

microRNA - 30b 在非小细胞肺癌中的表达及预后分析

齐泽铨 朱成楚 张 波 陈保富 朱 敏

摘 要 **目的** 探讨微小 RNA - 30b (miRNA - 30b) 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的表达情况, 并进一步分析 miR - 30b 与 NSCLC 患者预后的相关性。**方法** 收集 41 例 NSCLC 患者的肿瘤组织及其正常组织 (距离肿瘤组织 > 5cm), 采用 real - time PCR 法检测 miR - 30b 的表达情况, 并对预后进行分析。**结果** 肿瘤组织 miR - 30b 的表达水平显著低于正常组织 ($P < 0.01$); miR - 30b 的表达水平与临床分期、淋巴结转移及 EGFR 基因突变显著相关 ($P < 0.05$)。Kaplan - Meier 分析显示肿瘤组织中 miR - 30b 高表达组的生存时间明显高于低表达组 ($P < 0.05$)。**结论** MiR - 30b 在 NSCLC 中的表达是下调的, 可作为 NSCLC 预后的一个新的潜在标志物。

关键词 miR - 30b 非小细胞肺癌 EGFR 预后

中图分类号 R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.018

Expression of MicroRNA - 30b in Non - small Cell Lung Cancer and Its Prognostic Analysis. Qi Zecheng, Zhu Chengchu, Zhang Bo, Chen Baofu, Zhu Min. Department of Cardio - Thoracic Surgery, Taizhou Hospital, Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the expression of microRNA - 30b (miRNA - 30b) in patients of non - small cell lung cancer (NSCLC) and to analyse the association of its expression and prognosis. **Methods** The expression of miR - 30b in 41 tumor tissues and paired normal tissues of NSCLC were detected by RT - PCR. The relationship between the expression levels of miR - 30b and the prognosis of patients was analysed. **Results** The expression level of miR - 30b was up - regulated in tumor tissues while compared with paired normal tissues ($P < 0.05$). The expression of miR - 30b was associated with TNM stages, lymphatic metastasis and the genetic mutation of EGFR ($P < 0.05$). Kaplan - Meier analyse reveled that the overall survival of high - expression group was longer than the low - expression group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of miR - 30b in NSCLC is down - regulated, and it is maybe a novle evaluation of predicting the prognosis of NSCLC.

Key words miR - 30b; NSCLC; EGFR; Prognosis

近年来全球肺癌的发生率及病死率均显著上升, 在全球范围内均居首位, 其中 75% ~ 80% 为非小细胞肺癌 (NSCLC)^[1]。手术是可能治愈 NSCLC 的有效方法, 但只有约 30% 的 NSCLC 患者拥有手术机会。虽然放、化疗治疗使疾病的缓解率有所提升, 但 5 年生存率仍低于 15%^[2]。分子靶向治疗成为目前研究的重点。EGFR 基因突变在晚期 NSCLC 的治疗中发挥重要作用, 针对性使用分子靶向药物 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR - TKI) 可以取得很好的临床效果^[3]。但经过大量临床应用后发现, 有些患者对 EGFR - TKI 治疗并不敏感, 或者服用一段时间后对该类药物产生耐药。因此, 寻找有助于 NSCLC 诊断和预

后的新的分子标志物是目前急需解决的问题。

最近的研究数据表明, 细胞的耐药性不仅由遗传 (基因突变, 扩增, 缺失, 易位) 和后生 (DNA 甲基化, 组蛋白翻译后修饰) 的变化所调节, 同样也可以由 microRNA (miRNA) 所调节。miRNA 是一种内源性非编码小 RNA 分子, 参与肿瘤的发生、发展及转移的各个阶段, 对肿瘤的早期诊断及预后有重要意义。近来研究表明, miR - 30b 在黑色素瘤、髓母细胞瘤、恶性间皮瘤、头颈癌、口腔鳞状细胞癌等恶性肿瘤中的表达是上调的, 而在大肠癌中则是下调^[4-9]。但是, miR - 30b 在 NSCLC 中的作用机制及功能尚不明确, 本研究通过检测 miR - 30b 在 NSCLC 中的表达情况及其与 EGFR 突变之间的相关性, 进一步分析其对 NSCLC 诊断、及预后的意义。

