

· 论 著 ·

淋巴瘤患者循环 microRNA-21 的检测及其临床意义*

陈卫群^{1,2}, 孔德勇¹, 王 卉¹, 刘水逸¹, 孔庆志², 卢忠心^{1△}

(武汉市中心医院:1. 检验科;2. 中心实验室 430014)

摘要:目的 分析淋巴瘤患者外周血中循环 microRNA-21 (miR-21) 的表达,探讨循环 miR-21 在淋巴瘤早期诊断中的意义。**方法** 收集 60 例临床确诊的淋巴瘤患者外周血,50 名健康体检人群外周血作为正常对照组,用 FQ-PCR 方法检测 miR-21 的表达;同时检测对应的临床确诊淋巴瘤患者肿瘤组织及外周血中 miR-21 的表达,判断二者的相关性。**结果** FQ-PCR 检测结果显示,淋巴瘤患者外周血中循环 miR-21 的表达显著高于正常对照组,差异有统计学意义($t=6.9, P<0.0001$);且淋巴瘤患者外周血中循环 miR-21 的表达与肿瘤组织中 miR-21 的表达密切相关($r^2=0.931, P<0.0001$)。**结论** 外周血循环 miR-21 检测有望成为淋巴瘤早期诊断的新的分子标志。

关键词:淋巴瘤;微 RNAs;早期诊断;肿瘤标志

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)06-0535-02

Detection of serum circulating microRNA-21 in lymphoma and its clinical significance*

Chen Weiqun^{1,2}, Kong Deyong¹, Wang Hui¹, Liu Shuiyi¹, Kong Qinzhi², Lu Zhongxin^{1△}

(1. Department of Medical Laboratory; 2. Department of Central Laboratory, Central Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430014, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of serum circulating miR-21 in the patient with lymphoma and to validate its significance in early diagnosis of lymphoma. **Methods** We detected serum circulating miR-21 expression by FQ-PCR in lymphoma patients ($n=60$) and health controls ($n=50$). At the same time, we detected miR-21 expression by FQ-PCR in matched tumor tissue and serum from diffuse large B cell lymphoma Cymphoma patients ($n=30$). **Results** FQ-PCR results indicated miR-21 higher expression in serum from Cymphoma patients than controls ($t=6.9, P<0.0001$), and peripheral circulating miR-21 expression levels had very close correlation with those that matched tumor tissue in lymphoma cases ($r^2=0.931, P<0.0001$). **Conclusion** Circulating miR-21 may be expected to be as a new biomarker to early detection of lymphoma.

Key words: lymphoma; microRNAs; early diagnosis; tumor markers

microRNA(miRNA)是近年来发现的一类长度约 22 个核苷酸非编码小分子 RNA,通过靶 mRNA 降解或抑制其翻译来调节靶基因的表达,在细胞的分化、增殖和凋亡,个体发育、机体代谢,以及肿瘤、病毒感染等多种疾病中都具有重要的作用。研究表明,miRNA 作为癌基因或抑癌基因,广泛参与肿瘤的发生发展过程;不同肿瘤组织 miRNA 表达谱不同。最新研究发现,肿瘤患者血清中存在肿瘤细胞特异性 miRNA,并且高度稳定,表明肿瘤患者血清中 miRNA 的表达可能成为新的肿瘤标志物。本研究通过检测淋巴瘤患者外周血中循环 miR-21 的表达,为淋巴瘤的早期诊断提供可靠的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 60 例临床确诊的淋巴瘤患者外周血,50 名健康体检人群外周血作为正常对照组。选择临床确诊的淋巴瘤患者 30 例,同时收集肿瘤活检组织和外周血。肿瘤组织和血清中 miRNA 的提取采用 miRNA 提取试剂盒(mirVanaTM miRNA Isolation Kit,美国 Ambion 公司),microRNA-21(miR-21)检测采用 TaqMan miRNA 分析试剂盒(美国 ABI 公司)。

