

微小 RNA-185 水平对结直肠癌术后无进展生存有评估价值

张文俊¹ 王明祥² 宋沁哲² 张福杰¹ 于登峰¹ 罗福文²

¹辽宁省大连大学附属新华医院结直肠肛门外科, 辽宁大连 116021

²大连医科大学附属第二医院急腹症外科, 辽宁大连 116027

摘要 目的: 探讨微小 RNA(miRNA)-185 表达与结直肠癌临床病理特点的关联及其对预后的评估价值。方法:

回顾性分析手术治疗的 130 例结直肠癌患者的临床资料, 使用荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测癌组织标本和癌旁正常组织中的 miRNA-185 表达水平, 分析不同临床病理资料特征下 miRNA-185 表达水平差异。通过受试者工作特征(ROC)曲线和 Cox 多因素回归分析 miRNA-185 对预后的评估价值。结果: 结直肠癌组织中 miRNA-185 水平低于癌旁正常组织(0.176 ± 0.085 vs 0.364 ± 0.113 , $P < 0.05$), 不同性别、年龄、分化程度、肿瘤位置和肿瘤大小特征下 miRNA-185 表达水平无统计学差异($P > 0.05$), miRNA-185 在Ⅲ~Ⅳ期结直肠癌、淋巴结转移肿瘤组织中表达水平更低(P 均 < 0.05)。对评估术后肿瘤是否进展进行 ROC 曲线分析显示, miRNA-185 的曲线下面积为 0.816, 95% CI: 0.716~0.923, 灵敏度为 70.21%, 特异性为 83.23%, 多因素 Cox 结果显示, TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期($HR = 2.417$, 95% CI: 1.362~4.289), miRNA-185 低表达($HR = 3.121$, 95% CI: 1.603~6.077)是预后的危险因素。结论: miRNA-185 在结直肠癌组织中表达水平下调, 并能作为潜在的评估结直肠癌术后无进展生存的标志物。

关键词 微小核糖核酸-185; 结直肠癌; 临床病理; 预后

中图分类号 R735.3 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20240106

Expression of miRNA-185: a potential marker of progression-free survival after colorectal cancer ZHANG Wen-jun¹, WANG Ming-xiang², SONG Qin-zhe², ZHANG Fu-jie¹, YU Deng-feng¹, LUO Fu-wen². ¹Department of Anorectal Surgery, Dalian University Affiliated Xinhua Hospital, Liaoning Dalian 116021, China; ²Department of Acute Abdominal Surgery, The Second Hospital of Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116027, China
Corresponding author: LUO Fu-wen, fuwenluo@aliyun.com

Abstract Objective: To evaluate the expression of miRNA-185 in different clinicopathological characteristics of colorectal cancer and its value as a prognostic marker. Methods: Totally, 130 patients with colorectal cancer were retrospectively selected. The expression level of miRNA-185 was detected in cancer tissue specimens and normal tissues adjacent to cancer by fluorescence quantitative PCR. The miRNA-185 expression in different clinicopathological data was compared. Multivariate Cox regression and ROC curve were used to evaluate the prognostic value of miRNA-185. Results: The level of miRNA-185 in colorectal cancer tissues was significantly lower than that in normal tissues adjacent to cancer (0.176 ± 0.085 vs. 0.349 ± 0.114 , $P < 0.05$). The expression level of miRNA-185 was not significantly correlated with gender, age, degree of differentiation, tumor location and size ($P > 0.05$), but the expression was lower in stage Ⅲ-Ⅳ colorectal cancer and lymph node metastasis tumor tissues ($P < 0.05$). The ROC curve analysis of postoperative tumor progression showed that the area under the curve of miRNA185 was 0.816 (95%CI: 0.716-0.923), sensitivity was 70.21%, and specificity was 83.23%. Multivariate Cox analysis showed TNM stage Ⅲ-Ⅳ ($HR = 2.417$, 95% CI: 1.362-4.289), miRNA-185 low expression ($HR = 3.121$, 95% CI: 1.603-6.077) were prognostic risk factors. Conclusion: The expression of miRNA-185 is down-regulated in colorectal cancer tissues and can be used as a potential marker of progression-free survival after colorectal cancer surgery.

