

论 著

【文章编号】1006-6233(2019)02-0177-06

## miR-144-3p 和 SGK3 在口腔鳞癌中的表达水平及临床意义

颜孟雄, 华 炜, 高桂林

(湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院口腔科, 湖北 恩施 445000)

**【摘要】目的:**探究口腔鳞癌(OSCC)组织中 miR-144-3p 和血清和糖皮质激素调节蛋白激酶 3 (SGK3) 的表达,分析二者与临床病理特征及预后的关系。**方法:**收集 78 例 OSCC 组织标本作为病例组,另选正常口腔黏膜上皮组织标本作为对照组,实时定量 PCR 法(RT-PCR 法)检测组织中 miR-144-3p、SGK3 的相对表达,Western blot 法、免疫组化法检测组织中 SGK3 蛋白表达,分析二者与临床病理特征及预后的关系。制作受试者工作特征曲线(ROC),评估 miR-144-3p 和 SGK3 对 OSCC 的诊断效能;所有患者均进行 30 个月随访,统计患者生存率,采用 Kaplan-Meier 对生存情况进行分析,Log-Rank 法检测组间生存差异。Pearson 相关性分析 miR-144-3p、SGK3 二者相关性。**结果:**与对照组相比,OSCC 组 miR-144-3p mRNA 表达升高,SGK3 mRNA、蛋白、蛋白阳性表达率均降低( $P<0.05$ ),miR-144-3p 表达、SGK3 阳性表达与性别、年龄、吸烟情况、肿瘤浸润深度无关( $P>0.05$ ),与 TNM 分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移有关( $P<0.05$ )。ROC 曲线显示 miR-144-3p 预测 OSCC 的 AUC 为 0.767,敏感度 71.79%,特异度 63.96%。SGK3 预测 OSCC 的 AUC 为 0.683,敏感度 66.67%,特异度 75.64%。随访 30 个月,27 例患者死亡,生存率为 65.38%。miR-144-3p 高表达组死亡率(44.68%)、SGK3 阴性组死亡率(48.78%)明显高于 miR-144-3p 低表达组(19.35%)、SGK3 阳性组(18.92%),Kaplan-Meier 生存曲线显示,两组患者总体生存率差异显著( $P<0.05$ )。miR-144-3p 与 SGK3 表达呈显著负相关( $r=-0.417, P<0.05$ )。**结论:**miR-144-3p 在 OSCC 组织中表达上调,SGK3 表达下调,与肿瘤分期、分化程度、淋巴结转移有关,可能作为 OSCC 诊断、预后的生物学指标。

**【关键词】** 口腔鳞癌; 微小 RNA; 血清/糖皮质激素调节蛋白激酶 3

【文献标识码】 A

【doi】10.3969/j.issn.1006-6233.2019.02.001

## Expressions and Clinical Significances of MiR-144-3p L and SGK3 in Oral Squamous Cell Carcinoma

YAN Mengxiong, HUA Wei, GAO Guilin

(Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Hubei Enshi 445000, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the expressions of miR-144-3p and serum/glucocorticoid regulated protein kinase 3 (SGK3) in the oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissues, and to analyze the relationships between the them with the clinicopathological feature and prognosis. **Methods:** 78 cases of OSCC tissue specimens were selected as case group, and normal oral mucosa epithelium specimens were taken as control group, real time quantitative PCR (RT-PCR) was used to detect the relative expressions of miR-144-3p and SGK3 in tissues, Western blot and immunohistochemistry were used to detect the SGK3 protein expression in tissues, the relationships between the them with clinicopathological features and prognosis were analyzed. The working characteristic curve (ROC) of the subjects was made, evaluated the diagnostic efficiencies of miR-144-3p and SGK3 for OSCC; all patients were followed up for 30 months, the survival rate of patients was statistically analyzed, survival was analyzed by Kaplan-Meier, survival differences between the two groups were detected by Log-Rank. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between miR-144-3p and SGK3. **Results:** Compared with the control group, the expression of miR-144-3p mRNA in OSCC group was increased, SGK3 mRNA, protein and protein positive expression were all decreased ( $P<0.05$ ),

