

血清 microRNA 在妇科恶性肿瘤临床诊断及预后评价中的研究进展

何少仪 孙小丽 罗喜平

【摘要】 微小 RNA(miRNA)是一类在人体内广泛分布的内源性非编码 RNA,主要在转录后水平对靶基因的表达起调节作用,并在肿瘤的发生、发展中具有癌基因或抑癌基因功能。血清中 miRNA 表达水平与组织中表达水平相一致,因此可通过检测血清中 miRNA 水平来诊断疾病和评估病情。本文主要讨论血清 miRNA 在妇科恶性肿瘤早期诊断和预后评估中的临床应用,并对其研究进展进行综述。

【关键词】 微 RNAs; 卵巢肿瘤; 子宫内膜肿瘤; 宫颈肿瘤; 临床应用

Research progress of serum microRNA in gynecologic malignant tumor clinical application He Shaoyi, Sun Xiaoli, Luo Xiping. Department of Obstetrics and Gynecology, Guangdong Maternal and Child Health Care Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China
Corresponding author: Luo Xiping, Email: luoxiping07@aliyun.com

【Abstract】 MicroRNA(miRNA) is a class of endogenous non-coding RNA, which wide distribution in human body and primarily regulates the expression of target gene in the post-transcriptional level, and it has the function of oncogenes or tumor suppressor genes in the development of tumors. Expression level of serum miRNA is consistent with expression level in tissues, so we may diagnose the disease and assess pathogenetic condition by detect miRNA expression level in serum. This paper reviews the research progress of serum miRNA in clinical application for early diagnosis and assess prognosis of gynecological malignancies.

【Key words】 MicroRNAs; Ovarian neoplasms; Endometrial neoplasms; Uterine cervical neoplasms; Clinical application

* Project No. S2013010013951, supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province; Project No. 201510010177, supported by Project of Guangzhou Science Technology and Information Bureau

女性最常见生殖系统恶性肿瘤包括卵巢癌、宫颈癌和子宫内膜癌。目前临床主要通过典型症状,妇科检查,影像学检查(超声、CT、MRI)及血清学肿瘤标志物,包括鳞状细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen, SCCA),甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP),人附睾蛋白(human epididymis protein, HE)4, CA₁₂₅等检查进行女性生殖系统恶性肿瘤诊断。但上述检验或检查的敏感度及特异度均较低,使多数患者错过早期诊断及治疗时机,因此有必要寻找敏感度和特异度更高的肿瘤标志物,用于对癌症的早期诊断。微小 RNA(miRNA)最早于1993年被发现^[1],早期临床对 miRNA 的研究集中于细胞、组织中,直至2008年,发现其同样稳定存在于体液,如血清、唾液、尿液等^[2-4],对真核细胞的基因表达、细胞发育分化和个体发育等多方面起调控作用。血清 miRNA 参与生命活动的病理生理过程,在不同疾病及其不同阶段,血清 miRNA 表达谱

存在明显差异性,其中一些血清 miRNA 可作为相关疾病早期诊断、病情进展和预后评估的新型无创性生物标志物。正是因为研究发现某些血清 miRNA 对妇科恶性肿瘤的早期诊断和预后评估具有重要作用后,才使得血清 miRNA 的研究成为妇科肿瘤研究的热点之一。

1 血清 miRNA 概述

miRNA 是一类在人体内广泛分布的内源性非编码 RNA,在转录后水平对靶基因的表达起调节作用,其功能不仅包括调节细胞代谢、增殖、分化及凋亡等正常生理过程,还在肿瘤发生、发展中起重要调节作用^[5]。多项研究表明,血清中 miRNA 表达水平与组织中表达水平相一致,这使通过检测血清 miRNA 水平,用于诊断疾病和评估病情成为可能^[6-7]。研究结果表明,相对于临床常规血清学肿瘤标志物,血清 miRNA 具有以下独特优势。①稳定性好:研究表明,在不同温度、pH 值和反复冻融下,血清 miRNA 含量变化不大,而且与性别和个体差异无明显相关性^[8];②有组织特异性^[9];③检测方法简便:目前最常用反转录实时荧光定量聚合酶链反应(reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)进行血清 miRNA 检测,具有快捷、敏感度高及特异性强等特

DOI:10. 3877/cma. j. issn. 1673-5250. 2015. 06. 023

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(S201301001951);广州市科技和信息化局课题(201510010177)

