

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202625409

· 论著 ·

miR-29a 靶向调控 COL6A6 对垂体腺瘤细胞增殖和侵袭的影响及其与患者预后的相关性

廖修富¹, 张娇¹, 李忠万¹, 刘卓慧², 龙瑞清²

(1. 重庆市人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 重庆 401147; 2. 昆明医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 云南昆明 650032)

摘要: **目的** 探讨 miR-29a 靶向调控胶原蛋白 VIA6(COL6A6)在垂体腺瘤(PA)发生、发展过程中的作用机制及其与患者预后的相关性。**方法** 选取 2022 年 3 月—2023 年 3 月昆明医科大学第一附属医院鼻颅底外科收治的非侵袭性垂体腺瘤(NIPA)患者 25 例和侵袭性垂体腺瘤(IPA)患者 25 例。采用逆转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、Western blot 检测两组患者 PA 组织及正常垂体细胞、PA 细胞系(A1T-20、HP75)中 miR-29a、COL6A6 的表达水平,将 miR-29a mimic、miR-29a inhibitor 和对照 miRNA mimic、miRNA inhibitor 分别转染至 PA 细胞系中,通过 RT-qPCR 检测转染后 miR-29a、COL6A6 的表达水平;双荧光素酶报告基因实验验证 miR-29a 与 COL6A6 之间存在结合位点关系;CCK-8 检测细胞增殖能力;使用 SPSS 27.0 统计软件分析 miR-29a 表达差异与 IPA 的相关性以及其临床诊断预后价值。**结果** miR-29a 在 IPA 组织中的表达显著高于 NIPA 组织,差异具有统计学意义($P < 0.001$);与正常垂体细胞(MPC)相比,miR-29a 在 PA 细胞系(A1T-20、HP75)中均呈高表达,差异具有统计学意义($P < 0.01$);miR-29a 与 COL6A6 呈负相关的靶向结合关系。miR-29a 过表达可促进 PA 细胞的增殖与侵袭;miR-29a 的表达水平与肿瘤大小($\chi^2 = 4.056, P = 0.021$)、Knosp 分级($\chi^2 = 25.873, P < 0.001$)、肿瘤全切率($\chi^2 = 4.903, P = 0.027$)密切相关。ROC 曲线分析显示,miR-29a 表达水平评估 PA 的不良预后具有一定价值(AUC=0.779,95%CI: 0.638~0.920);Kaplan-Meier 生存曲线显示,miR-29a 低表达组与高表达组患者复发率分别为 13.0%、51.9%,差异具有统计学意义($HR = 3.882, 95\%CI: 1.45 \sim 10.39, P = 0.0069$);多因素非条件 Logistic 回归分析显示,肿瘤全切率($OR = 0.009, 95\%CI: 0.001 \sim 0.184, P = 0.002$)、miR-29a 表达水平($OR = 15.325, 95\%CI: 1.147 \sim 204.716, P = 0.039$)是影响 PA 患者预后的独立危险因素。**结论** miR-29a 通过靶向调控 COL6A6 促进 PA 细胞增殖与侵袭,这一靶向调控通路可能是 PA 发生、发展及侵袭性表型形成的重要分子机制;同时,miR-29a 是影响 PA 患者预后的独立危险因素,对评估患者不良预后具有可靠价值,可能为该疾病的诊断和治疗提供新的分子标志物和治疗靶点。

关键词: 垂体腺瘤;miR-29a;COL6A6;增殖;侵袭;预后

中图分类号:R739.91

Effect of miR-29a targeting COL6A6 on the proliferation and invasion of pituitary adenoma cells and its correlation with prognosis of patients

LIAO Xiufu¹, ZHANG Jiao¹, LI Zhongwan¹, LIU Zhuohui², LONG Ruiqing²

(1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Chongqing General Hospital, Chongqing 401147, China;
2. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism by which miR-29a targets and regulates collagen type VI alpha 6 chain (COL6A6) in the occurrence and development of pituitary adenoma (PA) and its correlation with patient prognosis. **Methods** Twenty-five patients with non-invasive pituitary adenoma (NIPA) and 25 patients with invasive pituitary adenoma (IPA) who were treated in the Department of Rhinocranial Base Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming

基金项目:国家自然科学基金(82160513);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项(202101AY070001-082);云南省建设面向南亚东南亚科技创新中心专项(202303AP140005)。

