

论著 · 临床研究

血清 microRNA-19a 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义*

季建伟, 孙明忠[△], 居会祥, 周中卫, 颜冬梅, 朱 蓉, 金 浩, 季禹乔
(东南大学医学院附属盐城医院检验科, 江苏盐城 224001)

摘 要:目的 探讨血清 microRNA-19a(miR-19a)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及其临床意义。方法 采用荧光定量 PCR 方法检测 50 例 NSCLC 患者和 60 例健康对照者血清 miR-19a 表达,同时测定患者及对照者血清癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白片段 19(CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达水平。结果 NSCLC 患者血清 miR-19a 相对表达量(3.46 ± 1.33)显著高于对照组(1.10 ± 0.48),且 TNM Ⅲ~Ⅳ期患者 miR-19a 相对表达量(4.00 ± 0.99)明显高于 TNM Ⅰ~Ⅱ期患者(3.03 ± 1.41),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示,miR-19a、CEA、CYFRA21-1 及 NSE 的曲线下面积(AUC)分别为 0.910、0.752、0.856 及 0.817。结论 miR-19a 也许可作为一种新的标志物用于 NSCLC 的早期诊断。

关键词:microRNA-19a; 非小细胞肺癌; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.001 **中图法分类号:**R734.2

文章编号:1673-4130(2018)16-1937-04 **文献标识码:**A

The expression level and clinical significance of microRNA-19a in the serum of patients with non-small cell lung cancer*

Ji Jianwei, SUN Mingzhong[△], JU Huixiang, ZHOU Zhongwei, YAN Dongmei, ZHU Rong, JIN Hao, JI Yuqiao
(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Yancheng Hospital of Southeast University Medical College, Yancheng, Jiangsu 224001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression level and clinical significance of microRNA-19a (miR-19a) in the serum of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Serum level of miR-19a was measured by Quantitative real-time PCR, and the levels of carcinoma embryonic antigen (CEA), cytokeratin protein fragment 21-1 (CYFRA21-1), and neuron specific enolase (NSE) were also measured at same time in 50 patients with NSCLC and 60 healthy control subjects. **Results** The relative expression level of miR-19a was significantly increased in patients with NSCLC (3.46 ± 1.33) compared with healthy control subjects (1.10 ± 0.48), and the patients at TNM stages Ⅲ-Ⅳ (4.00 ± 0.99) had higher miR-19a expression than those at TNM stages Ⅰ-Ⅱ (3.03 ± 1.41), and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The areas under receiver operating characteristic curve (AUC) of serum miR-19a in diagnosis of NSCLC was 0.910, and the AUC of CEA, CYFRA21-1 and NSE was 0.752, 0.856 and 0.817, respectively. **Conclusion** The serum miR-19a may be a novel marker for early diagnosis of NSCLC.

Key words: microRNA-19a; non-small cell lung cancer; diagnosis

非小细胞肺癌(NSCLC)发病率占肺癌总发病率的 80%以上,病死率高,预后差^[1]。虽然近年来临床采用化学疗法和靶向治疗提高了 NSCLC 的生存率,但晚期 NSCLC 患者的生存率尚未得到改变^[2-3],因此提高早期 NSCLC 诊断率有利于改善患者的预后。MicroRNA 是一类内源性的非编码单链小 RNA,长度为 18~22 nt, microRNA 具有高度的保守性、时序性及组织特异性,其通过调控基因转录后水平参与并调节着生物体的几乎整个生理病理过程,包括生长发育、细胞的增殖和分化、机体代谢,以及肿瘤的发生、发展等^[4-6]。microRNA-19a(miR-19a)是 miR-17-92 家族成员之一,位于人类染色体 13q31.3 位点,目前研究已经证实 miR-17-92 基因家族属于癌基因,研究亦表明,包括 miR-19a 在内的 miR-17-92 基因家族在

* 基金项目:盐城市科技发展计划项目(YK2013073)。

作者简介:季建伟,男,主管技师,主要从事临床分子生物学及免疫学研究。 △ 通信作者, E-mail: 15189300678@163.com。

本文引用格式:季建伟,孙明忠,居会祥,等. 血清 microRNA-19a 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(16): 1937-1939.

