

非小细胞肺癌患者血浆 miR-520f, miR-143-3p 表达与病理特征和预后的相关性研究

张玲玲, 张小霞, 於潇潇, 葛 琴 (南通市肿瘤医院检验科, 江苏南通 226361)

摘要: **目的** 探讨血浆微小核糖核酸 (micro RNA, miRNA) -520f 和 miR-143-3p 表达与非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者病理特征和预后的关系。**方法** 选择 2015 年 1 月~2017 年 1 月南通市肿瘤医院收治的 81 例首次确诊 NSCLC 患者 (NSCLC 组) 和 62 例体检正常者 (对照组)。均采集外周血浆, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 miR-520f 和 miR-143-3p 表达, 分析 miR-520f 和 miR-143-3p 表达与 NSCLC 临床病理特征的关系。以随访期间肿瘤复发、远处转移、死亡为终点事件, Kaplan-Meier 和 COX 回归分析 miR-520f 和 miR-143-3p 表达与 NSCLC 患者预后的关系。**结果** NSCLC 组血浆 miR-520f (1.82 ± 0.32), miR-143-3p (0.35 ± 0.06) 表达低于对照组 (2.51 ± 0.49 , 0.94 ± 0.11), 差异均有统计学意义 ($t=10.160, 40.986$, 均 $P < 0.05$)。miR-520f 表达与 NSCLC 患者 TNM 分期、淋巴结转移有关 ($t=4.335, 4.983$, 均 $P < 0.05$), miR-143-3p 表达与分化程度、TNM 分期和淋巴结转移有关 ($t=5.035, 3.349, 7.604$, 均 $P < 0.05$), 差异均有统计学意义。Kaplan-Meier 生存分析结果显示低 miR-520f (58.97%, 76.92%) 和 miR-143-3p (58.33%, 75.00%) 表达, NSCLC 患者无疾病进展 (progression-free survival, PFS) 与总体生存 (overall survival, OS) 生存率低于高 miR-520f 表达 (90.48%, 95.24%) 和高 miR-143-3p 表达 (88.89%, 95.56%), 差异均有统计学意义 (Log Rank $\chi^2=9.270, 5.303$, $P=0.02, 0.021$; Log Rank $\chi^2=9.079, 6.857$, $P=0.003, 0.009$)。淋巴结转移 (OR=1.680, 95%CI: 1.423 ~ 1.956), miR-520f (OR=1.836, 95%CI: 1.658 ~ 2.358), miR-143-3p (OR=2.169, 95%CI: 2.015 ~ 3.959) 与 NSCLC 不良预后有关 (均 $P < 0.05$)。**结论** miR-520f 和 miR-143-3p 在 NSCLC 患者中表达降低, 且与 NSCLC 细胞恶性增殖和侵袭行为以及 NSCLC 患者不良预后有关。

关键词: 非小细胞肺癌; 微小核糖核酸

中图分类号: R734.2; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 03-069-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.03.014

Correlation Study on Plasma miR-520f and miR-143-3p Expression with Pathological Features and Prognosis in Patients with Non-small Cell Lung Cancer

ZHANG Ling-ling, ZHANG Xiao-xia, YU Xiao-xiao, GE Qin

(Department of Laboratory Medicine, Nantong Tumor Hospital, Jiangsu Nantong 226361, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expression of plasma miR-520f and miR-143-3p and the pathological features and prognosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. **Methods** From January 2015 to January 2017, 81 patients with NSCLC diagnosed for the first time (NSCLC group) and 62 normal subjects (control group) were selected from Nantong Tumor Hospital. Peripheral blood was collected, and the expressions of miR-520f and miR-143-3p were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and the relationship between the expressions of miR-520f and miR-143-3p and the clinicopathological characteristics of NSCLC was analyzed. With tumor recurrence, distant metastasis, and death as endpoint events during follow-up, Kaplan-Meier and COX regression analysis were conducted to analyze the relationship between miR-520f and miR-143-3p expression and the prognosis of NSCLC patients. **Results** The expression of plasma miR-520f (1.82 ± 0.32) and miR-143-3p (0.35 ± 0.06) was lower than that in the control group ($2.51 \pm 0.49, 0.94 \pm 0.11$), the differences were statistically significant ($t=10.160, 40.986$, all $P < 0.05$). The expression of miR-520f was associated with the TNM stage and lymph node metastasis of NSCLC patients ($t=4.335, 4.983$, all $P < 0.05$), and the expression of miR-143-3p was associated with the degree of differentiation, TNM stage and lymph node metastasis ($t=5.035, 3.349, 7.604$, all $P < 0.05$), the differences were statistically significant, respectively. Kaplan-Meier survival analysis showed that the PFS and OS survival rates of NSCLC patients with low miR-520f (58.97%, 76.92%) and miR-143-3p (58.33%, 75.00%) expression were

