

膀胱尿路上皮癌组织中 miR-372-5p、CDH1 的表达水平及其临床意义

李红波¹ 李月兵¹

[摘要] 目的:探讨微小 RNA-372-5p(miR-372-5p)、E-钙黏蛋白(CDH1)表达与膀胱尿路上皮癌患者预后的关系。方法:选取 2014 年 7 月—2015 年 9 月于本院确诊的 94 例膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织作为膀胱癌组,选取其癌旁正常组织作为对照组。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 miR-372-5p 表达水平,免疫组织化学法检测 CDH1 蛋白表达,Ualcan 数据库检索 CDH1 在膀胱尿路上皮癌中的表达;Kaplan-Meier 法分析膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织 miR-372-5p、CDH1 表达与预后的关系;多因素 Cox 回归分析影响膀胱尿路上皮癌患者预后的因素。结果:Ualcan 数据库中,膀胱尿路上皮癌肿瘤组织中 CDH1 水平高于正常膀胱组织($P < 0.05$)。膀胱癌组 miR-372-5p 表达水平低于对照组,CDH1 阳性表达率高于对照组($P < 0.05$)。肿瘤大小 > 3 cm、可见肌层浸润、组织学分级 3 级膀胱尿路上皮癌患者 miR-372-5p 低表达、CDH1 阳性表达比例高于肿瘤大小 ≤ 3 cm、未见肌层浸润、组织学分级 1、2 级患者($P < 0.05$)。miR-372-5p 高表达膀胱尿路上皮癌患者 5 年生存率高于 miR-372-5p 低表达患者(88.89% vs. 67.35%, $\chi^2 = 6.274, P < 0.05$);CDH1 阳性表达膀胱尿路上皮癌患者 5 年生存率低于 CDH1 阴性表达患者(70.00% vs. 91.18%, $\chi^2 = 5.609, P < 0.05$)。CDH1 是影响膀胱尿路上皮癌患者预后死亡的独立危险因素($P < 0.05$),miR-372-5p 是影响膀胱尿路上皮癌患者预后死亡的保护因素($P < 0.05$)。结论:膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织中 miR-372-5p 表达下调、CDH1 表达上调,二者均与临床病理特征相关,且是患者预后的影响因素。

[关键词] 膀胱尿路上皮癌;微小 RNA-372-5p;E-钙黏蛋白;临床病理特征;预后

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2021.08.002

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

Expression and clinical significance of miR-372-5p and CDH1 in bladder urothelial carcinoma

LI Hongbo LI Yuebing

(Department of Urology, Affiliated Rugao Hospital of Nantong University, Rugao People's Hospital, Rugao, Jiangsu, 226500, China)

Corresponding author: LI Hongbo, E-mail: obf805@163.com

Abstract Objective: To investigate the relationship between the expression of microRNA-372-5p (miR-372-5p), E-cadherin (CDH1) and clinicopathological characteristics, prognosis of bladder urothelial carcinoma. **Methods:** From July 2014 to September 2015, tumor tissues of ninety-four patients with bladder urothelial carcinoma were selected as the bladder cancer group, and the adjacent normal tissues were selected as the control group. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression level of miR-372-5p, and immunohistochemistry was used to detect the expression of CDH1 protein. The expression of CDH1 in bladder urothelial carcinoma was retrieved using Ualcan database. Kaplan-Meier method was used to analyze the relationship between the expression of miR-372-5p, CDH1 and prognosis in patients with bladder urothelial carcinoma. Multivariate Cox regression analysis was used to analyze the prognostic factors of bladder urothelial carcinoma. **Results:** In the Ualcan database, the level of CDH1 in bladder urothelial carcinoma was higher than that in normal bladder tissue ($P < 0.05$). The expression level of miR-372-5p in bladder cancer group was lower than that in control group, and the positive expression rate of CDH1 was higher than that in control group ($P < 0.05$). The proportions of miR-372-5p low expression and CDH1 positive expression in patients with tumor size > 3 cm, muscle layer infiltration and histological grade 3 were higher than those with tumor size ≤ 3 cm, without muscle layer infiltration and histological grade 1 and 2 ($P < 0.05$). The 5-year survival rate of bladder urothelial carcinoma with high expression of miR-372-5p was higher than that of patients with low expression of miR-372-5p (88.89% vs. 67.35%, $\chi^2 = 6.274, P < 0.05$). The 5-year survival rate of patients with CDH1 positive expression was lower than that of patients with CDH1 negative expression (70.00% vs. 91.18%, $\chi^2 = 5.609, P < 0.05$). CDH1 was an independent risk factor for the prognostic death of patients with bladder urothelial carcinoma ($P < 0.05$), while miR-372-5p was a protective factor ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of miR-372-5p is down-regulated and

¹南通大学附属如皋医院 江苏省如皋市人民医院泌尿外科(江苏如皋,226500)
通信作者:李红波,E-mail:obf805@163.com

the expression of CDH1 is up-regulated in bladder urothelial carcinoma. Both of them are related to clinicopathological features and are the influencing factors of prognosis.

