

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.01.009

文章编号: 1005-8982(2019)01-0050-05

子宫内膜癌组织 microRNA-944 的表达及临床意义

章丽¹, 张志秀¹, 于爱军¹, 李明²

(山东省德州市人民医院 1. 妇产科, 2. 病理科, 山东 德州 253014)

摘要: **目的** 探讨子宫内膜癌组织 microRNA-944 (miR-944) 的表达及其与子宫内膜癌 (EC) 患者临床病理特征及预后的关系, 并分析 miR-944 对患者的早期诊断价值。 **方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 EC 癌组织 (80 例) 和正常子宫内膜组织 (30 例) 中 miR-944 的表达情况, 分析 miR-944 表达与 EC 患者临床病理特征之间的关系。采用 Kaplan-Meier 生存曲线法分析 miR-944 表达与 EC 患者预后的关系, 并采用受试者操作特征曲线 (ROC) 分析 miR-944 对 EC 的早期诊断价值。 **结果** qRT-PCR 结果显示, miR-944 在 EC 癌组织中的表达水平高于正常子宫内膜组织 ($P < 0.05$)。在 EC 癌组织中, miR-944 表达水平与肿瘤肌层浸润深度、有无淋巴转移、有无远处转移及国际妇产联盟 (FIGO) 分期相关 ($P < 0.05$), 而与患者年龄、绝经状态、病理分型和组织分级无关 ($P > 0.05$)。Log-rank 检验结果显示, miR-944 高表达组患者的生存时间较 miR-944 低表达组降低 ($P < 0.05$)。ROC 分析结果显示, miR-944 的曲线下面积 (AUC) 为 0.784。 **结论** EC 癌组织中 miR-944 呈高表达, 且其高表达与 EC 患者不良预后密切相关, miR-944 可作为 EC 早期诊断和预后预测的潜在靶点。

关键词: 子宫内膜肿瘤; 微 RNAs; 病理学, 临床; 预后

中图分类号: R737.3

文献标识码: A

Role of microRNA-944 in patients with endometrial carcinoma

Li Zhang¹, Zhi-xiu Zhang¹, Ai-jun Yu¹, Ming Li²

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, 2. Department of Pathology, Dezhou People's Hospital, Dezhou, Shandong 253014, China)

Abstract: Objective To investigate expression of microRNA-944 (miR-944) in patients with endometrial carcinoma (EC), and to determine its clinical significance. **Methods** The expression level of miR-944 in 80 cases of EC cancer tissues and 30 cases of normal endometrial tissues were measured by real-time quantitative fluorescence PCR (real-time PCR) test. Relationship between the expression of miR-944 and the clinical characteristics of patients with EC was analyzed. **Results** RT-PCR showed that the expression level of miR-944 in EC cancer tissue was significantly higher than that in normal endometrium ($P < 0.05$). Expression of miR-944 was correlated to the depth of tumor myometrium infiltration, lymph node metastasis, distant metastasis and FIGO stage ($P < 0.05$). Log-rank test showed that the survival time of the patients with high expression of miR-944 was decreased obviously compared with that in patients with low expression group of miR-944 ($P < 0.05$). ROC analysis showed that the area under the curve of miR-944 (AUC) was 0.784. No obvious correlation was identified between miR-944 and age, menopausal status, pathological classification, or histological grade ($P > 0.05$). **Conclusions** High expression of miR-944 in EC cancer tissue relates to the poor prognosis, which may be used as a potential diagnostic and prognostic biomarker.

