

血清 miRNA-221 单独及联合 PSA 相关指标检测在前列腺癌诊断中的意义

杨晓 张敏 张腊红 潘峰

【摘要】 目的 探讨血清 miRNA-221 单独及联合前列腺特异性抗原(PSA)相关指标检测在前列腺癌诊断中的意义。方法 采集 43 例前列腺癌患者、37 例良性前列腺增生患者、25 例健康对照者的外周静脉血并及时分离血清,采用化学发光法检测 T-PSA、F-PSA 水平,RT-PCR 法检测 miRNA-221 相对表达量。比较 3 组对象上述指标检测结果以及 miRNA-221 单独及联合 PSA 相关指标对前列腺癌的诊断效能。结果 前列腺癌组 miRNA-221 相对表达量、T-PSA 水平、F-PSA 水平均明显高于健康对照组、良性增生组(均 $P < 0.05$);前列腺癌组、良性增生组 F-PSA/T-PSA 均明显低于健康对照组(均 $P < 0.05$)。与 PSA 相关指标比较,miRNA-221 诊断前列腺癌的 AUC(0.714)、约登指数(0.317)、灵敏度(0.333)均较低,而特异度(0.984)较高;miRNA-221 联合 PSA 相关指标未提高对前列腺癌的诊断效能。结论 血清 miRNA-221 在前列腺癌诊断中具有一定的临床意义,其特异度较高,但灵敏度偏低;联合 PSA 相关指标检测并未提高对前列腺癌的诊断效能。

【关键词】 miRNA-221 前列腺特异性抗原 前列腺癌

前列腺癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,是男性因癌死亡的第 3 位致死因子^[1]。目前,用于辅助诊断前列腺癌的实验室指标主要是前列腺特异性抗原(PSA)相关指标,包括 T-PSA、F-PSA、F/T-PSA;在长期临床应用中,PSA 相关指标表现出其特异度不足的缺点^[2-3]。随着“液体活检”的提出,越来越多的相关实验室指标受到临床上的关注^[4]。miRNA 是一类长 18~25nt 的非编码小 RNA,与多种疾病的发生、发展密切相关^[5]。miRNA-221/222 基因定位于 X 染色体 p11.3 区域内,成簇分布的 miRNA-221/222 与肿瘤的发生、发展密切相关。前列腺癌患者的 miRNA-221/222 表达谱发生了变化,进而导致前列腺癌细胞生长、凋亡、迁移等过程出现紊乱^[6-7]。有研究显示,miRNA-221 在前列腺癌组织/细胞中的表达水平明显高于正常前列腺组织/细胞^[8]。本研究观察并比较了前列腺癌、良性前列腺增生和健康对照者外周血 miRNA-221 表达差异,并探讨了 miRNA-221 单独及联合 PSA 相关指标检测对前列腺癌的诊断效能,现将结

果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2016 年 3 月至 2017 年 8 月收治的 43 例前列腺癌患者(均经组织病理学确诊)为前列腺癌组,其中杭州师范大学附属医院 2 例,浙江省肿瘤医院 41 例;杭州师范大学附属医院同期就诊的 37 例良性前列腺增生患者为良性增生组;杭州师范大学附属医院同期 25 例健康体检者为健康对照组。排除肾功能衰竭、严重肝胆疾病、合并其他恶性肿瘤者。3 组对象年龄比较,差异无统计学差异($P > 0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会审批通过。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 使用促凝真空采血管采集所有对象外周静脉血 5ml,待完全凝固后及时分离血清于 2 个 EP 管, -80℃ 保存。

1.2.2 PSA 相关指标检测 使用化学发光仪(雅培 i4000)检测 T-PSA、F-PSA,计算得到 F-PSA/T-PSA。

1.2.3 血清 miRNA-221 检测 (1)血清总 RNA 提取:①血清中加入 1ml Trizol 裂解液,漩涡震荡混匀;②加入 0.2ml 三氯甲烷,剧烈摇动 10s,室温放置 1min;③ 4℃, 12 000g 离心 15min;④将上清液转移至另 1 个新的无 RNA 酶离心管中,加入等体积的 100%乙醇;⑤吸

