

血浆miR-92a与骨肉瘤预后相关性研究

孟伟¹, 张力², 黎健伟³, 危敏⁴

1. 南方医科大学基因工程研究所, 广东广州 510515;
2. 解放军 535 医院介入科, 湖南怀化 418008;
3. 南方医科大学南方医院创伤骨科, 广东广州 510515;
4. 深圳市南山区妇幼保健院, 广东深圳 518054

[摘要] **背景与目的:** 骨肉瘤是儿童和年轻人最常见的原发性恶性骨肿瘤, 目前尚无高特异度、高灵敏度的预后预测指标。该研究旨在探讨血浆miR-92a表达水平与骨肉瘤临床病理及预后的关系。**方法:** 收集30例健康体检者和45例骨肉瘤患者术前及术后血浆, 通过实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测血浆miR-92a水平。以术前miR-92a ≥ 5 为界限, 将骨肉瘤患者分为高表达组和低表达组。**结果:** 骨肉瘤患者血浆miR-92a水平显著高于正常体检人群, 患者术前miR-92a水平远高于术后。患者术前miR-92a表达水平与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小和组织学类型等无关, 而与Enneking分期、肿瘤坏死率和肺转移相关。Kaplan-Meier分析高表达miR-92a的骨肉瘤预后差($P=0.035$)。**结论:** 骨肉瘤患者血浆miR-92a表达水平与生存率相关, 可能是骨肉瘤一项有价值的预后指标。

[关键词] 骨肉瘤; miR-92a; 实时荧光定量聚合酶链反应

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.08.005

中图分类号: R738.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)08-0670-05

Correlation of miR-92a in plasma with prognosis in osteosarcoma MENG Wei¹, ZHANG Li², LI Jianwei³, WEI Min⁴ (1. Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; 2. Department of Interventional Radiology, 535 Hospital of PLA, Huaihua 418008, Hunan Province, China; 3. Department of Orthopaedics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; 4. Clinical Laboratory, Nanshan Maternity and Child Healthcare Hospital, Shenzhen 518054, Guangdong Province, China)

Correspondence to: WEI Min E-mail: mengwei_126@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumor in the children and young adults. Until now, there is no prognostic indicator with high specificity and high sensitivity. This study investigated the relationship between miR-92a level in plasma and clinical pathological characteristics, as well as the prognosis in osteosarcoma. **Methods:** The plasma from 30 healthy volunteers who underwent physical examination and from 45 cases of osteosarcoma before and after operation were collected. The miR-92a level was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) method. According to the relative expression ≥ 5 of miR-92a, the osteosarcoma patients were divided into 2 groups: miR-92a high expression group and low expression group. **Results:** The miR-92a level in plasma from osteosarcoma is significantly higher than that from healthy volunteers. Before surgery, the miR-92a level was markedly higher than after surgery. There was no correlation between the miR-92a level and the gender, age, tumor location, tumor size and histological type. However, significant correlation was found with Enneking grade, tumor cell necrosis rate and lung metastasis. Compared with the low-expression group, high miR-92a expression was associated with a significantly shorter overall survival using Kaplan-Meier analysis ($P=0.035$). **Conclusion:** The results suggest a significant relationship between miR-92a and survival ratio. miR-92a expression level may be a useful prognostic indicator in osteosarcoma.

[Key words] Osteosarcoma; miR-92a; Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction

骨肉瘤是最常见的原发性骨恶性肿瘤，高发于青少年，中位发病年龄为14.6岁，是青少年发病率排名第二的原发恶性肿瘤，占恶性肿瘤19%，年发病率约为3/100万，具有侵袭性生长和快速血道播散的特点，恶性程度高，早期转移率高，预后差^[1-2]。近年来，临床上虽然对手术方式及手术前、后化疗等综合治疗方法已有一定的改进，但患者的5年生存率仍不足70%。骨肉瘤早期临床症状无特异性，且病情进展较快，一旦出现肺转移，5年生存率降至30%以下，寻找能够在早期诊断及能够实现动态监测疾病的预后相关指标具有重要意义。miRNA是一类短链非编码小RNA，可于体液及分泌物中稳定表达，已有大量研究报道，miRs可作为多种疾病尤其是各种肿瘤的良好标志物^[3-5]。多项研究显示，miR-92a在乳腺癌、胃癌和肺癌等多种肿瘤中起原癌基因的作用^[6-8]，但在骨肉瘤中的报道较少。本研究旨在探讨其与骨肉瘤预后的相关性。

