

microRNA-10a 联合 microRNA-23a 在结直肠癌 腺癌早期诊断中的价值

唐 雷¹, 周 莉², 吴胜春¹, 石晓明¹, 姜广伟¹

(1. 河北省人民医院, 河北 石家庄 050051;

2. 河北医科大学第三医院, 河北 石家庄 050051)

摘要: [目的] 探讨血清 microRNA-10a 及 microRNA-23a 水平在结直肠癌腺癌早期诊断中的价值。 [方法] 选择经肠镜病理活检证实为结直肠癌腺癌患者 30 例作为研究组, 另选取同期接受治疗的结直肠良性病变患者 30 例作为对照组, 所有患者均抽取外周静脉血, 采用实时荧光定量 PCR 技术 (real-time PCR, qRT-PCR) 检测并比较研究组患者术前、术后 7d 及对照组患者的血清 miR-10a 及 miR-23a 表达水平, 通过受试者工作特性曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC) 判断各单项 miRNA 表达水平及两者联合在结直肠癌腺癌诊断中的灵敏度和特异性。 [结果] (1) 研究组患者术前血清 miR-10a 及 miR-23a 表达水平均显著升高, 明显高于对照组 ($t=9.376, 9.584, P < 0.001$), 术后则显著降低, 与术前比较差异均有统计学意义 ($t=4.231, 4.246, P < 0.001$)。 (2) ROC 曲线分析结果显示, 单用血清 miR-10a 检测结直肠癌腺癌的灵敏度为 75.7%, 特异性为 86.2%; 单用血清 miR-23a 检测结直肠癌腺癌的灵敏度为 73.4%, 特异性为 87.3%; 两者联合检测结直肠癌腺癌的灵敏度为 89.8%, 特异性为 81.6%, 且可产生最大 ROC 的曲线下面积 (AUC) 为 0.894。 [结论] miR-10a 及 miR-23a 生物标志物组可能是一种新型结直肠癌腺癌早期诊断的指标。

关键词: 结直肠癌腺癌; microRNA-10a; microRNA-23a; 早期诊断

中图分类号: R735.3⁺5; R735.3⁺7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)08-0712-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.08.B007

Value of MicroRNA-10a and MicroRNA-23a in Diagnosis of Colorectal Adenocarcinoma

TANG Lei¹, ZHOU Li², WU Sheng-chun¹, SHI Xiao-ming¹, JIANG Guang-wei¹

(1. Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China;

2. The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: [Objective] To assess the application of serum microRNA-10a (miR-10A) and microRNA-23a (miR-23A) levels in diagnosis of colorectal adenocarcinoma. [Methods] Thirty patients with colorectal adenocarcinoma confirmed by colonoscopic biopsy (study group) and 30 patients with colorectal benign lesions (control group) were enrolled in the study. Serum miR-10a and miR-23a levels were detected by Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) before and 7d after the operation, and the levels were compared between the study group and the control group. The sensitivity and specificity of serum miR-10a, miR-23a and the combination of two microRNAs in the diagnosis of colorectal adenocarcinoma were evaluated by receiver operator characteristic curve (ROC). [Results] The serum levels of miR-10a and miR-23a were significantly higher in the study group than those in the control group ($t=9.376, 9.584, all P < 0.001$), and decreased significantly after the operation ($t=4.231, 4.246, all P < 0.001$). ROC curve analysis showed that the sensitivity of serum miR-10a and miR-23a in detection of colorectal adenocarcinoma was 75.7% and 73.4%; the specificity of two microRNAs was 86.2% and 87.3%, respectively. The sensitivity and specificity of the combination of miR-10a and miR-23a was 89.8% and 81.6%, respectively; and the area under the curve (AUC) of ROC curve was 0.894. [Conclusion] Circulating miR-10a and miR-23a may be used as biomarkers for diagnosis of colorectal adenocarcinoma.

