

肿瘤内分泌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002352

术前血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达水平
预测前列腺癌患者术后复发转移的价值

郑奋薇, 蔡桂程, 梁美莲, 陈曼君, 陈冬花

(海口市第三人民医院泌尿外科, 海口 571100)

【摘要】目的:探讨血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 水平对前列腺癌(prostate cancer, PCa)患者术后复发转移的价值。**方法:**选取 2015 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日海口市第三人民医院收治的 PCa 患者 142 例, 根据其术后是否发生复发转移分为未复发转移组($n=84$)和复发转移组($n=58$)。检测两组术前 miR-148a-3p、miR-139-5p 及前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)表达水平, 分析其与临床病理特征的关系。应用 ROC 曲线分析 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 预测 PCa 术后复发转移的价值。Pearson 相关分析 miR-148a-3p、miR-139-5p 与 PSA 相关性。**结果:**复发转移组血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 水平分别为(4.80 ± 0.75)、(7.64 ± 2.38)和(63.75 ± 14.92) ng/mL, 均高于未复发转移组的(2.15 ± 0.36)、(3.50 ± 0.62)和(18.72 ± 8.60) ng/mL, 差异有统计学意义(t 值分别为 10.648、14.715 和 9.804, 均 $P=0.000$)。复发转移患者血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达水平与肿瘤分期($t=5.117, P=0.024; t=5.304, P=0.018$)、Gleason 评分($t=5.512, P=0.006; t=6.218, P=0.000$)及 PSA 水平($t=10.208, P=0.000; t=13.620, P=0.000$)有关联。ROC 曲线分析显示, 血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 预测 PCa 术后复发转移的最佳截值分别为 3.40、5.38 和 36.80 ng/mL, 三项联合预测 PCa 术后复发转移的 AUC (0.914, 95%CI=0.858~0.972)最大, 其敏感度和特异度为 92.0%和 83.6%。相关分析显示, 复发转移患者血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 水平与 PSA 均呈正相关($r=0.774, P<0.001; r=0.806, P<0.001$)。**结论:**术前血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达上调与 PCa 术后复发转移有关, 联合 PSA 检测对预测 PCa 术后复发转移具有较高的价值。

【关键词】前列腺癌; miR-148a-3p; miR-139-5p; 复发转移**【中图分类号】**R737.25**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-06-14Value of preoperative expression levels of serum miR-148a-3p
and miR-139-5p on prediction of recurrence and metastasis
in prostate cancer patients

Zheng Fenwei, Cai Guicheng, Liang Meilian, Chen Manjun, Chen Donghua

(Department of Urology, Third People's Hospital of Haikou)

【Abstract】Objective: To investigate the value of expression levels of serum miR-148a-3p and miR-139-5p on postoperative recurrence and metastasis in prostate cancer(PCa) patients. **Methods:** A total of 142 patients with PCa admitted to our hospital from January 1st, 2015 to December 31st, 2017 were selected and divided into the non-recurrence and metastasis group($n=84$) and the recurrence and metastasis group($n=58$) according to their postoperative condition. The expression level of preoperative miR-148a-3p, miR-139-5p and prostate specific antigen(PSA) in two groups were detected, and their relationship with clinicopathological characteristics was analyzed. ROC curve was used to analyze the value of miR-148a-3p, miR-139-5p and PSA in predicting postoperative recurrence and metastasis of PCa. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation among miR-148a-3p, miR-139-5p and PSA. **Results:** Levels of serum miR-148a-3p, miR-139-5p and PSA in the recurrence and metastasis group were (4.80 ± 0.75) ng/mL, (7.64 ± 2.38) ng/mL, (63.75 ± 14.92) ng/mL, respectively, which were significantly higher than those in the non-recurrence and metastasis group of (2.15 ± 0.36) ng/mL, (3.50 ± 0.62) ng/mL, (18.72 ± 8.60) ng/mL, with statistically significant differences($t=10.648$, 14.715, and 9.804, $P=0.000$). Expressions levels of serum miR-148a-3p and miR-139-5p in patients with recurrence and metastasis

