

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.05.0659

• 短篇论著 •

## MicroRNA-4286 在前列腺癌诊断中的价值

赵琳, 王富博, 施晓磊, 陈锐, 朱亚生, 许传亮, 孙颖浩\*

第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 检测血清前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)升高患者 microRNA-4286 (miR-4286)的表达情况,探讨其在前列腺癌诊断中的意义。**方法** 选择2016年3月至8月第二军医大学长海医院日间手术病区收治的171例血清PSA升高、行前列腺穿刺活检的患者,采用qPCR技术检测miR-4286在血清中的表达,比较前列腺癌(50例)和良性前列腺病变(121例)患者miR-4286表达的差异。并且分析10例良性病变患者术前与术后3d的血清miR-4286的表达变化,以及15例PCa患者的术前与术后3d及8例术前与术后7d的血清miR-4286的表达变化。以受试者工作特征曲线分析评价miR-4286对PCa的诊断效能。**结果** MiR-4286在前列腺癌和良性前列腺病变患者中的表达水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。术后3d前列腺癌患者miR-4286的表达水平升高,与术前相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。术后3d良性前列腺病变患者miR-4286的表达水平与术前相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。术后7d miR-4286在前列腺癌患者中的表达水平与术前相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。MiR-4286和PSA在前列腺癌中的诊断效能分别为曲线下面积(AUC)0.653(界值3.72,敏感性68.75%,特异性60.06%)和0.733(界值11.38 ng/mL,敏感性57.16%,特异性92.35%)。**结论** MiR-4286在前列腺癌中具有良好的诊断价值,可作为新型的液体活检标志物。

**[关键词]** microRNA-4286;前列腺肿瘤;诊断;生物学肿瘤标志物

**[中图分类号]** R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0659-05

### Diagnostic value of microRNA-4286 in prostate cancer

ZHAO Lin, WANG Fu-bo, SHI Xiao-lei, CHEN Rui, ZHU Ya-sheng, XU Chuan-liang, SUN Ying-hao\*

Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the diagnostic significance of microRNA-4286 (miR-4286) for prostate cancer through detecting its expression in patients with an elevated serum prostate-specific antigen (PSA) level. **Methods** We selected 171 patients with an elevated serum PSA level who underwent prostate biopsy at Day Ward between Mar. 2016 and Aug. 2016 in Changhai Hospital of Second Military Medical University; we determined and compared the expression of serum miR-4286 in 50 patients with prostate cancer and 121 with benign prostate diseases by qPCR assay. The serum miR-4286 levels were analyzed at pre-operation and three-day post-operation in 10 patients with benign prostate disease and 15 patients with prostate cancer, and at pre-operation and seven-day post-operation in 8 cases with prostate cancer. The receiver operating characteristic curve was used to evaluate the diagnostic performance of miR-4286 for prostate cancer. **Results** The expression of miR-4286 showed a significant difference between the prostate cancer and benign prostatic disease patients ( $P < 0.05$ ). The expression of 3-day post-operative miR-4286 was significantly elevated compared with pre-operation in the prostate cancer patients ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference in the expression of miR-4286 between pre- and 7 days post-operation in the prostate cancer patients ( $P > 0.05$ ) or between pre- and 3 days post-operation in the benign prostatic disease patients ( $P > 0.05$ ). The areas under curve of the miR-4286 and PSA were 0.653 (cut-off value 3.72, sensitivity 68.75%, specificity 60.06%) and 0.733 (cut-off value

**[收稿日期]** 2017-02-16 **[接受日期]** 2017-04-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(81430058),上海市卫生和计划生育委员会联合攻关项目(2013ZYJB0101). Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (81430058) and Joint Research Projects of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2013ZYJB0101).

**[作者简介]** 赵琳, 硕士生, 住院医师. E-mail: yszhaolin@163.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161718, E-mail: sunyhsmmu@126.com

11.38 ng/mL, sensitivity 57.16%, specificity 92.35%), respectively. **Conclusion** miR-4286 has a good diagnostic value and may be a new biomarker for liquid-biopsy in prostate cancer.

