

血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 在 子宫内膜异位症中诊断价值

王礼贤¹ 胡月阳²

摘要 目的 探讨血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 在子宫内膜异位症(EMT)中的诊断价值。方法 采用 RT-qPCR 技术检测 50 例 EMT 患者(病例组)及 50 例健康女性(对照组)血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 的表达水平,并通过 ROC 曲线评价二者在诊断 EMT 的价值。结果 病例组患者血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达水平均低于对照组($P < 0.05$),并通过 ROC 曲线分析显示 miRNA-188-5p 表达诊断 EMT 的敏感性度 77.6%,特异性度为 83.5%; miRNA-4741 表达诊断 EMT 的敏感性度为 84.5%,特异性度 91.2%;二者联合诊断 EMT 的敏感性度为 87.1%,特异性度 93.8%。结论 相对于健康女性,EMT 患者血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达水平降低,其临床诊断效能较高,可能是诊断 EMT 的潜在的生物学标志物。

关键词 子宫内膜异位症;外泌体;miRNA

中图分类号 R 711.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1126-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.028

子宫内膜异位症(endometriosis, EMT)是一种常见的妇科病,临床表现为痛经、不孕和盆腔包块等,在育龄期女性中发病率为 10%~15%,且呈逐年上升趋势,由于缺乏特异性的诊断标志物,确诊时间平均延迟 6~7 年^[1]。腹腔镜检查虽为诊断的“金标准”,但其为有创性检查且费用昂贵并不能被患者广泛接受,因此,寻找特异性强和敏感性高的非侵入性诊断标记物在 EMT 的研究中尤为重要。近年来,有研究认为微小 RNA(microRNA, miRNA)具备成为许多疾病潜在生物标志物的可能性^[2]。在此之前作者已对 EMT 患者和正常对照女性子宫内膜间质细胞的外泌体源性 miRNA 进行芯片分析。以此为

基础,该研究拟采用 RT-qPCR 技术检测 EMT 患者与正常对照女性血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 的表达水平,并通过 ROC 曲线分析二者在 EMT 中诊断价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2017 年 1 月~2018 年 4 月就诊于河北医科大学第四医院妇科的经病理确诊为 EMT 的患者 50 例,年龄 26~39(32.71 ± 5.60)岁,取其血浆标本为病例组;另选取同时期健康体检无异常的育龄期妇女 50 例,年龄 28~38(33.68 ± 4.22)岁,取其血浆标本为对照组;所有入组者既往月经规律,3 个月内未服用过激素类药物,亦无其他身体疾病。所有参与者均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和外泌体提取 使用含 EDTA-K2 的真空采血管收集全部受试者的血液标本,离心 5 min(3 000 r/min)分离血浆,使用外泌体提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司)提取血浆标本中的外泌体;使用 miRcute 亲和柱(北京天根生化科技公司)提取和纯化外泌体内的 miRNA,上述操作严格按说明书操作。将纯化好的 miRNA 溶解于 RNase-Free dd H₂O 10 μl(北京天根生化科技公司),保存于液氮中供试验用。

1.2.2 实时定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 采用逆转录试剂盒(美国 promega 公司)对提取的 RNA 逆转录呈 cDNA。反应条件为:37 °C、60 min、65 °C、5 s。PCR 反应体系为:5 μl SYBR green MIX(日本 Takara 公司)、5 μl cDNA、去 RNA 水 3 μl、靶基因上、下游引物各 1 μl。反应程序:95 °C、30 s、95 °C、5 s、60 °C、20 s、72 °C、10 s;共 40 个循环。仪器采用 Prism7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物详见表 1。每份标本设置 3 个复孔。以内参 U6 为 miRNA 相对定量参照基因。对每个检测目标基因设定相同的循环阈值(cycle threshold, CT 值)极限

2020-03-01 接收

基金项目:2018 年河北省卫生和计划生育委员会青年科技课题(编号:20180506)

