

MiR-3182 在鼻咽癌中的表达及其与远处转移和预后关系的研究

周敏燕, 兰桂平, 司勇峰, 莫祥兰

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81360355); 广西卫计委科研课题(编号:Z2013355, Z2010237)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院病理科(周敏燕, 莫祥兰), 耳鼻咽喉头颈肿瘤科(兰桂平, 司勇峰)

作者简介: 周敏燕(1978-), 女, 硕士研究生, 主管技师, 研究方向: 分子病理。E-mail: yanzi0241@163.com

通讯作者: 莫祥兰(1966-), 女, 医学博士, 主任医师, 研究方向: 淋巴瘤的诊治。E-mail: moxianglan@21cn.com

[摘要] 目的 探讨 MiR-3182 在鼻咽癌中的表达及与远处转移的关系。方法 用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 89 例鼻咽未分化非角化性癌(鼻咽癌)组织中 MiR-3182 的表达情况, 分析其表达强度与远处转移和预后的关系。结果 鼻咽癌组织表达 MiR-3182, 其表达强度, 有远处转移者明显高于无转移者($P < 0.01$), 无瘤生存期(DFS) < 3 年者明显高于 ≥ 3 年者($P < 0.01$)。结论 MiR-3182 在鼻咽癌远处转移过程中可能起重要作用, 并对预后有一定的影响, 其相关分子机制有待进一步研究。

[关键词] 鼻咽癌; MiR-3182; 荧光定量 RT-PCR; 远处转移

[中图分类号] R 739.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)05-0369-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.05.01

Expression patterns and significances of distant metastasis and prognosis of MiR-3182 in nasopharyngeal carcinoma ZHOU Min-yan, LAN Gui-ping, SI Yong-feng, et al. Department of Pathology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression patterns and the significances of distant metastasis and prognosis of MiR-3182 in nasopharyngeal carcinoma(NPC). **Methods** The expressions of MiR-3182 in 89 cases with nasopharyngeal carcinoma were detected by real time RT-PCR. The relation between the expression and distant metastasis of NPC and its prognosis were analyzed. **Results** The expressions of MiR-3182 were found in all of the tissues of nasopharyngeal carcinoma. The expression level of MiR-3182 in nasopharyngeal carcinoma in the group with distant metastasis was significantly higher than that in the group without distant metastasis($P < 0.01$). The expression of MiR-3182 in the group with DFS < 3 years was significantly higher than that in the group with DFS ≥ 3 years($P < 0.01$). **Conclusion** MiR-3182 may play a key role in distant metastasis of nasopharyngeal carcinoma and is associated with poor prognosis.

[Key words] Nasopharyngeal carcinoma; MiR-3182; Real time RT-PCR; Distant metastasis

鼻咽癌发病有明显的地域性, 其发生与环境、气候因素密切相关^[1]。尽管放疗和化疗技术在不断地进步, 使得患者的 5 年生存率有所升高。但由于鼻咽癌极易复发和转移, 因此仍有 15%~58% 的鼻咽癌患者死于复发和转移^[2]。对鼻咽癌复发及转移目前仍缺乏有效的治疗手段, 这是导致鼻咽癌生存率低的主要原因。因此, 深入了解鼻咽癌进展及转移的分子机制, 建立包括靶向治疗在内的新的治疗模式, 显得尤为紧迫。MicroRNAs(MiRNA)是一类短链的非编码 RNA, 它能够与靶基因的 mRNA 特

