

• 论 著 •

循环 miR-126-3p 在非小细胞肺癌中表达及诊断价值*

唐宇星¹, 李建棣¹, 李国盛¹, 陈思园¹, 黄婉英¹, 何融泉², 孔晋亮³, 陈 罡^{1△}

广西医科大学第一附属医院: 1. 病理科; 2. 肿瘤内科; 3. 呼吸与危重症医学科, 广西南宁 530021

摘要: **目的** 探讨循环微小核糖核酸(miR)-126-3p 在非小细胞肺癌(NSCLC)中表达及诊断价值。**方法** 收集多中心 miR 芯片及测序数据探讨 NSCLC 的循环 miR-126-3p 的表达差异。为了评估循环 miR-126-3p 综合表达水平, 计算标准化均数差(SMD)和综合受试者工作特征(sROC)曲线, 分析 sROC 曲线的曲线下面积(AUC), 探讨灵敏度、特异度、阳性阴性似然比, 并结合组织进一步综合分析循环 miR-126-3p 表达。通过 miRDB、starBase v2.0 和 TargetScan 7.1, 结合 NSCLC 中的上调差异基因, 利用互补序列方法筛选了循环 miR-126-3p 潜在靶基因。**结果** 基于 6 项循环 miR 数据集发现循环 miR-126-3p 表达水平高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 受试者工作曲线显示循环 miR-126-3p 有较强的诊断效能($AUC > 0.5$), 而在 199 例 NSCLC 组中综合表达低于对照组($SMD = -1.46$)。sROC 曲线显示循环 miR-126-3p 区分 NSCLC 组和对照组有高准确性($AUC = 0.91$), Egger's 检验不存在发表偏倚($P > 0.05$), 灵敏度、特异度均 ≥ 0.80 , 阳性似然比、阴性似然比为 5.37 和 0.18。此外, 对 26 个数据集 1 320 例 NSCLC 循环和组织综合分析显示, 循环 miR-126-3p 在 NSCLC 组中表达低于对照组($SMD = -2.07$)。sROC 曲线显示低表达的循环 miR-126-3p 在区分 NSCLC 组和对照组有高准确性($AUC = 0.97$)。此外, 筛选得到循环 miR-126-3p 的潜在靶基因 ADAM9 和 SLC7A5 在 NSCLC 组中表达均高于对照组。**结论** 低表达的循环 miR-126-3p 可能是 NSCLC 高准确性筛查的重要生物标志物。

关键词: 非小细胞肺癌; 微小核糖核酸-126-3p; 靶基因; 循环**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.16.015**中图法分类号:** R473.73**文章编号:** 1673-4130(2024)16-1996-09**文献标志码:** A**Expression and diagnostic value of circulating miR-126-3p
in non-small cell lung cancer***TANG Yuxing¹, LI Jiandi¹, LI Guosheng¹, CHEN Siyuan¹, HUANG Wanying¹,
HE Rongquan², KONG Jinliang³, CHEN Gang^{1△}1. Department of Pathology; 2. Department of Medical Oncology; 3. Department of Respiratory and
Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical
University, Nanning, Guangxi 530021, China

Abstract: **Objective** To explore the expression and diagnostic value of circulating microRNA (miR)-126-3p in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Multi-centred miR chips and sequencing data were collected to investigate the differential expression of circulating miR-126-3p in NSCLC. In order to evaluate the comprehensive expression level of circulating miR-126-3p in the cycle, the standardized mean difference (SMD) and summary receiver operating characteristic (sROC) curve were calculated, and the area under curve (AUC) of sROC curve was analyzed. Sensitivity, specificity, positive negative likelihood ratio were explored, and the expression of circulating miR-126-3p was further comprehensively analyzed in combination with tissue. By using miRDB, starBase v2.0, and TargetScan 7.1, combined with up-regulated differentially expressed genes in NSCLC, potential target genes of circulating miR-126-3p were screened using complementary sequence method. **Results** Based on six circulating miR datasets, the expression level of circulating miR-126-3p was higher than that of the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The receiver operating characteristic curves showed that circulating miR-126-3p had strong diagnostic efficacy

* 基金项目: 广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2020031); 广西医科大学 2023 年大学生创新创业训练计划项目(202310598039X)。

作者简介: 唐宇星, 男, 硕士研究生在读, 主要从事临床病理研究。△ 通信作者, E-mail: chengang@gxmu.edu.cn。

($AUC > 0.5$), and the comprehensive expression of circulating miR-126-3p was lower in 199 cases of NSCLC group than in the control group ($SMD = -1.46$). The sROC curve showed that circulating miR-126-3p distinguished the NSCLC group from the control group with high accuracy ($AUC = 0.91$), Egger's test showed no publication bias ($P > 0.05$), with sensitivity and specificity ≥ 0.80 , and positive likelihood ratio and negative likelihood ratio were 5.37 and 0.18, respectively. In addition, a comprehensive analysis of the circulation and tissue of 1 320 NSCLC samples from 26 datasets showed that circulating miR-126-3p expression was lower in NSCLC group than in the control group ($SMD = -2.07$). The sROC curve showed that low-expression circulating miR-126-3p had high accuracy in distinguishing between the NSCLC group and the control group ($AUC = 0.97$). In addition, potential target genes ADAM9 and SLC7A5 were screened for circulating miR-126-3p, and their expression in NSCLC group was higher than that in the control group. **Conclusion** Low expression of circulating miR-126-3p in the circulation may be an important biomarker for high-precision screening of NSCLC.

