

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.005

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.005>

循环 microRNA-95 在前列腺癌早期精准诊断和预后判断中的作用

肖春玲¹, 朱进², 王苏贵¹

(徐州医科大学附属淮安医院泌尿外科, 江苏 淮安 223002; 2. 苏州大学附属第二医院泌尿外科, 江苏 苏州 215004)

[摘要] 目的: 探讨循环microRNA(以下简称miR-95)在前列腺癌早期精准诊断和预后判断中的作用。方法: 通过qPCR检测60例前列腺癌患者、60例前列腺增生患者及60例健康男性血清miR-95的相对表达水平, 分析血清miR-95的相对表达水平与临床病理特征的关系, 并构建受试者工作特征(receiver operating characters, ROC)曲线, 分析血清miR-95对于前列腺癌诊断的敏感度和特异度。结果: 前列腺癌患者血清miR-95的表达水平较前列腺增生及健康男性增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而前列腺增生患者血清miR-95的表达水平和健康男性中的表达无明显统计学差异($P > 0.05$)。血清miR-95表达水平与前列腺癌临床病理分期、Gleason评分及骨转移显著相关($P < 0.05$); 与年龄、前列腺特异性抗原水平无关($P > 0.05$)。ROC曲线显示miR-95能够较好的区分前列腺癌与前列腺增生及健康男性, 曲线下面积分别为0.826(95%CI: 0.792~0.918)和0.808(95%CI: 0.745~0.919)。结论: miR-95在前列腺癌患者血清中高表达, 与前列腺癌进展有关, 有望作前列腺癌早期精准诊断和预后的标志物。

[关键词] miR-95; 血清; 前列腺癌

Role of circulating microRNA-95 in early accurate diagnosis and prognosis of prostate cancer

XIAO Chunling¹, ZHU Jin², WANG Sugui¹

(1. Department of Urology, Huai'an Hospital Affiliated of Xuzhou Medical College, Huai'an Jiangsu 223002;

2. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou Jiangsu 215004, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of circulating microRNA-95 in early accurate diagnosis and prognosis of prostate cancer. **Methods:** qPCR was used to detect the relative expression level of serum microRNA-95 in 60 patients with prostate cancer, 60 patients with benign prostatic hyperplasia and 60 healthy men. The relationship between the relative expression level of serum microRNA-95 and clinicopathological characteristics was analyzed. The ROC curve was constructed to analyze the sensitivity and specificity of serum microRNA-95 in the diagnosis of prostate cancer. **Results:** The expression level of serum microRNA-95 in prostate cancer patients

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-29

通信作者 (Corresponding author): 王苏贵, Email: wangsugui107@163.com

基金项目 (Foundation item): 江苏省“六大人才高峰”项目 (2019-WSW-218); 淮安市自然科学基金 (HAB201730); 徐州医科大学附属淮安医院科研基金 (YK201506)。This work was supported by the Six Talents Peak Programs in Jiangsu Province (2019-WSW-218), Natural Science Foundation of Huai'an (HAB201730) and Scientific Research Project of Huaian Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University (YK201506), China.

was higher than that in benign prostatic hyperplasia and healthy men ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the expression level of serum microRNA-95 between benign prostatic hyperplasia patients and healthy men ($P > 0.05$). Serum level of microRNA-95 was significantly correlated with clinical pathological stage, Gleason score and bone metastasis of prostate cancer ($P < 0.05$), but not with age and prostate specific antigen ($P > 0.05$). ROC curve showed that microRNA-95 could differentiate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and healthy males. The area under the curve was 0.826 (95% CI: 0.792–0.918) and 0.808 (95% CI: 0.745–0.919), respectively. **Conclusion:** The high expression of microRNA-95 in the serum of prostate cancer patients is related to the progression of prostate cancer, and it is expected to be a marker of early accurate diagnosis and prognosis of prostate cancer.

