

血浆 miRNA 表达谱与胰腺癌相关性的研究

潘峰^{1,2}, 闻洋³, 马士杰¹, 曹维克⁴, 董静³, 赵杨³, 胡志斌³, 施瑞华^{2*}

(¹南京医科大学附属淮安第一医院消化科, 江苏 淮安 223300; ²南京医科大学第一附属医院消化科, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系, 江苏 南京 210029; ⁴南京医科大学附属淮安第一医院中心实验室检验科, 江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的:探讨血浆 miRNA 的表达水平与胰腺癌发病的关联。方法:通过 TLDA(TaqMan low density array)芯片系统筛选 24 例胰腺癌患者和 24 例健康对照间差异表达的 miRNA, 对差异表达 miRNA 采用实时荧光定量 PCR 法进行单个样本验证。结果:miR-451 和 miR-409-3p 的表达水平在胰腺癌组和对照组中有显著的差别, *P* 值分别为 0.004 1 和 0.005 7。这 2 个 miRNAs 的组合以 93.8% 的受试工作者曲线下面积(area under the ROC curve, AUC)将健康对照组和胰腺癌患者组分开(灵敏度为 95.8%, 特异度为 91.7%)。结论:血浆 miR-451 和 miR-409-3p 的表达水平可有效区分胰腺癌患者和健康个体。

[关键词] 胰腺癌; miRNA; TLDA 芯片; 实时荧光定量 PCR

[中图分类号] R735.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1541-04

Correlation of serum microRNA profiling with pancreatic cancer risk

PAN Feng^{1,2}, WEN Yang³, MA Shi-jie¹, CAO Wei-ke⁴, DONG Jing³, ZHAO Yang³, HU Zhi-bin³, SHI Rui-hua^{2*}

(¹Department of Gastroenterology, the Huai'an First Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300; ²Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Epidemics and Health Statistics, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029; ⁴Clinic Test Lab, the Huai'an First Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the association of the expression level of serum miRNA and the incidence of pancreatic cancer. **Methods:** Using TaqMan low density array systematically screened the differentially expressed miRNA between the 24 pancreatic cancer patients and the 24 healthy controls. Then those miRNAs that satisfied the criteria were selected for further individual qRT-PCR confirmation. **Results:** The expression levels of two miRNAs (miR-451 and miR-409-3p) were confirmed to be significantly different in the pancreatic cancer patients and the controls, and *P*-values were 0.004 1 and 0.005 7, respectively. The area under the ROC curve (AUC) was 0.938 with sensitivity of 95.8% and specificity of 91.7%. **Conclusion:** The expression level of serum miR-451 and miR-409-3p can successfully distinguish the pancreatic cancer patients from the healthy.

[Key words] pancreatic cancer; miRNA; TaqMan low density array; qRT-PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1541-1544]

胰腺癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,其恶性程度高,预后极差,5 年生存率常低于 5%^[1-2]。由于胰腺癌早期症状不明显,没有敏感的肿瘤标记物,且其解剖位置较深,因此胰腺癌早期诊断困难,约

90% 的患者确诊时已处于晚期^[3-5]。寻找明确而有效的生物标志物,对胰腺癌做出明确的早期诊断将有助于胰腺癌患者早期治疗,从而改善其预后。

MicroRNA(即 miRNA)是一类分布广泛的非编码小 RNA,它的成熟状态是一类长约 19~23 个核苷酸的单链小分子 RNA,成熟 miRNA 主要通过和靶 mRNA 的 3'-非翻译区(untranslated region, UTR)、5'-UTR 和编码区域的碱基互补配对抑制靶 mRNA 翻译,在转录后水平调控靶基因表达^[6]。生物信息学研

[基金项目] 教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金(201081);新世纪优秀人才支持计划(NCET-10-0178);国家自然科学基金项目(30901232)

*通讯作者, E-mail: ruihuashi@126.com

究表明,单个 miRNA 分子能够与数百个功能各异的靶 mRNA 相结合而发挥调节作用,参与哺乳动物几乎所有的病理和生理活动,如个体发育、组织分化、细胞凋亡以及能量代谢等,与许多疾病的发生、发展存在着紧密的联系^[7]。近些年,多个研究报道血清/血浆 miRNA 表达谱可有效区分肿瘤患者和健康个体,因此,本研究采用两阶段病例-对照研究设计,通过前期 TLDA (TaqMan low density array) 芯片筛选和后期实时荧光定量 PCR 验证的方法探讨血浆 miRNA 作为生物标志物在胰腺癌诊断中的作用^[8]。

