高危人乳头状瘤病毒感染宫颈癌患者miR-34a-5p表达及意义

陈　娟[1],尤卞红[2]

(1.新乡市中心医院,河南 新乡 453000;2.辉县市人民医院,河南 辉县 453000)

摘　要:[目的]探讨高危人乳头状瘤病毒(high risk human papillomavirus,HR-HPV)感染宫颈癌患者组织及血清miR-34a-5p的表达以及血清miR-34a-5p对宫颈癌的诊断价值。[方法]采用RT-PCR检测70例HR-HPV阳性宫颈癌组织和癌旁组织、100例HR-HPV阳性宫颈癌患者血清、80例HR-HPV阳性宫颈上皮内瘤病变(CIN)患者血清、80例健康体检者血清中miR-34a-5p的表达水平。Pearson法分析组织和血清中miR-34a-5p表达量的相关性,分析miR-34a-5p与宫颈癌临床病理特征的关系,分析血清miR-34a-5p诊断宫颈癌的价值。[结果]宫颈癌组织miR-34a-5p相对表达量明显低于癌旁组织($P<0.05$)。宫颈癌患者血清miR-34a-5p相对表达量明显低于CIN患者和正常人($P<0.05$),CIN患者血清miR-34a-5p相对表达量明显低于正常人($P<0.05$)。癌组织miR-34a-5p相对表达量与淋巴结转移有关($P<0.05$)。血清miR-34a-5p相对表达量与淋巴结转移和远处转移有关($P<0.05$)。miR-34a-5p在癌组织与血清中的相对表达量呈正相关($r=0.459$,$P<0.05$)。血清miR-34a-5p诊断宫颈癌的ROC曲线下面积为0.860(95%CI:0.803~0.917)。[结论]HR-HPV宫颈癌患者血清miR-34a-5p下调,与癌组织miR-34a-5p表达呈正相关,有望成为宫颈癌诊断的分子标志物。

主题词:宫颈癌;乳头状瘤病毒;miR-34a-5p;血清

中图分类号:R737.33　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-170X(2020)11-0977-04

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2020.11.B010

Expression of MicroRNA-34a-5p in Cervical Cancer Patients with High Risk of Human Papillomavirus Infection and Its Clinical Significance

CHEN Juan[1],YOU Bian-hong[2]

(1. *Xinxiang Central Hospital*,*Xinxiang* 453000,*China*;
2. *People's Hospital of Huixian City*,*Huixian* 453000,*China*)

Abstract:[Objective] To investigate the expression of miR-34a-5p in tissues and serum of cervical cancer patients with high risk human papillomavirus(HR-HPV) infection and its clinical significance. [Methods] The expression of miR-34a-5p in cervical cancer tissues and adjacent tissues of 70 HR-HPV-positive patients was detected by RT-PCR. The expression of miR-34a-5p in serum samples of 100 HR-HPV-positive cervical cancer patients,80 HR-HPV positive cervical intraepithelial neoplasia (CIN) patients and 80 healthy subjects was also detected. Pearson correlation was used to analyze the correlation between the expression of miR-34a-5p in tissue and serum,and the relationship between miR-34a-5p and the clinicopathological characteristics of cervical cancer was also analyzed. [Results] The relative expression of miR-34a-5p in cervical cancer tissues was significantly lower than that in adjacent tissues ($P<0.05$). The relative expression of miR-34a-5p in serum samples of cervical cancer patients was significantly lower than that of CIN patients and normal subjects ($P<0.05$). The relative expression of serum miR-34a-5p in CIN patients was significantly lower than that in normal subjects ($P<0.05$). The relative expression of tissue miR-34a-5p was correlated with lymph node metastasis($P<0.05$). The relative expression of serum miR-34a-5p was correlated with lymph node metastasis and distant metastasis ($P<0.05$). The relative expression of miR-34a-5p in cancer tissue and serum was positively correlated with each other ($r=0.459$,$P<0.05$). The area under ROC curve of serum miR-34a-5p was 0.860 (95% CI:0.803 ~ 0.917). [Conclusion] The down-regulation of serum miR-34a-5p in HR-HPV positive cervical cancer patients is positively correlated with the expression of miR-34a-5p in cancer tissues,which is expected to be a molecular marker for diagnosis of cervical cancer.

