

·论 著·

miR-195及其靶向蛋白CHEK1与非小细胞肺癌
预后的关系

缪倩 郑勤红 吴锡林

[摘要] 目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中miR-195及其靶向蛋白CHEK1表达与预后的关系。方法 采用qRT-PCR方法检测miR-195在组织标本中的表达水平;采用Western blot检测miR-195的靶向蛋白CHEK1的表达,比较患者NSCLC组织和正常肺组织中miR-195及其靶向蛋白CHEK1表达差异,并分析miR-195及其靶向蛋白CHEK1表达与NSCLC患者临床病理特征的关系。结果 NSCLC组织中miR-195相对表达量较正常组织降低,靶向蛋白CHEK1表达量较正常组织升高(t 分别=18.10、41.97, P 均 <0.05);miR-195及其靶向蛋白CHEK1表达与疾病分期、淋巴结转移及远处转移相关,差异均有统计学意义(t 分别=12.40、11.19;11.95、10.88;11.07、11.88, P 均 <0.05),不同性别、年龄、有无吸烟史患者之间的miR-195及其靶向蛋白CHEK1表达比较,差异均无统计学意义(t 分别=1.97、0.78;0.56、0.02;1.90、1.60, P 均 >0.05)。结论 miR-195及其靶向蛋白CHEK1表达在NSCLC患者中表达异常,并与患者临床病理特征相关,可能与患者的预后生存密切相关。

[关键词] miR-195; 靶向蛋白CHEK1; 非小细胞肺癌; 预后

Relationship between miR-195, target protein CHEK1 and prognosis of NSCLC MIAO Qian, ZHENG Qinrong, WU Xilin. Department of Medical Oncology, Zhejiang Quzhou People's Hospital, Quzhou 324000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between miR-195 and its target protein CHEK1 expression and prognosis in NSCLC tissues. **Methods** The expression level of miR-195 in tissue samples was detected by QRT-PCR. Western blot was used to detect the expression of miR-195's targeted protein CHEK1. The differences in miR-195 and its targeted protein CHEK1 expression in NSCLC tissues and normal lung tissues were compared, and the relationship between miR-195 and its targeted protein CHEK1 expression and clinical characteristics of NSCLC patients were analyzed. **Results** The relative expression level of miR-195 in NSCLC tissues was lower than that in normal tissues ($t=18.10, P<0.05$), and the targeted protein CHEK1 was higher than that in normal tissues ($t=41.97, P<0.05$). The expression of miR-195 and its target protein CHEK1 were correlated with lymph node metastasis and distant metastasis of disease stage, and the differences were statistically significant ($t=12.40, 11.19; 11.95, 10.88; 11.07, 11.88, P<0.05$). The expressions of miR-195 and its target protein CHEK1 were not statistically related to gender, age, and smoking history ($t=1.97, 0.78; 0.56, 0.02; 1.90, 1.60, P>0.05$). **Conclusion** The expressions of miR-195 and its targeted protein CHEK1 are abnormal in NSCLC patients, and it is correlated with the clinical features of patients, which may be closely related to the prognosis and survival of patients.

[Key words] miR-195; target protein CHEK1; non-small cell lung cancer; prognosis

肺癌是世界上主要常见的恶性肿瘤,也是癌症患者致死的主要原因^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)在肺癌中占肿瘤组

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.09.005

基金课题:2017年度市级科技计划指导性项目(20172018)

作者单位:324000 浙江衢州,衢州市人民医院肿瘤内科

织学的绝大部分^[2]。现如今,虽然在NSCLC早期检测发现并进行治疗等方面的研究已经获得显著的进展,但NSCLC仍然难以治愈,许多患者疗效并不理想,且患者术后恢复较差,生存率低^[3]。因此,探讨NSCLC发生发展的机制及寻找新的预后标志物与与肺癌的发生发展相关的关键分子有着非常重要的意义。随着肺癌基因的深入研究发现,微小

RNA (microRNA, miR) 在肺癌的发生发展进程中, 有抑制癌或原癌基因, 调控肺癌细胞的生物学行为的作用, 越来越受到重视^[4,5]。故本次研究旨在观察 NSCLC 患者癌组织中 miR-195 及其靶向蛋白 CHEK1 表达水平及其与患者预后的关系。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 选取2016年1月至2019年3月于衢州市人民医院行手术切除的168例NSCLC患者的组织标本。168例患者中男性102例、女性66例; 年龄30~84岁, 平均年龄(51.34±8.20)岁。同时选取同期于本院就诊的42例肺外伤患者的正常肺组织标本。所有NSCLC患者均有完整的临床资料。所有患者均签署知情同意书。

