

· 临床研究 ·

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.10.10

非小细胞肺癌患者呼出气冷凝液中 microRNA486 表达及其应用价值分析

李荔^a, 孙芊芊^b, 陈金亮^b, 陈建荣^b, 陶国华^a(南通市第一人民医院 a.检验科, b.呼吸科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 分析非小细胞肺癌(NSCLC)患者呼出气冷凝液(EBC)中 microRNA486(miR-486)的表达水平及其临床应用价值。方法 选取 2016 年 6 月至 2017 年 12 月在南通市第一人民医院呼吸科和胸外科接受治疗并经病理证实为 NSCLC 的 50 例患者为研究组,50 例健康体检者为对照组。用实时定量 PCR 技术检测 EBC 和血清中 miR-486 的表达水平,同时检测 NSCLC 患者组织中 miR-486 的表达水平。用化学发光法检测血清中 CEA、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA211)的表达水平。分析 miR-486 在 NSCLC 不同病理分期和病理类型的表达水平差异;并用 ROC 曲线分析 EBC miR-486 单独及其联合血清 CEA、CYFRA211 对 NSCLC 的筛查效能。结果 NSCLC 患者 EBC 和血清中 miR-486 的相对表达量低于对照组($P < 0.05$)。非小细胞肺癌晚期(Ⅲ~Ⅳ期)患者 EBC 和血清中 miR-486 的表达量低于早期(Ⅰ~Ⅱ期)患者($P < 0.05$)。ROC 分析显示,EBC 和血清中 miR-486 诊断 NSCLC 的敏感性分别为 92%、74%;特异性分别为 52%、72%,miR-486 与血清 CEA、CYFRA211 联合筛查非小细胞肺癌敏感性为 72%,特异性为 78%。结论 miR-486 在 NSCLC 患者癌组织、血清和 EBC 中均低表达,EBC 中 miR-486 与血清 CEA、CYFRA211 联合检测对 NSCLC 的早期诊断有潜在的价值。

关键词:非小细胞肺癌;呼出气冷凝液;MicroRNA486

中图分类号:R446

文献标志码:A

根据国家癌症中心 2015 年数据统计显示,肺癌位居我国恶性肿瘤发病首位,占城市和农村恶性肿瘤死亡率第一位^[1]。肺癌根据病理类型可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)两大类,肺癌中 80%~85%是 NSCLC^[2-3]。微小核糖核酸(miRNA, miRNA)是一类非编码小分子 RNA,长约 18~25 个核苷酸,转录后通过识别靶 miRNA 3'端非翻译区(3'UTR)并与其互补结合,抑制 miRNA 的翻译过程或促进靶 miRNA 的降解,发挥调控基因表达的作用^[4]。研究表明,miRNA 与多种肿瘤的发生密切相关,它可作用于抑癌基因的靶点,使其表达下调,促进肿瘤形成;也可作用于癌基因,阻止细胞的恶性转化^[5-7]。microRNA486(miR-486)属于抑癌基因,与肺癌的发生、预后相关^[8-10]。

呼出气冷凝液(exhaled breath condensates, EBC)是一种生物液体,是呼吸道的天然基质,DNA、RNA、蛋白质、代谢物和挥发性化合物均可存在于 EBC 中。它是一种非侵入性采集的标本,正逐渐受到重视。目前,对于肿瘤组织和血液中 miRNA 的研究报道较多,而 EBC 中肺癌标志物的相关研究较少^[11]。本研究旨在通过分析 50 例经组织病理学证实的 NSCLC 患者 EBC 中 miR-486 的相对表达水平,并评价其在 NSCLC 中的临床应用价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 6 月至 2017 年 12 月在我院呼吸科和胸外科接受治疗并经组织病理学证实为 NSCLC 的 50 例患者为研究对象,男 27 例,女 23 例,年龄 42~83 岁,中位年龄 68.5 岁。上述患者中鳞癌 16 例,腺癌 34 例,手术前均未接受放、化疗及免疫治疗、靶向治疗。肺癌的临床分期参考国际抗癌联盟(UICC)2017 年版 NSCLC 分期标准,Ⅰ期 4 例,Ⅱ期 17 例,Ⅲ期 18 例,Ⅳ期 11 例。纳入同期本院体检健康者 50 例作为对照组,其中男 28 例,女 22 例,年龄 34~78 岁,中位年龄 48 岁。肺癌组和对对照组年龄、性别及吸烟史差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。本研究经我院医学伦理学委员会批准(批准文号:2017KY139),研究对象均签署知情同意书。