肺癌、结肠癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中表达上调^[7-8],但是 miR-19a 在相关肿瘤血清中的表达报道不多。本研究拟通过荧光定量 PCR 方法检测血清 miR-19a 在 NSCLC 患者中的相对表达量,分析其用于诊断 NSCLC 的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 1 月至 2015 年 1 月本院 50 例经术后病理确诊为 NSCLC 患者,其中男 38 例,女 12 例,平均年龄(60.8±8.7)岁;病理分型鳞癌为 29 例,腺癌 21 例;TNM 分期为:I 期 7 例,II 期 15 例,III 期 19 例,IV 期 9 例;所有纳入本次研究的患者在术前均未接受任何抗癌治疗。对照组包括 60 例健康志愿者,其中男性 47 例,女性 13 例,平均年龄(62.6±8.8)岁。所有受试者均签署书面知情同意书,研究方案经由本院伦理委员会同意批准。

1.2 标本采集 采集病例组及对照组空腹外周静脉血标本,分离血清后,部分血清用于即行检测癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白片段 19(CYFRA21-1)及神经元特异性烯醇化酶(NSE),余放置-80℃冰箱内保存用于集中检测 microRNA。

1.3 方法 通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)定量检测血清中 miR-19a 的表达水平。用 RNA 提取试剂盒(美国 ABI 公司)提取样本的总 RNA,以提取的 RNA 为模板用逆转录试剂盒(美国 ABI 公司)进行逆转录,miRNA 的 qRT-PCR 检测使用的引物序列如下:miRNA 上游引物 5'-TGC GCT GTG CAA ATC

TAT GCA AA-3',miRNA 下游引物 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3';内参 U6 上游引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',内参 U6 下游引物 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。反应体系为 15 μL,其中包括 0.15 μL 浓度为 100 mmol/L 的 dNTP,1 μL MultiScribe 逆转录酶,1.5 μL 的 10×逆转录缓冲液,0.19 μL 的 RNA 酶抑制剂,4.16 μL 无菌水及 3 μL 浓度为 20 μmol/L 的引物。反应热循环的具体条件如下:10 min 95℃;95℃ 15 s,40 个循环;60℃ 延伸 1 min。miRNA-19a 及 U6 的丰度测定采用 2^{-ΔΔCt}方法计算。采用罗氏公司的全自动电化学发光免疫检测仪及配套试剂检测 CEA、NSE 及 CYFRA21-1 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计分析软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验进行组间比较,率的比较采用 χ^2 检验。以受试者工作特征曲线(ROC)对各指标诊断价值进行分析,比较曲线下面积(AUC)。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 患者和对照组一般临床资料比较 NSCLC 患者和对照组 miR-19a 及一般临床资料比较中,年龄及性别比较差异无统计学意义(*P*>0.05),其余各项指标差异均有统计学意义(*P*<0.01),NSCLC 患者的 miR-19a 相对表达量为 3.46±1.33,对照组为 1.10±0.48,差异有统计学意义(*P*<0.01),见表 1。

表 1 CEA、NSE、CYFRA21-1 和 miR-19a 在 NSCLC 患者和对照组中表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	性别 (男/女, <i>n</i> / <i>n</i>)	CEA (ng/mL)	NSE (ng/mL)	CYFRA21-1 (ng/mL)	miR-19a 相对表达量
NSCLC	50	60.8±8.7	38/12	35.94±19.63	23.66±12.79	12.92±9.15	3.46±1.33
对照组	60	62.6±8.8	47/13	4.47±2.52	10.01±6.14	3.24±3.43	1.10±0.48
<i>t</i> / χ^2		0.800	0.085	11.257	6.914	7.073	11.902
<i>P</i>		0.113	0.771	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 2 NSCLC 患者中 miR-19a 相对表达水平与临床病理特征的关系

项目	<i>n</i>	miR-19a 相对表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
性别				
男	38	3.31±1.39	-1.339	0.168
女	12	3.92±1.01		
年龄				
>60 岁	21	3.46±1.36	0.012	0.991
≤60 岁	29	3.45±1.33		
病理类型				
鳞癌	29	3.67±1.29	1.327	0.191
腺癌	21	3.17±1.36		
TNM 分期				
I~II 期	22	3.03±1.41	-2.743	0.009
III~IV 期	28	4.00±0.99		

