

• 综 述 •

微小 RNAs 异常表达与其在非小细胞肺癌诊疗中相关研究进展

辛文瀚 综述, 罗 萍[△] 审校
(成都中医药大学, 四川成都 610075)

关键词: 微小 RNA; 非小细胞肺癌; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)23-3455-03

肺癌严重威胁着人类的生命健康, 2015 年最新发布的全球肿瘤流行病学统计数据(GLOBOCAN 2012)显示, 肺癌已经成为全球癌症病例中发病率和病死率最高的疾病。与此同时, 肺癌也成为我国恶性肿瘤疾病死亡的首要原因, 被确诊的肺癌患者 5 年内生存率不足 17%。肺癌主要分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC), 而后者占有肺癌病例数的 80% 以上, 其病死率高, 常规影像学诊断和组织学诊断检出率低, 且组织化学检测过程繁琐。近年来, 对微小 RNAs(miRNAs)的表达与 NSCLC 相关性的研究逐渐成为热点, 有研究表明, miRNAs 的表达异常对 NSCLC 肿瘤细胞的黏附、浸润和扩散起着重要的调节作用^[1-3]。本文则结合近几年的相关研究对 miRNAs 的异常表达和 NSCLC 的诊疗联系做一简要综述。

1 概要简介

miRNAs 是一群短片段的非编码单链 RNA 分子。成熟的 miRNAs 常形成 RNA 诱导的沉默复合体(miR-RISC), 在细胞浆中和 mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)互补结合或者与开放阅读框(ORF)和 5'非翻译区(5'UTR)结合, 从而抑制细胞翻译或者使转录产物降解^[4-5]。近年来研究认为, miRNAs 在肺癌的发生、进展中有着癌基因和抑癌基因的双重基因功能, 例如 NSCLC 肿瘤组织细胞中 miRNA-155 的高表达患者在治疗后病情难以缓解^[6], 而 miRNA-34 家族的低表达则出现在多种肿瘤细胞中, 这一类具有抑癌基因功能的 miRNAs 的低表达或者缺失常常导致机体肿瘤的发生^[7]。由于 miRNAs 广泛分布于人体, 在人体的血清、血浆、尿液、唾液等体液中均有其表达^[8-9], 所以标本容易采集, 且其在生物学上有调控细胞转录翻译的作用基础, 使得利用 miRNAs 早期无创诊断 NSCLC, 并预测癌症发生、发展和最终转归成为可能。

2 miRNAs 在 NSCLC 中表达上调

早在 2008 年, Chen 等^[10]采用 solex 测序对比健康人体血清和 NSCLC 患者血清发现, NSCLC 患者血清内有 63 种 miRNA 不同程度的表达调高, 28 种 miRNA 表达则显著下调。相关研究还证实, 高表达的数十种 miRNAs 中绝大部分通过抑制某些抑癌基因的表达从而起到致癌的效果。Galardi 等^[11]和 Garofalo 等^[12]的研究则指出, miRNA-221 和 miRNA-222 通过作用于抑癌基因 p27 的 3'-UTR 端, 降低 p27 在正常肺泡细胞内的表达水平, 从而增加其对肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体(TRAIL)的抵抗性达到致癌效果。2014 年挪威 Tromsø 大学的研究人员针对 miRNA-21, 采用原位杂交(ISH)分别检测 miRNA-21 在 NSCLC 患者肿瘤和肿瘤间质细胞的表达, 并利用免疫组化(IHC)的方法对 335 例诊断为 III A 期 NSCLC 患者的蛋白激酶 B(Akt)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、缺氧诱导

因子 1(HIF1 α)和血管内皮生长因子 A(VEGF-A)进行检测, 以探究在肿瘤形成过程中 miRNA-21 对 NSCLC 的肿瘤和肿瘤间质细胞生长及 miRNA-21 和血管生成蛋白标记物之间的关联。结果发现, 在单一变量分析中肿瘤细胞中 miRNA-21 的高表达对于伴有淋巴结转移的患者是一个积极的预后因素($P=0.024$), 而在肿瘤基质细胞中的高表达则是一个预后不良的因素($P=0.022$)。在多变量分析中, 淋巴结转移阳性的患者中 miRNA-21 的低表达是一个独立的不良预后因子(HR 为 2.03, 95%CI 为 1.09~3.78, P 值为 0.027)^[13], 该研究表明, 在伴有淋巴结转移的 NSCLC 患者中 miRNA-21 的高表达是一个良好的预后因子, 而对于其在基质中的高表达则可能提示预后不良。有研究纳入 I 期 NSCLC 患者 30 例、II~IV 期 NSCLC 患者 30 例和健康但有吸烟史者 30 例, 利用实时荧光聚合酶链式反应(PCR)对 3 组 miRNA-17、miRNA-21、miRNA-192 的表达进行定量检测, 比较健康人群和早期 NSCLC, 以及早期和晚期 NSCLC 组其 3 种 miRNA 的表达水平是否存在差异。结果表明, miRNA-17、miRNA-21 和 miRNA-192 在早期 NSCLC 中检测的 Ct 值明显低于健康人群组($P=0.001$), 但对于 NSCLC 早期和晚期鉴别诊断, 3 项指标的改变差异无统计学意义^[14]。Healy 等^[15]的研究同样验证了上述结果, 与此同时他们还发现, 联合 miRNA-125 和 miRNA574-5p 诊断这类肺癌可以使其诊断灵敏度达到 77%, 特异度达到 82%。另有研究表明, NSCLC 患者中 miRNA-21 的高度表达可以竞争性的结合抑癌基因 PTEN 的 3'-UTR 端从而下调其表达, 促进肿瘤细胞的增殖, 该研究指出, 对于人体内表达失控的 miRNAs, 其在 NSCLC 的发生和发展过程中实际充当着癌基因的作用。

