

miR-196a 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

章海燕¹, 刘连科², 束永前², 杨丰名²

1. 沭阳县人民医院肿瘤血液科, 江苏 沭阳 223600;

2. 南京医科大学第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 探讨微小核糖核酸-196a (microRNA-196a, miR-196a) 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的表达水平及其相应临床意义。**方法** 从 44 例 NSCLC 组织及其相应癌旁组织中提取总 RNA, 并使用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 技术检测 miR-196a 的相对表达量, 分析 NSCLC 患者临床 TNM 分期及无病生存期 (DFS) 与 miR-196a 表达水平之间的关系。**结果** miR-196a 在 86.36% (38/44) 的 NSCLC 组织中相对高表达; 临床分期 III 期 + IV 期的 NSCLC 患者肿瘤组织中 miR-196a 的相对表达量 (153.87 ± 32.57) 显著高于 I 期 (88.99 ± 35.89) 及 II 期患者 (96.37 ± 46.53) 的相对表达量 (P 均 < 0.01)。肿瘤组织中 miR-196a 高表达的 NSCLC 患者其中位 DFS (15 个月) 显著短于 miR-196a 低表达患者 (27 个月, $P < 0.05$)。**结论** NSCLC 组织中 miR-196a 高表达提示临床预后不佳, miR-196a 有望作为 NSCLC 预后预测的分子标志物。

关键词: 非小细胞肺癌; 微小核糖核酸; 微小核糖核酸-196a; 肿瘤侵袭; TNM 分期; 无病生存期

中图分类号: R 734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)10-1330-03

Expression of miR-196a in non-small cell lung cancer and its clinical significance

ZHANG Hai-yan*, LIU Lian-ke, SHU Yong-qian, YANG Feng-ming

* Department of Oncology and Hematology, Shuyang People's Hospital, Shuyang, Jiangsu 223600, China

Corresponding author: YANG Feng-ming, E-mail: yfmdoctor@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression level of micro ribonucleic acid (microRNA-196a, miR-196a) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its clinical significance. **Methods** Total RNA was extracted from 44 cancer tissues and corresponding paracancerous tissues specimens of NSCLC. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the relative expression levels of miR-196a. The association of clinical TNM staging and disease-free survival (DFS) with miR-196a expression were analyzed. **Results** A relative higher expression of miR-196a presented in 86.36% (38/44) of NSCLC samples, and its expression level was significantly higher in NSCLC tissues of clinical stage III and IV than those of stage I and II [(153.87 ± 32.57) vs (88.99 ± 35.89) , (153.87 ± 32.57) vs (96.37 ± 46.53) , all $P < 0.01$]. The median DFS of patients with miR-196a high-expression in tumor tissues (15 months) was significantly less than that of patients with miR-196a low-expression in tumor tissues (27 months, $P < 0.05$). **Conclusion** The high-expression level of miR-196a in NSCLC tissues prompts the poor clinical prognosis, and miR-196a is expected to serve as a molecular marker predicting the prognosis of NSCLC patients.

Key words: Non-small cell lung cancer; Micro ribonucleic acid; Micro ribonucleic acid-196a; Tumor invasion; TNM staging; Disease-free survival

肺癌是我国发病率及死亡率均排名第一的恶性肿瘤, 且其发病率呈逐年上升趋势^[1]。其中非小细胞肺癌 (NSCLC) 占肺癌总数的 80% ~ 85% 左右, 其 5 年生存率仅约为 11%^[2]。近年有研究表明微小核糖核酸 (MicroRNA, miRNA) 可参与细胞的增殖和凋亡,

与肿瘤的发生、侵袭和转移等过程密切相关^[3]。检测患者穿刺或活检组织、外周血中的 miRNAs 的表达可预测或辅助肿瘤的诊断^[4-5]。miRNA-196a (miR-196a) 作为一种较为重要的潜在致癌分子, 其在食管癌、胃癌、肝癌等恶性肿瘤中的研究较多^[6], 但有关 miR-196a 在 NSCLC 中的表达及其临床意义的研究极少。本研究通过检测 miR-196a 在 NSCLC 组织中的表达水平并结合患者临床资料进行分析, 进而研究 miR-196a 在 NSCLC 中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究使用的 44 对 NSCLC 肿瘤组织、癌旁对照组织及相应临床资料均来自南京医科大学第一附属医院,其中对照组织取自离病灶 5 cm 以上的癌旁正常肺泡组织。样本的采集和使用经过南京医科大学伦理委员会批准。样本在标准手术切除后 30 min 内采用无菌、无核酸酶水冲洗,并放于冻存管经液氮冷冻后保存于 -80℃ 冰箱。所有肿瘤组织和癌旁组织均经过了严格的病理诊断,并按照 TNM 分期标准对肿瘤样本进行分期。患者在术前均未接受过放疗、化疗或者分子靶向治疗在内的局部或全身治疗。入选的 44 例患者平均年龄为 63.5 岁;其中男性 34 例,女性 10 例,男女性别比例为 3.4:1;根据 TNM 分期标准,ⅠA 期 13 例,ⅠB 期 9 例,ⅡA 期 7 例,ⅡB 期 6 例,ⅢA 期 5 例,ⅢB 期 2 例,Ⅳ 期 2 例;根据分化程度,低分化 13 例,中分化 15 例,高分化 16 例;根据病理类型,腺癌 25 例,鳞癌 19 例。

