

## 论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.23.017

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20201111.1033.004.html\(2020-11-11\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20201111.1033.004.html(2020-11-11))miR-25-3p 和 PHLPP2 在肺腺癌中的  
表达及其与预后的相关性分析\*张卫强,赵京<sup>△</sup>,刘克强,裴迎新,谭健,马静波

(解放军总医院第七医学中心胸外科,北京 100700)

**[摘要]** **目的** 检测 miR-25-3p 与 PH 结构域和富含亮氨酸的重复蛋白磷酸酶 2 (PHLPP2) 在肺腺癌组织中的表达情况,探讨二者与肺腺癌临床病理参数及预后的相关性。**方法** 选择 2014 年 3 月至 2016 年 11 月在该院手术治疗的肺腺癌患者 90 例,采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测研究对象肺腺癌组织与癌旁组织中 miR-25-3p 和 PHLPP2 mRNA 表达水平,分析 miR-25-3p mRNA 和 PHLPP2 表达与肺腺癌患者预后的关系。**结果** miR-25-3p mRNA 在肺腺癌组织中表达水平高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ), PHLPP2 mRNA 在肺腺癌组织中表达水平低于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ); miR-25-3p mRNA 和 PHLPP2 表达水平与肺腺癌分化程度及淋巴结转移有关 ( $P < 0.05$ ); miR-25-3p mRNA 高表达组患者的 3 年累积生存率明显低于 miR-25-3p mRNA 低表达组, PHLPP2 高表达组患者的 3 年累积生存率明显高于 PHLPP2 低表达组 ( $P < 0.05$ )。Cox 回归模型分析显示,淋巴结转移、miR-25-3p mRNA 高表达、PHLPP2 低表达是影响肺腺癌患者预后的独立危险因素 ( $P < 0.05$ )。**结论** 在肺腺癌组织中 miR-25-3p mRNA 高表达、PHLPP2 低表达与患者生存情况有关,可能作为肺腺癌患者潜在的预后标志物。

**[关键词]** 肺肿瘤;腺癌;微 RNA-25-3p;PH 结构域和富含亮氨酸重复序列的蛋白磷酸酶;预后;危险因素

**[中图分类号]** R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)23-3936-05

## Expressions of miR-25-3p and PHLPP2 in lung adenocarcinoma and their relationships with prognosis\*

ZHANG Weiqiang, ZHAO Jing<sup>△</sup>, LIU Keqiang, PEI Yingxin, TAN Jian, MA Jingbo

(Department of Thoracic Surgery, the Seventh Medical Center of PLA

General Hospital, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective** To detect the expressions of miR-25-3p, PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase (PHLPP2) in lung adenocarcinoma, and to explore their correlations with clinical pathological parameters and prognosis of lung adenocarcinoma. **Methods** From March 2014 to November 2016, 90 patients with lung adenocarcinoma who were operated in this hospital were selected, and the expression levels of miR-25-3p and PHLPP2 mRNA in lung adenocarcinoma and paracancerous tissues were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The relationship between the expressions of miR-25-3p mRNA, PHLPP2 and the prognosis were analyzed. **Results** The expression level of miR-25-3p mRNA in lung adenocarcinoma was higher than that in paracancerous tissue ( $P < 0.05$ ), and the expression level of PHLPP2 in lung adenocarcinoma was lower than that in paracancerous tissue ( $P < 0.05$ ). The expression levels of miR-25-3p mRNA and PHLPP2 mRNA were related to the degree of lung adenocarcinoma differentiation and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The cumulative 3-year survival rate of patients in the miR-25-3p mRNA high expression group was significantly lower than that of patients in the miR-25-3p mRNA low expression group, and the cumulative 3-year survival rate of patients in the PHLPP2 high expression group was significantly higher than that of patients in the PHLPP2 low expression group ( $P < 0.05$ ). Cox regression analysis showed that lymph node metastasis, high expression of miR-25-3p mRNA and low expression of PHLPP2 were independent risk factors for prognosis in patients with lung adenocarcinoma ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** miR-25-3p mRNA is highly expressed and PHLPP2 is lowly expressed in lung adenocarcinoma, which is related to the survival

\* 基金项目:吴阶平医学基金项目(320.6750.14136)。 作者简介:张卫强(1971-),副主任医师,博士,主要从事肺癌的发病机制研究。

△ 通信作者, E-mail: congcong\_01@163.com。

of patients, and may be potential prognostic markers for lung adenocarcinoma.

