

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.010

文章编号: 1005-8982(2019)07-0048-05

MicroRNA-122-5p 与 MicroRNA-199a-5p 在 EMS 患者血清的表达及临床意义

袁琳¹, 张建洁¹, 陈雪¹, 郑艳¹, 姚燕¹, 李平²

(1. 华北石油管理局总医院 1. 妇科, 2. 耳鼻喉科, 河北 任丘 062552)

摘要: **目的** 探讨 microRNA-122-5p (miR-122-5p) 与 microRNA-199a-5p (miR-199a-5p) 在子宫内膜异位症 (EMS) 患者血清的表达及临床意义。 **方法** 前瞻性设计, 随机选取 2016 年 1 月—2017 年 12 月华北石油管理局总医院诊治的 EMS 患者 90 例 (EMS 组) 及同期不孕症检查的患者 70 例 (对照组) 为研究对象。分别采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 及酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测两组人群血清的 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 的表达及白细胞介素-6 (IL-6) 的表达, 并分析其与临床特征的相关性。构建受试者操作特征 (ROC) 曲线。 **结果** EMS 组患者的血清及腹腔液中 IL-6、miR-122-5p、miR-199a-5p 的表达与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), EMS 组均增高。miR-122-5p 的表达与 IL-6 水平 ($r = 0.578$, $P < 0.05$)、miR-199a-5p 表达 ($r = 0.721$, $P < 0.05$) 呈正相关。miR-199a-5p 的表达与 IL-6 水平 ($r = 0.562$, $P < 0.05$) 呈正相关。miR-122-5p 和 miR-199a-5p 检测 EMS 的敏感性分别为 94.7% 和 92.1%, 特异性分别为 90.5% 和 88.6%。 **结论** 血清 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 在 EMS 患者中的表达增加, miR-122-5p 与 miR-199a-5p 有成为诊断子宫内膜异位症的生物标志物的潜力。

关键词: 子宫内膜异位症; miR-122-5p/microRNAs; miR-199a-5p/microRNAs

中图分类号: R713

文献标识码: A

Expression and clinical significance of miR-122-5p and miR-199a-5p in serum of patients with endometriosis

Lin Yuan¹, Jian-jie Zhang¹, Xue Chen¹, Yan Zheng¹, Yan Yao¹, Ping Li²

(1. Department of Gynaecology, 2. Department of Otorhinolaryngology, North China Petroleum Administration Bureau General Hospital, Renqiu, Hebei 062552, China)

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of miR-122-5p and miR-199a-5p in patients with endometriosis (EMS). **Methods** Ninety patients with endometriosis and patients receiving infertility examination were involved in this study. Quantitative RT-PCR and enzyme linked immunosorbent assay were performed to detect the expression levels of miR-122-5p, miR-199a-5p and interleukin-6. Clinical relationships of the mentioned index with clinical features were analyzed. **Results** The serum levels of IL-6, miR-122-5p, and miR-199a-5p were significantly higher in endometriosis patients than in control group ($P < 0.05$). Expression of miR-122-5p was positively correlated with serum IL-6 ($r = 0.578$) and miR-199a-5p ($r = 0.721$); miR-199a-5p expression was positively correlated with serum IL-6 ($r = 0.562$). Sensitivity of circulating miR-122-5p and miR-199a-5p was 94.7% and 92.1%, respectively. Specificity of circulating miR-122-5p and miR-199a-5p was 90.5% and 88.6%, respectively. **Conclusions** Serum miR-122-5p and miR-199a-5p may serve as diagnostic biomarkers for endometriosis.

