血清 miR-153 和 miR-142-3p 表达在宫颈癌诊断和预后评估中的价值

苏红娥,钟庆吉,符春丽,薛万兴,林　元,邓森灵
(海南西部中心医院,海南 那大 571799)

摘　要:[目的]探讨宫颈癌患者血清 miR-153 及 miR-142-3p 的表达及其在宫颈癌诊断和预后评估中的价值。[方法]选取 2014 年 1 月至 2017 年 3 月收治的宫颈癌患者 142 例,采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测宫颈癌患者血清 miR-153 及 miR-142-3p 表达水平。绘制 ROC 曲线分析 miR-153 及 miR-142-3p 对宫颈癌诊断的截断值,并以此为标准将宫颈癌患者分为高表达和低表达,对两组临床病理特征进行比较。采用多因素 Cox 回归模型分析影响宫颈癌患者术后预后不良的危险因素。[结果]宫颈癌组血清 miR-153 (0.76±0.38 *vs* 1.92±0.95)及 miR-142-3p(2.14±1.06 *vs* 8.15±3.20)表达水平明显低于对照组(P<0.01)。血清 miR-153 及 miR-142-3p 表达水平诊断宫颈癌的最佳截断值分别为 1.31 和 4.93,AUC 分别为 0.817(95%CI:0.755~0.878)和 0.850(95%CI:0.791~0.912)。血清 miR-153 及 miR-142-3p 低表达与宫颈癌患者的临床分期、分化程度、浸润深度、淋巴结转移及脉管浸润有关(P<0.05)。miR-153 及 miR-142-3p 低表达与宫颈癌患者生存期短有关(P<0.01)。多因素 Cox 回归模型分析显示,临床分期、浸润深度、淋巴结转移、miR-153<1.32 及 miR-142-3p<4.93 是影响宫颈癌患者预后不良的独立危险因素。[结论]血清 miR-153 及 miR-142-3p 表达水平在宫颈癌患者中明显下调,miR-153 及 miR-142-3p 有望作为宫颈癌诊断及预后评估的生物学标志物。

主题词:宫颈癌;miR-153;miR-142-3p;诊断价值;预后评估
中图分类号:R737.33　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-170X(2020)11-0972-05
doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2020.11.B009

Value of Serum MicroRNA-153 and MicroRNA-142-3p in Diagnosis and Prognosis of Cervical Cancer

SU Hong-e,ZHONG Qing-ji,FU Chun-Li,XUE Wan-xing,LIN Yuan,DENG Sen-ling
(*Central Hospital of Western Hainan*,*Nada* 571799,*China*)

Abstract:[Objective] To investigate the expression of serum miR-153 and miR-142-3p in patients with cervical cancer and their diagnostic and prognostic value. [Methods] A total of 142 patients with cervical cancer admitted to our hospital from January 2014 to March 2017 were selected,and the expression levels of serum miR-153 and miR-142-3p in patients with cervical cancer were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. ROC curve was drawn to analyze the truncation value of miR-153 and miR-142-3p in the diagnosis of cervical cancer. Based on this criterion,patients with cervical cancer were divided into high miR-153 and miR-142-3p groups and low miR-153 and miR-142-3p groups. The clinicopathological characteristics of the two groups were compared. Multivariate Cox regression models were used to analyze the risk factors affecting poor prognosis of patients with cervical cancer. [Results] The serum levels of miR-153(0.76±0.38 *vs* 1.92±0.95) and miR-142-3p(2.14±1.06 *vs* 8.15±3.20) in cervical cancer group were significantly lower than that in control group (P<0.01). The optimal cut-off values of serum miR-153 and miR-142-3p in the diagnosis of cervical cancer were 1.31 and 4.93,and the AUC were 0.817(95%CI:0.755~0.878) and 0.850(95%CI:0.791~0.912),respectively. The low expression of serum miR-153 and miR-142-3p were associated with clinical stage,differentiation degree,depth of invasion,lymph node metastasis and vascular invasion of cervical cancer (P<0.05). The low expression of miR-153 and miR-142-3p were related to the short survival of patients with cervical cancer (P<0.01). Multivariate Cox regression analysis showed that clinical stage,depth of invasion,lymph node metastasis,miR-153<1.32 and miR-142-3p<4.93 were independent risk factors for poor prognosis of cervical cancer patients. [Conclusion] The expression levels of serum miR-153 and miR-142-3p are significantly down-regulated in patients with cervical cancer,and miR-153 and miR-142-3p are expected to be biomarkers for the diagnosis and prognosis of cervical cancer.