Subject words: colorectal adenocarcinoma; microRNA-10a; microRNA-23a; early diagnosis

微小核糖核酸 (micro RNA, miRNA) 是一类广泛存在于真核生物中的长度约为 19~25 个核苷酸

通信作者: 唐雷, 主治医师, 硕士; 河北省人民医院血管外科, 河北省石家庄市和平西路 348 号 (050051); E-mail: tangl88@126.com
收稿日期: 2018-03-30; **修回日期:** 2018-05-23

的单链非编码小 RNA 分子, 其可通过与靶基因的互补结合来抑制靶 mRNA 降解或翻译, 从而对靶基因表达产生负向调控作用 [1]。近年来研究发现 [2], miRNA 在多数肿瘤的发生和发展中具有癌基因抑

制或抑癌基因的作用,同时越来越多的研究也指出血清 miRNA 作为生物标志物在食管癌^[3]、肝癌^[4]等恶性肿瘤的诊断中显示出巨大潜力。结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在临床为常见恶性肿瘤,其中约有 75%~85% 的患者为结直肠腺癌^[5]。已有研究指出^[6-7],相比正常组织,人结直肠癌组织中 microRNA-10a (miR-10a) 和 microRNA-23a (miR-23a) 呈现高表达,且结直肠癌患者血清 miR-23a 表达水平也明显高于正常人。本研究则以此为基础,采用实时荧光定量 PCR 技术检测结直肠腺癌患者血清 miR-10a 及 miR-23a 的表达水平,初步探讨两者在结直肠腺癌早期诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 1 月至 2017 年 8 月在我院接受治疗的经肠镜病理活检证实为结直肠腺癌患者 30 例作为研究组,所有患者在收集外周血标本及手术治疗前和术后 1 周内未行任何辅助治疗,无其他肿瘤史,无恶性肿瘤家族史,且临床病理及随访信息均齐全。30 例患者中男性 22 例,女性 8 例;年龄 27~78 岁,平均年龄 58.67±12.53 岁;肿瘤部位:直肠 17 例,结肠 13 例;分化:低分化 6 例,高中分化 24 例;TNM 分期: I + II 期 12 例, III + IV 期 18 例。另选取同期在我院接受治疗的结直肠良性病变患者 30 例作为对照组,其中男性 20 例,女性 10 例;年龄 25~76 岁,平均 58.33±12.68 岁。两组年龄和性别构成等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获医院伦理委员会批准及患者知情同意,患者均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 血清标本收集

在患者知情同意的情况下,在术前 1d 和术后 7d 应用不加抗凝剂的红色头盖普通真空血清管采集目标对象 3ml 空腹血样,常温下静置直至血液自然凝固,将采集的血样标本在 5000r/min 离心 15min 后取上层淡黄色血清分装在经 DNA 酶和 RNA 酶灭活的 EP 管中,置于-80℃下保存待用。

1.2.2 主要仪器及试剂

主要仪器:9600 型 PCR 扩增仪、iQ5 定量 PCR

检测仪、紫外分光光度计,均来自于美国 Bio-tek 公司;BCM-8 超净工作台来自于苏州净化设备公司;台式离心机来自于德国 Eppendorf 公司;Nanodrop 来自于美国 Thermo scientific 公司。

主要试剂:rTaqPCR 试剂盒、dNTP(10mM)均来自于日本 TakaRa 公司;miReute miRNA 来自于 TIANGEN 公司;RNA 酶抑制剂、AMV 反转录酶均来自于美国 promega 公司;焦炭酸二乙酯来自于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;低熔点琼脂糖凝胶来自于美国 GIBCO 公司;RNase-free 水配制:RNase-free 水+氯仿+异丙醇+75%乙醇。

