

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.23.012

黑色素瘤患者血浆 miR-21 表达与临床病理特征的相关性*

李红芬¹ 汤由之² 汤建平² 张智弘¹ 张炜明¹ 李俊³

(江苏省人民医院 1 病理学部;2 整形外科;3 肿瘤科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探讨黑色素瘤患者血浆 miR-21 表达与临床病理特征的相关性。**方法:**2018 年 2 月到 2019 年 5 月选择在本院诊治的黑色素瘤患者 121 例作为黑色素瘤组,另选取同期良性皮肤肿瘤患者 121 例作为良性组。采集患者的空腹静脉血并提取血浆,采用 qRT-PCR 技术检测血浆 miR-21 表达。调查患者的临床病理特征并进行相关性分析。**结果:**黑色素瘤组血浆 miR-21 相对表达水平显著高于良性组($P<0.05$)。在黑色素瘤组中,血浆 miR-21 相对表达水平与患者的年龄、性别、饮酒、肿瘤部位等无相关性($P>0.05$),与临床分期、肿瘤转移、溃疡、吸烟等有显著相关性($P<0.05$)。取 miR-21 诊断黑色素瘤的临界值(4.71),其诊断黑色素瘤的敏感性、特异性、准确性分别为 77.6%、87.0%和 81.7%。logistic 回归模型分析显示吸烟、溃疡、miR-21 表达水平都为影响黑色素瘤发生的重要因素($P<0.05$)。**结论:**miR-21 变化在黑色素瘤中呈现高表达,且与临床特征显著相关性,早期鉴别诊断黑色素瘤的预后效果比较好,同时有助于提高患者的生存率与生活质量。

关键词:黑色素瘤;血浆;miR-21;临床病理特征;相关性

中图分类号:R739.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)23-4455-04

Correlation between Plasma miR-21 Expression and Clinicopathological Characteristics in Patients with Melanoma*

LI Hong-fen¹, TANG You-zhi², TANG Jian-ping², ZHANG Zhi-hong¹, ZHANG Wei-ming¹, LI Jun³

(1 Department of Pathology, 2 Plastic Surgery, 3 Oncology, Jiangsu Provincial People's Hospital, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To explore the correlation between plasma miR-21 expression and clinicopathological characteristics in patients with melanoma. **Methods:** From February 2018 to May 2019, 121 cases of patients with melanoma diagnosed in our hospital were selected as the melanoma group, and 121 cases of patients with benign skin tumors in the same period were selected as the benign group. The fasting venous blood of the patients were collected and plasma were extracted, and the plasma miR-21 expression were detected by qRT-PCR technology. And were to investigate the clinicopathological characteristics of patients and were given correlation analysis. **Results:** The relative expression level of plasma miR-21 in melanoma group were significantly higher than that in benign group ($P<0.05$). In the melanoma group, the relative expression level of plasma miR-21 were not related to the patient's age, sex, drinking, tumor location, etc. ($P>0.05$), and were significantly correlated with clinical stage, tumor metastasis, ulcer, and smoking ($P<0.05$). When selected the critical values (4.71) for miR-21 diagnosis of lung cancer, the sensitivity, specificity, and accuracy of the diagnosis of lung cancer were 77.6%, 87.0%, and 81.7%, respectively. Logistic regression model analysis showed that smoking, ulcers, and miR-21 expression levels were important factors affected melanoma occurrence ($P<0.05$). **Conclusion:** The changes of miR-21 are highly expressed in melanoma and have significant correlation with clinical features. The early differential diagnosis of melanoma have better effect, and it helps to improve the survival rate of patients.

Key words: Melanoma; Plasma; miR-21; Clinicopathological features; Correlation

Chinese Library Classification(CLC): R739.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)23-4455-04

前言

黑色素瘤(Melanoma)为一种好发于皮肤或邻近皮肤粘膜的恶性肿瘤,来源于表皮基底层黑色素细胞^[1]。当前全世界每年黑色素瘤的新发病例约 20 万例,每年死亡约 6 万例患者^[2,3]。该病在早期为皮肤色素痣或色素斑,并无特异性的标志物^[4]。在后期具有恶性程度高、侵袭性高、易转移等特点,特别是当黑色素瘤扩散到皮肤以外的部位时,患者的死亡率可在 50%以上^[5,6]。

