

癌组织中微小 RNA-200c 水平对非小细胞肺癌患者预后评估的价值

榆林市第一医院 张扬帆¹ 郝尧¹ 刘春娥*, 榆林 719000

摘要 目的:探讨癌组织中 microRNA-200c 表达水平对非小细胞肺癌(NSCLC)患者预后的预测价值。方法:选择接受肺叶切除、全肺切除联合系统性淋巴结清扫术治疗的 NSCLC 患者 100 例,均经病理确诊。根据癌组织中 microRNA-200c 水平将患者分为 microRNA-200c 低表达组(40 例)和 microRNA-200c 高表达组(60 例),分析 microRNA-200c 水平与临床、病理特征的关系,应用单因素、多因素非条件 Cox 回归分析影响 NSCLC 患者预后的危险因素。绘制 Kaplan-Meier 法生存曲线,分析 NSCLC 组织中 microRNA-200c 表达水平与患者预后的关系。结果:microRNA-200c 在 NSCLC 组织中表达水平高于癌旁正常组织(7.65 ± 2.01 vs 4.01 ± 0.88 , $P < 0.05$)。NSCLC 组织中 microRNA-200c 表达水平与年龄、性别、吸烟史、嗜酒史、组织类型、分化程度、肿瘤直径无关(均 $P > 0.05$),与 TNM 分期、N 分期有关(均 $P < 0.05$)。单因素、多因素 Cox 回归分析显示,N 分期(N1 ~ N2 期)、microRNA-200c 高表达是影响 NSCLC 患者无进展生存率和总生存率的危险因素(均 $P < 0.05$)。Kaplan-Meier 法生存曲线显示,NSCLC 组织中 microRNA-200c 高表达组患者无进展生存率、总生存率显著低于 microRNA-200c 低表达组(均 $P < 0.05$)。结论:肺癌组织中 microRNA-200c 高表达不利于 NSCLC 患者预后,其可作为评估 NSCLC 患者预后的分子标志物。

关键词 非小细胞肺癌; microRNA-200c; 无进展生存率; 总生存率

中图分类号 734.2 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20200407

Prognostic significance of MicroRNA-200c expression in cancer tissues of patients with non-small cell lung cancer

ZHANG Yang-fan^{*}, HAO Yao¹. Yulin First People's Hospital, Yulin 719000, China

Abstract Objective: To investigate the prognostic value of microRNA-200c expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Methods: 100 patients with NSCLC receiving pulmonary lobectomy, pneumonectomy combined with systemic lymphadenectomy therapy in our hospital from Jan. 2011 to Dec. 2012 were selected as study subjects. All diagnoses were confirmed pathologically. Patients were divided into microRNA-200c low expression group ($n = 40$) and microRNA-200c high expression group ($n = 60$) according to the expression level of microRNA-200c in NSCLC tissues. The relationship between the expression of microRNA-200c in NSCLC tissues and clinicopathological features was analyzed. The risk factors affecting the prognosis of NSCLC patients were analyzed by univariate and multivariate unconditional Cox regression. Kaplan-Meier survival curve was drawn to analyze the relationship between the expression of microRNA-200c and prognosis in NSCLC tissues. Results: The expression level of microRNA-200c in NSCLC tissues was (7.65 ± 2.01), significantly higher than that (4.01 ± 0.88) in normal tissues ($t = -16.59$, $P < 0.05$). The expression of microRNA-200c in NSCLC tissues was not correlated with age, sex, smoking history, alcoholism history, histological type, differentiation degree, tumor diameter ($P > 0.05$), but with TNM stage, N stage ($P < 0.05$). Univariate and multivariate Cox regression analysis showed that N stage (stage N1-N2) and high expression of microRNA-200c were risk factors for progression-free survival and overall survival in NSCLC patients ($P < 0.05$). The Kaplan-Meier survival curve showed that the progression-free survival rate and overall survival rate of NSCLC patients with high expression of microRNA-200c were significantly lower than those of low expression of microRNA-200c group ($P < 0.05$). Conclusion: High expression of microRNA-200c in cancer tissues is not conducive to the prognosis of patients with NSCLC, and microRNA-200c can be used as a molecular marker to evaluate the prognosis of patients with NSCLC.

