

非小细胞肺癌患者血浆中 miR-26b 的表达及其临床意义*

吴唐维, 胡 绘, 李晓怡, 刘水逸, 张天竺, 陈卫群, 卢忠心[△]

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院检验科, 湖北武汉 430014)

摘要:目的 探讨微小 RNA-26b(miR-26b)在非小细胞肺癌(NSCLC)患者血浆中的表达水平及其在肺癌辅助诊断及疗效监测中的作用。方法 收集 80 例 NSCLC 患者(肺癌组,其中腺癌 48 例、鳞癌 32 例,临床分期 I/II 期、III 期和 IV 期分别有 30、24、26 例)及 45 例健康人(对照组)的血浆,应用实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 miR-26b 水平。80 例肺癌患者中有 50 例收集到配对的治疗前后血浆,通过 FQ-PCR 检测上述 50 例肺癌患者治疗前后血浆中的 miR-26b 水平。结果 对照组血浆 miR-26b 相对表达量为 33.03 ± 19.6 , 肺癌组为 11.57 ± 9.41 , 肺癌组血浆 miR-26b 显著低于对照组($t=6.908, P<0.01$)。肺腺癌和肺鳞癌患者血浆 miR-26b 水平分别为 11.32 ± 8.56 、 12.03 ± 9.92 , 均低于对照组($t=6.841, 6.162, P<0.01$); 肺腺癌和肺鳞癌患者之间血浆 miR-26b 水平无显著差异($P>0.05$)。肺癌组中, I/II 期、III 期和 IV 期患者血浆 miR-26b 相对表达量分别为 15.26 ± 11.17 、 9.47 ± 7.04 、 9.37 ± 6.66 , I/II 期、III 期和 IV 期血浆 miR-26b 水平均低于对照组(t 值分别为 $4.987, 7.235, 7.394, P<0.01$); III 期和 IV 期患者血浆 miR-26b 水平低于 I/II 期患者(t 值分别为 $2.32, 2.43, P<0.05$); III 期与 IV 期患者之间血浆 miR-26b 水平无显著差异($P>0.05$)。50 例肺癌患者治疗前后血浆 miR-26b 相对表达量分别为 10.68 ± 8.18 、 18.69 ± 10.71 , 治疗后血浆 miR-26b 水平较治疗前显著升高($t=-4.855, P<0.01$)。结论 miR-26b 在肺癌患者血浆中明显降低, 并且血浆 miR-26b 水平与肺癌分期密切相关, 血浆 miR-26b 在治疗后显著升高, 血浆 miR-26b 水平有可能作为肺癌辅助诊断及疗效监测的新指标。

关键词: 非小细胞肺癌; miR-26b; 诊断; 疗效监测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.009

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2018)16-1968-04

文献标识码:A

The expression and clinical significance of circulating miR-26b in patients with non small cell lung cancer*

WU Tangwei, HU Hui, LI Xiaoyi, LIU Shuiyi, ZHANG Tianzhu, CHEN Weiqun, LU Zhongxin[△]

(Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Wuhan Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430014, China)

Abstract: Objective To investigate circulating miR-26b level in human serum for use as a biomarker for stratification and monitoring efficacy in NSCLC. **Methods** The plasma from 80 cases of non small cell lung cancer (NSCLC) (lung cancer group), including 48 cases of adenocarcinoma, 32 cases of squamous cell carcinoma, 30 cases in stage I/II, 24 cases in stage III and 26 cases in stage IV, and 45 healthy people (control group) were collected. Quantitative RT-PCR was performed to evaluate the expression of circulating miR-26b. 50 of 80 patients with lung cancer had matched plasma samples before and after treatment. The plasma levels of microarray-26b were detected by FQ-PCR. **Results** The relative expression of miR-26b in the control group was 33.03 ± 19.6 , while that in lung cancer group was 11.57 ± 9.41 , and the plasma miR-26b in lung cancer group was significantly lower than that in the control group ($t=6.908, P<0.01$). The levels of plasma miR-26b in the adenocarcinoma group and the squamous cell carcinoma group were 11.32 ± 8.56 and 12.03 ± 9.92 , which were lower than those in the control group ($t=6.841, 6.162, P<0.01$), and there was no statistical significance in the levels of plasma miR-26b in the adenocarcinoma group and the squamous cell carcinoma group ($P>0.05$). The relative expressions of circulating miR-26b level in stage I/II (15.26 ± 11.17), stage III (9.47 ± 7.04) and stage IV (9.37 ± 6.66) were lower than that in the control group ($t=4.987, 7.235, 7.394,$

