

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.012

上皮性卵巢癌患者血清 microRNA-21 的水平及其临床意义研究*

于晓敏¹ 宋克娟² 吕 腾² 焦今文² 姚 勤^{2Δ}

(1 青岛大学 山东 青岛 266071; 2 青岛大学附属医院妇科 山东 青岛 266003)

摘要 目的:检测上皮性卵巢癌患者血清中 microRNA-21 的表达,并探讨其作为标记物预测上皮性卵巢癌化疗耐药患者预后的可行性。**方法:**采用探针型实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测和比较 20 例上皮性卵巢癌患者和 10 例正常人卵巢血清标本中 microRNA-21 的表达,并分析血清 microRNA-21 水平与上皮性卵巢癌患者化疗耐药及其临床病理特征的相关性。**结果:**正常人、上皮性卵巢癌化疗敏感和化疗耐药患者血清中 microRNA-21 的相对表达量分别为 0.573 ± 0.318 、 2.606 ± 1.057 、 26.766 ± 26.710 , 上皮性卵巢癌化疗敏感和化疗耐药患者血清中 miR-21 的相对表达量均显著高于正常人血清中 miR-21 的相对表达量($P < 0.05$), 而上皮性卵巢癌化疗耐药患者血清中 miR-21 表达显著高于上皮性卵巢癌化疗敏感患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上皮性卵巢癌化疗耐药患者血清 miR-21 表达水平与其手术-病理分期无及是否发生淋巴结转移均无明显相关性($P > 0.05$)。**结论:**上皮性卵巢癌患者血清 microRNA-21 水平显著升高,可能作为其化疗耐药的预测参考指标,但血清 microRNA-21 水平与上皮性卵巢癌化疗耐药患者的不良预后并无显著相关性。

关键词:上皮性卵巢癌;microRNA-21;化疗耐药;Taqman 探针;实时荧光定量 PCR

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)06-1050-04

Expression of MicroRNA-21 in Serum of Patients with Epithelial Ovarian Carcinoma and Its Clinical Significances*

YU Xiao-min¹, SONG Ke-juan², LV Teng², JIAO Jin-wen², YAO Qin^{2Δ}

(1 Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266071, China;

2 Dept. of Gynecology, Qingdao University Affiliated Hospital, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of microRNA-21 in epithelial ovarian cancer serum samples and investigate the feasibility of microRNA-21 used as drug-resistant biomarker for the prognostic prediction of drug-resistant ovarian cancer. **Methods:** The expressions of microRNA-21 in serum from 20 cases of epithelial ovarian cancer and 10 cases of normal population were detected and compared by Taqman real-time RT-PCR. The correlations of serum levels of microRNA-21 and drug-resistance and clinicopathological characteristics of epithelial ovarian cancer were analyzed. **Results:** The serum levels of microRNA-21 in normal population, drug-sensitive and drug-resistant epithelial ovarian cancer were respectively 0.573 ± 0.318 , 2.606 ± 1.057 , 26.766 ± 26.710 . The serum levels of microRNA-21 in drug-sensitive and drug-resistant epithelial ovarian cancer were both significantly higher than that of normal population ($P < 0.05$). While the serum levels of microRNA-21 in drug-resistant epithelial ovarian cancer was significantly higher than that of drug-sensitive epithelial ovarian cancer ($P < 0.05$). The serum levels of microRNA-21 in drug-resistant epithelial ovarian cancer had no correlation with surgical-pathological stages and lymph nodes metastasis ($P > 0.05$). **Conclusion:** The serum levels of microRNA-21 in epithelial ovarian cancer was upregulated, which could be used as a reference index for predicting the chemotherapy drug-resistance. But the serum level of microRNA-21 had no correlation with the poor prognosis of patients with drug-resistant epithelial ovarian cancer.

Key words: Epithelial ovarian cancer; MicroRNA-21; Drug-resistant; Taqman probe; Realtime RT-PCR

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1050-04

前言

卵巢癌是女性生殖器常见的恶性肿瘤之一,随着紫杉醇与铂类的联合应用,上皮性卵巢癌的 5 年生存率约为 50%,大多数卵巢癌患者通常在就诊时已为晚期,治疗后 70% 的患者将会复发,难以治愈^[1]。MicroRNA(miRNA)是近年来发现的非编码

