

·基础研究·

本文引用:王瑛琨,贾冬冬,刘琼,窦宇红,徐志康,刘和录.血浆 miR-200c 作为肺癌早期诊断的临床价值研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(1):40-42.

血浆 miR-200c 作为肺癌早期诊断的临床价值研究

王瑛琨,贾冬冬,刘琼,窦宇红,徐志康,刘和录*

(广州医科大学附属深圳沙井人民医院检验科,广东 深圳 518125)

[摘要] 目的 分析血浆 miR-200c 的表达与肺癌患者临床病理特征的相关性,并探讨 miR-200c 能否作为肺癌早期诊断的潜在肿瘤标志物的可能性。方法 收集 55 例肺癌患者和 53 例健康体检者,采用实时荧光定量 PCR 检测受检者血浆 miR-200c 的表达情况,对检测结果进行统计学分析。结果 miR-200c 在肺癌患者组血浆中表达水平平均高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。受试者工作特征曲线显示 miR-200c 能够将肺癌与正常对照组区分出来(AUC=0.676)。结论 血浆 miR-200c 的表达可能与肺癌的发生有关,提示 miR-200c 可作为特异性生物标志物对肺癌患者进行早期诊断的可能性。

[关键词] 肺癌;miR-200c;实时荧光定量 PCR;早期诊断

[中图分类号]R73-34;R734.2 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.01.010

Clinical Value of Plasma miR-200c in Early Diagnosis of Lung Cancer

WANG Yingkun, JIA Dongdong, LIU Qiong, DOU Yuhong, XU Zhikang, LIU Helu*

(Clinical Laboratory, Shenzhen Shajing Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Shenzhen, Guangdong 518125, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the correlation between plasma miR-200c expression and clinicopathological features of lung cancer patients, and to explore the possibility of miR-200c as a potential tumor marker for early diagnosis of lung cancer. **Methods** Fifty lung cancer patients and fifty-three healthy subjects, the expression of miR-200c in plasma was detected by real-time fluorescent quantitative PCR, and the results were statistically analyzed. **Results** MiR-200c expression in lung cancer patients were higher than that in normal control group and the difference was statistically significant ($P<0.01$). The receiver operating characteristic curve showed that miR-200c expression was able to differentiate lung cancer from the normal control group (AUC=0.676). **Conclusion** The expression of miR-200c in plasma may be related to the occurrence of lung cancer, suggesting that miR-200c may be a specific biomarker in patients during early diagnosis.

[Keywords] lung cancer; miR-200c; real time PCR; early diagnosis

由于空气污染、吸烟等原因,肺癌的发病率逐年上升,位居全球恶性肿瘤发病首位。研究发现^[1],通过早期诊断可明显延长病人存活率。微小 RNA(miRNA)是一种广泛参与机体多种生物学功能的非编码短小 RNA,可调控细胞增殖、分化和凋亡,在肿

瘤发生、发展中具有重要作用^[1-2]。miR-200c 是 miR-200 家族成员之一,近年来许多研究表明,miR-200c 参与肿瘤发生、发展、转移和耐药等过程^[3-4]。但目前 miR-200c 在肺癌中的生物学功能并不清楚。本研究通过 real-time PCR 技术检测 miR-200c 在