作者简介: 张玲玲 (1992-), 女, 本科, 初级技师, 研究方向: 肿瘤免疫, E-mail: christoph3@163.com。

通讯作者: 葛琴 (1983-), 女, 本科, 主管技师, 研究方向: 基础检验技术, E-mail: 13912258@163.com。

lower than those with high miR-520f (90.48%, 95.24%) and miR-143-3p expression (88.89%, 95.56%), the differences were statistically significant (Log Rank χ^2 =9.270, 5.303, P =0.002, 0.021; Log Rank χ^2 =9.079, 6.857, P =0.003, 0.009). Multivariate COX regression analysis showed that lymphatic metastasis (OR=1.680, 95%CI: 1.423 ~ 1.956), low expression of miR-520f (OR=1.836, 95%CI: 1.658 ~ 2.358) and miR-143-3p (OR=2.169, 95%CI: 2.015 ~ 3.959) were associated with poor prognosis of NSCLC (all P < 0.05). **Conclusion** The expression of miR-520f and miR-143-3p was decreased in NSCLC patients, which was associated with the malignant proliferation and invasive behavior of NSCLC cells and the poor prognosis of NSCLC patients.

Keywords: non-small cell lung cancer; micro RNA

随着非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 研究的不断深入, 靶向治疗和免疫治疗逐渐应用于临床, 患者生存率得到一定程度提高, 但是总体生存率仍然较低, 尤其是发生转移的中晚期患者^[1], 其5年生存率不到5%^[2]。微小核糖核酸 (micro RNA, miRNA) 参与细胞分化、增殖、凋亡等调控, 在恶性肿瘤中或发挥致癌基因作用或发挥抑癌基因作用^[3]。其中 miR-520f, miR-143-3p 具有抑制癌细胞增殖和侵袭功能, 在多种恶性肿瘤中发挥抑癌基因作用^[4-5]。但是 miR-520f, miR-143-3p 在 NSCLC 的报道并不多见, 其作用机制以及和患者预后的关系尚不明确, 鉴于此本研究检测 NSCLC 患者血浆 miR-520f, miR-143-3p 表达并分析其临床意义, 旨在为病情评估和预后预测提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究已获得南通市肿瘤医院伦理委员会批准, 选择2015年1月~2017年1月南通市肿瘤医院收治的81例首次确诊为NSCLC患者 (NSCLC组), 排除其它类型肺癌; 入组前已经接受手术、放化疗治疗; 并发其它部位肿瘤、肺结核。

表1 引物序列和反应条件

引物	上游序列 (5'-3')	下游序列 (5'-3')
miR-520f	UCUUUCGCGAAGGGAUAUCC	UCUUUCGCGAAGGGAUAACA
miR-143-3p	CGAGACTGAGATGCACTG	ATCCACTGCAGGCGAGG
U6	AGAGAAGATTAGCATGGACCTG	ATCCACTGCAGGCTCCGAGG

1.4 统计学分析 采用SPSS 25.0进行数据录入和分析, miR-520f, miR-143-3p以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用Student t 检验; 计数资料以例(n)表示, 采用 χ^2 检验; 绘制NSCLC患者Kaplan-Meier生存曲线, Log-Rank检验不同miR-520f, miR-143-3p表达下患者生存率差异。COX风险比例回归检验NSCLC患者随访期间死亡的因素。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组血浆 miR-520f, miR-143-3p 表达比较 成组设计资料的 t 检验结果显示NSCLC患者血浆miR-520f (1.82 ± 0.32), miR-143-3p (0.35 ± 0.06)

