

hsa-miR-23a-3p 在肺腺癌组织中的表达及意义

周 燕¹, 张洁霞^{1,2}

(1. 广州医科大学附属第一医院, 广东 广州 510120;

2. 广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510120)

摘要: [目的] 探讨 hsa-miR-23a-3p 在肺腺癌组织中的表达水平及临床意义。[方法] 收集我院呼吸科就诊的 42 例肺腺癌患者的癌组织及癌旁组织样本, 同时选取 37 例非肺腺癌患者的肺穿刺样本为对照组。采用荧光定量 PCR 法检测各组患者肺组织中 hsa-miR-23a-3p 相对表达水平, 分析 hsa-miR-23a-3p 在肺腺癌组织中的表达及与患者临床特征的关系; 以患者血清癌胚抗原(CEA)指标为参考, 利用受试者工作特征曲线(ROC)评估肺腺癌患者癌组织中 hsa-miR-23a-3p 的表达临床应用价值。[结果] 对照组与癌旁组织中 hsa-miR-23a-3p 的表达水平差异无统计学意义(4.32 ± 0.34 vs 4.16 ± 0.41 , $P > 0.05$), 与对照组与癌旁组织比, 肺腺癌组织 hsa-miR-23a-3p 表达较高(6.08 ± 0.47 vs 4.32 ± 0.34 , 6.08 ± 0.47 vs 4.16 ± 0.41 , $P < 0.01$)。不同性别(6.16 ± 0.82 vs 5.89 ± 0.73)、分化程度(6.20 ± 0.84 vs 5.97 ± 0.67)癌组织的 hsa-miR-23a-3p 表达差异无统计学意义($P > 0.05$), TNM 分期越高(5.13 ± 0.49 vs 6.26 ± 0.51)、肿瘤越大(6.47 ± 0.65 vs 5.94 ± 0.71)、淋巴结转移(6.32 ± 0.53 vs 5.83 ± 0.46)及 CEA 阳性(6.47 ± 0.44 vs 5.79 ± 0.41)癌组织的 hsa-miR-23a-3p 表达显著性增高($P < 0.001$)。ROC 曲线分析显示, 与 CEA 比, hsa-miR-23a-3p 的曲线下面积高(0.779 vs 0.683)。[结论] 肺腺癌组织 hsa-miR-23a-3p 呈高表达, 与淋巴结转移、肿瘤大小及 TNM 分期相关, 可用于辅助诊断肺腺癌。

主题词: hsa-miR-23a-3p; 肺腺癌; 临床意义

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)01-0031-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.01.B007

Expression and Clinical Significance of hsa-miR-23a-3p in Lung Adenocarcinoma

ZHOU Yan¹, ZHANG Jie-xia^{1,2}

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China; 2. State Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and clinical significance of hsa-miR-23a-3p in lung adenocarcinoma. [Methods] The cancer tissue samples and paracancerous tissue samples of 42 patients with lung adenocarcinoma admitted to our hospital were collected. The lung puncture samples of 37 patients with non-lung adenocarcinoma were obtained as the control group. The expression of hsa-miR-23a-3p in tissue samples was detected by RT-PCR. The relationship between the expression of hsa-miR-23a-3p in lung adenocarcinoma and clinical characteristics of patients was analyzed. The serum carcinoembryonic antigen (CEA) levels of patients were measured. The receiver operating characteristic (ROC) was applied to evaluate the value of hsa-miR-23a-3p in diagnosis of lung adenocarcinoma. [Results] There were no significant differences in the expression level of hsa-miR-23a-3p between the control group and the paracancerous tissues (4.32 ± 0.34 vs 4.16 ± 0.41 , $P > 0.05$). Compared with the control group and paracancerous tissues, the expression of hsa-miR-23a-3p in lung adenocarcinoma tissue was higher (6.08 ± 0.47 vs 4.32 ± 0.34 , 6.08 ± 0.47 vs 4.16 ± 0.41 , $P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of hsa-miR-23a-3p between male and female patients (6.16 ± 0.82 vs 5.89 ± 0.73) or patients with different differentiation of cancer tissue (6.20 ± 0.84 vs 5.97 ± 0.67) ($P > 0.05$). The patients with higher TNM stage (5.13 ± 0.49 vs 6.26 ± 0.51), larger tumor size (6.47 ± 0.65 vs 5.94 ± 0.71), positive lymph node metastasis (6.32 ± 0.53 vs 5.83 ± 0.46), or positive serum CEA level (6.47 ± 0.44 vs 5.79 ± 0.41) had higher expression of hsa-miR-23a-3p (all $P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the curve (0.779 vs 0.683) and sensitivity (71.4% vs 47.6%) of hsa-miR-23a-3p were higher than CEA. [Conclusion] The hsa-miR-23a-3p is highly expressed in patients with lung adenocarcinoma and is associated with lymph node metastasis, tumor size and TNM staging, indicating that it might be used the diagnosis of lung adenocarcinoma.