Key words: non-small cell lung cancer; microRNA-126-3p; targeted gene; circulation

肺癌是全球第二大肿瘤疾病,也是中国主要癌症相关死亡的重要原因^[1-2]。据统计,2022 年中国新发病例达 870 982 例,而死亡病例达 766 898 例^[3]。其中,约 85% 的肺癌病例诊断为非小细胞肺癌(NSCLC),而肺腺癌(LUAD)和肺鳞状细胞癌(LUSC)是 NSCLC 的两大亚群^[4]。尽管精准肿瘤学发展迅速,但晚期和 I 期 NSCLC 患者的 5 年生存率分别为 15% 和 83%^[5]。因此 NSCLC 的早期诊断对于提高患者生存质量尤为重要。目前分子筛查是 NSCLC 早期筛查的研究热点,其中循环微小核糖核酸(miR)在癌症早期筛查效果显著^[6-7]。miR 广泛存在于真核细胞,在人体循环中稳定存在,相较于其他标志物,miR 具有稳定、可重复和一致性的特点,近年来被逐渐用于癌症早筛^[8]。循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中潜在的作用受到了广泛关注。循环 miR-126-3p 与抑制的 miR-221-3p 能够通过诱导肿瘤坏死因子相关细胞凋亡诱导配体介导的细胞凋亡,在体外和体内阻碍 NSCLC 的生长^[9]。循环 miR-126-3p 的下调与晚期 NSCLC 的转移相关,提示预后不良^[10]。循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中展现出较高的临床价值,但目前尚未有研究对循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中的表达水平和区分潜能做出系统性评估。本研究采用多中心数据,综合探讨了循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中的表达水平及诊断效能,并挖掘循环 miR-126-3p 潜在靶基因,探索循环 miR-126-3p 在 NSCLC 患者中的潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源 通过检索式:“lung AND (tumor OR cancer OR carcinoma OR neoplasms) AND (microRNA OR miRNA)”,收集来自公开数据库(基因表达综合数据库、ArrayExpress、癌症基因组图谱、基因型-组织表达、PubMed、知网、万方、维普)的 NSCLC 的循环 miR-126-3p 表达相关研究。纳入标

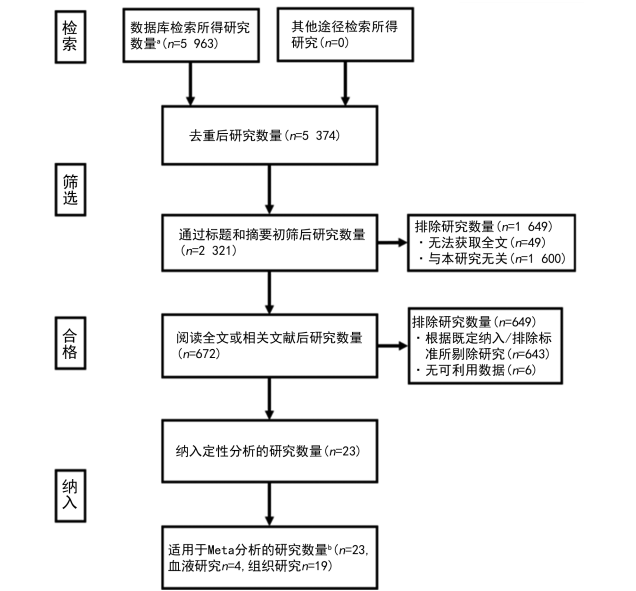
准:(1)样本来源为人类;(2)样本类型为 NSCLC 患者的血液或组织(NSCLC 组)和非 NSCLC 患者的血液或组织(对照组);(3)包含循环 miR-126-3p 表达信息。排除标准:(1)样本重复;(2)经过处理(药物、放射等)。最终,截至 2021 年 12 月 22 日,血液样本方面收集了 4 项研究(包括 3 个 miR 表达谱芯片,1 篇文献),共 88 例 LUAD 样本,51 例 LUSC 样本,60 例非特异性 NSCLC 样本)。组织样本方面收集了 19 项研究(包括 17 个 miR 表达谱芯片,文献[11-12]),共 848 例 LUAD 样本和 273 例 LUSC 样本。循环和组织中 NSCLC 样本共 1 320 例。PRISMA 流程见图 1。此外,本研究根据以上数据库收集了 NSCLC 的 mRNA 表达数据集,利用 sva 包合并同一平台数据集,用于循环 miR-126-3p 靶基因的预测与分析,并且还收集了含 ADAM9、SLC7A5 的 NSCLC 样本(LUSC 样本和 LUAD 样本)及对照组。

1.2 方法

1.2.1 循环和组织 NSCLC 中 miR-126-3p 的表达水平和诊断效能 通过收集的 6 项循环 miR 相关研究,探讨了循环 miR-126-3p 在 NSCLC 组与对照组之间的表达水平差异及诊断效能,并通过 26 项研究(包含组织、循环样本)进一步综合分析了循环 miR-126-3p 在 NSCLC 组与对照组的整体表达水平差异和诊断准确性。

1.2.2 LUSC 内部 mRNA 数据收集和实验 根据先前的研究使用原位 mRNA 微阵列采集与实验^[13],采用 TRIzol[®] Reagent(美国英杰生命技术有限公司)提取了 6 个内部 LUSC 组织和对照样品的总 RNA。通过测量 A_{260}/A_{280} 比率和 1.8~2.1 的标准范围,评估了 RNA 的纯度和完整性。当 A_{260}/A_{280} 大于 1.8 时,表明 RNA 未被降解。随后,合成了 cDNA 样品并进行了标记。使用 Nanodrop ND-1000(美国加利福尼亚州安捷伦公司)检测了荧光标记的效率。在标准

条件下,将芯片[数谱(上海)生物科技有限公司]与标记的探针进行了杂交。最后,使用安捷伦微阵列扫描仪(Agilent p/n G2565BA)进行扫描后,将结果转换为数字数据作为 In-house microarray matrix 矩阵,以便进行存储和后续分析。对此,本研究得到了广西医科大学第一附属医院医学伦理委员会伦理审查(2015-KY-国基-059),所有参与者均签署了知情同意书。



注: ^a 表示研究包括 miR 表达谱芯片、miR 高通量测序、miR 测序数据、实时荧光定量聚合酶链反应数据、文献数据等; ^b 表示共纳入 23 项研究,在后续分析中根据 LUAD、LUSC 亚型分类及按基因表达综合数据库芯片或数据测序时使用芯片的平台 (GPL) 来源合并处理,最终获得 26 项表达数据,其中血液数据 6 项,组织数据 20 项。