异性结合进而降解 mRNA 单链或抑制其翻译, 它作为潜在的肿瘤激活或抑制因子参与肿瘤的发生、发展。研究表明, 鼻咽癌组织中存在多种 miRNA 的异常表达^[3]。本课题组前期小样本研究发现, 鼻咽癌组织 MiR-3182 表达显著高于鼻咽黏膜慢性炎症组织。为进一步探讨 MiR-3182 在鼻咽癌组织中的表达及其临床意义, 本研究用荧光定量 RT-PCR 法检测 89 例鼻咽癌组织 MiR-3182 表达情况, 探讨其表达强度与远处转移和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008-01 ~ 2012-03 我院诊治的鼻咽未分化非角化性癌 89 例,其中 61 例无远处转移,28 例伴远处转移;男 64 例,女 25 例,年龄 25 ~ 76 岁,中位年龄 46 岁。所有患者治疗前进行活检确诊,确诊后均予放疗或放疗加化疗联合治疗。为确定局部复发情况及远处转移范围,所有患者均常规行鼻咽部及颈部 MRI,胸部 X 线/CT,骨扫描及腹部 B 超/CT 等相关检查。所有标本均为治疗前活检标本,经 4% 中性甲醛固定,石蜡包埋。

1.2 随访 采用电话随访及定期复查的方式,定期了解 89 例患者的生存情况,包括出现远处转移的时间、死亡时间、意外死亡情况及原因。以死亡或出现远处转移为随访终结。随访时间的计算从第一次明确诊断的时间开始,到发生远处转移时间或死亡时间或末次随访时间。无瘤生存期(disease-free survival, DFS)的计算时间从初治开始至确诊发生远处转移或死亡时为止。

1.3 方法 用荧光定量 RT-PCR (Taqman 探针法)方法检测鼻咽癌组织中 MiR-3182 表达情况,用 U6 基因为内参基因。用 PRIMER EXPRESS 2.0 软件设计针对 MiR-3182 和内参 U6 基因特异性引物,由江苏金维智生物科技有限公司合成。引物序列:MiR-3182 上游引物:CACTCAGCTGGCTTCTGTAGTG,通用下游引物:CTGGTGTCTGGAGTCG;通用探针:FAM-CCTGTACGACACGACGTCAGTTGAG-BHQ1;U6 上游引物:CACTCAGCTCACGCAATTCGTG,通用下游引物:CTGGTGTCTGGAGTCG,通用探针:FAM-CCTGTACGACACGACGTCAGTTGAG-BHQ1。用 HIPURE FFPE MIRNA KIT 提取试剂(R4313-02,购自 MAGEN)提取人鼻咽癌组织石蜡切片总 miRNA,按照试剂使用说明书操作。根据 REVERTRA ACE QPCR RT KIT(FSQ-101,批号:365900,购自 TO-YOBO)试剂盒说明书操作步骤进行反转录;按 KAPA PROBE FAST QPCR 试剂盒说明书操作步骤进行荧光定量 PCR 反应,反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 3 s,55 ℃ 30 s,40 循环;30 ℃ 30 s。

1.4 结果分析 反应结束后确认其扩增曲线和溶解曲线,用相对定量法对结果进行分析,使用每个检测样本的阈循环(Threshold cycle, Ct)值,阈循环值随模板浓度增大而减少; $\Delta Ct = Ct$ 目的基因 - Ct 内参基因, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 实验组目的基因 - ΔCt 对照组目的基因,目的基因相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.5 统计学方法 应用 SPSS18.0 统计软件进行数

据处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床病理特征 89 例患者,其中 61 例初治时无远处转移,28 例初治时已有远处转移。对 89 例患者进行随访,其中 6 例失访,83 例获随访,其中男 59 例,女 24 例。随访时间 4 ~ 82 个月,以死亡或出现远处转移为随访终结。其中 22 例死亡,19 例发生远处转移;其余 42 例无瘤生存。DFS ≥ 3 年的 41 例,DFS < 3 年的 42 例。见表 1。

表 1 临床病理特征

临床病理特征	例数(%)
性别(男/女)	64/25(71.9%/19.1%)
年龄(≥ 50 / < 50)	34/55(38.2%/61.8%)
初治时远处转移情况(有/无)	28/61(31.4%/68.6%)
远处转移部位	
肝	5(5.6%)
骨	17(19.1%)
肺	8(8.9%)
DFS(DFS ≥ 3 年/ < 3 年)	41/42(49.4%/50.6%)