Subject words:cervical cancer;papilloma virus;miR-34a-5p;serum

中国宫颈癌发病率呈上升和年轻化趋势[1]。miR-34a-5p是一种较为公认具有抑癌基因作用的微小RNA(microRNA,miRNA),已有研究报道在肝癌、慢性髓性白血病、卵巢癌、膀胱癌中较正常组织出现低表达,进而引起转化生长因子-β/人母亲DPP同源

通信作者:陈娟,科室副主任,副主任医师,本科;河南省新乡市中心医院产一科,河南省新乡市卫滨区金穗大道56号(453000);E-mail:13137309755@163.com

收稿日期:2020-03-17;**修回日期**:2020-03-27

物 4、细胞程序性死亡-配体 1 等靶基因的高表达，在肿瘤细胞的发生中产生重要作用[2-4]。研究显示，不同疾病患者循环血中 miRNA 表达存在差异，这种差异具有组织特异性[5]。目前关于宫颈癌患者血清 miR-34a-5p 表达变化及诊断价值较少报道。高危人乳头状瘤病毒（high-risk human papillomavirus，HR-HPV）感染是宫颈癌高危因素，对宫颈癌的发生有重要作用[6]。本研究采用逆转录-聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）实验检测 HR-HPV 感染的宫颈癌患者组织及血清 miR-34a-5p 水平，并分析 miR-34a-5p 水平与宫颈癌临床病理特征关系及其在早期诊断宫颈癌中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2016 年 1 月至 2019 年 1 月期间住院的 100 例 HR-HPV 阳性宫颈癌患者血清标本作为实验组研究对象，患者均病理确诊，年龄 33~67 岁，平均年龄（46.8±11.3）岁。全部患者均为首次治疗；无其他良恶性肿瘤及风湿免疫相关病史；病史资料均完整。其中 70 例行宫颈癌手术治疗，术中均获得癌组织及对应的癌旁组织。选择相同时间段内 80 例 HR-HPV 阳性宫颈上皮内瘤病变（cervical intraepithelial neoplasia，CIN）患者作为 CIN 组，年龄 32~70 岁，平均年龄（45.2±10.9）岁；CIN Ⅰ 7 例、CIN Ⅱ 32 例、CIN Ⅲ 31 例。选取 80 例 HR-HPV 阳性健康体检者作为对照组，年龄 31~68 岁，平均年龄（46.5±12.3）岁。三组间年龄比较无统计学差异（P>0.05）。本研究已经过医院伦理委员会批准，受试者均签署知情书。

1.2 实验方法

1.2.1 宫颈癌组织及血清样本收集

（1）宫颈癌与癌旁组织的收集：收集 70 例宫颈癌患者术中切除的新鲜宫颈癌及癌旁正常组织。获得组织立即放入液氮转存，-80℃冰箱保存备用。（2）血清样本的收集：采用无 RNA 酶管收集 100 例宫颈癌患者、80 例 CIN 患者、80 例正常人血液标本各 5ml，予以离心静置样本完全凝固。吸取 1.5ml 上清液于 RNA 酶管内-80℃存放待用。全部标本在 2 个月内完成实验测定。

1.2.2 高危型 HPV 检测

取手术切除的宫颈癌病灶，采用天津精耐特基因生物技术有限公司生产的基因组 DNA 提取试剂盒抽提基因组 DNA 后，通过达安 PCR 反向点杂交法进行测定，包括 HPV-16、HPV-18、HPV-33、HPV-35 和 HPV-5l；显色蓝紫色圆点者为高危型 HPV 感染阳性[7]。

1.2.3 RT-qPCR 测定组织、血清 miR-34a-5p 水平

引物由南京金斯瑞公司采用 primer5 软件设计及合成。miR-34a-5p 的引物序列为 5′-UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC-3′，U6 引物序列为 5′-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3′。Trizol 法提取总 RNA，反转录为 cDNA，采用 RT-qPCR 两步法测定 miR-34a-5p 表达水平。组织 miR-34a-5p 测定体系为：Template（反转录产物）3μl、Primer A（10μM）1.5μl、Primer B（10μM）1.5μl、PCR H_2O 9μl、2X Sybgreen PCR Master Mix15μl。条件为：95℃，10min；95℃，10s；59℃，50s；共 40 个循环。血清 miR-34a-5p 测定体系为：Template（反转录产物）2μl、Primer A（10μM）0.5μl、Primer B（10μM）0.5μl、PCR H_2O 12μl、2X Sybgreen PCR Master Mix15μl。条件为：95℃，10min；95℃，15s；60℃，60s；共 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 反映基因的相对表达量，△Ct=目的基因 Ct 值-内参 Ct 值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析，计量资料采取 t 检验或方差分析；计数资料选择 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法；相关性用 Pearson 相关性分析；采用受试者操作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线分析 miR-34a-5p 对宫颈癌的诊断价值，计算曲线下面积（area under curve，AUC）。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MicroRNA-34a-5p 表达水平