图 1 PRISMA 流程

1.2.3 NSCLC 中循环 miR-126-3p 潜在靶基因筛选和分析 为了研究 NSCLC 中循环 miR-126-3p 的分子机制,利用 miRDB、starBase v2.0 和 TargetScan 7.1 在线预测了循环 miR-126-3p 的靶基因。通过 R 软件,在全球数据集中,分别筛选了 LUAD 和 LUSC 的差异基因,将筛选得到的上调基因作为 NSCLC 的上调差异基因,与在线预测的靶基因进行交集,以获取循环 miR-126-3p 潜在靶基因,并通过 TargetScan 7.1 获取循环 miR-126-3p 和靶基因的结合位点。此外,ENCORI 数据库用于进一步分析循环 miR-126-3p 与靶基因的相关性。

1.3 统计学处理 基于上述得到的 6 项循环 miR 相关研究,结合 Wilcoxon 检验或独立样本 *t* 检验分析了循环 miR-126-3p 在 NSCLC 循环样本和正常循环样本之间的表达水平差异,若数据为正态分布,则使用独立样本 *t* 检验,若数据为非正态分布,则使用 Wilcoxon 检验,并展示对应的散点图。为了评估循环 miR-126-3p 区分 NSCLC 样本和正常样本的能力,绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线并计算曲线下面积 (AUC)。以上分析及结果可视化均通过软件 Graph-

Pad Prism 8.0 完成。利用软件 Stata v14.0 进行整合分析,结合以 LUAD、LUSC 及未区分癌症亚型的 NSCLC 进行分层与整合的亚组分析计算了 miR-126-3p 的标准化均数差 (SMD),若 $I^2 > 50\%$ 则选择随机效应模型,若 $I^2 \leq 50\%$,则选择固定效应模型,通过综合受试者工作特征 (sROC) 曲线进一步分析了循环 miR-126-3p 的诊断准确性 ($0.5 < AUC < 0.7$, 低准确性; $0.7 \leq AUC < 0.9$, 中等准确性; $AUC \geq 0.9$, 高准确性), Egger's 检验中若 $P > 0.05$ 则不存在发表偏倚,并计算了灵敏度和特异度,以及阳性似然比和阴性似然比。基于 26 项研究 (包含组织、循环样本),利用 Stata v14.0 进行亚组分析,通过计算 SMD 整合研究了 NSCLC 中 LUAD 和 LUSC 的循环 miR-126-3p 表达水平,并绘制了 sROC 曲线。通过计算全球数据集基因的 SMD,得到 LUAD 和 LUSC 中上调的差异基因 ($SMD > 0, P < 0.05$)。并基于 NSCLC 的全球 mRNA 数据集 (包括全球数据集和内部微阵列数据),通过整合分析计算了靶基因在 LUSC 和 LUAD 的 SMD,结果使用森林图展示。以上除 Egger's 检验外,其余统计方法均采用 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NSCLC 中循环 miR-126-3p 的表达水平和诊断效能 在纳入的 6 项研究中 (包括 5 项 miR 表达谱芯片,1 篇文献 [10] 已发表,其中收集的 GSE40738 和 GSE152702 均包含 LUAD 和 LUSC 2 种 miR 表达谱),4 项数据显示循环 miR-126-3p 在 NSCLC 组中显著下调,区分 NSCLC 组与对照组具有较高的准确性 ($P < 0.05$), $AUC > 0.5$ 。见图 2。相较于正常循环样本,NSCLC 的亚组分析中循环 miR-126-3p 在 LUAD 中下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但循环 miR-126-3p 在 LUSC 中下调差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而综合分析显示循环 miR-126-3p 在 NSCLC 组中明显下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Egger's 检验未检出偏倚,sROC 曲线显示循环 miR-126-3p 区别 NSCLC 组和对照组有高准确性。见图 3。在特异度和灵敏度分析中,综合各项研究后特异度和灵敏度均 ≥ 0.80 ,循环 miR-126-3p 区别 NSCLC 组和对照组有较好的特异度和灵敏度。此外,合并阳性似然比和合并阴性似然比也显示循环 miR-126-3p 区分 NSCLC 组和对照组能力较强。见图 4。

2.2 整合分析 NSCLC 的循环和组织样本中 miR-126-3p 表达水平 相较于正常循环和组织样本,NSCLC 的亚组分析中循环 miR-126-3p 表达水平在 LUAD、LUSC 中均显著下调;综合分析中循环 miR-126-3p 在 NSCLC 组中表达低于对照组,差异有统计

学意义($P<0.05$)。sROC 曲线结果显示,低表达的循环 miR-126-3p 在区分 NSCLC 组与对照组有高准确性。见图 5。

2.3 NSCLC 中循环 miR-126-3p 潜在靶基因的结合位点和表达水平 将在线预测的循环 miR-126-3p 靶基因与 NSCLC 上调的差异基因进行交集,最终得到了 2 个潜在靶基因,分别是 ADAM9 和 SLC7A5。循环 miR-126-3p 与 ADAM9 在 LUAD 中呈负相关

($r=-0.061,P=0.166$),在 LUSC 中呈正相关($r=0.003,P=0.944$),循环 miR-126-3p 与 SLC7A5 在 LUAD 中呈负相关($r=-0.076,P=0.0873$),在 LUSC 中呈负相关($r=-0.127,P=0.00569$)。见图 5。整合分析显示相较于对照组样本,ADAM9 和 SLC7A5 表达水平在 LUAD 样本和 LUSC 样本中均呈上调状态。见图 6~9。

