

网络出版时间:2016-3-8 8:29:02 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160308.0829.058.html>

血浆 microRNA-182 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

张艳艳¹, 徐爱晖¹, 李永怀¹, 胡华青²

摘要 目的 探讨 microRNA-182 (miR-182) 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者血浆中的表达及临床意义。方法 采用实时荧光定量 PCR 法检测 47 例 NSCLC 患者 (NSCLC 组) 和 39 例体检健康者 (对照组) 血浆中 miR-182 的水平, 同时用电化学发光法检测其血清癌胚抗原 (CEA) 及细胞角蛋白 19 片段 (CYFRA21-1) 含量。分析 miR-182 与 NSCLC 患者临床特征的关系。绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线, 评估 miR-182 的诊断价值。结果 miR-182 在 NSCLC 组血浆的相对表达量为 1.610 (1.435, 1.975), 与对照组的 1.060 (0.730, 1.355) 比较, 显著升高 ($P < 0.01$); miR-182 表达在胸膜转移上差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在肿块大小、病理类型、TNM 分期及淋巴结转移上差异无统计学意义; 血浆 miR-182 为 1.365 时, 灵敏度为 89.4%, 特异度为 79.5%; miR-182 联合 CEA 及 CYFRA21-1 时, 曲线下面积 (AUC) 为 0.995, 灵敏度高达 93.6%, 特异度为 97.4%。结论 NSCLC 患者血浆 miR-182 表达明显上调, 联合 CEA 及 CYFRA21-1 可弥补单一检测的局限性。miR-182 有望作为一种新的生物标志物用于 NSCLC 的辅助诊断。

关键词 非小细胞肺癌; 血浆 microRNA-182; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)04-0583-04

肺癌是全世界癌症相关死亡的主要原因之一, 约 85% 是非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 80% ~ 90% 患者确诊时已属晚期, 5 年生存率仅约 15%^[1]。目前广泛应用于临床的肿瘤标志物癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 敏感度低, 细胞角蛋白 19 片段 (cytokeratin 19-fragment, CYFRA21-1) 特异性差。研究^[2]表明, 胸部影像学检查显示的肺部结节, 约 50% 是良性的。另外, 经皮肺穿刺术及支气管镜术均为有创检查。因此, 需

要建立新的非侵入的、敏感的、实用的早期筛查方法。microRNA (miR) 是一类长约 20 ~ 25 nt 的非编码 RNA, 在转录后水平调节基因表达。近年来研究^[3-4]显示, miR 的异常表达与实体肿瘤的发生发展密切相关。miR-182 是 miR-183 家族的一员, 血浆中也存在 miR-182, 其能耐内源性核糖核酸酶而保持稳定。研究^[5]显示 miR-182 在 NSCLC 组织中表达增高, 但在 NSCLC 血浆中的表达报道少见。该研究用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-182 在 NSCLC 患者血浆中的表达情况, 研究其与各临床特征之间的关系, 探讨血浆 miR-182 水平对 NSCLC 的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2014 年 10 月 ~ 2015 年 7 月于安徽医科大学呼吸内科及胸外科住院的初诊 NSCLC 患者 47 例 (NSCLC 组), 其中男 27 例, 女 20 例; 年龄 41 ~ 80 (63.01 ± 8.09) 岁, 均经病理学或细胞学检查确诊。其中腺癌 25 例, 鳞癌 20 例, 腺鳞癌 2 例; 根据国际抗癌联盟 (UICC, 2009 年第 7 版) TNM 分期 I 期 4 例, II 期 6 例, III 期 12 例, IV 期 25 例。其中胸膜侵及者 17 例, 未侵及胸膜者 30 例。收集 2015 年 4 月 ~ 2015 年 5 月本院体检中心的健康者 39 例 (对照组), 男 21 例, 女 18 例; 年龄 40 ~ 76 (58.25 ± 7.45) 岁。分别抽取全血 4 ml, EDTA-K₂ 抗凝, 2 h 内常温, 2 624 r/min 离心 10 min, 取上层血浆, 4 ℃、11 836 r/min 离心 15 min 后, 置于 -80 ℃ 冰箱保存。