小分子 RNA,对基因的表达具有调控作用,miRNA 的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关。研究表明肿瘤患者血清中稳定存在 miRNAs,其表达异常提示去可能作为一类新型的肿瘤标记物^[2,3]。我们前期的研究表明上皮性卵巢癌患者组织和血清 miR-141 的表达水平均显著高于良性卵巢肿瘤患者及正常人,提示其可能参与了上皮性卵巢癌的发生、发展^[4]。近来,多项研

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81100697/H1208);山东省博士基金项目(BS2011SW003)

作者简介:于晓敏(1990-),硕士,医师,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:0532-82919605, E-mail: yuxiaomin_brain@163.com

Δ 通讯作者:姚勤,电话:0532-82919605, E-mail: dr_yaoqin@126.com

(收稿日期:2014-08-28 接受日期:2014-09-25)

究表明 microRNAs 与卵巢癌的化疗耐药具有相关性^[5-7]。多位研究者从细胞水平证实 miR-21 与卵巢癌的顺铂或紫杉醇化疗耐药密切相关^[6,8-10]，但目前尚未见上皮性卵巢癌患者血清中 miRNA 表达水平与化疗耐药相关性的报道。本研究采用 Taqman 探针实时荧光定量 PCR 技术检测和比较上皮性卵巢癌化疗耐药患者和化疗敏感患者及正常人血清 miRNA-21 水平的差异，旨在分析 miRNA-21 与上皮性卵巢癌化疗耐药的相关性，并探讨其作为肿瘤标志物评估卵巢癌化疗耐药患者预后的临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂及仪器 mirVana™ PARIS™ Kit (RNA 提取试剂盒), TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, TaqMan Universal Master Mix II, TaqMan MicroRNA Assays 均购自 ABI 公司。超速低温离心机购自上海力申科学仪器有限公司，分光光度计购自上海第三分析仪器厂，LightCycler480 型实时荧光定量 PCR 仪购自德国 Roche 公司。

1.1.2 临床资料 20 例上皮性卵巢癌血清标本于 2014 年 2 月至 2014 年 7 月取自青岛大学附属医院黄岛院区妇科，标本采集征得病人及家属同意，入组患者均给予以铂类为基础的一线化疗方案，参照《妇科常见肿瘤诊治指南》(第 3 版)化疗敏感入组标准：对初期以铂类药物为基础的治疗有明确反应，且已经达到临床缓解，停用化疗 6 个月以上病灶复发；化疗耐药入组标准：对初期的化疗有反应，但完成化疗后 6 个月内证实复发。其中，化疗敏感组 9 例，化疗耐药组 11 例，并以 10 例正常人组作为参照。化疗敏感组患者平均年龄为 50.7 岁，化疗耐药组患者平均年龄为 53 岁，正常人组平均年龄为 50 岁，三组的年龄比较无统计学差异 ($P>0.05$)，具有可比性。分期参照卵巢癌 2012 年国际妇产科联盟 (FIGO) 的新分期标准：I 期 1 例，II 期 2 例，III 期 14 例，IV 期 3 例；高分化 (G1) 3 例，中分化 (G2) 1 例，低分化 (G3) 16 例；浆液性腺癌 16 例，粘液性腺癌 1 例，透明细胞癌 2 例，子宫内膜样腺癌 1 例。血液经离心后留取血清标本，离体后迅速保存于 -80°C 超低温冰箱。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 根据 mirVana™ PARIS™ Kit 提供的使用说明，取冰冻保存的血清 600 μL 与等体积的 $2\times$ Denaturing Solution 立即完全混匀后置于冰上孵育 5 分钟；继续加入 Acid-Phenol: Chloroform 1200 μL (即血清体积 600 $\mu\text{L}+2\times$ Denaturing Solution 体积 600 μL)，涡旋 1 分钟混匀后于室温离心机中以 $10000\times g$ 速度，离心 5 分钟，分为上层水相，中层白膜，下层有机相。吸取上层水相，并记录体积，同时加入 1.25 倍体积的室温无水乙醇，混匀。将混合液转移到放有滤膜的收集管中，离心 30 秒直至混合液完全透过滤膜，弃滤过液。将 700 μL miRNA Wash Solution 1 加入到有滤膜的收集管中，离心 15 秒，直到液体完全透过滤膜，弃过滤液。将 500 μL Wash Solution 2/3 加入到有滤膜的收集管中，按上述步骤滤过，并重复 1 次，后弃过滤液。将滤膜转移至新的收集管中，加入 100 μL 预热至 95°C 的洗脱液，离心 30 秒收集洗脱液 (内含总 RNA)。采用分光光度计检测 RNA 溶液 D260/D280 光密度 OD 值，计算

