

鼻咽癌放疗患者血清 miR-196a 表达的临床意义

何 倩¹,王霜莲²,周高峰³,陈会琴³,冯雪萍²,龙学颖³

(1. 湖南省肿瘤医院 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院 头颈放疗科,湖南 长沙 410013;2. 中南大学湘雅医院医学科学研究中心,湖南 长沙 410008;3. 中南大学湘雅医院 放射科,湖南 长沙 410008)

摘 要: **目的** MicroRNAs(miRNAs)属于非编码蛋白基因,是一类负调控基因表达的小 RNA,血清中 miRNAs 具有重要临床意义。为探讨 miR-196a 在 NPC 中表达的临床意义,本研究分析血清 miR-196a 表达水平与 NPC 放疗反应的相关性。**方法** 收集选取中南大学湘雅医院 2010 年 6 月—2019 年 6 月接受调强放疗并有完整随访资料的 NPC 患者 138 例作为研究的实验组,同期选取来院健康检查的正常人 62 例作为对照组。对照组采集空腹静脉血,所有患者均于放疗前采集空腹静脉血,实时荧光定量 PCR (qPCR)检测血清 miR-196a 表达水平;分析血清 miR-196a 高表达与 NPC 患者临床分期及无病生存期(DFS)的相关性。以实体瘤变化和随访结果为评判标准,根据疗效将患者分为 A 组(放疗癌灶完全缓解)和 B 组(放疗癌灶部分缓解+放疗癌灶稳定进展);进而分析血清 miR-196a 表达水平与 NPC 疗效的关系。**结果** 138 例 NPC 患者 miR-196a 在血清中高表达 122 例(88.41%);其中 86 例临床分期Ⅲ、Ⅳ期 NPC 患者血清 miR-196a 高表达 81 例,16 例临床分期Ⅰ期 NPC 患者血清 miR-196a 高表达 14 例,36 例临床分期Ⅱ期 NPC 患者血清 miR-196a 高表达 27 例;各组 NPC 血清 miR-196a 表达与正常对照组比较,差异均具有统计学意义(P 均 <0.01)。按放疗效果分析,86 例 A 组患者,血清 miR-196a 高表达 71 例(82.56%);52 例 B 组患者,血清 miR-196a 高表达 51 例(98.08%),包括稳定进展 19 例(100.00%,19/19)和部分缓解 32 例(96.97%,32/33);A、B 两组血清 miR-196a 高表达比较,差异具有统计学意义($P<0.01$)。A 组患者中位 DFS(36 个月)明显高于 B 组患者中位 DFS(10 个月),差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 血清 miR-196a 高表达提示临床 NPC 放疗预后不佳,该基因有望成为 NPC 预后的血清生物标志物。

关 键 词:鼻咽癌;miR-196a;放疗;实时荧光定量 PCR;生物标志物
中图分类号:R739. 63

Clinical significance of miR-196a expression in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy

HE Qian¹, WANG Shuanglian², ZHOU Gaofeng³, CHEN Huiqin³, FENG Xueping², LONG Xueying³

(1. Department of Head and Neck Radiotherapy, Hunan Province Cancer Hospital, the Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China; 2. Institute of Medical Sciences, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Department of Radiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** MicroRNAs(miRNAs) belong to non-coding protein genes, which are a class of small RNAs that negatively regulate gene expression, and serral miRNAs have important clinical significance. To investigate the clinical significance of miR-196a level in nasopharyngeal carcinoma (NPC), this study analyzed the relationship between the level of serral miR-196a and the response to radiotherapy in NPC patients. **Methods** A total of 138 NPC patients with results of the follow-up after treated with intensity-modulated radiotherapy (IMRT) in Xiangya Hospital from June 2010 to June 2019 were chosen as the experimental group. Fasting venous blood samples of all patients were collected before radiotherapy. In addition, fasting venous blood samples of 62 normal adults who came to the hospital for health examination were collected as

