

宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 的表达及其临床意义*

冯磊, 常春红, 管晓卿, 汪新宇, 郭甜静 (涿州市医院妇产科, 河北涿州 072750)

摘要:目的 探讨血浆微小核糖核酸-10b(miRNA-10b)在宫颈癌患者中的表达及其临床意义。方法 采用 RT-PCR 检测 168 例宫颈癌患者, 68 例宫颈上皮内瘤样病变(CIN)患者(CIN 组)和 45 例健康女性(对照组)血浆 miRNA-10b、鳞癌抗原(SCCA)及癌胚抗原(CEA)表达水平, 分析 miRNA-10b 表达与宫颈癌临床病理特征的关系。应用 ROC 曲线评价 miRNA-10b, SCCA 及 CEA 对宫颈癌诊断的灵敏度和特异性, 多元 Logistic 回归模型分析三项指标与宫颈癌的关系。Pearson 相关分析宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 与 SCCA 和 CEA 的相关性。结果 宫颈癌组血浆 miRNA-10b, SCCA 及 CEA 表达水平均明显高于 CIN 组和对照组[miRNA-10b($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 5.83 ± 1.84 vs 2.64 ± 0.92 和 2.38 ± 0.75 ; SCCA(ng/ml): 8.74 ± 2.26 vs 1.97 ± 0.62 和 0.61 ± 0.15 ; CEA(ng/ml): 5.71 ± 2.15 vs 1.56 ± 0.58 和 1.34 ± 0.16 , $F=17.842, 13.614, 8.273$, 均 $P<0.01$]。宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 表达水平与临床分期、淋巴结转移、浸润深度及 SCCA 水平相关(t/F 值 = $19.287, 21.528, 5.672, 5.284$, 均 $P<0.05$)。血浆 miRNA-10b, SCCA, CEA 及三项联合诊断宫颈癌的 AUC(95%CI) 分别为 $0.836(0.752 \sim 0.924)$, $0.795(0.722 \sim 0.875)$, $0.664(0.596 \sim 0.738)$ 和 $0.882(0.794 \sim 0.958)$, 其最佳截值分别为 $4.26, 6.58$ ng/ml 和 4.05 ng/ml。Logistic 回归分析显示, 血浆 miRNA-10b 和 SCCA 水平升高是宫颈癌发生的独立危险因素[OR(95%CI) = $1.816(1.629 \sim 2.483)$, $1.427(1.206 \sim 1.975)$]。宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 与 SCCA 呈正相关($r=0.637, P<0.01$)。结论 血浆 miRNA-10b 有望作为早期诊断宫颈癌的分子标志物, 与 SCCA 和 CEA 联合应用可提高宫颈癌诊断的准确性。

关键词:微小核糖核酸-10b; 宫颈癌; 宫颈上皮内瘤样病变; 敏感性与特异性

中图分类号: R737.33; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)01-052-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.013

Expression of Plasma miRNA-10b in Patients with Cervical Cancer and Its Clinical Significance