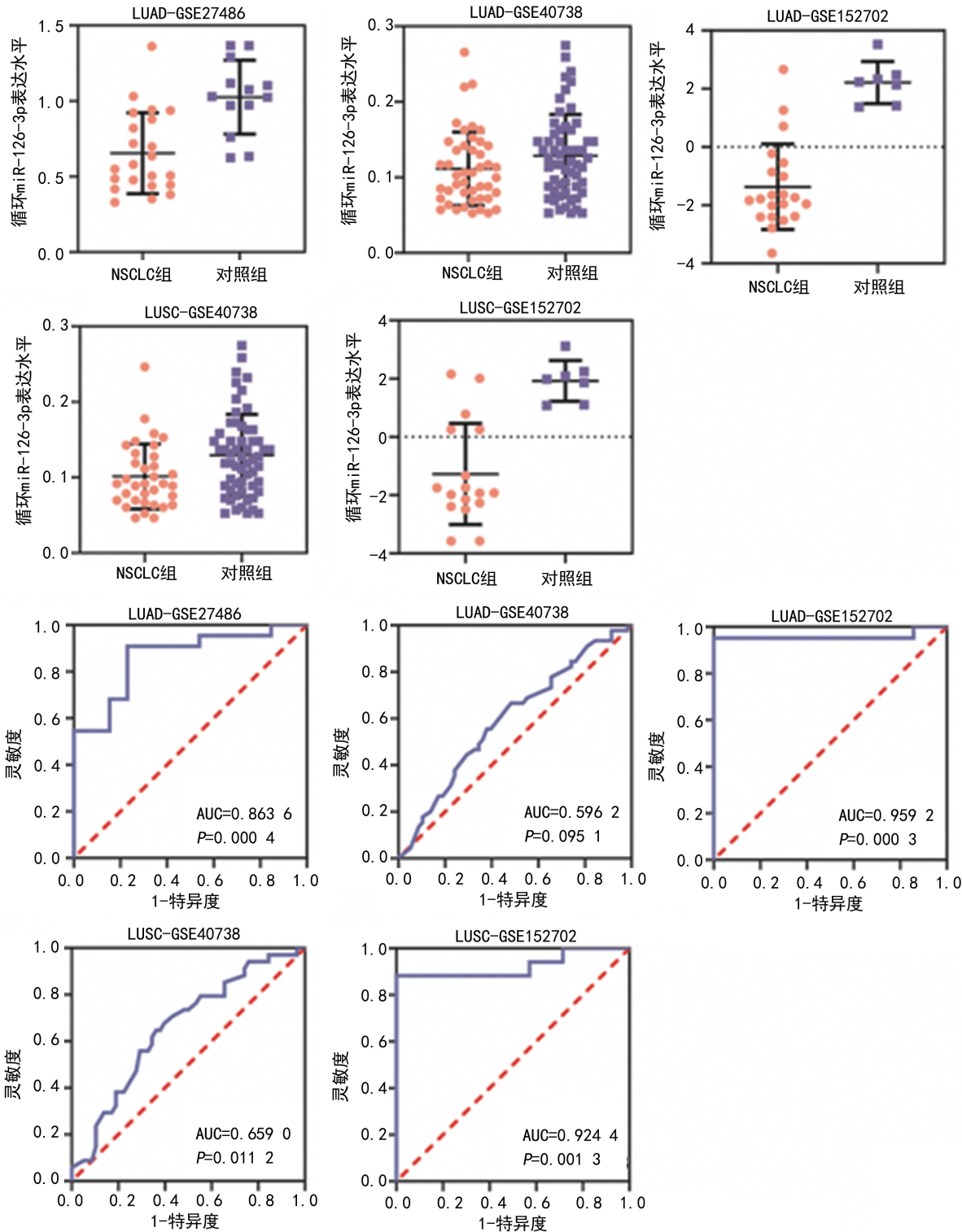
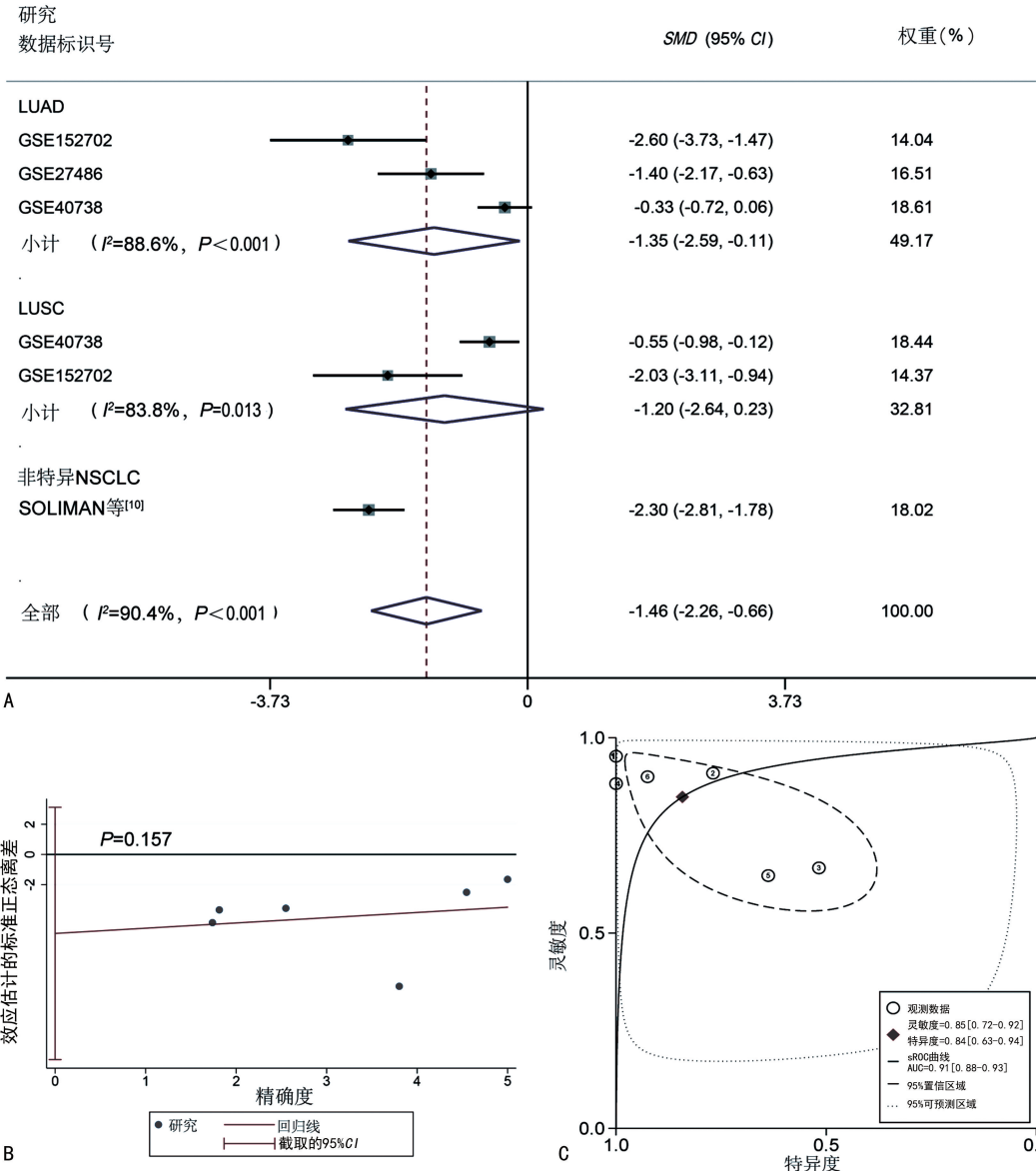


