

• 论 著 •

## 血清 miRNA-182 检测在结直肠癌中的诊断价值研究\*

张艳<sup>1</sup>, 陈琳<sup>2</sup>, 王峰<sup>1,3,△</sup>

(1. 南通大学公共卫生学院医学检验系, 江苏南通 226001; 2. 南通大学附属南通第三医院检验科, 江苏南通 226001; 3. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001)

**摘要:**目的 探讨血清 miRNA-182 作为结直肠癌(CRC)潜在标志物的诊断价值。方法 运用荧光定量 PCR 法检测 53 例 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量, 并与肠良性病变患者及健康体检者进行比较分析。结果 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量明显高于肠良性病变组及对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。ROC 曲线显示血清 miRNA-182 诊断 CRC 的曲线下面积为 0.846, 95% 置信区间为 0.768~0.925; 诊断灵敏度为 77.1%, 特异度为 81.1%。血清 miRNA-182 相对表达量与 CRC 患者 TNM 分期( $P = 0.011$ )及远距离转移( $P = 0.002$ )有关; 而与其他临床特征无关。CRC 患者术后血清 miRNA-182 相对表达量明显低于术前水平( $P < 0.01$ ); 而术后出现复发/转移的患者血清 miRNA-182 相对表达量又明显升高( $P = 0.019$ )。结论 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量明显升高, 并与病情及恶性进展密切相关, 血清 miRNA-182 可作为 CRC 潜在标志物用于临床诊断及病情评估。

**关键词:** 结直肠癌; miRNA-182; 血清标志物; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.15.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)15-2025-03

## Study on the diagnostic value of serum miRNA-182 in colorectal cancer\*

ZHANG Yan<sup>1</sup>, CHEN Lin<sup>2</sup>, WANG Feng<sup>1,3,△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Medicine College of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nantong Third Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the diagnostic value of serum miRNA-182 in colorectal cancer(CRC). **Methods** A total of 53 CRC patients were enrolled in this study, serum miRNA-182 was detected by quantitative real time polymerase chain reaction(qRT-PCR). The results were compared with those of patients with benign intestinal diseases and healthy controls. **Results** The content of serum miRNA-182 in CRC patients was significantly higher than those in patients with benign intestinal diseases and healthy group( $P < 0.05$ ). The ROC curve showed that the area under the curve of serum miRNA-182 was 0.846, the confidence interval was 0.768-0.925, the diagnostic sensitivity was 77.1%, and the specificity was 81.1%. Serum miRNA-182 levels were correlated with TNM stage( $P = 0.011$ ) and distant metastasis( $P = 0.002$ ) in patients with CRC, but no significant correlation with other clinical parameters( $P > 0.05$ ). Serum miRNA-182 level in CRC patients after surgery was significantly lower than that before operation ( $P < 0.01$ ), and which was significantly higher in patients with recurrence/metastasis after surgery( $P = 0.019$ ). **Conclusion** Serum miRNA-182 level increased significantly in CRC patients, and which was closely related to the disease and malignant progression, serum miRNA-182 could be used as a potential marker for clinical diagnosis and disease evaluation of CRC.

**Key words:** colorectal cancer; miRNA-182; serum biomarker; diagnosis

结直肠癌(CRC)是我国临床常见的恶性肿瘤,近年来其发病率呈逐年上升趋势,已位居各类恶性肿瘤的第3位。CRC患者确诊时多已进展至中晚期,且术后易复发、转移,预后差。因此,寻找新的生物标志物对CRC早期诊断、评估疗效及改善患者预后具有重要的临床价值<sup>[1]</sup>。miRNAs是一类长度为18~23 bp的非编码RNAs分子,通过与其靶mRNA的3'非编码区结合,在转录后水平调控靶基因的表达。有研究表明,miRNAs与包括CRC在内的多种肿瘤的发生、发展密切相关,且癌组织中的miRNAs也可作为肿瘤的潜在诊断标志物<sup>[2-3]</sup>。本研究通过检测CRC患者血清中miRNA-182的水平变化,进一步探讨其作为CRC潜在诊断标志物的临床应用价值,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集2013年1月至2014年6月南通大学附属医院收治的53例CRC患者纳入CRC组,其中男38例,女15例,年龄46~79岁,所有患者均经过病理诊断确诊,详细病理特征参数见表1。肠良性病变组患者24例,包括溃疡性结肠炎13例,肠息肉3例,肠腺瘤8例,其中男17例,女7例,年龄43~73岁。另选择健康体检者35例纳入对照组,其中男24例,女11例,年龄40~69岁。所有受试者均对本研究知情同意,研究通过本院伦理委员会批准进行。

