

• 短篇论著 •

多指标联合血浆 miRNA-574-3p、miRNA-941 在肺结节鉴别诊断中的临床应用研究*

张雨馨¹, 杨蕊菲¹, 王战争^{1,2}, 张乔盟¹, 覃丹娜¹, 冯飞雪^{1,2}, 马艳侠^{2△}

1. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学附属医院检验科, 陕西咸阳 712000

摘要:目的 分析结节直径、毛刺征、癌胚抗原(CEA)、鳞状上皮细胞癌抗原(SCC)、胃泌素释放肽前体(ProGRP)、细胞角蛋白 19 片段水平(CYFRA21-1)联合血浆微小 RNA(miRNA)-574-3p、miRNA-941 在肺结节患者中的鉴别诊断价值。方法 选取 2022 年 10 月至 2023 年 10 月陕西中医药大学附属医院收治的肺结节患者 167 例, 经病理诊断的肺癌患者 85 例作为肺癌组, 良性肺结节患者 82 例作为良性结节组, 另选择同期于陕西中医药大学附属医院行体格检查的 83 例健康者作为对照组。比较两组患者结节直径、毛刺征、CEA、SCC、ProGRP、CYFRA21-1 及血浆 miRNA-574-3p、miRNA-941 水平, 通过多因素 Logistic 回归分析影响肺癌患者的独立危险因素, 计算出诊断模型, 采用受试者工作特征(ROC)曲线对模型的诊断效能进行评价。结果 肺癌组与良性结节组结节直径和有毛刺征比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 肺癌组 CEA、CYFRA21-1、miRNA-574-3p、miRNA-941 水平高于良性结节组和对照组($P < 0.05$), 良性结节组 CYFRA21-1 水平高于对照组($P < 0.05$), 肺癌组和良性结节组 ProGRP 水平高于对照组($P < 0.05$)。结节直径、毛刺征、CEA、miRNA-574-3p、miRNA-941 是肺癌的独立危险因素($P < 0.05$), 诊断模型为 $Y = e^X / (1 + e^X)$, 其中 $X = -4.702 + (0.85 \times \text{结节直径}) + (1.505 \times \text{毛刺征}) + (0.183 \times \text{CEA}) + (0.402 \times \text{miRNA-574-3p}) + (0.525 \times \text{miRNA-941})$ 。该模型诊断肺癌的曲线下面积为 0.965, 均大于 CEA、miRNA-574-3p、miRNA-941 单项检测及 miRNA-574-3p 和 miRNA-941 二者联合检测($P < 0.05$)。结论 由结节直径、毛刺征、CEA、miRNA-574-3p 和 miRNA-941 组成的模型对肺癌具有较高的诊断价值, 基于以上指标建立的肺癌诊断模型可明显提升诊断效能。

关键词: 肺癌; 癌胚抗原; 微小 RNA; 结节直径; 毛刺征**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.24.020**中图法分类号:** R563**文章编号:** 1673-4130(2024)24-3045-04**文献标志码:** A

肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。肺癌的发生发展易受如环境暴露、遗传等多种因素的影响。因此, 肺癌患者往往在确诊时已处于中晚期, 给治疗带来很大困难, 且患者预后较差^[2-3]。

肺结节不等同于肺癌, 它是肺癌的早期表现, 良性肺结节多数情况下无需特殊治疗, 而恶性肺结节如不及时诊断干预可能会导致疾病的恶化和转移, 对人体健康造成严重危害^[4]。准确鉴别肺结节的良恶性, 一方面能减少患者焦虑, 另一方面更有利于医生早期明确治疗方案, 提高恶性肺结节患者的生存率。CT 影像特征是判断肺结节良恶性非常重要的依据, 但对于亚厘米级的肺结节, 单纯依靠 CT 很难对病变的良恶性进行准确定性^[5]。病理诊断作为疾病诊断的金标准, 特异度高, 但属于有创检查手段, 患者接受度低, 诊断假阴性率高^[6]。现有的肺癌血清肿瘤标志物早期诊断阳性率、灵敏度和特异度不高, 存在一定的限制^[7]。近年来, 不少研究发现血清微小 RNA(miRNA)的表达水平和肺癌的诊断和预后密切相关, 有望

