miR-21 和 miR-15b 在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理特征和化疗疗效的关系

赵 琦[1]，朱鸿静[2*]，陈广业[2]
（1. 中国人民解放军白求恩国际和平医院心胸外科，石家庄 050082；2. 重庆市荣昌区人民医院病理科，重庆 402460）

摘要：目的 探讨 miR-21 和 miR-15b 在非小细胞肺癌（NSCLC）中的表达及其与临床病理特征和化疗疗效的关系。**方法** 纳入 2014 年 2 月至 2016 年 8 月在我院接受治疗的 83 例 NSCLC 患者为研究对象，同时选取 30 例健康志愿者作为对照组。所有患者均采用顺铂联合吉西他滨的化疗方案治疗。采集化疗前后受试者血浆，实时荧光定量 PCR 检测 miR-21 和 miR-15b 表达，并分析其与患者临床病理特征的关系。根据化疗疗效将患者分为疾病控制组和疾病进展组，分析 miR-21 和 miR-15b 与化疗疗效的关系。**结果** NSCLC 患者血浆 miR-21 表达高于对照组（$P < 0.05$），miR-15b 表达低于对照组（$P < 0.05$）。miR-21 在 TNM 分期高、有淋巴结转移及有吸烟史的患者中表达更高（$P < 0.05$）；miR-15b 在 TNM 分期高、腺癌及有淋巴结转移的患者中表达更低（$P < 0.05$）。疾病控制组患者 miR-21 降幅和 miR-15b 增幅均大于疾病进展组患者（$P < 0.05$）。相关性分析显示，miR-21 降幅和 miR-15b 增幅与化疗疗效呈正相关性（$r = 0.705$，$r = 0.673$，$P < 0.05$）。**结论** NSCLC 患者血浆 miR-21 高表达，miR-15b 低表达，且其与患者肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移和化疗疗效相关。

关键词： miR-21；miR-15b；非小细胞肺癌（NSCLC）；临床病理特征；化疗疗效
中图分类号： R734.2；R365 **文献标志码：** A **文章编号：** 1672-9188（2018）06-0398-05
DOI：10.13683/j.wph.2018.06.009

Expression of miR-21 and miR-15b in non-small cell lung cancer and its relationship with clinicopathological features and chemotherapy efficacy

ZHAO Qi[1], ZHU Hong-jing[2*], CHENG Guang-ye[2]
（*1. Department of Thoracic Surgery, Chinese People's Liberation Army Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082; 2. Department of Pathology, Chongqing Rongchang District People's Hospital, Chongqing 402460, China*）

Abstract: ***Objective*** To investigate the expression of miR-21 and miR-15b in non-small cell lung cancer（NSCLC） and its relationship with clinicopathological features and chemotherapy efficacy. ***Methods*** A total of 83 NSCLC patients in our hospital from February 2014 to August 2016 were selected as the research subjects, while 30 healthy volunteers were selected as the control group. All of the patients were treated with cisplatin and gemcitabine. The plasma levels of miR-21 and miR-15b were detected by real-time fluorescence quantitative PCR in patients before and after chemotherapy. The relationships between the expression of miR-21, miR-15b and the clinicopathological features were analyzed. All patients were assigned into disease control group and disease progression group, according to the chemotherapy efficacy. The relationships between miR-21, miR-15b and the chemotherapy efficiency were analyzed. ***Results*** The expression of miR-21 in NSCLC patients was higher than that of the control group（$P < 0.05$）, while the miR-15b was lower than that of the control group（$P < 0.05$）. The expression of miR-21 was higher in the patients with high TNM stage, lymph node metastasis, and smoking history（$P < 0.05$）. The expression of miR-15b was lower in the patients with high TNM stage, adenocarcinoma and lymphnode metastasis（$P < 0.05$）. The expression of miR-21 decreased significantly and the expression of miR-15b increased

收稿日期： 2018-03-05；**修回日期：** 2018-04-20
作者简介： 赵 琦，主治医师，研究方向：心胸外科。
通信作者： 朱鸿静，主治医师，研究方向：病理学检查与诊断。

significantly in the disease control group than those in the disease progression group ($P<0.05$). The miR-21 and miR-15b were positively correlated with the chemotherapy efficacy ($r=0.705$, $r=0.673$, $P<0.05$). ***Conclusion*** The miR-21 is highly expressed and the miR-15b is lowly expressed in NSCLC patients. The miR-21 and miR-15b are correlated with TNM stage, lymphnode metastasis and chemotherapy efficacy.