Keywords: endometriosis; miR-122-5p/MicroRNAs; miR-199a-5p/ MicroRNAs

收稿日期: 2018-07-04

子宫内膜异位症 (Endometriosis, EMS) 是指子宫内组织 (腺体和间质) 在子宫腔被覆内膜以外的部位生长、浸润的一种慢性妇科疾病^[1]。流行病学资料显示, 约 5% ~ 10% 育龄妇女患子宫内膜异位症, 其中 50% 患者存在生育问题^[2]。EMS 的诊断主要凭借腹腔镜检查, 但其具有高侵入性且在 EMS 晚期发挥作用。超声及其他成像技术在 EMS 的诊断和分期方面准确性不高^[3]。目前缺乏高效的 EMS 早期血清诊断标志物。虽然一些 EMS 患者的血清 CA-125 升高, 但并不是特异性的, 而且敏感性也较差。因此, 寻找一种非侵入性的, 高效的 EMS 早期诊断标志物显得尤为重要。microRNAs (miRNAs) 是一种小的, 具有 21 ~ 22 个核苷酸的非编码 RNA 分子。miRNAs 通过基因沉默在转录后的水平或催化转录本降解, 调控许多生物过程^[4]。由于成熟的 miRNAs 能够与蛋白复合物结合, 所以 miRNAs 既存在于细胞内, 也稳定存在于血清中, 这使其成为具有诊断各种疾病的生物标志物的潜力^[5-6]。另外, 血清 miRNAs 表达稳定, 重复性好, 个体间差异小, 其特异性表达模式已被认定为包括癌症在内的多种疾病的生物标志物^[7]。血液中 miRNA 水平的改变可能反映正常生理过程中的变化^[8-9], 并与一些病理条件有关, 如妇科一些常见疾病^[10-11]。在与 EMS 密切相关的失调 miRNAs 中, miR-122-5p 与 miR-199a-5p 在 EMS 患者的血清中表达增强, 且与疾病病理分期呈正相关, 两者的血清浓度也呈正相关。同时, 两者的靶基因均为凋亡相关的, 在子宫内膜癌的分化中发挥重要作用的基因 *SOX4*, 故两者联合诊断 EMS 具有很好的前景^[12]。此外, EMS 的炎症标志物还存在争议, 有研究证实, EMS 与健康女性的白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 水平比较无差异, 而另有研究表明, EMS 患者的 IL-6 水平较高^[13]。故本研究将评估血清 miR-122-5p、miR-199a-5p 及 IL-6 在 EMS 早期诊断中的价值及临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究是一项前瞻性研究, 随机选取 2016 年 1 月—2017 年 12 月华北石油管理局总医院诊治的 EMS 患者 90 例 (EMS 组) 及同期盆腔疼痛或不孕症检查的患者 70 例 (对照组) 为研究对象。其中 EMS 患者均经腹腔镜诊断, 组织病理学检查证实。根据经

修订的美国生殖医学分类学会, EMS 被分为轻度/轻度 (I、II 期) 或中度/重度 (III、IV 期)^[14]。对照组包括所有接受腹腔镜手术治疗盆腔疼痛、不孕症或良性肿瘤, 但未被诊断为 EMS 的妇女。排除标准: ①腹腔镜前 3 个月内接受药物治疗; 子宫腺肌症、子宫内膜癌/增生、子宫内膜息肉。②慢性或急性炎症性疾病、感染性疾病、恶性肿瘤。③身免疫性疾病和心血管疾病。研究内容和方法均经受试者知情并签署同意书, 且经本院医学伦理委员会批准。

1.2 样本采集及检测方法

所有受试者于术前清晨空腹抽静脉血, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离出血清后于 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。Thermo Fisher miRNA First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒、Thermo Fisher qPCR Super Mix 试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 生物技术有限公司, 引物由美国 Invotrigen 公司设计并合成, 酶联免疫吸附试验检测 IL-6 的浓度, 由深圳欣博生物科技有限公司提供。实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 的表达 (SYBR-Green 法)。U6 RNA 作为内参。逆转录的 cDNA 保存在 4℃。实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 反应体系: 10 μl cDNA, 12.5 μl SYBR Green Master Mix, 0.5 μmol/L 引物, RNase-free 水补充体积至 25 μl。Real-time PCR 检测采用 7500 real-time PCR System (美国 Applied Biosystems 公司)。反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 10 s, 57℃ 退火 30 s, 75℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环。检测 miRNA 的相对表达水平, 以 U6 为内参基因, 对目标基因进行归一化处理。血清中 miRNA 的相对表达水平计算公式如下: $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验, 计数资料以例 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验, Pearson 进行相关性分析, ROC 曲线分析血清 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 的最佳截断水平, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

