

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.04.009
文章编号: 1005-8982 (2018) 04-0039-06

MicroRNA-21、microRNA-137 和 microRNA-498 在肺腺癌患者血清中表达情况及其临床意义*

唐曦¹, 胡娅², 徐炎华¹, 汪春林¹, 邱萍¹, 王向辉³

(1. 华中科技大学同济医学院附属荆州医院 肿瘤中心, 荆州 湖北 434020;
2. 长江大学医学院, 荆州 湖北 434023; 3. 华中科技大学同济医学院
附属荆州医院 胸外科, 荆州 湖北 434020)

摘要: 目的 研究肺腺癌相关 MicroRNAs 在正常人群及肺腺癌患者血清中的表达情况, 分析其在肺腺癌诊断中的临床价值。**方法** 收集 59 例肺腺癌及 40 例正常体检人群血清, 通过实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测各组 miR-498、miR-21、miR-137、miR-206、miR-138、miR-32 及 miR-125b 的表达情况。统计分析两组之间 miRNA 的表达差异以及单个血清 miRNA 在肺腺癌诊断中的价值, 进一步用统计学方法分析多个 miRNAs 联合检测的诊断价值。**结果** 相比正常体检人群, 肺腺癌患者血清中 miR-498、miR-21 和 miR-137 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组 miR-206、miR-138、miR-32 及 miR-125b 的表达量比较, 差异无统计学意义。AUC 曲线分析结果显示, miR-498 的 AUC 为 0.73 (95%CI, 0.63 ~ 0.81), miR-21 的 AUC 为 0.83 (95%CI, 0.74 ~ 0.90), miR-137 的 AUC 为 0.74 (95%CI, 0.64 ~ 0.82)。miR-498、miR-21 联合 miR-137 在肺腺癌诊断中 AUC 值为 0.93 (95%CI, 0.85 ~ 0.97), 3 者联合优于单个 miRNA 任一检测, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** miR-498、miR-21 和 miR-137 在肺腺癌患者血清中升高, 血清中 miR-498、miR-21 和 miR-137 在肺腺癌的诊断中具有潜在的应用价值。

关键词: 肺腺癌; 微小 RNA; 诊断

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

miR-498, miR-21 and miR-137 as potential serum markers in diagnosis of lung adenocarcinoma*

Xi Tang¹, Ya Hu², Yan-hua Xu¹, Chun-lin Wang¹, Ping Qiu¹, Xiang-hui Wang³

(1. Cancer Center, Jingzhou Central Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Jingzhou, Hubei 434020, China; 2. Medical College, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023, China; 3. Department of Cardiothoracic Surgery, Jingzhou Central Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Jingzhou, Hubei 434020, China)

Abstract: Objective To study the expressions of lung adenocarcinoma-related miRNAs in the serum of normal population and lung adenocarcinoma patients, and analyze their clinical value in the diagnosis of lung adenocarcinoma. **Methods** Serums were collected from 40 normal people and 59 lung adenocarcinoma patients. qRT-PCR was used to test the expressions of miR-498, miR-21, miR-137, miR-206, miR-138, miR-32 and miR-125b. The value of single serum miRNA in diagnosis of lung adenocarcinoma was analyzed and the diagnostic value of combined detection of multiple miRNAs were further analyzed using statistical methods. **Results** Compared with the normal controls, the expressions of miR-498, miR-21 and miR-137 were increased in the serum of the lung adenocarcinoma patients ($P < 0.05$). Meanwhile, the expressions of miR-206, miR-138, miR-32 and miR-125b had

收稿日期: 2016-11-06

* 基金项目: 湖北省卫生厅项目 (No: 2012Z-Y31); 湖北省教育厅项目 (No: B2013280)

