

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.014

血清 miR-141 和 miR-143 联合检测非小细胞性肺癌的诊断价值*

王雨涵,王洁,张洪为,雷丽明,黄远帅[△]

(泸州医学院附属医院输血科,四川泸州 646000)

[摘要] 目的 探讨血清中 microRNA 作为非小细胞性肺癌生物标志物的诊断价值。方法 采用定量 RT-PCR 检测训练组中 30 例非小细胞性肺癌患者血清、30 例健康对照者血清中差异表达的 microRNA,采用受试者工作曲线和曲线下面积来筛选作为候选标志物的 microRNA,建立诊断模型,再用 15 例非小细胞肺癌和 15 例健康对照者中的候选 miRNA 的表达情况去验证模型(验证组)的诊断效能,计算灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值等诊断价值。结果 训练组中 miR-141 和 miR-143 表达与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),在验证组中二者联合的诊断效能分别为:灵敏度为 99%(95%CI:0.94~1.0),特异度为 85%(95%CI:0.75~0.93),阳性预测值为 87%,阴性预测值为 99%。结论 血清 miR-141 和 miR-143 是非小细胞性肺癌潜在的诊断标志物。

[关键词] 非小细胞性肺癌;微小 RNA;灵敏度;特异度

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)07-0904-03

Serum miR-141 and miR-143 as biomarkers for detection of non-small cell lung cancer*

Wang Yuhuan, Wang Jie, Zhang Hongwei, Lei Liming, Huang Yuanshuai[△]

(Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the significance of serum miR-141 and miR-143 level as early biomarkers for non small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Serum miR-141 and miR-143 level were measured by qRT-PCR. 90 samples were divided into two sets, training set and the test set. In training set, it was compared in two groups of: 30 patients with NSCLC, 30 healthy volunteers and screened some candidate microRNA differential pairs (miR-141 and miR-143). In the test set (15 patients with NSCLC, 15 healthy volunteers) we validated the value of diagnostic with miR-141 and miR-143 and calculated some data: sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). **Results** In training set, the expression of miR-141 and miR-143 were significant different compared to the control group. In the test set, the diagnostic values of miR-141 and miR-143 were as follow: sensitivity 99% (95%CI: 0.94-1.0), specificity 85% (95%CI: 0.75-0.93), PPV 87% and NPV 99%. **Conclusion** Serum miR-141 and miR-143 are promising early biomarkers for NSCLC.

[Key words] non small cell lung cancer; microRNA; sensitivity; specificity

肺癌是全世界发病率和病死率最高的癌症之一。2012 年美国癌症调查结果有 226 160 例新增病例及 160 340 例死亡病例。肺癌分为小细胞性肺癌和非小细胞性肺癌,其中,后者占肺癌比例大于 80%,且其发病率呈逐年上升趋势^[1]。随着诊疗技术的发展,非小细胞性肺癌患者的治疗效果已有所改善,但预后仍不容乐观,总的 5 年生存率仅 15%^[2]。因为缺乏早期有效的诊断方法,所以,大部分非小细胞性肺癌患者在确诊时已经失去最佳的治疗时机。目前,非小细胞性肺癌的诊断方式主要有病理活检、影像学检查及实验室检查。病理活检是非小细胞性肺癌诊断的“金标准”,但因为取材和创伤性等原因限制了其在临床的应用。影像学检查如 CT 一度成为肺癌检测的重要手段,但其假阳性率高达 96.4%,检测费用偏高,因此,不适合常规体检^[3]。实验室检测项目有 CEA、CYFRA21-1、NSE 等,但是无论是单项检测或是联合应用,其灵敏度和特异度都不够理想^[4-5]。因此,寻找一种新的、诊断效能高的非小细胞性肺癌诊断标志物显得尤为重要。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,其大小长约 20~25 个核苷酸。miRNA 参与了广泛的生物学过程,如细胞的分化、增殖、凋亡、黏附及死亡

