DOI:10.16016/j.1000-5404.201407154

短篇论著

# 血浆 miR-20a 和 let-7a 在卵巢癌中的表达及其临床意义

孟伟伟,贺付成,吕 品,曲蕴慧 (450052 郑州,郑州大学第一附属医院检验科)

[摘要] **目的** 检测 miR-20a 和 let-7a 在卵巢癌患者血浆中的表达,探讨其临床意义。**方法** 选取卵巢癌患者 50 例为实验组,另选择同期与其年龄性别相匹配的健康体检者 20 例为健康对照组,采用实时定量荧光定量酶链反应(qRT-PCR)检测血浆 miR-20a 和 let-7a 表达水平,同时采用电化学发光法测定其血浆中糖类抗原125(CA125)的含量并进行统计分析。**结果** 卵巢癌患者血浆中 miR-20a 和 let-7a 的相对表达量分别为(4.02±3.77)、(0.42±0.34),卵巢癌患者血浆中 miR-20a 和 CA125 的表达均高于对照组($P<0.01$),let-7a 表达低于对照组($P<0.01$)。临床病理分期Ⅰ~Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌患者血浆 let-7a 相对表达量的中位数分别为0.39、0.21,差异有统计学意义($P<0.01$),而血浆 miR-20a 的表达与临床病理分期无关($P>0.05$),miR-20a 和 let-7a 的相对表达量与年龄、淋巴结转移和组织学分类均无关($P>0.05$)。miR-20a、let-7a 和 CA125 的 ROC 曲线下面积为 0.898(95% *CI*:0.802~0.957)、0.876(95% *CI*:0.775~0.942)、0.819(95% *CI*:0.708~0.900)。**结论** 卵巢癌患者血浆中 miR-20a 和 let-7a 均表达异常,提示能够成为辅助诊断卵巢癌的标志物。

[关键词] 卵巢癌;miR-20a;let-7a;CA125;血浆
[中图法分类号] R446.11;R737.31 [文献标志码] A

卵巢癌占女性肿瘤死亡率的第4位,全世界每年发病的大约200 000例卵巢癌中有125 000例死于此病,由于70%的患者就诊时已属晚期,常形成难治的复发及转移,而缺少早期的诊断方法是其主要原因[1]。微小RNA(microRNA,miRNA)是一类在生物体内源长度为20~23 nt的非编码型小RNA,通过对mRNA的降解和抑制其翻译来影响目的基因的表达,其在肿瘤的发展过程中也发挥了重要的作用[2-3]。在人类基因组中,miR-17-92簇编码6个miRNAs,包括miR-17-5p、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b-1和miR-92-1,其作为原癌基因能够促进细胞增殖,抑制肿瘤细胞的凋亡,并诱导肿瘤的血管生成[4]。miR-20a的过度表达与癌细胞凋亡和恶性转化有一定的相关性,在肝癌、胰腺癌及前列腺癌等肿瘤中均有报道[5-7]。let-7最早是在秀丽隐杆线虫中被发现的miRNA,是线虫从幼虫到成虫形态转变的关键性调控因子,而let-7a是let-7家族中的一员[8]。在人体中let-7a以肺组织的表达量最高,与肺癌的关系最为密切,同时与其他肿瘤的发生和发展也密切相关[9]。本研究通过对血浆中miRNA-20a和let-7a的表达进行检测,旨在探讨其在卵巢癌诊断中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

经本院伦理委员会批准,选取2013年8月到2014年4月在郑州大学第一附属医院妇产科确诊为卵巢癌患者50例为实验组,年龄(44.90±12.44)岁,另外选择20例与其年龄、性别相匹配的健康体检者作为对照组,年龄(44.35±13.61)岁。按FIGO分期:Ⅰ期12例,Ⅱ期19例,Ⅲ期13例,Ⅳ期6例,其中淋巴结转移16例。按WHO组织学分类标准:浆液性癌22例,子宫内膜样癌12例,粘液性癌11例,透明细胞癌3例,其他2例。两组受检者均为自愿参加并签署知情同意书。

