

miR-23a 和 MTSS1 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及其临床意义

刘亚杰¹, 马晓波²

(华北理工大学附属医院, 1. 检验科; 2. 病案科, 河北 唐山 063000)

【摘要】目的: 探讨 miR-23a 和 Mtss1 在大 B 细胞淋巴瘤中的表达情况及其临床意义。**方法:** 选取弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 患者淋巴结组织标本 65 例为观察组, 同期 RH 患者组织标本 35 例为对照组, 采取实时定量荧光 PCR 法和免疫组化 SP 法检测 miR-23a 和 Mtss1 在两组淋巴结组织中的表达情况, 分析 miR-23a 和 Mtss1 表达与 DLBCL 患者临床病理参数的关系及对患者预后的影响。**结果:** 在观察组淋巴结组织中, miR-23a 表达水平高于对照组, MTSS1 水平低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t = 7.693, 16.853, P < 0.01$); 通过相关性分析发现, miR-23a 和 MTSS1 表达量之间呈负相关关系, 差异具有统计学意义 ($r = -0.512, P < 0.01$); miR-23a、MTSS1 表达与 DLBCL 患者年龄、性别无相关性 ($P > 0.05$), 与患者 Ann Arbor 分期、有无淋巴结转移、IPI 评分明显相关 ($P < 0.05$); 通过对 DLBCL 患者随访 3 年发现, miR-23a 高表达患者生存率明显低于低表达患者, MTSS1 阳性患者生存率明显高于阴性患者, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 5.180, 4.842, P < 0.05$)。**结论:** miR-23a 和 MTSS1 在 DLBCL 中的表达呈负相关关系, 且与 DLBCL 的生存率有关, miR-23a 可能是 MTSS1 的一个靶基因。

【关键词】 miR-23a 和 Mtss1; 大 B 细胞淋巴瘤; 表达; 临床意义

【中图分类号】 R551.2 **【文献标志码】** A

Expression and clinical significance of miR-23a and MTSS1 in diffuse large B-cell lymphoma

LIU Ya-jie¹, MA Xiao-bo²

(1. Department of Laboratory; 2. Department of Medical Records, Affiliated Hospital of North China University of Technology, Tangshan 063000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and clinical significance of miR-23a and Mtss1 in large B-cell lymphoma. **Methods:** 65 lymph node tissue specimens of DLBCL patients were selected as observation group, and 35 RH patients as control group. Real-time quantitative fluorescent PCR and immunohistochemical SP method were used to detect the expression of miR-23a and MTSS1 in the two groups of lymph nodes. To analyze the relationship between the expression of miR-23a and MTSS1 and the clinicopathological parameters of DLBCL patients and the prognosis of DLBCL patients. **Results:** The expression level of miR-23a in the observation group was significantly higher than that in the control group, the expression level of MTSS1 was significantly lower than that in the control group ($t = 7.693, 16.853, P < 0.01$). Correlation analysis showed that there was a negative correlation between miR-23a and MTSS1 expression, and the difference was statistically significant ($r = -0.512, P < 0.01$). The expression of miR-23a and MTSS1 was not significantly correlated with age and sex of DLBCL patients ($P > 0.05$), which was significantly correlated with Ann Arbor stage, lymph node metastasis and IPI score ($P < 0.05$). After 3 years follow-up of DLBCL patients, the survival rate of patients with high expression of miR-23a was significantly lower than that of patients with low expression. The survival rate of patients with positive MTSS1 was significantly higher than that of negative patients ($\chi^2 = 5.180, 4.842, P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of miR-23a and MTSS1 in DLBCL is negatively correlated and is related to the survival rate of DLBCL. miR-23a may be a target gene of MTSS1.

【Key words】 miR-23a and MTSS1; DLBCL; Expression; Clinical significance

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffus large B-cell lymphoma, DLBCL) 是一种具有高度侵袭性和异质性的恶性肿瘤, 在发展中国家其发病率达到 60%, 而现代临床医疗手段只能使 40% ~ 50% 的患者得到缓

解, 且患者的复发率很高^[1-2], 因此寻找新的分子标志对 DLBCL 的预测、诊断和治疗具有十分重要的意义。目前, 有多项研究^[3-4]表明, DLBCL 发病机制与体内 miRNAs 的异常表达密切关系, miRNA 是一

