

肾透明细胞癌患者血清 miR-193a-3p 水平增加及早期诊断价值*

唐海霞, 王 成, 路美玲, 张春妮 (南京大学医学院附属金陵医院检验科, 南京 210002)

摘要:目的 检测肾透明细胞癌患者血清中 miR-193a-3p 的表达水平, 探讨其作为肾透明细胞癌分子诊断指标的可能性。方法 收集南京军区南京总医院 2010~2014 年期间 107 例住院肾透明细胞癌患者(TNM 分期 I 期 76 例、II 期 16 例、III 期 2 例、IV 期 8 例和未知 5 例)未经治疗前血清样本, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法检测 miR-193a-3p 含量, 并以 107 例年龄、性别匹配的非癌健康人作对照。ROC 曲线分析血清 miR-193a-3p 水平对肾透明细胞癌的早期诊断价值。结果 qRT-PCR 检测证实, miR-193a-3p 在总体患者血清中的含量显著高于对照组(3.294 ± 1.526 vs 1.944 ± 0.600 , $P=0.000$)。TNM I 期(3.411 ± 1.676 vs 1.944 ± 0.600 , $P=0.000$)、II 期(2.926 ± 0.927 vs 1.944 ± 0.600 , $P=0.001$)和 IV 期患者(2.926 ± 0.894 vs 1.944 ± 0.600 , $P=0.000$)血清中 miR-193a-3p 的表达水平均明显高于对照组。用于诊断肾透明细胞癌早期(I 期)的血清 miR-193a-3p ROC 曲线下面积(AUCROC)为 0.820(95% CI, 0.756~0.883), 敏感度为 80.3%, 特异度为 93.5%。结论 miR-193a-3p 在肾透明细胞癌患者血清中的水平显著升高, 并有较高的早期诊断准确性, 有望作为该病早期诊断的血清学指标。

关键词:肾透明细胞癌; 血清; miR-193a-3p; 定量 PCR; 早期诊断; 分子标志物

中图分类号: R737.11; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)03-043-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.012

Elevated Serum miR-193a-3p Level in Renal Clear Cell Carcinoma and Its Early Clinical Value

TANG Hai-xia, WANG Cheng, LU Mei-ling, ZHANG Chun-ni

(Department of Clinical Laboratory, Jingling Hospital of
Medical College Nanjing University, Nanjing 210002, China)

Abstract: **Objective** To determine the levels of miR-193a-3p in serum from patients with renal clear cell carcinoma, and evaluate the potential of miR-193a-3p as a molecular biomarker of renal clear cell carcinoma. **Methods** Serum samples were taken from 107 untreated hospitalized patients with renal clear cell carcinoma (TNM I grade 76 cases, II grade 16 cases, III grade 2 cases, IV grade 8 cases and unknown 5 cases) in Nanjing General Hospital from 2010 to 2014 year and 107 age- and gender-matched healthy individuals to determine the level of miR-193a-3p by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR). The early diagnostic value of miR-193a-3p for renal clear cell carcinoma was assessed by ROC curve. **Results** qRT-PCR confirmed that serum miR-193a-3p expression levels was significantly elevated in cancer than in normal controls (3.294 ± 1.526 vs 1.944 ± 0.600 , $P=0.000$). TNM I grade (3.411 ± 1.676 vs 1.944 ± 0.600 , $P=0.000$), II grade (2.926 ± 0.927 vs 1.944 ± 0.600 , $P=0.001$), IV grade (2.926 ± 0.894 vs 1.944 ± 0.600 , $P=0.000$) is significantly higher than that in control group. The area under the ROC curve (AUC) of miR-193a-3p was 0.820 (95% CI, 0.756~0.883), demonstrating a high sensitivity (80.3%) and specificity (93.5%) for the early diagnosis of renal clear cell carcinoma. **Conclusion** MiR-193a-3p content was significantly elevated in serum from renal clear cell carcinoma and has a high accuracy in diagnosing early cancer, which holds potential as molecular biomarker for renal clear cell carcinoma.