Keywords microRNA-95; serum; prostate cancer

前列腺癌是泌尿男生殖系统肿瘤中最常见的恶性肿瘤之一, 其在欧美男性恶性肿瘤中位居第一位, 在我国其发病率也呈逐年增加的趋势^[1]。血清前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)作为重要的判断指标, 其在临床上前列腺癌的筛查、诊断及预后判断中起重要作用, 但是血清PSA易受多种因素所干扰, 导致其存在一定的局限性^[2]。MicroRNA(miR)是一类高度保守的内源性小分子非编码单链RNA, 参与几乎所有的生命进程^[3]。前期已有研究^[4]表明: miRNA的异常表达在前列腺癌的发生、发展中起重要作用, 被认为是前列腺癌诊断和预后的重要生物标志物。miR-95在结肠癌、子宫内膜癌等多种肿瘤中高表达^[5-6], 但其与前列腺癌的关系尚未见报道。本研究通过检测前列腺癌患者血清miR-95的表达变化水平, 并探讨其临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2016年7月至2018年6月就诊于徐州医科大学附属淮安医院泌尿外科的60例前列腺癌患者, 设为前列腺癌组, 年龄62~82(69.3±4.8)岁; 同时选择60例前列腺增生患者, 设为前列腺增生组, 年龄65~85(70.1±4.2)岁; 选取60例健康体检男性, 设为对照组, 年龄58~79(69.8±6.2)岁。3组年龄等一般资料差异无统计学意义($P > 0.05$)。所有患者术前未进行任何治疗, 排除可能影响miRNA表达的如伴有其他恶性肿瘤、糖尿病等慢性病患者。前列腺癌的病理分级依据2003年WHO前列腺癌病理组织学分类标准Gleason评分, 肿瘤分期按美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)的TNM系统。本研究对象已签署相关知情同意

书, 并通过徐州医科大学附属淮安医院医学伦理委员会批准。

1.2 血清miR-95检查方法

1.2.1 总RNA的提取

取250 μ L血清加入1.5 mL EP管中, 在EP管中加入1 000 μ L TRIzol充分混匀, 冰上静置10 min, 使其裂解。加入氯仿200 μ L, 然后剧烈震荡约20 s, 冰上静置10 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心15 min, 取上层水相RNA上清液至新的1.5 mL EP管中, 加入等体积的异丙醇充分混匀, 冰上静置10 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心10 min, 离心后即可看到RNA沉于管底。加入75%乙醇1 mL洗涤RNA, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心5 min, 弃尽上清。室温晾干5 min, 即得到实验所需的总RNA。加入DEPC水50 μ L溶解RNA。使用NanoDrop[®]ND-2000测定RNA的浓度和纯度。

1.2.2 Real-time PCR检测

将提取的总RNA, 应用反转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司)将RNA反转录成cDNA, 反应条件42 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。miR-95及其内参U6茎环引物序列由广州锐博生物科技有限公司设计并合成(专利号ZL201010183196.4)。qPCR反应体系及条件参照SYBR Premix Ex Taq[™] qPCR试剂盒说明, 反应条件95 $^{\circ}$ C 5 s 40个循环, 60 $^{\circ}$ C 34 s。使用U6作为内参, 在7500 Real Time PCR仪(美国ABI公司)上进行测试, 以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示miR-95的相对表达水平, $\Delta Ct = Ct_{miR-95} - Ct_{U6}$ 。

1.3 统计学处理

使用SPSS 17.0软件进行数据分析。各组计量资料均服从正态分布, 结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清miR-95的相对表达水平

3组血清miR-95的相对表达量详见图1, 其中前列腺癌组miR-95相对表达水平(16.78 ± 3.23)较前列腺增生组(5.98 ± 3.92)和对照组(5.82 ± 4.52)增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。而前列腺增生组和对

照组相比差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 血清miR-95与前列腺癌临床病理特征的关系

血清miR-95的表达水平与前列腺癌临床病理关系详见表1, 血清miR-95表达水平与前列腺癌临床病理分期、Gleason评分及骨转移相关($P < 0.05$), 与年龄、前列腺特异性抗原水平无关($P > 0.05$)。