上述研究不难发现, miRNA-21 在早期诊断 NSCLC 上有着明显的优势, 合理的筛选和结合其他相关 miRNAs 进行检测将进一步有助于提高检验效能, 为 miRNAs 这一类潜在的肿瘤分子标志物尽早应用于临床诊断提供科学的实验数据支持。

3 miRNAs 在 NSCLC 中表达下调

另一类 miRNAs 常在 NSCLC 患者血清中表达下调, 目前文献报道的主要有 cluster let-7、miRNA-126、miRNA-30a、miRNA-143、miRNA-145、miRNA-188、miRNA-333、miRNA-34s 等。于筱舟等^[16]的研究利用荧光定量 PCR 对 44 例肿瘤组织和正常肺部组织成对标本进行筛选, 结果发现 has-miRNA-125b 等 13 种 miRNA 的表达明显降低, 并且 has-miRNA-125b 的表达水平还和肿瘤的分期及淋巴结转移有着明显的一致性。这一研究结果提示, 该 miRNA 可能作为疾病发展预后判定的一个潜在生物学标志物, 有待于进一步深入研究。2014 年有研究利用实时荧光 PCR 对 miRNA-126 表达进行研究发

现,miRNA-126 在 NSCLC 患者血清中表达下调程度和健康人群组存在明显差异($P < 0.001$),更为重要的是在对患者病情转归和预后判断的研究中发现 miRNA-126 在肿瘤组织大于 3 cm 的患者中明显低表达($P = 0.026$),而在肿瘤组织小于 3 cm 的患者中呈中度表达,两者结果对比有明显差异。此外,在肿瘤扩散和淋巴转移方面 miRNA-126 低表达也与其明显相关($P = 0.012$)。研究指出,miRNA-126 低表达的 NSCLC 患者预后差,生存期短^[17]。试验还结合了表达上调的 miRNA-200c,发现两者联合诊断在 miRNA-200c 高表达且 miRNA-126 低表达组患者 5 年内生存率明显下降。Incoronato 等^[18]通过研究发现,miRNA-212 的中低度表达对于 NSCLC 患者是一种危险因子,而其高表达则可以通过作用于 PED 的 3'-UTR 区使其表达下调,达到促使细胞凋亡的效果。

从以上研究可以看出,早期联合多个 miRNA 利用其各自的特点可以大大提高疾病的诊断效能。此外,这也进一步提示研究者,人工增强某些 miRNA 的表达水平达到对癌细胞的抑制,或许能使基因水平上靶向治疗 NSCLC 成为可能,这在近期相关研究中也得到印证。