基金项目:国家自然科学基金(81372905);湖南省卫生和计划生育委员会项目(C2017044);湖南省自然科学基金(2017JJ2384);研究生科研创新项目(2019zzts1038)。
第一作者简介:何 倩,女,硕士,副主任医师。
通信作者:王霜莲, Email:wangwwsl@163.com;冯雪萍, Email:fxp1029@aliyun.com;龙学颖, Email:280413177@qq.com

controls. And the expression level of serum miR-196a was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The correlation between the high expression of serum miR-196a and clinical staging related to disease-free survival (DFS) in NPC patients was analyzed. Based on the response evaluation criteria in solid tumors and follow-up results, the patients were divided into Group A (complete response, CR) and Group B (partial response, PR; stable progression, SP). The relationship between the levels of serum miR-196a and the efficacy of NPC radiotherapy was analyzed. **Results** MiR-196a was highly expressed in 122 sera of all the 138 NPC patients (88.41%). In sera of 86 patients in advanced clinical stage (Ⅲ、Ⅳ), miR-196a was highly expressed in 81 cases. In 16 patients of clinical stage I and 36 of clinical stage Ⅱ, miR-196a was highly expressed in 14 cases and 27 cases respectively. The level of miR-196a expression in serum of each NPC group was significantly higher than that in the normal group (all $P < 0.01$). According to the effect of radiotherapy, expression of serum miR-196a was high in 71 of 86 patients in Group A (82.56%), and 51 of 52 (98.08%) in Group B (PR; 96.97%, 32/33; SP; 100%, 19/19). The difference of serum miR-196a high expression between Group A and Group B was statistically significant ($P < 0.01$). The median DFS of Group A (36 months) was significantly higher than that of Group B (10 months) ($P < 0.01$). **Conclusions** The high expression of serum miR-196a hints a poor prognosis of NPC after radiotherapy. The miR-196a gene is expected to be a serum biomarker for the prognosis of NPC.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma; MiR-196a; Radiotherapy; Real-time fluorescence quantitative PCR; Biomarker

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)为我国常见的头颈部恶性肿瘤之一,具有明显区域聚集性,在中国南部地区发病率较高^[1]。我国NPC发病率和死亡率均高于全球平均水平^[2]。NPC早期症状不明显,且癌灶隐匿于鼻咽腔内,所以临床NPC早期诊断有一定难度^[3]。临床NPC最后确诊时,约70%~80%已发生颈部淋巴结转移甚至远处转移^[4]。放射治疗是临床NPC首选的治疗方法,放疗能有效控制NPC病变。随着调强放疗的推进,NPC疗效显著,但放疗后仍有30%出现远处转移和/或复发^[5]。另一方面,NPC放疗有较大的毒副反应。因此,放疗疗效是NPC研究的一个重要方向。

MicroRNAs(miRNAs)是一种短的(20~24 nt)单链小分子RNA,在多种肿瘤中表达异常,而患者液体活检的血清miRNAs是一种潜在的生物标志物^[6]。目前miRNAs在肿瘤诊治方面已取得了较大进展,血清miRNAs可以应用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)进行分析。在qPCR中,目标核酸的起始拷贝数越高,则荧光增加越快。本研究应用相对定量qPCR的比较CT法评估基因表达水平。

MicroRNA-196a(miR-196a)是由两个基因组位点HOXC(人类的Chr12,基因MIR196A2)和HOXB(人类的Chr17,基因MIR196A1)转录而来,分别位于HOX9的上游^[7]。MiR-196a与癌症发生发展密切相关,发挥一种致癌基因的作用。本研究旨在探讨miR-196a在NPC中表达的临床意义,分析人NPC血清miR-196a的表达差异以及与NPC放疗反应的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集中南大学湘雅医院2010年6月—2019年6月接受调强放疗(68.0~73.6Gy)NPC患者临床资料,分析随访结果选取138例NPC患者作为研究的实验组,包括男86例,女52例;年龄35~73岁,中位发病年龄为49岁。根据AJCC(第八版)NPC临床分期:I期16例,Ⅱ期36例,Ⅲ~Ⅳ期86例。138例均为非角化癌(未分化型)。另以来院健康体检结果均正常者62例作为对照组,男37例,女25例;年龄38~71岁,中位年龄47岁。本研究经患者及本院伦理委员会同意。