2.2 miR-3182 的表达量与临床病理特征的关系 分析 MiR-3182 表达量与鼻咽癌患者临床病理特征的关系结果显示,miR-3182 的表达强度与性别、年龄无关($P > 0.05$),与初治时已有远处转移有关,有远处转移组 MiR-3182 表达量显著高于无远处转移组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 miR-3182 的表达量与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	MiR-3182 相对表达量($\bar{x} \pm s$)	t	P
性别				
男	64	1.35 $\pm$ 0.26	0.36	0.72
女	25	1.55 $\pm$ 0.58		
年龄				
≥ 50 岁	34	1.66 $\pm$ 0.38	1.30	0.19
< 50 岁	55	1.01 $\pm$ 0.22		
初治有无远处转移				
有转移	28	1.83 $\pm$ 0.31	4.75	0.001
无转移	61	0.61 $\pm$ 0.09		

2.3 DFS ≥ 3 年与 DFS < 3 年鼻咽癌患者 MiR-3182 表达的差异 获随访的 83 例中,DFS ≥ 3 年者 41 例,DFS < 3 年者 42 例。两组 MiR-3182 表达量差异显著[(0.57 $\pm$ 0.06) vs (1.53 $\pm$ 0.25)],DFS < 3 年的病例 MiR-3182 的表达量明显高于 DFS ≥ 3 年的病例($P < 0.05$)。见图 1。

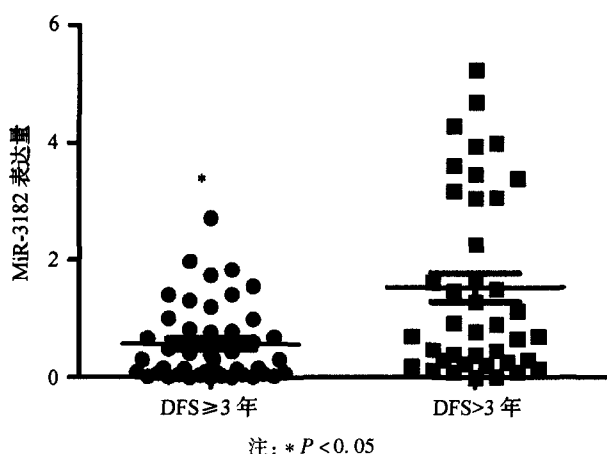


图1 DFS ≥ 3 年与DFS < 3 年鼻咽癌患者MiR-3182表达的差异图

3 讨论

3.1 鼻咽癌的发生、发展及转移是一个多步骤、多因素参与的复杂过程。随着医疗技术的进步,早期鼻咽癌的局部控制率达到90%以上,但中晚期鼻咽癌的远处转移率仍高达30%^[4]。远处转移是鼻咽癌治疗失败导致死亡的首要原因。因此深入研究鼻咽癌远处转移分子机制,寻找预测鼻咽癌远处转移分子标记物,对指导临床治疗尤为必需。

