

论著 • 临床研究

miR-655 和神经胶质瘤临床特征的关系及其在诊断和预后中的作用^{*}

闫海成¹, 薛际航¹, 高萌妍², 李玉莲³, 王 薇⁴

(1. 内蒙古医科大学附属医院神经外科, 内蒙古呼和浩特 010010; 2. 西安医学院公共卫生系, 陕西西安 710000; 3. 内蒙古医科大学附属医院病理科, 内蒙古呼和浩特 010010; 4. 内蒙古医科大学附属医院肿瘤内科, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘要:目的 探讨 miR-655 和神经胶质瘤临床特征的关系及其在诊断和预后中的作用。方法 收集 2013 年 1 月至 2017 年 5 月在内蒙古医科大学附属医院进行手术的 97 例胶质瘤患者的组织和癌旁组织, 采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-655 的表达, 分析 miR-655 在神经胶质瘤的诊断和预后中的作用。结果 和神经胶质瘤癌旁组织相比, 癌组织中 miR-655 的表达显著降低 ($P < 0.001$), 其表达水平与肿瘤大小 ($P = 0.024$)、WHO 分级 ($P = 0.002$) 显著相关。COX 回归分析表明 miR-655 的表达 ($P = 0.004$) 和肿瘤切除程度 ($P = 0.008$) 是神经胶质瘤的独立危险因素; ROC 分析表明 miR-655 诊断神经胶质瘤的曲线下面积 (AUC) 为 0.959 (95%CI: 0.936~0.982), 当 miR-655 表达为 0.755 时其诊断的敏感度和特异度分别为 89.7% 和 88.7%。Kaplan-Meier 分析神经胶质瘤的表达 < 0.426 组和 ≥ 0.426 组之间生存时间差异有统计学意义 ($P = 0.004$), miR-655 的表达越低说明神经胶质瘤患者的预后越差, miR-655 是影响神经胶质瘤患者生存的独立的危险因素。结论 miR-655 能够作为诊断和预后不良预测的标志物。

关键词: 神经胶质瘤; miR-655; 诊断; 预后; 标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.10.008

中图法分类号: R739.4

文章编号: 1673-4130(2018)10-1184-04

文献标识码: A

Relationship between miR-655 with the clinical features of glioma and its role in diagnosis and prognosis^{*}

YAN Haicheng¹, XUE Jihang¹, GAO Mengyan², LI Yulian³, WANG Wei⁴

(1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University; Hohhot, Inner Mongolia 010010 China; 2. Department of Public Health, Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi 710000, China; 3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China; 4. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between miR-655 with the clinical features of glioma and its role in diagnosis and prognosis. **Methods** The tissues and para cancerous tissues of 97 patients with glioma were collected from January 2013 to May 2017 at the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University. The expression of miR 655 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the diagnosis and prognosis of miR-655 in glioma were analyzed. **Results** The expression of miR-655 in the cancerous tissues was significantly lower than that of the paracancerous tissues of the glioma ($P < 0.001$), which was significantly related to the size of the tumor ($P = 0.024$) and the WHO grading ($P = 0.002$). COX regression analysis showed that the expression of miR-655 ($P = 0.004$) and the degree of tumor resection ($P = 0.008$) were independent risk factors for glioma; ROC analysis showed that the area under the curve of the glioma (AUC) under the miR-655 expression was 0.959 (95%CI: 0.936 - 0.982); when the expression of miR-655 was 0.755, the sensitivity and specificity of the diagnosis were 89.7% and 88.7% respectively. The Kaplan Meier analysis of the expression of glioma was statistically significant ($P = 0.004$). The lower expression of miR-655 indicated the worse the prognosis of glioma patients, the COX analysis miR-655 was an independent risk factor for the survival of glioma patients. **Conclusion** miR-655 can be used as a marker of poor prognosis in diagnosis

^{*} **基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81660469); 内蒙古自然科学基金资助项目 (2015MS0831, 2016BS0809)。

作者简介: 闫海成, 男, 主治医师, 主要从事神经系统肿瘤机制方面的研究。

本文引用格式: 闫海成, 薛际航, 高萌妍, 等. miR-655 和神经胶质瘤临床特征的关系及其在诊断和预后中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(10): 1184-1187.

and prognosis.