1 资料和方法

1.1 临床资料

收集南方医院骨科2005年1月—2010年1月临床资料完整的、术后病理确诊原发性骨肉瘤的患者术前及术后血浆标本。使用EDTA-K2抗凝管采集所有血浆标本，30 min内，4℃，3 000×g，离心10 min，取上层血浆，移至1.5 mL EP管中，为进一步去除细胞成分，4℃，11 000×g，离心10 min后，将血浆移至新的1.5 mL EP管中，置于-80℃冰箱保存。45例患者中，男性28例，女性17例，男女性别比为1.64:1。患者年龄9~51岁，中位年龄15岁。肿瘤部位：股骨14例，胫腓骨9例，肱骨8例，其他部位14例。按照Enneking外科分期：Ⅱ期32例，Ⅲ期13例。另随机取本院体检后6个月内未发现肿瘤的30例健康人血浆作为对照。全部患者均采用电话或定期门诊随访，中位随访时间36个月。

1.2 主要试剂及方法

miR抽提试剂盒miR Vana™购自美国Ambion公司，按说明书提取总miRNA。加入DEPC水20 μL，振荡溶解RNA，采用美国Thermo公司的NanoDrop ND-2000微量核酸蛋白检测仪检测RNA浓度。miRNA反转录和实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)购自上海吉玛制药技术有限公司，步骤根据试剂盒说明书进行操作，以U6为内参。miR-92a的反转录引物序列为：5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCAGGCCG-3'；miR-92a的RTFQ-PCR引物序列顺义链为：5'-GCTGAGTATTGCACTTGTCCCG-3'；反义链为：5'-GTGTCGTGGAGTCGGCAA-3'。反应体系见表1。

表1 反转录反应体系

Tab. 1 The reverse transcription reaction system

Reaction system	Volume V/μL
RNA less than 200 nt (100 ng)	2.0
5×reaction buffer polymerase	2.0
Olig DT	0.5
Random primer	0.5
miR reverse transcription	0.5
Reverse transcriptase	0.5
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	4.0
Total	10.0

采用ABI 7900 RTFQ-PCR仪进行检测，每个反应做3个复孔，记录每个孔中荧光信号到达设定阈值时的循环数，即Ct值，计算3个孔Ct值的平均值作为最终结果。将反应物置于PCR仪中，37℃反应60 min，85℃反应5 min，获得cDNA用于进一步扩增，并置于-20℃保存。RTFQ-PCR反应体系见表2。RTFQ-PCR反应条件：95℃预变性5 min；95℃ 10 s，60℃ 20 s，72℃ 30 s，共35个循环；72℃终延伸10 min。miRNA表达水平的计算方法：以U6作为内参，计算miR-92a相对表达值 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件包对数据进行统计学处

理。健康人与骨肉瘤患者miR-92a水平比较采用非配对t检验，骨肉瘤患者术前和术后miR-92a水平对比采用配对t检验，生存分析采用Kaplan-Meier法和Log-rank非参数检验，并绘制生存曲线；Cox比例风险模型进行多因素生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨肉瘤患者和健康体检者血浆miR-92a表达水平对比结果

45例骨肉瘤患者术前血浆miR-92a表达水平明显高于健康体检者($P=0.000$)， F 值为84.543；术后血浆miR-92a表达水平明显下降，但仍高于健康体检者($P=0.010$)， F 值为7.052。术前和术后患者miR-92a水平比较相关系数为0.592，差异有统计学意义($P=0.000$ ，表3)。

表 2 RTFQ-PCR反应体系

Tab. 2 RTFQ-PCR reaction system

Reaction system	Volume $V/\mu\text{L}$
2×RTFQ-PCR mix	10
RTFQ-PCR primer (2 $\mu\text{mol/L}$)	2
Universal adaptor PCR primer (2 $\mu\text{mol/L}$)	2
1 st strand cDNA	2
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	4
Total	20

表 3 骨肉瘤患者和健康体检血浆miR-92a表达

Tab. 3 The expression of miR-92a in the plasma from the physical examination and osteosarcoma patients

Group	Case number	miR-92a expression level $\bar{x} \pm s$
Osteosarcoma		
Pre-operation	45	3.92±0.97
Post-operation	45	1.84±0.51
Physical examination	30	1.07±0.34

2.2 miR-92a表达与患者临床病理特征的关系

45例骨肉瘤患者以术前血浆miR-92a ≥ 5 为分界线，分为低表达组($n=30$ ， 3.04 ± 0.78)。与高表达组($n=15$ ， 5.66 ± 0.470)与患者性别、年龄、肿瘤部位、病理类型无关，肿瘤大小、组织学类型及肿瘤坏死率无关，而与Enneking疾病分期及有无转移密切相关(表4)。

