

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.10.010

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210111.1335.004.html\(2021-01-12\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210111.1335.004.html(2021-01-12))非小细胞肺癌 miRNA-191 启动子区甲基化状态及其
临床病理特征的相关分析*徐 谊,徐 祥,王守峰,杨日荣,茅乃权,潘 泓[△]
(广西医科大学附属肿瘤医院胸瘤外科,南宁 530021)

[摘要] **目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)微小 RNA(miRNA)-191 启动子区甲基化状态及其在 NSCLC 发生、发展中的意义。**方法** 甲基化特异性 PCR(MSP)检测 105 份 NSCLC 患者术后肿瘤组织及其对应癌旁组织中的 miRNA-191 启动子甲基化水平,并分析 miRNA-191 启动子区甲基化状态与对应患者临床病理特征间的关系。**结果** 105 份 NSCLC 肿瘤标本中有 48 份发生甲基化,甲基化率为 45.71%,对应的癌旁组织中有 87 份发生甲基化,甲基化率为 82.86%,二者比较差异有统计学意义($\chi^2=37.87, P<0.01$)。miRNA-191 启动子区甲基化组与非甲基化组在 TNM 分期、肿瘤组织分化程度方面比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.27, 6.75, P=0.04, 0.01$),非甲基化组的 TNM 分期更晚、组织分化程度更低;而性别、年龄、组织类型方面比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.01, 0.89, 1.80, P=0.91, 0.35, 0.25$)。生存分析结果显示,与 NSCLC 患者甲基化组比较,NSCLC 患者非甲基化组的总生存期更短($\chi^2=6.06, P=0.01$)。**结论** NSCLC 肿瘤组织 miRNA-191 的甲基化率明显低于癌旁组织,NSCLC 的发生、发展过程可能与 miRNA-191 启动子区的异常甲基化密切相关。

[关键词] 癌,非小细胞肺癌;微 RNA-191;甲基化;预后**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)10-1667-05Analysis of relationship between methylation status of miRNA-191 promoter region
and its clinicopathological characteristics in non-small cell lung cancer*XU Yi, XU Xiang, WANG Shoufeng, YANG Rirong, MAO Naiquan, PAN Hong[△](Department of Thoracic Tumor Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical
University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the methylation status of miRNA-191 promoter region in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its significance in the occurrence and development of NSCLC. **Methods** The methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the methylation level of miRNA-191 promoter in postoperative tumor tissues and corresponding paracancerous tissues of 105 patients with NSCLC, and to analyze the relationship between the methylation status of miRNA-191 promoter region and the clinicopathological characteristics of the corresponding patients. **Results** Among 105 tumor specimens of NSCLC, 48 cases were methylated with a methylation rate of 45.71%, 87 cases of the corresponding paracancerous tissues were methylated with a methylation rate of 82.86%, and the difference between the two groups was statistically significant ($\chi^2=37.87, P<0.01$). There were statistically significant differences in the TNM staging and tumor tissue differentiation between the miRNA-191 promoter methylation and non-methylation groups ($\chi^2=4.27, 6.75, P=0.04, 0.01$). The TNM stage in the non-methylated group was later and the degree of tissue differentiation was lower. There was no statistically significant difference in the gender, age and tissue type ($\chi^2=0.01, 0.89, 1.80, P=0.91, 0.35, 0.25$). The survival analysis results showed that compared with the methylated group of NSCLC patients, the overall survival period of the non-methylated group of NSCLC patients was shorter ($\chi^2=6.06, P=0.01$). **Conclusion** The methylation rate of miRNA-191 in NSCLC tumor tissues is significantly lower than that in paracancerous tissues, and the occurrence and development process of NSCLC may be closely related to the abnormal methylation in the promoter region of miRNA-191.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung cancer; microRNA-191; methylation; prognosis* 基金项目:国家自然科学基金项目(81402306,81360312);广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281211)。 作者简介:徐谊(1991-), 医师,硕士,主要从事肺癌的诊治研究。 [△] 通信作者, E-mail:pan_hong1999@aliyun.com。

