

卵巢癌患者血清 miR-200 家族 和 miR-100 检测的临床价值

邱振华 王茂生 杨长福 魏凯 杨越红 麦大海

基金项目:广东省科技计划(2012B031800344);广东省医学科研基金(A2011671)

作者单位:525200 高州市,广东省高州市人民医院检验科(邱振华 王茂生 杨长福)

525000 茂名市,广东省茂名市人民医院检验科(魏凯 杨越红 麦大海)

通讯作者:邱振华,E-mail:qiu3122@sina.com

【摘要】 目的 探讨血清 microRNA 的表达差异在卵巢癌诊断和治疗中的临床价值。方法 收集 149 例卵巢肿瘤患者和 30 例健康体检者,采用 qRT-PCR 检测受检者血清 miR-200a、miR-200b、miR-200c 和 miR-100 的表达情况,对检测结果进行统计学分析。结果 miR-200a、miR-200b 和 miR-200c 在卵巢癌患者血清中表达水平均高于正常对照者,而 miR-100 在卵巢癌患者血清中表达水平低于对照组,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.001)。miR-200a、miR-200b、miR-200c 及 miR-100 在良性肿瘤患者与正常对照者血清中表达水平差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。miR-200a、miR-200b 和 miR-200c 在透明细胞癌的表达水平明显高于浆液性和黏液性癌,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。miR-200b 在浆液性癌中的表达水平高于黏液性癌,miR-200c 在透明细胞癌中的表达水平高于子宫内膜癌,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。结论 血清 miR-200 家族的表达可用于卵巢癌的诊断、疗效监测及预后评估。

【关键词】 miR-200 家族;miR-100;实时定量 PCR;卵巢癌

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2014.01.002

Clinical value of serum miR-200 family and miR-100 detection in ovarian cancer diagnosis

QIU Zhen-hua, WANG Mao-sheng, YANG Chang-fu, et al. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Gaozhou, Gaozhou 525200, China

【Abstract】 **Objective** To study the clinical value of microRNA in the diagnosis of ovarian cancer. **Methods** 149 ovarian tumor patients and 30 healthy people were collected. The expression of serum miR-200a, miR-200b, miR-200c and miR-100 were detected by qRT-PCR, and the results were analyzed statistically. **Results** The expression of serum miR-200a, miR-200b and miR-200c in ovarian cancer patients were all higher than that of in control group, the expression of the serum miR-100 in ovarian benign tumor patients was lower than that of in control group, and the differences all had statistical significance (P all < 0.001). There were no statistical significance in the differences of miR-200a, miR-200b, miR-200c and miR-100 levels between ovarian benign tumor patients and control group (P all > 0.05). The expression levels of serum miR-200a, miR-200b and miR-200c in clear cell carcinoma patients were all higher than that of in both serous and mucinous patients, and the differences all had statistical significance (P all < 0.05). The expression level of miR-200b in serous carcinomas patients was higher than that of in mucinous patients, and the expression level of miR-200c in clear cell carcinoma patients was higher than that of in endometrioid carcinomas, and the differences all had statistical significance (P all < 0.05). **Conclusion** The expression of serum miR-200 family can be used for early diagnosis and evaluation of the curative effect and recurrent clinical value in ovarian cancer.

【Key words】 miR-200 family; miR-100; qRT-PCR; Ovarian cancer

卵巢癌病死率居女性生殖系统恶性肿瘤之首,其发病率有逐年升高的趋势。国内资料^[1]显示,从 2004 年起,卵巢癌已取代子宫内膜癌成为上海市发病率最高的女性生殖系统恶性肿瘤。由于缺乏可靠的肿瘤标志物,且早期缺乏典型的临床症状,约

70% 的患者发现时已到晚期,因此临床上迫切需要寻找新的肿瘤标志物用于卵巢癌的早期诊断、治疗和预后评估。有研究^[2]显示,microRNA 与人类疾病的发生发展密切相关,在肿瘤发展的过程中,异常的 microRNA 表达可以灭活抑癌基因或者激活癌基因,

从而促进肿瘤的形成。本文旨在观察血清 miR-200a、miR-200b、miR-200c 和 miR-100 在卵巢癌中的差异性表达, 探讨将其作为非创伤性肿瘤标志物的临床价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2011 年 5 月至 2013 年 12 月我院病房及门诊卵巢肿瘤患者 149 例。其中, 良性肿瘤 17 例, 交界性肿瘤 23 例, 卵巢癌 109 例; 年龄 20~85 岁, 中位年龄 42 岁, 患者均无卵巢癌或其他妇科肿瘤家族史。所有肿瘤患者均经组织病理检查以明确诊断, 病理诊断结果见表 1。选择同期健康体检妇女 30 例为正常对照组。