1.2 仪器和试剂 StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),OneDrop 1000⁺微量分光光度计(日本松下电器公司),EcoScreen 冷凝器和 Master Screen 简易冷凝器(EricJaeger 公司),602 全自动化学发光分析仪(德国 Roche 公司)。miRNA 提取分离试剂盒(批号 R6529)、增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(批号 R6519)、增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒(批号 R6510)均购于北京天根公司。癌胚抗原(CEA,批号 28657403)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA211,批号 21374203)化学发光检测试剂盒均购自德国 Roche 公司。

作者简介:李荔,1986 年生,女,技师,大学本科,主要从事医学检验技术研究。

通信作者:陶国华,主任技师,E-mail:nttgh@163.com。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 NSCLC 患者于入院第 1 天采集外周血标本。体检健康者在体检期间采集外周血标本。用含促凝真空采血管采集研究对象静脉血标本 5 mL, 1 000×g 离心 10 min, 分离血清样品 ($\geq 500 \mu\text{L}$), 用无 RNase 离心管分离后于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。用 EcoScreen 冷凝器或者 Master Screen 简易冷凝器预冷 15 min, 嘱研究对象漱口、戴鼻夹, 经咬嘴平静呼吸 20 min 后取出收集管, 待标本液化后可得到 2~4 mL 液体, 即 EBC; 随即放入无 RNase 离心管中, 于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。留取肺癌患者手术后的癌组织, 经液氮快速冷冻后 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 总 RNA 的提取 采用 miRNA 提取分离试剂盒提取组织、血液和 EBC 标本 RNA。

1.3.3 RNA 含量和纯度测定 按照 OneDrop 1000⁺ 微量分光光度计操作手册, 对提取的 RNA 测定浓度及纯度。评价 RNA 样品纯度, 取 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 控制在 1.8~2.1 的样品用于后续实验。

1.3.4 参照基因的选择 本研究选择在组织细胞中稳定表达且应用最多的 *U6* 作为 NSCLC 患者组织中的参照基因。但由于目前 *U6* 等内参基因在体液中的稳定性尚存在争议, 因此本研究选取 *cel-miR-39* 作为血清和 EBC 中目的基因检测时的参照基因。

1.3.5 引物设计 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, miR-486、*U6*、*cel-miR-39* 引物序列见表 1, 由北京天根公司合成。

表 1 miR-486 和参照基因引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')
miR-486	上游: TGTACTGAGCTGCCCCGAG
	下游: CTCAACTGGTGTGCTGGAGTC
<i>U6</i>	上游: CTCGCTTCGGCAGCACAT
	下游: AACGCTTCACGAATTTGCGT
<i>cel-miR-39</i>	上游: GGCCTCACCGGTGTAAATCAG
	下游: AGTGCAGGTCCGAGGTAT

1.3.6 反应体系和条件 cDNA 第一链合成: $2 \times$ miRNA RT Reaction Buffer 10 μL , miRNA RT Enzyme Mix 2 μL , RNase-Free ddH₂O 补至 20 μL , 42 $^\circ\text{C}$ 60 min, 95 $^\circ\text{C}$ 3 min; PCR 体系: cDNA 2 μL , miRNA 荧光定量检测试剂 10 μL , 引物终浓度 200 mmol/L, 反应体积为 20 μL 。反应条件: 94 $^\circ\text{C}$, 2 min; 94 $^\circ\text{C}$, 20 s; 64 $^\circ\text{C}$, 34 s, 40 个循环。

