

原发性胆囊癌患者血清 miR-335 和 miR-155 水平及其临床意义

吴唐¹ 李应明² 黄聪斐¹ 李小佩¹

¹海南省第二人民医院检验科,五指山市 572200; ²海口市人民医院检验科 571700

通信作者:李应明,Email: sjcszx999@163.com

【摘要】 目的 探讨原发性胆囊癌(PCG)患者血清微小 RNA-335(miR-335)和微小 RNA-155(miR-155)水平及其临床意义。方法 选取2016年1月至2018年10月海南省第二人民医院收治的96例PCG患者(PCG组)和50例体检健康者(对照组),采用实时定量PCR(RT-PCR)检测各组血清miR-335和miR-155水平,分析血清miR-335和miR-155水平与PCG患者临床病理特征的关系。应用ROC曲线分析miR-335和miR-155对PCG的诊断价值。结果 PCG组血清miR-335水平明显低于对照组(1.50 ± 0.42 vs 3.65 ± 1.18 , $t = 10.319$, $P < 0.001$),PCG组血清miR-155水平明显高于对照组(3.18 ± 0.61 vs 0.74 ± 0.12 , $t = 13.627$, $P < 0.001$)。在PCG患者中血清miR-335和miR-155水平均与TNM分期($t = 4.863$, $P = 0.024$; $t = 5.117$, $P = 0.008$)及淋巴结转移($t = 5.725$, $P < 0.001$; $t = 6.802$, $P < 0.001$)相关。ROC曲线分析显示,miR-335和miR-155诊断PCG的临界值分别为1.18、2.35,两项联合诊断PCG的曲线下面积最大,为0.920,95%CI为0.863~0.977,其敏感性和特异性为93.8%和85.7%。结论 血清低水平miR-335和高水平miR-155与PCG较高的TNM分期及淋巴结转移相关,两项联合检测有助于提高PCG诊断率。

【关键词】 胆囊肿瘤;微RNAs

基金项目:海南省医学科研基金(17A601128)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2019.05.003

Serum levels and significances of miR-335 and miR-155 in primary gallbladder cancer

Wu Tang¹, Li Yingming², Huang Congfei¹, Li Xiaopei¹

¹Department of Clinical Laboratory, Second People's Hospital of Hainan Province, Wuzhishan 572200, China;

²Department of Clinical Laboratory, Haikou People's Hospital, Haikou 571700, China

Corresponding author: Li Yingming, Email: sjcszx999@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the serum levels and clinical significances of microRNA-335(miR-335) and microRNA-155(miR-155) in patients with primary gallbladder cancer(PCG). **Methods** A total of 96 PCG patients(PCG group) and 50 healthy controls(control group) admitted to the Second People's Hospital of Hainan Province from January 2016 to October 2018 were selected. Real-time quantitative PCR(RT-PCR) was used to detect the serum levels of miR-335 and miR-155 in each group. The relationships between miR-335 and miR-155 levels and clinical pathological characteristics of PCG patients were analyzed. The diagnostic value of miR-335 and miR-155 in PCG was analyzed by ROC curve. **Results** The serum level of miR-335 in PCG group was significantly lower than that in the control group (1.50 ± 0.42 vs. 3.65 ± 1.18 , $t = 10.319$, $P < 0.001$). The serum level of miR-155 in PCG group was significantly higher than that in the control group (3.18 ± 0.61 vs. 0.74 ± 0.12 , $t = 13.627$, $P < 0.001$). The serum levels of miR-335 and miR-155 in PCG patients were correlated with TNM stage ($t = 4.863$, $P = 0.024$; $t = 5.117$, $P = 0.008$) and lymph node metastasis ($t = 5.725$, $P < 0.001$; $t = 6.802$, $P < 0.001$). ROC curve analysis showed that the critical values of serum miR-335 and miR-155 for diagnosing PCG were 1.18 and 2.35, respectively. The area under the curve of the two combined diagnosis of PCG (0.920, 95% CI: 0.863-0.977) was the largest, with sensitivity and specificity of 93.8% and 85.7%. **Conclusion** The low serum level of miR-335 and high level of miR-155 are associated with the higher TNM stage and lymph node metastasis of PCG, and the combined detection of the two is helpful to improve the diagnostic rate of PCG.

