

microRNA-107对阴茎保留的阴茎癌患者预后的影响

张嘉宜¹, 宋乐彬², 王亚民¹, 陈晨¹, 王仪春¹, 杨杰¹, 宋宁宏^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 研究microRNA-107(miRNA-107)的表达对阴茎保留的阴茎癌患者预后的影响。方法: 回顾性分析2009年6月—2014年6月于南京医科大学第一附属医院行阴茎保留术的早期阴茎癌患者34例。应用Kaplan-Meier法分析生存数据, 并对临床参数进行Cox单变量分析及多变量分析, 分析因素包括患者年龄、婚姻状况、吸烟史、组织学分级、TNM分期、肿瘤原发部位及miRNA-107表达。结果: miRNA-107的表达与组织病理分级相关($\chi^2=3.948, P=0.047$), Cox比例风险模型单因素分析显示, 组织学分级较高(HR=5.537, $P=0.007$)和miRNA-107高表达(HR=7.651, $P=0.001$)的阴茎保留患者预后较差; Cox多因素分析显示miRNA-107高表达(HR=10.391, $P=0.003$)的阴茎保留患者预后较差。结论: miRNA-107是阴茎保留术预后的独立风险因素, 可作为阴茎保留术预后的重要分子标记物。

[关键词] miRNA-107; 阴茎保留术; 阴茎癌; 预后; 局部复发

[中图分类号] R737.27

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)01-0059-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180113

Prognostic value of miRNA-107 for patients with penile-sparing surgery

Zhang Jiayi¹, Song Lebin², Wang Yamin¹, Chen Chen¹, Wang Yichun¹, Song Ninghong^{1*}

¹Department of Urology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; ²The First Clinical Medical College of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the prognostic value of microRNA-107(miRNA-107) for patients with penile-sparing surgery.

Methods: The clinical data of 34 patients with penile-sparing surgery were collected from June, 2009 to June, 2014 in the first affiliated hospital of Nanjing Medical University. Kaplan-Meier method was used to analyze the survival data. Univariable analyses and multivariable analyses by Cox regression were performed to analyze the correlation between the potential factors and the prognosis. The factors included age, marital status, history of smoking, histological grade, TNM stage, tumor position, and miRNA-107 expression.

Results: We found that miRNA-107 expression was associated with histological grade ($\chi^2=3.948, P=0.047$). Univariable analyses showed that higher histological grade (hazard ratio, HR=5.537, $P=0.007$) and elevated expression of miRNA-107 (HR=7.651, $P=0.001$) significantly correlated with worse prognosis. Multivariable analyses demonstrated that higher miRNA-107 expression was related to unfavorable prognosis for patients (HR=10.391, $P=0.003$). **Conclusion:** miRNA-107 is an independent prognostic factor for patients with penile-sparing surgery, and it could be considered as an important biomarker.

[Key words] miRNA-107; penile-sparing surgery; penile cancer; prognosis; local recurrence

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(01):0059-0062]

阴茎癌是一种比较少见的泌尿生殖系恶性肿瘤,其主要病理类型为鳞状细胞癌。由于国家、民族、宗教信仰以及卫生习惯的不同,阴茎癌在欧美

发达国家的发病率较低,在美国约为0.69/10万、欧洲为0.1/10万~0.9/10万^[1],但在亚洲、非洲和拉丁美洲等发展中国家的欠发达地区人群中的发病率较高^[2]。近年来国内外研究表明阴茎保留手术可为早期阴茎癌患者较大程度地保留阴茎外形及器官功能^[3-5],然而保留阴茎的患者存在较高的局部复发和腹股沟淋巴结转移的可能^[6]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码小分子RNA,通过与靶基

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(2012-WSN-020);江苏省“333高层次人才培养工程”(2011.III-26110);江苏省自然科学基金(BK20131442)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: songninghong@126.com