作者介绍: 郑奋薇, Email: 2317390288@qq.com,

研究方向: 临床泌尿外科疾病研究。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20191125.1321.002.html>

(2019-11-26)

were correlated with tumor stage($t=5.117, P=0.024; t=5.304, P=0.018$), Gleason score($t=5.512, P=0.006; t=6.218, P=0.000$) and PSA level($t=10.208, P=0.000; t=13.620, P=0.000$). ROC curve analysis showed that the best cut-off values of serum

miR-148a-3p, miR-139-5p and PSA for predicting postoperative recurrence and metastasis of PCa were 3.40, 5.38 and 36.80 ng/mL, respectively. The area under curve(AUC)(0.914, 95%CI=0.858 to 0.972) of postoperative recurrence and metastasis predicted by the three combinations was the highest, with the sensitivity of 92.0% and the specificity of 83.6%. Correlation analysis showed that expression levels of serum miR-148a-3p and miR-139-5p were positively correlated with PSA in patients with recurrence and metastasis ($r=0.774, P<0.001; r=0.806, P<0.001$). **Conclusion:** The up-regulated expression of serum miR-148a-3p and miR-139-5p before surgery is related to the recurrence and metastasis after PCa surgery, and the test combined with PSA has a high value in predicting the recurrence and metastasis after PCa surgery.

[Key words] prostate cancer; miR-148a-3p; miR-139-5p; recurrence and metastasis

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,其发病率及死亡率均较高,对男性的生命健康造成极大的危害^[1-2]。随着医学水平的不断发展,PCa 的手术和药物治疗手段得到明显改善,但其预后仍然很差,这与缺乏可靠的远处转移和术后复发的预测指标有关。前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)是 PCa 筛查的常用指标,但其敏感度和特异度均不高^[3]。微小核糖核酸(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到重要作用。近期研究发现,miR-148a-3p 及 miR-139-5p 在多种恶性肿瘤中异常表达,并能通过调控多种信号通路调控其发生与发展^[4-5]。本研究通过分析 PCa 患者术前血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 表达水平变化,探讨其与 PCa 术后复发转移的关系,旨在为评估 PCa 患者的预后提供可靠的生物学标志物。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2015 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日海口市第三人民医院泌尿外科和肿瘤内科收治的行根治性前列腺切除术治疗的 PCa 男性患者 142 例,年龄 46~85 岁,中位年龄 67.30 岁。纳入标准:经穿刺活检或术后病理检查诊断为前列腺癌;均符合根治性前列腺切除术指征,且临床及随访资料完整者。排除标准:有严重心、肝、肾疾病及其他恶性肿瘤者;已接受放疗、化疗及手术治疗者;生活不能自理、不能配合本次研究者。本研究通过医院伦理委员会批准(HNKDSYY-2015010837),并与患者签署知情同意书。

1.2 方法

所有研究对象均接受根治性前列腺切除术,术后选择内分泌治疗,对激素敏感型晚期前列腺癌患者以内分泌治疗为主,包括去势(手术去势或药物去势)和抗雄激素治疗(比卡

鲁胺或氟他胺)或去势+抗雄激素治疗;对去势抵抗性前列腺癌患者采用二线内分泌治疗或新型内分泌治疗药物(阿比特龙、多西他赛)。随访时间自治疗结束开始之日算起,要求患者每 3 个月复查 1 次,截止时间为 2018 年 9 月 30 日。随访时间 6~36 个月,中位随访时间 16.2 个月。142 例 PCa 患者根据其在随访期间是否发生复发转移分为 84 例未复发转移组和 58 例复发转移组。复发转移部位主要包括:骨转移 40 例(71.4%),淋巴结转移 8 例(14.3%),肺转移 5 例(8.9%),膀胱转移 3 例(5.4%)。