[**Key words**] microRNA-4286; prostatic neoplasms; diagnosis; biological tumor markers

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 659-663]

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤,在男性肿瘤致死率中居第2位,并且随着人口寿命的增长,发病率逐年升高<sup>[1-2]</sup>。早期的PCa通常无明显(或无特异性)临床表现,患者多数是在出现尿路梗阻症状就诊时,因随检的前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)升高,行前列腺穿刺活检术而诊断出来。PSA作为应用最为普及的PCa诊断标志物,灵敏度高但特异性低,特别在用于我国老年男性患者时,造成了一定的过度诊疗。早期诊断、早期治疗对PCa患者的治疗和预后至关重要,因此寻找可靠、有效且适用于我国老年男性患者的PCa诊断分子标志物是目前临床研究的热点和难点。微小RNA(microRNA)是大小约为22个核苷酸的短链非编码RNA,在细胞增殖和分化、器官的形成和发育及肿瘤进展等方面均有着重要作用<sup>[3]</sup>。MiR-4286定位于人类染色体8p23.1,碱基序列为5'-ACC CCA CUC CUG GUA CC-3',多项研究证实其在肿瘤中的表达发生

变化<sup>[4-5]</sup>。我科实验室在72例血液样本microRNA芯片的数据基础上,发现了在癌与非癌患者中差异性表达的miR-4286,本研究检测了PSA升高患者的血清miR-4286的表达差异,旨在探索miR-4286与PCa的关系,研究其诊断价值。

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 前瞻性收集2016年3月至8月本院日间手术病区PSA升高、行前列腺穿刺活检的患者171例,中位年龄67.0岁(我院>75岁患者至泌尿外科病房住院穿刺),中位PSA 11.17 ng/mL;经直肠B超引导下前列腺穿刺活检术共检出PCa 50例、良性前列腺病变121例。良性病变中,良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH) 113例、前列腺上皮内瘤变(PIN I级)8例(表1)。所有患者自愿签署科研样本留取协议书,所取血清样本置于-80℃冰箱保存。所有患者均未接受过PCa相关的内分泌治疗。患者的确诊均以穿刺活检的病理诊断为依据。

表1 研究样本的临床参数

指标	总例数 N=171	PCa N=50	BPH+PIN N=121	P值
年龄(岁),中位数(Q1,Q3)	67.0(63.0,71.0)	66.5(63.0,69.5)	71.0(64.5,71.5)	>0.05
PSA ρ <sub>B</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> ),中位数(Q1,Q3)	11.17(9.58,20.62)	15.00(8.87,18.83)	8.49(6.32,10.86)	>0.05
直肠指检 n	36	25	11	<0.05
前列腺体积 V/mL,中位数(Q1,Q3)	46.86(34.86,54.72)	38.75(32.46,45.30)	50.62(38.68,56.82)	<0.05
Gleason 评分 n				
≤6		14		
7		15		
≥8		21		

PSA: 前列腺特异性抗原; PCa: 前列腺癌; BPH: 良性前列腺增生; PIN: 前列腺上皮内瘤变

1.2 试剂与仪器 BD采血管(美国BD公司),离心管(美国Axygen公司),RNA提取试剂盒(AM1556)、TaqMan反转录试剂盒、TaqMan探针(美国Life公司)。离心机为德国Eppendorf公司产品,普通反转录设备为美国Bio-Rad公司产品,qPCR仪为美国Life公司的ABI StepOnePlus实时荧光定量PCR仪。

1.3 标本采集与处理 早晨采集患者空腹静脉血3.5 mL,1 600 ×g离心10 min,吸取上清于1.5 mL

离心管中,再次于17 949 ×g 10 min离心,吸取350 μL上层血清置于1.5 mL离心管中,置于-80℃冰箱中保存。使用RNA抽提试剂盒从血清样本中提取总RNA,NanoDrop 2000紫外分光光度计测量RNA浓度及纯度,光密度介于1.8~2.1之间的样本用于后续实验。反转录体系为30 μL,包括10.00 μL RNA样品、0.30 μL dNTP、2.00 μL MultiScribe™反转录酶、3.00 μL 10×反转录缓冲液、0.38 μL RNase抑制剂、8.32 μL无核酸酶水、

6  $\mu\text{L}$  5 $\times$  反转录引物。反转录引物使用购置 TaqMan 探针时附带的 5 $\times$  特定引物,反转录条件为 16  $^{\circ}\text{C}$  30 min、42  $^{\circ}\text{C}$  30 min、85  $^{\circ}\text{C}$  5 min,反转录产物置于-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.4 TaqMan 法检测 miR-4286 在血清中的表达 采用 qPCR 法检测 miR-4286 在血清中的表达水平,反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,其中 TaqMan Small RNA Assay (20 $\times$ ) 1.00  $\mu\text{L}$ , cDNA 1.33  $\mu\text{L}$ , TaqMan 通用型 PCR Master Mix II (2 $\times$ ) 10.00  $\mu\text{L}$ ,无核酸酶水 7.67  $\mu\text{L}$ ;qPCR 反应条件及要求依据试剂盒(4465407, Reversion C, 01/2013)推荐条件进行,反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  2 min,60  $^{\circ}\text{C}$  60 s,40 个循环。血清 miR-4286 的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行计算。