图 2 NSCLC 中循环 miR-126-3p 的表达水平和诊断效能



注:A为SMD森林图,B为 Egger's 检验,C为循环 miR-126-3p 诊断 NSCLC 组和对照组的 sROC 曲线,其中①代表 LUSC-GSE152702,②代表 LUAD-GSE152702,③代表 LUAD-GSE27486,④代表 LUSC-GSE40738,⑤代表 LUAD-GSE40738,⑥代表 SOLIMAN 等^[10]。

图 3 整合分析 NSCLC 循环 miR-126-3p 的表达水平和诊断效能

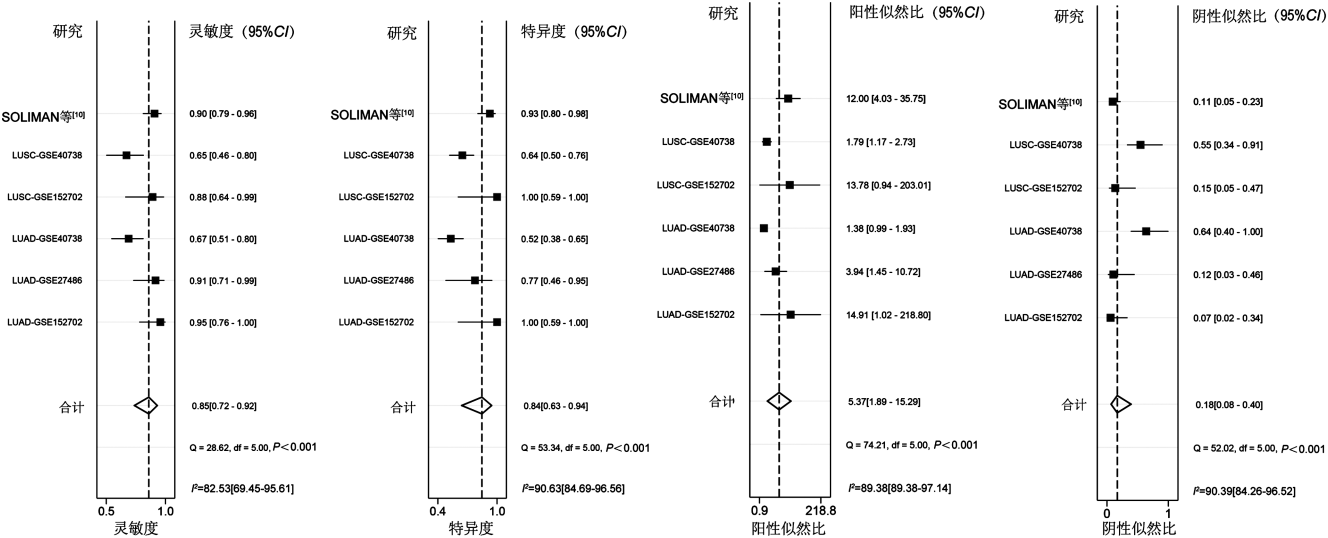
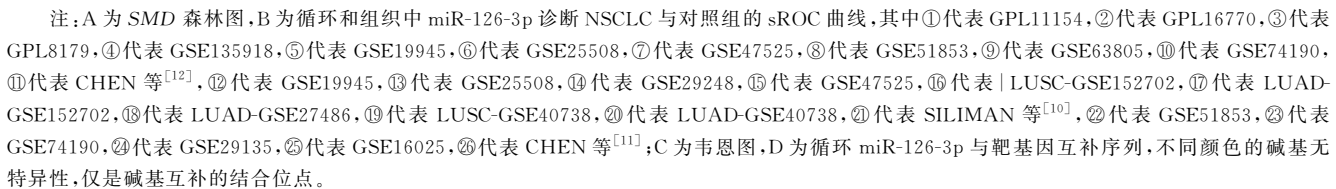
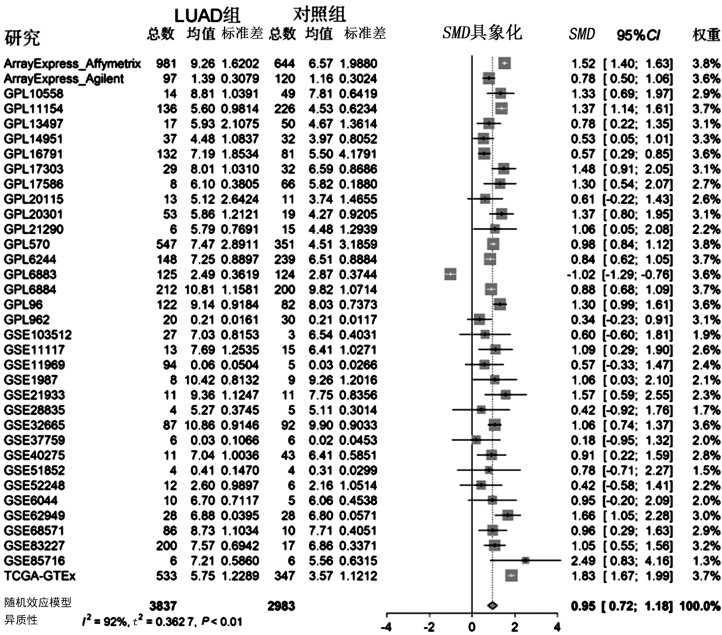