1.3 引物设计与合成

miR-148a-3p 引物:上游,5'-AGCTCTGCTACTGAGAT-GCG-3';下游,5'-GACTGCCAGCTATCATCG-3'。miR-139-5p 引物:上游,5'-GTACACTCTGTGACTCTCAG-3';下游,5'-ATCGTACTTGATACTACG-3'。

1.4 观察指标

所有患者均于术前采集空腹静脉血 5 mL 置于未加抗凝剂的离心管中,2 500 r/min 离心 15 min($r=8$ cm),分离血清,−80 ℃低温冰箱保存待测。在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)。反应体系为 20 μ L: TaqMan MicroRNA Assay 1.00 μ L, cDNA 1.33 μ L, TaqMan 2 $\times$ Universal PCR Master Mix 10.00 μ L, ddH₂O 7.67 μ L, 混合后离心放入定量 PCR 仪。扩增条件为:95 ℃预变性 10 min、95 ℃变性 15 s、60 ℃复性 60 s 进行 45 个循环,实验重复 3 次。以 U6 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 的相对表达水平,其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{U6}$ 。血清 PSA 水平采用酶联免疫分析法检测,严格按试剂盒说明书操作。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 20.0 对数据进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用卡方检验。绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)分析血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 水平预测 PCa 术后复发转移的价值,曲线下面积(area under curve, AUC)比较采用 Z 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组临床资料比较

复发转移组与未复发转移组的年龄、体质指数、血压、前列腺体积、前列腺癌家族史、糖尿病史、高血压史、冠心病史及吸烟史比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。具体见表 1。

表 1 2 组的临床一般资料比较

项目	未复发转移组 ($n=84$)	复发转移组 ($n=58$)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)	66.80 ± 7.50	68.20 ± 7.90	1.374	0.150
体质指数(kg/m ²)	23.28 ± 2.17	23.45 ± 2.38	0.706	0.384
收缩压(mmHg)	127.84 ± 13.72	129.52 ± 13.64	0.647	0.420
舒张压(mmHg)	77.40 ± 7.35	78.60 ± 7.72	0.852	0.316
前列腺体积(mL)	70.35 ± 15.60	73.48 ± 17.30	1.120	0.190
前列腺癌家族史	5 (6.0)	3 (5.2)	0.039	0.843
糖尿病史	20 (23.8)	16 (27.6)	0.259	0.611
高血压史	25 (29.8)	20 (34.5)	0.353	0.552
冠心病史	13 (15.5)	7 (12.0)	0.329	0.566
吸烟史	30 (35.7)	18 (31.0)	0.336	0.562

2.2 2 组血清 miR-148a-3p 和 miR-139-5p 及 PSA 水平比较

复发转移组血清 miR-148a-3p($t=10.648, P=0.000$)、miR-139-5p($t=14.715, P=0.000$)及 PSA 水平($t=9.804, P=0.000$)高

于未复发转移组,差异有统计学意义。具体见表 2。

表 2 2 组血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 水平比较
($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

	miR-148a-3p	miR-139-5p	PSA
未复发转移组($n=84$)	2.15 ± 0.36	3.50 ± 0.62	18.72 ± 8.60
复发转移组($n=58$)	4.80 ± 0.75	7.64 ± 2.38	63.75 ± 14.92
t 值	10.648	14.715	9.804
P 值	0.000	0.000	0.000

2.3 复发转移患者血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达与临床病理特征关系

复发转移患者血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达水平与肿瘤分期($t=5.117, P=0.024; t=5.304, P=0.018$)、Gleason 评分($t=5.512, P=0.006; t=6.218, P=0.000$)及 PSA 水平($t=10.208, P=0.000; t=13.620, P=0.000$)有关联。具体见表 3。

