

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.020

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.020>

miRNA-27b 在骨肉瘤中的表达及其临床意义

张其川¹, 王素芳², 王云峰¹, 杜云飞¹, 付新生¹

(新乡市中心医院 1. 骨2科; 2. 消毒供应中心, 河南 新乡 453000)

[摘要] 目的: 探讨微小RNA(miRNA)-27b在骨肉瘤中的表达情况及诊断和预后价值。方法: 选取经病理证实为骨肉瘤的患者血样51例, 年龄和性别相匹配的51例健康者血样作为对照组。采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测骨肉瘤患者及健康对照组血清miR-27b表达水平。结果: 相较于健康对照组, 骨肉瘤患者血清中miR-27b表达水平明显升高($P<0.001$)。miR-27b的高水平表达与较大的肿瘤体积($P=0.008$), 较高的TNM分级($P=0.001$)及远处转移($P=0.001$)相关。受试者工作曲线(ROC)提示血清miR-27b水平对骨肉瘤患者具有诊断价值。曲线下面积(AUC)为0.863, 其中敏感度为77.8%, 特异度为86.7%。Kaplan-Meier曲线分析表明miR-27b高水平表达组5年生存率较低。此外, 单变量和多变量Cox回归分析表明miR-27b是骨肉瘤患者预后的一个独立危险因素($P<0.001$ 和 $P=0.006$)。结论: 血清miR-27b水平可能成为骨肉瘤患者诊断及判断预后的生物标志物。

[关键词] miR-27b; 骨肉瘤; 诊断; 预后; 生物标志物

Expression and clinical significance of circulating microRNA-27b in patients with osteosarcoma

ZHANG Qichuan¹, WANG Sufang², WANG Yunfeng¹, DU Yunfei¹, FU Xinsheng¹

(1. Second Department of Orthopaedics; 2. Central Sterile Supply Department, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang Henan 453000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the application of serum miR-27b in diagnosis and prognosis of patients with osteosarcoma. **Methods:** Using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique, we assessed expression of studied miR-27b in serum samples of 51 pairs of osteosarcoma patients and corresponding healthy individuals. **Results:** Serum levels of miR-27b were found to be significantly higher in osteosarcoma patients than those in healthy controls ($P<0.001$). Moreover, elevated serum levels of miR-27b in osteosarcoma patients were correlated with the large tumor size ($P=0.008$), advanced TNM stages ($P=0.001$) and distant metastasis ($P=0.001$). Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses suggested that serum miR-27b had significant diagnostic value for osteosarcoma patients. It yielded an area under the curve (AUC) of ROC of 0.863 with 77.8% sensitivity and 86.7% specificity in distinguishing osteosarcoma patients from control subjects. Furthermore, Kaplan-Meier curve analysis indicated that osteosarcoma patients with a high serum miR-27b level had a significantly shortened overall survival ($P<0.001$). In addition, univariate and multivariable Cox

收稿日期 (Date of reception): 2017-09-06

通信作者 (Corresponding author): 张其川, Email: master-zqc@163.com

regression analysis revealed that serum miR-27b level was an independent risk factor for overall survival ($P<0.001$ and $P=0.006$, respectively). **Conclusion:** Therefore, serum levels of miR-27b may serve as a potential non-invasive biomarker for diagnosis and prognosis of osteosarcoma patients.

Keywords miR-27b; osteosarcoma; diagnosis; prognosis; biomarker

骨肉瘤多起源于长骨干骺端, 是儿童和青少年最常见的恶性骨肿瘤。其特点为恶性程度高, 预后差^[1]。近年来, 即使采用手术联合化疗方案, 其5年生存率也仅为65%~70%^[2]。微小RNA(miRNAs)是一种长为18~25 bp的真核生物源性小分子单链RNA, 是近年来新发现的一类非编码小RNA^[3]。文献[4-6]表明: miRNA与肿瘤的发生发展密不可分, 以miRNA为基础的诊断或预后的生物标志物具有重要的临床推广价值。近年来, miRNA与骨肉瘤等的临床相关性已经得到证实^[7]。循环miR-27b在宫颈癌^[8], 结肠癌^[9]及食管癌^[10]中都表达异常, 但其在骨肉瘤患者中的表达情况未见报道。因此, 本研究旨在通过检测miR-27b在骨肉瘤中的表达情况, 探讨其在骨肉瘤患者诊断及预后中的临床价值。

1 材料与方法

1.1 材料

选取新乡市中心医院骨科的51例骨肉瘤患者的血液标本。术前均未接受化疗或放疗。临床病理学和影像学检查诊断为骨肉瘤。血样标本获取后即刻放入液氮中保存, 随后储存于-80℃冰箱。本研究经医院伦理委员会批准, 患者签署知情同意书。

