血浆 miRNA 在子宫内膜异位症中的诊断价值

韩春龙，陈捷，彭子洁
福建中医药大学附属人民医院妇科，福建福州　350004

[摘要] **目的** 探讨血浆微小核糖核酸（micro RNA，miR）-451a、miR-3613-5p 和 miR-125b-5p 在子宫内膜异位症（endometriosis，EMT）中的诊断价值。**方法** 选取 2021 年 12 月至 2023 年 2 月就诊于福建中医药大学附属人民医院妇科的子宫内膜异位症患者 35 例作为病例组，同期选取 30 名健康体检无异常的育龄女性作为对照组。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应技术检测两组纳入者的 miR-451a、miR-3613-5p 和 miR-125b-5p 表达水平，并通过受试者操作特征曲线（receiver operating characteristic curve，ROC 曲线）评价其在 EMT 诊断中的价值。**结果** ①病例组患者血浆中 miR-451a、miR-3613-5p 和 miR-125b-5p 的表达水平均高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。②病例组中轻中度（Ⅱ~Ⅲ期）患者及重度（Ⅳ期）患者间 miRNA 表达水平比较差异无统计学意义（$P>0.05$），血浆中的糖类抗原 125（carbohydrate antigen 125，CA125）表达水平差异有统计学意义（$P<0.05$）。③通过 ROC 分析 miRNA 对 EMT 的诊断效能，miR-451a 的敏感度为 85.7%，特异性为 40.0%；miR-3613-5p 的敏感度为 60.0%，特异性为 90.0%；miR-125b-5p 的敏感度为 60.0%，特异性为 76.7%；三者联合诊断的敏感度为 48.6%，特异性为 96.7%。**结论** 相较于健康女性，miR-451a、miR-3613-5p 和 miR-125b-5p 在 EMT 患者血浆中表达水平升高，且不受临床分期影响，有望作为 EMT 无创诊断的候选标志物。

[关键词] 子宫内膜异位症；微小核糖核酸-451a；微小核糖核酸-3613-5p；微小核糖核酸-125b-5p
[中图分类号] R711.71　　[文献标识码] A　　[DOI] 10.3969/j.issn.1673–9701.2024.21.007

Diagnostic value of plasma miRNA in endometriosis

HAN Chunlong, CHEN Jie, PENG Zijie
Department of Gynecology, the Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian, China

[Abstract] Objective To explore the diagnostic value of microRNA (miR)-451a, miR-3613-5p and miR-125b-5p in endometriosis (EMT). **Methods** A tatol of 35 patients with EMT in the Department of Gynecology, the Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine were selected as the case group from December 2021 to February 2023, 30 healthy women of childbearing age were selected as the control group over the same period. The expression levels of miR-451a, miR-3613-5p and miR-125b-5p in the plasma of two groups were measured using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, the diagnostic value of these miRNAs in EMT was evaluated by using receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** ①The expression levels of miR-451a, miR-3613-5p and miR-125b-5p in case group were higher than those in control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). ②In case group, there was no significant difference in miRNA expression levels between mild-moderate patients (stage Ⅱ-Ⅲ) and severe patients (stage Ⅳ) ($P>0.05$). The expression levels of carbohydrate antigen 125 (CA125) in plasma was significantly different ($P<0.05$). ③The diagnostic efficacy of miRNA for EMT was evaluated through ROC analysis, with a sensitivity of 85.7% and specificity of 40.0% for miR-451a, a sensitivity of 60.0% and specificity of 90.0% for miR-3613-5p, and a sensitivity of 60.0% and specificity of 76.7% for miR-125b-5p. Combined with a sensitivity of 48.6% and specificity of 96.7%. **Conclusion** Compared to healthy women, the expression levels of miR-451a, miR-3613-5p and miR-125b-5p in plasma of EMT are increased, which are not affected by clinical stage, and are expected to be candidate markers for the non-invasive diagnosis of EMT, and are not affected by clinical staging, making them promising candidate biomarkers for non-invasive diagnosis of EMT.