2.3 miR-92a表达与骨肉瘤患者预后的关系

Kaplan-Meier生存分析结果显示，miR-92a低表达组患者的3年生存率为50%(15/30)，而高表达患者的3年生存率为20%(3/15)。miR-92a低表达的患者中位生存时间为28.26个月，显著长于高表达的患者(22.26个月)，差异有统计学意义($P=0.035$ ，图1)。

表 4 骨肉瘤患者血浆miR-92a表达与临床参数之间的关系

Tab. 4 The relationship between the expression of miR-92a in plasma and the clinical characteristics in osteosarcoma patients

Characteristics	Low expression group ($n=30$)	High expression group ($n=15$)	P value
Age/year			
<18	15	9	0.537
≥ 18	15	6	
Gender			
Male	21	7	0.134
Female	9	8	
Anatomic location			
Tibia/femur	18	5	0.672
Elsewhere	12	10	
Tumor size d/cm			
10	19	5	0.059
10	11	10	
Clinical stage			
II _A	22	5	0.009
II _B /III	8	10	
Necrosis rate/%			
≤ 90	21	7	0.134
>90	9	8	
Pathological type			
Conventional	24	13	0.591
Non-conventional	6	2	
Metastasis			
Negative	17	3	0.019
Positive	13	12	

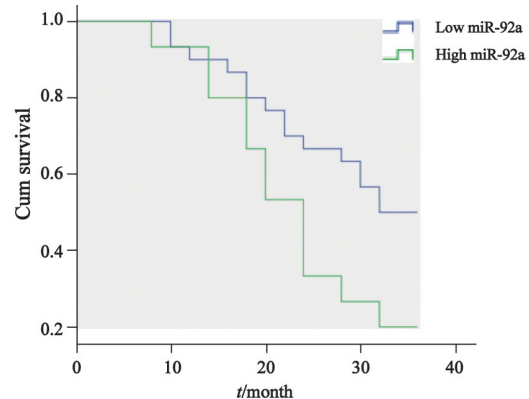


图 1 45例骨肉瘤患者Kaplan-Meier生存分析

Fig. 1 Kaplan-Meier survival analysis of the 45 osteosarcoma patients

3 讨 论

骨肉瘤是最常见的骨原发恶性肿瘤。近年来新辅助化疗的实施,足量、密集、长程的术后辅助化疗等新的治疗理念和方案的推进,使骨肉瘤患者预后的5年生存率从不足30%提高到接近70%。但骨肉瘤恶性程度高,早期就发生肺转移,10%~20%的患者在首诊时就已经发生了肺转移。随着CT、MRI和PET/CT等临床影像技术的不断提高,早期转移灶的发现率已显著提高,但影像学仪器精度限制了微小病灶的检出。寻找高灵敏度、高特异度的疾病预后预测指标具有重要的临床意义和价值。

miRNA是一类长度只有22 nt的短单链内源性RNA,通过与靶基因3'-或5'-UTR区域互补结合,在转录后对靶基因表达水平进行调控,其表达具有严格的时空和组织特异性。miRNA广泛参与细胞的分化、生长、发育、增殖、代谢和凋亡等生物过程。miRNA在肿瘤的发生、发展过程中起重要的调控作用,在肿瘤组织和肿瘤患者体液中稳定高表达,并有很强的特异性。血浆中的miRNA被称为循环miRNA,被认为是一类具有潜在临床应用价值的分子标志物和治疗靶标。血浆标本采样容易,患者依从性好,可作为动态监测的指标。miR-92a属于miR-17-92a基因簇,该基因簇是脊椎动物非常保守的典型多顺反子miRNA基因簇,定位于13q31.3,在多种肿瘤中均高表达并发挥原癌基因的作用。miR-17-92a基因簇的各个miRNA可协同发挥作用,也可单独发挥调控作用,其靶基因多为肿瘤抑制因子。Olive等^[9]的研究结果显示,miR-92a过表达可导致c-Myc异常高表达,促进淋巴瘤细胞过度增殖,抑制p-53依赖性凋亡。Manni等^[10]的研究结果显示,miR-92a靶向调控p63基因的表达,在骨髓瘤细胞内过表达miR-92a可显著促进瘤细胞增殖。Ghosh等^[11]分离了B细胞型慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocyte leukemia, CLL)患者的白血病细胞,发现miR-