**1.2 标本采集** 所有受试者均采集清晨空腹静脉血3 mL于分离胶真空管中,室温静置15 min后,2 000×g 4℃离心10 min,分离出上清液;对上清液12 000×g 4℃离心10 min,再

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81601842);江苏省南通市科技局项目(MS22016057,HS2014061)。

作者简介:张艳,女,本科在读,主要从事临床检验研究。△ 通信作者,E-mail:richardwangf@163.com。

次分离出上清液, -80 °C 保存备用。

**1.3 RNA 提取和反转录反应** 采用 miRCURY™ RNA 提取试剂盒(日本 Takara 公司)提取血清标本中总 RNA, Nano-drop2000 分光光度计(美国 Thermo 公司)检测总 RNA 的纯度与浓度。反转录反应采用 Mir-X™ miRNA First Strand 合成试剂盒(日本 Takara 公司)将提取的总 RNA 反转录成 cDNA, 所有操作严格按试剂盒说明书进行。

**1.4 qRT-PCR 检测** 采用 Mir-X™ miRNA qRT-PCR SYBR 试剂盒(日本 Takara 公司)在 ABI7000 定量 PCR 分析仪(美国 ABI 公司)上进行 qRT-PCR 反应。反应条件为: 先预变性 95 °C 10 min; 然后变性 95 °C 15 s, 退火/延伸 60 °C 1 min, 共扩增 40 个循环。以 miRNAs-16 为内参照, miRNA-182 的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  表示。PCR 引物由上海生工生物公司合成。miRNA-182 上游引物为 5'-TGC GGT TTG GCA ATG GTA GAA C -3', 下游引物为 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; miRNAs-16 上游引物为 5'- TAG CAG CAC GTA AAT ATT GGC G -3', 下游引物为 miRNA qRT-PCR 试剂盒自带通用引物。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计分析, 各组血清 miRNA-182 相对表达量用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验;  $\chi^2$  检验比较不同病理参数患者血清 miRNA-182 表达情况; ROC 曲线评估血清 miRNA-182 对 CRC 的诊断价值。采用双侧检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 各组血清 miRNA-182 相对表达量比较** qRT-PCR 结果显示, CRC 组血清 miRNA-182 相对表达量为  $4.11 \pm 0.33$ , 明显高于肠良性病变组的  $2.11 \pm 0.26$ , 以及对照组的  $1.64 \pm 0.16$ , 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 肠良性病变组血清 miRNA-182 相对表达量与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.115$ )。

**2.2 血清 miRNA-182 对 CRC 的临床诊断价值** ROC 曲线分析结果显示, 血清 miRNA-182 用于诊断 CRC 的曲线下面积为 0.846, 95% 置信区间(CI)为 0.768~0.925; 诊断灵敏度为 77.1%; 诊断特异度为 81.1%, 见图 1。

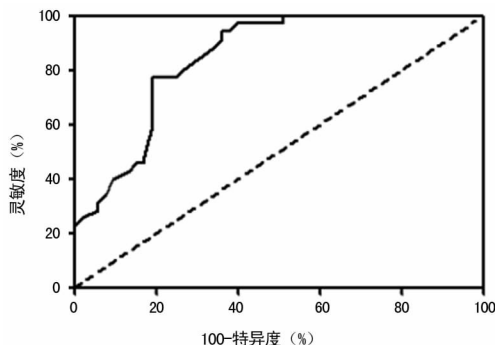


图 1 血清 miRNA-182 对 CRC 患者的临床诊断价值

**2.3 不同临床特征患者血清 miRNA-182 表达情况比较** 以 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量的平均值( $\bar{x} = 4.11$ )作为分界值, 将 CRC 患者分为 2 组, 即高表达组(血清 miRNA-182  $\geq 4.11, n = 25$ )和低表达组(血清 miRNA-182  $< 4.11, n = 28$ )。分析结果显示, 不同 TNM 分期 ( $P = 0.011$ ) 及是否远距离转移 ( $P = 0.002$ ) CRC 患者的血清 miRNA-182 高表达与低表达例数比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而不同

