

论著·临床研究

血清 miR-17-92 基因簇对视网膜母细胞瘤诊断价值的研究

陈言钊 刘智屏 周克英 李博

(暨南大学第二临床医学院暨深圳市人民医院儿科, 广东 深圳 518020)

[摘要] **目的** 分析血清 miR-17-92 基因簇对视网膜母细胞瘤(RB)的诊断价值。**方法** 采用实时定量PCR法检测20例RB患儿、20名健康对照者的血清 miR-17-92 基因簇表达水平,分析其不同分期RB患儿的表达差异及综合治疗前后的变化,并采用ROC曲线判断其对RB的诊断价值。**结果** RB患儿血清中 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a 和 miR-20a 的相对表达量均高于健康对照组,以 miR-18a 升高更为显著,差异均有统计学意义($P<0.05$);两组 miR-19a、miR-19b-1 和 miR-92a-1 相对表达量的差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-17-5P、miR-17-3P、miR-18a 和 miR-20a 表达量在早中期和晚期RB患儿之间的差异均无统计学意义($P>0.05$),但综合治疗后表达量显著降低($P<0.05$)。miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a 和 miR-20a 对RB诊断价值的曲线下面积(AUC)分别为0.770、0.755、0.828和0.665,以 miR-18a 的AUC最大,并具有较好的灵敏度(90%)和特异度(65%)。**结论** miR-17-92 基因簇的 miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a 和 miR-20a 在RB患儿血清中高表达,miR-18a 有可能作为RB诊断的新指标。

[中国当代儿科杂志, 2017, 19(7): 776-780]

[关键词] 视网膜母细胞瘤;微小核糖核酸;诊断;儿童

Value of serum miR-17-92 cluster in diagnosis of retinoblastoma

CHEN Yan-Zhao, LIU Zhi-Ping, ZHOU Ke-Ying, LI Bo. Department of Pediatrics, Shenzhen People's Hospital, Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen, Guangdong 518020, China (Zhou K-Y, Email: keyingzhou@163.com)

Abstract: Objective To investigate the value of serum miR-17-92 cluster in the diagnosis of retinoblastoma (RB). **Methods** Serum samples were collected from 20 children with RB and 20 healthy controls. Quantitative real-time PCR was used to measure the expression of miR-17-92 cluster. The expression of miR-17-92 cluster was compared between children with different stages of RB and the changes in the expression of miR-17-92 cluster after multimodality therapy were analyzed. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to investigate the value of serum miR-17-92 cluster in the diagnosis of RB. **Results** Compared with the healthy controls, the children with RB had significantly higher relative expression of miR-17-3P, miR-17-5P, miR-18a, and miR-20a in serum ($P<0.05$), and miR-18a showed the greatest increase. There were no significant differences in the relative expression of miR-19a, miR-19b-1, and miR-92a-1 between children with RB and healthy controls ($P>0.05$). There were no significant differences in the expression of miR-17-5P, miR-17-3P, miR-18a, and miR-20a between the children with early-to-moderate stage of RB and those with advanced stage of RB ($P>0.05$), but there were significant reductions after multimodality therapy ($P<0.05$). In the diagnosis of RB, the areas under the ROC curve (AUCs) for serum miR-17-3P, miR-17-5P, miR-18a, and miR-20a were 0.770, 0.755, 0.828, and 0.665 respectively, and miR-18a had the largest AUC, with a sensitivity of 90% and a specificity of 65%. **Conclusions** miR-17-3P, miR-17-5P, miR-18a, and miR-20a are highly expressed in the serum of children with RB, and miR-18a may be used as a new marker for the diagnosis of RB.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(7): 776-780]