1.2 治疗方法及血液收集

本研究入选的NPC临床资料和随访结果齐全,138例均为单纯接受调强放疗(68.0~73.6 Gy/30~33次,2.1~2.3 Gy/次)的NPC患者。对照组62例采集空腹静脉血;实验组138例NPC患者均在放疗前采集空腹静脉血;采集后的静脉血首先置于4℃,静置2 h;然后低温离心机4℃低速离心10 min(2 000 g)取上清液;所有血清均离心取上清后保存于-80℃备用。

1.3 血清总RNA提取

首先分取400 μL血清,加600 μL的Trizol,混匀后再静置10 min;再加200 μL的氯仿,振荡15 s后静置15 min;低温离心机4℃下12 000转离心25 min后取上清;然后异丙醇与上清液以等体积轻

轻混匀,并室温静置 10 min,4℃ 下 12 000 转离心 15 min,弃上清留沉淀;加 1mL 无酶水配制的 75% 乙醇,轻轻混合再 4℃ 离心 5 min(7 000 转)弃上清留沉淀晾干,加入 25 μL 无酶水溶解沉淀;以无酶水作空白对照测 RNA 浓度。

1.4 总 RNA 逆转录

在冰上溶解提取的 RNA,用逆转录酶把提取的 RNA 逆转录成 cDNA:反应管分别加入 1 μg 小分子 RNA、Poly A Polymerase (2.5 U/μL) 1 μL、1 μL 的 RTase Mix、5 μL 的 5 × PAP/RT Buffer,用 dd H₂O (RNase/Dnase free) 补充至 25 μL,在 37℃ 作用 60 min,85℃ 下 5 min 灭活酶,即获得逆转录产物。

1.5 qPCR 分析血清 miR-196a 表达

实验在冰上进行:用双蒸水稀释 miR-196a 引物及随机下游引物稀释成 2μM (U6 的引物序列: CAAGGATGACACGCAAATTCG; hsa-miR-196a 的引物序列 TAGGTAGTTTCA TGTTGTTGGG),设置 U6 为内参基因,通用反向引物(Universal primer) QIA-GEN 试剂盒自带,引物试剂盒均由锐博公司提供;用双蒸水将上述逆转模板 cDNA 按 1:3 稀释。在 EP 管中混合下列试剂:10μL 的 2 × All-in-One qPCR Mix、2μL 的 All-in-OneTM miRNA qPCR Primer (2 μM)、2μL 的 Universal Adaptor PCR Primer (2 μM)、1:3 稀释模板 cDNA、0.4μL 的 50 × ROX Reference Dye,用 3.6μL 双蒸水补充至 20μL;短暂离心,加入 96 孔 qPCR 板内离心:按表 1 设置 qPCR 反应程序完成 miR-196a 的 qPCR 分析。

表 1 血清 miR-196aqPCR 反应程序设置				
循环数	程序	温度(℃)	时间	探测
1	预变性	95	10 min	无
40	变性	95	10 s	无
40	退火	60	30 s	无
40	延伸	72	30 s	有

1.6 统计学方法

基因表达量的计算,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,计算出 cut off 值。所有数据应用 SPSS 10.0 统计软件统计,以%表示所有计数资料,以 χ^2 检验分析数据;以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示计量资料以 t 检验分析数据,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NPC 患者血清 miR-196a 的表达

本研究应用相对定量 qPCR 的比较 CT 法评估

基因表达水平,以比较 CT 法评估 miR-196a 基因表达高低,直接从 qPCR 仪器获取相对定量数据。qPCR 显示 NPC 患者血清 miR-196a 以高表达为主,而正常血清 miR-196a 以低表达为主。当 cut off 值为 0.0813 时:138 例 NPC 患者血清 miR-196a 高表达 122 例(88.41%);而对照组 62 例血清中,仅 6 例 miR-196a 高表达(9.68%);两组 miR-196a 高表达相比较,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01);而两组的性别、年龄相比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.01)。

2.2 患者血清 miR-196a 高表达与 NPC 临床分期的关系

138 例 NPC 患者 miR-196a 在血清中高表达 122 例(88.41%);其中 86 例临床分期Ⅲ、Ⅳ期 NPC 患者血清 miR-196a 高表达 81 例,16 例临床分期Ⅰ期 NPC 患者血清 miR-196a 高表达 14 例,36 例临床分期Ⅱ期 NPC 患者血清 miR-196a 高表达 27 例;NPC 患者各组血清 miR-196a 表达与正常对照组比较,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。具体见表 2、3。