第一作者简介:廖修富,男,硕士,主治医师。

通信作者简介:龙瑞清,男,博士,副主任医师。

Medical University from March 2022 to March 2023 were selected. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression levels of miR-29a and COL6A6 in PA tissues of the two groups, as well as in normal pituitary cells (MPC) and PA cell lines (AtT-20, HP75). miR-29a mimic, miR-29a inhibitor, control miRNA mimic and control miRNA inhibitor were transfected into PA cell lines, and RT-qPCR was used to detect the expressions of miR-29a and COL6A6. Dual-luciferase reporter gene assay was performed to verify the binding site relationship between miR-29a and COL6A6. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect cell proliferation ability. SPSS 27.0 was used for statistical analysis of the correlation between the differential expression of miR-29a and IPA, as well as the prognostic value of clinical diagnosis. **Results** The expression of miR-29a in IPA tissues was significantly higher than that in NIPA tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Compared with MPC, miR-29a was highly expressed in PA cells (AtT-20, HP75), and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). There was a negatively correlated targeted binding relationship between miR-29a and COL6A6. Overexpression of miR-29a could promote the proliferation and invasion of PA cells. The expression of miR-29a was closely associated with tumor size ($\chi^2 = 4.056$, $P = 0.021$), Knosp grade ($\chi^2 = 25.873$, $P < 0.001$) and total tumor resection rate ($\chi^2 = 4.903$, $P = 0.027$). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that the expression level of miR-29a had a certain value in evaluating the poor prognosis of PA (AUC = 0.779, 95%CI: 0.638–0.920). Kaplan-Meier survival curve showed that the recurrence rate of patients in the low-expression group of miR-29a and the high-expression group was 13.0% and 51.9%, respectively, and the difference was statistically significant ($HR = 3.882$, 95%CI: 1.45–10.39, $P = 0.0069$). Multivariate unconditional logistic regression analysis showed that total tumor resection rate ($OR = 0.009$, 95%CI: 0.001–0.184, $P = 0.002$) and miR-29a expression level ($OR = 15.325$, 95%CI: 1.147–204.716, $P = 0.039$) were independent risk factors affecting the prognosis of PA patients. **Conclusions** miR-29a promotes the proliferation and invasion of PA cells by targeting and regulating COL6A6, and this targeted regulatory pathway may serve as an important molecular mechanism for the occurrence, development, and formation of the invasive phenotype of PA. Meanwhile, miR-29a serves as an independent risk factor affecting patient prognosis in PA, providing reliable value for predicting poor outcomes and potentially offering a novel molecular marker and therapeutic target for the diagnosis and treatment of this disease.

Keywords: Pituitary adenoma; miR-29a; COL6A6; Proliferation; Invasion; Prognosis

垂体腺瘤(pituitary adenoma, PA)是临床最常见的颅底肿瘤,其发病率为 37.2~115.6/100 000 人^[1]。虽然大多数 PA 为良性肿瘤,但其中约 30% 的 PA 可呈侵袭性生长,生物学行为类似恶性,称为侵袭性垂体腺瘤(invasive pituitary adenoma, IPA)^[2]。IPA 常侵犯海绵窦、蝶窦及颈内动脉等重要组织结构,临床处理棘手^[3-4]。目前对于 PA,常用的治疗策略包括手术切除、化疗及放疗,但整体疗效有限^[5]。困扰临床的主要问题是 PA 的过度增殖致侵袭性生长,巨大 PA 全切率偏低、术后并发症多、肿瘤复发率高等^[2, 5]。因此,深入研究 PA 的发病机制、筛选诊断标志物和寻找潜在治疗靶点具有重要的临床意义。

微小 RNA (microRNAs, miR) 在多种肿瘤的发生、发展过程中发挥着关键的调控作用,其中 miR-29a 在不同肿瘤类型中的异常表达已被广泛报道,并且与肿瘤细胞的多种生物学行为密切相关。研究显示,miR-29a 在肿瘤中既可以表现为抑癌功能^[6-7],也可以表现为促癌功能^[8]。而 VI 型胶原蛋白 $\alpha 6$ 多肽链 (COL6A6) 作为细胞外基质的重要组成部分,在细胞的黏附、迁移等过程中也有着不可忽视的作用^[9]。然而,二者之间在 PA 中的具体调控

关系,以及对 PA 发生发展的联合作用机制尚未完全明确,这正是本研究的重点关注内容。

本研究旨在明确 miR-29a 在 PA 中的表达情况及其对 PA 细胞增殖和侵袭性的影响,揭示其与 COL6A6 的靶向调控关系,并基于前期对 COL6A6 作用机制的认知,进一步阐明 miR-29a/COL6A6 轴通过 PI3K/AKT 通路影响 PA 发生发展的具体机制,以及 miR-29a 与 PA 预后的相关性。深入剖析这一特定调控轴在 PA 中的作用,将前期分散的研究发现进行整合,为全面理解 PA 的分子发病机制提供新的视角,也有望为后续的精准治疗提供新的潜在靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

连续收集 2021 年 3 月—2022 年 3 月在昆明医科大学第一附属医院确诊并手术治疗的 50 例 PA 患者,术中取 PA 组织,用生理盐水洗净后于 10 min 内装入含 RNA 稳定液的冻存管,置于 -80 ℃ 超低温冰箱冻存,以备后续实验。所有标本均记录 Knosp 分级、年龄、性别、吸烟史、饮酒史、肿瘤大小、手术全

切情况等相关临床资料,经 RNA 质检排除不合格标本组织,最终纳入 50 例患者,其中 IPA 组患者 25 例,非侵袭性垂体腺瘤(non-invasive pituitary adenoma, NIPA)组患者 25 例;年龄 22~69 岁,平均年龄(48.76±15.52)岁。临床资料中 Knosp 分级是评估 PA 侵袭性的主要标准之一,将 Knosp 分级为 1、2 级的定义为 NIPA,而 Knosp 分级为 3、4 级的定义为 IPA^[10]。