作者单位:510010 广州医科大学附属广东省妇幼保健院妇科

通信作者:罗喜平, Email: luoxiping07@aliyun.com

点;④血清 miRNA 检测的敏感度高于常规检测指标;在疾病早期,患者血清 miRNA 表达异常早于临床常规血清学肿瘤标志物^[10]。

2 血清 miRNA 与卵巢癌

若国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)临床分期为 I 期和 II 期卵巢癌得到及时诊断及治疗,则可使患者的 5 年生存率达到 90%,但多数卵巢癌因早期无明显症状,导致患者就诊时已为 III 期或 IV 期,而致使患者的 5 年生存率 <30%。Moore 等^[11]研究发现,当特异度为 95% 时,血清肿瘤标志物 HE4 和 CA₁₂₅ 在诊断 I 期卵巢癌患者中的敏感度分别为 72.9% 和 43.3%;同时对于卵巢良性疾病,如卵巢子宫内膜异位症、浆液性卵巢肿瘤等,其 HE4 和 CA₁₂₅ 表达水平也会升高。因此该指标不能很好区分卵巢疾病的良性与恶性。血清 miRNA 在卵巢癌的诊断、预后评估方面却具有较独特优势^[12-18]。

2.1 血清 miRNA 与卵巢癌的诊断

研究表明,卵巢癌患者血清中 miRNAs 的表达水平与健康个体血清表达水平有差异,因此提出血清 miRNAs 检测有可能作为诊断早期卵巢癌的分子标志物而代替有创性较大的组织活检。Kan 等^[12]研究显示,浆液性卵巢癌患者血清 miR-200a、200b、200c 表达水平较健康个体显著增高,其中 miR-200c 增高最显著($P < 0.0005$)。联合检测血清 miR-200b 和 miR-200c 表达水平,对浆液性卵巢癌的发生有很好预测作用。使用微阵列技术对卵巢癌患者血清、组织及腹水的研究结果显示,在 3 种标本中,miRNAs 表达一致,miR-132、26a、145 和 let-7b 呈明显低表达。因此,研究者提出 miRNAs 可作为新颖分子标志物,用以鉴别诊断早期卵巢癌^[6]。Resnick 等^[10]应用新的实时荧光定量 PCR 方法进行卵巢癌患者血清 miR-21、92、93、126 和 29a 表达水平的研究发现,这些血清 miRNAs 水平均显著高于健康个体,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,术前血清 CA₁₂₅ 水平正常的卵巢癌患者,其血清 miR-21、92 和 93 亦有过表达的现象。因此,血清 miRNA 表达水平异常对早期诊断卵巢癌具有一定潜在临床价值。

2.2 血清 miRNA 与卵巢癌预后评估

Guo 等^[13]研究发现,血清 miR-92 表达水平在有淋巴结转移的上皮性卵巢癌患者,较无淋巴结转移患者显著增高;而且于疾病晚期比早期表达水平也显著增高,因此提出血清 miR-92 表达水平可评估卵巢癌疾病进展。Xu 等^[14]研究显示,III ~ IV 期卵巢癌患者的血清 miR-21 表达水平显著高于 I ~ II 期患者,差异有统计学意义($P = 0.002$),其表达水平与患者生存时间呈显著相关性($r = 0.565, P = 0.006$),因此预测 miR-21 高表达,是独立于其他临床病理因素的卵巢癌预后的不利因子($HR = 2.327, P = 0.019$)。Hong 等^[15]对 96 例上皮性卵巢癌患者血清 miRNAs 进行分析的结果发现,卵巢癌患者血清 miR-221 水平呈上调表达,其表达水平与 FIGO 临床分期、肿瘤分级有关。在影响卵巢癌患者总体生存率的多变量分析中显示,血清 miR-221 高表达是不良预后因素之一。Zheng 等^[16]对于 360 例卵巢癌患者的血清分析结果显示,血清 miR-let-7f 表

达水平低的卵巢癌患者预后较差。Langhe 等^[17]研究发现,早期出现血清 miR-let-7i-5p 失表达的卵巢癌患者,容易发展为化疗耐受,提示血清 miR-let-7i-5p 是卵巢癌预后标志物之一。冯朝霞等^[18]在卵巢癌患者血清 miRNA 表达水平与顺铂化疗敏感度相关性研究中发现,患者化疗后外周血中仅 miR-22 表达水平显著升高(升高约 3.2 倍),而且 miR-22 表达水平高者对化疗反应多数敏感,提示患者外周血清 miR-22 表达水平与其化疗敏感度呈正相关关系($P < 0.05$)。

