

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.019

胶质瘤患者血浆 miR-21 的表达水平及意义*

赵保¹ 吴峰² 郑林丰³ 叶晶亮¹ 韩瑞章¹ 苏国军^{1△}

(1 解放军第 98 医院神经外科 浙江 湖州 313000; 2 解放军第 98 医院心血管内科 浙江 湖州 313000;

3 上海交通大学附属第一人民医院放射科 上海 200080)

摘要 目的:研究脑胶质瘤患者血浆中 miR-21 的水平,并评价其作为临床诊断标志物的可能性。**方法:**收集临床确诊的胶质瘤患者和健康对照人群的血浆标本,常规方法提取血浆中 RNA,采用茎环结构的引物将其逆转录成 cDNA,实时定量 PCR 的方法分别检测 miR-21 在胶质瘤患者和健康对照人群中的水平,根据 ROC 分析评价 miR-21 作为诊断标志物的可能性。**结果:**分别收集了胶质瘤患者和健康对照人群血浆标本 52 例和 43 例,实时定量 PCR 结果显示,相对于健康对照人群,miR-21 在胶质瘤患者血浆中呈高水平状态。ROC 分析说明血浆 miR-21 水平作为诊断胶质瘤标志物具有较高的灵敏度和特异度。**结论:**血浆 miR-21 水平具有作为胶质瘤诊断的生物标志物的潜能。

关键词:胶质瘤;miR-21;血浆;诊断;标志物

中图分类号:R739.4;R446.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)15-2879-03

Expression and Significance of Plasma miR-21 in Patients with Glioma*

ZHAO Bao¹, WU Feng², ZHENG Lin-feng³, YE Jing-liang¹, HAN Rui-zhang¹, SU Guo-jun^{1△}

(1 Department of Neurosurgery, The 88th Hospital of People's Liberation Army, Huzhou, Zhejiang, 313000, China;

2 Department of Cardiology, The 88th Hospital of People's Liberation Army, Huzhou, Zhejiang, 313000, China;

3 Department of Radiology, First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To detect levels of plasma miR-21 and evaluate its possibility for clinical diagnostic biomarkers in patients with glioma. **Methods:** The plasma samples were collected from patients with glioma and healthy controls, and RNA was isolated by general methods. Then the cDNA of miR-21 was generated by reverse transcription with stem-loop primer, and real-time PCR was applied to detect the levels of plasma miR-21 in patients with glioma and healthy controls. **Result:** Of 52 plasma samples from glioma patients and 43 samples from healthy controls, the plasma miR-21 showed higher levels in glioma patients compared with the plasma from healthy controls ($P < 0.05$). Furthermore, ROC analysis certified that plasma miR-21 showed high sensitivity and specificity. **Conclusion:** Plasma levels of miR-21 maybe served as a potential biomarker for glioma diagnosis.

Key words: Glioma; miR-21; Expression; Clinical stage

Chinese Library Classification: R739.4; R446.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)15-2879-03

前言

胶质瘤约占所有颅内肿瘤的 45 %左右,其发病率逐年上升,有资料显示,我国脑胶质瘤患者年死亡人数达 3 万人^[1-3]。胶质瘤呈浸润性生长,与正常脑组织没有明显界限,手术难以完全切除,对放疗、化疗不甚敏感且容易复发^[4],早期诊断和治疗具有重要意义。目前临床对胶质瘤的诊断和评估主要依靠 CT 或核磁共振成像(MRI)等影像学检查,但仍存在一定的局限性^[5]。MicroRNA(miRNA)是一类在进化上高度保守,长约 18-25 个核苷酸的细胞内源性非编码单链小 RNA,一般通过与靶基因 3' 非翻译区(3'UTR)上靶位点的不完全互补配对结合,在转录后翻译水平调控基因表达^[6]。MiRNA 与多种疾病的发病机制密切相关,参与多种肿瘤的发生发展和演变过程^[7]。晚近研究发现,miRNA 可稳定存在于循环血中,其水平的差异可作为某些