Keywords: renal clear cell carcinoma; serum; miR-193a-3p; quantitative reverse-transcription PCR; early diagnosis; molecular biomarker

肾细胞癌是一种起源于肾小管上皮细胞的常见肾脏恶性细胞肿瘤。发病人数占所有恶性肿瘤人数的 3%, 每年全世界约有 90 000 人因肾癌而死亡^[1]。肾癌发病率现以每年 2% 的速度增长。其中肾透明细胞癌患者人数占所有肾细胞癌人数的

80%。肾透明细胞癌主要发病于 60~70 岁。但近年来, 发病年龄有年轻化趋势。该病早期常无症状, 或只有发热、乏力等全身症状, 发现时多为中晚期^[2,3]。遗憾的是, 目前缺乏敏感而特异的血清学诊断指标。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81171661; 81472021); 南京军区医学科技创新重点课题(12Z28); 南京军区南京总医院院管课题(2012058)。

作者简介: 唐海霞(1984—), 女, 本科, 技师, 主要从事临床检验工作, E-mail: tanghaixia_smile@163.com。

通信作者: 张春妮(1963—), 女, 博士, 主任技师, 博士生导师, 主要研究方向: 临床检验诊断学, E-mail: zchunni27@hotmail.com。

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类长约19~23个核苷酸的非编码单链小核糖核酸分子,它们通过与靶 mRNA 3'端非翻译序列完全或部分互补结合,导致靶 mRNA 降解或转录后翻译抑制从而调控靶基因的表达^[4]。大量的研究显示,miRNA 表达及特异性变化与肿瘤的发生、发展之间存在着必然联系。miRNA 有肿瘤组织特异性,且与分化程度、预后有关^[5]。据报道,肾透明细胞癌组织 miRNA 表达谱也有特异性的变化^[6],揭示 miRNA 可作为肿瘤新的标志物。但肿瘤组织的检测属创伤性检测,无法实现早期诊断和治疗效果的实时监控。有研究显示,miR-193a-3p 参与一些肿瘤的发生发展^[5,14]。本研究拟通过定量 PCR 方法检测血清中 miR-193a-3p 的表达量,探讨其对肾透明细胞癌的诊断价值,为利用血清 miRNA 这一新的标志物实现肾透明细胞癌无创伤性检出开辟一条新途径。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2010~2014年期间在南京军区南京总医院泌尿外科住院确诊的肾透明细胞癌患者术前血清标本107例,其中男性79例,女性28例,平均年龄 53.5 ± 12.3 岁。所有患者均未经放疗或化疗,按世界卫生组织(WHO)制定的病理组织学诊断依据确诊^[1],其中TNM分期Ⅰ期76例,Ⅱ期16例,Ⅲ期2例,Ⅳ期8例和未知5例。收集同期南京军区南京总医院的体检健康者血清标本107例,其中男性69例,女性38例,平均年龄 53.7 ± 8.5 岁。两组之间性别、年龄匹配,具有可比性。所有患者均签订知情同意书,且得到医院伦理委员会批准。

采集南京军区南京总医院107例患者治疗前和健康对照组空腹静脉血3 ml,室温3 000 r/min离心5 min,收集血清,4℃,12 000 r/min离心5 min,进一步去除残留的血细胞。血清置-80℃保存。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器:7500型荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystem公司),1612-1型高速离心机(上海医疗器械集团有限公司),5418型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2.2 试剂:Trizol(美国Invitrogen公司);水饱和酚(南京大治生物公司);氯仿,异丙醇,无水乙醇(上海化学试剂有限公司);DEPC水(南京凯基生物有限公司);引物、反向互补探针(美国Applied Biosystem公司);qRT-PCR试剂盒(大连TaKaRa公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清RNA提取:采用苯酚氯仿抽提法提取RNA^[7]。

1.3.2 实时荧光定量PCR(qRT-PCR):按照逆转录试剂盒说明书操作进行miRNA逆转录反应^[8]。qRT-PCR所用引物及探针由美国ABI公司设计并合成。血清RNA逆转录反应总体积为10 μ l,包括DEPC处理的重蒸馏水(ddH₂O)3.5 μ l,5 \times PCR缓冲液2 μ l,10 mmol/L dNTP 1 μ l,逆转录引物1 μ l,逆转录酶0.5 μ l,RNA 2 μ l。反应参数:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,4℃保存。qRT-PCR总反应体系为20 μ l,包括DEPC处理的ddH₂O 14.77 μ l,10 \times PCR缓冲液2 μ l,25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ l,10 mmol/L dNTPs 0.4 μ l,Taq酶0.3 μ l,探针及上、下游引物共0.33 μ l和cDNA 1 μ l。循环参数:95℃ 5 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min(收集荧光),共40个循环。每个样本设置3个复孔,并以DEPC处理的不含RNA模板的ddH₂O作为阴性对照。程序运行结束后,设定统一阈值,用仪器自带SDS 2.0分析软件对扩增曲线进行分析,获得循环数(Ct值),计算miR-193a-3p相对含量。本研究用三个内源性miRNA(let-7d: 5'-AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU-3',let-7g: 5'-UGAGGUAGUAG UUUGUACAGUU-3'和let-7i: 5' UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU-3')的三联体(let-7d/g/i)作为内参基因进行校正后分析^[13],miR-193a-3p相对含量计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