等,与癌症的形成及演变密切相关^[6]。血清 miRNA 在作为诊断方面的作用是近年来研究的热点。血清 miRNA 表达稳定、检测方便、损伤性小,是理想的癌症诊断标志物。血清 miRNA 在非小细胞性肺癌中的应用已有相关文献报道^[7-9]。本研究旨在寻找在非小细胞性肺癌患者血清中特异表达的 miRNA,评价其作为非小细胞性肺癌生物标志物的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 样本收集 采集来本院就诊的早期非小细胞性肺癌患者(治疗前,以 I~II 期为主)和门诊体检者的血液标本各 4 mL 于 BD Vacutainer 管内,分离血清,储存于 -80 °C 待用。患者资料见表 1,所有癌症患者均经病理检查证实且签署了知情同意书,本研究符合人体试验伦理学标准,并得到本院伦理委员会批准。

1.2 定量 RT-PCR (quantitative RT-PCR, qRT-PCR) 检测方法 逆转录反应和实时定量 PCR 技术联合检测训练组共 90 例标本中 miRNA,由于 miRNA16 大量而稳定地存在于血清中,所以,用它作为内标物质进行标准化^[10]。所用试剂为 Taqman human miRNA assay kit (由 Biosystems, Carlsbad, CA 提供),按试剂盒说明书步骤操作。

表 1 非小细胞性肺癌和健康对照组的临床基本资料

项目	健康对照训练组(n=30)	NSCLC 训练组(n=30)	健康对照验证组(n=15)	NSCLC 验证组(n=15)
年龄(̄±s,岁)	52.0±4.8	55.0±5.3	51.0±6.2	56.0±6.0
性别(男/女)	16/14	15/15	8/7	7/8
吸烟史(%)*	23	25	11	12
腺癌(%)	—	67.5	—	52.8
鳞状细胞癌(%)	—	32.5	—	47.2
Stage I Tumor(%)	—	33.2	—	62
Stage II Tumor(%)	—	33.0	—	23
Stage III Tumor(%)	—	33.8	—	11
Stage IV Tumor(%)	—	0	—	4

*:吸烟史的定义:持续吸烟至少 1 年以上者。—:此项无数据。

1.3 数据分析 运用 melting curve 测定 miRNA 的 Ct 值,目的 miRNA 在癌症组和对照组中的 Ct 值变化量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示。 $\Delta\Delta Ct = \text{癌症组}(Ct_{\text{目的miRNA}} - Ct_{\text{miRNA-16}}) - \text{对照组}(Ct_{\text{目的miRNA}} - Ct_{\text{miRNA-16}})$ 。在训练组中,非小细胞性肺癌和健康人组的 miRNA Ct 值比较用 Mann-Whitney U 检验,组间数据比较使用 Fisher 检验,筛选出表达差异的 miRNA,再用受试者工作曲线(ROC)及曲线下面积(AUC)比较不同 miRNA 区分非小细胞性肺癌和健康人组的能力,找到差异最显著的 miRNA,计算其灵敏度、特异度、阳性预测值[=真阳性/(真阳性+假阳性)×100%]、阴性预测值[=真阴性/(真阴性+假阴性)×100%]。然后将筛选出的差异 miRNA 带入验证组验证其诊断效能(灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值)。使用 Graph Pad-Prism V4.03 和 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,用 Log10 的常规转化数来表示相应 miRNA 的相对表达量。

2 结 果

2.1 血清 miR-141 和 miR-143 是非小细胞性肺癌的潜在生物标志物 用 qRT-PCR 检测训练组中按照年龄、性别和吸烟史匹配的患者标本和健康对照者样本各 30 例,总共检测到 53 个表达差异的 miRNA。其中,8 个能区分非小细胞性肺癌和健康对照者,其灵敏度和特异度均达 70% 以上,这 8 个候选的 miRNA 中有 6 个独立表达的 miRNA。用 Fisher 检验进行组间对比,最后筛选出 4 个 miRNA,分别为 miR-141、miR-143、miR-15b 和 miR-142-3p,在验证组验证其两两联合诊断非小细胞性肺癌的灵敏度和特异度在 73% 以上($P < 0.01$),见表 2、图 1,与单独的 miRNA 比较(图 2),联合诊断更有优势,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 验证组中不同 miRNA 组合对非小细胞性肺癌的诊断效能(%)

miRNA 组合	阳性预测值	阴性预测值	灵敏度	特异度
miR-141 和 miR-143	87	99	99	85
miR-15b 和 miR-143	78	91	93	74
miR142-3p 和 miR-143	77	84	86	75
miR-141 和 miR-15b	81	76	74	83
miR142-3p 和 miR-15b	75	76	76	75
miR142-3p 和 miR-141	76	74	73	77