### 1.2 试剂及仪器

TRIzol和RT反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司;荧光定量反转录试剂盒购自上海生物工程有限公司;引物由广州瑞博生物有限公司合成;CA125电化学发光试剂盒(Roche公司);其他试剂均为国产分析纯试剂。Nano-Drop2000C紫外分光光度计(美国赛默飞世尔公司);7500 Fast Real-Time PCR仪(美国ABI公司);罗氏全自动生化分析仪。

### 1.3 CA125的测定

实验组与对照组均于上午9点前空腹采集静脉血2 mL,置于肝素抗凝管中,将标本以3 500×*g*离心5 min,上层血浆移至EP管内。采用化学发光免疫法

[通信作者] 贺付成,E-mail: hefucheng@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141020.1012.003.html(2014-10-20)

使用罗氏全自动生化分析仪上机测定。

### 1.4 miR-20a 和 let-7a 的测定

实验组与对照组均于上午9点前空腹采集静脉血2 mL,置于EDTA-K2抗凝管中。将标本以2 000 × *g* 离心10 min,上层血浆移至EP管内,然后以12 000 × *g* 离心15 min,取上层血浆200 μL。TRIzol法提取血浆的总RNA,特异的茎环引物反转录按照反转录试剂盒说明书配置20 μL体系,反应条件为:42 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。以转录得到的cDNA为模板,按照qRT-PCR试剂盒说明书进行操作:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共35个循环。miR-20a引物序列如下:5′-GCGGCGGTAAAGTGCTTATAGTG-3′(正义链),5′-TGCAGGGTCCGAGGTAT-3′(反义链);let-7a引物序列:5′-GCGCCTGAGGTAGTAGGTTG-3′(正义链),5′-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3′(反义链);U6序列:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′(正义链),5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′(反义链)。所有样品做3个平行孔,循环数取其均数。以U6为内参,相对表达量以$2^{-\triangle\triangle Ct}$计算。△△Ct =(Ct目的基因 − Ct管家基因)$_{实验组}$ −(Ct目的基因 − Ct管家基因)$_{对照组}$。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 及中位数表示,正态分布的两组定量资料比较行独立样本 *t* 检验,偏态分布的定量资料行秩和检验。对检测结果作图绘制受试者工作特征曲线(ROC),计算曲线下面积(AUC),利用AUC估计肿瘤标志物的诊断价值:AUC≤0.5为无诊断价值,0.5 < AUC≤0.7为诊断准确性较低,0.7 < AUC≤0.9为诊断准确性较好,AUC > 0.9表示诊断准确性最高[10]。

## 2 结果

### 2.1 miR-20a、let-7a 和 CA125 的表达

实验组和对照组miR-20a、let-7a和CA125的表达量见表1。实验组和对照组miR-20a和let-7a的相对表达量相比,差异有统计学意义($P < 0.01$):卵巢癌患者血浆中miR-20a表达量高于健康人,而血浆中let-7a的表达低于健康人。实验组和对照组CA125表达量相比,差异有统计学意义($t = 4.60$, $P < 0.01$)。

**表1 两组临床资料及实验指标比较** ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | miR-20a | let-7a | CA125(U/mL) |
|---|---|---|---|---|
| 实验组 | 50 | 4.02 ± 3.77 | 0.42 ± 0.34 | 44.20 ± 32.05 |
| 对照组 | 20 | 1.05 ± 0.35 | 1.02 ± 0.26 | 10.74 ± 7.00 |
| *P* 值 | | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

### 2.2 miR-20a 和 let-7a 与临床特征关系

将50例卵巢癌患者按照临床病理特征因素(年龄、临床分期、淋巴结转移和组织学分类)进行分类,进一步分析miR-20a和let-7a相对表达量与卵巢癌患者临床特征的关系。临床病理分期Ⅰ~Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌患者血浆let-7a的下调倍数中位数相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),随肿瘤恶性程度升高而降低;而血浆miR-20a的表达与临床病理分期无关($P > 0.05$)。miR-20a和let-7a的表达与年龄、淋巴结转移和组织学分类无关($P > 0.05$,表2)。