3 血清 miRNA 与子宫内膜癌

大部分子宫内膜癌患者因出现不规则阴道流血及排量增多等早期症状而就诊,但仍有小部分患者因症状不典型而就诊时已发展至晚期。虽然血清 CA₁₂₅ 已多年被应用于子宫内膜癌的诊断,但因其特异度低,因而对子宫内膜癌的鉴别诊断价值差。目前研究显示,血清 miRNA 检测有助于早期诊断子宫内膜癌^[19-21]。

3.1 血清 miRNA 与子宫内膜癌的诊断

Torres 等^[19]采用受试者工作特征曲线的曲线下面积(area under curve, AUC)评估血清 miRNA 诊断子宫内膜癌的价值发现,血清 miR-99a 和 miR-199b 的 AUC 分别为 0.810(敏感度为 76.0%,特异度为 79.0%)和 0.786(敏感度为 79.0%,特异度为 71.0%),而联合血清 miR-99a 和 miR-199b 的 AUC 值则为 0.903(敏感度为 88.0%,特异度为 93.0%),提示联合检测 2 种血清 miRNAs,对子宫内膜癌的诊断价值,显著高于其中任一项血清 miRNA 单独检测。Torres 等^[20]在另一项研究中再次证明了此观点。Wang 等^[21]研究发现,miR-15b、-27a、-223 在子宫内膜癌患者血清中异常表达,其 AUC 分别为 0.768、0.813 和 0.768;并进一步分析发现,联合检测血清 miR-27a 和 CA₁₂₅ 可显著提高子宫内膜癌诊断率,其 AUC 为 0.894(敏感度为 77.4%,特异度为 97.0%)。因此认为,联合检测 ≥ 2 种血清 miRNAs,对子宫内膜癌的诊断价值远高于其中任一项血清 miRNA 单独检测;血清 miRNAs 和常规血清肿瘤标志物联合检测,能更准确诊断子宫内膜癌。

3.2 血清 miRNA 与子宫内膜癌预后评估

文献报道,有盆腔淋巴结转移的子宫内膜癌组患者的血清 miR-141 表达水平,显著高于无盆腔淋巴结转移组,并且差异有统计学意义($P < 0.001$),提示血清 miR-141 表达水平,与子宫内膜癌的淋巴结转移密切相关,可能为子宫内膜癌淋巴结转移的血清标志物及进展期子宫内膜癌的独立预后因素^[22]。谭志琴等^[23]研究结果显示,血清 miR-155 表达水平随子宫内膜癌手术病理分化增高而增高,有盆腔淋巴结转移者高于无盆腔淋巴结转移者,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。陈玉芬^[24]对 52 例子宫内膜癌患者的随访发现,血清 miR-155 表达水平相对较低患者的病死率为 8.00%,而表达水平相对高患者的病死率则为 25.93%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

4 血清 miRNA 与宫颈癌

流行病学和分子生物学研究表明,人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染是导致宫颈上皮内瘤变(cervical

intra epithelial neoplasia, CIN)及宫颈癌发生的主要原因。目前临床诊断宫颈癌主要采用“三阶梯”程序,即宫颈细胞学检查和高危型 HPV DNA 检测、阴道镜检查、宫颈活组织检查,但耗时长、费用高。淋巴结转移是导致宫颈癌预后不良的主要因素。判断淋巴结转移的方法主要依据 CT、MRI 等影像学检查,但影像学检查对微小病灶的检出存在一定局限,而血清 miRNA 检测具有快捷、创伤小、可重复性等特点,利于宫颈癌的临床诊断与预后评估。

4.1 血清 miRNA 与宫颈癌的诊断

Yu 等^[25]研究结果显示,与健康个体相比,宫颈癌患者血清中 miR-218 表达水平显著降低,并且差异有统计学意义($P < 0.001$),而且 miR-218 表达水平与宫颈癌临床病理特征相关。Juan 等^[26]对宫颈癌患者血清进行 Solexa 高通量测序发现,2 种新颖 miRNAs(尚未被注册及命名)在宫颈癌患者血清中表达水平显著下调,但二者的表达水平与宫颈癌临床分期、淋巴结转移和病理分化无相关性($P > 0.05$),提示二者可能与宫颈癌发生有关,但与宫颈癌进展无关。师婕和张林燕^[7]研究结果显示,miR-27a 的相对表达量在宫颈癌患者的血清和组织中显著高于对照组健康个体,并且差异有统计学意义($P < 0.05$),而且表达水平在宫颈癌患者血清及组织中呈正相关($r = 0.866$, $P < 0.05$)。由于宫颈癌患者血清 miRNAs 表达与健康个体存在明显差异,同时可避免因宫颈活检给患者带来不适,故血清 miRNAs 检测可能成为宫颈癌新的辅助诊断方法。