作者单位:河北医科大学第四医院¹ 妇产超声科、² 实验动物中心,石家庄 050011

作者简介:王礼贤,女,主治医师,责任作者,E-mail: 247888324@qq.com

和截点。计算 miRNA 表达量计算公式: $2^{-\Delta\Delta CT}$ 来比较组间差异,其中 $\Delta CT = CT(\text{目的基因}) - CT(\text{内参基因})$ 。

表1 RT-qPCR 的引物序列

基因	引物序列
GAPDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
miRNA-188-5P	F: 5'-ATCGCCACCATGGATGAACA-3' R: 5'-CATGCTAGCCCTGGGATAG-3'
miR-4741	F: 5'-TCCTGGAACACTTCAGAGGC-3' R: 5'-GAGCCATTCTCCACAACCA-3'

1.2.3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳 电泳设备: 电泳仪和电泳槽(北京市六一仪器厂)。采用 2 g 琼脂糖(西班牙进口分装)、1 × TAE 缓冲液 100 ml 和 EB 溶液(北京鼎盛生物技术公司) 7 μl 制备 1.5% 琼脂糖凝胶。电泳槽内加入 1 × TAE 电泳液 600 ml。加样, DNA Marker, 样品 5 μl, 设置空白对照 GAPDH。电压 120 V, 电流 60 mA, 电泳 20 min, 然后凝胶成像仪(英国 Syngene 公司)下成像, 摄影。

1.3 统计学处理 根据前期芯片结果, 采用 R2.15.0 软件, 对两组外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达水平进行聚类分析。采用 SPSS 21.0 软件对所有数据进行统计学分析, 数据呈非正态分布, 用中位数(四分位数间距)来表示, 组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验, 截断值的确定采用受试者工作曲线(receiver operator characteristic curve, ROC 曲线), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

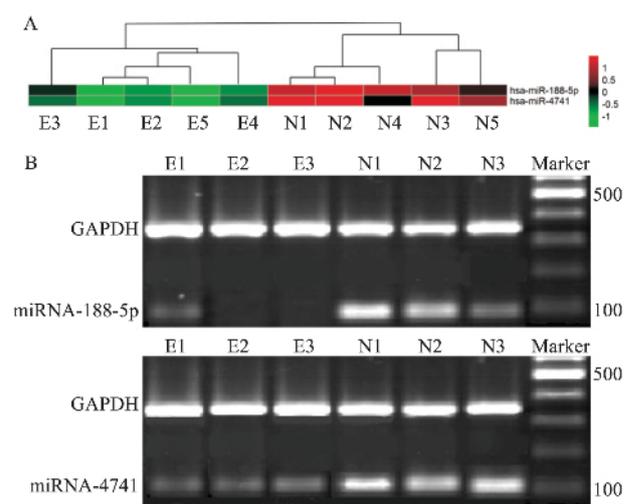
2.1 研究对象的一般资料比较 病例组和对照组年龄、初潮年龄、月经周期、胎产次和体质指数(body mass index, BMI) 比较差异均无统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

表2 病例组与对照组研究对象的一般特征($\bar{x} \pm s$)

一般特征	病例组($n=50$)	对照组($n=50$)	<i>P</i> 值
年龄(岁)	32.71 ± 5.60	33.68 ± 4.22	0.75
初潮年龄(岁)	13.48 ± 1.52	13.67 ± 1.43	0.27
月经周期(d)	27.64 ± 2.41	28.04 ± 2.15	0.32
胎产次(次)	1.18 ± 0.55	1.12 ± 0.59	0.54
BMI	20.87 ± 3.16	21.15 ± 2.84	0.49

2.2 外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 的表达差异 首先, 根据前期芯片结果, 采用 R2.15.0 软件, 对两组中外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 的表达水平进行聚类分析, 见图 1A。如图所示, 列表示组织样本, 行表示表达水平, 用红

