



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.17

文章编号: 2095-1264(2022)06-0791-05

miRNA-154 在皮肤鳞状细胞癌中的表达 及其临床意义

梁晓红, 刘雅妍, 罗文辉, 唐丽梅
(株洲市中心医院 皮肤科, 湖南 株洲, 412000)

摘要: **目的** 分析 miRNA-154 在皮肤鳞状细胞癌(CSCC)中的表达水平以及其在 CSCC 发展过程中的临床意义。**方法** 采用 RT-PCR 法和原位杂交法检测 98 例 CSCC 组织和 60 例正常皮肤组织中 miRNA-154 的表达水平。研究对入组患者均进行了 5 年的跟踪随访,对患者的生存情况进行统计和总结,同时对 miRNA-154 表达水平和 CSCC 患者预后的关系进行进一步分析。**结果** CSCC 组织中 miRNA-154 相对表达量为 (0.57 ± 0.09) ,明显低于其在正常组织中的表达量 (1.56 ± 0.02) ,差异有统计学意义 $(P < 0.001)$ 。CSCC 组织中 miRNA-154 表达的平均光密度为 (63.26 ± 10.08) ,明显低于正常组织的 (109.56 ± 30.05) ,差异有统计学意义 $(P < 0.001)$ 。CSCC 组织中 miRNA-154 表达水平越低,则临床分期越高、肿瘤分化程度越低,同时越容易发生淋巴结转移,差异均有统计学意义 $(P < 0.05)$ 。miRNA-154 高表达组患者的总生存期显著长于 miRNA-154 低表达组(41.9 个月 vs. 31.4 个月, $P < 0.001$)。Cox 回归分析结果显示,miRNA-154 低表达、肿瘤低分化、高临床分期及淋巴结转移与 CSCC 患者死亡预后显著相关 $(P < 0.05)$ 。**结论** 在 CSCC 发生发展过程中,miRNA-154 是重要的抑癌基因,其表达水平与肿瘤分化程度呈负相关,与临床分期、淋巴结转移以及生存期呈正相关,可能是潜在的抗肿瘤生物治疗靶点。

关键词: microRNA; 皮肤鳞状细胞癌; 病理特征; 预后

中图分类号: R739.5 **文献标识码:** A

Expression and clinical significance of miRNA-154 in cutaneous squamous cell carcinoma

LIANG Xiaohong, LIU Yayan, LUO Wenhui, TANG Limei

(Department of dermatology, Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou, 412000, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To analyze the expression level of miRNA-154 in cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC) and its clinical significance in the development of CSCC. **Methods** RT-PCR and in situ hybridization were used to detect the expression of miRNA-154 in 98 cases of CSCC and 60 cases of normal skin. All the patients were followed up for 5 years, and the survival rate of the patients were counted and summarized. The relationship between the expression level of miRNA-154 and the prognosis of CSCC patients was further analyzed. **Results** The relative expression of miRNA-154 in CSCC tissues (0.57 ± 0.09) was significantly lower than in normal tissues (1.56 ± 0.02) ($P < 0.001$). The average optical density of miRNA-154 expression in CSCC tissues (63.26 ± 10.08) was significantly lower than in normal tissues (109.56 ± 30.05) ($P < 0.001$). The lower the level of miRNA-154 expression was in CSCC tissues, the higher the clinical stage, the lower the tumor differentiation, and the more prone to lymphatic metastasis ($P < 0.05$). The overall survival rate of patients with high expression of miRNA-154 was significantly higher than that of patients with low expression of miRNA-154 (41.9 months vs. 31.4 months, $P < 0.001$). Cox regression analysis showed that the low expression of miRNA-154, low tumor differentiation, high clinical stage, and lymphatic metastasis were related to the prognosis of death in patients with CSCC ($P < 0.05$).

作者简介:梁晓红,女,硕士,副主任医师,从事皮肤疾病研究。

Conclusion miRNA-154 is an important tumor suppressor gene in the occurrence and development of CSCC. The expression of miRNA-154 showed a negative relationship with tumor differentiation, and a positive relationship with the clinical stage, lymphatic metastasis and survival rate of CSCC patients. miRNA-154 may be a potential target for anti-tumor bio-therapy of CSCC.