Subject words:cervical cancer;miR-153;miR-142-3p;diagnostic value;prognostic evaluation

通信作者:苏红娥,主治医师,本科;海南西部中心医院妇产科,海南省儋州市那大伏波东路 2 号(571799);E-mail:2819641338@qq.com
收稿日期:2019-11-26;**修回日期**:2020-03-15

微小核糖核酸(microRNA,miRNA) 作为一种内源性、非编码小分子 RNA,参与细胞增殖、分化、凋亡和新陈代谢等过程，在恶性肿瘤的发生发展中起到重要的作用[1]。近年来研究发现,miR-153 及 miR-142-3p 在宫颈癌及乳腺癌中异常表达,通过调控多种信号通路参与癌症的发生发展，并可能作为癌症治疗的一个新的治疗靶点[2-3]。miR-153 及 miR-142-3p 能否作为宫颈癌诊断及预后评估的新型生物学标志物,目前尚未明确。本研究通过检测宫颈癌患者血清 miR-153 及 miR-142-3p 表达水平,分析其对宫颈癌诊断及预后评估的价值，旨在为宫颈癌的早期诊断、预后判断及靶向治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 1 月至 2017 年 3 月海南西部中心医院收治的宫颈癌患者 142 例，年龄 34~76 岁,平均年龄(49.30±10.25)岁。纳入标准:(1)符合国际妇产科联合会 (international federation of obstetrics and gynecology,FIGO)分类标准和 WHO 分级标准,且经病理确诊为宫颈癌;(2)行宫颈癌根治术者。排除标准:(1)随访过程中失访,病例资料不完整者;(2)术前已行放疗、化疗或生物免疫治疗者;(3)术前有急慢性感染性疾病、血液系统疾病、自身免疫性疾病及合并其他恶性肿瘤。142 例宫颈癌患者的临床分期:Ⅰ期 78 例,Ⅱa 期 43 例,Ⅱb 期 21 例;病理类型:鳞状细胞癌 126 例,腺癌 16 例;淋巴结转移 27 例,无淋巴结转移 115 例。另选取同期健康体检的正常女性 60 例作为对照组，年龄 36~73 岁，平均年龄(48.62±9.74)岁。两组间一般资料比较差异无统计学意义(P>0.05)。本研究获得医院伦理委员会批准,患者或家属签署知情同意书。

1.2 miR-153和 miR-142-3p 检测

患者均于术前抽取空腹静脉血 5ml 置于未加抗凝剂的肝素离心管中，于室温 2500r/min 离心 15min,吸取上层血清 400μl,加入 1ml 提取剂,于-70℃保存。按照总 RNA 快速提取试剂盒说明书从中提取总 RNA。在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain react,RT-PCR)。以 U6 为内参,miRNA 逆转录反应体系 15μl:5μl RNA 模板,3μl U6 及 miRNA 特异性茎环引物,0.15μl 100mmol/L 脱氧核糖核苷酸 (dNTPs),1.00μl 逆转录酶(50U/μl),10×反转录缓冲液 1.50μl,0.19μl RNase 抑制剂 (20U/μl),4.16μl 无菌三蒸水。反应条件:16℃ 30min、42℃ 30 min、85℃ 5min。扩增反应体系为 20μl:1μl 引物及探针 Mix(20×),10μl TaqMan 通用混合物溶液 (2×),1.33μl 反转录产物 cDNA,7.67μl 无核酸酶的水。扩增条件:95℃预变性 10min,95℃变性 15s、60℃复性 60s 进行 45 个循环。每个反应体系中荧光信号达到设定阈值所经历的循环数即为 Ct 值,采用 $2^{-\triangle\triangle Q}$ 法计算 miR-153 及 miR-142-3p 相对表达水平,其中△Ct=$Ct_{目的基因}$-Ct_{U6}。

