

• 临床检验研究论著 •

脑脊液中 miR-21 和 miR-128 诊断神经胶质瘤的价值

袁 平,何晓英,李小刚

(泸州医学院附属医院神经内科,四川泸州 646000)

摘要:目的 探索脑脊液中微 RNA(miRNA)的表达差异,为检测神经胶质瘤寻找全新的生物标志物并确定其诊断价值。**方法** 采用荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 20 例神经胶质瘤患者和 20 例非胶质瘤患者的脑脊液候选标志物水平,通过 Mann-Whitney *U* 检验和 Kruskal-Wallis 检验筛选差异表达的 miRNA,采用受试者工作曲线(ROC curves)和曲线下面积(AUC)评价其用于诊断神经胶质瘤的诊断效能。**结果** miR-21 在神经胶质瘤中表达显著高于对照组($P<0.05$),而 miR-128 在神经胶质瘤中表达显著低于对照组($P<0.05$),miR-21 单独诊断的 AUC 为 0.96。灵敏度为 90%,特异度为 95%。miR-128 和 miR-21 联合诊断神经胶质瘤的灵敏度和特异度均为 100%。**结论** 脑脊液中 miR-128 和 miR-21 可能是神经胶质瘤潜在的早期诊断标志物。

关键词:脑脊液; 神经胶质瘤; 微 RNA; 灵敏度; 特异度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.018 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)18-2464-03

Identification of miR-128 and miR-21 in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma

Yuan Ping, He Xiaoying, Li Xiaogang

(Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** Investigate the expression difference of miRNA in cerebrospinal fluid(CSF) to explore new biomarkers for glioma diagnosis and evaluate the diagnostic value. **Methods** The candidate biomarkers in CSF were detected by using FQ-PCR for 20 cases of glioma patients and 20 cases of non-glioma patients(control group). miRNAs with significant level changes in CSF samples from patients with gliomas ($n=20$) compared with healthy volunteers ($n=20$) were screened out by using Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis test, and the diagnostic values were evaluated by receiver-operating characteristic curves(ROC curves) and area under the curve(AUC). **Results** MiR-128 and miR-21 were differentially expressed in CSF samples from patients with gliomas compared with control group. Expression of miR-21 in glioma is significantly higher than that in the control group($P<0.05$), while the expression of miR-128 in gliomas was significantly lower than that in control group($P<0.05$). AUC was 0.96 when using only miR-21 as the diagnostic biomarker, and the sensitivity was 90%, specificity was 95%. The diagnostic sensitivity and specificity were 100% when MiR-128 and miR-21 combined. **Conclusion** miR-128 and miR-21 are potential markers for gliomas diagnosis in the CSF.

Key words: cerebrospinal fluid; glioma; miRNA; sensitivity; specificity

神经胶质瘤起源于神经胶质细胞,发生于神经外胚层的肿瘤,是中枢神经系统最常见的致死性肿瘤,约占全部颅内肿瘤的 50%左右,多见于成人^[1]。其主要特征是肿瘤细胞弥漫性浸润生长、无明确边界、无限增殖并具有高度侵袭性,患者确诊后,生存期超过 5 年的不足 10%^[2]。早期诊断可以提高神经胶质瘤的存活率,与其他肿瘤一样,神经胶质瘤诊断的“金标准”仍是病理检查,除此之外,神经影像学的检查如电子计算机断层扫描(CT)和核磁共振扫描(MRI)是神经胶质瘤诊断、分期分型、肿瘤随访的重要手段^[3]。迄今为止,还没有发现血或脑脊液中有较为理想的用于神经胶质瘤诊断、随访、预后判断的生物标志物。已有报道显示,微 RNA(miRNA)在人类肿瘤的发生、发展中起着十分重要的作用,它们参与了广泛的生物学过程,如细胞的分化、增殖、凋亡、黏附及死亡等,这些与癌症的形成及演变都密切相关^[4]。近年来,体液 miRNA 在癌症诊断方面的作用成为研究的热点,体液中 miRNA 表达稳定,检测方便,损伤性小,是理想的癌症诊断潜在标志物,血液 miRNA 在神经胶质瘤诊断中的应用已有相关文献报道^[5-8]。本研究旨在寻找特异表达在神经胶质瘤中的 miRNA,评价其作为

