

·论 著·

血清 miRNA 联合经阴道彩色多普勒超声诊断
宫颈癌的临床研究

叶玲红 陈方红 姚奏英 陈志辉 吕晴 杨惠芬

[摘要] 目的 探究 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a、miRNA-92a、miRNA-93 联合经阴道彩色多普勒超声 (TVCDs) 诊断宫颈癌的临床价值。方法 选择术后经病理证实为宫颈癌患者 133 例 (宫颈癌组)、宫颈上皮瘤变患者 130 例 (CIN 组) 及子宫良性病变患者 130 例 (对照组)。分析比较三组 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a、miRNA-92a、miRNA-93 的表达水平, 超声血流参数及这些指标的诊断灵敏度、特异度。结果 宫颈癌组 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a 表达量明显低于 CIN 组及对照组, miRNA-92a、miRNA-93 表达量明显高于 CIN 组及对照组, 差异均有统计学意义 (q 分别=26.06、22.60、9.96、4.97、8.41; 55.62、68.53、44.67、18.42、13.21, P 均 <0.05); 宫颈癌组宫颈前后径、左右径明显大于 CIN 组与对照组, 差异均有统计学意义 (q 分别=17.18、14.80、23.41, 17.57, P 均 <0.05), 而收缩期峰值血流速度 (PSV) 明显快于 CIN 组与对照组, 阻力指数 (RI) 明显低于 CIN 组与对照组, 差异有统计学意义 (q 分别=23.23、8.36、39.66、40.89, P 均 <0.05); 血清 miRNA 联合 TVCDs 诊断宫颈癌灵敏度、特异度明显高于血清 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a、miRNA-92a、miRNA-93、TVCDs, 差异均有统计学意义 (χ^2 分别=11.35、9.78、9.03、7.62、8.32、8.52; 14.14、12.22、6.00、5.08、4.32、168.07, P 均 <0.05)。结论 血清 miRNA 联合 TVCDs 诊断宫颈癌具有无创、灵敏度高、特异度高等优势, 对宫颈癌疾病的诊断及预后判断均具有指导价值。

[关键词] miRNA; 经阴道彩色多普勒超声; 宫颈癌; 宫颈上皮瘤变; 血流动力学

Research on the diagnostic value of serum miRNA combined with transvaginal color doppler ultrasound in cervical carcinoma YE Linghong, CHEN Fanghong, YAO Zouying, et al. Department of Ultrasound, Lishui Central Hospital, Lishui 323000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical value of miRNA-424, miRNA-375, miRNA-34a, miRNA-92a, and miRNA-93 combined with transvaginal color doppler ultrasound (TVCDs) in the diagnosis of cervical cancer (CC). **Methods** Totally 133 patients with cervical cancer were enrolled as CC group, 130 patients with cervical epithelial neoplasia were enrolled as CIN group, and 130 patients with benign uterine lesions were selected as normal group. The expression levels of miRNA-424, miRNA-375, miRNA-34a, miRNA-92a and miRNA-93 in three groups were analyzed and compared, as well as ultrasonic blood flow parameters, diagnostic sensitivity and specificity. **Results** The expression levels of miRNA-424, miRNA-375 and miRNA-34a in CC group were significantly lower than those in CIN group and normal group, and the expression levels of miRNA-92a and miRNA-93 were significantly higher than those in CIN group and normal group ($q=26.06, 22.60, 9.96, 4.97, 8.41; 55.62, 68.53, 44.67, 18.42, 13.21, P<0.05$). The anteroposterior diameter and the left to right cervical diameter of CC group were significantly larger than those of CIN group and normal group, and the differences were statistically significant ($q=17.18, 14.80, 23.41, 17.57, P<0.05$). The PSV of CC group was significantly faster than CIN group and normal group, the RI of CC group was significantly lower than CIN group and normal group ($q=23.23, 8.36, 39.66, 40.89, P<0.05$). The specificity and sensitivity of serum miRNA combined with TVCDs in the diagnosis of CC were significantly higher than those of miRNA-424, miRNA-375, miRNA-34a, miRNA-92a, miRNA-93, and TVCDs ($\chi^2=11.35, 9.78, 9.03, 7.62, 8.32, 8.52; 14.14, 12.22, 6.00, 5.08, 4.32, 168.07, P<0.05$). **Conclusion** The combination of serum miRNA with TVCDs in the diagnosis of CC has the advantages of non-invasive, high

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.012.004

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2017KY730)

作者单位: 323000 浙江丽水, 丽水市中心医院超声科 (叶玲红、陈方红、陈志辉、吕晴), 中医科 (姚奏英), 妇产科 (杨惠芬)

92a, miRNA-93, and TVCDs ($\chi^2=11.35, 9.78, 9.03, 7.62, 8.32, 8.52; 14.14, 12.22, 6.00, 5.08, 4.32, 168.07, P<0.05$). **Conclusion** The combination of serum miRNA with TVCDs in the diagnosis of CC has the advantages of non-invasive, high

sensitivity and high specificity, which has guiding value for the diagnosis and prognosis of CC disease.

