

肾透明细胞癌血浆 miR-210、miR-378 的表达及临床意义^{*}

李东亮¹ 舒博¹ 唐双阳¹ 毕兴¹ 陈鹏¹

〔摘要〕 目的:分析肾透明细胞癌患者和健康人群中循环 miR-210 和 miR-378 表达差异及其临床意义。方法:收集肾透明细胞癌患者和健康人群血液标本分别为 22 例和 20 例。采用实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测 miR-210 和 miR-378 在肾透明细胞癌患者和健康人群血浆的表达水平,分析其表达水平与临床病理特征的关系。结果:miR-210、miR-378 在肾透明细胞癌患者血浆中表达值 $[(1.76 \pm 1.88), (0.21 \pm 0.19)]$ 显著高于其健康人群中的表达值 $[(0.55 \pm 0.79), (0.04 \pm 0.05)]$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-210 的表达水平与肿瘤的病理分期(TNM 分期)有关($P < 0.05$);而与患者性别和年龄、民族、肿瘤大小和病理核分级(Furman 分级)无明显关系($P > 0.05$)。而 miR-378 的表达水平与患者性别和年龄、民族、肿瘤大小、病理分期和病理核分级无明显关系($P > 0.05$)。miR-210 和 miR-378 在诊断肾透明细胞癌的 AUC 分别为 0.803 和 0.802($P < 0.05$)。灵敏度分别为 0.818 和 0.682,特异度分别为 0.80 和 0.90。结论:血浆 miR-210、miR-378 与肾透明细胞癌的发生发展有关,可能成为肾透明细胞癌的筛查诊断的生物学指标。

〔关键词〕 肾透明细胞癌;实时荧光定量;miRNAs;血浆

doi: 10.13201/j.issn.1001-1420.2015.10.009

〔中图分类号〕 R737.11 **〔文献标识码〕** A

Expression of plasma miR-210, miR-378 and theirs clinical significance in renal clear cell carcinoma

LI Dongliang SHU Bo TANG Shuangyang BI Xing CHEN Peng

(Department of Urology, Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi, 830011, China)

Corresponding author: CHEN Peng, E-mail: chenpeng9@126.com; BI Xing, E-mail: 44272603@qq.com

Abstract Objective: To investigate the difference of plasma miR-210 and miR-378 expression between patients with renal clear cell carcinoma and healthy people, and evaluate the clinical significance. **Method:** We collected blood specimens from 22 renal clear cell carcinoma patients and 20 healthy people. The level of plasma miR-210 and miR-378 were quantified by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the relationship between miR-210, miR-378 level and clinical and pathological factors was explored. **Result:** The expression of plasma miR-210 and miR-378 in renal clear cell carcinoma $[(1.76 \pm 1.88), (0.21 \pm 0.19)]$ was significantly higher than that in the healthy people $[(0.55 \pm 0.79), (0.04 \pm 0.05)]$. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The high expression of miR-210 was associated with pathological stage (TNM stage) ($P < 0.05$). There was no statistical difference of the expression of miR-210 among different genders, ages, nations, tumor sizes and Furman grades by the statistical analysis ($P > 0.05$). The high expression of miR-378 was not associated with gender, age, nation, tumor size, pathological stage and Furman grade by the statistical analysis ($P > 0.05$). The study show that plasma miR-210 and miR-378 have significant diagnostic value for renal clear cell carcinoma. MiR-210 showed the areas under the ROC curve was 0.803 ($P < 0.05$) with 81.8% in sensitivity and 80.0% in specificity, and miR-378 showed the areas under the ROC curve was 0.802 ($P < 0.05$) with 68.2% in sensitivity and 90.0% in specificity. **Conclusion:** Plasma miR-210 and miR-378 play a role in the development and progression of renal clear cell carcinoma and may be potential biomarkers in the screening diagnosis of renal clear cell carcinoma.