Key words bladder urothelial carcinoma; microRNA-372-5p; E-cadherin; clinicopathological features; prognosis

膀胱癌恶性程度较高,是最常见的泌尿系统肿瘤^[1]。大多数膀胱癌为膀胱尿路上皮癌,其发病率和死亡率均较高,尽管近几年其治疗手段发展较快,但患者5年生存率仍不理想^[2]。因此,临床中寻找与膀胱癌病情进展及预后相关性较高的生化指标十分必要。微小RNA(microRNA, miRNA)与多种癌症的发生、发展密切相关,部分已成为诊断及预后评估的潜在生物标志物^[3]。miR-372在乳腺癌、前列腺癌等癌症中均呈异常表达^[4]。E-钙黏蛋白(E-cadherin, CDH1)表达于所有上皮细胞,在胃癌等癌症中均呈低表达^[5]。本研究前期通过生物学信息网站 miRDB(<http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>)预测到 miR-372-5p 与 CDH1 间有靶向调控作用,但目前关于 miR-372-5p、CDH1 表达与膀胱癌相关性的研究较少,因此,本研究通过探讨 miR-372-5p、CDH1 表达与膀胱尿路上皮癌患者临床病理特征及预后的关系,以期对膀胱尿路上皮癌的诊疗提供一定的实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年7月—2015年9月于本院确诊的94例膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织作为膀胱癌组,其中男52例,女42例;年龄47~81岁,平均(60.36±11.29)岁。选取其癌旁正常组织作为对照组。

纳入标准:①患者均经组织病理学检查及膀胱镜检确诊为膀胱癌^[6];②临床资料记录完整,且经本院临床研究伦理委员会批准;③首次确诊,且术前均未进行任何化疗、放疗、免疫治疗及生物靶向治疗者。排除标准:①伴有严重肝、肾脏器衰竭者;②伴有严重心血管疾病或其他类型恶性肿瘤者;③伴有其他血液疾病或自身免疫疾病者。

1.2 主要试剂与仪器

RNA提取试剂盒(货号:TR205-50)购自北京天漠科技发展有限公司;miScript SYBR[®] Green qPCR Kit(货号:218073),购自德国 QIAGEN 公司;反转录试剂盒(货号:RP1105)购自上海振誉生物科技有限公司;免疫组化试剂盒(货号:11719386001)购自德国罗氏公司;CDH1单克隆抗体(货号:MAB1388)购自上海科敏生物科技有限公司;生物素标记的羊抗鼠 IgG(二抗)(货号:010-14031)购自广州威佳科技公司。qRT-PCR仪(型号:7500),购自美国ABI公司。

1.3 研究方法

1.3.1 样品采集及保存 采集膀胱尿路上皮癌患者术中肿瘤组织标本及其对照癌旁正常组织标本,保存待测。

1.3.2 一般资料收集 收集并整理患者门诊及住院资料,主要包括年龄、性别、吸烟史、肌层浸润情况、肿瘤大小、病灶数、组织学分级等。

1.3.3 qRT-PCR法检测膀胱尿路上皮癌肿瘤组织及癌旁正常组织 miR-372-5p 表达水平 采用RNA提取试剂盒提取膀胱尿路上皮癌肿瘤组织及癌旁正常组织总RNA,反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)仪对 miR-372-5p 及其内参 U6 进行扩增,引物序列见表1,引物由上海生工生物工程有限公司合成。qRT-PCR反应体系共20 μL:cDNA(50 ng/μL)2 μL, miScript SYBR[®] Green Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.8 μL, ddH₂O 6.4 μL。每个样品设3个重复孔,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 miR-372-5p 相对表达量。

表1 qRT-PCR引物序列

基因	上游引物	下游引物 5'
miR-372-5p	5'-GATAGGTCAGCATACGTACTAC-3'	5'-CGTATGGTCACGTACTCCCAG-3'
U6	5'-CATCGTATATGGATGTACTGG-3'	5'-CTGTAGGAACAATCTGCATCG-3'