[Key words] miRNA; transvaginal color doppler ultrasound; cervical cancer; cervical epithelioma; haemodynamics

目前宫颈癌发病率位于女性恶性肿瘤中第2位,死亡率位于女性恶性肿瘤中第4位^[1]。且我国宫颈癌发病率与死亡率呈上升趋势^[2]。人乳头瘤病毒检测是宫颈癌筛查的主要方式^[3],具有较高敏感性,但特异性较差,确诊依据不足。临床研究证实,miRNA(miRNA)广泛存在于血清中,且在宫颈癌疾病发展变化过程中发挥着重要作用^[4],但临床对于miRNA是否可作为宫颈癌筛查与诊断工具尚未有明确定论。经阴道彩色多普勒超声(transvaginal color doppler ultrasound, TVCDS)是经典无创影像学检查方式,能够通过影像学特征、血流动力学改变等对疾病进行诊断^[5]。本次研究采用血清miRNA联合TVCDS进行诊断,探讨其诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择丽水市中心医院2017年1月至2018年12月妇产科术后经病理证实为宫颈癌患者133例作为宫颈癌组,宫颈上皮瘤变(cervical intraepithelial neoplasias, CIN)患者130例作为CIN组,子宫良性病变患者130例作为对照组。宫颈癌组年龄25~70岁,平均年龄(41.35±4.23)岁;按FIGO标准分期:I期63例、II期70例;按WHO组织学分型:鳞癌92例、腺癌41例;病理分化程度:中、低分化84例,高分化49例;病理学证实无淋巴结转移69例、有淋巴结转移64例。CIN组年龄28~68岁,平均(42.75±4.10)岁;对照组年龄24~69岁,平均年龄(42.33±4.17)岁。三组年龄比较,差异无统计学意义(P 均>0.05)。

1.2 纳入排除标准 纳入标准为:①宫颈癌、CIN患者经手术病理组织学确诊,患者知晓自身病情;②术前进行血清miRNA与TVCDS检查;③临床资料完整,意识清醒,无认知障碍;④自愿签署相关知

情同意书。排除标准为:①合并其他恶性肿瘤;②有宫颈部分或全切除手术史;③处于妊娠期、哺乳期妇女;④伴有严重心脑血管疾病,肝肾功能障碍。

1.3 方法

1.3.1 血清miRNA 患者清晨采集全血样本,常温下1 500 r/min,离心5 min,采用移液枪收集血清,采集的血清置于4℃环境下,12 000 r/min,离心5 min,去除残留血细胞,保存至-80℃冰箱中备用。取血清100~200 μl,根据QIAGEN提供的miRNeasy Mini Kit试剂盒进行血清总RNA提取。采用RT-qPCR分析定量miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a、miRNA-92a、miRNA-93。miRNA相对表达水平为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta CT = CT_{\text{目的}} - CT_{\text{内参}}$ 。

1.3.2 TVCDS检查 患者入组后嘱咐排空膀胱接受TVCDS检查,采用GE Voluson E8彩色多普勒超声诊断仪,选择经阴道探头,频率5~9 MHz,探头进行横向、纵向、斜向等多方位扫查。患者取截石位,分别观察宫颈外口、宫颈内、宫颈管回声情况,通过影像显示判定宫颈大小、内膜、肌层等具体情况,通过脉冲多普勒超声采集对象收缩期峰值血流速度(peak systolic velocity, PSV)、阻力指数(resistance index, RI),操作过程中尽可能对平行于取样线的血流方向进行有效保持,保持夹角在30°以下,进行连续3次测量,取平均值。

1.4 统计学方法 采用SPSS 19.0软件进行统计学处理。计数资料采用率表示,进行 χ^2 检验;计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,三组间采用ANOVA法,两两比较采用 q 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组血清miRNA表达量情况比较见表1

表1 三组血清miRNA表达量情况比较

组别	miRNA-424	miRNA-375	miRNA-34a	miRNA-92a	miRNA-93
宫颈癌组	0.86 ± 0.21 ^{*#}	0.85 ± 0.21 ^{*#}	0.39 ± 0.11 ^{*#}	2.41 ± 0.90 ^{*#}	0.50 ± 0.12 ^{*#}
CIN组	2.44 ± 0.65 [*]	2.43 ± 0.75 [*]	0.57 ± 0.13 [*]	2.12 ± 0.64 [*]	0.42 ± 0.11 [*]
对照组	4.22 ± 0.99	5.65 ± 1.16	1.22 ± 0.33	1.31 ± 0.43	0.37 ± 0.10

