

· 论 著 ·

miRNA-193a 在肺腺癌患者体内的表达水平及意义

霍红日, 杨智勇, 朱玲莉

(南京市职业病防治院检验科, 南京 210042)

摘要: 目的 研究 miRNA-193a 在肺腺癌患者体内的表达水平, 并将其用于肺癌诊断的效能与癌胚抗原(CEA)进行比较, 探讨其价值。方法 将 40 例确诊的肺腺癌患者作为肺癌组, 同时将 40 例健康体检者作为对照组。肺腺癌患者中手术 12 例, 术后收集切除的肺段, 取正常组织、癌旁组织及癌组织, 通过实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)检测组织中 miRNA-193a 的表达水平; 检测 40 例肺癌患者及健康者血清中 miRNA-193a 和 CEA 的水平, 使用 Spearman 相关性分析软件分析两者的关系; 应用 ROC 曲线及 AUC(95%CI)评估 miRNA-193a、CEA 作为诊断指标的效能并将两者进行比较。结果 肺腺癌患者癌组织 miRNA-193a 表达量较正常组织明显下降($P < 0.05$); 肺癌组血清 miRNA-193a 水平较对照组明显下降($P < 0.05$); 而且与 CEA 之间无相关性($r = 0.079, P = 0.618$), 其血清 miRNA-193a 的 AUC 为 0.829, 95%CI 为 0.741~0.917。结论 肺腺癌患者癌组织及血清中 miRNA-193a 含量均低于正常对照。血清 miRNA-193a 可能是诊断肺腺癌的一个重要指标。

关键词: 肺腺癌; miRNA; 癌胚抗原; PCR**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.017**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2017)13-1773-03

Expression of miRNA-193a and its significance in pulmonary adenocarcinoma

HUO Hongri, YANG Zhiyong, ZHU Lingli

(Department of Clinical Laboratory, Nanjing Occupational Disease Prevention and Treatment Hospital, Nanjing, Jiangsu 210042, China)

Abstract: Objective To explore the diagnostic value of the quantitative detection of serum miRNA-193a in pulmonary adenocarcinoma. **Methods** 40 pulmonary adenocarcinoma patients and 40 healthy people were recruited to receive quantitative detection of serum miRNA-193a and CEA. And then the relationship between the concentration of miRNA-193a and CEA was analyzed by Spearman correlation analysis. 12 of the 40 patients underwent operation and the different levels of miRNA-193a expression among pulmonary adenocarcinoma tissues, adjacent tissues and normal tissues was detected by qRT-PCR. The different miRNA-193a levels were compared among groups by t-test. The diagnostic performance of miRNA-193a was evaluated with receiver operating characteristic curves(ROC) and the area under the curve (AUC) and its 95%CI were calculated. **Results** The relative expressions of miRNA-193a in pulmonary adenocarcinoma tissues, adjacent tissues and normal tissues were 1.07 ± 0.16 ; 0.80 ± 0.10 ; 0.11 ± 0.07 . miRNA-193a expression in pulmonary adenocarcinoma tissues was significantly lower than that in other two groups($P < 0.05$). The expression of serum miRNA-193a in pulmonary adenocarcinoma group was significantly lower than that in healthy group($P < 0.05$). There was no correlation between miRNA-193a and CEA($r = 0.079, P = 0.618$). The detection of miRNA-193a yielded a ROC AUC of 0.829(0.741~0.917) in discriminating pulmonary adenocarcinoma from healthy group. **Conclusion** The relative expression of miRNA-193a in pulmonary adenocarcinoma was significantly lower than that in healthy controls no matter in tissue or serum, serum miRNA-193a may prove to be a non-invasive biomarker for the auxiliary diagnosis of pulmonary adenocarcinoma.

Key words: pulmonary adenocarcinoma; miRNA; CEA; PCR

随着工业的不断发展和环境的日益恶化, 肺癌已成为了严重危害人类健康的肿瘤之一。大部分肺癌患者起病隐匿, 无特异性症状, 常因出现转移病灶症状而就诊。在中国, 肺癌是最常见的癌症^[1]。目前虽然常用的肿瘤标志物如癌胚抗原(CEA)对肺癌的诊断有一定的价值, 但是灵敏度及特异度不够高。肺癌早期诊断困难, 患者预后差, 后期生存期短, 尤其是肺腺癌, 发病率较其他类型肺癌发病率低, 发病年龄较小, 且肿块生长缓慢, 更易漏诊。近年来, 除了不断完善肿瘤患者的治疗外, 寻找能有效指导临床早期诊断的血清肿瘤标志物也成为了肺腺癌研究的热点。miRNA 是一类内源性小分子非编码蛋白的 RNA 分子, 其广泛存在于动植物中, 在基因的表达以及调控等过程中起着重要的作用^[2]。大部分 miRNA 长度在 21~24 个核苷酸, 稳定性强, 与 mRNA 相比, 其水平的检测能够更