1.2.3 血清总 RNA 提取

取 500 μ l 血清置于 1.5ml 灭活 RNase 酶的 EP 管中,向其中加入同体积的裂解液 MZ,漩涡振荡混匀后室温下静置,以完全解离 RNA 蛋白复合物;室温下离心取上清液置于新的无酶离心管中,加入氯仿后漩涡振荡混匀,室温静置;室温下离心取上层无色水相置于新的无酶 EP 管中;缓慢加入 1/3 体积的无水乙醇,混匀后将混合物转移至 miRspin,静置 2min 后离心取流出液;在流出液中加入 2/3 体积的无水乙醇,充分混匀后将混合物转入吸附柱 miRelute 中,室温下静置 2min 后离心留取吸附柱 miRelute;在吸附柱 miRelute 中加入 500 μ l 去蛋白液 MRD,静置 2min 后离心弃废液;在吸附柱中加入 600 μ l 漂洗液 RW,静置 2min 后离心弃废液;重复上一步骤后室温下空离,将吸附柱中 miRelute 中的残余液体去除;然后将吸附柱 miRelute 置于无酶的 1.5ml 离心管中,加入 30 μ l DEPC 处理水,以溶解 RNA 沉淀,沉淀完全溶解后将其置于-70℃下保存待测。

1.2.4 cDNA 第一链合成及实时定量 PCR

采用基于茎-环引物的实时定量 PCR 是将具有靶向特异性的逆转录引物引入,其可于成熟的 miRNA 结合为 RT 引物+成熟 miRNA 复合体,并延伸至 miRNA 的 5'末端,从而获得符合要求的进行 RT-qPCR 的反转录扩增子模板。本研究中 RT-PCR 检测 miRNA 相对表达水平的内参基因为 miR-16。

引物序列:miR-16 RT primer:5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGCGACTGGATACGACCGC-CAAT 3';miR-16 Fwd primer:5'GCCCCGCTAGCAGC-ACGTAAATAT3'; miR-23a RT primer:5' GTCGTA-

TCCAGTGCAGG GTCCGAGGGCACTGGATACGACC-CAAATGG3';miR-23a Fwd primer:5' ATCACATTGCCAG 3';miR-10a RT primer:5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGCACTGGATACGACCACAAATT 3';miR-10a Fwd primer:5'TGCCGTACCCTGTAGATCCG 3';Reverse primer:5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'。

RT-PCR 检测步骤:(1) 配制反应体系:2μg 小片段 RNA +1μl miR-16、miR-23a/miR-10a 引物(100pmol/μl)+10μLDEPC 水;65℃下变性 10min,后 25℃下 5min, 后冰浴 5min; 加入 4μl 5×fist stand buffer+1μl dNTOs(10mM)+1μl RNase(40U/μl)+1μL M-MLV(200U/μl), 共计 20μl;42℃下延伸 30min,后 70℃下灭活 10min, 将产物置于-20℃下保存备用。(2)RT-PCR 检测目标 miRNA 表达水平: 配制 RT-PCR 体系:5.0μl cDNA (1:20)+0.5μl 上游引物+0.5μl 下游引物+10μl 2x SYBR Green PCR Master Mix +4.0μl H₂O, 总体积为 20μl;将 20μl 的混合物进行扩增,具体条件为 95℃下 5min;95℃下 15s,65℃下 15s,72℃下 32s,40 个循环;(3) 收集数据: 采用相对法(ΔΔCT 法)表示血清目标 miRNA 的表达量,CT 为反应达到阈值时的循环数,用方程 2^{-ΔCT} 表示目标 miRNA 相对标准内参的表达量,其中 ΔCT=CT_{待测 miRNA}-CT_{miR-16}。

以健康人群 95%数据区间确定血清 micro-10a 和 micro-23a 表达水平的正常值范围作为标准,高于该范围则为其表达阳性,联合检测诊断结直肠癌的标准为任一检测结果为阳性。以穿刺活检的病理结果作为金标准,计算单独检测和联合检测的敏感度和特异性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行数据的统计学处理,采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)或中位数(四分位数间距)描述计量资料,组内比较采用配对 t 检验,组间比较采用独立样本 t 检验;采用受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve,ROC) 判断 miR-10a、miR-23a 表达水平及两者组合在结直肠癌诊断中的

灵敏度和特异性,选择 ROC 曲线上最靠左上方的点,以统计结果中各可能的敏感度和特异性为依据计算约登指数,诊断截点为最大的切点敏感度=真阳性/(真阳性+假阴性)×100%; 特异度=真阴性/(真阴性+假阳性)×100%。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者血清 miR-10a 及 miR-23a 表达水平比较