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.7.2018-3273

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYB234)

作者单位:310001 杭州师范大学附属医院(杭州市第二人民医院)医学检验科(杨晓、张腊红、潘峰);浙江省肿瘤医院医学检验科(张敏)

通信作者:潘峰, E-mail:2359506302@qq.com

取全部样品,加入带有 2ml 收集管的离心柱,8 000g 室温离心 15s,弃流穿液;⑥将剩余样品转移至离心柱,重复第 5 步;⑦往离心柱中加入 700 μ l 清洗缓冲液,轻盖盖子,8 000g 室温离心 15s,弃流穿液;⑧重复第 7 步,用 500 μ l 清洗缓冲液洗涤离心柱 2 次;⑨将离心柱转移至 1 个新的无 RNA 酶 1.5ml 离心管中,往硅胶膜中央滴加 50 μ l DEPC 水,4 $^{\circ}$ C,10 000g 离心 3min 洗脱 RNA。(2)RT-PCR 法检测血清 miRNA-221 含量:使用 RT-PCR 仪(MX3000P,美国安捷伦公司)对上述提取的总 RNA 进行逆转录反应,总体系 20 μ l,反应条件:42 $^{\circ}$ C 30min,85 $^{\circ}$ C 10min。以 hsa-miR-16 为内参,反应体系 20 μ l,反应条件:95 $^{\circ}$ C 3min 变性,95 $^{\circ}$ C 12s,62 $^{\circ}$ C 40s;共 40 个循环。计算 miRNA-221 相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 q 检验。单一指标诊断效能的判断采用 ROC 曲线分析;多个指标联合检测诊断效能的判断先采用 logistic 回归方程计算预测概率,再进行 ROC 曲线分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组对象 miRNA-221 及 PSA 相关指标检测结果比较 前列腺癌组 miRNA-221 相对表达量、T-PSA 水平、F-PSA 水平均明显高于健康对照组、良性增生组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);前列腺癌组、良性增生组 F-PSA/T-PSA 均明显低于健康对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组对象 miRNA-221 及 PSA 相关指标检测结果比较

组别	<i>n</i>	T-PSA (ng/ml)	F-PSA (ng/ml)	F-PSA/ T-PSA	miRNA-221 相对表达量
前列腺癌组	43	51.09 $\pm$ 8.87 [△]	7.38 $\pm$ 0.78 ^{*△}	0.15 $\pm$ 0.10 [*]	6.94 $\pm$ 0.89 [△]
良性增生组	37	7.25 $\pm$ 2.04	1.43 $\pm$ 0.50	0.20 $\pm$ 0.02 [*]	3.22 $\pm$ 0.47
健康对照组	25	1.29 $\pm$ 0.21	0.31 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.03	2.92 $\pm$ 0.49
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与健康对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与良性增生组比较,[△] $P < 0.05$

2.2 miRNA-221 单独及联合 PSA 相关指标检测对前列腺癌的诊断效能 与 PSA 相关指标比较,miRNA-221 诊断前列腺癌的 AUC、约登指数、灵敏度均较低,特异度较高;miRNA-221 联合 PSA 相关指标未提高对前列腺癌的诊断效能,见表 2。

3 讨论

血清 PSA 相关指标是目前临床应用最广泛的预测

表 2 miRNA-221 单独及联合 PSA 相关指标检测对前列腺癌的诊断效能

项目	AUC	约登指数	灵敏度	特异度
T-PSA	0.957	0.816	0.911	0.905
F-PSA	0.837	0.600	0.822	0.778
F-PSA/T-PSA	0.745	0.403	0.714	0.689
miRNA-221	0.714	0.317	0.333	0.984
miRNA-221 联合 T-PSA	0.958	0.816	0.911	0.905
miRNA-221 联合 F-PSA	0.860	0.610	0.689	0.921
miRNA-221 联合 F-PSA/T-PSA	0.794	0.495	0.622	0.873