FENG Lei, CHANG Chun-hong, GUAN Xiao-qing, WANG Xin-yu, GUO Tian-jing

(Department of Obstetrics and Gynecology, Zhuozhou City Hospital, Hebei Zhuozhou 072750, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of plasma microRNA-10b (miRNA-10b) in patients with cervical cancer. **Methods** The levels of plasma miRNA-10b, SCCA and CEA were detected by RT-PCR in 168 patients with cervical cancer, 68 patients with CIN (CIN group) and 45 healthy women (control group), analyzed the relation between miRNA-10b expression and clinicopathological features of cervical cancer. The sensitivity and specificity of miRNA-10b, SCCA and CEA in the diagnosis of cervical cancer were evaluated by ROC curve, and the relationship between three indexes and cervical cancer were analyzed by multivariate Logistic regression model. Correlation analysis of plasma miRNA-10b and SCCA, CEA in patients with cervical cancer was analysed by Pearson. **Results** The levels of miRNA-10b, SCCA and CEA in the cervical cancer group were significantly higher than those in the CIN group and the control group[miRNA-10b($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 5.83 ± 1.84 vs 2.64 ± 0.92 and 2.38 ± 0.75 ; SCCA(ng/ml): 8.74 ± 2.26 vs 1.97 ± 0.62 and 0.61 ± 0.15 ; CEA(ng/ml): 5.71 ± 2.15 vs 1.56 ± 0.58 and 1.34 ± 0.16 , $F=17.842, 13.614, 8.273$, all $P<0.01$]. The level of plasma miRNA-10b expression was correlated with clinical stage, lymph node metastasis, depth of invasion and SCCA level in patients with cervical cancer($t/F=19.287, 21.528, 5.672, 5.284$, $P<0.05$). Plasma miRNA-10b, SCCA and CEA and three combined diagnosis of cervical cancer of AUC (95%CI) were $0.836(0.752 \sim 0.924)$, $0.795(0.722 \sim 0.875)$, $0.664(0.596 \sim 0.738)$ and $0.882(0.794 \sim 0.958)$, respectively. The optimal cut-off values were $4.26, 6.58$ ng/ml and 4.05 ng/ml, respectively. Logistic regression analysis showed that elevated plasma miRNA-10b and SCCA levels were independent risk factors for cervical cancer[OR(95%CI) = $1.816(1.629 \sim 2.483)$, OR(95%CI) = $1.427(1.206 \sim 1.975)$]. Plasma miRNA-10b was positively correlated with SCCA in patients with cervical cancer($r=0.637, P<0.01$). **Conclusion** Plasma miRNA-10b will be expected to be a molecular marker for the early diagnosis of cervical cancer. The combination of SCCA and CEA can improve the diagnostic accuracy of cervical cancer.

Keywords: miRNA-10b; cervical cancer; cervical intraepithelial neoplasia; sensitivity and specificity

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤,其发病率有逐年上升和年轻化发展的趋势,已成为严重威胁女性生命健康的恶性肿瘤之一^[1]。宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)是宫颈

* 基金项目:保定市科学计划与发展指导计划项目(16ZF196)。

作者简介:冯磊(1971—),女,本科,主治医师,主要从事临床妇产科疾病研究, E-mail: 18003123880@163.com。

癌的癌前病变,早期诊断和治疗 CIN 对于预防宫颈癌有着重要的意义。近年研究表明,微小核糖核酸(microRNA, miRNA)在肿瘤发生、发展及转移中起着重要的作用,其中 miRNA-10b 与多种恶性肿瘤的发生有关,可能在肿瘤发生过程中发挥癌基因的作用^[2,3]。本研究通过检测血浆 miRNA-10b 在宫颈癌患者中的表达情况,分析其表达与宫颈癌临床病理特征间的关系,旨在为宫颈癌的早期诊断及靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2014 年 3 月~2017 年 3 月河北省涿州市医院妇产科收治的宫颈癌患者 168 例,年龄 29~76(47.36±10.85)岁。纳入标准:①符合国际妇产科联合会(FIGO)分类标准和 WHO 分级标准,且经病理确诊为宫颈癌者;②术前均未接受放射治疗、化疗及生物免疫治疗者;③能配合本次研究及病历资料完整者。宫颈癌临床分期:I 期 58 例,II 期 67 例,III 期 25 例,IV 期 18 例;病理类型:鳞状细胞癌 140 例,腺癌 28 例;病理分级:G1 34 例,G2 56 例,G3 78 例;有淋巴结转移 45 例,无淋巴结转移 123 例。另取同期与宫颈癌患者年龄匹配的 CIN 患者 68 例(CIN II 21 例,CIN III 47 例)作为 CIN 组和正常健康女性 45 例作为对照组。宫颈癌组、CIN 组和对照组间年龄、体质指数、婚姻状况、吸烟史、饮酒史、家族史及流产史比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。所有研究对象均于清晨空腹抽静脉血 5 ml,离心分离血浆后保存于-80℃冰箱待检。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器:RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司,在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)。