**[Key words]** lung neoplasms; adenocarcinoma; microRNA-25-3p; PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase; prognosis; risk factors

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,依据其病理类型分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌,肺腺癌属于非小细胞肺癌,近年其发病率逐渐增高<sup>[1-2]</sup>。肺腺癌的发生由多种因素决定,其发病机制尚不清楚。miRNAs 是一类内源性的非编码 RNA,可以调控多种肿瘤细胞的迁移和侵袭。已有研究表明多种 miRNAs 在肺腺癌组织中表达<sup>[3]</sup>。有研究报道 miR-25-3p 通过下调人肺癌 A549 细胞中 CPEB4 基因的表达,进而抑制癌细胞的侵袭和迁移<sup>[4]</sup>。PH 结构域和富含亮氨酸的重复蛋白磷酸酶(PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase, PHLPP)能够使磷酸化的蛋白激酶(p-AKT)脱磷酸化,抑制多种肿瘤细胞的生长、增殖、存活和迁移,可以作为潜在的癌症诊断、预后评估和靶向治疗的生物标志物<sup>[5]</sup>。PHLPP2 是 PHLPP 的成员之一,研究发现 PHLPP2 在多种恶性肿瘤中表达,参与肿瘤的发生与发展<sup>[6]</sup>。目前 miR-25-3p 与 PHLPP2 在肺腺癌中的研究报道不多,本研究采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 miR-25-3p 与 PHLPP2 在肺腺癌患者肺腺癌组织中的表达情况,探讨其与肺腺癌临床病理参数及预后的相关性。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料**

选择 2014 年 3 月至 2016 年 11 月在本院手术治疗的肺腺癌患者 90 例为研究对象,其中男 49 例,女 41 例,年龄 35~75 岁,平均(56.40±15.20)岁。纳入标准:(1)术后经病理检测确诊为肺腺癌;(2)术前未经放、化疗等治疗;(3)患者知情同意并签署知情同意书。排除标准:(1)经过放、化疗等治疗;(2)临床资料不全。本研究经过医院伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂与仪器**

RNA 提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit 购自美国赛默飞世尔科技公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶试剂盒购自郑州博赛生物技术有限公司;miR-25-3p、PHLPP2 及内参基因 U6、GAPDH 由上海生工生物工程股份有限公司设计与合成。免疫组织化学试剂盒、PHLPP2 抗体、羊抗鼠二抗购自美国 Invitrogen 公司。

**1.3 方法**

**1.3.1 样品采集及保存**

所有标本均取自肿瘤中外 1/3 交界处,采集时注意避免肿瘤明显坏死或钙化部分,放入-80℃冰箱保存备用。癌旁组织作为对照。取得组织一部分用于提取 RNA,一部分做成石蜡切片,用于免疫组织化学染色。

**1.3.2 qRT-PCR 检测肺腺癌组织中 miR-25-3p 和 PHLPP2 mRNA 表达**

采用 RNA 提取试剂盒提取肺腺癌组织及癌旁组织中总 RNA,用紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)检测总 RNA 浓度及纯度,按照 TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit 说明书进行逆转录合成 cDNA。逆转录得到的 cDNA 置于-20℃保存备用。采用 qRT-PCR 检测 miR-25-3p 和 PHLPP2 的表达。miR-25-3p、PHLPP2 及内参基因序列设计引物见表 1。反应条件:95℃ 90 s,95℃ 10 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s,40 个循环。每个样品设置 3 个复孔。反应结束后,miR-25-3p 和 PHLPP2 表达水平采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 分析法进行计算。

表 1 引物序列

基因	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
miR-25-3p	GGAATGTTGCTCGGTGA	CAGTGCGTGTCGTGGA
PHLPP2	CCTTCCAACACTGGTAGAGCAC	CGGATGGTAAAGACTCCAGACTA
U6	CGCTTCGGCAGCACATA	TTCACGAATTTGCGTGTCAT
GAPDH	AAGGTGAAGTCCGGAGTCAAC	GGGGTCATTGATGGCAACAATA