宫颈癌组织 miR-34a-5p 相对表达量明显低于癌旁组织（P<0.05）。宫颈癌患者血清 miR-34a-5p 相对表达量明显低于 CIN 患者和正常人（P<0.05），CIN 患者血清 miR-34a-5p 相对表达量明显低于正常人（P<0.05）（Table 1）。

2.2 宫颈癌患者手术前后血清 miR-34a-5p 变化

宫颈癌患者术前和术后 1 周时血清 miR-34a-5p 相对表达量分别为 0.365±0.119 和 0.437±0.152，组间比较有统计学差异（t=3.730，P<0.05）。

Table 1　Expression of miR-34a-5p in tissue and serum

Items	miR-34a-5p	*t/F*	*P*
Tissue			
Cervical cancer tissue	0.216±0.107	39.709	<0.001
Paracancerous tissue	0.972±0.188		
Serum			
Cervical cancer patients	0.365±0.119		
CIN patients	0.549±0.284	88.946	<0.001
Healthy individuals	0.942±0.271		

2.3　组织和血清 miR-34a-5p 表达与临床及病理因素的关系

宫颈癌组织 miR-34a-5p 相对表达量与淋巴结转移有关($P<0.05$),与年龄、绝经、临床分期、病理分级、肿瘤直径均无关($P>0.05$)。血清 miR-34a-5p 相对表达量与淋巴结转移和远处转移有关($P<0.05$),与年龄、绝经、临床分期、病理分级、肿瘤径直径无关($P>0.05$)(Table 2)。

2.4　组织 miR-34a-5p 与血清 miR-34a-5p 的关系

MicroRNA-34a-5p 在癌组织与血清中的相对表达量呈正相关($r=0.459$,$P<0.001$)(Figure 1)。

2.5　血清 miR-34a-5p 对宫颈癌的诊断价值

当 miR-34a-5p 取值为 0.508 时约登指数最大(0.630),此时诊断效能最高,AUC 为 0.860(95%CI:0.803~0.917),敏感度为 83.6%,特异性为 79.4%。

3　讨　论

微小 RNA 可加速降解和(或)阻断其靶基因的翻译及诱导转录后基因表达,从而参与调节细胞增殖、分化、代谢和凋亡等各种生物学过程[8]。血清 miRNAs 的来源尚不完全清楚，目前认为有三种来源[9]:(1)凋亡、坏死细胞破损后 miRNA 从细胞释放进入循环血;(2)miRNA 经外泌体、穿梭泡等微泡进行细胞之间的信号传导及运输作用;(3)miRNA 在组织细胞的分泌过程中经与 RNA 结合蛋白结合后释放出入循环血。相对于 DNA、mRNA 来说,miRNA 在循环血中表达的更为稳定[9]。血清 miRNA 在多种肿瘤性疾病中有异常变化,对早期诊断有一定价值[10]。

HPV 与宫颈癌的发生密切相关,据报道宫颈癌患者 HPV 感染率达 80%，其中 HPV-16、HPV-18 和 HPV-45 分别占 26%~36%、37%~41%、5%~7%[11]。miRNA 会影响 HPV 介导的 DNA 复制,例如 Lu 等[12]

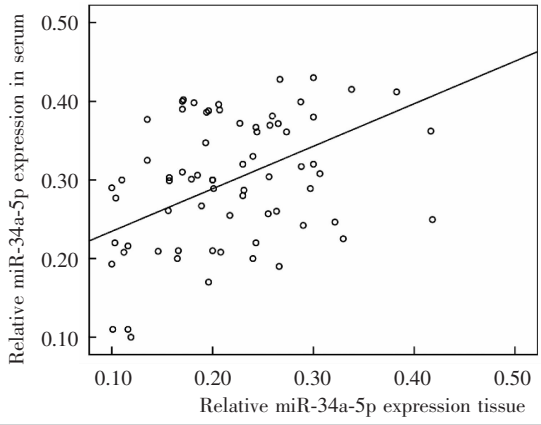

Figure 1　Relationship between tissue and serum miR-34a-5p in patient with cervical cancer