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与CIN组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见,三组间 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a、miRNA-92a、miRNA-9 表达比较,差异均有统计学意义(F 分别=774.12、1216.13、547.40、90.51、44.81, P 均 <0.05)。进一步两两比较,与对照组比较,宫颈癌组与 CIN 组 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a 表达下降,miRNA-92a、miRNA-93 表达上升,差异有统计学意义(q 分别=55.62、29.39;

68.53、45.66; 44.67、34.51; 18.42、13.37; 13.21、4.76, P 均 <0.05);与 CIN 组比较,宫颈癌组 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a 表达更低,miRNA-92a、miRNA-93 表达更高,差异有统计学意义(q 分别=26.06、22.60、9.96、4.97、8.41, P 均 <0.05)。

2.2 三组宫颈前后径、左右径及血流动力学情况比较见表2

表2 三组血流动力学情况比较

组别	宫颈前后径/cm	宫颈左右径/cm	PSV/cm/s	RI
宫颈癌组	3.86 ± 0.58* [#]	4.71 ± 1.03* [#]	19.73 ± 3.31* [#]	0.49 ± 0.07* [#]
CIN 组	3.17 ± 0.38*	3.91 ± 0.23*	13.37 ± 2.75*	0.58 ± 0.11*
对照组	2.92 ± 0.39	3.76 ± 0.15	8.87 ± 3.32	0.93 ± 0.17

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与 CIN 组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见,三组间宫颈前后径、宫颈左右径、PSV、RI 比较,差异均有统计学意义(F 分别=147.47、89.62、397.70、464.57, P 均 <0.05)。进一步两两比较,宫颈癌组与 CIN 组宫颈前后径、宫颈左右径明显长于对照组,PSV 明显快于对照组,RI 明显小于对照组,差异均有统计学意义(q 分别=23.41、6.19、17.57、2.75、39.66、16.34、40.89、32.34, P 均 <0.05);宫颈癌组宫颈前后径、宫颈左右径明显长于 CIN 组,PSV 明显快于 CIN 组,RI 明显小于 CIN 组,差异均有统计学意义(q 分别=17.18、14.80、23.23、8.36, P 均 <0.05)。

2.3 血清 miRNA、TVCDs 及联合诊断宫颈癌情况见表3

表3 血清 miRNA、TVCDs 及联合诊断宫颈癌情况/%

方法	灵敏度	特异度
miRNA-424	56.45	90.33
miRNA-375	57.93	91.01
miRNA-34a	58.91	93.93
miRNA-92a	60.31	95.42
miRNA-93	59.69	95.83
TVCDs	76.23	47.97
miRNA+TVCDs	90.23	95.00

由表3可见,血清 miRNA 联合 TVCDs 诊断宫颈癌灵敏度、特异度明显高于血清 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a、miRNA-92a、miRNA-93、TVCDs,差异均有统计学意义(χ^2 分别=11.35、9.78、9.03、7.62、8.32、8.52; 14.14、12.22、6.00、5.08、4.32、168.07, P 均 <0.05)。

2.4 宫颈癌影像学表现见封二图1~2

由封二图1可见,宫颈实质性团块,内回声均匀,血供异常丰富;由封二图2可见,团块大小 30 mm × 27 mm。

3 讨论

宫颈癌作为临床常见病与多发病,因其早期症状表现缺乏典型性,且当前筛查方式敏感度与特异度还有待提升,导致宫颈癌患者错过最佳治疗时机^[6]。TVCDs 是无创的影像学检查手段,能够直接显示宫颈、血管与管腔内血流状态,还能将检查结果进行量化表达,是一种简便、有效的检查手段。但本次研究结果显示 TVCDs 诊断宫颈癌灵敏度为 76.23%,特异度为 47.97%,提示该检查方法特异度较低,可用于宫颈癌早期筛查及预后判断。何玉春等^[7]研究报道亦显示,TVCDs 可发现病灶内微血管情况及判断早期宫颈癌的预后与发展。miRNAs 广泛存在于外周血中,受各类检测方法影响性较小,是近些年发现的肿瘤血清学检测潜在指标^[8]。本次研究采用 TVCDs 联合检测 miRNA,旨在更好地进行宫颈癌疾病的临床检测与诊断,提升宫颈癌疾病无创诊断准确性。

本次研究结果显示宫颈癌组 miRNA-424、miRNA-375、miRNA-34a 表达量明显低于 CIN 组及对照组,miRNA-92a、miRNA-93 表达量明显高于 CIN 组及对照组(P 均 <0.05),提示血清 miRNAs 在宫颈癌疾病中呈不同表达量,可将 miRNAs 异常表达作为诊断宫颈癌疾病的主要依据。miRNAs 异常通过下调或上调靶基因表达,在肿瘤的发生与进展中发挥重要作用,参与恶性肿瘤增殖、侵袭、转移与药物抵

