

# MicroRNA-145 在上皮性卵巢癌及细胞株中表达及其临床意义

刘萍<sup>1,2</sup>, 邹晨<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>江苏大学附属人民医院普外科, 江苏 镇江 212002; <sup>2</sup>扬州市江都人民医院妇产科, 江苏 扬州 225200

**[摘要]** 目的: 研究 microRNA-145(miRNA-145) 在上皮性卵巢癌患者组织及血清中的表达情况, 并探讨其作为肿瘤标记物在上皮性卵巢癌诊断和预后分析中的价值。方法: 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测 45 例上皮性卵巢癌患者和 45 例正常人血清标本中 miR-145 的表达, 以及 45 例上皮性卵巢癌患者组织及 8 例正常卵巢组织中 miR-145 的表达。结果: miR-145 在上皮性卵巢癌患者血清中相对表达量显著低于正常对照( $P < 0.01$ ); miR-145 在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量明显低于正常卵巢组织( $P < 0.01$ ); miR-145 表达水平随上皮性卵巢癌临床分期的进展呈下降趋势( $P < 0.05$ ), 与年龄、组织分级、病理类型、淋巴结转移和 CA125 的升高无关( $P > 0.05$ ); ROC 曲线显示血清 miR-145 可作为上皮性卵巢癌的分子诊断靶点; Kaplan-Meier 生存曲线显示血清 miR-145 的表达水平与上皮性卵巢癌患者的无进展生存率及总生存率有关( $P < 0.05$ )。结论: miR-145 在上皮性卵巢癌的发生发展中发挥抑癌基因作用, 可能成为诊断和预后评价的生物标志物。

**[关键词]** 微小 RNA; 微小 RNA-145; 上皮性卵巢癌; 实时定量 PCR

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)11-1528-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20181109

## Expression and clinical significance of microRNA-145 in epithelial ovarian cancer tissues and cell lines

Liu Ping<sup>1,2</sup>, Zou Chen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of General Surgery, People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, Zhenjiang 212002, <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Jiangdu People's Hospital of Yangzhou, Yangzhou 225200, China

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the expression of microRNA-145(miR-145) in epithelial ovarian cancer tissue and serum, and investigate the diagnosis and prognosis value of miR-145 as a biomarker for epithelial ovarian cancer. **Methods:** The expression of miR-145 in serum from 45 cases of epithelial ovarian cancer and 45 cases of healthy control, as well as in ovarian tissues from 45 cases of epithelial ovarian cancer and 8 cases of healthy control, was detected by real-time PCR. **Results:** The expressions of miR-145 in the serum and ovarian tissues of patients with epithelial ovarian cancer were significantly lower than those in healthy control ( $P < 0.01$ ). The expression of miR-145 decreased with the progression of the clinical stages ( $P < 0.05$ ), but it is not correlated with age, histological classification, lymph node metastasis, histological grading and the increasing of CA125 ( $P > 0.05$ ). ROC curves revealed that serum miR-145 might be a promising diagnostic biomarker for patients with epithelial ovarian cancer. **Conclusion:** MiR-145 act as a tumor suppressor in the development of epithelial ovarian cancer. MiR-145 may serve as a biomarker for diagnosis and predictor of epithelial ovarian cancer.

**[Key words]** microRNA; microRNA-145; epithelial ovarian cancer; real-time PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(11): 1528-1532]

卵巢癌是妇科生殖系统三大恶性肿瘤之一, 病死率位居女性生殖道恶性肿瘤的首位。由于多数卵巢癌患者早期无明显临床症状, 且缺乏特异的筛

查方法, 70% 的患者发现时已为晚期。卵巢癌预后较差的原因是多方面的, 这包括缺乏早期诊断方法以及症状不明显, 虽然目前肿瘤标记物的检测使其诊断水平大为提高, 但其应用仍然受到很多限制, 例如血清中最常用的生物标志物糖链抗原 125(carbohydrate antigen 125, CA125) 仅在约 50% 的早期

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金(BK20171304)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: Tigerzou@126.com