1.2 主要试剂 miRVana PARIS Kit (美国 Ambion 公司); EzOmics™ 一步法实时荧光定量 PCR 检测试剂盒、miR-182 特异性茎环逆转录引物、上下游引物 (百奥迈科生物科技有限公司)。

1.3 血浆 miRNA 的提取 取冰冻血浆 500 μl, 按照 miRVana PARIS Kit 说明书提取总 RNA。RNA 溶解于 20 μl 无 RNA 酶水中。

1.4 实时荧光定量 PCR 按照 EzOmics™ 一步法实时荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书操作。总反应体系为 20 μl, 包括 RNA 模板 50 ng, 2 × Master

2015-12-21 接收

基金项目: 国家公益性行业科研专项 (编号: 201302003)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 呼吸内科, ² 体检中心, 合肥 230022

作者简介: 张艳艳, 女, 硕士研究生;

徐爱晖, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xuaihui0909@163.com

mix 12.5 μ l, miR-182 特异性茎环逆转录引物 (20 μ mol/L) 0.5 μ l, 上下游引物 (20 μ mol/L) 各 0.5 μ l, DEPC-H₂O 补充至 20 μ l。循环参数: 42 $^{\circ}$ C 反转录 60 min; 95 $^{\circ}$ C 热失活变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C、20 s, 62 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 共 40 个循环。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[6] 计算。 ΔCt = 目标基因 Ct - 内参基因 Ct, $\Delta\Delta Ct$ = 待测标本 ΔCt - 对照样本 ΔCt 。

1.5 血清 CEA 及 CYFRA21-1 安徽医科大学第一附属医院核医学科采用电化学发光法检测血清 CEA、CYFRA21-1, 使用仪器为罗氏公司 E601 电化学发光仪, 试剂由欧诺公司提供, 正常参考值为 CEA 0 ~ 5.0 ng/ml, CYFRA21-1 0 ~ 3.3 ng/ml。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。正态分布资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 t 检验; 偏态分布用中位数和四分位数间距 [$M(Q1, Q3)$] 表示, 采用 Mann-Whitney U 检验; 等级资料采用 Spearman 相关系数检验; 绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 评估血浆 miR-182 的诊断效能; Logistic 回归分析 miR-182 联合 CEA 及 CYFRA21-1 的诊断价值, 绘制联合 ROC 曲线。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 法检测 U6 snRNA 和 miR-182 表达 NSCLC 组血浆 U6 snRNA 的 Ct 值为 (14.76 $\pm$ 0.33), 对照组血浆中 U6 snRNA 的 Ct 值为 (14.86 $\pm$ 0.58), 差异无统计学意义 ($t = 0.97$), U6 snRNA 在两组中稳定表达。miR-182 在 NSCLC 患者血浆的相对表达量为 [1.610 (1.435, 1.975)], 与对照组 [1.060 (0.730, 1.355)] 比较, 差异有统计学意义 ($U = 179, P < 0.01$)。见图 1。

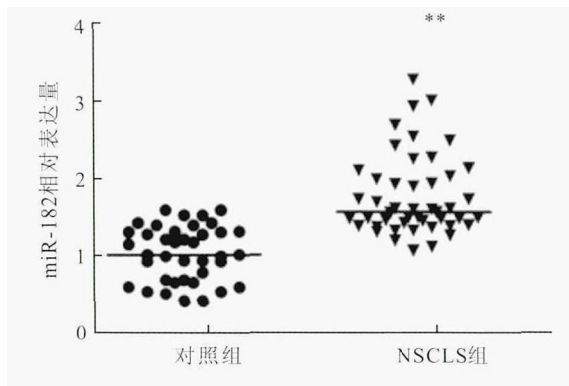


图1 NSCLC组与对照组血浆 miR-182 相对表达量
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 血浆 miR-182 与 NSCLC 患者临床病理特征