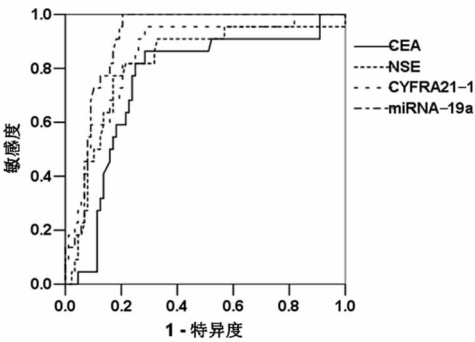


图 1 miR-19a 与 CEA、CYFRA21-1 及 NSE 诊断 NSCLC 的 ROC 曲线

2.2 NSCLC 患者中 miR-19a 相对表达量与临床病理特征的关系 在不同性别、年龄及不同肿瘤病理类型的 NSCLC 患者相比较,miR-19a 相对表达量差异

无统计学意义($P>0.05$),但 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期的 NSCLC 患者 miR-19a 相对表达量显著高于 TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期的患者($P<0.01$),见表 2。

2.3 miR-19a 与 CEA、CYFRA21-1 及 NSE 对 NSCLC 诊断效能的比较 ROC 曲线分析显示,miR-19a 预测 NSCLC 的 AUC 值为 0.910,而 CEA、CYFRA21-1 及 NSE 的 AUC 分别为 0.752、0.856 及 0.817,尽管各指标 AUC 与 0.5 相比差异均有统计学意义($P<0.01$),但 miR-19a 预测 NSCLC 的价值最高,见图 1。

3 讨论

目前,诊断 NSCLC 最准确的方法仍是组织活检,但该法属于侵入性检查,对患者具有一定的创伤性,难以用于早期筛查^[9]。临床上传统诊断肺癌的方法还包括影像学检查、痰细胞学检查及支气管镜检查等,影像学和痰细胞学检查虽然经济方便,但其特异性和敏感性不高,支气管镜检查亦为有创检查,患者多因惧怕痛苦而不愿接受^[10];再者,除了组织细胞学检查,传统性的其他诊断方法对于早期诊断的效果均有限,以致大多患者在确诊时已是中晚期^[11]。血清学指标凭借其微创、禁忌证少、成本较低等优势,可用于人群筛查。目前临床上常规检测肺癌的血清学肿瘤标志物如 CEA、CYFRA21-1 和 NSE 等虽然可用于 NSCLC 的诊断和预后,但临床效果均不甚理想^[12]。

本研究采用 qRT-PCR 方法检测血清中的 microRNA 表达,以为临床肺癌的筛查和早期诊断提供一个理想的标志物。研究表明,对于 microRNA 的检测手段,qRT-PCR 技术较测序技术、微阵列技术等,具有耗时少、制备简单,且灵敏度和特异性亦均较理想等特征^[13]。本研究中所检测的血清 miR-19a 表达在 NSCLC 患者中显著高于健康对照者,且 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期的 NSCLC 患者 miR-19a 相对表达量明显高于 TNM 分期为Ⅰ~Ⅱ期的患者,提示血清 miR-19a 也许可作为标志物用于 NSCLC 的诊断或早期诊断。张淮等^[14]研究亦显示,miR-19a 在 NSCLC 患者血清中的浓度显著高于对照组,且 TNM Ⅲ期患者高于 TNM Ⅰ~Ⅱ期患者,与本研究结果一致,但该研究并未将 miR-19a 的诊断效能与目前临床常规检测肺癌的血清标志物如 CEA、CYFRA21-1 及 NSE 等进行比较。本研究使用 ROC 曲线分析了 miR-19a、CEA、CYFRA21-1 及 NSE 对 NSCLC 的诊断效能,结果显示 miR-19a 的 AUC 最大,诊断效能最高,进一步提示 miR-19a 可作为一种新的标志物用于 NSCLC 的诊断或人群筛查。LIN 等^[15]研究了 201 例 NSCLC 病例均显示 miR-19a 在肿瘤组织和血清中表达上调;此外,该研究还表明 miR-19a 血清水平除与患者的 TNM 分期相关,还与淋巴结转移呈正相关,

