·论　著·

血清外泌体 miRNA 谱联合肿瘤组织 PD-L1、VEGF 表达预测肺癌抗血管生成治疗反应的价值*

肖芳芳,刘　军,董久兴△

河北中石油中心医院肿瘤科,河北廊坊 065000

摘　要:目的　探讨血清外泌体 miRNA 谱与肿瘤组织程序性死亡配体 1(PD-L1)、血管内皮生长因子(VEGF)表达与肺癌抗血管生成治疗反应的相关性及预测价值,为个体化治疗提供参考依据。**方法**　选取河北中石油中心医院 2022 年 1 月至 2025 年 1 月收治的 288 例肺癌患者,根据抗血管生成治疗反应分为应答组(190 例)与无应答组(92 例)。比较两组临床资料、肿瘤组织 PD-L1、VEGF 表达水平、血清外泌体 miRNA 谱。**结果**　无应答组肿瘤组织 PD-L1、VEGF 阳性表达率高于应答组($P<0.05$),共筛选出 52 个显著相关的差异 miRNA。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证,无应答组 miR-126-5p、miR-let-7c-5p 相对表达量低于应答组($P<0.001$),miR-200b-3p、miR-21-5p、miR-210-3p、miR-155-5p 相对表达量高于应答组($P<0.001$),表达趋势与高通量测序结果完全一致,主要富集于 VEGF、HIF-1 及 PD-L1/PD-1 信号通路;血清 miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p、肿瘤组织 PD-L1、VEGF 是肺癌抗血管生成治疗反应的独立影响因素($P<0.05$);miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p、肿瘤组织 PD-L1、VEGF 联合预测模型的 AUC 显著高于单独指标预测(均 $P<0.001$);该模型的校准度为 0.822,且在 5%～90%广泛的阈概率范围内持续产生临床净获益;内部验证显示,该模型的 AUC 为 0.876(95%*CI*:0.771～0.981),校准度为 0.820,临床净获益范围为 15%～100%。**结论**　miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p 是与肺癌抗血管生成治疗反应相关的 miRNA 标志物,与肿瘤组织 PD-L1、VEGF 联合预测具有高准确性、稳健的泛化能力及显著的临床净获益。

关键词:肺癌;　抗血管生成;　治疗反应;　血清外泌体 miRNA;　程序性细胞死亡蛋白 1 配体;　血管内皮生长因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.18.009　　**中图法分类号:**R734.2

文章编号:1673-4130(2026)18-2229-09　　**文献标识码:**A

Value of serum exosomal miRNA profile combined with the expression of PD-L1 and VEGF in tumor tissues in predicting the response of lung cancer to anti-angiogenesis therapy*

Xiao Fangfang, Liu Jun, Dong Jiuxing△

Department of Oncology, Hebei PetroChina Central Hospital, Langfang, Hebei 065000, *China*

Abstract: Objective　To explore the correlation of serum exosomal miRNA profile with the expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissues and the response to anti-angiogenic therapy in lung cancer, as well as their predictive value, so as to provide reference basis for individualized treatment. **Methods**　Lung cancer patients treated in Hebei PetroChina Central Hospital from January 2022 to January 2025 were enrolled. According to the response to anti-angiogenic therapy, the patients were divided into the responder group (190 cases) and the non-responder group (92 cases). Clinical data, expression levels of PD-L1 and VEGF in tumor tissues, and serum exosomal miRNA profile were compared between the two groups. **Results**　The positive expression rates of PD-L1 and VEGF in tumor tissues in the non-responder group were higher than those in the responder group ($P<0.05$). A total of 52 significantly correlated differential miRNAs were screened out. Verified by RT-qPCR, the relative expression levels of miR-126-5p and miR-let-7c-5p in the non-responder group were lower than those in the responder group ($P<0.001$), while the relative expression levels of miR-200b-3p, miR-21-5p, miR-210-3p and miR-155-5p were higher than those in the responder group ($P<0.001$). The expression trends were completely consistent with the results of high-throughput sequencing, and these miRNAs were mainly enriched in VEGF, HIF-1 and PD-

* **基金项目:**河北省医学科学研究课题计划项目(20251476)。

作者简介:肖芳芳,女,副主任医师,主要从事肿瘤内科方面的研究。　△ **通信作者**,E-mail:dong-jx@sina.com。

L1/PD-1 signaling pathways. Serum miR-126-5p, miR-21-5p, miR-210-3p, tumor tissue PD-L1 and VEGF were independent influencing factors for the response to anti-angiogenic therapy in lung cancer ($P<0.05$). The combined prediction model constructed by miR-126-5p, miR-21-5p, miR-210-3p, tumor tissue PD-L1 and VEGF yielded corresponding AUC values Significantly higher than predicted by individual indicators (all $P<0.001$). The calibration of this model was 0.822, and it continuously produced clinical net benefit within a wide threshold probability range of 5%－90%. Internal validation showed that the AUC of the model was 0.876 (95%*CI*: 0.771－0.981), the calibration was 0.820, and the range of clinical net benefit was 15%－100%. **Conclusion**　miR-126-5p, miR-21-5p and miR-210-3p are miRNA biomarkers associated with the response to anti-angiogenic therapy in lung cancer. Combined prediction with tumor tissue PD-L1 and VEGF presents high accuracy, robust generalization ability and significant clinical net benefit.

