

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.26.013

文章编号: 1005-8982(2017)26-0066-04

## MicroRNA-182 在人肺腺癌中的表达及其临床意义\*

房延凤, 张红军, 金发光, 傅恩清, 鲁曦

(第四军医大学唐都医院 呼吸与危重症医学科, 陕西 西安 710038)

**摘要:目的** 探讨 microRNA-182(miRNA-182)在人肺腺癌组织中的表达,以及与患者临床特征及预后的相关性。**方法** 收集术后或穿刺活检病理证实的人肺腺癌新鲜组织 98 例,以及其癌旁正常肺组织和良性病变旁正常肺组织 98 例,实时荧光定量聚合酶链反应检测 miRNA-182 的相对表达量,分析其与临床特征及生存预后的关系,用 ROC 曲线评估 miRNA-182 对人肺腺癌的诊断能力。**结果** miRNA-182 在人肺腺癌组织相对表达量为(0.8001±0.2112),在正常肺组织相对表达量为(0.2721±0.1216),人肺腺癌组织中的表达高于正常肺组织( $P<0.05$ );miRNA-182 的表达水平与 TNM 分期、淋巴结转移、远处转移及肿瘤分化相关( $P<0.05$ )。ROC 曲线分析发现,当界值设置为 0.52 时,miRNA-182 在人肺腺癌中的表达特异性为 95.918%,敏感性为 91.837%,阳性预测值为 95.745%。**结论** miRNA-182 在人肺腺癌组织中表达量高于正常肺组织,有可能成为人肺腺癌诊断、预后评估的重要指标。

**关键词:** microRNA-182;人肺腺癌;诊断;预后

**中图分类号:** R734.2

**文献标识码:** A

## MicroRNA-182 expression and its clinical significance in human lung adenocarcinoma\*

Yan-feng Fang, Hong-jun Zhang, Fa-guang Jin, En-qing Fu, Xi Lu

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China)

**Abstract: Objective** To study the level of microRNA-182 (miRNA-182) in human lung adenocarcinomas, and to evaluate its correlations with clinical features and prognosis of the patients with lung adenocarcinomas. **Methods** The fresh human lung adenocarcinoma tissues and their paired adjacent normal lung tissues of 98 cancer patients, and normal lung tissues of 98 cases with benign lesions were collected. All tissues of surgery or biopsy were confirmed by pathology. miRNA-182 was measured by qRT-PCR. The correlations of miRNA-182 with clinical features and prognosis of human lung adenocarcinomas were analyzed. The ROC curve was used to evaluate the ability of miRNA-182 in diagnosis of human lung adenocarcinomas. **Results** The level of miRNA-182 in the human lung adenocarcinomas (0.8001±0.2112) was significantly higher than that in the normal lung tissues [(0.2721±0.1216),  $P<0.05$ ]. The level of miRNA-182 in human lung adenocarcinomas was correlated with TNM stage, lymphatic metastasis, distant metastasis and tumor differentiation ( $P<0.05$ ). After further analysis by ROC curve, the results showed that when the cut-off value was set to 0.52, the specificity, the sensitivity and the positive predictive value of miRNA-182 in human lung adenocarcinomas were 95.918%, 91.837% and 95.745% respectively. **Conclusions** Level of miRNA-182 in human lung adenocarcinomas is significantly higher than that in normal lung tissues, it may be an important index for the diagnosis of human lung adenocarcinomas and prognosis evaluation.

**Keywords:** miRNA-182; human lung adenocarcinoma; diagnosis; prognosis

收稿日期:2016-10-19

\* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(No:31300121)

[通信作者] 鲁曦, E-mail: luxi1126@163.com

肺癌是全球发病率和死亡率最高的肿瘤,大多数患者被发现时已处于中、晚期<sup>[1]</sup>。因此,寻找有关肺癌早期预警、诊断标志物是目前研究的热点之一<sup>[2]</sup>。近来研究显示,microRNA-182(miRNA-182)的异常表达与肺癌的发生、发展密切相关<sup>[3-4]</sup>。本实验采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测 98 例术后或穿刺活检病理证实的人肺腺癌新鲜组织标本中 miRNA-182 的表达,研究其与各临床特征的关系,探讨 miRNA-182 在人肺腺癌中的诊断价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床标本及资料