1.2.2 miRNA 的提取:取 300 μ l 血浆样本,加入 1 ml 总 miRNA 提取液,按照血液总 miRNA 快速提取试剂盒(miRNeasy 血浆提取试剂盒)说明书从血浆中提取总 RNA。

1.2.3 miRNA 逆转录及 RT-PCR 检测:以 U6 为

实验内参,miRNA 逆转录反应体系:5 μ l RNA 模板,3 μ l U6 及 miRNA 特异性茎环引物,0.15 μ l 100 mmol/L dNTPs(with dTTP),1.00 μ l 逆转录酶(50 U/ μ l),1.50 μ l 10 \times 反转录缓冲液,0.19 μ l RNase 抑制剂(20 U/ μ l),4.16 μ l 无菌三蒸水。反应条件:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,4℃ 保存,进行逆转录反应。以 U6 为实验内参,反应体系为 20 μ l:1.00 μ l TaqMan Small RNA Assay (20 \times)溶液,10.00 μ l TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II (2 \times)溶液,1.33 μ l 反转录产物 cDNA,7.67 μ l DEPC 水。扩增条件为:95℃ 10 min 1 个循环,95℃ 15 s,60℃ 60 s 进行 40 个循环,实验重复 3 次。每个反应体系中荧光信号达到所设定阈值的经历的循环数即为 C_t 值,以 U6 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miRNA-10b 的相对表达水平,其中 $\Delta C_t = C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{U6}}$ 。

1.2.4 血浆鳞状细胞癌抗原(SCCA)和癌胚抗原(CEA)检测:分别采用贝克曼和罗氏电化学发光免疫分析仪及配套试剂盒,化学发光法测定 SCCA 和 CEA 水平,操作过程严格按照说明书进行。

1.3 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计软件分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验。绘制受试者工作特征曲线(ROC)评价血浆 miRNA-10b 对宫颈癌的诊断价值,相关性分析采用 Pearson 相关分析。应用多元 Logistic 回归分析血浆 miRNA-10b 与宫颈癌的关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血浆 miRNA-10b,SCCA 及 CEA 表达水平比较 见表 1。宫颈癌组血浆 miRNA-10b,SCCA 及 CEA 表达水平均明显高于 CIN 组和对照组,差异有统计学意义($F=17.842, 13.614, 8.273$,均 $P<0.01$);而 CIN 组与对照组血浆 miRNA-10b,SCCA 及 CEA 表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组血浆 miRNA-10b,SCCA 及 CEA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

项 目	对照组($n=45$)	CIN 组($n=68$)	宫颈癌组($n=168$)	F 值	P 值
miRNA-10b($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	2.38±0.75	2.64±0.92	5.83±1.84	17.842	<0.001
SCCA(ng/ml)	0.61±0.15	1.97±0.62	8.74±2.26	13.614	<0.001
CEA(ng/ml)	1.34±0.16	1.56±0.58	5.71±2.15	8.273	<0.001

2.2 宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 表达与临床病理特征的关系 见表 2。随着宫颈癌临床分期的进展,miRNA-10b 表达水平逐渐升高,III~IV 期宫颈癌患者中 miRNA-10b 表达水平明显高于 I~II 期,差异有统计学意义(t/F 值 = 19.287, $P<$

0.01)。血浆 miRNA-10b 表达水平与淋巴结转移、浸润深度及 SCCA 水平也相关(t/F 值 = 21.528, 5.672, 5.284, 均 $P<0.05$),而与年龄、病理类型、病理分级、肿瘤大小、绝经状态及 CEA 水平差异无统计学意义(t/F 值 = 0.462, 0.714,