1.5 统计学处理 应用 MedCalc 11.4.2.0 软件进行统计学分析,两组均数间的差异性分析采用 Mann-Whitney U 检验,两配对样本资料的差异性分析采用 Wilcoxon 配对符号秩检验,诊断效能分析采用受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线,使用曲线下面积(AUC)比较诊断效能。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 PCa 和良性病变患者的血清 miR-4286 表达水平 用 miR-1228 作为内参,经检测 miR-4286 在 PCa 和良性病变(BPH+PIN)患者血清中均稳定表达,其中 PCa 患者 miR-4286 表达量的中位数为 3.291(95%CI: 2.616~4.146),良性病变患者表达量的中位数为 2.538 (95%CI: 2.107~3.289),差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1。

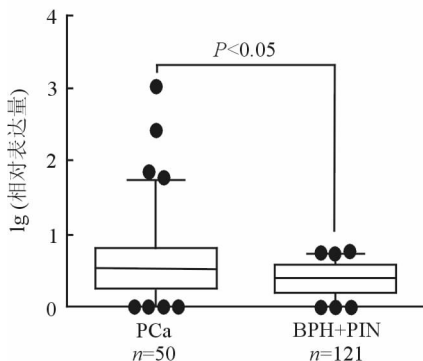


图 1 PCa 和良性病变患者血清 miR-4286 的表达

PCa: 前列腺癌; BPH: 良性前列腺增生; PIN: 前列腺上皮内瘤变

2.2 PCa 和良性病变患者血清 miR-4286 在术前与

术后的表达 本研究在参考文献[6]的基础上,分析研究了 10 例良性病变患者术前与术后 3 d 的血清 miR-4286 的表达变化,以及 15 例 PCa 患者的术前与术后 3 d 及 8 例 PCa 患者术前与术后 7 d 的血清 miR-4286 的表达变化。结果显示在良性病变患者中,术后 3 d miR-4286 的表达水平较术前升高,但差异无统计学意义( $P>0.05$ );而在 PCa 患者中,术后 3 d miR-4286 的表达水平较术前升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。术后 7 d PCa 患者血清 miR-4286 的表达水平较术前无显著变化( $P>0.05$ ),见图 3。

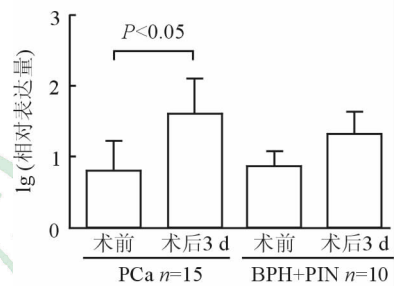


图 2 PCa 和良性病变患者血清 miR-4286 在术前与术后 3 d 的表达

PCa: 前列腺癌; BPH: 良性前列腺增生; PIN: 前列腺上皮内瘤变.  $\bar{x}\pm s$

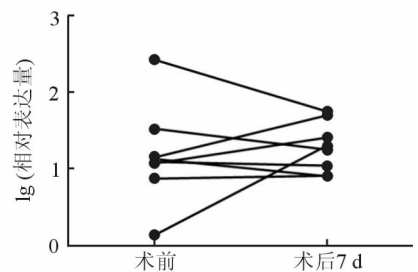


图 3 PCa 患者血清 miR-4286 在术前和术后 7 d 的表达

PCa: 前列腺癌.  $n=8$

2.3 MiR-4286 在 PSA 升高患者中的诊断效能 在 171 例血清 PSA 升高患者中的研究发现,miR-4286 在 PSA 升高患者中具有一定的诊断价值。在 171 例穿刺患者中,使用 miR-4286 的血清表达差异诊断 PCa,在界值为 3.72 时,AUC 可达 0.653,敏感性为 68.75%,特异性为 60.06%。而使用 PSA 进行诊断分析,在界值为 11.38 ng/mL 时 AUC 达到 0.733,敏感性为 57.16%,特异性为 92.35%。联合使用 PSA 和 miR-4286 的表达水平诊断 PCa 时,AUC 可高达 0.766 (95%CI: 0.691~0.830),敏感性为 56.58%,特异性高达 94.81%。详见表 2 和图 4。