Key words Non-small cell lung cancer; MicroRNA-200c; Progression-free survival; Overall survival rate

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的预后较差^[1,2],且缺乏可靠的预后生物标志物,microRNA-200c 属于 microRNA-200 家族成员,参与多种恶性肿瘤及其他类型疾病的发生、发展及转移过程^[3~6]。本研究分析癌组织中 microR-

NA-200c 表达水平与 NSCLC 患者无进展生存率和总生存率的关系,报道如下。

资料与方法

一般资料 选择 2011 年 1 月 ~ 2012 年 12 月在榆林市第一医院接受肺叶切除、全肺切除联合系统性淋巴结清扫术治疗并经病理确诊的 NSCLC 患者 100 例(男 61,女 39),年龄 40 ~ 76 岁,平均 ($58.7 \pm$

¹ 榆林市第二医院

* 通信作者:刘春娥,E-mail:lkq262626@163.com

18.0)岁;其中鳞癌 48 例、腺癌 52 例;低分化 23 例、中分化 45 例、高分化 32 例;TNM 分期 I 期 44 例、II 期 40 例、III 期 16 例;肿瘤直径 2 ~ 5 cm, 平均 (3.15 ± 1.02) cm; N 分期 N0 期 50 例、N1 ~ N2 期 50 例。另选择同一患者癌旁组织(距离原发肿瘤组织 > 5 cm)作为对照,病理证实正常。本研究获得医院医学伦理委员会批准,且患者均知情同意。

纳入标准 NSCLC 诊治符合 2011 年《中国原发性肺癌诊疗规范》标准^[7];根据国际抗癌联盟标准对 NSCLC 组织标本进行 TNM 分期^[8];术前无放疗、化疗等新辅助治疗史。

排除标准 伴有心、肝、脾、肺、肾等重要脏器损伤;合并其它恶性肿瘤;合并呼吸系统或血液系统疾病;精神疾病及言语功能障碍。

方法 microRNA-200c 检测:取 NSCLC 组织标本和癌旁正常组织标本各 10 ~ 20 mg,加入液氮中研磨,加入 1 mL Trizol 反复吹打混匀,静置 10 min;加入 200 μ L 氯仿,震荡,静置 5 min,12 000 r/min 离心 20 min,吸取上层;依次加入异丙醇、无水乙醇混匀,12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,干燥沉淀,加入 DEPC 水溶解沉淀,利用分光光度计检测 RNA 浓度及纯度;以此 RNA 为底物添加特异性逆转录引物(美国 Applied Biosystems 公司),根据逆转录试剂盒说明书要求进行逆转录。实时荧光定量 PCR 中, microRNA-200c F: 5'-GAGCCGTCTTACCCAGCA-3', R: 5'-GTGCAGGTCCTCGAGGTAT-3', 内参基因 U6 F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', R: 5'-GTGCAGGTCCTCGAGGT-3', 引物由上海生工合成;扩增条件为: 95℃ 5 min 1 个循环, 95℃ 15s, 60℃ 50s, 68℃ 10s 40 个循环。每个样本设置 3 个复孔。记录每个反应管中的荧光信号到达所设定的域值时所经历的循环数,即 Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 NSCLC 组织标本和癌旁正常组织标本中 microRNA-200c 的相对表达水平。

患者术后每隔 3 ~ 6 个月复查 1 次胸部 CT 并进

行实验室检查,采用门诊复查及电话进行随访,至患者死亡或 2018 年 8 月 31 日为随访终点。其中,无进展生存率为从入院时至随访结束,完全缓解、部分缓解或疾病未恶化的患者疾病不继续恶化的概率;总生存率为从入院至随访结束生存的患者例数占全部人数的比例。资料不完整患者将去除。

统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计软件包。符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验或单因素方差分析;计数资料以百分数(%)表示,采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法进行生存曲线绘制,利用 Log-rank 法进行差异性检验。单因素、多因素采用非条件 Cox 回归进行分析。多分类变量以亚变量的形式进入回归模型。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

microRNA-200c 在 NSCLC 和癌旁正常组织中的表达情况 microRNA-200c 在 NSCLC 组织中的相对表达水平高于癌旁正常组织 $(7.65 \pm 2.01$ vs $4.01 \pm 0.88, P < 0.05)$ 。以 microRNA-200c (7.65 ± 2.01) 为临界值, $\geq 7.65 \pm 2.01$ 为 microRNA-200c 高表达组, $< 7.65 \pm 2.01$ 为 microRNA-200c 低表达组。本研究中, microRNA-200c 高表达组 60 例,低表达组 40 例。