4 诊断治疗和预后评估

基于 miRNAs 在肿瘤发生、转移、扩散和复发过程中起到的致癌或抑癌作用,通过对 miRNAs 表达的调控成为了治疗肿瘤的一种新方法。最近,以 miRNAs 靶向治疗肿瘤的报道给不少患者带来了新的希望。人们发现,利用先进的基因转染技术对一些表达缺失和下调的基因进行基因改良,重新激活并使其表达,可以使肿瘤的生长、增殖和扩散等诸多环节得到有效的抑制。Xu 等^[19]利用 miRNA-133a 对基质金属蛋白酶-14 (MMP-14)的表达抑制,将其导入 NSCLC 肿瘤细胞中发现,肺癌细胞在其移动迁徙和增殖过程中均受到明显抑制。另有研究表明,利用在肺正常细胞内高表达的 miRNA-145,结合单纯疱疹病毒-1 (HSV-1),通过靶序列扩增构建溶瘤病毒 AP27i145,将后者成功导入 NSCLC 细胞中后 AP27i145 可以大量增殖,对癌细胞有强大的杀伤作用^[20]。在联合分型诊断方面,研究者发现不同类型的 miRNA 在不同类型的肺癌中表达差异明显。早在 2006 年有研究者通过对正常肺组织细胞和 NSCLC 患者组织的细胞比较发现,3 种 miRNAs 的表达存在明显差异。研究进一步揭示,肺鳞状细胞癌患者和肺腺癌患者在 miRNA-99b、miRNA-102、miRNA-(202-205)的细胞内表达存在明显差异^[21]。这一研究成果的展示使得利用 miRNAs 在不同类型肺癌病变中表达的不同来鉴别诊断肺癌的类型成为可能,同时也为肺癌的分型诊断和个性化治疗提供了有力依据。而对于试验诊断效能的提升,大多数研究者选择综合 3~4 种 miRNA 进行联合检测,以提高检测的精密度和特异度。如 Xing 等^[22]利用患者痰液中的 miRNA-205、miRNA-210、miRNA-708 诊断肺鳞状细胞癌,其灵敏度和特异度分别达到 73%和 96%。Shen 等^[23]研究发现,综合 miRNA-21、miRNA-126、miRNA-210 和 miRNA-486-5p 这 4 种 miRNAs 对健康人群组和 NSCLC 患者进行鉴别诊断,其灵敏度和特异度可以分别达到 86.22%和 96.55%。且试验还可以进一步区分 NSCLC 患者的 I~IV 期分期。Hennessey 等^[24]研究发现,将 miRNA-15b 和 miRNA-27b 联合诊断 NSCLC,其灵敏度和特异度、阳性预测值、阴性预测值均可以达到 80%以上。上述报道可以发现,对于早期临床诊断 NSCLC 患者,联合使用 miRNAs 不失为一种提高诊断效能的好方法,如果技术成熟对于这类诊断开发混合试剂盒将大大提高临床对于此类疾病的早

期预测能力。由于目前肺癌患者 5 年生存率依旧较低,对治疗后的预后判断成为另一大研究热点。Hu 等^[25]通过对 30 例生存期较长的 NSCLC 患者(平均生存期 49.54 个月)和 30 例生存期较短的 NSCLC 患者(平均生存期 9.54 个月)血清 miRNA 表达水平进行检测发现,miRNA-486、miRNA-30d、miRnA-1、miRNA-499 与肺癌患者的预后关系密切,两组患者中 4 项指标差异达到 5 倍,且 4 种 miRNA 是独立的预后判定因素,可以作为潜在的无创伤性的分子标记物。Chen 等^[26]对血清中 miRNA-17-5p 与 NSCLC 临床病例及其预后的关系进行分析发现,与健康人相比 miRNA-17-5p 水平异常升高。生存期分析表明,相对于血清 miRNA-17-5p 低水平表达患者,血清 miRNA-17-5p 高水平表达患者生存期较短。

5 小 结

随着分子生物学技术的发展,借助先进的实验室技术对 miRNAs 与 NSCLC 之间联系进行研究逐渐成为热点,许多研究结果均表明 NSCLC 患者血清中 miRNAs 的相关表达和健康人存在明显差异,且利用 miRNAs 对 NSCLC 进行早期诊断和预后治疗判断有较高的灵敏度和特异度,这使得有理由相信 miRNAs 可以成为潜在的 NSCLC 诊断和预后判断的重要血清肿瘤学标志物。然而,许多关于 miRNAs 的理论研究仅仅处于实验室阶段,一些 miRNAs 可能在不同的癌症中普遍表达升高或者降低,正如上述所提及的,miRNA 在人体的分布并无特异性,而现在已经发现的 miRNA 成百上千,要在众多的 miRNA 中选择合适的配比应用于临床诊疗,使患者享受到费用低廉且结果精准的诊疗技术,还需要后期大量的研究。

参考文献

- [1] Kim MS, Park TI, Lee YM, et al. Expression of Id-1 and VEGF in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(10): 2102-2111.
- [2] Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(12): 849-864.
- [3] Saito M, Schetter AJ, Mollerup S, et al. The association of microRNA expression with prognosis and progression in early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1875-1882.
- [4] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(3): 143-159.
- [5] Lee D, Shin C. MicroRNA-target interactions: new insights from genome-wide approaches[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1271(71): 118-128.
- [6] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(6): 659-666.
- [7] Wang QZ, Xu W, Habib N, et al. Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(4): 572-594.
- [8] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [9] Javeri A, Ghaffarpour M, Taha MF, et al. Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 413.