卵巢癌患者中升高<sup>[1-2]</sup>,因此研究并发现能提高卵巢癌检测敏感性和特异性的新型生物标记物相当迫切。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一种具有高度保守序列的非编码蛋白,长度为20~25个核苷酸,它主要在转录后水平调控靶基因的表达,通过与靶mRNA的3'-UTR区域结合,诱导其降解或抑制其翻译,实现对细胞增殖、分化、凋亡等生理进程的调控,与肿瘤发生、发展、侵袭和转移密切相关<sup>[3]</sup>。最近研究表明,miRNA在肿瘤组织的表达存在显著特异性,且在血液中已检测到可稳定存在的肿瘤细胞特异性miRNA<sup>[4]</sup>。研究发现人类microRNA-145(miR-145)在睾丸、前列腺、脾脏、子宫、卵巢、心脏中高表达<sup>[5]</sup>。以往研究中,miR-145的异常表达与前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌和其他多种肿瘤有关<sup>[6-7]</sup>。目前,miR-145在上皮性卵巢癌的诊断和预后价值少有报道。本研究采用real-time PCR方法检测miR-145在上皮性卵巢癌患者与正常人血清的表达量,探究二者是否存在差异,同时检测其在上皮性卵巢癌组织及细胞株中的表达情况,分析其表达水平和上皮性卵巢癌临床病理特征的关系,并探讨其作为肿瘤标记物在卵巢癌诊断以及预后评估中的意义。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

本研究经扬州大学医学院医学伦理委员会批准,所有参加者均签署知情同意书。卵巢癌血清和组织均来自2013年1月—2017年12月在扬州江都区人民医院的45例上皮性卵巢癌患者,45例正常人血清来自2016年1月—2017年12月在扬州江都区人民医院体检的正常成年人,8例正常卵巢组织来自2013年1月—2017年12月在扬州江都区人民医院因绝经后子宫肌瘤行全子宫+双附件切除术的患者。使用国际妇产科联合会(FIGO)分期系统对肿瘤进行分期,所有卵巢癌患者均经组织病理学诊断,所有患者术前没有接受放疗或化疗。

正常人上皮卵巢细胞系(IOSE-386)和4种人上皮性卵巢癌细胞(A2780、OVCAR-3、SKOV-3、HO8910)均来自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。IOSE-386细胞在DMEM培养基(Gibco公司,美国)中培养,人上皮性卵巢癌细胞系在RPMI 1640培养基(Gibco公司,美国)中培养,补充10%的胎牛血清(Gibco公司,美国),置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱。

高速离心机(Sigma公司,德国);mirVana Paris试剂盒(Ambion公司,美国);96孔热循环仪、7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems公司,美国);NanoDrop 1000A分光光度计(NanoDrop Technologies公司,美国);逆转录cDNA合成试剂盒、SYBR Green Master(Rox)PCR试剂盒(Roche Pharmaceutical公司,瑞士)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 卵巢癌和正常卵巢组织的采集及储存

患者手术过程中,待卵巢标本切下即进行标本处理。将手术获得的上皮卵巢癌和正常卵巢组织切成小块,放入去RNA酶的冻存管中,立刻放入液氮罐冻存。卵巢癌组织和正常卵巢组织离体到标本冻存均在30 min内完成,尽可能减少RNA降解的风险。

#### 1.2.2 血清样本处理

从肿瘤患者和健康志愿者抽静脉血5~10 mL,离心(2 000 g, 10 min, 4℃),吸取上清液获得血清。所有血清样品储存在-80℃待进一步RNA提取。

#### 1.2.3 miRNA提取和实时定量聚合酶链式反应(real-time PCR)

使用mirVana Paris试剂盒根据说明书提取总RNA(包括所有小的非编码RNA)。通过NanoDrop 1000 A分光光度计测量RNA溶液的浓度和纯度;逆转录反应用Veriti 96孔热循环仪和逆转录cDNA合成试剂盒进行;使用Roche FastStart的7500 Fast Real-Time PCR System和FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)PCR试剂盒来确定miR-145的表达水平。总体积20 μL PCR反应混合物含有RT产物、miR-145的上下游引物和Roche Rox,所有测定重复3次。95℃变性10 min;95℃10 s和58℃持续30 s,40个循环。U6 RNA作内参以确定miR-145的相对表达水平,通过-ΔCt方法计算miR-145的表达水平。