Table 2　Relationship between miR-34a-5p expression and clinicopathological parameters of cervical cancer

Clinicopathological parameters		Tissue				Serum			
		N	miR-34a-5p expression	*t/F*	*P*	N	miR-34a-5p expression	*t/F*	*P*
Age(years old)	<45	33	0.225±0.109	0.492	0.624	47	0.377±0.138	0.372	0.173
	⩾45	37	0.213±0.095			53	0.342±0.117		
Menopause	Yes	22	0.220±0.101	0.322	0.749	32	0.371±0.140	0.810	0.420
	No	48	0.211±0.112			68	0.350±0.111		
Clinical stages	ⅠA~ⅠB	38	0.227±0.105	0.984	0.329	59	0.372±0.145	0.777	0.440
	ⅡA~ⅡB	32	0.201±0.116			41	0.343±0.113		
Pathological grade	G1	4	0.221±0.121			14	0.373±0.116		
	G2	30	0.220±0.860	0.144	0.741	36	0.371±0.124	1.003	0.771
	G3	36	0.209±0.103			50	0.358±0.115		
Tumor diameter	⩽4cm	41	0.226±0.118	0.877	0.383	57	0.371±0.141	1.186	0.238
	>4cm	29	0.203±0.092			43	0.340±0.112		
Lymph node metastasis	N0	65	0.224±0.104	2.131	0.037	74	0.391±0.132	2.226	0.028
	N1	5	0.122±0.088			26	0.326±0.116		
Distant metastasis	No	70	0.216±0.107	–	–	96	0.382±0.128	2.380	0.019
	Yes	0	–			4	0.227±0.114		

发现 miR-221 可以通过细胞因子信号传导抑制分子 1/Ⅰ型干扰素信号通路抑制 HPV16 E1-E2 介导的 DNA 复制。由此可见 miRNA 可能成为宫颈癌的治疗靶点。miR-34a-5p 基因定位于 1p36.23 染色体,在多种肿瘤中呈异常表达,包括宫颈癌[2-4,13-14]。本研究发现 HR-HPV 阳性宫颈癌患者的癌组织和血清 miR-34a-5p 相对表达量明显较低,提示 miR-34a-5p 可能发挥癌基因作用。

MicroRNA-34a-5p 影响肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移、分化和细胞周期等,但是其作用机制目前尚未明确,可能通过沉默信息调节因子 2 相关酶 1/p66shc 通路[15]、Wnt/β-Catenin 通路[16]和 Notch 信号通路[17]等发挥作用。在宫颈癌的研究中,有报道显示在宫颈癌 Caski 细胞株中过表达 miR-34a-5p 可经抑制细胞周期基因 CDK4、E2F1 及蛋白的表达,进而抑制细胞的增殖[18]。Wang 等[19]发现,miR-34a-5p 可上调 RIG-I 基因水平抑制了宫颈癌细胞周期,并促进凋亡。本研究发现,宫颈癌组织 miR-34a-5p 相对表达量与淋巴结转移有关,与年龄、绝经、临床分期、病理分级、肿瘤径直径均无关。血清 miR-34a-5p 相对表达量与淋巴结转移和远处转移有关,与年龄、绝经、临床分期、病理分级、肿瘤径直径无关,说明 miR-34a-5p 与宫颈癌进展有关。

本研究分析了血清 miR-34a-5p 诊断宫颈癌的价值,当 miR-34a-5p 取值为 0.508 时 ROC 曲线下面积为 0.860,说明 miR-34a-5p 诊断效能较高。但是本研究未比较 miR-34a-5p 与传统肿瘤标志物的诊断效能,这是本研究的局限性。

综上,HR-HPV 感染宫颈癌患者血清 miR-34a-5p 出现下调,与癌组织 miR-34a-5p 水平呈正相关,有望成为辅助诊断宫颈癌的分子标志物;血清 miR-34a-5p 水平与宫颈癌患者淋巴结转移及远处转移有关,有助于肿瘤病情判断与术后病情监测。但目前对于宫颈癌患者血清 miR-34a-5p 表达改变及作用机制尚不清楚,需要未来深入分析。

参考文献:

[1] Di J,Rutherford S,Chu C. Review of the cervical cancer burden and population-based cervical cancer screening in China[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2015,16(17):7401–7407.