男性42例, 女性39例, 年龄51~72 (63.35 ± 4.21)岁, 吸烟史 (吸烟史定义为每天吸烟20支, 烟龄 ≥ 20 年) 51例。另选择62例体检者为对照组, 男性38例, 女性24例, 年龄51~70 (63.09 ± 4.17)岁, 吸烟史13例。两组年龄、性别、吸烟史比例比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

1.2 试剂和仪器 Trizol试剂购自美国Invitrogen公司; SuperScript IV反转录酶, VeritiPro PCR仪 (美国赛默飞公司); Optima XPN系列超速离心机 (美国贝克曼库尔特公司)。

1.3 方法 NSCLC组术前 (对照组体检当日) 采集肘静脉血, 参照刘旭辉等^[6]的操作方法, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算miR-520f, miR-143-3p相对表达量, 引物序列见表1。采用电话随访方式对NSCLC患者进行定期随访 (每3个月一次) 和生存状况统计, 时间截止2020年9月。自病理确诊至影像学或实验室复查发现的肿瘤复发、转移或全因死亡/随访截止时间为无疾病进展 (progression-free survival, PFS) 生存时间。自病理确诊至全因死亡/随访截止时间为总体生存 (overall survival, OS) 时间, 统计随访期间NSCLC患者PFS, OS生存率。

表达低于对照组 (2.51 ± 0.49 , 0.94 ± 0.11), 差异具有统计学意义 ($t=10.160$, 40.986 , 均 $P < 0.01$)。

2.2 血浆 miR-520f, miR-143-3p 水平与 NSCLC 患者临床病理特征的关系 见表2。成组设计资料的 t 检验结果显示TNM分期、淋巴结转移NSCLC患者血浆miR-520f表达低于TNM分期I~II期、无淋巴结转移患者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 低中度分化、TNM分期III~IV期、淋巴结转移NSCLC患者血浆miR-143-3p表达低于高度分化、TNM分期I~II期、无淋巴结转移患者, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。

表2 不同临床病理特征患者血浆 miR-520f, miR-143-3p 表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

类别	n	miR-520f	t 值	P 值	miR-143-3p	t 值	P 值
性别							
男	42	1.67 ± 0.28	1.862	0.066	0.33 ± 0.05	0.817	0.416
女	39	1.79 ± 0.30			0.34 ± 0.06		
年龄 (岁)							
≥ 60	46	1.68 ± 0.27	1.919	0.059	0.33 ± 0.04	0.811	0.420
< 60	35	1.80 ± 0.29			0.34 ± 0.07		
吸烟史							
有	51	1.70 ± 0.28	1.177	0.243	0.33 ± 0.05	0.807	0.422
无	30	1.78 ± 0.32			0.34 ± 0.06		
肿瘤直径 (cm)							
≥ 3	35	1.68 ± 0.23	1.545	0.126	0.33 ± 0.04	0.466	0.643
< 3	46	1.77 ± 0.28			0.33 ± 0.05		
病理类型							
腺癌	45	1.68 ± 0.25	1.800	0.075	0.33 ± 0.03	1.286	0.202
鳞癌	36	1.79 ± 0.30			0.34 ± 0.06		
分化程度							
低中度分化	42	1.69 ± 0.26	1.309	0.194	0.30 ± 0.04	5.035	< 0.01
高度分化	39	1.77 ± 0.29			0.37 ± 0.08		
TNM 分期							
I ~ II 期	33	1.89 ± 0.35	4.335	< 0.01	0.31 ± 0.04	3.349	< 0.01
III ~ IV 期	48	1.62 ± 0.21			0.35 ± 0.06		
淋巴结转移							
是	23	1.52 ± 0.20	4.983	< 0.01	0.26 ± 0.03	7.604	< 0.01
否	58	1.81 ± 0.29			0.36 ± 0.06		

2.3 不同血浆 miR-520f, miR-143-3p 表达 NSCLC 患者预后差异及 PFS, OS 生存曲线图 生存分析曲线图见图 1, 图 2。Kaplan-Meier 生存分析结果显示低表达 miR-520f 组 (miR-520f < 1.82, n=39) NSCLC 患者 PFS 生存率、OS 生存率分别为 58.97% (23/39), 76.92% (30/39), 低于高表达 miR-520f 组 (miR-520f ≥ 1.82, n=42) 的 90.48% (38/42), 95.24% (40/42), 差异具有统