纳入标准:①所有患者均为我院首次确诊 PA 并且住院行内镜手术治疗,此前从未进行过化疗、放疗、生物治疗等;②术后病检证实为 PA 的标本组织。排除标准:①伴有其他系统良恶性肿瘤的患者;②有自身免疫系统性疾病患者;③术前存在急性感染或炎性反应的患者;④有放疗、化疗、生物治疗等抗肿瘤治疗史的患者。本研究的参与研究患者均有完善的病历资料,均取得患者及家属同意参与研究的知情同意书并双方签字存档。所有标本均按《赫尔辛基宣言》的原则收集,并通过我院伦理委员会批准(伦理审查编号:KY S2022-018-01)。

1.2 实验动物

小鼠垂体细胞(MPC)和小鼠 PA 细胞(AtT-20)购自上海北诺生物科技有限公司;人 PA 细胞 HP75 购自青旗(上海)生物技术有限公司。所有细胞均按照生产商提供的说明书进行培养。

1.3 方法

1.3.1 上游靶基因预测 前期研究已证实 COL6A6 可通过 PI3K/AKT 通路调控 PA 的增殖与侵袭^[11]。本研究进一步结合 TargetScan 算法预测 COL6A6 的上游调控基因,发现 COL6A6 的 3'-UTR 区域同样存在 miR-29a 潜在结合位点。故推测 miR-29a 可能对 COL6A6 及 PTEN(或非仅限于二者)基因存在双重(或多重)靶标作用,从而复合调控 PI3K/Akt 信号通路,在 PA 进程中起到关键的作用。

1.3.2 逆转录实时荧光定量 PCR(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 miR-29a、COL6A6 mRNA 表达水平 使用 Trizol 试剂(ThermoFisher, USA)提取组织与细胞总 RNA,采用 NanoDrop-2000 分析仪来检测提取的 RNA 的纯度和浓度。使用 SYBR Premix Ex Taq kit (TaKaRa, Japan)进行 RT-qPCR,反应体系为 RNase-free 4.6 μL,上下游引物各 0.2 μL, cDNA 5 μL, SYBR Premix Ex Taq kit 10 μL。反应程序为 95 ℃ 10 min, 94 ℃ 20 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 20 s,共 40 个循环。再进入溶解曲线(95 ℃)分析阶段,每个样本设置 3 个复孔。设置循环数值(Ct),目的产物的 CT

值与内参的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。其中 ΔCt =目的基因 Ct-内参基因 Ct,内参基因采用 U6。引物见表 1。

表 1 引物名称和序列

名称	引物序列
miR-29a	R:5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' F:5'-CGCGTAGCACCATCTGAAAT-3'
COL6A6	R:5'-TCCACCCATCTGCCTGATA-3' F:5'-CCCAGGCCACAGATTTCAT-3'
U6	R:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3' F:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'

注:F(正向引物);R(反向引物);U6(内参基因)。

1.3.3 Western blot 检测 收集不同处理组的细胞,加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒(Sigma Aldrich, USA)测定蛋白浓度后,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(ThermoFisher, USA),将蛋白转移至 PVDF(ThermoFisher, USA)膜上,用相应的一抗 COL6A6(ThermoFisher, USA)进行孵育过夜,再用辣根过氧化物酶偶联二抗(Abcam)孵育,最后通过化学发光显色法检测蛋白条带的灰度值,分析各蛋白表达水平的变化情况,以 GAPDH 作为内参蛋白进行标准化。

1.3.4 细胞培养与转染 将小鼠垂体细胞(MPC)、小鼠 PA 细胞(AtT-20)和人 PA 细胞(HP75)接种于含有 1%青霉素-链霉素和 10%FBS 的 DMEM 培养基(ThermoFisher, USA),置于饱和湿度、37 ℃、5%CO₂ 的培养箱内恒温恒湿培养。待细胞生长至合适密度后,按照转染试剂说明书分别将 miR-29a mimic(miR-29a 模拟物)、miR-29a inhibitor(miR-29a 抑制剂)、miR-29a inhibitor + si-COL6A6(沉默 COL6A6)和对照 miRNA mimic、miRNA inhibitor 转染至细胞中,同时设置阴性对照(转染阴性对照序列),转染后的细胞继续培养一定时间用于后续实验检测。

1.3.5 双荧光素酶报告基因实验 通过过表达萤火虫荧光素酶(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)与有可能的 miR-29a 结合位点(Addgene)的 COL6A6 mRNA 3'-UTR 的载体,构建了报告载体:在报告基因编码区的下游插入 COL6A6 mRNA 的 3'-UTR 区,然后将靶标基因 COL6A6 的 3'-UTR 克隆到荧光素酶载体(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)上进行转染。通过 mimic 改变细胞中 miR-29a 的表达水平,检测荧光素酶的表达情况以分析 COL6A6 mRNA 的 3'-UTR 区中是否含有 miR-29a 的靶位点。

1.3.6 CCK-8 细胞增殖实验 将转染后的细胞以合适的密度接种于 96 孔板中,每组设置多个复孔,分别在培养 24、48、72 h 后加入 CCK-8 试剂(ThermoFisher, USA),继续孵育一定时间后,使用酶标仪测定 450nm 处的吸光度值(OD 值),根据吸光度值绘制细胞生长曲线,以此评估不同处理组细胞的增殖能力变化。