1.2 实验方法 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-196a 的表达:使用 TRIzol 试剂从肺癌组织及癌旁组织中提取总 RNA;取总 RNA 2 μg,以 37℃ 60 min,85℃ 25 min 为反应条件进行逆转录反应;取逆转录产物 cDNA 2 μl 进行 qRT-PCR 反应,每个样本设置 3 个复孔,反应条件:95℃ 预变性 10 min,然后按 95℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 10 s 一个循环,进行 40 个循环,在反应体系中加入 SYBR 荧光染料试剂(Takara 公司),每循环 1 次收集 1 个荧光强度数据,建立实时扩增曲线,其产物荧光强度与其表达量,即模板中目的基因的丰度呈正相关,以上各步骤均严格按照说明书进行。待反应结束后检测各模板的 Ct 值,并应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 标准化法计算组织中 miR-196a 表达的相对值。

1.3 随访 通过调取病例资料及严格电话随访,并详细记录每次随访相关信息,获取患者的无病生存期(DFS),并将其作为主要的预后观察指标用于生存分析,DFS 的计算方法为手术日期直至疾病复发。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 版本软件分析所得数据。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验;生存分析采用 Kaplan-Meier 法。当 $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-196a 表达量与患者临床特征的相关性 TNM 临床分期与 miR-196a 相对表达量存在相关性,

即Ⅲ期 + Ⅳ 期较 Ⅰ 期 + Ⅱ 期患者 miR-196a 相对表达量增高($P < 0.01$)。不同年龄、性别、组织分型组间比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.2 NSCLC 组织中 miR-196a 的表达 采用 qRT-PCR 技术,以 U6 作为内参,检测 miR-196a 的表达,进而分析 NSCLC 组织和癌旁组织的相对表达量。miR-196a 在 86.36% (38/42) 的样本中高表达;在 NSCLC 组织中的相对表达量为: 104.44 ± 45.64 ,在癌旁组织中的相对表达量为: 25.60 ± 15.18 ,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

2.3 NSCLC 组织中 miR-196a 的表达与临床分期相关 miR-196a 在临床分期 Ⅰ 期及 Ⅱ 期 NSCLC 组织中的相对表达量为: 88.99 ± 35.89 和 96.37 ± 46.53 ,两者比较无统计学差异($P > 0.05$);在临床分期 Ⅲ 期 + Ⅳ 期的相对表达量为 153.87 ± 32.57 ,分别显著高于 Ⅰ 期、Ⅱ 期患者(P 均 < 0.01)。见图 2。

2.4 NSCLC 组织中 miR-196a 的表达水平与 DFS 的相关性 通过调取病例资料及电话和门诊随访获取了 44 例 NSCLC 患者的 DFS, Kaplan-Meier 法(乘积限法)单因素生存分析发现:肿瘤组织中 miR-196a 低表达的 NSCLC 患者其中位 DFS (27 个月)显著长于 miR-196a 高表达的 NSCLC 患者的 DFS (15 个月),差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

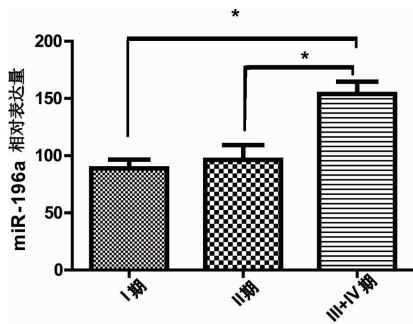
表 1 NSCLC 患者不同临床特征的 miR-196a 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	例数	miR-196a 表达量	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)				
≥60	27	105.16 ± 43.91	0.13	>0.05
<60	17	103.30 ± 49.65		
性别				
男	34	99.35 ± 43.97	1.38	>0.05
女	10	121.76 ± 49.36		
组织分型				
鳞癌	19	115.32 ± 47.16	1.39	>0.05
腺癌	25	96.17 ± 43.60		
TNM 分期				
Ⅰ 期 + Ⅱ 期	35	91.73 ± 39.66	4.33	<0.01
Ⅲ 期 + Ⅳ 期	9	153.87 ± 32.57		