1.2 试剂与器材 RNA提取试剂盒、反转录试剂盒(均由上海恒斐生物科技有限公司生产); PCR检测试剂盒(由哈尔滨经纬百科生物技术有限公司生产); 酶标仪(由Bio生物公司生产); 蛋白印迹仪(由帝肯(上海)贸易有限公司生产); Western Blot检测试剂盒(由碧云天生物技术研究生产)。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR方法检测 miR-195 在组织标本中的表达水平 采用Trizol法提取每例患者的NSCLC组织和正常组织标本的RNA, 通过逆转录来合成cDNA, 采用SYBR Green染料法检测miR-195的表达水平, 内参基因选用U6。检测重复3次。引物序列见表1。实验结束后, 采用2- $\Delta\Delta CT$ 法计算待测目的基因的相对表达量。

表1 引物序列

引物	引物序列	5'→3'
miR-195	上游引物	5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCAGCACAGAAAT-3'
	下游引物	5'-TGGTGTCTGGAGTCTG-3'
U6	上游引物	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	下游引物	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.3.2 Western blot方法检测组织标本中蛋白CHEK1表达 取每例患者的NSCLC组织和癌旁组织标本, 裂解细胞后, 提取细胞蛋白, 配制分离胶、浓缩胶, 上样, 进行SDS-PAGE电泳; 将5 μ l 蛋白样品与20 μ l 5×蛋白上样缓冲液混合均匀, 转膜2.5 h, 取下聚偏二氟乙烯膜, 以含10%牛血清蛋白的TBST溶液封闭1 h, 加兔抗人CHEK1单克隆抗体, 孵育1 h, TBST洗3次, 加二抗, 孵育1 h, TBST洗3次。蛋白条浸泡发光液, 于蛋白印迹仪检测。设置上样内参蛋白为 β -actin。采用Biomad western分析仪自动分析蛋白表达含量。检测重复3次。实验结束后, 采用2- $\Delta\Delta CT$ 法计算待测目的基因的相对表达量。

1.4 统计学方法 采用SPSS 22.0统计学软件处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组织及 NSCLC 组织中 miR-195、蛋白CHEK1 的表达水平见表2

由表2可见, NSCLC组织中miR-195相对表达量较正常组织降低, 靶向蛋白CHEK1表达量较正常组织升高(t 分别=18.10、41.97, P 均 < 0.05)。

表2 正常组织及NSCLC组织中miR-195、蛋白CHEK1的表达情况

组别	miR-195	蛋白CHEK1
NSCLC组织	4.01 ± 1.06*	0.72 ± 0.14*
正常组织	7.27 ± 1.91	0.21 ± 0.07

注: *, 与正常组织比较, $P < 0.05$ 。

2.2 miR-195 及其靶向蛋白 CHEK1 表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系见表3

由表3可见, NSCLC患者I~II期癌组织中miR-195相对表达量高于III~IV期, 而蛋白CHEK1低于III~IV期的表达(t 分别=12.40、11.19, P 均 < 0.05); 有淋巴结转移的NSCLC患者癌组织中miR-195相对表达量低于无淋巴结转移者, 而蛋白CHEK1的表达高于无淋巴结转移者(t 分别=11.95、10.88, P 均 < 0.05); 有远处转移的NSCLC患者癌组织中miR-195相对表达量低于无远处转移者, 而蛋白CHEK1的表达高于无远处转移者(t 分别=11.07、11.88, P 均 < 0.05)。不同性别、年龄、有无吸烟史患者之间的miR-195及其靶向蛋白CHEK1表达比较, 差异均无统计学意义(t 分别=1.97、0.78; 0.56、0.02; 1.90、1.60, P 均 > 0.05)。

表3 miR-195 及其靶向蛋白CHEK1 表达
与 NSCLC 患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	蛋白CHEK1 表达	miR-195 表达水平
性别			
男	102	0.73 ± 0.16	3.75 ± 1.32
女	66	0.67 ± 0.20	3.90 ± 1.24
年龄			
≥60 岁	114	0.73 ± 0.15	3.86 ± 1.33
<60 岁	54	0.75 ± 0.11	3.86 ± 1.05
吸烟史			
有	90	0.74 ± 0.13	3.96 ± 1.13
无	76	0.70 ± 0.17	3.68 ± 1.12
分期			
I ~ II 期	64	0.45 ± 0.17	5.36 ± 1.28
III ~ IV 期	104	0.86 ± 0.26	3.23 ± 1.05
淋巴转移			
有	101	0.92 ± 0.22	3.32 ± 1.35
无	67	0.55 ± 0.18	5.28 ± 0.99
远处转移			
有	60	0.88 ± 0.20	3.40 ± 1.17
无	108	0.56 ± 0.13	5.76 ± 1.34