1.3.7 随访情况 对 PA 患者手术后进行为期 3 年的电话随访,并在门诊行颅脑 MRI 检查明确有无肿瘤复发(术后 3 个月、6 个月,此后每年复查影像),随访时间至 PA 确诊复发或 2024 年 6 月。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 27.0 统计软件(IBM, USA)进行分析,图形图像预处理采用 Adobe Illustrator 2022 软件(Adobe, USA)和 GraphPad Prism 10.0 软件(La Jolla, USA)。计量资料若符合正态分布,连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),事后检验采用 LSD 法;若不符合正态分布,采用非参数秩和检验(Mann-Whitney U 检验/Kruskal-Wallis H 检验)。ROC 曲线评估 miR-29a 的表达对 IPA 的诊断价值;Kaplan-Meier 生存曲线法分析 miR-29a 的表达水平与患者预后的关系;多因

素非条件 Logistic 回归分析影响 PA 患者预后的因素。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般临床资料比较

两组患者的年龄、性别、体重指数、PA 类型、吸烟史、饮酒史、高血压及糖尿病患病情况进行比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);两组间瘤体直径差异具有统计学意义($P < 0.001$)。见表 2。

2.2 miR-29a 在 PA 组织中的表达

miR-29a 在 IPA 组织中高表达,而在 NIPA 组织中低表达(图 1),差异具有统计学意义($P < 0.001$)。

2.3 miR-29a 在 PA 细胞系中表达水平

通过使用 RT-qPCR 技术来检测 miR-29a 在 MPC、AtT-20 和 HP75 中的表达水平,发现 miR-29a 在 AtT-20 和 HP75 中高表达,在 MPC 中低表达($P < 0.001, P < 0.01$),见图 2。

2.4 miR-29a 和 COL6A6 的相互作用

通过 TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/)对 miR-29a 和 COL6A6 是否存在结合位点进行预测,发现 miR-29a-3p 在 COL6A6 的 mRNA 3'-UTR 区域有潜在结合位点(图 3)。

表 2 两组患者一般临床资料比较 [例(%), $\bar{x} \pm s$]

项目	NIPA ($n=25$)	IPA ($n=25$)	$\chi^2(t)$	P
女性	15(60.0)	18(72.0)	0.802	0.370
年龄(岁)	47.2 $\pm$ 10.9	49.7 $\pm$ 12.2	(-0.78)	0.439
功能性 PA *	8(32.0)	6(24.0)	0.397	0.529
吸烟史	8(32.0)	10(40.0)	0.347	0.521
饮酒史	9(36.0)	13(52.0)	1.299	0.254
高血压	7(28.0)	6(24.0)	0.104	0.747
糖尿病	6(24.0)	8(32.0)	0.397	0.529
体重指数(kg/m ²)	23.6 $\pm$ 2.5	22.9 $\pm$ 2.9	(0.935)	0.354
瘤体直径(mm)	20.4 $\pm$ 7.1	33.4 $\pm$ 8.9	(-5.731)	<0.001