0.487, 0.828, 0.318, 0.663, 均 $P>0.05$ 。

表2 宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 表达与临床病理特征的关系

组别	n	nmRNA-10b($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	t/F值	P值
年龄(岁)				
<45	79	5.72±1.93		
≥45	89	5.94±1.77	0.462	0.513
临床分期				
I~II期	125	3.41±1.24		
III~IV期	43	8.27±3.15	19.287	<0.001
病理类型				
鳞癌	140	6.04±1.85		
腺癌	28	5.68±1.62	0.714	0.426
病理分级				
G ₁	34	5.95±1.82		
G ₂	56	5.73±1.68	0.487	0.509
G ₃	78	5.86±1.75		
肿瘤大小				
≤4cm	97	5.71±1.65		
>4cm	71	6.03±1.94	0.828	0.314
淋巴结转移				
是	45	3.38±1.26		
否	123	8.41±3.17	21.528	<0.001
绝经				
是	56	5.80±1.76		
否	112	5.87±1.82	0.318	0.627
浸润深度				
≤1/2肌层	65	4.15±1.34		
>1/2肌层	103	8.06±3.26	5.672	0.012
SCCA(ng/ml)				
<6.0	78	4.26±1.37		
≥6.0	90	7.93±3.08	5.284	0.018
CEA(ng/ml)				
<5.0	107	5.76±1.73		
≥5.0	61	5.92±1.85	0.663	0.482

表3 血浆 miRNA-10b, SCCA 及 CEA 对宫颈癌的诊断价值

项目	最佳截值	标准误	AUC(95%CI)	P值	敏感度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
miRNA-10b	4.26	0.042	0.836(0.752~0.924)	<0.001	82.6	80.2	83.6	79.3
SCCA	6.58 ng/ml	0.051	0.795(0.722~0.875)	<0.001	79.3	75.6	79.5	75.2
CEA	4.05 ng/ml	0.063	0.664(0.596~0.738)	0.025	74.2	65.8	68.4	71.5
三项联合	-	0.035	0.882(0.794~0.958)	<0.001	84.7	81.4	85.2	80.6

表4 多元 Logistic 回归分析血浆 miRNA-10b, SCCA, CEA 与宫颈癌的关系

因素	β	SE(β)	Wald 值	OR 值	95%CI	P 值
miRNA-10b	0.613	0.185	8.267	1.816	1.629~2.483	<0.001
SCCA	0.215	0.084	4.574	1.427	1.206~1.975	0.023
CEA	0.108	0.037	2.093	1.162	0.894~1.627	0.084

