

食管癌患者血清神经元特异性烯醇化酶与长链非编码 RNA ITGA9-AS1 水平联合检测的实验诊断价值研究

朱 娇^{1a}, 孙国才^{1b}, 刘素荣^{1a}, 王英英²

(1. 兵器工业五二一医院 a. 肿瘤血液病科; b. 老年病科, 西安 710065;

2. 陕西中医药大学附属医院肿瘤二科, 陕西咸阳 712000)

摘要: 目的 探究食管癌(esophagus cancer, EC)患者血清神经元特异性烯醇化酶(neuronspecific enolase, NSE)与长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA) ITGA9-AS1水平联合检测的实验诊断价值。方法 选择2018年5月~2019年7月兵器工业五二一医院收治的112例EC可疑病变患者为研究对象,经病理学检查确诊67例EC患者为EC组,45例食管良性病变为食管良性病变组。采用电化学发光免疫分析仪检测NSE水平,采用实时荧光定量PCR(quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)检测血清lncRNA ITGA9-AS1的水平。Pearson相关分析分析血清NSE, lncRNA ITGA9-AS1水平与EC患者病理分期、肿瘤浸润深度的相关性。结果 EC组患者血清NSE($22.71 \pm 3.03 \mu\text{g/L}$ vs $2.98 \pm 0.22 \mu\text{g/L}$)和lncRNA ITGA9-AS1(0.88 ± 0.21 vs 0.64 ± 0.14)的表达水平高于食管良性病变组,差异具有统计学意义($t=13.33, 6.41$, 均 $P=0.00$)。III期EC患者血清NSE和lncRNA ITGA9-AS1水平显著高于I期和II期,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。另外肿瘤浸润深度T4血清NSE和lncRNA ITGA9-AS1水平显著高于T1,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。Pearson相关性分析结果显示,血清NSE, lncRNA ITGA9-AS1水平与EC患者病理分期、肿瘤浸润深度呈显著正相关($r=0.142, P=0.005$ 和 $r=0.171, P=0.013$)。血清NSE, lncRNA ITGA9-AS1诊断敏感度均较低,但均具有较高的特异度。联合检测在EC中有较高的敏感度和特异度,分别为82.1%和83.2%。结论 血清NSE和lncRNA ITGA9-AS1定量检测可用于EC的诊断,联合检测可提高诊断的敏感度。

关键词: 神经元特异性烯醇化酶; 长链非编码RNA; 食管癌

中图分类号: R735.1; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2021)05-062-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.05.014

Experimental Diagnostic Value of Combined Detection of Serum Neuron-Specific Enolase and Long Non-Coding RNA ITGA9-AS1 in Patients with Esophageal Cancer

ZHU Jiao^{1a}, SUN Guo-cai^{1b}, LIU Su-rong^{1a}, WANG Ying-ying²

(1a. Department of Oncology Hematology; 1b. Department of Geriatric, 521 Hospital of Norinco Group, Xi'an 710065, China; 2. the Second Oncology Department, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712000, China)

Abstract: Objective To explore the diagnostic value of combined detection of serum neuronspecific enolase (NSE) and long non-coding RNA(lncRNA) ITGA9-AS1 in patients with esophagus cancer (EC). **Methods** A total of 112 patients with suspected EC lesions admitted to 521 Hospital of Norinco Group from May 2018 to July 2019 were selected as the study subjects. 67 patients with EC confirmed by pathological examination were classified as EC group, and 45 patients with benign esophageal lesions were classified as esophageal benign lesions group. The level of NSE was detected by electrochemiluminescence immunoanalyzer, and the level of serum lncRNA ITGA9-AS1 was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** The expression levels of serum NSE($22.71 \pm 3.03 \mu\text{g/L}$ vs $2.98 \pm 0.22 \mu\text{g/L}$) and lncRNA ITGA9-AS1 (0.88 ± 0.21 vs 0.64 ± 0.14) in EC group were higher than those in esophageal benign lesions group, and the difference was statistically significant ($t=13.33, 6.41$, all $P=0.00$). The serum levels of NSE and lncRNA ITGA9-AS1 in stage III EC patients were significantly higher than those in stage I and II, with statistical significance ($P < 0.01$). In addition, the serum levels of NSE and lncRNA ITGA9-AS1 in T4 patients with tumor invasion depth were significantly higher than those in T1, with statistical significance ($P < 0.01$). Pearson correlation analysis showed that serum NSE, lncRNA ITGA9-AS1 levels were significantly positively correlated with pathological stage and tumor invasion depth in EC patients ($r=0.142, P=0.005$ and $r=0.171, P=0.013$). Serum NSE and lncRNA

