

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.28.023

miR-152 在非小细胞肺癌患者血清中的表达及临床意义

强勇, 杨楠, 张雷, 李鹏, 刘凯, 吴海卫, 申翼, 李忠东[△]

(南京军区南京总医院心胸外科 210002)

[摘要] **目的** 通过检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者血清中 microRNA-152(miR-152)的水平,探讨其与 NSCLC 的关系。**方法** 采用 Real time-PCR 法检测 61 例 NSCLC 患者和 80 例健康对照者血清 miR-152 的表达水平,并分析其与临床病理指标间的关系。**结果** NSCLC 组血清 miR-152 的表达水平显著降低($P<0.01$)。且其表达量与患者吸烟史和 TNM 分期有关,有吸烟史的 NSCLC 晚期的患者表达更低($P<0.05$),而在不同年龄、性别、组织学类型、肿瘤分化间差异无统计学意义($P>0.05$)。根据 miR-152 的表达水平绘制 ROC 曲线,曲线下面积为 0.820(95%CI=0.752~0.889),临界值取 0.48 时,灵敏度和特异度分别为 63.80%和 90.20%。**结论** NSCLC 患者血清中 miR-152 表达低,且与肿瘤分化程度相关,miR-152 可能作为 NSCLC 诊断的特异肿瘤标志物。

[关键词] miR-152;癌,非小细胞癌;逆转录聚合酶链反应;ROC 曲线**[中图分类号]** R735.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)28-3956-03**Serum microRNA-152 expression and its clinical significance in patients with non-small cell lung cancer**Qiang Yong, Yang Nan, Zhang Lei, Li Peng, Liu Kai, Wu Haiwei, Shen Yi, Li Zhongdong[△]

(Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of microRNA-152(miR-152) in the serum of patients with non-small cell lung cancer(NSCLC), and to explore the clinical significance of NSCLC. **Methods** The relative expression levels of miR-152 in serum of 61 NSCLC patients and 80 healthy individuals were assessed by quantitative real-time PCR(RT-PCR), and the clinical pathological parameters was analyzed. **Results** The expression of miR-152 was significantly lower in the serum of NSCLC than that of controls($P<0.01$). Down regulation of miR-152 was found to be correlated with the clinicopathological features such as smoking history and TNM staging($P<0.05$), but there was no significant difference in different age, sex, histological type and tumor differentiation($P>0.05$). The ROC curve for miR-152 revealed a strong diagnostic performance, the value of the area under ROC(AUC-ROC) was 0.820(95%CI:0.752-0.889), optimal sensitivity and specificity were 63.80% and 90.20% when 0.48 was selected as the critical value. **Conclusion** It was found that miR-152 is significantly reduced in serum samples of NSCLC patients, and the data suggests that it may be a particular biomarker for the clinical diagnosis of NSCLC.

[Key words] microRNA-152; carcinoma, non-small cell lung; R7-PCR; Roc curve

肺癌,尤其是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是人类罹患癌症死亡的主要原因,每年全球有超过 500 000 人死亡^[1]。尽管近年来在 NSCLC 的早期发现和治疗上有所进步,但其高病死率并未显著下降。NSCLC 往往在确诊时已属晚期,且 5 年生存率低于 15%^[2]。NSCLC 的不良预后主要是由于缺乏规范有效而又经济实用的诊断方式,以便能够筛选出早期的肿瘤。有文献报道及时诊断治疗早期 NSCLC 可将患者 5 年生存率提高到 60%~80%^[1,3],所以开发这样的生物标志物是一个关乎公共健康,势在必行的举措。微小 RNA(miRNAs)是一类含量丰富的,包含 17~25 个核苷酸的小的非编码 RNA,它通过直接结合到靶 mRNA 的 3'端非翻译区(3'UTR 区),从而在转录后水平调控基因表达^[4-5]。miRNAs 是一类重要的调节因子,参与到很多生理病理过程,例如细胞生长、分化、凋亡及肿瘤的发生、转移、恶化^[6-7]。鉴于它的多功能性,miRNAs 的表达水平或许能够作为肿瘤的标志物。