#### 1.3 统计学方法

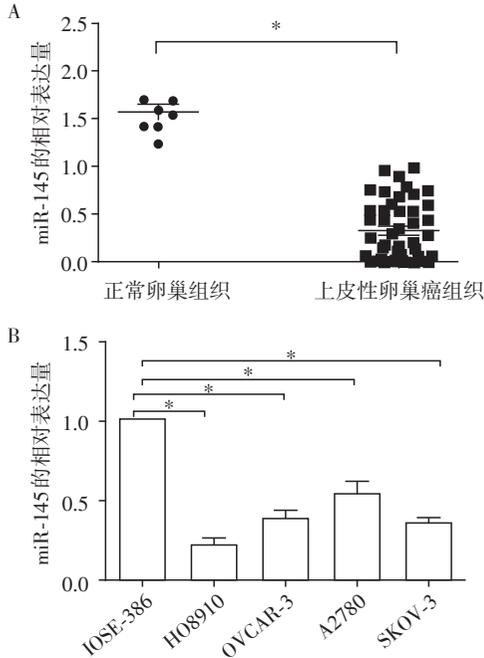
采用SPSS 23.0统计软件进行数据处理与分析,运用描述性统计方法t检验比较miR-145表达水平在不同组别的差异,ROC曲线法确定miR-145的最佳截点,计算ROC曲线下面积及95%可信区间(95%CI),Kaplan-Meier曲线评估患者预后的影响因素, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 上皮性卵巢癌组织及卵巢癌细胞中miR-145表达水平的检测

Real-time PCR结果显示 miR-145在上皮性卵

巢癌组织中的相对表达量显著低于正常卵巢组织(图1A);与正常卵巢细胞相比,上皮性卵巢癌细胞系中miR-145的表达水平明显降低,其中HO8910和SKOV-3细胞中miR-145表达水平更低(图1B,  $P < 0.01$ )。



A: miR-145在卵巢组织中的表达情况;B: miR-145在卵巢细胞系中的表达情况。两组比较,  $P < 0.01$ 。

图1 miR-145在上皮性卵巢癌组织和细胞系中的表达  
Figure 1 Expression of miR-145 in epithelial ovarian cancer tissues and cell lines

## 2.2 检测 miR-145 在上皮性卵巢癌患者及健康对照血清中的表达水平

卵巢癌患者血清中miR-145的表达水平明显低于健康对照组( $P < 0.01$ ,图2)。

## 2.3 上皮性卵巢癌患者血清中 miR-145 表达与临床病理特征的关系

血清miR-145表达水平与临床分期密切相关,随着临床分期进展,血清miR-145的表达逐渐降低( $P < 0.05$ ,表1)。miR-145的表达与卵巢癌其他临床病理特征,包括年龄、病理分级、组织学类型、淋巴结是否转移、CA125的水平均无明显统计学差异( $P > 0.05$ )。

## 2.4 血清 miR-145 表达水平对上皮性卵巢癌的诊断效率

根据上皮性卵巢癌患者及健康对照血清中的miR-145表达水平绘制ROC曲线。结果显示,ROC曲线下面积0.890(95% CI: 0.824~0.957),灵敏度为

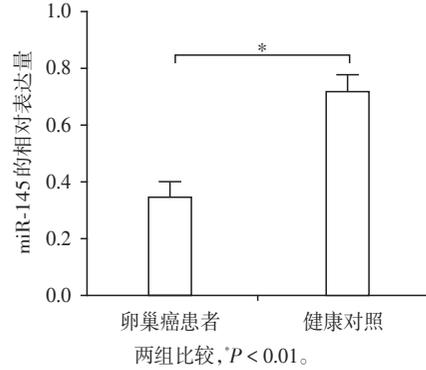


图2 血清miR-145在上皮性卵巢癌患者中的表达  
Figure 2 Expression of serum miR-145 in patients with epithelial ovarian cancer

表1 上皮性卵巢癌患者血清中miR-145表达和临床病理因素的相关性  
Table 1 Relationship between miR-145 expression in serum of patients with epithelial ovarian cancer and clinical pathologic characteristics

因素	miR-145		P值
	低表达	高表达	
年龄			0.18
<50岁(n=23)	8	15	
≥50岁(n=22)	12	10	
临床分期			0.04
I~II(n=19)	5	14	
III~IV(n=26)	15	11	
病理分级			0.84
G1,G2(n=21)	9	12	
G3(n=24)	11	13	
组织类型			0.23
浆液性(n=29)	11	18	
其他类型(n=16)	9	7	
淋巴结转移			0.09
是(n=15)	4	11	
否(n=30)	16	14	
CA125			0.06
≤200 U/mL(n=10)	7	3	
>200 U/mL(n=35)	13	22	

77.8%,特异度为91.1%,对应诊断界值0.411,提示miR-145在上皮性卵巢癌中有较高的诊断效率(图3)。

## 2.5 miR-145 表达水平与预后的关系

上皮性卵巢癌患者的血清miR-145表达水平根据中位数分为高表达组( $n=25$ )及低表达组( $n=20$ ),Kaplan-Meier曲线显示miR-145表达水平与患者无进展生存率密切相关,miR-145低表达的患者无进展生存率明显低于高表达患者( $P < 0.01$ ,图4A),在