1.3 随 访

随访起始时间为术后第 1 天始，通过电话或门诊等方式对患者进行调查,截止时间为 2019 年 4 月 30 日。总生存时间(overall survival,OS)定义为术后第 1 天至患者死亡的时间。无进展生存时间(progression-free survival,PFS) 定义为术后第 1 天起,未发生复发、原发器官肿瘤转移及其他原因引起死亡的时间。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件分析,连续变量均通过正态性检验和方差齐性检验，符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料组间比较采用 χ^2 检验。单因素生存分析应用 Kaplan-Meier 法,组间比较行 Log-rank 检验,多因素生存分析应用 Cox 回归分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 宫颈癌组和对照组血清 miR-153及 miR-142-3p 表达水平比较

宫颈癌组血清 miR-153 表达水平(0.76±0.38)明显低于对照组(1.92±0.95),差异有统计学意义(t=10.814,P<0.01)；宫颈癌组血清 miR-142-3p 表达水平(2.14±1.06)明显低于对照组(8.15±3.20),差异有统计学意义(t=15.247,P<0.01)。

2.2 血清 miR-153及 miR-142-3p 表达水平诊断宫颈癌的价值

血清 miR-153 表达水平诊断宫颈癌的最佳截断值为 1.31,ROC 曲线下面积 (area under cure,AUC)

为 0.817(95%CI:0.755~0.878),敏感度和特异性为 82.6%和 78.2%。血清 miR-142-3p 表达水平诊断宫颈癌的最佳截断值为 4.93,AUC 为 0.850 (95%CI:0.791~0.912),敏感度和特异性为 85.7%和 82.4%。

2.3 血清 miR-153及 miR-142-3p 表达水平与宫颈癌患者的临床病理特征关系

以 miR-153=1.31 及 miR-142-3p=4.93 为界值,将 142 例宫颈癌患者分为高 miR-153 组(miR-153≥1.31,n=56)和低 miR-153 组(miR-153<1.32,n=86);高 miR-142-3p 组 (miR-142-3p≥4.93,n=53) 和低 miR-142-3p 组(miR-142-3p<4.93,n=89)。高 miR-153 组与低 miR-153 组的临床分期、分化程度、浸润深度、淋巴结转移及脉管浸润比较差异有统计学意义(P<0.05);高 miR-142-3p 组与低 miR-142-3p 组的临床分期、分化程度、浸润深度、淋巴结转移及脉管浸润比较差异有统计学意义(P<0.05)。两组的年龄、绝经状况、病理类型及肿瘤直径比较差异无统计学意义 (P>0.05)(Table 1)。

2.4 miR-153及 miR-142-3p 表达与宫颈癌患者预后

142 例宫颈癌患者中失访 4 例, 随访率为 97.2%(138/142)。138 例随访时间为 11~69 个月,中位随访时间为 29.2 个月。生存分析显示,低 miR-153 组患者总生存率明显低于高 miR-153 组 (57.2% *vs* 76.5%;Log-rank χ^2=9.216,P<0.01);低 miR-153 组患者无进展生存率明显低于高 miR-153 组 (37.0% *vs* 62.4%;Log-rank χ^2=10.381,P<0.01) (Figure 1)。低 miR-142-3p 组患者总生存率明显低于高 miR-142-3p 组 (53.8% *vs* 74.2% ;Log-rank χ^2=9.438,P<0.01);低 miR-142-3p 组患者无进展生存率明显低于高 miR-142-3p 组 (32.8% *vs* 59.2%;Log-rank χ^2=13.615,P<0.01) (Figure 2)。

多因素 Cox 回归分析结果显示临床分期 (HR=

Table 1 Comparison of serum levels of miR-153 and miR-142-3p with clinicopathological features of cervical cancer patients