因3'端非编码区特异性结合从而调控蛋白表达,参与细胞生长发育、分化凋亡等重要的生命过程^[7-8],其中miRNA-107曾被研究报道在肾透明细胞癌、乳腺癌及非小细胞肺癌中异常表达并且与预后相关^[9-11],既往研究进行的RNA测序亦显示阴茎癌组织中miRNA-107的表达相对于癌旁正常组织显著上调^[12]。本文通过回顾性分析34例保留阴茎患者的临床资料,并对其组织样本进行miRNA-107表达检测,从而探讨阴茎保留患者预后相关的风险因素。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究共收集2009年6月—2014年6月于南京医科大学第一附属医院行阴茎保留手术的早期阴茎鳞状细胞癌患者34例,平均年龄46.6岁(26.0~65.0岁),入选标准:①术前病理活检示阴茎鳞状细胞癌;②组织学分级、临床TNM分期及肿瘤原发部位综合评估后适合行阴茎保留手术;③患者知情同意行阴茎保留手术并愿意配合术后随访,中位随访时间1.8年(0.5~3.3年)。本研究经南京医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准。统计资料包括34例患者就诊时的年龄、婚姻情况、吸烟史、病理组织学分级、TNM分期及肿瘤原发部位等(表1)。阴茎癌的分期方法参照2009年UICC TNM分期^[13],组织学分级参照Broders分级分为G1(高分化)、G2(中分化)、G3(低分化),均无淋巴结及远处转移。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器

Veriti® 96-Well Thermal Cycler 反应仪(Applied Biosystems 公司,美国); StepOnePlus™ Real-Time PCR System(Applied Biosystems 公司,美国); Allegra 64R centrifuge 高速冷冻离心机(Beckman Coulter 公司,美国); Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(Tecan 公司,美国)。TRIzol(Invitrogen 公司,美国); hsa-miRNA-107(CD201-0192)、内参 hsa-U6(CD201-0145)(北京天根生化科技有限公司); 逆转录试剂盒(Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit, Clontech 公司,美国),实时定量PCR试剂盒(QuantiNova™ SYBR Green PCR Kit, Qiagen 公司,德国)。

1.2.2 组织RNA提取与逆转录反应

取100 mg冷冻阴茎癌组织,加入1 mL TRIzol 试剂后匀浆粉碎,按照说明书提取组织总RNA,20 μL DEPC水稀释,采用Infinite M200 Pro 多功能酶标仪测量总RNA $[D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})]$ 。按照逆转录

试剂盒操作说明进行逆转录反应,冰上加入下列试剂:mRQ buffer 5 μL,mRQ Enzyme 1.25 μL,总RNA 3.75 μL。反应条件为37 °C 1 h,85 °C 5 min。

1.2.3 实时定量PCR法

实时定量PCR反应体系:2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL,QN ROX Reference Dye 2 μL,上游引物(10 μmol/L)1 μL,下游引物(10 μmol/L)1 μL,cDNA 2 μL,加DEPC水至20 μL。反应条件为95 °C 2 min 预变性;PCR反应95 °C 5 s,60 °C 10 s,40个循环,监测荧光信号。实验重复3次。定量的方法参照文献^[14],以 $2^{-\Delta Ct}$ (C_t 代表循环阈值, $\Delta Ct=miRNA-107$ 循环数-U6循环数)表示基因的表达量,把 $2^{-\Delta Ct}$ 中位数作为分界值,将患者分为miRNA-107低表达组和高表达组。

1.3 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行统计学处理, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。miRNA-107表达情况与临床参数统计分析方法采用卡方检验。使用Kaplan-Meier生存曲线法进行生存分析,采用log-rank检验比较miRNA-107低表达和高表达组无局部复发生存率的差异,并将可能影响阴茎保留术预后的相关因素应用Cox比例风险模型进行单因素分析及多因素联合效应分析。

2 结果

2.1 miRNA-107表达与阴茎保留患者临床参数的关系

以 $2^{-\Delta Ct}$ 中位数作为分界值,34例保留阴茎的阴茎癌患者被分为miRNA-107低表达组(25例)和高表达组(9例)。统计结果显示,miRNA-107表达与组织病理分级相关($\chi^2=3.948, P=0.047$),其中高分化组织中有4例miRNA-107高表达,20例低表达;而中分化组织中有5例miRNA-107高表达,5例低表达。miRNA-107的表达与患者年龄($\chi^2=0.317, P=0.574$)、婚姻情况($\chi^2=2.378, P=0.123$)、吸烟史($\chi^2=1.858, P=0.173$)、TNM分期($\chi^2=0.343, P=0.558$)及肿瘤原发部位($\chi^2=0.481, P=0.488$)均无统计学意义(表1)。