4.2 血清 miRNA 与宫颈癌预后评估

宫颈癌早期即可发生淋巴结转移,淋巴结转移亦被公认为影响宫颈癌预后的主要危险因素之一。Chen 等^[27]研究结果显示,通过检测 6 种血清 miRNAs(miR-1246, -20a, -2392, -3147, -3162-5p, -4484)的表达水平,可以预测早期宫颈鳞癌患者有无淋巴结转移。上述 6 种 miRNAs 预测宫颈癌患者伴淋巴结转移的 AUC 为 0.932(敏感度为 85.6%,特异度为 85.0%),且显著优于血清 SCCA 检测[AUC 为 0.713(敏感度为 61.2%,特异度为 70.0%)];并且差异有统计学意义($P < 0.0001$),由此认为,上述 6 种 miRNAs 对预测宫颈癌淋巴结转移的价值显著高于 SCCA。Zhao 等^[28]对 80 例 I~II_A 期宫颈癌患者血清 miR-20 表达水平的研究发现,在淋巴结转移患者中,血清 miR-20 过表达,由此认为血清 miR-20a 可能可以作为检测宫颈癌患者淋巴结转移恶性进展的生物分子标记。贺婵娟等^[29]研究结果显示,宫颈鳞癌伴淋巴结转移组患者的血清 miR-21 表达水平高于不伴淋巴结转移组患者,并且差异有统计学意义($P < 0.05$),而宫颈鳞癌不伴淋巴结转移组患者的血清中 miR-21 表达水平同正常对照组健康个体比较,差异却无统计学意义($P > 0.05$)。Ma 等^[30]研究结果显示,①宫颈癌患者血清 miR-205 高表达与肿瘤组织低分化、淋巴结转移和晚期宫颈癌有相关性($P = 0.009, 0.015, 0.001$);②生存分析结果显示,宫颈癌患者血清 miR-205 高表达趋向于短的总生存期;③多变量回归分析结果提示,miR-205 可作为预测宫颈癌预后的独立危险因素。

5 问题与展望

Keller 等^[31]研究结果显示,健康个体血清 miRNAs 主要来

源于血细胞,而肿瘤患者血清中 miRNAs 差异性表达,可能系肿瘤细胞分泌的自身特有 miRNAs,这些差异性表达的 miRNAs 在正常人血清中不能被检测到,并且这种差异性表达多与肿瘤临床病理特征,如肿瘤临床分期、病理分化及是否淋巴结转移等有关。对血清 miRNA 的研究工作目前尚处于初步阶段,使其在临床应用上仍存在以下一些问题:①虽然血清中 miRNA 具有较好稳定性,其特异度亦高于临床常规肿瘤血清标志物,但其含量远低于组织中 miRNA 含量,若病变范围较小,则血清 miRNA 不能完全或明显表现出表达异常,因此目前临床检测血清 miRNA 水平尚不可完全、明确诊断早期肿瘤。②目前关于血清 miRNA 测定对妇科肿瘤早期诊断和预后评价方面的文献报道有限,对血清 miRNA 研究多无重复性文献验证,因此血清 miRNA 在妇科肿瘤的确切作用尚待进一步研究。③目前多数文献报道的血清 miRNA 研究样本量较小,并且主要集中在术前与短期血清 miRNA 水平检测,缺乏长期随访监测研究,尚不能对患者预后进行有效评估。④国内学者研究血清 miRNA 表达水平时,大多采用内参(人体稳定表达的一种基因,如 U6, miR-16 等)作为参照物,而国外研究者则大多采用外参(人体循环无法表达的 miRNA,如 cel-miR-39 等),因此国内外学者的研究结果是否存在实验数据差异,目前尚无文献报道证实。⑤目前血清 miRNA 检测方法主要采用 RT-qPCR,虽然方便快捷,但高成本分析限制其成为临床常规诊断的血清学肿瘤标志物。

综上所述,血清 miRNA 具有肿瘤特异性、组织特异性及免疫相关性等特点,因此血清 miRNAs 检测,可能成为应用于妇科恶性肿瘤临床诊断和预后评估的新一代血清学肿瘤标志物。