选取 2010 年 6 月 -2011 年 6 月第四军医大学唐都医院术后或穿刺活检病理证实的人肺腺癌新鲜组织 98 例,及其正常肺新鲜组织(癌旁正常肺组织或良性病变旁正常肺组织)98 例。其中,年龄 33 ~ 88 岁,平均(60.67 ± 9.76)岁。临床病理分期采用 UICC(2009 年)制定的 TNM 分期标准。所有患者术前未行放、化疗,亦无其他恶性病变病史,相关资料完整。正常肺组织选用标准为癌组织边缘 >5 cm 或手术后良性病变周围正常肺组织。常规处理组织后,在 -80℃冰箱中保存。术后随访至 2016 年 6 月,随访 98 例,失访 11 例,随访率为 88.775%(87/98),随访期间,把死于与肺癌无关或失访的患者作为删失患者。入组患者均签署知情同意书。

### 1.2 主要仪器及设备

总 RNA 提取试剂:miRNeasy FFPE Kit 和 RNase-Free DNase I(德国 Qiagen 公司)。仪器:微量移液器(德国 Eppendorf 公司),离心机(型号:3K-15,德国 SIGMA 公司),紫外分光光度计(美国热电公司)。逆转录试剂:Prime Script<sup>®</sup> RT reagent Kit With gDNA Eraser(日本 TaKaRa 公司);PCR 试剂:SYBR Prime Script<sup>™</sup> miRNA RT-PCR kit(日本 TaKaRa 公司);仪器:PCR 基因扩增仪和 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 引物及内参

PCR 引物用 Oligo 和 Beacon 7.8 软件进行荧光定量设计,由上海生工生物工程股份有限公司负责合成。正向引物:5'-GCTTTGGCAATGGTAGAACTCACACT-3';反向引物:5'-TTTGGCAATGGTAGAACTCACT-3'。选择  $\beta$ -actin 作为内参,正向引物:5'-GTGGGCGCCCCAGGCACCA-3';反向引物:5'-CTCCT

TAATGTCACGCACGATTTC-3'。

### 1.4 RNA 提取、逆转录及 qRT-PCR

RNA 提取按照日本 TaKaRa 公司 RNA 纯化试剂盒说明书进行操作,注意 RNA 降解。利用紫外分光光度计对 RNA 定量后于 -80℃冰箱冷冻保存待用。随后利用逆转录试剂盒逆转录,操作步骤严格按照说明书进行。本研究采用 SYBR 法进行 qRT-PCR,反应体系的配置严格按说明书操作,反应条件如下:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,共 40 个循环。对 miRNA-182 行相对定量分析,反应结束后绘制溶解曲线,确认引物特异性后记录内参基因和目的基因的 CT 值,同时计算相对表达量。每个标本重复 3 次。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件行,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用方差分析或 *t* 检验,描述生存过程用 Kaplan-Meier 法,miRNA-182 对人肺腺癌的诊断用 ROC 曲线,肺腺癌患者影响因素的分析采用 COX 比例风险模型, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 正常肺组织与肺腺癌组织 miRNA-182 表达的比较

肺腺癌组织相对表达量为(0.8001 ± 0.2112),正常肺组织相对表达量为(0.2721 ± 0.1216),经 *t* 检验,差异有统计学意义( $t = 16.380, P = 0.000$ ),肺腺癌组织 miRNA-182 相对表达量高于正常肺组织。见图 1。

### 2.2 miRNA-182 表达与患者临床病理特征的关系

不同性别、年龄患者的 miRNA-182 表达水平比较,经 *t* 检验,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );不同肿瘤分化程度比较,经方差分析,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),低、中分化患者的 miRNA-182 表达水平

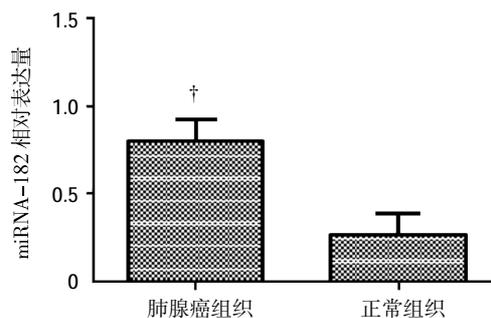


图 1 肺腺癌组织与正常组织 miRNA-182 的相对表达量比较

高于高分化患者;有远处转移及淋巴结转移患者的 miRNA-182 表达水平高于无上述转移患者( $P<0.05$ ); TNM III、IV 期患者的 miRNA-182 表达水平高于 TNM I、II 期患者( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 患者临床病理特征与 miRNA-182 表达的关系