图 4 循环 miR-126-3p 检测 NSCLC 的诊断效能



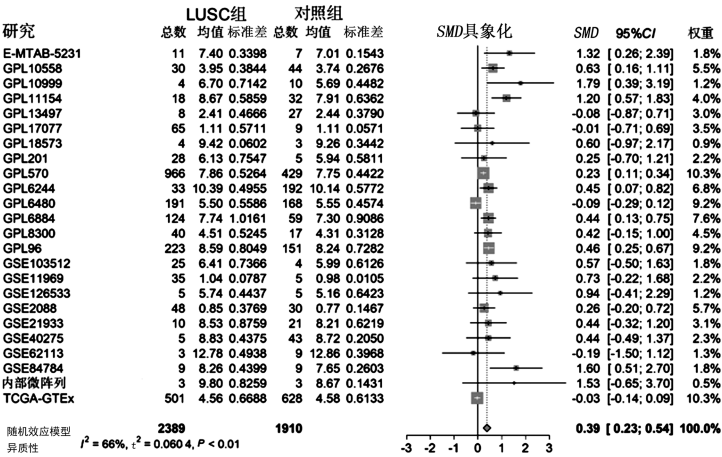
研究	LUAD组			对照组			SMD具象化	SMD	95%CI	权重
	总数	均值	标准差	总数	均值	标准差				
ArrayExpress_Affymetrix	981	8.67	0.6066	644	8.10	0.6489		0.93	[0.82; 1.03]	4.5%
ArrayExpress_Agilent	97	1.32	0.3488	120	1.22	0.3600		0.26	[-0.01; 0.53]	4.1%
GPL10558	14	7.70	0.5916	49	7.70	0.3835		0.00	[-0.59; 0.60]	2.9%
GPL11154	136	6.64	0.6759	226	6.58	0.2695		0.13	[-0.08; 0.34]	4.3%
GPL13497	17	4.87	1.6069	50	4.50	1.4400		0.24	[-0.31; 0.80]	3.0%
GPL14951	37	4.18	0.4200	32	4.38	0.3302		-0.50	[-0.98; -0.02]	3.3%
GPL16791	132	11.01	1.8825	81	11.03	1.3415		-0.01	[-0.29; 0.26]	4.1%
GPL17303	29	9.28	0.5589	32	8.93	0.4817		0.65	[0.14; 1.17]	3.2%
GPL17586	8	7.57	0.1520	66	7.34	0.1529		1.47	[0.69; 2.24]	2.3%
GPL20115	13	3.98	1.5832	11	3.29	0.6116		0.54	[-0.28; 1.36]	2.2%
GPL20301	53	5.28	0.8354	19	5.03	0.7175		0.30	[-0.23; 0.83]	3.1%
GPL21290	6	5.65	0.6785	15	5.77	0.4975		-0.21	[-1.16; 0.74]	1.8%
GPL570	547	8.51	3.6800	351	6.19	3.6574		0.63	[0.49; 0.77]	4.5%
GPL6244	148	9.53	0.6011	239	9.28	0.5903		0.42	[0.21; 0.62]	4.3%
GPL6883	125	2.59	0.1991	124	2.49	0.1575		0.56	[0.30; 0.81]	4.2%
GPL6884	212	7.79	0.8493	200	7.53	0.6682		0.33	[0.14; 0.53]	4.3%
GPL96	122	9.59	0.7587	82	9.52	0.5509		0.10	[-0.18; 0.38]	4.1%
GPL962	20	0.26	0.0279	30	0.26	0.0168		0.00	[-0.56; 0.57]	3.0%
GSE103512	27	6.36	0.7258	3	6.64	0.7204		-0.37	[-1.56; 0.83]	1.3%
GSE11117	13	2.16	3.8809	15	3.57	4.5135		-0.32	[-1.07; 0.42]	2.4%
GSE11969	94	0.04	0.1087	5	-0.04	0.0222		0.69	[-0.21; 1.60]	1.9%
GSE1987	8	8.69	0.5314	9	8.58	0.8306		0.14	[-0.82; 1.09]	1.8%
GSE21933	11	8.16	0.7372	11	8.05	0.6976		0.14	[-0.70; 0.97]	2.1%
GSE28835	4	8.97	0.4587	5	9.05	0.2706		-0.21	[-1.53; 1.11]	1.2%
GSE32665	87	8.83	0.5900	92	9.16	0.3967		-0.66	[-0.97; -0.36]	4.0%
GSE37759	6	-0.10	0.0459	6	-0.02	0.0462		-1.57	[-2.94; -0.21]	1.1%
GSE40275	11	8.66	0.6724	43	8.73	0.2038		-0.20	[-0.86; 0.47]	2.6%
GSE51852	4	1.71	0.4655	4	1.07	0.1079		1.64	[-0.14; 3.43]	0.7%
GSE52248	12	7.47	0.4953	6	7.25	0.3163		0.47	[-0.53; 1.47]	1.7%
GSE6044	10	6.90	0.5197	5	6.10	0.5254		1.45	[0.22; 2.69]	1.3%
GSE62949	28	6.71	0.0270	28	6.68	0.0362		1.12	[0.55; 1.68]	3.0%
GSE68571	86	8.44	0.7674	10	8.59	0.3683		-0.20	[-0.85; 0.46]	2.7%
GSE83227	200	4.24	0.5141	17	4.18	0.2643		0.12	[-0.38; 0.61]	3.3%

图 6 整合计算 LUAD 中循环 miR-126-3p 潜在靶基因 ADAM9 表达水平



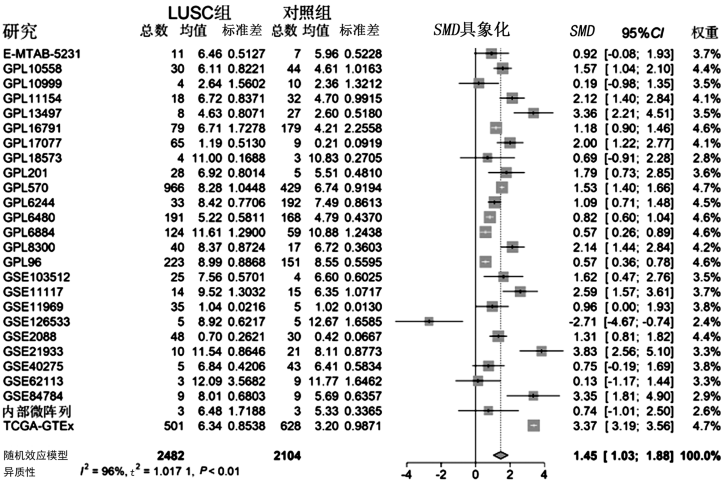
注:SMD 具象化是指 SMD、权重、95%CI 在图形上的体现,方块位置为 SMD,方块大小代表权重,横线代表 95%CI,菱形为总 SMD;直线为无效线,跨过直线为差异无统计学意义。

