

miR-155 与 SOCS1 在非小细胞肺癌中表达及临床意义

冼海兵, 冯卫能, 张 华, 梁剑苗

(佛山市第一人民医院, 广东 佛山 528000)

摘 要: [目的] 研究非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 癌组织中微小 RNA (microRNA, miR)-155 及细胞因子信号传导抑制因子 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 的表达及其临床意义。[方法] 应用荧光实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 96 例 NSCLC 癌组织和癌旁组织中 miR-155 与 SOCS1 的表达。统计分析不同组间 miR-155 与 SOCS1 表达差异及其与临床病理特征之间的关系。Cox 比例风险模型分析影响 NSCLC 患者预后的危险因素。[结果] 癌组织与癌旁组织 miR-155 相对表达量分别为 3.13 ± 0.31 、 1.05 ± 0.22 , SOCS1 相对表达量分别为 1.26 ± 0.25 、 4.02 ± 0.33 。与癌旁组织相比, NSCLC 癌组织中 miR-155 表达明显较高, 而 SOCS1 表达明显较低 (P 均 < 0.05)。癌组织中 miR-155 及 SOCS1 表达与肿瘤分期有关 ($P < 0.05$), 而与性别、年龄、病理类型、肿瘤大小、组织学分级及淋巴结转移无关 (P 均 > 0.05)。96 例 NSCLC 患者随访 3~36 个月, 中位随访时间 23.2 个月, 高 miR-155 表达组患者 3 年 OS 明显低于低表达组 ($\chi^2 = 4.315$, $P = 0.034$), 低 SOCS1 表达组患者 3 年 OS 明显高于高表达组 ($\chi^2 = 3.924$, $P = 0.048$)。NSCLC 癌组织中高 miR-155 表达、低 SOCS1 表达、高肿瘤 TNM 分期是影响患者生存预后的独立危险因素。[结论] NSCLC 癌组织中 miR-155 表达升高, SOCS1 表达降低, 两者均与肿瘤分期有关, 有望成为 NSCLC 新的肿瘤标志物。

关键词: 非小细胞肺癌; miR-155; 细胞因子信号传导抑制因子 1

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0586-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B004

Expression of miR-155 and SOCS-1 in Non-small Cell Lung Cancer and Its Clinical Significance

XIAN Hai-bing, FENG Wei-neng, ZHANG Hua, LIANG Jian-miao

(The First People's Hospital of Foshan, Foshan 528000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and clinical significance of microRNA(miR)-155 and suppressor of cytokine signaling 1(SOCS1) in non-small-cell lung cancer(NSCLC) cancer tissues. [Methods] The expression of miR-155 and SOCS1 in 96 specimens of NSCLC tissues and pericancerous tissues were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The expressions of miR-155 and SOCS1 and their relationship with clinicopathological features were analyzed. The Cox proportional hazards model was used to analyze the risk factors related to the prognosis of patients with NSCLC. [Results] The relative expression of miR-155 was significantly higher in NSCLC tissues (3.13 ± 0.31 vs. 1.05 ± 0.22 , $P < 0.05$), while the expression of SOCS1 was significantly lower (1.26 ± 0.25 vs. 4.02 ± 0.33 , $P < 0.05$) than those in pericancerous tissues. The expression of miR-155 and SOCS1 in cancer tissues was correlated with tumor stage ($P < 0.05$), but not related to gender, age, pathological type, tumor size, histological grade and lymph node metastasis (P all > 0.05). Kaplan-Meier analysis showed that the 3-year overall survival (OS) of high miR-155 expression group was significantly lower than that of low miR-155 expression group ($\chi^2 = 4.315$, $P = 0.034$), while the 3-year OS of low SOCS1 expression group was significantly lower than that of high SOCS1 expression group ($\chi^2 = 3.924$, $P = 0.048$). High miR-155 expression, low SOCS1 expression in NSCLC cancer tissues and high tumor TNM stage were independent risk factors for poorer survival in NSCLC patients. [Conclusion] The expression of miR-155 is increased and the expression of SOCS1 is decreased in NSCLC tissues. Both of them are related to tumor stage and may be used as a new tumor marker of NSCLC.