Key words miRNA-185; Colorectal cancer; Clinical pathology; Prognosis

微小 RNA(micro RNA, miRNA)是一组高度保守的单链非编码 RNA, 可以与对应的靶标 mRNA 不完全结合抑制靶基因的转录或者翻译, 在肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移等过程中起重要作用^[1,2]。miRNA-185 低表达与前列腺癌的发生、发展有关, 可能作为前列腺癌分级、预后评估的标志物^[3]。本研究

检测 miRNA-185 在结直肠癌组织中表达情况,并分析其表达与临床病理参数之间的关系,初步探讨其作为预后标志物的潜在价值。

资料与方法

1. 一般资料:回顾性分析 2017 年 4 月-2019 年 2 月在大连大学附属新华医院接受手术治疗的 130 例结直肠癌患者的临床资料,所有患者均取得手术组织标本,其中男性 71 例,女性 59 例,年龄 57 ~ 76 岁,平均(68.4 ± 6.7)岁;肿瘤位于结肠 68 例,位于直肠 62 例;低分化 8 例,中分化 90 例,高分化 32 例;TNM 分期 I、II 期 72 例,III 期 39 例,IV 期 19 例;淋巴转移 58 例,无淋巴转移 72 例;本研究经医院伦理委员会审批(伦理批件号:2019-YXKY-043),并获得知情同意豁免,病理组织采集前与患者或家属沟通取得同意。

2. 纳入与排除标准:纳入标准:①初诊原发性结直肠癌;②病例资料完整,随访时间超过 12 个月;③手术前未接受新辅助化疗、放疗。排除标准:①病理存档组织不足;②合并其他部位恶性肿瘤。

3. 主要试剂、仪器:miRNeasy 提取试剂盒、荧光定量 PCR 检测试剂盒(上海兆吉生物科技有限公司,217004)、M-MLV 逆转录酶(大连宝生物科技有限公司),荧光定量 PCR 仪(美国罗氏公司),Has-miRNA-185 茎环引物(上海吉玛生物科技有限公司),莱卡 CM3050S 冷冻病理切片机[徕卡生物系统(努斯洛赫)有限公司]。

4. 肿瘤组织获取 :由病理科医生从手术存档的癌组织及距离癌组织 0.5 cm 远的癌旁组织中切取厚度为 4 ~ 6 μm 的石蜡切片各3 ~ 5 片。

5. miRNA-185 表达的检测:遵循 miRNeasy 配套试剂盒操作说明,从切片提取癌组织及癌旁组织总 RNA,并通过荧光分度计检验提取 RNA 纯度和浓度。根据大连宝生物科技有限公司提供的逆转录茎环引物和 M-MLV 逆转录酶反转录,TaqDNA 聚合酶、Has-miRNA-185 茎环引物试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cRNA。miR-185 引物序列为:5'-GCTGTG-GAGAGAAAGGCAGTCTG-3' (上游),5'-GTG-CAGGGTCCG AGGT-3' (下游)。使用 RT-PCR ABI7300 仪进行荧光定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, PCR),反应体系:95℃ 15 min, 92℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s,45 个循环。以 U6 作为内参,使用相对定量方法计算 miRNA-185

的表达量 $Ct = \Delta Ct_{miR-185} - Ct_{U6}$ 。

6. 无进展生存期随访:截止末次随访时间 2021 年 5 月底,通过电子病历系统检索入选患者在门诊、日间化疗病房、肿瘤内科病房以及急诊科的就诊记录,获取患者肿瘤进展或生存状态信息,对于病历记录无法确认是否因疾病进展开启新的治疗方案患者,通过主管医生联系患者或其家属,确认新治疗开始时肿瘤状态。无进展生存期(progression free survival, PFS)定义为手术完成后至肿瘤首次进展/死亡,以发生时间早者为准^[4]。