单独或者联合现有标志物作为肺癌诊断和预后判断的新方法^[8-10]。本研究旨在应用结节直径、毛刺征、癌胚抗原(CEA)、miRNA-574-3p、miRNA-941 等建立联合诊断模型, 并评价其在肺结节鉴别诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取陕西中医药大学附属医院 2022 年 10 月至 2023 年 10 月肺结节患者 167 例作为研究对象, 其中经病理确诊的肺癌患者 85 例作为肺癌组, 良性肺结节患者 82 例作为良性肺结节组, 选取同期体检健康者 83 例作为对照组。肺癌组中, 男 43 例, 女 42 例; 年龄 45~83 岁, 平均 (66.36 ± 8.92) 岁; 吸烟 36 例。良性肺结节组中, 男 41 例, 女 41 例; 年龄 44~90 岁, 平均 (65.76 ± 11.75) 岁; 吸烟 32 例。对照组中, 男 37 例, 女 46 例; 年龄 50~90 岁, 平均 (69.73 ± 9.32) 岁; 吸烟 29 例。3 组性别、吸烟史、平均年龄比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经陕西中医药大学附属医院医学伦理学委员会审查

* 基金项目: 2023 年陕西省大学生创新创业训练计划项目(202310716030); 陕西中医药大学 2024 年度研究生课程教材建设项目(KCJ202407)。

△ 通信作者, E-mail: 13991038586@163.com。

批准[SZFYIEC-PJ-2023 年第(206)号]。患者或家属签署知情同意书。

纳入标准:(1)胸部 CT 显示不确定的肺结节;(2)结节的良恶性有明确病理诊断结果;(3)入院前均未接受任何肿瘤相关性手术、放化疗及其他肿瘤相关治疗。排除标准:(1)肿瘤广泛全身性转移或者合并其他部位有肿瘤;(2)合并其他肺部疾病;(3)结节内有明显空洞、明显钙化、脂肪及坏死成分;(4)血液标本被污染或溶血、脂血等原因导致血液标本不合格;(5)存在感染或妊娠期;(6)CT 扫描影像特征不清晰、报告描述不完整;(7)心、肝、肾等其他器官功能障碍。

1.2 仪器与试剂 miRNA-574-3p、miRNA-941 检测使用 ABI7500 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪,试剂购自北京天根生化科技有限公司。血清 CEA、鳞状上皮细胞癌抗原(SCC)、胃泌素释放肽前体(ProGRP)、细胞角蛋白 19 片段水平(CYFRA21-1)检测使用美国雅培公司全自动化学发光免疫分析仪(ARCHITECT i4000sr 型)及配套试剂。胸部 CT 检查使用美国 GE 公司 Apex CT。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 所有肺癌患者、肺良性结节患者于入院当天,健康体检者于体检当天,采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管采血 3 mL,干燥管采血 5 mL。抗凝管血液标本 2 h 内处理,4 000 r/min 的速度离心 5 min 后 12 000 r/min 的速度再次离心 5 min,吸取上层血浆于干净 EP 管,−80 ℃冰箱冻存备用。干燥管血液标本室温静置 30 min 后以 3 000 r/min 的速度离心 10 min,分离上层血清。

1.3.2 miRNA-574-3p、miRNA-941 检测 采用生物信息学分析筛选出 2 个肺癌差异 miRNA(miRNA-574-3p、miRNA-941)。采用 miRcute 血清/血浆

miRNA 提取分离试剂对标本血浆中的总 RNA 进行提取,采用 Nano drop 微量分光光度仪对 RNA 浓度及纯度进行检测,采用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 检测,2^{−ΔΔC_t} 法计算 miRNA-574-3p、miRNA-941 水平。

1.3.3 血清 CEA、SCC、ProGRP、CYFRA21-1 检测 采用化学发光法定量测定血清 CEA、SCC、ProGRP、CYFRA21-1。参考区间:CEA 0~5 ng/mL, SCC 0~1.5 ng/mL, ProGRP 0~50 pg/mL, CYFRA21-1 0~2 ng/mL。