材料与方法

1. 标本: 癌组织以及正常组织 (距离肿瘤组织 >

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2015KYA239)

作者单位: 317000 温州医科大学附属台州医院心胸外科

通讯作者: 朱成楚, 主任医师, 电子信箱: zhucc669266@163.com

5cm)标本均来源于2011年1~12月在笔者医院接受外科手术的41例确诊为NSCLC的患者,所选患者术前均未接受任何治疗,记录相关临床病理资料包括年龄、性别、组织病理学结果等,根据2015年最新肺癌TNM分期标准进行分期。其中,男性24例,女性17例,患者年龄47~88岁,平均年龄 65.6 ± 10.4 岁;Ⅰ期8例,Ⅱ期15例,Ⅲ期18例。

2. 主要试剂:Trizol、TaqMan microRNA 反转录试剂盒、TaqMan 探针、Taqman Universal Master Mix II 均购买于Applied Biosystems公司,其中miR-30b的茎环引物序列:5'-ACCAAGUUUCAGUUCAUGUAAA-CAUCCUACACUCAGCUGUAAUACAUGGAUUGGCUG-GGAGGUGGAUGUUUACUUCAGCUGACUUGGA-3',内参U6的茎环引物序列:5'-GTGCTCGCTTCG-GCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGAGAA-GATTAGCATGGCCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAA-TTCGTGAAGCGTTCCATATTTT-3'。

3. 研究方法:RNA提取和实时荧光定量PCR:将部分癌及正常组织研磨后加入1ml Trizol,严格按照试剂盒说明书提取总RNA,且RNA的A260/A280值1.8~2.0。根据TaqMan Small RNA Assays(Applied Biosystems公司)说明书先反转录合成特异性miR-30b cDNA,再根据下述体系进行real-time PCR:TaqMan Small RNA Assay(20×) 1.00μl, cDNA 1.33μl, Mix II 10.00μl, Nuclease-free water 7.67μl, NTC 同时做阴性对照孔,各管作3副孔,按默认条件使用7300 real-time PCR system(Applied Biosystems公司)仪器进行PCR。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示miR-30b的相对表达量。

4. 统计学方法:应用SPSS 20.0统计软件进行统计学分析,所得数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计资料符合正态分布采用成组t检验,不符合正态分布采用Kruskal-Wallis test法。生存分析采用Kaplan-meier分析,组间比较采用log-rank法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. miR-30b在肺癌组织中的表达:在NSCLC患者肿瘤组织中miR-30b相对于内参的表达量为 0.21 ± 0.04 ,而在正常组织中相对于内参的表达量为 0.8 ± 0.2 ,肿瘤组织中miR-30b的表达水平明显低于正常组织($P < 0.01$)。

2. miR-30b的表达水平与NSCLC临床病理特征之间的关系:如表1所示,miR-30b的表达水平与

肿瘤的临床分期、淋巴结转移明显相关。与Ⅰ期肺癌相比较,Ⅱ、Ⅲ期肺癌组织中miR-30b的表达水平明显下调($P < 0.01$)。同时发现,miR-30b表达水平与EGFR基因突变之间存在相关性,存在EGFR基因突变的肿瘤组织中miR-30b的表达水平明显低于未突变组织($P < 0.05$)(仅有27名患者进行了EGFR基因突变检测)。miR-30b的表达水平与患者性别、年龄、吸烟与否、肿瘤直径以及病理类型无明显相关性($P > 0.05$)。