7. 统计学分析:采用 SPSS 21.0 统计软件,正态性分布的计量资料使用($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间差异分析使用独立 t 检验,癌组织与癌旁组织中 miRNA-185 表达比较采用配对 t 检验,多组间比较采用方差分析,应用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估诊断价值,并计算曲线下面积(area under the curve, AUC),绘制生存曲线评估预后,采用多因素 Cox 分析影响因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 结直肠癌组织中 miRNA-185 的表达:结直肠癌组织中 miRNA-185 表达水平低于癌旁组织(0.176 ± 0.085 vs 0.364 ± 0.113 , $t = 64.938$, $P < 0.05$)。

2. miRNA-185 在不同临床资料患者中的表达差异:癌组织中 miRNA-185 表达水平在不同性别、年龄、分化程度、肿瘤位置和大小间差异无统计学意义(P 均 > 0.05),而在高 TNM 分期和淋巴结转移患者中表达水平降低(P 均 < 0.05),见表 1。

表 1 miRNA-185 在不同临床资料患者中的表达差异

临床资料	例	miRNA-185 ($2^{-\Delta Ct}$)	t/F 值	P 值
男性	71	0.182 ± 0.083	1.228	0.222
>60 ~ 76 岁	52	0.161 ± 0.083	1.432	0.154
分化程度			0.023	0.977
低	8	0.189 ± 0.059		
中	90	0.182 ± 0.043		
高	32	0.166 ± 0.068		
肿瘤位置			0.736	0.463
直肠	62	0.168 ± 0.087		
结肠	68	0.178 ± 0.080		
有淋巴结转移	58	0.153 ± 0.095	2.592	0.011
肿瘤 ≥ 5 cm	46	0.155 ± 0.077	1.872	0.063
TNM III/IV 期	58	0.142 ± 0.087	4.182	<0.001

3. miRNA-185 评估结直肠癌术后无进展预后价值:以是否发生疾病进展为状态变量(0 = 未进展,1 = 进展),miRNA-185 表达水平作为检验变量进行 ROC 曲线分析,结果显示,当截断值为 0.172 时,曲线下面积为 0.816 (95%CI:0.716 ~ 0.923),灵敏度为 70.21%,特异性为 83.23%,见图 1。

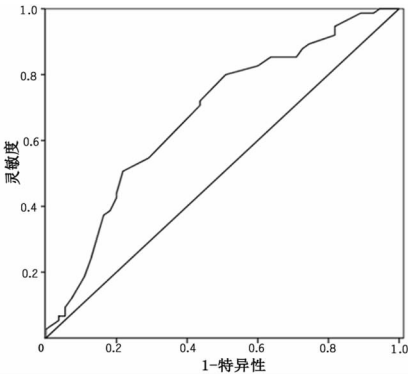


图1 miRNA-185 评估术后无进展生存的 ROC 曲线

4. Cox 单因素回归:截止末次随访日,随访18 ~ 44 个月,中位随访时间 32 个月,共有 55 例患者发生疾病进展。对术后 PFS 进行 Cox 单因素分析,结果显示肿瘤分化程度 ($HR = 0.159, 95\% CI: 0.085 \sim$

0.298)、淋巴结转移状态 ($HR = 7.893, 95\% CI: 4.030 \sim 15.462$)、TNM 分期 ($HR = 11.765, 95\% CI: 5.596 \sim 24.732$) 以及癌组织 miRNA-185 水平 ($HR = 2.570, 95\% CI: 1.504 \sim 4.392$) 影响预后,见表 2。

5. Cox 多因素回归:以术后疾病是否进展作为因变量(是 = 1,否 = 0),将表 4 中 $P < 0.1$ 因素纳入多因素 Cox 分析,结果显示 TNM 分期 ($HR = 2.417, 95\% CI: 1.362 \sim 4.289$)、肿瘤组织中 miRNA-185 ($HR = 3.121, 95\% CI: 1.603 \sim 6.077$) 表达是术后无进展生存期的影响因素 (P 均 < 0.05),同时 I/II 期及 III/IV 期患者 miRNA-185 高表达 PFS 更好,见表 3,图 2、3。

讨 论

miRNA 可通过调控基因的表达参与生物学过程,且与肿瘤的发生有关^[5~7]。在结直肠癌中,发现 miRNA 的异常表达与肿瘤的负荷、不良预后有关,部分 miRNA 参与结直肠癌对化疗药物的耐受,可作为调节化疗敏感性的重要生物学分子^[8]。miRNA-185 在消化系统恶性肿瘤的近年研究中逐渐受到重视^[9]。本研究发现miRNA-185在结直肠癌患者肿