[2] Feili X,Wu S,Ye W,et al. MicroRNA-34a-5p inhibits liver fibrosis by regulating TGF-beta1/Smad3 pathway in hepatic stellate cells[J]. Cell Biol Int,2018,42(10):1370–1376.

[3] Cao HX,Miao CF,Sang LN,et al. Circ_0009910 promotes imatinib resistance through ULK1-induced autophagy by sponging miR-34a-5p in chronic myeloid leukemia[J]. Life Sci,2020,243:117255.

[4] Zuo Y,Zheng W,Liu J,et al. MiR-34a-5p/PD-L1 axis regulates cisplatin chemoresistance of ovarian cancer cells[J]. Neoplasma,2020,67(1):93–101.

[5] Sun Z,Shi K,Yang S,et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. Mol Cancer,2018,17(1):147.

[6] Kong TW,Kim M,Kim YH,et al. High-risk human papillomavirus testing as a primary screening for cervical cancer:position statement by the Korean Society of Obstetrics and Gynecology and the Korean Society of Gynecologic Oncology[J]. Obstet Gynecol Sci,2020,31(1):e31.

[7] Jiang C,Du YN,Yang W,et al. Correlation between high-risk HPV infection and pathological features of cervical cancer and Th17/Treg immune responsep[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology and Rehabilitation,2018,25(12):1488–1491.[江策,杜亚妮,杨维,等. 高危型 HPV 感染与宫颈癌患者病理特征和 Th17/Treg 免疫应答的相关性研究[J]. 中国肿瘤临床与康复,2018,25(12):1488–1491.]

[8] Ganju A,Khan S,Hafeez BB,et al. miRNA nanotherapeutics for cancer[J]. Drug Discov Today,2017,22(2):424–432.

[9] Backes C,Meese E,Keller A. Specific miRNA disease biomarkers in blood,serum and plasma:challenges and prospects[J]. Mol Diagn Ther,2016,20(6):509–518.

[10] Chu GCW,Lazare K,Sullivan F. Serum and blood based biomarkers for lung cancer screening:a systematic review[J]. BMC Cancer,2018,18(1):181.

[11] Zhu Y,Wang Y,Hirschhorn J,et al. Human papillomavirus and its testing assays,cervical cancer screening,and vaccination[J]. Adv Clin Chem,2017,81:135–192.

[12] Lu H,Gu X. MicroRNA-221 inhibits human papillomavirus 16 E1-E2 mediated DNA replication through activating SOCS1/Type I IFN signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol,2019,12(5):1518-1528.

[13] Pu Y,Zhao F,Li Y,et al. The miR-34a-5p promotes the multi-chemoresistance of osteosarcoma via repression of the AGTR1 gene[J]. BMC Cancer,2017,17(1):45.

[14] Hasakova K,Reis R,Vician M,et al. Expression of miR-34a-5p is up-regulated in human colorectal cancer and correlates with survival and clock gene PER2 expression[J]. 2019,14(10):e0224396.

[15] Zhu JN,Fu YH,Hu ZQ,et al. Activation of miR-34a-5p/Sirt1/p66shc pathway contributes to doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Sci Rep,2017,7(1):11879.

[16] Ji Y,Wang M. The long noncoding RNA NEAT1 targets miR-34a-5p and drives nasopharyngeal carcinoma progression via Wnt/beta-Catenin signaling[J]. Yonsei Med J,2019,60(4):336–345.

[17] Xu H,Zhang Y,Qi L,et al. NFIX circular RNA promotes glioma progression by regulating miR-34a-5p via Notch signaling pathway[J]. Front Mol Neurosci,2018,11:225.

[18] Lin J,Jin X,Bu Y,et al. Efficient synthesis of RITA and its analogues:derivation of analogues with improved antiproliferative activity via modulation of p53/miR-34a pathway[J]. Org Biomol Chem,2012,10(48):9734–9746.

[19] Wang JH,Zhang L,Ma YW,et al. microRNA-34a-upregulated retinoic acid-inducible gene-i promotes apoptosis and delays cell cycle transition in cervical cancer cells[J]. DNA Cell Biol,2016,35(6):267–279.