1.2 RNA提取与实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

根据TRIzol试剂(Invitrogen公司)说明书抽提RNA, 用紫外分光光度计监测A260/A280比值, 并检测RNA的纯度和浓度, 使用吉玛试剂盒进行反转录和qRT-PCR。反应条件: 95℃ 5 s, 58℃ 20 s, 72℃ 30 s共45个循环。将U6 RNA作为内参比较miR-27b表达水平, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分别计算miR-27b在骨肉瘤血清中相对表达量。所有的样本重复实验3次。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0统计学软件进行分析。Mann-

Whitney U检验来比较各组miR-27b表达水平。用受试者工作曲线(ROC)评估miR-27b对骨肉瘤的诊断价值。Kaplan-Meier分析和Log-rank检验进行生存分析评估。Cox比例风险模型和多因素分析进行预后评估。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清miR-27b与骨肉瘤患者临床病理特征的相关性

与正常对照组相比, 骨肉瘤患者血清miR-27b表达水平显著升高(图1)。51名患者的血清miR-27b中位值为7.62。以此中位值为分界点, 患者可分为高miR-27b组($n=26$)和低miR-27b组($n=25$)。骨肉瘤患者血清miR-27b的高水平表达与较大的肿瘤体积($P=0.008$), 较高的TNM分级($P=0.001$)和远处转移($P=0.001$)相关(表1)。

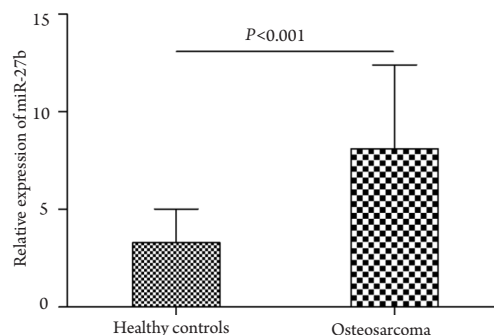


图1 骨肉瘤及正常对照组血清miR-27b表达情况

Figure 1 Relative expression of miRNA-27b in healthy controls and osteosarcoma

2.2 血清miR-27b对骨肉瘤的诊断价值

ROC曲线分析显示曲线下面积(AUC)为0.863。当分界值为6.675时, 敏感度和特异度分别为77.8%和86.7%(图2), 表明miR-27b水平对骨肉瘤患者具有较高的诊断价值。

表1 血清miR-27b水平与骨肉瘤患者临床病理参数之间的相关性
Table 1 Correlation between miR-27b expression and clinicopathological factors of osteosarcoma patients

参数	<i>n</i>	miR-27b的表达		<i>P</i>
		低表达	高表达	
年龄/岁				0.205
<20	23	9	14	
≥20	28	16	12	
性别				0.679
男	26	12	14	
女	25	13	12	
肿瘤大小/cm				0.008
<5	25	17	8	
≥5	26	8	18	
位置				0.492
肢体远端	24	13	11	
近端或躯干	27	12	15	
组织学类型				0.183
成骨性	21	10	11	
成软骨性	16	11	5	
毛细血管扩张行	8	2	6	
成纤维细胞	6	2	4	
TNM分期				0.001
IIA	29	20	9	
IIB/III	22	5	17	
远处转移				0.001
无转移	27	19	8	
转移	24	6	18	

2.3 血清 miR-27b 对骨肉瘤的预后价值

Kaplan-Meier分析和log-rank检验表明, miR-27b高水平表达组与低水平表达组的5年生存率差异具有统计学意义($P<0.001$, 图3)。miR-27b高水平表达组的5年生存率低于低水平表达组。单变量Cox比例

风险回归分析提示骨肉瘤患者5年生存率与肿瘤体积大小($P=0.005$)、TNM分级($P<0.001$)、远处转移($P=0.002$)和血清miR-27b水平($P<0.001$)密切相关。此外, 多因素分析提示miR-27b高水平表达是骨肉瘤患者预后的一个独立危险因素($P<0.001$, 表2)。