1.3.4 CDH1蛋白水平测定 采用免疫组织化学法检测组织 CDH1 蛋白表达水平。依照常规免疫组化方法,按照免疫组化试剂盒说明书操作。结果随机选5个高倍镜视野(10×10)进行观察,计数200个细胞,以胞浆内出现棕褐色或棕黄色为阳性细胞,以阳性细胞占计数细胞百分比为阳性细胞比例。采用半定量法进行评分,首先按染色强度计

分:棕褐色为3分,棕黄色为2分,浅黄色为1分,无色为0分;之后按照阳性细胞比例计分,阳性细胞比例1/3以下为1分,1/3~2/3为2分,2/3以上为3分。最终得分为2次评分乘积,≤2分为阴性表达,>2分为阳性表达。

1.3.5 Ualcan数据库检索 在Ualcan数据库(<http://ualcan.path.uab.edu>)中检索。设定 gene

symbol 为 CDH1, 设定 TCGA 数据集为 Bladder urothelial carcinoma, 进行 CDH1 表达分析。

1.3.6 随访 手术后 5 年内对所有患者采用电话以及患者入院复查等方式进行随访, 术后 1~3 年内平均每 3~6 个月随访 1 次, 术后 4~5 年内每半年随访 1 次。其生存期从手术之日起计算, 随访截至 2020 年 9 月。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较行 *t* 检验; 计数资料以例 (%) 表示, 组间比较行 χ^2 检验; 采用 Kaplan-Meier 法分析膀胱尿路上皮癌患者 miR-372-5p、CDH1 表达与预后的关系, 用 log-rank 对生存曲线进行显著性检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准; 采用多因素 Cox 回归分析影响膀胱尿路上皮癌患者预后的因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ualcan 数据库正常膀胱组织及膀胱尿路上皮癌肿瘤组织中 CDH1 表达水平比较

Ualcan 数据库中, 膀胱尿路上皮癌肿瘤组织中 CDH1 水平高于正常膀胱组织, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1。

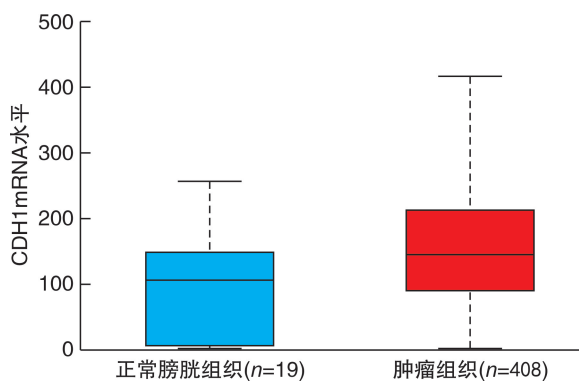


图 1 Ualcan 数据库正常膀胱组织及膀胱尿路上皮癌肿瘤组织中 CDH1 表达水平比较

2.2 对照组和膀胱癌组 miR-372-5p、CDH1 表达水平比较

膀胱癌组 miR-372-5p 表达水平低于对照组, CDH1 阳性表达率高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2 和图 2。

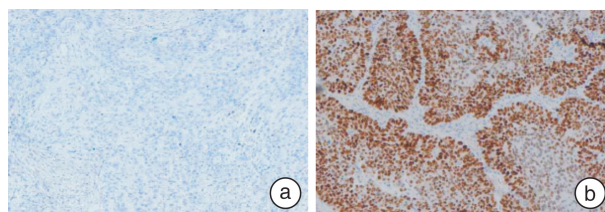
2.3 膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织 miR-372-5p、CDH1 表达与临床病理特征的关系

根据膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织 miR-372-5p 表达水平平均值 (0.67) 及 CDH1 是否阳性表达, 将患者分为 miR-372-5p 高表达组 45 例, miR-372-5p 低表达组 49 例; CDH1 阳性表达组 60 例, CDH1 阴

性表达组 34 例。不同年龄、性别、吸烟史、病灶发生个数患者 miR-372-5p、CDH1 表达比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 肿瘤大小 >3 cm、可见肌层浸润、组织学分级 3 级膀胱尿路上皮癌患者 miR-372-5p 低表达、CDH1 阳性表达比例高于肿瘤大小 ≤ 3 cm、未见肌层浸润、组织学分级 1、2 级患者, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 2 对照组和膀胱癌组 miR-372-5p、CDH1 表达水平比较

