

非小细胞肺癌患者血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达与临床特征及术后复发的相关性研究*

黄刚¹, 陈霏², 肇玉博¹, 张迪¹ (1. 陕西中医药大学附属医院检验科, 陕西咸阳 712000; 2. 陕西省核工业二一五医院检验科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 探讨血浆微小 RNA(miRNA)-145 和 miRNA-221 表达在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)术后复发中的诊断价值。方法 选取 2016 年 4 月~2018 年 4 月期间在陕西中医药大学附属医院和陕西省核工业二一五医院胸外科行手术切除的 55 例原发性非小细胞肺癌患者的临床资料进行回顾性分析,依据术后是否复发分为复发组和未复发组。同时选取 50 例同期体检健康者作为对照组。采用实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测 NSCLC 患者血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 的表达,采用电化学发光方法检测血清细胞角蛋白片断 21-1(CYFRA21-1)和癌胚抗原(CEA)水平,比较分析以上标志物的变化与 NSCLC 患者术后复发的关系。结果 在对照组、未复发组和复发组中,血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 的表达分别为 0.97 ± 0.27 , 0.35 ± 0.15 , 0.17 ± 0.09 和 0.20 ± 0.11 , 0.39 ± 0.17 , 1.06 ± 0.31 。未复发组的 miRNA-221 表达显著高于对照组,而显著低于复发组;未复发组的 miRNA-145 表达显著低于对照组,而显著高于复发组;以上比较的差异均有统计学意义($F=118.73 \sim 123.72$, 均 $P < 0.01$)。在对照组、未复发组和复发组中,血清 CYFRA21-1(ng/ml)和 CEA(ng/ml)水平分别为 3.02 ± 1.17 , 9.05 ± 3.43 , 47.68 ± 16.72 和 2.31 ± 2.03 , 7.37 ± 3.29 , 29.37 ± 12.49 。复发组和未复发组的 CYFRA21-1 和 CEA 水平与对照组比较显著增高;复发组两肿瘤标志物水平与未复发组比较显著增高;以上比较差异均有统计学意义($F=87.46 \sim 96.83$, 均 $P < 0.01$)。在复发组中,血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达具有负相关性($r^2=0.772$, $P < 0.01$)。miRNA-145 表达分别与 CYFRA21-1 和 CEA 水平有负相关性($r^2=0.772 \sim 0.794$, 均 $P < 0.01$),而 miRNA-221 表达分别与 CYFRA21-1 和 CEA 水平有正相关性($r^2=0.663 \sim 0.687$, 均 $P < 0.01$)。血浆 miRNA-221 和 miRNA-145 表达在鳞癌中的异常率高于腺癌,在 TNM III 期中的异常率高于 I-II 期($\chi^2=0.012 \sim 0.039$, 均 $P < 0.05$);两标志物与患者年龄、肿瘤大小和吸烟无明显相关性($\chi^2=0.301 \sim 1.000$, 均 $P > 0.05$)。结论 血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 的差异表达与 NSCLC 的病变更进有关,检测血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达可用于监测 NSCLC 术后的复发。

关键词:非小细胞肺癌;微小 RNA-145;微小 RNA-221;细胞角蛋白片断 21-1(CYFRA21-1);癌胚抗原(CEA)

中图分类号:R734.2;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)04-040-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.010

Study on the Correlation between the Expression of MicroRNA145 and MicroRNA221 in Plasma and Clinical Characteristics and Postoperative Recurrence in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer

HUANG Gang¹, CHEN Fei², ZHAO Yu-bo¹, ZHANG Di¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine University of Shaanxi, Shaanxi Xianyang 712000, China; 2. 215 Hospital of Nuclear Industry of Shaanxi, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: Objective To investigate the diagnostic value of the expression of microRNA145 and microRNA221 in plasma for postoperative recurrence of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The clinical data of 55 patients with primary NSCLC who underwent surgical resection at the Department of Thoracic Surgery in Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine University of Shaanxi and 215 Hospital of Nuclear Industry of Shaanxi from April 2016 to April 2018 were retrospectively analyzed. According to whether the recurrence after surgery, they were divided into recurrent group and non-recurrent group. At the same time, 50 cases of healthy people in the same period were selected as the control group. Real-time polymerase-linked quantitative (RT-PCR) technique was used to detect the expression of miRNA-145 and miRNA-221 in plasma of patients with NSCLC, serum levels of CYFRA21-1 and CEA were detected by electrochemiluminescence method. The relationship between the changes of the above markers and the recurrence of NSCLC patients was comparatively analyzed. **Results** In the control group, non-recurrence group and recurrence group, the expression of plasma microRNA-145 and microRNA-221 were 0.97 ± 0.27 , 0.35 ± 0.15 , 0.17 ± 0.09 and 0.20 ± 0.11 , 0.39 ± 0.17 , 1.06 ± 0.31 , respectively. The expression of miRNA-221 in the non-recurrent group was significantly higher than that in the control group, but significantly