之间的关系 I/II 期、III 期及 IV 期 NSCLC 患者血浆 miR-182 水平均显著高于对照组 ($U = 44, 28, 107, P < 0.01$); Spearman 相关分析显示血浆 miR-182 水平与 TNM 分期差异无统计学意义 ($r_s = 0.055, P = 0.713$)。箱内线代表中位数, 两端线分别代表下四分位数和上四分位数, 上下限分别表示最大值和最小值, 见图 2。在侵及胸膜组相对表达量较未侵及胸膜组减低, 差异有统计学意义 ($U = 156.5, P < 0.05$)。见图 3。与其他临床病理参数无关。见表 1。

表1 血浆 miR-182 表达水平与 47 例 NSCLC 患者临床病理特征的关系 [$M(Q1, Q3)$]

临床特征	n	血浆 miR-182	U 值	P 值
年龄 (岁)			248.0	0.696
<65	19	1.608 (1.521, 2.057)		
≥ 65	28	1.609 (1.434, 2.023)		
性别			211.0	0.812
男	29	1.659 (1.480, 2.067)		
女	18	1.600 (1.439, 1.784)		
吸烟			211.0	0.812
是	29	1.659 (1.480, 2.067)		
否	18	1.600 (1.439, 1.784)		
病理分型			198.0	0.235
腺癌	25	1.608 (1.500, 2.322)		
鳞癌	20	1.603 (1.366, 1.696)		
腺鳞癌	2			
肿块大小 (cm)			160.0	0.867
<5	18	1.608 (1.439, 2.181)		
≥ 5	21	1.665 (1.450, 2.115)		
未测量	8			
淋巴结转移			212.5	0.216
有	27	1.635 (1.532, 2.189)		
无	20	1.537 (1.424, 1.963)		
胸水			156.5	0.029
有	17	1.532 (1.410, 1.665)		
无	30	1.724 (1.532, 2.270)		

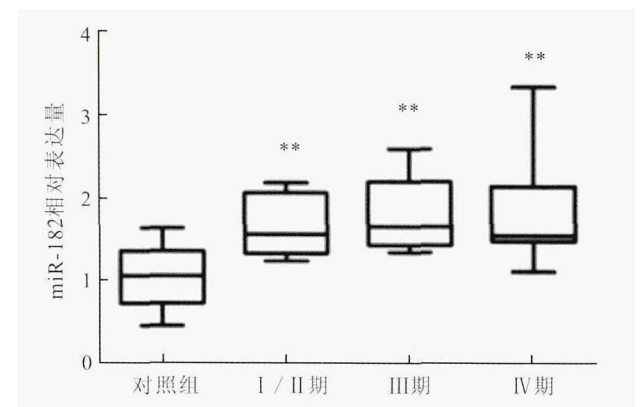


图2 对照组与 TNM 分期各组血浆 miR-182 相对表达量
与对照组比较: ** $P < 0.01$

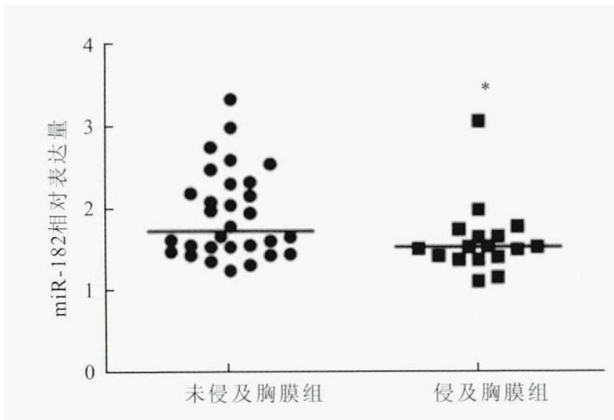


图3 未侵及胸膜组与侵及胸膜组血浆 miR-182 相对表达量
与未侵及胸膜组比较: * $P < 0.05$

2.3 血浆 miR-182 在 NSCLC 中的诊断价值 血浆 miR-182 为 1.365 时,灵敏度为 89.4%,特异度为 79.5%,曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.902 (95% 可信区间: 0.841 ~ 0.964),介于 CEA 和 CYFRA21-1 之间;CEA 为 3.45 ng/ml 时,灵敏度为 55.3%,特异度为 97.4%,AUC 为 0.825 (95% 可信区间: 0.739 ~ 0.911);CYFRA21-1 为 2.815 ng/ml 时,灵敏度为 83%,特异度为 87.2%,AUC 为 0.914。血浆 miR-182 联合 CEA 及 CYFRA21-1 时, AUC 为 0.995,灵敏度高达 93.6%,特异度为 97.4%。见图 4。