表2 PSA和miR-4286对前列腺腺癌的诊断效能分析

指标	AUC	敏感性(%)	特异性(%)	95% CI	界值
MiR-4286	0.653	68.75	60.06	(0.569, 0.731)	3.72
年龄	0.546	92.31	19.48	(0.464, 0.626)	58.0岁
PSA	0.733	57.16	92.35	(0.653, 0.786)	11.38 ng/mL
PSA+miR-4286	0.766	56.58	94.81	(0.691, 0.830)	0.506

PSA: 前列腺特异性抗原; AUC: 曲线下面积; CI: 置信区间

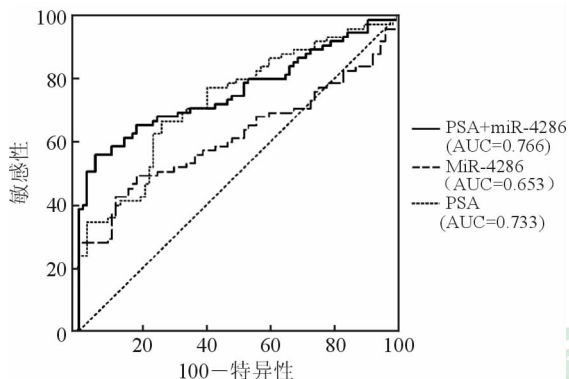


图4 MiR-4286、PSA和PSA+miR-4286诊断前列腺腺癌的ROC曲线

PSA: 前列腺特异性抗原; ROC: 受试者工作特征; AUC: 曲线下面积

### 3 讨论

目前PCa的发病与进展机制尚不明确<sup>[7]</sup>, PSA是PCa筛查、诊断、预后及进展的常用标志物, 应用虽然已经普及, 但是PSA的高敏感性、低特异性的特点使其在临床应用上存在一定的局限性。如BPH患者和前列腺炎患者的血清PSA也会有一定程度的升高, 这直接影响了医师的诊断, 也在一定程度上导致对血清PSA升高患者的过度诊疗<sup>[8]</sup>。目前关于microRNA在PCa中的诊断研究越发详细<sup>[9-11]</sup>, 研究表明miR-4286与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[5, 11-12]</sup>。研究显示miR-4286在黑素瘤及食管癌中均高表达, 并且在食管癌患者的循环血液中存在高表达<sup>[11-12]</sup>, 有望成为液体活检(liquid biopsy)的新型标志物, 但是miR-4286在PCa中的研究目前尚无报道。本研究依据对我科实验室检测的血液microRNA芯片的数据分析, 找出在PCa患者和良性病变患者中差异性表达的miR-4286, 采用高特异性的TaqMan探针技术方法, 检测了我院连续性系统穿刺的PSA升高患者的血清miR-4286的表达情况, 发现其在PCa患者中的表达高于良性病变患者( $P < 0.05$ )。因此通过检测PSA升高患者中miR-

4286的表达情况能够将PCa患者与非癌患者有效区分开来, 并且可以辅助PSA联合诊断, 提高临床医师对于PCa患者的早期诊断率, 也在一定程度上减少了PSA升高患者的过度诊疗。本研究还进行了PCa患者与良性病变患者血清中miR-4286术前与术后的表达水平的变化检测, 结果提示miR-4286与PCa存在高度相关性, 该结果趋势与国外早期类似研究<sup>[6]</sup>结果相似。MiR-4286在术前表达和术后3d及7d的表达差异分析也说明了miR-4286在前列腺组织中的相对特异性<sup>[13]</sup>。MiR-4286区别、诊断PCa的效能与PSA相近, 但是其敏感性略优于PSA, 这在临床工作中对于PCa的诊断具有一定的指导意义。本研究中PSA的诊断效能较高, 可能跟阶段性纳入的患者情况有关, 与大样本、多中心的PSA诊断能力有着一定区别<sup>[14]</sup>, 明显高于既往报道。为更加有效的对比研究miR-4286和PSA的诊断效能, 还需更大样本和多中心的样本研究以做支持。在目前的提升PCa诊断率的研究中, 以临床信息数据(如PSA)联合实验室研究标志物共同诊断为主<sup>[15-17]</sup>。本研究发现PSA和miR-4286联合诊断PCa具有良好价值, 符合目前的研究趋势和证据支持。本研究亦存在一定可改进之处。在选择手术前后对比样本时, 因我院泌尿科良性病变患者术后3d即可出院, 缺少和PCa患者匹配的术后7d样本以作对比。虽前列腺体积在两类患者中存在统计学差异, 但收集的精确前列腺各径数值为行穿刺活检时的经直肠B超数值, 在门诊应用时存在一定障碍, 故未行纳入分析。