* 作者简介:黄刚(1979—),男,大学本科,主管检验师,研究方向:疾病的基因诊断, E-mail:3436309161@qq.com。

通讯作者:陈霏(1985—),女,大学本科,主管检验师,研究方向:疾病的基因诊断, E-mail:3499337430@qq.com。

lower than that in the recurrent group. The expression of miRNA-145 was significantly lower than that in the control group, and significantly higher than that in the recurrent group. The above differences were statistically significant ($F=118.73\sim 123.72$, all $P<0.01$). The expression of serum CYFRA21-1 (ng/ml) and CEA (ng/ml) in the control group, non-recurrence group and recurrence group were 3.02 ± 1.17 , 9.05 ± 3.43 , 47.68 ± 16.72 and 2.31 ± 2.03 , 7.37 ± 3.29 , 29.37 ± 12.49 , respectively. Compared with the control group, the levels of CYFRA21-1 and CEA in the recurrent group and non-recurrence group were significantly increased. Compared with the non-recurrence group, the levels of the two tumor indicators in the recurrent group were significantly increased. The above differences were statistically significant ($F=87.46\sim 96.83$, all $P<0.01$). A negative correlation was showed between plasma expression of miRNA-145 and miRNA-221 ($r^2=0.772$, $P<0.01$). miRNA-145 expression was negatively correlated with the levels of CYFRA21-1 and CEA ($r^2=0.772\sim 0.794$, all $P<0.01$), while miRNA-221 was positively correlated with the levels CYFRA21-1 and CEA ($r^2=0.663\sim 0.687$, all $P<0.01$). The abnormal rate of the plasma expressions of microRNA-221 and microRNA-145 in squamous cell carcinoma was higher than that in adenocarcinoma, and in TNM stage III was higher than that in stage I~II ($\chi^2=0.012\sim 0.039$, all $P<0.05$). There was no significant correlation between the two markers and patient's age, tumor size and smoking ($\chi^2=0.301\sim 1.000$, all $P>0.05$). **Conclusion** The differential expressions of miRNA-145 and miRNA-221 in plasma were related to the progression of NSCLC. Detection of plasma expressions of miRNA-145 and miRNA-221 can be used to monitor recurrence after NSCLC.

Keywords: non-small cell lung cancer; miRNA-145; miRNA-221; CYFRA21-1; CEA

肺癌是目前世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是其最常见的类型^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种长度为19~22个核苷酸的内源性小分子非编码RNA,其作为一类高度保守的非蛋白编码RNA参与基因表达的调控^[2]。本文回顾性分析55例行完全切除术的NSCLC患者的临床资料,探讨血浆miRNA-145和miRNA-221表达与NSCLC术后复发的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2016年4月~2018年4月期间在陕西中医药大学附属医院和陕西省核工业二一五医院胸外科行手术切除术的55例原发性非小细胞肺癌患者的临床资料进行回顾性分析,依据术后复发情况分为复发组和未复发组。复发组36例,其中男性25例,女性11例,平均年龄 57.1 ± 7.5 岁;未复发组19例,其中男性14例,女性5例,平均年龄 58.2 ± 7.3 岁。所取标本均经过病理学证实,符合卫生部2011年版原发性肺癌诊疗规范标准^[3]。选取同期体检健康者50例作为对照组,其中男性30例,女性20例,平均年龄 59.7 ± 7.1 岁。非小细胞肺癌患者术中、术前均未接受放疗、化疗及免疫治疗。所有患者均符合完全手术指征并接受了完全切除术。三组研究对象的年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究已获得陕西中医药大学附属医院和陕西省核工业二一五医院医学伦理委员会批准,并得到所有患者或亲属的知情同意。