Key words renal clear cell carcinoma; RT-PCR; miRNAs; plasma

微小 RNA(miRNA)是一种长度为 18~22 个

核苷酸组成的内源性非编码小分子 RNA,可以通过与靶基因序列特异性翻译在转录水平对基因表达进行调节,从而参与多种重要的生物学进程。有研究表明,miRNAs 具有癌基因或抑癌基因的作

^{*} 基金项目:乌鲁木齐市科技基金(编号 Y131310005)

¹ 新疆医科大学附属肿瘤医院泌尿外科(乌鲁木齐,830011)

通信作者:陈鹏,E-mail: chenpeng9@126.com;毕兴,E-mail: 44272603@qq.com

用,它在细胞的生长、增殖和凋亡过程中发挥着重要作用,其表达水平的异常与许多肿瘤的发生、发展相关^[1]。本研究通过实时荧光定量 PCR 技术检测肾透明细胞癌患者和健康人群血循环中 miR-210 和 miR-378 表达情况,分析患者组与健康人群组间表达的差异。并分析血浆中 miR-210、miR-378 与肾透明细胞癌临床病理特征之间的关系,进一步探讨 miR-210、miR-378 在肾透明细胞癌的发生发展及诊断中意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院 2013 年 4 月~2014 年 7 月术前肾透明细胞癌患者(试验组)外周血液标本和门诊体检健康人群即志愿者(对照组)外周血液标本分别为 22 例和 20 例。试验组均经我院病理切片证实为肾透明细胞癌,并排除其他肾脏相关疾病且未行任何肿瘤相关治疗(放疗、化疗及生物治疗)。收集记录患者一般资料性别、年龄、民族、肿瘤组织大小、肿瘤核分级、临床分期。对照组为门诊体检健康志愿者。试验组和对照组均于清晨空腹在无菌条件下用 EDTA 管抽取外周血 5 ml,室温下 3 000 转/min 离心 10 min,取上清液 2 ml,装入无酶 EP 管,再存入-80℃低温冰箱保存。试验组与对照组的一般资料见表 1。

表 1 试验组与对照组的一般资料

项目	试验组	对照组
平均年龄/岁	56.09±11.16	54.5±11.22
性别比例(男:女)	17:5	16:4
民族比例(汉族:维族)	17:5	18:2
例数	22	20

1.2 方法

血浆总 RNA 的提取:采用 miRcute、miRNA 提取分离试剂盒(北京天根生物科技公司,产品目录号:DP501)提取血浆总 miRNA。具体试验步骤严格按照试验说明书进行操作。紫外分光光度仪检测血浆总 RNA 浓度,本试验样本检测 A260/A280 在 1.8~2.0 之间,样本纯度较高。

逆转录反应:本试验 miR-210 和 miR-378 的茎环结构逆转录引物由上海吉玛制药技术有限公司提供设计并合成(具体结构未提供)。应用逆转录试剂盒(大连宝生生物技术公司产品,目录号 takara rr037A)配置 10 μl 逆转录反应体系,反应条件为 42℃反应 15 min,85℃反应 5 s。反应结束后于-20℃冰箱中保存。

实时荧光定量 PCR 反应:miR-210、miR-378 (目的基因)和 U6(内参)的上游和下游引物由北京奥科鼎盛公司合成。其具体结构如下:miR-210 上

游引物为 5'-TTGACCTGTGCGTGTGACA-3', miR-210 下游引物为 5'-TATGGTTGTTCT-GCTCTCTGTCTC-3';miR-378a 上游引物为 5'-TGTCTGAACTGGACTTGGAGTCA-3', miR-378a 下游引物为 5'-TATGGTTGTTCT-GCTCTCTGTCTC-3';U6 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3',U6 下游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

严格按照 SYBRgreen 实时荧光定量 PCR 试剂盒(美国 life 公司 SYBR select master mix 试剂盒)配制 20 μl RT-PCR 反应体系,具体反应条件为:50℃反应 2 min;95℃反应 2 min,95℃反应 15 s,60℃反应 1 min,共计 40 个循环。每个样本均重复 2 次,取其平均值。血浆中 miR-210、miR-378 的相对表达量用 2^{-ΔCt}法计算。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用两独立样本 *t* 检验分析肾透明细胞癌试验组与对照组血浆中 miR-210、miR-378 表达的差异。试验组血浆 miR-210、miR-378 表达水平与肾透明细胞癌的临床病理特征的相关性和 miR-210、miR-378 二者之间的关系运用 Pearson 法进行相关性分析。运用 ROC 曲线下面积分析血浆中 miR-210、miR-378 作为生物学标志物在诊断肾透明细胞癌中的意义。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 试验组与对照组血浆 miR-210、miR-378 表达水平的比较

对试验组和对照组 miR-210、miR-378 表达量采用独立样本 *t* (或 *t'*) 检验,提示试验组血浆中 miR-210、miR-378 表达水平明均显示高于对照组的表达水平。血浆 miR-210 在肾透明细胞癌试验组表达量为(1.76±1.88);对照组表达量为(0.55±0.79)。血浆 miR-378 在试验组表达量为(0.21±0.19);对照组表达量为(0.04±0.05)。两组比较差异均有统计学意义(*P* < 0.01)。详见表 2。