Key words: lung cancer;　anti-angiogenesis;　treatment response;　serum exosomal miRNA;　programmed death-ligand 1;　vascular endothelial growth factor

肺癌是全世界范围内高发性恶性肿瘤，具有高发病率、高病死率及年轻化发展趋势[1]。抗血管生成联合化疗是延长晚期肺癌患者无进展生存期和总生存期的重要治疗手段，但其治疗反应存在显著个体差异，部分患者难以获益，病情无法得到有效控制[2-3]。因此，亟须寻找精准预测疗效的生物标志物，指导个体化治疗。肿瘤组织程序性死亡配体 1(PD-L1)是反映肿瘤免疫微环境状态的分子标志物，血管内皮生长因子(VEGF)是评估血管生成情况的核心分子，已成为临床研究的关键指标[4-5]。然而，二者单独作为预测工具时存在时空异质性、难以动态监测的局限，亟须一种能克服组织异质性、实现无创动态监测的循环标志物。血清外泌体作为细胞间通讯的关键载体，其携带的微小核 RNA(miRNA)谱能反映来源细胞的分子特征[6]。相关研究表明，血清外泌体 miRNA 谱能够连接肿瘤微环境与机体系统循环，参与调控肿瘤 PD-L1、VEGF 等信号通路[7-8]。基于上述分析提出科学假设：血清外泌体 miRNA 谱能作为生物标志物用于预测肺癌患者抗血管生成治疗反应。为此，本研究探讨血清外泌体 miRNA 谱与肿瘤组织 PD-L1、VEGF 表达在预测肺癌抗血管生成治疗反应中的价值，旨在构建并验证一个联合预测模型，为临床精准决策提供新思路。现报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取本院 2022 年 1 月至 2025 年 1 月收治的 288 例肺癌患者作为研究对象。纳入标准：(1)均经病理活检证实为肺癌；(2)均属于非小细胞肺癌[9]；(3)临床分期Ⅲ～Ⅳ期；(4)均为首次确诊，参与本研究前未接受任何抗肿瘤治疗和抗血管生成治疗。排除标准：(1)合并其他恶性肿瘤的患者；(2)属于肿瘤复发的患者；(3)患有免疫疾病、血液疾病的患者；(4)患有全身感染性疾病的患者；(5)合并心、肝、肾功能异常的患者；(6)合并严重心、脑、肝、肾等主要脏器器质性病变的患者；(7)精神异常、认知障碍的患者。患者及家属均签署知情同意书。本研究经本院伦理委员会审批通过[院科伦审：(2021)伦审第(00061)号]。

1.2　方法

1.2.1　治疗方法　(1)根据患者实际病情选择给予贝伐珠单抗(第 1 天静脉滴注，剂量为 15 mg/kg，21 天/次)、重组人血管内皮抑制素(第 1～14 天静脉持续泵注，剂量为 7.5 mg/m^2)及口服多靶点酪氨酸激酶抑制剂(TKI)等抗血管生成药物。(2)含铂双药化疗，腺癌给予培美曲塞＋顺铂/卡铂，鳞癌给予紫杉醇/吉西他滨＋顺铂/卡铂，21 d 为 1 个周期，均持续治疗 4 个周期。(3)根据 PD-L1 表达状态及患者实际情况选择是否联合免疫治疗。

1.2.2　血清外泌体 miRNA 谱检测方法　于所有患者入院次日清晨于无抗凝剂采血管中采集空腹外周血 10 mL，3 000×g 的转速离心 10 min，取血清置于无 RNA 酶离心管中，保存至－80 ℃冰箱内，避免反复冻融，批量待测。将冻存的血清解冻，采用差速离心结合超速离心法提取血清外泌体：采用 PBS 稀释血清，依次行 300×g、2 000×g、10 000×g 离心去除细胞与碎片，再以 110 000×g 超速离心 70 min，沉淀外泌体。利用 TRIzol LS 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司，货号：10296028)与外泌体 RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司，货号：217184)提取总 RNA，测定 RNA 浓度与纯度(NanoDrop 微量分光光度计)和评估 RNA 完整性(Agilent 2100 生物分析仪)。对发现队列样本($n=40$，其中应答组与无应答组各 20 例)使用 Illumina NextSeq 平台(美国 Illumina 公司)进行 miRNA 文库构建与 2×150 bp 测序，采用 DESeq2 软件包进行差异表达分析，筛选标准为：Log_2(Fold Change)绝对值＞1 且校正后 $P<0.05$。为验证高通量测序结果的可靠性，从差异表达的 miRNA 中选择候选 miRNA 进行验证，选择依据：(1)差异表达倍数在 2.0 倍以上；(2)与 VEGF 通路、PD-L1/PD-1 轴或肺癌预后相关。采用茎环法逆转录引物和 SYBR

Green 试剂盒(日本 TaKaRa 公司,货号:RR036A),在 QuantStudio 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)仪上进行 qRT-PCR 扩增,反应条件:95 ℃ 10 min,40 个循环(95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min),以 U6 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。每个样品设 3 个技术复孔,实验进行严格质控:要求内参 U6 的 Ct 值在样本间变异小于 1 个循环,且复孔间 Ct 值的变异系数<5%。

1.2.3 肿瘤组织 PD-L1、VEGF 检测方法　采用行病理活检穿刺获取的包含代表性肿瘤区域的石蜡包埋肿瘤组织标本进行 PD-L1、VEGF 的免疫组化法检测,连续切片,厚度为 4 μm,常规脱蜡、水化盒抗原热修复。采用 PD-L1 抗体(克隆号 22C3,Dako/Agilent,货号:SK006)在 Dako Autostainer Link 48 全自动免疫组化染色平台上进行操作,严格按照说明书。采用鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(克隆号 JH121,Santa Cruz Biotechnology,货号:sc-7269),工作浓度 1∶100,EnVision 二步法染色。以已知 PD-L1/VEGF 阳性的肺癌组织切片,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判读:于高倍镜(×400)下观察每个组织切片中的 5 个视野,计数呈明确细胞膜染色的肿瘤细胞,PD-L1、VEGF 阳性细胞比例评分:阳性细胞比例≤10%为 0 分,>10%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,≥50%~75%为 3 分;>75%为 4 分;PD-L1、VEGF 染色强度评分:无可见染色为 0 分,呈浅黄色(弱阳性)为 1 分,呈棕黄色(中等阳性)为 2 分;呈棕褐色为 3 分。以阳性细胞比例评分与染色强度评分的乘积为最终评分,范围为 0~12 分,PD-L1 最终评分≥5 分判定为阳性,VEGF 最终评分≥3 分判定为阳性。由两名资深病理医师在双盲情况下独立评估,意见不一致时通过共同显微镜下复核协商达成一致。