种单链非编码的小 RNA 分子,通过调控生命体的遗传表达,对肿瘤的发生发展起一定的促进或抑制作用。转移抑制因子 1 (metastasis suppressor-1, MTSS1) 是新发现的一个肿瘤转移抑制基因,在很多肿瘤中的表达下调,且与肿瘤转移、疾病进展相关^[5]。本研究通过对 DLBCL 和淋巴结反应性增生 (reactive lymphoid hyperplasia, RH) 患者淋巴结组织中 miR-23a 和 MTSS1 表达情况进行检测,分析两者之间的关系,探究其临床意义及预后价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选取 2013 年 2 月至 2016 年 2 月华北理工大学附属医院病理科存档的 DLBCL 患者淋巴结组织标本 65 例为观察组,其中男性 40 例,女性 25 例;年龄 40~71 岁,平均 (55.40 ± 10.23) 岁;Ann Arbor 分期: I 期 18 例, II 期 22 例, III 期 20 例, IV 期 5 例;原发于淋巴结内 22 例,结外 43 例;乳酸脱氢酶 (LDH) 值 ≥ 300 IU/L 患者 36 例, < 300 IU/L 患者 29 例;淋巴瘤国际预后指数 (IPI) 评分 0~1 分 23 例, 2~4 分 42 例。随机选取 RH 患者淋巴结组织标本 35 例作为对照组,其中男性 22 例,女性 13 例;年龄 40~73 岁,平均 (56.10 ± 11.06) 岁。两组患者性别和年龄比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会审查批准,所有患者自愿签署知情同意书。

纳入标准:(1) 所有 DLBCL 标本均参照《中国淋巴瘤合并 HBV 感染患者管理专家共识》^[6] 诊断标准,且由两名高级职称病理医师确诊为 DLBCL;(2) 手术取样前均未服用任何抗肿瘤药物或接受任何放化疗;(3) 病例和随访资料完整者;(4) 均未合并其他肿瘤或癌前病变者。排除标准:(1) 存在肝、肾等重要器官耗损性疾病患者;(2) 合并其他恶性肿瘤或感染性疾病患者;(3) 意识不清有精神障碍者。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂购自海门碧云天生物技术研究; miR-23a 引物、内参 U6 引物、荧光 PCR 引物、逆转录试剂盒均购自上海吉玛公司;鼠抗人 MTSS1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;SP 免疫组化试剂盒购自福州迈新公司;PBS 溶液购自北京中山生物试剂公司;二氨基联苯胺显色剂及载玻片购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR 检测淋巴结组织中 miR-23a 表达水平 取液氮中保存的淋巴结组织 100 mg

磨成粉,加入 TRIzol 试剂提取总 RNA,用超微量分光光度计检测其纯度,计算 RNA 浓度。按照 Hairpin-it TM miRNA 反转录试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录反应条件为:16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min。用 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 反应,引物序列:miR-23a 正向引物 5'-GGGATCA-CATTGGCCAGG-3', 反向引物 5'-AGTGCCTGTCGT-GGAGTC-3';内参 U6 正向引物 5'-GCTTCGGCAG-CACATATACTAAAAT-3', 反向引物 5'-CGCT-TCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-23a 相对表达量,重复 3 次取平均值,miR-23a 相对表达量 ≥ 均数为高表达,反之为低表达。

1.3.2 免疫组化检测淋巴结组织中 MTSS1 表达水平 取淋巴结组织标本制作石蜡切片,按常规方法脱蜡水化,用柠檬酸修复液微波修复 5 min,根据链霉菌抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶复合物 (SP) 法阻断内源性过氧化物酶;用血清封闭后滴加 MTSS1 一抗 (1:100) 过夜,再滴加二抗,二氨基联苯胺显色,苏木精复染,脱水、透明和封片,置于显微镜下观察。以空白 PBS 液作阴性对照,每张切片随机观察 5 个高倍下不重复视野,根据细胞染色程度和染色细胞的百分率进行综合评分。染色程度为无着色计 0 分,淡黄色计 1 分,黄色或棕黄计 2 分,褐色或棕褐色计 3 分;阳性细胞百分比 ≤ 5% 计 0 分, 6%~25% 计 1 分, 26%~50% 计 2 分, 51%~75% 记 3 分, > 75% 计 4 分;将上述两项得分相加, 0~1 分为阴性, 2~6 分为阳性。