1 对象与方法

1.1 对象

选取 2007 年 6 月~2010 年 12 月在南京医科大学第一附属医院及附属淮安第一医院收集的新发胰腺癌患者 24 例,均经病理组织学确诊。对照为同期进行社区慢性病筛查的健康个体 24 例,按性别和年龄(± 5 岁)与病例进行频数匹配。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 抽提和逆转录

所有研究对象抽取外周静脉血 5 ml,用乙二胺四乙酸抗凝。4 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,12 000 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片,将血浆保存于 -80°C 冰箱备用。采用 TRIzol LS(美国 Invitrogen 公司)和 miRNeasy Mini Kit(美国 Qiagen 公司)进行 RNA 的提取、富集和纯化;采用 Taqman miRNA 逆转录试剂盒和 miRNA 特异性茎环结构(stem-loop)逆转录引物(美国 Applied Biosystems 公司)进行 miRNA 逆转录反应。提取过程均按照试剂盒的操作手册进行。本研究在变性处理后加入同一终浓度(1×10^{-4} pmol/ μl)的人工合成线虫 39 miRNA (cel-miR-39),用于标化提取、逆转录及后续定量检测全过程操作中的样本间差异。在每一步都采用等体积的样本,在每次试验过程中选用同一批号的试剂和耗材。

1.2.2 TLDA 芯片筛选

将胰腺癌病例组的每一例样本吸取 30 μl 血浆后进行混合,同时将对照组的每一例样本吸取 30 μl 血浆后进行混合。采用 TLDA 芯片(V2.0,美国 Applied Biosystems, CA, V2.0)对病例组和对照组的混合血浆样本进行差异表达 miRNA 的筛选,操作步骤按照试剂盒的操作流程进行。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 反应

采用 TaqMan PCR 试剂盒进行实时荧光定量

PCR 反应,PCR 反应在 7900 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)上进行。所有的反应均进行 3 次平行操作。

1.3 统计学方法

TLDA 芯片的数据采用 RQ-Manger 软件进行分析, C_t 阈值设为 0.2。两组样品血浆 miRNA 的表达量比值可用方程 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示,其中 $\Delta C_t = C_{t \text{ 样本}} - C_{t \text{ cel-miR-39}}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 病例}} - \Delta C_{t \text{ 对照}}$ 。采用 Logistic 回归分析 miRNA 的表达水平与胰腺癌发病风险之间的关系。为了进一步研究这几种 miRNA 构成的综合指征用于胰腺癌诊断的效果,以对照组 miRNA 表达量的单侧 95%参考值范围为标准,对 miRNA 进行评分,表达量小于第 95 百分位数的评分为 0 分,表达量大于等于第 95 百分位数的评分为 1 分,以 Logistic 回归分析的系数进行加权,进一步求得危险分值,以危险分值的中位数为界值,绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC) 来评估预测的灵敏性和特异性,进而评估这些 miRNA 的表达对胰腺癌发病的判断能力。

2 结果

2.1 研究对象的一般情况

病例组与对照组比较,平均年龄、性别构成差异无显著性,其中病例组平均年龄(59.46 ± 10.12)岁,对照组平均年龄(60.42 ± 6.22)岁。病例组中 54.2%为男性,45.8%为女性;对照组中 58.3%为男性,41.7%为女性(表 1)。

表 1 研究对象的一般情况

Table 1 General information of the research objects

基本特征	[n(%)]		
	病例组 (n=24)	对照组 (n=24)	P 值
年龄			0.700
< 60 岁	13(54.17)	13(54.17)	
> 60 岁	11(45.83)	11(45.83)	
性别			0.085
男	13(54.17)	14(58.33)	
女	11(45.83)	10(41.67)	

2.2 TLDA 芯片初筛

TLDA 芯片结果显示,有 7 个 miRNA(miR-451、miR-30e、miR-30a、miR-766、miR-30d、miR-409-3p 和 miR-923)在病例和对照组的 ΔC_t 值均大于 35,且两组之间 $\Delta\Delta C_t$ 大于 2(表 2)。