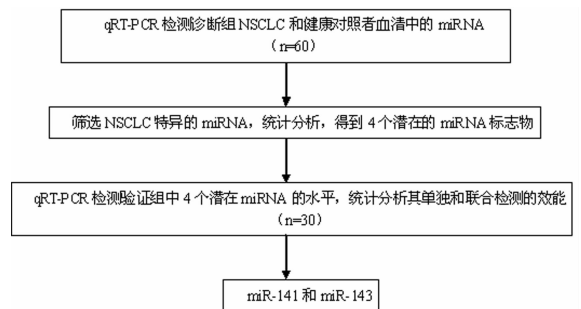


图 1 非小细胞肺癌 miRNA 生物标志物的检测过程

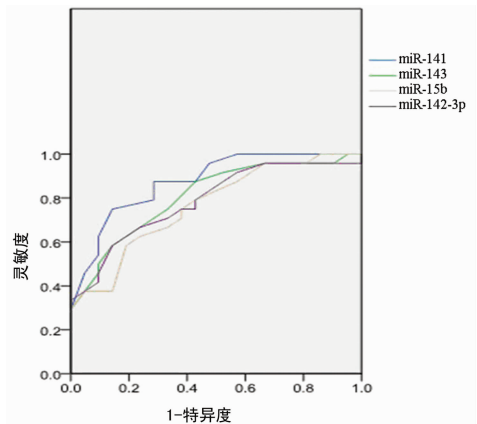


图 2 miR-141、miR-143、miR-15b 和 miR-142-3p 分别诊断非小细胞肺癌的受试者工作曲线

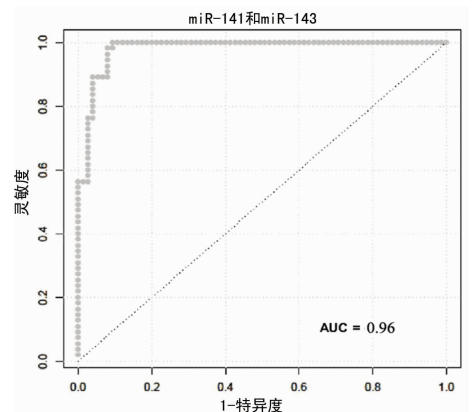


图 3 miR-141 和 miR-143 联合诊断非小细胞肺癌的受试者工作曲线

2.2 血清 miR-141 和 miR-143 诊断非小细胞性肺癌的诊断价值 通过计算发现 miR-141 和 miR-143 在非小细胞性肺癌组中的表达差异最大,在健康对照组中其分布宽度广(>4 Cts),而在非小细胞性肺癌组分布狭窄(<2 Cts)。用 Ct 值计算其差异表达值,水平线用来表示数据最佳灵敏度、特异度的阈值。左右两边的表格分别为训练组和验证组中 miR-141 和 miR-143 诊断非小细胞性肺癌的诊断价值。绘制出受试者 ROC,计算曲线下面积为 0.96(图 3),在验证组中,经验证其诊断灵敏度和特异度分别为 99% 和 85%,阳性预测值为 87%,阴性预测值为 99%。

3 讨论

本研究发现 miR-141 和 miR-143 联合诊断能将非小细胞性肺癌患者从健康对照者中区分开,且具有较高的诊断价值:灵敏度和特异度分别为 99% 和 85%,阳性预测值为 87%,阴性预测值为 99%,说明二者可以成为非小细胞性肺癌的诊断生物标志物,这与之前的一些研究吻合^[11-12],但本研究标本量更大,资料及分组更加详尽。已有一些关于 miR-141 和 miR-143 在非小细胞性肺癌中的文献研究表明,它们与非小细胞性肺癌的发生、发展有着重要的联系,并且成为诊断标志物。Tejero 等^[13]指出,miR-141 和 miR-200c 作为早期诊断非小细胞性肺癌的标志物在疾病分型中有不同的表达(腺癌中高表达)并影响其预后。Zeng 等^[14]研究表明,miR-143 是非小细胞肺癌早期诊断的标志物,miR-150 是区分鳞癌和腺癌的早期标志物。miR-141 和 miR-143 作为非小细胞肺癌的标志物已有一些文献支撑,但二者联合诊断非小细胞肺癌的研究尚未发现,基于目前的研究现状,本研究发现二者联合诊断非小细胞肺癌有较高的诊断价值。虽然本研究的数据显示了较好的诊断效能,但若应用于临床,仍需要扩大样本量,找到每个分类或者分型的标志物将对疾病诊断更加特异。