提示 miR-19a 的表达可作为一项独立预后因素对 NSCLC 患者进行评估。

4 结论

本研究显示血清 miR-19a 的表达水平在 NSCLC 患者的血清中上调,对于 NSCLC 诊断效能优于目前临床上常规的标志物 CEA、CYFRA21-1 及 NSE,其有望成为一种新的标志物用于 NSCLC 的诊断和筛查。

参考文献

- [1] URAMOTO H, TANAKA F. Recurrence after surgery in patients with NSCLC[J]. Transl Lung Cancer Res, 2014, 3(4):242-249.
- [2] XIAO F, LIU D, GUO Y, et al. Survival rate and prognostic factors of surgically resected clinically synchronous multiple primary non-small cell lung cancer and further differentiation from intrapulmonary metastasis[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(4):990-1001.
- [3] SUN G, LIU B, HE J, et al. Expression of EGFR Is Closely Related to Reduced 3-Year Survival Rate in Chinese Female NSCLC [J]. Med Sci Monit, 2015, 21:2225-2231.
- [4] SELBACH M, SCHWANHÄUSSER B, THIERFELDER N, et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs[J]. Nature, 2008, 455(729):58-63.
- [5] BRACKEN C P, SCOTT H S, GOODALL G J. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(12):719-732.
- [6] GOV E, ARGAS K Y. Interactive cooperation and hierarchical operation of microRNA and transcription factor crosstalk in human transcriptional regulatory network [J]. IET Syst Biol, 2016, 10(6):219-228.
- [7] GU Y, LIU S, ZHANG X, et al. Oncogenic miR-19a and miR-19b co-regulate tumor suppressor MTUS1 to promote cell proliferation and migration in lung cancer[J]. Protein Cell, 2017, 8(6):455-466.
- [8] LIU F, ZHANG F, LI X, et al. Prognostic role of miR-17-92 family in human cancers: evaluation of multiple prognostic outcomes[J]. Oncotarget, 2017, 8(40):69125-69138.
- [9] DE MARGERIE-MELLON C, DE BAZELAIRE C, DE KERVILER E. Image-guided biopsy in primary lung cancer: Why, when and how [J]. Diagn Interv Imaging, 2016, 97(10):965-972.
- [10] KUMAR R, GUPTA N. Role of bronchoscopy in evaluation of cases with sputum smear negative pulmonary tuberculosis, interstitial lung disease and lung malignancy: A retrospective study of 712 cases [J]. Indian J Tuberc, 2015, 62(1):36-42.
- [11] HOFFMAN R M, SANCHEZ R. Lung cancer screening [J]. Med Clin North Am, 2017, 101(4):769-785.
- [12] NAKAMURA H, NISHIMURA T. (下转第 1943 页)

研究显示,静脉血栓栓塞症是肿瘤患者死亡的第二大杀手^[10]。本研究就患者的不同病理分期及个体因素对 D-D、FIB、PLT 的关系进行探究,同时针对不同 CTC 表达情况进行综合分析。CTC 阳性患者 D-D、FIB、PLT 水平分别为 (2.37 ± 2.47) mg/L、 (3.81 ± 1.48) g/L、 $(341 \pm 145) \times 10^9$ /L,均高于 CTC 阴性患者。其他研究表明,患者肿瘤细胞能够分泌出组织因子和癌促凝因子等凝血系统相关因子,激发患者机体凝血进程,同时,高凝的血液状态使得肿瘤细胞更容易黏附在靶器官血管壁上,增加了转移灶形成的概率^[11]。本研究也提示 CTC 阳性可能与 D-D、FIB、PLT 水平存在一定相关性。发生远处转移的患者 CTC 阳性率、D-D、FIB、PLT 等指标均明显高于未发生远处转移的患者,进一步证明了血液高凝状态即高 D-D、FIB、PLT 水平的升高促进了 CTC 的转移,促进了肺癌细胞远处转移的发生。对 CTC 与 D-D 及 PLT 进行 Logistic 回归分析发现,患者 CTC 阳性率与 D-D 及 PLT 存在正相关性,这表明血液高凝状态促进了 CTC 的血转移,进而导致了肺癌远处转移的风险性。

4 结 论

本文就肺部恶性肿瘤患者 CTC 与 D-D、FIB 和 PLT 的相关性进行了研究。肺癌患者的高凝状态不仅容易引发静脉血栓栓塞症,而且还会促进 CTC 转移^[12]。因此,针对无禁忌证的肺癌患者进行预防性的抗凝治疗有助于延缓肿瘤的复发和转移,进而保障患者生命健康安全。

参考文献

[1] 刘春花,巩平,杨杰. 肺癌患者外周血中循环肿瘤细胞与 D-二聚体纤维蛋白原及血小板的关系[J]. 中华肿瘤杂志,2016,38(5):368-371.