3.2 鼻咽癌远处转移的分子机制仍在探索中,研究证实癌基因与抑癌基因表达失衡与鼻咽癌远处转移有关,如C-met、EGFR、COX-2、p53、p16、nm23等。新近研究发现,Delta样配体4(DLL4)在人类恶性肿瘤发生和增殖过程中高表达,在部分鼻咽癌组织中表达上调,表达强度与远处转移呈正相关^[5]。Cui等^[6]研究发现,乳腺癌转移抑制基因1(BRMS1)在鼻咽癌组织和鼻咽癌细胞株中低表达,低表达与远处转移及总生存率低密切相关;体内外实验证实BRMS1可抑制鼻咽癌细胞迁移、侵袭和肺转移。研究还发现,细胞粘附和侵袭相关基因表达失衡与鼻咽癌远处转移密切相关。claudins是上皮细胞间紧密连接骨架蛋白,参与紧密连接的构成,紧密连接有维持细胞极向排列和屏障功能。Hsueh等^[7]研究发现,大部分鼻咽癌组织高表达claudins 1和4,低表达claudins7;低表达claudin4和高表达claudin7与远处转移有关。N-cadherin为钙依赖粘附素家族成员,有研究揭示其在细胞质或核中高表达可促进肿瘤细胞分裂增殖,诱导MMPs基因表达,促进肿瘤血管的形成及基底膜细胞外基质的破坏,促进肿瘤转移。N-cadherin在部分NPC组织中高表达,核高表达者与远处转移及预后差有关^[8]。但上述分子标记物在部分无远处转移的鼻咽癌中亦有异常表

达。因此,需寻找敏感度和特异度高的预测鼻咽癌远处转移分子标记物,指导临床治疗。

3.3 近来研究发现 MicroRNAs (MiRNA) 表达失衡与肿瘤发生发展有关。肿瘤相关的MiRNA一直是MiRNA功能和表达研究的热点方向,在鼻咽癌领域也是一样。越来越多的实验证据显示鼻咽癌细胞中MiRNA的异常表达与鼻咽癌细胞的增殖、侵袭及转移密切相关。一些MiRNA可以促进肿瘤细胞的转移。MiR-93直接作用于转化生长因子受体 $\beta 2$ (transforming growth factor- β receptor II)^[9],从而促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。MiR-30a能通过下调靶基因E-cadherin增加鼻咽癌肿瘤细胞转移和侵袭能力^[10]。MiR-155通过下调JMJD1A及BACH1的表达促进肿瘤细胞转移和侵袭^[11]。MiR-144可下调肿瘤抑制因子PTEN的表达,从而上调pAkt及cyclin D1的表达,促进G1期进程,下调E-cadherin的表达从而促进转移和侵袭^[12];相反,一些MiRNAs可以抑制转移。研究表明MiR-200a可逆转上皮细胞间质化的过程从而抑制肿瘤细胞的转移^[13],MiR-9在鼻咽癌组织中通常表达下调从而抑制鼻咽癌细胞的增殖、转移和侵袭^[14]。有研究表明血清MiR-9水平下降与淋巴结转移及癌症进展显著相关^[15]。近来有体内外实验表明,MiR-9具有通过下调CXC-R4表达来抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移、侵袭等功能^[16]。Liu等^[17]体外研究试验表明,MiR-29c能阻止鼻咽癌细胞转移及侵袭,体内研究试验表明,MiR-29c通过作用于靶基因TIAM1抑制肺部转移。本研究发现鼻咽癌组织表达MiR-3182,其表达强度有远处转移者显著高于无远处转移者,无瘤生存期 < 3 年者明显高于 ≥ 3 年者。MiR-3182可能通过干扰肿瘤转移相关基因表达促进鼻咽癌细胞远处转移。

总之,MiR-3182可作为预测鼻咽癌远处转移的分子标记物,对MiR-3182高表达者,应加强随访。MiR-3182促远处转移和对预后影响的分子机制及其在治疗中的应用价值有待进一步研究。

参考文献

- Zhang L, Chen QY, Liu H, et al. Emerging treatment options for nasopharyngeal carcinoma[J]. Drug Des Dev Ther, 2013, 7(1): 37 - 52.
- Lin S, Lu JJ, Han L, et al. Sequential chemotherapy and intensity-modulated radiation therapy in the management of locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: experience of 370 consecutive cases [J]. BMC Cancer, 2010, 10(1): 39 - 47.
- Tan G, Tang X, Tang F. The role of microRNAs in nasopharyngeal carcinoma[J]. Tumour Biol, 2015, 36(1): 69 - 79.