Key words: miR-21; miR-15b; non-small cell lung cancer (NSCLC); clinicopathological feature; chemotherapy efficacy

肺癌是临床上最为常见的恶性肿瘤之一，其发病率和死亡率已位居所有恶性肿瘤之首，对人类健康与生命构成了严重威胁。非小细胞肺癌（NSCLC）约占全部肺癌的 80% ～ 85%[1]，约 75% 以上的 NSCLC 患者发现时已处于晚期阶段，失去了最佳的治疗时机，预后极差，5 年生存率低至 15% 以下 [2]。实现 NSCLC 诊疗上的突破，深入研究其发病机制和寻求有效治疗靶点，已成为众多学者研究的热点。

微小 RNA（miRNA）是近几年来被大量研究的一类非编码单链小分子 RNA，具有广泛的基因调节功能，参与细胞的增殖、分化、凋亡等各个方面。有研究证实，miR-21 和 miR-15b 在多种恶性肿瘤中异常表达，且与化疗药物的敏感性相关 [3-4]。鉴于 miR-21 和 miR-15b 在肿瘤的发生、发展及在化疗耐药中的作用，本研究观察其在 NSCLC 中的表达及其与临床病理特征和化疗疗效的关系，从而为 NSCLC 的诊断和治疗提供一定参考。

1　资料与方法

1.1　病例选择

纳入 2014 年 2 月至 2016 年 8 月接受治疗的晚期 NSCLC 患者 83 例。其中男性 53 例，女性 30 例；年龄 44 ～ 75 岁，平均年龄（53.3±10.2）岁；按国际抗癌联盟 2009 年国际肺癌 TNM 分期标准：Ⅲb 期 51 例，Ⅳ期 32 例；按组织病理类型分类：腺癌 50 例，鳞癌 33 例。纳入标准：①均经影像学和肺穿刺病理活检确诊；②卡氏功能状态评分（KPS）≥ 60 分，可承受化疗治疗；③既往无放化疗史。排除标准：①心、肺、肝、肾等重要器官功能障碍者；②合并糖尿病、高血压等其他慢性疾病者；③合并其他恶性肿瘤者。所有患者或家属均签署知情同意书，并经本院医学伦理委员会批准。同时选取 30 例在我院体检的健康志愿者作为对照组。

1.2　药品、试剂和仪器

注射用顺铂，齐鲁制药有限公司生产，生产批号：37021358，4060241DD；规格：10 mg/ 瓶；注射用盐酸吉西他滨，商品名：泽菲，江苏豪森药业股份有限公司生产，生产批号：20140603；规格：1.0 g/ 瓶（以吉西他滨计）。

TRIzol（总 RNA 提取试剂盒），美国 Invitrogen 公司生产，生产批号：20141209；逆转录试剂盒，美国 ABI 应用生物系统公司生产，生产批号：20150217；Real-time PCR 试剂盒，日本 TaKaRa 公司，生产批号：20150819。

Nano Drop 2000C 核酸蛋白分析仪（美国 Thermo Scientific 公司）；ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 应用生物系统公司）。

1.3　化疗方法

NSCLC 患者（NSCLC 组）均采用顺铂联合吉西他滨的化疗方案。顺铂，一日 25 mg/m^2，静脉滴注，第 1 ～ 3 天；吉西他滨，1 000 mg/m^2，静脉滴注 30 min，第 1 天和第 8 天。一个化疗周期为 3 周，共化疗 2 个周期，疗程间休息 1 周。对照组不经任何治疗。

1.4　检测指标

实时荧光定量聚合酶联反应（RTQ-PCR）检测 miR-21 和 miR-15b 的表达。①标本采集：采集健康志愿者和患者化疗前后清晨空腹肘静脉血 10 ml，注入含 EDTA 钠的抗凝剂的采血管中，混匀，4 ℃下 3 000 r/min 离心 10 min，分离血浆，−80 ℃保存待检。② RNA 提取：采用 TRIzol（总 RNA 提取试剂