Subject words: non-small cell lung cancer; miR-155; suppressor of cytokine signaling 1

通信作者: 冼海兵, 副主任医师, 本科; 佛山市第一人民医院头颈胸肿瘤内科, 广东省佛山市禅城区岭南大道北 81 号 (528000); E-mail: pinkcatsums@163.com

收稿日期: 2019-09-04; **修回日期:** 2019-10-11

微小 RNA (micro RNAs, miR) 是长度约 18~25 个核苷酸的非编码 RNA, 在细胞分化、细胞增殖和凋亡及细胞衰老等过程中发挥重要的调控作用^[1]。miR-155 基因位于 21q21.3, 参与多细胞生物中基因表达的转录后调节。研究表明肿瘤细胞中 miR-155 表达增加, 通过影响靶基因如 RhoA 等 mRNA 的稳定性, 影响下游细胞信号传导, 促进肿瘤细胞恶性进展^[2]。细胞因子信号传导抑制因子 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1), 该基因编码蛋白是 STAT 抑制剂 (SSI) 的成员之一, SSI 家族成员是细胞因子信号传导的细胞因子诱导的负调节因子。研究表明 SOCS1 在肿瘤细胞中表达明显降低, 导致对肝细胞生长因子诱导的 MET 信号抑制作用减弱, 促进肿瘤细胞增殖和迁移^[3]。肿瘤中 SOCS1 表达降低可能与转录后调控异常有关, 研究发现 miR-21、miR-155 能够通过结合并降低 SOCS1 信使 RNA 的稳定性, 发挥转录后调控的作用^[4]。本研究通过检测非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 癌组织中 miR-155、SOCS1 表达, 分析两者与临床病理特征之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2015 年 5 月至 2016 年 5 月于佛山市第一人民医院诊治并行肺癌根治术或姑息性切除的 96 例 NSCLC 患者的癌组织标本, 同时以距癌组织边缘 3cm 以上的癌旁组织作为对照。NSCLC 患者纳入标准: (1) 经术后病理学明确诊断为 NSCLC; (2) 患者既往未接受过放化疗、免疫治疗等其他抗肿瘤治疗; (3) 临床病理及随访资料完整; (4) 患者一般状况良好, KPS 评分 > 90 分。排除标准: (1) 合并有急慢性感染性疾病, 如肺炎、急性胃肠炎等; (2) 同时伴其他器官的恶性肿瘤; (3) 伴严重心肺肾等脏器功能不全; (4) 随访过程中失访病例。男性 59 例, 女性 37 例; 年龄 32~78 岁, 平均年龄 (58.3±8.1) 岁; 病理类型: 肺腺癌 64 例, 鳞癌 32 例; 肿瘤分期参考第八版美国癌症联合会 TNM 分期标准^[5]: I 期 35 例、II 期 34 例、III 期 27 例。组织学分化: 高分化 21 例, 中分化 36 例, 低分化 39 例; 伴淋巴结转移 33 例, 无淋巴

结转移 63 例。96 例患者术后均予以顺铂为基础的辅助化疗方案, 如紫杉醇/顺铂 (TP) 方案、培美曲塞/顺铂, 顺铂剂量 75mg/m², 21 天为一周期, 共 2~4 个周期。患者自确诊之日起开始随访, 每 3 个月随访 1 次, 随访截止日期至 2019 年 5 月, 随访内容包括生存情况及疾病进展情况等, 以门诊或电话方式随访, 随访截止至随访日期结束或患者死亡。本研究符合《赫尔辛基宣言》要求, 所有患者均签署知情同意书。

1.2 检测方法

qPCR 检测组织中 miR-155 和 SOCS1 表达。收集术中获取的癌组织及癌旁组织, 放置于冻存管内, 液氮速冻后, 转运至标本库置于 -80℃ 冰箱保存。取约 100mg 组织, 采用 Trizol 法提取组织中总 RNA, 溶于约 50μl DEPC 水中, Nodrop 鉴定 RNA 溶液的浓度及纯度。以总 RNA 为模板, 用反转录合成 cDNA。反应条件: 42℃ 40min, 70℃ 6min, 实验步骤严格按照反转录试剂盒说明书进行。