[收稿日期]2016-12-14

[基金项目]深圳市宝安区科技创新局社会公益项目(2014208)。

[作者简介]王瑛琨,女,主管技师,研究方向:临床检验。

[通讯作者]*刘和录,男,博士,主任技师,E-mail:185766321@qq.com。

肺癌患者和健康体检者血浆中的表达情况,探讨血浆 miR-200c 的表达与肺癌发生的关系以及其是否可作为特异性生物标志物对肺癌患者进行早期诊断。

1 资料和方法

1.1 一般资料

在病人知情同意情况下,收集 2014 年 4 月-10 月于本院和广州医科大学呼吸疾病研究所就诊的患者血液标本。挑选未经治疗且疾病处于 I/II 期的新发病例,经病理学确诊的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者 55 例为观察组,另选取本院 53 例健康体检者作为对照组。两组性别、年龄比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 肺癌患者组和正常对照组的性别、年龄特征比较 (例, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 性别 | | 年龄/岁 |
|-------------|-------|----|-------------|
| | 男 | 女 | |
| 肺癌患者组(55 例) | 31 | 24 | 60.71±10.62 |
| 正常对照组(53 例) | 24 | 29 | 57.11±12.09 |
| <i>P</i> 值 | 0.338 | | 0.103 |

1.2 病例选择标准

1.2.1 诊断标准 (1)NSCLC 分期:根据 TNM 分期,可分为 I、II、III、IV 期,其中 I~II 期为早期。(2)NSCLC 肺癌病变组织的病理组织学确诊、分期及分型按照 1997 年国际抗癌联盟(UICC)和美国癌症联合委员会(MCC)对 NSCLC 的诊断标准^[9]执行。

1.2.2 纳入标准 (1)未经治疗且处于疾病 I/II 期患者;(2)疾病局限于胸部,没有远端转移的证据;(3)标本采集前一年内患者没有外科手术史和放射治疗史。

1.2.3 排除标准 (1)疾病处于 III/IV 期患者;(2)疾病有远端转移的证据;(3)标本采集前一年内患者有外科手术史和放射治疗史;(4)有肺部其他疾病如肺炎、肺结核、慢性阻塞性肺病等患者。

1.2 方法

1.2.1 样本收集 用 EDTA 抗凝管抽取静脉血液 5.0 mL 并混匀抗凝,30 min 内于 4 °C,3 000 g 离心 10 min。上层血浆分装至 1.0 mL 冷冻管,每管 0.5 mL,置-80 °C 贮存备用。

1.2.2 miR-200c 表达检测 受试者均分别取血浆 400 μ L,参照 miReasy Mini Kit miRNA (Qiagen 公

司,德国)提取试剂盒提供的方法提取血浆 miRNA。按照 miScript Reverse Transcription Kit 试剂盒(Qiagen 公司,德国)说明进行 miRNA 的逆转录,由于血清中 miRNA 的浓度较低,按照试剂盒说明书进行预扩增,条件为 15 μ L 模板 RNA+4 μ L Buffer RT+1 μ L Mix,反应体系为 20 μ L,反应条件为 37 °C,1 h,95 °C,5 min。然后采用 miScript SYBR Green PCR Kit 试剂盒(Qiagen 公司,德国)在 real-time qPCR 仪器(Applied Biosystems 公司)进行定量检测。反应体系为 20 μ L。反应条件为 95 °C,15 min,94 °C,30 s,55 °C,15 s,70 °C,30 s,设置 2 个重复孔,40 个循环结束。实验所用引物及探针由上海英淮捷基生物技术有限公司合成。引物序列为 TAAT-ACTGCCGG GTAATGATGGA。

1.2.3 定量 PCR 数据分析 miR-200c 为目的基因,miR-Cel-54 作为内参基因作数据的标准化处理。肺癌样本作为实验组 c,正常样本作为对照组 n。目的基因的相对表达量(Re)应用 $2^{-\Delta CT}$ 公式进行计算, $\Delta CT_c = CT_{c_{目}} - CT_{c_{内}}$, $\Delta CT_n = CT_{n_{目}} - CT_{n_{内}}$ 。对目的基因的相对表达量对数处理后 ($\log_2 Re = -\Delta CT$) 进行统计学整理分析。统计学分析使用 SPSS 17.0 软件,性别比较采用卡方检验,年龄比较采用 *T* 检验,miR-200c 在两组间的分布差异采用 *Levene* 检验,双侧 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。同时计算出接收器的操作特性曲线(ROC 曲线)下的 AUC(area under the curve) 值,以评估指标的诊断价值,AUC>0.5 为有诊断价值。