1.2 仪器与试剂 湖南湘怡CTK80离心机、罗氏公司Elecscy 601全自动电化学发光分析仪。总RNA提取试剂采用北京先锋生物公司FAST1000

试剂盒。荧光定量PCR试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司。采用美国ABI-step one 荧光定量PCR仪。

1.3 方法

1.3.1 非小细胞肺癌患者完成解剖性肺叶切除: 肺叶切除后进行标准的系统淋巴结清扫,所有入组患者均为R0切除,达到根治性手术标准。术后病理分期IB期且并发高危因素的患者及II期以上患者建议辅助化疗3~4周期,采用含铂类的双药方案。术后5年之内,每6个月行胸部CT检查。所有患者每年接受1次上腹部B超,头颅CT或者MRI及全身骨扫描检查。术后每6个月进行一次随访,记录患者术后局部复发和转移性复发情况,包括复发或转移的首发部位,出现的具体时间。

总RNA提取采用Trizol法。血浆miRNA-145和miRNA-221表达采用RT-PCR技术检测。血清CYFRA21-1和CEA水平采用罗氏公司的Elecscy601电化学发光免疫分析技术测定,血清CYFRA21-1和CEA参考值范围分别为0~6.3 ng/ml, 0~3.5 ng/ml。

1.3.2 标本采集与处理: 抽取所有研究对象肘静脉血10 ml,未复发组于术后2周采取,复发组在CT或者MRI扫描显示有局部复发和转移性复发时采集,对照组于体检时采集。采取的血液分为两管,一管置于EDTA抗凝管中,在4℃环境以3 000 r/min的速度离心20 min后,收集血浆,用于检测miRNA-145和miRNA-221表达。另一管分离血清用于检测CEA和CYFRA21-1水平,分离的血清和血浆于-80℃冰箱冻存备用。

1.3.3 RT-PCR: 总RNA提取采用Trizol法。引物设计采用pfimer5软件,使用实时反应PCR仪

进行扩增反应。U6 作为内参照。实时定量 PCR 反应体系总体积为 20 μ l, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后以 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s 和 72 $^{\circ}$ C 40 s 进行 40 个循环, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 求出 miRNA-145 和 miRNA-221 的相对表达量。

表 1 miRNAs 引物序列

miRNAs	引物序列
miRNA-221	上游 5'-CATCTTCCAGTACAGTGTGGA-3' 下游 5'-CTCATTTGTGTCGTACGAACAGTG-3'
miRNA-145	上游 5'-GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT-3' 下游 5'-GTCCAGTCCCATTGGCCTAATCT-3'
U6	上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' 下游 5'-CGAAGCCCTTGCATCG-3'

表 2 NSCLC 患者血清 CYFRA21-1 和 CEA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组 (n=50)	未复发组 (n=19)	复发组 (n=36)	F
CYFRA21-1 (ng/ml)	3.02 \pm 1.17	9.05 \pm 3.43	47.68 \pm 16.72	96.83
CEA (ng/ml)	2.31 \pm 2.03	7.37 \pm 3.29	29.37 \pm 12.49	87.46

2.2 NSCLC 患者血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达水平比较 见表 3。未复发组的 miRNA-221 表达显著高于对照组, 而显著低于复发组; 未

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.00 软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。非小细胞肺癌的临床特征比较采用卡方检验, miRNA-145 和 miRNA-221 表达以及 CYFRA21-1 和 CEA 水平的比较采用单因素方差分析和 q 检验分析。相关性分析采用 Pearson 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 患者血清 CYFRA21-1 和 CEA 水平比较 见表 2。与对照组比较, 复发组和未复发组的 CYFRA21-1 和 CEA 水平显著增高; 而与未复发组比较, 复发组的两肿瘤标志物水平显著增高; 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。

复发组的 miRNA-145 表达显著低于对照组, 而显著高于复发组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 相关性分析 肺癌患者术后 5 年生存率为

表 3 NSCLC 患者血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组 (n=50)	未复发组 (n=55)	复发组 (n=55)	F
miRNA-145 水平	0.97 \pm 0.27	0.35 \pm 0.15	0.17 \pm 0.09	123.72
miRNA-221 水平	0.20 \pm 0.11	0.39 \pm 0.17	1.06 \pm 0.31	118.73

55.35%。在复发组中血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达具有负相关性 ($P < 0.01$), 见图 1。miRNA-145 表达分别与 CYFRA21-1 和 CEA 水平有负相关性 ($P < 0.01$), 见图 2~3, 而 miRNA-221 表达分别与 CYFRA21-1 和 CEA 水平有正相