Key words: Retinoblastoma; microRNA; Diagnosis; Child

[收稿日期] 2017-02-24; [接受日期] 2017-03-28

[基金项目] 深圳市卫生计生系统科研项目(编号: 20151007)。

[作者简介] 陈言钊,男,硕士,主治医师。

[通信作者] 周克英,男,主任医师。

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是一种起源于视网膜胚胎性核层细胞的恶性肿瘤, 是婴幼儿最常见、危害性最大的原发性眼内恶性肿瘤, 由于缺乏特异性的检测手段, 致使其难以早期诊断^[1]。在发展中国家对 RB 的延迟诊断达 6 个月以上, 导致死亡率增加 70%^[2]。提高我国 RB 患儿的早期诊断水平是挽救患儿生命、提高存活率的关键。microRNA (miRNA 或 miR) 是一类广泛存在于生物体的 18~24 个核苷酸的内源性非编码小 RNA, 通过与目标 mRNA 特定区域不同程度的互补结合而引起后者的降解或者翻译抑制, 在多种恶性肿瘤中表达, 并调控细胞增殖、侵袭转移。miR-17-92 基因簇是一种有效的 microRNA 编码癌基因, 定位于人染色体 13q31-q32 上, 可产生 miR-17-3p、miR-17-5p、miR-18a、miR-19a、miR-19b-1、miR-20a 和 miR-92a-1 等 7 个成熟的 miRNA^[3]。miR 17-92 基因簇可能与 RB 发生发展有关。Lillington 等^[4]、Kandalam 等^[5]研究发现, miR 17-92 基因簇在原发性 RB 中过度表达, 而上皮细胞粘附分子的抑制剂可导致 miR 17-92 基因簇表达减少, 进而细胞增殖、侵袭能力降低。但国内未见 miR-17-92 基因与视网膜母细胞瘤发生发展关系的研究报道。本研究通过实时定量 PCR (real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 miR-17-92 基因簇在 RB 患儿和健康对照者的表达, 分析不同分期 RB 和其综合治疗前后的 miR-17-92 基因表达水平的差异, 初步探讨其对 RB 的诊断价值, 为提高 RB 诊断率及改善预后提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2013 年 1 月至 2017 年 1 月于深圳市眼科医院确诊及深圳市人民医院接受化疗, 且临床资料完整的 20 例 RB 患儿为研究对象。RB 患儿根据眼部表现, 尤其是典型眼底改变, 再结合眼部 CT、双眼彩色超声多普勒、眼底照相和/或眼球摘除后的病理检查确诊。患儿年龄 3~57 个月, 平均 20 ± 17 个月; 男 11 例 (55%), 女 9 例 (45%); 单眼受累 14 例 (70%), 双眼 6 例 (30%)。局限于眼球内的肿瘤采用国际 RB 分期 (intraocular

international retinoblastoma classify, IIRC) 分为 A~E 期^[6]。双眼 RB 患儿按病情较重侧患眼的分期参与研究。20 例患儿中 A~C 期 (早中期) 5 例、D~E 期 (晚期) 15 例 (D 期 9 例 +E 期 6 例)。对照组选取同期我院健康体检儿童 20 例, 其中男性 10 例、女性 10 例, 年龄 4~56 个月、平均 23 ± 18 个月。病例组和对照组在年龄、男女比例方面的差异无统计学意义。本研究获得医院伦理委员会批准, 及研究对象监护人知情同意。

1.2 治疗方案

RB 患儿采用以化疗为主结合激光光凝、冷凝及眼球摘除手术等综合治疗原则^[6]。20 例患儿均以化疗为基础, 结合激光治疗者 4 例, 冷凝处理者 2 例, 手术眼球摘除者 11 例。化疗采用卡铂、依托泊苷和长春新碱三联方案^[7-8], 由儿科医生负责; 而激光光凝、冷凝及眼球摘除手术等则由眼科医师负责。对于早期发现的体积较小且较为局限的 RB, 采用激光光凝或冷凝等治疗, 具体方案根据肿瘤的位置和大小制定。部分早期保眼患儿经过化疗后病情仍进展, 需行眼球摘除手术。所有病例均定期于眼科医院随诊、评估。

1.3 qRT-PCR 检测 miR-17-92 基因簇表达

采集病例组综合治疗前、化疗后 1 周内以及健康对照组的空腹静脉血 3 mL, 1500 r/min 离心 10 min, 收集血清, 保存备检。

取 100 μ L 样品加入 300 μ L 焦碳酸二乙酯水, 提取总 RNA, -80°C 保存备用。采用所提取的 RNA 与 AMV (avian myeloblastosis virus) 逆转录酶 (Takara 公司)、逆转录引物 (ABI 公司) 等制备逆转录体系, 合成 cDNA。