1.3 抗血管生成治疗反应标准　根据实体瘤疗效评价标准[10]于治疗 4 个周期结束后 4 周时判定抗血管生成治疗反应,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(PD),将 CR+PR 纳入应答组,SD+PD 纳入无应答组。

1.4 统计学处理　采用 SPSS26.0 统计学软件进行数据分析。计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验;计量资料行 Kolmogorov-Smirnov 正态性检验,均确认符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间计量资料比较采用独立样本 t 检验;采用 Lasso 回归分析和 10 折交叉验证选取模型误差最小时的 λ 值,筛选出具有最强预测能力的非零系数变量;Logistic 回归分析独立影响因素;受试者工作特征(ROC)曲线、校正曲线、临床决策(DCA)曲线分析预测模型的预测价值,曲线下面积(AUC)比较采用 De-long 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。应用 DAVID 数据库 6.8 对预测靶基因进行 GO 功能富集与 KEGG 通路分析,超几何分布检验(Fisher 精确检验)计算富集显著性,以 Benjamini-Hochberg 校正后 $P<0.05$ 为显著阈值。

2 结　果

2.1 两组临床资料比较　共 282 例肺癌患者完成 4 个周期的治疗,其中应答 190 例(CR 1 例,PR 189 例)无应答 92 例(SD 41 例,PD 51 例)。两组性别、年龄、体重指数(BMI)、吸烟史、病理类型、ECOG 体力状况评分、肿瘤最大径、抗血管生成药物、联合治疗方案比较,差异无统计学意义($P>0.05$);无应答组临床分期Ⅳ期占比、血清癌胚抗原(CEA)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA 21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)高于应答组($P<0.05$)。见表 1。

2.2 两组肿瘤组织 PD-L1、VEGF 表达情况比较　无应答组肿瘤组织 PD-L1、VEGF 阳性表达率高于应答组($P<0.05$)。见表 2。

表 1　两组临床资料比较[n/n 或 $\bar{x}\pm s$ 或 n(%)]

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	BMI(kg/m²)	吸烟史	病理类型	
						腺癌	鳞癌
无应答组	92	60/32	62.18±5.31	23.43±1.77	64(69.57)	89(96.74)	3(3.26)
应答组	190	121/69	61.59±5.09	23.14±1.58	133(70.00)	185(97.37)	5(2.63)
χ^2/t		0.063	0.900	1.389	0.006	0.007	
P		0.801	0.369	0.166	0.941	0.933	

组别	n	ECOG 体力状况评分		临床分期		肿瘤最大径(cm)	CEA(ng/mL)
		0~1 分	≥2 分	Ⅲ期	Ⅳ期		
无应答组	92	80(86.96)	12(13.04)	21(22.83)	71(77.17)	4.51±1.26	38.27±12.77
应答组	190	169(88.95)	21(11.05)	67(35.26)	123(64.74)	4.38±1.13	23.50±7.18
χ^2/t		0.238		4.466		0.872	12.411
P		0.626		0.035		0.384	<0.001

续表 1　两组临床资料比较[n/n 或 $\bar{x}\pm s$ 或 n(%)]

组别	n	抗血管生成药物			联合免疫治疗	CYFRA 21-1 (ng/mL)	NSE (ng/mL)
		贝伐珠单抗	重组人血管内皮抑制素	口服多靶点 TKI			
无应答组	92	65(70.65)	10(10.87)	17(18.48)	26(28.26)	6.75±2.21	19.48±5.06
应答组	190	137(72.11)	24(12.63)	29(15.26)	57(30.00)	4.19±1.37	15.33±4.49
χ^2/t			0.365		0.090	11.930	6.977
P			0.715		0.764	<0.001	<0.001

表 2　两组肿瘤组织 PD-L1、VEGF 表达情况比较[n(%)]

组别	n	PD-L1		VEGF	
		阳性	阴性	阳性	阴性
无应答组	92	60(65.22)	32(34.78)	77(83.70)	15(16.30)
应答组	190	64(33.68)	126(66.32)	85(44.74)	105(55.26)
χ^2		25.018		38.486	
P		<0.001		<0.001	

2.3　两组血清外泌体 miRNA 谱比较　首先对发现队列(n=40,其中应答组与无应答组各 20 例)的血清外泌体样本进行 miRNA 高通量测序,成功构建应答组与无应答组的血清外泌体 miRNA 表达谱。通过生物信息学分析共筛选出 52 个在两组间存在显著差异表达的已知 miRNA,其中 24 个 miRNA 在无应答组中表达上调,28 个 miRNA 在无应答组中表达下调。其中差异表达倍数排名前 10 的 miRNA 见表 3。为验证高通量测序结果的可靠性,从差异表达的 miRNA 中选择 6 个候选 miRNA 进行 qRT-PCR 验证,无应答组 miR-126-5p、miR-let-7c-5p 相对表达量低于应答组,miR-200b-3p、miR-21-5p、miR-210-3p、miR-155-5p 相对表达量高于应答组(P<0.001),表达趋势与高通量测序结果完全一致,见表 4。预测靶基因的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析显示,miR-126-5p、miR-let-7c-5p、miR-200b-3p、miR-21-5p、miR-210-3p、miR-155-5p 靶基因显著富集于多个与肺癌抗血管治疗反应密切相关的信号通路,其中 VEGF 信号通路、HIF-1 信号通路及 PD-L1/PD-1 信号通路的富集最为显著,见表 5。