同年龄、性别、肿瘤定位、肿瘤大小及肿瘤分化程度等患者的 miRNA-182 高表达与低表达例数比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

**2.4 动态分析 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量** 对 25 例行手术切除的 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量进行动态观察发现, CRC 患者术后血清 miRNA-182 相对表达量明显低于术前水平 ( $P < 0.01$ )。经随访, 25 例术后 CRC 患者中有 13 例出现复发或转移, 且该 13 例 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量明显升高 ( $P = 0.019$ ); 复发或转移患者与研究组所有患者术前血清 miRNA-182 相对表达量相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2。

表 1 不同临床特征 CRC 患者血清 miRNA-182 表达情况比较 (n)

参数	n	血清 miRNA-182		P
		高表达 (n=25)	低表达 (n=28)	
年龄(岁)				
<62	26	10	16	0.275
$\geq 62$	27	15	12	
性别				
男	38	20	18	0.237
女	15	5	10	
肿瘤定位				
结肠	29	15	14	0.583
直肠	24	10	14	
肿瘤大小(cm)				
$\leq 5$	23	8	15	0.166
$> 5$	30	17	13	
分化程度				
高+中	31	11	20	0.055
低	22	14	8	
TNM 分期				
I + II	21	5	16	0.011
III + IV	32	20	12	
远距离转移				
无	33	10	23	0.002
有	20	15	5	

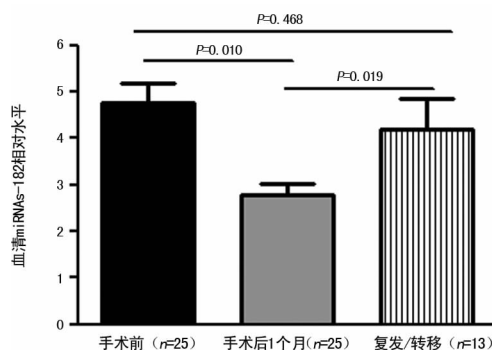


图 2 动态分析 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量变化

**3 讨 论**

miRNAs 在肿瘤的发生、发展中扮演着重要的角色, 在肿瘤中高表达的 miRNAs 具有癌基因的潜能, 可以促进肿瘤细

胞的增殖、侵袭与转移,抑制细胞凋亡;而在肿瘤中低表达的 miRNAs 具有抑癌基因的潜能,可以抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭与转移,促进细胞凋亡。miRNAs 作为新的肿瘤诊断标志物及生物治疗的靶点,越来越引起人们极大的关注,为临床诊疗各种恶性肿瘤提供了新的候选靶标。

miRNAs 不仅可在肿瘤组织中异常表达,也可在包括血清/血浆、尿液、关节腔液、脑脊液等体液中异常表达。由于 miRNAs 分子小,能抵御内源核糖核酸酶的降解;且 miRNAs 在体外经反复冻融仍保持稳定存在;同时,血液标本易获得,创伤性很小,可在体外持续、稳定检测。因此,与以往任何血清肿瘤标志物相比,外周血中 miRNAs 可作为肿瘤的临床诊断、病情评估及预后判断的一类非侵袭性、高度准确,且极具治疗潜能的新型候选标志物。已有文献报道,miRNA-103、miRNA-702、miRNA-372、miRNA-21、miRNA-194、miRNA-29b 等 miRNAs 分子在 CRC 患者血清中异常表达,可作为 CRC 临床诊断、治疗监测、复发/转移预测及预后评估的标志物<sup>[4-7]</sup>,提示 miRNAs 在 CRC 的临床诊疗中具有重要价值。