组别	例数	miR-372-5p	CDH1 阳性表达例 (%), $\bar{x} \pm s$
对照组	94	1.01 ± 0.23	29 (30.85)
膀胱癌组	94	0.67 ± 0.20	60 (63.83)
<i>t</i> / χ^2	—	10.815	20.505
<i>P</i>	—	0	0



a, 癌旁正常组织 CDH1 蛋白阴性表达; b, 肿瘤组织 CDH1 蛋白阳性表达。

图 2 对照组和膀胱癌组 CDH1 表达免疫组化染色 ($\times 100$)

2.4 肿瘤组织 miR-372-5p、CDH1 表达与膀胱尿路上皮癌患者预后的关系

采用 Kaplan-Meier 法分析膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织 miR-372-5p、CDH1 表达水平与患者 5 年生存率的关系, 结果显示 miR-372-5p 高表达膀胱尿路上皮癌患者 5 年生存率 (88.89%) 高于 miR-372-5p 低表达患者 (67.35%), 差异有统计学意义 ($\chi^2=6.274, P<0.05$)。CDH1 阳性表达膀胱尿路上皮癌患者 5 年生存率 (70.00%) 低于 CDH1 阴性表达患者 (91.18%), 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.609, P<0.05$)。见图 3、4。

2.5 影响膀胱尿路上皮癌患者预后的多因素 Cox 回归分析

以膀胱尿路上皮癌患者是否发生死亡作为因变量, 以 miR-372-5p、CDH1、肌层浸润、肿瘤大小、组织学分级为自变量进行多因素 Cox 回归分析, 结果显示, CDH1 是影响膀胱尿路上皮癌患者预后死亡的独立危险因素 ($P<0.05$), miR-372-5p 是影响膀胱尿路上皮癌患者预后死亡的保护因素 ($P<0.05$)。见表 4。

表 3 膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织 miR-372-5p、CDH1 表达与临床病理特征的关系 例(%)

项目	例数	miR-372-5p		χ^2	P	CDH1		χ^2	P
		低表达组 (n=49)	高表达组 (n=45)			阴性 表达组 (n=34)	阳性 表达组 (n=60)		
年龄				0.15	0.698			1.572	0.210
≥60 岁	50	27(54.00)	23(46.00)			21(42.00)	29(58.00)		
<60 岁	44	22(50.00)	22(50.00)			13(29.55)	31(70.45)		
性别				0.002	0.965			1.47	0.225
女	42	22(52.38)	20(47.62)			18(42.86)	24(57.14)		
男	52	27(51.92)	25(48.08)			16(30.77)	36(69.23)		
吸烟				0.004	0.95			0.053	0.817
有	40	21(52.50)	19(47.50)			15(37.50)	25(62.50)		
无	54	28(51.85)	26(48.15)			19(35.19)	35(64.81)		
肿瘤大小				11.878	0.001			6.314	0.012
≤3 cm	56	21(37.50)	35(62.50)			26(46.43)	30(53.57)		
>3 cm	38	28(73.68)	10(26.32)			8(21.05)	30(78.95)		
肌层浸润				7.011	0.008			4.916	0.027
未见肌层浸润	58	24(41.38)	34(58.62)			26(44.83)	32(55.17)		
可见肌层浸润	36	25(69.44)	11(30.56)			8(22.22)	28(77.78)		
病灶数				0.33	0.565			2.408	0.121
单发	62	31(50.00)	31(50.00)			19(30.65)	43(69.35)		
多发	32	18(56.25)	14(43.75)			15(46.87)	17(53.13)		
组织学分级				8.467	0.015			15.904	0
1 级	49	19(38.78)	30(61.22)			27(55.10)	22(44.90)		
2 级	31	19(61.29)	12(38.71)			5(16.13)	26(83.87)		
3 级	14	11(78.57)	3(21.43)			2(14.29)	12(85.71)		