2.4　血清外泌体 miRNA 谱的 Lasso 回归分析　以抗血管生成治疗反应作为因变量(应答=0,无应答=1),利用 Lasso 回归分析,6 个候选 miRNA(miR-126-5p、miR-let-7c-5p、miR-200b-3p、miR-21-5p、miR-210-3p、miR-155-5p)的相对表达量作为初始预测变量。Lasso 回归分析,随着正则化参数 λ 值的增大,自变量的回归系数逐渐向 0 收缩,miR-let-7c-5p、miR-200b-3p、miR-155-5p 的系数被压缩为 0,未进入最终模型,见图 1;利用十折交叉验证确定最优 λ 值,当 λ=0.049 时,模型均方误差最小。最终筛选出 3 个 miRNA,分别为 miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p,见图 2。

表 3　应答组与无应答组差异表达倍数排名前 10 的 miRNA(高通量测序)

miRNA 名称	表达趋势(无应答组 *vs*. 应答组)	差异表达倍数
miR-126-5p	表达下调	4.15
miR-let-7c-5p	表达下调	3.41
miR-200b-3p	表达上调	3.17
miR-21-5p	表达上调	2.85
miR-210-3p	表达上调	2.39
miR-155-5p	表达上调	2.23
miR-34a-5p	表达上调	1.80
miR-145-5p	表达上调	1.72
miR-150-5p	表达上调	1.36
miR-10a-5p	表达上调	1.19

表 4　两组候选 miRNA 的 RT-qPCR 检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-126-5p	miR-let-7c-5p	miR-200b-3p	miR-21-5p	miR-210-3p	miR-155-5p
无应答组	92	0.81±0.26	1.06±0.35	2.46±0.63	3.14±1.03	3.26±1.07	2.21±0.67
应答组	190	2.55±0.91	2.28±0.72	1.95±0.48	1.83±0.60	1.79±0.58	1.77±0.54
t		17.973	15.386	7.528	13.453	14.952	5.917
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 5　候选 miRNA 的靶基因预测与功能富集分析

miRNA 名称	显著富集的通路	*P*	调整后 *P*
miR-126-5p	VEGF 信号通路;细胞黏附分子;黏着斑	<0.0001	<0.001
miR-let-7c-5p	mTOR 信号通路;MAPK 信号通路;TGF-β 信号通路	<0.0001	<0.001
miR-200b-3p	PD-L1/PD-1 通路;HIF-1 信号通路;癌症中的蛋白聚糖	<0.0001	<0.001
miR-21-5p	HIF-1 信号通路;黏着斑;细胞凋亡	<0.0001	<0.001
miR-210-3p	Wnt 信号通路;TGF-β 信号通路;癌症中的蛋白聚糖	<0.0001	<0.001
miR-155-5p	PD-L1/PD-1 通路;趋化因子信号通路;JAK-STAT 信号通路	<0.0001	<0.001

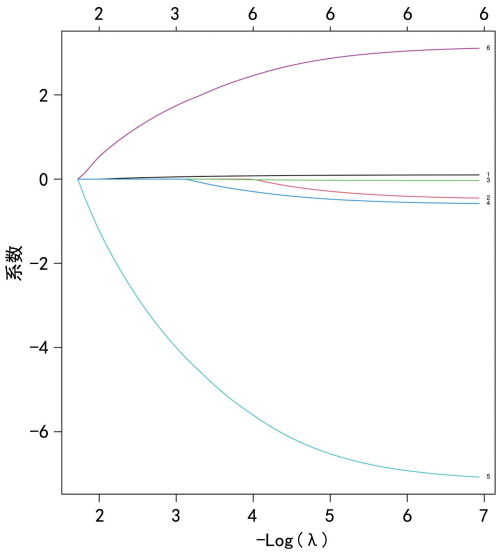

图 1　Lasso 回归系数路径图

2.5　肺癌抗血管生成治疗反应的影响因素　以抗血管生成治疗反应作为因变量(应答=0,无应答=1),为避免模型过度拟合和系数估计偏倚,采用基于 AIC 信息准则的逐步回归分析法从临床分期、血清 CEA、CYFRA 21-1、NSE、miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p、肿瘤组织 PD-L1、VEGF 中进行变量筛选,最终保留 miR-126-5p(以相对表达量的实际值录入)、miR-21-5p(以相对表达量的实际值录入)、miR-210-3p(以相对表达量的实际值录入)、肿瘤组织 PD-L1(阴性=0,阳性=1)、VEGF(阴性=0,阳性=1)作为自变量。Logistic 回归分析,miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p、肿瘤组织 PD-L1、VEGF 是肺癌抗血管生成治疗反应的独立影响因素(P<0.05)。见表 6。

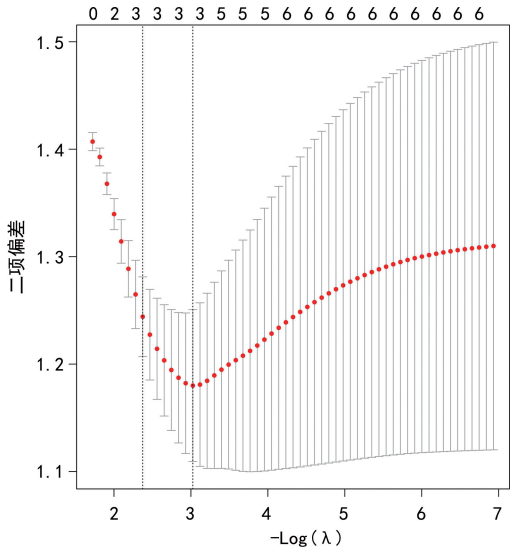

图 2　Lasso 回归交叉验证图

表 6　肺癌抗血管生成治疗反应的影响因素

项目	*β*	*SE*	*Wald* χ^2	*P*	*OR*	95%*CI*
miR-126-5p	−0.799	0.076	110.612	<0.001	0.450	0.387～0.522
miR-21-5p	0.781	0.080	95.342	<0.001	2.184	1.867～2.555
miR-210-3p	0.804	0.083	93.856	<0.001	2.235	1.899～2.629
肿瘤组织 PD-L1	1.068	0.107	99.582	<0.001	2.909	2.359～3.588
肿瘤组织 VEGF	1.252	0.110	129.544	<0.001	3.497	2.819～4.339
常数项	−1.187	0.095	118.617	<0.001	—	—