参 考 文 献

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5):843-854.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30):10513-10518.
- Patel RS, Jakymiw A, Yao B, et al. High resolution of microRNA signatures in human whole saliva[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(12):1506-1513.
- Wang G, Chan ES, Kwan BC, et al. Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer[J]. Clin Genitourin Cancer, 2012, 10(2):106-113.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Dev Biol, 2007, 302(1):1-12.
- Chung YW, Bae HS, Song JY, et al. Detection of microRNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patients[J]. Int J Gynecol Cancer, 2013, 23(4):673-679.
- 师婕, 张林燕. 微小 RNA-27a 在子宫颈鳞癌患者血清和组织中的表达及意义[J]. 中国妇产科临床杂志, 2014, 15(2):172-174.
- Li J, Smyth P, Flavin R, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen

- cells[J]. BMC Biotechnol, 2007, 7: 36.
- 9 Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2009, 4: 199-227.
- 10 Resnick KE, Alder H, Hagan JP, *et al.* The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1): 55-59.
- 11 Moore RG, Brown AK, Miller MC, *et al.* The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(2): 402-408.
- 12 Kan CW, Hahn MA, Gard GB, *et al.* Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 627.
- 13 Guo F, Tian J, Lin Y, *et al.* Serum microRNA-92 expression in patients with ovarian epithelial carcinoma[J]. J Int Med Res, 2013, 41(5): 1456-1461.
- 14 Xu YZ, Xi QH, Ge WL, *et al.* Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(2): 1057-1060.
- 15 Hong F, Li Y, Xu Y, *et al.* Prognostic significance of serum microRNA-221 expression in human epithelial ovarian cancer[J]. J Int Med Res, 2013, 41(1): 64-71.
- 16 Zheng H, Zhang L, Zhao Y, *et al.* Plasma miRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e77853.
- 17 Langhe R, Norris L, Saadeh FA, *et al.* A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 628-636.
- 18 冯朝霞, 黄余良, 欧阳先辉. 卵巢癌患者血浆 miRNA 水平与顺铂化疗敏感性的相关性研究[J]. 中国医师杂志, 2014, 16(7): 930-933.
- 19 Torres A, Torres K, Pesci A, *et al.* Dereglulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 369.
- 20 Torres A, Torres K, Pesci A, *et al.* Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients[J]. Int J Cancer, 2013, 132(7): 1633-1645.
- 21 Wang L, Chen YJ, Xu K, *et al.* Circulating microRNAs as a fingerprint for endometrial endometrioid adenocarcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110767.
- 22 贾英华. 子宫内膜癌患者血清 Has-miR-141 的表达及其临床意义[D]. 北京协和医学院, 2013.
- 23 谭志琴, 刘伏香, 唐海林, 等. 子宫内膜癌患者血清 hsa-miR-155 的表达及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(10): 772-774.
- 24 陈玉芬. 子宫内膜癌患者血清中 miR-155 的表达及其临床意义研究[J]. 中国医药导刊, 2014, 16(1): 160-161.
- 25 Yu J, Wang Y, Dong R, *et al.* Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4): 671-674.
- 26 Juan L, Tong HL, Zhang P, *et al.* Identification and characterization of novel serum microRNA candidates from deep sequencing in cervical cancer patients[J]. Sci Rep, 2014, 4: 6277.
- 27 Chen J, Yao D, Li Y, *et al.* Serum microRNA expression levels can predict lymph node metastasis in patients with early-stage cervical squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(3): 557-567.
- 28 Zhao S, Yao D, Chen J, *et al.* Circulating miRNA-20a and miRNA-203 for screening lymph node metastasis in early stage cervical cancer[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2013, 17(8): 631-636.
- 29 贺婵娟, 姚德生, 陈军莹. miR-21 在宫颈鳞癌淋巴结转移患者血清中的表达及其临床意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(19): 3195-3197.
- 30 Ma Q, Wan G, Wang S, *et al.* Serum microRNA-205 as a novel biomarker for cervical cancer patients[J]. Cancer Cell Int, 2014, 14: 81.
- 31 Keller A, Leidinger P, Bauer A, *et al.* Toward the blood-borne miRNome of human diseases[J]. Nat Methods, 2011, 8(10): 841-843.
- 何少仪, 孙小丽, 罗喜平. 血清 microRNA 在妇科恶性肿瘤临床诊断及其预后评价中的研究进展[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志: 电子版, 2015, 11(6): 789-792.

(收稿日期: 2015-07-09 修回日期: 2015-11-25)