表2 影响结直肠癌患者术后 PFS 的单因素 Cox 分析

临床资料	例	PFS(月)	HR (95% CI)	log-rank χ^2 值	P 值
男性	71	33	1.407 (0.817 ~ 2.421)	1.183	0.218
>60 ~ 76 岁	52	33	1.630 (0.921 ~ 2.884)	2.304	0.086
分化程度			0.159 (0.085 ~ 0.298)	4.322	0.046
低	8	31			
中	90	33			
高	32	36			
肿瘤位置			1.479 (0.860 ~ 2.542)	1.876	0.157
直肠	62	32			
结肠	68	31			
有淋巴结转移	58	33	7.893 (4.030 ~ 15.462)	11.887	<0.001
肿瘤 ≥ 5 cm	46	32	1.574 (0.903 ~ 2.743)	2.165	0.109
TNM III/IV 期	58	31	11.765 (5.596 ~ 24.732)	13.976	<0.001
miRNA-185 ≥ 0.172	77	39	2.570 (1.504 ~ 4.392)	8.765	0.001

表3 影响结直肠癌患者 PFS 的多因素 Cox 分析

因素	赋值	β 值	SE 值	Wald ² 值	P 值	HR 值	95% CI
年龄	$\geq 60 = 1, < 60 = 0$	0.103	0.393	0.068	0.794	1.108	0.513 ~ 2.394
肿瘤分化	高、中、低分化 = 0、1、2	1.012	0.829	1.491	0.222	2.752	0.542 ~ 13.973
淋巴结转移	阳性 = 1, 阴性 = 0	0.737	0.419	3.084	0.079	2.089	0.918 ~ 4.754
肿瘤大小	$\geq 5\text{cm} = 1, < 5\text{cm} = 0$	0.200	0.314	0.404	0.525	1.221	0.660 ~ 2.260
TNM 分期	III ~ IV 期 = 1, I ~ II 期 = 0	0.883	0.293	9.095	0.003	2.417	1.362 ~ 4.289
miRNA-185	$< 0.172 = 1, \geq 0.172 = 0$	1.138	0.340	11.210	0.001	3.121	1.603 ~ 6.077

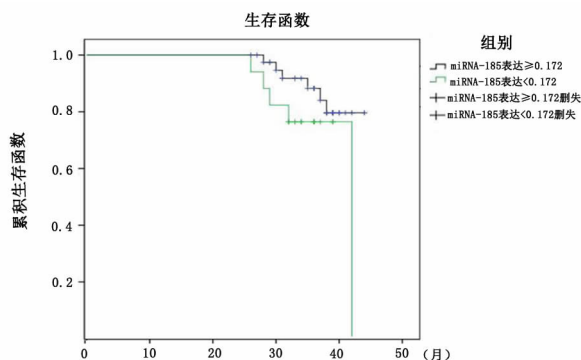


图2 I/II期患者中 miRNA-185 表达与 PFS 生存曲线

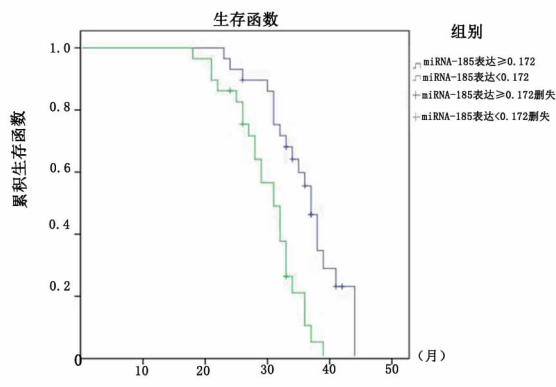


图3 III/IV期患者中 miRNA-185 表达与 PFS 生存曲线

瘤组织中表达降低。miRNA-185 位于人染色体的 21q11.21, 如果该基因缺失可引起 miRNA-185 表达的下调可能和一些精神类的疾病有关。近期基础研究发现 miRNA-185 在肿瘤中发挥抑癌基因的作用^[10], 与本研究结果一致, 提示 miRNA-185 在结直肠发生中可能存在一定作用。