神经胶质瘤生物标志物的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按时间先后顺序选取 2010 年 1 月至 2013 年 1 月来本院就诊,经核磁共振检查发现肿瘤并经病理检查(WHO 中枢神经系统肿瘤分类标准)确诊的神经胶质瘤患者 20 例(病例组),年龄 20~70 岁,男女各 10 例,其中低级星形细胞瘤 6 例,间变星形细胞瘤 4 例,多形胶质母细胞瘤 10 例;对照组 20 例,男女各 10 例,年龄 18~69 岁,均为无神经系统疾病且非肿瘤的外科腰麻手术患者,留取脑脊液。病例组脑脊液样本采集于患者病情确认后治疗前,均签署了知情同意书。脑脊液标本采集后立即室温离心($500\times g, 10\text{ min}$)去除细胞、纤维和碎片,然后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2 定量 RT-PCR(qRT-PCR)检测 先用 Trizol 提取肿瘤组 and 对照组中脑脊液标本的总 RNA,逆转录反应和荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术联合检测两组中共 40 例脑脊液标本中的 miRNA,引物信息见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。选取 miR-24 作为内标物质进行标准化($\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{miR}} - \Delta\text{Ct}_{\text{miR-24}}$),相对表达量以 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 表示。所用试剂为 Taq-

man human miRNA assay kit (由美国 Biosystems 公司提供),按试剂盒说明书步骤操作。

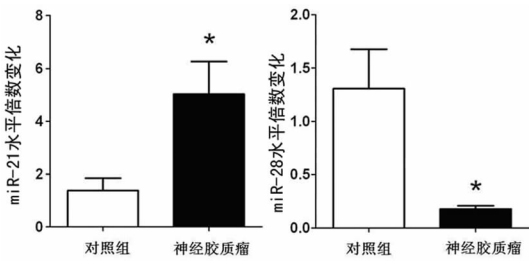
1.3 统计学处理 组间数据比较采用 Mann-Whitney *U* 检验,数据之间两两比较采用 Kruskal-Wallis 检验,所有数据均使用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。利用 Graph PadPrism V4.03 软件进行数据分析和作图。

2 结 果

2.1 脑脊液中的候选 miRNA 肿瘤组(20 例)和对照组(20 例)患者共 40 例脑脊液标本经 FQ-PCR 检测,初步筛选出 6 个 miRNA,见表 1。在 6 个候选标志物中 miR-21 在肿瘤组中表达增高(Ct 降低),而 miR-128 在肿瘤组中表达降低(Ct 增高),差异有统计学意义($P<0.05$)。而剩余的 miR-16、miR-19b、miR-92 和 miR-342-3p,二组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-128 和 miR-21 在肿瘤组和对照组中相对表达的差异情况见图 1,纵坐标表示 miR-128 和 miR-21 在肿瘤组和对照组中的相对表达量(经 miR-24 标准化后),统计学分析为 Mann-Whitney *U* 检验,从图中可见 miR-128 在肿瘤组中表达降低($P<0.05$),而 miR-21 在肿瘤组的表达增高($P<0.05$)。

表 1 miRNA 在神经胶质瘤组和对照组的表达情况($\bar{x}\pm s$)

miRNA 类型	肿瘤组 Ct 值($n=20$)	对照组 Ct 值($n=20$)	<i>P</i>
miR-16	28.27±0.81	28.68±1.27	0.13
miR-342-3p	34.80±0.51	32.70±0.78	0.07
miR-128	36.82±0.42	28.03±1.45	<0.01
miR-19b	30.13±0.81	33.02±2.85	0.13
miR-92	28.31±0.65	29.69±0.26	0.08
miR-21	25.93±0.89	33.26±1.42	<0.01



*: $P<0.05$,与对照组比较。

图 1 miR-128 和 miR-21 在肿瘤组和对照组中相对表达的差异情况

2.2 脑脊液中 miR-128 和 miR-21 诊断神经胶质瘤的诊断价值 单独使用 miR-21 作为神经胶质瘤的诊断标志物,作受试者工作曲线(ROC)得到曲线下面积(AUC)为 0.96(95%可信区间为 0.926~1.022),在相对表达量为 8.0 时(cut-off 值),诊断神经胶质瘤的灵敏度和特异度分别为 90%和 95%,见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。为了提高肿瘤的 diagnostic 价值,联合使用 miR-128 和 miR-21 一起作为区分神经胶质瘤与对照组的生物标志物,作分类树分析,见附图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),在 miR-128 相对表达量为 0.4 时(cut-off 值),其诊断价值最高。故当 miR-128 和 miR-21 的 cut-off 值分别取 0.4 和 8.0 时,二者联合诊断神

经胶质瘤灵敏度和特异度分别为 100%和 100%。miR-128 和 miR-21 的相对表达量 cut-off 值分别取 0.4 和 8.0 时,二者联合诊断神经胶质瘤灵敏度和特异度分别为 100%和 100%。