Subject words: hsa-miR-23a-3p; lung adenocarcinoma; clinical significance

基金项目: 广州医科大学附属第一医院 2015 年度科研项目临床应用与转化医学项目(201515gyfyy)

通信作者: 张洁霞, 主任医师, 硕士; 广州医科大学附属第一医院呼吸科, 广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室; 广州市越秀区沿江路 151 号(510120); E-mail: drzjxcn@126.com

收稿日期: 2019-04-01; **修回日期:** 2019-09-25

微小 RNA(microRNA, miRNA)为普遍存在于生物中的一种非编码内源性 RNA^[1-2], 广泛涉及到生命的重要过程, 如细胞凋亡、分化、生长等^[3]。正常表达的 miRNA 能够调控细胞分化与增殖, 但是表达异常时导致肿瘤发生或肿瘤发展^[4-5]。通过负性调控的靶基因, 使其在转录后的水平中能够表达, 通常以靶基因与 miRNA 配对结合为主^[6]。在肿瘤中, miR-23a 生理功能非常重要, 参与了多种癌症的发生与发展, 如消化系统、神经系统肿瘤等, 故称其为研究肿瘤时的明星分子^[7-8]。肿瘤 miRNAs 表达谱中, hsa-miR-23a-3p 常被检出存在显著性变化, 研究显示 hsa-miR-23a-3p 可促进乳腺癌细胞复制增加并增加耐药癌基因 CKS1B 的表达, 该结果在原发性乳腺癌中也获得证实^[9]。抑制乳腺癌细胞中 hsa-miR-23a-3p 表达可降低细胞迁移能力, Tian 等^[10]研究发现骨肉瘤细胞中转染 miR-23a 抑制剂可显著性减弱癌细胞侵袭。本实验检测肺腺癌组织内 hsa-miR-23a-3p 表达, 并分析 hsa-miR-23a-3p 表达与肺腺癌临床病理参数的关系, 评价 hsa-miR-23a-3p 能否作为肺腺癌的诊断标志物, 为治疗肺腺癌方案提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取我院呼吸科 2015 年 3 月至 2017 年 9 月经病理确诊肺腺癌患者 42 例, 肺癌组织以及癌旁组织标本, 置于液氮保存。年龄 35~72 岁, 平均年龄 (57.5±12.7) 岁; 男性 27 例, 女性 15 例; 体重指数 (19.4~25.5) kg/m², 平均体重指数 (22.4±2.5) kg/m²; 有吸烟史 12 例; TNM 分期: I 期 10 例, II 期 21 例, III 期 11 例; 低分化 15 例, 中高分化 27 例; 24 例淋巴结转移; 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) 阴性 22 例, 阳性 20 例。选 37 例进行肺组织穿刺的患者作为对照组, 经病理确诊为非肺腺癌, 年龄 37~70 岁, 平均年龄 (55.2±9.6) 岁; 男性 23 例, 女性 14 例, 体重指数 (20.0~26.0) kg/m², 平均体重指数 (23.1±2.7) kg/m²; 有吸烟史 11 例; 肺腺癌组及对照组的年龄、性别、体重指数和吸烟史等一般资料差异无统计学意义 ($P <$

0.05)(Table 1)。

1.2 试剂与仪器

Trizol 试剂购自 Invitrogen, TaqMan® RNA Reverse Transcription kit 试剂盒购自美国应用生物系统公司, 荧光定量 PCR 仪(LightCycler480, 美国罗氏生物), 罗氏公司出售的电化学发光试剂盒, 上海生工生物公司出售的酶联免疫吸附试剂盒, 天根生物科技有限公司出售的普通 PCR 反应与 RNA 提取试剂盒。