临床病理特征	例数	miRNA-182/ ( $\bar{x} \pm s$ )	F/t 值	P 值
<b>性别</b>				
男	41	0.8042 ± 0.2051	0.360	0.501
女	57	0.7791 ± 0.2070		
<b>年龄</b>				
<65 岁	42	0.8145 ± 0.2259	0.871	0.405
≥65 岁	56	0.7801 ± 0.1921		
<b>肿瘤分化</b>				
低	45	0.9010 ± 0.2001	9.498	0.001
中	27	0.8001 ± 0.2012		
高	26	0.6792 ± 0.1744		
<b>淋巴结转移</b>				
阳性	67	0.8441 ± 0.1859	3.569	0.023
阴性	31	0.6914 ± 0.2159		
<b>远处转移</b>				
阳性	38	0.8886 ± 0.1859	3.769	0.021
阴性	60	0.7367 ± 0.1965		
<b>TNM 分期</b>				
I、II	34	0.6867 ± 0.2070	10.099	0.000
III	26	0.8019 ± 0.1617		
IV	38	0.8891 ± 0.1939		

### 2.3 miRNA-182 表达与患者生存分析

**2.3.1 5 年总体生存分析** 用电话方式对 98 例患者进行随访,随访时间为 2010 年 6 月 -2016 年 6 月,期间患者死亡 78 例,存活 9 例,失访 11 例;总体中位生存时间 35.253 个月,5 年生存率为 10.345% (9/87)。见图 2。

**2.3.2 多因素生存分析** 将人肺腺癌中 miRNA-182 表达有差异的相关变量:miRNA-182 表达、人肺腺癌分化程度、淋巴结及远处转移,以及 TNM 分期纳入 COX 多因素比例风险回归模型。逐步回归分析结果表明,miRNA-182 表达状态、TNM 分期是影响肺腺癌患者预后的独立因素( $P<0.05$ )。见表 2。

### 2.4 miRNA-182 表达对人肺腺癌诊断能力的评价

采用 98 例人肺腺癌组织和 98 例正常肺组织 miRNA-182 的相对表达量建立 ROC 曲线,曲线下面积确定为 0.95,界值 0.52(见图 3)。以该界值对肺癌

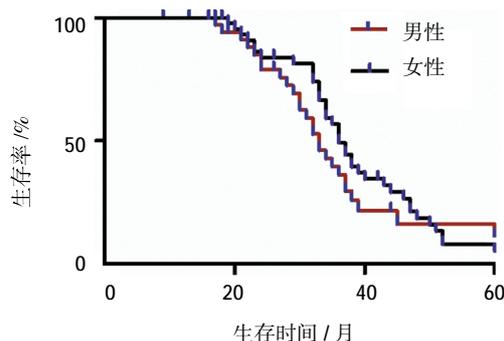


图 2 男女 5 年生存率比较

表 2 肺腺癌患者影响因素的多因素 COX 回归分析相关参数

变量	b	S <sub>b</sub>	Wald $\chi^2$	P 值	RR	95%CI	
						上限	下限
miRNA-182 表达	1.022	0.408	6.399	0.012	2.781	1.256	6.159
肿瘤分化	-0.141	0.208	0.489	0.488	0.866	0.581	1.302
淋巴结转移	0.492	0.391	1.662	0.190	1.640	0.770	3.501
远处转移	0.007	0.720	0.001	0.991	1.008	0.241	4.420
TNM 分期	1.311	0.470	7.761	0.004	3.710	1.481	9.342

和正常肺组织重新进行判断,<0.52 判定为肺癌组织,>0.52 判定为正常肺组织。miRNA-182 表达对肺癌诊断的特异性为 95.918% (94/98), 敏感性为 91.837% (90/98), 阳性预测值为 95.745% (90/94), 阴性预测值为 92.157% (94/102), 阴性似然比为 0.085 (1-0.91837/0.95918), 约登指数为 87.755% (91.837%+95.918% -1), 阳性似然比为 22.498 (0.91837/1-0.95918)。