3 讨论

肺癌是常见的一种恶性肿瘤,其病理不仅复杂,且放化疗及手术等传统的治疗效果不佳,使得肺癌的发病率和死亡率较高^[6]。miR-195 属于非编码微小 RNA miRNA-15 /16 /195 家族中的一员,在各类真核生物体内都广泛分布,可通过对靶基因的调控发挥抑癌作用^[7-9]。NSCLC 组织标本的临床研究发现,miR-195 在肿瘤组织中低表达,并与患者病情相关^[10]。CHEK1 作为 DNA 损伤反应的核心成分,参与 DNA 损伤反应,CHEK1 激活后调控细胞周期及细胞活动并协调 DNA 修复^[11]。有研究表明 CHEK1 是 miR-195 的靶点^[12,13]。罗雷等^[14]对 miR-195 mRNA 水平与 CHEK1 蛋白含量进行相关性分析研究发现,两者呈负相关,miR-195 可通过下调 CHEK1 蛋白表达水平,对肺癌细胞的生物学行为进行调控。在乳腺癌、肝癌和鼻咽癌等肿瘤中 CHEK1 高表达,促进肿瘤细胞生长,能使肿瘤细胞的生存优势更高,促进恶性肿瘤细胞的发生及肿瘤的复发^[15,16]。本次研究印证了这一点。本次研究比较患者 NSCLC 患者组织和正常组织中 miR-195 的表达水平和蛋白 CHEK1 的含量,结果发现 NSCLC 患者

组织中 miR-195 相对表达量降低,而蛋白 CHEK1 含量升高。

蔡静等^[17]在多因素分析和校正肿瘤病理分期、有无淋巴结转移及远处转移等临床分期等因素后,发现 miR-195 不但与 NSCLC 的发病和转移有关,还与 NSCLC 的预后相关,是影响 NSCLC 预后的独立因子,miR-195 可作为 NSCLC 潜在的早期诊断、预后评价的分子标志物。本次研究针对 NSCLC 患者临床资料、临床肿瘤 TNM 分期、有无淋巴结转移及远处转移等与 NSCLC 组织中 miR-195 及其靶向蛋白 CHEK1 表达的相关性进行分析,结果显示 I ~ II 期癌组织中 miR-195 相对表达量高于 III ~ IV 期,而蛋白 CHEK1 低于 III ~ IV 期的表达;有淋巴结转移的 NSCLC 患者癌组织中 miR-195 相对表达量低于无淋巴结转移者,而蛋白 CHEK1 的表达高于无淋巴结转移者;有远处转移的 NSCLC 患者癌组织中 miR-195 相对表达量低于无远处转移者,而蛋白 CHEK1 的表达高于无远处转移者(P 均 <0.05)。表明 NSCLC 患者组织中 miR-195 及其靶向蛋白 CHEK1 表达,与肿瘤 TNM 分期、有无淋巴结转移及远处转移密切相关,可作为肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移与否的分子标志物。本次研究还发现,不同性别、年龄、有无吸烟史患者之间的 miR-195 及其靶向蛋白 CHEK1 表达无统计学差异。

本次研究还存在一定局限性,未进行更深入的检测与验证 miR-195 及其靶向蛋白 CHEK1 的相关通路及对其他靶基因的相关通路。在今后的研究中,建议通过临床标本对 miR-195 靶基因及相关的通路进行检测,深入研究其机制,为肺癌的临床治疗与诊断提供更可靠的依据。

参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- 2 Subramaniam S, Thakur RK, Yadav VK, et al. Lung cancer biomarkers: State of the art[J]. J Carcinog, 2013, 12: 3.
- 3 Tonon G, Wong KK, Maulik G, et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(27): 9625-9630.
- 4 Yu N, Zhang Q, Liu Q, et al. A meta-analysis: micro-RNAs' prognostic function in patients with nonsmall cell lung cancer[J]. Cancer Med, 2017, 6(9): 2098-2105.
- 5 Du X, Zhang J, Wang J, et al. Role of miRNA in lung