参照 Taqman miRNA (ABI 公司) qRT-PCR 说明书制备反应体系, 于 ABI Prism 7300 荧光定量 PCR 仪中行扩增和荧光信号检测, 反应条件: 95°C 预变性 15 min; 95°C 变性 15 秒, 60°C 退火 60 秒, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各目标 miRNA 相对表达量, 结果用倍数表示^[9]。所有样本均重复验证, 每个样本独立重复试验 3 次。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两个独立样本组间比较采用 t 检验; 计数资料以百分率表示, 采用 χ^2 检验。采用 ROC 曲线下面积 (area under

the curve, AUC) 反映血清 miRNA 诊断的准确性。AUC=0.5 表示无诊断价值; $0.5 < \text{AUC} \leq 0.7$, 表示诊断准确性较低; $0.7 < \text{AUC} \leq 0.9$, 表示准确性中等; $0.9 < \text{AUC} < 1$, 表示诊断准确性较高; AUC=1 表示理想的诊断价值。取 ROC 曲线中最靠近左上角的一点做为预测诊断临界值, 其灵敏度和特异度之和最大。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 miR-17-92 基因簇的相对表达量

RB 患儿血清中 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a 和 miR-20a 的相对表达量均高于对照组, 以 miR-18a 升高更为显著, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而两组间 miR-19a、miR-19b-1 和 miR-92a-1 相对表达量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组 miR-17-92 基因簇的相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-17-3P	miR-17-5P	miR-18a	miR-19a	miR-19b-1	miR-20a	miR-92a-1
对照组	20	1.7 ± 1.0	1.7 ± 1.2	2.6 ± 2.1	1.7 ± 1.2	1.7 ± 1.1	2.6 ± 2.3	1.7 ± 1.0
病例组	20	3.3 ± 2.1	3.3 ± 2.1	9.8 ± 8.1	2.1 ± 1.3	1.9 ± 1.1	5.3 ± 4.9	1.8 ± 1.1
t 值		3.191	2.979	3.857	0.967	0.597	2.255	0.386
P 值		0.004	0.006	<0.001	0.340	0.554	0.032	0.702

2.2 不同分期 RB 患儿的 miR-17-5P、miR-17-3P、miR-18a 和 miR-20a 表达比较

miR-17-5P、miR-17-3P、miR-18a 和 miR-20a 表达量在早中期 (IIRC 分期 A~C 期) 和晚期 (IIRC 分期 D~E 期) RB 患儿之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 不同分期 RB 患儿的 miR-17-5P、miR-17-3P、miR-18a 和 miR-20a 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-17-3P	miR-17-5P	miR-18a	miR-20a
早中期	5	3.1 ± 1.8	3.0 ± 1.0	8 ± 7	6 ± 5
晚期	15	3.3 ± 2.2	3.3 ± 2.1	10 ± 8	5 ± 4
t 值		-0.214	-0.420	-0.503	0.470
P 值		0.833	0.680	0.621	0.644

2.3 miR-17-5P、miR-17-3P、miR-18a 和 miR-20a 在 RB 患儿综合治疗前后的表达比较

研究过程中脱落 3 例, 共计 17 例 RB 患儿完成综合治疗, 与治疗前相比, 治疗后 miR-17-5P、miR-17-3P、miR-18a 和 miR-20a 相对表达量减少 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 miR-17-5P、miR-17-3P、miR-18a 和 miR-20a 在 RB 患儿治疗前后的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-17-3P	miR-17-5P	miR-18a	miR-20a
治疗前	20	3.3 ± 2.1	3.3 ± 2.1	9.8 ± 8.1	5.3 ± 4.9
治疗后	17	1.8 ± 1.3	1.8 ± 1.4	3.0 ± 2.3	2.8 ± 2.3
t 值		2.803	2.504	3.617	2.068
P 值		0.009	0.017	<0.001	0.048

2.4 miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a 和 miR-20a 对 RB 诊断价值的 ROC 曲线分析

miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a 和 miR-20a 对 RB 诊断价值的 ROC 曲线分析显示, miR-18a 的 AUC 最大, 对诊断 RB 具有较好的灵敏度 (90%) 和特异度 (65%), 见表 4 和图 1。

表 4 miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a 和 miR-20a 对 RB 诊断价值的 ROC 曲线分析

项目	AUC	95%CI	临界值	灵敏度	特异度	P 值
miR-17-3P	0.770	0.624~0.916	1.135	90	50	0.003
miR-17-5P	0.755	0.605~0.905	1.135	90	45	0.006
miR-18a	0.828	0.700~0.955	2.175	90	65	<0.001
miR-20a	0.665	0.494~0.836	1.245	80	60	0.074