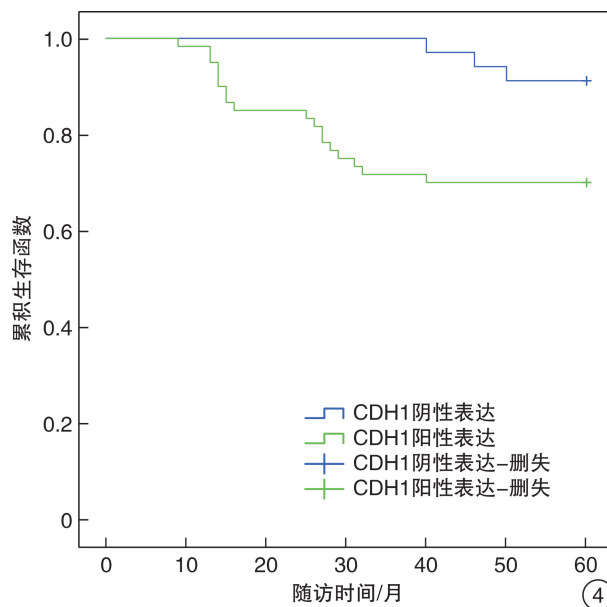
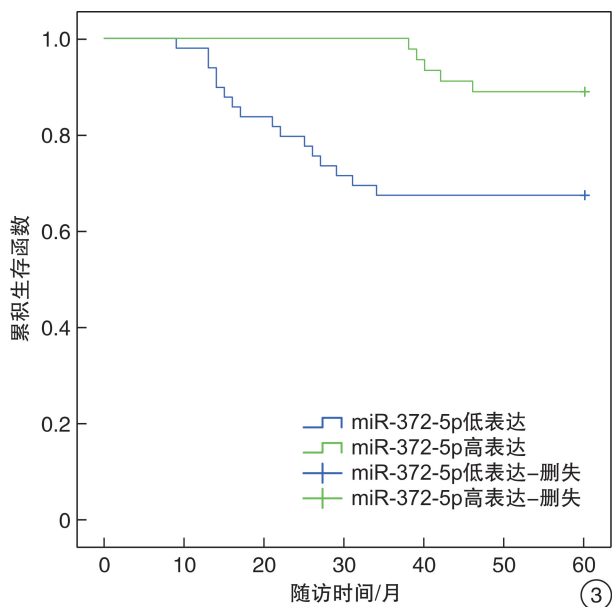


图 3 膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织 miR-372-5p 表达与预后的关系； 图 4 膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织 CDH1 表达与预后的关系

表 4 影响膀胱尿路上皮癌患者预后的多因素 Cox 回归分析

影响因素	B	SE	Wald	HR	95%CI	P
miR-372-5p	0.425	0.286	2.208	0.654	0.453~0.944	0.003
CDH1	0.821	0.559	2.157	2.272	1.732~2.981	0.006
肌层浸润	0.416	0.527	0.623	1.516	0.762~3.016	0.068
肿瘤大小	0.195	0.182	1.148	1.215	0.539~2.741	0.071
组织学分级	0.384	0.429	0.801	1.469	0.815~2.647	0.062

3 讨论

膀胱癌多发、预后差等特点使其成为一个重要的公共卫生问题,严重威胁患者的生命安全^[7]。膀胱癌的发病机制目前尚不明确,但其发展及恶性行为是多因素作用的结果,与遗传上的分子生物学改变有密切联系^[8]。膀胱癌的诊断、治疗需在对其分子机制充分认识的基础上进行^[9]。寻找膀胱癌相关肿瘤标记物可能为肿瘤发病机制的进一步研究提供重要的理论指导,而且可能为疾病的治疗及预后评估提供可靠的依据。

miRNA 是一类非编码的小分子单链 RNA,其通过与靶基因 mRNA 的 3' UTR 翻译区结合,在转录后水平调控其靶基因的表达,进而参与增殖、凋亡等细胞过程^[10]。miRNA 已用于包括膀胱癌在内的癌症诊断、预后评估及个体化治疗^[11],但 miR-372-5p 在膀胱癌中的作用有待进一步挖掘。CDH1 是钙依赖性黏附蛋白家族中的成员,同时是上皮间质转化的重要表型蛋白,可介导细胞间的黏附^[12]。张伟等^[13]研究结果显示,膀胱癌组织中 miR-372-3p、CDH1 表达异常,可能与膀胱癌的发生、发展有关。而本研究主要探究 miR-372-5p 与 CDH1 在膀胱尿路上皮癌中的表达及临床意义,结果显示,膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织中 CDH1 高表达、miR-372-5p 低表达,且 Ualcan 数据库显示,膀胱癌肿瘤组织中 CDH1 水平高于正常膀胱组织,与本研究结果一致。提示 miR-372-5p 的低表达及 CDH1 的高表达与膀胱尿路上皮癌的发生发展有相关性,推测二者可能通过相互作用参与疾病进展。Wang 等^[14]研究表明,下调 miR-372-5p 表达可促进口腔鳞状细胞癌的生长和进展。进一步研究显示,肿瘤大小 > 3 cm、可见肌层浸润、组织学分级 3 级膀胱尿路上皮癌患者 miR-372-5p 低表达、CDH1 阳性表达比例高于肿瘤大小 ≤ 3 cm、未见肌层浸润、组织学分级 1、2 级患者。提示 miR-372-3p、CDH1 表达与临床病理特征有密切联系,推测二者通过相互作用,干扰上皮间质转化过程,加速膀胱尿路上皮癌细胞周期的进展,促进细胞增殖,调控膀胱癌细胞迁移和侵袭。且本研究中 miR-372-3p 低表达、CDH1 阳性表达的膀胱尿路上皮癌患者预后较差,5 年生存率低,二者均是膀胱尿路上皮癌患者预后死亡的重要影响因素。提示 miR-372-3p、CDH1 可作为膀胱尿路上皮癌患者预后的生物标记和潜在治疗靶标。