1.3 组织 RNA 提取

由液氮中取出肺癌患者组织, 加入研钵中, 迅速磨成粉末状; 取出 100mg 新鲜研磨的粉末加入含有 1ml Trizol 裂解液的 EP 管中, 混合均匀; 室温静止 5min, 加入 200μl 氯仿, 然后充分混匀, 室温放置 10min; 然后 4℃, 12 000rpm 离心 15min, 取上层水相, 于 RNase-free 的 1.5ml 离心管中, 加入等体积异丙醇, 充分震荡混匀, 冰上放置 30min; 取出离心管, 然后再 4℃, 12 000rpm RNA 沉淀经 15min 12 000rpm 离心可获得; 之后洗涤 RNA 沉淀 2 次, 洗涤时采用 75% 酒精 500μl, 再进行风干; 使用 RNase-free 水 50μl 可在室温下溶解 RNA; 为测定抽提的所有 RNA 浓度, 使用 NanoDrop 技术, 放置在 -20℃ 备用。

1.4 荧光定量 PCR 检测

按照 ABI 公司的 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit 试剂盒操作说明书, 对抽提的 RNA 进行体外反转录实验, 得到 cDNA 产物; 反应条件为: 16℃, 孵育 30min, 42℃孵育 30 min, 85℃加热 5 min, 4℃保存。以得到的 cDNA 为模版, 进行荧光定量 PCR, 采用 TaqMan® Universal PCR Master Mix 20μl 反应体系, 在罗氏 LightCycler480 仪器上操作, 以 U6 作为表达检测的内参, ΔCT 表示 hsa-miR-23a-3p 的相对表达, 其中 $\Delta CT = CT_{U6} - CT_{hsa-miR-23a-3p}$, 反应条件为: 95℃, 预变性 10 min; 95℃ 15sec, 60℃ 30sec, 70℃ 30sec 进行 40 个循环的扩增, 引物信息见 Table 2。

Table 1 Comparison of general data in two groups[n(%)]

Characteristics	Lung adenocarcinoma group(n=42)	Control group (n=37)	t/χ^2	P
Gender(%)	Male	27(64.29)	0.038	0.845
	Female	15(35.17)		
Age (years old)	57.5±12.7	55.2±9.6	0.898	0.372
Body mass index(kg/m ²)	22.4±2.5	23.1±2.7	1.196	0.235
History of smoking	Yes	12(28.57)	0.013	0.910

Table 2 Primer sequence

Gene		Primer sequence(5'-3')
hsa-miR-23a-3p	Upstream	ATCCAGTCAAGGACTG
	Downstream	CGAATCAGGACTCGTC
U6	Upstream	TAGGGTGCTCGCTTCGGC
	Downstream	CTGCTGTCGTGGAGTCG

1.5 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计学软件进行数据分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;定性资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌组织中 hsa-miR-23a-3p 表达

肺腺癌组织、癌旁组织及对照组的 hsa-miR-23a-3p 的 ΔCt 值分别为 6.08 ± 0.47 、 4.32 ± 0.34 和 4.16 ± 0.41 ,癌旁组织及对照组的 hsa-miR-23a-3p 差异无统计学意义($t=1.896$, $P=0.066$)。与癌旁组织及对照组比,肺腺癌组织的 hsa-miR-23a-3p 显著性增高($F=318.462$, $P < 0.001$)(Figure 1)。

2.2 肺腺癌 hsa-miR-23a-3p 表达与临床病理的关系

不同性别、不同分化程度肺腺癌患者 hsa-miR-23a-3p 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。TNM 分期越高、肿瘤越大、淋巴结转移及 CEA 阳性患者癌组织的 hsa-miR-23a-3p 表达显著性增高($P < 0.05$)(Table 3)。

2.3 hsa-miR-23a-3p 表达在肺腺癌诊断中的价值

hsa-miR-23a-3p 在肺腺癌组织中的表达较高,ROC 曲线下面积为 0.779,显著性高于

CEA(0.683)($\chi^2=12.112$, $P < 0.001$)(Figure 2, Table 4)。

3 讨论

尽管肺癌发病机制尚不明确,但调控基因可能参与肺癌的发生与发展^[11-12]。miRNAs 是重要的调控因子。大量的研究显示 hsa-miR-23a-3p 在恶性肿瘤

Table 3 Expression and clinical pathology of hsa-miR-23a-3p in lung adenocarcinoma

