

血清 miR-194 在结直肠癌诊断和预后判断中的价值研究

王时光, 朱光辉, 周联明, 单远洲, 张学利

(上海市奉贤区中心医院, 上海 201499)

摘要: [目的] 探讨血清 miR-194 在结直肠癌诊断和预后判断中的价值。[方法] 采用实时荧光定量 PCR 法检测 60 例结直肠癌患者和 60 例健康志愿者血清 miR-194 的相对表达水平, 并分析 miR-194 表达与结直肠癌患者预后的关系。[结果] 结直肠癌患者的血清 miR-194 水平显著低于健康对照者 ($P < 0.05$)。按照血清 miR-194 相对定量值 (临界值为 1.015) 进行结直肠癌诊断时的敏感性为 70.0%, 特异性为 78.3%, 阳性预测值为 76.3%, 阴性预测值为 72.3%。血清 miR-194 可产生最大受试者工作特征曲线的曲线下面积 (AUC) 为 0.86 (95%CI: 0.79~0.92)。N 分期、cTNM 分期、血清 miR-194 表达水平是结直肠癌患者预后的独立危险因素 ($P < 0.05$)。[结论] 血清 miR-194 可能是一种新的非侵入性指标用于结直肠癌患者的诊断及预后判断。

关键词: 结直肠肿瘤; 血清; miR-194; 诊断; 预后

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)05-0360-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.05.B005

Value of Serum MiR-194 in Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer

WANG Shi-guang, ZHU Guang-hui, ZHOU Lian-ming, et al.

(Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201499, China)

Abstract: [Objective] To assess the value of serum miR-194 in diagnosis and prognosis of colorectal cancer. [Methods] The relative expression level of serum miR-194 in 60 cases with colorectal cancer and 60 normal controls were detected by real-time fluorescence quantitative PCR assay, and the relationship between miR-194 expression and prognosis of colorectal cancer patients was analyzed. [Results] The level of serum miR-194 in patients with colorectal cancer was significantly lower than that of healthy controls ($P < 0.05$). The sensitivity and specificity of miR-194 (cut-off value as 1.015) for the diagnosis of colorectal cancer were 70.0% and 78.3%, and the positive predictive value and negative predictive value were 76.3% and 72.3%, respectively. The area under the ROC curve (AUC) was 0.86 (95%CI: 0.79~0.92). N staging, cTNM staging and serum miR-194 expression level were independent risk factors for prognosis of colorectal cancer ($P < 0.05$). [Conclusion] Serum miR-194 might be a new non-invasive serum marker for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer.

Subject words: colorectal neoplasms; serum; miR-194; diagnosis; prognosis

结直肠癌是临床上常见的消化道恶性肿瘤之一,也是世界上癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。结直肠癌起病隐匿、早期症状不典型且恶性程度高,预后较差^[2]。通过非侵入性的肿瘤标志物检测,早期诊断结直肠癌,可获得更有效的治疗和更好的预后^[3]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度为 19~24 nt 内源性单链非编码 RNA 片段,以调控 mRNA 翻译

的方式调节靶基因表达,其在肿瘤发生、发展过程中可能发挥癌基因或抑癌基因样作用^[4]。越来越多的科学家提出 miRNA 在血清和血浆中也有较高的稳定性和特异性,是潜在的新型无创诊断肿瘤标志物^[5]。miR-194 被证实在食管鳞状细胞癌和前列腺癌组织中表达上调^[6],而在子宫内膜癌^[7]、肾细胞癌^[8]和结直肠癌组织^[9]中表达下调。值得注意的是,结直肠癌组织中 miR-194 的低表达与肿瘤大小有关^[9]。此外,结直肠癌患者较正常志愿者粪便样本中 miR-194 表达水平下调^[9]。本研究采用实时荧光定量

通讯作者: 张学利,主任医师,博士生导师,博士;上海市奉贤区中心医院普外科,上海市奉贤区南奉公路 6600 号 (201499); E-mail: lejing1996@aliyun.com