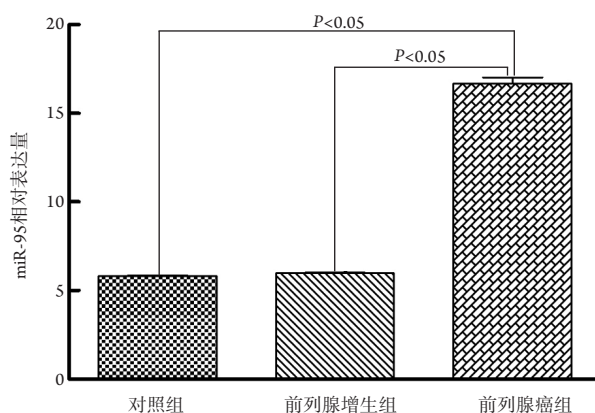


图1 miR-95在前列腺癌、前列腺增生及对照正常男性患者中的相对表达

Figure 1 Relative expression of microRNA-95 in prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and normal male controls

表1 血清miRNA-95的表达与前列腺癌患者临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between the expression of serum microRNA95 and clinicopathological characteristics of prostate cancer patients

| 临床病理参数 | n | 血清miR-95相对表达 | 统计值 | P |
|------------------------------|----|--------------|-------|-------|
| 年龄/岁 | | | 0.657 | >0.05 |
| ≤70 | 22 | 16.08 ± 2.82 | | |
| >70 | 38 | 17.58 ± 3.13 | | |
| 临床病理分期 | | | 3.463 | <0.05 |
| T1~T2 | 18 | 13.96 ± 3.61 | | |
| T3~T4 | 42 | 19.88 ± 2.24 | | |
| Gleason评分 | | | 2.748 | <0.05 |
| ≤7 | 15 | 14.19 ± 3.14 | | |
| >7 | 45 | 18.98 ± 2.69 | | |
| 骨转移 | | | 4.553 | <0.05 |
| 有 | 12 | 20.18 ± 1.83 | | |
| 无 | 48 | 14.71 ± 3.27 | | |
| 血清PSA/(ng·mL ⁻¹) | | | 0.416 | >0.05 |
| ≤10 | 15 | 16.18 ± 4.26 | | |
| >10 | 45 | 18.18 ± 3.17 | | |

2.3 ROC曲线分析血清miR-95对前列腺癌的诊断效率

由图2可知miR-95可以较好地地区分前列腺癌与前列腺增生或健康对照, ROC曲线显示miR-95区分前列腺癌和前列腺增生的曲线下面积为0.826(95%CI: 0.792~0.918), 取5.025为前列腺癌

的诊断临界值, 敏感性和特异性分别为81.8%和83.7%(图2A); miR-95区分前列腺癌和健康对照的曲线下面积为0.808(95%CI: 0.745~0.919), 取8.457为前列腺癌的诊断临界值, 敏感度和特异度分别为80.2%和78.7%(图2B)。