图 7 整合计算 LUAD 中循环 miR-126-3p 潜在靶基因 SLC7A5 表达水平



注:SMD 具象化是指 SMD、权重、95%CI 在图形上的体现,方块位置为 SMD,方块大小代表权重,横线代表 95%CI,菱形为总 SMD;直线为无效线,跨过直线为差异无统计学意义。

图 8 整合计算 LUSC 中循环 miR-126-3p 潜在靶基因 ADAM9 表达水平



注:SMD 具象化是指 SMD、权重、95%CI 在图形上的体现,方块位置为 SMD,方块大小代表权重,横线代表 95%CI,菱形为总 SMD;直线为无效线,跨过直线为差异无统计学意义。

图 9 整合计算 LUSC 中循环 miR-126-3p 潜在靶基因 SLC7A5 表达水平

3 讨 论

NSCLC 的早期诊断仍然是一项巨大的挑战,临床上多数 NSCLC 患者被发现时已为晚期,做到 NSCLC 的早期诊断能有效提高患者的预后和生活质量。本研究首次结合多中心多平台数据集,明确了循环 miR-126-3p 在 199 例 NSCLC 中表达下调,并结合组织,整合 1 320 例 NSCLC 循环和组织样本进一步证实了 NSCLC 患者中低表达的循环 miR-126-3p 具有较高的诊断潜能。此外,本研究首次结合全球大数据挖掘出循环 miR-126-3p 的两个潜在靶基因 ADAM9 和 SLC7A5,分别在 6 226 例和 6 319 例 NSCLC 样本中呈高表达。本研究有助于分析循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中的潜在分子机制,探讨循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中高准确性筛查的潜在价值。

目前,已有众多研究表明循环 miR-126-3p 在多种癌症中特异表达,提示疾病恶性发展的可能性。有研究表明,在高级别浆液性卵巢癌循环中,循环 miR-126-3p 被鉴定为最稳定的 miR^[14]。相较于健康献血者和前列腺癌患者,循环 miR-126-3p 在膀胱癌患者中表达更低,是识别和区分泌尿生殖系统的潜在工具^[15]。当然,除了直接检测循环中 miR-126-3p 表达,此前还有研究者报道了血浆外囊泡中循环 miR-126-3p 可作为膀胱癌的诊断生物标志物^[16]。这说明循环 miR-126-3p 是重要液体样本检测指标之一。而在早期的 NSCLC 中,循环 miR-126-3p 在血清和血清外泌体中表达均低于健康对照^[17]。循环 miR-126-3p 表达水平的下降与 LUAD 病理分期差、肿瘤最大径大、有淋巴结转移相关,这提示循环 miR-126-3p 可能是能够预测 LUAD 发展严重程度的潜在靶基因^[18]。暴露空气污染条件下,循环 miR-126-3p 作为差异表达基因,其失调提示患者有肺癌的潜在患病风险^[19]。对此,本研究首次利用多水平多中心的数据库,系统地分析和评估了循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中的下调状态和较高的区分潜能,作为抑癌基因,其结果与前人研究结果相符^[10]。而 miR 的稳定、可重复和一致性的特点,为循环 miR-126-3p 是 NSCLC 的潜在生物标志物提供了更全面的理论依据,为开发新的 NSCLC 治疗策略提供了新的思路。

ADAM9 和 SLC7A5 是低表达的循环 miR-126-3p 的潜在靶标。作为处于下调状态循环 miR-126-3p 的靶基因,ADAM9 在达拉非尼耐药的黑色素瘤中上调促进细胞增殖和侵袭性,同时也会增强细胞对于达拉非尼的耐药性,因此,通过调节循环 miR-126-3p 从而沉默 ADAM9 可能是治疗达拉非尼耐药下黑色素瘤的潜在治疗方案^[20]。在较大的肿瘤及具有甲状腺外浸润的肿瘤样本和高危组甲状腺癌中表达显著降低的循环 miR-126-3p 能够通过过表达直接靶向抑制 ADAM9 和 SLC7A5 表达水平,进而抑制甲状腺癌细胞的生长和转移^[21]。基质金属蛋白酶 2 响应肽结合

循环 miR-126-3p 构建,并进一步伪装红细胞膜,能够通过靶向 ADAM9 有效诱导肺癌细胞凋亡并抑制 LUAD 的发生和进展,其中下调的循环 miR-126-3p 在 LUAD 中是高表达 ADAM9 的负调节因子^[22]。本研究也通过大样本证实了 ADAM9 和 SLC7A5 在 NSCLC 中高表达,并研究了循环 miR-126-3p 与靶基因的碱基互补序列关系,进一步证实了在 NSCLC 中,低表达的循环 miR-126-3p 可能作用于高表达的 ADAM9 和 SLC7A5 进而调节 NSCLC 的发生发展。

循环 miR-126-3p 的低表达可能与 DNA 甲基化相关。有研究表明,循环 miR-126-3p 的启动子甲基化相关表达被确定为 LUAD 组织中差异调控的 miR 中下调最显著的 miR 之一^[22]。表观遗传学修饰是指在不改变 DNA 序列的情况下发生可遗传和可逆的基因表达变化,甲基化作为其中的重要途径,对于生物学行为的调节起着重要作用,抑癌基因高甲基化事件的发生,可能表达会受到沉默,从而促进肿瘤的发生、发展,其中 DNA 甲基化可通过超甲基化 miR 启动子区域中的 CpG 岛从而抑制 miR 转录,降低 miR 表达水平,进而导致调控的靶基因表达上调^[23-24]。多囊卵巢综合征中存在一种有趣的甲基化现象,循环 miR-126-3p 启动子的甲基化会导致其表达下调,而相应的调控靶基因 SLC7A5 却是上调的,这一发现对于深入理解多囊卵巢综合征的发病机制具有重要意义^[24]。高糖和 DNMT1 过表达会增加人脐静脉内皮细胞中的 DNA 甲基化水平,从而可能通过降低循环 miR-126-3p 启动子活性,进而抑制循环 miR-126-3p 表达水平^[25]。本研究下调的循环 miR-126-3p 的靶基因恰恰是高表达的 ADAM9 和 SLC7A5,这提示循环 miR-126-3p 与 ADAM9 和 SLC7A5 之间的调控可能与甲基化相关。但目前循环 miR-126-3p 与 DNA 甲基化之间的表观遗传作用关系仍不清楚,有待深入探索,这一领域的深入探究将为低表达的循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中引发的不良调控关系提供了更全面的理论依据。