两组患者年龄、体重指数 (BMI)、临床症状比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 生育史比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 一般临床资料比较

组别	n	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	BMI / (kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	临床症状 例 (%)			生育史 (初产) 例 (%)
				痛经	盆腔疼痛	月经不规律	
EMS 组	90	40.54 ± 5.76	22.53 ± 3.76	47 (52.22)	29 (32.22)	42 (46.67)	50 (55.56)
对照组	70	41.24 ± 6.43	21.45 ± 3.12	33 (47.14)	23 (32.86)	25 (35.71)	4 (5.71)
t / χ^2 值		0.725	1.939	0.406	0.007	1.941	43.746
P 值		0.470	0.054	0.524	0.932	0.164	0.000

2.2 两组患者血清 IL-6 水平及 miR-122-5p、miR-199a-5p 的表达

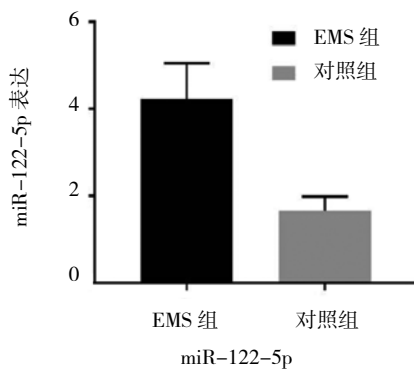
EMS 组患者的血清 IL-6 水平及 miR-122-5p 与 miR-199a-5p 的表达与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), EMS 组患者增高。见表 2 和图 1。

2.3 血清 miR-122-5p 与 miR-199a-5p 的表达与 EMS 患者的临床病理特征关系

不同病理分期的 EMS 患者中, 血清 miR-122-5p

表 2 两组患者血清 IL-6 水平及 miR-122-5p 与 miR-199a-5p 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6 / (pg/ml)	miR-122-5p	miR-199a-5p
EMS 组	90	51.67 ± 12.11	4.23 ± 0.82	4.59 ± 1.01
对照组	70	17.92 ± 10.17	1.65 ± 0.33	1.17 ± 0.22
t 值		18.741	24.826	27.863
P 值		0.000	0.000	0.000



与 miR-199a-5p 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 EMS 患者血清 IL-6 水平、miR-122-5p、miR-199a-5p 表达的相关性

EMS 患者血清 IL-6 水平、miR-122-5p、miR-199a-5p 的表达呈正相关。见表 4。

2.5 EMS 患者血清 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 表达的诊断效率

EMS 患者血清 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 表

表 3 血清 miR-122-5p 与 miR-199a-5p 的表达与 EMS 患者的临床病理特征关系 ($\bar{x} \pm s$)

病理分期	n	miR-122-5p	miR-199a-5p
I、II	38	4.31 ± 0.68	4.98 ± 1.23
III、IV	52	4.26 ± 0.17	5.06 ± 1.07
t 值		0.453	0.325
P 值		0.651	0.746

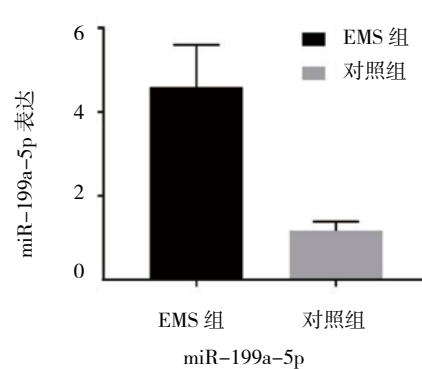


图 1 两组患者血清 miR-122-5p 与 miR-199a-5p 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

表 4 EMS 患者血清 IL-6 水平、miR-122-5p、miR-199a-5p 表达的相关性

指标	IL-6		miR-122-5p		miR-199a-5p	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
IL-6	-	-	0.578	0.001	0.562	0.000
miR-122-5p	0.578	0.001	-	-	0.721	0.000
miR-199a-5p	0.562	0.000	0.721	0.000	-	-