收稿日期: 2018-05-09

[通信作者] 于爱军, E-mail: yuaijun1968@126.com; Tel: 13184123076

Keywords: endometrial neoplasms; microRNAs; pathology, clinical; prognosis

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年升高的趋势,且患者的预后较差^[1]。EC早期患者,在接受根治手术治疗后,其5年总存活率可高达96%^[2]。然而,EC在发生远处转移或者复发后,采用内分泌、放疗的治疗效果并不理想,患者的存活率较低^[3]。因此,临床上迫切需要寻找与EC肿瘤形成相关且有助于EC早期诊断、预后预测的分子靶标。微RNAs(microRNAs)为长度约22个核苷酸的非编码小RNA,在转录后水平通过降解mRNA和/或抑制翻译,负性调控靶基因的表达。MicroRNAs在很多重要的生物学进程中发挥重要作用,如细胞增殖、凋亡、病毒感染及肿瘤发生等^[4]。研究证实,在宫颈癌的肿瘤形成和恶性进展过程中,存在多种microRNAs异常表达^[5],然而仅少数microRNAs在宫颈癌中的功能被深入研究。本研究以EC患者的癌组织样本为研究对象,采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测EC癌组织和正常子宫内膜组织中microRNA-944(miR-944)的表达情况,并分析miR-944表达与EC患者临床病理特征和预后的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2013年6月—2015年6月山东省德州市人民医院80例EC患者的癌组织手术标本。纳入标准:①具有完整的病历资料;②术后病理诊断为EC;③术前均未接受放疗;④无内分泌、免疫和代谢性疾病;⑤术前6个月内未服用激素类药物。排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②全身感染性疾病;③肝肾疾病。本研究中,<55岁患者43例,≥55岁患者37例;绝经前患者47例,绝经后患者33例;子宫内膜样腺癌患者51例,非子宫内膜样腺癌患者29例;组织分级:G₁患者16例,G₂患者26例,G₃患者38例;肌层浸润深度≤1/2患者39例,肌层浸润深度>1/2患者41例;有淋巴结转移患者54例,无淋巴结转移患者26例;有远处转移患者49例,无远处转移患者31例;国际妇产联盟(FIGO)分期:I、II期患者43例,III、IV期患者37例。另收集同期30例子宫肌瘤等良性病变行子宫切除术患者的正常子宫内膜组织作为对

照组。所有子宫内膜组织样本离体后,立即保存于液氮中。本研究获该院医学伦理委员会批准,所有患者知情并签署知情同意书。

1.2 试剂与方法

1.2.1 试剂与仪器 Trizol试剂购自美国Invitrogen公司, RNA提取试剂盒购自美国Axygen公司, MicroRNAs逆转录试剂盒购自上海吉玛制药技术有限公司, cDNA逆转录试剂盒购自美国Thermo Scientific公司, SYBR Green购自德国Roche公司, real-time PCR引物购自上海生工生物工程股份有限公司。Nanodrop分光光度计购自美国Thermo公司, qRT-PCR扩增仪购自德国Roche公司。

1.2.2 qRT-PCR检测miR-944表达 从液氮中取出组织样本,迅速置于10 ml离心管中,加入Trizol试剂,以匀浆器高速间断匀浆,匀浆过程中,离心管置于冰上。Trizol法提取EC癌组织及正常子宫内膜组织中总RNA,操作步骤参照RNA提取试剂盒的说明书。Nanodrop分光光度计检测总RNA浓度及纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.8~2.0), cDNA逆转录试剂盒进行逆转录, cDNA产物置于-20℃冷冻保存备用。引物序列如下:miR-944正向5'-CGCGAGCAGGAAATTATTGTA-3', miR-944反向5'-TATGCTTCTCTCGTCTCTGTC-3';内参U6正向5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3', U6反向5'-AACGC TTCACGAATTTGCCGT-3'。定量PCR扩增仪检测miR-944相对表达水平。qRT-PCR扩增体系为10 μl,反应条件:95℃预变性10 s, 95℃变性15 s, 60℃退火20 s, 70℃延伸20 s,共35个循环。采用2^{-ΔΔCt}法表示miR-944相对表达量。每个组织样品进行3次重复试验后,进行统计分析。

1.3 随访

随访方式为电话或者门诊。随访时间为患者术后1~48个月,随访终点事件为患者死亡或者到达随访截止时间(2017年6月)。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 13.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组的比较采用方差分析,两组的比较采用成组t检验。计数资料以率(%)表示,比较采用 χ^2 检验,建立Kaplan-Meier生存模型,组间比较采用Log-rank检验,采用受试者操作特征

(receiver operation characteristic, ROC) 曲线。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同子宫内膜组织中 miR-944 表达情况

EC 癌组织中 miR-944 相对表达量与正常子宫内膜组织比较, 差异有统计学意义 ($t=15.405, P=0.000$), EC 癌组织 (3.29 ± 1.21) 高于正常子宫内膜组织 (1.02 ± 0.32)。

2.2 EC 癌组织中临床病理特征与 miR-944 表达的关系

EC 癌组织中, miR-944 表达与患者的年龄、绝经状态、病理分型及组织分级无关 ($P > 0.05$); 而与肿瘤肌层浸润深度、有无淋巴结转移、有无远处转移及 FIGO 分期相关 ($P < 0.05$)。在肌层浸润深度 $> 1/2$ 组的癌组织中, miR-944 表达水平高于肌层浸润深度 $\leq 1/2$ 组 ($P < 0.05$); 有淋巴结转移组的癌组织中, miR-944 表达水平高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$); 有远处转移的癌组织中, miR-944 表达水平高于无远处转移组 ($P < 0.05$); 在 I、II 期组的癌组织中, miR-944 表达水平低于 III、IV 期组 ($P < 0.05$)。见附表。