1.3.7 CEA、CYFRA211 的检测 按试剂盒说明书采用化学发光法检测 CEA、CYFRA211。CEA 参考区间: $< 5 \mu\text{g/L}$ 。CYFRA211 参考区间: $< 3.5 \mu\text{g/L}$ 。

1.4 统计学分析 用 SPSS 21.0 统计软件进行。

qRT-PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法处理后再进行统计学分析。计量资料先做正态性检验(K-S 检验); 若数据符合正态分布, 两组数值比较采用 *t* 检验; 若不符合正态分布, 采用两独立样本的非参数检验(Mann-Whitney *U* 检验)。两组计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对 NSCLC 的诊断价值用 ROC 曲线分析。

2 结果

2.1 血清 miR-486、CEA、CYFRA211 水平 见表 2。K-S 检验结果显示, 各组 miR-486、CEA、CYFRA211 数据呈非正态分布($P < 0.05$)。Mann-Whitney *U* 检验结果显示, 与健康人对照组比较, NSCLC 组血清 miR-486 表达水平降低($P < 0.01$), 而 CEA、CYFRA211 水平升高($P < 0.01$), 差异均有统计学意义。

表 2 健康人对照组和 NSCLC 组血清 miR-486、CEA、CYFRA211 水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

分组	<i>n</i>	miR-486	CEA ($\mu\text{g/L}$)	CYFRA211 ($\mu\text{g/L}$)
健康人对照组	50	1.8(0.92, 4.31)	2.33(0.5, 4.7)	1.62(0.2, 3.4)
NSCLC 组	50	0.73(0.21, 1.92)	12.5(5.1, 20.2)	6.7(3.3, 11.4)
Z(P)值		-3.058(<0.01)	-8.593(<0.01)	-10.058(<0.01)

2.2 组织、血清和 EBC 中 miR-486 的表达水平 肺癌组织中 miR-486 的相对表达水平 0.58(0.32, 1.17) 低于癌旁组织 1.66(0.82, 3.21), 差异有统计学意义($Z = -3.20, P < 0.05$)。肺癌组血清中 miR-486 的相对表达水平 0.73(0.21, 1.92) 低于健康人对照组 1.78(0.92, 4.31), 差异有统计学意义($Z = -4.68, P < 0.05$)。肺癌组 EBC 中 miR-486 的相对表达水平 0.50(0.32, 1.02) 低于健康人对照组 1.56(0.81, 3.02), 差异有统计学意义($Z = -3.94, P < 0.05$)。

2.3 不同 TNM 分期 miR-486 表达水平 不同 TNM 分期 NSCLC 患者组织、血清和 EBC 中 miR-486 相对表达水平见表 3。III~IV 期患者组织、血清和 EBC 中 miR-486 相对表达水平均低于 I~II 期患者, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

表 3 不同 TNM 分期 miR-486 相对表达水平

分期	<i>n</i>	组织	血清	EBC
I~II 期	21	0.71(0.41, 1.61)	0.89(0.4, 1.95)	0.76(0.38, 1.52)
III~IV 期	29	0.36(0.11, 1.12)	0.43(0.21, 0.82)	0.28(0.12, 0.61)
Z(P)值		-2.113(<0.05)	-4.993(<0.05)	-6.542(<0.05)

2.4 不同病理类型 miR-486 相对表达水平 不同病理类型 NSCLC 患者组织、血清和 EBC 中 miR-486 相对表达水平见表 4。鳞癌患者组织、血清和 EBC

中 miR-486 相对表达水平与腺癌患者比较差异无统计学意义 (P 均 >0.05)。

表 4 miR-486 在不同病理类型中相对表达水平

分组	n	组织	血清	EBC
腺癌	34	0.59(0.42,1.13)	0.62(0.46,1.22)	0.43(0.25,0.71)
鳞癌	16	0.54(0.36,0.98)	0.45(0.33,0.87)	0.37(0.26,0.68)
Z 值		-0.123	-1.024	-1.76
P 值		0.902	0.306	0.078