疾病诊断和预后的标志物^[8]。本研究对胶质瘤患者和健康对照血浆中 miR-21 的水平进行了检测,评价其作为胶质瘤诊断生物标志物的可行性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

经本院伦理委员会批准,收集在本院经 CT 扫描,病理标本等临床资料完整的确诊为脑胶质瘤的患者血浆标本 52 例,其中年龄在 55 岁以上(含)的 25 例,55 岁以下的 27 例;男性 32 例,女性 20 例;低级别胶质瘤 21 例,其中 WHO 1 级 8 例,WHO 2 级 13 例,高级别胶质瘤 31 例,其中 WHO 3 级 15 例,WHO 4 级 16 例,具体见表 1。健康对照人群为本院体格检查志愿者,共 43 例。

* 基金项目:上海交通大学医工交叉项目(YG2011MS47)

作者简介:赵保(1973-),男,副主任医师,主要研究方向:脑血管疾病及颅脑创伤救治。电话:0572-3269999, E-mail:dearwgk@163.com

△ 通讯作者:苏国军,电话:0572-2023571, E-mail:zxb1688@yeah.net

(收稿日期:2014-01-12 接受日期:2014-02-10)

表 1 入选患者的临床一般情况

Table 1 Clinical characteristics of the including patients

Parameter		Number	Ratio (%)
Sex	Male	32	61.54
	Female	20	38.46
Age	≥ 55	25	48.08
	<55	27	51.92
WHO Class	WHO 1	8	15.38
	WHO 2	13	25.00
	WHO 3	15	28.85
	WHO 4	16	30.77

1.2 样本收集

抽取患者静脉血 5 mL,健康对照组于体格检查前取血,收集于抗凝管中,1000 rpm 离心后取血浆,-20℃ 冰箱保存。相关参数由本院检验中心检测。

1.3 核酸提取

采用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒(天根公司)提取每个样本血浆中的 miRNA,具体操作参照试剂盒说明书进行。每 200 μL 的血浆提取 miRNA 后用 30 μL 去离子水溶解。取 2 μL 在紫外分光光度计上进行全波长扫描,并以细胞 RNA 样品作对照。

1.4 逆转录反应

使用 primeScript™ 反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司),利用茎环结构的反转录引物将 miRNA 反转录合成 cDNA。10 μL 的反应体系中含有 primeScript™ 缓冲体系 (1×),prime-Script™ 反转录酶混合物 (1×),miR-21 的反转录引物 (20 pmol),总 RNA 样品 (4 μL),用去离子水补足。反应条件为 37℃,15 min;85℃,15 sec。所用 miR-21 反转录引物序列为 CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCA ACATC (5'-3')。

1.5 实时定量 PCR 反应

运用 OneStep SYBR PrimeScript™ PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)进行 miR-21 的定量 PCR 检测。利用已知浓度的人工合成 miR-21 绘制绝对定量 PCR 的标准曲线,并通过检测的 Ct 值计算实际的 miR-21 拷贝数。反应条件为 95℃,30 sec;95℃,5 sec;60℃,15 sec;共 45 个循环。所用 miR-21 的 PCR 引物序列为:正向 ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCA-GACTGA (5'-3');反向 CTCAACTGGTGTCTGGAGT (5'-3')。

1.6 统计学分析

所有的实验重复三次,数据以平均值±标准误表示。采用 SPSS16.0 统计学软件进行数据分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,多组样本均数的比较采用 One-Way ANOVA,血浆 miRNA 的诊断价值利用受试者工作特征曲线 (Receiver Operating Characteristic curve,ROC 曲线)分析。P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 RNA 的全波长扫描结果

将提取的 RNA 样品经紫外分光光度计全波长扫描后发

现,相对于细胞总 RNA,血浆 RNA 的含量很低,且在 230 nm 处吸收峰较强,260 nm 处并无明显吸收峰值,而在 270 nm 处有较强的吸收峰(图 1)。

