织中均显著上调,与 CRC 分期和分化程度相关;二者未在同一细胞中表达,CCL20 主要表达于肿瘤微环境中的浸润免疫细胞,miR-21 主要表达于肿瘤相关成纤维细胞。这一发现为深入理解 miRNA 与趋化因子在肿瘤免疫微环境中的交互作用提供了新线索。

[参考文献]

- [1] WU Y, XIE Z, DENG S, et al. MicroRNA-96 in human cancers[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2023, 26(7): 1285-1297.
- [2] 崔秋利, 赵云清. miRNA-21 在急性心肌梗死发生、发展中的作用机制[J]. 医学临床研究, 2023, 40(4): 600-603.
- [3] GRASSO G, KIERNAN R. The polyvalent role of NF90 in RNA biology[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21): 13584.
- [4] MIN K W, JO M H, SONG M, et al. Mature microRNA-binding protein QKI promotes microRNA-mediated gene silencing[J]. RNA Biol, 2024, 21(1): 1-15.
- [5] 吕爽, 贾永峰, 包玉龙, 等. 不同乳腺癌细胞株胞外囊泡特性和差异 miRNA 自噬通路靶基因分析[J]. 实用癌症杂志, 2024, 39(7): 1054-1060.
- [6] MORTOGLOU M, MIRALLES F, ARISAN E D, et al. microRNA-21 regulates stemness in pancreatic ductal adenocarcinoma cells[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1275.
- [7] HANNA D N, SMITH P M, NOVITSKIY S V, et al. SMAD4 suppresses colitis-associated carcinoma through inhibition of CCL20/CCR6-mediated inflammation[J]. Gastroenterology, 2022, 163(5): 1334-1350.
- [8] 王佳, 林雪容, 高恒波, 等. miR-21 靶向 CCL20 及 PDCD4 对腺毒症大鼠心肌中细胞凋亡及炎症反应的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(4): 389-394.
- [9] SINGH A, SINGH A K, GIRI R, et al. The role of microRNA-21 in the onset and progression of cancer[J]. Future Med Chem, 2021, 13(21): 1885-1906.
- [10] WANG H, ZHOU Z, LIN W, et al. MicroRNA-21 promotes head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) induced transition of bone marrow mesenchymal stem cells to cancer-associated fibroblasts[J]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 1135.
- [11] 魏文渊, 栗东海, 孙佳鑫, 等. microRNA-125b 与乳腺癌的发生发展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2023, 32(6): 628-635.
- [12] HUANG X, ZHANG W, PU F, et al. LncRNA MEG3 promotes chemosensitivity of osteosarcoma by regulating antitumor immunity via miR-21-5p/p53 pathway and autophagy[J]. Genes Dis, 2023, 10(2): 531-541.
- [13] HU Y, XIAO M, ZHANG D, et al. Comprehensive analysis of chemokines family and related regulatory ceRNA network in lung adenocarcinoma[J]. Heliyon, 2022, 8(11): e11399.
- [14] JIA S N, HAN Y B, YANG R, et al. Chemokines in colon cancer progression[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86: 400-407.
- [15] RATTAN NEGI R, RANA S V, GUPTA V, et al. Evaluation of the plasma expression levels of miR-21 and miR-145 as potential non-invasive biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2024, 25(8): 2797-2804.
- [16] 胡立宏, 潘雪峰, 关佳恒, 等. 结肠直肠癌患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与 Wnt/ β -catenin 信号通路和预后的关系分析[J]. 疑难病杂志, 2023, 22(4): 383-389.
- [17] YU H, PAN J, ZHENG S, et al. Hepatocellular carcinoma cell-derived exosomal miR-21-5p induces macrophage M2 polarization by targeting RhoB[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4593.
- [18] BARKLEY D, MONCADA R, POUR M, et al. Cancer cell states recur across tumor types and form specific interactions with the tumor microenvironment[J]. Nat Genet, 2022, 54(8): 1192-1201.
- [19] 刘欣欣, 姚欣卉, 孙跃峰, 等. 乳腺癌微环境中趋化因子 CCL20 作用的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2022, 36(3): 250-254.
- [20] KFOURY Y, BARYAWNO N, SEVERE N, et al. Human prostate cancer bone metastases have an actionable immunosuppressive microenvironment[J]. Cancer Cell, 2021, 39(11): 1464-1478.

(此文编辑 朱雯霞)