Characteristics	N	hsa-miR-23a-3p	t/χ^2	P
Gender				
Male	27	6.16 ± 0.82	0.865	0.402
Female	15	5.94 ± 0.73		
TNM				
I	10	5.13 ± 0.49	6.825	<0.001
II ~ III	32	6.38 ± 0.51		
Differentiation				
Low	15	6.20 ± 0.84	0.804	0.429
Medium/High	27	6.01 ± 0.67		
Tumor size(cm)				
>3	15	6.47 ± 0.65	2.747	0.011
≤ 3	27	5.86 ± 0.71		
Lymph node metastasis				
Yes	24	6.32 ± 0.53	3.582	0.002
No	18	5.76 ± 0.46		
CEA				
Positive	20	6.47 ± 0.44	5.642	<0.001
Negative	22	5.73 ± 0.41		

Table 4 hsa-miR-23a-3p and CEA in diagnosis for lung adenocarcinoma

Indicators	AUC	95%AUC	Sensitivity(%)	Specificity(%)
hsa-miR-23a-3p	0.779	0.542~0.865	71.4	81.1
CEA	0.683	0.441~0.768	47.6	82.6

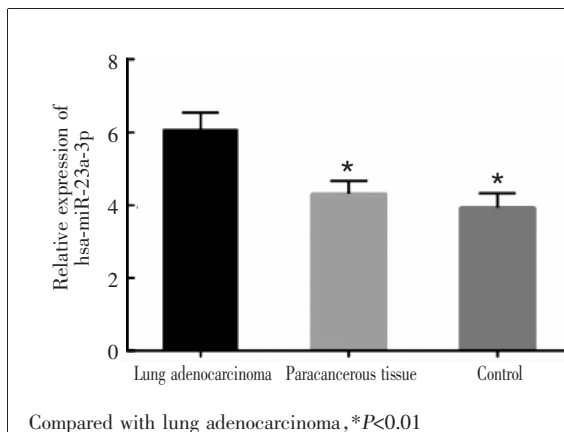


Figure 1 hsa-miR-23a-3p expression in 3 group

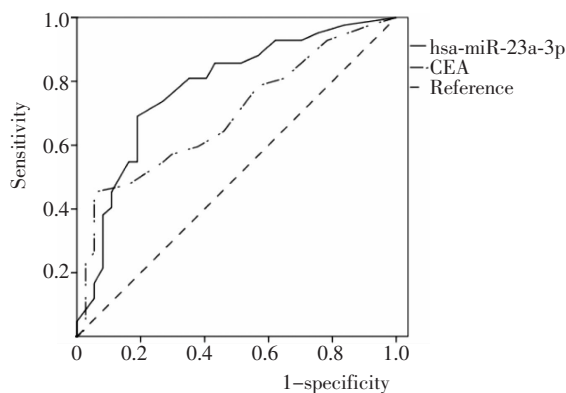


Figure 2 ROC curve of the hsa-miR-23a-3p in diagnosis of lung adenocarcinoma

中呈异常表达：神经胶质瘤细胞株 U87、U251、SHG44 细胞内, hsa-miR-23a-3p 呈高表达, hsa-miR-23a-3p 可通过直接作用于 HOXD10 而调控基质金属蛋白酶 14, 促进 U87 和 U251 细胞浸润^[13], 胃腺癌细胞系 MGC803 的 hsa-miR-23a-3p 表达也明显增高, hsa-miR-23a-3p 直接抑制 IL-6 受体, 提高胃腺癌 MGC803 细胞株增殖, 促进胃恶性肿瘤细胞的生长^[14]; hsa-miR-23a-3p 在肾母细胞瘤低表达, 通过下调 HOXB4 蛋白质表达而参与肾母细胞瘤的发生发展^[15]。相关研究表明, 获得耐药后肺癌患者血清中 miRNA 表达差异显著, 24 种 miRNA 变异超过 2 倍, 其中 19 种 miRNA 上调, 5 种 miRNA 下调, 且 RT-PCR 结果与 miRNA 微阵列的结果一致^[16]。hsa-miR-23a-3p 在肺癌 miRNA 血清谱呈高表达, 但 hsa-miR-23a-3p 在肺癌组织中的表达报道较少。本研究通过对肺腺癌组织中 hsa-miR-23a-3p 表达检测发现, 与癌旁组织及对照组相比, hsa-miR-23a-3p 在肺腺癌患者癌组织中表达较高; 不同性别和不同分化患者的 hsa-miR-23a-3p 表达水平无明显差异。TNM 分期、肿瘤 > 3 cm 和发生淋巴结转移组织者 hsa-miR-23a-3p 表达水平分别明显高于 TNM I、肿瘤 ≤ 3 cm 和未发生淋巴结转移的组织, 提示癌组织中 hsa-miR-23a-3p 高表达与肿瘤大小、TNM 分期及淋巴结转移密切相关, 与文献报道类似^[17], 该结果显示 hsa-miR-23a-3p 可能参与了肺腺癌的发生发展, 抑制 hsa-miR-23a-3p 或可成为治疗肺腺癌的潜在方法。进一步通过 ROC 曲线分析显示, hsa-miR-23a-3p 诊断肺腺癌的曲线下面积略高于 CEA, 表明 hsa-miR-23a-3p 具有较高的肺腺癌诊断效能, 可用于肺腺癌的诊断。

