

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.14.008

## 唾液及血浆中微小 RNA-21 水平应用于早期食管癌的诊断价值\*

李 伟<sup>1</sup>, 闫丛临<sup>1</sup>, 谭晓刚<sup>2</sup>

(1. 河南省南阳市中心医院胸外科 473009; 2. 中国医学科学院肿瘤医院胸外科, 北京 100021)

**[摘要]** 目的 研究唾液及血浆中的微小 RNA-21(miRNA-21)水平应用于早期食管癌的诊断价值。方法 选取 2011 年 2 月至 2014 年 2 月河南省南阳市中心医院收治的 112 例早期食管癌患者作为观察组, 同期来该院进行健康查体的 100 例患者作为对照组, 比较两组查体者 miRNA-21 的表达水平, 比较唾液和血浆 miRNA-21 的诊断价值; 研究 miRNA-21 水平与肿瘤分期、病理类型和分化的相关性。结果 观察组唾液 miRNA-21 水平为  $(6.08 \pm 2.22)$ , 对照组为  $(0.64 \pm 0.09)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 观察组的血浆 miRNA-21 表达水平为  $(20.91 \pm 10.59)$ , 对照组为  $(1.69 \pm 0.17)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。唾液中的 miRNA-21 水平 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.866 5, 灵敏度为 88.24%, 特异度为 69.97%; 血浆中的 miRNA-21 AUC 为 0.882 0, 灵敏度为 90.20%, 特异度为 70.69%, 二者诊断价值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。唾液与血浆中的 miRNA-21 水平与早期食管癌的分期和病理类型无明显的相关性 ( $P > 0.05$ ), 与分化程度相关性较强 ( $P < 0.05$ )。结论 唾液及血浆中的 miRNA-21 水平应用于早期食管癌具有较高的诊断价值, 唾液可能代替血浆应用于早期食管癌的诊断。

**[关键词]** 唾液; 血浆; 微小 RNA-21; 食管肿瘤; 诊断价值

**[中图分类号]** R735.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)14-1894-03

## Diagnostic value of application of salivary and plasma microRNA-21 in early esophageal cancer\*

Li Wei<sup>1</sup>, Yan Conglin<sup>1</sup>, Tan Xiaogang<sup>2</sup>

(1. Department of Thoracic Surgery, Nanyang Municipal Central Hospital, Nanyang, Henan 473009, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Tumor Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the diagnostic values of salivary and plasma microRNA-21 for early esophageal cancer. **Methods** Totally 112 patients with early esophageal cancer in Nanyang Municipal Central Hospital from February 2011 to February 2014 were selected as the observation group and contemporaneous 100 healthy people of physical examination were selected as the control group. The salivary and plasma microRNA-21 expression levels were compared between the two groups; the diagnostic values of salivary versus plasma microRNA-21 for the early esophageal cancer were also compared; the correlation between the miRNA-21 level with the stage, pathogenic type and differentiation of early esophageal cancer. **Results** The salivary microRNA-21 level  $(6.08 \pm 2.22)$  in the observation group and  $(0.64 \pm 0.09)$  in the control group, the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ); the plasma microRNA-21 level in the observation group was  $(20.91 \pm 10.59)$  and  $(1.69 \pm 0.17)$  in the control group, the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ). The area under ROC curve(AUC) of salivary microRNA-21 level was 0.866 5, the sensitivity was 88.24%, the specificity was 69.97%; while AUC of plasma microRNA-21 level was 0.882 0, the sensitivity was 90.20%, the specificity was 70.69%, the differences in the diagnostic value had no statistical significance between them ( $P > 0.05$ ). The salivary and plasma microRNA-21 levels had no obvious correlation with the stage and pathogenic type of early esophageal cancer ( $P > 0.05$ ), while had strong correlation with the differentiation degree ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Salivary and plasma microRNA-21 has higher diagnostic value in for early esophageal cancer, and saliva may supplant plasma in the diagnosis of early esophageal cancer.