2.5 miR-486 诊断 NSCLC 的价值 组织中 miR-486 的 ROC 曲线下面积 (AUC^{ROC}) 为 0.783, 当 cut-off 值取 0.94 时, 敏感性为 87%, 特异性为 70%。血清中 miR-486 的 AUC^{ROC} 为 0.752, 当 cut-off 值取 0.615 时, 敏感性为 74%, 特异性为 72%。EBC 中 miR-486 的 AUC^{ROC} 为 0.792, 当 cut-off 值取 1.08 时, 敏感性和特异性分别为 92% 和 52%, miR-486 与血清 CEA、CYFRA211 联合筛查 NSCLC 时 AUC^{ROC} 为 0.776, 当 cut-off 值取 0.68 时, 敏感性和特异性分别为 72% 和 78%。

3 讨论

miR-486 是一类在哺乳动物中高度保守的 miRNA, 位于染色体 8p11, 是许多癌症中基因组丢失的一个区域。本研究结果显示, miR-486 在 NSCLC 患者癌组织、血清及 EBC 中均呈低表达状态。miR-486 相对表达水平与 NSCLC 患者 TNM 分期有关, 可能成为预测 NSCLC 患者预后的指标, 与毕雪冰等^[12] 研究结果一致。本研究中组织、血清和 EBC miR-486 的表达水平与病理细胞类型均无关, 分析原因可能与样本量少有关, 需扩大样本量作进一步研究。ROC 曲线分析显示, EBC 中 miR-486 的检测对于 NSCLC 患者敏感性较高, 但是特异性不如组织和血清。EBC 中 miR-486 和 CEA、CYFRA211 联合应用时, AUC^{ROC} 为 0.776, 当 cut-off 值取 0.68 时, 敏感性和特异性分别为 72% 和 78%, 与文献^[13] 报道一致。本研究认为, 虽然 EBC 采集是一种无创、安全的技术, 可以在整个随访过程中反复采集样本而不会给患者带来不适。但由于本研究样本量较小, 还需要进行大规模多中心临床研究来验证其有效性。

4 参考文献

- [1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
- [2] Eitinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. Non-small cell lung cancer, Version 6. 2015 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2015, 13(5): 515-524.
- [3] 张建华, 汪学琦, 陈森, 等. 非小细胞肺癌治疗研究进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(31): 191.
- [4] Fressigné L, Simard MJ. Biogenesis of small non-coding RNAs in animals [J]. Med Sci, 2018, 34(2): 137-144.
- [5] Huang Y, Hu Q, Deng Z, et al. MicroRNAs in body fluids as biomarkers for non-small cell lung cancer: a systematic review [J]. Technol Cancer Res Treat, 2014, 13(3): 277-287.
- [6] Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy [J]. Trends Mol Med, 2014, 20(8): 460-469.
- [7] Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(2): 430-441.
- [8] Kasinski AL, Slack FJ. miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2012, 72(21): 5576-5587.
- [9] Kulda V, Svaton M, Mukensnabl P, et al. Predictive relevance of miR-34a, miR-224 and miR-342 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung undergoing palliative chemotherapy [J]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 592-599.
- [10] Bommer GT, Gerin I, Feng Y, et al. P53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes [J]. Curr Biol, 2007, 17(15): 1298-1307.
- [11] Mozzoni P, Banda I, Goldoni M, et al. Plasma and EBC microRNAs as early biomarkers of non-small-cell lung cancer [J]. Biomarkers, 2013, 18(8): 679-686.
- [12] 毕雪冰, 贾友超, 马慧卿, 等. 血浆 miRNA-486、miRNA-499 在非小细胞肺癌中的预后价值研究 [J]. 检验与诊断, 2016, 10(6): 71.
- [13] 苗留飞, 杨阳, 李晓军. 非编码 RNA 作为 NSCLC 辅助诊断和预后标志物的研究进展 [J]. 临床检验杂志, 2019, 37(12): 934-937.

(收稿日期: 2020-06-05)

(本文编辑: 王海燕)