前列腺癌的肿瘤标志物,随着其发现与应用,前列腺癌的早期发现与诊断有了明显提高^[9-10]。在临床应用中,发现 PSA 虽然具有组织特异性,但缺乏对前列腺癌诊断的特异度。前列腺炎、良性前列腺增生、前列腺相关检查(直肠指检、经直肠超声检查等)均可引起 PSA 升高。有研究表明,联合 2 种及以上指标检测对疾病的诊断效能高于单一指标^[11-12]。Dimitry 等^[12]发现血清中 IL-8、TNF- α 、sTNFR 联合 PSA 相关指标检测前列腺癌,较单独 PSA 相关指标的灵敏度和特异度均有不同程度的升高。笔者前期研究发现,联合 PLT、纤维蛋白原等检测能提高 PSA 相关指标对前列腺癌的诊断效能^[13]。

miRNA 是一类长 18~25nt 的非编码小 RNA,其表达水平受到染色体重排(缺失、重复、突变等)、启动子甲基化及转录活性等调控机制的影响^[5]。近年来研究表明,miRNA 能通过调控细胞增殖、凋亡和分化,进而在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用。随着大量肿瘤特异性 miRNA 表达谱被发现,miRNA 在肿瘤诊断、分级、预后中的作用引起研究者的关注。当 miRNA 暴露于较恶劣的条件时,如煮沸、过酸、过碱、反复冻融等,miRNA 依然可以保持较高的稳定性。因此,miRNA 被认为是理想的无创诊断标志物候选者。研究发现,血清 miRNA-210、miRNA-21 诊断非小细胞肺癌的 AUC 为 0.845、0.725;两者联合诊断的 AUC 为 0.928,对非小细胞肺癌的诊断具有一定的诊断效能^[14]。另一项研究表明,血清 miR-767-3p 诊断直肠癌的 AUC、灵敏度和特异度分别为 0.770、0.800、0.680,而 miR-767-3p 联合血清癌胚抗原诊断直肠癌的 AUC、灵敏度和特异度分别为 0.862、0.730、0.840,联合检测有助于直肠癌的诊断^[15]。有研究显示,miR-221 在胰腺癌、乳腺癌、结直肠癌等肿瘤中表达失调,可以辅助疾病的诊断^[16-18]。笔者前期研究发现,miRNA-221 在前列腺癌组织/细胞中的表达明显高于正常前列腺组织/细胞。为了探讨 miRNA-221 在前列腺癌无创诊断中的价值,笔者检测了血清 miRNA-221

在前列腺癌患者、良性前列腺增生患者及健康对照者中的差异以及联合 PSA 相关指标检测的效能。结果显示,前列腺癌组 miRNA-221 相对表达量、T-PSA 水平、F-PSA 水平均明显高于健康对照组、良性增生组(均 $P < 0.05$);前列腺癌组、良性增生组 F-PSA/T-PSA 均明显低于健康对照组(均 $P < 0.05$)。血清 miRNA-221 单独及联合 PSA 相关指标对前列腺癌的诊断效能进行比较,结果发现 miRNA-221 诊断前列腺癌的 AUC 为 0.714,诊断价值中等(AUC 0.5~0.7 为诊断价值较低,0.7~0.9 为诊断价值中等, >0.9 诊断价值为较高),低于 PSA 相关指标的诊断效能。当约登指数最大时,miRNA-221 具有较高的诊断特异度(0.984),但其灵敏度较低(0.333)。分析灵敏度较低的原因,可能由于血清中 miRNA 含量与组织细胞 miRNA 含量的异质性,血清 miRNA 本身含量较低,或受检测方法灵敏度的局限所致。血清 miRNA 联合 PSA 相关指标检测时,对前列腺癌的诊断效能也无明显改善。