1.3.3 随访 对两组患者随访 3 年,在本院长期治疗、复查者详细登记病例,不在本院进行复查的患者采用电话或信件的方式进行随访,主要记录患者生存情况。

1.4 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以 [$n(\%)$] 表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 对生存情况进行分析,Log-Rank 法检测组间生存差异; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组淋巴结组织中 miR-23a 和 MTSS1 的表达情况

在观察组淋巴结组织中,miR-23a 表达水平显著高于对照组,MTSS1 表达水平显著低于对照组,差异均具有统计学意义 ($t = 7.693, 16.853, P < 0.01$),见表 1;通过免疫组化检测,发现 MTSS1 阳性免疫组化染色呈棕黄色,见图 1。

表 1 两组淋巴组织中 miR-23a 和 MTSS1 的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-23a	Mtss1
观察组 ($n=65$)	4.59 ± 1.23	0.35 ± 0.20
对照组 ($n=35$)	2.96 ± 0.31	3.79 ± 1.63
t 值	7.693	16.853
P 值	0.001	0.001

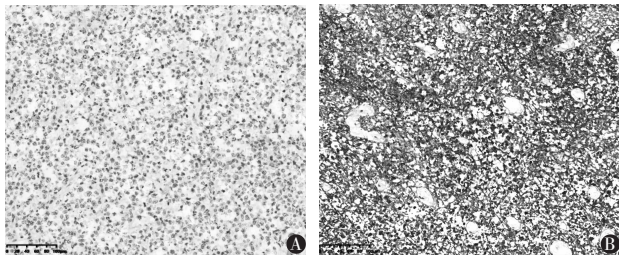


图 1 免疫组化检测组织中 MTSS1 表达

A. 阴性表达; B. 阳性表达。

2.2 DLBCL 患者淋巴结组织中 miR-23a 和 MTSS1 表达的相关性分析

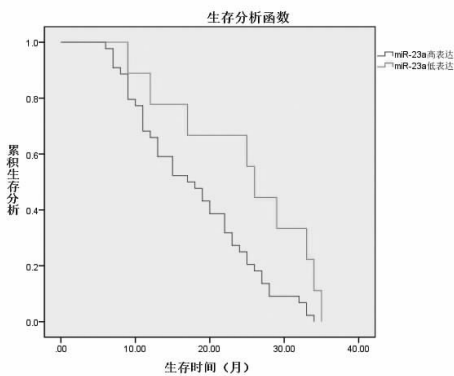
对 DLBCL 患者淋巴结组织中 miR-23a 和 MTSS1 表达进行相关性分析,发现 miR-23a 和 MTSS1 表达量之间呈负相关关系,差异具有统计学意义 ($r = -0.512, P < 0.01$),见表 2。

表 2 DLBCL 患者淋巴结组织中 miR-23a 和 MTSS1 表达的相关性分析

miR-23a	MTSS1		r 值	P 值
	阳性	阴性		
高表达	11	40	-0.512	$P < 0.01$
低表达	8	6		

2.3 DLBCL 患者淋巴结组织中 miR-23a、MTSS1 表达与其临床病理参数的关系

在 DLBCL 患者淋巴结组织中,miR-23a、MTSS1 表达与患者的年龄、性别无相关性,差异无统计学意



义 ($P > 0.05$),而与患者的 Ann Arbor 分期、有无淋巴结转移、IPI 评分明显相关,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 DLBCL 患者淋巴结组织中 miR-23a、MTSS1 表达与其临床病理参数的关系 [$n(\%)$]

临床特征	例数	miR-23a 高表达	χ^2 值	P 值	Mtss1 阴性	χ^2 值	P 值
年龄(岁)			0.013	0.910		0.244	0.621
≥60	38	30(78.95)			26(68.42)		
<60	27	21(77.78)			20(74.07)		
性别			0.146	0.703		0.030	0.863
男	40	32(80.00)			28(70.00)		
女	25	19(76.00)			18(72.00)		
Ann Arbor 分期			4.406	0.036		5.831	0.016
I-II 期	40	28(70.00)			24(60.00)		
III-IV 期	25	23(92.00)			22(88.00)		
淋巴结转移			6.508	0.011		6.157	0.013
有	36	32			30		
无	29	18			116		
IPI 评分(分)			6.519	0.011		5.950	0.015
0-1	23	14(60.87)			12(52.17)		
2-4	42	37(88.10)			34(80.95)		