实时定量 PCR 检测结果显示,研究组患者术前血清 miR-10a 及 miR-23a 表达水平均显著升高,且明显高于对照组(P<0.05),术后则显著降低,与术前比较差异有统计学意义,与对照组相比差异有统计学意义(P<0.05)。见 Table 1。

Table 1 Comparison of serum miR-10a and miR-23a expression levels between study group and control group

Group	miR-10a				miR-23a			
	Preoperation	Postoperation	t	P	Preoperation	Postoperation	t	P
Study group	2.02±0.48	1.57±0.33	4.231	<0.001	2.16±0.56	1.66±0.32	4.246	<0.001
Control group	1.06±0.29	1.06±0.29	-	-	1.04±0.31	1.04±0.31	-	-
t	9.376	6.358			9.584	7.622		
P	<0.001	<0.001			<0.001	<0.001		

2.2 miR-10a、miR-23a 表达水平及两者联合在结直肠癌诊断中的价值

ROC 曲线分析结果(Figure 1)显示,单用血清 miR-10a 相对定量值检测结直肠腺癌的灵敏度为 75.7%, 特异性为 86.2%,ROC 的曲线下面积(area under the curve,AUC) 为 0.767; 单用血清 miR-23a 相对定量值检测结直肠腺癌的灵敏度为 73.4%, 特异性为 87.3%,AUC 为 0.763;单用 miR-10a、miR-23a 进行结肠癌诊断时的 AUC 均明显高于 0.5 (P<0.05),但两者之间诊断效能无显著性差异(P>0.05)。两者联合检测结直肠腺癌的灵敏度为 89.8%, 特异性为 81.6%,且可产生最大 AUC 为 0.894,均明显高于 miR-10a、miR-23a 单项指标的 AUC (P<0.05),详见 Table 2。

3 讨论

研究显示 microRNAs(miRNAs)是潜在的肿瘤早期诊断及预后判断的标志物,具有降解或翻译抑

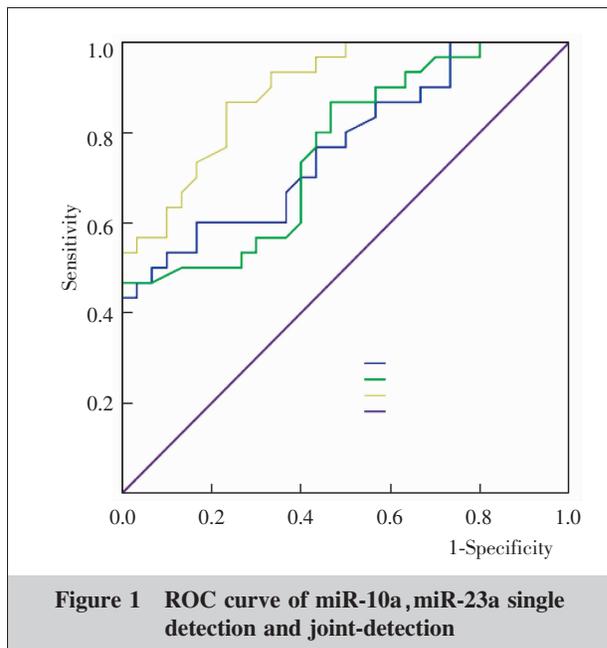


Figure 1 ROC curve of miR-10a, miR-23a single detection and joint-detection

Table 2 Comparison of diagnostic efficacy of miR-10a, miR-23a single detection and joint-detection

Detection project	AUC	Standard error	95% confidence interval	Sensitivity (%)	Specificity (%)
miR-10a	0.767	0.060	0.649~0.886	75.7	86.2
miR-23a	0.763	0.061	0.643~0.882	73.4	87.3
miR-10a+miR-23a	0.894	0.039	0.819~0.970	89.8	81.6