注:—表示无数据。

2.6　血清外泌体 miRNA 谱、肿瘤组织 PD-L1、VEGF 预测价值　ROC 曲线分析结果显示,miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p、肿瘤组织 PD-L1、VEGF 单独预测抗血管生成治疗反应的 AUC 为 0.742(95% *CI*:0.687～0.792)、0.761(95% *CI*:0.707～0.810)、0.766(95% *CI*:0.712～0.814)、0.658(95% *CI*:0.599～0.713)、0.695(95% *CI*:0.637～0.748),灵敏度为 61.96%、75.00%、

63.04%、65.22%、83.70%，特异度为 80.00%、68.42%、80.95%、66.32%、55.26%，见图 3。根据 Logistic 回归分析建立 miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p 与肿瘤组织 PD-L1、VEGF 的联合预测模型：$Y=-1.187-0.799\times$miR-126-5p$+0.781\times$miR-21-5p$+0.804\times$miR-210-3p$+1.068\times$肿瘤组织 PD-L1$+1.252\times$肿瘤组织 VEGF。该模型预测抗血管生成治疗反应的 AUC 为 0.878（95% *CI*：0.834～0.914），灵敏度为 71.74%，特异度为 89.47%，经 Delong 检验，联合模型的预测价值显著优于各指标单独预测价值（$Z=2.581$、2.816、2.513、3.274、3.428，均 $P<0.001$），见图 4；校正曲线分析结果显示，该模型的校准度为 0.822，提示该模型具有稳健且良好的预测能力，见图 5；DCA 曲线分析结果显示，该模型在 5%～90%广泛的阈概率范围内持续产生临床净获益，其效用显著优于常规“全部治疗”或“全部不治疗”的二元决策方法，提示该模型可靠的判别能力与净获益表现，见图 7。

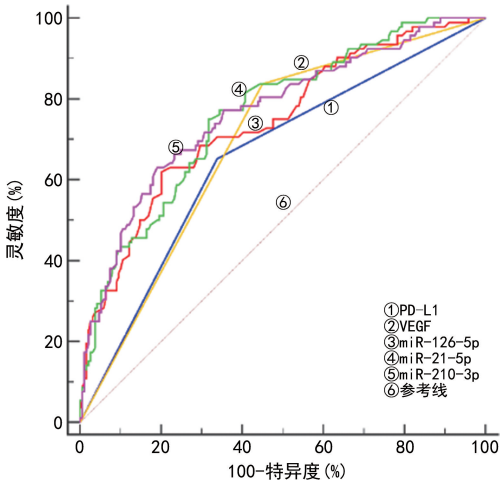

图 3　血清外泌体 miRNA 谱、肿瘤组织 PD-L1、VEGF 的 ROC 曲线

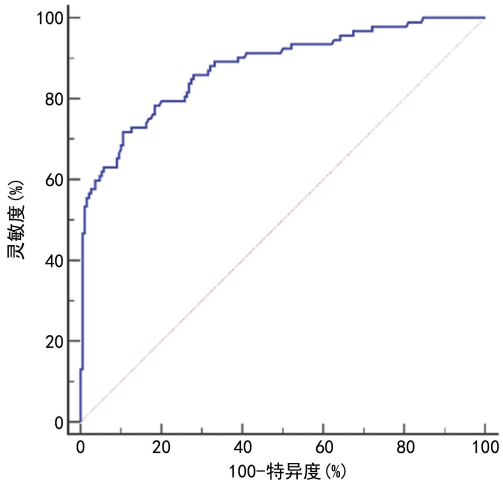

图 4　联合预测模型的 ROC 曲线

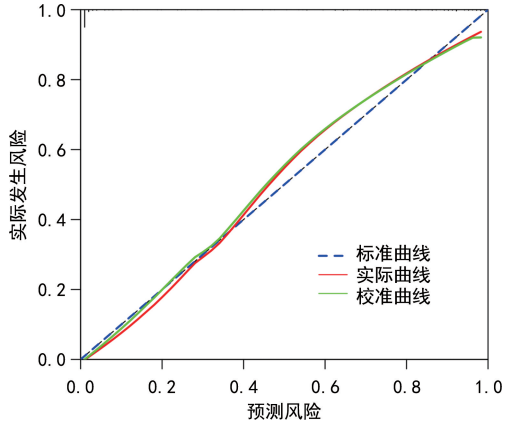

图 5　联合预测模型的校正曲线

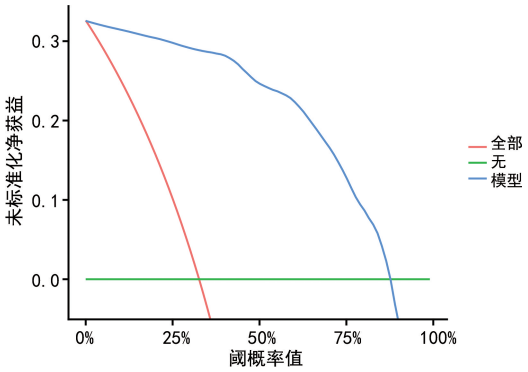

图 6　联合预测模型的 DCA 曲线

2.7　时间序列的内部验证　另选取本院 2025 年 2 月至 2025 年 7 月收治的 64 例肺癌患者作为时间序列的内部验证集，根据抗血管生成治疗反应分为应答患者 44 例与无应答患者 20 例。在时间序列的内部验证集中，该模型预测抗血管生成治疗反应的 AUC 为 0.876（95% *CI*：0.771～0.981），灵敏度为 75.00%，特异度为 90.91%，见图 7；校正曲线分析结果显示，该模型的校准度为 0.820，证实该模型预测能力较高，见图 8；DCA 曲线分析结果显示，该模型在 15%～100%广泛的阈概率范围内具有显著的临床净获益，证实该模型的临床净获益表现可靠，见图 9。