**1.3.3 免疫组织化学染色**

使用免疫组织化学试剂盒进行染色。石蜡切片经过脱蜡、修复,加过氧化氢去除内源性过氧化物酶活性,加牛血清封闭,滴加 PHLPP2 抗体,于 4℃过夜,再加羊抗鼠二抗,最后染色,封片。显微镜下观察,采集图像。染色结果判断:细胞出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。未着色为 0 分,浅黄色为 1

分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞比例:<5%记 0 分,5%~25%记 1 分,>25%~50%记 2 分,>50%~75%记 3 分,>75%记 4 分;两种评分相乘,0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4~6 分为阳性(++),6 分以上为强阳性(+++)。其中阴性(-)、弱阳性(+)为低表达,阳性(++)、强阳性(+++)为高表达。

### 1.3.4 随访

出院后,对所有患者进行电话或门诊随访,随访时间 36 个月,每 3 个月 1 次,末次随访时间为 2019 年 12 月 31 日,随访期间死亡患者以死亡时间作为随访截止日期。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验;计数资料以例数和百分比表示,采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肺腺癌组织和癌旁组织 miR-25-3p 和 PHLPP2 mRNA 表达水平比较

在肺腺癌组织中 miR-25-3p mRNA 表达水平高于癌旁组织,PHLPP2 mRNA 表达水平低于癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 肺腺癌组织和癌旁组织 miR-25-3p 和 PHLPP2 mRNA 表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	miR-25-3p mRNA	PHLPP2 mRNA
肺腺癌组织	90	3.56 ± 0.58	0.89 ± 0.25
癌旁组织	90	1.23 ± 0.27	1.45 ± 0.38
<i>t</i>		34.551	11.680
<i>P</i>		<0.001	<0.001

### 2.2 肺腺癌组织与癌旁组织 PHLPP2 阳性表达比较

肺腺癌组织中 PHLPP2 阳性表达率明显低于癌旁组织( $P < 0.05$ ),见图 1、表 3。

表 3 肺腺癌组织及癌旁组织 PHLPP2 阳性表达情况

组别	<i>n</i>	- ( <i>n</i> )	+ ( <i>n</i> )	++ ( <i>n</i> )	+++ ( <i>n</i> )	阳性率 (%)	$\chi^2$	<i>P</i>
肺腺癌组织	90	22	25	32	11	47.78	9.179	0.002
癌旁组织	90	14	13	34	29	70.00		

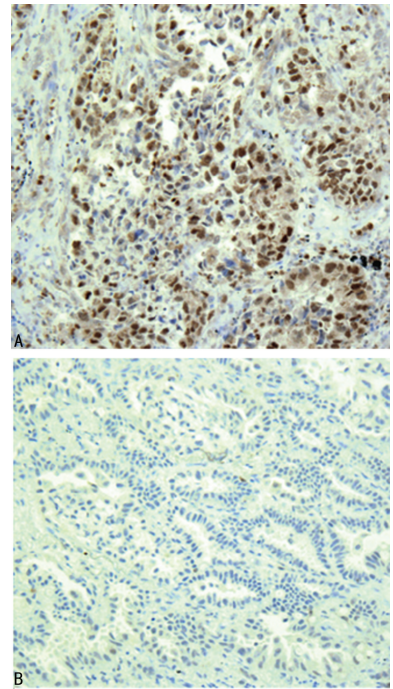
### 2.3 miR-25-3p mRNA 和 PHLPP2 表达水平与肺腺癌临床病理特征的关系

以肺腺癌组织中 miR-25-3p mRNA 表达的平均值将肺腺癌患者分为高表达组( $\geq 3.56$ )和低表达组( $< 3.56$ );以 PHLPP2 免疫组织化学染色结果,将肺腺癌患者分为 PHLPP2 高表达组和 PHLPP2 低表达组。分析发现 miR-25-3p mRNA、PHLPP2 表达与肿瘤分化程度和淋巴转移有关( $P < 0.05$ ),与性别、年龄、肿瘤直径、TNM 分期、是否辅助治疗无关( $P > 0.05$ ),见表 4。