色和绿色分别表示高表达和低表达, 黑色介于二者之间。根据组织样本类别不同自动发生聚集, 10 个样本自然分为两组, E1-5 代表病例组, N1-5 代表对照组, 组内 5 个样本一致性较高, 从图中可看出 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达水平在两组间比较差异较大: 病例组中大部分呈现绿色, 即表达降低; 对照组中大部分呈现红色, 即表达升高。其次, 采用 RT-PCR 技术检测病例组和对照组中 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达水平, 见图 1B。如图所示, E1-3 代表病例组, N1-3 代表对照组, 病例组中 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达水平较对照组低。

图1 两组中血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达差异
A: 聚类分析; B: RT-PCR

2.3 外泌体的形态学特点 采用外泌体提取试剂盒提取出外泌体后, 用 PBS 稀释, 经负染后于透射电镜下观察, 可见大小不均一的圆形或类圆形透亮区, 此为囊泡状的外泌体, 其外层为脂质包裹, 直径在 30 ~ 200 nm 之间(图 2)。

2.4 两组血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达的比较 采用 RT-qPCR 技术检测两组血浆中外泌体 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达水平。与对照组中 miRNA-188-5p 的表达水平 0.537(0.463 ~ 0.609) 相比, 病例组中 miRNA-188-5p 的表达水平 0.023(0.010 ~ 0.029) 明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与对照组中 miRNA-4741 的表达水平 0.628(0.537 ~ 0.714) 相比, 病例组中 miRNA-4741 的表达水平 0.047(0.015 ~ 0.089) 明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-

4741 在 EMT 中的诊断价值 通过 ROC 曲线分析,结果显示血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 诊断 EMT 的截断值为 0.025,曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.875(95% CI: 0.746 ~ 0.933),敏感性度 77.6% 特异性为 83.5%;血浆外泌体源性 miRNA-4741 诊断 EMT 的截断值为 0.056,AUC 为 0.907(95% CI: 0.824 ~ 0.961) 敏感度为 84.5% 特异性度 91.2%;二者联合诊断 EMT 的截断值为 0.047,AUC 为 0.916(95% CI: 0.835 ~ 0.963),敏感度为 87.1% 特异性度 93.8% 见图 3 和表 3。

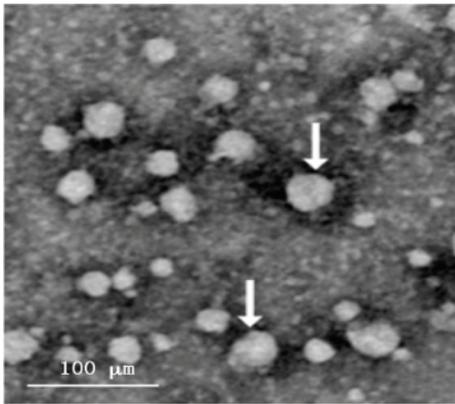


图 2 透射电镜下血浆外泌体的形态

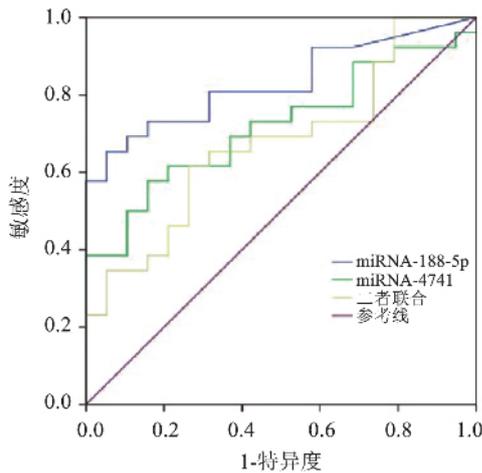


图 3 血浆外泌体 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 诊断 EMT 的 ROC 曲线

表 3 血浆外泌体 miRNA-188-5p 与 miR-4741 诊断 EMT 的 ROC 曲线参数

项目	截断值	AUC(95% CI)	敏感度 (%)	特异性 (%)
miRNA-188-5p	0.025	0.875(0.746 ~ 0.933)	77.6%	83.5%
miRNA-4741	0.056	0.907(0.824 ~ 0.961)	84.5%	91.2%
二者联合	0.047	0.916(0.835 ~ 0.963)	87.1%	93.8%