提取的 RNA 浓度和纯度，A260:A280 为 1.8-2.1 方可用于进一步检测，提取总 RNA 浓度约为 5 ng/ μL 。检测完成后将含有总 RNA 的洗脱液置于 -20°C 冰箱保存备用。

1.2.2 miRNA-21 的表达分析 MicroRNA 的分子量小，且血清中 miRNA 含量远少于细胞和组织中的 miRNA 含量，故本实验采用 Taqman 探针型 Real Time-PCR 对血清中的 miRNA-21 表达水平进行检测。实验基本原理为 PCR 扩增时同时加入一对逆转录引物及一个特异性的荧光探针，探针两端分别被一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团所标记。当 PCR 扩增时，Taqman 探针在 Taq 酶的酶切作用下降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，荧光监测系统可接收到荧光信号，使得荧光信号的累积与 PCR 产物形成过程完全同步 (图 1、2)^[11]。miRNA RT 反应体系见表 1，反应条件： 16°C 30 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min。RT-PCR 反应体系见表 2，RT-PCR 反应条件：预变性 95°C 15 min，变性 95°C 15 sec，退火 60°C 60 sec, 40 循环。Real time-PCR 使用 Roche 480II 高分辨率溶解曲线分析仪记录 Ct 值，选 RNU6B 作为内参，采用定量 PCR 中的相对定量法进行分析，以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示 miR-21 在上皮性卵巢癌及正常人血清中的相对表达量，其中 $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{Ct}_{21}-\text{Ct}_{16})_{\text{卵巢癌}}-(\text{Ct}_{21}-\text{Ct}_{16})_{\text{正常}}$ 。

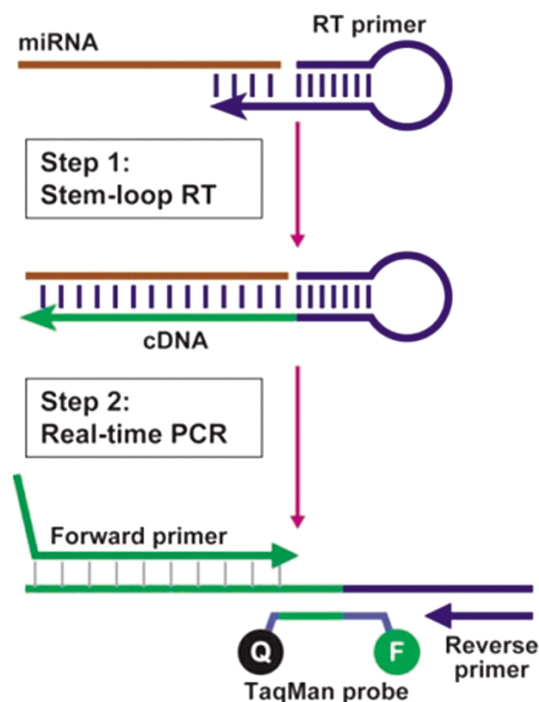


图 1 探针型 Real Time-PCR 的实验原理

Fig.1 Principle of Probe Real Time-PCR

1.3 统计学处理

利用统计学软件 SPSS19.0 对数据进行统计分析。试验资料中的定量资料均应用统计学软件进行正态性检验，均符合正态分布，同时进行方差齐性检验。应用公式 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 miR-21 的相对表达量，其中上皮性卵巢癌化疗耐药组与敏感组血清的 $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}_{\text{miR-21}}-\text{Ct}_{\text{RNU6B}}$ ，卵巢癌化疗耐药组、化疗敏感组及正常人组血清中的 miR-21 的相对表达量的差异比较均选用

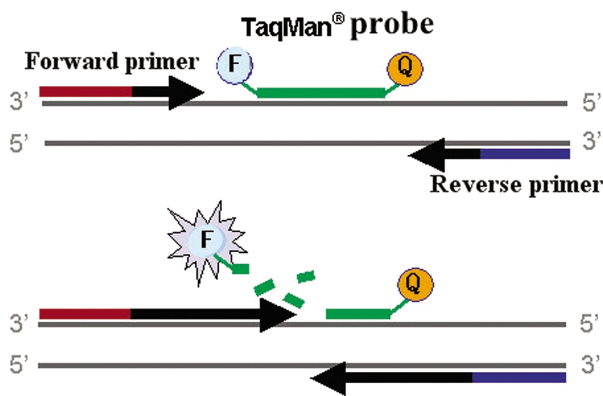


图2 Taqman 探针

Fig.2 Taqman Probe

两独立样本的 t 检验。miR-21 的相对表达量以均数 $\pm$ 标准差表示,取 $P<0.05$ 为假设检验为有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 卵巢癌化疗耐药组、化疗敏感组及正常人组血清 miR-21 水平的比较