### 2.4 肺腺癌组织中 miR-25-3p mRNA 和 PHLPP2 表达对患者生存率的影响

通过 Kaplan-Meier 生存分析可知,miR-25-3p mRNA 高表达组肺腺癌患者 3 年累积生存率明显低于低表达组(24.18% vs. 54.69%,  $P < 0.05$ )。PHLPP2 高表达组肺腺癌患者 3 年累积生存率明显

高于低表达组(53.82% vs. 18.54%,  $P < 0.05$ ),见图 2。



A: 肺腺癌组织; B: 癌旁组织。

图 1 PHLPP2 在肺腺癌组织与癌旁组织中的表达( $\times 200$ )

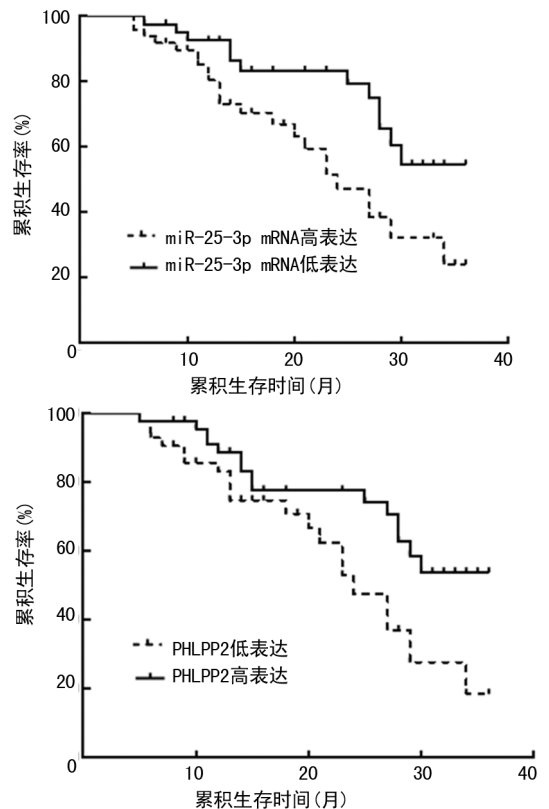


图 2 Kaplan-Meier 生存分析

### 2.5 预后影响因素分析

Cox 回归模型单因素分析结果显示,性别、年龄、肿瘤直径与肺腺癌患者预后无关( $P > 0.05$ );低分化、淋巴结转移、miR-25-3p mRNA 高表达、PHLPP2 低表达是影响肺腺癌患者预后的危险因素( $P < 0.05$ )。

多因素分析结果显示,淋巴结转移、miR-25-3p mRNA 的高表达、PHLPP2 低表达是影响肺腺癌患者预后的独立危险因素( $P < 0.05$ ),见表 5。

表 4 miR-25-3p mRNA 和 PHLPP2 表达水平与肺腺癌临床病理特征的关系[n(%)]

组别	n	miR-25-3p mRNA		$\chi^2$	P	PHLPP2		$\chi^2$	P
		高表达(n=49)	低表达(n=41)			高表达(n=43)	低表达(n=47)		
性别				0.019	0.891			3.781	0.052
男	49	27(55.10)	22(44.90)			28(57.14)	21(42.89)		
女	41	22(53.66)	19(46.34)			15(36.59)	26(63.41)		
年龄(岁)				0.018	0.894			0.621	0.431
<60	38	21(55.26)	17(44.74)			20(52.63)	18(47.37)		
≥60	52	28(53.85)	24(46.15)			23(44.23)	29(55.77)		
肿瘤直径(mm)				0.180	0.671			0.956	0.328
<33	57	32(56.14)	25(43.86)			25(43.86)	32(56.14)		
≥33	33	17(51.52)	16(48.48)			18(54.55)	15(45.45)		
肿瘤分化程度				11.995	0.002			11.232	0.004
低分化	45	32(71.11)	13(28.89)			29(64.44)	16(35.56)		
中分化	23	11(47.83)	12(52.17)			9(39.13)	14(60.87)		
高分化	22	6(27.27)	16(72.73)			5(22.73)	17(77.27)		
淋巴结转移				13.222	0.001			13.907	0.001
N0	35	11(31.43)	24(68.57)			9(25.71)	26(74.29)		
N1	40	26(65.00)	14(35.00)			22(55.00)	18(45.00)		
N2	15	12(80.00)	3(20.00)			12(80.00)	3(20.00)		
TNM 分期				0.427	0.514			2.112	0.146
I+II	79	42(53.16)	37(46.84)			40(50.63)	39(49.37)		
III+IV	11	7(63.64)	4(36.36)			3(27.27)	8(72.73)		
辅助治疗				0.019	0.891			2.089	0.148
是	41	22(53.66)	19(46.34)			23(56.10)	18(43.90)		
否	49	27(55.10)	22(44.90)			20(40.82)	29(59.18)		