制靶基因 mRNA (癌基因或抑癌基因) 的作用^[2]。虽然目前有关 miRNA 的作用机制尚未完全阐明,但国内外已经有大量研究证实 miRNA 的表达异常会通过影响基因表达参与到多种肿瘤的发生和进展过程中,包括胰腺癌、肺癌等及结直肠癌。Arndt 等^[8]利用 MiR Vana miRNA Binarrays 对 CRC 细胞系、CRC 组织及相应正常结直肠组织中的 miRNAs 表达谱进行比较,结果显示有 37 个 miRNAs 表达水平出现异常,其中有些 miRNAs 与 CRC 的进展有关。之后有研究指出^[6],血清 miRNA 检测相对组织检测具有表达稳定、特异性高及损伤小、取材方便等优点,并提出血循环 miRNA 是潜在的肿瘤诊断标志物。Chen 等^[9]对 CRC 患者血清 miRNAs 进行深度测序,结果显示有 69 个 CRC 血清特有 miRNAs 出现显著性表达,但指出其中只有少量的血清 miRNAs 最终可发展为 CRC 的特定诊断标志物,其中就包括血清 miR-10a 和 miR-21a。

miR-10a 在多种恶性肿瘤中均呈现异常表达,包括原发性肝癌、膀胱癌、急性髓样白血病、

胰腺癌等,但不同肿瘤中其异常表达的方向和程度都不尽相同。例如在原发性肝细胞癌中,miR-10a 为显著高表达,在胰腺癌、膀胱癌等中也呈高表达,但在食管癌、乳腺癌、头颈部鳞癌等中则呈现低表达,这种差异可能是其作用基因位点的不同和信号传导途径差异导致的^[10-11]。有研究指出^[9],在 CRC 细胞系和组织中,miR-10a 呈明显高表达,并指出其是 CRC 肿瘤组织表达丰富的 miRNAs 之一,并指出 miR-10a 的靶基因均是与 CRC 发生有关的基因,具有促进肿瘤发生和发展的作用。本研究结果显示研究组患者手术治疗前血清 miR-10a 表达水平要明显高于对照组,术后则明显降低 ($P < 0.05$)。提示在 miR-10a 在 CRC 中可能具有致癌作用,这与上述研究结论相一致。

miR-23a 是 miR-23 家族中的一员,其同样在肝癌、前列腺癌及 CRC 等多种实体肿瘤细胞、组织及患者血清中呈现异常表达。研究发现,在淋巴瘤、前列腺癌患者的肿瘤组织中,miR-23a 呈现显著低表达,前者主要是受 c-Myc 基因的影响,后者则主要受抑癌基因 PML-RARA 的影响^[12-13]。而在胰腺癌、肝癌等及 CRC 肿瘤组织中,更多则呈现显著高表达^[14]。在 CRC 中,目前多数研究认为 miR-23a 可促进其发生和发展,尤其可促进其侵袭性生长以及发生转移。Jahid 等^[15]通过动物实验证明,miR-23a 可促进 CRC 侵袭性生长。Wang 等^[16]也指出,miR-23a 在 CRC 细胞系和组织中呈现显著高表达,且异常高表达与肿瘤的发生、发展、侵袭和转移均有关,并指出其作用机制可能为抑制抑癌基因 MTSS1 的表达。而有关循环 miR-23a 在 CRC 患者表达水平的研究结果也均指出,CRC 患者血清中 miR-23a 表达显著升高。本研究结果显示研究组患者手术治疗前血清 miR-23a 表达水平明显高于对照组,手术后则明显降低。提示 miR-23a 在结直肠癌中可能具有致癌作用,这也与上述研究结论相一致。

我们进一步通过 ROC 曲线对 miR-10a、miR-23a 检测及两者联合检测对结直肠癌诊断的灵敏度和特异性进行分析,结果显示单用血清 miR-10a 相对定量值诊断结直肠癌的灵敏度和特异性均较高,其 AUC 均明显高于 0.5,提示这两个 miRNA 单

独作为结直肠腺癌的肿瘤标志物均具有一定的准确性和可行性。同时,进一步分析显示 miR-10a 及 miR-23a 联合作为结直肠腺癌检测的生物标志物组合诊断结直肠腺癌的灵敏度为 89.8%, 特异性为 81.6%, AUC 为 0.894, 其 AUC 明显高于单项指标 ($P<0.05$)。提示采用 miR-10a 和 miR-23a 的生物学指标组织进行结直肠腺癌的诊断具有更高的灵敏度和特异性。但有关两者具体在结直肠腺癌中特异性表达上调的机制及生理功能还需进一步研究探讨。

