

血清 miRNA-720 和 miRNA-484 在结肠癌分期及早期诊断中的应用*

芦 嘉, 史伟峰 (常州市第一人民医院检验科, 江苏常州 213003)

摘要:目的 探讨血清 miRNA-720 和 miRNA-484 是否能作为非侵入性的结肠癌生物标记。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 104 例结肠癌患者(分为 I~II 期组和 III~IV 期组)以及 60 例健康对照血清中 miRNA-720 和 miRNA-484 的表达。通过 ROC 曲线分析两种 miRNA 对不同分期结肠癌患者的诊断价值。结果 与健康对照组相比, miRNA-720 在 I~II 期组上调接近 2 倍($t=1.997, P<0.05$), 在 III~IV 期组上调 3 倍左右($t=2.133, P<0.05$); miRNA-484 在 I~II 期组下调约 2 倍($t=2.585, P<0.05$), 在 III~IV 期组上调超过 3 倍($t=3.416, P<0.01$)。两种 miRNA 用于诊断结肠癌的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.76(95%CI: 0.67~0.86) 和 0.79(95%CI: 0.69~0.89); 两者联合使用可增至 0.87(95%CI: 0.77~0.96)。结论 血清 miRNA-720 和 miRNA-484 可作为非侵入性生物标记对结肠癌做出早期诊断, 并能区别出不同分期的结肠癌。

关键词:结肠癌; 微小 RNA-720; 微小 RNA-484; 生物标记

中图分类号:R735.35; R730.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)01-077-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.021

Application of Serum miRNA-720 and miRNA-484 in the Staging and Early Diagnosis of Colon Cancer

LU Jia, SHI Wei-feng (Department of Clinical Laboratory,
the First People's Hospital of Changzhou City, Jiangsu Changzhou 213003, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether serum miRNA-720 and miRNA-484 can be used as non-invasive biomarkers of colon cancer. **Methods** Real time-polymerase chain reaction was used to detect the expressions of miRNA-720 and miRNA-484 in serum from 104 colon cancer patients(divided into I~II-stage group and III~IV-stage group) compared with 60 additional healthy controls. ROC curve was performed to analyse the diagnostic usefulness of both miRNAs distinguishing between different stages of colon cancer patients. **Results** Compared with healthy controls, the miRNA-720 was upregulated close to 2 times in I~II-stage group ($t=1.997, P<0.05$), and was upregulated about 3 times in III~IV-stage group ($t=2.133, P<0.05$). The miRNA-484 was downregulated almost 2 times in I~II-stage group ($t=2.585, P<0.05$), but was upregulated over 3 times in III~IV-stage group ($t=3.416, P<0.01$). The area under the ROC curve (AUC) for the diagnosis of colon cancer were 0.76 (95%CI: 0.67~0.86) and 0.79 (95%CI: 0.69~0.89) respectively. The combined use of both miRNAs could make the AUC up to 0.87 (95%CI: 0.77~0.96). **Conclusion** Serum miRNA-720 and miRNA-484 can be used as non-invasive biomarkers to diagnose early colon cancer. They can also distinguish between different stages of colon cancer patients.

Keywords: colon cancer; miRNA-720; miRNA-484; biomarker

在全球范围内, 结肠癌新发病率和死亡率均位于恶性肿瘤的第三位, 在发达国家中以每年一百万的新增病例数迅速增长^[1], 在我国其发病率也逐年上升。以目前的医疗水平, 结肠癌最有效的治疗方法是早期通过手术切除病变部位, 术后 5 年存活率可接近 90%^[2]。然而结肠癌起病隐匿, 现在普遍使用的筛查指标为血清 CEA 与 CA199, 两者针对结肠癌的敏感度均不超过 50%^[3]。而金标准的肠镜检查作为一种侵入性的方法不易被患者接受, 经常出现确诊时已是晚期转移的情况, 即使进行手

术, 术后 5 年存活率仅有 12%~13%^[3]。因此迫切需要简便的非侵入性检测方法对结肠癌进行早期诊断以及分期。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长约 19nt~25nt 的非编码单链小 RNA 分子, 在转录后水平调控靶基因表达^[4,5]。miRNA 拥有调控细胞周期、分化细胞等基本功能, 并参与疾病的发生和发展。不同肿瘤组织的 miRNA 表达谱有特异的区别, 循环至外周血中的相应 miRNA 耐受反复冻融、酸碱以及核酸酶的处理, 对于 RNA 酶处理也

* 作者简介: 芦 嘉 (1983-), 男, 学士, 主管技师, 主要从事临床生化检验, Tel: 13813696921, E-mail: 158585359@qq.com。

通讯作者: 史伟峰, 男, 硕士, 主任技师, 研究方向为临床微生物耐药机制及耐药基因的研究, Tel: 0519-68870895, E-mail: 13961120249@163.com。