【Key words】 Gallbladder neoplasms; MicroRNAs

Fund program: Hainan Medical Research Fund of China (17A601128)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2019.05.003

原发性胆囊癌(primary gallbladder cancer, PCG)是一种恶性程度很高的消化系统肿瘤,其发病率和死亡率近年来有升高的趋势,严重危害人类的生命健康^[1]。传统的肿瘤标志物是早期筛查 PCG 的常用指标,但其对 PCG 诊断的敏感性和特异性均不高^[2]。

近期的研究发现,微小 RNA(microRNA, miRNA)在细胞分化、增殖、控制细胞周期、凋亡和新陈代谢等过程的基因调控中起重要作用,其中微小 RNA-335(miR-335)和微小 RNA-155(miR-155)在多种恶性肿瘤中异常表达,并能通过调控多种信号通路参与肿瘤的发生发展^[3-5]。本研究采用实时定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)检测 PCG 患者血清 miR-335 和 miR-155 水平,探讨其对 PCG 的诊断价值,旨在为 PCG 的诊断及靶向治疗提供可靠的生物学标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月至 2018 年 10 月海南省第二人民医院收治的 PCG 患者 96 例,其中男性 44 例,女性 52 例,年龄(53.60 ± 10.34)岁,年龄范围 34 ~ 81 岁。纳入标准:①通过手术切除并且术后病理检查诊断为 PCG;②临床及随访资料完整者。排除标准:①有严重心、肝、肾疾病及其他恶性肿瘤者;②已接受放疗、化疗及手术治疗者;③生活不能自理,不能配合本次研究者。

96 例 PCG 患者中,高分化腺癌 15 例、中分化腺癌 53 例、低分化腺癌 28 例;临床 TNM 分期: I 期 12 例、II 期 26 例、III 期 33 例、IV 期 25 例;有淋巴结转移 43 例,无淋巴结转移 53 例。另选取同期海南省第二人民医院体检健康者 50 例作为对照组,其中男性 21 例,女性 29 例,年龄(52.28 ± 10.14)岁,年龄范围 35 ~ 78 岁。本研究通过海南省第二人民医院伦理委员会批准(批准号:SDEYY2016-XH03108),所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 RT-PCR 检测

采集所有研究对象的空腹静脉血 5 ml,置于未加抗凝剂的离心管中,离心 10 min(3 000r/min,离心半径 12 cm)分离血清, - 80 °C 低温冰箱保存待测。在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行 RT-PCR,反应条件为:95 °C 30 s 预变性,95 °C 5 s 变性,58 °C 30 s 退火,72 °C 30 s 延伸,进行 40 个循

环,每个标本重复做 3 个孔位。溶解曲线进行分析的时间为反应完成后(15 s 95 °C, 1 min 60 °C, 15 s 95 °C, 15 s 60 °C),每个反应体系中荧光信号达到所设定阈值所经历的循环数即为 Ct 值,以 U6 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNA 的相对表达水平,其中 $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{U6}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{实验组标本} - \Delta Ct_{对照组标本}$ 。

1.3 引物设计与合成

miR-335 正向引物:ACGTCGTATGACTGATCGA-CATC,反向引物:ACTCTGCCTACTACACGAATT; miR-155 正向引物:AGCTAGTGTACCTTATATGACTG,反向引物:AGTGCTCGTTCTACTCACTCG。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据,所有连续变量均通过正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。绘制 ROC 曲线分析 miR-335 和 miR-155 诊断 PCG 的价值,曲线下面积(area under curve, AUC)的比较采用 *Z* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PCG 组和对照组一般临床资料比较