[Key words] Endometriosis; miR-451a; miR-3613-5p; miR-125b-5p

子宫内膜异位症（endometriosis，EMT）作为常见的妇科病症，在育龄期女性中的发病率约为 10%，其可导致痛经、慢性盆腔痛、性交痛及不孕等一系列症状，严重影响女性的身心健康和生活质量[1]。

基金项目：福建省中青年教师教育科研项目（科技类）（JAT200186）
通信作者：韩春龙，电子信箱：646910110@qq.com

中国知网　https://www.cnki.net

EMT 的发病机制目前仍未完全明确，也缺乏准确的诊断方法[2]，由于早期可能缺乏典型症状，患者症状明显时病情往往已经较为严重。因此，对 EMT 的早期诊断显得尤为关键[3]。目前，糖类抗原 125（carbohydrate antigen 125，CA125）是辅助诊断 EMT 的常用生物标志物，但其特异性在单独使用时并不理想。腹腔镜检查可作为诊断 EMT 的“金标准”，但其高昂的成本和侵入性操作使其在临床上的应用受到限制。鉴于此，研究者们一直在寻找具有高特异性和敏感度的非侵入性诊断标志物。微小核糖核酸（micro RNA，miR）是一类由大约 22 个核苷酸组成的单链 RNA 分子，并在多种细胞过程中发挥关键调节作用[4]。研究表明 miRNA 在 EMT 的发生和发展过程中扮演重要角色，并有可能成为 EMT 的无创诊断标志物[5]。本研究旨在通过分析 EMT 患者与健康女性血浆中 miR-451a、miR-3613-5p 和 miR-125b-5p 的表达差异，并采用受试者操作特征曲线（receiver operating characteristic curve，ROC 曲线）评估其在 EMT 诊断中的应用价值，期望能为 EMT 的早期诊断提供新的策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2021 年 12 月至 2023 年 2 月就诊于福建中医药大学附属人民医院妇科的 35 例 EMT 患者作为病例组，同期选取 30 名健康体检无异常的育龄女性作为对照组。病例组患者的年龄（32.23 ± 5.07）岁，体质量指数（21.38 ± 2.31）kg/m^2，对照组纳入者的年龄（32.50 ± 4.45）岁，体质量指数（21.26 ± 2.85）kg/m^2，两组纳入者的一般资料比较，差异无统计学意义（P>0.05）。病例组按术中所见以美国生殖医学会（American Society for Reproductive Medicine，ASRM）修正的子宫内膜异位症分期法[6]进行分期：Ⅱ期患者 4 例，Ⅲ期患者 11 例，Ⅳ期患者 20 例。病例组纳入标准：①接受腹腔镜手术且术后病理确诊 EMT；②既往月经规律；③本人及其家属同意加入本研究，并签署知情同意书。排除标准：①术前 3 个月内接受促性腺激素释放激素激动剂类似物或激素类药物治疗；②同时患有其他妇科疾病或严重器质性疾病者。本研究经福建中医药大学附属人民医院伦理委员会批准（伦理审批号：2021-051-02）。

1.2 试剂与设备

mRNA 逆转录试剂盒及 miRNA 逆转录试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司。Trizol 试剂购自美国 Thermo 公司，CA125 酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒购自南京博研生物科技有限公司。miR-451a、miR-3613-5p、miR-125b-5p 及 U6（内参）引物由北京擎科合成。荧光定量聚合酶链反应仪购自美国 Thermo 公司，型号 PIKOREAL96；多功能酶标分析仪购自瑞士 Tecan 公司，型号 Infinite 200Pro。

1.3 实验方法

1.3.1 标本收集 所有纳入者在清晨空腹状态下抽取 5ml 静脉血，静置于含抗凝剂的试管中，常温 3000 转/min 离心 15min 取血浆，存于无菌离心管并冷冻于–80℃待测。

1.3.2 miRNA 检测 Trizol 法提取细胞总 RNA，分光光度计测定浓度并计算纯度。先利用反转录试剂盒逆转录成 cDNA，以 cDNA 为模板进行扩增，再进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应。选用 U6 作为内参，以 Ct 值为基础，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算血浆 miR-451a、miR-3613-5p 及 miR-125b-5p 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT–qPCR 引物序列