达的诊断效率以 ROC 曲线下面积 (AUC) 表示。见表 5 和图 2。

表 5 EMS 患者血清 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 表达的诊断效率

指标	AUC	截止点	敏感性 /%	特异性 /%	95% CI	
					下限	上限
miR-122-5p	0.908	3.180	94.7	90.5	0.842	0.974
miR-199a-5p	0.899	2.170	92.1	88.6	0.829	0.970

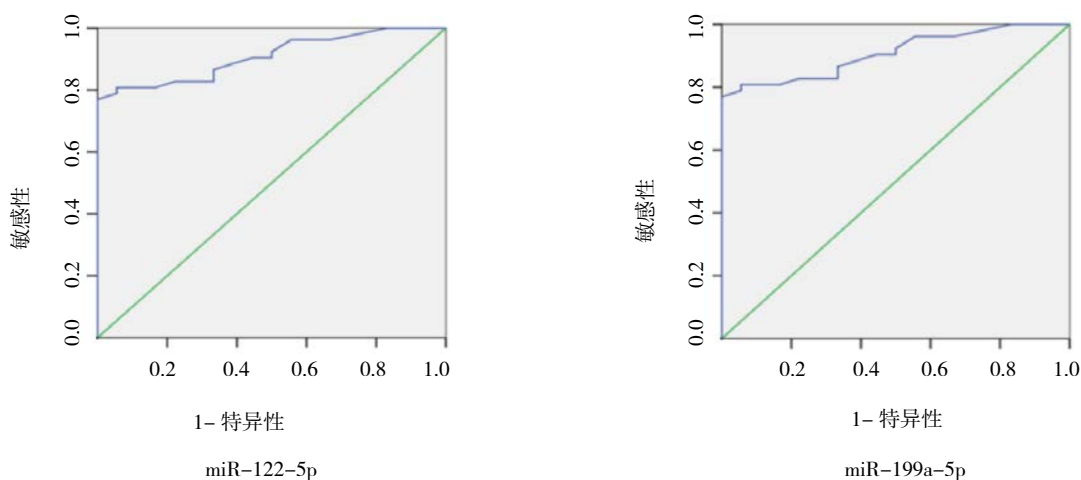


图 2 EMS 患者血清 miR-122-5p 与 miR-199a-5p 表达的 ROC 曲线

3 讨论

目前, EMS 的诊断和评估主要凭借腹腔镜, 但由于腹腔镜技术具有高侵袭性, 且诊断的 EMS 大多数处于疾病晚期, 故开发用于 EMS 早期阶段的敏感性 & 特异性高的生物标志物显得尤为迫切。本研究中, EMS 患者的血清 miR-122-5p、miR-199a-5p 及 IL-6 的水平升高, 血清 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 用于检测 EMS 的敏感性分别为 94.7% 和 92.1%, 特异性分别为 90.5% 和 88.6%, 提示这些分子有可能成为诊断 EMS 生物标志物的潜力。此外, 相关性分析得出, miR-122-5p 的表达与 IL-6、miR-199a-5p 表达呈正相关, 这说明 miRNAs 联合炎症因子检测 EMS 具有较高的诊断准确率。

miRNAs 在多种生理和病理条件下起着重要的作用。在各种类型的癌症中, 包括实体瘤、白血病、B 细胞淋巴瘤、卵巢癌和其他疾病, 如糖尿病和肝硬化, 均检测到血浆 miRNAs 的变化^[15]。由于血清标志物的获取方便, 测量方法简单可行。因此, 其在早期诊断 EMS 具有很好的应用前景。然而, 先前的研究主要集中在子宫内膜组织中 miRNAs 的表达。LIU 等^[16]通过 TCGA 数据库分析子宫内膜腺癌组织中表达异常