* 基金项目:湖北省自然科学基金重点项目(2015CFA078);武汉市黄鹤英才计划;武汉市卫生计生委资助项目(WX11A03, WX14B10, WX15A12);武汉市中心医院院内青年基金项目(YQ14A01, YQ15A03)。

作者简介:吴唐维,女,主管技师,主要从事肿瘤发生、发展的分子机制研究。△ 通信作者, E-mail: lzx71@yahoo.com。

本文引用格式:吴唐维,胡绘,李晓怡,等.非小细胞肺癌患者血浆中 miR-26b 的表达及其临床意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(16): 1968-1971.

$P < 0.01$). The circulating miR-26b levels in stage III and stage IV were lower than that in stage I/II ($t = 2.32, 2.43, P < 0.05$), and there was no statistical significance in the levels of plasma miR-26b between the patients in stage III and stage IV ($P > 0.05$). Furthermore, the expression level of miR-26b in the post-operative plasma of 50 lung cancer patients (18.69 ± 10.71) was significantly increased when compared to their pre-operative plasma (10.68 ± 8.18) ($t = -4.855, P < 0.01$). **Conclusion** The circulating miR-26b level was significantly reduced in NSCLC patients and closely related to the lung cancer stages, the miR-26b level showed a markedly increase after treatment. Plasma miR-26b level may be used as a new indicator for the diagnosis and monitoring of lung cancer.

Key words: non small cell lung cancer; miR-26b; diagnosis; therapeutic efficacy monitoring

肺癌是当前世界对人类健康和生命威胁最严重的肿瘤之一。美国癌症学会最新发布的数据显示,肺癌已经成为恶性肿瘤死亡原因的首位,肺癌的五年生存率也只有不到 10%^[1]。肺癌中,80%以上为非小细胞肺癌(NSCLC)。目前我国肺癌的发病率以每年 26.9% 的速度增长,肺癌病死率在过去 30 年间上升了 465%,成为致死率最高的恶性肿瘤。缺乏有效的早期诊断和治疗手段是造成肺癌病死率高的两大主要原因^[2]。因此,寻找良好的标志物,为肺癌的早发现早治疗争取时间已成为迫切需要。

微小 RNA(miRNA)是近年来发现的一类长度约 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA,其通过降解靶 mRNA 或抑制其翻译来调节靶基因的表达,广泛参与到肿瘤的发生、发展中^[3-5]。课题组前期研究发现,在肺癌细胞系中 miR-26b 的表达明显降低,槐尔清膏能提高肺癌细胞系中 miR-26b 的表达量,miR-26b 通过靶向作用于 Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)参与到槐尔清膏的抗肿瘤作用中,miR-26b 所介导的槐尔清膏抗肿瘤机制,为研究人员提供了新的中药抗肿瘤作用的研究思路,同时更为以 miR-26b 为靶点的肺癌的生物治疗提供了新的线索^[6]。因此,进一步挖掘 miR-26b 在肺癌发生、发展中的具体作用机制及 NSCLC 患者血浆中 miR-26b 与肺癌的临床关系具有深刻意义。

本文在前期研究的基础上,收集肺癌患者血浆标本,并通过实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测循环 miR-26b 的相对表达量,探讨 miR-26b 水平在肺癌诊断及疗效监测中的潜在价值,以期从 miRNA 水平为肺癌的早期诊断、预后判断及靶向基因治疗提供新的理论和实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 自 2013 年 6 月至 2014 年 9 月,从华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院收集临床确诊的、尚未进行任何治疗的 80 例 NSCLC 患者的血浆标本(肺癌组),包括 48 例腺癌和 32 例鳞癌,其中 I/II 期患者 30 例,III 期 24 例,IV 期 26 例。同时收集 45 例健康人的血浆标本作为对照组。80 例肺癌患者中,收集到 50 例配对的治疗前后血浆标本。所有标本经 $1\ 000 \times g, 4\ ^\circ\text{C}$ 离心 15 min 后,分离血浆,