加准确地对疾病进行诊断^[3]。本研究比较了肺腺癌患者正常组织、癌旁组织以及癌组织中 miRNA-193a 的表达情况, 血清中 miRNA-193a 的表达差异及, 分析了 miRNA-193a 与 CEA 水平间的相关性, 旨在探讨 miRNA-193a 在肺腺癌诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2015 年 3 月至 2016 年 3 月本院确诊为肺腺癌的患者 40 例纳入研究作为肺腺癌组, 男 18 例、女 22 例, 年龄 35~70 岁。40 例肺腺癌患者中进行手术的有 12 例, 男 4 例、女 8 例, 年龄 35~55 岁, 术后收集正常组织、癌旁组织(距离病灶 2 cm)及癌组织, 并立即存于液氮中保存。同期纳入健康人群 40 例作为对照组, 男性 18 例, 女性 22 例, 年龄 35~65 岁。本研究获得本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 抽提 从液氮中取出组织,使其迅速融化,100 mg 组织加入 1 mL TRIZOL,在无菌无酶条件下提取组织总 RNA,至于焦碳酸二乙酯(DEPC)水中测定浓度后,冰上放置待用。

1.2.2 血液标本的采集和血清总 RNA 的提取 使用真空采集管收集肺腺癌组及对照组人群空腹静脉血液标本,3 000 r/min 离心 20 min 后,静置 0.5 h,吸取上层血清装于无酶的离心管中,-80 °C 保存。按照血清 RNA 提取试剂盒步骤提取血清总 RNA,逆转录成 cDNA 后扩增。

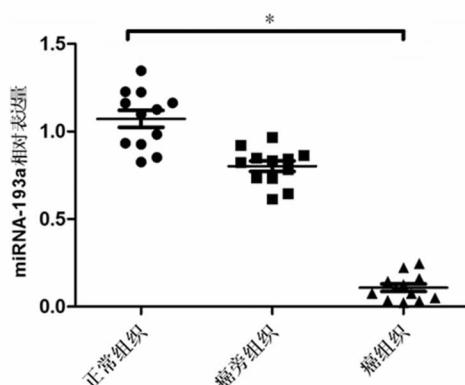
1.2.3 实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)验证不同组织中 miRNA-193a 表达 利用 Primer Premier 5 软件设计内参基因和目的基因的 PCR 引物,引物由吉凯基因设计和合成。miRNA-193a 逆转录引物序列为 F: 5'-GCA TAA CTG GCC TAC AAA GT-3'; R: 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。本实验选取了 U6 作为内参,其特异性序列为: F: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'; R: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。使用 miRNA-193a 逆转录引物将总 mRNA 逆转录为 cDNA,经过 40 个循环扩增后后收集荧光信号,绘制溶解曲线,通过溶解曲线验证产物的特异性。每个样本做 3 个复孔,结果取其均值。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算不同组中 miRNA-193a 相对表达量。

1.2.4 CEA 的水平检测 采用德国罗氏诊断有限公司的 E170 电化学发光仪检测 CEA 水平。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示;PCR 中每个标本均做 3 个复孔,对同一标本复孔 Ct 值标准差大于 0.5 者舍去;组间比较采用独立样本 t 检验;采用 Spearman 相关性分析 miRNA-193a 和 CEA 水平的相关性;应用 ROC 曲线及 AUC(95%CI)评估其作为诊断指标的效能; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miRNA-193a 在正常组织、癌旁组织及肺腺癌组织中的表达量 qRT-PCR 结果显示,在肺腺癌患者远端正常组织和癌旁组织中的 miRNA-193a 表达水平比较差异无统计学意义(相对表达量分别为 1.07 ± 0.16 、 0.80 ± 0.10 ; $P > 0.05$),但是在癌组织中,miRNA-193a 的表达量较正常组织明显下降,差异有统计学意义(相对表达量分别为 1.03 ± 0.14 、 0.11 ± 0.07 ; $P < 0.05$)。