2.4 miR-23a 和 MTSS1 表达与 DLBCL 患者预后的关系

对 65 例 DLBCL 患者随访 3 年,无失访,随访率为 100%。miR-23a 高表达患者生存率明显低于低表达患者,MTSS1 阳性患者生存率明显高于阴性患者,差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 5.180, 4.842, P < 0.05$)。见图 2。

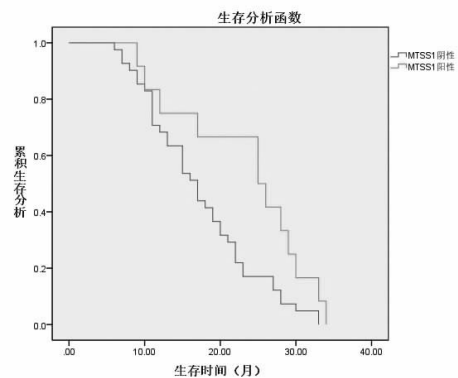


图 2 miR-23a、MTSS1 表达水平与 DLBCL 患者 3 年生存率的关系

3 结论

DLBCL 作为最常见的非霍奇金 B 细胞淋巴瘤,大约占有非霍奇金淋巴瘤的 30%。在 2008 年最新世界卫生组织分类中被定义为:一组有 B 细胞起

源和大肿瘤细胞的、临床表现具有侵袭性、需要强烈化疗的淋巴瘤^[7]。根据第四版 WHO 造血与淋巴组织肿瘤分类标准,DLBCL 被分为非特殊类型、特殊亚型和独立疾病,其中最为常见的是非特殊类型^[8]。目前,关于 DLBCL 的发病机制尚未完全清

楚,且诊断方法极易掩盖其多样化的遗传基础,使得该病的成功治疗受到很大的阻碍,因此,寻找新的高效早期诊断和治疗方式是目前的紧迫任务。

miRNA 作为一种非编码 RNA,在众多肿瘤中均出现表达失调的现象,成为肿瘤学中备受关注的生物分子之一,且约 50% 的 miRNA 基因聚集在染色体的脆性位点或癌基因、抑癌基因的断裂位区,参与到肿瘤的发生发展过程中^[9-11]。因此,miRNA 在肿瘤的早期诊断、治疗和预后方面具有很高的应用价值^[12]。miR-23a 是位于染色体 19p13.12 上的 miR-23a/24/27a 家族成员,近年来研究^[13-15]表明,miR-23a 高表达与胃癌、非小细胞肺癌、喉癌等多种肿瘤不良预后密切相关。本研究发现,miR-23a 在观察组中的表达水平明显高于对照组,差异具有统计学意义($t = 7.693, P < 0.01$);进一步分析 miR-23a 与 DLBCL 患者临床病理因素之间的关系发现,miR-23a 表达与患者的年龄、性别无相关性($P > 0.05$),与患者的 Ann Arbor 分期、有无淋巴结转移、IPI 评分明显相关($P < 0.05$);通过对 miR-23a 表达与 DLBCL 患者生存情况的分析发现,miR-23a 高表达患者生存率明显低于低表达患者,差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.180, P < 0.05$)。以上结果说明 miR-23a 可能参与 DLBCL 的发生与发展过程,并发挥促癌基因的作用。

MTSS1 是位于染色体 8q24.1 上的一种衔接蛋白,其 N 端含有丰富的脯氨酸组成的结构域,C 端含有 WH2 结构域,这两个结构域均参与肌动蛋白的生物学功能,从而达到调控细胞骨架的作用^[16-17]。有研究^[18]发现,MTSS1 在乳腺癌、宫颈癌、喉鳞癌等多种癌症中表达下调甚至缺失。在本研究中,MTSS1 在观察组中的表达水平明显低于对照组,差异具有统计学意义($t = 16.853, P < 0.01$);且对 miR-23a 和 MTSS1 在 DLBCL 中的相关性进行分析发现,miR-23a 和 MTSS1 表达量之间呈负相关关系,差异具有统计学意义($r = -0.512, P < 0.01$);进一步分析 MTSS1 与 DLBCL 患者临床病理因素之间的关系发现,MTSS1 表达也与患者的年龄、性别无关($P > 0.05$),与患者的 Ann Arbor 分期、有无淋巴结转移、IPI 评分明显相关($P < 0.05$);通过对 MTSS1 表达与 DLBCL 患者生存情况的分析发现,MTSS1 阳性患者生存率明显高于阴性患者,差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.842, P < 0.05$)。以上结果说明 MTSS1 对评价 DLBCL 的预测转移、恶性程度和判断预后有一定的参考价值,且与 miR-23a 一同参与 DLBCL 的发生发展过程。