miR-155 引物上游序列: 5'-CGGCGGTTTAATGCTAATCGTGAT-3', 下游引物序列: 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3', 以 U6 为内参基因, 上游引物序列: 5'-CGGCGGTCGTGAAGCGTTCCAT-3', 下游引物序列: 3'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-5'; SOCS1 上游引物序列: 5'-GTAGGAGGTGCAGAGTTCAGG-3', 下游引物序列: 5'-GACCCCTTCTCACCTCTTGA-3', 以 GAPDH 为内参, 上游引物序列: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游引物序列: 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'。qPCR 总反应体系 20μl, 含模板 cDNA 2μl, TaqDNA-pol 0.1μl、上游和下游引物各 1μl、SYBR Green 1μl 及 10mmol/L dNTPs 0.4μl。反应条件为: 94℃ 5min, 94℃ 变性 15s, 62℃ 退火 60s, 70℃ 延伸 10s, 变性退火延伸共 40 个循环, 每个样本重复 3 次。miR-155、SOCS1 表达采用相对 Ct 值方法表示, 目的基因相对于内参基因的比值为 $2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{miR-155/SOCS1} - Ct_{U6/GAPDH}$ 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较应用两独立样本 *t* 检验, Pearson 线性相关分析 miR-155 和 SOCS1 表达的相关性。Kaplan-Meier 生存分析不同 miR-155、SOCS1 表达患者生存预后差异。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织与癌旁组织中 miR-155 与 SOCS1 表达

癌组织与癌旁组织 miR-155 相对表达量分别为 3.13 ± 0.31 、 1.05 ± 0.22 , SOCS1 相对表达量分别为 1.26 ± 0.25 、 4.02 ± 0.33 。癌组织 miR-155 相对表达量显著性高于癌旁组织 ($t=53.612$, $P<0.001$), 而癌组织 SOCS1 相对表达量显著性低于癌旁组织 ($t=65.319$, $P<0.001$) (Figure 1)。NSCLC 癌组织中 miR-155 相对表达量与 SOCS1 呈负相关 ($r=-0.602$, $P=0.001$)。

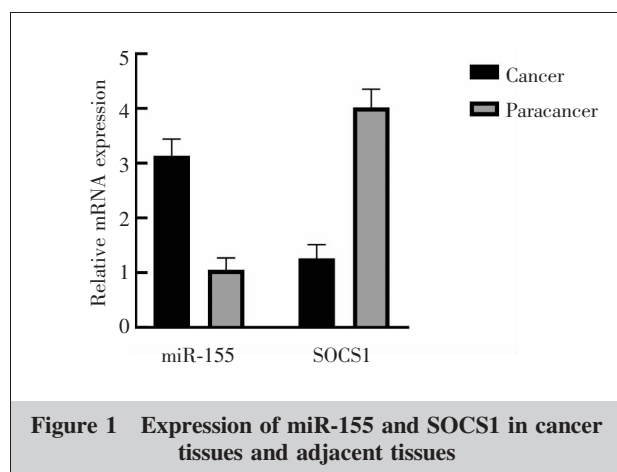


Table 1 Relationship between miR-155, SOCS1 expression and clinicopathological features

Parameter	N	miR-155			SOCS1		
		$\bar{x} \pm s$	t	P	$\bar{x} \pm s$	t	P
Age(years old)							
<60	44	3.12 ± 0.30	0.314	0.754	1.25 ± 0.24	0.398	0.692
≥ 60	52	3.14 ± 0.32			1.27 ± 0.25		
Gender							
Male	59	3.14 ± 0.31	0.467	0.641	1.27 ± 0.25	0.590	0.557
Female	37	3.11 ± 0.30			1.24 ± 0.23		
Pathological type							
Adenocarcinoma	64	3.14 ± 0.31	0.301	0.764	1.27 ± 0.26	0.373	0.710
Squamous cell carcinoma	32	3.12 ± 0.30			1.25 ± 0.22		
Differentiation							
High/medium	57	3.12 ± 0.32	0.624	0.534	1.27 ± 0.26	0.388	0.699
Low	39	3.16 ± 0.29			1.25 ± 0.23		
Tumor size							
$\leq 5\text{cm}$	58	3.10 ± 0.30	1.074	0.285	1.27 ± 0.27	0.556	0.580
$> 5\text{cm}$	38	3.17 ± 0.33			1.24 ± 0.24		
Lymph node metastasis							
Yes	33	3.18 ± 0.34	1.185	0.239	1.30 ± 0.28	1.125	0.263
No	63	3.10 ± 0.30			1.24 ± 0.23		
TNM grade							
I ~ II	69	3.04 ± 0.28	4.683	<0.001	1.29 ± 0.26	2.118	0.037
III	27	3.36 ± 0.35			1.17 ± 0.22		