本文中高 TNM 分期和淋巴结转移患者肿瘤组织中 miRNA-185 表达更低。既往细胞模型研究中上调 miRNA-185 的表达水平可以抑制胃癌细胞的增殖、转移^[11], 并且能通过调控 TRIM29 抑癌基因的下调, 使 cyclin D1、 β -catenin、c-Myc 表达下调, 使细胞周期受到阻滞, 从而诱发细胞的凋亡^[12]。这可能是 miRNA-185 表达水平的下调促进肿瘤侵袭, 增加淋巴结转移几率的原因。文献报道 miRNA-185 在肝癌患者中表达水平上调时可以抑制肝癌细胞的生长、侵袭, 低表达时可使早期肝癌患者的生存率下降, 使肝癌更易复发^[13]。在肝癌细胞中 miRNA-185 超表达可抑制 DNMT1 的表达, 抑制肝癌细胞的增殖及侵袭力, 一旦 miRNA-185 突变, 这种抑制作用就消除了。miRNA-185 超表达也可减少 PTEN 启动子的磷酸化, 使 PTEN 的表达下降, 减少 Akt 的激

活^[14,15]。本文结果进一步提示 miRNA-185 在结直肠癌淋巴结转移中的潜在作用。

本研究发现 miRNA-185 对结直肠癌患者术后肿瘤进展具有良好的判断价值, 其 AUC 值为 0.816 [95% CI (0.716, 0.923)], 灵敏度为 70.21%, 特异性为 83.23%。在矫正多种病理特征因素后, Cox 比例风险回归模型分析显示, miRNA-185 低表达是术后无进展生存期的危险因素 [HR = 3.121, 95% CI (1.603, 6.077)], 提示肿瘤组织 miRNA-185 低表达患者可能具有不良预后。最近有研究显示, miRNA-185-3p 在结直肠癌细胞中可以抑制 RhoA、Cdc42 的表达, 使癌细胞周期 G1 期发生阻滞作用, 诱导细胞的凋亡, 抑制结直肠癌细胞的增殖, 从而发挥抑癌基因的作用^[16]。miRNA-185 亦能直接调控基质相互作用因子 1 (stromal interaction molecule 1, STIM1)^[17], 使 STIM1 在高度恶性结直肠癌细胞中表达减低, 减弱癌细胞侵袭力, 因而 miRNA-185-STIM1 轴系可能是结直肠癌预后的生物标志物。

限于单中心回顾性的研究设计, 在研究人群纳入及样本选择中难免存在一定地域性偏移, 同时 miRNA-185 表达在不同人群中存在一定变异性, 在外推本研究结论时需谨慎小心, 甚至对单独个体应用中可能存在一定的结论偏差。

参考文献

- Niu LR, Yang WL, Duan LL, et al. Biological implications and clinical potential of metastasis-related miRNA in colorectal cancer [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 23(1): 42-54.
- 张扬帆, 郝尧, 刘春娥. 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 [J]. 内科急危重症杂志, 2020, 26(4): 288-291.
- 朱清. miRNA-185 在前列腺癌中的临床意义研究 [J]. 重庆医学, 2015, 44(3): 399-400.
- 郑鹏, 潘冰, 汪洋, 等. 结直肠癌患者组织中 miR-99a 和 miR-100 表达水平与肿瘤转移的关系 [J]. 国际消化病杂志, 2021, 41(1): 45-49.
- Li JX, Ma XD, Chakravarti D, et al. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer [J]. Genes Dev, 2021, 35(11-12): 787-820.
- Long JL, He QL, Yin YT, et al. The effect of miRNA and autophagy on colorectal cancer [J]. Cell Prolif, 2020, 53(10): e12900.
- Peruhova M, Peshevska-Sekulovska M, Krastev B, et al. What could miRNA expression tell us more about colorectal serrated pathway carcinogenesis [J]? World J Gastroenterol, 2020, 26(42): 6556-6571.
- Yao F, Xiang X, Zhou C, et al. Identification of circular RNAs associated with chemoresistance in colorectal cancer [J]. Front Genet, 2021, 17(12): 696948.
- Wang W, Li Y, Zhi S, et al. LncRNA-ROR/microRNA-185-3p/YAP1