miR-144-3p expression and SGK3 positive expression were not related to sex, age, smoking status and depth of tumor invasion ( $P>0.05$ ), was related to TNM stage, tumor differentiation and lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). The ROC curve showed that the AUC of miR-144-3p in the prediction of OSCC was 0.767, the sensitivity was 71.79%, and the specificity was 63.96%. The AUC of SGK3 in the prediction of OSCC was 0.683, the sensitivity was 66.67%, and the specificity was 75.64%. Followed up for 30 months, 27 patients died, the survival rate was 65.38%. The mortality rates of miR-144-3p high expression group (44.68%) and SGK3 negative group (48.78%) were significantly higher than those of miR-144-3p low expression group (19.35%) and SGK3 positive group (18.92%), Kaplan-Meier survival curve showed that the overall survival rate of the two groups was significantly different ( $P<0.05$ ). There was a significant negative correlation between miR-144-3p and SGK3 expression ( $r=-0.417$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion:** The expression of miR-144-3p in OSCC tissues is up-regulated, and the expression of SGK3 is down-regulate, it is related to the stage of tumor, the degree of differentiation, and lymph node metastasis, it may be a biological indicator of the diagnosis and prognosis of OSCC.

**【Key words】** Oral squamous cell carcinoma; Micro RNA; Serum/glucocorticoid regulated protein kinase 3

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)属于头颈部常见恶性肿瘤,调查显示近年来发病率逐年升高有年轻化的趋势。临床主要采用手术治疗、放化疗等,但预后仍较差,易出现局部复发、远处转移,因此早期发现、诊断及治疗,对于提高 OSCC 生存率具有积极的意义<sup>[1]</sup>。OSCC 发生、发展涉及多种基因、蛋白,因此筛选出诊断效能高的分子标志物,对其靶向治疗具有十分重要的意义。miR-144-3p 属于微小 RNA 的一种,近年来研究显示其参与调控癌细胞的增殖,在直肠癌、胶质瘤细胞、肾癌细胞中均呈高表达,可促进癌细胞的增殖、迁移,发挥促癌基因的作用<sup>[2,3]</sup>。血清与糖皮质激素调节激酶 3 (serum/glucocorticoid regulated kinase 3, SGK3) 属于激酶分子,研究显示,在肝癌、胶质瘤细胞、前列腺癌中均呈现低表达,过表达可抑制癌细胞的增殖、存活<sup>[4]</sup>。因此,miR-144-3p 和 SGK3 的异常表达与癌症的发生密切相关,但在 OSCC 中报道较少。本文通过检测 OSCC 组织中 miR-144-3p 和 SGK3,并分析其表达与临床参数、患者预后的关系,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料:**收集 2012 年 3 月至 2015 年 9 月在本院接受治疗的 78 例 OSCC 病理标本进行研究。OSCC 患者中男 43 例,女 35 例;年龄 30~72 岁,平均年龄(54.03±7.18)岁;低分化 34 例,中分化 16 例,高分化 28 例;术中发现淋巴结转移 41 例,淋巴结未转移 37 例。另外收集 40 例同期在本院进行牙槽嵴整形手术者口腔黏膜上皮组织标本作为对照组,以上所有病理标本取出后立即保存在液氮中。纳入标准:①所有研究标本均经组织病理学确诊;②患者术前未行放疗、化疗或其他相关治疗;③初次发病;④患者知情同意,临

床资料完整。排除标准:①伴其他部位恶性肿瘤;②伴感染性、毒性或自身免疫性疾病;③伴严重心脑血管疾病及内分泌系统疾病。本研究经本院伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂:**miR-144-3p 和 SGK3 引物均于上海生工生物工程有限公司合成;RNA 提取试剂盒购自于北京天根生化科技有限公司;miRNA 反转录试剂盒、蛋白提取试剂盒购自美国 Thermo scientific 公司;RT-PCR 反应试剂盒购自日本 Takara 公司;蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;鼠抗人 SGK3、 $\beta$ -actin 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 RT-PCR 检测组织中 miR-144-3p 和 SGK3 mRNA 表达:**从液氮中取出预冻存的组织,利用 Trizol 法提取总 RNA,参照 RNA 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,反应体系为 20 $\mu$ L:2 $\times$ SYBR Premix 10 $\mu$ L, H2O 8 $\mu$ L, cDNA 1 $\mu$ L,上下游引物各 0.5 $\mu$ L。反应程序:起始 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min;95 $^{\circ}$ C 变性 10s、60 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 2min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。根据 2<sup>- $\Delta\Delta$ Cq</sup> 算法以 GADPH 作为内参基因进行计算 SGK3mRNA 表达量,以 U6 作为内参基因计算 miR-144-3p mRNA 表达量。见表 1。