本研究的多中心数据分析弥补了其他研究类型数据的不足,并独立且系统地评估了循环 miR-126-3p 的临床应用价值。但本研究仍存在一定的局限性,例如循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中的表达和区分能力仍需要大量 NSCLC 循环样本进一步验证。针对循环 miR-126-3p 与潜在靶基因 ADAM9 和 SLC7A5 之间相关性也有待大量样本验证,同时循环 miR-126-3p 在 NSCLC 中调节靶基因的潜在生物学机制,可借助实验进一步研究。

综上所述,本研究通过多中心数据证实了循环 miR-126-3p 表达水平在 NSCLC 样本中下调,循环 miR-126-3p 可能是 NSCLC 高准确性筛查的潜在生物标志物。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[2] WU F, WANG L, ZHOU C. Lung cancer in China: current and prospect[J]. *Curr Opin Oncol*, 2021, 33(1): 40-46.

[3] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590.

[4] RELLI V, TREROTOLA M, GUERRA E, et al. Abandoning the notion of non-small cell lung cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(7): 585-594.

[5] SUN J, WU S, JIN Z, et al. Lymph node micrometastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 149(1): 112817.

[6] ZOU R, LOKE S Y, TANG Y C, et al. Development and validation of a circulating microRNA panel for the early detection of breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2022, 126(3): 472-481.

[7] LIU H P, LAI H M, GUO Z. Prostate cancer early diagnosis: circulating microRNA pairs potentially beyond single microRNAs upon 1231 serum samples[J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(3): bbaa111.

[8] 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.

[9] DI PAOLO D, PONTIS F, MORO M, et al. Cotargeting of miR-126-3p and miR-221-3p inhibits PIK3R2 and PTEN, reducing lung cancer growth and metastasis by blocking AKT and CXCR4 signalling[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(11): 2969-2988.

[10] SOLIMAN S E, ABDELALEEM A H, ALHANAFY A M, et al. Circulating miR-21-5p and miR-126-3p: diagnostic, prognostic value, and multivariate analysis in non-small-cell lung cancer[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(3): 2543-2552.

[11] CHEN S W, LU H P, CHEN G, et al. Downregulation of miRNA-126-3p is associated with progression of and poor prognosis for lung squamous cell carcinoma[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(8): 1624-1641.

[12] CHEN P, GU Y Y, MA F C, et al. Expression levels and co-targets of miRNA-126-3p and miRNA-126-5p in lung adenocarcinoma tissues: alphan exploration with RT-qPCR, microarray and bioinformatic analyses[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(2): 939-953.

[13] HOU W, LI G S, GAO L, et al. SYNJ2 is a novel and potential biomarker for the prediction and treatment of cancers: from lung squamous cell carcinoma to pan-cancer[J]. *BMC Med Genomics*, 2022, 15(1): 114.

[14] PETERSEN P H D, LOPACINSKA-JORGENSEN J, HOGDALL C K, et al. Identification of stably expressed microRNAs in plasma from high-grade serous ovarian carcinoma and benign tumor patients[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(12): 10235-10247.

[15] SEQUEIRA J P, BARROS-SILVA D, FERREIRA-TORRE P, et al. OncoUroMiR: circulating miRNAs for detection and discrimination of the main urological cancers using a ddPCR-based approach[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 13890.

[16] SABO A A, BIROLO G, NACCARATI A, et al. Small non-coding RNA profiling in plasma extracellular vesicles of bladder cancer patients by next-generation sequencing: expression levels of miR-126-3p and piR-5936 increase with higher histologic grades[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(6): 1507.

[17] WU Q, YU L, LIN X, et al. Combination of serum miRNAs with serum exosomal miRNAs in early diagnosis for non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12(1): 485-495.

[18] CHEN Q, HU H, JIAO D, et al. miR-126-3p and miR-451a correlate with clinicopathological features of lung adenocarcinoma: the underlying molecular mechanisms[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 909-917.

[19] SIMA M, ROSSNEROVA A, SIMOVA Z, et al. The impact of air pollution exposure on the microRNA machinery and lung cancer development[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(1): 60.

[20] CAPORALI S, AMARO A, LEVATI L, et al. miR-126-3p down-regulation contributes to dabrafenib acquired resistance in melanoma by up-regulating ADAM9 and VEGF-A[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 272.

[21] XIONG Y, KOTIAN S, ZEIGER M A, et al. miR-126-3p inhibits thyroid cancer cell growth and metastasis, and is associated with aggressive thyroid cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0130496.

[22] LIANG L, CEN H, HUANG J, et al. The reversion of DNA methylation-induced miRNA silence via biomimetic nanoparticles-mediated gene delivery for efficient lung adenocarcinoma therapy[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 186.

[23] MUNTEANU R, TOMULEASA C, IUGA C A, et al. Exploring therapeutic avenues in lung cancer: the epigenetic perspective[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(22): 5394.

[24] MAO Z, LI T, ZHAO H, et al. Identification of epigenetic interactions between microRNA and DNA methylation associated with polycystic ovarian syndrome[J]. *J Hum Genet*, 2021, 66(2): 123-137.

[25] XUE W, ZHANG Q, CHEN Y, et al. Hydrogen sulfide improves angiogenesis by regulating the transcription of pri-miR-126 in diabetic endothelial cells[J]. *Cells*, 2022, 11(17): 2651.