1.3.4 胸部 CT 检查 使用 Apex CT 对所有患者行胸部 CT 检查,结果判读由陕西中医药大学附属医院影像科 2 名医师完成,报告包括结节部位、结节直径、结节数量、毛刺征等。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据统计分析。非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验;计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用多因素 Logistic 回归分析影响肺癌的独立危险因素,建立诊断模型,绘制受试者工作特征(ROC)曲线评价诊断模型的诊断效能,计算曲线下面积(AUC)、灵敏度、特异度。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组影像学、血清标志物、2 个 miRNA 指标水平比较 肺癌组与良性结节组结节直径和有毛刺征比较差异有统计学意义($P<0.05$),肺癌组 CEA、CYFRA21-1、miRNA-574-3p、miRNA-941 水平高于良性结节组和对照组($P<0.05$),良性结节组 CYFRA21-1 水平高于对照组($P<0.05$),肺癌组和良性结节组 ProGRP 水平高于对照组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 影像学、血清标志物、2 个 miRNA 指标在 3 组人群中的水平比较[$M(P_{25}, P_{75})$ 或 $n(\%)$]

项目	肺癌组($n=85$)	良性结节组($n=82$)	对照组($n=83$)	H/χ^2	P
结节直径(mm)	29.00(18.00,44.05) ^a	8.50(5.00,15.00)	—	200.959	<0.001
有毛刺征	56(65.9) ^a	11(13.4)	—	53.824	<0.001
CEA(ng/mL)	4.21(2.19,11.09) ^{ab}	2.42(1.62,3.54)	2.24(1.66,3.51)	32.174	<0.001
SCC(ng/mL)	0.70(0.50,1.30)	0.70(0.50,1.00)	0.70(0.50,1.00)	1.865	0.394
ProGRP(ng/mL)	34.52(27.23,47.63) ^b	33.09(24.89,40.86) ^b	19.56(16.21,26.12)	78.646	<0.001
CYFRA21-1(ng/mL)	2.91(1.91,7.49) ^{ab}	1.69(1.30,2.61) ^b	1.58(0.98,1.81)	58.035	<0.001
miRNA-574-3p	1.07(0.47,3.19) ^{ab}	0.52(0.27,0.86)	0.42(0.19,0.80)	34.954	<0.001
miRNA-941	1.59(0.60,4.71) ^{ab}	0.73(0.37,1.39)	0.61(0.25,0.90)	33.684	<0.001

注:与良性结节组比较,^a $P<0.05$;与对照组比较,^b $P<0.05$;—表示无数据。

2.2 肺癌独立危险因素分析 结节直径、毛刺征、CEA、miRNA-574-3p、miRNA-941 为肺癌的独立危险因素($P<0.05$)。见表 2。

2.3 不同指标及模型对肺癌诊断效能的比较 由结果 2.2 可得,以结节直径、毛刺征、CEA、miRNA-574-

3p、miRNA-941 联合建立肺癌诊断模型。诊断模型预测值 $Y=e^X/(1+e^X)$, $X=-4.702+(0.85\times\text{结节直径})+(1.505\times\text{毛刺征})+(0.183\times\text{CEA})+(0.402\times\text{miRNA-574-3p})+(0.525\times\text{miRNA-941})$, 其中有毛刺征表示为 1,无毛刺征表示为 0。通过

ROC 曲线分析,该模型诊断肺癌的 AUC 为 0.965,灵敏度为 93.0%,特异度为 87.8%,最佳截断值为 0.215,约登指数为 0.808,与 CEA、miRNA-574-3p、

miRNA-941 单项检测及 miRNA-574-3p 和 miRNA-941 二者联合检测相比,该模型的诊断效能显著提升($P<0.05$)。见表 3。

表 2 肺癌独立危险因素分析

项目	β	SE	wald χ^2	自由度	P	OR
结节直径	0.074	0.020	13.051	1	<0.001	1.077
有毛刺征	1.588	0.584	7.381	1	0.007	4.893
CEA	0.197	0.066	8.812	1	0.003	1.218
SCC	0.039	0.085	0.206	1	0.650	1.039
ProGRP	0.017	0.010	3.060	1	0.081	1.017
CYFRA21-1	0.017	0.010	1.520	1	0.218	1.017
miRNA-574-3p	0.379	0.160	5.617	1	0.018	1.461
miRNA-941	0.544	0.136	15.962	1	<0.001	1.723

表 3 不同指标及模型对肺癌诊断效能的比较

指标	AUC	95%CI	P	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数
CEA	0.717	0.645~0.788	<0.001	52.3	84.8	0.371
miRNA-574-3p	0.726	0.659~0.793	<0.001	55.8	82.3	0.381
miRNA-941	0.714	0.645~0.784	<0.001	51.2	84.8	0.360
两个 miRNA 联合	0.788	0.727~0.848	<0.001	72.1	74.4	0.465
肺癌早诊预测模型	0.965	0.945~0.985	<0.001	93.0	87.8	0.808