miR-152 属于 miR-148/152 家族^[8],已经确定它在标本和细胞系下调^[9-10]。然而,miR-152 在 NSCLC 患者血清中的表达报道还不多。因此,在本研究中,笔者通过检测 61 例 NSCLC 患者和 80 例健康个体血清 miR-152 的表达水平,来分析其表达与患者临床资料间的联系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血样来自 2014 年 3 月至 2015 年 4 月在本院接受原发性 NSCLC 手术切除的患者 61 例(NSCLC 组),原发性 NSCLC 均为初次发现,均经病理组织学确诊,术前未行任何抗肿瘤治疗。患者中男 40 例,女 21 例,中位年龄 60 岁(32~77 岁)。病理类型包括鳞癌 26 例,腺癌 30 例,腺鳞癌 5 例。TNM 分期按照国际肺癌研究会(IASLC)公布的标准,Ⅰ/Ⅱ期 37 例,Ⅲ/Ⅳ期 24 例。本研究经本院医学伦理学委员会批准,患者签署知情同意书。此外,选取本院同期 80 例体检中心健康个体为对照组,男 50 例,女 30 例,年龄 28~72 岁,中位

年龄 58 岁。经检查均无肝、肺、肾、脑等脏器疾病,无消化道和血液系统疾病史。研究对象均于清晨空腹采血 3~5 mL 于促凝管中,3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,吸取上清液并迅速置于 -80 °C 保存。

1.2 主要试剂及仪器 基因扩增检测仪 LightCycler480R II 购自德国 Roche 公司;miRcute miRNA 提取分离试剂盒、miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒和 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒购自 Tiangen 公司;引物均由上海英骏生物技术有限公司合成并修饰。

1.3 总 RNA 提取 按 miRcute miRNA 提取试剂盒说明书抽提血清,用核酸蛋白检测仪在 OD260/280 nm 处测定 OD 值,计算 miRNA 的含量及纯度。利用 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒反转录成 20 μL cDNA,cDNA 样本置 -20 °C 保存备用。

1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 扩增所用的 miR-152 和 U6 的引物序列见表 1。PCR 总反应体系为 20.0 μL,内含 2×miRcute miRNA Premix 10.0 μL,10 μmol/L 的上、下游引物各 0.4 μL,cDNA 2.0 μL,其余加双蒸水补足。扩增条件为:94 °C 预变性 2 min;94 °C 20 s,60 °C 34 s(温度转换率均为 20 °C/s),扩增 40 个循环。60 °C 延伸时采集荧光信号,所有样品均做复孔,miR-152 的相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 法表示。

表 1 miRNAs 的引物序列

名称	序列(5'-3')
miR-152	
正向引物	ACTCTCGAGGCTTCTAAGCTGGGAACCTTTGTC
反向引物	ACTGAATTCGGCTGTCTTGGACATATGGCACT
U6	
正向引物	CTCGCTTCGGCAGCACA
反向引物	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;不符合正态分布的计量资料,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 和 Kruskal-Wallis *H* 检验;基于 miR-152 的值绘制受试者工作(ROC)曲线,计算曲线下面积(AUC)和 95%置信区间(CI),选取临界阈值得到相应的灵敏度和特异度,以评价 miR-152 在肺癌中的诊断价值。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

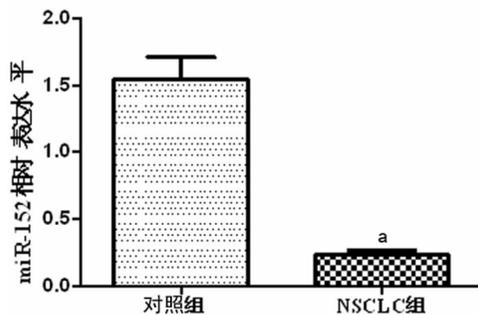
2 结 果

2.1 miR-152 的表达水平 miR-152 的相对表达量通过同一标本 miR-152 与 U6 的比值来表示。NSCLC 患者血清 miR-152 的表达量为 0.23 ± 0.19,显著低于对照组的 1.54 ± 0.67,差异有统计学意义(*P* < 0.01),见图 1。