Key words:glioma; miR-655; diagnose; prognosis; biomarker

神经胶质瘤是最常见和具有侵袭性的脑肿瘤,约占所有脑和中枢神经系统肿瘤的 30%^[1]。目前,胶质瘤主要采用手术治疗,随后采用放射治疗和替莫唑胺化疗。神经胶质瘤的预后与世界卫生组织(WHO)分级相关,WHO II 级胶质瘤患者的中位生存期为 5~10 年,Ⅲ级胶质瘤的中位生存期为 3~5 年^[2]。因此,发现新的生物标志物有利于神经胶质瘤的诊断及预后评估。微小 RNA(miRNA)通过结合基因 3'-UTR 调节转录后水平的基因表达,从而影响细胞增殖、凋亡、分化和癌症转移和侵袭^[3]。许多研究已经证明 miRNA 失调可能作为诊断和预后标记^[4-5]。在神经胶质瘤中,miR-520b^[6]、miR-202^[7]、miR-592^[8] 和 miR-373^[9]等血浆或血清 miRNA 可作为诊断和预后的生物标志物。

以往研究表明 miR-655 在肿瘤中低表达,能够作为肿瘤的诊断基因及治疗靶点^[10-11]。但是 miR-655 在神经胶质瘤中的作用还不明确。本研究通过分析 miR-655 在神经胶质瘤中的表达及其与临床特征的相关性,探讨了 miR-655 在神经胶质瘤中的诊断和预后作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月至 2017 年 5 月在内蒙古医科大学附属医院进行手术治疗的 97 例胶质瘤患者的组织和癌旁组织。所有患者手术后进行随访,随访时间为 3~40 个月。所有参与者都签署知情同意书,本研究经过内蒙古医科大学附属医院伦理委员会批准。所有患者在接受手术获取标本前未接受过放疗或化疗等治疗,并且具有完整的临床资料。所有诊断均由 2 名病理科医师确认。将收集的组织样本进行-80℃冷冻处理,然后提取总 RNA 进行 miRNA 检测。

1.2 方法 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)进行检测。收集神经胶质瘤组织以及癌旁组织样品,称量 50 mg 进行液氮研磨,加入 1 mL Trizol(美国 Invitrogen)提取液按照试剂说明书操作步骤提取组织总 RNA。将提取的总 RNA 采用超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher)检测总 RNA 的浓度和纯度。然后取 1 μg 总 RNA 采用 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根生化科技)进行 miRNA 逆转录,操作步骤按照试剂盒说明书进行。qPCR 采用 SYBR Green 法检测。反应体系以及扩增条件按照 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒(北京天根生化科技)检测说明书进行操作。检测引物由苏州金维智合成。miR-655 上游引物为 5'-TCC GAA TAA TAC ATG GTT AA-3',下游引物由试剂盒提供;U6 上游引物为 5'-TCC GAT CGT GAA GCG

TTC-3',下游引物为 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。反应体系为:cDNA 5.0 μL;上游引物 0.5 μL;下游引物 0.5 μL;2×miRcute Plus miRNA Premix 10 μL,ddH₂O 4.0 μL,总体积为 20 μL。miR-655 采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems)检测。qPCR 扩增条件为:94℃预变性 15 min,然后 94℃ 20 s、60℃ 34 s 进行 40 个循环。以 U6 表达为内参,相对表达水平采用 2^{-ΔΔCt} 进行计算。每个样品重复 3 次。