2.2 miRNA-107表达与阴茎保留患者预后的关系

应用Kaplan-Meier法对34例患者进行生存分析,结果显示miRNA-107高表达组局部复发中位时间为1.5年,较miRNA-107低表达组(2.3年)明显缩短,且两组无局部复发生存期差异有统计学意义($P < 0.001$,图1)。根据Cox比例风险模型单因素分析显示,组织学分级较高($P=0.007$)和miRNA-107高表达($P=0.001$)与阴茎保留患者的预后相关(表2);

表1 34例阴茎保留患者miRNA-107表达与临床特征的相关性

Table 1 Association of miRNA - 107 expression and the clinical characteristics of 34 patients with penile-sparing surgery [n(%)]

基本信息	n	miRNA-107表达水平		χ^2 值	P值
		高表达	低表达		
年龄(岁)				0.317	0.574
≤50	17	3(8.8)	14(41.2)		
>50	17	6(17.6)	11(32.4)		
婚姻状况				2.378	0.123
否	4	0(0.0)	4(11.8)		
是	30	9(26.5)	25(73.5)		
吸烟史				1.858	0.173
否	21	4(11.8)	17(50.0)		
是	13	5(14.7)	8(23.5)		
病理分级				3.948	0.047
G1	24	4(11.8)	20(58.8)		
G2	10	5(14.7)	5(14.7)		
TNM分期				0.343	0.558
TisNOM0	3	1(2.9)	2(5.9)		
TaNOM0	4	0(0.0)	4(11.8)		
T1aNOM0	27	8(23.5)	19(55.9)		
肿瘤部位				0.481	0.488
阴茎头	22	7(20.6)	15(44.1)		
冠状沟	6	1(2.9)	5(14.7)		
包皮系带	6	1(2.9)	5(14.7)		

Cox多因素分析显示,miRNA-107高表达是阴茎保留患者预后的独立危险因素($P=0.003$,表2)。

3 讨论

近年来研究表明阴茎保留手术使早期阴茎原

表2 影响阴茎保留患者预后的单因素及多因素分析

Table 2 Univariable multivariable analyses of local - recurrence survival for 34 patients with penilesparing surgery

基本信息	单因素分析		多因素分析	
	HR	P值	HR	P值
年龄	2.843	0.123	1.025	0.550
婚姻状况	1.275	0.817	0.733	0.835
吸烟史	0.476	0.274	0.251	0.090
病理分级	5.537	0.007	4.372	0.063
TNM分期	0.104	0.213	<0.001	0.961
肿瘤部位	0.908	0.810	2.854	0.073
miRNA-107	7.651	0.001	10.391	0.003

HR(hazard ratio):危害比。

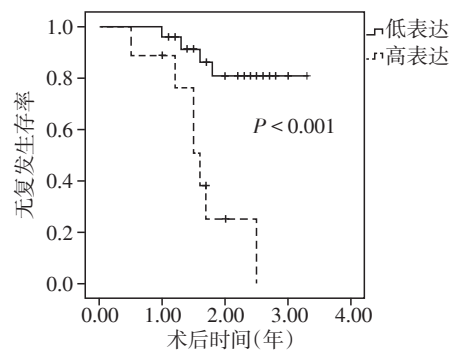


图1 miRNA-107高表达组和低表达组患者的生存曲线

Figure 1 Kaplan- Meier survival curves of dichotomous miRNA-107 expression in patients with penile-sparing surgery

发癌患者在术后拥有更良好的生理功能和更健康的心理^[15],相对于根治性切除术,阴茎保留手术患者术后局部复发率较高,此时需再次手术治疗^[16-17]。因此,探索阴茎保留术预后的独立风险因素对局部复发或转移的预测十分重要。越来越多的研究表明miRNA-107与多种肿瘤的发生发展相关,Takahashi等^[18]发现相比于Let-7 miRNA,miRNA-107在肺癌细胞中具有更强的细胞周期调控能力;Datta等^[19]在头颈鳞癌细胞中发现miRNA-107可通过下调靶基因蛋白激酶C ϵ (PKC)的表达来抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭;在胃癌中miRNA-107亦通过靶作用于DICER1进而促进肿瘤的侵袭和转移^[20]。此外Zhang等^[12]研究发现与正常组织相比,阴茎癌组织中的miRNA-107在所有表达上调的miRNA中最显著。因此,miRNA-107可能在阴茎癌的发生发展中起到关键作用。