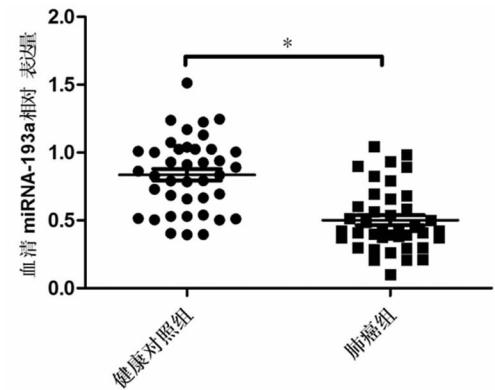


注: * 表示与正常组织相比, $P < 0.05$ 。

图 1 miRNA-193a 在不同组织中的表达量的比较

2.2 肺腺癌患者与健康人群血清 miRNA-193a 表达水平的比

较 对照组和肺腺癌组血清 miRNA-193a 的相对表达量分别为 0.83 ± 0.27 、 0.50 ± 0.23 。肺腺癌患者血清 miRNA-193a 表达量较对照组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注: * 表示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 肺癌患者与健康人群血清 miRNA-193a 表达水平的比较

2.3 肺腺癌患者血清 miRNA-193a 相对表达量与 CEA 的相关性 肺腺癌组与对照组血清 CEA 水平分别为 (19.99 ± 16.56) 和 $(5.56 \pm 3.86)\mu\text{g/L}$,肺癌组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。通过相关性分析后发现,肺腺癌患者血清 miRNA-193a 相对表达量与 CEA 之间无明显相关性($r = 0.079$, $P = 0.618$)。

2.4 ROC 曲线分析 将肺腺癌组与对照组的血清 miRNA-193a 相对表达量、CEA 水平分别作 ROC 曲线。肺腺癌组与健康对照组比较,miRNA-193a 相对表达量用于肺腺癌诊断的最佳临界值为 0.501,其灵敏度为 62.5%,特异度为 92.5%,CEA 的灵敏度为 50%,特异度为 95.5%,miRNA-193a 的 AUC 为 0.829,95%CI 为 $0.741 \sim 0.917$;miRNA-193a 的 AUC 为 0.778,95%CI 为 $0.673 \sim 0.882$,由此可见 miRNA-193a 诊断性略优于 CEA($P < 0.05$),见图 3。

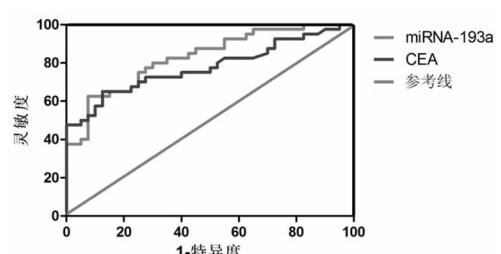


图 3 ROC 曲线分析

3 讨 论

肺癌的早期诊断是改善肺癌患者预后,提高年生存率至关重要的因素。目前临幊上对肺癌的诊断包括血清学指标和影像学检查,常用的血清指标包括 CEA、NSE、CYFRA21-1 等各组肿瘤标记物,尤其是 CEA 对于肺癌的诊断已得到了临幊的重视,这些标记物是癌基因异常表达过程中产生的生物活性物质,有一定的诊断价值,但其水平在不同个体和不同肿瘤中存在较大差异,特异性差^[4]。影像学检查,如 CT、胸片等,早期缺乏诊断特性,容易漏诊,尤其是肺腺癌发病率相对较低,无明显症状,肿块生长缓慢,更易漏诊。通过纤维支气管镜或者胸腔镜等取得组织后进行病理分析是目前临幊确诊肺腺癌的最终依据,其特异性较高,但它属有创操作,且操作过程中存在出血,心脏骤停等风险,无法广泛应用于人群。因此寻找能高效、

特异、能广泛应用于临床的诊断指标已成为肺癌研究的共同方向。

自 1993 年 miRNA 被首次发现以来, 经过不断研究已有 1500 种 miRNA 被发现。在不同类型的肺癌组织中 miRNA 表达量也各不相同, 即使在同一个体中正常组织与癌组织之间 miRNA 的表达水平也存在差异, 正是这些差异的存在为 miRNA 作为肺腺癌早期诊断指标奠定了基础。Yanaihara 等^[5] 利用基因芯片技术, 对 104 例非小细胞肺癌患者的癌组织与正常肺组织进行分析, 发现在所有表达的基因中有 28 种 miRNA 下调, 同时有 15 种 miRNA 表达上调。随后的研究发现, 部分 miRNA 甚至能够准确地区分肺癌的病理类型如腺癌或者鳞癌^[6]。而在对非小细胞肺癌早期患者以及健康对照组人群的血清分析中发现, 患者血清中 miR-146b、Let-7a、miR-193a、miR-17-5p、miR-27a、miR-21 等表达均存在差异, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)^[7-8]。将血液中差异性表达的 miR-21、miR-155 和 miR-145 作为组合分析, 区分肺癌和吸烟者, 其灵敏度为 69.4%, 特异度为 78.3%^[9]。上述研究成果均为进一步研究 miRNA 在肺腺癌中的作用奠定了基础。王海兵等^[8] 发现, 在这些差异性表达的 miRNA 中, miR-193a 的表达低于健康对照组, 但并未对其诊断价值做进一步评估。因此, 本研究选取了 miR-193a 作为诊断指标, 评价其诊断效能, 并将其与肺癌诊断常用指标 CEA 进行了比较。