盒）提取血浆总 RNA，采用核酸蛋白分析仪进行 RNA 质量评估，若样品 A260/A280 比值为 2.0，则提示所提取 RNA 满足试验要求。③逆转录：采用经典的茎环结构设计特异性逆转录引物（上海吉玛制药技术有限公司设计合成）。miR-21 逆转录引物：5'-TCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCG CACTGGATACGACTCAACA-3'，miR-15b 逆转录引物：5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACG ACTGTAAA-'。按逆转录试剂盒操作逆转录成合成 cDNA。④ PCR 扩增：以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，引物委托上海吉玛制药技术有限公司设计合成。miR-21 上游：5'-GCCCGCTAG CTTATCAGACTGATG-3'，下游：5'-GTGCAGGGTC CGAGGT-3'；miR-15b 上游：5'-GCC GGCTAGCAGC ACATCATGG-3'，下游：5'-CGTC TTCAGAGACAG CCAGGAG-3'；U6 上游：5'-GCTT CGGCAGCACA TATACTAAAAT-3'，下游: 5'-CGCTTCACGAATTTGC GTGTCAT-3'。扩增条件：95 ℃ /15 s，58 ℃ /20 s，72 ℃ /15 s，共 40 个循环。计算目的基因相对含量（RQ），$RQ = 2^{-\triangle\triangle Ct}$。

1.5 疗效判定

参考世界卫生组织制定的实体瘤疗效评价标准（RECIST 1.1 版）：完全缓解（CR）：所有靶病灶全部消失；部分缓解（PR）：所有靶病灶的最大长径总和减少 30% 或以上；疾病稳定（SD）：所有靶病灶的最大长径总和减少小于 30% 或增大 20% 以下；疾病进展（PD）：所有靶病灶的最大长径总和增大 20% 或以上。客观缓解率（ORR）=（CR+PR）/ 总病例数，疾病控制率（DCR）=（CR+PR+SD）/ 总病例数。

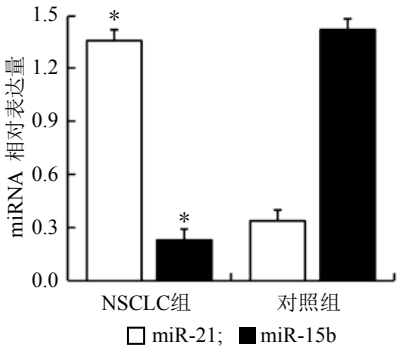
1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析，所有符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用 t 检验；计数资料以百分比表示，组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 和 miR-15b 在 NSCLC 中的表达

图 1 显示，NSCLC 患者血浆 miR-21 的表达量为（1.36±0.74），显著高于对照组（0.34±0.13），差异有统计学意义（$P < 0.05$）；NSCLC 患者血浆 miR-15b 的表达量为（0.23±0.09），显著低于对照组（1.42±0.71），差异有统计学意义（$P < 0.05$）。



与对照组相比，*$P < 0.05$

vs control group, *$P < 0.05$

图 1 血浆 miR-21 和 miR-15b 的表达

Figure 1 Expression of plasma miR-21 and miR-15b

2.2 miR-21 和 miR-15b 的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

表 1 显示，miR-21 在 TNM 分期高（Ⅳ期）、有淋巴结转移、有吸烟史的患者中表达高（$P < 0.05$）。miR-15b 在 TNM 分期高（Ⅳ期）、腺癌及有淋巴转移的患者中表达低（$P < 0.05$）。

2.3 miR-21 和 miR-15b 的表达与化疗疗效的关系

化疗后，CR 0 例（0.0%），PR18 例（21.7%），SD 27 例（32.5%），PD 38 例（45.8%）。ORR 为 21.7%(18/83)，DCR 为 54.2%(45/83)。根据化疗疗效将患者分为疾病控制组（$n = 45$）和疾病进展组（$n = 38$），比较化疗前后血浆 miR-21 和 miR-15b 的变化。