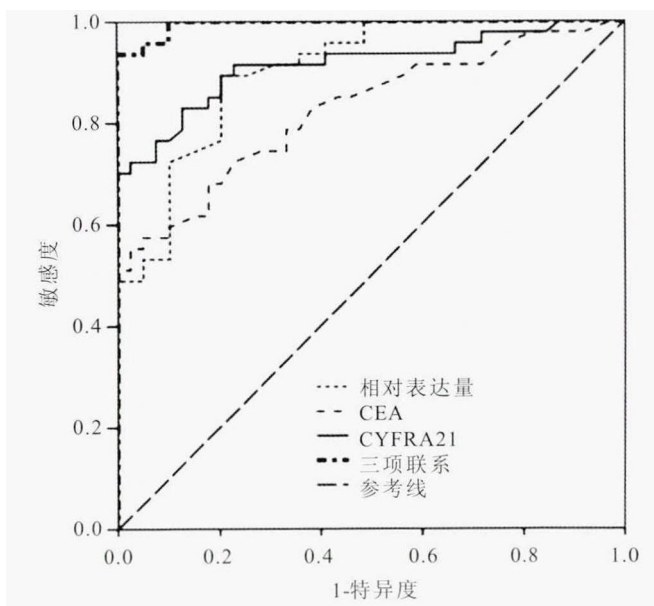


图4 血浆 miR-182、CEA、CYFRA21-1 及 3 者的联合 ROC 曲线

3 讨论

miR 是一类内源性非编码小 RNA,广泛存在于

血液、痰、尿、粪便等临床标本中。健康者血浆 miR 来源于血细胞。肿瘤患者血浆 miR 的来源尚无定论,但一般认为与血细胞无关,可能来源于肿瘤细胞分泌、凋亡及破碎细胞的释放。血循环中的 miR 能稳定存在,尽管血液中有大量的 RNA 酶,具体机制尚不清楚,可能与血液中 miR 的存在形式有关,如外核体^[7]、蛋白质复合体^[8]等。血浆 miR 可反复冻融,且在室温、4℃ 环境可保持稳定。血浆中的 miR 量虽少,但具有良好的稳定性,故可作为临床研究指标。

miR-182 是 miR-183 家族成员之一,共同定位于人类 7q31-34 染色体。该区域也是染色体上的不稳定脆性区域,该区域 DNA 拷贝数的异常扩增,可能是导致肿瘤发生的重要因素^[9]。miR-182 有促癌基因活性,在肺癌、宫颈癌、结肠癌、乳腺癌等组织中高表达,而在胃癌中表达降低。对于肺癌中 miR-182 表达的研究多见于组织学和细胞系,国外对于 NSCLC 患者血浆中 miR-182 报道^[10-11]很少,国内尚无肺癌血浆 miR-182 表达的研究,仅有一篇肺癌血清学 miR-182 的研究^[12]。

本研究采用实时荧光定量 PCR 法,检测 47 例 NSCLC 患者及 39 例健康者血浆中 miR-182 的表达水平。结果显示 NSCLC 组血浆 miR-182 水平明显高于对照组,且 I/II 期、III 期及 IV 期的患者血浆 miR-182 水平均亦明显高于对照组,但 miR-182 的表达与肿瘤 TNM 分期不相关,这与报道^[10-11]一致。Shen et al^[11] 用实时荧光定量 PCR 法同时检测 NSCLC 组织和血浆中 miR-182 的表达,进一步 Spearman 相关分析提示两者有明显的相关性 ($r_s \geq 0.85$, $P < 0.01$)。其他 miR 分子在非小细胞肺癌血清/血浆中也可异常表达,如 miR-126^[13]、miR-10b^[14]等,其表达水平与肿瘤的 TNM 分期、淋巴结转移及疾病预后有一定的相关性。Yang et al^[15] 发现,肺癌早期 Sp1 通过上调 miR-182 的表达,进一步抑制 FOXO3 表达,促进肺癌细胞的生长;肺癌晚期 Sp1 和 miR-182 表达下降,FOXO3 表达上调,利于肺癌的转移。本研究进一步对 NSCLC 患者的临床特征分析显示 NSCLC 患者血浆 miR-182 的表达减低与肿瘤胸膜转移有关,这与研究^[15]相符。

