

• 论 著 •

血清 miR-6801 在非小细胞肺癌辅助诊断中的临床意义

时广利,班武娟,陈 燕,尹颜军,白万秋,丁湘彧[△]

(首都医科大学附属北京胸科医院,北京 101149)

摘要:目的 探讨血清 miR-6801 在非小细胞肺癌(NSCLC)患者中的表达水平及其在 NSCLC 辅助诊断中的临床意义。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 40 例健康人和 78 例 NSCLC 患者血清中 miR-6801 的表达量,并构建受试者操作特征(ROC)曲线计算血清 miR-6801 的灵敏度和特异度。**结果** NSCLC 患者血清中 miR-6801 的表达水平显著低于健康者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。血清 miR-6801 在Ⅲ期+Ⅳ期中的表达水平显著低于Ⅰ期+Ⅱ期($P < 0.05$)。血清 miR-6801 对 NSCLC 检测的灵敏度为 51.9%;miR-6801 对Ⅰ期、Ⅱ期 NSCLC 检测的灵敏度为 40.6%。**结论** NSCLC 患者 miR-6801 的检测对于 NSCLC 的辅助诊断和早期诊断有一定的临床应用价值。**关键词:**非小细胞肺癌; 微小 RNA; 辅助诊断; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)24-3416-03

Clinical significance of serum miR-6801 in auxiliary diagnosis of non-small cell lung cancerSHI Guangli, BAN Wujuan, CHEN Yan, YIN Yanjun, BAI Wanqiu, DING Xiangyu[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level of serum miR-6801 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its clinical significance in the auxiliary diagnosis of NSCLC. **Methods** The real-time quantitative PCR method was adopted to examine the expression amount of serum miR-6801 in 78 NSCLC patients and 40 healthy controls. The sensitivity and specificity of miR-6801 in the diagnosis of NSCLC were evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** The expression level of miR-6801 in the patients with NSCLC was significantly lower than that in healthy controls with statistical difference ($P < 0.05$); the expression level of miR-6801 at stages Ⅲ and Ⅳ was significantly lower than that at stages Ⅰ and Ⅱ ($P < 0.05$); the sensitivity of miR-6801 in detecting NSCLC was 51.9%, and the sensitivities of miR-6801 in the stage I and II of NSCLC was 40.6%. **Conclusion** The serum miR-6801 detection has a certain clinical application value for auxiliary diagnosing and early diagnosing of NSCLC.**Key words:**non-small cell lung cancer; miRNA; auxiliary diagnosis; polymerase chain reaction

肺癌是严重威胁人类健康与生命的恶性肿瘤之一,其病死率居各种恶性肿瘤之首。75%~80%的肺癌患者为非小细胞肺癌(NSCLC),其 5 年存活率仅为 15%~20%,而Ⅰa 期发现并治疗的患者,5 年生存率可达 80%^[1]。缺乏有效的 NSCLC 早期诊断手段是 NSCLC 患者高病死率的主要原因^[2]。微小 RNA(miRNA)是一类内源性高度保守的长度为 18~25 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,miRNA 在肿瘤的发生、发展中有致癌和抑癌的不同作用^[3]。miRNA 在血清中非常稳定,有可能作为诊断肺癌的新血清标志物^[4]。因此,本研究对 NSCLC 患者与健康者血清中 miR-6801 的表达水平进行了检测,探讨血清 miR-6801 表达水平在 NSCLC 辅助诊断中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 8 月至 2015 年 10 月首都医科大学附属北京胸科医院收治的初治 NSCLC 患者 78 例(NSCLC 组),其中男 45 例、女 33 例,年龄 41~73 岁(平均 50.1 岁),其中肺腺癌 38 例、肺鳞癌 40 例。所有 NSCLC 患者全部经细胞学或组织学确诊,既往未进行放疗或化疗,肺癌分期参照 2002 年美国癌症联合协会(AJCC)标准。健康对照组为北京胸科医院体检健康职工 40 例,其中男 19 例、女 21 例,年龄 25~55 岁(平均 39.4 岁),无高血压、高血脂、糖尿病等基础性疾病。