已有研究表明,miRNA-182 在 CRC 癌组织中高表达,并与患者分期、转移及不良预后密切相关,抑制 miRNA-182 表达,可降低 CRC 细胞增殖、迁移与侵袭能力,提示 miRNA-182 在 CRC 中具有癌基因的潜能<sup>[8-10]</sup>。然而,miRNA-182 在 CRC 患者血清中的表达情况尚不清楚。本研究结果显示,CRC 组血清 miRNA-182 相对表达量明显高于肠良性病变组及对照组,提示血清 miRNA-182 检测可用于肠道恶性疾病的诊断。ROC 曲线分析进一步显示,血清 miRNA-182 用于诊断 CRC 的曲线下面积为 0.846,95%CI 为 0.768~0.925;诊断灵敏度为 77.1%;诊断特异度为 81.1%,提示血清 miRNA-182 对于 CRC 的诊断具有一定价值。通过对不同临床特征的 CRC 患者 miRNA-182 高、低表达例数比较发现,血清 miRNA-182 相对表达量与 CRC 患者 TNM 分期及远距离转移有关;而其他不同临床特征患者 miRNA-182 高表达与低表达例数比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示血清 miRNA-182 相对表达量与 CRC 病情恶性程度相关。对 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量进行动态观察发现,患者术后血清 miRNA-182 相对表达量明显低于术前水平,而术后出现复发/转移的 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量又明显升高,因此,动态监测血清 miRNA-182 相对表达量有助于判断 CRC 术后疗效,以及预测术后复发与转移。

本研究初步分析了血清 miRNA-182 在 CRC 中的临床诊断价值,结果提示 CRC 患者血清 miRNA-182 相对表达量明显升高,并与病情及恶性进展密切相关,血清 miRNA-182 可作为 CRC 潜在标志物用于临床诊断及病情评估。本研究为初步研

究,所得结论有待大样本、长期随访及多中心合作研究的证实。相信随着研究的深入,必将为 CRC 的临床诊断、治疗及预后评估提供新的思路和新的靶标。

参考文献

[1] Nguyen MT, Weinberg DS. Biomarkers in colorectal cancer screening[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2016, 14(8): 1033-1040.

[2] Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran B. The role of microRNAs in colorectal cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84(6): 705-713.

[3] Yang Y, Gu X, Zhou M, et al. Serum microRNAs: A new diagnostic method for colorectal cancer[J]. Biomed Rep, 2013, 1(4): 495-498.

[4] 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.

[5] Yu J, Jin L, Jiang L, et al. Serum miR-372 is a diagnostic and prognostic biomarker in patients with early colorectal cancer[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2016, 16(4): 424-431.

[6] Beckett EL, Martin C, Choi JH, et al. Folate status, folate-related genes and serum miR-21 expression: Implications for miR-21 as a biomarker[J]. BBA Clin, 2015, 4: 45-51.

[7] Basati G, Razavi AE, Pakzad I, et al. Circulating levels of the miRNAs, miR-194, and miR-29b, as clinically useful biomarkers for colorectal cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(2): 1781-1788.

[8] Zhang Y, Wang X, Wang Z, et al. miR-182 promotes cell growth and invasion by targeting forkhead box F2 transcription factor in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2015, 33(5): 2592-2598.

[9] Wang S, Yang MH, Wang XY, et al. Increased expression of miRNA-182 in colorectal carcinoma: an independent and tissue-specific prognostic factor[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(6): 3498-3503.

[10] Yang MH, Yu J, Jiang DM, et al. microRNA-182 targets special AT-rich sequence-binding protein 2 to promote colorectal cancer proliferation and metastasis[J]. J Transl Med, 2014, 12: 109.

(收稿日期:2017-02-23 修回日期:2017-04-23)

(上接第 2024 页)

Se, Zn, Mn plus lachesis muta venom[J]. J Radiat Res, 2011, 52(5): 557-567.

[8] Singh K, Parekh I, Brown S, et al. Tocopherol succinate: modulation of antioxidant enzymes and oncogene expression, and hematopoietic recovery[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 79(2): 571-578.

[9] 侯新然, 王晓波, 李忠亮, 等.<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线损伤后小鼠造血系统生理指标的动态变化[J]. 解放军药学报, 2012, 28

(6): 491-498.

[10] 毛秉智, 陈家佩. 急性放射病基础与临床[M]. 2 版. 北京: 军事医学科学出版社, 2001.

[11] 刘耀文, 罗庆良, 董波, 等. rhIL-11 对急性放射病小鼠骨髓细胞凋亡的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2004, 24(1): 18-20.

(收稿日期:2017-02-09 修回日期:2017-04-09)