2.2 肺癌患者临床参数与 miR-152 表达的关系 分析 NSCLC 患者中 miR-152 表达水平与患者年龄、性别、吸烟史、组织学类型、肿瘤分化及 TNM 分期等临床病理参数的关系。结果显示,miR-152 在有吸烟史的患者中表达量低于无吸烟史的患者(*P* < 0.05);且晚期患者 miR-152 表达水平显著下降,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。

2.3 miR-152 对 NSCLC 的诊断价值 对 61 例 NSCLC 患者

血清 miR-152 水平建立 ROC 曲线,见图 2,利用 ROC 曲线评价 miR-152 的诊断价值。AUC 为 0.820(95% CI: 0.752 ~ 0.889)。当临界值取 0.48 时,灵敏度和特异度分别为 63.80% 和 90.20%。



^a: *P* < 0.05.

图 1 NSCLC 组和对照组血清的 miR-152 表达水平

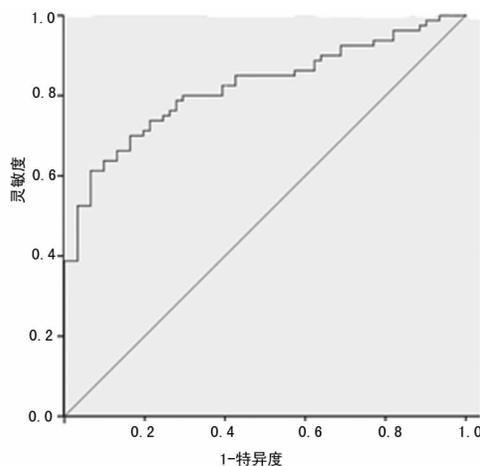


图 2 miR-152 ROC 曲线

表 2 NSCLC 患者临床参数及其与血清中 miR-152 水平的关系

项目	占比 <i>n</i> (%)	miR-152 相对表达量	<i>P</i>
性别			>0.05
男	40(65.6)	0.25 ± 0.09	
女	21(34.4)	0.20 ± 0.08	
年龄			>0.05
<60 岁	27(44.3)	0.17 ± 0.07	
≥60 岁	34(55.7)	0.25 ± 0.09	
吸烟史			<0.05
不吸烟	30(49.2)	0.29 ± 0.11	
吸烟	31(50.8)	0.12 ± 0.06	
组织学类型			>0.05
鳞癌	26(42.6)	0.27 ± 0.10	
腺癌	30(49.2)	0.17 ± 0.08	
腺鳞癌	5(8.2)	0.14 ± 0.04	
肿瘤分化			>0.05
中分化	19(31.2)	0.17 ± 0.09	
中低分化	18(29.5)	0.20 ± 0.11	

续表 2 NSCLC 患者临床参数及其与血清中 miR-152 水平的关系

项目	n(%)	miR-152 相对表达量	P
低分化	24(39.3)	0.25±0.10	<0.05
TNM 分期			
I/II	37(60.7)	0.32±0.43	
III/IV	24(39.3)	0.05±0.17	

3 讨论

miRNAs 非常稳定,即使是在成分复杂的富含 RNase 酶的血清中,也可以长时间存在^[11]。在某些疾病包括 NSCLC 中,它们的表达水平会发生变化^[12],由此它们可被选作生物标志物,用来检测疾病的发生和进展。目前,一些在疾病发病过程中有明显改变的 miRNAs,已作为新型的血液标志物应用到这些疾病的诊断和预后上。NSCLC 病死率居全球癌症前两位,迄今为止仍然无非常可靠的生物指标来诊断早期的 NSCLC。

本研究中,作者通过定量 RT-PCR 检测血清中 miR-152 的表达,发现 miR-152 在 NSCLC 患者中显著下调($P < 0.001$)。进一步分析发现 miR-152 与临床病理特征,如患者的吸烟史、TNM 分期相关($P < 0.05$)。ROC 曲线显示血清 miR-152 能作为诊断 NSCLC 的可靠生物标志物,其 AUC 为 0.820 (95%CI:0.752~0.889),灵敏度和特异度分别达到 63.80% 和 90.20%。本试验证实 miR-152 的表达水平在 NSCLC 患者和健康个体中显著不同,依据其表达差异,miR-152 可用于筛选患 NSCLC 的个体。这一研究表明,血清中的 miR-152 可作为区分 NSCLC 的一种新型的非侵入性生物标志物。