92a显著升高,并靶向调控与HIF-1 α 降解密切相关的VHL基因,而HIF-1 α 与p300和磷酸化的STAT3结合形成复合物,促进血管内皮生长因子表达及分泌,维持CLL细胞恶性增殖。Al-Nakhle等^[12]的研究结果显示,miR-92a调节ER β 参与乳腺癌细胞恶性增殖。Haug等^[13]的研究结果显示,miR-92a直接靶向负调控肿瘤抑制因子Wnt信号通路调节因子DKK家族的Dickkopf-3(DDK3),miR-92a表达与胶质瘤恶性增殖密切相关。Ren等^[7]的研究结果显示,胃癌组织高表达miR-92a,可作为胃癌的独立预后指标。Tan等^[14]的研究发现,miR-17-92a基因簇的水平与肝癌恶性增殖及转移密切相关。miR-17-92a基因簇的表达受原癌基因c-Myc表达调节,这个反馈环调节肿瘤组织的发生、发展。本研究检测骨肉瘤患者术前及术后血浆miR-92a表达水平的变化,并对比健康体检人与之的差异,结果发现,手术前患者血浆miR-92a均值为 3.92 ± 0.97 ,手术后骨肉瘤患者miR-92a血浆均值显著下降,为 1.84 ± 0.51 ,但是仍高于健康人群(1.07 ± 0.34)。

本研究根据术前miR-92a ≥ 5 作为分界线,将患者划分为miR-92a高表达组和低表达组,发现miR-92a表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小及组织学类型无明显关系,而与Enneking分期及肺转移密切相关。miR-92a低表达骨肉瘤分期:II_A期22个(73.33%),II_B/III期8个(26.67%);而高表达者分期:II_A期5个(33.33%),II_B/III期10个(66.67%),差异有统计学意义($P=0.009$)。miR-92a高表达骨肉瘤患者80%有转移(12/15),而低表达患者的转移率为43.33%(13/30),差异均有统计学意义($P=0.019$)。本研究结果还显示,miR-92a高表达者的3年生存率及中位生存时间显著短于miR-92a低表达者,提示miR-92a高表达的患者预后较差。本研究结果提示,miR-92a可能参与骨肉瘤的发生、发展,且影响患者的预后,可能是潜在的骨肉瘤预后预测因子。

[参 考 文 献]

- [1] FRIEBELE J C, PECK J, PAN X, et al. Osteosarcoma: a meta-analysis and review of the literature [J] . Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2015, 44(12): 547-553.
- [2] BISHOP M W, JANEWAY K A, GORLICK R. Future directions in the treatment of osteosarcoma [J] . Curr Opin Pediatr, 2016, 28(1): 26-33.
- [3] NUGENT M. MicroRNA and bone cancer [J] . Adv Exp Med Biol, 2015, 889: 201-230.
- [4] HATA A, KASHIMA R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer [J] . Crit Rev Biochem Mol Biol, 2016, 51(3): 121-34.
- [5] WANG J, YANG M, LI Y, et al. The role of micrnas in the chemoresistance of breast cancer [J] . Drug Dev Res, 2015, 76(7): 368-374.
- [6] GU Y Q, GONG G, XU Z L, et al. miRNA profiling reveals a potential role of milk stasis in breast carcinogenesis [J] . Int J Mol Med, 2014, 33(5): 1243-1249.
- [7] REN C, WANG W, HAN C, et al. Expression and prognostic value of miR-92a in patients with gastric cancer [J] . Tumour Biol, 2016. [Epub ahead of print] .
- [8] ZHAO J, FU W, LIAO H, et al. The regulatory and predictive functions of miR-17 and miR-92 families on cisplatin resistance of non-small cell lung cancer [J] . BMC Cancer, 2015, 15: 731.
- [9] OLIVE V, SABIO E, BENNETT M J, et al. A component of the mir-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis [J] . Elife, 2013, 2: e00822.
- [10] MANNI I, ARTUSO S, CARECCIA S, et al. The microRNA miR-92 increases proliferation of myeloid cells and by targeting p63 modulates the abundance of its isoforms [J] . FASEB J, 2009, 23(11): 3957-3966.
- [11] GHOSH A K, SHANAFELT T D, CIMMINO A, et al. Aberrant regulation of pVHL levels by microRNA promotes the HIF/VEGF axis in CLL B cells [J] . Blood, 2009, 13(22): 5568-5574.
- [12] AL-NAKHLE H, BURNS P A, CUMMINGS M, et al. Estrogen receptor {beta}1 expression is regulated by miR-92 in breast cancer [J] . Cancer Res, 2010, 70(11): 4778-4784.
- [13] HAUG B H, HENRIKSEN J R, BUECHNER J, et al. MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3 (DKK3) in neuroblastoma [J] . Carcinogenesis, 2011, 32(7): 1005-1012.
- [14] TAN W, LI Y, LIM S G, et al. miR-106b-25/miR-17-92 clusters: polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma [J] . World J Gastroenterol, 2014, 20(20): 5962-5972.

(收稿日期: 2016-02-01 修回日期: 2016-04-01)