收稿日期: 2015-12-09; **修回日期:** 2016-01-14

PCR 技术检测结直肠癌患者血清 miR-194 的水平,并评估其作为生物学标志物的准确性和可行性,为血清 miRNA 作为生物标志物用于结直肠癌的临床诊断和预后判断提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集上海市奉贤区中心医院普外科 2011 年 1 月至 2013 年 12 月收治的 60 例结直肠癌患者外周血,标本获得前患者未经任何放、化疗,患者均经病理检查确诊结直肠癌,无其他肿瘤病史。按国际抗癌联盟(UICC,2010 版)标准确定结直肠癌 TNM 分期。同时选取同期 60 例健康体检者为健康对照。结直肠癌患者和健康志愿者的年龄和性别无统计学差异 ($P>0.05$)。随访方式为门诊随访与电话随访相结合。随访时间为 2011 年 1 月 15 日至 2015 年 11 月 30 日。所有标本的采集均获得患者和健康志愿者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血清样本的收集

采集所有待检者的空腹静脉血 5ml,迅速转入不含 EDTA 的普通试管中,在水浴箱(37℃)中静置 10min,至血液完全凝固。室温条件下,3000rpm 离心 10min,吸取上清液至洁净的 1.5ml 离心管中,4℃、16 000g 离心 10min,小心吸取上清液到新的离心管中,置于-80℃冰箱低温保存。

1.2.2 血清总 RNA 的提取

取上述血清样本,每份 500ul,按 miRNeasy 试剂盒(美国 Qiagen 公司)说明书所述的方法抽提总 RNA。取 1μlRNA 在 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer 仪(美国 NanoDrop 公司)上测定 RNA 浓度。抽提获得的 RNA 置于-80℃冰箱中保存备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测

采用 miScript II Reverse Transcription 逆转录试剂盒(美国 Qiagen 公司)将其逆转录为 cDNA,反应条件:37℃1h,95℃5min。以 cDNA 为模板,应用 miScript SYBR Green PCR 试剂盒(美国 Qiagen 公司)进行实时荧光定量 PCR,以 U6 小核 RNA(small nuclear RNA,snRNA) 为内参照,miR-194 和 U6snRNA 的特异性引物序列见文献^[10],引物由上海生工生物工

程股份有限公司合成。每个样本做 3 个复孔,实时荧光定量 PCR 检测在 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Roche 公司)上进行。PCR 反应条件:第 1 步,95℃预热 3min;第 2 步,95℃3s,60℃20s,72℃1s,共 45 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算实验组与对照组相对表达量, $\Delta Ct=Ct_{miR-194}-Ct_{U6}$ 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间均值差异比较采用 t 检验。计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。通过受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve,ROC) 判断 miR-194 表达水平在结直肠癌诊断中的敏感性和特异性。单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验,多因素生存分析采用 Cox 比例风险模型。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-194 表达水平在结直肠癌患者诊断中的价值

结直肠癌患者的血清 miR-194 水平(0.90 ± 0.12)显著低于健康对照者(1.16 ± 0.21)($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果显示,血清 miR-194 相对定量值(临界值为 1.015) 进行结直肠癌诊断时的敏感性为 70.0%,特异性为 78.3%,阳性预测值为 76.3%,阴性预测值为 72.3%;曲线下面积(AUC)为 0.86(95%CI:0.79~0.92),与 AUC=0.5 比较,差异有统计学意义($P<0.01$)(Figure 1)。

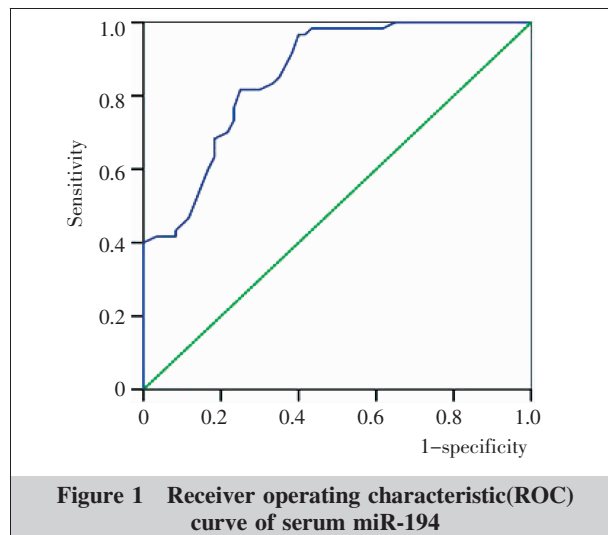


Figure 1 Receiver operating characteristic(ROC) curve of serum miR-194

2.2 miR-194 表达水平在结直肠癌预后判断中的价值

以血清 miR-194 相对定量值的中位值 0.87 为临界点将结直肠癌患者血清 miR-194 表达水平分为高低两组。截止至 2015 年 11 月 30 日, 60 例结直肠癌患者中, 34 例死于结肠癌。中位随访时间 26 个月