注:PA(垂体腺瘤);NIPA(非侵袭性垂体腺瘤);IPA(侵袭性垂体腺瘤);*将 PA 分为功能性 PA 和无功能性 PA。下同。

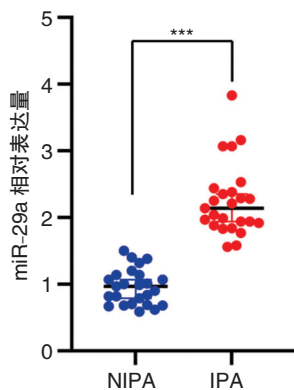


图 1 miR-29a 在 PA 组织中表达情况 注:*** $P < 0.001$ 。下同。

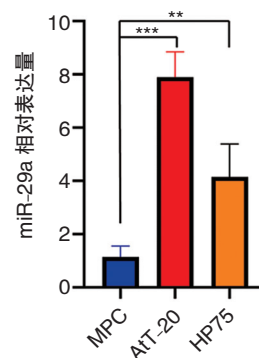


图 2 miR-29a 在 MPC、AtT-20 和 HP75 中表达情况 注:** $P < 0.01$ 。下同。

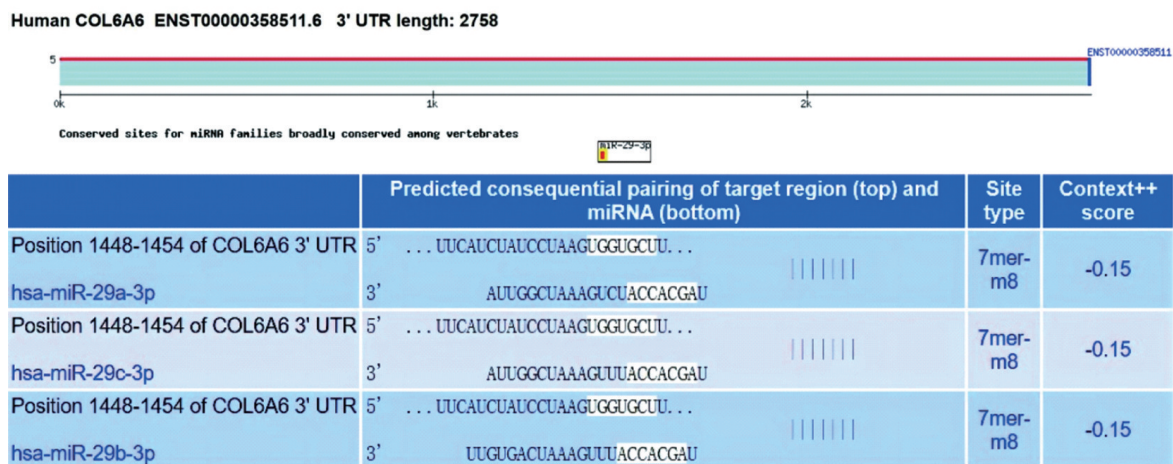


图 3 TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) miRNA 靶标预测

利用双荧光素酶报告基因进一步验证 miR-29a 和 COL6A6 之间存在结合关系,发现 miR-29a mimic (miR-29a 模拟物)可以显著降低 COL6A6-WT 组中荧光素酶活性,而对 COL6A6-MUT 组荧光素酶活性无明显影响 ($P=0.054$),见图 4。

2.5 COL6A6 在 PA 组织中的表达

使用 RT-qPCR 检测 COL6A6 在 IPA ($n=25$)组织和 NIPA ($n=25$)组织中的表达水平,发现 COL6A6 在 IPA 组织中低表达 ($P<0.001$) (图 5)。Western blot 检测 COL6A6 在 IPA ($n=25$)、NIPA ($n=25$)组织中的表达水平,提示 COL6A6 在 IPA 组织中低表达 ($P<0.001$) (图 6),与 RT-qPCR 检测结果一致。

2.6 COL6A6 与 miR-29a 在组织中的表达

通过分析 IPA ($n=25$)组织和 NIPA ($n=25$)组织中 miR-29a 和 COL6A6 表达的关系,发现 miR-29a 与 COL6A6 表达呈负相关 ($P=0.0413$)。见图 7。

2.7 miR-29a 影响 PA 细胞的增殖情况

利用 CCK-8 检测 NC、AtT-20 和 HP75 细胞株增殖情况,结果发现,与 NC 组相比较,转染 miR-29a mimic (miR-29a 模拟物)的细胞株增殖增加,两组间差异具有统计学意义 ($P<0.01$),转染 miR-29a inhibitor (miR-29a 抑制剂)的细胞株细胞增殖明显受到抑制,两组间差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。见图 8。

2.8 miR-29a 表达水平对 IPA 的临床诊断效能

ROC 曲线分析显示,miR-29a 表达水平诊断 IPA 效能良好,其 AUC 值为 0.779 (95% CI: 0.638 ~

0.920),根据约登指数最大值确定最佳截断值,最佳截断值 (灵敏度+特异度-1 最大值处) 为 1.800,灵敏度和特异度分别为 76.5% 和 72.7%。见图 9。

2.9 miR-29a 表达水平与 PA 患者临床特征的单因素分析

根据 miR-29a 在 PA 组织中的表达情况分析,结果发现 miR-29a 的差异表达与 PA 患者的性别 ($P=0.156$)、年龄 ($P=0.524$) 及肿瘤病理分型 ($P=0.297$) 均无明显相关性,而与肿瘤大小 (以 MRI 检查测量的肿瘤最大直径为准,按照肿瘤直径 ≥ 40 mm 为巨腺瘤或 <40 mm 为大腺瘤分类) ($P=0.021$)、KnoSp 分级 ($P<0.001$) 和肿瘤全切率 ($P=0.027$) 具有相关性。具体见表 3。

2.10 miR-29a 表达水平与 PA 患者临床复发的相关性分析

在纳入的 50 例 PA 患者中,有 49 例 (98%) 完成电话随访,并在门诊行颅脑 MRI 检查明确有无肿瘤复发 (术后 3 个月、6 个月、每年复查影像),1 例 (2%) 因更换联系方式失访,随访时间 (841 ± 52) d,随访时间最长为 1 095 d,最短为 152 d。随访期间有 17 例 (34%) 出现肿瘤复发。Kaplan-Meier 生存曲线显示 (图 10),PA 组织中 miR-29a (≥ 1.800) 在随访期间复发率显著高于 miR-29a (<1.800) 的患者,两者间复发率分别为 51.9% vs 13.0%,差异具有统计学意义 ($HR=3.882$ 95% CI: 1.450 ~ 10.390, $P=0.007$)。