1.3 统计学处理 数据统计分析用 SPSS19.0 进行。通过独立的 *t* 检验确定 miR-655 水平的差异。通过 χ^2 检验确定 miR-655 表达与神经胶质瘤临床病理特征的相关性的意义。诊断界限值及曲线下面积(AUC)采用 ROC 进行分析,以评估 miR-655 在神经胶质瘤中的诊断价值。存活率差异采用 Kaplan-Meier 分析。使用 Cox 多变量分析进行预后危险因素分析。双侧 *P*<0.05 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-655 在神经胶质瘤中的表达显著降低 神经胶质瘤组织和癌旁组织中 miR-655 的表达采用 qRT-PCR 检测。结果表明神经胶质瘤旁组织和癌组织中 miR-655 的相对表达分别为 1.79±0.908 和 0.47±0.262,差异具有统计学意义(*t*=13.11,*P*<0.001),miR-655 在神经胶质瘤组织中的表达显著降低。

2.2 miR-655 和宫颈癌临床数据的相关性 神经胶质瘤患者的临床特征与 miR-655 表达的相关性如表 1 所示。根据 miR-655 的中位值(0.426)分为两组:低表达组(<0.426)48 例和高表达组(≥0.426)49 例。研究结果表明 miR-655 表达与性别、年龄、手术切除方式无相关性(*P*>0.05)。然而,miR-655 的表达与肿瘤大小和 WHO 分级显著相关(*P*<0.05)。

表 1 miR-655 表达和神经胶质瘤患者临床特征的相关性

临床特征	<i>n</i>	miR-655 的表达		<i>t</i>	<i>P</i>
		低表达组 (<i>n</i> =48)	高表达组 (<i>n</i> =49)		
性别				0.501	0.479
男	47	25	22		
女	50	23	27		
年龄(岁)				1.252	0.263
≥50	58	26	32		
<50	39	22	17		
肿瘤大小				5.060	0.024
<5 cm	62	36	26		
≥5 cm	35	12	23		
WHO 分级				9.338	0.002

续表 1 miR-655 表达和神经胶质瘤患者临床特征的相关性

临床特征	n	miR-655 的表达		t	P
		低表达组 (n=48)	高表达组 (n=49)		
I+II	60	37	23		
III+IV	37	11	26		
肿瘤切除程度				0.250	0.617
根治切除	53	25	28		
姑息切除	44	23	21		

2.3 miR-655 在诊断中的作用 ROC 曲线分析 miR-655 对神经胶质瘤患者的诊断意义,结果见图 1。结果表明 miR-655 表达诊断神经胶质瘤 AUC 为 0.959(95%CI:0.936~0.982),根据约登指数确定最佳临界值为 0.755,其敏感度和特异度分别为 89.7%(87/97)和 88.7%(86/97)。

2.4 miR-655 在预后中的作用 采用 COX 回归进行单变量和多变量分析用于评估 miR-655 表达和各种临床病理参数对患者预后的影响,结果如表 2 所示。该结果表明 miR-655 表达(P=0.008)和切除程度(P=0.004)是独立危险因素,用于指示胶质瘤的预

后不良。根据 miR-655 的表达中位值 0.426 分为两组(<0.426 组和 ≥0.426 组),Kaplan-Meier 分析 miR-655<0.426 组和 miR-655≥0.426 组的生存时间,结果见图 2。该结果表明 miR-655<0.426 组和 miR-655≥0.426 组神经胶质瘤患者的生存时间差异有统计学意义($\chi^2=8.011,P=0.004$),miR-655 的表达越低说明神经胶质瘤患者的预后越差。

