

miR-155-5p 表达水平与鼻咽癌远处转移及预后的关系

黄永塔, 叶秋容, 翁敬锦, 李玲, 温宗华, 莫祥兰

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81360355); 广西卫计委科研课题(编号:Z2013355, Z2014622, Z2016590)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院病理科(黄永塔, 叶秋容, 李玲, 温宗华, 莫祥兰), 耳鼻喉头颈肿瘤科(翁敬锦)

作者简介: 黄永塔(1982-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 头颈肿瘤、淋巴造血系统肿瘤的诊断。E-mail: huangyongta@126.com

通讯作者: 莫祥兰(1966-), 女, 博士, 主任医师, 研究方向: 淋巴造血系统肿瘤诊断及分子遗传学。E-mail: binglike86131@163.com

[摘要] **目的** 检测 miR-155-5p 在鼻咽癌组织中的表达水平, 探讨 miR-155-5p 与远处转移及临床预后的关系。**方法** 收集有远处转移(转移组)和仅有原发病灶(非转移组)鼻咽癌活检标本共 60 例, 应用实时荧光定量-PCR(QRT-PCR)方法检测鼻咽癌中 miR-155-5p 的表达水平, 分析 miR-155-5p 与临床病理参数及预后的关系。**结果** 远处转移组 miR-155-5p 表达水平较非转移组显著上调, 相对表达量为 $[(4.92 \pm 5.52) \text{ vs } (1.98 \pm 2.66)] (t = -2.505, P = 0.017)$ 。miR-155-5p 表达水平与性别、年龄、发病部位、淋巴结转移、T 分期及临床分期等均无明显的相关关系($P > 0.05$)。以 miR-155-5p 相对表达量中位值 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.66$ 为截断值, Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-rank 检验结果显示, miR-155-5p 高表达组鼻咽癌患者 5 年总生存率明显低于低表达组($\chi^2 = 4.18, P = 0.041$)。**结论** miR-155-5p 表达水平与鼻咽癌远处转移密切相关, 可能成为辅助判断患者预后的生物学指标。

[关键词] 鼻咽癌; miR-155-5p; 实时荧光定量-PCR; 转移

[中图分类号] R 739.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2018)09-0851-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2018.09.01

Correlation of miR-155-5p with distant metastasis and prognosis in nasopharyngeal carcinoma HUANG Yong-ta, YE Qiu-rong, WENG Jing-jin, et al. Department of Pathology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of miR-155-5p in nasopharyngeal carcinomas (NPC) and its relationship between metastasis and prognosis in NPC patients. **Methods** The biopsy specimens of 60 NPC patients with distant metastasis (metastatic group) or primary cancer focus alone (non-metastatic group) in our hospital were collected, and the expressions of miR-155-5p in the specimens were detected by real time fluorescent quantitative PCR (QRT-PCR). The relationship between miR-155-5p and the clinicopathological parameters and prognosis were analyzed. **Results** Compared with that in the non-metastatic group, the level of miR-155-5p in the metastatic group was significantly up-regulated $[(4.92 \pm 5.52) \text{ vs } (1.98 \pm 2.66)] (t = -2.505, P = 0.017)$. No significant differences were observed among miR-155-5p and sex, age, location, lymph node metastasis, T grades and clinical stages ($P > 0.05$). If the median level of miR-155-5p was considered as cut-off value, Kaplan - Meier survival curve and the Log-rank test results showed that the overall 5 year survival rate of the NPC patients with low expression of miR-155-5p was significantly higher than that of the NPC patients with high expression of miR-155-5p ($\chi^2 = 4.18, P = 0.041$). **Conclusion** The expression level of miR-155-5p may play a key role in metastasis of NPC. It may be a novel biomarker in predicting prognosis of NPC.