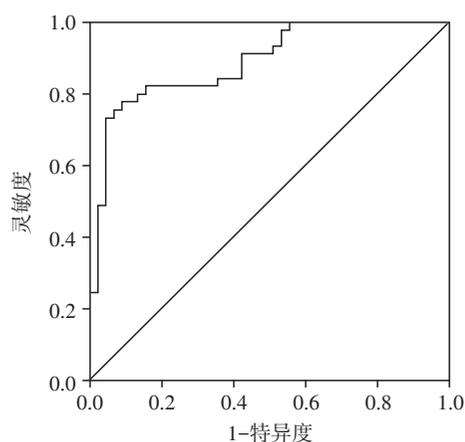


图3 血清miR-145对上皮性卵巢癌的诊断效率

Figure 3 Diagnostic efficiency of serum miR-145 in epithelial ovarian cancer

总生存率方面, miR-145低表达的患者预后更差, 表现为总生存期缩短( $P < 0.05$ , 图4B)。

### 3 讨论

卵巢癌是最致命的妇科恶性肿瘤之一, 其中以上皮性卵巢癌最常见, 约占卵巢恶性肿瘤的70%。在过去几十年里, 虽然手术联合化疗等治疗手段不

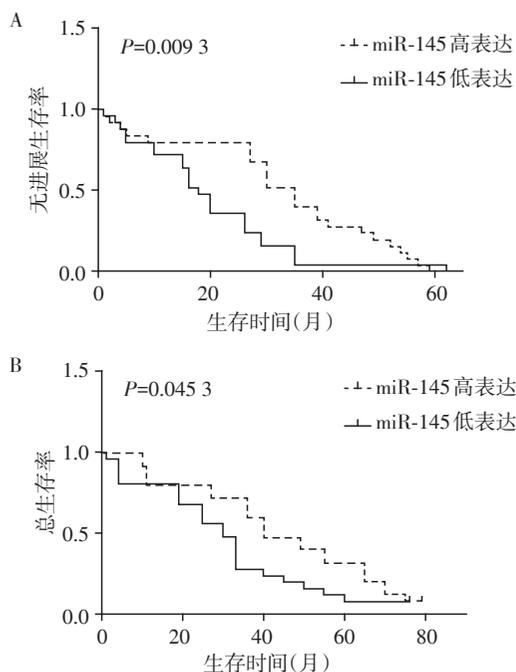
断进步, 但卵巢癌复发率和病死率仍然很高, 其5年生存率仍低于45%<sup>[8-9]</sup>。卵巢癌防治的关键在于早期诊断、早期治疗。因此, 探索高敏感性和特异性的卵巢癌新型诊断及预后标记物以降低病死率迫在眉睫。

目前有研究报道异常表达的microRNA可以作为乳腺癌、肺癌、结直肠癌及其他肿瘤的生物标记物<sup>[10-11]</sup>。Iorio等<sup>[12]</sup>发现不同miRNA表达谱可清楚地区分卵巢癌和对照组, 在卵巢癌患者组织中miR-200c、miR-200b、miR-200a和miR-145明显下调, 而miR-125b-1、miR-140、miR-199a和其他25种miRNA则上调。Nam等<sup>[13]</sup>在浆液性卵巢癌中评估了miRNA表达谱, 与正常卵巢组织比较, 发现miR-21、miR-16、miR-200和其他8个miRNA上调, 而miR-145、miR-100、miR-143和其他9个miRNA下调。Chung等<sup>[14]</sup>进行了血清、组织和腹水的miRNA分析, 证实有95个miRNA下调, 88个miRNA上调。在所有3个标本中具有一致改变的miRNA中, miR-145、miR-132、miR-26a、miR-143和miR-98在卵巢癌患者的血清中明显下调。

越来越多的证据表明, miR-145具有抗增殖和促凋亡作用, 可能是一种具有抑癌基因作用的miRNA<sup>[15]</sup>。研究表明, miR-145通过负向调控靶基因如p53、高迁移率族蛋白A2、c-Myc和p70S6K1的表达, 抑制卵巢癌细胞的增殖、侵袭和肿瘤生长, 同时促进细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>。本研究显示miR-145在上皮性卵巢癌中显著下调, 从而推测其低表达可能促进卵巢癌的发生发展。