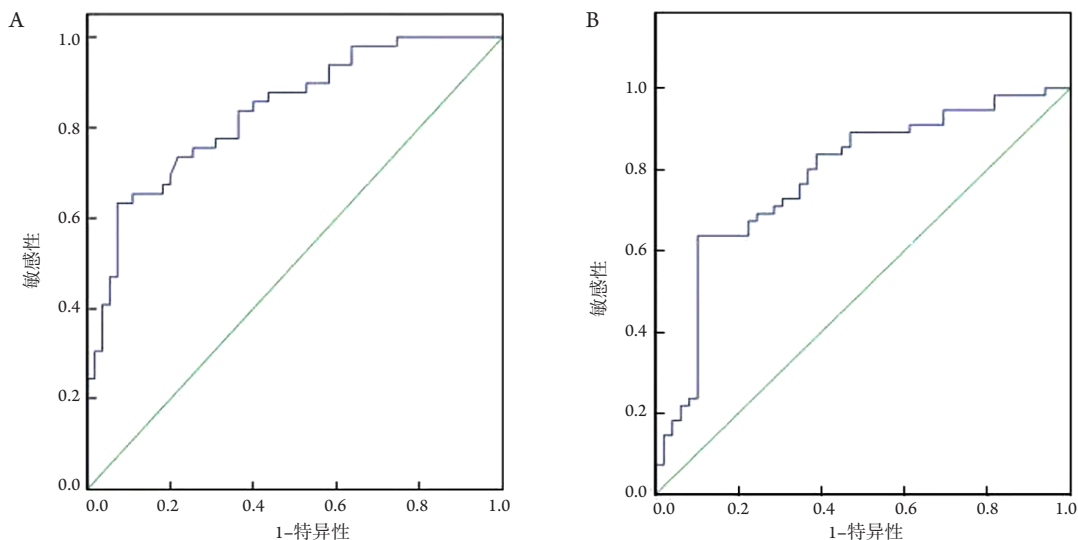


图2 ROC曲线分析miR-95区分前列腺癌、前列腺增生或健康对照的诊断价值

Figure 2 ROC curve analysis of the diagnostic value of miR-95 in differentiating prostate cancer from benign prostatic hyperplasia or healthy controls

(A) 前列腺癌与前列腺增生的ROC曲线分析; (B) 前列腺癌与健康对照的ROC曲线分析。

(A) ROC curve analysis of prostate cancer and prostatic hyperplasia; (B) ROC curve analysis of prostate cancer and health control.

3 讨论

在我国前列腺癌发病率呈逐年增加趋势, 绝大多数患者在确诊前列腺癌时往往已是中晚期, 使患者失去了根治性手术的机会, 使得患者预后较差^[1], 因此迫切需要寻找合适的方法以提高早期前列腺癌的检出率。血清PSA作为重要的判断指标, 其在临床上前列腺癌的筛查、诊断及预后判断中起重要作用。但是由于血清PSA易受导尿、前列腺按摩、膀胱镜检查、炎症等多种因素所影响, 导致其存在着一定的局限性。

随着近些年miRNA的发现及其研究机制的不断深入, 其研究成果不断拓宽了对癌症发生、发展机制的认识。在前列腺癌组织中, miRNA的异常表达与前列腺癌的发生、发展有关: miR-221, miR-222, miR-125b及miR-21等在前列腺癌组织或细胞中呈高表达^[7-9], 而miR-164a, miR-34a等在前列腺癌组织或细胞中低表达^[10-11]。由于miRNA能稳定存在于人体外周血中, 且具有较高的肿瘤相

关性^[12], 使其已成为肿瘤监测中潜在的生物学标志物^[13]。

目前关于miR-95的报道相对较少, 其在前列腺癌中组织与血清中尚未见相关研究报道。在结肠癌中, miR-95通过高表达来促进结肠癌细胞系SW620的侵袭和迁移^[6], miR-95在子宫内膜癌中高表达, 其与子宫内膜癌的临床分期、淋巴结转移、肌层浸润深度有关^[5]。miR-95在乳腺癌中高表达, 其与乳腺癌临床分期有关^[14]。本研究通过荧光定量PCR检测对照组、前列腺增生组及前列腺癌组共180例患者血清中miR-95的相对表达, 结果显示: miR-95在前列腺癌患者血清中的表达明显高于前列腺增生患者及健康对照组, 而miR-95在前列腺增生患者血清中的表达与健康对照物明显差异。miR-95可以良好的区分前列腺癌与前列腺增生(或健康对照), AUC分别为0.826和0.808。同时, 本研究还发现血清miR-95表达水平随着患者临床分期的增加, 其相对表达水平也逐渐增加; 与Gleason评分也密切相关, 评分>7的患者, 血清miR-95表达水平也随之

增加;同时,存在骨转移的患者,其血清miR-95表达水平也较未转移者高。本研究表明:miR-95可能参与了前列腺癌细胞的发生、发展、增殖及远处转移。本研究发现miR-95是前列腺癌中一种新的miRNA,其可以作为前列腺癌发生、发展、预后评估的监测指标和潜在的治疗靶点。通过检测血清中miR-95的相对表达水平,有助于前列腺癌的早期诊断和预后判断。