表1 miR-30b与NSCLC患者临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	n(%)	miR-30b的相对表达量($\bar{x} \pm s$)	P
性别			0.425
男性	24(58.5)	0.22 ± 0.05	
女性	17(41.5)	0.29 ± 0.08	
年龄(岁)			0.687
<65	20(48.8)	0.23 ± 0.05	
≥65	21(51.2)	0.26 ± 0.07	
吸烟史			0.544
无	15(36.6)	0.27 ± 0.06	
有	26(63.4)	0.23 ± 0.06	
肿瘤直径(cm)			0.07
<3	11(26.8)	0.37 ± 0.1	
≥3	30(73.2)	0.2 ± 0.04	
病理类型			0.381
腺癌	29(70.7)	0.18 ± 0.03	
鳞癌	12(29.3)	0.26 ± 0.1	
淋巴结转移			0.007
无	14(34.1)	0.4 ± 0.06	
有	27(64.9)	0.17 ± 0.05	
TNM分期			0.000
Ⅰ	8(19.5)	0.58 ± 0.06	
Ⅱ	15(36.6)	0.2 ± 0.05	
Ⅲ	18(43.9)	0.15 ± 0.04	
EGFR突变			0.029
无	15(36.6)	0.32 ± 0.07	
有	12(29.3)	0.15 ± 0.03	

3. miR-30b与NSCLC患者预后的关系:在41例NSCLC患者的随访中,共有2例失访。MiR-30b的平均表达水平为 0.27 ± 0.04 ,按照该水平将其分为高表达组和低表达组。Kaplan-Meier分析显示,miR-30b高表达者生存时间明显高于低表达者,分别为 35.8 ± 1.2 、 27.3 ± 2.1 ,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图1)。

讨 论

miRNAs是基因组编码的一类长度约为18~25个核苷酸的內源性非编码小RNA分子,可特异性识

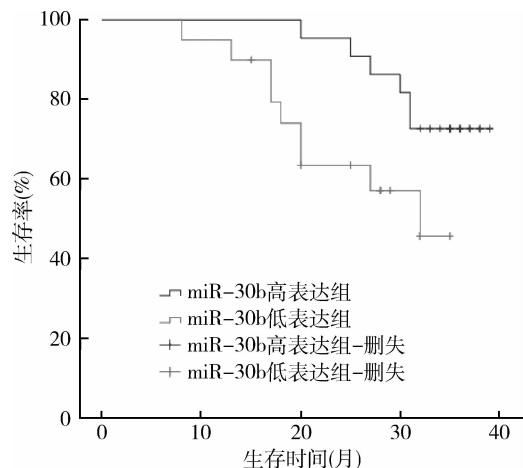


图 1 miR-30b 与 NSCLC 患者生存时间的关系

别靶 mRNA 的 3' 端非编码区 (3' untranslated region, 3' UTR) 并与之结合, 促进靶 mRNA 降解或抑制其翻译, 进而在基因表达的转录后调控中发挥重要作用^[10]。研究表明, miRNAs 参与多种细胞过程, 包括细胞增殖、分化、凋亡等^[11], 同时, miRNAs 可作为癌基因或者抑癌基因在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用。

miR-30 家族是 miRNAs 的重要组成部分, 包括 miR-30a、miR-30b、miR-30c、miR-30d、miR-30e, 它们之间的序列同源性非常高, 在人类肿瘤中可能发挥着重要的调节作用。多项研究显示, miR-30b 在黑色素瘤、髓母细胞瘤、恶性间皮瘤、头颈癌、口腔鳞状细胞癌等恶性肿瘤中的表达是上调的, 且 miR-30b 的上调促进了肿瘤细胞的增殖、浸润和转移^[4-8]。然而, Liao 等^[9]发现, miR-30b 在大肠癌中的表达是下调的, 通过抑制 KRAS/PI₃KCD/BCL2 这 3 种靶基因, 可能影响大肠癌中肿瘤细胞的生存, miR-30b 的过表达也许能够作为恶性大肠癌靶向治疗的一种有效治疗方法。而 miR-30b 在胃癌中的研究存在一定的争议, Fukushima 等发现, miR-30b 在 5 个胃癌早期患者的 RNA 样本中的表达是上调的^[12]。

Qiao 等^[13]指出, miR-30b-5p 在 62.75% 的胃癌组织中的表达是显著降低的, 并且与胃癌中淋巴结的转移相关, miR-30b-5p 的过表达可以抑制肿瘤的远处转移。Zhu 等^[14]也提出, miR-30b 在胃癌组织和细胞系中的表达是显著下调的, 并且与 PAI-1 呈负相关, 在胃癌的治疗中可以作为潜在的生物标志物或治疗靶点。而 miR-30b 在肺癌中的研究尚少, Gu 等^[15]研究发现, 在 TKI 一线治疗的 NSCLC