**[Key words]** saliva; plasma; microRNA-21; esophageal neoplasms; diagnostic value

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤。中国是该疾病的高发地区之一, 其发生率和病死率高居第 4 位。在我国, 每年约 15 万人死于食管癌<sup>[1]</sup>。早期食管癌症状多不典型, 主要表现为吞咽粗糙食物时的不适感, 故多数患者就诊时已经处于肿瘤的中晚期, 治疗效果和预后均不理想。因此, 早期的诊断和干预对食管癌患者的意义重大。大量研究表明, 微小 RNA-21(miRNA-21)的表达水平与食管癌相关性较高<sup>[2]</sup>。同时, 唾液含有多种血液中的分子物质<sup>[3]</sup>, 故本次研究选取 112 例食管癌患者作为研究对象, 探讨唾液及血浆中的 miRNA-21 水平在早

期食管癌诊断中的应价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2011 年 2 月至 2014 年 2 月河南省南阳市中心医院收治的 112 例早期食管癌患者作为观察组, 其中男 65 例, 女 47 例, 年龄 38~72 岁, 平均  $(54.2 \pm 14.3)$  岁。112 例患者均行吞钡 X 线食管摄片和纤维食管镜检查确诊, TNM 分期如下: I 期 61 例, II 期 51 例; 鳞癌 83 例, 非鳞癌 29 例; 高分化 72 例, 中分化 27 例, 低分化 13 例。选取同一时期来该院进行健康查体的 100 例查体者作为对照组, 其中男 52 例, 女 48

例,年龄 38~72 岁,平均(54.2±14.3)岁。两组研究对象的性别和年龄差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。所有研究对象均签署知情同意书,研究符合医学伦理学原则。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 所有研究对象均禁饮食 10 h,于上午 7:00 左右在门诊或病房采外周静脉血 4 mL,并将血液放置于外周抗凝管。在收集唾液前,需要禁口腔清洁,用柠檬酸湿润过的无菌棉签刺激研究对象舌头一侧,以增加唾液量,使用 59 mL 的无菌无酶离心管收集唾液,反复操作,保证收集的唾液大于或等于 3 mL。将收集到的样本,在 4 °C 的离心机中离心 15 min,转速为 3 000 g,收集上清液置于 EP 管中,再以 12 000 g 的速度在 4 °C 下离心 10 min,将上清液置于-80 °C 的冰箱中保存。

1.2.2 唾液及血浆中的 miRNA-21 水平检测 应用 Ambion 公司生产的 mirVana PARIS Kit 试剂盒对唾液和血浆中的总 RNA-21 进行提取。DNA 模板 5  $\mu$ L,PCR 缓冲液 2  $\mu$ L,dNTP 2  $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L,引物 1(upward,上海生物工程公司)0.5  $\mu$ L,引物 2(downward,上海生物工程公司)0.5  $\mu$ L,dH<sub>2</sub>O 7.75  $\mu$ L,Tag 0.25  $\mu$ L,共 20  $\mu$ L 配成反应体系。反转录条件:94 °C 变性 5 min,94 °C 1 min,5 °C 1 min,72 °C 1 min,顺序循环 35 次,72 °C 延伸 5 min,产物于 4 °C 保存。扩增方法如下:取 3  $\mu$ L 反转产物作为模板,用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(TaKa-Ra 公司)进行扩增,所有反应均同时用 3 个复孔,循环 50 次,扩增条件为 95 °C 2 min,然后 95 °C 5 s,60 °C 10 s。内参选择 miR-16。溶解曲线:65.0~95.0 °C,increment 0.5 °C for 0.05 min+plate read。采用 Biorad 公司的 CFX962.1 实时定量 PCR 仪进行检测。miRNA-21 的表达量采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 表示<sup>[4]</sup>。