作者简介: 朱娇(1987-),女,硕士,主治医师,研究方向:肿瘤血液病的临床诊疗, E-mail:aa362484318@126.com。

通讯作者: 王英英(1986-),女,硕士,主治医师,研究方向:常见肿瘤的治疗, E-mail:listars555@163.com。

ITGA9-AS1 had low diagnostic sensitivity, but both had high specificity and sensitivity. The sensitivity and specificity of the combined test in EC were 82.1% and 83.2%, respectively. **Conclusion** Quantitative detection of serum NSE and lncRNA ITGA9-AS1 could be used in the diagnosis of EC, and the combined detection can improve the sensitivity of the diagnosis.

Keywords: neuronspecific enolase; long non-coding RNA; esophageal carcinoma

食管癌(esophagus cancer, EC)是我国常见恶性肿瘤之一,其发病较隐匿,患者就诊时大多已处于中晚期,致死率高^[1-2]。临床上对EC患者主要采用手术治疗并辅以放疗、化疗和生物治疗,大量研究显示中晚期EC患者的生存率较早期明显降低,因此早期的EC诊疗是提高患者预后的关键点^[3]。近年来有报道指出神经元特异性烯醇化酶(neuronspecific enolase, NSE)对EC的诊断具有一定价值和意义^[4],但敏感度不高。目前已有多种与EC密切相关的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)被鉴定出来,其广泛分布于血清、脑脊液和血浆等体液中^[5]。lncRNA ITGA9-AS1在乳腺癌中低表达且与患者病理特征恶化有关^[6],关于lncRNA ITGA9-AS1在EC中的表达及意义尚不明确。本研究通过测定NSE和血清lncRNA ITGA9-AS1水平,旨在分析其在EC中的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2018年5月~2019年7月兵器工业五二一医院收治的112例EC可疑病变患者为研究对象,其中男性59例,女性53例;年龄30~71岁,平均年龄 51.04 ± 8.97 岁。经病理学检查确诊67例EC患者为EC组,45例食管良性病变为食管良性病变组(食管炎12例、食管溃疡27例和Barrett食管6例)。本研究经由我院伦理委员会审批。

纳入标准:①研究对象均经胃镜检查有黏膜粗糙和食管糜烂等表现,出现吞咽不适、反酸等不适者;②临床资料完整;③自愿参与本研究且签署知情同意书。

排除标准:①合并重要脏器功能衰竭者;②并发其他恶性肿瘤和严重感染者。

1.2 仪器与试剂 雅培I2000型电化学发光免疫分析仪,Trizol试剂购自Invitrogen公司,SYBR Green Realtime PCR Master Mix扩增试剂盒购自日本ToYoBo公司,TakaRa Prime-Script RT reagent kit购自大连宝生物工程有限公司,血清RNA提取试剂盒购自北京天根公司,荧光定量PCR仪(美国Bio-rad公司),lncRNA ITGA9-AS1及内参引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 方法 采集两组晨起空腹肘静脉血3 ml,12 000 r/min离心10 min分离血清,-20℃保存。采用电化学发光免疫分析仪和配套试剂盒检测NSE水平。

取EC组织和食管良性病变组织,采用血清

RNA提取试剂盒提取组织中的总RNA,采用TakaRa Prime-Script RT reagent kit将血清总RNA逆转录为cDNA,采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测血清lncRNA ITGA9-AS1和内参基因GAPDH的水平。lncRNA ITGA9-AS1引物序列为:F:5'-GTTCTGAAAATCACAGTCATCCTA-3',R:5'-TGTGCTTCCGTCACCTCTAAATC-3'。GAPDH引物序列为:F:5'-ATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGA-3',R:5'-TTCTCCATGGTGGTG AAGACGCCA-3'。95℃预变性2 min,95℃15s,60℃30s共40个循环,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值计算lncRNA ITGA9-AS1的相对表达量。