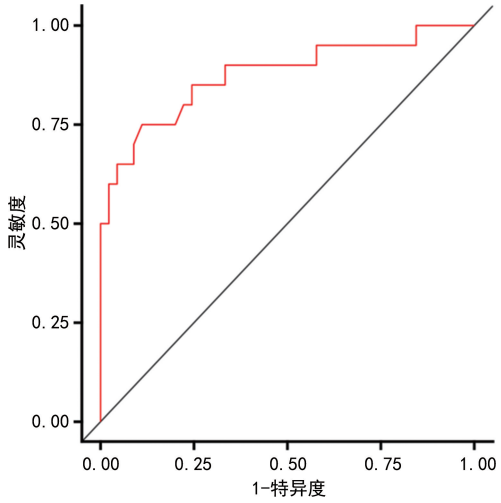

图 7　联合预测模型在时间序列内部验证集中的 ROC 曲线

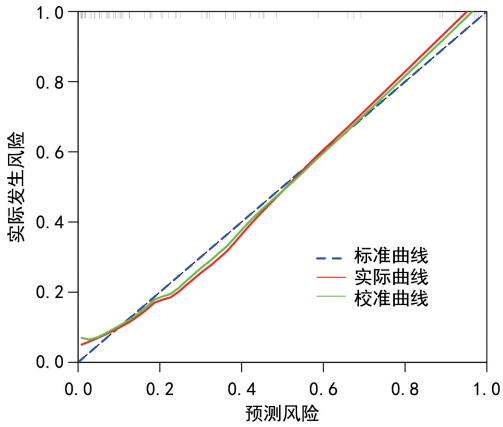

图 8　联合预测模型在时间序列内部验证集中的校正曲线

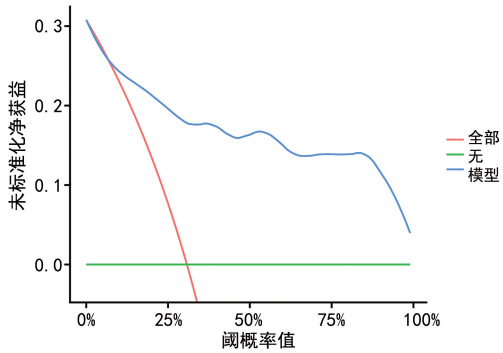

图 9　联合预测模型在时间序列内部验证集中的 DCA 曲线

3　讨　　论

抗血管生成治疗反应的个体化差异是当前实现肺癌精准医疗主要问题之一。既往研究多集中于单一类型标志物的预测价值,存在明显局限性[11-12]。本研究立足于血清外泌体 miRNA 标志物与常规的病理组织学标志物,通过整合这两类不同层面和维度的生物学信息,构建新的预测体系,以期为临床预测肺癌抗血管生成治疗反应提供新策略。

本研究成功构建应答组与无应答组的血清外泌体 miRNA 表达谱,共筛选出 52 个显著差异表达的 miRNA,提示患者机体内系统性的分子应答与抗血管生成治疗反应密切相关。针对候选 miRNA 的高通量测序结果进行 qRT-PCR 验证,发现 miR-126-5p、let-7c-5p 在无应答组中呈低表达,miR-21-5p、miR-210-3p、miR-200b-3p 与 miR-155-5p 在无应答组中呈高表达,表达趋势与高通量测序趋势完全一致。利用 Lasso 回归降维算法筛选出 miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p 构成最精简且预测能力最强的血清外泌体 miRNA 特征组合。这三项 miRNA 的入选并非偶然,其各自的生物学重要性已在既往研究中获得广泛证实。例如,党乙等[13]报道显示,miR-126-5p 表达情况对非小细胞肺癌患者顺铂耐药性有重要影响。程万里等[14]研究发现,miR-21-5p 参与非小细胞肺癌进展过程,能够预测预后。另有文献证实,miR-210-3p 在肺腺癌患者血清中的表达改变情况具有一定的临床诊断价值[15]。然而,本研究的核心创新点在于将 miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p 应用于肺癌抗血管生成治疗反应的特定场景下。从机制分析原因:miR-126-5p 是一种调节血管内皮功能和维持血管完整性的关键因子,其可以直接抑制 SPRED1 的表达,而 SPRED1 是 VEGF 信号通路中的重要负调控因子,当 miR-126-5p 抑制 SPRED1 后,便可对 VEGF 信号通路形成负向调控作用,因此其可能促进抗血管生成药物诱导的“血管正常化”,改善肿瘤微环境,从而能够正向预测治疗反应[16-17]。miR-21-5p 属于多功能的致癌 miRNA,可靶向抑制 PDCD4、PTEN 等多种抑癌基因,增强肿瘤细胞分化、增殖及侵袭能力,还能够通过抑制 PTEN 表达,导致 PI3K/AKT 信号通路的过度激活,而 AKT 通路激活后会促使巨噬细胞向免疫抑制的 M2 型极化,显著上调其表面的 PD-L1 表达,进而影响肿瘤免疫,故其高表达通常提示更强的肿瘤侵袭性和更严重的免疫逃逸[18-19]。miR-210-3p 是 HIF-1 信号通路的核心下游靶基因,上调表达标志着肿瘤处于持续缺氧状态,而缺氧会刺激 VEGF 上调,驱动血管异常增生,并引发免疫抑制,从而影响药物作用[20-21]。靶基因富集分析显示,初筛的 6 个候选 miRNA 显著富集于 VEGF、HIF-1 及 PD-1/PD-L1 通路,与最终筛选出的 miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p 的功能高度吻合,从生物信息学角度证实三者与抗血管生成治疗反应直接相关,而非随机关联。且 ROC 曲线证实 miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p 具有中等预测效能,能作为独立预测因子。