2.4 血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 水平预测 PCa 术后复发转移的价值

血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 预测 PCa 术后复发转移的最佳截值分别为 3.40、5.38、36.80 ng/mL。三项联合预测 PCa 术后复发转移的 AUC(95%CI)为 0.914(0.858~0.972), 高于 miR-148a-3p[0.795(0.731~0.860)]、miR-139-5p[0.837(0.782~0.895)]及 PSA[0.773(0.712~0.834)], 差异有统计学意义($Z=5.916, Z=4.317, Z=6.248$, 均 $P<0.05$), 其敏感度和特异度分别为 92.0%和 83.6%。具体见表 4、图 1。

表 3 58 例复发转移患者血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达与临床病理特征关系

组别	例数	miR-148a-3p	t 值	P 值	miR-139-5p	t 值	P 值
年龄(岁)			0.683	0.417		0.467	0.584
≥65	32	5.04 ± 0.81			7.90 ± 2.45		
<65	26	4.65 ± 0.70			7.38 ± 2.16		
肿瘤分期(期)			5.117	0.024		5.304	0.018
I ~ II	23	3.84 ± 0.62			6.35 ± 1.74		
III ~ IV	35	5.63 ± 0.91			8.73 ± 2.60		
Gleason 评分(分)			5.512	0.006		6.218	0.000
>7	47	5.87 ± 0.96			9.12 ± 2.80		
≤7	11	3.53 ± 0.51			6.13 ± 1.64		
肿瘤体积(cm)			0.617	0.482		0.816	0.342
≤5	25	4.60 ± 0.72			7.30 ± 2.13		
>5	33	5.13 ± 0.84			7.95 ± 2.42		
PSA 水平(ng/mL)			10.182	0.000		13.617	0.000
>15	48	6.10 ± 1.14			9.60 ± 2.90		
≤15	10	3.32 ± 0.40			5.64 ± 1.53		

表 4 血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 水平预测 PCa 术后复发转移的价值

项目	最佳截值 (ng/mL)	AUC (95%CI)	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	阳性似然比	阴性似然比
miR-148a-3p	3.40	0.795 (0.731 ~ 0.860)	78.4	77.0	75.3	80.4	3.409	0.281
miR-139-5p	5.38	0.837 (0.782 ~ 0.895)	80.0	82.7	79.6	84.0	4.624	0.242
PSA	36.80	0.773 (0.712 ~ 0.834)	76.8	73.5	76.4	73.8	2.898	0.316
三项联合		0.914 (0.858 ~ 0.972)	92.0	83.6	87.0	89.5	5.610	0.096

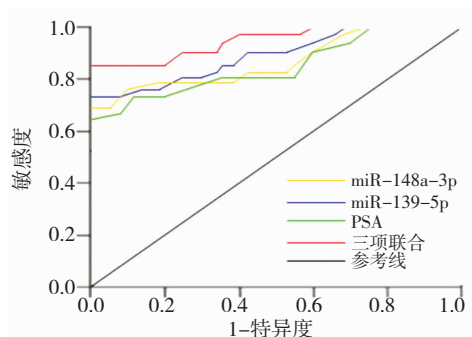


图1 血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 水平预测 142 例 PCa 术后复发转移的 ROC 曲线

2.5 血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 水平与 PSA 相关性

复发转移患者血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 水平与 PSA 均呈正相关($r=0.774, r=0.806$; 均 $P=0.000$), miR-148a-3p 与 miR-139-5p 呈正相关($r=0.835, P=0.000$)。未复发转移患者血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 水平与 PSA 均无明显相关性($r=0.164, r=0.137$; 均 $P>0.05$)。如图 2 所示。