微小 RNA(miRNA)是长度约为 22 个核苷酸的非编码内源性小 RNA,在转录后水平与靶 mRNA 的 3'UTR(untranslated region)结合,是肿瘤基础研究领域的热门话题^[1]。miRNA-191 与肿瘤的关系也日益受到学者的重视,其定位于人类染色体 3p21.31,在多种肿瘤中存在不同程度的高表达,miRNA-191 作为一种潜在的疾病标志物和治疗靶点正日益受到关注^[2-3]。但是关于 miRNA-191 启动子区甲基化状态的研究还鲜有报道,本研究旨在探讨非小细胞肺癌(NSCLC)miRNA-191 启动子区甲基化状态及其与临床病理特征间的关系,为进一步证实 miRNA-191 在 NSCLC 发生、发展过程中的意义奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 2 月至 2016 年 11 月在本院手术切除的 NSCLC 肿瘤标本 105 份及对应距肿瘤组织边缘大于或等于 5 cm 的癌旁组织 105 份,所获标本均符合以下要求:(1)术后经组织病理学确诊为 NSCLC;(2)术前未行放疗、化疗及免疫治疗;(3)患者及家属均理解并签署知情同意书;(4)标本离体后即刻置于液氮中,迅速转移至 -80 °C 的冰箱中保存。病例的纳入标准:(1)患者的姓名、年龄、性别、组织类型、TNM 分期、组织分化程度、生存时间等个人资料及临床病理资料完整;(2)患者术后病理标本均经过病理学专家确诊为 NSCLC;(3)按照 WHO 国际组织学分类标准进行分期。本研究已通过广西医科大学附属肿瘤医院伦理委员会的审查批准。

1.2 方法

1.2.1 试验主要试剂

实验主要试剂 DNA 提取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司,EZ DNA Methylation-Direct™ Kit 购自美国 ZYMO RESEARCH 公司,Taq 酶、PCR buffer 等购自日本 TAKARA 公司。

1.2.2 组织 DNA 提取

先用液氮研磨肿瘤及癌旁肺组织,然后依据 Omega DNA 提取试剂盒说明书中的顺序提取 DNA,再用琼脂糖电泳检测 DNA 纯度,同时采用紫外分光光度计进行定量。

1.2.3 DNA 亚硫酸氢盐修饰及回收

DNA 的亚硫酸盐修饰按照 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit(ZYMO RESEARCH)的说明书,在 PCR 仪上进行,修饰条件:98 °C 8 min,64 °C 3.5 h,4 °C 储存 20 h。按照试剂盒的纯化试剂说明书对修饰完成后的 DNA 进行纯化,再放于 -20 °C 的冰箱保存备用。

1.2.4 miRNA-191 启动子查找及甲基化特异性 PCR(MSP)引物设计

运用 UCSC 数据库预测人 miRNA-191 启动子序列,提取启动子上游 2 kb 区域。MethPrimer 在线分析网站用于分析和预测 miRNA-191 启动子的甲基化 CpG 岛,并设计引物,由广西南宁澳利可生物科技有限公司合成特异性甲基化引物和非甲基化引物。

1.2.5 MSP

(1)MSP 巢式 PCR 第一步引物及循环条件。上游引物:5'-ATT TTT TTT AGG GTT TTA GAG ATG G-3',下游引物:5'-CCA CCT CCC CTT CTA TTA TTC T-3',目的条带为 221 bp。94 °C 预变性 1 min,94 °C 变性 5 s,63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,5 个循环;94 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,5 个循环;94 °C 变性 5 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,20 个循环。(2)巢式 PCR 第二步引物及循环条件。甲基化上游引物:5'-TAT TTG GGT TAG GGC GTT GTT TAG G-3',甲基化下游引物:5'-CAA CTA TTA TCT CCA AAA CAT TCC A-3',目的条带为 82 bp;非甲基化上游引物:5'-TAT TTG GGT TAG GGT GTT GTT TAG G-3',非甲基化下游引物:5'-CAA CTA TTA TCT CCA AAA CAT TCC A-3',目的条带为 82 bp。94 °C 预变性 1 min,94 °C 变性 5 s,63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,5 个循环;94 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,5 个循环;94 °C 变性 5 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,25 个循环。