关性 ($P < 0.01$), 见图 4~5。血浆 miRNA-221 和 miRNA-145 表达在鳞癌中的异常率高于腺癌, 在 TNM III 期中的异常率高于 I~II 期 ($P < 0.05$), 见表 4; 两标志物与患者年龄、肿瘤大小和吸烟无明显相关性 ($P > 0.05$)。

表 4 NSCLC 患者临床特征分析 (%)

项 目		n	miRNA-145			miRNA-221		
			异常	正常	χ^2	异常	正常	χ^2
年龄(岁)	<60	22	68.1	31.9	0.768	63.6	36.4	0.301
	≥ 60	33	72.7	27.3		64.3	35.7	
肿瘤大小	$\leq 3\text{cm}$	37	70.3	29.7	0.360	67.5	32.5	0.551
	$> 3\text{cm}$	18	72.2	27.8		55.5	44.5	
病理类型	鳞癌	35	80.0	20.0	0.033	74.2	25.8	0.043
	腺癌	20	50.0	50.0		45.0	55.0	
TNM 分期	I ~ II	43	62.5	37.5	0.012	55.8	44.2	0.039
	III	12	100.0	0		83.3	16.7	
吸烟	是	23	73.9	26.1	0.769	65.2	44.8	1.000
	否	32	68.7	31.3		62.5	47.5	