表 2 NPC 组各临床分期与对照组的血清 miR-196a 表达情况比较 (例)					
分组	血清 miR-196a 表达情况		合计	χ^2	P^*
	高表达	低表达			
NPC 组	122	16	138	115.086	< 0.01
Ⅰ期	14	2	16	40.398	< 0.01
Ⅱ期	27	9	36	43.513	< 0.01
Ⅲ、Ⅳ期	81	5	86	106.195	< 0.01
对照组	6	56	62		

注: * P 与对照组比较差异均具有统计学意义。

2.3 患者血清 miR-196a 高表达与 NPC 放疗效果的关系

采用如上述 qPCR 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法标准分析 NPC 血清 miR-196a 表达,当 cut off 值为 0.0813 时,高于该值为 miR-196a 高表达。本研究 qPCR 显示放疗后癌灶稳定进展的 NPC 患者(19 例)所有血清均高表达 miR-196a,因此我们按放疗效果进行了 miR-196a 的表达分析。临床上 NPC 放疗后癌灶完全缓解(A 组),提示放疗效果相对较好;NPC 放疗后癌灶稳定进展患者,临床提示其放疗效果相对较差(B 组);NPC 放疗后癌灶部分缓解患者,提示其疗效介于两者之间,但放疗后癌灶部分缓解可能有癌细胞残存,所以这些 NPC 归于 B 组。MRI 显示 A 组完全缓解 NPC 患者肿块对放疗敏感,患者放疗前后肿块变化显著(图 1a、b),而 B 组放疗稳定进展 NPC

患者 MRI 显示整块继续增大(图 1c、d);另一方面,血清样本 qPCR 的溶解曲线为一个单一的吸收峰(图 2a)且扩增曲线较好(图 2b),提示该基因血清中稳定易于检测;miR-196a 高表达提前进入指数扩增期、如箭头所指上升曲线居前(图 2b)。

根据 NPC 放疗效果分析血清 miR-196a 高表达结果:A 组完全缓解 NPC 的 86 例,71 例患者血清 miR-196a 高表达(71/86,82.56%);B 组 19 例稳定

进展 NPC 患者均为 miR-196a 高表达(19/19,100.00%),以及 B 组 33 例部分缓解 NPC 患者高表达 32 例(32/33,96.97%),B 组高表达共为 51 例(51/52,98.08%);两组相比差异具有统计学意义($\chi^2=7.614,P<0.01$)。完全缓解 NPC 患者中位 DFS(36 个月)明显高于放疗稳定进展 NPC 患者中位 DFS(10 个月)($P<0.01$)。

表 3 NPC 组各临床分期的血清 miR-196a 表达情况比较 [例(%)]

表达情况	临床分期			合计	χ^2	P
	I 期(n=16)	II 期(n=36)	III、IV 期(n=86)			
高表达	14 (87.50)	27 (75.00)	81 (94.19)	122	9.128	0.010
低表达	2 (12.50)	9 (25.00)	5 (5.81)	16		
合计	16	36	86	138		