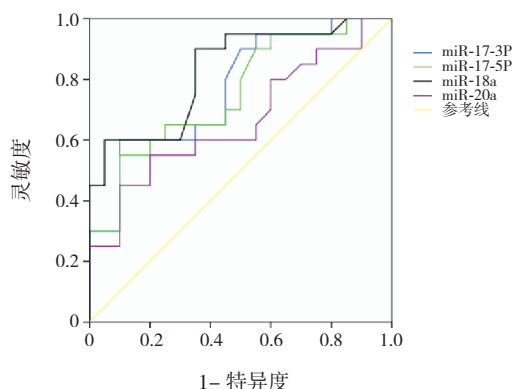


图1 miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a 和 miR-20a 对 RB 诊断价值的 ROC 曲线分析

3 讨论

我国每年报告新发视网膜母细胞瘤(RB)病例约1300例,约85%的RB患儿发病年龄<5岁,占儿童致盲原因的5%^[10]。RB在美欧国家存活率可高达95%~100%,因早期诊断保存了一部分视力^[11];而欠发达国家包括我国在内的RB患儿诊断时多为高风险的晚期,常伴有复发转移,眼球摘除率较高。神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)是目前临床广泛采用的RB肿瘤标志物,但神经母细胞瘤等其它恶性肿瘤也可使其增高,存在较高的假阳性率^[12]。因此,寻找新的敏感的RB肿瘤标记物具有十分重要的意义。

miR-17-92基因簇在部分肿瘤高表达已被证实^[13-16]。Conkrite等^[17]发现,在成年小鼠和人类的RB中,miR-17-92基因簇均呈高表达,miR-17-92过表达可抑制细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂上调,促进增殖,驱动视网膜母细胞瘤形成。Nittner等^[18]研究表明,miR-17-92失活可抑制小鼠成视网膜细胞瘤形成,并且miR-17/20a和p53的共沉默协同降低了人视网膜细胞瘤细胞的存活。说明miR-17-92基因簇表达与RB关系密切,有可能作为候选肿瘤标记物诊断RB。本研究发现,RB患儿血清miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a和miR-20a相对表达量较对照组升高,与Kandalam等^[5]研究基本一致。结果还显示,miR-17-92基因簇表达量升高最多的是miR-18a,与Yang等^[19]报道一致,提示miR-18a可能可作为RB的诊断标志物。本研究RB患儿血清miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a和miR-20a在RB早中期和晚期患儿之间的表

达差异并无统计学意义,说明miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a和miR-20a可能在RB早期即已参与RB的发生发展,显示出作为RB肿瘤标志物的优势。综合治疗后RB患儿miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a和miR-20a相对表达量明显降低,提示这4种miRNA有可能可作为RB随访监测的指标。miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a和miR-20a的ROC曲线分析显示,miR-18a的AUC最大、并具有较好的灵敏度(90%)和特异度(65%)。提示miR-18a对于RB诊断可能具有较高的价值,扩大样本量、并进行治疗后的随访监测以进一步验证其诊断价值。随着人们对miRNAs在RB发生、发展和转移作用的研究不断深入,miR-17-92基因簇不仅有望作为RB肿瘤标志物,在RB的早期诊断中起到重要作用,还可能作为肿瘤生物治疗的靶点,为RB的预防、临床诊断、预后和靶向治疗提供新的契机。研究显示,SD-208[转化生长因子(TGF)- β RI激酶抑制剂]可以通过调节包括miR-17-92簇在内的一些miRNA表达而发挥抗癌作用,表明SD-208可能是视网膜母细胞瘤治疗的替代药物^[20]。Jo等^[21]研究显示,细胞信号激活和转录因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的激活与视网膜母细胞瘤细胞中miR-17-92基因簇上调相关,STAT3抑制剂可能可作为是视网膜母细胞瘤新的治疗方法。

综上所述,miR-17-92基因簇中miR-17-3P、miR-17-5P、miR-18a和miR-20a在RB患儿表达增加,可能参与了RB的发生发展过程,其中以miR-18a相对表达量最大和曲线下面积最大,有可能做为RB诊断的筛查指标。

[参 考 文 献]