PCG 组与对照组的性别、年龄、体重指数、血压、肿瘤家族史、糖尿病史、高血压史、饮酒史及吸烟史比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。

表 1 PCG 组和对照组一般临床资料比较

项目	PCG 组 (n = 96)	对照组 (n = 50)	χ^2/t 值	<i>P</i> 值
女性[例(%)]	52(54.2)	29(58.0)	0.196	0.658
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	53.60 ± 10.34	52.28 ± 10.14	0.617	0.462
体重指数(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	22.83 ± 2.35	22.56 ± 2.24	0.751	0.380
收缩压(mm Hg, $\bar{x} \pm s$)	120.35 ± 13.28	117.82 ± 12.56	0.704	0.405
舒张压(mm Hg, $\bar{x} \pm s$)	83.46 ± 7.30	81.30 ± 7.52	0.805	0.361
肿瘤家族史[例(%)]	9(9.4)	2(4.0)	1.363	0.243
糖尿病史[例(%)]	14(14.6)	4(8.0)	1.318	0.251
高血压史[例(%)]	22(22.9)	7(14.0)	1.642	0.200
饮酒史[例(%)]	25(26.0)	11(22.0)	0.289	0.591
吸烟史[例(%)]	23(24.0)	9(18.0)	0.682	0.409

注:PCG 为原发性胆囊癌;对照组为同期体检健康者;1 mm Hg = 0.133 kPa

2.2 PCG 组和对照组血清 miR-335 和 miR-155 水平比较

PCG 组患者血清 miR-335 水平明显低于对照组, miR-155 水平明显高于对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 见表 2。

表 2 PCG 组和对照组血清 miR-335 和 miR-155 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血清 miR-335 水平	血清 miR-155 水平
PCG 组 ($n=96$)	1.50 ± 0.42	3.18 ± 0.61
对照组 ($n=50$)	3.65 ± 1.18	0.74 ± 0.12
t 值	10.319	13.627
P 值	<0.001	<0.001

注: PCG 为原发性胆囊癌; 对照组为同期体检健康者; miR-335 为微小 RNA-335; miR-155 为微小 RNA-155

2.3 PCG 患者血清 miR-335 和 miR-155 水平与临床病理特征的关系

PCG 患者血清 miR-335 和 miR-155 水平与 TNM 分期和淋巴结转移相关 (均 $P < 0.05$); 而与患者年龄、性别、肿瘤直径、分化程度及肿瘤浸润深度无关 (均 $P > 0.05$), 见表 3。

表 3 96 例 PCG 患者血清 miR-335 和 miR-155 水平与临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	例数	miR-335 水平	t 值	P 值	miR-155 水平	t 值	P 值
年龄(岁)							
≥60	36	1.45 ± 0.36	0.679	0.425	3.24 ± 0.64	0.480	0.571
<60	60	1.56 ± 0.47			3.08 ± 0.52		
性别							
男	44	1.47 ± 0.35	0.620	0.463	3.32 ± 0.68	0.716	0.402
女	52	1.53 ± 0.45			3.04 ± 0.53		
TNM 分期							
I ~ II 期	38	1.94 ± 0.71	4.863	0.024	2.05 ± 0.27	5.117	0.008
III ~ IV 期	58	1.12 ± 0.18			4.13 ± 1.26		
淋巴结转移							
有	43	1.04 ± 0.13	5.725	<0.001	4.30 ± 1.34	6.802	<0.001
无	53	2.06 ± 0.75			1.97 ± 0.22		
肿瘤直径(cm)							
≤3	41	1.58 ± 0.49	0.804	0.347	3.02 ± 0.51	0.916	0.285
>3	55	1.43 ± 0.34			3.35 ± 0.70		
分化程度							
低分化	28	1.60 ± 0.52	0.583	0.487	3.12 ± 0.60	0.471	0.579
中或高分化	68	1.48 ± 0.41			3.28 ± 0.65		
肿瘤浸润深度							
Tis ~ T ₂	37	1.64 ± 0.56	1.315	0.162	2.96 ± 0.48	1.708	0.106
T ₃ ~ T ₄	59	1.41 ± 0.30			3.42 ± 0.73		