Clinicopathological features	N	miR-153				miR-142-3p			
		Low expression (n=86)	High expression (n=56)	χ^2	P	Low expression (n=89)	High expression (n=53)	χ^2	P
Age (years old)				0.388	0.533			0.366	0.545
<60	103	64(62.1)	39(37.9)			63(61.2)	40(38.8)		
≥60	39	22(56.4)	17(43.6)			26(66.7)	13(33.3)		
Menopause				0.033	0.855			0.648	0.421
Yes	57	34(59.6)	23(40.4)			38(66.7)	19(33.3)		
No	85	52(61.2)	33(38.8)			51(60.0)	34(40.0)		
Clinical stage				10.167	0.001			17.183	<0.001
Ⅰ	78	38(48.7)	40(51.3)			37(47.4)	41(52.6)		
Ⅱa~Ⅱb	64	48(75.0)	16(25.0)			52(81.2)	12(18.8)		
Pathological type				0.028	0.866			0.318	0.573
Squamous cell carcinoma	126	76(60.3)	50(39.7)			80(63.5)	46(36.5)		
Adenocarcinoma	16	10(62.5)	6(37.5)			9(56.3)	7(43.7)		
Degree of differentiation				3.990	0.046			9.993	0.002
Highly differentiated	59	30(50.8)	29(49.2)			28(47.5)	31(52.5)		
Moderately low differentiation	83	56(67.5)	27(32.5)			61(73.5)	22(26.5)		
Depth of invasion				6.196	0.013			14.979	<0.001
≤1/2 Muscular layer	86	45(52.3)	41(47.7)			43(50.0)	43(50.0)		
>1/2 Muscular layer	56	41(73.2)	15(26.8)			46(82.1)	10(17.9)		
Lymph node metastasis				8.462	0.004			12.755	<0.001
Yes	27	23(85.2)	4(14.8)			25(92.6)	2(7.4)		
No	115	63(54.8)	52(45.2)			64(55.7)	51(44.3)		
Tumor diameter(cm)				0.317	0.573			0.367	0.545
<5	77	45(58.4)	32(41.6)			50(64.9)	27(35.1)		
≥5	65	41(63.1)	24(36.9)			39(60.0)	26(40.0)		
Vascular invasion				4.859	0.027			11.863	0.001
Yes	40	30(75.0)	10(25.0)			34(85.0)	6(15.0)		
No	102	56(54.9)	46(45.1)			55(53.9)	47(46.1)		

2.482，95%CI：1.736~3.495）、浸润深度（HR=2.115，95% CI：1.146~3.277）、淋巴结转移（HR=2.753，95%CI：1.984~4.428）、miR-153<1.32（HR=4.183，95%CI：3.327~9.482）及miR-142-3p<4.93（HR=5.260，95%CI：4.283~12.417）是影响宫颈癌患者预后不良的独立危险因素（Table 2）。

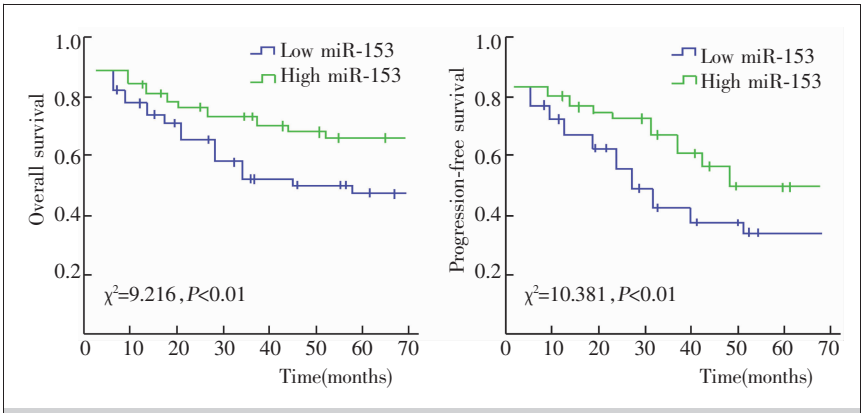

Figure 1 Comparison of total survival time and progression free survival time between high miR-153 and low miR-153 in cervical cancer patients

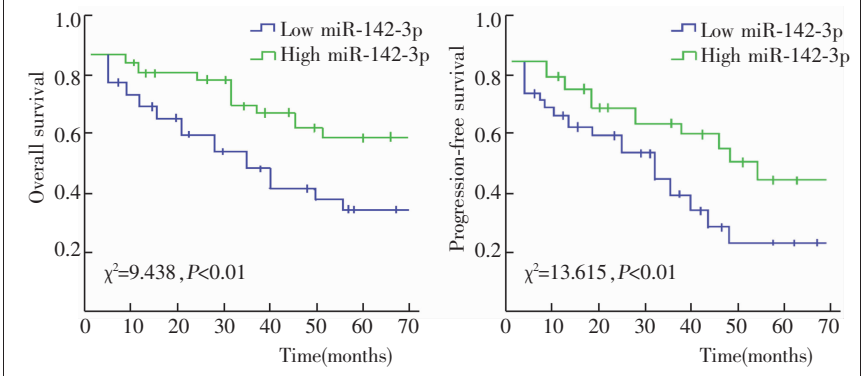

Figure 2 Comparison of survival and progression free survival time between high miR-142-3p group and low miR-142-3p group