1.2.6 PCR 产物电泳

在电泳槽中放入 2% 琼脂糖凝胶,并添加 TAE 缓冲液,直到液面比凝胶表面高 1~2 mm。将 PCR 产物加入凝胶样品孔,电压设为 100 V,电泳时间 20 min,于紫外线下观察具体的电泳情况。

1.2.7 结果判定

用甲基化引物和非甲基化引物扩增肺癌组织和癌旁组织,如果基因发生甲基化,则用甲基化引物扩增出的 DNA 产物将产生相应的甲基化目标条带;若基因未出现甲基化,则非甲基化引物扩增出相应的非甲基化目标条带。根据 miRNA-191 启动子区的甲基化状态将患者分为甲基化组和非甲基化组,采用 Kaplan-Meier 分析患者的预后。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析,计数资料以频数、百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Student's-test 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌患者的基线资料

105 例患者中,男 76 例,女 29 例;其中鳞癌 69 例,腺癌 36 例;低、未分化者 82 例,高、中分化者 23

例;TNM 分期中, I + II 期 89 例, III + IV 期 16 例。

2.2 筛选出合适的引物

运用 UCSC 数据库预测人 miRNA-191 启动子序列,提取启动子上游 2 kb 区域。MethPrimer 网站分

析和预测人 miRNA-191 启动子区的甲基化 CpG 岛(图 1),根据结果,共设计出 7 对甲基化特异性引物和非甲基化引物,同时筛选出合适的引物。

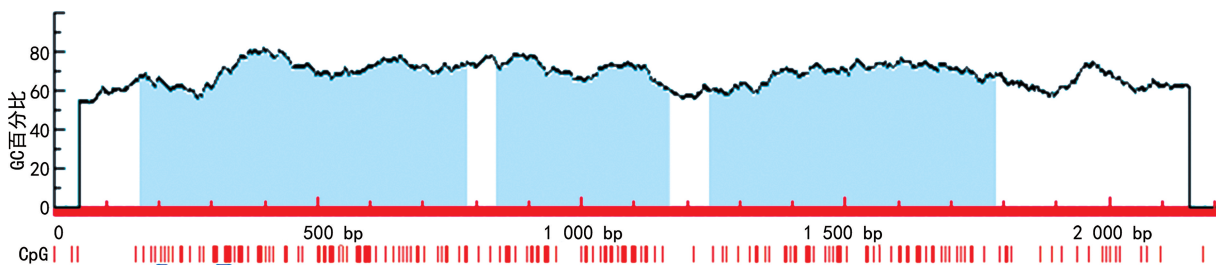


图 1 miRNA-191 启动子区 CpG 岛的预测及各 CpG 位点(阴影部分为 CpG 岛)

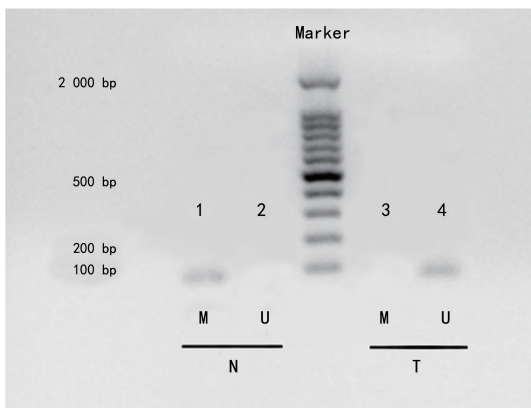
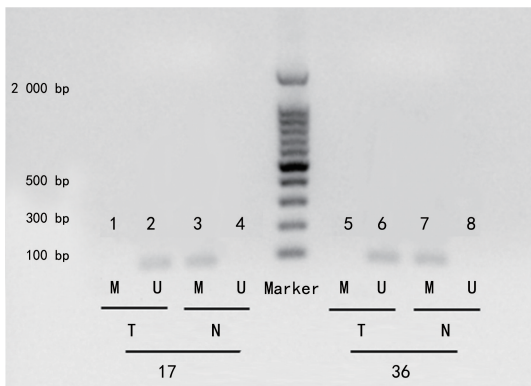
2.3 MSP 检测 miRNA-191 启动子区的甲基化水平