同时也有研究发现miR-145可以在不同肿瘤的检测中作为诊断性生物标记物。Ichimi等<sup>[18]</sup>发现miR-145可作为膀胱癌诊断的生物标记物, miR-145产生的曲线下面积(AUC)为0.861, 可用于区分膀胱癌和正常膀胱上皮, 灵敏度为90.5%, 特异度为77.4%。Ferm等<sup>[19]</sup>报道miR-145可以作为区分乳腺癌患者与健康对照的一个潜在生物标记物, 灵敏度为94.40%, 特异度为100%。然而, 在Ng等<sup>[20]</sup>研究中, miR-145单独用来区分肺癌和健康吸烟者只能产生0.66的AUC(灵敏度55.9%, 特异度56.3%); 而miR-21、miR-145、miR-155联合应用产生的AUC为0.87(灵敏度76.5%, 特异度81.3%)。这些结果表明, 不同肿瘤中miR-145的诊断价值存在差异。

然而很少有研究关注miR-145在卵巢癌中的临床诊断及预后评估价值。本研究发现与健康对照相比, 卵巢癌患者血清miR-145的相对表达量显著



A: 血清miR-145的表达与卵巢癌患者无进展生存率的关系; B: 血清miR-145表达与卵巢癌患者总生存率的关系。

图4 血清miR-145表达与卵巢癌患者无进展生存率和总生存率的关系

Figure 4 Relationship between serum miR-145 expression and progression free survival or overall survival in patients with ovarian cancer

下降。根据ROC分析结果提示miR-145在上皮性卵巢癌中有较高的诊断效率,所以血清miR-145有望成为卵巢癌诊断的新指标。此外,还发现miR-145的表达水平与上皮性卵巢癌的临床分期呈负相关,高表达miR-145的患者无进展生存率和总生存率均较好,因此miR-145有望成为卵巢癌的预后评估指标。

## [参考文献]

- [1] Dodge JE, Covens AL, Lacchetti C, et al. Preoperative identification of a suspicious adnexal mass: a systematic review and meta-analysis[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 126(1):157-166
- [2] 王继贵. 卵巢癌新的血清生物标志物[J]. *实验与检验医学*, 2010, 28(5):468-468
- [3] Wienholds E, Plasterk RHA. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development [J]. *Science*, 2005, 309(5732):310-311
- [4] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of micro-RNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10):997-1006
- [5] Zaravinos A, Radojicic J, Lambrou G I, et al. Expression of miRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer [J]. *J Urol*, 2012, 188(2):615-623
- [6] Luo X, Christian S, Barbara B, et al. Identification and evaluation of plasma microRNAs for early detection of colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e62880
- [7] 檀碧波,李勇,赵群,等. miR-145在胃癌组织和胃癌患者外周血中表达的临床意义[J]. *中华普通外科杂志*, 2017, 32(1):73-74
- [8] Herzog T J, Pothuri B. Ovarian cancer: a focus on management of recurrent disease[J]. *Nat Clin Prac Oncol*, 2006, 3(11):604-611
- [9] Montero A, Fossella F, Hortobagyi G, et al. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data[J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(4):229-239
- [10] Li S, Yang X, Yang J, et al. Serum microRNA-21 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(1):29-35
- [11] Leng Q, Wang Y, Jiang F. A direct plasma miRNA assay for early detection and histological classification of lung cancer[J]. *Trans Oncol*, 2018, 11(4):883-889
- [12] Iorio MV, Visone R, Di LG, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 67(18):8699-8707
- [13] Nam EJ, Yoon H, Sang WK, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9):2690-2695
- [14] Chung YW, Bae HS, Song JY, et al. Detection of micro-RNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patients [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(4):673-679
- [15] Letelier P, Garc AP, Leal P, et al. miR-1 and miR-145 act as tumor suppressor microRNAs in gallbladder cancer [J]. *In J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5):1849
- [16] Kim TH, Song JY, Park H, et al. miR-145, targeting high-mobility group A2, is a powerful predictor of patient outcome in ovarian carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2):937-945
- [17] Zhang W, Wang Q, Yu M, et al. MicroRNA-145 function as a cell growth repressor by directly targeting c-Myc in human ovarian cancer [J]. *Tech Cancer Res Treat*, 2014, 13(2):161-168
- [18] Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(2):345-352
- [19] Ferm NMA, Mendoza-ram Rez JA, Ismael MS, et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers [J]. *Disease Markers*, 2013, 34(3):163-169
- [20] Ng EK, Li R, Shin VY, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53141

[收稿日期] 2018-02-27