3 讨论

近年来,许多研究认为 miRNA 可通过调节细胞分裂、分化和凋亡以及细胞间的信号传导,参与调节 EMT 的促进经血逆流、炎症发生和血管生成等多种病理过程,多种循环 miRNA 被认为具有 EMT 组织特异性^[3-4]。Hunter et al^[5]发现血浆中 miRNA 主要来源于外泌体,外泌体源性 miRNA 因受外泌体双层膜结构的保护,使其免受 RNA 酶的降解,具有较好的稳定性,提高其作为疾病生物标志物的潜力。许多研究^[6]表明外泌体源性 miRNA 与多种疾病的发生和发展密切相关,例如卵巢肿瘤、肺腺癌和乳腺癌等。EMT 虽为一种良性疾病,却具有侵袭、复发等恶性肿瘤的生物学行为。并且,外泌体在血浆中具有很高的浓度,且血浆样本具有采集容易、可重复获得以及对患者创伤小的特点,因此,血浆外泌体源性 miRNA 具备了成为 EMT 的非侵入性生物标志物的条件^[1]。

国内外对于 EMT 中外泌体和外泌体源性 miRNA 的研究报道甚少,目前尚处于起步阶段,本研究是国内首次对 EMT 患者血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 表达水平进行检测,结果发现与对照组相比,病例组中二者的表达水平降低,差异有统计学意义,此结果也与我们前期芯片结果一致,验证了芯片结果的真实性和可靠性。目前,国内外学者对于 miRNA-188-5p 与 miR-4741 的研究也较少, Li et al^[7]发现 miR-188-5p 作为抑癌基因,在胶质瘤中 miRNA-188-5p 过表达,可以抑制 β-catenin 表达,从而抑制胶质瘤细胞增殖、细胞周期的转换,起到促进细胞凋亡的作用。虽然到目前为止 EMT 的发病机制尚不清楚,但很多研究^[8]表明 EMT 患者的在位内膜和异位内膜细胞的增殖率增加,凋亡率减少。因此,推测在 EMT 患者中 miRNA-188-5p 表达水平降低,可能通过促进内膜细胞的增殖,减少内膜细胞的凋亡,从而在 EMT 的发生中发挥了一定的作用。对于 miR-4741 的研究, Liu et al^[9]在寻找预测肝细胞癌肝动脉栓塞术预后的生物标志物的研究中,首先采用 miRNA Profiling Chips 筛选出包含 miR-4741 在内的 19 个差异表达 miRNA,随后采用 RT-qPCR 技术检测 miR-4741 表达水平,发现其存在差异表达,到目前为止虽还未发现其具体功能,但研究认为血液循环中 miR-4741 作为可以预测肝细胞癌肝动脉栓塞术预后的一个候选生物标志物。就本研究而言,在前期采用芯片技术,筛选出与正常女性

相比, EMT 中多个具有差异表达的外泌体源性 miRNA 再采用 RT-qPCR 技术发现病例组中 miR-4741 表达低于对照组, 从而推测血浆外泌体源性 miRNA-4741 可以作为检测卵巢子宫内膜异位症的一个生物标志物。

目前, 临床上对于 EMT 的术前诊断主要依靠超声和血清糖类抗原 125 (cancer antigen-125, CA125) 检查, 超声检查对于早期、不典型和特殊部位的 EMT 诊断率并不高, 存在一定的局限性; 而血清 CA125 是糖蛋白性的肿瘤相关抗原, 虽然作为诊断 EMT 常规的实验室检查已在临床上应用多年, 但其灵敏度和特异度并不是特别高, 发生卵巢癌或上皮性肿瘤时 CA125 也会升高。周赞华等^[10]认为 CA125 诊断 EMT 的敏感度为 74.4%, 特异度为 72.7%; 汤礼宾等^[11]认为 CA125 诊断 EMT 的敏感度为 66.3% 特异度为 85.5%。而本研究显示血浆外泌体源性 miRNA-188-5p、miRNA-4741 以及二者联合起来诊断 EMT 的敏感度分别为 77.6%、84.5% 和 87.1% 特异度分别为 83.5%、91.2% 和 93.8% 与血清 CA125 相比具有较高的诊断效能。综上, 血浆外泌体源性 miRNA-188-5p 与 miRNA-4741 可作为诊断 EMT 潜在的生物学标志物, 为今后 EMT 非创伤性检查的生物标志物的寻找和鉴定提供了新方向。