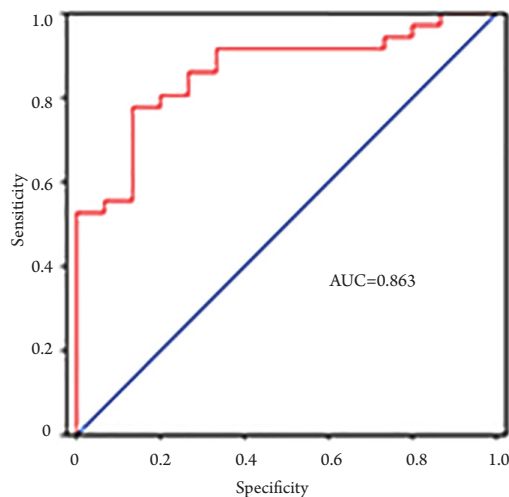


图2 血清miR-27b的ROC曲线分析, 以评估其对骨肉瘤患者的诊断价值
Figure 2 ROC curve analysis of serum miRNA-27b, assessing its diagnosis value on osteosarcoma

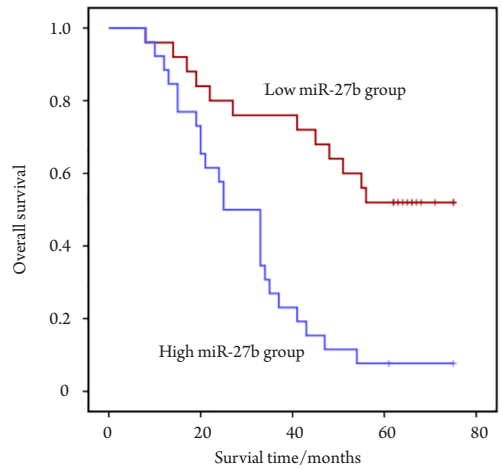


图3 根据血清miR-27b表达情况, Kaplan-Meier分析骨肉瘤患者的5年总体生存率
Figure 3 According to the expression of serum miR-27b, Kaplan-Meier analyzed the 5-year overall survival rate of patients with osteosarcoma

表2 单因素及多因素分析验证血清miR-27b水平对骨肉瘤患者预后的评价作用

Table 2 Univariate and multivariate analysis for the prognostic significance of serum miR-27b levels in osteosarcoma patients

参数	单因素分析P	多因素分析		
		P	HR	95% CI
年龄	0.746	0.174	0.600	0.288~1.253
性别	0.714	0.946	1.027	0.478~2.208
肿瘤大小	0.005	0.726	1.160	0.505~2.664
肿瘤生长位置	0.133	0.179	1.642	0.797~3.384
组织学类型	0.881	0.091	0.725	0.500~1.052
TNM分期	<0.001	0.062	2.340	0.959~5.708
远处转移	0.002	0.157	1.888	0.783~4.553
miR-27b表达	<0.001	0.006	1.229	1.062~1.422

3 讨论

骨肉瘤是一种起源于间叶组织的原发性恶性肿瘤, 好发于儿童及青少年^[11]。miRNA是一类长度为20~24个核苷酸的非编码小分子RNA, 主要通过和靶基因3'端非编码区发生不完全配对, 从而抑制靶基因mRNA翻译, 参与调控个体发育、细胞凋亡、细胞增殖和分化等生命活动, 与肿瘤的发生、转移、耐药等病理进程密切相关^[12-13]。Mitchell等^[14]从健康志愿者外周血浆中提取RNA, 经标记后电泳分离, 进一步提取小分子的RNA片段进行反转录, 建立小RNA cDNA文库, 其中93%

是已知的miRNA。Chen等^[6]应用茎环RT-PCR和Solexa高通量测序技术同样证实了外周血中miRNA的存在。Mitchell等^[14]通过人工miRNA与内源性miRNA对照实验研究证实外周血中的miRNA是稳定的, Chen等^[6]通过对照大分子RNA进行实验研究得出了同样的结论。此外, 一系列试验^[15-16]如室温下过夜、反复冻存解冻、煮沸、酸碱试验等, 证实外周血miRNA在温度、酸碱环境及物理状态等条件改变情况下, 其表达仍然维持稳定。越来越多的研究^[17]表明: miRNA在肿瘤发生发展过程中发挥着重要作用。有些miRNA表达水平显著降低, 起到抑制肿瘤生长的作用; 有些miRNA表

达水平明显升高,起到促进肿瘤生长的作用^[18]。研究^[19]证实miRNA在骨肉瘤发生发展过程中也发挥着抑瘤或促瘤的双重作用。本研究主要探讨miR-27b与骨肉瘤患者的临床病理特征相关性及其对骨肉瘤患者的诊断及判断预后的价值。

由于缺乏有效的早期诊断生物标志物,骨肉瘤患者预后仍旧较差^[20]。研究miRNA在骨肉瘤发生发展中的生物学作用将有助于骨肉瘤患者的早期诊断^[21]。本研究中骨肉瘤患者和正常对照组血清miR-27b的qRT-PCR检测结果显示:骨肉瘤患者的miR-27b表达水平明显高于正常对照组。此外,miR-27b高水平表达与较大肿瘤体积,较高的TNM分级和远处转移相关。因此推测miR-27b与骨肉瘤的发生发展相关。