Keywords: MicroRNA; Cutaneous squamous cell carcinoma; Pathological features; Prognosis

前言

皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma, CSCC)简称鳞癌,是发生于表皮或者附属器细胞的一种恶性肿瘤,好发于口腔、皮肤、子宫颈、食管以及口唇部。临床上,大多数 CSCC 可以通过手术切除进行治疗,并且患者预后良好,但是,约 4% 的患者会发生转移,其中约 1.5% 的患者最终死亡^[1]。有报道显示,大多数转移性 CSCC 患者预后不良,1 年特异性生存率为 44%~56%^[2],因此,早发现、早治疗对于 CSCC 的治疗具有重要意义。微小 RNA(microRNA, miRNA)为单链 RNA 分子,其主要结构之一是内源基因编码,主要参与转录后基因表达的调控^[3]。既往研究显示,miRNA 可直接参与机体多个代谢过程,例如常见的防御、发育以及细胞的分化、增殖以及凋亡等等^[4]。近年来,越来越多的研究发现,miRNA 与 CSCC 的发生和发展有关^[5]。Chen 等^[6]发现,miRNA-154 可以靶向 *WHSC1* 基因,通过 P53 信号通路抑制 CSCC 细胞 A431、CSCC-15 的增殖和侵袭,提示 miRNA-154 可能作为抑癌基因发挥作用。然而,miRNA-154 与 CSCC 患者临床病理特征及预后有何关系既往未见报道。本研究检测了 98 例 CSCC 组织中 miRNA-154 的表达水平及其与患者病理特征和生存期的关系,旨在探讨 miRNA-154 在 CSCC 中的作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次研究中的研究对象均为就诊于我院肿瘤科的 CSCC 患者,就诊时间为 2013 年 5 月—2015 年 5 月,共计纳入 98 例患者。入组患者

包括 57 例男性患者和 41 例女性患者,年龄均在 18~87 岁之间,中位年龄为(57.23±6.01)岁;CSCC 发生于颈部 32 例、面部 26 例、头部 40 例;颈部淋巴结有转移 24 例;临床分期^[7]: I 期 27 例、II 期 18 例、III 期 36 例、IV 期 17 例。通过手术取组织标本。纳入标准:经临床观察和病理组织学检测后确诊为 CSCC;入组前未接受过放疗和化疗;临床资料完整。60 例正常皮肤组织标本取自普外科非肿瘤患者全厚皮片,其中包括 25 例女性和 35 例男性,年龄均在 19~86 岁之间,中位年龄为(58.01±5.96)岁;其中 24 例患者取头部标本,16 例患者取面部标本,20 例患者取颈部标本。两组患者的基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),可进行组间对比。所有患者入组时对本次研究方法和研究内容均知晓和了解,详细阅读知情同意书后自愿签署,并同意入组研究。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 每个样本均取 50 mg 液氮冷冻组织进行研磨处理(粉末状),加入 1 mL TRIzol 试剂(上海伯易生物科技有限公司)提取总 RNA,逆转录后进行 PCR,检测组织中 miRNA-154 的表达。引物序列设计见表 1。每个样本最少重复 3 次。RT-PCR 反应条件为:预变性 95 °C 30 s;PCR 反应 95 °C 5 s,60 °C 30 s,共计 40 个循环。

1.2.2 miRNA-154 原位杂交法 取石蜡包埋组织,加入二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱苯,用柠檬酸盐抗原修复,在杂交缓冲液中预杂交 2 h,加入 miRCURY 锁核酸探针(美国 Sigma 公司)标记的抗体地高辛(1:500),4 °C 孵育过夜。阴性对照为 Scrambled LNA probes。用 PBS 缓冲液冲洗,随后在暗室中加入染色液,室温孵育 24 h。当达到预期亮度时,将玻