引物名称	引物序列	引物长度（bp）
H-U6	F：5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′ R：5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3’	94
hsa-miR-125b-5p	F：5′-TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA-3′ R：5′-GCTGTCAACGATACGCTACGTA-3′	75
hsa-miR-451a	F：5′-AAACCGTTACCATTACTGAGTT-3′ R：5′-GCTGTCAACGATACGCTACGTA-3′	76
Has-miR-3613-5p	F：5′-GCTGTTGTACTTTTTTTTTTGTTC-3′ R：5′-GCTGTCAACGATACGCTACGTA-3′	75

1.3.3 CA125 检测 使用 ELISA 试剂盒进行测定，严格遵守试剂盒说明书的规范步骤进行操作。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件对数据进行处理分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间比较采用独立样本 t 检验；不符合正态分布的计量资料以中位数（四分位数间距）[M（Q_1，Q_3）]表示，两组间比较采用 Mann-Whitnely U 检验。诊断价值的比较采用 ROC 曲线分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组与对照组的血浆 miRNA 指标比较

病例组患者的血浆 miR-451a、miR-3613-5p 和 miR-125b-5p 水平均高于对照组，差异有统计学意义（P<0.05），见表 2。

中国知网 https://www.cnki.net

表 2　病例组和对照组的血浆 miRNA 指标比较[M（Q_1，Q_3）]

组别	miR-451a	miR-3613-5p	miR-125b-5p
对照组（n=30）	0.12（0.04，0.32）	0.31（0.15，0.46）	0.28（0.15，0.70）
病例组（n=35）	0.21（0.08，1.01）	0.72（0.35，1.61）	0.81（0.27，1.14）
Z	–2.119	–4.066	–2.684
P	0.034	<0.001	0.007

2.2　病例组不同分期患者血浆 miRNA 和 CA125 的比较

轻中度（Ⅱ~Ⅲ期）患者及重度（Ⅳ期）患者血浆 miR-451a、miR-3613-5p 和 miR-125b-5p 的相对表达量差异无统计学意义（P>0.05）；轻中度与重度 CA125 对比差异有统计学意义（P<0.05），见表 3。

2.3　ROC 曲线分析 miRNA 诊断效能

血浆 miR-451a 诊断 EMT 的截断值为 0.067，曲线下面积（area under the curve，AUC）为 0.653（95%CI：0.519~0.787），敏感度为 85.7%，特异性为 40.0%；血浆 miR-3613-5p 诊断 EMT 的截断值为 0.523，AUC 为 0.794（95%CI：0.688~0.900），敏感度为 60.0%，特异性为 90.0%；血浆 miR-125b-5p 诊断 EMT 的截断值为 0.671，AUC 为 0.694（95%CI：0.566~0.823），敏感度为 60.0%，特异性为 76.7%；三者联合诊断 EMT 的截断值为 0.708，AUC 为 0.801（95%CI：0.697~0.905），敏感度为 48.6%，特异性为 96.7%，见图 1。

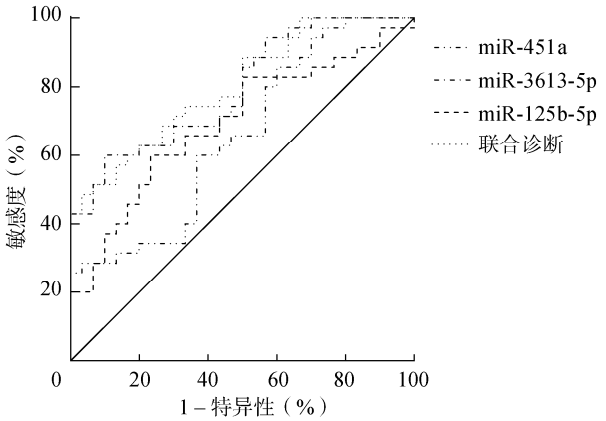

图 1　miRNA 诊断 EMT 的 ROC 曲线

3　讨论

EMT 是生育年龄妇女常见的妇科疾病，不仅对患者的生命质量产生负面影响，还给社会卫生资源造成重大负担[1]。因此，实现 EMT 的早期诊断和干预对改善患者预后至关重要[3]。发现非侵入性、具有高敏感度和特异性的生物标志物对 EMT 的诊断、缓解患者的不适、减少医疗费用、提升诊断的精确度和迅速性进而优化患者的整体治疗过程具有重要意义。