1.4 统计学分析 采用SPSS 19.0统计学软件处理数据,满足正态性分布及方差齐性的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,相关性分析采用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清NSE和lncRNA ITGA9-AS1水平的比较 EC组患者血清NSE($22.71 \pm 3.03 \mu\text{g/L}$ vs $2.98 \pm 0.22 \mu\text{g/L}$)和lncRNA ITGA9-AS1(0.88 ± 0.21 vs 0.64 ± 0.14)的表达水平高于食管良性病变组,其差异具有统计学意义($t=13.33, 6.41$,均 $P=0.00$)。

2.2 EC患者NSE和lncRNA ITGA9-AS1水平与病理分期、肿瘤浸润深度的关系 见表1。III期EC患者血清NSE和lncRNA ITGA9-AS1水平显著高于I期和II期,其差异具有统计学意义($P < 0.01$),另外肿瘤浸润深度T4血清NSE和lncRNA ITGA9-AS1水平显著高于T1,其差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 EC患者NSE和lncRNA ITGA9-AS1水平与病理分期、肿瘤浸润深度的关系

病理特征	NSE ($\mu\text{g/L}$)	lncRNA ITGA9-AS1
I期	11.15 ± 2.48	0.26 ± 0.20
II期	$17.26 \pm 4.11^{\#}$	$0.71 \pm 0.64^{\#}$
III期	$25.32 \pm 3.61^{**}$	$1.17 \pm 1.35^{**}$
T ₁	11.13 ± 2.56	0.27 ± 0.25
T ₂	13.25 ± 4.15	0.51 ± 0.23
T ₃	15.42 ± 3.71	$0.71 \pm 1.35^{\#}$
T ₄	25.41 ± 4.05^{bc}	$1.15 \pm 1.05^{\#}$

注:相较于I期,[#] $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;相较于III期,[#] $P < 0.01$;相较于T₁,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;相较于T₃,^c $P < 0.01$ 。

2.3 血清 NSE, lncRNA ITGA9-AS1 水平与 EC 患者病理分期、肿瘤浸润深度的相关性 Pearson 相关性分析结果显示, 血清 NSE, lncRNA ITGA9-AS1 水平与 EC 患者病理分期、肿瘤浸润深度呈显著正相关 ($r=0.142, P=0.005; r=0.171, P=0.013$)。

2.4 血清 NSE, lncRNA ITGA9-AS1 联合检测对 EC 的诊断价值 血清 NSE, lncRNA ITGA9-AS1 诊断敏感度均较低 (23.9%, 53.0%), 但均具有较高的特异度 (93.7%, 90.2%)。联合检测在 EC 中有较高的敏感度和特异度, 分别为 82.1% 和 83.2%。

3 讨论

EC 位居世界癌症死因的第 6 位, 我国 EC 患者的死亡和发病病例约占全球的 50%, 尤其是医疗卫生相对欠发达的中西部农村高发地区, EC 给当地患者带来了巨大的经济负担和精神压力^[7]。EC 发病隐匿导致就诊时患者大多无法治愈, 预后较差。流行病学指出发展中国家 EC 患者的 5 年生存率小于 5%, NSE 是神经内分泌细胞特有烯醇化酶的同工酶, 在小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 中过量表达^[8], 其还可用于小儿神经母细胞瘤病情和治疗效果的评估^[9]。屈雪等^[10]指出 NSE 在 EC 患者中的表达高于食管良性病变组, 但是单独检测其特异度较低。目前已有多种与 EC 密切相关的 lncRNA 被鉴定出来, 其广泛分布于血清、脑脊液和血浆等体液中^[11-12]。lncRNA ITGA9-AS1 在乳腺癌中低表达且与患者病理特征恶化有关, 关于 lncRNA ITGA9-AS1 在 EC 中的表达及意义尚不明确。本研究通过测定血清 NSE 和 lncRNA ITGA9-AS1 水平, 旨在分析其在 EC 中的诊断价值。