**1.3.2 Western blot 检测组织中 SGK3 蛋白表达:**取出组织后添加裂解液,研磨、离心后收集上清液,参照细胞总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,BCA 法测定提取蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳结束后,将蛋白凝胶转移至 PVDF 膜上行转膜反应,加入脱脂牛奶封闭后,加入一抗 SGK3 抗体(1:500),4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 清洗后加入羊抗鼠 IgG 二抗(1:1000),室温下放置 2h, TBST 清洗后 ECL 显色,置于凝胶成像仪中观察蛋白表达情况。

表1 RT-PCR引物

基因名称		序列(5'-3')
miR-144-3p	F	ACACTCCAGCTGGGTACAGTATAGATGATGTA
	R	CTCAACTGGTGTCTCGTGGA
U6	F	CTCGCTTCGGCAGCACA
	R	AACGCTTCACGAATTTGCGT
SGK3	F	CGGGATCCCAAAGAGATCACACCATG
	R	GAGCGGCCGCCAAAAATAAGTCTTCTGAAGG
GADPH	F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	R	GAAGATGGTGATGGGATTTTC

**1.3.3 免疫组化检测胆囊组织中SGK3蛋白表达:**常规制备标本组织石蜡切片脱水后置于柠檬酸盐缓冲液抗原热修复,加入过氧化氢溶液孵育25min,PBS溶液清洗后,添加山羊血清封闭15min,加SGK3一抗置于4℃冰箱中过夜孵育,PBS清洗后加入二抗室温下孵育1h,PBS溶液清洗后添加DAB显色液进行显色,蒸馏水清洗后,添加苏木素复染,冲洗后置于1%盐酸中10s后清洗,随后在乙醇中脱水,滴加二甲苯进行透明处理,用中性树脂进行封片,置于显微镜下进行观察。每张切片挑选10个视野,计算阳性染色细胞数比例。

**1.3.4 评价指标:**分析miR-144-3p和SGK3表达与患者临床病理参数的关系,以检测miR-144-3p和SGK3中位值作为临界值,比较高水平、低水平miR-144-3p和SGK3表达患者预后情况。

**1.3.5 随访:**所有患者均进行30个月随访,采用电话或复诊的方式进行。

**1.4 统计学处理:**应用SPSS21.0软件进行统计学分析。计数资料采用(%)表示,采用 $\chi^2$ 检验;计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用t检验;制作受试者工作特征曲线评估miR-144-3p和SGK3在OSCC中的诊断效能,采用Kaplan-Meier对生存情况进行分析,Log-Rank法检测组间生存差异,Pearson相关性分析miR-144-3p和SGK3二者相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 口腔组织中miR-144-3p和SGK3mRNA表达:**与对照组相比,OSCC组miR-144-3pmRNA表达升高,SGK3 mRNA表达降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表2。

**2.2 SGK3蛋白表达:**与对照组相比,OSCC组SGK3蛋白表达、蛋白阳性表达率降低,差异有统计学意义

( $P<0.05$ )。见图1、表3。

表2 两组口腔组织中miR-144-3p和SGK3mRNA表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	miR-144-3p	SGK3
OSCC组	78	0.74±0.12	0.19±0.04
对照组	40	0.24±0.04	0.70±0.13
t		25.587	31.934
P		0.000	0.000

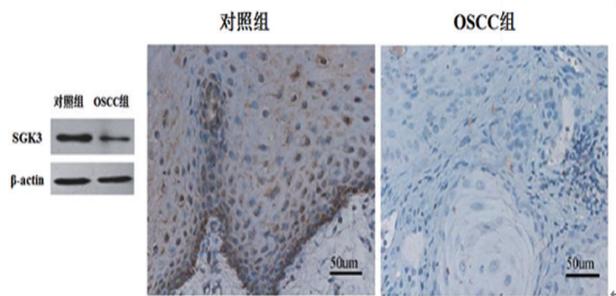


图1 SGK3蛋白检测结果

表3 两组SGK3蛋白表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	SGK3	SGK3阳性率(%)
OSCC组	78	0.17±0.04	21.39±2.95
对照组	40	0.72±0.15	76.35±10.22
t		30.499	44.194
P		0.000	0.000