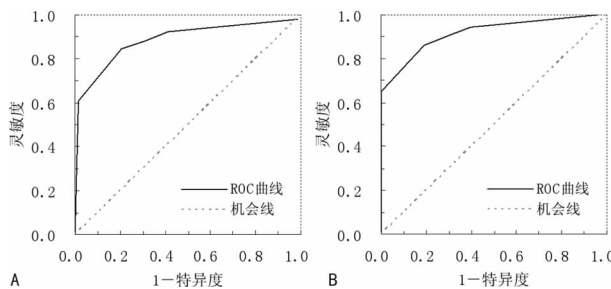
1.3 统计学处理 (1)采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,采用 *t* 检验,变量之间的相关性采用 Spearman 相关分析;(2)MedCalc12.7.8 统计软件分析,唾液和血浆中的 miRNA-21 水平诊断价值比较采用 DeLong 法。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组研究对象唾液和血浆 miRNA-21 水平比较 观察组唾液 miRNA-21 水平为(6.08±2.22),对照组唾液 miRNA-21 水平为(0.64±0.09),差异有统计学意义( $t=4.982, P<0.05$ );观察组的血浆 miRNA-21 表达水平为(20.91±10.59),对照组血浆 miRNA-21 表达水平为(1.69±0.17),差异有统计学意义( $t=5.113, P<0.05$ )。

2.2 唾液与血浆中 miRNA-21 水平的诊断价值比较 针对唾液中的 miRNA-21 水平构建 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.866 5,血浆 miRNA-21 水平诊断早期食管癌的灵敏度为 88.24%,特异度为 69.97%(图 1A)。针对血浆中的 miRNA-21 水平构建 ROC 曲线,AUC 为 0.882 0,血浆 miRNA-21 水平诊断早期食管癌的灵敏度为 90.20%,特异度为 70.69%(图 1B)。唾液与血浆中的 miRNA-21 水平的诊断价值差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.3 唾液与血浆中的 miRNA-21 水平与早期食管癌的分期、病理类型及分化的相关性 唾液与血浆中的 miRNA-21 水平与早期食管癌的分期和病理类型无明显的相关性( $P>0.05$ ),与分化程度相关性较强( $P<0.05$ ),见表 1。



A: 唾液; B: 血浆。

图 1 miRNA-21 水平的 ROC 曲线

表 1 miRNA-21 水平与早期食管癌的分期、病理类型及分化的相关性( $\bar{x}\pm s$ )

项目	分级/分期	n	miRNA-21	P
TNM 分期				
唾液	I 期	61	4.92±1.56	>0.05
	II 期	51	6.28±1.79	
血浆	I 期	61	17.98±9.82	>0.05
	II 期	51	23.78±8.23	
病理类型				
唾液	鳞癌	83	5.11±1.73	>0.05
	非鳞癌	29	6.29±1.54	
血浆	鳞癌	83	18.12±9.13	>0.05
	非鳞癌	29	22.98±9.27	
分化程度				
唾液	高分化	72	3.12±0.97	<0.05
	中分化	27	5.51±1.22	
	低分化	13	6.44±0.81	
血浆	高分化	72	15.34±4.89	<0.05
	中分化	27	18.97±4.42	
	低分化	13	25.01±5.65	

3 讨 论

食管癌是我国较为常见的恶性肿瘤,男性发病率高于女性,它的发生与多种因素有关,包括遗传因素、不良饮食习惯、抽烟、酗酒<sup>[5]</sup>。食管癌患者的早期症状多不明显,且临床上缺乏有效的诊断手段,给疾病的诊断带来一定的困难,延误治疗。