1.2 方法 采用 FQ-PCR 检测 miR-21 的表达水平,用 miRNA 提取试剂盒提取肿瘤组织和血清中的 miRNA,用 miR-21

检测试剂盒检测 miR-21 的表达水平。首先取 10 ng 总 RNA 与 3 μ L 逆转录酶混合,在 15 μ L 反应体系中,16 $^{\circ}$ C 30 min、42 $^{\circ}$ C 30 min、85 $^{\circ}$ C 5 min 进行逆转录;然后将逆转录产物 cDNA 150 倍稀释,取 2 μ L 稀释的 cDNA 与 2 μ L TaqMan 引物混合,在 20 μ L 反应体系中,95 $^{\circ}$ C 10 min 变性,随后 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环。相对 miRNA 表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算改变倍数,U6 snRNA 作为内对照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。各指标间的比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者外周血中循环 miR-21 的表达结果 与正常对照组比较,淋巴瘤患者外周血中循环 miR-21 显著升高($t=6.9, P<0.0001$),结果见图 1。

2.2 淋巴瘤患者外周血循环中 miR-21 与对应肿瘤组织中的 miR-21 的相关性分析结果 结果显示淋巴瘤患者外周血中循环 miR-21 的表达与对应肿瘤组织中 miR-21 的表达显著相关($r^2=0.931, P<0.0001$),见图 2。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071921);武汉市科技攻关计划项目(201062938366-02)。 △ 通讯作者,E-mail:lzx71@yahoo.com。

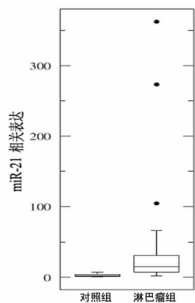


图 1 两组患者血清中 miR-21 的表达

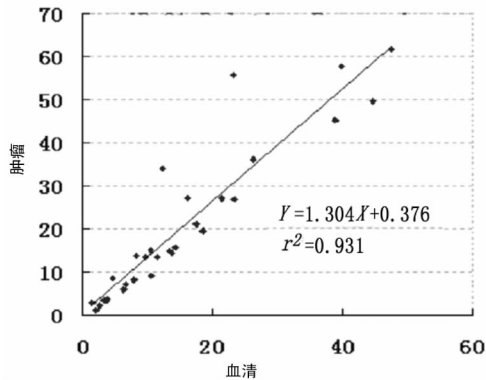


图 2 淋巴瘤患者外周血中循环 miR-21 的表达与对应肿瘤组织中 miR-21 的表达相关性

3 讨论

miRNA 是近年来发现的一类长度约 22 个核苷酸非编码小分子 RNA,通过降解靶 mRNA 或抑制其翻译来调节靶基因的表达,在细胞的分化、增殖和凋亡,个体发育、机体代谢,以及肿瘤、病毒感染等多种疾病中都具有重要的作用,是当前的研究热点和前沿之一^[1-2]。目前已发现 700 多种人类 miRNA,由于 miRNA 通过与靶序列的不完全互补来调节基因的表达,一个 miRNA 可以调节多个基因的表达,同时一个基因可以被多个 miRNA 所调节,所以 miRNA 被认为是最重要的调节分子之一,大约 92% 的人类基因被 miRNA 所调节^[3]。目前国外对 miRNA 的研究进展很快,随着对 miRNA 的产生机制、调节基因表达的分子机制研究不断深入,miRNA 的检测方法的不断完善,miRNA 作为诊断的分子标志和治疗及预后判断的分子靶点也进入临床前研究。国内目前主要集中于对单个疾病的 miRNA 表达谱的研究,机制研究很少,检测方法不够成熟并且比较单一。

miRNA 与肿瘤密切相关,约 52% 的 miRNA 编码基因位于肿瘤相关基因位点和脆性染色体区域^[4];在肿瘤中 miRNA 异常表达且具有组织特异性,不同肿瘤组织 miRNA 表达谱不同^[5];进一步研究表明 miRNA 作为癌基因或抑癌基因,广泛参与肿瘤的发生发展过程^[6]。miRNA 可能成为肿瘤诊断的新的分子标志物和治疗及预后判断的分子靶点,由于 miRNA 在转录后水平调节基因的表达,因此更有利于肿瘤的早发现、早诊断和早治疗,必将具有广泛的临床应用前景^[7]。