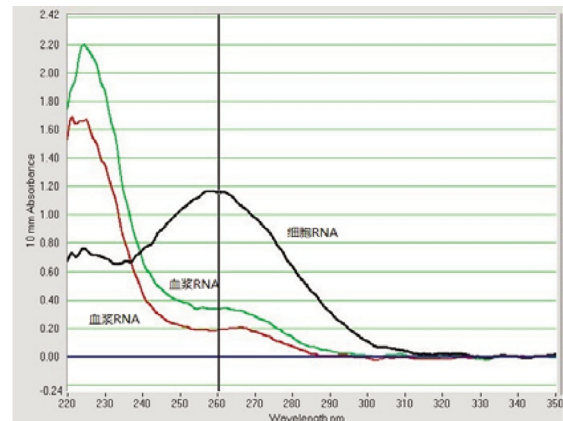


图 1 RNA 样品的全波长扫描

Fig.1 The Whole wave Scan of RNA Sample

2.2 血浆 miR-21 在胶质瘤患者中的水平升高

血浆 miR-21 水平在胶质瘤患者中明显高于健康对照组 (P<0.05)。将胶质瘤患者重新分组后分析,发现低级别胶质瘤患者与健康对照组无明显差异,高级别胶质瘤患者明显高于低级别胶质瘤患者和健康对照组 (P<0.01),结果见图 2。

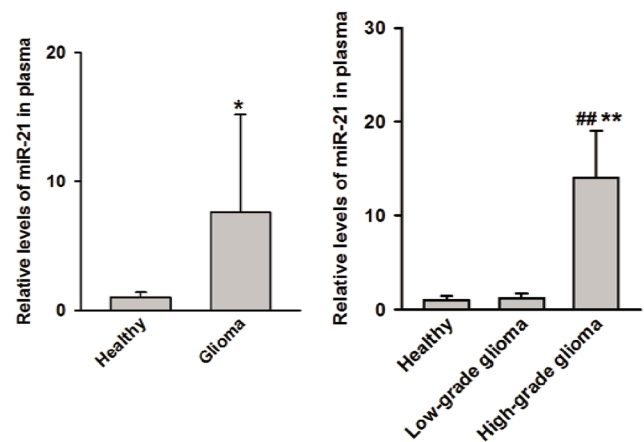


图 2 胶质瘤患者血浆中 miR-21 的水平

Fig.2 The plasma miR-21 levels in patients with glioma

2.3 血浆 miR-21 的诊断价值

用血浆 miR-21 的水平区分健康对照组和胶质瘤组的诊断价值,如图 3。ROC 曲线分析发现血浆 miR-21 水平的 ROC 曲线下面积为 0.841,95 %的可信区间为 0.812-0.924。

3 讨论

胶质瘤发生率、治疗后的复发率和死亡率都很高^[9],目前的诊断主要靠影像学检查^[10],寻求新型的血清诊断标志物具有重要的意义。MiRNA 作为调节基因表达信号通路中最重要的转录后水平调控因子,在众多疾病中的表达异常已引起了重视^[11]。循环血 miRNA 的发现使其在新型诊断标志物的研究领域展开了新的篇章^[12]。目前血浆 miRNA 作为多种疾病诊断标志物的