对癌旁组织及肺癌组织的 DNA 进行亚硫酸盐修饰后再行 PCR 扩展,结果显示,在 105 份癌旁组织标本中共有 87 份发生甲基化,甲基化率为 82.86%;在 105 份肿瘤组织中共有 48 份发生甲基化,甲基化率为 45.71%。癌旁组织与肺癌组织的 miRNA-191 启动子甲基化率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 37.87, P < 0.01$)。miRNA-191 启动子 MSP 电泳图,见图 2。

组织分化程度、组织类型、TNM 分期等临床病理特征间的相关性分析结果显示,肺癌组织 miRNA-191 启动子甲基化率与癌组织的细胞分化程度及 TNM 分期相关,非甲基化组比甲基化组的分化程度更低($\chi^2 = 6.75, P = 0.01$),且非甲基化组 NSCLC 患者 TNM 分期更晚($\chi^2 = 4.27, P = 0.04$)。但 miRNA-191 启动子区的甲基化状态与患者的性别、年龄及肺癌组织学类型等无明显相关性($P > 0.05$),见表 1。

表 1 miRNA-191 启动子甲基化状态与临床病理特性的关系[n (%)]

临床特征	n	非甲基化组 (n=57)	甲基化组 (n=48)	χ^2	P
年龄(岁)				0.89	0.35
≤60	49	29(59.18)	20(40.82)		
>60	56	28(50.00)	28(50.00)		
性别				0.01	0.91
男	76	41(53.95)	35(46.05)		
女	29	16(55.17)	13(44.83)		
TNM 分期				4.27	0.04
I+II	85	42(49.41)	43(50.59)		
III+IV	20	15(75.00)	5(25.00)		
分化程度				6.75	0.01
高、中分化	23	7(30.43)	16(69.57)		
低、未分化	82	50(60.98)	32(39.02)		
组织学类型				1.80	0.25
腺癌	36	24(66.67)	12(33.33)		
鳞状细胞癌	69	33(47.83)	36(52.17)		



T:肺癌组织;N:癌旁肺组织;M:甲基化引物;U:非甲基化引物。

图 2 miRNA-191 启动子 MSP 电泳图

2.4 NSCLC 组织中 miRNA-191 启动子甲基化水平及其与临床病理特征间的相关性分析

对 NSCLC 患者甲基化组和非甲基化组的 miRNA-191 启动子甲基化水平与患者的年龄、性别、肿瘤

2.5 NSCLC 患者 miRNA-191 启动子甲基化状态和患者预后的相关性分析

Kaplan-Meier 分析结果显示,miRNA-191 启动子区甲基化组患者的总生存期明显高于非甲基化组患者($\chi^2 = 6.06, P = 0.01$),见图 3。