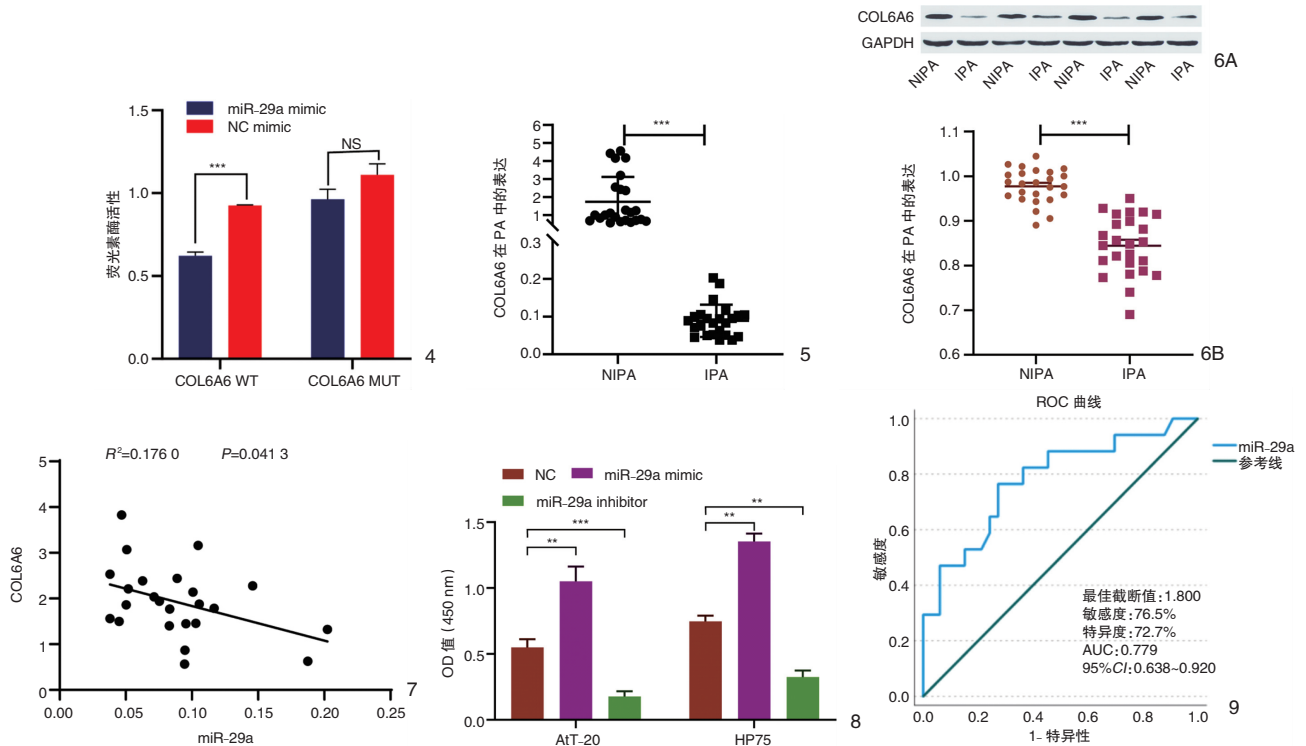


图 4 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-29a 与 COL6A6 的靶向关系 图 5 RT-qPCR 检测 COL6A6 在 PA 中表达情况
图 6 Western blot 检测 COL6A6 在 PA 组织中表达情况 6A:蛋白电泳图;6B:蛋白相对表达定量分析 图 7 PA 组织中
miR-29a 与 COL6A6 的表达相关性分析 图 8 CCK-8 检测 miR-29a 影响 PA 细胞系增殖情况 图 9 miR-29a 表达水平
诊断 IPA 的 ROC 曲线分析 注:ROC(受试者工作特征曲线)。

表 3 miR-29a 表达水平与 PA 患者临床特征的单因素分析 [例(%)]

临床特征	例数(n=50)	miR-29a 的表达		χ^2	P
		低表达*	高表达		
性别				0.794	0.156
男	26(52.0)	11(22.0)	15(30.0)		
女	24(48.0)	14(28.0)	10(20.0)		
年龄(岁)				0.032	0.524
≥60	7(14.0)	3(6.0)	4(8.0)		
<60	43(86.0)	24(48.0)	19(38.0)		
肿瘤亚型				6.741	0.297
NFPA	11(22.0)	6(12.0)	5(10.0)		
GH	6(12.0)	2(4.0)	4(8.0)		
PRL	5(10.0)	3(6.0)	2(4.0)		
ACTH	7(14.0)	5(10.0)	2(4.0)		
FSH	16(32.0)	8(16.0)	8(16.0)		
LH	5(10.0)	3(6.0)	2(4.0)		
肿瘤大小(mm)				4.056	0.021
≥40	11(22.0)	2(4.0)	9(18.0)		
<40	39(78.0)	25(50.0)	14(28.0)		
Knosp 分级				25.873	<0.001
1,2 级	25(50.0)	21(42.0)	4(8.0)		
3,4 级	25(50.0)	5(10.0)	20(40.0)		
肿瘤是否全切				4.903	0.027
是	34(68.0)	22(44.0)	12(24.0)		
否	16(32.0)	5(10.0)	11(22.0)		

注: * 50 例样本的 miR-29a 表达最佳截断值为 1.800, ≥1.800 为高表达, <1.800 为低表达; NFPA(无功能垂体腺瘤); GH(生长激素); PRL(催乳素); ACTH(促肾上腺皮质激素); FSH(促卵泡激素); LH(黄体生成素)。