较 mRNA 更加稳定^[6], 这种特异性和稳定性决定了外周血 miRNA 作为肿瘤标志物的潜在价值。本文旨在通过检测不同分期结肠癌患者血清中 miRNA-720 和 miRNA-484 的表达变化, 以评价血清 miRNA-720 和 miRNA-484 作为结肠癌早期诊断标记物及对结肠癌进行分期的可能性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取常州市第一人民医院胃肠外科从 2014 年 3 月~2016 年 3 月收治的新发现的结肠癌患者 104 例, 其中男性 65 例, 女性 39 例, 年龄 41~81 岁, 平均年龄 63.8 ± 11.2 岁。所有患者均通过肠镜病理确诊, 按 TNM 分期法分期: I 期 23 例, II 期 27 例, III 期 30 例, IV 期 24 例, 按照有无淋巴结转移分为: I~II 期组和 III~IV 期组。同时选择年龄匹配、同期来院体检的健康者 60 例作为对照组, 其中男性 30 例, 女性 30 例, 年龄 46~80 岁, 平均年龄 66.2 ± 9.6 岁。

1.2 仪器及试剂 Roche LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪(罗氏公司); 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司); SAS67120 型超纯水机(Millipore 公司); WH-851 型涡旋仪、1612-1 型高速离心机(上海医疗器械公司); Multiskan FC 酶标仪(赛默飞世尔公司); Trizol 总 RNA 提取试剂(Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒, SYBR Green qPCR Mix 试剂盒(上海诺伦公司); U6 snRNA, 特异性引物(广州锐博公司); 分析纯氯仿, 异丙醇, 无水乙醇(上海化学试剂公司); DEPC 水(Sigma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本收集与保存: 采集 104 例患者及 60 例健康对照空腹静脉血 5 ml, 低温 4°C , $2\ 700\ \text{g}$, 离心 5 min, 分离血清 -80°C 保存。采血前患者均未接受过放、化疗处理, 健康体检者均未服用任何药物。

1.3.2 血清 RNA 提取及实时荧光定量 PCR: RNA 提取采用 Trizol 法, 将复融血清按照操作说明提取总 RNA。酶标仪测定 RNA 吸光度 $A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$ 介于 $1.7 \sim 1.9$, $A_{260\text{nm}/280\text{nm}} > 1$ 方可用于后续实验。调整 RNA 模板浓度至 $400\ \text{ng}/\mu\text{l}$ 用于逆转录, 反应体系: RT Master Mix $10\ \mu\text{l}$ + RT Enzyme Mix $1\ \mu\text{l}$ + 特异性引物 ($1\ \mu\text{mol}/\text{L}$) $1.2\ \mu\text{l}$ + RNA 模板 $5\ \mu\text{l}$ + RNase Free ddH₂O $2.8\ \mu\text{l}$, 共 $20\ \mu\text{l}$, 反应条件: $45^{\circ}\text{C}\ 30\ \text{min}$, $85^{\circ}\text{C}\ 10\ \text{min}$ 。实时荧光定量 PCR 检测 miRNA, 使用 U6 snRNA 作为内参, 所有反应都设 3 复孔和空白对照。反应体系: SYBRGreen Master Mix $10\ \mu\text{l}$ + 特异性 Forward primer ($5\ \mu\text{mol}/\text{L}$) $0.4\ \mu\text{l}$ + Reverse primer ($5\ \mu\text{mol}/\text{L}$) $0.4\ \mu\text{l}$ + cDNA template $5\ \mu\text{l}$ + RNase Free ddH₂O $4.2\ \mu\text{l}$ 共 $20\ \mu\text{l}$, 反应条件: $94^{\circ}\text{C}\ 2$

min, 40 个 PCR 循环 ($94^{\circ}\text{C}\ 15\ \text{s}$, $62^{\circ}\text{C}\ 40\ \text{s}$, $70^{\circ}\text{C}\ 40\ \text{s}$)。根据待测 miRNA 与内参 U6 的 Ct 值计算 miRNA-720 和 miRNA-484 的相对表达量, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示血清目的基因的表达相对于对照血清表达的变化倍数, 其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{结肠癌目的基因}} - \text{Ct}_{\text{结肠癌内参}}) - (\text{Ct}_{\text{对照目的基因}} - \text{Ct}_{\text{对照内参}})$ 。

1.4 统计学分析 数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析。结肠癌 I~II 期组和 III~IV 期组分别与健康对照组进行比较, 两种 miRNA 的表达差异采用独立样本 *t* 检验, 以双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。绘制 ROC 曲线用来分析两种 miRNA 诊断结肠癌的敏感度及特异度。