(6~59 个月)。单因素生存分析结果显示, 组织病理学分级、T 分期、N 分期、cTNM 分期、血清 miR-194 表达水平与患者预后有关($P < 0.05$), 而性别、年龄、肿瘤大小、M 分期与患者预后均无关($P > 0.05$, Table 1, Figure 2)。组织病理学分级、T 分期、N 分期、cTNM

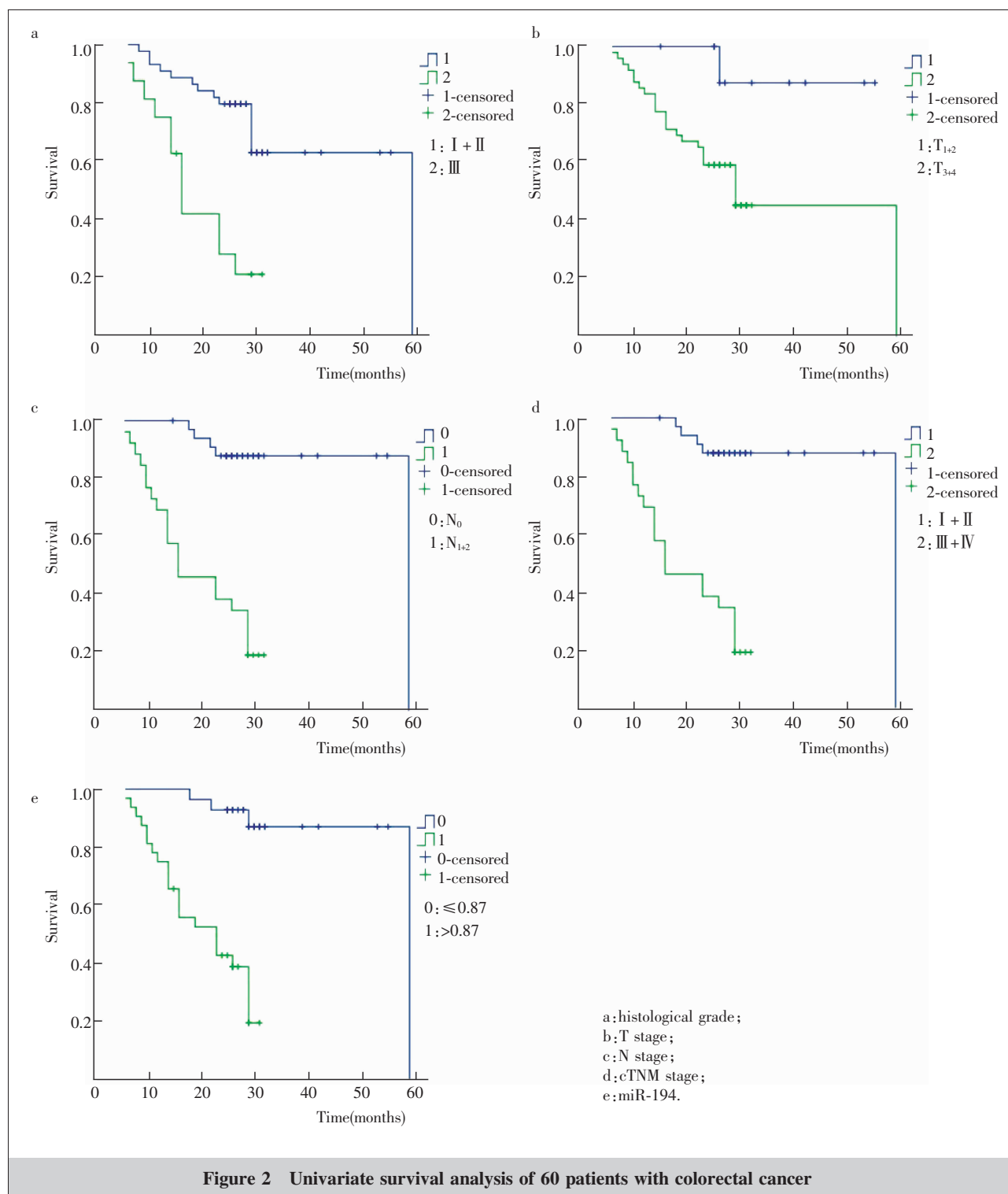


Table 1 Univariate survival analysis of 60 patients with colorectal cancer

Variables	Chi-Square	df	Sig.
Gender(male vs female)	0.502	1	0.479
Age(≤60 vs >60)	0.248	1	0.619
Tumor size(≤5cm vs >5cm)	0.307	1	0.579
Histological grade(I + II vs III)	14.684	1	0.000
T stage(T ₁₊₂ vs T ₃₊₄)	4.735	1	0.030
N stage(N ₀ vs N ₁₊₂)	27.636	1	0.000
M stage(M ₀ vs M ₁)	3.119	1	0.077
cTNM stage(I + II vs III+IV)	27.636	1	0.000
miR-194(≤0.87 vs >0.87)	23.719	1	0.000

分期低者,总生存期显著长于高者($P=0.000,0.030,0.000,0.000$);血清 miR-194 高表达者,总生存期显著长于低表达者($P=0.000$)。将单因素分析有统计学意义的 5 个因素引入 Cox 比例风险模型进行多因素分析。根据多因素生存分析结果,N 分期、cTNM 分期、血清 miR-194 表达水平是结直肠癌患者预后的独立危险因素($P<0.05$,Table 2)。

Table 2 Multivariate survival analysis of 60 patients with colorectal cancer

Variables	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B) (95%CI)
Histological grade(I + II vs III)	-0.168	0.445	0.142	1	0.860	0.846(0.354~2.022)
T stage(T ₁₊₂ vs T ₃₊₄)	-0.878	1.042	0.711	1	0.417	0.416(0.054~3.201)