手术切除仍然是治疗早期黑色素瘤的主要方法,可显著延长患者的生存时间;但是很多晚期黑色素瘤的患者失去了手术治疗指征,即使手术也很难改善预后^[7]。组织细胞学检查仍是诊断黑色素瘤的金标准,但是有创伤性检查。因此需要一种非侵入性的、特异度、敏感性较高的生物学标志物来用于判断黑色素瘤的形成变化^[8,9]。微小 RNA (microRNA, miRNA)是一类长度为 20-24 个核苷酸的内源性非编码 RNA,可在转录后水平调节一系列肿瘤相关基因的表达,从而影响肿瘤的发生^[10,11]。miRNA

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81702614)

作者简介:李红芬(1964-),女,本科,副主任技师,研究方向:病理学科,电话:13512511229,E-mail:lihongfen1964@163.com

(收稿日期:2020-02-28 接受日期:2020-03-23)

具有在不同组织中具有不同的生物学作用,一个 mRNA 可靶向调控很多不同的相关信息通路,从而发挥调控基因作用^[12]。研究发现 miR-21 可以调节细胞的分化、增殖,在促进机体免疫调节、血管生成和心肌能量代谢等均发挥着重要的作用^[13]。有学者从黑色素瘤组织中鉴别多个异常表达的 miRNA,其中 miR-21 表达水平明显上调,可通过抑制某些抑癌基因促进肿瘤的增殖与转移^[14],但是具体的作用机制还不明确。本文具体探讨了 miR-21 变化与黑色素瘤形成的相关性,旨在提高早期黑色素瘤的诊断水平,降低黑色素瘤的死亡率。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究得到了本院伦理委员会的批准与患者的知情同意,2018 年 2 月到 2019 年 5 月选择在本院诊治的黑色素瘤患者 121 作为黑色素瘤组,纳入标准:无恶性肿瘤家族史;均为未接受过手术治疗等任何治疗的新发初诊病例;临床病理及随访信息齐全;既往无肿瘤相关疾病;经术后病理学检查确诊为黑色素瘤。其中男 78 例,女 43 例;年龄最小 29 岁,最大 78 岁,平均年龄 56.69 ± 2.19 岁;吸烟 76 例,饮酒 45 例;肿瘤部位:四肢与躯干 108 例,头颈 13 例;临床分期:Ⅰ期 60 例,Ⅱ期 40 例,Ⅲ期 21 例;肿瘤转移 34 例,溃疡 42 例。

另选取同期良性皮肤肿瘤患者 121 例作为良性组,其中男 76 例,女 45 例;年龄最小 27 岁,最大 77 岁,平均年龄 56.71 ± 2.44 岁;吸烟 24 例,饮酒 39 例;疾病类型:细胞痣 24 例,瘢痕疙瘩 56 例,脂溢性角化病 20 例,其他 21 例。

表 1 两组 miR-21 相对表达水平对比($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the relative expression levels of miR-21 between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	miR-210
Melanoma group	121	$6.79 \pm 0.22^*$
Benign group	121	1.77 ± 0.31

Note: Compared with the benign group, $*P < 0.05$.

2.2 黑色素瘤特征与 miR-21 表达水平的相关性

在黑色素瘤组中,血浆 miR-21 相对表达水平与患者的年龄、性别、饮酒、肿瘤部位等无相关性($P > 0.05$),与临床分期、肿瘤转移、溃疡、吸烟等有显著相关性($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 诊断价值

取 miR-21 诊断黑色素瘤的临界值(4.71),其诊断黑色素瘤的敏感性、特异性、准确性分别为 77.6%、87.0%和 81.7%。

2.4 影响因素分析

在黑色素瘤发生作为因变量,以吸烟、溃疡、miR-21 表达水平作为自变量,logistic 回归模型分析显示吸烟、溃疡、miR-21 表达水平都为影响黑色素瘤发生的重要因素($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

皮肤癌是当前一个日益严重的问题,黑色素瘤源自于黑色素细胞,为主要的皮肤癌类型,其发病率已经在全球范围内逐渐增加^[15]。该病早期患者症状较轻,一般难以确诊,但是疾病进展快且容易复发,晚期患者的死亡率比较高^[16,17]。因此研究清楚

1.2 标本采集

采用 EDTA 抗凝管采集患者的空腹静脉血 2-3 mL,1 h 内 2000 rpm 离心 10 min,提取上层血浆 600 μ L,用无 RNA 酶的 EP 管进行分装,长期冻存于 -70℃ 超低温冰箱。