ROC曲线分析可以有效地判断miR-27b对骨肉瘤患者的诊断价值。本结果也表明miR-27b可以有效地对骨肉瘤患者和正常人进行辨别(AUC=0.863)。因此,异常表达的血清miR-27b可能成为骨肉瘤患者的新的诊断标志物。

众所周知,对骨肉瘤患者预后进行有效的评估将有助于对其治疗方案的制定^[22-23]。根据Kaplan-Meier分析和log-rank检验,本研究结果表明:相较于miR-27b的高水平表达,miR-27b的低水平表达具有较好的5年生存率。另外,多因素分析提示miR-27b的高水平表达是骨肉瘤患者预后的一个独立危险因素。因此,本研究首次证明miR-27b可能成为骨肉瘤患者预后的生物标志物。

综上所述,血清miR-27b可能成为骨肉瘤患者诊断及预后的生物标志物。以此为基础,进一步的对miR-27b在骨肉瘤发生发展中作用机制的研究将有助于其在临床中的推广应用。

参考文献

1. Zhang J, Yan YG, Wang C, et al. MicroRNAs in osteosarcoma[J]. Clin Chim Acta, 2015, 444: 9-17.
2. Allison DC, Carney SC, Ahlmann ER, et al. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era[J]. Sarcoma, 2012, 2012: 704872.
3. Ivey KN, Srivastava D. microRNAs as developmental regulators[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(7): a008144.
4. Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer[J]. Curr Biol, 2014, 24(16): R762-R776.
5. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(2): 99-110.
6. 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.
7. Gougelet A, Pissaloux D, Besse A, et al. Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response[J]. Int J Cancer, 2011, 129(3): 680-690.
8. Zhang S, Liu F, Mao X, et al. Elevation of miR-27b by HPV16 E7 inhibits PPAR γ expression and promotes proliferation and invasion in cervical carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2015, 47(5): 1759-1766.
9. Ye J, Wu X, Wu D, et al. miRNA-27b targets vascular endothelial growth factor C to inhibit tumor progression and angiogenesis in colorectal cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60687.
10. Gu J, Wang Y, Wu X. MicroRNA in the pathogenesis and prognosis of esophageal cancer[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(7): 1292-1300.
11. Hatting MT, Blakely ML. Management of osteosarcoma pulmonary metastases[J]. Semin Pediatr Surg, 2006, 15(1): 25-29.
12. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression[J]. Sci STKE, 2007, 2007(367): re1.
13. Jannot G, Simard MJ. Tumor-related microRNAs functions in caenorhabditis elegans[J]. Oncogene, 2006, 25(46):6197-6201.
14. Mitchell PS, Parkin PK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10513-10518.
15. Resnik KE, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel realtime PCR platform[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1): 55-59.
16. Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2008, 54(3): 482-490.
17. Jones KB, Salah Z, Del Mare S, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma[J]. Cancer Res, 2012, 72(7): 1865-1877.
18. Mostert B, Sieuwerts AM, Martens JW, et al. Diagnostic applications of cell-free and circulating tumor cell-associated miRNAs in cancer patients[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2011, 11(3): 259-275.
19. Li H, Zhang K, Liu LH, et al. MicroRNA screening identifies circulating microRNAs as potential biomarkers for osteosarcoma[J]. Oncol Lett, 2015, 10(3): 1662-1668.
20. Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(27): 3029-3035.
21. Zhou G, Lu M, Chen J, et al. Identification of miR-199a-5p in serum as

- noninvasive biomarkers for detecting and monitoring osteosarcoma[J].
Tumour Biol, 2015, 36(11): 8845-8852.
22. Xiao X, Wang W, Zhang H, et al. Individualized chemotherapy for
osteosarcoma and identification of gene mutations in osteosarcoma[J].
Tumour Biol, 2015, 36(4): 2427-2435.
23. Gill J, Ahluwalia MK, Geller D, et al. New targets and approaches in
osteosarcoma[J]. Pharmacol Ther, 2013, 137(1): 89-99.

本文引用: 张其川, 王素芳, 王云峰, 杜云飞, 付新生. miRNA-27b在骨肉瘤中的表达及其临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(12): 2633-2638. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.020

Cite this article as: ZHANG Qichuan, WANG Sufang, WANG Yunfeng, DU Yunfei, FU Xinsheng. Expression and clinical significance of circulating microRNA-27b in patients with osteosarcoma[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(12): 2633-2638. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.020