2.3 EC 癌组织中 miR-944 表达与患者生存率之间的关系

以平均值为界限, 将 EC 患者分为 miR-944 低表达组 (34 例) 与 miR-944 高表达组 (46 例), 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。结果显示, miR-944 高表达组患者的 5 年总生存率与低表达组患者比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=8.534, P=0.003$), 高表达组为 54.35% (25/46), 低于 miR-944 低表达组患者的 85.29% (29/34)。miR-944 高表达组的患者平均生存时间为 (50.09 ± 2.03) 个月, 而 miR-944 低表达组患者的平均生存时间为 (56.03 ± 1.83) 个月, Log-rank 检验结果显示, miR-944 高表达组患者的生存时间较 miR-944 低表达患者降低 ($\chi^2=7.784, P=0.006$)。见图 1。

2.4 miR-944 表达对患者预测 / 诊断价值分析

以正常对照组和子宫内膜癌组为样本, 进行 miR-944 表达水平的 ROC 分析, 分析 miR-944 表达水平对患者是否具有一定的辅助诊断 / 判断价值。约登指数 = (敏感性 + 特异性 - 1), 约登指数最大时对应的 miR-944 相对表达量, 即为鉴别诊断阈值, 本研究中的鉴别诊断阈值为 1.8, 在此阈值点, 敏感性为 74.3%, 特异性为 70.8%, ROC 曲线的曲线下面积

(AUC) 为 0.784, 1-特异性为 29.2%, 约登指数为 0.451。ROC 曲线见图 2。

附表 EC 癌组织中临床病理特征与 miR-944 表达的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	n	miR-944	t/F 值	P 值
年龄				
<55 岁	43	3.36 ± 1.22	0.522	0.603
≥ 55 岁	37	3.22 ± 1.17		
绝经状态				
绝经前	47	3.29 ± 1.24	0.034	0.973
绝经后	33	3.30 ± 1.36		
病理分型				
子宫内膜样腺癌	51	3.42 ± 1.45	1.074	0.286
非子宫内膜样腺癌	29	3.07 ± 1.31		
组织分级				
G ₁	16	3.25 ± 1.17	0.641	0.529
G ₂	26	3.09 ± 1.34		
G ₃	38	3.45 ± 1.24		
肌层浸润深度				
≤ 1/2	39	2.51 ± 1.37	4.567	0.000
> 1/2	41	4.04 ± 1.61		
淋巴结转移				
有	54	3.48 ± 1.24	2.100	0.039
无	26	2.83 ± 1.41		
远处转移				
有	49	3.53 ± 1.46	2.192	0.031
无	31	2.82 ± 1.33		
FIGO 分期				
I、II 期	43	3.02 ± 1.35	-3.069	0.001
III、IV 期	37	3.71 ± 1.49		