N stage(N ₀ vs N ₁₊₂)	-1.663	0.585	8.086	1	0.004	0.190(0.060~0.596)
cTNM stage(I + II vs III+IV)	-1.663	0.585	8.086	1	0.004	0.190(0.060~0.596)
miR-194(≤0.87 vs >0.87)	-1.727	0.645	7.166	1	0.007	0.178(0.050~0.630)

3 讨论

近年来研究发现 miRNA 在肿瘤发生、发展过程中可能发挥癌基因或抑癌基因样作用,并表现为不同类型的肿瘤有其特异的 miRNA 表达谱^[11],有望成为早期诊断肿瘤的一个潜在分子标志物。肿瘤患者的血液循环中存在来源于肿瘤的 miRNA 分子,且在血清和血浆中具有较高稳定性和特异性^[12]。血清或血浆放置在常温 24h 以上或在强酸强碱环境中以及反复冻融样本也不影响 miRNA 的稳定性^[13]。由于外周血样品检测具有无创便捷和水平稳定等优点,故血清 miRNA 的检测更适于临床应用。

miR-194 在各种肿瘤中的确切作用还存在争议。有研究表明 miR-194 在食管鳞状细胞癌和前列腺癌组织中表达上调^[6],而在子宫内膜癌^[7]、肾细胞癌^[8]和结直肠癌组织^[9]中表达下调。我们的研究结果证实:与健康对照组比较,结直肠癌患者的血清

miR-194 水平显著降低 ($P<0.05$)。这表明 miR-194 在结肠癌中很可能表现为一个抑癌因子。已有研究报道 miR-194 可能的抑癌机制。miR-194 通过靶向 PDK1/AKT2/XIAP 途径抑制结直肠癌细胞的侵袭能力^[9]。在子宫内膜癌中,miR-194 通过抑制 BMI-1,调控上皮间质转化相关基因的表达,抑制肿瘤侵袭过程^[14]。此外,肾癌细胞系中 miR-194 抑制 MDM2、胸苷酸合成酶(TYMS)和 *SIP1/ZEB2* 基因的表达^[15]。

本研究结果显示,应用血清 miR-194 相对定量值(临界值为 1.015)进行结直肠癌诊断时的敏感性为 70.0%,特异性为 78.3%,阳性预测值为 76.3%,阴性预测值为 72.3%。ROC 曲线分析结果显示,AUC 为 0.86(95%CI:0.79~0.92),与 AUC=0.5 比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。生存分析显示,血清 miR-194 表达水平是结直肠癌患者预后的独立危险因素($P<0.05$)。这提示血清 miR-194 水平可以作为结直肠癌潜在的无创诊断和预后预测因子,作为结直肠癌