[Key words] Nasopharyngeal carcinomas (NPC); miR-155-5p; Real time fluorescent quantitative PCR (QRT-PCR); Metastasis

MicroRNAs (miRNAs) 是一类短链的非编码 RNA, 通过调节信号分子广泛地参与机体生命活动及疾病

发生发展的调控。迄今, 已发现多个发挥原癌基因或肿瘤抑制基因作用的 miRNAs, 它作为潜在的肿

瘤激活或抑制因子参与肿瘤的发生发展。鼻咽癌是我国南方地区常见的恶性肿瘤, 有较高的复发率和(或)远处转移, 严重危害人类健康。尽管放疗技术使得患者的5年生存率有所升高, 但仍有15%~58%的患者死于复发和转移, 侵袭转移仍是鼻咽癌治疗失败导致死亡的首要原因^[1]。因此, 寻找具有潜在价值的能够判断肿瘤侵袭转移的预测指标, 在对患者进行危险度分层的基础上, 为鼻咽癌的临床治疗提供新靶点尤为必需。作为 miRNAs 家族成员, miR-155-5p 为 B 细胞整合簇(B-cell integration cluster, BIC)的表达产物, 在许多肿瘤中过表达, 且过表达的 miR-155-5p 在这些肿瘤的进展中起到“癌基因”作用, 与肿瘤侵袭转移等过程密切相关^[2]。然而, 目前对 miRNAs 的很多认识还仅限于初级阶段, 对于 miR-155-5p 与鼻咽癌的密切关系也需要进行更多更深入的研究。因此, 探讨 miR-155-5p 在鼻咽癌发生发展及侵袭转移过程中的作用, 以建立包括靶向治疗在内的新治疗模式, 对于鼻咽癌治疗和预后判断具有重要的现实意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集我院 2010-02~2012-10 有完整临床和病理资料的鼻咽癌患者 60 例, 其中男 42 例, 女 18 例, 年龄 25~81(46.6±12.3)岁。患者初次就诊时, 通过影像学检查发现仅有鼻咽部原发病灶(非转移组)34 例, 伴有肝、肺、骨等远处部位转移(转移组)26 例。依据 UICC(2010)分期标准进行临床分期, 临床 I+II 期 5 例, III+IV 期 55 例。所有鼻咽癌病检标本均在放疗之前获取, 并经两名病理专家诊断为鼻咽部未分化非角化性癌, 确诊后均予以放疗或放疗加化疗联合治疗。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量-PCR(QRT-PCR)检测 用 miRNeasy FFPE kit(217504, 购自 Qiagen)提取人鼻咽癌组织石蜡切片总 RNA; Nanodrop2000 测定 RNA 提取液的 OD260 吸光度值, 计算纯度和浓度; 使用 miscript II RT kit(218161, 购自 Qiagen)进行逆转录反应, 按照试剂盒说明书进行操作。cDNA 逆转录反应条件: 42℃ 60 min; 95℃ 5 min; 使用 SYBR Green 法(miscript SYBR PCR kit, 该试剂盒含有 miRNA 通用引物)检测鼻咽癌组织中 miR-155-5p 表达水平, 用 U6 基因作为内参基因。引物序列: miR-155-5p-5p 特异引物 5'TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT3', U6 上游引物 5'ATTGGAACGATACAGAGAAGATT3', 通用下游引物 5'GGAACGCTTCACGAATTTG3'。QRT-PCR

反应条件: (1)95℃ 15 min; (2)94℃ 15 s; (3)55℃ 30 s; (4)70℃ 34 s, (2)~(4)共 40 个循环。

1.2.2 结果分析 反应结束后确认其扩增曲线和溶解曲线, 用相对定量法对结果进行分析, 使用每个检测样本的阈循环(Threshold cycle, Ct)值, 阈循环值随模板浓度增大而减少; 目的基因相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.2.3 随访 采用电话随访及定期复查的方式, 所有患者均随访 5 年, 以病死或出现复发、新转移病灶为随访终结。随访内容包括间接鼻咽镜、鼻咽及颈部 CT/MRI、腹部 B 超、胸部 X 线片等检查。生存时间按月计算, 随访期内死亡者随访时间记为完全数据, 随访期内未死亡者随访时间记为截尾时间。