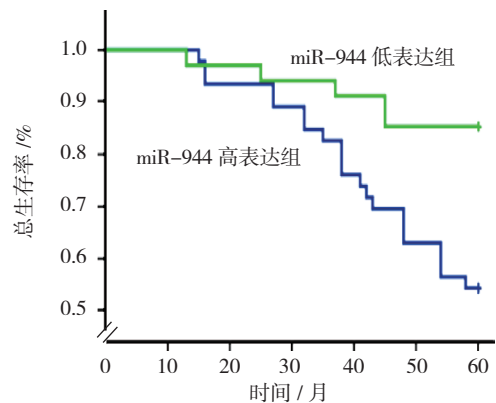


图 1 EC 癌组织中 miR-944 表达与患者生存率之间的关系

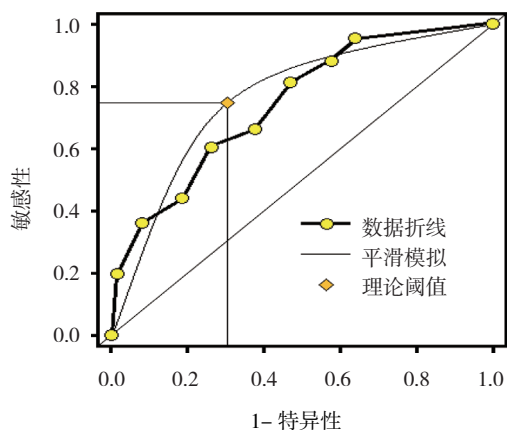


图 2 ROC 曲线

3 讨论

EC 发病率位居女性恶性肿瘤的第 6 位, 据统计, 2012 年全球 EC 新发病例数约 32 万^[6]。EC 是一种高度异质性的恶性肿瘤, 且多种危险因素可诱发 EC, 如高血压、绝经状态、不孕症及家族史等^[7]。近年来, 对 EC 诊断和治疗方面取得了巨大进展, 然而 EC 晚期患者的预后并不乐观, 其 5 年总生存率仅 10% ~ 29%^[8]。在人类肿瘤发生和恶性进展中, 存在多种 microRNAs 的功能异常和表达异常。MicroRNAs 可同时具有促癌基因和抑癌基因功能^[9], 取决于其下游靶基因的功能, 如 miR-340 在骨肉瘤癌细胞通过靶向沉默 *ROCK1* 基因表达, 抑制肿瘤细胞增殖和侵袭, 具有抑癌基因功能^[10], 而在胃癌细胞中, miR-340 则能够促进肿瘤细胞生长、抑制细胞凋亡, 发挥促癌基因的功能^[11]。多种 microRNAs 在 EC 细胞增殖和凋亡过程中发挥促癌基因或者抑癌基因的功能, 如 miR-199A-3P^[12]、miR-101^[13] 等。越来越多的证据表明, miR-944 参与多种恶性肿瘤的发生和恶性进展过程, 本研究关注 miR-944 在 EC 癌组织中表达情况及其临床意义。

首先, qRT-PCR 结果显示, 与正常子宫内膜组织相比, miR-944 在 EC 癌组织中表达水平上调, 提示在 EC 肿瘤形成过程中, miR-944 可能发挥促癌基因的功能, 同时也有研究证实, miR-944 在非小细胞肺癌 (nonsmall-cell lung cancer, NSCLC) 中靶向下调抑癌基因 *SOCS4* 表达, 进而促进肿瘤形成, 发挥促癌基因功能^[14], 然而, miR-944 在胃癌^[15]、食道癌^[16]及结肠癌^[17]等肿瘤细胞中发挥抑癌基因功能, 可能与肿瘤所属组织器官差异或者 miR-944 下游靶基因不同有关。

分析 EC 癌组织中 miR-944 表达与 EC 患者临床病理特征之间的关系, 结果显示, miR-944 在肌层浸

润深度 >1/2、存在淋巴转移、远处转移和 III、IV 期的癌组织中的表达水平较高, 提示在 miR-944 可能促进了 EC 癌细胞对周围组织浸润、淋巴转移和远处转移, 且 miR-944 具有作为 EC 早期诊断 (I、II 期) 指标的潜能。miR-944 可能是通过靶向调节与肿瘤浸润、侵袭及转移相关的基因表达, 进而发挥作用, 如 XIE 等^[18] 研究证实, miR-944 靶向下调抑癌基因 *S100BP* 表达, 进而促进宫颈癌细胞侵袭转移, 本研究并未对 miR-944 促进肿瘤转移的内在机制进行探究, 将在以后的研究中进行探索。

此外, 本研究对 miR-944 表达与 EC 患者预后的关系进行分析, 结果显示, miR-944 高表达的 EC 患者, 其术后 5 年总生存率和平均生存时间均低于 miR-944 低表达患者, 提示 miR-944 高表达可能预示着较低的生存率和较短的生存时间, 与 EC 患者不良预后密切相关, miR-944 具有作为 EC 患者不良预后预测的生物靶分子的潜能。HE 等^[19] 在乳腺癌中的研究结果也得到类似的结论, miR-944 通过靶向调节 *BNIP3* 基因表达, 产生获得性耐药, miR-944 可作为乳腺癌患者不良预后的预测靶标。

最后, miR-944 表达水平的 ROC 分析, 结果提示: 当 miR-944 表达水平在 1.8 (ROC 分析所得阈值) 以上时, 患者 EC 的阳性率提高。提示其可作为判断 EC 的辅助证据, ROC 曲线下面积 AUC 值较高 (0.784), 敏感性和特异性也较好。董动丽等^[20] 的研究结果表明, 血清 HE4 和 CA125 诊断 EC 的敏感性分别为 54.67% 和 28.00%, 特异性分别为 98.57% 和 91.43%, 与之相比, 本研究中 miR-944 诊断 EC 的敏感性较高, 而特异性偏低。当然, 由于本研究的实验样本量较少, 可能会导致结果出现一定的偏倚, 在后续的研究中应扩大样本量, 以得到更加可靠、准确的结论。