2 结果

2.1 受试者的基本情况分析

肺癌患者组和正常对照组年龄、性别比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 miR-200c 在肺癌患者组和正常对照组中的表达比较

miR-200c 的 FC(fold change)值大于 1,表示在肺癌患者组中 miR-200c 高表达,且差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 2。与正常组比较,肺癌患者血浆 miR-200c 含量 5.528 5 倍显著高水平表达,且肺癌患者接收器的操作特性曲线下的面积(AUC)的值是 0.676,表明有诊断价值(AUC>0.5)。见图 1。

表 2 miR-200c 在肺癌患者组和正常对照组中的表达比较

| 项目 | 肺癌患者组 C/n=55 | | 正常对照组 N/n=53 | | - $\Delta\Delta CT^*$ | FC**fold change | <i>P</i> 值 |
|----------|-------------------|---------|-------------------|---------|-----------------------|-----------------|------------|
| | 均值(ΔCT) | 标准差 | 均值(ΔCT) | 标准差 | | | |
| miR-200c | 7.472 7 | 2.157 3 | 9.939 6 | 4.027 3 | 2.466 9 | 5.528 5 | 0.000 |

注:**FC:miRNA 在 C 组的含量是 N 组的倍数,数值大于 1 即为在肿瘤组中是高表达。

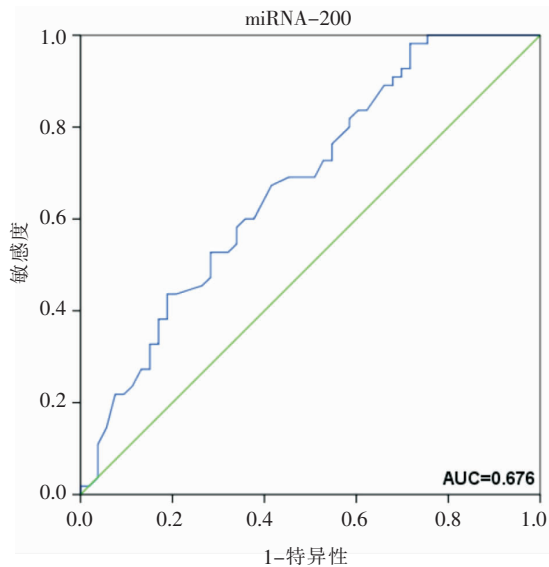


图1 肺癌患者组和正常组血浆中 miR-200c 含量的 ROC 曲线分析

3 讨论

肺癌是世界范围内发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一^[6],且绝大多数患者被确诊时已到局部晚期或发生了远处转移^[7],严重威胁着人类健康。如果肺癌能早期诊断可明显延长病人存活率。miRNA 是长约 22 个碱基大小的非编码 RNA,通过与靶基因完全或不完全结合抑制靶基因的功能或降解靶基因,从而在转录后水平调节基因表达^[8]。同时参与调节生理过程的许多方面,例如细胞的分化、增殖、新陈代谢、耐药性以及凋亡,同时它还发挥癌基因和抑癌基因的作用。miRNA 只有在受到致病因素的影响以及病理状态下,其表达量才会发生改变,因此 miRNA 具有成为各种疾病的诊断生物标志物的可能^[9]。在早期肺癌患者与晚期肺癌患者中,miRNA 同样有着不同的表达模式,说明 miRNA 表达谱的变化是随肿瘤的发展而改变的^[10]。miR-200c 属于 miRNA-200 家族一员(miRNA-200 家族包括 miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429),miRNA-200 家族与肿瘤的侵袭、转移甚至肿瘤干细胞均有密切关系。