3 讨 论

miRNA是一类长度为21~25nt的内源性单链非编码RNA小分子，可激活多种胞内信号通路，参与调控细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和分化等过程，对恶性肿瘤的发生发展产生影响[4-5]。研究表明，miRNA在宫颈癌中异常表达，与宫颈癌的发生、发展、转移及预后密切相关，可作为宫颈癌早期诊断和预后评估的新型标志物[6-8]。近年来研究证实，miR-153及miR-142-3p可以通过多种信号通路在宫颈癌的发生发展、侵袭、转移及耐药等病理过程中发挥着重要的作用[9-11]。Sun等[12]研究表明，miRNA异常表达与宫颈癌的发生发展密切相关，可作为宫颈癌诊断和监测病情发展进程的生物学标志物。Deng等[13]研究发现，miR-142-3p在宫颈癌细胞增殖和侵袭中起到抑制肿瘤的作用。

本研究显示，宫颈癌患者血清miR-153及miR-142-3p表达水平明显低于对照组，提示miR-153及miR-142-3p可能是一种抑癌基因，其表达下降可能参与宫颈癌的发生发展。本研究中血清miR-153及miR-142-3p表达水平诊断宫颈癌的最佳截断值分别为1.31和4.93，ROC曲线下面积分别为0.817和0.850，其敏感度和特异性均较好，提示miR-153及miR-142-3p可作为宫颈癌诊断的生物学指标。本研究结果显示，随着临床分期增加、分化程度越来越差、浸润深度>1/2肌层、有淋巴结转移及脉管浸润的宫颈癌患者，miR-153及miR-142-3p表达水平均明显下调，说明miR-153及miR-142-3p低表达与宫颈癌患者较差的临床病理特征有关，miR-153及miR-142-3p在宫颈癌中发挥抑癌基因功能，其低表

Table 2 Mltivariate Cox regression analysis of poor prognosis in patients with cervical cancer

Factors	β	SE	Wald	HR(95%CI)	*P*
Clinical stage(Ⅱa~Ⅱb/Ⅰ)	1.105	0.436	4.628	2.482(1.736~3.495)	0.024
Differentiation degree (Yes/No)	0.282	0.073	1.346	1.493(0.917~2.026)	0.175
Depth of invasion(>1/2 Muscular layer /≤1/2 Muscular layer)	0.637	0.218	4.215	2.115(1.146~3.277)	0.041
Lymph node metastasis(Yes/No)	1.248	0.537	4.973	2.753(1.984~4.428)	0.015
Vascular invasion(Yes/No)	0.406	0.084	1.802	1.572(0.963~2.194)	0.093
miR-153(<1.32/≥1.32)	2.215	1.305	5.287	4.183(3.327~9.482)	0.002
miR-142-3p(<4.93/≥4.93)	3.418	1.846	7.412	5.260(4.283~12.417)	<0.001

达可导致一系列靶向的癌基因过度激活，从而参与宫颈癌的发生发展。肿瘤组织可抑制更多的具有抑癌基因作用的 miR-153 及 miR-142-3p 进入血液，同时可促进机体促癌基因表达，进而导致机体 miR-153 及 miR-142-3p 表达水平异常降低。Park 等[14]研究表明，miRNA 表达水平在宫颈癌患者中显著性升高，可作为宫颈癌早期诊断、病情进展和预后评估的潜在生物标志物。本研究探讨 miR-153 及 miR-142-3p 与宫颈癌患者预后的临床价值，结果显示低 miR-153 及低 miR-142-3p 组患者总生存率明显低于高 miR-153 及低 miR-142-3p 组，低 miR-153 及高 miR-142-3p 组患者无病生存率明显低于高表达 miR-153 及 miR-142-3p 组，说明 miR-153 及 miR-142-3p 低表达与宫颈癌患者生存期短有关。本研究多因素 Cox 回归模型分析显示，临床Ⅱa~Ⅱb 期、浸润深度、淋巴结转移、miR-153<1.32 及 miR-142-3p<4.93 是影响宫颈癌患者预后不良的独立危险因素。Liu 等[15]研究显示，与匹配的非癌组织和正常宫颈上皮细胞系相比，宫颈癌组织和细胞系中 miR-153 表达水平明显下调，miR-153 下调与宫颈癌患者 5 年生存率低相关。Li 等[16]研究发现，与相邻正常宫颈组织相比，宫颈癌组织中 miR-142-3p 表达水平降低，且与临床分期晚期、淋巴结转移和宫颈浸润深度显著性相关，低表达 miR-142-3p 的宫颈癌患者总体生存率和无进展生存率较低，miR-142-3p 可能是预测宫颈癌患者总生存率和无进展生存率的独立指标。