表 2 显示，化疗后，疾病控制组 miR-21 表达降幅显著大于疾病进展组［(64.3±9.7)% 对（40.3±8.9)%］；而 miR-15b 增幅显著大于疾病进展组［(283.1±94.7)% 对（195.2±68.3)%］，差异均有统

计学意义（$P < 0.05$）。以化疗后 miR-21 和 miR-15b 变化比例作为评价治疗疗效的指标，相关性分析显示，miR-21 降幅和 miR-15b 增幅与化疗疗效呈明显正相关性（$r = 0.705$，$r = 0.673$，$P < 0.05$）。

3　讨论

miRNA 的发现被视为表观遗传学调控领域的重大突破，自首个 miRNA 于 1993 年被发现以来，有关 miRNA 的研究备受青睐。近年研究显示，约有一半以上的 miRNA 基因定位于与肿瘤相关的染色体座位或其脆性位点上，提示 miRNA 与肿瘤的发生、发展密切相关 [5]。证据表明，肿瘤引起的 miRNA 表达改变，可稳定、特异地反应在血清或血浆中，这一

表 1　miR-21 和 miR-15b 的表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系（$\bar{x}\pm s$）

Table 1　Relationship between expression of miR-21 and miR-15b with pathologic features in patients with non-small cell lung cancer（$\bar{x}\pm s$）

临床病理特征	*n*/例	miR-21 表达量	*t* 值	*P* 值	miR-15b 表达量	*t* 值	*P* 值
性别							
男	53	1.30±0.63	0.615	＞0.05	0.22±0.09	0.934	＞0.05
女	30	1.39±0.66			0.24±0.10		
年龄							
≥60岁	46	1.42±0.77	1.013	＞0.05	0.22±0.09	1.436	＞0.05
＜60岁	37	1.26±0.62			0.25±0.10		
吸烟史							
有	50	1.64±0.84	2.568	＜0.05	0.21±0.08	1.591	＞0.05
无	33	1.20±0.63			0.24±0.09		
病理类型							
腺癌	50	1.47±0.79	1.062	＞0.05	0.17±0.06	6.207	＜0.05
鳞癌	33	1.29±0.70			0.30±0.11		
分化程度							
高分化	28	1.28±0.71	1.285	＞0.05	0.20±0.09	1.661	＞0.05
中低分化	55	1.51±0.80			0.24±0.11		
TNM分期							
Ⅲb期	51	1.09±0.61	3.484	＜0.05	0.33±0.15	8.573	＜0.05
Ⅳ期	32	1.73±0.92			0.14±0.04		
淋巴结转移							
有	47	1.69±0.86	3.269	＜0.05	0.12±0.05	8.097	＜0.05
无	36	1.12±0.68			0.37±0.18		

表 2　疾病控制组与疾病进展组患者化疗前后血浆 miR-21 和 miR-15b 变化（$\bar{x}\pm s$）

Table 2　changes of plasma miR-21 and miR-15b before and after chemotherapy in patients with disease control and disease progression group（$\bar{x}\pm s$）

组别	miR-21表达量		降幅/%	miR-15b表达量		增幅/%
	化疗前	化疗后		化疗前	化疗后	
疾病控制组（*n*=45）	1.25±0.68	0.47±0.18	64.3±9.7$^{\Delta}$	0.31±0.11	1.17±0.64	283.1±94.7$^{\Delta}$
疾病进展组（*n*=38）	1.51±0.80	0.89±0.25	40.3±8.9	0.18±0.05	0.54±0.23	195.2±68.3

与疾病进展组相比，$^{\Delta}P<0.05$

vs PD group，$^{\Delta}P<0.05$

特性使得 miRNA 可作为肿瘤诊断和预后判断的血液肿瘤标志物[6]。任丽等[7]发现，miR-21 在 NSCLC 顺铂耐药细胞株 A549 中的表达显著高于顺铂敏感细胞株，下调 miR-21 表达能明显增加耐药细胞株对顺铂的敏感性。以上研究提示，miRNA-21 可作为肺癌对铂类化疗药物敏感性的评价指标。Wang 等[8]研究发现，血清 miR-21 低表达的 NSCLC 患者，其 3 年存活率明显高于 miR-21 高表达患者，提示血清 miRNA-21 可作为判断患者存活期的独立预测因素。国内有关 miR-15b 与 NSCLC 的研究尚不多见。Hennessey 等[9]及 Bandi 等[10]研究均证实，miR-15b 在 NSCLC 患者中的表达显著降低，可作为判断 NSCLC 发病的血清肿瘤标志物。