Kim 等^[11]研究报道在 72 例非小细胞肺癌和 30 例肺良性疾病组织中,miR-200c 在非小细胞肺癌的表达显著增高 ($P < 0.01$),miR-200c 可能发挥致癌作用,可能是潜在的非小细胞肺癌的预后标志物。Chen 的研究^[12]检测结肠癌和癌旁组织中 miR-200c 的表达水平,在结肠癌组织中 miR-200c 表达显著升高,且下调 miR-200c 水平可诱导细胞凋亡。还有研究表明^[13]在结肠癌组织中 miR-200c 表达水平显著高于正常组织,与健康人群相比,结肠癌患者血浆中 miR-200c 表达水平显著升高,且术后较术前显

著降低,miR-200c 可能作为结肠癌筛选的分子标志物。晚期食管鳞状细胞癌患者血清 miR-200c 与健康对照组相比显著升高,且与晚期食管鳞状细胞癌 TNM 分期和疗效显著相关^[14]。

本研究通过分析 55 例肺癌患者和 53 例健康体检者血浆的 miR-200c 的表达,在肺癌患者组血浆中 miR-200c 表达水平平均高于正常对照组,受试者工作特征曲线显示 miR-200c 能够将肺癌与正常对照组区分出来。与国内研究报道^[15]miR-200c 在肺癌细胞和组织中的表达水平普遍升高的结论一致。因此可推论血浆 miR-200c 的表达可能与肺癌的发生有关,提示 miR-200c 具有作为特异性生物标志物对肺癌患者进行早期诊断的可能性。

参考文献:

- [1] ZHANG Y C, XU Z, ZHANG T F, et al. Circulating microRNAs as diagnostic and prognostic tools for hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(34): 9853-9862.
- [2] 唐金凤,鲁耀邦,胡文铎,等.miR-135b 在鼻咽癌中的表达及其意义[J].湖南中医药大学学报, 2015, 35(7):50-53.
- [3] FENG X, WANG Z, FILLMORE R, et al. MiR-200, A new star miRNA in human cancer[J]. Cancer Lett, 2014, 344(2):166-173.
- [4] 朱名毅,姚金光,刘津,等.miR-200c 在肿瘤发生发展中的研究进展[J].右江民族医学院学报, 2014, 36(1):80-82.
- [5] MOUNTAIN C F. Revisions in the international system for staging lung cancer[J]. Chest, 1997, 111(6):1710-1717.
- [6] JEMAL A, TIWARI R C, MURRAY T, et al. Cancer statistics 2004[J]. CA Cancer J Clin, 2004, 54(1):8-29.
- [7] JEMAL A, CENTER M M, DESANTIS C, et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(8):1893-1907.
- [8] HE L, HANNON G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(7):522-531.
- [9] 彭岭,郭宗耀,李杰,等.循环 microRNA 在冠心病及其中医证候诊断中的作用[J].湖南中医药大学学报, 2016, 36(5):85-88.
- [10] 丁琦晨,郑敏.血液 miRNA 在肺癌诊断中作用的研究进展[J].中华胸部外科电子杂志, 2015, 2(2):94-97.
- [11] KIM M K, JUNG S B, KIM J S, et al. Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. Virchows Arch, 2014, 465(4):463-471.
- [12] CHEN J, WANG W, ZHANG Y, et al. The roles of miR-200c in colon cancer and associated molecular mechanisms [J]. Tumour Biol, 2014, 35(7):6475-6483.
- [13] ZHANG G J, ZHOU T, LIU Z L, et al. Plasma miR-200c and miR-18a as potential biomarkers for the detection of colorectal carcinoma[J]. Mol Clin Oncol, 2013, 1(2):379-384.
- [14] YU H, DUAN B, JIANG L, et al. Serum miR-200c and clinical outcome of patients with advanced esophageal squamous cancer receiving platinum-based chemotherapy[J]. Am J Transl Res, 2013, 6(1):71-77.
- [15] 王勇,李宇男,于晓松.肺癌细胞及组织中 miR-181a, miR-200a, miR-200c 表达变化及意义[J].山东医药, 2014, 54(48):16-18.