3 讨 论

本研究使用 qRT-PCR 方法,通过对 20 例神经胶质瘤和 20 例各类腰麻手术患者的脑脊液进行检测,筛选出 9 个候选标志物,再通过统计分析找到差异有统计学意义的两个标志物(miR-128 和 miR-21),最后进行诊断价值的评价。使用 miR-21 作为独立表达标志物诊断神经胶质瘤时,其诊断灵敏度和特异度分别为 90%和 95%,AUC 为 0.96(95%可信区间为 0.926~1.022)。在此基础上,联合使用 miR-128 作为诊断标志物,二者诊断神经胶质瘤的灵敏度和特异度均可达 100%。说明脑脊液中 miR-128 和 miR-21 对神经胶质瘤的诊断有十分重要的价值。

早有报道指出 miR-128 在神经胶质瘤脑组织中的表达低于健康人脑组织的表达^[9]。它通过调控细胞周期,从而在神经胶质瘤的发生、发展中扮演了重要的角色,使得其在神经胶质瘤组织中表达降低,本研究结果与文献报道相一致。虽然本研究的标本脑脊液,其中的蛋白种类和浓度相对较少,但由于 miRNA 的表达不特异,尤其是在血液标本中,miR-128 也可以在其他疾病中表达发生变化^[10-11];而 miR-21 的表达谱更广,在肝癌^[12]、肺癌^[13]、结肠癌^[14] 等中均高表达。考虑到 miR-21 的高表达,本研究首先尝试将其作为单一标志物来预测神经胶质瘤的发生,取得了很好的诊断价值(灵敏度为 90%,特异度为 95%)。所以单靠某一种标志物去诊断疾病,影响因素太多,不如联合诊断的价值大,本研究就脑脊液中差异表达的两种蛋白作联合诊断分析,其诊断神经胶质瘤的价值大大提高(灵敏度为 100%,特异度为 100%)。

由于标本的来源不易,导致样本量偏少,而且对照组结构较单一,缺乏诊断模型的验证,这是本文的局限。但正是由于标本的特殊性,脑脊液中所含蛋白的模式比血液简单得多,miRNA 检测的干扰因素相对较少,能更好筛选标志物,便于重复和统一。下一步研究应扩大样本量,进行标志物诊断价值的验证分析;选取相同疾病的不同标本来源(脑组织、血液)检测 miRNA 进行横向对比和验证。

综上所述,尽管本研究尚有一些局限,但血浆 miR-128 和 miR-21 仍不失作为神经胶质瘤有效的早期诊断标志物,而且本研究在横向和纵向上均有进一步研究的价值和可行性。

参考文献

[1] Viel T, Schelhaas S, Wagner S, et al. Early assessment of the efficacy of temozolomide chemotherapy in experimental glioblastoma using [18F] FLT-PET imaging [J]. PLoS One, 2013, 8 (7): e67911.

[2] Chamberlain MC. Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma[J]. Clin Med Insights Oncol, 2011, 5(1): 117-129.

[3] Blasiak B, Barnes S, Foniok T, et al. Comparison of T2 and T2*-weighted MR molecular imaging of a mouse model of glioma. [J]. BMC Med Imaging, 2013, 13(1): 20.

[4] Kothandan R, Biswas S. Search for signatures in miRNAs associated with cancer[J]. Bioinformation, 2013, 9(10): 524-527.

[5] Zhang W, Zhang J, Yan W, et al. Whole-genome microRNA expression profiling identifies a 5-microRNA signature(下转第 2468 页)

mL。cTnI 是特异性的心肌损伤血浆标志物,一旦心肌受损,膜的完整性和通透性改变,cTnI 从心肌释放,导致心肌受损患者血浆 cTnI 水平增高。外周血中,cTnI 一般在轻微心肌缺血性损伤后 0~6 h 迅速增高,可作为心肌损伤早期最特异、最敏感的标志物,且增高可持续 7~10 d,不仅能用于诊断 AMI,而且能用于轻微心肌损伤的诊断。美国和欧洲心脏病学会将 cTnI 水平作为诊断 AMI 患者急性心肌损伤的必要条件^[16]。本研究中,治疗前的 AMI 组血浆 cTnI 水平较对照组高($t=5.426, P<0.01$)。治疗好转者血浆 cTnI 水平低于对照组($t=3.301, P<0.01$),36 例死亡患者血浆 cTnI 水平持续增高。cTnI 水平可以作为早期诊断 AMI 的指标,而且可以用于 AMI 治疗后预防复发和预测心血管事件的发生^[17]。

生物学标志物对 AMI 的诊断已成为国内外研究的热点。本研究表明血浆 LP(a)、Hcy、hs-CRP 和 cTnI 水平是早期诊断 AMI 的有效指标,而血浆 hs-CRP 和 cTnI 水平对 AMI 治疗的预后判断和随访监测具有重要意义。

参考文献

[1] Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? [J]. *Circulation*, 2002, 105 (17): 2107-2111.