基于国内外对于 miRNA 的研究, 本课题组利用 qRT-PCR 技术分析了 12 例肺腺癌患者 miRNA-193a 在不同组织中的表达量, 同时检测了 40 例肺腺癌患者及其匹配的对照组人群中血清 miRNA-193a 的表达差异。研究发现, 在肺腺癌患者中, 癌组织 miRNA-193a 表达量显著下降 ($P < 0.05$), 而癌旁组织与正常组织相比差异并无统计学意义。肺腺癌患者血清 miRNA-193a 水平下降, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其作为诊断肺腺癌的指标灵敏度为 62.5%, 特异度为 92.5%。

有文献报道 miRNA-193a 与抑制乳腺癌细胞周期以及抑制增殖有关^[10]。另外, 有学者用 miRNA-193a 在急性骨髓性白血病中抑制了 c-kit 的表达, 证实了 miRNA-193a 可发挥重要的抑癌作用^[11]。在对胃间质瘤进行的基因芯片分析中发现, miRNA-193a 表达下调, 可作为抑癌 miRNA 成为胃间质瘤诊断的新靶点^[12], 上述报道均与本研究的结果是一致的。

miRNA 在肺癌形成过程中起着重要的作用, 不同 miRNA 表达水平与肺癌的诊断、治疗、进展、预后及患者生存率等方面均有密切联系。近年来, 以 miRNA 作为不同类型的肺癌早期诊断指标的研究进展迅速, miRNA 在检测标本中性质稳定, 可增加检测的敏感度和特异度。其检测具有操作简单, 快速, 花费低等优点, 因此随着对 miRNA 研究的不断深入, 其有望成

为早期肺腺癌诊断的重要指标。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer [J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167-179.
- [3] 马丽萍, 李娜, 何湘君, 等. miR-449b 和 miR-34c 对卵巢癌细胞 SKOV3-ipl 周期相关蛋白的下调及细胞周期阻滞作用[J]. 北京大学学报(医学版), 2011, 43(1): 129-133.
- [4] 钟方才. 血清肿瘤标志物联合检测对肺癌的诊断价值研究[J]. 内蒙古中医药, 2011, 29(23): 75-76.
- [5] 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.
- [6] Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(2): 430-441.
- [7] Heegaard NH, Schetter AJ, Welsh JA, et al. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2012, 130 (6): 1378-1386.
- [8] 王海兵, 张慧君, 苏晋梅, 等. 肺癌 A549 细胞上皮-间质转化及其对微小 RNA 表达的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(8): 590-593.
- [9] Tang D, Shen Y, Wang M, et al. Identification of plasma microRNAs as novel noninvasive biomarkers for early detection of lung cancer[J]. Eur J Cancer Prev, 2013, 22 (6): 540-548.
- [10] Uhlmann S, Mannsperger H, Zhang JD, et al. Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer[J]. Mol Syst Biol, 2012, 8 (1): 570.
- [11] Gao XN, Lin J, Li YH, et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia[J]. Oncogene, 2011, 30(31): 3416-3428.
- [12] 魏伟, 王智, 汪玲, 等. miRNA-193a-5p 和 miR-3178 在胃间质瘤中的表达意义[J]. 医学新知杂志, 2015, 25(5): 321-325.

(收稿日期: 2017-02-06 修回日期: 2017-04-08)

(上接第 1772 页)

Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(1): 7-14.

[14] 李岷. 一种深部真菌早期诊断的新方法—测定真菌细胞壁成分(1→3)-β-D-葡聚糖[J]. 国外医学皮肤性病学分

册, 1998, 24(6): 343-345.

[15] 胡仁静, 严子禾, 胡锡池. 血浆 1,3-β-D 葡聚糖检测在侵袭性真菌感染中的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(17): 3920-3922.

(收稿日期: 2017-02-04 修回日期: 2017-04-06)