2.3 差异表达 microRNA 的单个样本验证

对上述差异表达的 7 个 miRNA 在病例组和对

表 2 TLDA 芯片筛选结果

Table 2 Results of TLDA screening of 7 miRNAs for pancreatic cancer risk

microRNA	ΔC_t 病例值	ΔC_t 对照值	$\Delta \Delta C_t$ 值
hsa-miR-451	25.311	29.755	-5.096 01
hsa-miR-30e	33.657	30.920	2.084 99
hsa-miR-30a	31.683	28.894	2.136 99
hsa-miR-766	34.429	31.036	2.740 99
hsa-miR-30d	34.245	30.637	2.955 99
hsa-miR-409-3p	34.082	30.437	2.992 99
hsa-miR-923	34.105	28.345	5.107 99

对照组的共 48 个样本中做单个验证, 结果发现 miR-

451 和 miR-409-3p 的表达水平在病例组和对照组中差异具有统计学意义, miR-451 在病例组的均数为 0.35 ± 0.54 , 对照组均数 0.01 ± 0.01 , t 检验的 P 值为 0.004 1。miR-409-3p 在病例组的均数为 0.01 ± 2.15 , 对照组的均数为 0.06 ± 0.88 , t 检验的 P 值为 0.005 7, 表达水平的差异见图 1。

Logistic 回归分析显示, 调整年龄和性别后, miR-451 的表达水平上调可显著增加胰腺癌的发病风险 ($OR=320.864, P < 0.001$); miR-409-3p 的表达水平上调可显著降低胰腺癌的发病风险 ($OR=25.604, P = 0.001$, 表 3)。

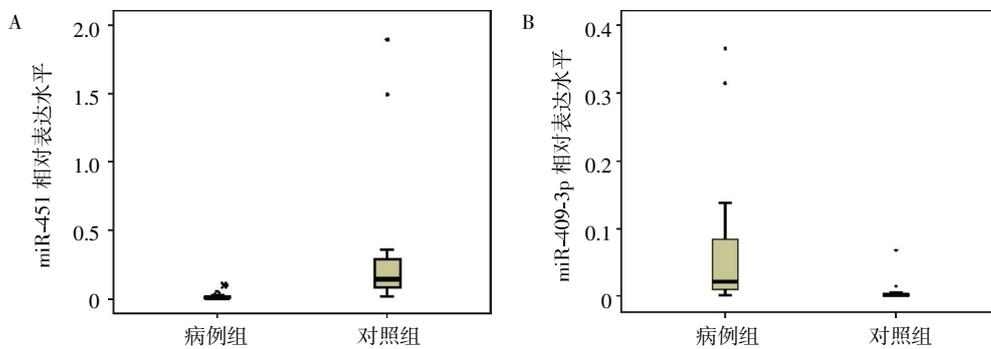


图 1 miR-451(A)和 miR-409-3p(B)在胰腺癌病例组和对照组表达水平

Figure 1 Expression levels of miR-451(A) and miR-409-3p(B) in the pancreatic cancer patients and the controls

表 3 Logistic 回归分析结果

Table 3 Results of Logistic regression model analysis

miRNA	回归系数	标准误	χ^2 值	P 值	OR 值
miR-451	5.771	1.382	17.425	0.000	320.864
miR-409-3p	3.243	0.996	10.601	0.001	25.604

2.4 ROC 分析

通过 ROC 来评价 miRNA 标志物在胰腺癌诊断中的价值。就单个 miRNA 而言, miR-451 以 91.7% 的 AUC 将对照组和病例组分开, 最佳临界点的灵敏度为 91.7%, 特异度为 91.7%; miR-409-3p 为以 75% 的 AUC 将对照组和病例组分开, 最佳临界点的灵敏度为 58.3%, 特异度为 91.7%。对 2 个标志物的联合分析发现, 二者组合以 93.8% 的 AUC 将健康对照和胰腺癌病例分开, 最佳临界点的灵敏度为 95.8%, 特异度为 91.7%(图 2)。

3 讨论

自从 Lee 等^[9]在 1993 年利用遗传分析的方法发现了第一个 miRNA (lin-4) 之后, miRNA 受到了广泛的关注。目前的研究表明人类血清/血浆中存在近千种 miRNAs, 作为一类新型的肿瘤标志物有