卵巢癌化疗耐药组、化疗敏感组及正常人组血清 miR-21 的相对表达量分别为 26.766 ± 26.710 、 2.606 ± 1.057 、 0.573 ± 0.318 ,化疗敏感组和化疗耐药组 miR-21 相对表达量均显著高于正常人组($P<0.05$),差异有统计学意义($P<0.05$),化疗耐药组 miR-21 相对表达量明显高于化疗敏感组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.2 上皮性卵巢癌化疗耐药组血清 miR-21 水平与患者临床病理特征的相关性

本研究化疗耐药组浆液性腺癌 9 例,粘液性腺癌 1 例,透明细胞癌 1 例;11 例患者癌组织分化程度病理证实均为低分

表 1 MiRNA RT 的反应体系

Table 1 Reaction components of MiRNA Reverse-transcription

Component	Master mix	volume per 15- μ L reaction
100 mM dNTPs(with dTTP)		0.15 μ L
Mutiscribe TM Reverse Transcriptase,50 U/ μ L		1.00 μ L
10 $\times$ Reverse Transcription Buffer		1.50 μ L
Rnase inhibitor,20 U/ μ L		0.19 μ L
Nuclease-free water		4.16 μ L
Total volume		7.00 μ L

※ Each 15- μ L RT reaction consists of 7 μ L master mix,3 μ L RT primer, and 5 μ L RNA sample.

表 2 MiRNA RT-PCR 的反应体系

Table 2 Reaction components of MiRNA RT-PCR

Component	Volume(μ L)per 20- μ L reaction
Taqman MicroRNA Assay(20 $\times$)	1.00
Product from RT reaction (Minimum 1:15 Dilution)	1.33
Taqman Universal Master Mix II, no UNG	10.00
Nuclease-free water	7.67
Total volume	20

化。由表 4 可以看出,不同手术-病理分期上皮性卵巢癌化疗耐药患者血清 miR-21 相对表达水平比较无明显差异($P>0.05$);血清 miR-21 水平与患者是否发生淋巴结转移亦无明显相关性($P>0.05$)。

表 3 卵巢癌化疗耐药组、化疗敏感组及正常人组血清 miR-21 水平的比较

Table 3 Comparison of the serum miR-21 levels between normal group, chemotherapy-sensitive group and chemotherapy-resistant group

Group	n	Δ ct	Δ Δ ct	$2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$
Normal group	10	0.535 ± 0.360	1.031 ± 0.602	0.573 ± 0.318
Chemotherapy-sensitive group	9	-0.737 ± 0.602	4.148 ± 2.464	$2.606 \pm 1.057^*$
Chemotherapy-resistant group	11	-0.3394 ± 1.782	-3.929 ± 1.782	$26.766 \pm 26.710^{*#}$

表 4 卵巢癌化疗耐药患者血清 miR-21 水平和临床病理特征的相关性

Table 4 The correlation of serum miR-21 expression with clinicopathologic features of ovarian cancer patients with chemotherapy resistance

Clinicopathologic features	n	The relative expression of miR-21(2 ^{-△△ct})	P
Surgical and pathological stage			
I II	2	13.096± 15.435	P>0.05
III IV	9	29.804± 28.370	
Lymph node metastasis			
Yes	7	42.589± 38.593	P>0.05
No	4	13.096± 15.435	

3 讨论

microRNAs 在血浆及血清中稳定存在,且同一物种的不同个体间表达是一致的,这为 microRNAs 作为肿瘤标志物进行检测提供了可能。虽然肿瘤 microRNAs 在血液中的存在机制存在不同观点,但是肿瘤确实影响着血液中 microRNAs 的水平^[12]。研究表明不同肿瘤有其各自特异性的 microRNA 表达谱^[13],国内外研究者应用微阵列芯片筛选肿瘤化疗耐药相关 microRNAs 表达谱,发现多种 microRNAs 与肿瘤化疗耐药相关。多位研究者对卵巢癌化疗耐药相关 microRNAs 表达谱进行检测,但微阵列芯片检测结果不尽相同^[14-16]。