**2.3 口腔组织中miR-144-3p、SGK3表达与临床参数**

的关系:以高于 miR-144-3p mRNA 平均值作为高表达组,低于其平均值作为低表达组,miR-144-3p 表达、SGK3 阳性表达与性别、年龄、吸烟情况、肿瘤浸润

深度无关( $P>0.05$ ),与 TNM 分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移有关,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4。

表 4 OSCC 者 miR-144-3p、SGK3 表达与临床参数关系

临床特征	miR-144-3p 高表达 (n=47)	miR-144-3p 低表达 (n=31)	$\chi^2$	P	SGK3 阳性 (n=37)	SGK3 阴性 (n=41)	$\chi^2$	P
性别			0.790	0.374			0.056	0.814
男	24	19			21	22		
女	23	12			16	19		
年龄			0.057	0.811			1.725	0.189
≤50 岁	21	13			19	15		
>50 岁	26	18			18	26		
吸烟			0.257	0.612			1.195	0.274
是	27	16			18	25		
否	20	15			19	16		
TNM 分期			5.606	0.018			4.403	0.036
I、II 期	31	12			25	18		
III、IV 期	16	19			12	23		
肿瘤分化程度			14.081	0.001			12.500	0.002
低	28	6			9	25		
中	9	7			8	8		
高	10	18			20	8		
淋巴结转移			4.893	0.027			6.122	0.013
有	29	12			14	27		
无	16	19			23	14		
肿瘤浸润深度			0.173	0.678			0.000	0.999
Tis-T2	22	16			18	20		
T3~T4	25	15			19	21		

**2.4** 口腔组织中 miR-144-3p、SGK3 诊断 OSCC 效能分析:ROC 曲线分析显示组织 miR-144-3p 预测 OSCC 的 AUC 为 0.767(95%CI:0.585~0.794),见图 2,敏感度 71.79%,特异度 63.96%。组织 SGK3 预测 OSCC 的 AUC 为 0.683(95%CI:0.568~0.712),见图 3,敏感度 66.67%,特异度 75.64%。

**2.5** 口腔组织中 miR-144-3p、SGK3 与患者预后的关

系分析:所有患者均随访 30 个月,无失访患者,共 27 例患者出现死亡,整体生存率为 65.38%。miR-144-3p 高表达组患者 47 例,其中 21 例(44.68%)患者死亡;低表达组患者 31 例,其中 6 例(19.35%)患者死亡。Kaplan-Meier 生存曲线显示,两组患者总体生存率差异有统计学意义( $P<0.05$ )。SGK3 阳性组患者 37 例,其中 7 例(18.92%)患者死亡;阴性组患者 41 例,

其中20例(48.78%)患者死亡。Kaplan-Meier生存曲线显示,两组患者总体生存率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图4和图5。