最新研究发现,肿瘤患者血清中存在肿瘤细胞特异性 miRNA,并且高度稳定,能够抵抗血清中以及外源性 RNase^[8-10]。由于血清标本易于获得且容易被患者所接受,检测肿瘤患者血清中 miRNA 的表达,将成为肿瘤诊断、治疗以

及预后判断的有利工具。但至目前为止进行肿瘤患者血清中 miRNA 表达检测研究的病例数非常有限,并且尚未见应用肿瘤患者血清中 miRNA 的表达进行肿瘤分级分期和预后判断的研究。因此扩大病例数并利用进行肿瘤患者血清中 miRNA 的表达进行肿瘤分级分期和预后判断的研究将具有重要的理论和应用价值。

miR-21 是目前发现的惟一在多种实体肿瘤(肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、头颈部肿瘤、食管癌等)及非实体瘤(慢性淋巴细胞性白血病、B 细胞性淋巴瘤等)中高表达的 miRNA^[11-13],也是第一个在肿瘤患者血清中检测到的 miRNA。作者的前期研究表明,miR-21 通过靶向细胞凋亡相关基因(programmed cell death 4, PDCD4)而促进肿瘤细胞增殖,参与肿瘤的发生发展;应用反义 miR-21 (anti-miR-21)抑制 miR-21 的表达能够抑制肿瘤细胞的增殖,诱导肿瘤细胞凋亡^[14],被认为是重要的癌基因之一。

淋巴瘤是原发于淋巴结或淋巴结外组织或器官的一种恶性肿瘤,根据临床和病理特点不同,淋巴瘤分为霍奇金病(hodgkin disease, HD)和非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin lymphoma, NHL)。淋巴瘤的诊断主要依靠临床表现、病理学检查及必要的辅助性检查,对只有深部病变而无浅表淋巴结肿大者,诊断往往较困难。近年来淋巴瘤发病率呈不断增加趋势,寻找有效地、无创或微创的早期诊断标志对于淋巴瘤的防治具有重要意义。研究表明淋巴瘤肿瘤组织中 miR-21 高表达^[15],表明 miR-21 可能成为淋巴瘤早期诊断的重要标志之一。作者的研究结果显示,在淋巴瘤患者外周血中循环 miR-21 表达水平高于正常对照组水平,且与淋巴瘤患者肿瘤组织中 miR-21 的表达密切相关,循环 miR-21 的检测可能成为淋巴瘤新的早期诊断的分子标志。血清 miR-21 作为淋巴瘤诊断和预后分子标志物不仅具有创伤小,方法准确、便捷的优势,而且还可改进淋巴瘤诊断、分类、预后估计、疗效及复发预测的精度。但是,由于 miR-21 在多种肿瘤中高表达,仅仅检测血清 miR-21 作为肿瘤标志物特异性不足,若将多种 miRNA 组合使用并与其他类型肿瘤标志物检测相结合,可望显著提高诊断的准确性。血清 miRNA 作为新兴的肿瘤分子标志物在未来的肿瘤临床诊断和治疗中会有更好的应用前景。

参考文献:

[1] Stefani G,Slack FJ. Small noncoding RNAs in animal development[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2008,9(2):219-230.

[2] Liu M,Lu Z,Jiang S,et al. Physiological and Pathological Functions of Mammalian MicroRNAs. In: McQueen CA eds. Comprehensive Toxicology: Cellular and Molecular Toxicology[M]. 2nd Edition. Oxford:Elsevier,2010,427-446.

[3] Griffiths-Jones S,Grocock RJ, Van Dongen S, et al. miR-Base: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. Nucleic Acids Res,2006,34(Database issue): D140-D144

[4] Esquela-Kerscher A,Slack FJ. Oncomirs: MicroRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer,2006,6:259-269.

[5] Lu J,Getz G,Miska EA, et al. MicroRNA(下转第 539 页)

EPCs 在肿瘤新生血管中的作用,抑制肿瘤的生长,为肿瘤的治疗提供了一个新的靶点。

参考文献:

[1] 时继慧,傅乃武. β -榄香烯的抗肿瘤作用和药理学研究[J]. 中国中药杂志,1984,9(2):35-39.

[2] 郭永田. 温莪术的抗癌成分研究[J]. 中药通报,1983,8(3):31.