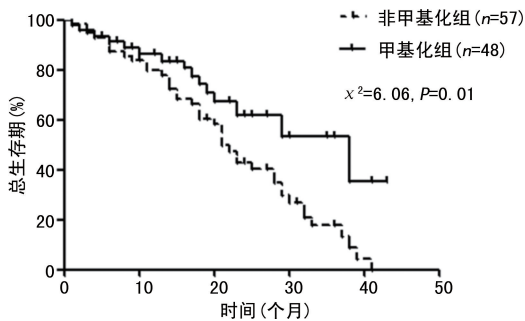


图3 NSCLC患者miRNA-191启动子甲基化状态与OS的Kaplan-Meier分析图

3 讨论

NSCLC约占所有肺癌类型的80%，且发病率和病死率逐年上升。有研究表明，表观遗传和细胞内遗传的异常改变是造成人类恶性肿瘤细胞产生的主要因素^[4]。表观遗传学的改变不仅发生在恶性肿瘤的早期阶段，还在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用，而DNA甲基化的研究是表观遗传学的重要内容^[5-6]。近年来，对miRNA的甲基化研究逐渐深入后发现，许多miRNA启动子区的异常甲基化状态是某些癌基因及抑癌基因的“调控开关”，启动子区的高度甲基化会使基因的表达降低，而去甲基化则可以使被沉默的基因恢复表达^[7-8]。对miRNA-191的研究是当今细胞生物学领域的热点，有研究指出，miRNA-191在肿瘤的增殖与迁移中起着重要的作用^[9-11]。随着研究的进一步深入，众多学者开始探索miRNA-191在癌症发生、发展中的机制，但其具体机制尚不清楚。XU等^[12]研究报道，miRNA-191的过表达能促进上皮间质转化(EMT)和癌症干细胞(CSC)增殖迁移，同时具有促进细胞间质化并抑制细胞分化的能力，并且可以诱导癌症的发生和促进癌症细胞的早期转移。LIU等^[13]研究报道，miRNA-191还可以诱导H1299和A549两个细胞系对放射产生抗拒作用。在肝癌的研究中也有报道，miRNA-191高表达可以预测肝癌患者的预后不良^[14]。有研究发现，miRNA的甲基化改变会影响miRNA的表达，可能导致下游的增殖或者凋亡相关的癌蛋白异常表达，从而影响肿瘤的发生、发展^[15-16]。目前，尚鲜有关于miRNA-191启动子甲基化状态对miRNA-191表达影响的报道。因此，研究癌症发生、发展过程中miRNA-191基因启动子甲基化状态的改变及其影响，对阐明肿瘤的发生机制，具有非常重要的意义。

目前，关于NSCLC中基因启动子区的甲基化研究很多，但关于miRNA的相对较少，多在miRNA-137、miRNA-34b/c、miRNA-196a等的启动子区甲基化水平的研究中，且证明与miRNA的表达及肺癌的恶性程度有关^[17]。本研究结果显示，NSCLC肿瘤组织的甲基化率明显低于癌旁正常肺组织，并且相较甲

基化组的患者，非甲基化组的肿瘤具有组织分化程度低、TNM分期晚、预后差的特点。提示非甲基化状态可能参与肿瘤增殖转移过程，并影响预后。本课题组前期研究发现，沉默肺癌A549细胞的miRNA-191后，通过划痕实验和Transwell实验可发现肺癌A549细胞的迁移能力减弱，同时也证实了miRNA-191高表达与NSCLC患者的不良预后有关^[18]。本课题组一直关注NSCLC中miRNA-191表达上调的原因，通过在生物信息学网站的分析，发现miRNA-191启动子区有丰富CPG岛，甲基化的异常通常都发生在CPG岛，与癌症的发展密切相关。同时，通过TCGA数据库可以发现，miRNA-191启动子区有甲基化水平明显降低的位点，表明miRNA-191启动子区甲基化异常，与此次试验结果相符合。提示miRNA-191启动子区的低甲基化水平可能是导致miRNA-191高表达的关键因素，本课题组将在后续的研究中进一步验证。

本研究结果表明，NSCLC患者的miRNA-191启动子区存在异常甲基化，并且其甲基化状态与患者临床病理特征关系密切，有望成为判断NSCLC预后的候选指标。

参考文献

- [1] LUJAMBIO A. The microcosmos of cancer[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 347-355.
- [2] CHEN P, PAN X, ZHAO L, et al. MicroRNA-191-5p exerts a tumor suppressive role in renal cell carcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1686-1693.
- [3] GOTO T, FUJIYA M, KONISHI H, et al. An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 116.
- [4] BAYLIN S B. A decade of exploring the cancer epigenome: biological and translational implications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(10): 726-734.
- [5] LYKO F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(2): 81-92.
- [6] HOMS A, CODINA-SOLÀ M, RODRÍGUEZ-SAN TIAGO B, et al. Genetic and epigenetic methylation defects and implication of the ERMN gene in autism spectrum disorders[J]. *Transl Psychiatry*, 2016, 6(7): e855.