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primers sequence of RT-PCR

基因	序列	产物长度
miRNA-154	上游 5'-UAGGUUAUCCGUCGUGUUGCCUUGC-3'	124
	下游 5'-AAGGCAACACGAUAACCUAUU-3'	
β -actin	上游 5'-ATCGTCGCGGACATCAAGG-3'	137
	下游 5'-TCGTTGCCGATGCTGATAC-3'	

片转移至终止液中,苏木精复染,蓝紫色表示阳性^[8]。

1.2.3 生存期 采用电话和门诊方式对所有患者随访5年,从患者确诊之日起开始计算,将末次随访日作为终止日期(2020年5月),失访患者计算方法相同。总生存期指患者自确诊开始至因各种原因死亡的时间。

1.3 统计学方法 数据处理:SPSS 21.0 统计学软件;资料描述:计数资料为例(%),计量资料为均数±标准差($\bar{x} \pm s$);差异检验方法:计数资料为 χ^2 检验,计量资料为 t 检验;差异有统计学意义判定标准: $P < 0.05$ 。用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,生存分析采用Log-Rank检验。采用Cox回归模型分析影响CSCC患者预后的因素。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 miRNA-154 在 CSCC 组织和正常组织中的表达 CSCC组织中miRNA-154相对表达量为(0.57±0.09),明显低于其在正常组织中的表达量(1.56±0.02),差异有统计学意义($t = -83.849$, $P < 0.001$)(图1)。

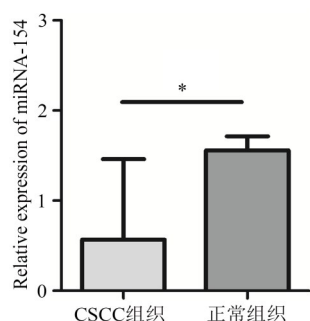


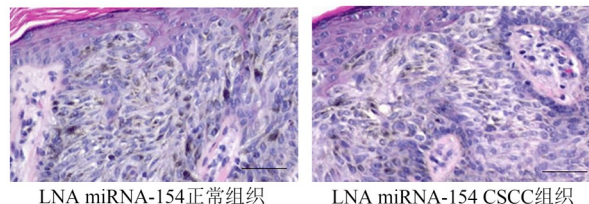
图1 miRNA-154在CSCC组织和正常组织中的表达(* $P < 0.001$)

Fig. 1 Expression of miRNA-154 in CSCC and normal tissues (* $P < 0.001$)

2.2 原位杂交法检测 miRNA-154 在 CSCC 组织和正常组织中的表达 miRNA-154在CSCC组织和正常组织中均有表达,miR-154阳性表达定位于细胞核内。CSCC组织中miRNA-154表达的平均光密度明显低于正常组织[(63.26±10.08) vs. (109.56±30.05), $P < 0.001$](图2)。

2.3 miRNA-154 表达水平与 CSCC 患者临床病理特征的相关性 将患者的年龄(>55岁、≤55岁)、性别(男、女)、肿瘤大小(≤5 cm、>5 cm)、肿瘤分化程度

(高/中分化、低分化),临床分期(I/II、III/IV),淋巴结转移(是、否)与CSCC患者miRNA-154表达水平进行相关分析,结果显示,肿瘤分化程度、临床分期、淋巴结转移与miRNA-154表达存在相关性,miRNA-154表达水平越低,则临床分期越高、肿瘤分化程度越低,同时越容易发生淋巴结转移($P < 0.05$)(表2)。



注:HE×200; Scale bar标尺=50 mm; LNA:锁核酸。

Note: HE×200; Scale bar=50 mm; LNA: locked nucleic acid.