NSCLC 组织中 microRNA-200c 表达水平与临床病理特征的关系 NSCLC 组织中 microRNA-200c 表达水平与年龄、性别、吸烟史、嗜酒史、组织类型、分化程度、肿瘤直径无关(均 $P > 0.05$),与 TNM 分期、N 分期有关(均 $P < 0.05$),见表 1。

影响预后的单因素 Cox 回归分析 100 例 NSCLC 患者中有 71 例(71%) 在随访结束时死亡,无进展生存期 $(8.50 \sim 65.82)$ 个月,平均 (47.54 ± 12.84) 个月;总生存期 $(9.25 \sim 68.24)$ 个月,平均 (52.15 ± 14.45) 个月。单因素 Cox 回归分析显示,

表 1 NSCLC 组织中 microRNA-200c 表达水平与临床病理特征的关系

组别	例	年龄(例)		性别(例)		吸烟史(例)		嗜酒史(例)		组织类型(例)	
		≤ 60 岁	> 60 岁	男	女	有	无	有	无	鳞癌	腺癌
低表达组	40	25	15	26	14	15	25	10	30	18	22
高表达组	60	30	30	35	25	20	40	15	45	30	30
组别	例	分化程度(例)			TNM 分期(例)*			肿瘤直径(cm)		N 分期(例)*	
		低分化	中分化	高分化	I	II	III	≤ 3	> 3	N0	N1 ~ N2
低表达组	40	8	20	12	20	15	5	21	19	30	10
高表达组	60	15	25	20	24	25	11	27	33	20	40

注: 2 组间比较, * $P < 0.05$

TNM 分期、N 分期、microRNA-200c 表达水平是影响 NSCLC 患者无进展生存率和总生存率的危险因素 (均 $P < 0.05$), 见表 2。

表 2 影响 NSCLC 患者预后的单因素 Cox 回归分析

(月, $\bar{x} \pm s$)

因素	无进展生存率 中位生存时间	总生存率 中位生存时间
年龄(岁)		
≤60	47.25 ± 12.15	52.95 ± 14.11
>60	47.66 ± 13.05	52.02 ± 14.87
性别		
男	46.22 ± 15.22	52.51 ± 14.03
女	47.94 ± 14.35	52.01 ± 14.32
吸烟史		
有	46.36 ± 15.02	52.23 ± 14.12
无	47.91 ± 13.85	52.94 ± 14.26
嗜酒史		
有	46.32 ± 13.24	51.78 ± 12.85
无	47.85 ± 14.33	52.62 ± 15.67
组织类型		
鳞癌	46.22 ± 15.03	51.25 ± 13.65
腺癌	47.88 ± 14.22	53.85 ± 15.66
分化程度		
低分化	48.25 ± 14.03	52.24 ± 15.11
中高分化	46.11 ± 12.15	51.98 ± 13.54
TNM 分期		
I	51.26 ± 14.32	58.89 ± 15.12
II ~ III	43.55 ± 10.68*	48.21 ± 13.66*
肿瘤直径(cm)		
≤3	46.32 ± 14.33	52.82 ± 15.15
>3	47.86 ± 12.98	51.98 ± 13.57
N 分期		
N0	51.44 ± 12.65	58.87 ± 13.56
N1 ~ N2	42.65 ± 10.65 [#]	44.02 ± 15.41 [#]
microRNA-200c		
低表达	52.62 ± 14.02	59.48 ± 13.65
高表达	41.26 ± 11.32 [△]	45.66 ± 15.18 [△]

注:与 TNM I 期比较, * $P < 0.01$; 与 N0 期比较, [#] $P < 0.01$; 与 microRNA-200c 低表达比较, [△] $P < 0.01$

影响预后的多因素 Cox 回归分析 多因素 Cox 回归分析显示, N 分期 (N1 ~ N2 期)、microRNA-200c 高表达是影响 NSCLC 患者无进展生存率和总

生存率的危险因素 (均 $P < 0.05$), 见表 3。

NSCLC 组织中 microRNA-200c 表达水平与患者预后的关系 Kaplan-Meier 法生存曲线显示, NSCLC 组织中 microRNA-200c 高表达组患者无进展生存率、患者总生存率显著低于低表达组 (均 $P < 0.05$), 见图 1。