1.2 标本采集 用真空采血管收集 NSCLC 患者和健康人空

腹外周静脉血 4 mL。所有标本经 4 000 r/min 离心后分离出血清,收集后的血清标本放至-80 ℃超低温冰箱中冷冻,集中进行 miRNA 的提取。此研究经本院伦理委员会审核通过。

1.3 方法

1.3.1 血清标本 miRNA 的提取 按照北京天根生化科技有限公司生产的 miRNA 提取试剂盒的操作说明书提取所有血清标本中的 miRNA,使用 Quawell Q3000 微量核酸检测仪对提取的 miRNA 进行检测。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR) qRT-PCR 实验以合成的 cDNA 为模板,同时以 miR-103 作为内参照。qRT-PCR 反应为 20 μL 体系,PCR 反应循环条件:94 ℃预热 2 min,94 ℃ 20 s,60 ℃ 34 s,共进行 45 个循环。qRT-PCR 实验数据经过 Lightcycler 480 II 软件进行分析,每个 cDNA 标本的表达量检测均重复 3 次,血清 miRNA 的相对表达量用 $2^{-\Delta Ct}$ 表示。

1.3.3 血清标本癌胚抗原(CEA)的检测 所有血清标本 CEA 的浓度测定采用流式荧光免疫法,CEA 检测试剂盒由上海透景生物科技有限公司生产,应用美国 LUMINEX200 流式荧光点阵分析仪进行测定。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以中位数(四分位间距)表示。多组间血清 miRNA 相对表达量比较采用 Kruskal Wallis H 检验,两组之间比较采用

Mann-Whitney U 检验;通过受试者操作特征曲线(ROC)分析 miRNA 表达水平对 NSCLC 诊断价值,并计算 95% 置信区间;组间率的比较采用 χ^2 检验。所有统计学检验均为双侧概率检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清 miR-6801 相对表达量的检测结果 NSCLC 组患者血清中 miR-6801 的表达水平显著低于健康对照组,差异有统计学意义($Z = 2.128, P < 0.05$);NSCLC 组患者血清中 miR-6801 的表达水平与患者性别及吸烟状态不相关,差异无统计学意义($P > 0.05$)。NSCLC 组经 TNM 分期后,血清 miR-6801 在Ⅲ期+Ⅳ期中的表达水平显著低于Ⅰ期+Ⅱ期($Z = 2.081, P < 0.05$);NSCLC 组经病理分期后,血清 miR-6801 在腺癌中的表达水平与鳞癌比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组研究对象血清中 miR-6801 的相对表达量

组别	n	miR-6801	Z	P
健康对照组	40	1.69(0.45~5.26)		
NSCLC 组	78	1.15(0.38~4.21)	2.218	0.029*
Ⅰ期+Ⅱ期	32	1.38(0.49~5.16)		
Ⅲ期+Ⅳ期	46	1.07(0.31~4.12)	2.081	0.041#
腺癌	38	1.19(0.40~4.28)		
鳞癌	40	1.11(0.35~4.15)		
吸烟	35	1.21(0.42~4.29)		
不吸烟	43	1.10(0.34~4.11)		
男	45	1.18(0.40~4.23)		
女	33	1.10(0.35~4.13)		

注:与健康对照组比较,* $P = 0.029$;与Ⅰ期+Ⅱ期比较,# $P = 0.041$ 。

2.2 血清 miR-6801 对 NSCLC 检测的灵敏度 血清 miR-6801 在Ⅲ期+Ⅳ期 NSCLC 中检测的灵敏度(57.8%)显著高于Ⅰ期+Ⅱ期(40.6%)($\chi^2 = 5.565, P < 0.05$);血清 miR-6801 对早期 NSCLC(Ⅰ期+Ⅱ期)检测的灵敏度(40.6%)显著高于 CEA(21.9%),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.875, P < 0.05$);血清 miR-6801 在肺腺癌中检测的灵敏度与肺鳞癌比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 血清 miR-6801 对 NSCLC 检测的灵敏度(%)

组别	n	miR-6801	CEA
NSCLC 合计	78	51.9	43.5
Ⅰ期+Ⅱ期	32	40.6*	21.9
Ⅲ期+Ⅳ期	46	57.8#	56.5
腺癌	38	50.6	49.2
鳞癌	40	53.2	35.4