1.2 方法 抽取卵巢肿瘤患者及正常对照者外周血 5 ml, 以离心半径 20 cm, 3000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液至除酶管内, -70 °C 保存备用。

总 RNA 提取: 受试者均分别取血清 400 μl, 参照 mirVana miRNA (Ambion 公司) 提取试剂盒提供的方法提取血清总 RNA。

miRNA 表达检测: 按照 TaqMan MicroRNA 检测试剂盒 (Applied Biosystems 公司) 说明进行逆转录反应, 然后应用 real-time qPCR (TaqMan PCR Master Mix, Applied Biosystems 公司) 进行定量。考虑到 miRNA 在血清中的丰度不高, 用 TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems 公司) 进行预扩增, 扩增条件: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 12 个循环; 95 °C

15 s, 60 °C 1 min。预扩增产物按 1:2.5 稀释, 每 10 μl miRNA 反应体系中加入 5 μl 稀释后的产物。以 RNU6 作为内参照, 采用 real-time PCR 中的相对定量法进行分析, 反应条件为: 95 °C 5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。实验所用引物及探针均由 Applied Biosystems 公司合成。引物序列分别为: miR-200a: 5'-CTGTGAGCATCTTACCGGA-3'; miR-200b: 5'-TGGATGGAGTCAGGTCTCTA -3'; miR-200c: 5'-CAGTGAGGCTGGGATTCG -3'; miR-100: 5'-CGTAGATCCGAACCTTGTGTAT-3'。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计学分析。用 Mann-Whitney U 检验方法分析卵巢癌患者和健康人血清 miR-200a、miR-200b、miR-200c 及 miR-100 表达差异, 采用 one-way ANOVA 分析不同病理类型卵巢癌患者血清 miR-200a、miR-200b 和 miR-200c 表达差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA 在卵巢肿瘤患者及正常对照者血清中的表达水平比较 miR-200a、miR-200b、miR-200c 在卵巢癌患者的表达水平较正常对照组显著上升, 且差异均有统计学意义 (P 均 < 0.001), 而 miR-100 在卵巢癌患者的表达水平较正常对照组显著下降, 且差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 1)。另外, miR-200a、miR-200b、miR-200c 和 miR-100 在良性肿瘤

表 1 卵巢肿瘤病理诊断结果

病理类型	例数 (%)	浆液性	黏液性	子宫内膜样	透明细胞样
卵巢良性肿瘤	17(11.4)	7	10	-	-
卵巢交界性肿瘤	23(15.4)	8	15	-	-
卵巢癌	109(73.2)	66	24	12	7

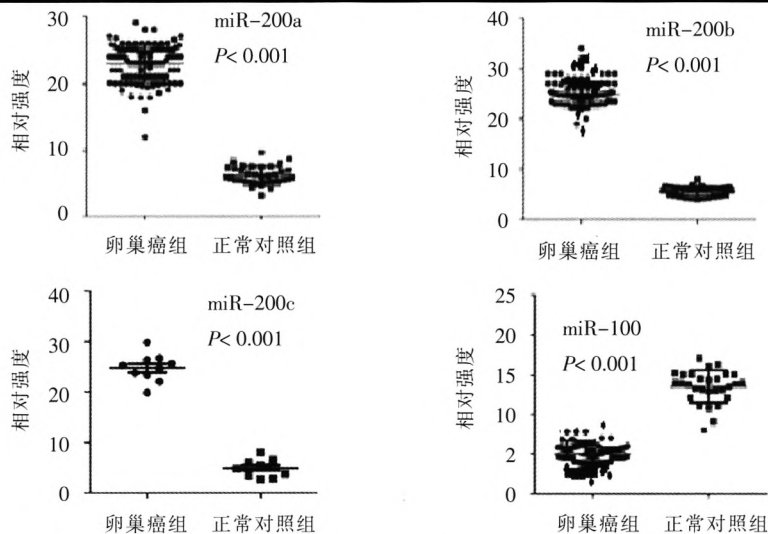


图 1 miRNA 在和卵巢癌患者和正常对照组血清中的表达差异

注: miR-200 家族在卵巢癌患者中表达明显高于对照组, miR-100 则在对照组中明显高表达

患者和正常对照组间的表达差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.2 miRNA 的表达与卵巢癌病理类型的关系
miR-200a、miR-200b 和 miR-200c 在透明细胞癌的表达水平明显高于浆液性和黏液性癌，且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。miR-200b 在浆液性癌中的表达水平高于黏液性癌，miR-200c 在透明细胞癌中的表达水平高于子宫内膜癌，且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。(图 2)。