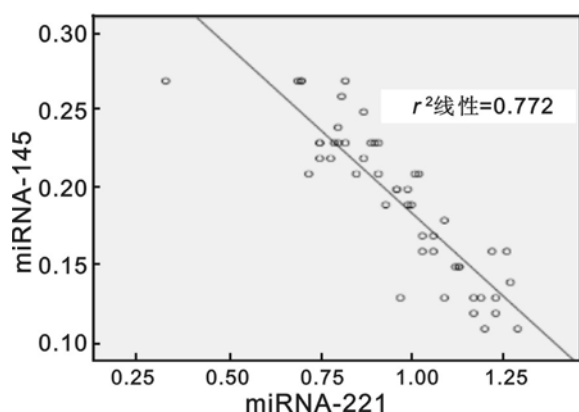


图1 miRNA-145与miRNA-221相关性分析

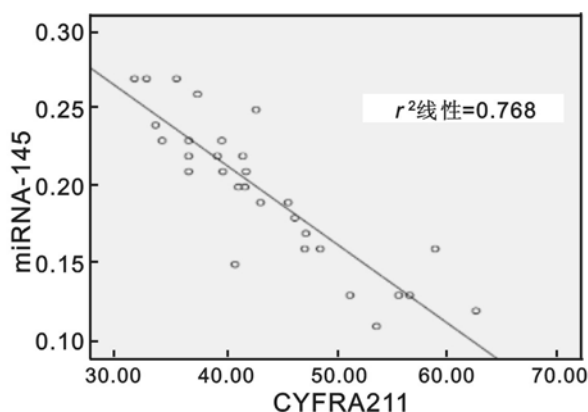


图3 miRNA-145与CYFRA21-1相关性分析

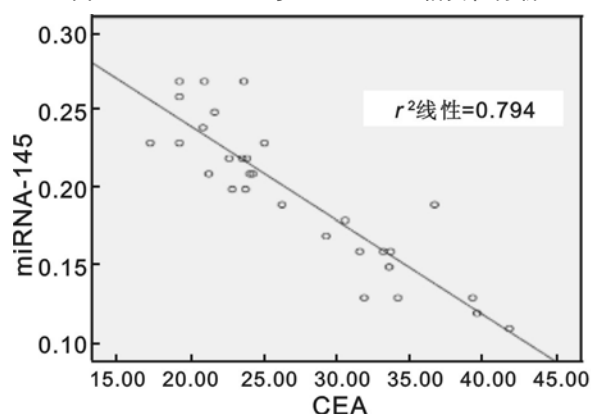


图2 miRNA-145与CEA相关性分析

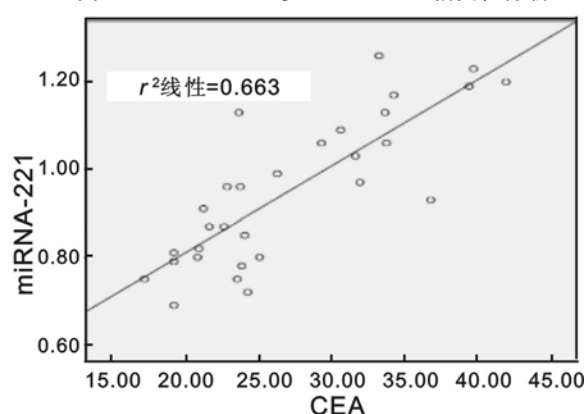


图4 miRNA-221与CEA相关性分析

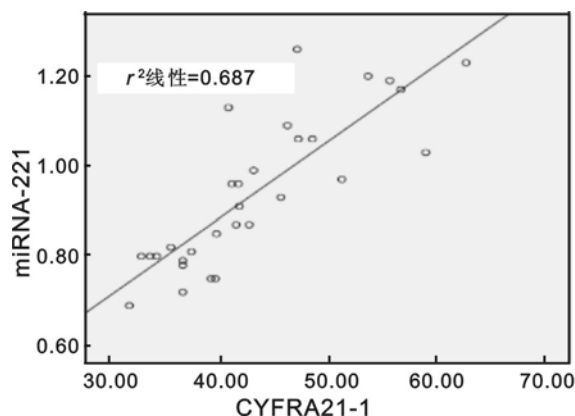


图5 miRNA-221与CYFRA21-1相关性分析

3 讨论 目前早期非小细胞肺癌的治疗已取得了很大进展,尤其是IA肿瘤期患者手术切除预后良好,5年生存率达到83.9%。但大多数非小细胞肺癌患者到了晚期才能得到正确的诊断,总生存率很低^[4],因此早期正确诊断并及时治疗可降低非小细胞肺癌患者的死亡率。更多的研究显示,外周血中microRNA的差异性表达可以识别多种人类肿瘤。miRNA-145被证实与前列腺癌、膀胱癌、食管癌、卵巢癌和肾癌等肿瘤的病理过程有关^[5]。YE等^[6]研究认为miRNA-145的甲基化程度与非小细胞肺癌患者的预后直接相关,其在非小细胞肺癌肿瘤组织中的表达水平显著下调。此外,miRNA-145已被证实在非小细胞肺癌的鳞癌和腺癌组织

中呈现低表达,并且与肿瘤的临床分期紧密相关^[7]。SUI等^[4]的研究则印证了外周循环中miRNA-145表达在非小细胞肺癌中的作用。他们发现非小细胞肺癌患者血清miRNA-145的表达明显低于对照组,且miRNA-145对非小细胞肺癌的诊断具有良好的敏感度和特异度。本研究采用RT-PCR技术对55例非小细胞肺癌患者的研究显示复发组患者血浆miRNA-145的表达显著低于对照组,进一步的分析显示未复发组血浆miRNA-145的表达明显增加。提示miRNA-145的表达上调可能抑制肿瘤细胞的生长并且促进非小细胞肺癌治疗的进展。

miRNA-221在非小细胞肺癌中的作用也已被证实。研究表明miRNA-221在非小细胞肺癌复发组的异常率为61.1%,上调miRNA-221表达可以促进非小细胞肺癌NCI-H1299细胞株的生长,而下调miRNA-221表达则导致了这种能力的降低^[8]。王峰等^[9]分析153例非小细胞肺癌患者的临床资料发现,miRNA-221表达与患者年龄、临床分期存在明显相关性。多因素COX回归分析显示,临床分期和miRNA-221表达是影响患者总生存期的独立危险因素,miRNA-221的高表达与非小细胞肺癌患者总生存期的缩短有关。miRNA-221在NSCLC疗效监测中的应用也被证实。有研

究纳入 184 例非小细胞肺癌患者作为研究对象,分析其术后复发情况,结果发现复发组血清 miRNA-221 表达水平及表达率高于未复发组^[10]。本研究采用 RT-PCR 技术分析非小细胞肺癌患者的疗效结果显示非小细胞肺癌术后复发组血浆 miRNA-221 表达显著高于对照组,而未复发组 miRNA-221 表达则明显降低,提示调节 miRNA-221 表达可能影响非小细胞肺癌患者的预后。