患者中, miR-30b、miR-30c 的表达是显著降低的, 并具有一定的相关性, 它们的表达水平与 TKI 作为一线治疗药物时的长/短效应有关。

本实验笔者选取了 41 例术前未经任何治疗的 NSCLC 患者, 在肺癌组织中对 miR-30b 进一步研究以验证上述结果。笔者发现, 在 NSCLC 肿瘤组织中 miR-30b 的表达是显著降低的, 并且与肿瘤的浸润和远处转移明显相关, 这与 Gu 等的报道相一致。由此推测, miR-30b 在肺癌中是一种抑癌基因, 抑制肿瘤细胞的浸润和转移。同时, 笔者首次发现 miR-30b 在 NSCLC 中的表达水平与 EGFR 基因突变相关, 与未突变患者相比, miR-30b 在 EGFR 基因突变患者中的表达是显著降低的, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 EGFR 基因突变与否是 NSCLC 患者接受 EGFR-TKI 治疗的必要前提, 且治疗效果要显著优于未突变患者^[16]。因此, miR-30b 可能作为 EGFR-TKI 疗效判断及预后的一个新的标志物。但 miR-30b 与 EGFR 基因突变之间的调控机制尚不清楚, 有待于进一步研究。

综上所述, miR-30b 在 NSCLC 中的表达是显著降低的。进一步对 NSCLC 患者临床病理资料及生存期进行分析发现, miR-30b 的表达水平与肿瘤的分期、淋巴结转移、EGFR 突变显著相关, 与患者的总生存期呈正相关。这表明, miR-30b 在 NSCLC 中可能是作为一种抑癌基因来调控肿瘤的增殖及转移, 但具体机制目前尚不明确。因此, 深入研究 miR-30b 在 NSCLC 中的调控机制, 为 NSCLC 的诊治及预后判断提供新的潜在分子标志物是今后的研究重点。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30
- 2 Krawczyk P, Kowalski DM, Wojas-Krawczyk K, et al. The qualification of docetaxel or erlotinib for second-line therapy should be based on clinical and molecular predictive factors [J]. Chemotherapy, 2012, 58(1): 60-69
- 3 Soria JC, Mok TS, Cappuzzo F, et al. EGFR mutated oncogene - addicted non-small cell lung cancer: current trends and future prospects [J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(5): 416-430
- 4 Lu Y, Ryan SL, Elliott DJ, et al. Amplification and overexpression of Hsa-miR-30b, Hsa-miR-30d and KHDRBS3 at 8q24.22-q24.23 in medulloblastoma [J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6159
- 5 Gaziel-Sovran A, Segura MF, Di Micco R, et al. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis [J]. Cancer Cell, 2011, 20(1): 104-120

(下转第 82 页)