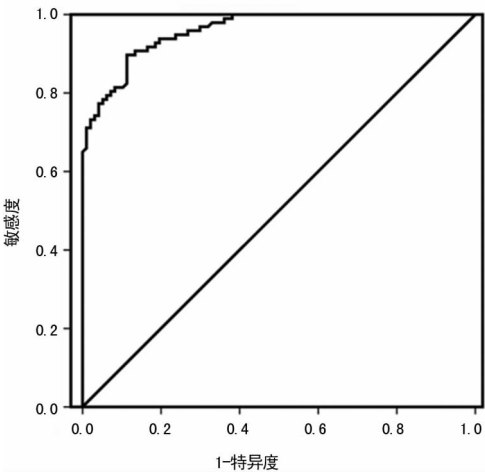


图 1 ROC 曲线分析 miR-655 对神经胶质瘤患者的诊断意义

表 2 COX 回归进行单变量和多变量分析临床病理参数对神经胶质瘤患者预后的影响

参数	单因素分析			多因素分析		
	危险比	95% CI	P	危险比	95% CI	P
性别	0.865	0.432~1.899	0.864	0.661	0.310~1.201	0.156
年龄	1.112	0.995~1.213	0.357	1.011	0.936~1.132	0.293
肿瘤大小	1.028	0.953~1.316	0.069	0.901	0.713~1.112	0.267
WHO 分级	2.903	1.268~4.813	0.001	0.618	0.214~1.865	0.412
切除程度	0.251	0.110~0.573	0.002	0.296	0.103~0.568	0.008
miR-655 表达	0.031	0.050~0.199	<0.001	0.006	0.000~0.109	0.004

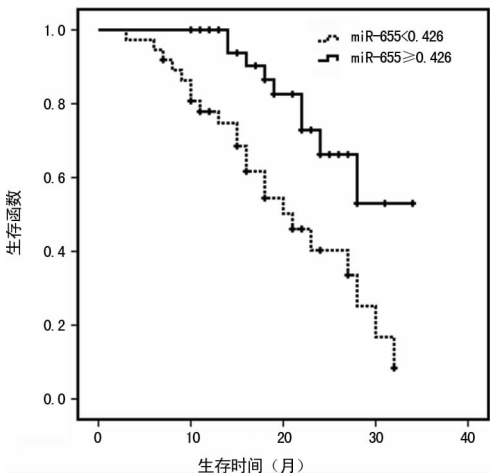


图 2 Kaplan-Meier 分析 miR-655<0.426 组和 miR-655≥0.426 组的生存时间

3 讨 论

神经胶质瘤是中枢神经系统中最常见的肿瘤。

目前对神经胶质瘤的主要诊断方法是计算机断层扫描和核磁共振成像,该诊断价格昂贵所以阻碍其作为常规诊断筛选工具的广泛应用。因此,发展快速和有效的筛选工具有利于神经胶质瘤诊断及预后预测。

miRNA 在肿瘤发展中发挥重要作用,可能作为神经胶质瘤的潜在诊断和/或预后生物标志物。以往研究表明 miR-655 在食管鳞癌、肝癌、三阴性乳腺癌及垂体瘤中的表达显著降低^[11-14],和本研究结果相同。本研究结果表明 miR-655 在神经胶质瘤中的表达显著降低,而且 miR-655 的表达和肿瘤大小、WHO 分级密切相关,COX 回归分析表明 miR-655 的表达和肿瘤切除程度是神经胶质瘤的独立危险因素;ROC 分析表明 miR-655 表达诊断神经胶质瘤的 AUC 为 0.959(95%CI:0.936~0.982),当 miR-655 表达为 0.755 时其诊断的敏感度和特异度分别为 89.7%(87/97)和 88.7%(86/97)。Kaplan-Meier 分析神经胶质瘤的表达<0.426 组和 ≥0.426 组生存时间差异