表 2 试验组与对照组血浆 miR-210 与 miR-378 表达情况
 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-210	miR-378
试验组	22	1.76±1.88	0.21±0.19
对照组	20	0.55±0.79	0.04±0.05
<i>t</i> 值		2.76	3.95
<i>P</i> 值		0.01	0.01

2.2 肾透明细胞癌试验组血浆 miR-210、miR-378 表达量与临床病理特征的关系

肾透明细胞癌试验组血浆 miR-210、miR-378

表达水平与临床病理特征的相关性运用 Pearson 法进行相关分析。通过分析,提示血浆中 miR-210 的表达水平与肿瘤的病理分期(采用 2010 年 AJCC 的 TNM 分期)有相关性($P < 0.05$),而与患者的性别、年龄、民族、肿瘤大小和病理核分级(Furman 分级)无明显关系($P > 0.05$)。血浆中 miR-378 的表达水平与患者的性别、年龄、民族、肿瘤大小、肿瘤病理分期及病理分级无明显关系($P > 0.05$)。详见表 3。

表 3 肾透明细胞癌试验组血浆 miR-210、miR-378 的表达与临床病理特征的关系

指标	例数	miR-210	r 值	P 值	miR-378	r 值	P 值
性别							
男	17	1.96±2.07	-0.208	0.256	0.19±0.19	0.25	0.17
女	5	1.07±0.76			0.29±0.17		
年龄							
≥50 岁	15	1.82±2.03	-0.045	0.805	0.27±0.19	-0.351	0.055
<50 岁	5	1.62±1.63			0.10±0.12		
民族							
汉族	17	1.66±1.97	0.172	0.347	0.20±0.18	0.05	0.784
维族	5	2.09±1.67			0.25±0.22		
肿瘤大小							
≥7 cm	5	2.78±1.74	0.351	0.055	0.11±0.20	-0.335	0.066
<7 cm	17	1.45±1.86			0.24±0.18		
病理分期							
早期	14	1.03±0.65	0.362	0.048	0.24±0.16	-0.286	0.116
中晚期	8	3.03±2.62			0.16±0.23		
核分级(Furman 分级)							
高分化	14	1.44±1.23	0.012	0.946	0.19±0.17	0.087	0.633
中低分化	8	2.29±2.68			0.25±0.21		

2.3 血浆中 miR-210 、miR-378 在肾透明细胞癌诊断中的意义

通过对试验组和对照组 miR-210、miR-378 表达量的分析得出试验组血浆中 miR-210 和 miR-378 表达水平均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。绘制 ROC 曲线,运用 ROC 曲线下面积判断 miR-210、miR-378 诊断肾透明细胞癌的诊断价值。血浆中 miR-210 用于诊断肾透明细胞癌的 ROC 曲线下 AUC 为 0.803。参照对照组血浆中 miR-210 的表达量的 95%可信区间的上限为阳性诊断,即当血浆中 miR-210 的表达量在 $2^{-\Delta Ct}$ 在 ≥ 0.780 时,其诊断的灵敏度为 81.8%,特异度为 80%。同样血浆中 miR-378 在用于诊断肾透明细胞癌的 ROC 曲线下 AUC 为 0.802。当血浆中 miR-378 的表达量 $2^{-\Delta Ct}$ 在 ≥ 0.104 时,灵敏度为 68.2%,特异度为 90%(图 1)。将 miR-210、miR-378 二者合并做串联试验和并联试验并分别计算其灵敏度和特异度,二者并联试验的灵敏度为 100%,串联试验的特异度为 90%(表 4)。通过分析 miR-210、miR-378 在诊断肾透明细胞癌中的诊断价值,得出 miR-210、miR-378 可以作为肾透明细胞癌的生物标志物。ROC 曲线下面积 ≤ 0.7 表示诊断价值较低; $0.7 < \text{ROC 曲线下面积} \leq$