注: PCG 为原发性胆囊癌; miR-335 为微小 RNA-335; miR-155 为微小 RNA-155

2.4 miR-335、miR-155 及两项联合诊断 PCG 的价值
miR-335、miR-155 诊断 PCG 的临界值分别为 1.18、2.35。两项联合诊断 PCG 的 AUC(95% CI) 为 0.920(0.863 ~ 0.977), 明显高于单项 miR-335 的 0.802(0.742 ~ 0.865) 及单项 miR-155 的 0.838(0.784 ~ 0.896), 差异均有统计学意义 ($Z = 6.217, P < 0.001; Z = 5.704, P = 0.003$), 其敏感性和特异性分别为 93.8% 和 85.7%, 见图 1 和表 4。

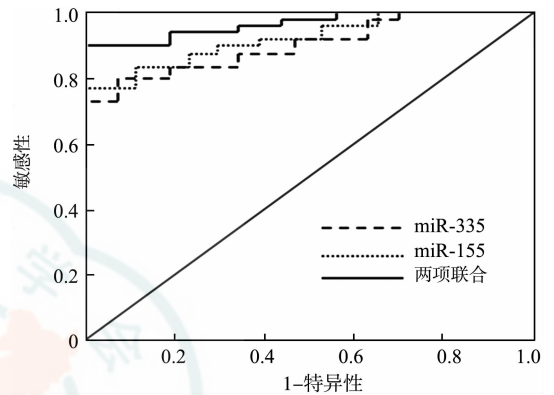


图 1 miR-335、miR-155 及两项联合诊断 96 例 PCG 的 ROC 曲线
注: miR-335 为微小 RNA-335; miR-155 为微小 RNA-155; PCG 为原发性胆囊癌

表 4 miR-335、miR-155 及两项联合诊断 96 例 PCG 的价值

项目	临界值	AUC(95% CI)	敏感性 (%)	特异性 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	阳性似然比	阴性似然比
miR-335	1.18	0.802(0.742~0.865)	79.6	77.5	80.6	76.2	3.538	0.263
miR-155	2.35	0.838(0.784~0.896)	80.4	83.0	79.5	84.6	4.729	0.236
两项联合	-	0.920(0.863~0.977)	93.8	85.7	88.6	90.4	6.559	0.072

注:miR-335 为微小 RNA-335;miR-155 为微小 RNA-155;PCG 为原发性胆囊癌;AUC 为曲线下面积

3 讨论

PCG 的发生发展是一个多基因参与调节的过程,从分子水平了解 PCG 的发病机制对提高 PCG 的早期诊断水平、改善患者的预后具有重要意义^[6]。miRNA 是一类长度为 21~25 nt 的内源性单链非编码 RNA 小分子,可激活多种细胞内信号通路,参与调控细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和分化等过程,从而对恶性肿瘤的发生发展产生影响。近年来研究发现,miR-335 和 miR-155 可以通过多种信号通路在细胞周期、超甲基化、血管生成等方面促进或抑制恶性肿瘤的发生、浸润、转移和耐药等,可能为恶性肿瘤的诊断和治疗开辟新的思路^[7-8]。Yang 等^[9]研究表明,miRNA 异常表达参与胆囊癌的肿瘤恶性进程,并与肿瘤浸润、转移及复发相关,为临床治疗胆囊癌提供了新的靶点和思路。束翌俊等^[10]通过检测胆囊癌患者和邻近正常组织标本微小 RNA-29c-5p 表达水平发现,微小 RNA-29c-5p 表达下调与胆囊癌的进展及预后不良相关,并能够作为胆囊癌患者预后的分子标志物。