1.3 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验或 Mann-Whitney-U 非参数检验分析, 生存数据采用 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-rank 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-155-5p 表达水平与临床病理特征的关系 获随访的 60 例鼻咽癌患者中, 转移组 26 例, 非转移组 34 例。转移组的 miR-155-5p 表达水平较非转移组明显上调[(4.92±5.52) vs (1.98±2.66)], 差异有统计学意义(*t* = -2.505, *P* = 0.017)。见图 1。miR-155-5p 表达量与性别、年龄、发病部位、淋巴结转移、T 分期及临床分期均无明显相关性(*P* > 0.05)。见表 1。

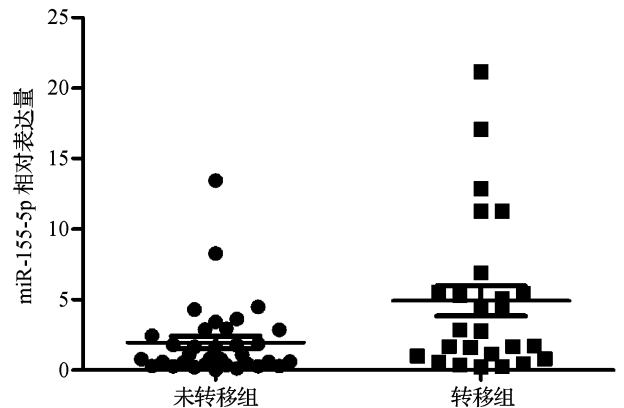


图 1 miR-155-5p 在鼻咽癌组织中的表达图

表 1 miR-155-5p 表达水平与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

病例特征	例数	miR-155-5p 相对表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
性别				
男	42	3.13±4.61	-0.341	0.734
女	18	3.55±3.80		

续表 1

病例特征	例数	miR-155-5p 相对表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄				
<50岁	39	3.34 ± 4.51	0.210	0.834
≥50岁	21	3.09 ± 4.16		
病灶部位				
咽隐窝	24	4.05 ± 5.09	1.166	0.248
顶侧壁	36	2.72 ± 3.78		
T分期				
T1 + 2	16	4.81 ± 6.31	1.288	0.214
T3 + 4	44	2.68 ± 3.31		
淋巴结转移				
无	11	1.80 ± 1.98	-1.225	0.225
有	49	3.58 ± 4.68		
远处转移				
无	34	1.98 ± 2.66	-2.505	0.017
有	26	4.92 ± 5.52		
临床分期				
I + II	5	3.45 ± 5.65	0.103	0.919
III + IV	55	3.23 ± 4.29		

2.2 miR-155-5p 表达水平与患者临床预后的关系
 随访时间 1 ~ 60 个月,中位随访时间为 34 个月,高表达组、低表达组中位生存时间分别为 20.5 个月、50.5 个月。以 miR-155-5p 相对表达量中位值 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.66$ 为截断值,Kaplan-Meier 生存分析表明,60 例患者 5 年总生存率为 46.7%,高表达组鼻咽癌患者 5 年总生存率明显低于低表达组,两组总生存率分别为 33.3%、60%,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.18, P = 0.041$)。见图 2。