2.2 癌组织中 miR-155 与 SOCS1 表达与临床病理特征之间的关系

癌组织中 miR-155、SOCS1 表达与肿瘤分期有关 (P 均 <0.05), 而与性别、年龄、病理类型、肿瘤大小、组织分级及淋巴结转移无关 (P 均 >0.05)。与肿瘤分期 I ~ II 期癌组织相比, 肿瘤分期 III 期癌组织中 miR-155 表达明显较高, 而 SOCS1 表达明显较低 (P 均 <0.05) (Table 1)。

2.3 miR-155 与 SOCS1 表达与 NSCLC 预后的关系

96 例 NSCLC 患者随访 3~36 个月, 中位随访时间 23.2 个月。截止至随访结束, 共死亡 51 例, 3 年总体生存率 (OS) 为 46.9% (45/96)。

以 miR-155 相对表达量平均数 3.13 为临界值, 分为高 miR-155 表达组 49 例, 低表达组 47 例, 3 年 OS 分别为 32.7% (16/49)、61.7% (29/47); Kaplan-Meier 分析结果显示高 miR-155 表达组患者 3 年 OS 明显低于低表达组 ($\chi^2=4.315$, $P=0.034$)。

以 SOCS1 相对表达量平均数 1.26 为临界值, 分为高 SOCS1 表达组 48 例, 低 SOCS1 表达组 48 例, 3 年 OS 分别为 58.3% (28/48)、35.4% (17/48); Kaplan-Meier 分析结果显示低 SOCS1 表达组患者 3 年 OS 明显低于高表达组 ($\chi^2=3.924$, $P=0.048$) (Figure 2)。

2.4 Cox 比例风险模型分析影响 NSCLC 患者预后的危险因素

Cox 单因素分析结果表明, NSCLC 患者 3 年 OS 与癌组织中 miR-155、SOCS1 表达、肿瘤分期有关。多因素 Cox 比例风险模型分析结果表明, NSCLC 癌组织中高 miR-155 表达、低 SOCS1 表达、高肿瘤 TNM 分期是影响患者 3 年 OS 的独立危险因素 (Table 2)。

3 讨论

许多研究表明大多数人类基因组转录本被转录成非编码 RNA, 包括短的非

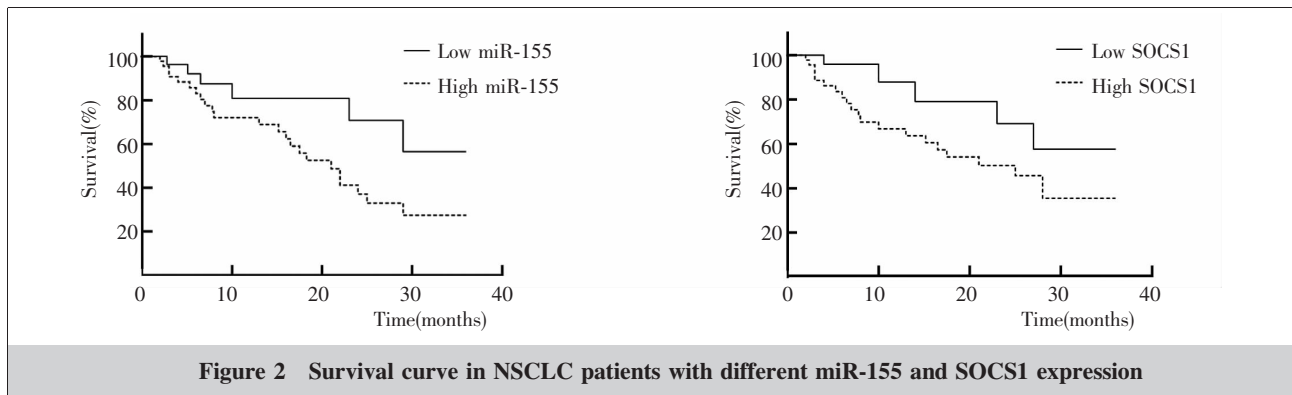


Table 2 Cox proportional hazards model for prognostic factors in patients with NSCLC