注:与 CEA 比较,* $P = 0.024$;与Ⅰ期+Ⅱ期比较,# $P = 0.038$ 。

2.3 血清 miR-6801 在 NSCLC 中的诊断价值分析 应用 ROC 曲线分析血清 miR-6801 在 NSCLC 中的诊断价值,血清 miR-6801 诊断 NSCLC 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.732,95% 置信区间(CI)=0.628~0.831;血清 miR-6801 对 NSCLC 的诊断价值高于血清 CEA(AUC=0.596,95% CI=0.484~

0.709)。

3 讨 论

目前,CT、X 线片等影像学检查及支气管镜和痰脱落细胞检查是最常用的肺癌检测手段。但是,胸片和痰脱落细胞检查在肺癌诊断中的灵敏度比较低。支气管镜检查为侵入性方式检查。而 CT 检查由对肺癌诊断的灵敏度过高而容易引起假阳性。尽管有人建议低剂量螺旋 CT 可作为肺癌筛查的常规手段,但仍处于研究阶段^[5]。肿瘤标志物对肺癌的辅助诊断、早期诊断、预后判断和疗效监测具有重要的应用价值。但是,目前应用的肿瘤标志物在肺癌诊断中的灵敏度较低,尤其是在早期肺癌(Ⅰ期+Ⅱ期)中的灵敏度更低,对于肺癌的诊断具有很大的局限性^[6]。因此,寻找新型、并且特异度和灵敏度都比较好的血液肿瘤标志物是当今临床迫切需要的。

miRNA 在细胞的增殖、凋亡、肿瘤的发生、发展等多种生理和病理过程中发挥重要作用,miRNA 有可能成为新的肺癌早期诊断和癌症进程相关的标记物^[7]。目前,血清中 miRNA 作为恶性肿瘤分子标志的研究是近几年来的研究热点。血清 miRNA 的来源,认为主要来自于坏死或凋亡的细胞,或者来自于肿瘤细胞释放的内源性 miRNA 入血^[4]。miRNA 在血清中能够非常稳定地存在,能够抵抗 RNA 内切酶的降解^[8]。Shen 等^[9]研究显示,联合检测血浆 miR-21、miR-126、miR-210 和 miR-486-5p 这 4 种 miRNA 对 NSCLC 检测的灵敏度和特异度高达 86.2% 和 96.5%;对Ⅰ期 NSCLC 检测的灵敏度和特异度为 73.3% 和 96.5%。Zheng 等^[10]研究发现,血浆 miR-155、miR-197 及 miR-182 在Ⅰ期肺癌患者中的表达水平显著上升,这 3 种 miRNA 对肺癌检测的灵敏度和特异度为 81.3% 和 86.7%。Roth 等^[11]研究发现,miR-10b、miR-34a、miR-141 在肺癌患者血清的表达水平明显高于良性疾病组和对照组,并与淋巴结是否转移相关联。Zhu 等^[12]研究结果显示,肺癌患者血清中 miR-183 家族(包括 miR-96、miR-182 和 miR-183)的表达水平显著高于健康对照组,并且与肺癌患者的生存期密切相关。目前的这些研究提示,血清中 miRNA 表达水平与肺癌的发生、发展和病理过程密切相关,并且 miRNA 有可能参与肺癌的早期形成阶段。

本研究的实验结果首次发现,NSCLC 患者血清中 miR-6801 的表达水平显著低于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);血清 miR-6801 在Ⅲ期+Ⅳ期中的表达水平显著低于Ⅰ期+Ⅱ期,差异有统计学意义($P < 0.05$);血清 miR-6801 在Ⅲ期+Ⅳ期 NSCLC 中检测的灵敏度(57.8%)显著高于Ⅰ期+Ⅱ期(40.6%)($P < 0.05$);血清 miR-6801 对早期 NSCLC(Ⅰ期+Ⅱ期)检测的灵敏度(40.6%)显著高于 CEA(21.9%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上研究结果表明,血清 miR-6801 作为筛查 NSCLC 的肿瘤标志物具有潜在的临床应用价值,并且有可能成为 NSCLC 早期诊断的参考指标。

参 考 文 献

- [1] 陈蕾,邹桂华,柳玉红,等. EGFR、VEGF 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(11): 2110-2111.
- [2] 张晓丰. 肺癌标志物临床研究点评[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(7): 997-999.

(下转第 3420 页)