有统计学意义($\chi^2=5.011, P=0.018$), miR-655 的表达越低说明神经胶质瘤患者的预后越差。以上结果和以往研究类似。在三阴性乳腺癌中 miR-655 的表达和淋巴结转移相关, 过表达 miR-655 能够通过抑制 Prrx1 的表达抑制 EMT, 从而抑制三阴性乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[14]。在食管鳞状细胞癌中 miR-655 与食管鳞状细胞癌的淋巴结转移及预后不良相关, 过表达能够抑制 ZEB1 的表达, 能够促进 EMT 过程, 促进肿瘤的迁移和侵袭^[15]。在肝癌中 miR-655-3p 的表达与阳性微血管浸润、晚期肿瘤分期和淋巴结转移呈负相关, 是肝癌的独立危险因素, 可能作为潜在的预后不良的生物标志物^[11]。也有研究表明 miR-655 的低表达与肝癌的肿瘤大小、TNM 分期和转移状态呈负相关^[16]。以上研究表明 miR-655 可以作为肿瘤的预后预测标志物, 是影响肿瘤患者生存的独立危险因素。以往研究还表明过表达 miR-655 通过抑制 PT-TG1 抑制食管鳞癌和垂体瘤细胞的迁移和侵袭^[12-13]。前期研究表明 Securin (PTTG1 编码的蛋白) 在神经胶质瘤中过表达且能够促进神经胶质瘤细胞的迁移和侵袭^[17], 而本研究表明 miR-655 在神经胶质瘤中低表达且能够影响神经胶质瘤患者的预后, 表明 miR-655 可能通过靶向调控 PTTG1 从而影响神经胶质瘤的发展。

总之, 本研究表明 miR-655 在神经胶质瘤中的表达降低, 且其表达水平与肿瘤大小、WHO 分级密切相关, 能够作为诊断和预后不良预测的标志物。

参考文献

- [1] GOODWINBERGER M L, JENKINS R B. Genetics of adult glioma[J]. *Cancer Genet*, 2012, 205(12): 613-621.
- [2] LOUIS D N, OHGAKI H, WIESTLER O D, et al. The 2007 who classification of tumours of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 97-109.
- [3] BARTEL D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] SHANG Y, ZANG A, LI J, et al. MicroRNA-383 is a tumor suppressor and potential prognostic biomarker in human non-small cell lung cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 1175-1181.
- [5] GONG L, WANG C, GAO Y, et al. Decreased expression of microRNA-148a predicts poor prognosis in ovarian cancer and associates with tumor growth and metastasis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 58-63.
- [6] CUI S, LIU L, WAN T, et al. Mir-520b inhibits the devel-

- opment of glioma by directly targeting mbd2[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(7): 1528-1539.
- [7] YANG J, FAN B, ZHAO Y, et al. MicroRNA-202 inhibits cell proliferation, migration and invasion of glioma by directly targeting metadherin[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1670-1678.
- [8] PENG T, ZHOU L, QI H, et al. Mir-592 functions as a tumor suppressor in glioma by targeting IGFBP2[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317719273.
- [9] JING S Y, JING S Q, LIU L L, et al. Down-expression of mir-373 predicts poor prognosis of glioma and could be a potential therapeutic target[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(10): 2421-2425.
- [10] CHANG P, WANG X, ZHOU Y, et al. Analysis of the correlation between the expression of mir-655 and esophageal cancer prognosis[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4691-4694.
- [11] ZHAO X Q, LIANG B, JIANG K, et al. Down-regulation of mir-655-3p predicts worse clinical outcome in patients suffering from hepatocellular carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(4): 748-752.
- [12] WANG Y, ZANG W, DU Y, et al. Mir-655 up-regulation suppresses cell invasion by targeting pituitary tumor-transforming gene-1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Transl Med*, 2013, 11(301): 1479-5876.
- [13] LIANG H Q, WANG R J, DIAO C F, et al. The pttg1-targeting mirnas mir-329, mir-300, mir-381, and mir-655 inhibit pituitary tumor cell tumorigenesis and are involved in a p53/pttg1 regulation feedback loop[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 29413-29427.
- [14] LV Z D, KONG B, LIU X P, et al. Mir-655 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition by targeting prrx1 in triple-negative breast cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(5): 864-873.
- [15] HARAZONO Y, MURAMATSU T, ENDO H, et al. Mir-655 is an emt-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFB2[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62757.
- [16] WU G, ZHENG K, XIA S, et al. MicroRNA-655-3p functions as a tumor suppressor by regulating ADAM10 and beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 89.
- [17] YAN H, WANG W, DOU C, et al. Securin promotes migration and invasion via matrix metalloproteinases in glioma cells[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(6): 2895-2901.

(收稿日期: 2017-09-13 修回日期: 2017-11-04)