2.5 宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 与 SCCA, CEA 的相关性 见图1。

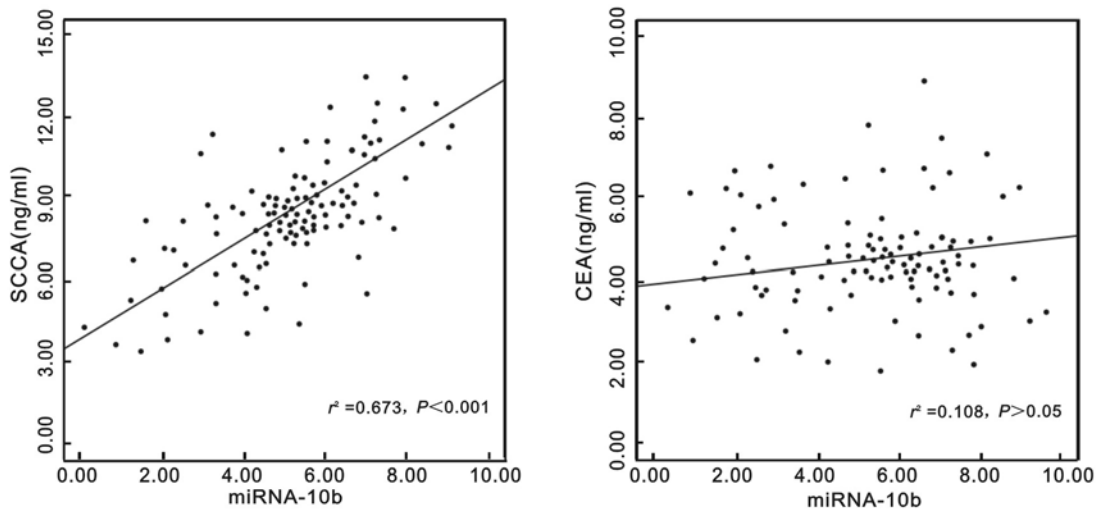


图1 血浆 miRNA-10b 与 SCCA, CEA 的相关性

Pearson 相关分析显示, 血浆 miRNA-10b 与 SCCA 呈正相关($r=0.637, P<0.01$); 血浆 miRNA-10b 与 CEA 无明显相关($r=0.108, P>0.05$)。

3 讨论 宫颈癌的发生是多基因、多因素和多阶段共同作用的过程,其病理机制目前尚不完全明确。微小核糖核酸(miRNA)是一类内源性非编码的小RNA,在肿瘤生理病理过程中发挥着重要的调控作用,有望成为一种新的疾病诊断、分类和预后判断的工具^[4]。已有研究证实,多种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判断的新型标记物^[5]。近年来研究发现,血浆miRNA-10b在多种恶性肿瘤中异常表达,且不同组织来源的恶性肿瘤中表达水平存在明显差异,是诊断恶性肿瘤患者的潜在生物学指标^[6,7]。然而,血浆miRNA-10b能否作为宫颈癌早期诊断的分子标志物,目前尚未明确。

本研究结果显示,宫颈癌组血浆miRNA-10b, SCCA及CEA表达水平均明显高于CIN组和对照组,而CIN组与对照组无显著差异。在宫颈癌患者临床病理分期中,Ⅲ~Ⅳ期患者血浆miRNA-10b的表达水平明显高于Ⅰ~Ⅱ期。说明血浆miRNA-10b在宫颈癌患者中异常表达,可能通过发挥癌基因的作用来调节宫颈癌的发生发展过程。Hou等^[8]研究认为,miRNA-10b作为miRNA家族中的一员,在宫颈癌患者中存在异常表达,并且与肿瘤的侵袭及远处转移有密切关系。另有研究表明,异常表达的miRNA参与了宫颈癌的发病和进展,可以将miRNA作为宫颈癌新的诊断标志物和生物治疗新的靶点^[9]。此外,进一步分析miRNA-10b表达与宫颈癌临床病理特征的关系,显示miRNA-10b表达水平与淋巴结转移及浸润深度有关,提示miRNA-10b在肿瘤预测方面有一定的作用,分析其原因可能是存在淋巴结转移的患者肿瘤负荷往往较大,肿瘤组织可释放更多的具有原癌基因作用的miRNA进入血液,同时可抑制机体原有的具有抑癌作用的miRNA水平表达,进而导致机体miRNA表达水平异常升高;浸润越深的患者病情进展越快,肿瘤组织miRNA表达水平升高越明显。Zou等^[10]研究也显示,miRNA-10b在宫颈癌患者的发生发展过程中具有一定的作用,可能促进宫颈癌患者的进展和转移。

应用ROC曲线分析,结果显示血浆miRNA-10b对宫颈癌患者的诊断效能明显优于传统肿瘤标志物SCCA和CEA,其最佳截值为4.26,敏感度和特异度分别为82.6%和80.2%;三项联合诊断宫颈癌的敏感度和特异度最好,分别为84.7%和81.4%。相关性分析显示,血浆miRNA-10b与SCCA呈正相关。说明血浆miRNA-10b可作为宫颈癌辅助诊断的新型肿瘤标志物,三项联合检测有