呈显著负相关( $r = -0.417, P < 0.05$ )。见图6。

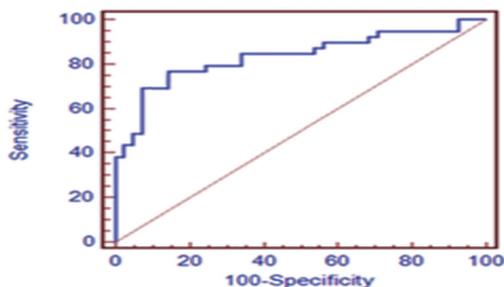


图2 miR-144-3p预测OSCC的ROC曲线分析

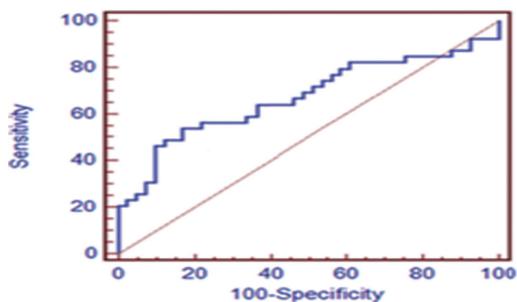


图3 SGK3预测OSCC的ROC曲线分析

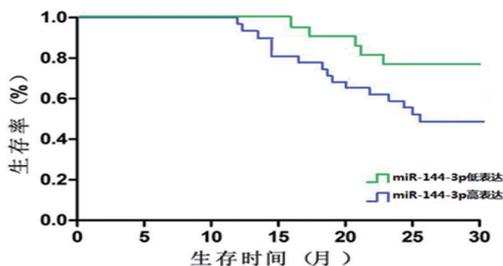


图4 miR-144-3p不同表达患者预后生存曲线分析

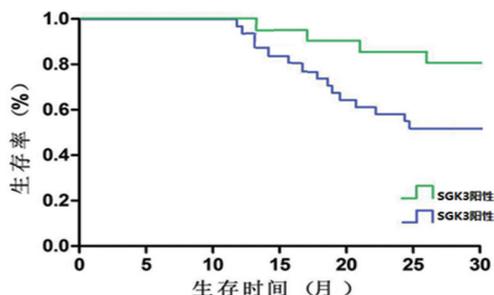


图5 SGK3不同表达患者预后生存曲线分析

### 2.6 OSCC中miR-144-3p、SGK3表达的相关性; Pearson相关性分析显示,miR-144-3p与SGK3表达

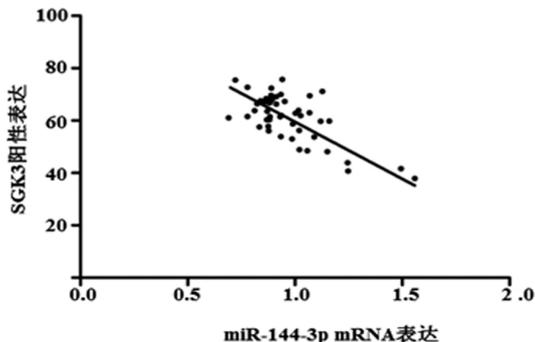


图6 miR-144-3p、SGK3相关性分析

### 3 讨论

MicroRNAs包含22个核苷酸序列,通过结合靶基因的3'UTR区域抑制靶标mRNA翻译,与癌症的发生发展、转移密切相关,其能够作为促癌基因,也能够作为抑癌基因<sup>[5]</sup>。MicroRNAs在OSCC中已广泛报道,如miR-1271、miR-188在OSCC中下调表达,促进癌细胞转移<sup>[6,7]</sup>。探究OSCC中miRNAs的表达,对于探究OSCC的发生、发展机理十分重要。

miR-144位于染色体17q11.2,有miR-144-3p和miR-144-5p两种形式。楼宁等通过miRNAs芯片对肾癌组织microRNA表达分析,结果显示miR-144-3p在肾透明细胞癌组织中表达明显高于正常组织<sup>[8]</sup>。Hela细胞中研究发现抑制miR-144-3p表达后可明显降低癌细胞的增殖、迁移,发挥促癌基因的功能<sup>[9]</sup>。在喉鳞状细胞癌、非小细胞肺癌中研究均显示,过表达miR-144-3p能够明显抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[10,11]</sup>。研究提示在不同的肿瘤中miR-144-3p表达特异性不同。本研究结果显示OSCC中miR-144-3p表达水平显著升高,且与OSCC肿瘤分期、肿瘤转移有关,提示miR-144-3p与OSCC的发生、发展密切相关。预后分析显示miR-144-3p高表达者预后较差,提示,miR-144-3p可以作为预测OSCC患者预后的生物标志物。

SGK3位于染色体8q12.2,在癌症的发生中发挥重要作用,Liu等研究显示在胶质母细胞瘤中miR212-3p可通过靶向SGK3抑制细胞的增殖<sup>[12]</sup>。在卵巢癌中研究显示SGK3可促进癌细胞增殖、迁移<sup>[13]</sup>。鼻咽癌中研究显示SGK3蛋白阳性表达率明显高于慢性鼻炎组<sup>[14]</sup>。目前在OSCC中关于SGK3的报道较少。本研究发现,OSCC组织中SGK3蛋白表达明显降低,与OSCC临床分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移有关,提示,SGK3参与OSCC的发生进展。预后分析显示SGK3阴性者预后较差,提示,SGK3可作为预测OSCC患者预后的生物标志物。miRNA、SGK3在OSCC中的异常表达有可能成为早期诊断、治疗的靶点。本研究

显示 OSCC 组织中 miR-144-3p 和 SGK3 对 OSCC 诊断均有一定的价值,提示二者可能是 OSCC 的潜在诊断标志物。

miRNA 一般通过结合靶基因 3'UTR 发挥抑癌或促癌作用。研究证实,在肝癌细胞中 miR-144-3p 特异性与 SGK3 序列中的 3'UTR 结合,进而抑制靶标的表达<sup>[15]</sup>。本研究分析显示 miR-144-3p 和 SGK3 呈显著性负相关,但是在二者在 OSCC 中是否存在靶向关系,还有待后续进行深入探究。