3 讨 论

世界卫生组织 2020 年发布的癌症报告显示,全球新确诊肺癌病例约 200 万例,肺癌死亡病例约 1.76 万例^[11]。在中国,肺癌已成为恶性肿瘤总体死亡顺位的首位,且女性的肺癌病死率更高^[12]。鉴于肺癌诊断给社会和个人带来的经济负担沉重,加之多数患者在确诊时已处于疾病晚期,过去 40 年间,医学界和社会各界共同努力,致力于在肺癌患者仍有机会接受根治性治疗时实现早期诊断^[13-14]。肺结节不等同于肺癌,它是指肺内直径 ≤ 3 cm 的局灶性、类圆形、密度增高的实性或亚实性肺部阴影,肺结节是肺癌的早期表现^[15]。因此,早期鉴别肺结节的良恶性对肺癌的早期诊断具有重要的临床价值^[16]。临床实践中,影像学检查和血清肿瘤标志物检测是肺癌筛查与早期诊断中常用的技术手段^[17]。然而,单纯依赖任何一种检查方法,对肺癌的早期诊断不如人意,并可能受到其他生理与病理因素的干扰^[18]。因此,综合运用多种检查手段,提高肺癌诊断的准确性和检出率,是当前肺癌防治工作的重要方向。

近几年来液体活检技术发展迅速,其运用先进的分子检测技术,对液体标本(特别是血液)进行深入分析,正成为癌症分子图谱分析的重要手段,为精准肿瘤学的发展提供了有力支持^[19-21]。miRNA 是一种长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA(ncRNA),在基因

表达调控中扮演着至关重要的角色,其表达失调与包括癌症在内的多种疾病有关^[22]。有研究表明,多种 miRNA 在癌症的进程中发挥着重要作用,参与肿瘤免疫反应^[23]。基于这些研究成果,科学家们提出了众多潜在的癌症诊断和预后生物标志物,为癌症的早期筛查提供了新的思路 and 方向^[24]。

本研究比较了肺癌组、肺良性结节组、对照组 3 组影像学、血清标志物(CEA、SCC、ProGRP、CYFRA21-1)及 2 个 miRNA(miRNA-574-3p、miRNA-941)的水平差异。CT、血清标志物是目前临床常用的肺癌筛查方法,对肺结节早期良恶性鉴别诊断有一定临床应用价值,本研究结果与之基本相符。肺癌组与良性结节组患者的结节直径和有毛刺征比较差异有统计学意义($P<0.05$),肺癌组 CEA、CYFRA21-1、miRNA-574-3p、miRNA-941 水平高于良性结节组和对照组($P<0.05$),良性结节组 CYFRA21-1 水平高于对照组($P<0.05$),肺癌组和良性结节组 ProGRP 水平高于对照组($P<0.05$)。

本研究多因素 Logistic 回归分析结果显示,结节直径、毛刺征、CEA、miRNA-574-3p、miRNA-941 为肺癌的独立危险因素($P<0.05$),并由此得出肺癌早诊预测模型 $Y=e^X/(1+e^X)$, $X=-4.702+(0.85\times \text{结节直径})+(1.505\times \text{毛刺征})+(0.183\times \text{CEA})+(0.402\times \text{miRNA-574-3p})+(0.525\times \text{miRNA-941})$ 。

该模型最佳截断值为 0.215, 即当模型的诊断预测值 >0.215 时, 则认为待测者患肺癌的可能性较高, 当诊断预测值 <0.215 时, 则认为待测者患肺癌的可能性较低。此外, 本研究继续比较了该模型与 CEA、miRNA-574-3p、miRNA-941 单项指标及 miRNA-574-3p、miRNA-941 二者联合对早期肺癌的诊断效能, 结果显示, 该模型的灵敏度 (93.0%)、特异度 (87.8%)、约登指数 (0.808) 及 AUC (0.965) 都显著高于其他方法, 多种指标联合检测能起到较好的互补作用, 能够满足临床鉴别诊断肺癌的要求, 有利于肺癌的早期诊断。

单项标志物检测均存在一定局限性, 但目前仍然是临床肺癌早期筛查诊断中应用最广泛的方法, 将传统临床标志物联合灵敏度、特异度更高的新型标志物进行诊断, 其准确度、灵敏度及特异度均可能有所提升, 不仅有助于高效确诊疾病及制订合理的治疗方案, 提高诊断效能, 且为肺癌患者的预后改善也奠定了一定基础。此外, 本研究鉴于现有研究样本数量有限, 未来计划通过扩大样本量和实施多中心验证, 来进一步增强结果的可靠性, 为肺癌的早期发现和治疗提供更好的支持。