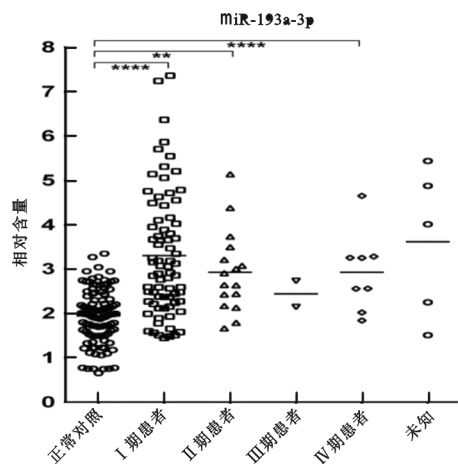
1.4 统计学分析 用SPSS 22.0统计软件进行数据统计分析。miR-193a-3p水平以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,分析前进行正态性检验。组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。根据ROC曲线分析miR-193a-3p对肾透明细胞癌早期诊断价值。

2 结果

2.1 血清miR-193a-3p qRT-PCR检测结果 107例肾透明细胞癌患者血清miR-193a-3p浓度为 3.294 ± 1.526 ,与健康对照组(1.944 ± 0.600)比较显著升高,差异具有统计学意义($P = 0.000 < 0.05$)。

2.2 TNM各分期血清miR-193a-3p检测结果 患者按TNM分期分成五个亚组,其miR-193a-3p浓度分别为:Ⅰ期 3.411 ± 1.676 ,Ⅱ期 2.926 ± 0.927 ,Ⅲ期 2.439 ± 0.416 ,Ⅳ期 2.926 ± 0.894 和未知组 3.618 ± 1.688 ,其中Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅳ期血清中miR-193a-3p的表达水平明显高于健康对照组(1.944 ± 0.600),而TNM分期Ⅲ期和未知亚组血清miR-193a-3p浓度无明显差异,可能由于Ⅲ期

和未知亚组标本量相对较少,见图1。



* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

图1 TNM各分期血清miR-193a-3p含量

2.3 ROC曲线分析 由于I期肾透明细胞癌确诊者可进行肿瘤完全切除术,且预后良好,因此本研究用ROC曲线分析miR-193a-3p对肾透明细胞癌早期诊断价值(图2)。miR-193a-3p的ROC曲线下面积AUCROC为0.820(95%CI, 0.756~0.883),当miR-193a-3p的cutoff值为2.756时,诊断早期肾透明细胞癌的敏感度和特异度高达80.3%和93.5%。

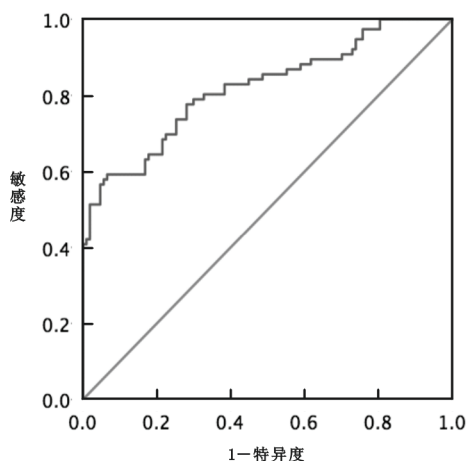


图2 miR-193a-3p的ROC曲线分析

3 讨论 肾透明细胞癌是一种起源于肾近曲小管细胞的恶性肿瘤,发病率在我国泌尿系统恶性肿瘤中仅次于膀胱癌居第二位,死亡率高达40%,位泌尿系统恶性肿瘤第三位^[1,2]。近20年来肾透明细胞癌发病率上升一倍以上,尤其令人堪忧的是呈年轻化趋势。肾透明细胞癌早期多无症状且转移率、复发率高,发病机制至今不详^[2]。目前肾透明细胞癌的临床诊断主要依靠影像学检查,但影像学诊断常受肿瘤类型、组织结构及瘤内坏死出血等因素影响,且亦受检查者主观因素干扰,具有一定的局限性,特别是对于小于1cm的早期肿瘤无法检测

到^[9]。目前没有肾透明细胞癌特异的血清学标志物^[10~12]。因此,寻找具有潜在临床应用前景的分子标志物,阐明其在肾透明细胞癌发生发展中的作用机制,探索新的诊治策略,显得尤为迫切和重要。miRNA具有肿瘤组织特异性、且与分化程度、预后有关^[5],据报道,肾透明细胞癌组织miRNA表达谱也有特异性的变化^[6],揭示miRNA可作为肿瘤新的标志物,为肿瘤的基因治疗提供新的分子靶点。但肿瘤组织的检测属创伤性检测,无法实现早期诊断和治疗效果的实时监控。