1.3 miR-21 检测

按照美国 Ambion 公司的 AM1556 的 RNA 提取试剂盒提取血浆的总 RNA,采用 qRT-PCR 技术 (7500 Fast Real-time PCR 仪,美国 ABI 公司)检测血浆中 miR-21 表达水平,以 U2 为内参。miRNA 表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。反应条件为 95℃ 10 min, (95℃ 15 s, 60℃ 1 min) $\times$ 40 个循环,并设置 3 个平行复孔及阴性对照。

1.4 调查资料

调查所有患者的性别、年龄、疾病类型、吸烟、饮酒等,记录黑色素瘤组患者的临床分期、病理特征、肿瘤转移、溃疡等。

1.5 统计方法

应用 SPSS 20.00,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,计数数据以%表示,对比为 t 检验与卡方分析,ROC 曲线分析计算诊断效果,通过建立 logistic 回归模型分析黑色素瘤患病的影响因素,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 miR-21 表达水平对比

黑色素瘤组的血浆 miR-21 相对表达水平显著高于良性组($P < 0.05$)。见表 1。

黑色素瘤的发生和发展机制对于提高患者的生存率与改善预后具有重要价值。

已有研究显示黑色素瘤的病理发生是一系列遗传事件的累积,包括 DNA 修复、miRNA 异常表达、组蛋白修饰等^[18]。miRNA 是一类高度保守、长度很短的非编码调控单链 RNA,可在转录后水平通过抑制靶基因 mRNA 翻译或诱导靶基因 mRNA 降解来调控靶基因的表达^[19]。研究证明 miRNA 可参与生命过程中一系列重要的进程,包括早期胚胎发育、肿瘤发生发展和侵袭转移、细胞增殖、凋亡、死亡、脂肪代谢等^[20,21]。发现 miRNA 可作为结肠癌、白血病、胃癌的诊断和预后靶标,特别是血浆中存在大量 miRNA,并且其表达谱在黑色素瘤患者和正常人中不同,可作为诊断包括黑色素瘤在内的多种疾病的标志物^[22]。miRNA 可通过多种途径调控肿瘤的发生和发展^[23]。本研究显示黑色素瘤组的血浆 miR-21 相对表达水平显著高于良性组,表明黑色素瘤患者多表现为血浆 miR-21 的高表达。Abdulhussain MM^[24]等人 and Anwar SL 等人^[25]的研究也本研究有一定的类似,说明高水平血浆 miRNA-197-3p 和 miRNA-361-3p

表 2 黑色素瘤特征与 miR-21 表达水平的相关性(n=121)

Table 2 Correlation between melanoma characteristics and miR-21 expression levels (n=121)

Clinical features	n	miR-210	t	P
Sex-Male	78	6.81±0.21	0.089	0.943
Female	43	6.75±0.31		
Age-≥60 years old	70	6.82±0.33	0.144	0.878
<60 years old	51	6.72±0.44		
Smoking-yes	76	10.37±1.48	10.242	0.000
No	45	4.58±0.33		
Drinking-yes	45	6.82±0.44	0.214	0.833
No	76	6.73±0.51		
Tumor site-limbs and trunk	108	6.80±0.58	0.072	0.954
Neck	13	6.79±0.32		
Clinical stage I + II	100	5.72±1.22	8.193	0.004
III	21	8.92±1.39		
Tumor metastasis-yes	34	11.38±2.47	13.022	0.000
No	87	4.09±1.74		
Ulcer-yes	42	12.76±3.13	13.076	0.000
No	79	4.77±1.22		

表 3 影响黑色素瘤发生的因素分析(n=121)

Table 3 Analysis of factors affecting the occurrence of melanoma (n=121)

Variable	β	Wald	P	OR	95% CI
Smoking	0.914	6.093	0.014	2.714	1.294-5.187
Ulcer	0.908	7.090	0.008	2.166	1.572-4.872
miR-21	0.117	4.292	0.034	1.822	1.002-1.762

可以作为诊断黑色素瘤的新型标志物,miR-210 在黑色素瘤患者中表达水平高于正常对照,且与不良预后、肿瘤转移、黑色素瘤分期有关,肿瘤转移阳性的黑色素瘤患者血浆中 miR-210 表达水平高于肿瘤转移阴性者。但是国内外的临床上还缺乏黑色素瘤与血浆 miR-21 相对表达水平的相关性研究以及作用机制探究。