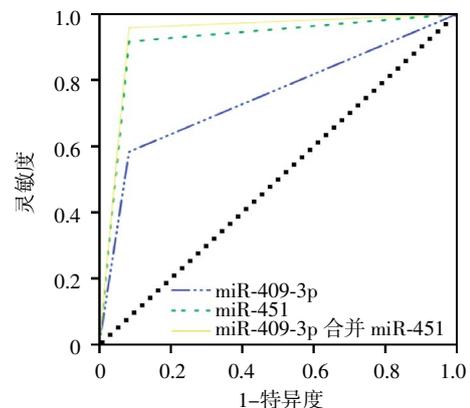


图 2 miR-451 和 miR-409-3p 的 ROC 分析

Figure 2 ROC analysis of the two-miRNA signature to predict pancreatic cancer

其独特的优点, 即性质稳定、易于定量检测, 且存在明显的疾病特异性。本课题组前期研究发现血浆 miR-486、miR-30d、miR-1 和 miR-499 组成的标志物

可稳定预测非小细胞肺癌患者的预后^[10]；而血清 miR-16、miR-25、miR-222 和 miR-324-3p 可以作为乳腺癌的诊断标志物^[11]。

本研究发现血浆 miR-451 和 miR-409-3p 的表达水平可有效区分胰腺癌患者和健康个体。Liu 等^[12]在最近的研究中发现一组血浆 miRNAs 的表达水平在胰腺癌病例组和健康对照组中存在差异。本次研究发现 2 个血浆 miRNAs (miR-451 和 miR-409-3p) 的表达水平可有效区分胰腺癌患者和健康个体,其中 miR-451 的表达水平在胰腺癌病例组的血浆中显著上调,与 Liu 等^[12]的研究结果一致。此外,研究发现 miR-451 可以调节乳腺癌中多耐药基因的表达水平,并在恶性胶质瘤干细胞中低表达,抑制恶性胶质瘤干细胞的增殖和分化^[13]。miR-451 还可以通过改变癌基因及细胞周期正向调节因子的表达水平发挥抑瘤作用。

研究表明,miR-409-3p 表达水平在胰腺导管腺癌组织中显著下调^[14]。miR-409-3p 可通过与 PHF10 相互作用而参与细胞的增殖和凋亡^[15]。此外,miR-409-3p 可通过下调血管生成素的表达水平抑制肿瘤的生长、血管形成和新陈代谢^[16]。

由于单个 miRNA 的表达水平的变化可能影响到成百上千功能各异的下游 mRNA,引起多种功能变化,因此通过分析血清/血浆 miRNA 的表达水平与肿瘤发病的关联。血清/血浆 miRNA 可以作为分子生物标志物有效地预测肿瘤的发病及预后,有望开拓生物标志物研究和应用的新领域。

[参考文献]

- [1] 倪泉兴. 胰腺癌的临床流行病学研究现状[J]. 胰腺病学,2006,6(2):65-68
- [2] Zhang YQ,LiM,Wang H,et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis[J]. World J Surg,2009,33(4):698-709
- [3] Torrisani J,Bournet B,du Rieu MC,et al. let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression [J]. Hum Gene Ther,2009,20(8):831-844
- [4] Mathers CD,Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. PLoS Med,2006,3(11):e442
- [5] Jemal A,Siegel R,Ward E,et al. Cancer statistics,2007 [J]. CA Cancer J Clin,2007,57(1):43-66
- [6] Filipowicz W,Bhattacharyya SN,Sonenberg N,et al. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. Nat Rev Genet,2008,9(2):102-114
- [7] Esquela-Kerscher A,Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer,2006,6:259-269
- [8] 张晓娟,董静,马红霞,等. 血清/血浆 microRNA 检测方法探讨与建立[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(4):529-531
- [9] Lee RC,Feinbaum RL,Amruos V,et al. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell,1993,75(5):843-854
- [10] Hu ZB,Chen X,Zhao Y,et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer[J]. Clin Oncol,2010,28(10):1721-1726
- [11] Hu ZB,Dong J,Wang LE,et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls [J]. Carcinogenesis,2012,33(4):828-834
- [12] Liu R,Chen X,Du YQ,et al. Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer[J]. Clin Chem,2012,58(3):1-9
- [13] Kovalchuk O,Filkowski J,Meservy J,et al. Involvement of miR-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin[J]. Mol Cancer Ther,2008,7(7):2152-2159
- [14] Bloomston M,Frankel WL,Petrocca F,et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis[J]. JAMA,2007,297(17):1901-1908
- [15] Li C,Nie H,Wang M,et al. MicroRNA-409-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting PHF10 in gastric cancer[J]. Cancer Lett,2012,320(2):189-197
- [16] Weng C,Dong H,Chen G,et al. miR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation,vascularization and metastasis by targeting angiogenin [J]. Cancer Lett,2012,323(2):171-179

[收稿日期] 2012-07-17