本研究结果显示,PCG 组患者血清 miR-335 水平明显低于对照组,PCG 组患者血清 miR-155 水平明显高于对照组,提示 miR-335 和 miR-155 在 PCG 患者中异常表达,其可能参与 PCG 的发生发展。miR-155 在 PCG 中上调,属于有致癌基因作用的 miRNA,其可通过负性调控 PCG 抑癌基因影响细胞的分化和凋亡,从而促进 PCG 的发展;而 miR-335 在 PCG 中下调,则起到抑癌基因的作用。Yang 等^[11]研究显示,在胆囊癌中异常表达的 miRNA 既有上调也有下调,这些 miRNA 具有癌基因和抑癌基因的作用,共同参与胆囊癌的发生发展。本研究中,PCG 患者血清 miR-335 和 miR-155 水平与 TNM 分期及淋巴结转移相关,其中 III~IV 期的 PCG 患者其血清 miR-155 水平明显高于 I~II 期患者,血清 miR-335 水平明显低于 I~II 期患者;有淋巴结转移的 PCG 患者其血清 miR-155 水平明显高于无淋巴结转移者,血清 miR-335 水平明显低于无淋巴结转移者。分析原因可能是由于存在淋巴结转移的 PCG 患者其肿瘤负荷往往较大,肿瘤组织可释放更多的具有原癌基因作用的

miR-155 进入血液,同时可降低机体原有的具有抑癌作用的 miR-335 的水平,进而参与 PCG 的发生发展。Peng 等^[12]的研究发现,miR-335 在胆囊癌组织中的表达低于癌旁不典型增生的胆囊上皮组织,同时 miR-335 的表达水平在高级别组织学分级、高病理学分期和临床分期以及淋巴结转移的胆囊癌组织中明显减少,表明 miR-335 低表达可能与肿瘤的侵袭性有关。亦有研究表明,miR-155 在胆囊癌中高表达,与肿瘤增殖、侵袭、淋巴结转移和不良预后有关^[13]。ROC 曲线分析结果显示,miR-335 和 miR-155 对诊断 PCG 均具有一定的价值,且两项联合诊断 PCG 的 AUC 优于单项诊断,其敏感性和特异性为 93.8% 和 85.7%。说明 miR-335 和 miR-155 两项联合检测有助于提高 PCG 诊断的准确性,并有望作为分析其发病机制的潜在标志物。Zhang 等^[14]研究显示,中国人群中胆囊癌组织 miR-155 表达水平明显高于正常胆囊组织,高水平的 miR-155 是患者预后不良的指标,miR-155 有望作为胆囊癌诊断的潜在生物学标志物。韩超和王健东^[15]研究认为,miRNA 参与了胆囊癌进展的各个阶段,调控胆囊癌的多个生物学程序,在胆囊癌进展过程中发挥关键作用,同时也为胆囊癌的临床诊断与治疗提供了依据。另有研究表明,胆囊癌患者 miRNA 表达水平降低,miRNA 可作为胆囊癌诊断、制定治疗方案和预后判断的参考指标^[16]。

综上所述,血清 miR-335 低表达和 miR-155 高表达与 PCG 患者较高的 TNM 分期及淋巴结转移相关,miR-335 和 miR-155 两项联合检测对诊断 PCG 具有较好的敏感性和特异性。但目前临床实践中还缺乏大样本的随访研究支持,miRNA 的来源也没有统一的标准,仍需循证医学研究进一步证实 miR-335 和 miR-155 在 PCG 中的临床应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Rahman R, Simoes EJ, Schmaltz C, et al. Trend analysis and survival of primary gallbladder cancer in the United States: a 1973-2009 population-based study[J]. Cancer Med, 2017, 6(4): 874-880. DOI: 10.1002/cam4.1044.
- [2] Shen HX, Song HW, Xu XJ, et al. Clinical epidemiological survey of