助于提高宫颈癌早期诊断的准确性。既往研究表明,血浆miRNA-10b在肿瘤患者中表达升高,是肿瘤预后监测的独立指标,有可能成为肿瘤早期诊断的生物标志物^[11]。Parrella等^[12]研究也表明,血浆miRNA-10b在肿瘤预后方面具有一定的临床应用价值,可作为肿瘤治疗的新靶点。本研究中,血浆miRNA-10b和SCCA水平升高是宫颈癌发生的独立危险因素,而与年龄、病理类型、病理分级、肿瘤大小、绝经状态及CEA水平无关。提示miRNA-10b可独立作为宫颈癌早期诊断的分子标志物。Saldanha等^[13]研究认为,miRNA-10b在肿瘤患者中异常表达,能成为临床实践中一项新的诊断和预后标志物。Eissa等^[14]研究也发现,肿瘤组织中miRNA-10b的表达变化有助于调控细胞周期调节通路,而细胞通路的激活又抑制其他靶基因,故miRNA的表达模式可作为肿瘤的潜在标志物。另有研究表明,循环miRNA-10b是检测乳腺癌淋巴结转移的潜在生物标志物^[15]。

综上所述,血浆miRNA-10b在宫颈癌患者中异常表达,有望作为早期诊断宫颈癌的分子标志物,与SCCA和CEA联合应用可提高宫颈癌诊断的准确性。但本研究为单中心的临床研究,其结果可能存在一定的偏差,尚需多中心、大样本的前瞻性研究来进一步验证。

参考文献:

- [1] Suh DH, Kim JW, Kang S, et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2013[J]. J Gynecol Oncol, 2014, 25(3): 236-248.
- [2] M'hamed IF, Privat M, Ponelle F, et al. Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers[J]. Cell Oncol (Dordr), 2015, 38(6): 433-442.
- [3] Wang Y, Li Z, Zhao X, et al. miR-10b promotes invasion by targeting HOXD10 in colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2016, 12(1): 488-494.
- [4] Shi LX, Zhang L, Wang CY, et al. Expression of serum microRNA-378 and its clinical significance in renal cell carcinoma[J]. Genet Mol Biol, 2017, 40(2): 525-529.
- [5] Chen AH, Qin YE, Tang WF, et al. MiR-34a and miR-206 act as novel prognostic and therapy biomarkers in cervical cancer[J]. Cancer Cell Int, 2017, 9(6): 1-9.
- [6] Yang YL, Xu LP, Zhuo FL, et al. Prognostic value of microRNA-10b overexpression in peripheral blood mononuclear cells of nonsmall-cell lung cancer patients[J]. Tumour Biol, 2015, 36(9): 7069-7075.
- [7] Liang AL, Zhang TT, Zhou N, et al. MiRNA-10b sponge: An anti-breast cancer study in vitro[J]. Oncol Rep, 2016, 35(4): 1950-1958.
- [8] Hou R, Wang D, Lu J, et al. MicroRNA-10b inhibits proliferation, migration and invasion in cervical cancer cells via direct targeting of insulin-like growth factor-1 receptor[J]. Oncol Lett, (下转 58 页)

(上接 55 页)2017,13(6):5009-5015.

- [9] 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.
- [10] Zou D, Zhou Q, Wang D, et al. The downregulation of microRNA-10b and its role in cervical cancer[J]. Oncol Res, 2016, 24(2):99-108.
- [11] Wang N, Chen P, Huang LP, et al. Prognostic significance of microRNA-10b overexpression in breast cancer: a meta-analysis[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(2):7350-7359.
- [12] Parrella P, Barbano R, Pasculli B, et al. Evaluation of microRNA-10b prognostic significance in a prospec-

tive cohort of breast cancer patients[J]. Mol Cancer, 2014, 13(1):142.

- [13] Saldanha G, Elshaw S, Sachs P, et al. MicroRNA-10b is a prognostic biomarker for melanoma[J]. Mod Pathol, 2016, 29(2):112-121.
- [14] Eissa S, Matboli M, Shehata HH, et al. MicroRNA-10b and minichromosome maintenance complex component 5 gene as prognostic biomarkers in breast cancer[J]. Tumour Biol, 2015, 36(6):4487-4494.
- [15] Chen WJ, Cai FF, Zhang B, et al. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers[J]. Tumour Biol, 2013, 34(1):455-462.

收稿日期:2017-08-31

修回日期:2017-09-29