- [10] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997-1006.
- [11] Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27kip1[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(32): 23716-23724.
- [12] Garofalo M, Quintavalle C, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(27): 3845-3855.
- [13] Stenvold H, Donnem T, Andersen S, et al. High tumor cell expression of microRNA-21 in node positive non-small cell lung cancer predicts a favorable clinical outcome[J]. *BMC Clin Pathol*, 2014, 14(1): 9.
- [14] Qi Z, Yang DY, Cao J. Increased micro-RNA 17, 21, and 192 gene expressions improve early diagnosis in non-small cell lung cancer[J]. *Medical Oncology*, 2014, 31(9): 195.
- [15] Healy N, Heneghan H, Muller N, et al. Systemic microRNA as potential biomarkers in cancer. *Int J Cancer*, 2013, 13(1): 2265-2271.
- [16] 于筱舟, 魏枫, 闫帆, 等. 非小细胞肺癌组织中低表达 microRNA 表达谱[J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(5): 291-295.
- [17] Kim MK, Jung SB, Kim JS, et al. Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Virchows Arch*, 2014, 465(4): 463-471.
- [18] Incoronato M, Garofalo M, Urso L, et al. miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9): 3638-3646.
- [19] Xu M, Wang YZ. miR-133a suppresses cell proliferation, migration and invasion in human lung cancer by targeting MMP-14[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(3): 1398-1404.
- [20] Li JM, Kao KC, Li LF, et al. MicroRNA-145 regulates oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of human non-small cell lung cancer cells[J]. *Virology*, 2013, 10(7): 241.
- [21] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(3): 189-198.
- [22] Xing L, Todd NW, Yu L, et al. Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(8): 1157-1164.
- [23] Shen J, Todd NW, Zhang H, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(4): 579-587.
- [24] Hennessey PT, Sanford T, Choudhary A, et al. Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32307.
- [25] Hu Z, Chen X, Zhao Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(10): 1721-1726.
- [26] Chen Q, Si Q, Xiao S, et al. Prognostic significance of serum miR-17-5p in lung cancer[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 353.

(收稿日期: 2015-08-21)

• 综 述 •

肺癌肿瘤标志物的研究现状

王鑫蕊 综述, 刘旭 审校

(天津中医药大学第一附属医院检验科, 天津 300193)

关键词: 癌胚抗原; 神经元特异性烯醇化酶; 细胞角蛋白 19 片段; 循环肿瘤标志物; 微小 RNA

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 23. 040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)23-3457-03

近年来, 肺癌成为威胁人类健康的主要恶性肿瘤之一, 且发病率逐年增高。临床上传统的肺癌诊断方法有胸部 X 线片、支气管镜检查、痰液细胞涂片等, 但因其特异度和灵敏度有限, 大多数患者发现时已是晚期。肿瘤标志物相比于其他传统诊断方法具有更高的特异度和灵敏度。本文对常见的几个肿瘤标志物及近来新兴的标志物进行综述。

1 常见肺癌肿瘤标志物

肿瘤标志物是由肿瘤细胞分泌产生的, 常见种类有酶、抗原、微量细胞及核糖核酸等, 它们常常存在于血液当中, 随着肿瘤细胞的转移扩散也会在患者组织液及分泌物中测出。健康人体内有极微量的肿瘤标志物, 但在肿瘤患者体内水平较高^[1]。它具有灵敏度高, 特异性强, 标本易取且微创等特点。肿瘤标志物的检测在肿瘤倾向患者的防治、恶性肿瘤的诊断及病程分析、药物治疗后患者的生存期观察中得到了广泛应用。现临床上常应用高特异性的肺癌肿瘤标志物协同其他检测手段进行肺癌诊断。

1.1 癌胚抗原(CEA) CEA 是胚胎抗原类肿瘤标记物, 于 1965 年在大肠癌提取物中发现。CEA 是一种糖蛋白, 其中含有 45%~55% 的糖类, 相对分子质量为 $(150 \sim 300) \times 10^3$, 由 641 个氨基酸组成。组织学检测发现, 正常的结肠柱状细胞和杯状细胞可分泌 CEA^[2]。CEA 对肺癌的特异度最高, 40%~50% 的肺癌患者 CEA 水平明显升高^[3]。

Tomita 等^[4]通过对 CEA 水平的检测发现, 接受切除手术的肺腺癌贴壁状生长型患者比其他型(原位生长、微浸润生长)有较好的生存期。试验采集了 2007~2012 年 181 例接受手术的患者(死于术后其他疾病或失访除外)信息, 结果 5 年间患者 CEA 水平升高了 65.41%, 与正常 CEA 水平的患者相比差异有统计学意义($P=0.0045$), 又对腺癌 3 种类型的患者进行 CEA 水平对比, 发现贴壁状生长型患者明显比其他两种类型有较好的生存期。Arrieta 等^[5]提出了 CEA 对非小细胞肺癌(NSCLC)进行期患者化疗疗效的研究, 检测 180 例符合条件的患者化疗前后血清 CEA 水平, 发现 CEA 水平下降是肿瘤