- gallbladder carcinoma in northwestern China, 2009-2013: 2379 cases in 17 centers[J]. *Chronic Dis Transl Med*, 2017, 3(1): 60-66. DOI: 10.1016/j.cdtm.2017.01.003.
- [3] Slotwiński R, Lech G, Slotwińska SM. MicroRNAs in pancreatic cancer diagnosis and therapy[J]. *Cent Eur J Immunol*, 2018, 43(3): 314-324. DOI: 10.5114/cej.2018.80051.
- [4] Liu J, Bian T, Feng J, et al. miR-335 inhibited cell proliferation of lung cancer cells by target Tra2β[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(2): 289-296. DOI: 10.1111/cas.13452.
- [5] Cao H, Huang S, Liu A, et al. Up-regulated expression of miR-155 in human colonic cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(3): 604-607. DOI: 10.4103/0973-1482.175432.
- [6] Kai D, Yannian L, Yitian C, et al. Circular RNA HIPK3 promotes gallbladder cancer cell growth by sponging microRNA-124[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 863-869. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.088.
- [7] Wang F, Li L, Piontek K, et al. Exosome miR-335 as a novel therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2018, 67(3): 940-954. DOI: 10.1002/hep.29586.
- [8] Khalighfar S, Alizadeh AM, Irani S, et al. Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17981. DOI: 10.1038/s41598-018-36321-3.
- [9] Yang L, Huang S, Ma H, et al. MicroRNA-125b predicts clinical outcome and suppressed tumor proliferation and migration in human gallbladder cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1010428317692249. DOI: 10.1177/1010428317692249.
- [10] 束翌俊, 江林, 包润发, 等. MiR-29c-5p 在胆囊癌组织中的表达及临床意义[J]. *中华普通外科杂志*, 2015, 30(9): 715-718. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-631X.2015.09.014.
- [11] Yang G, Zhang L, Li R, et al. The role of microRNAs in gallbladder cancer[J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 5(1): 7-13. DOI: 10.3892/mco.2016.905.
- [12] Peng HH, Zhang YD, Gong LS, et al. Increased expression of microRNA-335 predicts a favorable prognosis in primary gallbladder carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6(11): 1625-1630. DOI: 10.2147/OTT.S53030.
- [13] Kono H, Nakamura M, Ohtsuka T, et al. High expression of microRNA-155 is associated with the aggressive malignant behavior of gallbladder carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1): 17-24. DOI: 10.3892/or.2013.2443.
- [14] Zhang XL, Chen JH, Qin CK. MicroRNA-155 expression as a prognostic factor in patients with gallbladder carcinoma after surgical resection[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11): 21241-21246.
- [15] 韩超, 王健东. 非编码微小 RNA 在胆囊癌中的表达及功能[J]. *中华消化外科杂志*, 2015, 14(10): 877-880. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2015.10.021.
- [16] Lv YP, Shi W, Liu HX, et al. Identification of miR-146b-5p in tissues as a novel biomarker for prognosis of gallbladder carcinoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(3): 518-522.

(收稿日期:2019-01-10 修回日期:2019-03-10)

(本文编辑:孙娜)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

汉字数字的用法

1. 数字作为词素构成定型词、词组、惯用语、缩略语或具有修辞色彩的词句,应使用汉字。例如:二倍体、一氧化碳、九五规划、十二指肠等。
2. 临近的两个数字并列连用表示概述时,应使用汉字,连用的两个数字之间不加标点,如七八公里、五十二三岁、两三家医院等。
3. 我国清朝以前(含清朝)以及非公历的历史纪年要用汉字。例如:清咸丰十年九月二十日、八月十五中秋节等。
4. 部队医院编号有“第”字者,其编号用汉字。例如:解放军第三〇二医院。
5. 不定数词一律用汉字。例如:任何一个病人,这是一种免疫反应,无一例死亡。

本刊编辑部