表 5 影响肺腺癌患者预后的危险因素分析结果

项目	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
性别(男 vs. 女)	1.324	0.454~3.864	0.378	1.298	0.485~3.476	0.352
年龄(<60 vs. ≥60)	0.648	0.268~1.568	0.218	1.328	0.356~4.954	0.236
肿瘤直径(<33 mm vs. ≥33 mm)	1.210	0.456~3.214	0.256	1.010	0.269~3.793	0.251
分化程度(高、中 vs. 低)	2.267	1.213~4.236	0.021	2.666	1.584~4.487	0.135
淋巴结转移(无 vs. 有)	1.985	1.012~3.893	0.001	1.903	1.113~3.254	0.004
miR-25-3p mRNA(高表达 vs. 低表达)	2.653	1.345~5.236	0.006	2.417	1.542~3.789	0.007
PHLPP2(高表达 vs. 低表达)	2.304	1.210~4.389	0.002	2.350	1.245~4.436	0.001

### 3 讨 论

在我国肺癌的发生率及病死率居高不下,严重威胁人们的生命健康,肺腺癌是肺癌的主要病理类型<sup>[7]</sup>。虽然由于医疗水平及诊断方法的改变,使得肺腺癌的诊断率提高,但是,对于肺腺癌的发病机制尚不清楚。因此研究肺腺癌的发病机制,寻找新的治疗药物及靶点具有重要临床意义。

miRNA 是一类由内源基因编码的长度 22~25 个核苷酸组成的单链非编码小分子 RNA,可调节基

因的表达及多种细胞信号通路,其表达失衡与多种肿瘤的发生密切相关。有研究表明,miRNA 在肺腺癌组织中低表达,且与患者不良预后有关<sup>[3]</sup>。赵铎等<sup>[8]</sup>研究表明 miRNA-181a 能够抑制肺腺癌细胞活力和细胞侵袭能力,可能参与肺腺癌的发生、发展。房延凤等<sup>[9]</sup>研究表明 miRNA-182 表达水平与肺腺癌的 TNM 分期、淋巴结转移、远处转移及肿瘤分化相关。以上表明,多种 miRNA 与肺腺癌发生、发展密切相关,可能作为多种疾病早期诊断、治疗靶点或预后监



测的指标。miR-25-3p 是其中一种 miRNA,在多种肿瘤组织或细胞中上调或下调表达,参与多种肿瘤发生、发展。薛亚军等<sup>[10]</sup>通过细胞学方法研究发现,miR-25-3p 可通过靶向调节 NOTCH1 促进人食管鳞癌细胞的侵袭、迁移和增殖。NING 等<sup>[11]</sup>研究表明,miR-25-3p 能够抑制胃癌细胞的肿瘤发生与侵袭。张慧慧等<sup>[4]</sup>研究表明,miR-25-3p 可通过下调人肺癌 A549 细胞中 CPEB4 基因的表达,进而抑制癌细胞的侵袭和迁移。本研究结果显示,miR-25-3p mRNA 在肺腺癌组织中高表达,提示 miR-25-3p 在肺腺癌的发生过程中可能发挥促进作用。进一步分析结果显示,miR-25-3p mRNA 表达水平与肺腺癌分化程度、淋巴结转移及患者 3 年累积生存率有关,提示 miR-25-3p 可能参与肺腺癌进展过程,与肺腺癌患者生存情况有关,提示 miR-25-3p 可能作为评估肺腺癌患者不良预后的生物标志物。