**表2 miR-20a 和 let-7a 与临床病理特征因素的关系**

| 临床病理特征 | 例数 | miR-20a 上调倍数[a] | let-7a 下调倍数[a] |
|---|---|---|---|
| 年龄(岁) | | | |
| ≤50 | 26 | 3.59(1.85~4.61) | 0.37(0.22~0.43) |
| >50 | 24 | 3.08(1.33~4.97) | 0.24(0.18~0.74) |
| *P* 值 | | 0.268 | 0.260 |
| 临床分期 | | | |
| Ⅰ~Ⅱ期 | 31 | 2.51(1.70~4.02) | 0.39(0.25~0.14) |
| Ⅲ~Ⅳ期 | 19 | 3.20(2.14~8.11) | 0.21(0.18~0.27) |
| *P* 值 | | 0.139 | 0.001 |
| 淋巴结转移 | | | |
| 无 | 34 | 3.08(1.65~4.86) | 0.35(0.21~0.50) |
| 有 | 16 | 3.41(2.46~4.43) | 0.25(0.20~0.38) |
| *P* 值 | | 0.369 | 0.411 |
| 组织学分类 | | | |
| 浆液性癌 | 22 | 3.08(1.65~5.61) | 0.38(0.20~0.88) |
| 子宫内膜样癌 | 12 | 4.35(2.72~6.70) | 0.30(0.21~0.43) |
| 粘液性癌 | 11 | 3.20(1.82~3.73) | 0.27(0.20~0.74) |
| 透明细胞癌 | 3 | 1.07(0.86~2.44) | 0.23(0.21~0.25) |
| 其他 | 2 | 2.47(2.44~2.51) | 0.21(0.17~0.25) |
| *P* 值 | | 0.063 | 0.600 |

a:相对表达量的中位数及第25~75百分位数;两组之间采用Mann-Whitney *U* 检验,两组以上采用Kruskal-Wallis检验

### 2.3 miR-20a 和 let-7a 对卵巢癌的诊断价值

建立miR-20a、let-7a和CA125的ROC曲线,利用ROC曲线评价三者在卵巢癌中的诊断价值。miR-20a的AUC为0.898(95% *CI*:0.802~0.957),let-7a的AUC为0.876(95% *CI*:0.775~0.942),CA125的AUC为0.819(95% *CI*:0.708~0.900),miR-20a、let-7a和CA125均具有较好的诊断价值(图1)。