研究中,112 例早期食管癌患者的唾液 miRNA-21 水平较正常人群唾液平均上调超过 10.5 倍;患者血浆 miRNA-21 水平较正常人群血浆 miRNA-21 表达水平平均上调了 15.3 倍,这表明,与健康人群相比,早期食管癌的患者 miRNA-21 的水平明显增加。这一结果与叶敏华等<sup>[6]</sup>的结果较为一致。恶性肿瘤是由细胞增殖和分化的调控机制异常,导致细胞增殖失控而引起的疾病<sup>[7]</sup>。正常细胞内存在多种抑癌基因和原癌基因,这些基因的突变和异常表达都可以导致细胞的增殖、分化和凋亡过程失控,形成肿瘤<sup>[8]</sup>。miRNA 是一类非编码的内源性的 RNA 序列,研究表明,它可以通过调控相应 mRNA 的翻译和降解过程来调节特定基因的表达水平,从而参与细胞的增殖、分化和凋亡过程的调节<sup>[9-10]</sup>。研究发现多种 miRNA 与食管癌的发生、发展和预后具有一定的相关性;miR-21,它通过与细胞程序性死亡蛋白 4(PDCD4) mRNA 相结合,抑制了 PDCD4 的翻译过程,增加了食管癌的发生风险<sup>[11]</sup>。刘清等<sup>[12]</sup>利用脂质

体介导的细胞转染方法将 miRNA-21 抑制剂转入食管鳞癌细胞 Eca109 中,转染后细胞的 miRNA-21 水平明显下降,而 PD-CD4 明显上升,组织水平上 miRNA-21 与 PDCD4 呈负相关。因此 miRNA-21 水平在早期食管癌的诊断中具有一定的价值。本研究同时对患者唾液和血浆中的 miR-21 水平及其诊断价值进行比较,唾液中的 miRNA-21 水平 AUC 为 0.866 5,灵敏度为 88.24%,特异度为 69.97%;血浆中的 miRNA-21 AUC 为 0.882 0,灵敏度为 90.20%,特异度为 70.69%,二者均具有较高的诊断价值。唾液腺的血流丰富,唾液中含有与血浆非常相似的分子物质,如蛋白质和核酸。血浆中的蛋白质、DNA 和 RNA 通过水通道、直接扩散和细胞间隙进入唾液腺并分泌到唾液中,故唾液可以作为血浆的代替品,反应机体内的分子动态变化<sup>[13]</sup>。研究认为,肿瘤组织释放的多种介质可以通过脉管系统对远端的唾液腺等器官的生物功能进行调控,增加或减少唾液中的蛋白质、DNA 和 RNA 的释放。故唾液中 miRNA-21 的诊断价值与血浆 miRNA-21 相当。检测血浆的 mi-RNA 水平需要进行有创操作,故需要有经验的人员进行操作。唾液中的 mi-RNA 水平检测是无创性操作,但是影响因素较多,且唾液中含有多种酶类,可能影响结果的准确性。miRNA-21 的稳定性较差,故应该严格按照流程操作,注意样本的保存。

本次研究中,miRNA-21 的水平与早期食管癌的病理分期和类型无明显的相关性,与食管癌的分化程度相关性较强。I 期和 II 期食管癌均属于早期食管癌,差异并不明确;食管癌的分化程度是食管癌预后的重要不良因素,与 miRNA-21 水平的相关性较强,提示 miRNA-21 也可以作为预后判断的指标。