研究表明非小细胞肺癌患者血清 CEA 和 CYSRA21-1 水平明显增高,且随非小细胞肺癌病理 TNM 分期的递增而逐渐增高^[1]。检测血清 CEA 和 CYSRA21-1 水平可以监测非小细胞肺癌术后的复发^[11]。本研究结果显示未复发组 CEA 和 CYSRA21-1 水平高于对照组,而低于复发组。这些结果印证了非小细胞肺癌根治术的疗效,同时又能提示非小细胞肺癌的复发。相关性分析显示复发组血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达分别与 CEA 和 CYSRA21-1 具有显著相关性。非小细胞肺癌患者病理特征的分析显示 miRNA-145 和 miRNA-221 表达与 TNM 分期和病理类型有显著相关性。以上提示 miRNA-145 和 miRNA-221 可能参与非小细胞肺癌的病变进展,两标志物的差异表达可提示非小细胞肺癌术后的复发状况。

总之,随着对非小细胞肺癌分子生物学研究的深入,基于肿瘤标志物的诊断及预后研究将会有着越来越多的发现,有关恶性肿瘤新的分子标志物的研究和发现将可能会改变临床诊治的策略和流程。

参考文献:

- [1] 鲁丹,万彦彬,赖馨,等. 血清 CEA, NSE, CYFRA21-1 水平与非小细胞肺癌病理分期的相关性[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(6): 912-914.
LU Dan, WAN Yanbin, LAI Xin, et al. Level of serum CEA, NSE, CYFRA21-1 correlation with pathological staging of non-small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2016, 20(6): 912-914.
- [2] HA Minju, KIM V N. Regulation of microRNA biogenesis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(8): 509-524.
- [3] 王传新. 肺癌早期诊断的新肿瘤标志研究[J/OL]. 中华临床实验室管理(电子杂志), 2017, 5(4): 212-216.
WANG Chuanxin. Research of new tumor biomarkers for early diagnosis of lung cancer[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Management (Electronic Edition), 2017, 5(4): 212-216.
- [4] SUI Ankui, ZHANG Xifeng, ZHU Qing. Diagnostic value of serum miR197 and miR145 in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 17(3): 3247-3252.
- [5] 强勇, 杨楠, 张雷, 等. 非小细胞肺癌患者血清中 miRNA-145 的表达和意义[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(1): 62-65.
QIANG Yong, YANG Nan, ZHANG Lei, et al. Expression serum microRNA145 in patients with non-small cell lung cancer and its clinical significance[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2016, 29(1): 62-65.
- [6] YE Zhiqiang, SHEN Ning, WENG Yimin, et al. Low miR-145 silenced by DNA methylation promotes NSCLC cell proliferation, migration and invasion by targeting mucin[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(7): 1071-1079.
- [7] 张潍, 张伟, 王辉, 等. miRNA-141, miRNA-145 在非小细胞肺癌中的表达及与临床病理的关系[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 36(3): 368-372.
ZHANG Wei, ZHANG Wei, WANG Hui, et al. Expression of miRNA141 and miRNA145 in non-small cell lung cancer, and their relation with clinical pathology[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2015, 36(3): 368-372.
- [8] 吴展陵, 钟敏华. MicroRNA-221 对非小细胞肺癌 NCI-H1299 细胞生长的影响及其机制研究[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(6): 36-40.
WU Zhanling, ZHONG Minhua. Effect of microRNA-221 on NCI-H1299 cells growth in non-small-cell lungcancer[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2016, 28(6): 36-40.
- [9] 王峰, 李梅, 朱建伟, 等. miRNA-221 在行完全切除术非小细胞肺癌中的表达及患者生存分析[J]. 东南大学学报(医学版), 2016, 35(3): 332-336.
WANG Feng, LI Mei, ZHU Jianwei, et al. Expression of miRNA221 and its correlation with survival in non-small cell lung cancer[J]. Journal of Southeast University (Medical Sciences Edition), 2016, 35(3): 332-336.
- [10] 李犹龙, 范江. 5 种 miRNA 表达对 NSCLC 患者临床预后的影响[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(12): 1498-1500, 1507.
LI Youlong, FAN Jiang. Peripheral blood miRNAs and the prognosis of NSCLC[J]. Journal of Tropical Medicine, 2016, 16(12): 1498-1500, 1507.
- [11] 田应选, 余敏, 孙莉, 等. 五种血清肿瘤标志物检测对非小细胞肺癌术后复发诊断研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(3): 37-39.
TIAN Yingxuan, YU Min, SUN Li, et al. Application of tumor markers for early diagnosis in the postoperative recidivation of NSCLC[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 37-39.

收稿日期: 2019-05-07

修回日期: 2019-05-09