- cancer-potential biomarkers and therapies[J]. Curr Pharm Des, 2018, 23(39):5997-6010.
- 6 Albaba H, Lim C, Leighl NB. Economic considerations in the use of novel targeted therapies for lung cancer: review of current literature[J]. Pharmacoeconomics, 2017, 35(12):1195-1209.
 - 7 He JF, Luo YM, Wan XH, et al. Biogenesis of miRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2011, 25(6):404-408.
 - 8 Li Y, Di C, Li W, et al. Oncomirs miRNA-221 /222 and tumor suppressors miRNA-199a /195 are crucial miRNAs in liver cancer: a systematic analysis[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(8):2315-2327.
 - 9 Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al. miR-Base: tools for microRNA genomics[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(Database issue): D154-D158.
 - 10 Liu B, Qu J, Xu F, et al. miR-195 suppresses non-small cell lung cancer by targeting CHEK1[J]. Oncotarget, 2015, 6(11):9445-9456.
 - 11 黄申晖, 隋超, 刘佳鑫, 等. miR-195对肺癌A549 细胞生物学行为的影响及其机制[J]. 肿瘤药学, 2018, 8(2):153-157.
 - 12 Carrassa L, Damia G. Unleashing Chk1 in cancer therapy[J]. Cell Cycle, 2011, 10(3):2121-2128.
 - 13 Liu B, Qu J, Xu F, et al. miR-195 suppresses non-small cell lung cancer by targeting CHEK1[J]. Oncotarget, 2015, 6(11):9445-9456.
 - 14 罗雷, 杨彦辉, 李季, 等. miR-195靶向调控CHEK1对非小细胞肺癌细胞增殖、转移及侵袭的作用[J]. 局解手术学杂志, 2019, 28(4):261-266.
 - 15 Zhang Y, Hunter T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy[J]. Int J Cancer, 2014, 134(5):1013-1023.
 - 16 Rundle S, Bradbury A, Drew Y, et al. Targeting the ATR-Chk1 axis in cancer therapy[J]. Cancers, 2017, 9(5):41.
 - 17 蔡静, 候玥. 非小细胞肺癌患者血清miR-195的表达及其临床意义[J]. 实用肿瘤学杂志, 2018, 32(5):415-419.

(收稿日期 2019-05-30)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第780页)

性加重次数, 延缓疾病的进展, 改善预后。这与国内文献报道相一致^[7,8]。

综上所述, 对COPD患者给予三级医院联合社区卫生院强化管理, 能够增加患者对疾病的认识与了解, 提高用药依从性, 减缓病情的发展, 改善患者生活质量, 为COPD的慢性管理提供了新的思路及理论基础。但本次研究仅随访了2年, 相对于COPD的病程偏短, 且样本数也有所不足, 关于该管理模式是否广泛适用于各COPD患者的治疗, 值得进一步地研究和探讨。

参考文献

- 1 Siafaka NM, Vermeire P, Pride NB, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a consensus statement of the European Respiratory[J]. Eur Respir J, 1995, 8(8):1398-1420.
- 2 Murray CJ, Lopez AD. Alternative projection of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study[J]. Lancet 1997, 394(9064):1498-1504.
- 3 陈亚红. 2017年GOLD慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗及预防的全球策略解读[S]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2017, 9(1):37-47.
- 4 刘淑, 何远强, 郑玉龙, 等. COPD严重程度分级与6分钟步行试验距离的关系[J]. 广东医学, 2011, 32(3):344-345.
- 5 钟南山. 中国医学科技工作者应为慢性阻塞性肺疾病的防治作出贡献[J]. 中华结核和呼吸疾病, 2009, 32(4):241-242.
- 6 曾容辉, 曾焕雄, 杨少河, 等. 健康管理对社区慢性阻塞性肺疾病患者治疗效果的影响[J]. 海南医学, 2015, 26(9):1363-1364.
- 7 杜丽丽, 王汝雯, 葛利静, 等. 医院-社区主动康复训练模式对慢性阻塞性肺疾病患者肺功能及生活质量影响的临床研究[J]. 宁夏医学杂志, 2015, 37(4):377-379.
- 8 徐迅, 李凡, 朱云霞, 等. 社区规范化管理对慢性阻塞性肺疾病患者质量调整生命年的影响研究[J]. 中国全科医学, 2013, 16(9):798-801.

(收稿日期 2019-06-25)

(本文编辑 蔡华波)