miRNA 是一类由大约 22 个核苷酸组成的单链 RNA 分子，在真核生物中高度保守，可以多种方式调控基因的转录或翻译，单个 miRNA 甚至可对一个靶基因进行双重或多重调控[4]。近年来研究显示 miRNA 在 EMT 的发生和发展中广泛参与，包括细胞的增殖迁移、血管的生成、炎症信号的传导及激素的调节等多个方面，对 EMT 的进展具有决定性影响[5]。Bendifallah 等[7]利用人工智能和机器学习技术开发基于 miRNA 的 EMT 诊断程序，其敏感度、特异性和 AUC 分别达 96.8%、100.0%和 98.4%，这表明 miRNA 作为诊断标志物具有巨大潜力。Moustafa 等[8]采用 miRNA 检测组合作为 EMT 的非侵入性诊断方法，发现 miR-451a、miR-3613-5p 和 miR-125b-5p 在 EMT 患者中的表达水平显著高于健康对照者，而 miR-3613-5p 和 let-7b 水平则显著低于健康对照者。Vanhie 等[9]基于全基因组 miRNA 表达谱分析，识别包括 miR-125b-5p、miR-451a 和 miR-3613-5p 在内的 42 种具有区分潜力的血浆 miRNA，并构建 3 种诊断模型。Gao 等[10]的研究发现 miR-451a 在正常子宫内膜中的表达减少，其可能通过促进细胞增殖和减少凋亡促进 EMT 的发病。Li 等[11]在小鼠 EMT 模型上使用 miR-451a 抑制剂治疗后，观察到 EMT 病变体积显著减小。但根据 Wang 等[12]的研究，在患有 EMT 并伴有不孕症状的个体中，miR-451a 在组织样本及细胞系的表达水平显著低于正常人群。Walasik 等[13]的前瞻性研究也发现 EMT 患者血浆中的 miR-451a 和 miR-3613-5p 水平显著降低，但 miR-125b-5p 和 miR-199a-3p 水平在 EMT 患者和健康对照者间没有差异。Cosar 等[14]研究发现在经过治疗的狒狒 EMT

表 3　病例组不同分期患者血浆 miRNA 和 CA125 的比较[M（Q_1，Q_3）]

分期	miR-451a	miR-3613-5p	miR-125b-5p	CA125（U/ml）
轻中度（n=15）	0.23（0.08，1.01）	1.01（0.34，1.60）	0.75（0.27，1.01）	46.70（29.50，68.30）
重度（n=20）	0.19（0.07，1.02）	0.57（0.35，1.69）	0.85（0.19，1.88）	83.15（48.83，152.30）
Z	–0.100	–0.300	–0.567	–2.350
P	0.920	0.764	0.571	0.019

中国知网　https://www.cnki.net

模型中，miR-451a 和 miR-150-5p 水平显著降低，而 miR-3613-5p 水平显著升高。此外，研究发现 miR-3613-3p 在调节内皮细胞凋亡中发挥不可或缺的作用[15]。

尽管国内外已有许多研究致力于评估 miRNA 作为 EMT 诊断标志物的潜力，并采取多种策略标准化 miRNA 表达数据，但所得结果却并不一致[16]。这种不一致可归因于采血时的月经周期时间、患者的炎症状态、样本储存时间或样本溶血等[17]。另外本研究还使用 ROC 曲线评价 miRNA 对 EMT 的诊断效能，其中 miR-451a 具有较高的敏感度但特异性不足；相反，miR-3613-5p 具有较高的特异性而敏感度不高，miR-125b-5p 的敏感度和特异性均一般，三者联合诊断时虽敏感度不足但特异性极高，有望弥补 CA125 单独诊断 EMT 时特异性不足的缺点。