置 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻存。本研究经院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。80 例 NSCLC 患者平均(59.18 ± 8.1)岁,其中男 55 例,女 25 例,45 例健康对照者平均(56.29 ± 7.7)岁,其中男 31 例,女 14 例,2 组在年龄和性别组成上无显著差异($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 mirVana PARIS 血浆 miRNA 提取试剂盒购自 Ambion 公司,TaqMan miRNA 分析试剂盒购自美国 ABI 公司,CFX96 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法 采用 FQ-PCR 检测 miR-26b 的表达,提取血浆 RNA,用 miR-26b 检测试剂盒检测 miR-26b 的表达水平。首先取 10 ng 总 RNA 与 3 μL 逆转录酶混合,在 15 μL 反应体系中,16 $^\circ\text{C}$ 30 min,42 $^\circ\text{C}$ 30 min,85 $^\circ\text{C}$ 5 min,进行逆转录;然后将逆转录产物 cDNA 进行 150 倍稀释,取 2 μL 稀释的 cDNA 与 2 μL TaqMan 引物混合,在 20 μL 反应体系中,95 $^\circ\text{C}$ 10 min 变性,随后 95 $^\circ\text{C}$ 15 s,60 $^\circ\text{C}$ 60 s,40 个循环。采用外源性秀丽隐杆线虫 cel-miR-39 作为对照,miR-25 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \times 10^4$ 来表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,所得计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与肺癌组血浆 miR-26b 的表达 对照组血浆 miR-26b 相对表达量为 33.03 ± 19.6 ,肺癌组血浆 miR-26b 为 11.57 ± 9.41 ,肺癌组血浆 miR-26b 的表达显著低于对照组($t = 6.908, P < 0.01$),见图 1A。48 例肺腺癌和 32 例肺鳞癌患者血浆 miR-26b 的水平分别为 11.32 ± 8.56 和 12.03 ± 9.92 ,均较对照组低($t = 6.841, 6.162, P < 0.01$),肺腺癌和肺鳞癌患者之间血浆 miR-26b 水平无显著差异($P > 0.05$),见图 1B。

2.2 各期肺癌患者血浆 miR-26b 的表达 肺癌组中,I/II 期、III 期和 III 期患者血浆 miR-26b 相对表达量分别为 $15.26 \pm 11.17, 9.47 \pm 7.04, 9.37 \pm 6.66$,I/II 期、III 期和 IV 期血浆 miR-26b 的表达均低于对照组(t 值分别为 4.987、7.235、7.394, $P < 0.01$),III 期和 IV 期患者血浆 miR-26b 的表达低于 I/II 期患者(t 值分别为 2.32、2.43, $P < 0.05$),III 期与 IV 期患者

之间血浆 miR-26b 水平无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 2。

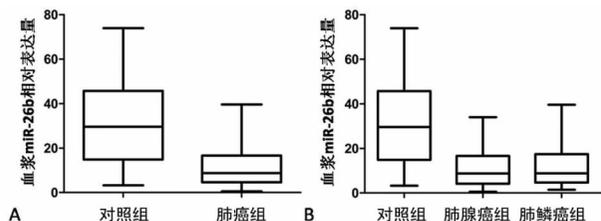


图 1 对照组与肺癌组血浆 miR-26b 的表达

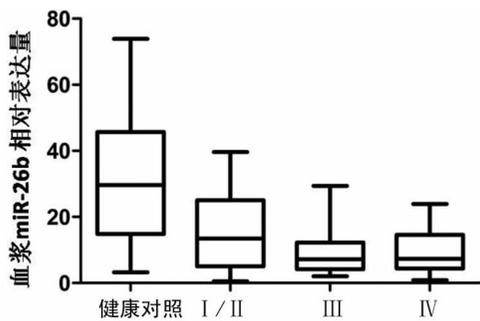


图 2 各期肺癌患者血浆 miR-26b 的表达

2.3 肺癌患者治疗前后血浆 miR-26b 水平 FQ-PCR 检测 50 例肺癌患者治疗前后血浆 miR-26b 水平, 见图 3。患者治疗前后血浆 miR-26b 的相对表达量分别为 10.68 ± 8.18 、 18.69 ± 10.71 , 治疗后血浆 miR-26b 的表达较治疗前显著升高 ($t = -4.855, P < 0.01$)。