讨 论

NSCLC 发病率有逐年升高趋势, 患者预后差^[1]。临床上, 即使 NSCLC 患者具有相同的病理分期, 但患者复发转移及预后情况差别较大。miRNAs 是近年来研究的热点^[3]。microRNA-200c 在多种恶性肿瘤的发生、发展及转移过程发挥重要作用^[9~11]。Mi 等^[12]研究发现, microRNA-200c 表达水平在 NSCLC 患者中显著上调, 并提出 microRNA-200c 具有明显的致癌作用; Si 等^[13]研究指出, NSCLC 患者中 microRNA-200c 表达水平与淋巴结转移密切相关, microRNA-200c 高表达不利于患者预后; Li 等^[14]研究发现, microRNA-200c 在 NSCLC 组织中表达显著下调, 其表达的缺失可以诱导 NSCLC 浸润、侵袭及化疗耐药。上述研究结论的差异或许是由于机体微环境的复杂性及 microRNA-200c 基因的多效性导致^[15]。N 分期表示淋巴结转移程度, 本研究结果表明组织中 microRNA-200c 与淋巴结转移存在密切联系。microRNA-200c 高表达组 NSCLC 患者中 N1 ~ N2 分期患者比例较高。单因素 Cox 回归分析结果显示, 不同 TNM 分期、N 分期、microRNA-200c 表达水平 NSCLC 患者无进展生存率和总生存率的中位生存时间存在差异, 表明 TNM 分期、N 分期、microRNA-200c 表达水平是影响 NSCLC 患者无进展生存率和总生存率的危险因素。多因素 Cox 回归分析结果显示, N 分期 (N1 ~ N2 期)、microRNA-200c 高表达是影响 NSCLC 患者无进展生存率和总生存率的危险因素。进一步 Kaplan-Meier 法生存曲线结果显示, NSCLC 组织中 microRNA-200c 高表达组患者无进展生存率、总生存率显著低于低表达组。研究发现 microRNA-200c 在 NSCLC 组织中的高表达水平可以调控 E-钙黏蛋白抑制因子

表 3 影响 NSCLC 患者预后的多因素 Cox 回归分析

因素	无进展生存率			总生存率		
	HR 值	95% CI	P 值	HR 值	95% CI	P 值
TNM 分期 (II ~ III 期)	1.012	0.997 ~ 1.089	0.23	1.005	0.994 ~ 1.077	0.18
N 分期 (N1 ~ N2 期)	1.201	1.044 ~ 1.874	0.02	1.115	1.034 ~ 1.689	0.01
microRNA-200c 高表达	1.007	1.001 ~ 1.414	<0.01	1.445	1.071 ~ 3.125	<0.1

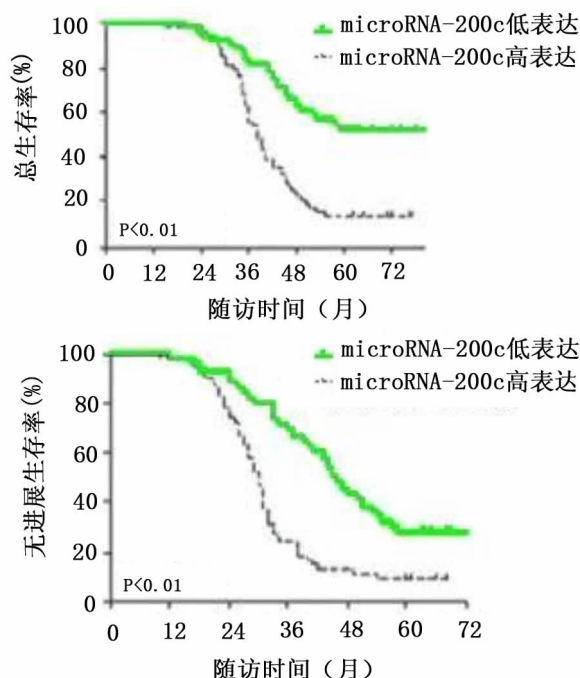


图1 NSCLC组织中microRNA-200c表达水平与患者预后的关系

(zinc finger E box binding protein-1, ZEB1)和ZEB2的表达,诱导肿瘤细胞的上皮-间质转化过程,从而增加肿瘤细胞的侵袭和转移能力,进而影响患者预后^[16,17]。这可能是其机制。组织中microRNA-200c高表达提示NSCLC患者预后不良,microRNA-200c可作为评估NSCLC患者预后的分子标志物。