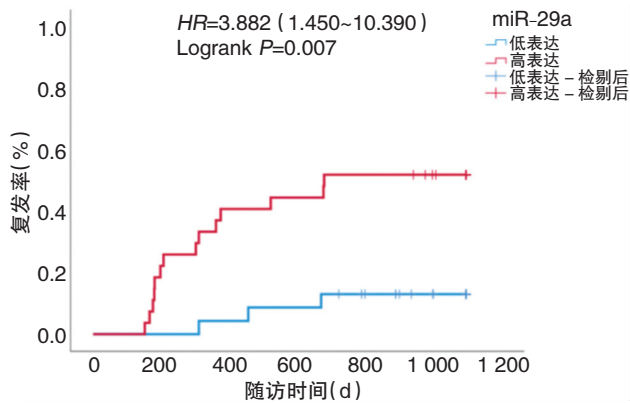


图10 不同 miR-29a 表达水平与 PA 患者的预后关系

表4 miR-29a 表达水平与 PA 患者临床特征的多因素分析

影响因素	β	Wald χ^2	OR(95%CI)	P
性别	-0.794	0.803	0.452(0.080~2.567)	0.370
年龄	0.029	0.279	1.029(0.926~1.144)	0.597
吸烟史	1.919	0.991	6.811(0.156~297.895)	0.320
饮酒史	-1.278	0.994	0.279(0.023~3.434)	0.319
垂体腺瘤亚型	-0.880	0.482	0.415(0.035~4.966)	0.487
高血压病史	-0.495	0.108	0.609(0.032~11.719)	0.743
糖尿病病史	0.552	0.187	1.736(0.142~21.192)	0.666
肿瘤大小	2.957	2.761	19.233(0.588~629.051)	0.097
Knosp 分级	-1.142	0.339	0.319(0.007~14.916)	0.560
肿瘤全切率	-4.697	9.384	0.009(0.001~0.184)	0.002
miR-29a	2.730	4.260	15.325(1.147~204.716)	0.039

3 讨论

PA 作为临床最常见的神经内分泌肿瘤之一,根据其生物学特性分为 NIPA 和 IPA。而 IPA 生长特性复杂,其手术切除难度大,术后残留和复发的风险显著,这给临床治疗带来了极大的挑战^[12]。研究表明,IPA 的复发率较高,且其生物学行为具有一定的恶性特征,这使得早期识别和干预变得尤为重要^[13]。目前,IPA 的治疗方法主要包括手术、药物治疗及放射治疗等。手术治疗是首选,但术后复发率较高,药物治疗和放射治疗则作为辅助治疗手段^[14]。随着对肿瘤生物学的深入理解,个体化的精准治疗方案逐渐成为趋势,研究者们正在探索新的分子标志物,以帮助预测肿瘤的侵袭性和复发风险,从而制定更为有效的治疗策略^[15-16]。

miR-29a 是一种重要的微小 RNA,近年来在多种肿瘤的研究中引起了广泛关注。它在肿瘤发生和发展中起双重作用,既可以作为肿瘤抑制因子,也可能在某些情况下促进肿瘤的进展^[17-18]。研究表明,在黑色素瘤细胞系中 miR-29a 表达下调,过表达 miR-29a 可通过靶向下调 BMI1,有效抑制黑色素瘤

2.11 miR-29a 表达水平与 PA 患者临床特征的多因素分析

以 PA 患者预后为因变量(1 = 复发,0 = 未复发),以年龄、性别、垂体瘤类型、吸烟史、饮酒史、高血压病史、糖尿病史、肿瘤大小、Knosp 分级、肿瘤全切率、miR-29a 表达水平为自变量,赋值后进行多因素非条件 Logistic 回归分析结果显示,肿瘤全切率($OR = 0.009$, 95% CI : 0.001 ~ 0.184, $P = 0.002$)、miR-29a 表达水平($OR = 15.325$, 95% CI : 1.147 ~ 204.716, $P = 0.039$)是影响患者预后的独立危险因素(表4)。

A375 细胞的存活、迁移和侵袭,从而发挥抑癌作用^[19]。另一项研究表明,miR-29a 在肝癌细胞中具有促癌作用,可通过靶向 PTEN 促进肝癌细胞侵袭和迁移^[20]。miR-29a 与脑胶质瘤侵袭能力呈显著正相关,过表达 miR-29a 可抑制 PTEN、EphB3 和 Sox4 的表达,激活 Akt 通路启动胶质细胞瘤生长和侵袭程序^[21]。以上研究均表明 miR-29a 在多种良恶性肿瘤中的作用复杂而多样,其作为潜在的生物标志物和治疗靶点的前景值得进一步研究。

我们的研究通过 RT-qPCR 技术验证了 IPA 组织中 miR-29a 的表达差异,并发现 miR-29a 的高表达与 IPA 的高复发率呈正相关。这一发现提示 miR-29a 可能在 IPA 的发生发展中扮演重要角色。miR-29a 的高表达可能与肿瘤细胞的增殖、侵袭和耐药性增强有关,从而影响 IPA 的预后。本研究揭示了 miR-29a 在 IPA 中的潜在作用机制,并为 IPA 的临床治疗提供了新的分子靶点。此外,miR-29a 的表达水平可能对 IPA 的治疗方案选择和预后评估具有指导意义,为 IPA 的个体化治疗提供了新的视角。

本研究存在相应局限性:①纳入病例的样本量较小,可能影响结果的普适性;②受伦理和实际操作

的限制,未能获得肿瘤周边正常垂体组织作为对照,这限制了对 miR-29a 表达差异的全面理解;③本研究未能深入探讨 miR-29a 的分子调控机制,这将是未来研究的重点。