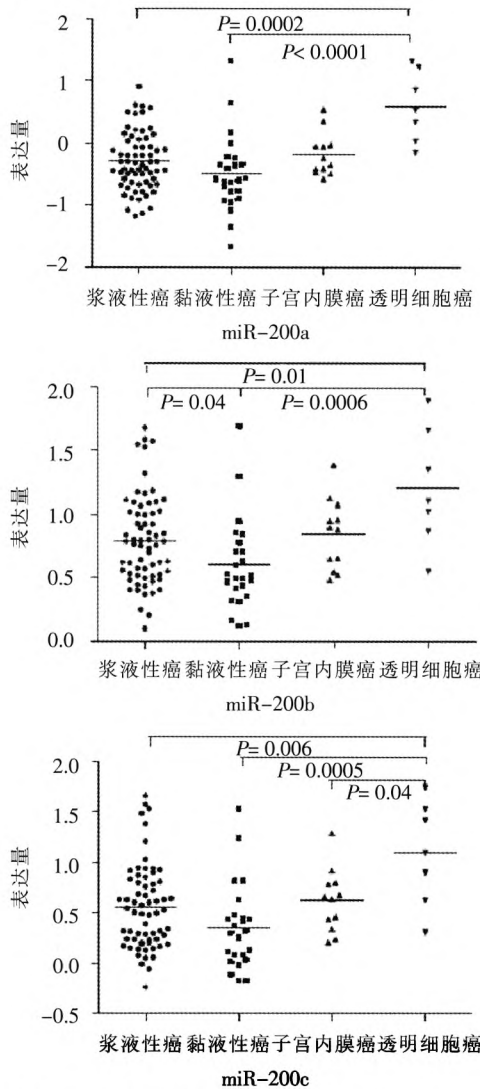


图 2 miRNA 表达与卵巢癌临床病理类型的关联

3 讨论

现在临床上主要通过查体、B 超和血清癌糖蛋白抗原 CA-125 检测来筛查卵巢癌。但是，CA-125 只在不到 50% 的早期患者中能检测到，而且在妊娠、月经期、子宫内膜炎，以及其他非卵巢肿瘤中也可检测到其水平的升高^[3]，因此，临床迫切需要寻找新的肿瘤标志物用于卵巢癌的早期诊断、治疗和预后评估。

miRNA 是一类非编码小分子 RNA，通常为 17-22 个核苷酸长度。主要参与细胞的增殖与凋亡、个体发育的调控及肿瘤的形成等生物学过程，与肿瘤的发生和发展有着非常密切的关系^[4]。Lu 等^[5]利用 miRNA 液态芯片研究了 20 种不同肿瘤的 miRNA 表达谱，发现每一种肿瘤都有一个相对稳定、特征性的 miRNA 表达谱。根据 miRNA 表达水平的差异可准确确定大多数低分化肿瘤的器官或组织起源^[6]。总体而言，miRNA 基因表达、调控的异常主要涉及有或无的差别，以及表达丰度高或低的差异。肿瘤特异性的 miRNA 表达谱的发掘对于肿瘤诊断、分型、寻找低分化肿瘤的原发灶具有重要临床价值，对于肿瘤的个体化治疗也具有重要的指导意义。

miRNA 的表达具有组织特异性，同样可以在血液中检测到，并且与肿瘤的临床行为相关^[7,8]。这类小分子在肿瘤中有着不同的表达谱，可以用来区分正常组织和癌组织，并且可以区分卵巢癌的不同亚型^[9]。Chen 等^[10]对血液样本进行不同极端条件处理，包括极端 pH (pH= 1、pH= 13) 处理 3 h，反复冻融，以及延长储存期等，血清 miRNA 依然稳定。这些特点使得血清 miRNA 非常适合作为一种分子标志物用于肿瘤的诊断、治疗及预后监测。但 miRNA 对 RNA 酶降解抵抗的机制目前尚不清楚，有待进一步研究。另外，miRNA 在外周血中具体以怎样的形式存在、循环，目前尚无统一意见，可能是以脂蛋白、凋亡小体等形式存在。针对其来源，有学者认为是肿瘤细胞释放其内源性 miRNA 进入外周血循环，且血清中的 miRNA 分子能保持良好的稳定性^[10,11]；或者是组织细胞特异性表达的 miRNA 因细胞坏死而直接进入血循环，导致特定疾病状态下特定循环 miRNA 的表达水平显著变化^[12,13]。