[3] Li X,Wang G,Zhao J,et al. Antiproliferative effect of be-ta-elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G_2-M phase[J]. Cell Mol Life Sci,2005,62(7/8):894-904.

[4] 周昆,崔黎,闫焱,等. 榄香烯对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞 VEGF-C 及 VEGFR-3 表达的影响[J]. 中国老年学志,2008,28(6):551-553.

[5] 陶磊,周梁,郑璐滢,等. 榄香烯对真核细胞翻译起始因子家族表达和血管生成的抑制作用[J]. 中华耳鼻喉头颈外科杂志,2005,40(11):840-845.

[6] 钱军,等. 抗癌新药——榄香烯的药理及临床[J]. 中国肿瘤临床,1996,23(6):453-455.

[7] De Bont ES,Guikema JE. Mobilized human CD34+hema-topoietic stem cells enhance tumor growth in a nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mouse model of human non Hodgkin's lymphoma[J]. Cancer Res,2001,61(20):7654-7659.

[8] Asahara T,Masuda H,Takahashi T,et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for post-

natal vasculogenesis in physiological and pathological neo-vascularization[J]. Circ Res,1999,85(3):221-228.

[9] Shinkaruk S ,Bayle M ,Lain GD. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy[J]. Curr Med Chem Anti-Canc Agents,2003,3(2):95-117.

[10] Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by pep-tide receptor signalling pathway:paradigms of multiplicity [J]. Cell Signal,2001,13(11):777-785.

[11] Gimbrone MA Jr,Cotran RS,Folkman J. Tumor growth and neovascularization:an experimental model using rab-bit cornea[J]. J Natl Cancer Inst,52(2):413-427.

[12] Ribatti D, Judah Folkman,a pioneer in the study of angio-genesis[J]. Angiogenesis,2008,10(11):3-10.

[13] Asahara T,Murohara T,Sullivan A,et al. Isolation of pu-tative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science,1997,275(14):964-967.

[14] Denizot F,Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability[J]. Immunol Meth-ods,1986,89(2):271-277.

[15] 刘跃明,孙立群,王义. 榄香烯诱导 Hep22 细胞凋亡及其对细胞周期各时相的影响[J]. 中国老年学杂志,2008,28(5):868.

(收稿日期:2011-09-09 修回日期:2011-10-22)

(上接第 536 页)

expression profiles classify human cancers[J]. Nature,2005,435(7043):834-838.

[6] Szafranska AE,Davison TS,John J,et al. MicroRNA ex-pression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncogene,2007,26(30):4442-4452.

[7] Tricoli JV,Jacobson JW. MicroRNA:potential for cancer detection,diagnosis,and prognosis[J]. Cancer Res,2007,67(10):4553-4555.

[8] Moltzahn F,Olshen AB,Baehner L,et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prog-nostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients [J]. Cancer Res,2011,71(2):550-560.

[9] Zhao H,Shen J,Medico L,et al. A pilot study of circulat-ing miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer[J]. PLoS One,2010,5(10):e13735.

[10] Arroyo JD,Chevillet JR,Kroh EM,et al. Argonaute2 comple-xes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA,

2011,108(12):5003-5008.

[11] Shibuya H,Iinuma H,Shimada R,et al. Clinicopathologi-cal and Prognostic Value of MicroRNA-21 and MicroR-NA-155 in Colorectal Cancer[J]. Oncology,2010,79(3/4):313-320.

[12] Gong C,Yao Y,Wang Y,et al. Upregulation of MIR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer[J]. J Biol Chem,2011,286(21):1927-1937.

[13] Kwak HJ,Kim YJ,Chun KR,et al. Downregulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas [J]. Oncogene,2011,30(21):2433-2442.

[14] Lu ZX,Liu M,Stribinskis V,et al. MicroRNA-21 pro-motes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene[J]. Oncogene,2008,27(31):4373-4379.

[15] Lawrie CH,Soneji S,Marafioti T,et al. MicroRNA ex-pression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma[J]. Int J Cancer,2007,121(5):1156-1161.

(收稿日期:2011-06-16 修回日期:2011-11-24)