[2] O'neill WW, Dixon SR. The year in interventional cardiology[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43 (5): 875-890.

[3] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会, 中国循环杂志编辑委员会. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 29(12): 710-725.

[4] Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High density lipoprotein and it's dysfunction[J]. *Open Biochem J*, 2012, 6(7): 78-93.

[5] Hartmann M, von Birgelen C, Mintz GS, et al. Relation between lipoprotein(a) and fibrinogen and serial intravascular ultrasound plaque progression in left main coronary arteries[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(3): 446-452.

[6] Moon JY, Kwon HM, Kwon SW, et al. Lipoprotein(a) and LDL particle size are related to the severity of coronary artery disease [J]. *Cardiology*, 2007, 108(4): 282-289.

[7] 吴志勤, 陈庆伟, 吴庆, 等. 血清脂蛋白 a 与冠心病的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(11): 1356-1360.

[8] Chien KL, Hsu HC, Su TC, et al. Lipoprotein(a) and cardiovascular disease in ethnic Chinese: the Chin-Shan Community Cardiovascular Cohort Study[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(2): 285-291.

[9] Skibinska E, Sawicki R, Lewezuk A, et al. Homocysteine and progression of coronary artery disease[J]. *Kardiol Pol*, 2004, 60(3): 197-205.

[10] Gupta SK, Kotwal J, Kotwal A, et al. Role of homocysteine and MTHFR C677T gene polymorphism as risk factors for coronary artery disease in young Indians[J]. *Indian J Med Res*, 2012, 135 (4): 506-512.

[11] Monteiro CM, Pinheiro LF, Izar MC, et al. High sensitive C-reactive protein and male gender are independent related to the severity of coronary event[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43(3): 297-302.

[12] Retterstol L, Eikvar L, Berg K. A twin study of C-reactive protein compared to other risk factors for coronary heart disease[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 169(2): 279-282.

[13] Scrutinio D, Passantino A, Di Serio F, et al. High-sensitivity C-reactive protein predicts cardiovascular events and myocardial damage after vascular surgery[J]. *J Vasc Surg*, 2011, 54(2): 474-479.

[14] Cho DY, Kim KN, Kim KM, et al. Combination of high-sensitivity C-reactive protein and homocysteine may predict an increased risk of coronary artery disease in Korean population[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(4): 569-573.

[15] 朱同华. 急性心肌梗死患者血浆 BNP、cTnI、hs-CRP 和 β 2MG 水平测定早期诊断的临床分析[J]. *中国血液流变学杂志*, 2013, 23 (2): 351-352.

[16] Dawie J, Chawla R, Worku Y, et al. Diagnosis of ischemic heart disease using CK-MB, troponin-I and ischemia modified albumin [J]. *Ethiop Med J*, 2011, 49(1): 25-33.

[17] Christenson RH, Phillips D. Sensitive and high sensitivity next Generation cardiac troponin assays: more than just a name[J]. *Pathology*, 2011, 43(3): 213-219.

(收稿日期: 2014-03-15)

(上接第 2465 页)

as a prognostic biomarker in Chinese patients with primary glioblastoma multiforme[J]. *Cancer*, 2013, 119(4): 814-824.

[6] Wang Q, Li P, Li A, et al. Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1): 97.

[7] Kirschner MB, Cheng YY, Badrian B, et al. Increased circulating miR-625-3p: a potential biomarker for patients with malignant pleural mesothelioma[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(7): 1184-1191.

[8] Zhang W, Zhang J, Hoadley K, et al. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression[J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14(6): 712-719.

[9] Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4): 1351-1358.

[10] Li M, Fu W, Wo L, et al. miR-128 and its target genes in tumori-

genesis and metastasis[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319 (20): 3059-3064.

[11] Ji S, Shao G, Lv X, et al. Downregulation of miRNA-128 sensitises breast cancer cell to chemodrugs by targeting Bax[J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(7): 653-658.

[12] Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(1): 167-175.

[13] Wei J, Gao W, Zhu CJ, et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(6): 407-414.

[14] Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, et al. Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer[J]. *Ann Surg*, 2012, 256(3): 544-551.

(收稿日期: 2014-05-11)