综上所述,膀胱尿路上皮癌患者肿瘤组织中 CDH1 高表达、miR-372-5p 低表达,且二者与肌层浸润、肿瘤大小、组织学分级等临床病理特征及预后有关,其可能通过相互作用参与膀胱尿路上皮癌的发生、发展。miR-372-5p、CDH1 的异常表达有可能成为膀胱尿路上皮癌早期诊断及治疗的突破点,

作为其潜在的肿瘤标志物。但二者影响疾病的具体分子机制有待进一步通过细胞和动物实验验证。

参考文献

- [1] Nagai T, Okamura T, Yanase T, et al. Examination of Diagnostic Accuracy of UroVysion Fluorescence In Situ Hybridization for Bladder Cancer in a Single Community of Japanese Hospital Patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(4):1271-1273.
- [2] 张涛,王志平. 膀胱尿路上皮癌 PD-1/PD-L 抑制剂的治疗进展[J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(8):635-640.
- [3] Piao XM, Jeong P, Kim YH, et al. Urinary cell-free microRNA biomarker could discriminate bladder cancer from benign hematuria[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(2):380-388.
- [4] Cheng X, Chen J, Huang Z. miR-372 promotes breast cancer cell proliferation by directly targeting LATS2 [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3):2812-2817.
- [5] Godwin TD, Kelly ST, Brew TP, et al. E-cadherin-deficient cells have synthetic lethal vulnerabilities in plasma membrane organisation, dynamics and function[J]. *Gastric Cancer*, 2019, 22(2):273-286.
- [6] 陈莉,汪涌,祝广峰,等. 2020 年欧洲泌尿协会肌层浸润性膀胱癌诊断和治疗指南概要[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2020, 25(11):1025-1029.
- [7] Yang CD, Yuan WB, Yang X, et al. Circular RNA circ-ITCH inhibits bladder cancer progression by sponging miR-17/miR-224 and regulating p21, PTEN expression[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):19-30.
- [8] Lee SH, Hu W, Matulay JT, et al. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer[J]. *Cell*, 2018, 173(2):515-528. e17.
- [9] Alvaesus J, Rosenblatt R, Johansson M, et al. Fewer tumour draining sentinel nodes in patients with progressing muscle invasive bladder cancer, after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy [J]. *World J Urol*, 2020, 38(9):2207-2213.
- [10] 麦尔哈巴·阿不都热依木,潘燕. 非编码 RNA 作为 ceRNA 在人癌症中的功能及机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(8):895-902.
- [11] Wang Y, Li Z, Lin Q, et al. Highly Sensitive Detection of Bladder Cancer-Related miRNA in Urine Using Time-Gated Luminescent Biochip [J]. *ACS Sens*, 2019, 4(8):2124-2130.
- [12] Kitagawa K, Shigemura K, Sung SY, et al. Possible correlation of sonic hedgehog signaling with epithelial-mesenchymal transition in muscle-invasive bladder cancer progression[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(9):2261-2271.
- [13] 张伟,郭永连,李国灏,等. miR-372-3p 在膀胱癌组织中的表达及其对膀胱癌细胞增殖、迁移与侵袭的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(1):45-50.
- [14] Wang MX, Qiu YF, Zhang R, et al. MEHP promotes the proliferation of oral cancer cells via down regulation of miR-27b-5p and miR-372-5p [J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 58(1):35-41.

(收稿日期:2020-12-22)