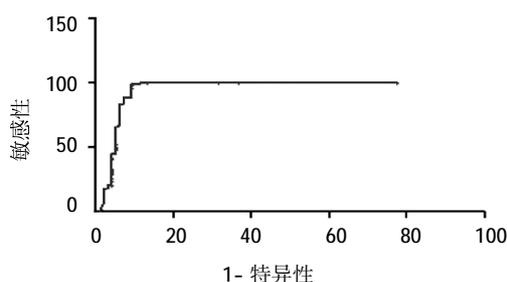


图 3 miRNA-182 在肺腺癌组织和癌旁正常肺组织表达的 ROC 曲线

### 3 讨论

miRNA 为一类非编码 RNA 分子,对转录后的基因进行调控<sup>[6]</sup>。miRNA 在细胞生长多个过程中发挥重要调节作用<sup>[6]</sup>。迄今发现,作为 miRNA 家族一员的 miRNA-182 的异常表达与人类很多肿瘤相关,miRNA-182 作为一种癌基因或抑癌基因,具有调节肿瘤浸润、转移等功能<sup>[7]</sup>。新近研究发现,miRNA-182 在多株肺腺癌细胞包括 SPC-A-1 和 A549 细胞中表达高,使 PDCD4 表达量下调,从而加快肺癌细胞的增殖<sup>[8]</sup>。

本研究首先发现,miRNA-182 在人肺腺癌组织中的表达高于正常肺组织,其中低、中分化癌组织中 miRNA-182 表达高于高分化组织,TNM III、IV 期表达高于 TNM I、II 期,即腺癌组织恶性程度越高、分期越晚,其表达量越高。既往 YANG 等<sup>[9]</sup>研究得出,在人肺癌早期 miRNA-182 表达增加,可促进肺癌细胞的增殖、转移,与本研究结果一致。其次,本文 COX 多因素生存分析提示,miRNA-182 表达状态、TNM 分期是影响肺腺癌患者预后的独立因素,由此可见,miRNA-182 对肺腺癌患者的预后评估有重要作用。最后,本实验通过对 98 例人肺腺癌组织及其正常肺组织的 miRNA-182 相对表达量建立 ROC 曲线,明确诊断界值,重新判定肺癌和正常组织,得出其特异性、敏感性及阳性预测值均高于传统肿瘤标志物。虽然该方法有局限性,但是一定程度上表明,miRNA-182 对于人肺腺癌的诊断、分期及预后预测有重要意义,有望成为腺癌组织形态学改变前的分子学改变,其高表达预示肿瘤的高危性或进展性。此外 BARSHACK 等<sup>[10]</sup>用 qRT-PCR 和微阵列分析对 110 个肺原发肿瘤及肺转移癌组织标本进行检测,得出 miRNA-182 在肺原发癌中明显升高,而肺转移癌中 miRNA-126 过表达,从而表明 miRNA-182 可能对鉴别肺转移癌及肺原发肿瘤有一定意义。

LEI 等<sup>[11]</sup>研究发现,miRNA-182 在乳腺癌细胞中

高表达,且与乳腺癌的预后呈负相关。因此 miRNA-182 并不是肺癌的特有指标,应联合其他肿瘤标志物及相关临床资料,成为早期诊断肺癌的方法之一。最后,鉴于本研究样本量有限,还需在多中心大样本量中进一步验证其应用价值。

#### 参 考 文 献:

- [1] CARILLIO G, MONTANINO A, COSTANZO R, et al. Cetuximab in non-small-cell lung cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012, 12(2): 163-175.
- [2] SAWYERS C L. The cancer biomarker problem[J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 548-552.
- [3] 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.
- [4] 朱清,许波,刘雨生. microRNA 在卵巢和卵巢癌中的表达及功能[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(5): 694-697.
- [5] FARAZI T A, SPITZER J I, MOROZOV P, et al. miRNAs in human cancer[J]. *J Pathol*, 2011, 223(2): 102-115.
- [6] LUJAMBIO A, LOWE S W. The microcosmos of cancer[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 347-355.
- [7] RASHEED S A, TEO C R, BEILLARD E J, et al. MicroRNA-182 and microRNA-200a control G-protein subunit alpha-13 (GNA13) expression and cell invasion synergistically in prostate cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(11): 7986-7995.
- [8] WANG M, WANG Y, ZANG W, et al. Downregulation of miRNA-182 inhibits cell growth and invasion by targeting programmed cell death 4 in human lung adenocarcinoma cells[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1): 39-46.
- [9] YANG W B, CHEN P H, HSU T S, et al. Sp1-mediated microRNA-182 expression regulates lung cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(3): 740-753.
- [10] BARSHACK I, LITHWICK-YANAI G, AFEK A, et al. MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung[J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(8): 578-584.
- [11] LEI R, TANG J, ZHUANG X, et al. Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis[J]. *Oncogene*, 2014, 33(10): 1287-1296.

(童颖丹 编辑)