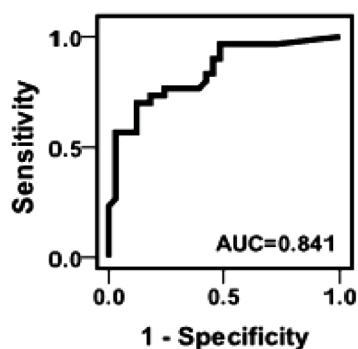


图3 血浆 miR-21 作为胶质瘤诊断的 ROC 分析

Fig.3 ROC analysis of plasma miR-21 for diagnosis of glioma

研究已相继报道,如 miR-141 可作为前列腺癌诊断的标志物等^[13]。MiRNA 在器官、组织和细胞中特殊的表达谱^[14]也为其作为诊断标志物的特异性提供了条件。血浆 miRNA 的性质研究发现,miRNA 在循环系统中以蛋白复合体、微泡等结构结合的形式稳定存在,我们发现纯化的血浆 RNA 通过紫外分光光度计全波长扫描,在 270 nm 处并无明显的核酸吸收峰,而在 270 nm 处有较强吸收峰,进一步说明 miRNA 与蛋白复合体具有较强的结合力,普通的 RNA 纯化方式并不能完全分离 RNA。最近的研究发现血浆 RNA 在强酸/碱、RNA 消化酶等方式处理下仍稳定存在,提示血浆 RNA 是在蛋白复合体/微泡的结合下存在的。MiR-21 是一个与多种肿瘤的发生发展密切相关的 miRNA,在胃癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、食管癌等组织中呈高表达^[15,16]。研究发现 miR-21 通过抑制 PTEN、PDCD4 以及 TPM1 等基因的表达促进肿瘤的发生和发展^[17,18]。随着 miRNA 研究的深入以及科研水平的发展,血浆中 miR-21 的水平也被发现与肿瘤的诊断以及预后密切相关。Lawrie 等发现血浆 miR-21、miR-210 和 miR-155 的水平可作为弥漫性大 B 细胞淋巴瘤诊断标志物,并且 miR-21 的水平与淋巴瘤复发及患者生存率相关^[19]。尽管以 miRNA 为靶点的诊断标志物研究还处在起步阶段,但可以预见的是巨大的潜力价值将在未来的研究和实践中体现。同时,在血液之外的其他体液,如唾液、痰、尿液中,以 miRNA 作为肿瘤标志物的研究也显示了临床应用的潜在价值^[20]。随着更多临床研究的开展,体液 miRNA 作为疾病的诊断和预后标志物的研究将为临床治疗提供更多的潜在应用。

总之,本研究发现胶质瘤患者血浆 miR-21 水平升高,其具有作为胶质瘤诊断的生物标志物的潜能,尚需后续进一步研究。

参考文献(References)

[1] Jones C, Perryman L, Hargrave D. Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012, 9(7): 400-413

[2] Dunn GP, Fecci PE, Curry WT. Cancer immunoediting in malignant glioma[J]. *Neurosurgery*, 2012, 71(2): 201-222

[3] Wu JS, Zhang J, Zhuang DX, et al. Current status of cerebral glioma

surgery in China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(17): 2569-2577

[4] Wang Y, Jiang T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management [J]. *Cancer Lett*, 2013, 331(2): 139-146

[5] Tabatabai G, Hegi M, Stupp R, et al. Clinical implications of molecular neuropathology and biomarkers for malignant glioma [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2012, 12(3): 302-307

[6] Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(5): 358-369

[7] Zhang Y, Dutta A, Abounader R. The role of microRNAs in glioma initiation and progression[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17: 700-712

[8] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(6): 659-666

[9] Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(5): 319-331

[10] Waitz D, Putzer D, Kostron H, et al. Treatment of high-grade glioma with radiolabeled peptides[J]. *Methods*, 2011, 55(3): 223-229

[11] Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(11): 2309-2315

[12] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006

[13] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10513-10518

[14] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 441-450

[15] Yang M, Shen H, Qiu C, et al. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(3): 604-615

[16] Ma X, Choudhury SN, Hua X, et al. Interaction of the oncogenic miR-21 microRNA and the p53 tumor suppressor pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(6): 1216-1223

[17] Xiong B, Cheng Y, Ma L, et al. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(1): 219-228

[18] Hou L, Bowman L, Meighan TG, et al. Induction of miR-21-PDCD4 signaling by tungsten carbide-cobalt nanoparticles in JB6 cells involves ROS-mediated MAPK pathways [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2013, 32(1): 41-51

[19] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(5): 672-675

[20] Roa WH, Kim JO, Razzak R, et al. Sputum microRNA profiling: a novel approach for the early detection of non-small cell lung cancer [J]. *Clin Invest Med*, 2012, 35(5): E271