本研究为单中心研究,样本量较少;且NSCLC组织标本获取时间不一致造成组织中microRNA-200c检测时间不一致,或许对研究结果产生影响。

参考文献

- Venkatesulu BP, Mallick S, Singh A, et al. Non small cell carcinoma of lung with metachronous breast metastasis and cardiac tamponade: Unusual presentation of a common cancer[J]. J Egypt Natl Cane Inst, 2015, 27(3):165-169.
- Sun Z, Wang Z, Liu X, et al. New development of inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in personalized treatment of non-small-cell lung cancer[J]. Anticancer Drugs, 2015, 26(1):1-14.
- 陈婧, 张亚芬, 陆奎英. 不同剂量瑞舒伐他汀对于急性脑梗死患者血清相关miRNAs水平的影响[J]. 内科急危重症杂志, 2018, 24(1):31-33.
- Koo T, Cho BJ, Dan HK, et al. MicroRNA-200c increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling[J]. Oncotarget, 2017, 8(39):65457-65468.
- Zhang H, Sun Z, Li Y, et al. MicroRNA-200c binding to FN1 suppresses the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88(1):285-292.
- Zhang G, Zhang W, Li B, et al. MicroRNA-200c and microRNA-141 are regulated by a FOXP3-KAT2B axis and associated with tumor metastasis in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2017, 19(1):73-81.
- 支修益, 吴一龙, 马胜利, 等. 原发性肺癌诊疗规范(2011年版)[J]. 中国肺癌杂志, 2012, 15(12):677-688.
- Rice TW, Blackstone EH, Rusch VW. 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Esophagus and Esophagogastric Junction[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(7):1721-1724.
- Mei J, Wang DH, Wang LL, et al. MicroRNA-200c suppressed cervical cancer cell metastasis and growth via targeting MAP4K4[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(3):623-631.
- Kurata A, Yamada M, Ohno SI, et al. Expression level of microRNA-200c is associated with cell morphology in vitro and histological differentiation through regulation of ZEB1/2 and E-cadherin in gastric carcinoma[J]. Oncol Rep, 2018, 39(1):91-100.
- Tayel SI, Eam F, Gohar S F, et al. Potential role of MicroRNA 200c gene expression in assessment of colorectal cancer[J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 647(1):41-46.
- Mi KK, Sang BJ, Kim JS, et al. Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. Virchows Arch, 2014, 465(4):463-471.
- Si L, Tian H, Yue W, et al. Potential use of microRNA-200c as a prognostic marker in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(4):4325-4330.
- Li J, Li X, Ren S, et al. miR-200c overexpression is associated with better efficacy of EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer patients with EGFR wild-type[J]. Oncotarget, 2014, 5(17):7902-7916.
- Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis[J]. Cell, 2009, 137(6):1032-1046.
- Eggers JC, Martino V, Reinbold R, et al. microRNA miR-200b affects proliferation, invasiveness and stemness of endometrial cells by targeting ZEB1, ZEB2 and KLF4[J]. Reprod Biomed Online, 2016, 32(4):434-445.
- Guan T, Dominguez CX, Amezcua RA, et al. ZEB1, ZEB2, and the miR-200 family form a counterregulatory network to regulate CD8+ T cell fates[J]. J Exp Med, 2018, 215(4):1153-1168.

(2018-09-30 收稿 2020-07-26 修回)

(上接第287页)

- Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure[J]. Cell Host Microbe, 2020, 27(6):992-1000.
- Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study[J]. Lancet, 2020, 395(10229):1054-1062.
- Zegeye MM, Lindkvist M, Fälför K, et al. Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells[J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1):55. Published 2018 Sep 5.
- Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A Descriptive Study[J]. Lancet, 2020, 395(10229):814-818.
- Luo P, Liu Y, Qiu L, et al. Tocilizumab treatment in COVID-19: A

- single center experience[J]. J Med Virol, 2020, 92(7):814-818.
- Zhang W, Zhao Y, Zhang F, et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China[J]. Clin Immunol, 2020, 214:108393.
- Choi KW, Chau TN, Tsang, et al. Outcomes and Prognostic Factors in 267 Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong[J]. Ann Intern Med, 2003, 139(9):715-723.
- Hong KH, Choi JP, Hong SH, et al. Predictors of mortality in middle east respiratory syndrome (MERS)[J]. Thorax, 2018, 73(3):286-289.
- Guo WN, Li M, Dong Y, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2020, 31:e3319.

(2020-05-11 收稿, 2020-06-22 修回)