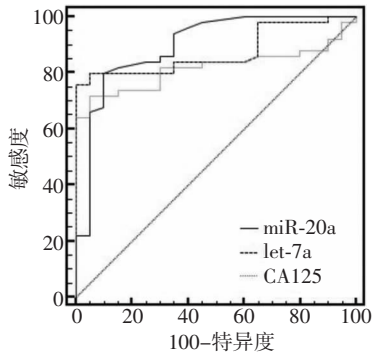



**图1 miR-20a、let-7a 和 CA125 对卵巢癌诊断的 ROC 曲线**

## 3 讨论

目前,越来越多的证据表明miRNA能够参与细胞的基本功能,如胚胎发育、细胞生长、细胞凋亡和分化,同时miRNA的失调也常见于各种癌症,失调的miRNA通过改变正常的基因表达进而在肿瘤进展中发挥重要作用[4]。miR-20a是miR-17-92家族的1个成员,与肿瘤的形成、发展、转移及预后密切相关。然而在不同肿瘤中其作用不同,研究证实miR-20a在乳腺癌、胰腺癌中表达下调,在结肠癌、神经胶质瘤和肺癌中上调,说明其具有组织特异性[5,11-15]。有研究证明miR-20a对早期生长反应蛋白2(EGR2)有负调控作用,且能够作用于EGR2信号通路,在胃癌组织中高表达并对其形成、侵袭和转移产生重要作用[15]。在胰腺癌及肝癌中的报道认为miR-20a的高表达可以抑制胰腺癌细胞的增殖和侵袭,转录因子E2F1能够促进细胞的程序性凋亡,miR-20a的过表达已被证实能够下调E2F1,进而抑制细胞的凋亡[16-17]。这说明在不同的肿瘤中其靶基因可能不同,不管是作为癌基因还是抑癌基因,其在不同肿瘤中均发挥重要作用但产生的影响可能不同。let-7a是let-7家族中的一员,有研究表明,对细胞转染后过表达的let-7能够引起Ras家族和HMGA2蛋白水平明显降低,同时细胞生长也明显减慢,因此可以推断let-7如果低表达或者缺失将会引起癌基因和细胞周期调控因子高表达,进而刺激细胞增生,let-7对肿瘤具有抑制作用[18]。研究已经证实let-7能够对HMGA2原癌基因进行特异性抑制,其对于HMGA2调节的靶向性优于RAS,而对let-7的破坏将导致肿瘤的形成[19]。此外,let-7与其他肿瘤的发生及发展密切相关,而miRNA在血浆中表达的稳定性使其可以作为潜在的肿瘤标志物[20]。

本研究结果表明,miR-20a在卵巢癌患者血浆中的表达普遍高于健康人,而let-7a的表达低于健康人。为了更好地评价miR-20a和let-7a在卵巢癌诊断方面的应用价值,本研究按年龄、临床分期、淋巴结转移和组织学分类对卵巢癌患者分组,结果显示卵巢癌患者血浆中let-7a的低表达与临床分期有关,Ⅲ~Ⅳ期明显低于Ⅰ~Ⅱ期,而血浆miR-20a的表达与临床病理分期无关,同时miR-20a和let-7a的表达与年龄、淋巴结转移和组织学分类均无关。相对于其他肿瘤标志物,CA125在卵巢癌诊断中具有较高的灵敏性和特异性,通常作为其特异的诊断标志物[21]。本研究利用ROC曲线并和CA125相对比,评价miR-20a、let-7a的诊断能力,结果显示,miR-20a和let-7a的AUC分别为0.898、0.876,而CA125的AUC为0.819,说明miR-20a和let-7a对卵巢癌具有较高的诊断价值,其中miR-20a的诊断价值最高。但是miR-20a和let-7a并不是卵巢癌的特有标志,其作为卵巢癌的诊断标志物仍需要结合其他肿瘤标志和临床资料,也许可以提高诊断的灵敏度和特异度。鉴于本研究所纳入样本量有限,仍存在偶然误差的可能,其灵敏度特异度如何以及临界值的选择还需在大样本的人群中进一步验证。

综上所述,卵巢癌患者血浆中miR-20a高表达而let-7a低表达,let-7a的相对表达量与临床分期有关,其均能够作为辅助诊断卵巢癌的指标。然而miR-20a和let-7a在疾病中的作用机制尚需进一步研究,其有可能成为治疗疾病的潜在靶点,其临床应用价值仍需要进一步研究证实。

**志谢** 感谢河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室在本研究中给予的帮助

**参考文献:**

[1] Perren T J, Swart A M, Pfisterer J, *et al*. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer[J]. N Engl J Med, 2011, 365(26): 2484-2496.
[2] Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655.
[3] Croce C M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(10): 704-714.
[4] Mendell J T. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease[J]. Cell, 2008, 133(2): 217-222.
[5] Yan H, Wu J, Liu W, *et al*. MicroRNA-20a overexpression inhibited proliferation and metastasis of pancreatic carcinoma cells[J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(12): 1723-1734.
[6] Fan M Q, Huang C B, Gu Y, *et al*. Decrease expression of microRNA-20a promotes cancer cell proliferation and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32(1): 21.
[7] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, *et al*. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 3753-3756.
[8] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, *et al*. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
[9] Li X, Pan J H, Song B, *et al*. Suppression of CX43 expression by miR-20a in the progression of human prostate cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(10): 890-898.
[10] Fischer J E, Bachmann L M, Jaeschke R. A readers´guide to the interpretation of diagnostic test properties: clinical example of sepsis[J]. Intensive Care Med, 2003, 29(7): 1043-1051.
[11] Volinia S, Calin G A, Liu C G, *et al*. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer

gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2257-2261.
[12] Schetter A J, Leung S Y, Sohn J J, *et al*. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. JAMA, 2008, 299(4): 425-436.
[13] Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, *et al*. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas[J]. Brain Pathol, 2010, 20(3): 539-550.
[14] Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, *et al*. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92[J]. Oncogene, 2007, 26(41): 6099-6105.
[15] Li X, Zhang Z, Yu M, *et al*. Involvement of miR-20a in promoting gastric cancer progression by targeting early growth response 2 (EGR2)[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8): 16226-16239.
[16] O'Donnell K A, Wentzel E A, Zeller K I, *et al*. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. Nature, 2005, 435(7043): 839-843.
[17] Ebelt H, Hufnagel N, Neuhaus P, *et al*. Divergent siblings: E2F2 and E2F4 but not E2F1 and E2F3 induce DNA synthesis in cardiomyocytes without activation of apoptosis[J]. Circ Res, 2005, 96(5): 509-517.
[18] Kumar M S, Erkeland S J, Pester R E, *et al*. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(10): 3903-3908.
[19] Droge P, Davey C A. Do cells let-7 determine stemness?[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(1): 8-9.
[20] 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.
[21] Husseinzadeh N. Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review[J]. Gynecol Oncol, 2011, 120(1): 152-157.

(**收稿**:2014-07-23;**修回**:2014-09-16)
(编辑 邓强庭)

# 短篇论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201407145

## 正畸托槽脱落原因的相关因素研究

舒绍兵[1,2],罗金英[3],钟建鑫[2],张 倩[2],朱 璨[2],周继祥[2] (401147 重庆,武警重庆总队机关门诊部口腔科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院口腔科[2];408415 重庆,重庆市南川区人民医院口腔科[3])

[**摘要**] **目的** 探讨在口腔正畸治疗中造成托槽脱落原因的相关因素。**方法** 连续观察应用直接粘贴技术的口腔正畸患者187例,粘贴托槽3 292颗。记录托槽的脱落及处理情况,并进行分析。**结果** 托槽的脱落率:①12~<15岁组中,男性(15.28%)高于女性(12.25%),差异有统计学意义($P<0.05$);15~<18岁组中,男性(13.68%)高于女性(10.86%),但差异无统计学意义($P>0.05$)。≥18岁组中,男性(6.60%)高于女性(5.93%),差异无统计学意义($P>0.05$)。②无论是男性还是女性,12~<15岁组、15~<18岁组与≥18岁组比较,前2组间托槽脱落率差异均无统计学意义($P>0.05$);但前2组分别与≥18岁组比较,无论是男性还是女性患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。③下颌牙位(15.06%)高于上颌牙位(9.59%),差异有统计学意义($P<0.05$)。④再次粘贴组(16.30%)高于首次粘贴组(12.30%),差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 患者的性别、年龄、颌位、牙位及是否再次粘贴等多种因素均可影响正畸托槽的粘结效果,临床上必须重视这些相关因素,从而降低托槽的脱落率。

[**关键词**] 口腔正畸;托槽;脱落;相关因素
[**中图法分类号**] R181.23;R783.5 [**文献标志码**] A

[**通信作者**] 周继祥,电话:(023)68754387,E-mail:Zhoujx6518@sina.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140930.1155.005.html(2014-09-30)

直接粘结技术是目前口腔正畸治疗中最主要的粘结方式,其优点是简化了操作过程,缩短了操作时