0.9 表示诊断价值中等;ROC 曲线下面积 > 0.9 表示诊断价值较高。

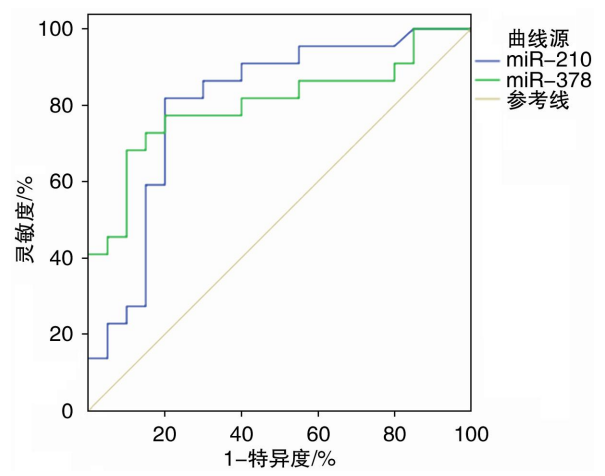


图 1 血浆中 miR-210 和 miR-378 在诊断肾透明细胞癌的 ROC 曲线

2.4 肾透明细胞癌试验组血浆 miR-210 和 miR-378 表达量的相关性分析

运用相关性分析,22 例肾透明细胞癌患者血浆中 miR-210 和 miR-378 表达量无明显相关性, $r=0.187, P=0.225$ 。

表 4 血浆中 miR-210 和 miR-378 在诊断肾透明细胞癌 AUC 及灵敏度和特异度

指标	AUC	95%CI	P 值	灵敏度	特异度
miR-210	0.803	0.662~0.945	0.01	0.818	0.800
miR-378	0.802	0.664~0.940	0.01	0.682	0.900
miR-210 和 miR-378 并联	0.750	0.594~0.906	0.06	1.000	0.500
miR-210 和 miR-378 串联	0.768	0.620~0.916	0.03	0.636	0.900

3 讨论

肾细胞癌(renal cell carcinoma,RCC)是泌尿系统常见的恶性肿瘤,占成人肾脏恶性肿瘤的90%^[2]。目前肾细胞癌的治疗以手术为主,早期行根治性手术切除的患者预后良好,但仍有30%的RCC患者在初诊即发现转移,晚期肾细胞癌对放化疗均不敏感,其5年生存率不到10%^[3]。因此,寻找肾细胞癌的筛查及诊断的生物学标志物具有重要意义。

本试验通过对试验组和对照组血浆中miR-210、miR-378表达量的分析得出试验组中miR-210和miR-378表达水平均明显高于对照组($P<0.01$)。运用ROC曲线下面积分析血浆中miR-210、miR-378在肾透明细胞癌中的诊断价值,miR-210的ROC曲线下面积为0.803,灵敏度为81.8%,特异度为80%;miR-378的ROC曲线下面积为0.802,灵敏度为68.2%,特异度为90%。因此,我们认为miR-210、miR-378可以作为肾透明细胞癌生物学标志物。这一结论与当前的一些研究相符。如Zhao等^[4]通过对68例肾透明细胞癌患者和42例健康对照的血清进行实时PCR检测得出血清中的miR-210可作为一种新型的肾透明细胞癌分子诊断生物标志物。Redova等^[5]通过对15例肾透明细胞癌患者和12例健康对照者的血清miRNA进行了定量RT-PCR试验,认为血清中的miR-378是肾细胞癌的潜在生物标志物。

miRNAs的表达情况与肿瘤的预后具有相关性。现有研究表明,miR-210在肾癌^[6]、肺癌^[7]、骨肉瘤^[8]、胃癌^[9]、胰腺癌^[10]、大肠癌^[11]、肝癌^[12]等癌症组织中表达上调。Toyama等^[13]通过对161例乳腺癌患者几个影响生存的变量进行相对危险相关分析认为miR-210是乳腺癌的一个独立因素,低表达组的预后要优于miR-210高表达组。而miR-378在肿瘤预后相关的研究较少, Lee等^[14]在对卵巢癌的研究发现高分级的浆液性卵巢癌中miR-378呈现低表达,且患者生存期较短。当前的研究大都认为循环miRNA主要来源于细胞的主动分泌、凋亡或坏死细胞以及循环细胞的裂解^[15,16]。认为血浆中miRNAs的表达与肿瘤组织中的表达及预后因素上具有一定的联系。本研究就肾透明细胞癌患者组血浆miR-210、miR-378表达量与临床病理特征的关系的研究显示血浆中