的 mRNA, miRNA 与 DNA 甲基化相关基因, 最终确定出异常变化的 DEGs, 包括 ZEB1、ZEB2、TIMP2、TCF4、CYP1B1、PITX1、PITX2、ZNF154 及 TSPYL5 等有望成为治疗子宫内膜腺癌的靶点。循环 miRNAs 用于早期诊断 EMS 的研究是一个新的领域, 相关的研究报道较少^[17]。WANG 等^[18]对子宫内膜异位症和健康女性患者的血清 miRNA 表达的研究表明, miR-122 和 miR-199a 的水平升高, miR-145、miR-141、miR-542-3p 及 miR-9 在 EMS 患者中的水平降低, 并提出该化合物可以作为其潜在的生物标志物。同时, 研究还指出 miR-122a 和 miR-199a 的表达可能用于评估疾病的严重程度。本研究结果提示, miR-122a 和 miR-199a 的表达与疾病的严重程度无相关性。还需要进一步扩大样本量, 多中心进行研究。WANG 等^[18]对 30 例轻度子宫内膜异位症患者和 20 例对照组女性血清样本的 miRNAs 表达进行评估。通过深度测序, 发现有 98 个 miRNAs 被下调, 10 个 miRNAs 被上调。这可能是由于抽样技术和分析方法的不同造成^[19]。

综上所述, 与对照组比较, 子宫内膜异位症患者的血清 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 的水平升高, 且诊断效率较高。因此, 这些 miRNAs 有望成为诊断子宫内膜

异位症生物标志物的潜力。此外,本研究还存在缺乏腹腔镜检查 EMS 后患者的用于评估该 miRNAs 稳定性的随访资料,后续深入研究为血清 miR-122-5p 和 miR-199a-5p 成为 EMS 诊断标志物提供证据。

参 考 文 献:

- [1] LOGAN P C, YANGO P, TRAN N D. Endometrial stromal and epithelial cells exhibit unique aberrant molecular defects in patients with endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2018, 25(1): 140-159.
- [2] MORADI M, PARKER M, SNEDDON A, et al. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study[J]. *BMC Womens Health*, 2014, 14: 123.
- [3] DUNSELMAN G A, VERMEULEN N, BECKER C, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29: 400-412.
- [4] ZHU J, ZHENG Z, WANG J, et al. Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum[J]. *Front Genet*, 2014(5): 149.
- [5] CORCORAN C, FRIEL A M, DUFFY M J, et al. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(1): 18-32.
- [6] SAYED A S, XIA K, LI F, et al. Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases[J]. *Heart Lung Cir*, 2014, 23(6): 503-510.
- [7] SCHWARZENBACH H, NISHIDA N, CALIN G A, et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(3): 145-156.
- [8] LAI C Y, WU Y T, YU S L, et al. Modulated expression of human peripheral blood microRNAs from infancy to adulthood and its role in aging[J]. *Aging Cell*, 2014, 13(4): 679-689.
- [9] REDNI S T, GADD S, JAFARI N, et al. A parallel study of mRNA and microRNA profiling of peripheral blood in young adult women[J]. *Front Genet*, 2011(2): 49.
- [10] ZHAO Z, ZHAO Q, WARRICK J, et al. Circulating microRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(5): 896-905.
- [11] MURRI M, INSENER M, FERNANDEZ-DURAN E, et al. Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013(98): e1835-1844.
- [12] SAEGUSA M, HASHIMURA M, KUWATA T. Sox4 functions as a positive regulator of beta-catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas[J]. *Lab Invest*, 2012, 92(4): 511-521.
- [13] FASSBENDER A, VODOLAZKAIA A, SAUNDERS P, et al. Biomarkers of endometriosis. fertility and sterility[J]. 2013, 99(4): 1134-1145.
- [14] HAAS D, SHEBL O, SHAMIYEH A, et al. The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2013, 92(1): 3-7.
- [15] VALLONE C, RIGON G, GULIA C, et al. Non-coding RNAs and endometrial cancer[J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(4): 187.
- [16] LIU Y, NAN F, LU K, et al. Identification of key genes in endometrioid endometrial adenocarcinoma via TCGA database[J]. *Cancer Biomark*, 2017, 21(1): 11-21.
- [17] CHO S, MUTLU L, GRECHUKHINA O, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis[J]. *Fertil, Steril*, 2015, 103(5): 1252-1260.
- [18] WANG W T, ZHAO Y N, HAN B W, et al. Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(1): 281-289.
- [19] WANG L, HUANG W, REN C, et al. Analysis of serum microRNA profile by solexa sequencing in women with endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2016, 23(10): 1359-1370.

(张西倩 编辑)