有关 miR-141 和 miR-143 的研究显示,其表达差异不仅局限于肺癌。有报道指出,其在肝细胞癌、宫颈鳞癌等疾病中也起着一定的作用,说明它们的表达并不具有特异性,所以单个 miRNA 作为疾病诊断的标志物有着一定的风险。已知联合检测比单项检测具有更高的检测价值,而在后期的研究中不仅可以考虑多个相关的 miRNA 联合检测,更可以尝试将 miRNA 与传统的肺癌检测标志物(如 CYFRA21-1、NSE 等)联合检测,在横向上拓宽了研究的思路。另外,有关非小细胞性肺癌的 miRNA 研究中,也发现其他 miRNA 表现出一定的诊断价值。有研究指出,miR-126 也可区分非小细胞性肺癌和健康人,其灵敏度为 73%,特异度为 96%^[15]。也有学者指出 miR-126 和 miR-98 也能较好地地区分非小细胞性肺癌和健康对照者,miR-126 在肺组织中高表达与血管细胞黏附分子 I (VCAM-1) 的调控有关。这为后期研究提供了很好的思路,即研究标志物的作用机制,这样,标志物不仅可以作为疾病诊断和预后判断的标准,同时也可以阐明疾病发生、发展的机制,在纵向上加深了研究的深度。

参考文献

[1] Al-Saleh K, Quinton C, Ellis PM. Role of pemetrexed in advanced non-small-cell lung cancer: meta-analysis of randomized controlled trials, with histology subgroup analy-

sis[J]. *Current Oncology*, 2012, 19(1): e9-e15.

- [2] Indovina P, Marcelli E, Maranta P, et al. Lung cancer proteomics: recent advances in biomarker discovery[J]. *Int J proteomics*, 2011, 27(6): 726-729.
- [3] Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues[J]. *RNA*, 2008, 14(5): 844-852.
- [4] Sung HJ, Cho JY. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics[J]. *BMB Rep*, 2008, 41(9): 615-625.
- [5] Patz EF Jr, Campa MJ, Gottlin EB, et al. Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(35): 5578-5583.
- [6] Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7390-7394.
- [7] Yamashita S, Yamamoto H, Mimori K, et al. MicroRNA-372 is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Oncology*, 2012, 82(4): 205-212.
- [8] Weiland M, Gao XH, Zhou L, et al. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases[J]. *RNA Biology*, 2012, 9(6): 850-859.
- [9] Tjensvoll K, Svendsen KN, Reuben JM, et al. miRNA expression profiling for identification of potential breast cancer biomarkers[J]. *Biomarkers*, 2012, 17(5): 463-470.
- [10] Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, et al. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer[J]. *Ann Surg*, 2010, 251(3): 499-505.
- [11] Xia H, Sun SJ, Wang B, et al. miR-143 inhibits NSCLC cell growth and metastasis by targeting Limk1[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 11973-11983.
- [12] Mei Z, He Y, Feng J, et al. MicroRNA-141 promotes the proliferation of non-small cell lung cancer cells by regulating expression of PHLPP1 and PHLPP2[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17): 3055-3061.
- [13] Tejero R, Navarro A, Campayo M, et al. miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101899.
- [14] Zeng XL, Zhang SY, Zheng JF, et al. Altered miR-143 and miR-150 expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2013, 126(23): 4510-4516.
- [15] Shen J, Todd NW, Zhang H, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(4): 579-587.

(收稿日期: 2014-10-25 修回日期: 2014-12-11)