- [1] Ortiz MV, Dunkel IJ. Retinoblastoma[J]. J Child Neurol, 2016, 31(2): 227-236.
- [2] Chang CY, Chiou TJ, Hwang B, et al. Retinoblastoma in Taiwan: survival rate and prognostic factors[J]. Jpn J Ophthalmol, 2006, 50(3): 242-249.
- [3] Attar M, Arefian E, Nabiuni M, et al. MicroRNA 17-92 expressed by a transposon-based vector changes expression level of cell-cycle-related genes[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(11): 1005-1012.
- [4] Lillington DM, Kingston JE, Coen PG, et al. Comparative genomic hybridization of 49 primary retinoblastoma tumors identifies chromosomal regions associated with histopathology, progression, and patient outcome[J]. Genes Chromosomes

- Cancer, 2003, 36(2): 121-128.
- [5] Kandalam MM, Beta M, Maheswari UK, et al. Oncogenic microRNA 17-92 cluster is regulated by epithelial cell adhesion molecule and could be a potential therapeutic target in retinoblastoma[J]. Mol Vis, 2012, 18: 2279-2287.
- [6] Dimaras H, Kimani K, Gallic BL, et al. Retinoblastoma[J]. Lancet, 2012, 379(9824): 1436-1446.
- [7] 路璐, 唐松, 郭慧, 等. 全身化学药物治疗对晚期视网膜母细胞瘤患儿肿瘤浸润和眼外转移及特定疾病生存率的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2016, 32(4): 404-407.
- [8] 刘智屏, 陈俐丽, 李博, 等. 鞘内化疗防治视网膜母细胞瘤颅内转移疗效观察[J]. 海南医学, 2016, 27(19): 3211-3213.
- [9] 国芳, 姚玮艳, 戴欣, 等. 血清 miRNA 作为胃癌早期诊断标记物的初步研究[J]. 胃肠病学, 2014, 19(4): 198-202.
- [10] 王建仓, 赵敬聪, 赵军阳, 等. 早期视网膜母细胞瘤激光光凝治疗效果[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2014, 16(6): 376-378.
- [11] MacCarthy A, Birch JM, Draper GJ, et al. Retinoblastoma: treatment and survival in Great Britain 1963 to 2002[J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93: 38-39.
- [12] 胡慧敏, 王一卓, 黄东生, 等. 视网膜母细胞瘤患儿化疗前后血清及脑脊液实验室指标的变化[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(15): 1157-1160.
- [13] Andreas E, Hoelker M, Neuhoef C, et al. MicroRNA 17-92 cluster regulates proliferation and differentiation of bovine granulosa cells by targeting PTEN and BMP2 genes[J]. Cell Tissue Res, 2016, 366(1): 219-230.
- [14] Dellago H, Bobbili MR, Grillari J. MicroRNA-17-5p: At the crossroads of cancer and aging - A mini-review[J]. Gerontology, 2017, 63(1): 20-28.
- [15] Brockway S, Zeleznik-Le NJ. WEE1 is a validated target of the microRNA miR-17-92 cluster in leukemia[J]. Cancer Genet, 2015, 208(5): 279-287.
- [16] 于宇, 张淑兰. miR-17-92 基因簇研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 41(2): 124-127.
- [17] Konkrite K, Sundby M, Mukai S, et al. miR-17-92 cooperates with RB pathway mutations to promote retinoblastoma[J]. Genes Dev, 2011, 25(16): 1734-1745.
- [18] Nittner D, Lambert I, Clermont F, et al. Synthetic lethality between Rb, p53 and Dicer or miR-17-92 in retinal progenitors suppresses retinoblastoma formation[J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(9): 958-965.
- [19] Yang Y, Mei Q. miRNA signature identification of retinoblastoma and the correlations between differentially expressed miRNAs during retinoblastoma progression[J]. Mol Vis, 2015, 21: 1307-1317.
- [20] Fadakar P, Akbari A, Ghassemi F, et al. Evaluation of SD-208, a TGF- β -RI kinase inhibitor, as an anticancer agent in retinoblastoma[J]. Acta Med Iran, 2016, 54(6): 352-358.
- [21] Jo DH, Kim JH, Cho CS, et al. STAT3 inhibition suppresses proliferation of retinoblastoma through down-regulation of positive feedback loop of STAT3/miR-17-92 clusters[J]. Oncotarget, 2014, 5(22): 11513-11525.

(本文编辑: 俞燕)