目前临床上常用的非小细胞肺癌标志物有 CEA、CYFRA21-1 等。CEA 敏感性低,但特异性较高,尤其是对腺癌。CYFRA21-1 对鳞癌有一定的诊断价值,但特异性欠佳。本研究结果显示血浆 miR-182 的 ROC 的 AUC 为 0.872,敏感性高于 CEA 及

CYFRA21-1,但特异性不高,3者联合可明显提高对NSCLC的诊断效能,灵敏度达93.6%,特异度为97.4%。因此,血浆miR-182对NSCLC有一定的诊断价值,联合CEA及CYFRA21-1可弥补单一检测的局限性。

参考文献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1):9-29.
- [2] Boeri M, Verri C, Conte D, et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(9):3713-8.
- [3] Wang H, Wu S, Zhao L, et al. Clinical use of microRNAs as potential non-invasive biomarker for detecting non-small cell lung cancer: a meta-analysis[J]. *Respirology*, 2015, 20(1):56-65.
- [4] 朱清, 许波, 刘雨生. microRNA在卵巢和卵巢癌中的表达及功能[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(5):694-7.
- [5] Ning F L, Wang F, Li M L, et al. MicroRNA-182 modulates chemosensitivity of human non-small cell lung cancer to cisplatin by targeting PDCD4[J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9:143.
- [6] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6):1101-8.
- [7] Taylor D D, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(1):13-21.
- [8] Law P T, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(3):437-49.
- [9] Segura M F, Hanniford D, Menendez S, et al. Aberrant miRNA-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(6):1814-9.
- [10] Zheng D, Haddadin S, Wang Y, et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011, 4(6):575-86.
- [11] Shen J, Todd N W, Zhang H, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(4):579-87.
- [12] Zhu W, Liu X, He J, et al. Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study[J]. *BMC Cancer* 2011, 11:393.
- [13] Lin Q, Mao W, Shu Y, et al. A cluster of specified microRNAs in peripheral blood as biomarkers for metastatic non-small-cell lung cancer by stem-loop RT-PCR[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(1):85-93.
- [14] 刘菲, 潘旭峰, 周琳, 等. 肺腺癌患者血浆microRNA-10b表达及临床意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2014, 28(9):846-8.
- [15] Yang W B, Chen P H, Hsu T, et al. Spl-mediated microRNA-182 expression regulates lung cancer progression[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(3):740-53.

Expressions of plasma microRNA-182 in non-small cell lung cancer and its clinical significance

Zhang Yanyan, Xu Aihui, Li Yonghui, et al

(Dept of Respiration, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate microRNA-182 (miR-182) expressions in plasma of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients and its clinical significance. **Methods** Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was employed to detect miR-182 from the plasma of 47 NSCLC patients (NSCLC group) and 39 healthy controls (control group). Serum carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratin 19-fragment (CYFRA21-1) were examined by chemiluminescence. The relationship between miR-182 expressions and clinical pathological features was analyzed and receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to assess the diagnostic value of miR-182. **Results** The level of miR-182 was 1.610 (1.435, 1.975) in NSCLC group, which was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The expression of miR-182 showed a significant difference in pleural metastasis ($P < 0.05$), and there was no significant difference in tumor size, pathological type, TNM staging and lymph node metastasis. When plasma miR-182 was 1.365, the sensitivity was 89.4%, and the specificity was 79.5%. The combination ROC analysis of CEA, CYFRA21-1 and miR-182 revealed increased AUC value to 0.995 with 93.6% sensitivity and 97.4% specificity. **Conclusion** The plasma miR-182 level is up-regulated in NSCLC patients, which combined with CEA and CYFRA21-1 can remedy the limitation of the single detection. miR-182 may be a potential novel biomarker for the diagnosis of NSCLC.

Key words non-small cell lung cancer; plasma microRNA-182; qRT-PCR