在明确血清外泌体 miRNA 谱预测价值的同时,本研究亦再次确认肿瘤组织 PD-L1、VEGF 作为经典预测指标的价值,数据显示,无应答组中 PD-L1、VEGF 阳性表达率显著高于应答组。分析产生此结果的原因在于:高 PD-L1 表达反映了肿瘤免疫抑制状态,抗血管生成治疗可诱导血管正常化,促进免疫细胞浸润,但在严重免疫抑制的肿瘤微环境中其治疗作用被削弱[22-24]。高 VEGF 表达则表示肿瘤血管生成通路过度激活,当应用抗血管生成药物治疗时,可能因更高的血管密度和更强大的旁路激活机制而导致疗效降低[25-27]。肿瘤组织 PD-L1、VEGF 是临床决策不可或缺的肿瘤原位、蛋白水平的直接证据,但本研究发现肿瘤组织 PD-L1、VEGF 的预测不充分。为此,本文整合了血清外泌体 miRNA 核心特征谱与肿瘤组织 PD-L1、VEGF,发现联合模型的 AUC 高达 0.878,显著优于任一单一标志物,证实两种标志物的信息具有高度互补性,整合后的联合模型能够更全

面、更精准地捕捉到与抗血管生成治疗反应密切相关的复杂生物学网络。校正曲线的校准度与一致性指数接近理想值,表示预测结果可靠,具有稳健的泛化能力。DCA 曲线显示,在 5%～90%广泛的临床决策阈值概率范围内,与“全部治疗”或“全部不治疗”的简单策略相比,应用该模型指导治疗策略能带来持续且显著的临床净获益,为临床进行个体化决策提供可靠的客观、量化依据。且上述结果得到了后续时间段收集的独立样本进行的时间序列内部验证的证实,说明该联合模型具有可靠的应用价值,其具体的临床实际价值在于能够早期精准识别出抗血管生成治疗无效的肺癌亚群患者,可尽早调整治疗方案,从而避免无效治疗带来的治疗时机延误、不良反应及经济负担,进而实现个体化精准防治。本研究同样存在局限性:单中心、前瞻性的研究结论需要大规模、多中心研究进行外部验证;患者接受不同抗血管药物与联合方案,可能引入混杂因素;血清外泌体 miRNA 与肿瘤组织 PD-L1、VEGF 的机制关联仅为生物信息学推断,有待细胞与动物实验证实其因果性。

综上所述,miR-126-5p、miR-21-5p、miR-210-3p 是与肺癌抗血管生成治疗反应相关的血清外泌体 miRNA 标志物,其靶基因富集于 VEGF、HIF-1 及 PD-1/PD-L1 通路,与肿瘤组织 PD-L1、VEGF 联合预测具有高准确性、稳健的泛化能力及显著的临床净获益,为制定个体化治疗方案提供可靠的决策辅助工具。

参考文献

[1] 候梦圆,李春阳,沙晓雨,等. 外周血 NLR、PLR、CEA、NSE 和 CYFRA21-1 对晚期非小细胞肺癌免疫疗效的预测价值研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2024,27(4):414-425.

[2] Tsukada A,Morita C,Shimizu Y,et al. Efficacy of first-line immune checkpoint inhibitor and anti-angiogenic agent combination therapy for Kirsten rat sarcoma viral antigen-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and network meta-analysis[J]. Thorac Cancer,2024,15(25):1854-1862.

[3] 李云鹏,周腾飞,于海瑛,等. 肺腺癌转化小细胞癌的多线治疗分析及文献复习[J]. 中国综合临床,2023,39(1):32-37.

[4] Cheng W,Kang K,Zhao A,et al. Dual blockade immunotherapy targeting PD-1/PD-L1 and CTLA-4 in lung cancer[J]. J Hematol Oncol,2024,17(1):54.

[5] Huang Z,Li L,Zhao X,et al. scRNA-seq reveals that VEGF signaling mediates the response to neoadjuvant anlotinib combined with PD-1 blockade therapy in non-small cell lung cancer[J]. J Transl Med,2025,23(1):478.

[6] Peng J,Zhang Y,Zhou G,et al. Circulating serum exosomes i-tRF-AspGTC and tRF-1-SerCGA as diagnostic indicators for non-small cell lung cancer[J]. Clin Transl Oncol,2024,26(8):1988-1997.

[7] Cao X,Zhong W,Guo S,et al. Low expression of miR-27b in serum exosomes of non-small cell lung cancer facilitates its progression by affecting EGFR[J]. Open Med (Wars),2022,17(1):816-825.

[8] Xu S,Zheng L,Kang L,et al. Correction: microRNA-let-7e in serum-derived exosomes inhibits the metastasis of non-small-cell lung cancer in a SUV39H2/LSD1/CDH1-dependent manner[J]. Cancer Gene Ther,2022,29(7):1071-1073.

[9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 原发性肺癌诊疗规范(2018 年版)[J/CD]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2019,5(3):100-120.

[10] 张百红,岳红云. 实体瘤疗效评价标准简介[J]. 国际肿瘤学杂志,2016,43(11):845-847.

[11] Chen Y,Zhang Z,Pan F,et al. Pericytes recruited by CCL28 promote vascular normalization after anti-angiogenesis therapy through RA/RXRA/ANGPT1 pathway in lung adenocarcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res,2024,43(1):210.

[12] Abdallah M,Voland R,Decamp M,et al. Evaluation of anti-angiogenic therapy combined with immunotherapy and chemotherapy as a strategy to treat locally advanced and metastatic non-small-cell lung cancer[J]. Cancers,2024,16(24):4207.

[13] 党乙,张梁,翟恒钰,等. CircBIRC6 调节 miR-126-5p/JARID2 轴对非小细胞肺癌细胞顺铂耐药性的影响[J]. 河北医学,2022,28(11):1768-1774.