已有文献报道了 miR-152 在很多肿瘤中表达下调,例如 miR-152 在 HBV 相关的肝癌组织中表达下调^[13];Chen 等^[14]报道了胃肠道肿瘤组织及细胞株中 miR-152 表达显著降低,并且降低的程度与肿瘤组织大小及肿瘤分期密切相关;而在肺癌方面,Cheng 等^[9]通过检测 30 例 NSCLC 患者的肿瘤组织和正常组织发现 miR-152 在肺癌组织中表达下降,并与其预后不良相关;Su 等^[10]证实这一结果,并且发现上调 miR-152 表达能明显抑制 NSCLC 细胞的增殖、克隆形成及迁移和侵袭。进一步分析表明了 miR-152 通过下调靶基因 FGF2 和 ADAM17 的表达^[9-10],从而抑制 NSCLC 的增殖和侵袭。虽然对 NSCLC 肿瘤中 miR-152 的研究较多,但对 NSCLC 患者外周血中 miR-152 研究较少,作者的研究填补了这一空缺,也证实 miR-152 在 NSCLC 患者血清中的表达与之前组织中的报道一致,均显著减少。但是因为本研究所选用的样本数较少,所以研究结果还带有一定的局限性。

综上所述,本研究发现 miR-152 在 NSCLC 患者的血清中表达显著减少。检测外周血中 miR-152 的可作为一种无创性、快速的诊断工具,用于筛选患 NSCLC 的个体。下一步笔者将收集更多患呼吸道疾病的血清样本,进一步确定 miR-152 的表达是否可作为一个潜在的预测 NSCLC 的生物标志物。

参考文献

[1] Mellema WW, Burgers SA, Smit EF. Tumor flare after

start of RAF inhibition in KRAS mutated NSCLC: a case report[J]. Lung Cancer, 2015, 2(87): 201-203.

- [2] Blanchon F, Grivau M, Asselain B, et al. 4-year mortality in patients with non-small-cell lung cancer: development and validation of a prognostic index[J]. Lancet Oncol, 2006, 7(10): 829-836.
- [3] International EI, Henschke CI, Yankelevitz DF, et al. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening[J]. N Engl J Med, 2006, 17(355): 1763-1771.
- [4] Jia LF, Wei SB, Gong K, et al. Prognostic implications of microRNA miR-195 expression in human tongue squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56634.
- [5] Sandhu R, Rivenbark AG, Mackler RM, et al. Dysregulation of microRNA expression drives aberrant DNA hypermethylation in basal-like breast cancer[J]. Int J Oncol, 2014, 44(2): 563-572.
- [6] Rutnam ZJ, Yang BB. The involvement of microRNAs in malignant transformation[J]. Histol Histopathol, 2012, 27(10): 1263-1270.
- [7] Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(3): 228-234.
- [8] Chen Y, Song YX, Wang ZN. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players[J]. Mol Cancer, 2013, 12: 43.
- [9] Cheng Z, Ma R, Tan W, et al. MiR-152 suppresses the proliferation and invasion of NSCLC cells by inhibiting FGF2[J]. Exp Mol Med, 2014, 46(1): e112.
- [10] Su Y, Wang Y, Zhou H, et al. MicroRNA-152 targets Adam17 to suppress NSCLC progression[J]. FEBS Lett, 2014, 588(10): 1983-1988.
- [11] Leuenberger N, Robinson N, Saugy M. Circulating miRNAs: a new generation of anti-doping biomarkers[J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 30(405): 9617-9623.
- [12] Morley-Smith AC, Mills A, Jacobs S, et al. Circulating microRNAs for predicting and monitoring response to mechanical circulatory support from a left ventricular assist device[J]. Eur J Heart Fail, 2014, 16(8): 871-879.
- [13] Huang J, Wang Y, Guo Y, et al. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1[J]. Hepatology, 2010, 52(1): 60-70.
- [14] Chen Y, Song Y, Wang Z, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance[J]. J Gastrointest Surg, 2010, 14(7): 1170-1179.

(收稿日期:2016-06-05 修回日期:2016-07-20)