Lawrie 等发现 microRNA-21 为第一个血清 microRNA 标志物,参与了调节多种肿瘤的增殖、侵袭、转移及凋亡过程,与多种恶性肿瘤包括胃癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌等的化疗耐药相关^[6,18-21]。我们前期的研究发现 microRNA-21 通过参与卵巢癌间质成纤维细胞的转化影响卵巢癌的发生、发展^[7]。本研究结果显示上皮性卵巢癌患者血清 miR-21 的相对表达水平高于正常人,提示其可能用于上皮性卵巢癌的早期诊断;此外,血清 miR-21 的相对表达水平与上皮性卵巢癌化疗耐药具有显著相关性,这为 miR-21 作为上皮性卵巢癌化疗耐药的潜在肿瘤标志提供了依据。但本研究结果显示上皮性卵巢癌患者血清 miR-21 水平与卵巢癌的手术-病理分期及是否发生淋巴结转移均无明显相关性,这可能与本研究的样本量不足有关。因此,为进一步研究血清 miR-21 的相对表达水平与卵巢癌化疗耐药的相关性,尚需在本研究结果基础上进一步扩大样本,并对病人生存率进行随访追踪;同时应在细胞水平深入研究 miR-21 参与卵巢癌化疗耐药的机制,为探讨上皮性卵巢癌的预后指标及治疗靶点奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Vargas-Hernandez VM, Moreno-Eutimio MA, Acosta-Altamirano G, et al. Management of recurrent epithelial ovarian cancer [J]. *Gland Surg*, 2014, 3(3): 198-202
- [2] Chin LJ, Slack FJ. A truth serum for cancer--microRNAs have major potential as cancer biomarkers[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 983-984
- [3] Zhao YN, Chen GS, Hong SJ. Circulating MicroRNAs in gynecological malignancies: from detection to prediction [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2014, 3: 14
- [4] 吕腾,姚勤,戴淑真,等.MicroRNA-141 在上皮性卵巢癌患者组织和血清中的表达及临床意义的探讨[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(13): 2511-2515, 2466
Lv Teng, Yao Qin, Dai Shu-zhen, et al. Expression of MicroRNA-141 in Tissue and Serum of Patients with Ovarian Epithelial Carcinoma and Its Clinical Significance [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(13): 2511-2515, 2466
- [5] Yu PN, Yan MD, Lai HC, et al. Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(3): 542-551
- [6] Chan JK, Blansit K, Kiet T, et al. The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 132(3): 739-744
- [7] Chan JK, Blansit K, Kiet T, et al. miR-9 regulation of BRCA1 and ovarian cancer sensitivity to cisplatin and PARP inhibition [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(22): 1750-1758
- [8] Echevarría-Vargas IM, Valiyeva F, Vivas-Mejía PE. Upregulation of miR-21 in cisplatin resistant ovarian cancer via JNK-1/c-Jun pathway[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97094
- [9] Xie Z, Cao L, Zhang J. MiR-21 modulates paclitaxel sensitivity and hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human ovarian cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(3): 795-800
- [10] Liu S, Fang Y, Shen H, et al. Berberine sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin through miR-21/PDCD4 axis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(9): 756-762
- [11] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179
- [12] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006
- [13] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838
- [14] Eitan R, Kushnir M, Lithwick-Yanai G, et al. Tumor microRNA expression patterns associated with resistance to platinum based chemotherapy and survival in ovarian cancer patients [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(2): 253-259
- [15] Sorrentino A, Liu CG, Addario A, et al. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 111(3): 478-486
- [16] Yang N, Kaur S, Volinia S, et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10307-10314
- [17] Yao Q, Cao S, Li C, et al. Micro-RNA-21 regulates TGF-beta-induced myofibroblast differentiation by targeting PDCD4 in tumor-stroma interaction[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(8): 1783-1792
- [18] Yang SM, Huang C, Li XF, et al. miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells by regulating PTEN[J]. *Toxicology*, 2013, 306: 162-168
- [19] Wang ZX, Lu BB, Wang H, et al. MicroRNA-21 modulates chemosensitivity of breast cancer cells to doxorubicin by targeting PTEN[J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(4): 281-290
- [20] Shen H, Zhu F, Liu J, et al. Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103305
- [21] Song WF, Wang L, Huang WY, et al. MiR-21 upregulation induced by promoter zone histone acetylation is associated with chemoresistance to gemcitabine and enhanced malignancy of pancreatic cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(12): 7529-7536