抗等。miRNA-375在宫颈癌中可能具有抑癌功能^[9],阻止宫颈癌细胞增殖与迁移^[10]。miRNA-34a在宫颈癌中呈下调表达^[11];miRNA-92a在多种肿瘤组织中表达异常,在宫颈癌组织中呈显著上调表达^[12];宫颈癌组织中miRNA-93表达明显高于正常组织^[13]。这些研究均与本次研究结果一致。

宫颈癌疾病的TVCDs诊断主要表现为宫颈实质性团块,或伴形态不规则,内回声均匀,血供异常丰富。本次研究结果显示,宫颈癌组宫颈前后径、左右径明显大于CIN组与对照组(P 均 <0.05);PSV明显快于CIN组与对照组,RI明显低于CIN组与对照组,差异有统计学意义(P 均 <0.05),提示TVCDs对于宫颈癌疾病临床诊断较为准确地评价了宫颈大小、形态及血流动力学情况。本次研究结果显示血清miRNA联合TVCDs诊断宫颈癌灵敏度、特异度明显高于血清miRNA、TVCDs(P 均 <0.05),提示血清miRNA联合TVCDs诊断宫颈癌具有更高特异度与灵敏度,可用于宫颈癌疾病的临床诊断。原因可能为:①miRNA在血清中较稳定,受RNA酶降解影响较小,在当前各类血清保存手段(煮沸、冻融、酸碱)下不会造成miRNA的损失;②相对于传统穿刺取样,血液样本取样方便,检测损伤较小;③检出谱系较广,且均有较高灵敏度,在宫颈癌早期筛查中具有良好应用价值;④循环miRNA能够反映机体病情,临床用于诊断及预后评估有指导意义,结合其他诊断方法能够有助于提升疾病诊断及预后精度。

本次研究未对血清miRNA联合TVCDs诊断宫颈癌分期的情况进行探究,后期可针对此方面进行深入研究,丰富miRNA联合TVCDs诊断宫颈癌的数据基础。本次研究发现血清miRNA的取样及处理虽较为简便,但检验过程较为复杂,基层医院可能不具备相应器材及检验手段,但对宫颈癌疾病的无创诊断具有一定指导价值。

参考文献

- 1 Bray F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 can-

- cers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- 2 胡尚英,郑荣寿,赵方辉,等. 1989至2008年中国女性宫颈癌发病和死亡趋势分析[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(2): 119-125.
- 3 赵晓,冯骏,张伟珍. 丽水地区中老年宫颈癌患者人乳头瘤病毒感染现状及危险因素[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2019, 46(2): 135-138.
- 4 Pereira PM, Marques JP, Soares AR, et al. MicroRNA expression variability in human cervical tissues[J]. PLoS ONE, 2010, 5(7): e11780.
- 5 张利霞,闫国珍. 经阴道彩色多普勒超声技术在子宫动脉及其分支血管血流频谱检测方面的应用进展[J]. 包头医学院学报, 2012, 28(3): 137-139.
- 6 Du PL, Wu KS, Fang JY, et al. Cervical cancer mortality trends in China, 1991-2013, and predictions for the future[J]. APJCP, 2015, 16(15): 6391-6396.
- 7 何玉春,李慧敏,李邱静,等. 经阴道彩色多普勒超声病灶内微血管与早期宫颈癌预后发展的关系[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(2): 335-338.
- 8 Mollaei H, Safaralizadeh R, Rostami Z. MicroRNA replacement therapy in cancer[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12369-12384.
- 9 Yu X, Zhao W, Yang X, et al. miR-375 affects the proliferation, invasion, and apoptosis of hpv16-positive human cervical cancer cells by targeting IGF-1R[J]. Int J Gynecol Cancer, 2016, 26(5): 851-858.
- 10 张强,张晶晶,曹丽艳,等. miRNA-375对宫颈癌细胞系Si-Ha增殖能力和迁移能力的影响及相关机制研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(16): 1739-1743.
- 11 邓晶,王敏,谢环. 宫颈癌患者组织和血液miR-21和miR-34a表达及诊断意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(6): 566-568.
- 12 Motawi TK, Rizk SM, Ibrahim TM, et al. Circulating microRNAs, miR-92a, miR-100 and miR-143, as non-invasive biomarkers for bladder cancer diagnosis[J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(3): 142-148.
- 13 间学敏,张艳,戴宇,等. miR-106b/miR-93降低了宫颈癌细胞对顺铂化疗的敏感性[J]. 复旦学报(自然科学版), 2014, 53(6): 689-696.

(收稿日期 2019-08-24)

(本文编辑 蔡华波)