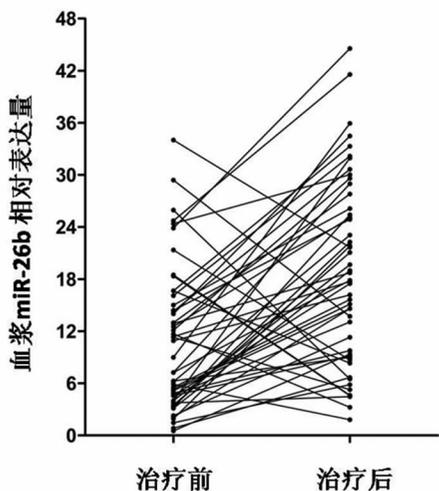


图 3 肺癌患者治疗前后血浆 miR-26b 水平

3 讨论

研究表明, miR-26b 在肿瘤的发生、发展中发挥着抑癌基因的作用。LI 等^[7]研究发现, miR-26b 通过靶向作用于岩藻糖基转移酶 FUT4, 抑制结直肠癌细胞的侵袭和转移。miR-26b 亦靶向作用于酪氨酸蛋白激酶受体 EphA2, 从而增强肝癌细胞的放疗敏感性^[8]。但是也有研究显示, 在脑垂体瘤细胞中, 抑制 miR-26b 的表达能明显抑制肿瘤细胞的集落形成和侵袭^[9]。虽然 miR-26b 到底扮演着癌基因或抑癌基

因的角色存在争议, 但这也说明 miR-26b 确实与肿瘤的发生、发展密切相关。

研究发现肿瘤患者血清中存在组织特异性 miRNA, 并且高度稳定, 能够抵抗血清中以及外源性 RNase; 由于血清标本易于获得且容易被患者所接受, 检测患者血清中 miRNA 的表达, 将成为疾病诊断、治疗及预后判断的有力工具^[10-11]。有报道显示, 循环 miR-25 有望作为肺癌诊断的分子标志^[12], 也有研究表明, 循环 miR-23b 与结直肠癌患者的分期相关, 并且 miR-23b 低表达的结直肠癌患者呈现较低的无病生存率和总的生存率^[13]。循环 miR-25 在骨肉瘤患者血浆中明显增高, miR-25 水平能很好地反映骨肉瘤患者的病情进展和预后情况^[14]。陈卫群等^[15]报道了弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者血清中 miR-21 呈高表达, 且与弥漫性大 B 细胞淋巴瘤临床分级分期、基因型和预后判断密切相关, miR-21 有可能成为弥漫性大 B 细胞淋巴瘤早期诊断、基因分型及预后判断的新分子标志。王卉等^[16]亦通过检测乳腺癌患者血清 miR-21 的表达, 发现高表达的血清 miR-21 与乳腺癌分期密切相关。HSU 等^[17]发现, 在头颈部鳞状细胞癌患者中, 术后循环 miR-21 和 miR-26b 降低的患者均有较好的预后。

课题组前期研究发现, 肺癌细胞系中 miR-26b 呈低表达, 而提高 miR-26b 在肺癌细胞中的表达量, 能明显促进肺癌细胞凋亡, 抑制肺癌细胞增殖, miR-26b 通过靶向作用于 EZH2 参与到槐尔清膏抗肿瘤作用中^[6]。本文在前期研究的基础上, 收集肺癌患者血浆标本, 发现 miR-26b 在肺癌患者血浆中明显降低, 低表达的 miR-26b 对肺癌的诊断及对肺癌各期的区分具有一定价值, 并且肺癌患者血浆 miR-26b 在治疗后明显升高。

4 结论

血浆 miR-26b 水平对肺癌及肺癌各期的鉴别诊断具有重要意义, 循环 miR-26b 作为非侵袭性的小分子, 有望成为肺癌辅助诊断、分期和疗效监测的新的指标。课题组后续将结合大批量的肺癌患者血浆、组织 miR-26b 水平进行深入分析, 进一步探索 miR-26b 在肺癌发生、发展中的重要作用。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. Ca Cancer J Clin, 2017, 67(3):104-117.

[2] BUROTTO M, THOMAS A, SUBRAMANIAM D, et al. Biomarkers in early-stage non-small-cell lung cancer: current concepts and future directions[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(11):1609-1617.

[3] VAN BEIJNUM J R, GIOVANNETTI E, POEL D, et al. miRNAs: micro-managers of anticancer combination therapies[J]. Angiogenesis, 2017, 20(2):269-285.