[14] 程万里,汪俊其,刘鑫,等. 微小 RNA-21 在非小细胞肺癌中诊疗作用的研究进展[J]. 医学研究杂志,2022,51(8):22-24.

[15] 董胜鉴,黄丽丽,李树锦. 肺腺癌患者血清中 miR-498,miR-339-5p 和 miR-210-3p 水平表达的临床诊断价值[J]. 现代检验医学杂志,2022,37(2):58-60.

[16] Han F,Huang D,Meng J,et al. miR-126-5p enhances radiosensitivity of lung adenocarcinoma cells by inhibiting EZH2 via the KLF2/BIRC axis[J]. J Cell Mol Med,2022,26(9):2529-2542.

[17] Lv J,Zhu S,Chen H,et al. Paeonol inhibits human lung cancer cell viability and metastasis in vitro via miR-126-5p/ZEB2 axis[J]. Drug Dev Res,2022,83(2):432-446.

[18] Zhao Y,Wan Y,He T. Circ_SAR1A regulates the malignant behavior of lung cancer cells via the miR-21-5p/TXNIP axis[J]. Clinical Laboratory Analysis,2022,36(5):e24366.

(下转第 2242 页)

·论　　著·

老年帕金森病患者血清 PGRN、APPL1、NPTX2 水平变化及其与认知功能障碍的关系

霍江涛,蔡津津,梁　惠,郭功兵,张小乔△

湖北省十堰市太和医院/湖北医药学院附属医院老年医学科,湖北十堰 442000

摘　要:目的　探讨老年帕金森病(PD)患者血清颗粒蛋白前体(PGRN)、磷酸酪氨酸衔接蛋白 1(APPL1)、神经突触活动诱导蛋白 2(NPTX2)水平变化及其与认知功能障碍(CI)的关系。**方法**　采用前瞻性队列研究设计,选取该院 2022 年 8 月至 2024 年 8 月收治的 168 例老年 PD 患者作为 PD 组,根据患者病情程度分为轻度、中度和重度组,根据有无发生 CI 分为 CI 组和非 CI 组;按照 1∶1 比例选取同期健康体检者 168 例作为对照组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 PGRN、APPL1、NPTX2 水平;采用 Logistic 回归分析 PD 患者发生 CI 的相关因素;绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 PGRN、APPL1、NPTX2 水平联合检测对 PD 患者发生 CI 的预测价值,采用 Bootstrap 对 PD 患者发生 CI 预测模型进行内部验证;采用决策曲线分析(DCA)评估 PGRN、APPL1、NPTX2 水平预测 PD 患者发生 CI 模型的临床实用性。**结果**　PD 组血清 NPTX2 水平显著低于对照组($P<0.05$),PGRN、APPL1 水平显著高于对照组($P<0.05$)。轻度、中度和重度组血清 NPTX2 水平均依次降低($P<0.05$),PGRN、APPL1 水平依次升高($P<0.05$)。CI 组血清 NPTX2 水平显著低于非 CI 组($P<0.05$),PGRN、APPL1 水平显著高于非 CI 组($P<0.05$)。根据 Logistic 回归分析病程、PGRN、APPL1、NPTX2 与 PD 患者发生 CI 有关($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果显示血清 PGRN、APPL1、NPTX2 水平单独及联合预测 PD 患者 CI 的曲线下面积(AUC)为 0.752、0.806、0.758、0.903,联合预测的 AUC 优于各自单独预测($Z=2.915$、2.924、2.815,均 $P<0.05$)。Bootstrap 内部验证 C-index 为 0.846,H-L 检验为 $\chi^2=7.754$,$P=0.654$,结果显示预测 PD 患者发生 CI 的校准曲线接近理想曲线。DCA 曲线分析结果显示,阈值在 0.13～0.82 时联合预测 PD 患者发生 CI 的净获益率优于 PGRN、APPL1、NPTX2 水平单独预测。**结论**　老年 PD 患者血清 PGRN、APPL1、NPTX2 水平异常波动,与患者病情程度和 CI 有关,联合检测对 PD 患者发生 CI 有一定预测价值。

关键词:帕金森病;　颗粒蛋白前体;　磷酸酪氨酸衔接蛋白 1;　神经突触活动诱导蛋白 2;　认知功能障碍

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.18.010　　**中图法分类号:**R742.5;R446.1

文章编号:1673-4130(2026)18-2237-06　　**文献标识码:**A

Changes in serum PGRN,APPL1 and NPTX2 levels in elderly patients with Parkinson's disease and their relationship with cognitive impairment

Huo Jiangtao, Cai Jinjin, Liang Hui, Guo Gongbing, Zhang Xiaoqiao△

Department of Geriatrics, Taihe Hospital of Shiyan (Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan, Hubei 442000, *China*

Abstract: Objective　To investigate the changes in serum levels of progranulin (PGRN), adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1 (APPL1), and neuronal pentraxin 2 (NPTX2) in elderly patients with Parkinson's disease (PD) and their association with cognitive impairment (CI). **Methods**　A prospective cohort study design was used, a total of 168 PD patients admitted to the hospital from August 2022 to August 2024 were selected (as the PD group). Patients were divided into mild, moderate, and severe groups based on the severity of condition of the patients, and into CI and non-CI groups based on the occurrence of CI. A total of 168 healthy individuals undergoing physical examinations during the same period were selected as the control group in a 1∶1 ratio. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of PGRN, APPL1, and NPTX2. Logistic regression analysis was conducted to identify factors related to CI occurrence in PD patients. Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted to analyze the predictive value of combined detection of serum PGRN, APPL1, and NPTX2 for CI occurrence in

作者简介:霍江涛,男,副主任医师,主要从事老年认知功能障碍及心境障碍方面的研究。　△　**通信作者**,E-mail:zhangxiaoqiao1975@126.com。