综上所述，本研究在探索 miRNA 作为 EMT 诊断生物标志物方面取得一定的进展，但同时也暴露一些局限性。首先，研究的样本量相对较小，其次，主要集中于中重度 EMT 患者，这可能限制研究结果在更广泛人群中的适用性。为克服这些局限性，未来的研究应考虑扩大样本量，进行多中心研究，并涵盖不同临床分期的 EMT 患者，为 miRNA 在 EMT 诊断中的应用提供更坚实的科学基础。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] 中国医师协会妇产科医师分会，中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症诊治指南(第三版)[J]. 中华妇产科杂志, 2021, 56(12): 812–824.

[2] CHAPRON C, MARCELLIN L, BORGHESE B, et al. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(11): 666–682.

[3] KIESEL L, SOUROUNI M. Diagnosis of endometriosis in the 21st century[J]. Climacteric, 2019, 22(3): 296–302.

[4] PU M, CHEN J, TAO Z, et al. Regulatory network of miRNA on its target: Coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(3): 441–451.

[5] BRICHANT G, LARAKI I, HENRY L, et al. New therapeutics in endometriosis: A review of hormonal, non-hormonal, and non-coding RNA treatments[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10498.

[6] Anon. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996[J]. Fertil Steril, 1997, 67(5): 817–821.

[7] BENDIFALLAH S, DABI Y, SUISSE S, et al. MicroRNome analysis generates a blood-based signature for endometriosis[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 4051.

[8] MOUSTAFA S, BURN M, MAMILLAPALLI R, et al. Accurate diagnosis of endometriosis using serum microRNAs[J]. Am J Obstet Gynecol, 2020, 223(4): 557.

[9] VANHIE A, O D, PETERSE D, et al. Plasma miRNAs as biomarkers for endometriosis[J]. Hum Reprod, 2019, 34(9): 1650–1660.

[10] GAO S, LIU S, GAO Z M, et al. Reduced microRNA-451 expression in eutopic endometrium contributes to the pathogenesis of endometriosis[J]. World J Clin Cases, 2019, 7(16): 2155–2164.

[11] LI M, ZHOU Y, TAYLOR H S. miR-451a inhibition reduces established endometriosis lesions in mice[J]. Reprod Sci, 2019, 26(11): 1506–1511.

[12] WANG L, ZHANG J, SUN H, et al. Effect of miR-451 on IVF/ICSI-ET outcome in patient with endometriosis and infertility[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(11): 13051–13058.

[13] WALASIK I, KLICKA K, GRZYWA T M, et al. Circulating miR-3613-5p but not miR-125b-5p, miR-199a-3p, and miR-451a are biomarkers of endometriosis[J]. Reprod Biol, 2023, 23(4): 100796.

[14] COSAR E, MAMILLAPALLI R, MORIDI I, et al. Serum microRNA biomarkers regulated by simvastatin in a primate model of endometriosis[J]. Reprod Sci, 2019, 26(10): 1343–1350.

[15] LIU J, XU S, LIU S, et al. miR-3613-3p/MAP3K2/p38/caspase-3 pathway regulates the heat-stress-induced apoptosis of endothelial cells[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(3): 633.

[16] PAPARI E, NORUZINIA M, KASHANI L, et al. Identification of candidate microRNA markers of endometriosis with the use of next-generation sequencing and quantitative real-time polymerase chain reaction[J]. Fertil Steril, 2020, 113(6): 1232–1241.

[17] TAKADA Y, SHIBUTA T, HATANO M, et al. Pre-analytical modification of serum miRNAs: Diagnostic reliability of serum miRNAs in hemolytic diseases[J]. J Clin Med, 2021, 10(21): 5045.

（收稿日期：2024–01–08）
（修回日期：2024–07–08）

中国知网 https://www.cnki.net