综上所述,血清 miRNA-221 在前列腺癌诊断中具有一定的临床意义,其特异度较高,但灵敏度偏低;联合 PSA 相关指标检测并未提高对前列腺癌的诊断效能。

4 参考文献

- [1] Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review[J]. JAMA, 2017, 317(24):2532-2542. DOI: 10.1177/1740774512453224.
- [2] Naoki T, Shusuke A, Takashi K, et al. Prognostic and predictive biomarkers in prostate cancer: latest evidence and clinical implications[J]. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2017, 9(8):565-573. DOI: 10.1177/1758834017719215.
- [3] Rui C, Yiran H, Li PX, et al. Prostate Specific Antigen and Prostate Cancer in Chinese Men Undergoing Initial Prostate Biopsies Compared with Western Cohorts[J]. The Journal of Urology, 2017, 197(1): 90-96. DOI: 10.1016/j.juro.2016.08.103.
- [4] Miriam H, Arnulf S, Jens B, et al. Liquid biopsy: ready to guide therapy in advanced prostate cancer? [J]. BJU International, 2016, 118(6):855-863. DOI: 10.1111/bju.13586.
- [5] Masanori K, Akiko S, Yoshikazu T, et al. MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2017, 79(4):719-725. DOI: 10.1292/jvms.16-0279.
- [6] Han QX, Wei X, JH, et al. Downregulation of miR-221, -30d, and -15a contributes to pathogenesis of prostate cancer by targeting Bmi-1[J]. Biochemistry, 2015, 80(3):276-283. DOI: 10.1134/s0006297915030037.
- [7] Fulya YA, Muge K, Yavuz D, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer[J]. Tumor Biology, 2011, 32(3):583-588. DOI: 10.1007/s13277-011-0154-9.
- [8] Xiao Y, Ying YM, Rong G, et al. Down-Regulation of miRNA-221 and mir-222 Restrains Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration That Is Partly Mediated by Activation of SIRT1[J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e98833-e98833. DOI: 10.1371/journal.pone.0098833.
- [9] Xavier F, Laura F. Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer[J]. Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, 2015, 53(7): 963-973. DOI: 10.1515/cclm-2014-0988. DOI: 10.1515/cclm-2014-0988.
- [10] Carsten S, Klaus J, Bernhard R. Current biomarkers for diagnosing of prostate cancer[J]. Future Oncology, 2015, 11(20):2743-2755. DOI: 10.2217/fon.15.203.
- [11] Vytytilova F, Radova L, Sachlova M, et al. Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer[J]. Carcinogenesis, 2016, 37(10):941-951. DOI: 10.1093/carcin/bgw078.
- [12] Dimitry AC, Veronika AM, Andrey VG, et al. New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer[J]. Seminars in Cancer Biology, 2018, 52 (Part1):9-16. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.01.012.
- [13] 杨晓, 张腊红, 洪理泉, 等. 血小板、纤维蛋白原、前列腺特异抗原联合检测在前列腺癌诊断中的意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(14):2031-2033, 2037.
- [14] 周金林, 邓述恺. 血清 miRNA-210 和 miRNA-21 联合检测对 NSCLC 的临床应用价值[J]. 重庆医学, 2017, 46(7): 908-912. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2017.07.014.
- [15] 陈玉琢, 刘海宁, 刘韬. 结直肠癌患者血清 miRNA-767-3p 水平及诊断意义[J]. 复旦学报(医学版), 2018, 45(1): 52-56. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2018.01.008.
- [16] Xu QH, Li P, Chen X, et al. miR-221/222 induces pancreatic cancer progression through the regulation of matrix metalloproteinases[J]. Oncotarget, 2015, 6(16):14153-14164. DOI: 10.18632/oncotarget.3686.
- [17] Wei YF, Lai XF, Yu ST, et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells[J]. Breast cancer research and treatment, 2014, 147(2): 423-431. DOI: 10.1007/s10549-014-3037-0.
- [18] Qin J, Luo M. microRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK[J]. FEBS Lett, 2014, 588(1):99-104.
- [19] Liu S, Sun X, Wang M, et al. A microRNA 221- and 222-mediated feedback loop maintains constitutive activation of NF- κ B and STAT3 in colorectal cancer cells[J]. Gastroenterology, 2014, 147(4):847-859. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.06.006.
- [20] Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer[J]. British journal of cancer, 2013, 108(2):361-369. DOI: 10.1038/bjc.2012.546.

(收稿日期:2018-12-27)

(本文编辑:陈丹)