图2 miRNA-154在CSCC组织和正常组织中的表达

Fig. 2 Expression of miRNA-154 in CSCC and normal tissue

表2 miRNA-154表达水平与CSCC患者临床病理特征的相关性分析

Tab. 2 Correlation analysis between miRNA-154 expression level and clinicopathologic features of CSCC patients

临床病理特征	β	SE	P	OR	95% CI
性别	-0.092	0.488	0.85	0.912	0.351~2.372
年龄/岁	-0.818	0.627	0.192	0.441	0.129~1.508
肿瘤大小/cm	0.058	0.649	0.929	1.06	0.297~3.783
肿瘤分化程度	2.054	0.745	0.006	7.799	1.812~33.563
临床分期	1.931	0.578	0.001	6.898	2.223~21.399
淋巴结转移	2.596	0.681	<0.001	13.405	3.532~50.875

2.4 miRNA-154 表达水平与患者生存期的关系 miRNA-154低表达组患者生存期为31.4个月,高表达组为41.9个月,差异有统计学意义与($P < 0.001$)(图3)。采用Cox回归模型对影响患者预后的因素进行分析,结果表明,miRNA-154低表达($HR = 4.158$, $95\% CI = 2.301 \sim 8.586$, $P < 0.001$)、低分化($HR = 1.713$, $95\% CI = 1.026 \sim 3.132$, $P = 0.035$)、高临床分期($HR = 2.254$, $95\% CI = 1.369 \sim 4.109$, $P = 0.002$)、淋巴结转移($HR = 3.268$, $95\% CI = 1.742 \sim 7.360$, $P = 0.002$)与CSCC患者死亡预后有关(表3)。

3 讨论

CSCC是常见的非黑色素瘤皮肤癌,发病率有逐渐升高之势^[9]。临床上治疗CSCC的方法主要有手术治疗、光动力治疗、药物治疗、冷冻治疗以及放

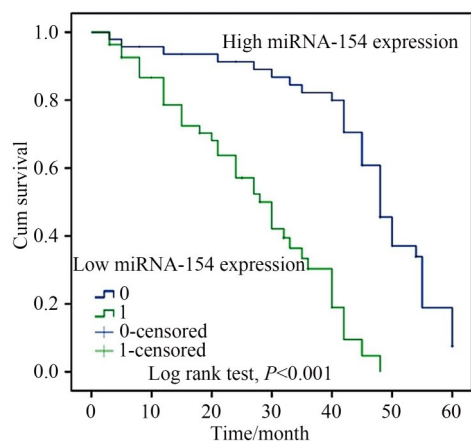


图3 miRNA-154 表达水平与患者总体生存率的关系
Fig. 3 Relationship between miRNA-154 expression level and overall survival rate of patients

射治疗等^[10-11]。随着基础和临床研究的不断推进,临床针对 CSCC 的新型靶点展开了深入研究,并且通过对患者病理特征进行研究和分析,发现 miRNA 与肿瘤的发生和发展具有一定的关系^[5, 12]。Hu 等^[13]研究发现,miRNA-186 可以靶向 *RETREG1* 基因,从而促进 CSCC 细胞增殖并抑制其凋亡。Zhang 等^[14]发现, CSCC 组织中 miRNA-20a 表达水平下降,并且与肿瘤分期和患者死亡预后有关。

既往研究证实,miRNA-154 是潜在的抑癌因子,可通过作用于 *E2F5* 基因^[15]、*Wnt5a* 基因^[16]、*PI-WIL1* 基因^[17]等参与胰腺癌、骨肉瘤、胶质瘤细胞的侵袭、迁移以及凋亡等生物学行为。miRNA-154 在 CSCC 中的作用目前鲜有报道,笔者回顾了既往相关文献,发现仅有一篇体外研究。本研究检测了 98 例 CSCC 组织中 miRNA-154 的表达,结果显示 CSCC 组织和正常组织中 miRNA-154 相对表达量分别为 (0.57 ± 0.09) 和 (1.56 ± 0.02) , 差异有统计学意义 ($P < 0.001$);原位杂交法检测结果同样显示,miRNA-154

在 CSCC 组织中的表达高于正常皮肤组织,提示 miRNA-154 高表达与 CSCC 的发生有关,与既往研究相符,同时证明了 miRNA-154 在 CSCC 中具有诊断价值。