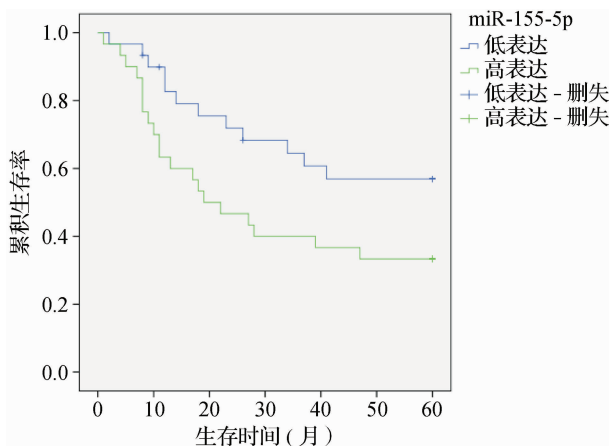


图 2 miR-155-5p 表达水平与生存率的关系图

3 讨论

3.1 miRNAs 是一类非编码的单链小 RNA 分子,不

仅在机体发育、器官形成和物质代谢等多种生物学功能发挥重要作用,还参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、黏附、血管生成等生物学过程调控,与肿瘤发生发展、转移等密切相关。miRNAs 与肿瘤的关系是目前研究的热点。miRNAs 在鼻咽癌相关蛋白表达调控、信号通路调节过程中发挥重要作用,与肿瘤细胞增殖和侵袭转移密切相关。miR-155-5p 作为 miRNAs 家族一员,在多种肿瘤中发挥癌基因功能。近年来,临床和基础研究陆续发现,子宫内膜样腺癌、胰腺癌、乳腺癌患者血清循环 miR-155-5p 表达水平明显增高,血清 miR-155-5p 丰度随着 TNM 分期的递进而逐渐增加^[3~5]。Gironella 等^[6]实验证实,miR-155-5p 能抑制内源性 TP53INP1 的表达,促进肿瘤发生。Bhattacharya 等^[7]发现与正常组织相比,骨肉瘤细胞中 miR-155-5p 的表达水平明显上调,并能通过抑制靶基因 Ripk1 的表达,阻滞细胞凋亡,促进肿瘤转移和侵袭。

3.2 目前,关于 miR-155-5p 在鼻咽癌生物学功能及作用机制的研究较少。体外细胞实验证实,miR-155-5p 在鼻咽癌细胞中过表达,miR-155-5p 表达上调能促进鼻咽癌细胞增殖、侵袭和迁移^[8]。然而,关于 miR-155-5p 在鼻咽癌组织中的表达情况及其与临床病理特征、预后的关系罕见文献报道。我们的实验结果显示,转移组鼻咽癌组织 miR-155-5p 表达显著上调,其相对表达量是非转移组 2.5 倍。miR-155-5p 在伴有远处转移的鼻咽癌中持续表达上调,推测 miR-155-5p 与鼻咽癌细胞增殖及远处转移密切相关。与我们的实验结果一致,miR-155-5p 在多种恶性肿瘤组织中均呈过表达趋势,参与了调控细胞生长、分化和存活等过程的信号转导通路,促进癌细胞的增殖和提高其侵袭转移能力^[9~13]。然而,目前 miR-155-5p 在肿瘤远处转移中的具体作用机制尚未完全阐明。Du 等^[14]发现,过表达的 miR-155 通过抑制其下游靶基因 JMJD1A、BACH1 表达,介导鼻咽癌远处转移。Li 等^[15]通过对体外肝细胞癌研究证实,miR-155-5p 表达上调能改变癌细胞 E-cadherin、FN1 等细胞黏附分子的表达水平,促进癌细胞向间质转化,增强侵袭转移能力。此外,miR-155-5p 可以上调 FOXO3a 的表达水平,进而阻止细胞凋亡,促进肾透明细胞癌增殖、侵袭转移^[16]。因此,作为具有癌基因功能的 miRNAs,miR-155-5p 与淋巴结转移状态、肿瘤大小及脉管侵犯等病理特征一样,能够反映肿瘤的侵袭转移潜能。

3.3 在肿瘤研究中发现,miRNAs 通过调控下游靶基因的转录和翻译,起到癌基因或抑癌基因的作用,

促进肿瘤发生发展、转移,与临床预后密切相关^[17]。本实验证实,miR-155-5p 表达水平与患者 5 年总生存率明显相关。miR-155-5p 高表达组鼻咽癌患者中位生存时间较低表达组减少了 30 个月。高表达 miR-155-5p 的患者发生远处转移及死亡的风险显著高于低表达组,术后 5 年总生存率较低表达者明显下降。高表达 miR-155-5p 的鼻咽癌患者预后差,这与 Du 等^[14] 的研究报道一致。因此,miR-155-5p 作为鼻咽癌患者潜在的临床预后评估因子值得关注。