计学意义 (Log Rank $\chi^2=9.270$, 5.303, $P=0.002$, 0.021); 低表达 miR-143-3p 组 (miR-143-3p < 0.35, n=36) NSCLC 患者 PFS 生存率、OS 生存率分别为 58.33% (21/36), 75.00% (27/36), 低于高表达 miR-143-3p 组 (miR-143-3p ≥ 0.35, n=45) 的 88.89% (40/45), 95.56% (43/45), 差异具有统计学意义 (Log Rank $\chi^2=9.079$, 6.857, $P=0.003$, 0.009)。

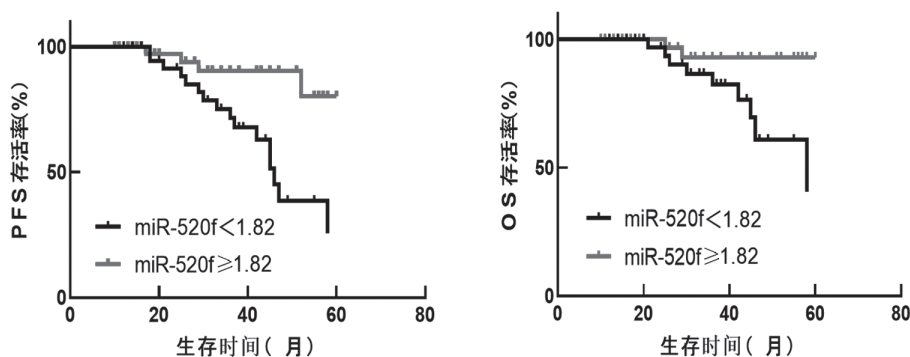


图1 不同血浆 miR-520f 表达 NSCLC 患者 PFS, OS 生存曲线图

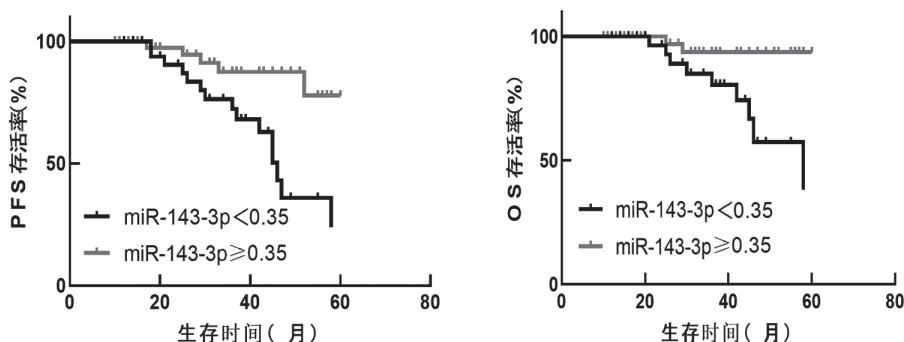


图2 不同血浆 miR-143-3p 表达 NSCLC 患者 PFS, OS 生存曲线图

2.4 NSCLC 患者终点事件的 COX 回归分析 见表 3。经单因素 COX 回归分析：肿瘤直径、分化程度、远处转移、TNM 分期、淋巴转移、miR-520f, miR-143-3p 与 NSCLC 终点事件有关（均 P

< 0.05 ）。多因素 COX 回归分析：淋巴结转移、miR-520f, miR-143-3p 与 NSCLC 患者终点事件独立相关（均 $P < 0.001$ ）。

表 3 影响 NSCLC 患者预后的 COX 回归分析

因素	单因素 COX		多因素 COX	
	RR(95%CI)	P 值	RR(95%CI)	P 值
年龄	1.240 (0.802 ~ 1.428)	0.895	-	-
性别	1.233 (0.806 ~ 1.499)	0.935	-	-
吸烟史	1.365 (0.815 ~ 1.565)	0.719	-	-
肿瘤直径	1.295 (1.035 ~ 1.501)	0.009	1.378 (0.963 ~ 1.435)	0.525
病理类型	1.319 (0.875 ~ 1.563)	0.619	-	-
分化程度	1.382 (1.189 ~ 1.589)	0.008	1.346 (0.896 ~ 1.399)	0.636
TNM 分期	1.891 (1.725 ~ 2.661)	0.002	1.369 (0.820 ~ 1.547)	0.517
淋巴转移	2.042 (1.856 ~ 2.976)	0.003	1.680 (1.423 ~ 1.956)	0.003
miR-520f	2.969 (2.435 ~ 3.602)	< 0.001	1.836 (1.658 ~ 2.358)	0.006
miR-143-3p	2.461 (2.301 ~ 3.235)	< 0.001	2.169 (2.015 ~ 3.959)	< 0.001