的生物标志物有一定的准确性和可行性。自 Ng 等^[16]首次发现结直肠癌患者血浆中 miR-92 水平上调,是结直肠癌潜在的生物学标志物以来,多篇文献报道结直

肠癌患者循环中 miRNA 表达的改变对结直肠癌有一定的诊断价值,如 miR-532-3p,miR-331,miR-195,miR-17,miR-142-3p,miR-15b,miR-532,miR-652,miRNA-21,miRNA-339-3p^[17],miRNA-18a,miRNA-19a,miRNA-19b,miRNA-15b,miRNA-29a,miRNA-335^[18],miRNA-21,let-7g,miRNA-31,miRNA-92a,miRNA-181b,miRNA-203^[19]。此外,由于不同肿瘤的特异性 miRNAs 存在交叉性和多样性,单个 miRNA 对结直肠癌的诊断可能无法达到理想的敏感性和特异性,因此,血清中多种 miRNAs 组成的联合标志谱,可能有助于提高其诊断价值^[20]。这说明循环中 miRNA 表达水平对结直肠癌的诊断价值需要进一步研究。为了早期诊断结直肠癌和改善患者预后,需要进一步扩大样本量,验证和筛选结直肠癌特异性血清生物标志物,使其成为结直肠癌早期诊断及判断预后的灵敏、特异和无创简便的肿瘤检测方法。但目前通过检测血清 miRNAs 早期诊断肿瘤还有许多有待解决的问题。

例如组织特异 miRNAs 的确定、miRNAs 检测方法和诊断阈值的标准化等。随着这些问题的解决,血清 miRNAs 在临床诊断和疾病监测中会有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(2): 104-117.
- [2] van Geel RM, Beijnen JH, Bernards R, et al. Treatment individualization in colorectal cancer[J]. Curr Colorectal Cancer Rep, 2015, 11(6): 335-344.
- [3] Narayanan V, Peppelenbosch MP, Konstantinov SR. Human fecal microbiome-based biomarkers for colorectal cancer[J]. Cancer Prev Res, 2014, 7(11): 1108-1111.
- [4] Barte DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [5] 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[J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.
- [6] Selth L, Townley S, Bert A, et al. Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients [J]. Br J Cancer, 2013, 109(3): 641-650.
- [7] Zhai H, Karaayvaz M, Dong P, et al. Prognostic significance of miR-194 in endometrial cancer[J]. Biomark Res, 2013, 1: pii: 12.
- [8] White NM, Bao TT, Grigull J, et al. miRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation[J]. J Urol, 2011, 186(3): 1077-1083.
- [9] Zhao HJ, Ren LL, Wang ZH, et al. miR-194 deregulation contributes to colorectal carcinogenesis via targeting AKT2 pathway[J]. Theranostics, 2014, 4(12): 1193-1208.
- [10] Qian XY, Sun YH, Wang XH, et al. Correlations between miR-194 in blood during deep hypothermic circulatory arrested and postoperative neurological score [J]. Molecular Cardiology of China, 2013, 13(3): 553-558. [钱向阳, 孙燕华, 王小华, 等. 深低温停循环血中 miR-194 变化与术后神经功能评分的相关性分析[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2013, 13(3): 553-558.]
- [11] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA[J]. Cell, 2013, 153(3): 516-519.
- [12] 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 [J]. Cell Res, 2008, 18 (10): 997-1006.
- [13] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [14] Dong P, Kaneuchi M, Watari H, et al. MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 99.
- [15] Khella HW, Bakhiet M, Allo G, et al. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(10): 2231-2239.
- [16] Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening [J]. Gut, 2009, 58(10): 1375-1381.
- [17] Kanaan Z, Roberts H, Eichenberger MR, et al. A plasma microRNA panel for detection of colorectal adenomas: a step toward more precise screening for colorectal cancer [J]. Ann Surg, 2013, 258(3): 400-408.
- [18] Giráldez MD, Lozano JJ, Ramírez G, et al. Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013, 11(6): 681-688.e3.
- [19] Wang J, Huang SK, Zhao M, et al. Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e87451.
- [20] Saplaçan RM, Mircea PA, Balacescu L, et al. MicroRNAs as non-invasive screening biomarkers of colorectal cancer [J]. Clujul Med, 2015, 88(4): 453-456.