[2] 尹梅. 非小细胞肺癌患者凝血功能检测及临床意义探讨[J]. 重庆医学,2014(4):424-426.

[3] 张香花,左学荣,李玉权,等. 血清 C-反应蛋白在肺癌 TNM 分期中的临床意义及其与纤维蛋白原及 D-二聚体联合检测评估化疗效果的应用价值[J]. 中国老年学杂志,2015(21):6135-6136.

[4] 朱辉,张海燕,何明,等. 肺癌患者围手术期血浆 D-二聚体水平变化分析[J]. 天津医药,2014(7):710-712.

[5] 王亚辉. 肺癌患者化疗前后凝血、纤溶功能及血小板参数变化的临床意义[J]. 中国综合临床,2016,32(3):263-266.

[6] XUE P, YE KAI, GAO JIE, et al. Isolation and elution of Hep3B circulating tumor cells using a dual-functional her-ringbone chip[J]. Microfluid Nanofluidics, 2014, 16(3): 605-612.

[7] 朱建华. 肺癌患者化疗前后凝血、纤溶功能相关指标和血小板计数变化分析[J]. 中国基层医药,2016,23(19): 3014-3017.

[8] 毛德奎,秦海峰,于爱平,等. 肺癌患者化疗前后凝血、纤溶功能与血小板参数的变化及其临床意义[J]. 军事医学,2012,36(2):141-146.

[9] ZHANG P, ZHANG R, GAO M X, et al. Novel nitrocellulose membrane substrate for efficient analysis of circulating tumor cells coupled with surface-enhanced Raman scattering imaging[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6(1):370-376.

[10] 陈腊,张小林,蒋峰,等. 肿瘤标志物 D-二聚体血小板计数对肺癌脑转移的诊断及其对预后的评估[J]. 浙江临床医学,2016,18(6):1011-1013.

[11] 乔理华,王琳,姜加陶. 循环肿瘤细胞在良恶性肺部孤立性结节鉴别诊断中的应用价值[J]. 中华检验医学杂志,2016,39(12):941-945.

[12] 王俊,王峰,王自正. 循环肿瘤细胞检测应用于肺癌诊治的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(19):2654-2656.

[13] 张江霞,肖正红. 重组人血小板生成素联合重组人白细胞介素 11 治疗恶性肿瘤化疗后血小板减小症的安全性及有效性[J]. 医学综述,2016,22(15):3059-3063.

[14] 张丽敏,郭雨童,曹磊,等. 脑肿瘤患者围术期凝血-纤溶相关指标及血小板水平变化[J]. 检验医学与临床,2017,14(2):158-160.

[15] 苏雷,胡玲,刘妙玲,等. 银杏叶治疗对老年肿瘤患者血液高凝状态及血浆纤维蛋白原、D-二聚体水平、血小板计数的影响[J]. 中国老年学杂志,2014(19):5392-5393.

(收稿日期:2018-01-15 修回日期:2018-03-24)

(上接第 1939 页)

History, molecular features, and clinical importance of conventional serum biomarkers in lung cancer[J]. Surg Today, 2017, 47(9):1037-1059.

[13] 祁双. microRNA 检测方法的优缺点评价[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(1):85-88.

[14] 张潍,王辉,乔哲,等. miR-19a 和 miR-19b 在非小细胞肺癌中的表达[J]. 西安交通大学学报(医学版),2015,36

(6):810-814.

[15] LIN Q Y, CHEN T J, LIN Q Y, et al. Serum miR-19a expression correlates with worse prognosis of patients with non-small cell lung cancer[J]. J Surg Oncol, 2013, 107(7):767-771.

(收稿日期:2018-01-13 修回日期:2018-03-22)