注: χ^2 为 NPC 组各临床分期的血清 miR-196a 高表达比较, $P=0.010$ 为各期差异均具有统计学意义。

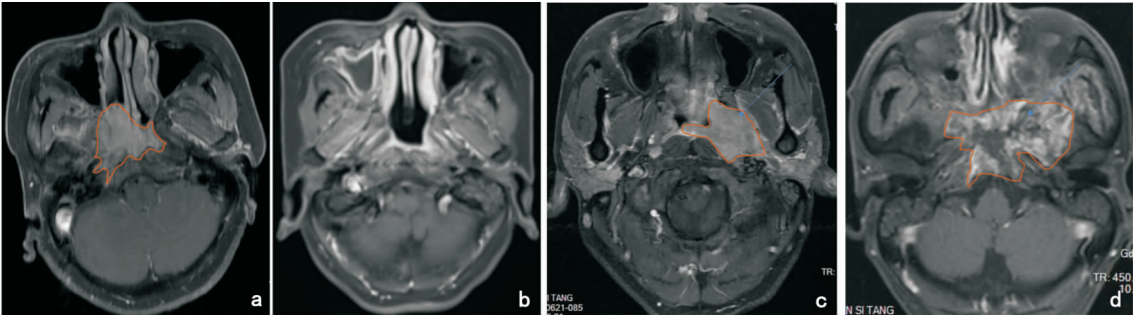


图 1 影像学 MRI 检测 NPC 患者放疗前后肿块变化,A 组患者放疗前 NPC(a)红色线圈内所示 NPC 肿块(IV),放疗 12 个月复查(b)NPC 肿块完全缓解;B 组患者放疗前 NPC(c)红色线圈内所示为 NPC 肿块,放疗 12 个月复查(d)红色线圈内 NPC 继续增大肿块

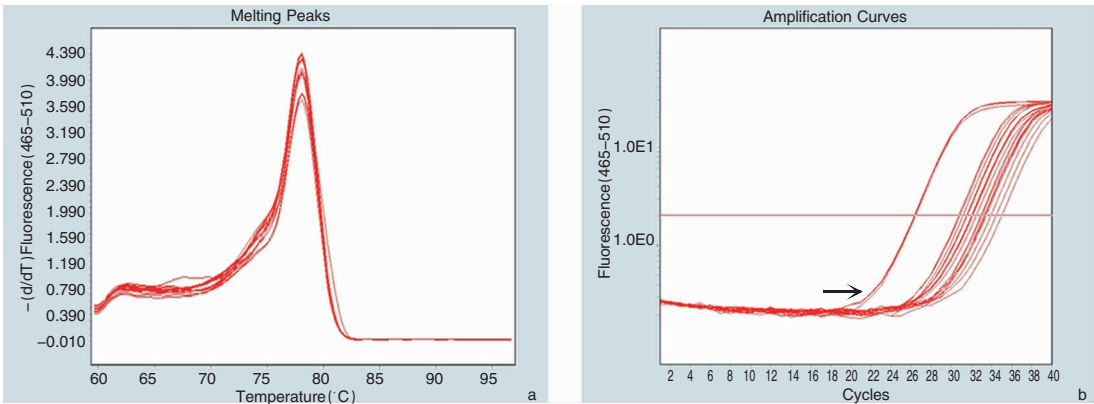


图 2 NPC 血清一组样本 qPCR 分析 miR-196a 表达的代表性结果 a:miR-196a 的溶解曲线,图为一个单一的吸收峰; b:miR-196a 的扩增曲线,该基因高表达曲线居前(箭头所示),该居前的曲线血清样本来源于放疗稳定进展 NPC 患者,其中一个样本为图 1c 患者放疗前血清,显示 miR-196a 高表达

3 讨论

非编码微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是内源性的 RNA 分子,具有抑癌基因或癌基因的双重作用,为 18~25 个核苷酸组成单链的 RNAs,在调控细胞增殖、分化和凋亡等方面发挥重要作用^[8]。非编码 miRNA 可以靶向特定的编码 mRNA 形成相对完整的互补结构,可导致靶向的 mRNA 被降解而负调控蛋白质翻译过程^[8-10]。不同种类的肿瘤具有不同的 miRNAs 表达谱,miRNAs 表达谱与肿瘤特性相关。检测 miRNAs 表达水平,可用于肿瘤疗效评估和预后判断,可作为肿瘤诊断的标志物^[8-10]。

有研究显示 miR-196a 在多种肿瘤中有癌基因的特性,在肿瘤发生发展中起重要作用。MiR-196 被报道在各种恶性肿瘤中异常表达,包括黑色素瘤^[9]和食管癌^[10]。研究者认为是消化道肿瘤的生物标志物^[11]。本研究显示 miR-196a 在正常人血清中低表达,而在 NPC 血清中高表达,与文献报道的结果一致。研究也表明低氧诱导的 miR-196 下调可促进肝癌发生及促进肝癌转移^[12];miR-196a 通过靶向 IκBα 促进转移的结直肠癌^[13]。我们进一步分析发现血清 miR-196a 高表达与 NPC 临床分期相关,晚期 NPC 患者血清 miR-196a 高表达(94.19%)。这些结果提示 miR-196a 在 NPC 中同样有癌基因特性,进一步验证 miR-196a 的恶性特征。