注:两种组织间比较,* $P < 0.01$ 。

图 1 miR-196a 在肺癌(T)及癌旁组织(N)中的相对表达量比较



注:与 III + IV 期比较, * $P < 0.01$ 。

图 2 miR-196a 在 I 期、II 期、III + IV 期肺癌组织中的相对表达量比较

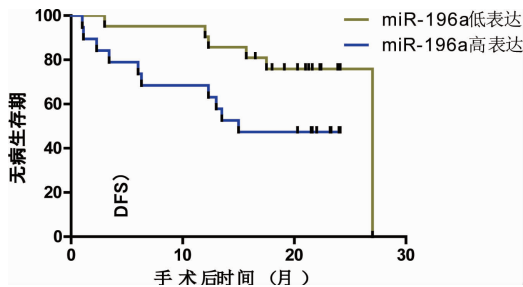


图 3 miR-196a 表达高低组的 DFS 比较

3 讨论

NSCLC 患者 5 年生存率仅约为 11%^[2], 研究其发病机制有助于 NSCLC 的早期诊断及治疗。近年有研究表明 miRNA 可参与肿瘤的发生、侵袭和转移过程^[3], 且 miRNAs 的表达与肺癌患者的临床特征存在相关性。通过检测患者穿刺或活检组织、外周血中 miRNAs 的表达可预测或辅助肿瘤的诊断, 使患者得到更为及时的治疗^[4-5]。研究发现 miR-196a 在胃癌、乳腺癌和结肠癌中高表达, 且可促进肿瘤细胞的增殖和迁移^[6-7]。在食管癌中 miR-196a 高表达可以下调膜联蛋白 1 (ANXA1) 的表达水平, 进而抑制细胞凋亡、促进细胞的增殖^[8], Yuan 等^[9]的研究也发现在乳腺癌中 ANXA1 可通过核因子 κ B (NF- κ B) 和 C-Myc 通路负反馈抑制 miR-196a, 从而抑制乳腺癌细胞的增殖。

Li 等^[10]研究发现通过降低 NSCLC A549/DDP 细胞中的 miR-196a 表达, 可恢复 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性。本研究通过检测 44 例 NSCLC 组织及其相应癌旁正常组织中 miR-196a 的表达水平, 发现 miR-196a 在 86.36% (38/44) 的 NSCLC 组织中高表达, 结果也提示 miR-196a 在 NSCLC 细胞中发挥了癌基因样的作用。进一步分析 miR-196a 的表达水平与临床特征的关系, 发现 miR-196a 的高表达与较晚的临床分期密切相关; 通过随访患者的 DFS, 发现 DFS 在 miR-196a 高表达的 NSCLC 患者显著短于

miR-196a 低表达的患者。Fan 等^[11]的研究也发现 miR-196a 高表达的卵巢癌患者预后较差。王朝霞教授等研究发现 miR-196a 可通过靶向 HOXA5 促进肺癌细胞的增殖及侵袭^[12]。据此, 我们推测 miR-196a 可能通过靶向 HOXA5 进而激活下游信号通路, 在 NSCLC 中起到了促癌基因样的作用。

综上所述, 本研究结果表明 miR-196a 在 NSCLC 中起到了促癌基因的作用且与临床预后不佳密切相关, miR-196a 在未来有望作为预测肺癌预后的分子标志物之一。相关结果在未来仍需要进一步的分子机制研究以阐明上述假说。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115 - 132.
- [2] Allemani C, Weir HK, Carreira H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009; analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. Lancet, 2015, 385(9972): 977 - 1010.
- [3] Bartel DP. MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281 - 297.
- [4] He Y, Lin J, Kong D, et al. Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers [J]. Clin Chem, 2015, 61(9): 1138 - 1155.
- [5] Wang H, Wu S, Zhao L, et al. Clinical use of microRNAs as potential non-invasive biomarkers for detecting non-small cell lung cancer: a meta-analysis [J]. Respirology, 2015, 20(1): 56 - 65.
- [6] Hoffman AE, Zheng T, Yi C, et al. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis [J]. Cancer Res, 2009, 69(14): 5970 - 5977.
- [7] Li Y, Jin L, Chen D, et al. Tumor suppressive miR-196a is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 560 - 566.
- [8] Luthra R, Singh RR, Luthra MG, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers [J]. Oncogene, 2008, 27(52): 6667-6678.
- [9] Yuan Y, Anbalagan D, Lee LH, et al. ANXA1 inhibits miRNA-196a in a negative feedback loop through NF- κ B and C-Myc to reduce breast cancer proliferation [J]. Oncotarget, 2016 Apr 20. [Epub ahead of print].
- [10] Li JH, Luo N, Zhong MZ, et al. Inhibition of microRNA-196a might reverse cisplatin resistance of A549/DDP non-small-cell lung cancer cell line [J]. Tumour Biol, 2016, 37(2): 2387 - 2394.
- [11] Fan Y, Fan J, Huang L, et al. Increased expression of microRNA-196a predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(4): 4132 - 4137.
- [12] Liu XH, Lu KH, Wang KM, et al. MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5 [J]. BMC Cancer, 2012, 12: 348.

收稿日期: 2016-06-19 修回日期: 2016-07-10 编辑: 石嘉莹