- Antioxid Redox Signal, 2012, 17(2): 302–326
- 6 Lupo PJ, Noursome D, Kamdar KY, *et al.* A case – parent triad assessment of folate metabolic genes and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Causes Control, 2012, 23(11): 1797–1803
 - 7 贺文兴, 邓觐云. TS 及其基因多态性与肿瘤的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(5): 375–379
 - 8 Mandola MV, Stoecklacher J, Zhang W, *et al.* A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels[J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(5): 319–327
 - 9 Zhuang W, Wu XT, Zhou Y, *et al.* Polymorphisms of thymidylate synthase in the 5′ – and 3′ – untranslated regions and gastric cancer [J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(7): 1379–1385
 - 10 Yuan JM, Lu SC, Van Den, *et al.* Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes and risk of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2007, 46(3): 749–758
 - 11 Hou Q, Li S, Li L, *et al.* Association between SLC01B1 gene T521C polymorphism and statin – related myopathy risk: a Meta – analysis of case – control studies [J]. Medicine: Baltimore, 2015, 94(37): e1268
 - 12 杨春兰. 胸苷酸合成酶基因多态性与儿童急性白血病易感性及 HD – MTX 毒副作用的相关性[D]. 重庆:重庆医科大学, 2013
 - 13 Gast A, Bermejo JL, Flohr T, *et al.* Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case – control study[J]. Leukemia, 2007, 21(2): 320–325
 - 14 Chan JY, Ugrasena DG, Lum DW, *et al.* Xenobiotic and folate pathway gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Javanese children[J]. Hematol Oncol, 2011, 29(3): 116–123
 - 15 Lightfoot TJ, Johnston WT, Painter D, *et al.* Genetic variation in the folate metabolic pathway and risk of childhood leukemia[J]. Blood, 2010, 115(19): 3923–3929
 - 16 Yeoh AE, Lu Y, Chan JY, *et al.* Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia shows protection in Malay boys: results from the Malaysia – Singapore ALL Study Group [J]. Leuk Res, 2010, 34(3): 276–283
 - 17 王芬芬, 崔莲花, 宋扬, 等. 叶酸代谢相关酶基因多态性与消化系统肿瘤的关系[J]. 肿瘤, 2010, 30(12): 1074–1076
 - 18 Ijichi K, Adachi M, Ogawa T, *et al.* Cell – cycle distribution and thymidylate synthetase(TS) expression correlate with 5 – FU resistance in head and neck carcinoma cells [J]. Anticancer Res, 2014, 34(6): 2907–2911
 - 19 Graziano F, Kawakami K, Watanabe G, *et al.* Association of thymidylate synthase polymorphisms with gastric cancer susceptibility[J]. Int J Cancer, 2004, 112(6): 1010–1014
 - 20 Zhai X, Gao J, Hu Z, *et al.* Polymorphisms in thymidylate synthase gene and susceptibility to breast cancer in a Chinese population: a case – control analysis[J]. BMC Cancer, 2006, 6: 138
 - 21 Qasem WA, Yousef AM, Yousef M, *et al.* Thymidylate synthase polymorphisms and risk of lung cancer among the Jordanian population: a case control study[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(18): 8287–8292
 - 22 Liu P, Zhang M, Xie X, *et al.* Polymorphisms of 5,10 – methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase, dietary folate intake, and the risk of leukemia in adults[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 3265–3275

(收稿日期:2016–07–24)

(修回日期:2016–07–24)

(上接第 65 页)

- 6 Guled M, Lahti L, Lindholm PM, *et al.* CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma – a miRNA microarray analysis[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2009, 48(7): 615–625
- 7 Rahbari R, Holloway AK, He M, *et al.* Identification of differentially expressed microRNA in parathyroid tumors [J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(4): 1158–1166
- 8 Shao C, Yu Y, Yu L, *et al.* Amplification and up – regulation of microRNA – 30b in oral squamous cell cancers [J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(8): 1012–1017
- 9 Liao WT, Ye YP, Zhang NJ, *et al.* MicroRNA – 30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting Kras, PIK₃CD and Bcl2[J]. J Pathol, 2014, 232(4): 415–427
- 10 Lages E, Ipas H, Guttin A, *et al.* MicroRNAs: molecular features and role in cancer[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17: 2508–2540
- 11 Suh N, Belloch R. Small RNAs in early mammalian development; from gametes to gastrulation [J]. Development, 2011, 138(9): 1653–1661
- 12 Inoue T, Iinuma H, Ogawa E, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of microRNA – 107 and its relationship to DICER1 mRNA expression in gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2012, 27(6): 1759–1765
- 13 Qiao FC, Zhang K, Gong PH, *et al.* Decreased miR – 30b – 5p expression by DNMT1 methylation regulation involved in gastric cancer metastasis[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(9): 5693–5700
- 14 Zhu ED, Li N, Li BS, *et al.* miR – 30b, down – regulated in gastric cancer, promotes apoptosis and suppresses tumor growth by targeting plasminogen activator inhibitor – 1 [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e106049
- 15 Gu YF, Zhang H, Su D. micro – 30 expression predicted response to tyrosine kinase inhibitors as first line treatment in non – small cell lung cancer[J]. Chin Med J, 2013, 126(23): 4435–4445
- 16 Burel – Vandenbos F, Ambrosetti D, Coutts M, *et al.* EGFR mutation status in brain metastases of non – small cell lung carcinoma[J]. J Neurooncol, 2013, 111(1): 1–11

(收稿日期:2016–05–31)

(修回日期:2016–06–27)