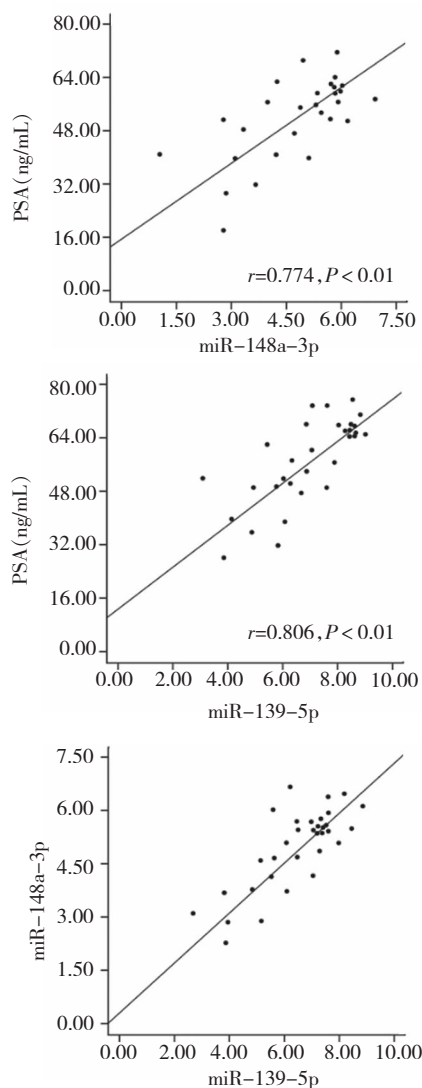


图2 血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 水平与 PSA 相关性

3 讨论

PCa 的发生发展是一个多因素和多基因协同作用过程,其术后复发转移是造成患者死亡的主要原因。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,对恶性肿瘤的发生发展产生影响。近年来研究发现,miR-148a-3p 及 miR-139-5p 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、转移和耐药等多个阶段,有可能为恶性肿瘤的诊断和治疗开辟新的思路^[6-7]。Kanwal 等^[8]对 PCa 患者血清 miRNA 进行了分析,发现多种 miRNA 异常表达与 PCa 的进展及预后密切相关,由此推测 miRNA 在 PCa 的发生、发展、治疗及预后中具有重要的意义。

本研究结果显示,复发转移组血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 水平均高于未复发转移组,提示血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 在复发转移患者中异常高表达,其可能通过发挥癌基因的作用来调节 PCa 的发生发展过程。在复发转移患者中,肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期患者血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达水平高于Ⅰ~Ⅱ期。分析其原因可能是肿瘤分期高的患者病情进展较快,肿瘤组织可释放更多的具有原癌基因作用的 miRNA 进入血液,同时可抑制机体原有的具有抑癌作用的 miRNA 水平表达,进而导致机体 miRNA 表达水平异常升高。PSA 是前列腺组织分泌的一种糖蛋白,PCa 患者血清 PSA 水平较正常健康人群明显升高,监测 PSA 水平对 PCa 患者的诊断及病情评估均具有重要的应用价值^[9]。Gleason 评分是 PCa 分级最常用的方法,可作为评估肿瘤分期、远处转移、肿瘤侵犯及制定治疗方案的主要参考指标^[10]。本研究中 Gleason 评分>7 分及 PSA 水平>20 ng/mL 的复发转移患者血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达水平明显升高,提示术前 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 表达水平升高可能与 PCa 术后发生复发转移有关。罗振国等^[11]研究显示,PCa 患者血清 miRNA-107 表达水平与 Gleason 评分、肿瘤分期及 PSA 水平相关,Gleason 评分>8 分、肿瘤分期Ⅲ~Ⅳ期及 PSA 水平>10 ng/mL

的 PCa 患者血清 miRNA 水平明显升高。黄晓娟等^[12]研究发现,PCa 患者血清和组织中 miR-421 表达水平与 Gleason 评分及 TNM 临床分期相关,miR-421 高表达对 PCa 的发生发展有一定的促进作用,有望辅助 PCa 的早期诊断。亦有研究表明,miRNA 在 PCa 中表达明显升高,且其表达水平与 PSA 水平有一定的相关性,有可能作为 PCa 诊断的生物学标志物^[13]。