本研究发现,miRNA-154 与肿瘤分化程度、临床分期、淋巴结转移有关,其表达水平越低,则临床分期越高、肿瘤分化程度越低,同时越容易发生淋巴结转移, Kaplan-Meier 分析结果进一步证明, miRNA-154 低表达患者的生存期往往更短。miRNA-154 可通过靶向 mRNA 的 3' 非翻译区负向调控基因的表达,参与肿瘤细胞的生命活动, Tian 等^[18]通过体外细胞实验证实,过表达 miRNA-154 能抑制人骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,并通过抑制 E2F 转录因子 5 阻滞细胞周期,证实了 miRNA-154 的肿瘤抑制作用。Geng 等^[19]发现, miR-154-5p 受 lncRNA 小核仁 RNA 宿主基因 11 的靶向负调控,抑制脑胶质瘤细胞的增殖、侵袭和转移。Kai 等^[20]亦证实,下调 miR-154 表达能促进人结直肠癌的进展。上述研究说明 miR-154 具有肿瘤抑制因子的作用,与本研究结论具有同质性。同时,本研究也发现, miRNA-154 低表达 ($HR=4.158$, $95\% CI=2.301 \sim 8.586$, $P < 0.001$) 与 CSCC 患者死亡预后有关,进一步证实 miRNA-154 在 CSCC 中的作用,说明 miRNA-154 具有作为 CSCC 治疗靶点的研究价值。

本研究存在以下局限性:仅分析了 miRNA-154 与 CSCC 患者临床病理特征和预后的关系,而未检测 miRNA-154 靶点的表达, miRNA-154 调控 CSCC 发生和发展的具体机制需要未来进一步研究;此外,样本量相对较小也是本研究的局限性之一。

综上所述,miRNA-154 是 CSCC 发生发展过程中重要的抑癌基因,其表达水平可影响肿瘤的临床分期、分化程度、淋巴结转移以及生存期,可能是潜

表3 影响 CSCC 患者死亡预后的单因素和多因素分析

Tab. 3 Univariate and multivariate analysis of factors affecting the prognosis of death of CSCC patients

临床病理特征	单因素分析			Cox 多因素分析		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
miRNA-154(低表达 vs. 高表达)	5.421	3.021~10.005	<0.001	4.158	2.301~8.586	<0.001
性别(男 vs. 女)	1.452	0.865~2.310	0.105	—	—	—
年龄(≤ 55 岁 vs. > 55 岁)	0.932	0.521~1.565	0.754	—	—	—
肿瘤大小(≤ 5 cm vs. > 5 cm)	1.305	0.834~2.004	0.220	—	—	—
分化程度(高中分化 vs. 低分化)	2.403	1.403~4.390	0.004	1.713	1.026~3.132	0.035
临床分期(I / II vs. III / IV)	3.369	1.932~4.268	<0.001	2.254	1.369~4.109	0.002
淋巴结转移(是 vs. 否)	4.421	2.013~9.001	<0.001	3.268	1.724~7.360	<0.001