综上所述,循环 miR-10a 及 miR-23a 生物标志物组可能是一种新型结直肠腺癌早期诊断的指标,而血浆 miRNA 分析有可能成为一种全新的非侵入性 CRC 早期筛查和诊断方法广泛应用。

参考文献:

[1] Tian SB, Yu JB, Kang WB, et al. MicroRNA and gastric cancer [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2014, 36 (2): 214-217. [田树波, 于健春, 康维明, 等. 微小 RNA 与胃癌[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(2): 214-217.]

[2] Zhang TT, Chen J. New progress in the study of the relationship between micro RNA and tumor [J]. Chinese Journal of Pathology, 2013, 42(5): 358-360. [张婷婷, 陈杰. 微小 RNA 与肿瘤关系研究新进展 [J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(5): 358-360.]

[3] Lu J, Xue LY, Jin ML, et al. Expression profiling of metastasis-related microRNAs in early esophageal squamous cell carcinoma [J]. Chinese Journal of Pathology, 2014, 43 (5): 313-317. [路军, 薛丽燕, 金木兰, 等. 早期食管鳞状细胞癌转移相关微小 RNA 的表达 [J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(5): 313-317.]

[4] Zhan MX, Li Y, Hu BS, et al. Expression of serum microRNAs (miR-222, miR-181, miR-216) in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance [J]. National Medical Journal of China, 2013, 93(23): 1830-1832. [占美晓, 李勇, 胡宝山, 等. 肝癌患者血清中微小 RNA 的表达及其临床意义 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93 (23): 1830-1832.]

[5] Di Z, Zheng RS, Zou XN, et al. Analysis and prediction of colorectal cancer incidence trend in China [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2012, 46 (7): 598-603. [代珍, 郑荣寿, 邹小农, 等. 中国结直肠癌发病趋势分析和

预测[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(7): 598-603.]

[6] Schee K, Lorenz S, Worren MM, et al. Deep sequencing the MicroRNA transcriptome in colorectal cancer [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66165.

[7] Yong FL, Law CW, Wang CW. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 280-289.

[8] Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, et al. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2009, 9(1): 374-390.

[9] Chen H, Nayak SS, Liu H, et al. Sa1906 circulating plasma MicroRNA as markers in the early detection of colorectal cancer [J]. Gastroenterology, 2014, 146(5): S325.

[10] Hoppe R, Achinger-Kawecka J, Winter S, et al. Increased expression of miR-126 and miR-10a predict prolonged relapse-free time of primary oestrogen receptor-positive breast cancer following tamoxifen treatment [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(17): 3598-3608.

[11] Safari A, Seifoleslami M, Yahaghi E, et al. Upregulation of miR-20a and miR-10a expression levels act as potential biomarkers of aggressive progression and poor prognosis in cervical cancer [J]. Tumour Biol. 2015 Oct 1. [Epub ahead of print]

[12] Li B, Sun M, Gao F, et al. Up-regulated expression of miR-23a/b targeted the pro-apoptotic Fas in radiation-induced thymic lymphoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32 (6): 1729-1740.

[13] Cai S, Chen R, Li X, et al. Downregulation of microRNA-23a suppresses prostate cancer metastasis by targeting the PAK6-LIMK1 signaling pathway [J]. Oncotarget, 2015, 6 (6): 3904-3911.

[14] Wang JX, Li FQ, Liu JW. Research advances of miR-23a [J]. Medical Recapitulate, 2016, 22 (1): 1-4. [王珺晓, 李凤卿, 刘建伟, 等. miR-23a 研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(1): 1-4.]

[15] Jahid S, Sun J, Edwards RA, et al. miR-23a promotes the transition from indolent to invasive colorectal cancer [J]. Cancer Discov, 2012, 2(6): 540-553.

[16] Wang Z, Wei W, Sarkar FH. miR-23a, a critical regulator of "migR" ation and metastasis in colorectal cancer [J]. Cancer Discov, 2012, 2(6): 489-491.