目前血清 miR-196a 表达是否能影响 NPC 放疗反应尚未见报道。Bao 等^[14]研究显示血清 miR-196a 为非小细胞肺癌的无创检测生物标志物。本研究分析显示 miR-196a 高表达与放疗效果有关,qPCR 显示放疗后癌灶稳定进展的 NPC 患者所有血清均高表达 miR-196a,而 MRI 显示放疗稳定进展 NPC 患者整块继续增大(从图 1c 放疗前,变成图 1d 放疗后);而血清 miR-196a 分析显示放疗稳定进展 NPC 患者该基因高表达(图 2b),因此提示 NPC 患者血清中 miR-196a 高表达,可能影响 NPC 放疗效果,放疗前血清 miR-196a 高表达是 NPC 患者放疗的不利因素,但血清 miR-196a 参与 NPC 放疗反应调控的机制尚不清楚,而且其调控的靶基因亦待深入研究。

在本研究中,我们对 NPC 血清中 miR-196a 表达进行了初步分析,初步结果提示 miR-196a 高表达可能是 NPC 无创检测的一个血清特征分子,放疗前 NPC 患者血清 miR-196a 高表达为 NPC 放疗不利因素,提示 NPC 血清中 miR-196a 高表达者可能预后不佳。

参考文献:

- [1] Wei F, Wu Y, Tang L, et al. BPIFB1 (LPLUNC1) inhibits migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma by interacting with VTN and VIM[J]. *B J Cancer*, 2018, 118(2):233-247.
- [2] Cao SM, Simons MJ, Qian CN. The prevalence and prevention of nasopharyngeal carcinoma in China[J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(2):114-119.
- [3] Wei F, Tang L, He Y, et al. BPIFB1 (LPLUNC1) inhibits radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by inhibiting VTN expression[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(4):432.
- [4] Gong ZJ, Yang Q, Zeng ZY, et al. An integrative transcriptomic analysis reveals p53 regulated miRNA, mRNA, and lncRNA networks in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(3):3683-3695.
- [5] Yang LT, Tang YY, He Y, et al. High expression of LINC01420 indicates an unfavorable prognosis and modulates cell migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Cancer*, 2017, 8(1):97-103.
- [6] Benoist GE, Oort IMV, Boerrigter E, et al. Prognostic value of novel liquid biomarkers in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer treated with enzalutamide: a prospective observational study[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(6):842-851.
- [7] Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA[J]. *Science*, 2004, 304(5670):594-596.
- [8] Lu YC, Chang JT, Liao CT, et al. OncomiR-196 promotes an invasive phenotype in oral cancer through the NME4-JNK-TIMP1-MMP signaling pathway[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13:218.
- [9] Mueller DW, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(5):1064-1074.
- [10] Haiat S, Watson DI, Leong MP, et al. MicroRNA-196a & microRNA-101 expression in Barrett's oesophagus in patients with medically and surgically treated gastro-oesophageal reflux[J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4:41.
- [11] L YC, Chang JT, Err-Cheng Chan, et al. miR-196, an emerging cancer biomarker for digestive tract cancers[J]. *J Cancer*, 2016, 7(6):650-655.
- [12] Zheng H, Bi FR, Yang Y, et al. Downregulation of miR-196-5p induced by hypoxia drives tumorigenesis and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Horm Cancer*, 2019, 10(4-6):177-189.
- [13] Xin H, Wang C, Liu Z. MiR-196a-5p promotes metastasis of colorectal cancer via targeting IκBα[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):30.
- [14] Bao M, Pan S, Yang W, et al. Serum miR-10a-5p and miR-196a-5p as non-invasive biomarkers in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Clin Expe Pathol*, 2018, 11(2):773-780.

(收稿日期:2020-06-30)

本文引用格式:何 倩,王霜莲,周高峰,等.鼻咽癌放疗患者血清 miR-196a 表达的临床意义[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2020,26(4):405-409. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202004012

Cite this article as:HE Qian, WANG Shuanglian, ZHOU Gaofeng, et al. Clinical significance of miR-196a expression in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2020, 26(4):405-409. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202004012