综上所述,miR-23a 和 MTSS1 在 DLBCL 的发生、发展过程中起着重要的作用,并且与患者的预后密切

相关,同时 miR-23a 可能是 MTSS1 的一个靶基因,但由于本实验样本数较少,有待扩大样本进行深入研究。

参考文献

- [1] 涂义姚,张瑰红,杨枫,等.弥漫大 B 细胞淋巴瘤中 miR-339-5p 的表达及意义[J].临床与实验病理学杂志,2015,31(4):409-412.
- [2] Borsarelli CBA, Torresan DM, de Oliveira C, et al. Polymorphisms in key regulator genes of the intrinsic apoptosis pathway in risk and clinical presentation of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Hematol Oncol, 2016, 5(3): 2297-2307.
- [3] Lim EL, Trinh DL, Scott DW, et al. Comprehensive miRNA sequence analysis reveals survival differences in diffuse large B-cell lymphoma patients[J]. Genome Biol, 2015, 16(1): 18-26.
- [4] Ni H, Tong R, Zou L, et al. MicroRNAs in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Oncol Lett, 2016, 11(2): 1271-1280.
- [5] Schemionek M, Herrmann O, Reher MM, et al. Mtss1 is acritical epigenetically regulated tumor suppressor in CML[J]. Leukemia, 2016, 30(4): 823-832.
- [6] 中华医学会血液学分会,中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会,中华医学会肝病学会.中国淋巴瘤合并 HBV 感染患者管理专家共识[J].中华血液学杂志,2013,34(11):988-993.
- [7] Kim H, Kim IS, Lee EY, et al. First Case of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Subtype of Monomorphic Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder With 3q27 Translocation [J]. Ann Lab Med, 2016, 36(4): 380-383.
- [8] 张东光,杨文萍.弥漫大 B 细胞淋巴瘤研究进展[J].肿瘤药,2012,2(1):10-13.
- [9] Zhang Y, Li M, Xiao F, et al. Impact of partial DAZ1/2 deletion and partial DAZ3/4 deletion on male infertility[J]. Gene, 2015, 571(1): 9-16.
- [10] McGuire A, Kerin M, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring[J]. Cancer Metastasis Rev, 2015, 34(1): 145-55.
- [11] Ma J, Lin Y, Zhan M, et al. Differential miRNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of lung cancer[J]. Lab Invest, 2015, 95(10): 1197-1206.
- [12] Ors K, Gulce I, Biray A, et al. Therapeutic microRNAs in human cancer[J]. Cytotechnology, 2017, 71(1): 411-425.
- [13] Zhang XW, Liu N, Chen S, et al. High microRNA-23a expression in laryngeal squamous cell carcinoma is associated with poor patient-prognosis[J]. Diagn Pathol, 2015, 10(16): 22-31.
- [14] 何嵘,马业罡,刘宏旭. miR-23a/b 在非小细胞肺癌的表达及临床意义[J].解剖科学进展,2017,23(1):61-64.
- [15] Zhuang K, Han K, Tang H, et al. Up-regulation of plasma miR-23a is associated with poor prognosis of gastric cancer[J]. Med Sci Monit, 2016, 22(3): 356-361.
- [16] Giacobbe A, Compagnone M, Bongiorno-Borbone L, et al. P63 controls cell migration and invasion by transcriptional regulation of MTSS1[J]. Oncogene, 2016, 5(12): 1602-1608.
- [17] Schemionek M, Kharabi Masouleh B, Klaile Y, et al. Identification of the adapter molecule MTSS1 as a potential oncogene-specific tumor suppressor in acute myeloid leukemia[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0125783.
- [18] Schemionek M, Herrmann O, Reher MM, et al. Mtss1 is acritical epigenetically regulated tumor suppressor in CML[J]. Leukemia, 2016, 30(4): 823-832.

(收稿日期:2020-01-30)

学术编辑:谭榜宪)