在肿瘤状态下血循环中的miRNA可能主要来自于癌组织细胞的主动分泌,并通过外泌体、微小体等载体进行细胞间的交流:传送到癌细胞微循环中的其他受体细胞中;或通过血循环传送到其他组织细胞,影响这些细胞的功能,促进肿瘤的发展^[5]。由此可见,血循环miRNA表达及特征性变化极可能与肿瘤的发生、发展存在着必然联系。因此,研究血清miRNA也将有助于阐明肿瘤发生、发展机制。本研究中用let-7d/g/i作为内参基因来测定肾透明细胞癌血清miRNA水平。我们在之前的研究中发现,let-7d/g/i在不同疾病的患者和健康对照庞大数据中具有高度一致的结果,并且在统计学上优于目前常用的一些参考基因,如U6, RNU44, RNU48和miR-16等^[13]。本文可靠内参基因的选用提高了qRT-PCR实验的灵敏性和重复性,并能较精确地诠释所得数据。

大量肿瘤组织中miRNA的功能实验对评估血清miRNA作为各种癌症特异分子标志物具有重要意义。据报道,miR-193a-3p在恶性胸膜间皮瘤组织中过度表达,并且可用于恶性胸膜间皮瘤与其他胸膜恶性肿瘤的鉴别诊断^[14]。本实验采用qRT-PCR法检测发现miR-193a-3p在肾透明细胞癌患者血清中的含量显著升高($P=0.000$)。尤其是TNM分期I期患者miR-193a-3p的含量也显著高于健康对照($P=0.000$)。进一步ROC曲线分析显示,miR-193a-3p对肾透明性细胞癌早期诊断具有较高的准确度,AUCROC达0.817,敏感度和特异度分别高达80.3%和93.5%,提示miR-193a-3p可作为肾透明细胞癌新的潜在的诊断标志物,并且具有早期诊断潜能。本实验中我们没有观察到III期患者血清miR-193a-3p浓度与对照组的显著差异,其可能的原因是由于本实验中的III期标本量相对较少($n=2$)。根据其他TNM分期患者的结果,我们推测若达到一定的标本量,III期患者血清miR-193a-3p的水平很可能与其他分期患者一样,明显高于对照。不过,

(下转49页)

(上接 45 页)还需要大样本量实验验证。我们下一步将扩大研究的病例数,并对患者进行长期随访,以全面评估 miR-193a-3p 对肾透明性细胞癌的临床应用价值,以期为该病的诊治提供新的手段和思路。

本研究结果显示,miR-193a-3p 对肾透明性细胞癌具有诊断潜能,是该病潜在的早期诊断标志物。

参考文献:

- [1] Epstein JI. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs[M]. IARC, Lyon;Renouf Pub Co Ltd,2004;1-87.
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1):10-29.
- [3] Banumathy G, Cairns P. Signaling pathways in renal cell carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(7): 658-664.
- [4] Graves P, Zeng Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2012, 10(5):239-245.
- [5] Price C, Chen J. MicroRNAs in cancer biology and therapy: current status and perspectives[J]. Genes Dis, 2014, 1(1):53-63.
- [6] Youssef YM, White NM, Grigull J, et al. Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature[J]. Eur Urol, 2011, 59(5):721-730.
- [7] Zhang C, Wang C, Chen X, et al. Expression profile of microRNAs in serum; a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Chem, 2010, 56

(12):1871-1879.

- [8] Yang CH, Wang C, Chen X, et al. Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas[J]. Int J Cancer, 2013, 132(1):116-127.
- [9] Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: The 2010 update[J]. Eur Urol, 2010, 58(3):398-406.
- [10] Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25787.
- [11] Redova M, Poprach A, Nekvindova J, et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma[J]. J Transl Med, 2012(10):55.
- [12] Hauser S, Wulfken LM, Holdenrieder S, et al. Analysis of serum microRNAs (miR-26a-2*, miR-191, miR-337-3p and miR-378) as potential biomarkers in renal cell carcinoma[J]. Cancer Epidemiol, 2012, 36(4):391-394.
- [13] Chen X, Liang H, Guan D, et al. A combination of let-7d, let-7g and let-7i serves as a stable reference for normalization of serum microRNAs[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e79652.
- [14] Benjamin H, Lebanony D, Rosenwald S, et al. A diagnostic assay based on microRNA expression accurately identifies malignant pleural mesothelioma[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(6):771-779.

收稿日期:2015-01-02

修回日期:2015-02-04