综上所述, 由结节直径、毛刺征、CEA、miRNA-574-3p 和 miRNA-941 组成的模型对肺癌具有较高的诊断价值, 基于以上指标建立的联合诊断模型可明显提升诊断效能, 为临床医生提供更多的参考依据。

参考文献

[1] THAI A, SOLOMON B, SEQUIST L, et al. Lung cancer [J]. *Lancet* (London, England), 2021, 398 (10299): 535-554.

[2] DE SOUSA VITOR M L, CARVALHO L. Heterogeneity in lung cancer[J]. *Pathobiology*, 2018, 85(1/2): 1-12.

[3] 朱小琪, 司妮平, 付晓宇, 等. 一种新的调控型遗传变异与中国人肺癌发病风险的关系: 两阶段病例-对照研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2021, 42(11): 2053-2059.

[4] 李响, 朱焱宁, 吴卫兵, 等. 肺结节三维空间位置判定方法及临床意义 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2021, 28 (3): 305-310.

[5] 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 老年肿瘤防治专家委员会. 导航引导下经支气管肺结节介入诊断与治疗中国专家共识 [J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(9): 993-999.

[6] NING J, GE T, JIANG M, et al. Early diagnosis of lung cancer: which is the optimal choice [J]. *Aging* (Albany NY), 2021, 13(4): 6214.

[7] 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会. 中国人群肺癌血清标志物临床应用及参考区间建立规范化流程专家共识 [J]. *中国肿瘤临床*, 2021, 48(22): 1135-1140.

[8] KANG J, KIM W, LEE S, et al. TFAP2C promotes lung tumorigenesis and aggressiveness through miR-183-and miR-33a-mediated cell cycle regulation [J]. *Oncogene*,

2017, 36(11): 1585-1596.

[9] 李渊, 何开明, 王超. 肺癌患者血清中 miRNA-144-3p 表达及临床意义 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2022, 27(10): 891-895.

[10] 邵宇峰, 李森, 冯宇, 等. 非小细胞肺癌患者血清中 miRNA-214 的表达及其与预后的关系 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21(18): 1946-1949.

[11] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-791.

[12] ZHU D, SHI X, NICHOLAS S, et al. Estimated annual prevalence, medical service utilization and direct costs of lung cancer in urban China [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(8): 2914-2923.

[13] 白春学. 肺癌的早期筛查与管理: 解决中国肺癌二高一低的利器 [J]. *国际呼吸杂志*, 2019, 39(21): 1601-1603.

[14] LEE E, KAZEROONI E A. Lung cancer screening [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2022, 43(6): 839-850.

[15] 梁铨, 刘梦雯, 张丽, 等. 全球部分地区肺癌发病趋势及年龄变化情况分析 [J]. *中国肿瘤*, 2022, 31(9): 683-692.

[16] 中国中西医结合学会肿瘤专业委员会, 北京中医药学会肿瘤专业委员会肺结节全程管理共识专家组, 杨国旺, 等. 肺结节中西医结合全程管理专家共识 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(1): 149-159.

[17] LELEU O, VINCENT G, AUQUIER M, et al. Predictive factors for the participation of general practitioners in lung cancer screening by low-dose CT scan in the Somme Department in Northern France [J]. *Respir Med Res*, 2020, 77: 95-99.

[18] YAN M, WANG W. A non-invasive method to diagnose lung adenocarcinoma [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 602.

[19] MATTOX A K, BETTEGOWDA C, ZHOU S, et al. Applications of liquid biopsies for cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(507): 1984.

[20] NIKANJAM M, KATO S, KURZROCK R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 131.

[21] AMELIO I, BERTOLO R, BOVE P, et al. Liquid biopsies and cancer omics [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6(1): 131.

[22] HE D, WU D, MULLER S, et al. miRNA-independent function of long noncoding pri-miRNA loci [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(13): e2017562118.

[23] OMAR H A, EL-SERAFI A T, HERSI F, et al. Immunomodulatory microRNAs in cancer: targeting immune checkpoints and the tumor microenvironment [J]. *FEBS J*, 2019, 286(18): 3540-3557.

[24] HE B, ZHAO Z, CAI Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2628.