Parameter	Univariate analysis		Multi-factor analysis	
	OR	95%CI	OR	95%CI
Gender	1.43	0.92~2.17	—	—
Age	0.94	0.65~1.57	—	—
TNM grade	0.51	0.22~1.01	0.42	0.19~0.91
miR-155 expression	0.64	0.27~0.95	0.46	0.26~0.78
SOCS1 expression	0.39	0.23~0.71	0.37	0.21~0.67
Differentiation	0.67	0.44~1.01	—	—
Lymph node metastasis	1.08	0.67~1.71	—	—

编码 RNA 和长的非编码 RNA, 通过调控细胞信号传导及靶基因的表达, 影响细胞增殖、凋亡及迁移等生物学行为, 在个体发育、分化及疾病的发生进展中发挥重要的调控作用^[6]。

微小 RNA (miRNA) 作为小的非编码 RNA 分子, 参与真核细胞中基因表达的转录后调控。miRNA 可以与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区特异性结合, 降低 mRNA 稳定性, 导致靶基因 mRNA 降解。miRNA 在很多不同类型的恶性肿瘤如乳腺癌、前列腺癌等肿瘤均存在异常表达的现象, 参与肿瘤的发生发展的调控, 有助于肿瘤的早期诊断、治疗选择及预后判断^[7]。研究表明肿瘤细胞中 miR-155 表达上调, 并通过抑制下游 CD44、CD90 等基因的表达, 促进肿瘤的恶性进展^[8]。本研究中 NSCLC 癌组织中 miR-155 相对表达量明显高于癌旁组织, 表明癌组织中 miR-155 表达上调, 可能是肿瘤微环境中的肿瘤细胞分泌或旁分泌细胞因子如白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、IL-3 等表达增加, 通过结合肿瘤细胞表面相应的细胞因子, 促进 miR-155 表达, 进而发挥促进肿瘤细胞增殖等效应^[9]。本研究中 NSCLC 癌组织中 miR-155 表达与肿瘤分期有关, 肿瘤分期Ⅲ期癌组织中 miR-155 表达水平明显高于Ⅰ~Ⅱ期, 表明癌

组织中 miR-155 表达可能参与促进 NSCLC 的发生发展。研究表明 miR-155 高水平表达能够通过 Janus 激活的激酶 (Janus activated kinase, JAK) 途径导致信号转导和转录激活因子 3 (signal transduction and activator of transcription 3, STAT3) 的组成型激活, 促进下游癌基因的表达, 促进肿瘤细胞的恶性增殖和局部浸润等生物学行为^[10]。本研究中进一步分析不同 miR-155 表达水平患者 3 年总体生存率, 高表达组 3 年总体生存率明显低于低表达组患者, 表明高表达 miR-155 提示 NSCLC 患者不良生存预后; Cox 比例风险模型分析结果进一步表明, 高表达 miR-155 是 NSCLC 患者预后的独立危险因素。因此, miR-155 有可能成为判断 NSCLC 患者预后的肿瘤标志物。

SOCS1 是 JAK/STAT 信号的负调控因子, SOCS1 含有 SH2 结构域, 能够结合 JAK 磷酸化酪氨酸残基, 阻断 JAK 下游信号^[11]。此外, SOCS1 激酶抑制区位于 SH2 结构域的上游, 与 JAK 直接结合并抑制 JAK 酪氨酸激酶的催化活性。研究表明, SOCS1 在肝癌、胃癌等多种肿瘤中均发现其表达下调的现象, 通过影响 p21 等癌基因的表达, 促进肿瘤的恶性进展^[12]。本研究中, NSCLC 癌组织中 SOCS1 的表达明显低于癌旁组织, 其原因与 SOCS1 基因启动子区高甲基化导致基因转录受到抑制有关^[13]。本研究中, NSCLC 癌组织中 SOCS1 表达与肿瘤分期有关, 肿瘤分期Ⅲ期癌组织中 SOCS1 表达水平显著性较低, 表明 SOCS1 亦参与促进 NSCLC 发生发展。SOCS1 促进 p53 蛋白第 15 位丝氨酸磷酸化, 促进其与 DNA 损伤调节的激酶形成复合物, 激活 p53 依赖的下游基因, 参与 DNA 损伤修复和凋亡调节。SOCS1 表达