miR-210的表达水平与肾透明细胞癌的病理分期有关($P<0.05$);miR-378与肾透明细胞癌的病理分期无相关性($P>0.05$)。提示miR-210的高表达与肾透明细胞癌患者预后有一定的相关性,可能提示预后较差。在对其他一些因素分析显示miR-210、miR-378均与性别、年龄、民族、肿瘤大小和病理核分级等因素无明显关系($P>0.05$)。由于在肾透明细胞癌患者中血浆miRNAs与预后的相关性研究目前可参考的文献较少。Jung等^[17]发现miR-210在肾癌组织中上表达上调,miR-210与肾透明细胞癌的预后无关。周亮等^[18]对52例不同阶段的肾透明细胞癌及其癌旁组织进行检测,也发现miR-210的表达量与肾癌的病理分期无显著的相关性。本研究血浆中miR-210表达与预后关系与组织中的研究结果不同。血浆中miR-210可否作为判断肾透明细胞癌的预后的一个因素仍需进一步试验验证。

目前关于不同的miRNAs在同一肿瘤发生过程中的相互作用关系如协同作用或拮抗作用的相关研究较少。本研究就22例肾透明细胞癌患者血浆中miR-210、miR-378之间的关系运用相关性分析,得出miR-210和miR-378在肾透明细胞癌的发生发展中是2个独立因素,他们之间无相关性由于在不同个体之间以及肿瘤本身之间的表达差异、标本的采集、保存方式、试验研究的方法等原因不同试验的结果可能不同,本试验由于样本数量有限,研究结果还需要在大样本、多中心的临床试验中进一步验证。

综上所述,我们认为肾透明细胞癌患者血浆中miR-210、miR-378相较于健康人群呈现高表达,可能起到了类似癌基因作用,血浆中miR-210、miR-378可以作为肾透明细胞癌患者筛查的生物学指标。血浆中miR-210的表达水平与肾透明细胞癌的病理分期有关,可否作为判断预后的因素需进一步验证。

[参考文献]

1 Manikandan J, Aarthi J J, Kumar S D, et al. Oncomirs: The potential role of non coding MicroRNAs in understanding cancer[J]. Bioinformation, 2008, 2(8): 330-334.

2 Eble J N, Sauter G, Epstein J I, et al. Pathology and genetics tumours of the urinary system and male genital

- organs[M]. Lyoh: International Agency for Research on Cancer, 2004: 4—6.
- 3 Ljungberg B. Prognostic factors in renal cell carcinoma [J]. *Scand J Surg*, 2004, 93(2): 118—125.
 - 4 Zhao A, Li G, Péc'h M, et al. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 94(1): 115—120.
 - 5 Redova M, Poprach A, Nekvindova J, et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 55.
 - 6 Redova M, Poprach A, Besse A, et al. miR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(1): 481—491.
 - 7 Grosso S, Doyen J, Parks S K, et al. MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radio resistance in human lung cancer cell lines [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e544.
 - 8 Cai H, Lin L, Cai H, et al. Prognostic evaluation of microRNA-210 expression in pediatric osteosarcoma [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(2): 499.
 - 9 Rotkrue P, Shimada S, Mogushi K, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(4): 932—940.
 - 10 Chen W Y, Liu W J, Zhao Y P, et al. Induction, modulation and potential targets of miR-210 in pancreatic cancer cells [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2012, 11(3): 319—324.
 - 11 Ota T, Doi K, Fujimoto T, et al. KRAS up-regulates the expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a three-dimensional-specific manner in DLD-1 colorectal cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(6): 2271—2275.
 - 12 Yang W, Sun T, Cao J, et al. Down regulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radio sensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(8): 944—954.
 - 13 Toyama T, Kondo N, Endo Y, et al. High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple negative breast cancer patients [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42 (4): 256—263.
 - 14 Lee C H, Subramanian S, Beck A H, et al. MicroRNA profiling of BRCA1/2 mutation carrying and non-mutation carrying high grade serous carcinomas of ovary[J]. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7314.
 - 15 Skrzypek K, Tertilt M, Golda S, et al. Interplay between heme oxygenase-1 and miR-378 affects non-small cell lung carcinoma growth, vascularization, and metastasis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(7): 644—660.
 - 16 Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more[J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(2): 43—51.
 - 17 Jung M, Mollenkopf H J, Grimm C, et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell Cancer identifies a robust signature to define renal malignancy[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(9B): 3918—3928.
 - 18 周亮, 冷慧敏, 翟庆娜, 等. 肾癌中 miR-210 的异常表达及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 3(16): 468—471.

(收稿日期: 2015-06-08)