- [7] SIPPL C,URBSCHAT S,KIM Y J,et al. Promoter methylation of RB1, P15, P16, and MGMT and their impact on the clinical course of pilocytic astrocytomas[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15 (2): 1600-1606.
- [8] SAITO Y,LIANG G,EGGER G,et al. Specific activation of micro RNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells [J]. *Cancer Cell*,2006,9(6):435-443.
- [9] ZHAO J,QIAO C R,DING Z,et al. A novel pathway in NSCLC cells; miR 191, targeting NFIA, is induced by chronic hypoxia, and promotes cell proliferation and migration[J]. *Mol Med Rep*,2017,15(3):1319-1325.
- [10] ZHANG X,WU M,CHONG Q Y,et al. Amplification of hsa-miR-191/425 locus promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting DICER1[J]. *Carcinogenesis*,2018,39(12):1506-1516.
- [11] KANG P C,LENG K M,LIU Y P,et al. miR-191 inhibition induces apoptosis through reactivating secreted frizzled-related protein-1 in cholangiocarcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018,49(5):1933-1942.
- [12] XU W,JI J,XU Y,et al. MicroRNA-191, by promoting the EMT and increasing CSC-like properties, is involved in neoplastic and metastatic properties of transformed human bronchial epithelial cells[J]. *Mol Carcinog*, 2014, 54 Suppl 1: S148-161.
- [13] LIU Z,HUANG S. Inhibition of miR-191 contributes to radiation-resistance of two lung cancer cell lines by altering autophagy activity[J]. *Cancer Cell Int*,2015,15(1):1-10.
- [14] LI H,ZHOU Z Q,YANG Z R,et al. MicroRNA-191 acts as a tumor promoter by modulating the TET1-p53 pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Hepatology*, 2017, 66(1):136-151.
- [15] KUNEJ T,GODNIC I,FERDIN J,et al. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer:an integrated review of literature [J]. *Mutat Res*, 2011,717(1/2):77-84.
- [16] TANG W,WAN S,YANG Z,et al. Tumor origin detection with tissue-specific miRNA and DNA methylation markers[J]. *Bioinformatics*, 2018,34(3):398-406.
- [17] HUANG X,WU C,FU Y,et al. Methylation analysis for multiple gene promoters in non-small cell lung cancers in high indoor air pollution region in China[J]. *Bull Cancer*,2018,105(9):746-754.
- [18] 周鑫,陶诗诗,邱莫灿,等. miR-191 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. *现代生物医学进展*,2018,18(3):496-499.

(收稿日期:2020-09-12 修回日期:2021-01-08)

(上接第 1666 页)

- Prevent,2013.
- [11] O'NEILL J. Antimicrobial resistance:tackling a crisis for the health and wealth of nations[J]. *Rev Antimicrob Resist*,2016(2016):1-16.
- [12] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017,17(5):481-491.
- [13] VAN BOECKEL T P,GANDRA S,ASHOK A,et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010;an analysis of national pharmaceutical sales data[J]. *Lancet Infect Dis*,2014,8(14):742-750.
- [14] Antibiotics in the 21 century;are we really safe? [J]. *EBioMedicine*,2018,38:1-2.
- [15] 沈亚青. 医院感染相关危险因素分析与抗菌药物干预建议[J]. *中国生化药物杂志*,2017,37(8):358-362.
- [16] 尹寿祥,王凌,沈发英. 2016 年我院抗菌药物使用及细菌耐药性分析[J]. *西北药学杂志*,2018,33(5):682-687.
- [17] 郑伟,茅一萍,韩方正,等. 大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌耐药性与抗菌药物使用强度相关性[J]. *中国感染控制杂志*,2017,16(7):606-609.
- [18] NICOLAOU K C,RIGOL S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis[J]. *J Antibiot*,2018,71(2):153-184.
- [19] 黄勋,邓子德,倪语星,等. 多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J]. *中国感染控制杂志*,2015,14(1):1-9.

(收稿日期:2020-06-15 修回日期:2020-12-06)