本研究采用实时荧光定量 PCR 法检测 83 例 NSCLC 患者和 30 例健康志愿者血浆 miR-21 和 miR-15b 的表达。结果显示，NSCLC 患者血浆 miR-21 表达增加，miR-15b 表达降低，这与文献报道的基本一致。研究进一步分析了 miR-21 和 miR-15b 表达与临床病理特征的关系，结果显示，miR-21 和 miR-15b 的表达均与肿瘤 TNM 分期和淋巴转移有关，而与肿瘤分化程度无关。值得一提的是，有吸烟史的 NSCLC 患者，其血浆 miR-21 表达较无吸烟史患者高。

对于晚期 NSCLC 患者，临床上主要采用以铂类化合物为基础的联合化疗治疗。然而，肿瘤细胞对铂类化合物易耐药，多数患者一线化疗效果并不十分满意，须进行二线乃至三线化疗。因此，寻找评价化疗疗效的敏感标志物具有重要的临床应用价值，以便及时区分对化疗不敏感的患者，并及时调整化疗方案。本研究采用顺铂联合吉西他滨的两药化疗方案治疗，结果显示，ORR 仅 21.7%，DCR 也仅 54.2%。以化疗后 miR-21 和 miR-15b 变化比例作为评价治疗疗效的指标，结果显示，疾病控制组患者 miR-21 降幅和 miR-15b 增幅均大于疾病进展组患者。相关性分析显示，miR-21 降幅和 miR-15b 增幅与化疗疗效呈正相关。

本研究尚存在以下不足：样本量较少且来源单一，缺少大样本多中心的临床研究；随访时间较短，缺少患者生存分析。欲深入探究 miR-21 和 miR-15b 与 NSCLC 间的关系，尚需更多、更全面的研究。

4 结论

综上所述，NSCLC 患者血浆 miR-21 高表达，miR-15b 低表达，其与患者肿瘤 TNM 分期、淋巴转移和化疗疗效相关。miR-21 和 miR-15b 或可作为 NSCLC 诊断的新标志物和治疗的新靶点。

参考文献：

[1] 李艳, 郭其森. 晚期非小细胞肺癌维持治疗进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(10): 112-115.

[2] 许晶晶, 杨廷桐. microRNA在非小细胞肺癌血清中的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(4): 726-728.

[3] 陈劼. 血液中 microRNA-21 对肺癌诊断价值的 Meta 分析[J]. 重庆医学, 2015, 44(17): 2389-2391.

[4] An FM, Gong BD, Wang H. miR-15b and miR-16 regulate TNF mediated hepatocyte apoptosis via BCL2 in acute liver failure[J]. Apoptosis, 2012, 17(7): 702-716.

[5] 赵晓鸿, 赫捷. 微小 RNA 与肿瘤[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(7): 547-550.

[6] 谢丽, 钱晓萍, 刘宝瑞. 新的肿瘤标志物——循环微小RNA[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(9): 641-642.

[7] 任丽, 黄琛, 柳雅慧. 微小 RNA-21 转染对人肺癌细胞株顺铂耐药性的影响及机制探讨[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(18): 1454-1458.

[8] Wang ZX, Bian HB, Wang JR, *et al*. Prognostic significance of selzim miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer[J]. J Surg Oncol, 2011, 104(7): 847-851.

[9] Hennessey PT, Sanford T, Choudhary A. Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(2): E32307.

[10] Bandi N, Vassella E. miR-34a and miR-15a/16 are co-regulated in nonsmall cell lung cancer and control cell cycle progression in a synergistic and Rb-dependent[J]. Mol Cancer, 2011, 10(55). doi:10.1186/1476-4598-10-55.

（责任编辑：赵绪韬）