综上所述，宫颈癌患者血清 miR-153 及 miR-142-3p 表达水平明显下调，临床分期、浸润深度、淋巴结转移、miR-153<1.32 及 miR-142-3p<4.93 是影响宫颈癌患者预后不良的独立危险因素。miR-153<1.32 及 miR-142-3p<4.93 预测宫颈癌患者预后不良具有较高的价值，有望作为宫颈癌诊断及预后评估的生物学标志物。但本研究为单中心研究，病例来源较单一，缺乏多中心的研究结果，未来仍需大规模多中心的前瞻性研究进一步证实 miR-153 及 miR-142-3p 与宫颈癌患者预后不良的关系。

参考文献：

[1] He Y,Deng F,Yang S,et al. Exosomal microRNA:a novel biomarker for breast cancer[J]. Biomark Med,2018,12(2):177–188.

[2] Zuo Z,Ye F,Liu Z,et al. MicroRNA-153 inhibits cell proliferation,migration,invasion and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer via direct targeting of RUNX2[J]. Exp Ther Med,2019,17(6):4693–4702.

[3] Deng B,Zhang Y,Zhang S,et al. MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation and invasion of cervical cancer cells by targeting FZD7[J]. Tumour Biol,2015,36(10):8065–8073.

[4] He Z,Xu H,Meng Y,et al. miR-944 acts as a prognostic marker and promotes the tumor progression in endometrial cancer[J]. Biomed Pharmacother,2017,88(4):902–910.

[5] Moustafa AA,Kim H,Albeltagy RS,et al. MicroRNAs in prostate cancer:from function to biomarker discovery[J]. Exp Biol Med (Maywood),2018,243(10):817–825.

[6] Wang S,Zhu H,Ding B,et al. Genetic variants in microRNAs are associated with cervical cancer risk[J]. Mutagenesis,2019,34(2):127–133.

[7] Hasanzadeh M,Movahedi M,Rejali M,et al. The potential prognostic and therapeutic application of tissue and circulating microRNAs in cervical cancer[J]. J Cell Physiol,2019,234(2):1289–1294.

[8] Zhou J,Liu X,Wang C,et al. The correlation analysis of miRNAs and target genes in metastasis of cervical squamous cell carcinoma[J]. Epigenomics,2018,10(3):259–275.

[9] Zhao W,Yin CY,Jiang J,et al. MicroRNA-153 suppresses cell invasion by targeting SNAI1 and predicts patient prognosis in glioma[J]. Oncol Lett,2019,17(1):1189–1195.

[10] Liu SS,Chan KKL,Chu DKH,et al. Oncogenic microRNA signature for early diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer[J]. Mol Oncol,2018,12(12):2009–2022.

[11] Xia C,Liang S,He Z,et al. Metformin,a first-line drug for type 2 diabetes mellitus,disrupts the MALAT1/miR-142-3p sponge to decrease invasion and migration in cervical cancer cells[J]. Eur J Pharmacol,2018,830(7):59–67.

[12] Sun P,Shen Y,Gong JM,et al. A new microRNA expression signature for cervical cancer[J]. Int J Gynecol Cancer,2017,27(2):339–343.

[13] Deng B,Zhang Y,Zhang S,et al. MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation and invasion of cervical cancer cells by targeting FZD7[J]. Tumour Biol,2015,36(10):8065–8073.

[14] Park S,Eom K,Kim J,et al. MiR-9,miR-21,and miR-155 as potential biomarkers for HPV positive and negative cervical cancer[J]. BMC Cancer,2017,17(1):658.

[15] Liu L,Lai X,Yuan C,et al. Aberrant expression of miR-153 is associated with the poor prognosis of cervical cancer[J]. Oncol Lett,2018,15(6):9183–9187.

[16] Li M,Li BY,Xia H,et al. Expression of microRNA-142-3p in cervical cancer and its correlation with prognosis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2017,21(10):2346–2350.