- 4 何跃平,罗晶晶,刘 钊,等.靶向 livin 的 sirna 对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响[J].中国免疫学杂志,2014,30(8):1028-1031.
- 5 Zhang JX, Cai MB, Wang XP, et al. Elevated DLL4 expression is correlated with VEGF and predicts poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. Med Oncol, 2013, 30(1):390-399.
- 6 Cui RX, Liu N, He QM, et al. Low BRMS1 expression promotes nasopharyngeal carcinomametastasis in vitro and in vivo and is associated with poor patient survival[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1):113-118.
- 7 Hsueh C, Chang YS, Tseng NM, et al. Expression pattern and prognostic significance of claudins 1, 4, and 7 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Hum Pathol, 2010, 41(7):944-950.
- 8 Luo WR, Wu AB, Fang WY, et al. Nuclear expression of N-cadherin correlates with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. Histopathology, 2012, 61(2):237-246.
- 9 Lu X, Fang W, Cai L, et al. TGF β R2 is a major target of miR-93 in nasopharyngeal carcinoma aggressiveness[J]. Mol Cancer, 2014, 13(51):1476-4598.
- 10 Wang HY, Li YY, Fu S, et al. MicroRNA-30a promotes invasiveness and metastasis in vitro and in vivo through epithelial-mesenchymal transition and results in poor survival of nasopharyngeal carcinoma patients[J]. Exp Biol Med, 2014, 239(7):891-898.
- 11 Zhu X, Wang Y, Sun Y, et al. MiR-155 up-regulation by Imp1 DNA contributes to increased nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014, 271(9):1939-1945.
- 12 Zhang LY, Ho-Fun Lee V, Wong AM, et al. MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(2):454-463.
- 13 Xia H, Cheung WK, Sze J, et al. Mir-200a regulates epithelial-mesenchymal to stem-like transition via zeb2 and beta-catenin signaling[J]. J Biol Chem, 2010, 285(47):36995-37004.
- 14 Gao F, Zhao ZL, Zhao WT, et al. Mir-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 431(3):610-616.
- 15 Lu J, Xu X, Liu X, et al. Predictive value of mir-9 as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma metastasis[J]. Br J Cancer, 2014, 110(2):392-398.
- 16 Lu J, Luo H, Liu X, et al. Mir-9 targets cxcr4 and functions as a potential tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(3):554-563.
- 17 Liu N, Tang LL, Sun Y, et al. Mir-29c suppresses invasion and metastasis by targeting tiam1 in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Lett, 2013, 329(2):181-188.

[收稿日期 2015-11-20][本文编辑 黄晓红]

课题研究·论著

8-OHdG 与 p-EGFR 在舌鳞癌中的表达及两者的相关性

覃向明, 陈 蕾, 于大海, 梁飞新

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81360403)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

作者简介: 覃向明(1986-), 男, 在读研究生, 研究方向: 口腔肿瘤的诊治。E-mail: 79333172@qq.com

通讯作者: 梁飞新(1973-), 男, 医学博士, 副教授, 研究方向: 口腔癌的分子靶向药物治疗。E-mail: liangfx@hotmail.com

[摘要] 目的 探讨舌鳞状细胞癌组织中活性氧的标志物 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)和磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)的表达水平,并分析二者的相互关系。方法 应用免疫组化法检测 30 例舌鳞癌组织及其癌旁组织中 8-OHdG 和 p-EGFR 表达,通过相关性分析探讨两者之间的关系。结果 8-OHdG 和 p-EGFR 在舌癌组织中高表达,阳性表达率分别为 80.0%、56.7%;两者在癌旁组织中呈低表达,阳性表达率分别为 16.7%、6.7%,它们在癌组织中的阳性表达率均显著高于癌旁组织($P < 0.05$),8-OHdG 的表达与 p-EGFR 的表达具有显著相关性($P < 0.05$)。结论 该研究初步确定活性氧在口腔癌中的表达和作用,以及其与磷酸化