本研究结果显示: 相较于食管良性病变组, EC 组患者血清 NSE 和 lncRNA ITGA9-AS1 过量表达, 并且随着 EC 的进展, 分期愈晚, 肿瘤浸润深度愈深, 血清 NSE 和 lncRNA ITGA9-AS1 水平愈高, 说明 NSE 和 lncRNA ITGA9-AS1 可用于 EC 的早期诊断。但敏感度、特异度分析提示, 单一标志物检测敏感度欠佳, 无法用于 EC 的诊断和病情评估, 应用价值有限。当联合 NSE 和 lncRNA ITGA9-AS1 时敏感度和特异度均较高, 分别为 82.1% 和 83.2%, 说明联合检测可有效弥补单项指标检测敏感度不强的缺点。

综上所述, 血清 NSE 和 lncRNA ITGA9-AS1 联合检测可提高 EC 早期诊断的敏感度, 值得深入研究。

参考文献:

- [1] 孟茜茜, 张子凡, 程志远, 等. 食管癌肿瘤标志物研究及临床应用进展 [J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(7):634-639.
MENG Qianqian, ZHANG Zifan, CHENG Zhiyuan,

et al. Advances in research and clinical application of tumor markers in esophageal cancer [J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2019, 39(7):634-639.

- [2] 马箐, 马山蕊, 王孟, 等. MicroRNAs 与食管癌关系的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2017, 26(5):371-377.
MA Qing, MA Shanrui, WANG Meng, et al. Research progress on relationship between microRNAs and esophageal cancer [J]. China Cancer, 2017, 26(5):371-377.
- [3] 吴丹, 贺远龙. 早期食管癌内镜下切除术后食管狭窄的防治进展 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32(11):1882-1884.
WU Dan, HE Yuanlong. Progress in the prevention and treatment of esophageal stenosis after endoscopic resection of early esophageal cancer [J]. The Journal of Practical Medicine, 2016, 32(11):1882-1884.
- [4] 熊利芬, 李蜀豫. 食管黏膜脱落细胞 DNA 倍体联合血清 IL-12, IL-16, IL-17 检测在食管癌诊断中的应用 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(11):24-27.
XIONG Lifen, LI Shuyu. DNA ploidy in esophageal mucosa exfoliated cells combined with serum IL-12, IL-16 and IL-17 detection in diagnosis of patients with esophageal cancer [J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2019, 31(11):24-27.
- [5] 李国良, 朱明闯, 熊鹏, 等. 长链非编码 RNA 在食管癌中的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34 (24):4015-4018.
LI Guoliang, ZHU Mingchuang, XIONG Peng, et al. Research progress of long non-coding RNA in esophageal cancer [J]. The Journal of Practical Medicine, 2018, 34(24):4015-4018.
- [6] 贾小婷, 罗利云, 郑国沛, 等. lncRNA ITGA9-AS1 抑制乳腺癌细胞增殖并增强其对顺铂的敏感性 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(7):706-711.
JIA Xiaoting, LUO Liyun, ZHENG Guopei, et al. lncRNA ITGA9-AS1 inhibits proliferation and enhances sensitivity of breast cancer cells to cDDP [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 33(7):706-711.
- [7] 杜园园, 李鹏, 郭旭霞. 血清 C-反应蛋白联合细胞角蛋白 19 片段抗原、鳞状上皮细胞癌相关抗原及神经元特异性烯醇化酶检测在食管癌患者中的临床应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(9):1033-1035, 1042.
DU Yuanyuan, LI Peng, GUO Xuxia. Clinical application of combined detection of serum CRP, CYFRA21-1, SCC and NSE in esophageal cancer [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2020, 30(9):1033-1035, 1042.
- [8] 彭彦, 王燕, 李峻岭, 等. 血清 NSE, ProGRP 和 LDH 在小细胞肺癌诊断治疗中的作用 [J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(9):590-594.
PENG Yan, WANG Yan, LI Junling, et al. Utility of NSE, ProGRP and LDH in diagnosis and treatment in patients with small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2016, 19(9):590-594.