综上所述,在 OSCC 组织中 SGK3 呈下调表达,而 miR-144-3p 呈上调表达,二者成负相关与患者的预后有关,可作为 OSCC 诊断指标。但本研究仅从临床水平研究二者在 OSCC 中的临床意义以及相关性,并未从分子机制上研究二者具体的调控模式,这有待后续进一步探究。

#### 【参考文献】

[1] 黄江峰,何保昌,陈法,等.口腔卫生状况及慢性病与口腔鳞状细胞癌的关系研究[J].中华预防医学杂志,2015,49(8):688~692.

[2] Lan F, Yu H, Hu M, et al. miR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met[J]. Journal of Neurochemistry, 2015, 135(2):274~286.

[3] Xiao W, Lou N, Ruan H, et al. Mir-144-3p promotes cell proliferation, metastasis, sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma by downregulating ARID1A[J]. Cellular Physiology & Biochemistry, 2017, 43(6):2420~2433.

[4] Wang Y, Zhou D, Chen S. SGK3 is an androgen-inducible kinase promoting prostate cancer cell proliferation through activation of p70 S6 kinase and up-regulation of cyclin D1[J]. Molecular Endocrinology, 2014, 28(6):935~948.

[5] 白黎露,姚宏,张海军,等.microRNA 在口腔鳞癌中的研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(16):3163~3166.

[6] Kong D, Zhang G, Ma H, et al. miR-1271 inhibits OSCC

cell growth and metastasis by targeting ALK[J]. Neoplasma, 2015, 62(4):559~567.

[7] Wang L, Liu H. microRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3):4105~4113.

[8] 楼宁.miR-144-3p 在肾透明细胞癌中作为肿瘤标记物的鉴定及其生物学功能的研究[D].华中科技大学,2016.

[9] Tao P, Wen H, Yang B, et al. miR-144 inhibits growth and metastasis of cervical cancer cells by targeting VEGFA and VEGFC[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2018,12(6):562~568.

[10] Zhang S Y, Lu Z M, Lin Y F, et al. miR-144-3p, a tumor suppressive microRNA targeting ETS-1 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(10):11637~11650.

[11] Gao F, Wang T, Zhang Z, et al. Regulation of activating protein-4-associated metastases of non-small cell lung cancer cells by miR-144[J]. Tumor Biology, 2015,8(1):1~7.

[12] Liu H, Li C, Shen C, et al. MiR-212-3p inhibits glioblastoma cell proliferation by targeting SGK3.[J]. Journal of Neuro-Oncology, 2015, 122(3):431~439.

[13] 胡可可,宋泓,于渊毅.蛋白激酶 SGK3 过表达促进卵巢癌细胞 SKOV3 增殖和侵袭[J].临床合理用药杂志,2017,10(17):159~161.

[14] Kong X, Liu F, Gao J. MiR-155 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells through the activation of PI3K/SGK3/ $\beta$ -catenin signaling pathways:[J]. Oncotarget, 2016, 7(40):66051~66060.

[15] Wu M, Huang C, Huang X, et al. MicroRNA-144-3p suppresses tumor growth and angiogenesis by targeting SGK3 in hepatocellular carcinoma[J]. Oncology Reports, 2017, 38(4):659~664.

【文章编号】1006-6233(2019)02-0182-05

## 血清 $\beta$ -HCG hs-CRP IL-6 联合检测对胎膜早破合并宫内感染的诊断价值分析

李洁

(青海省红十字医院产二科, 青海 西宁 810018)

【摘要】目的:分析血清人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -HCG)、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)联合检测对胎膜早破合并宫内感染的诊断价值。方法:我院 2016 年 6 月至 2017 年 6 月期间确诊的 82 例胎膜早破孕妇根据胎膜组织学诊断是否发生宫内感染分为感染组和对照组,抽取两组孕妇空腹静脉血标本,检测血清  $\beta$ -HCG、hs-CRP、IL-6 水平,并按照受试者工作特征(ROC)曲线确定三项血

【基金项目】青海省卫生厅资助基金项目,(编号:2015044687)