综上所述, 从PCa的诊断上看, 还需要发现高灵敏性和高特异性的诊断标志物, 以提高PSA升高患者的诊断率, 避免不必要的前列腺穿刺活检和医疗支出。本研究提示miR-4286与PCa高度相关, 并且具有良好的诊断效能, 可作为PCa液体活检的新型分子标志物。

## [参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, ZHANG S, ZENG H, BRAY F, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 5-29.
- [3] GREGORY R I, SHIEKHATTAR R. MicroRNA biogenesis and cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65: 3509-3512.
- [4] DRAHOS J, SCHWAMEIS K, ORZOLEK L D, HAO H, BIRNER P, TAYLOR P R, et al. MicroRNA profiles of barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma; differences in glandular non-native epithelium [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016, 25: 429-437.
- [5] PEHSERL A M, RESS A L, STANZER S, RESEL M, KARBIENER M, STADELMEYER E, et al. Comprehensive analysis of miRNome alterations in response to sorafenib treatment in colorectal cancer cells[J/OL]. Int J Mol Sci, 2016, 17: e2011. doi: 10.3390/ijms17122011.
- [6] EGIDI M G, COCHETTI G, SERVA M R, GUELFI G, ZAMPINI D, MECHELLI L, et al. Circulating micrnas and kallikreins before and after radical prostatectomy: are they really prostate cancer markers? [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 241780.
- [7] VELTRI R W, CHRISTUDASS C S. Nuclearmorphometry, epigenetic changes, and clinical relevance in prostate cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 773: 77-99.
- [8] 谭书涛,吴斌. 前列腺癌主动监测的研究进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2016, 21: 68-71.
- [9] KACHAKOVA D, MITKOVA A, POPOV E, POPOV I, VLAHOVA A, DIKOV T, et al. Combinations of serum prostate-specific antigen and plasma expression levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as potential better diagnostic biomarkers for prostate cancer [J]. DNA Cell Biol, 2015, 34: 189-200.
- [10] LARNE O, MARTENS-UZUNOVA E, HAGMAN Z, EDSJ A, LIPPOLIS G, DEN BERG M S, et al. miQ-A novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer[J]. Int J Cancer, 2013, 132: 2867-2875.
- [11] ZHAI R, WEI Y, SU L, LIU G, KULKE M H, WAIN J C, et al. Whole-miRNome profiling identifies prognostic serum miRNAs in esophageal adenocarcinoma; the influence of *Helicobacter pylori* infection status[J]. Carcinogenesis, 2015, 36: 87-93.
- [12] KOMINA A, PALKINA N, AKSENENKO M, TSYRENZHAPOVA S, RUKSHA T. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of miR-4286 inhibition in melanoma cells[J/OL]. PLoS One, 2016, 11: e0168229. doi: 10.1371/journal.pone.0168229.
- [13] YANG B, LIU Z, NING H, ZHANG K, PAN D, DING K, et al. MicroRNA-21 in peripheral blood mononuclear cells as a novel biomarker in the diagnosis and prognosis of prostate cancer [J]. Cancer biomarker, 2016, 17: 223-230.
- [14] 陈锐,谢立平,周立群,黄翼然,傅强,贺大林,等. 中国前列腺癌联盟成员医院前列腺穿刺活检现状的调查报告[J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36: 342-345.
- [15] KRISTENSEN H, THOMSEN A R, HALDRUP C, DYRSKJOT L, HOYER S, BORRE M, et al. Novel diagnostic and prognostic classifiers for prostate cancer identified by genome-wide microRNA profiling [J]. Oncotarget, 2016, 7: 30760-30771.
- [16] LI Z, MA Y Y, WANG J, ZENG X F, LI R, KANG W, et al. Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 139-148.
- [17] SALIDO-GUADARRAMA A I, MORALES-MONTOR J G, RANGEL-ESCARENO C, LANGLEY E, PERALTA-ZARAGOZA O, CRUZ COLIN J L, et al. Urinary microRNA-based signature improves accuracy of detection of clinically relevant prostate cancer within the prostate-specific antigen grey zone[J]. Mol Med Rep, 2016, 13: 4549-4560.

[本文编辑] 胡蓉,孙岩