2 结果

2.1 血清 miR-720 和 miR-484 的检测 见表 1。以健康组的血清 miR-720 和 miR-484 作为对照, 表达值为 1。qRT-PCR 检测结果显示, 结肠癌患者血清的 miR-720 相对表达量与对照组相比, 在 I~II 期组上调接近 2 倍, III~IV 期组上调超过 3 倍, 差异有统计学意义 ($t_{\text{I~II}} = 1.997$, $P < 0.05$; $t_{\text{III~IV}} = 2.133$, $P < 0.05$)。miR-484 在结肠癌患者血清中的相对表达量与对照组相比, 在 I~II 期组下调约 2 倍, 而在 III~IV 期组上调超过 3 倍, 差异有统计学意义 ($t_{\text{I~II}} = 2.585$, $P < 0.05$; $t_{\text{III~IV}} = 3.416$, $P < 0.01$)。

表 1 I~II 期组、III~IV 期组相比对照组 miRNA 的表达变化

项目	I~II 期组(50 例)		III~IV 期组(54 例)	
	miR-720	miR-484	miR-720	miR-484
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	1.55	0.48	3.17	3.69
变化水平*	1.55	-2.11	3.18	3.7
<i>t</i>	1.997	2.585	2.133	3.416
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.01

注: * 与对照组相比的变化倍数, 正值为上调, 负值为下调。

2.2 ROC 曲线分析 绘制两种 miRNA 的 ROC 曲线, miR-720 与 miR-484 用于诊断早期结肠癌的曲线下面积 (AUC) 分别为 0.76 (95% CI: $0.67 \sim 0.86$) 和 0.79 (95% CI: $0.69 \sim 0.89$); 两者联合使用, AUC 增至 0.87 (95% CI: $0.77 \sim 0.96$)。用 ROC 评价 miR-720 和 miR-484 诊断早期结肠癌的敏感度和特异度, 见表 2。

表 2 miR-720 和 miR-484 诊断早期结肠癌的敏感度和特异度 (%)

miRNA	敏感度	特异度
miR-720	79.3	87.8
miR-484	76.6	85.9
miR-720 联合 miR-484	85.7	91.4

3 讨论 随着 miRNA 在肿瘤学方面的应用被提出,关于 miRNA 作为结肠癌的生物诊断标记的研究便不断被报道。既往对结肠癌 miRNAs 的研究主要集中在组织细胞内的表达,但从患者体内获取病变组织是有创操作,且无法保证取样的绝对准确,因此大多数研究都是回顾性的,对病人的早期诊断支持不足。在肿瘤发生发展的早期阶段即有核酸释放入血,这些循环核酸被认为携带了肿瘤组织遗传学和表观遗传学的异常改变。借助分子生物学技术从外周血中提取循环核酸进行检测分析,可以实现肿瘤的实时、无创和动态监测,为早期诊断、疗效评估、复发监测及预后判断提供重要信息^[7]。由于血液中核酸酶的存在,曾有大量研究者对外周血中 RNA 能否长时间稳定持怀疑态度,而近几年研究表明,循环 miRNA 可以免受血液中 RNase 的破坏,并且在恶劣的条件下(高温,异常 pH 环境,多次冻融)仍能保持稳定^[8]。其机制还不是完全清楚,但已经发现血清中 miRNA 抵抗降解的能力可能与脂质和脂蛋白的复合物有关。研究显示 mRNA 和 miRNA 的跨膜交换发生在微泡(>1 μm)及细胞外小泡(exosomes, 50~90 nm)中^[9],外周血存在来自肿瘤的细胞外小泡,细胞外小泡内含有具备生物活性的 miRNA。血清中的 miRNA 主要存在于微泡及细胞外小泡中,正是由于微泡及细胞外小泡的保护,避免了 miRNA 受血清 RNase 的破坏。

miRNA-720 和 miRNA-484 是近年来新被发现的 miRNA,它们被认为是肠道肿瘤 miRNA 谱中的成员,有很多研究对其在肿瘤组织和正常组织中的不同表达做出了种种探索,但在结肠癌患者血清中的具体变化很少见到报道^[10]。本实验采用实时荧光定量 PCR 技术检测 104 例结肠癌患者和 60 例健康对照血清 miRNA-720 和 miRNA-484 的表达,发现两种 miRNA 在血清中的表达结果与其他研究中在肿瘤组织中两种 miRNA 的表达有着良好的相关性^[11]。相比健康对照,miRNA-720 在结肠癌患者血清中的表达明显上调,Ⅲ~Ⅳ期相比Ⅰ~Ⅱ期上调更多,提示 miRNA-720 可能在结肠癌早期正常组织细胞向肿瘤细胞分化过程中产生,并随肿瘤细胞的生长不断增多。Nonaka 等^[12]发现,miRNA-720 与肿瘤细胞的淋巴结转移相关,有淋巴结转移的结肠癌患者血清表达明显比无转移的患者要高,与本实验的结果一致。另有研究发现,miRNA-484 通过线粒体网络抑制线粒体分裂蛋白 Fis1 翻译,造成线粒体 DNA 畸变从而使细胞发生癌变^[13]。在本实验中,miRNA-484 在Ⅰ~Ⅱ期结肠癌血清中相较正常对照表达下调,在Ⅲ~Ⅳ