参考文献

[1] Moga M A, Bălan A, Dimienescu O G, et al. Circulating miRNAs

as biomarkers for endometriosis and endometriosis-related ovarian cancer—an overview [J]. J Clin Med 2019 8(5): 735–54.

[2] Mao A J, Anastasi J K. Diagnosis and management of endometriosis: the role of the advanced practice nurse in primary care [J]. J Am Acad Nurse Pract 2010 22(2): 109–16.

[3] 郑玉丹, 尹香花. microRNAs 在子宫内膜异位症早期诊断中的研究进展 [J]. 实用妇科内分泌杂志 2018 5(28): 11–4.

[4] 张玮, 彭澎, 沈铿. 外泌体来源 RNA 在细胞通讯中的作用 [J]. 中国医学科学院学报 2016 38(4): 480–3.

[5] Hunter M P, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles [J]. Plos One, 2008 3(11): e3694.

[6] 唐慧, 伍海娜, 杨怡, 等. 外泌体源性 microRNA 在疾病诊疗中的研究进展 [J]. 中南大学学报(医学版) 2015 40(11): 1270–5.

[7] Li N, Shi H, Zhang L, et al. miR-188 inhibits glioma cell proliferation and cell cycle progression through targeting β -catenin [J]. Oncol Res 2018 26(5): 785–94.

[8] Clouaire T, Stancheva I. Methyl-CpG binding proteins: Specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? [J]. Cell Mol Life Sci 2008 65: 1509–22.

[9] Liu J, Yan J, Zhou C, et al. miR-1285-3p acts as a potential tumor suppressor miRNA via downregulating JUN expression in hepatocellular carcinoma [J]. Tumour Biol 2015 36(1): 219–25.

[10] 周赞华, 董海娜, 卫哲, 等. 子宫内膜异位症早期综合评分临床诊断模型研究 [J]. 中国全科医学 2017 20(21): 2665–70.

[11] 汤礼宾, 章志福, 麦丽兰. 血清 CA125、VEGF、MCP-1 在子宫内膜异位症诊断中的应用价值 [J]. 临床和实验医学杂志 2018, 17(10): 1085–8.

The preliminary study on the diagnosis value of plasma exosome miRNA-188-5p and miRNA-4741 in the endometriosis

Wang Lixian¹, Hu Yueyang²

(¹Dept of Gynecology and Obstetrics Ultrasonography, ²Laboratory Animal Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011)

Abstract Objective To study the value of plasma exosome miRNA-188-5p and miRNA-4741 in the diagnosis of endometriosis (EMT). **Methods** RT-qPCR was used to analyze the expressions of plasma exosome miRNA-188-5p and miRNA-4741 in 50 patients with EMT and 50 healthy controls. ROC curve was used to evaluate the roles of miRNA-188-5p and miRNA-4741 in the diagnosis of EMT. **Results** The expression levels of miRNA-188-5p and miRNA-4741 in case group were lower than those in control group ($P < 0.05$). ROC curve showed that for the diagnosis of endometriosis, the sensitivity and the specificity of miRNA-188-5p were 77.6% and 83.5%, the sensitivity and the specificity of miR-4741 were 84.5% and 91.2%, and the sensitivity and the specificity of the combination of them were 87.1% and 93.8%. **Conclusion** Compared with healthy women, the expressions of plasma exosome miRNA-188-5p and miRNA-4741 in EMT are lower, and their clinical diagnostic efficiency are higher, which may be potential biomarkers for the diagnosis of EMT.

Key words ovarian endometriosis; exosome; miRNA