- axis exerts function in biological characteristics of osteosarcoma cells [J]. Genomics. 2021, 113(1pt2):450-461.
- 10 Cyza B, Xz A, Bbz A, et al. miRNA-185 regulates retained fetal membranes of cattle by targeting STIM1 [J]. Theriogenology, 2019, 126(2): 166-171.
- 11 Li L, Wang X, Liu D. MicroRNA-185 inhibits proliferation, migration and invasion in human osteosarcoma MG63 cells by targeting vesicle-associated membrane protein 2 [J]. Gene, 2019, 696(1): 80-87.
- 12 QIU F, XIONG JP, DEN J, et al. TRIM29 functions as an oncogene in gastric cancer and is regulated by miR-185 [J]. Int Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 5053-5061.
- 13 Filip R, Desrochers GF, Lefebvre DM, et al. Profiling of MicroRNA targets using activity-based protein profiling: linking enzyme activity to MicroRNA-185 function [J]. Cell Chem Biol. 2021, 28(2): 202-212. e6.
- 14 Yao CJ, Lv Y, Zhang CJ, et al. MicroRNA-185 inhibits the growth and proliferation of osteoblasts in fracture healing by targeting PTH gene through down-regulating Wnt/ β -catenin axis: In an animal experiment [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(1): 55-63.
- 15 Cheng JZ, Chen JJ, Wan , et al. MicroRNA-185 inhibits cell proliferation while promoting apoptosis and autophagy through negative regulation of TGF- β 1/mTOR axis and HOXC6 in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Biomark, 2022, 34(4): 695.
- 16 Li K, Cui M, Zhang et al. M1 macrophages-derived extracellular vesicles elevate microRNA-185-3p to aggravate the development of atherosclerosis in ApoE $-/-$ mice by inhibiting small mothers against decapentaplegic 7 [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 90: 107138.
- 17 Wang B , Hao X, Li X, et al. Long noncoding RNA HEIH depletion depresses esophageal carcinoma cell progression by upregulating microRNA-185 and downregulating KLK5 [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(11): 1002

(2022-04-22 收稿 2023-11-13 修回)

欢迎订阅 2024 年《内科急危重症杂志》

《内科急危重症杂志》于 1995 年由国家科委批准, 中华人民共和国教育部主管, 华中科技大学同济医学院主办, 同济医院承办。1997 年被清华全文期刊数据库收录, 2001 年被中国科技信息研究所万方数据库收录, 2002 年被列入国家科技部中国科技论文统计源期刊和中国科技核心期刊。历年公布的被引用总次数呈逐年上升势态, 表明本刊在学术交流中的重要作用。

《内科急危重症杂志》是我国第一个以内科各专科及神经内科、传染科、皮肤科、ICU 等临床急危重症为主要内容的杂志。以广大临床医师及医学院校师生和有关科研人员为主要读者对象。其宗旨和任务是刊载大内科范围急危重症医学领域的临床诊治经验总结, 以及紧密结合临床的基础研究, 国内外重症监护 (ICU) 新进展等。设有: 专家论坛、临床研究、基础研究、诊疗经验、临床病例讨论、个案等栏目。特色是每期邀请国内著名专家就某一专题谈国内外最新诊断治疗指南与临床治疗经验。本刊编辑部从 2014 年 6 月起, 开始使用新的投稿采编系统平台。作者、读者可通过网站首页进行投稿和稿件审理状态查询。

《内科急危重症杂志》为双月刊, 大 16 开, 96 页。国际刊号: ISSN1007-1042, 国内统一刊号: CN42-1394/R。每册 12 元, 全年 6 期 72 元, 热忱欢迎广大医务工作者订阅和积极投稿。

订阅方式: 全国各地邮局, 邮发代号 38-223。漏订可直接与编辑部联系。

编辑部地址: 武汉市解放大道 1095 号同济医院《内科急危重症杂志》编辑部

邮政编码: 430030 **电话:** 027-69378378

E-mail: nkjwzzzz@163.com **网址:** <http://nkjwzzzz.chmed.net>