期却明显上调,提示 miRNA-484 可能在结肠癌晚期通过抑制线粒体分裂蛋白 Fis1 翻译这一途径造成肿瘤细胞的浸润和转移。但这两种 miRNA 参与肿瘤发生发展以及与肿瘤细胞之间的调控机制尚不清楚,尤其是 miRNA-484 在早期结肠癌中表达下调的原因还是未解之谜,有待进一步的深入研究。

有研究表明,当某种 miRNA 诊断的敏感度和特异度均超过 75%^[14],或者其 ROC 曲线下面积(AUC)>0.7 时,便可认为该 miRNA 作为标记物能够较好地筛查出肿瘤患者^[15]。在本实验中,ROC 曲线显示 miRNA-720 和 miRNA-484 诊断结肠癌的敏感度和特异度都在 80%左右,且两者联合应用时 AUC 达到了 0.87,说明它们具有作为结肠癌临床筛查指标的潜能。

综上所述,血清 miRNA-720 和 miRNA-484 在不同分期的结肠癌患者中表达明显不同,对诊断结肠癌的敏感度和特异度都基本达到要求,因此可作为新的非侵入性结肠癌早期诊断标志物。同时由于在Ⅰ~Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期患者血清中表达有特征性的区别,miRNA-720 和 miRNA-484 可以对结肠癌进行相对准确的分期。但由于本实验选取的临床病例有限,它们能否在以后的实验中得到验证,甚至作为肿瘤标志物应用于临床,还需要更加大量的后续实验加以继续探索和证明。

参考文献:

- [1] Xiao ZG, Deng ZS, Zhang YD, et al. Clinical significance of microRNA-93 downregulation in human colon cancer[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2013, 25(3):296-301.
- [2] Hofslis E, Sjursen W, Prestvik WS, et al. Identification of serum microRNA profiles in colon cancer[J]. Br J Cancer, 2013, 108(8):1712-1719.
- [3] Li T, Leong MH, Harms B, et al. MicroRNA-21 as a potential colon and rectal cancer biomarker[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(34):5615-5621.
- [4] Chevillet JR, Lee I, Briggs HA, et al. Issues and prospects of microRNA-based biomarkers in blood and other body fluids[J]. Molecules, 2014, 19(5):6080-6105.
- [5] Kita Y, Vincent K, Natsugoe S, et al. Epigenetically regulated microRNAs and their prospect in cancer diagnosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2014, 14(6):673-683.
- [6] McDonald MK, Capasso KE, Ajit SK. Purification and microRNA profiling of exosomes derived from blood and culture media[J]. J Vis Exp, 2013(76):e50294.
- [7] 李琳, 张连海, 季加孚. 外周血循环核酸作为肿瘤标志物在胃癌中的应用现状[J]. (下转 83 页)

(上接 79 页)中华胃肠外科杂志,2014,17(1):21-25.

- Li L,Zhang LH, Ji JF. Application status of circulating nucleic acids as biomarkers in gastric cancer[J]. Chin J Gastrointest Surg, 2014, 17(1): 21-25.
- [8] Valencia K, Luis-Ravelo D, Bovy N, et al. miRNA cargo within exosome-like vesicle transfer influences metastatic bone colonization[J]. Mol Oncol, 2014, 8(3): 689-703.
- [9] Ge QY, Zhou YX, Lu JF, et al. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions[J]. Molecules, 2014, 19(2): 1568-1575.
- [10] Ye JJ, Cao J. MicroRNAs in colorectal cancer as markers and targets: recent advances[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(15): 4288-4299.
- [11] Hofslie E, Sjursen W, Prestvik WS, et al. Identification of serum microRNA profiles in colon cancer[J]. Br J Cancer, 2013, 108(8): 1712-1719.
- [12] Nonaka R, Miyake Y, Hata T, et al. Circulating miR-

103 and miR-720 as novel serum biomarkers for patients with colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2015, 47(3): 1097-1102.

- [13] Wang K, Long B, Jiao JQ, et al. miR-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1 [J]. Nat Commun, 2012(3): 781.
- [14] Piepoli A, Tavano F, Copetti M, et al. Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33663.
- [15] 王钦君, 张红春, 申娟娟, 等. MicroRNAs 作为结直肠癌潜在标记物的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 107-110, 114.
- Wang QJ, Zhang HC, Shen XJ, et al. MicroRNAs as a potential marker in the progress of colorectal cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(4): 107-110, 114.

收稿日期: 2016-06-29

修回日期: 2016-11-14