水平降低后,导致 p53 抑癌功能丧失,促进肿瘤的无限增殖和恶性进展,导致肿瘤分期增高^[14]。本研究中东低 SOCS1 表达组患者 3 年总体生存率明显低于高表达组患者,并且低表达 SOCS1 是 NSCLC 患者预后的独立危险因素,可见低表达 SOCS1 与患者不良生存预后有关。癌组织中 miR-155 与 SOCS1 的表达呈负相关,其机制尚不清楚,可能与 SOCS1 是 miR-155 作用的靶基因有关。研究表明 miR-155 能够结合于 SOCS1 mRNA 的 3' 非编码区,通过降低 SOCS1 mRNA 稳定性,抑制 SOCS1 表达,而对 SOCS1 中 3' 非编码区中的相应结合位点进行点突变,miR-155 对 SOCS1 表达抑制作用减弱,进一步证实 miR-155 对 SOCS1 表达的调控作用^[15]。但亦有研究报道,SOCS1 表达上调后可能对 miR-155 的表达具有抑制作用,促进免疫抑制性细胞因子如 IL-10 等的表达,进而发挥免疫抑制的作用^[16],但两者在 NSCLC 中的相互作用机制有待深入研究。

综上所述,NSCLC 癌组织中 miR-155 表达升高,而 SOCS1 表达降低,两者与 NSCLC 肿瘤分期及预后有关,参与 NSCLC 发生发展,有可能成为 NSCLC 的新的肿瘤标志物。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Al-Haidari AA, Syk I, Thorlacius H. MiR-155-5p positively regulates CCL17-induced colon cancer cell migration by targeting RhoA[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 14887–14896.
- [3] Villalobos-Hernandez A, Bobbala D, Kandhi R, et al. SOCS1 inhibits migration and invasion of prostate cancer cells, attenuates tumor growth and modulates the tumor stroma[J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2017, 20(1): 36–47.
- [4] Xue X, Liu Y, Wang Y, et al. MiR-21 and miR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 84508–84519.
- [5] Jang N, Choi JE, Kang SH, et al. Validation of the pathological prognostic staging system proposed in the revised eighth edition of the AJCC staging manual in different molecular subtypes of breast cancer [J]. *Virchows Arch*, 2019, 474(2): 193–200.
- [6] Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(6): 321–333.
- [7] Chan JJ, Tay Y. Noncoding RNA: RNA regulatory networks in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1310–1326.
- [8] Zuo J, Yu Y, Zhu M, et al. Inhibition of miR-155, a therapeutic target for breast cancer, prevented in cancer stem cell formation[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21(2): 383–392.
- [9] Cao H, Huang S, Liu A, et al. Up-regulated expression of miR-155 in human colonic cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(3): 604–607.
- [10] Persson JL. miR-155 meets the JAK/STAT pathway [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(14): 2170.
- [11] Khan MGM, Ghosh A, Variya B, et al. Hepatocyte growth control by SOCS1 and SOCS3[J]. *Cytokine*, 2019, 121: 154733.
- [12] Beaurivage C, Champagne A, Tobelaim WS, et al. SOCS1 in cancer: an oncogene and a tumor suppressor [J]. *Cytokine*, 2016, 82: 87–94.
- [13] Komazaki T, Nagai H, Emi M, et al. Hypermethylation-associated inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human pancreatic cancers[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2004, 34(4): 191–194.
- [14] Mallette FA, Calabrese V, Ilangumaran S, et al. SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence[J]. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2(7): 445–452.
- [15] Jiang S, Zhang HW, Lu MH, et al. MicroRNA-155 functions as an oncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(8): 3119–3127.
- [16] Chen C, Su X, Hu Z. Immune promotive effect of bioactive peptides may be mediated by regulating the expression of SOCS1/miR-155[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(3): 1850–1862.