3 讨论

非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）早期症状隐匿，检出率低，确诊时多数已处于中晚期，丧失最佳手术时机，生存状况差^[6]，探寻预测 NSCLC 患者预后的非侵入性指标十分重要。miRNA 是一类非编码小分子 RNA，通过特异性识别靶 mRNA 3' 非编码区，导致靶 mRNA 降解，翻译抑制，转录后调控基因表达，参与恶性肿瘤发生发展，现已发现多种 miRNA 与 NSCLC 发病有关^[7-8]。

miR-520f 是 miR-520 家族成员之一，定位于 19 号染色体，具有调控胚胎干细胞生长、分化作用^[9]。miR-520f 已被证实参与多种恶性肿瘤发生和进展，体外研究显示敲除胃癌细胞中 miR-520f 可导致细胞的侵袭性增殖^[10]，动物实验结果显示 miR-520f 过表达可抑制小鼠肺转移^[11]。本研究发现 NSCLC 组 miR-520f 表达低于健康对照组，且 miR-520f 表达与 NSCLC 患者 TNM 分期和淋巴结转移有关，提示 miR-520f 在 NSCLC 中发挥抑癌基因作用。体外研究表明 miR-520 可调节癌细胞侵袭和转移，下调 miR-520f 可能减弱细胞凋亡抑制作用，并导致化疗耐药^[11-12]。miR-520f 可通过靶向调控 4 跨膜区的 L6 超家族成员 1 抑制肝癌细胞增殖和侵袭^[13]，也可通过靶向调控去整合素 - 金属蛋白酶 9 和 II 型转化生长因子 -p 受体抑制癌细胞侵袭，在恶性肿瘤中发挥抗侵袭和抗转移作用^[11]。本研究统计分析结果显示 miR-520f 低表达与患者低生存率有关，miR-520f 低表达是 NSCLC 终点事件发生的危险因

素，提示 miR-520f 可以为 NSCLC 预后评估提供一定参考。

miR-143-3p 是 miR-143 家族成员之一，位于人类基因组 5 号染色体 33 位，可调控细胞增殖、细胞凋亡及细胞周期等，miR-143-3p 表达显著降低癌细胞增殖、迁移和侵袭能力^[14]。miR-143-3p 已被证实存在于卵巢癌^[14]、骨肉瘤^[15]、鼻鳞状细胞癌^[16]等多种肿瘤细胞中呈低表达，但是 miR-143-3p 在 NSCLC 的作用机制尚不清楚，本研究结果发现 miR-143-3p 在 NSCLC 呈低表达，miR-143-3p 低表达与低分化程度、TNM 分期、淋巴结转移均有关，说明 miR-143-3p 表达缺失可能与 NSCLC 癌细胞恶性增殖、侵袭和淋巴结转移有关。YANG 等^[17]人报道显示 miR-143-3p 通过负向调控核糖核酸还原酶 M2 亚基（ribonucleotide reductase M2 subunit, RRM2）抑制 NSCLC 癌细胞生长，而这一调控机制受 LINC00667 调控，提示 miR-143-3p 通过 LINC00667/miR-143-3p/RRM2 信号通路参与 NSCLC 发生和进展。本研究生存分析曲线图显示低 miR-143-3p 表达 NSCLC 患者 PFS, OS 生存率偏低，经 COX 回归分析 miR-143-3p 低表达与 NSCLC 患者随访期间终点事件的发生密切相关，说明 miR-143-3p 的表达缺失是 NSCLC 患者肿瘤复发、远处转移、死亡的主要因素之一，这与 miR-143-3p 表达缺失导致对癌细胞增殖、侵袭抑制作用减弱、致癌基因表达增强有关。

综上，NSCLC 患者血浆中 miR-520f, miR-143-3p 表达均下调，miR-520f, miR-（下转第 78 页）