本研究应用 ROC 曲线分析显示,血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 预测 PCa 术后复发转移的最佳截值分别为 3.40、5.38、36.80 ng/mL,三项联合预测 PCa 术后复发转移的 AUC 最大,其敏感度和特异度较高。相关分析显示,复发转移患者血清 miR-148a-3p、miR-139-5p 水平与 PSA 均呈正相关,miR-148a-3p 与 miR-139-5p 呈正相关。这说明 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 可作为 PCa 预后评估的非侵入性生物学标志物,联合 PSA 水平检测有助于提高预测 PCa 术后复发转移的敏感度。Dybos 等^[14]研究认为,miR-148a-3p 表达水平与 PCa 患者的进展和预后密切相关,其表达水平越高,预后越差,有望作为 PCa 患者预后评估的新型生物学标志物。另有研究表明,miR-139-5p 表达水平在 PCa 患者外周血中显著升高,可作为 PCa 患者诊断和预后的潜在生物标志物^[15]。

综上所述,复发转移患者术前血清 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 明显升高,且与肿瘤分期、Gleason 评分及 PSA 水平相关,miR-148a-3p、miR-139-5p 及 PSA 三项联合检测对预测 PCa 术后复发转移具有较好的敏感度和特异度。但目前临床实践中还缺乏随访大样本资料支持,miRNA 的来源也没有统一的标准,未来仍需循证医学研究以进一步证实 miR-148a-3p 及 miR-139-5p 在 PCa 中的临床应用价值。

参 考 文 献

[1] Pardo C, Cendales R. Cancer incidence estimates and mortality for the top five cancer in Colombia, 2007–2011[J]. Colomb Med (Cali),

2018, 49(1):16–22.

[2] Chattopadhyay S, Zheng G, Hemminki O, et al. Prostate cancer survivors: risk and mortality in second primary cancers[J]. Cancer Med, 2018, 7(11):5752–5759.

[3] Alberts AR, Schoots IG, Roobol MJ. Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: past and future[J]. Int J Urol, 2015, 22(6):524–532.

[4] Song B, Du J, Song DF, et al. Dysregulation of NCAPG, KNL1, miR-148a-3p, miR-193b-3p, and miR-1179 may contribute to the progression of gastric cancer[J]. Biol Res, 2018, 51(1):44.

[5] Agosta C, Laugier J, Guyon L, et al. MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer[J]. Int J Cancer, 2018, 143(4):944–957.

[6] Wang W, Dong J, Wang M, et al. miR-148a-3p suppresses epithelial ovarian cancer progression primarily by targeting c-Met[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5):6131–6136.

[7] Huang LL, Huang LW, Wang L, et al. Potential role of miR-139-5p in cancer diagnosis, prognosis and therapy[J]. Oncol Lett, 2017, 14(2):1215–1222.

[8] Kanwal R, Plaga AR, Liu X, et al. MicroRNAs in prostate cancer: functional role as biomarkers[J]. Cancer Lett, 2017, 407:9–20.

[9] Pezaro C, Woo HH, Davis ID. Prostate cancer: measuring PSA[J]. Intern Med J, 2014, 44(5):433–440.

[10] Rusthoven CG, Carlson JA, Waxweiler TV, et al. The prognostic significance of Gleason scores in metastatic prostate cancer[J]. Urol Oncol, 2014, 32(5):707–713.

[11] 罗振国, 邓勇泉, 陈向锋, 等. 血清 miRNA-107 检测在前列腺癌诊断与预后判断中的价值[J]. 中国男科学杂志, 2018, 32(2):52–54.

[12] 黄晓娟, 张 力, 徐凌凡, 等. 前列腺癌患者血清和组织中 miR-421 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(6):610–614.

[13] Leidinger P, Hart M, Backes C, et al. Differential blood-based diagnosis between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: miRNA as source for biomarkers independent of PSA level, Gleason score, or TNM status[J]. Tumour Biol, 2016, 37(8):10177–10185.

[14] Dybos SA, Flatberg A, Halgunset J, et al. Increased levels of serum miR-148a-3p are associated with prostate cancer[J]. APMIS, 2018, 126(9):722–731.

[15] Pang C, Liu M, Fang W, et al. MiR-139-5p is increased in the peripheral blood of patients with prostate cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(8):1111–1117.

(责任编辑:唐秋姗)