- [4] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] GANDELLINI P, DOLDI V, ZAFFARONI N. microRNAs as players and signals in the metastatic cascade: implications for the development of novel anti-metastatic therapies[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 44: 132-140.
- [6] WU T, CHEN W, LIU S, et al. Huaier suppresses proliferation and induces apoptosis in human pulmonary cancer cells via upregulation of miR-26b-5p [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(12): 2107-2114.
- [7] LI Y, SUN Z, LIU B, et al. Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): e2892.
- [8] JIN Q, LI X, CAO P. MicroRNA-26b enhances the radio-sensitivity of hepatocellular carcinoma cells by targeting EphA2[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2016, 238(2): 143-151.
- [9] PALUMBO T, FAUCZ F R, AZEVEDO M, et al. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTEN-AKT pathway[J]. *Oncogene*, 2013, 32(13): 1651-1659.
- [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] AJIT S K. Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules[J]. *Sensors*, 2012, 12(3): 3359-3369.
- [12] WU T, CHEN W, KONG D, et al. miR-25 targets the modulator of apoptosis 1 gene in lung cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(8): 925-935.
- [13] KOU C, ZHOU T, HAN X, et al. Downregulation of mir-23b in plasma is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 4838-4844.
- [14] FUJIWARA T, UOTANI K, YOSHIDA A, et al. Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 33375-33392.
- [15] 陈卫群, 卢宏达, 孔德勇, 等. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者血清和细胞中 miR-21 的表达及其临床意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(5): 431-435.
- [16] 王卉, 刘水逸, 吴唐维, 等. miR-21 在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌侵袭转移的影响[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(3): 186-190.
- [17] HSU C M, LIN P, WANG Y, et al. Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(6): 1933-1942.

(收稿日期: 2018-01-10 修回日期: 2018-03-28)

(上接第 1967 页)

- risk in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review[J]. *J Rheumatol*, 2016, 43(1): 54-65.
- [8] MANZI S, MEILAHN E N, RAIRIE J E, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study[J]. *Am J Epidemiol*, 1997, 145(5): 408-415.
- [9] BULKLEY B H, ROBERTS W C. The heart in systemic lupus erythematosus and the changes induced in it by corticosteroid therapy. A study of 36 necropsy patients[J]. *Am J Med*, 1975, 58(2): 243-264.
- [10] ESDAILE J M, ABRAHAMOWICZ M, GRODZICKY T, et al. Traditional framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(10): 2331-2337.
- [11] 耿斌, 曹铁生, 段云友. 外周动脉超声检查预测冠状动脉粥样硬化性心脏病的探讨[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(11): 651-654.
- [12] 杨景阳, 吕国荣, 张东妹, 等. 系统性红斑狼疮患者颈动脉内中膜厚度与血清高敏 CRP 的关系[J]. *中国超声医学杂志*, 2015, 31(3): 265-267.
- [13] HOE E, ANDERSON J, NATHANIELSZ J, et al. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease[J]. *Microbiol Immunol*, 2017, 61(2): 49-56.
- [14] VON VIETINGHOFF S, LEY K. Interleukin 17 in vascular inflammation [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(6): 463-469.
- [15] CHENG X, YU X, DING Y, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome[J]. *Clin Immunol*, 2008, 127(1): 89-97.
- [16] ZHU M, MO H, LI D, et al. Th17/Treg imbalance induced by increased incidence of atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)[J]. *Clin Rheumatol*, 2013, 32(7): 1045-1052.
- [17] LIN J, KAKKAR V, LU X. Impact of MCP-1 in atherosclerosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(28): 4580-4588.
- [18] 黎娜, 朱文玲, 陈莲凤, 等. 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对平滑肌细胞增殖、趋化和组织因子表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(11): 975-978.
- [19] 张杰, 李江涛, 杨南萍. 单核细胞趋化蛋白-4 在系统性红斑狼疮中的表达及临床意义[J]. *华西医学*, 2013, 28(1): 40-43.
- [20] 郭辉, 张雅利, 王淑梅, 等. 系统性红斑狼疮患者胰岛素抵抗情况和胰岛 β 细胞功能的评价[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2006, 27(6): 569-571.

(收稿日期: 2018-01-06 修回日期: 2018-03-24)