近年来研究显示, 随着肿瘤的发生发展, 病理改变也可发生在癌旁组织, 本文结果显示癌旁组织的 hsa-miR-23a-3p 表达也有增高的趋势。由此可见, 与正常组织相比, 评估癌旁组织的 hsa-miR-23a-3p 表达, 有助于判断肿瘤的恶性程度。

综上所述, 肺腺癌组织的 hsa-miR-23a-3p 呈高表达, 与淋巴结转移、肿瘤大小及 TNM 分期相关, 可用于辅助诊断肺腺癌。

参考文献:

- [1] Backes C, Meese E, Keller A. Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects[J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20(6): 509–518.
- [2] McGuire A, Brown JA, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(1): 145–155.
- [3] Hausser J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions—beyond repression of gene expression[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(9): 599–612.
- [4] Izabela S, Joanna W, Rafal P. Molecular background of miRNA role in asthma and COPD: an updated insight[J]. *Biomed Res Int*, 2016, (2016–6–8), 2016, 2016(2): 1–10.
- [5] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203–222.
- [6] Karimi N, Ali Hosseini-pour Feizi M, Safaralizadeh R, et al. Serum overexpression of miR-301a and miR-23a in patients with colorectal cancer [J]. *J Chin Med Assoc*, 2019, 82(3): 215–220.
- [7] Gindin Y, Jiang Y, Francis P, et al. miR-23a impairs bone differentiation in osteosarcoma via down-regulation of GJA1[J]. *Front Genet*, 2015, 6: 233.
- [8] Hsu YL, Hung JY, Chang WA, et al. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1 [J]. *Oncogene*, 2017, 36(34): 4929–4934.
- [9] Black JC, Zhang H, Kim J, et al. Regulation of transient site-specific copy gain by microRNA [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(10): 4862–4871.
- [10] Tian K, Di R, Wang L. Micrma-23a enhances migration and in-vasion through pten in osteosarcoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(7): 351–359.
- [11] Feng B, Zhang K, Wang R, et al. Non-small-cell lung cancer and miRNAs: novel biomarkers and promising tools for treatment[J]. *Clin Sci*, 2015, 128(10): 619–634.
- [12] Munagala R, Aqil F, Gupta RC. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(8): 10703–10714.
- [13] Hu X, Chen D, Cui Y, et al. Targeting microRNA-23a to inhibit glioma cell invasion via HOXD10 [J]. *Sci Rep*, 2013, 3(7478): 3423–3428.
- [14] Zhu L, Tian J, Chen L, et al. Effect of blocking endogenous miR-23a on the proliferation and invasion in gastric adenocarcinoma cell line MGC803[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2013, 33(5): 678–683.
- [15] Koller K, Das S, Leuschner I, et al. Identification of the transcription factor HOXB4 as a novel target of miR-23a [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(8): 709–715.
- [16] Huang Q, Li D. Differential expression of serum miRNAs in patients with advanced non-small cell lung cancer treated by gefitinib before and after acquiring drug resistance[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2018, 43(12): 1288–1293.
- [17] Lan T, Lu Y, Xiao Z, et al. A six-microRNA signature can better predict overall survival of patients with esophagus adenocarcinoma[J]. *Peer J*, 2019, 7(7): e7353.