## 参考文献

- [1] 韦碧柳,吴灵飞. 食管癌细胞凋亡调控基因的研究进展[J]. 广东医学,2011,32(3):386-388.
- [2] 康宁宁,张仁泉. 食管癌循环肿瘤细胞的研究进展[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(12):1555-1558.
- [3] 赵元,于在诚. 食管癌术前分期诊断方法的研究现状及进展[J]. 医学研究杂志,2011,40(3):17-20.
- [4] Jiang L, Lv XX, Li J, et al. The status of microRNA-21 expression and its clinical significance in human cutaneous malignant melanoma[J]. Acta Histochem, 2012, 114(6): 582-588.
- [5] 曹秀峰,李苏卿. 微小 RNA 在食管癌诊断预后及治疗中的作用[J]. 中华肿瘤杂志,2011,33(3):161-164.
- [6] 叶敏华,叶鹏辉,张伟珠,等. 唾液与血浆微小 RNA-21 对早期食管癌的诊断价值[J]. 南方医科大学学报,2014,34(6):885-889.
- [7] 李书军,牛秀兰,崔爱荣,等. miR-181a 对人食管癌 TE11 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 肿瘤,2011,31(7):613-618.
- [8] 谢子钧,陈刚,黄健,等. 血浆 miR-10b 对食管癌的诊断价值[J]. 广东医学,2013,34(16):2465-2468.
- [9] 李书军,张利军,张海龙,等. 微小 RNA-181a 在人食管癌 EC9706 细胞中对靶基因 PRDM1 调控作用的研究[J]. 肿瘤,2011,31(9):813-818.
- [10] 余江流,凌志强,毛伟敏. 食管癌相关微小 RNA 研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志,2011,38(12):920-922.
- [11] Dong CG, Wu WK, Feng SY, et al. Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells[J]. Int J Oncol, 2012, 41(3): 1005-1012.
- [12] 刘清,吕国栋,郑树涛,等. 食管鳞癌中微小核糖核酸 let-7 的表达及病理生物学意义[J]. 中华消化杂志,2011,31(4):231-234.
- [13] 谢子钧,李子俊. 不同体液中微小 RNA 在肿瘤诊断中的应用[J]. 国际肿瘤学杂志,2012,39(2):117-120.

(收稿日期:2015-01-10 修回日期:2015-02-26)

(上接第 1893 页)

- [1] 糖尿病防治指南(2010 年版)[J]. 中国糖尿病杂志,2012,20(1):S1-S6.
- [2] 本刊编辑部. 运动与 2 型糖尿病——美国运动医学院与美国糖尿病学会联合声明[J]. 中国糖尿病杂志,2001,19(4):23-25.
- [3] 王安利. 运动医学[M]. 北京:人民体育出版社,2010:434-435.
- [4] 李斌,刘礼斌,刘小莺,等. 中等强度运动对 2 型糖尿病伴肥胖患者胰岛素敏感性及其血浆脂联素水平的影响[J]. 中国临床康复,2005,9(39):23-25.
- [5] 崔旭红,胡聪玲,姜志红,等. 三餐后有氧运动对糖尿病疗效观察[J]. 现代预防医学,2009,36(16):3171-3173.
- [6] 鹿相花,冯玉欣,武秀梅. 有氧运动对肥胖 2 型糖尿病患者血糖、血脂的影响[J]. 中外医疗,2009,24(6):53-54.
- [7] 林世量. 2 型糖尿病患者最少有效锻炼时间的研究[D]. 北京:北京体育大学,2004.
- [8] 刘峰. II 型糖尿病人群运动处方的制定及跟踪研究[D]. 辽宁:大连理工大学,2008.

- [9] 肖卉. 中老年糖尿病患者运动和健康教育综合干预研究[D]. 天津:天津医科大学,2010.
- [10] 陈德明,陈霄辉. 2 型糖尿病运动疗法的训练学分析[J]. 哈尔滨体育学院学报,2012,30(1):109-116.
- [11] 陈瓔珞,元香南,尹杰,等. 不同运动因素对 2 型糖尿病患者早餐后糖代谢的影响[J]. 中国运动医学杂志,2007,26(1):29-34.
- [12] 元香南,陈瓔珞,齐智,等. 不同条件餐后运动对血糖和胰岛素的影响[J]. 中国糖尿病杂志,2008,16(2):72-77.
- [13] 陈庆法. 餐后不同时间运动对糖尿病患者降糖的作用[C]. 第五次全国创伤康复暨第七次全国运动疗法学术会议论文汇编:229.
- [14] 陈莉莉. 选择不同时间段运动对糖尿病患者糖化血红蛋白及血脂的影响[J]. 中国实用医药,2008,3(10):112-113.

(收稿日期:2014-12-18 修回日期:2015-02-15)