本研究回顾性分析了南京医科大学第一附属医院34例行阴茎保留术的早期阴茎癌患者的临床资料,采用RT-PCR法对阴茎癌组织样本中miRNA-107的表达情况进行检测,应用Kaplan-Meier法对34例患者进行生存分析并用Cox风险比例模型进行单因素和多因素分析。统计结果发现miRNA-107的表达与患者年龄、婚姻情况、吸烟史、TNM分期及肿瘤原发部位无明显相关性。卡方检验提示miRNA-107与组织学分级相关($P=0.047$),Cox单因素分析也表明阴茎保留术后的局部复发与组织学分级显著相关($P=0.007$),本研究认为miRNA-107与组织学分级相关具有一定的临床意义。Cox风险比例模型单因素分析表明miRNA-107的高表达与阴茎保留患者的预后明显相关($P=0.001$),且多因素分析显示miRNA-107的高表达是阴茎保留患者预后的独立危险因素($HR=10.391, P=0.003$)。Kaplan-Meier生存

曲线表明 miRNA-107 的表达与阴茎保留患者的无复发生存率呈明显负相关,miRNA-107 高表达的患者局部复发时间较短。因此,miRNA-107 可能是阴茎保留预后的一个重要分子标记物。

本研究为回顾性分析,临床资料相对不完善,如缺少阴茎肿瘤面积的信息;缺少癌旁正常组织和肿瘤组织的对比。此外,纳入研究的病例数还有待进一步补充。

[参考文献]

[1] Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-sang J, et al. Incidence trends in primary malignant penile cancer[J]. Urol Oncol, 2007, 25(5):361-367

[2] Mobilio G, Ficarra V. Genital treatment of penile carcinoma[J]. Curr Opin Urol, 2001, 11(3):299-304

[3] Yang J, Chen J, Wu XF, et al. Glans preservation contributes to postoperative restoration of male sexual function: a multicenter clinical study of glans preserving surgery [J]. J Urol, 2014, 192(5):1410-1417

[4] 李 权, 宋宁宏, 李鹏超, 等. 保留阴茎头手术在浅表性阴茎癌治疗中的应用[J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(7):619-622

[5] Feldman AS, McDougal WS. Long-term outcome of excisional organ sparing surgery for carcinoma of the penis[J]. J Urol, 2011, 186(4):1303-1307

[6] 那彦群, 叶章群, 孙颖浩, 等. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013:121

[7] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2):281-297

[8] Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference[J]. Nature, 2004, 431(7006):371-378

[9] Song N, Ma X, Li H, et al. microRNA-107 functions as a candidate tumor suppressor gene in renal clear cell carcinoma involving multiple genes [J]. Urol Oncol, 2015, 33(5):205e1-11

[10] Li XY, Luo QF, Wei CK, et al. MiRNA-107 inhibits prolif-

eration and migration by targeting CDK8 in breast cancer [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(1):32-40

[11] Zhong KZ, Chen WW, Hu XY, et al. Clinicopathological and prognostic significance of microRNA - 107 in human non small cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(7):4545-4551

[12] Zhang L, Wei P, Shen X, et al. MicroRNA expression profile in penile cancer revealed by next-generation small RNA sequencing[J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0131336

[13] Sobin LH, Gospodariwics M, Wittekind C(eds). TNM Classification of malignant tumours [C]// Bamberg M. UICC International Union Against Cancer, 7th edition, Willy - Blackwell, 2009:239-242

[14] Feng J, Wang K, Liu X, et al. The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR[J]. Gene, 2009, 437(1-2):14-21

[15] Branney P, Witty K, Eardley I. Patients' experiences of penile cancer[J]. Eur Urol, 2011, 59(6):959-961

[16] Feldman AS, McDougal WS. Long-term outcome of excisional organ sparing surgery for carcinoma of the penis[J]. J Urol, 2011, 186(4):1303-1307

[17] Djajadiningrat RS, van Werkhoven E, Meinhardt W, et al. Penile sparing surgery for penile cancer-does it affect survival?[J]. J Urol, 2014, 192(1):120-125

[18] Takahashi Y, Forrest AR, Maeno E, et al. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines [J]. PLoS One 2009, 4(8):e6677

[19] Datta J, Smith A, Lang JC, et al. microRNA-107 functions as a candidate tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma by downregulation of protein kinase C ϵ [J]. Oncogene, 2012, 31(36):4045-4053

[20] Li X, Zhang Y, Shi Y, et al. MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(9):1887-1895

[收稿日期] 2016-12-13

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnm. njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
 稿件审理情况。