PHLPP 是一种新型蛋白磷酸酶家族,在多种人类肿瘤中表达水平显著降低,可增强细胞运动性,与癌症转移有关<sup>[12]</sup>。曾冰微等<sup>[13]</sup>研究表明 PHLPP 在子宫颈鳞状细胞癌中低表达,可能与肿瘤的发生、发展及转移密切相关,可作为判断子宫颈癌患者预后的参考指标。杨东杰<sup>[6]</sup>等研究表明 PHLPP2 在胃癌及淋巴结转移灶中呈低表达,PHLPP2 阴性与肿瘤远处转移及更差的预后相关。许晓阳等<sup>[14]</sup>研究表明,PHLPP2 在结直肠癌组织中表达较正常组织明显降低,PHLPP2 表达缺失与肿瘤的发生、发展及转移密切相关。本研究结果显示,PHLPP2 在肺腺癌组织中低表达,提示 PHLPP2 在肺腺癌的发展过程中可能发挥抑制作用。进一步分析结果显示,PHLPP2 表达水平与肺腺癌分化程度及淋巴结转移有关,且 PHLPP2 低表达组患者 3 年累积生存率显著低于 miR-25-3p mRNA 高表达组患者,提示 PHLPP2 可能与肿瘤分化及转移有关,进而影响患者生存情况。进一步研究发现,淋巴结转移、miR-25-3p mRNA 高表达及 PHLPP2 低表达是影响肺腺癌患者预后的独立危险因素,提示 miR-25-3p 和 PHLPP2 可能作为评估肺腺癌患者不良预后的生物标志物。

综上所述,在肺腺癌组织中 miR-25-3p mRNA 高表达、PHLPP2 低表达与患者生存情况有关,有望成为肺腺癌患者评估预后的分子标志物。但由于本研究临床样本数据少,其作用机制需要做进一步研究。

## 参考文献

[1] 赵丽,章淑芳,周杨,等. TGF- $\beta$ 2 表达水平与肺腺癌患者预后的关系[J]. 临床肺科杂志,2020,25(1):82-87.  
[2] 于正伦,张曙光,许顺. 148 例肺腺癌患者的预后

影响因素分析[J]. 中国医科大学学报,2019,48(11):1045-1048.

- [3] 许晶晶,刘峰,杨廷桐,等. 肺腺癌中 miRNA34a 和 c-myc 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(12):1374-1378.  
[4] 张慧慧,贾凡佰,王涛. miR-25-3p 调控 CPEB4 基因对人肺癌 A549 细胞侵袭和迁移的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2017,30(10):1033-1037.  
[5] XING Y,SUN W,WANG Y,et al. Mutual inhibition of insulin signaling and PHLPP-1 determines cardioprotective efficiency of Akt in aged heart[J]. *Aging*,2016,8(5):873-887.  
[6] 杨东杰,王志雄,徐建波,等. PHLPP2 在胃癌中的表达及其临床意义探讨[J/CD]. 消化肿瘤杂志(电子版),2018,10(4):191-195.  
[7] 中华医学会,中华医学会肿瘤学分会,中华医学会杂志社. 中华医学会肺癌临床诊疗指南(2018 版)[J]. 肿瘤研究与临床,2018,30(12):793-824.  
[8] 赵铎,金柱,宋亚亚,等. miRNA-181a 在人肺腺癌细胞中的表达及对细胞功能的影响[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(8):1395-1402.  
[9] 房延凤,张红军,金发光,等. MicroRNA-182 在人肺腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(26):66-69.  
[10] 薛亚军,杜雅彦,周奕君,等. MiR-25-3p 靶向 NOTCH1 对食管鳞癌细胞 ECA109 侵袭、迁移、增殖的影响[J]. 安徽医科大学学报,2020,55(1):75-80.  
[11] NING L,ZHANG M S,ZHU Q L,et al. miR-25-3p inhibition impairs tumorigenesis and invasion in gastric cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Bioengineered*,2020,11(1):81-90.  
[12] SMITH A J,WEN Y A,STEVENS P D,et al. PHLPP negatively regulates cell motility through inhibition of Akt activity and integrin expression in pancreatic cancer cells[J]. *Oncotarget*,2016,7(7):7801-7815.  
[13] 曾冰微,庄雪瑜. 子宫颈鳞状细胞癌中 PHLPP 表达与肿瘤转移的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,2018,34(1):95-97.  
[14] 许晓阳,吴淑华,孙晨博,等. 结直肠癌中 PHLPP2、PTEN 与 p-Akt1 表达的相关性及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2018,34(8):827-833.