本研究也显示在黑色素瘤组中,血浆 miR-21 相对表达水平与患者的年龄、性别、饮酒、病理特征等无相关性,与临床分期、肿瘤转移、溃疡、吸烟等有显著相关性,与 Lei H 等人^[26]和 Mu Z 等人^[27]的类似,通过探究恶性黑色素瘤细胞 miR-21 与 PTPN 关系及其对迁移和侵袭影响,结果显示 miR-21 下调可以促进靶分子 PTPN 的表达,阻滞恶性黑色素瘤细胞的细胞增殖、侵袭及迁移,均提示 miR-21 在恶性黑色素瘤的发生发展以及预后中发挥着重要的作用。

当前有一半以上的患者在诊断时黑色素瘤已进展到晚期,使得术后 5 年生存率在 30 % 以下,因此早期发现、早期诊断可以明显降低黑色素瘤的死亡率^[28,29]。miRNA 的结构较为简单且稳定,而检测和分析的技术进步使血浆 miRNA 可称为各种疾病中有价值的生物标记物。当前也有研究报道了血清中 miR-125 和 miR-574 可用作早期黑色素瘤的诊断标志物,其敏

感和特异度分别达到 78.2 % 和 96.6 %^[30]。本研究显示 miR-21 诊断黑色素瘤的敏感性、特异性、准确性等都在 75.0 % 以上; logistic 回归模型分析显示吸烟、溃疡、miR-21 表达水平都为影响黑色素瘤发生的重要因素。吸烟是黑色素瘤发生发展的重要因素,香烟烟雾可以导致皮肤组织中 miRNAs 表达异常,从而导致影响细胞周期,可诱发黑色素瘤的发生^[31]。而 miR-21 可在在乏氧的条件下调节乏氧微环境下肿瘤细胞线粒体的呼吸功能,促进肿瘤细胞的生长,从而影响肿瘤的转移、侵袭^[32]。

总之,miR-21 变化在黑色素瘤中呈现高表达,且与临床特征呈显著相关性,早期鉴别诊断黑色素瘤的预后效果比较好,同时有助于提高患者的生存率。不过本研究也有一定的不足,miR-21 对于黑色素瘤的调控可能是多靶点和多方向的,但研究样本数量较少,将在后续研究中深入分析。

参 考 文 献 (References)

- [1] Alexandru N, Constantin A, Nemezc M, et al. Hypertension Associated With Hyperlipidemia Induced Different MicroRNA Expression Profiles in Plasma, Platelets, and Platelet-Derived Microvesicles; Effects of Endothelial Progenitor Cell Therapy [J]. Front Med (Lausanne), 2019, 6(12): e280
- [2] Bian Y, Yang L, Zhang B, et al. LincRNA Cox-2 Regulates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response of Human