综上所述,我们的研究表明 miR-29a 在 IPA 中扮演着关键角色,为 IPA 的个体化治疗策略提供了新的理论视角。未来的研究将深入探究 miR-29a 在 IPA 病理生理过程中的具体分子机制,并致力于将其研究成果转化为临床实践中的诊疗手段,旨在为 IPA 患者提供更为精准和高效的医疗服务。

参考文献:

- [1] Fernandez A, Karavitaki N, Wass JA. Prevalence of pituitary adenomas; a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK)[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, 72(3): 377-382.
- [2] Tampourlou M, Ntali G, Ahmed S, et al. Outcome of nonfunctioning pituitary adenomas that regrow after primary treatment: A study from two large UK centers[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 102(6): 1889-1897.
- [3] Zhu X, Wang Y, Zhao X, et al. Incidence of pituitary apoplexy and its risk factors in Chinese people; A database study of patients with pituitary adenoma [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139088.
- [4] Caffaratti G, Villalonga JF, Katz D, et al. Carcinoma pituitario: es demasiado tarde? [Pituitary carcinoma: is it too late?][J]. *Rev Neurol*, 2019, 69(6): 262-263.
- [5] Santos-Pinheiro F, Penas-Prado M, Kamiya-Matsuoka C, et al. Treatment and long-term outcomes in pituitary carcinoma; a cohort study[J]. *Eur J Endocrinol*, 2019, 181(4): 397-407.
- [6] Zhao S, Li B, Gao H, et al. MiR-320a Acts as a Tumor Suppressor in Somatotroph Pituitary Neuroendocrine Tumors by Targeting BCAT1[J]. *Neuroendocrinology*, 2024, 114(1): 14-24.
- [7] Németh K, Darvasi O, Likó I, et al. Comprehensive analysis of circulating miRNAs in the plasma of patients with pituitary adenomas[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(9): 4151-4168.
- [8] Niedra H, Peculis R, Litvina HD, et al. Genome wide analysis of circulating miRNAs in growth hormone secreting pituitary neuroendocrine tumor patients' plasma[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 894317.
- [9] Fitzgerald J, Holden P, Hansen U. The expanded collagen VI family: new chains and new questions[J]. *Connect Tissue Res*, 2013, 54(6): 345-350.
- [10] Fang Y, Pei Z, Chen H, et al. Diagnostic value of Knosp grade and modified Knosp grade for cavernous sinus invasion in pituitary adenomas; a systematic review and meta-analysis[J]. *Pituitary*, 2021, 24(3): 457-464.
- [11] Long R, Liu Z, Li J, et al. COL6A6 interacted with P4HA3 to suppress the growth and metastasis of pituitary adenoma via blocking PI3K-Akt pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(20): 8845-8859.
- [12] Heaney A. Management of aggressive pituitary adenomas and pituitary carcinomas[J]. *J Neurooncol*, 2014, 117(3): 459-468.
- [13] Lv L, Zhang B, Wang M, et al. Invasive pituitary adenomas with gross total resection: The wait-and-see policy during postoperative management[J]. *J Clin Neurosci*, 2018, 58: 49-55.
- [14] Hayhurst C, Taylor PN, Lansdown AJ, et al. Current perspectives on recurrent pituitary adenoma: The role and timing of surgery vs adjuvant treatment[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2020, 92(2): 89-97.
- [15] Zhou Y, Fu X, Zheng Z, et al. Identification of gene co-expression modules and hub genes associated with the invasiveness of pituitary adenoma[J]. *Endocrine*, 2020, 68(2): 377-389.
- [16] Larysz D, Blamek S, Rudnik A. Clinical aspects of molecular biology of pituitary adenomas[J]. *Folia Neuropathol*, 2012, 50(2): 110-117.
- [17] Tréhoux S, Lahdaoui F, Delpu Y, et al. Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(10 Pt A): 2392-2403.
- [18] Han X, Zheng J, Wang Y, et al. miRNA-29a inhibits colon cancer growth by regulation of the PTEN/Akt/GSK3 β and Wnt/ β -catenin signaling pathways[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2): 2638-2644.
- [19] Yang Y, Dodbele S, Park T, et al. MicroRNA-29a inhibits glioblastoma stem cells and tumor growth by regulating the PDGF pathway[J]. *J Neurooncol*, 2019, 145(1): 23-34.
- [20] Yang Y, Chen XQ, Jia YX, et al. Circ-0044539 promotes lymph node metastasis of hepatocellular carcinoma through exosomal-miR-29a-3p[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(8): 630.
- [21] Zhao Y, Huang W, Kim TM, et al. MicroRNA-29a activates a multi-component growth and invasion program in glioblastoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 36.

(收稿日期:2025-10-25)

本文引用格式: 廖修富, 张娇, 李忠万, 等. miR-29a 靶向调控 COL6A6 对垂体腺瘤细胞增殖和侵袭的影响及其与患者预后的相关性[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2026, 32(3): 73-80. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202625409

Cite this article as: LIAO Xiufu, ZHANG Jiao, LI Zhongwan, et al. Effect of miR-29a targeting COL6A6 on the proliferation and invasion of pituitary adenoma cells and its correlation with prognosis of patients [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2026, 32(3): 73-80. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202625409