综上所述, 本研究结果证实, miR-944 在 EC 癌组织中呈高表达状态, 且 miR-944 高表达预示着患者可能发生肌层浸润、淋巴结转移及远处转移, 并且与患者较低的术后 5 年总生存率和较短平均生存时间相关, 提示 miR-944 参与并促进了 EC 肿瘤形成和恶性进展, miR-944 可作为 EC 早期诊断和预后预测的潜在靶点。

参 考 文 献:

- [1] MATSUO K, MOEINI A, CAHOON S S, et al. Weight change pattern and survival outcome of women with endometrial

- cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23(9): 2988-2997.
- [2] 罗茜, 尹国武, 朱晓明, 等. 子宫内膜癌手术治疗的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(11): 2197-2200.
- [3] BOGANI G, DOWDY S C, CLIBY W A, et al. Management of endometrial cancer: issues and controversies[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2016, 37(1): 6-12.
- [4] 田晓琳, 杨臻, 王建英, 等. 微小 RNA 与肿瘤的关系 [J]. *癌症进展*, 2016, 14(1): 22-25.
- [5] MEI J, LI M Q, LI D J, et al. MicroRNA expression profiles and networks in CXCL12-stimulated human endometrial stromal cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 249-255.
- [6] CHISHTI U, AZIZ A B, AKHTAR M, et al. Selective lymphadenectomy in endometrial cancer: retrospective analysis of morbidity and survival data at a tertiary care centre[J]. *Pak J Med Sci*, 2015, 31(4): 950-955.
- [7] 石妮娅, 犹忆, 吴艳乔. 关于子宫内膜癌危险因素 Meta 分析 [J]. *预防医学情报杂志*, 2015, 31(4): 299-303.
- [8] 赵祎琪, 邓泽文, 郗明蓉, 等. 226 例晚期子宫内膜癌的临床病理特征及治疗与其预后的相关因素分析 [J]. *实用妇产科杂志*, 2017, 33(7): 506-511.
- [9] 田晓琳, 杨臻, 王建英, 等. 微小 RNA 与肿瘤的关系 [J]. *癌症进展*, 2016, 14(1): 22-25.
- [10] ZHOU X, WEI M, WANG W. MicroRNA-340 suppresses osteosarcoma tumor growth and metastasis by directly targeting ROCK1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437(4): 653-658.
- [11] HOU X, QIAO H. Effect of miR-340 on gastric cancer cell proliferation and apoptosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 13108-13113.
- [12] WU D, HUANG H J, HE C N, et al. MicroRNA-199a-3p regulates endometrial cancer cell proliferation by targeting mammalian target of rapamycin (mTOR)[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(7): 1191-1197.
- [13] KONNO Y, DONG P, XIONG Y, et al. MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15): 6049-6062.
- [14] MA J, MANNOOR K, GAO L, et al. Characterization of microRNA transcriptome in lung cancer by next-generation deep sequencing[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(7): 1208-1219.
- [15] PAN T, CHEN W, YUAN X, et al. miR-944 inhibits metastasis of gastric cancer by preventing the epithelial-mesenchymal transition via *MACC1/Met/AKT* signaling[J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(7): 905-914.
- [16] WARNECKE-EBERZ U, CHON S H, HÖLSCHER A H, et al. Exosomal onco-miRs from serum of patients with adenocarcinoma of the esophagus: comparison of miRNA profiles of exosomes and matching tumor[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4643-4653.
- [17] WEN L, LI Y, JIANG Z, et al. MiR-944 inhibits cell migration and invasion by targeting *MACC1* in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3415-3422.
- [18] XIE H, LEE L, SCICLUNA P, et al. Novel functions and targets of miR-944 in human cervical cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E230-241.
- [19] HE H, TIAN W, CHEN H, et al. MiR-944 functions as a novel oncogene and regulates the chemoresistance in breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 1599-1607.
- [20] 董动丽, 顾劲松, 赵绍杰. 子宫内膜癌患者血清 HE4、CA125 水平变化及其意义 [J]. *山东医药*, 2017, 57(3): 73-75.

(张西倩 编辑)