在的抗肿瘤生物治疗靶点。

参考文献

- [1] LI L, TIAN Y L, SHI C F, et al. Over-expression of CD200 predicts poor prognosis in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 1079–1084. DOI: 10.12659/msm.895245.
- [2] OH Y, KIM J, ZHENG Z L, et al. Risk factors for recurrence in cutaneous squamous cell carcinoma after Mohs micrographic surgery: a retrospective review of 237 Asian patients [J]. J Dermatol, 2020, 47(1): 72–77. DOI: 10.1111/1346-8138.15129.
- [3] MASOOD N, BASHARAT Z, KHAN T, et al. Entangling relation of micro RNA-let7, miRNA-200 and miRNA-125 with various cancers [J]. Pathol Oncol Res, 2017, 23(4): 707–715. DOI: 10.1007/s12253-016-0184-0.
- [4] FERRANTE M, CONTI G O. Environment and neurodegenerative diseases: an update on miRNA role [J]. Micron, 2017, 6(3): 157–165. DOI: 10.2174/2211536606666170811151503.
- [5] KONICKE K, LÓPEZ-LUNA A, MUÑOZ-CARRILLO J L, et al. The microRNA landscape of cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Drug Discov Today, 2018, 23(4): 864–870. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.01.023.
- [6] CHEN H Q, GAO D. Inhibitory effect of microRNA-154 targeting WHSC1 on cell proliferation of human skin squamous cell carcinoma through mediating the P53 signaling pathway [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 100: 22–29. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.04.021.
- [7] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2010: 1527–1529.
- [8] WANG R Z, FU T, YOU K, et al. Identification of a TGF- β -miR-195 positive feedback loop in hepatocytes and its deregulation in hepatoma cells [J]. FASEB J, 2018, 32(7): 3936–3945. DOI: 10.1096/fj.201701199r.
- [9] GREEN A C, OLSEN C M. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review [J]. Br J Dermatol, 2017, 177(2): 373–381. DOI: 10.1111/bjd.15324.
- [10] BERNAL MARTÍNEZ Á J, FERNÁNDEZ LETAMENDI N, DELGADO MARTÍNEZ J, et al. Evaluation of the treatment of head and neck cutaneous squamous cell carcinoma in the elderly: a survival analysis [J]. Cir Esp (Engl Ed), 2018, 96(9): 577–582. DOI: 10.1016/j.ciresp.2018.05.005.
- [11] TRODELLO C, PEPPER J P, WONG M, et al. Cisplatin and cetuximab treatment for metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review [J]. Dermatol Surg, 2017, 43(1): 40–49. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000799.
- [12] GARCÍA-SANCHA N, CORCHADO-COBOS R, PÉREZ-LOSADA J, et al. microRNA dysregulation in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2181. DOI: 10.3390/ijms20092181.
- [13] HU X D, LIU Y F, AI P, et al. microRNA-186 promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis in cutaneous squamous cell carcinoma by targeting RETREG1 [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3): 1930–1938. DOI: 10.3892/etm.2019.7154.
- [14] ZHANG L, XIANG P, HAN X, et al. Decreased expression of microRNA-20a promotes tumor progression and predicts poor prognosis of cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11446–11451.
- [15] ZHENG Y, ZHU C, MA L, et al. miRNA-154-5p inhibits proliferation, migration and invasion by targeting E2F5 in prostate cancer cell lines [J]. Urol Int, 2017, 98(1): 102–110. DOI: 10.1159/000445252.
- [16] ZHOU H, ZHANG M L, YUAN H P, et al. microRNA-154 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting Wnt5a [J]. Oncol Rep, 2016, 35(3): 1851–1858. DOI: 10.3892/or.2015.4495.
- [17] WANG X Y, SUN S P, TONG X G, et al. miRNA-154-5p inhibits cell proliferation and metastasis by targeting PIWIL1 in glioblastoma [J]. Brain Res, 2017, 1676: 69–76. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.08.014.
- [18] TIAN Q, GU Y F, WANG F F, et al. Upregulation of miRNA-154-5p prevents the tumorigenesis of osteosarcoma [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124: 109884. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109884.
- [19] GENG Y B, XU C, WANG Y, et al. Long non-coding RNA SNHG11 promotes cell proliferation, invasion and migration in glioma by targeting miR-154-5p [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(9): 4901–4908. DOI: 10.26355/eurrev_202005_21179.
- [20] YANG K, CHENG Q, PAN X X, et al. Decreased miR-154 expression and its clinical significance in human colorectal cancer [J]. World J Surg Oncol, 2015, 13: 195. DOI: 10.1186/s12957-015-0607-5.

校稿: 李征 王娟

本文引用格式: 梁晓红, 刘雅妍, 罗文辉, 等. miRNA-154在皮肤鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤药, 2022, 12(6): 791–795. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.17.

Cite this article as: LIANG Xiaohong, LIU Yayan, LUO Wenhui, et al. Expression and clinical significance of miRNA-154 in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2022, 12(6): 791–795. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.17.