本文研究检测了 4 个 miRNA (miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-100) 在卵巢癌患者和正常对照者血清中的表达水平，结果显示，这 4 个 miRNA 表达水平在两组人群中差异均有统计学意义 (P 均 < 0.001)。而在良性卵巢肿瘤组与正常对照组比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。提示，上述 4 个 miRNA 可以作为卵巢癌的肿瘤标志物用于其临床诊断。另外，miR-200a、miR-200b 和 miR-200c 在卵巢癌的不同病理类型中的表达差异有统计学意义，提示其表达水平的检测可用于卵巢癌病理类型的诊断并对指导临床治疗有重要的价值。

Mateescu 等^[14]报道，miR-200a 以 P38a 为调节靶点，调节氧化应激反应，高度恶性的卵巢癌表达高

水平的 miR-200a 和低浓度的 P38a,且高表达 miR-200a 的卵巢癌患者对治疗的反应性好,预后好。Park 等^[15]报道 miR-200c 高表达的患者其生存率反而更好,推测其机制可能是由于 miR-200c 的靶蛋白 ZEB1 所致,此蛋白是关键的转录调控子,调节上皮细胞间充质化,使细胞保持在一种低侵袭性的上皮细胞状态中。而化疗敏感性则可能是由 miR-200c 的另一个靶蛋白 TUBB3/III 型 β -微蛋白的下调所致,该蛋白可与紫杉醇结合,也或许是 miR-200a 驱动的氧化应激反应增加了对紫杉醇诱导产生的活性氧的敏感性^[16]。不管是何种机制导致了肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性增加,miR-200 家族的表达水平显然可以给临床医生的用药提供指导。

相对于正常对照者而言,miR-100 在卵巢癌患者血清中的表达水平明显降低。笔者推测可能是由于 miR-100 本身能抑制肿瘤的进展,起到了类似于抑癌基因的作用,所以在肿瘤中是低表达的。但是 Huang 等^[17]报道在胰腺癌中,转移性癌细胞里 miR-100 是高表达的,似乎 miR-100 可以促进胰腺癌细胞的转移,属于癌基因。Leite 等^[18]发现 miR-100 可以调控蛋白基因 BAZ2A(溴结构区邻近至锌指结构区蛋白 2A)、mTOR(雷帕霉素靶蛋白)、成纤维细胞生长因子受体 3、自然凋亡相关蛋白 2 和肌动蛋白依赖性染色质调控因子 5,但其究竟是发挥癌基因还是抑癌基因的作用,取决于其所处的分子环境,单纯的升高或降低并不能直接预测患者的预后。相对于 miR-200 家族来说,miR-100 可能并不能算一个独立预测因子。

miR-200 家族的高表达不仅提示有卵巢癌的可能性,更可以用于患者对化疗反应和预后的评估,而 miR-100 表达的高低临床意义则要取决于具体的分子环境,在卵巢癌中,其低表达可能促进了肿瘤的进展。至于发现更多有独立预测作用的 miRNA,不但需要更多的样本进行筛查,更需要加强对其作用机制的研究,用以指导筛查方向。

4 参考文献

- Zhang L, Huang J, Yang N, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:9136-9141.
- Giannakakis A, Coukos G, Hatzigeorgiou A, et al. miRNA genetic alterations in human cancers. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7:1375-1386.
- Dodge JE, Covens AL, Lacchetti C, et al. Preoperative identification of a suspicious adnexal mass: A systematic review and meta-analysis.

- Gynecol Oncol, 2012, 126:157-166.
- Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol*, 2006, 2:73-82.
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, 435:834-838.
- Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*, 2008, 26:462-469.
- Resnick KE, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*, 2009, 112:55-59.
- Yu SL, Chen HY, Yang PC, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*, 2008, 13:48-57.
- Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 2007, 67:8699-8707.
- Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18:997-1006.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:10513-10518.
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106:4402-4407.
- Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*, 2011, 54:1767-1776.
- Mateescu B, Batista L, Cardon M, et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumor genesis by controlling oxidative stress response. *Nat Med*, 2011, 17:1627-1635.
- Park SM, Gaur AB, Lengyel E, et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev*, 2008, 22:894-907.
- Leskela S, Leandro-Garcia LJ, Mendiola M, et al. The miR-200 family controls beta-tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients. *Endocr Relat Cancer*, 2010, 18:85-95.
- Huang JS, Egger ME, Grizzle WE, et al. MicroRNA-100 regulates IGF1-receptor expression in metastatic pancreatic cancer cells. *Biotech Histochem*, 2013, 88:397-402.
- Leite KR, Morais DR, Reis ST, et al. MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013, 68:797-802.

(收稿日期:2014-02-09)

(本文编辑:陈淑莲)