综上所述,在前列腺癌患者中的血清中,可检测到高表达的miR-95,其与前列腺癌进展有关,有望作前列腺癌早期精准诊断和预后的标志物。由于本研究样本量偏少,未来还需要进一步扩大样本量及扩展研究中心来进一步证实。

参考文献

1. 叶定伟,朱耀.中国前列腺癌的流行病学概述和启示[J].中华外科杂志,2015,53(4):249-252.
YE Dingwei, ZHU Yao. Epidemiological overview and Enlightenment of prostate cancer in China[J]. Chinese Journal of Surgery, 2015, 53(4): 249-252.
2. 李树平,贺凯,阳大庆,等.尿肌氨酸与血清PSA在前列腺癌早期诊断中的意义[J].中国男科学杂志,2017,31(2):33-35.
LI Shuping, HE Kai, YANG Daqing et al. Significance of urinary sarcosine and serum PSA in the early diagnosis of prostate cancer[J]. Chinese Journal of Andrology, 2017, 31(2): 33-35.
3. 王苏贵,吴自余,李强,等.微小RNA活性分析法筛选前列腺癌去势抵抗转化相关微小RNA的实验研究[J].中华解剖与临床杂志,2018,23(6):538-542.
WANG Sugui, WU Ziyu, LI Qiang, et al. Experimental study on screening microRNAs related to castration resistance and transformation of prostate cancer by microRNA activity analysis[J]. Chinese Journal of Anatomy and Clinical, 2018, 23(6): 538-542.
4. 丁翔,崔凤梅,侯健全,等.前列腺癌患者血清微小RNA表达谱的初步研究[J].中华泌尿外科杂志,2015,36(3):225-228.
DING Xiang, CUI Fengmei, HOU Jianquan, et al. Preliminary study of serum microRNA expression profile in patients with prostate cancer[J]. Chinese Journal of Urology, 2015, 36(3): 225-228.
5. 雷娜,刘贝贝,董枫,等.子宫内腺癌患者组织miR-95表达与临床病理特征及预后的关系[J].中国老年医学杂志,2017,37(12):2974-2975.
LEI Na, LIU Beibei, DONG Feng, et al. The relationship between the expression of microRNA-95 and clinicopathological features and prognosis in endometrial cancer[J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2017, 37(12): 2974-2975.
6. 王超超,向征,杜昆利,等.miR-95对结肠癌细胞系SW620侵袭和迁移的影响及机制[J].基础医学与临床,2015,35(12):1633-1639.
WANG Chaochao, XIANG Zheng, DU Kunli, et al. The effect and mechanism of microRNA-95 on invasion and migration of colon cancer cell line SW620[J]. Basic Medicine and Clinic, 2015, 35(12): 1633-1639.
7. Shi XB, Xue L, Yang J, et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(50): 19983-19988.
8. Li T, Li D, Sha J, Sun P, et al. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 383(3): 280-285.
9. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1[J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23716-23724.
10. Xu B, Wang N, Wang X, et al. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer[J]. Prostate, 2012, 72(11): 1171-1178.
11. Fujita Y, Kojima K, Hamada N, et al. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC-3 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(1): 114-119.
12. Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 60.
13. Heegaard NH, Schetter AJ, Welsh JA, et al. Circulating microRNA expression profiles in early stage non-small cell lung cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 130(6): 1378-1386.
14. 刘雅恬,何侠.miR-95在乳腺癌中的表达及其临床意义[J].江苏医药,2012,38(20):2448-2449.
LIU Yatian, HE Xia. The expression of microRNA-95 in breast cancer and its clinical significance[J]. Jiangsu Medical Journal, 2012, 38 (20): 2448-2449.

本文引用:肖春玲,朱进,王苏贵.循环microRNA-95在前列腺癌早期精准诊断和预后判断中的作用[J].临床与病理杂志,2019,39(12):2669-2673. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.005
Cite this article as: XIAO Chunling, ZHU Jin, WANG Sugui. Role of circulating microRNA-95 in early accurate diagnosis and prognosis of prostate cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(12): 2669-2673. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.005