综上所述,miR-155-5p 表达上调与鼻咽癌远处转移、不良预后密切相关,可以作为预测鼻咽癌转移风险及预后评估的分子标记物,有望成为鼻咽癌治疗的新靶点。

参考文献

- 1 周敏燕,兰桂平,司勇峰,等. MiR-3182 在鼻咽癌中的表达及其与远处转移和预后关系的研究[J]. 中国临床新医学,2016,9(5): 369 - 372.
- 2 Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, et al. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1792(6):497 - 505.
- 3 谭志琴,刘伏香,唐海林,等. 子宫内膜癌患者血清 has-miR-155 的表达及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志,2010,45(10):772 - 774.
- 4 王晓刚,童 钟,金 钢. 血清 miR-155 对胰腺癌诊断和预后评估的价值[J]. 中华肝胆外科杂志,2015,21(3):189 - 193.
- 5 Liu J, Mao Q, Liu Y, et al. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients [J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25(1):46 - 54.
- 6 Gironella M, Seux M, Xie MJ, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(41):16170 - 16175.

- 7 Bhattacharya S, Chalk AM, Ng AJ, et al. Increased miR-155-5p and reduced miR-148a-3p contribute to the suppression of osteosarcoma cell death [J]. Oncogene, 2016, 35(40):5282 - 5294.
- 8 Zhu X, Wang Y, Sun Y, et al. MiR-155 up-regulation by LMP1 DNA contributes to increased nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014, 271(7): 1939 - 1945.
- 9 曹红亮,黄少军,刘爱华,等. miR-155 在结肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华消化外科杂志, 2013,12(6):440 - 442.
- 10 宋 军,王 辉,付海嘯,等. miR-155 和 miR-30a 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 中华实验外科杂志,2013,29(8):1550 - 1552.
- 11 程田力,胡成平,李 敏,等. miR-155 在肺腺癌 A549 细胞侵袭和转移中的作用 [J]. 中华肿瘤杂志,2016,38(2):86 - 92.
- 12 Fang H, Shuang D, Yi Z, et al. Up-regulated microRNA-155 expression is associated with poor prognosis in cervical cancer patients [J]. Biomed Pharmacother, 2016,83:64 - 69.
- 13 Zhang XL, Chen JH, Qin CK. MicroRNA-155 expression as a prognostic factor in patients with gallbladder carcinoma [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11):21241 - 21246.
- 14 Du ZM, Hu LF, Wang HY, et al. Upregulation of MiR-155 in nasopharyngeal carcinoma is partly driven by LMP1 and LMP2A and downregulates a negative prognostic marker JMJD1A [J]. PLoS One, 2011,6(4):e19137.
- 15 Li DP, Fan J, Wu YJ, et al. MiR-155 up-regulated by TGF-β promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis of human carcinoma cells in vitro [J]. Am J Transl Res, 2017,9(6): 2956 - 2965.
- 16 Ji H, Tian D, Zhang B, et al. Overexpression of miR-155 in clear-cell renal cell carcinoma and its oncogenic effect through targeting FOXO3a [J]. Exp Ther Med, 2017,13(5):2286 - 2292.
- 17 许宇彪,杨建荣. microRNA 在人类恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 中国临床新医学,2016,9(9):833 - 837.

[收稿日期 2018 - 01 - 30][本文编辑 黄晓红]

《中国临床新医学》杂志诚征广告启事

《中国临床新医学》杂志为国家卫生计生委主管,由中国医师协会和广西壮族自治区人民医院共同主办的国家级医学学术性科技期刊(月刊,国内外公开发行)。本刊诚征各种药品、医疗器械、医疗耗材等宣传广告。有意者请与本刊联系。

本刊地址:广西南宁市桃源路 6 号广西壮族自治区人民医院内,联系电话:0771 - 2186013。

E-mail:zglcxyzz@163.com,联系人:韦颖。

· 本刊编辑部 ·