- Peritoneal Mesothelial Cells via Modulating miR-21/NF-kappaB Axis [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019(13): 8626703
- [3] Chen L, Zhan CZ, Wang T, et al. Curcumin Inhibits the Proliferation, Migration, Invasion, and Apoptosis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell Line by Regulating MiR-21/VHL Axis [J]. *Yonsei Med J*, 2020, 61(1): 20-29
- [4] He C, Chen S, Zhao J, et al. Ultrasensitive detection of microRNA-21 based on electrophoresis assisted cascade chemiluminescence signal amplification for the identification of cancer cells [J]. *Talanta*, 2020, 209(12): e120505
- [5] Chang M, Yan P, Zhang B, et al. MicroRNA-769-5p Promotes The Growth Of Glioma Cells By Targeting Lysine Methyltransferase 2A [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12(15): 9177-9187
- [6] You C, Jin L, Xu Q, et al. Expression of miR-21 and miR-138 in colon cancer and its effect on cell proliferation and prognosis[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2): 2271-2277
- [7] Zhang N, Hu Z, Qiang Y, et al. Circulating miR-130b- and miR-21-based diagnostic markers and therapeutic targets for hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(12): e1012
- [8] Sheng J, Liang WD, Xun CH, et al. Downregulation of miR-21 promotes tibial fracture healing in rabbits through activating ERK pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(23): 10204-10210
- [9] Chen Y, Zhao H, Li H, et al. LINC01234/MicroRNA-31-5p/MAGEA3 Axis Mediates the Proliferation and Chemoresistance of Hepatocellular Carcinoma Cells[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 19(13): 168-178
- [10] Fander J, Kielstein H, Buttner M, et al. Characterizing CD44 regulatory microRNAs as putative therapeutic agents in human melanoma[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(60): 6509-6525
- [11] Li H, Song JB, Chen HX, et al. MiR-155 inhibits proliferation, invasion and migration of melanoma via targeting CBL [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(21): 9525-9534
- [12] Sabat N, Migianu-Griffoni E, Tudela T, et al. Synthesis and antitumor activities investigation of a C-nucleoside analogue of ribavirin[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 188(18): e12009
- [13] Shen C, Hua H, Gu L, et al. miR-124 Functions As A Melanoma Tumor Suppressor By Targeting RACK1 [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12(9): 9975-9986
- [14] Wu S, Chen H, Han N, et al. Long Noncoding RNA PVT1 Silencing Prevents the Development of Uveal Melanoma by Impairing MicroRNA-17-3p-Dependent MDM2 Upregulation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(14): 4904-4914
- [15] Yang Y, Xu W, Zheng Z, et al. LINC00459 sponging miR-218 to elevate DKK3 inhibits proliferation and invasion in melanoma[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): e19139
- [16] Yu Y, Xiang N, Lin M, et al. miR-26a Sensitizes Melanoma Cells To Dabrafenib Via Targeting HMGB1-Dependent Autophagy Pathways [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13(12): 3717-3726
- [17] Zou Y, Wang SS, Wang J, et al. CircRNA_0016418 expedites the progression of human skin melanoma via miR-625/YY1 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24): 10918-10930
- [18] Huang Q, Zhang X, Bai F, et al. Corrigendum to "Methyl helicertate ameliorates liver fibrosis by regulating miR-21-mediated ERK and TGF-beta1/Smads pathways"[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 79(8): e106117
- [19] Jimenez-Alesanco A, Marcuello M, Pastor-Jimenez M, et al. Acute pancreatitis promotes the generation of two different exosome populations[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): e19887
- [20] Mitchell KA, Nichols N, Tang W, et al. Recurrent PTPRT/JAK2 mutations in lung adenocarcinoma among African Americans [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): e5735
- [21] Ryu KJ, Lee JY, Park C, et al. Isolation of Small Extracellular Vesicles From Human Serum Using a Combination of Ultracentrifugation With Polymer-Based Precipitation [J]. *Ann Lab Med*, 2020, 40(3): 253-258
- [22] Sabahi A, Salahandish R, Ghaffarinejad A, et al. Electrochemical nano-genosensor for highly sensitive detection of miR-21 biomarker based on SWCNT-grafted dendritic Au nanostructure for early detection of prostate cancer[J]. *Talanta*, 2020, 209(2): e120595
- [23] Abdollahi A, Rahmati S, Ghaderi B, et al. A combined panel of circulating microRNA as a diagnostic tool for detection of the non-small cell lung cancer[J]. *Qjm*, 2019, 112(10): 779-785
- [24] Abdulhussain MM, Hasan NA, Hussain AG. Interrelation of the Circulating and Tissue MicroRNA-21 with Tissue PDCD4 Expression and the Invasiveness of Iraqi Female Breast Tumors [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2019, 34(1): 26-38
- [25] Anwar SL, Sari D NI, Kartika AI, et al. Upregulation of Circulating MiR-21 Expression as a Potential Biomarker for Therapeutic Monitoring and Clinical Outcome in Breast Cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(4): 1223-1228
- [26] Lei H, Chen J, Dai GE. Regulatory relationship between miR-21 and PTPN14 and its impact on migration and invasion of malignant melanoma [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2019, 26(5): 301-305
- [27] Mu Z, Sun Q. Cantharidin inhibits melanoma cell proliferation via the miR-21-mediated PTEN pathway [J]. *Molecular medicine reports*, 2018, 18(5): 4603-4610
- [28] Galuppini F, Fassan M, Bertazza L, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) as a novel prognostic marker for papillary thyroid carcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(12): 7845-7855
- [29] Kumagai-Togashi A, Uozaki H, Kikuchi Y, et al. Tumorous CD10 Is More Strongly Related to the Progression of Urothelial Carcinoma than Stromal CD10[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(2): 635-640
- [30] Lyu K, Xu Y, Yue H, et al. Long Noncoding RNA GAS5 Acts As A Tumor Suppressor In Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Via miR-21[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(9): 8487-8498
- [31] Nasser MZ, Zayed NA, Mohamed AM, et al. Circulating microRNAs (miR-21, miR-223, miR-885-5p) along the clinical spectrum of HCV-related chronic liver disease in Egyptian patients [J]. *Arab J Gastroenterol*, 2019, 20(4): 198-204
- [32] Pan L, Chen H, Bai Y, et al. Long non-coding RNA CASC2 serves as a ceRNA of microRNA-21 to promote PDCD4 expression in oral squamous cell carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12(5): 3377-3385