[通信作者] 胡娅, E-mail: huyahbwh@sina.com

no statistical differences between the two groups. AUC analysis showed that, the AUC value of miR-498 was 0.73 (95% CI: 0.63-0.81, $P < 0.05$); the AUC value of miR-21 was 0.83 (95% CI: 0.74-0.90, $P < 0.05$); the AUC value of miR-137 was 0.74 (95% CI: 0.64-0.82, $P < 0.05$). The AUC value of miR-498, miR-21 combined with miR-137 in the diagnosis of lung adenocarcinoma was 0.93 (95% CI: 0.85-0.97, $P < 0.05$), which was better than any of three miRNAs ($P < 0.05$). **Conclusions** The expressions of serum miR-498, miR-21 and miR-137 in the lung adenocarcinoma patients are elevated, and combination of miR-498, miR-21 and miR-137 can be used as an potential marker for the diagnosis of lung adenocarcinoma.

Keywords: lung adenocarcinoma; miRNA; diagnosis

肺癌的发病率居全世界所有恶性肿瘤的首位, 年全球新增病例高达 180 万, 肺癌也是死亡率最高的恶性肿瘤, 占有恶性肿瘤死亡的 30% 左右^[1]。近年来, 肺腺癌在所有肺癌中所占的比例也逐步提高。目前应用于临床的肺腺疾病诊断方法有多种, 但真正较为成熟或有理想应用前景的诊断肺腺癌的手段并不多。

MicroRNA 是一类内源性的非编码 RNA, 由 19 ~ 25 个左右核苷酸组成, 通过与靶 mRNA 的 3' - UTR 碱基互补配对, 从而抑制 mRNA 翻译或直接使其降解, 导致靶基因的表达在转录后水平受到抑制, 最终调控基因表达^[2]。近年来的研究表明血清 miRNAs 表达谱与肿瘤的病理及临床特征都有关系, 并且可以预测肿瘤的预后和指导临床的处理。很多 miRNAs 在肺腺癌患者血清或癌组织中的异常表达可以影响肿瘤的行为和进展, 其中包括 miR-498、miR-21、miR-137、miR-206、miR-138、miR-32、miR-125b^[3-8]。LI 等^[5]的研究发现 miR-32 在肺腺癌组织中表达增加, 并可以通过下调 TWIST 从而影响肺腺癌的进展。CHEN 等^[8]的研究结果显示 miR-206 靶向下调 MET, 抑制肺腺癌细胞的转分化。但是目前为止这 7 种 miRNA 在患者血清中的表达及其在肺腺癌诊断中的应用价值尚未有报道。

在本研究拟通过检测正常人群、肺腺癌患者血清中 miR-498、miR-21、miR-137、miR-206、miR-138、miR-32、miR-125b 这 7 种 miRNA 的表达情况, 分析其在肺腺癌诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2010 年 4 月 -2016 年 4 月华中科技大学同济医学院附属荆州医院肿瘤中心 215 例术前疑似肺癌患者及 40 例正常体检人群静脉血, 血液采集后立即离心, 血清保存于 -80°C 冰箱。所有患者术前均未行任何放、化疗。入选者年龄 37 ~ 83 岁, 平均 (63.7 ± 6.9) 岁。最终术后病理诊断确认肺腺癌患者 59 例。本研

究中患者均签署知情同意书, 并由华中科技大学同济医学院附属荆州医院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 实验试剂 RNA 提取试剂 (美国 Invitrogen 公司), TaKaRa 逆转录试剂盒 (大连宝生物公司), SYBR Green 荧光染料试剂盒 (Roche 公司), PCR 引物由上海吉玛公司设计合成。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测基因表达 提取所收集患者和体检人群血清中总 RNA, 将提取的 RNA 进行逆转录合成 cDNA, 反应体系为 $20\mu\text{l}$, 反应条件为: 16°C 30 min, 45°C 30 min, 85°C 5 min。运用 SYBR Green 法检测 miR-498、miR-21、miR-137、miR-206、miR-138、miR-32 及 miR-125b 的表达情况, 运用的反应条件为: 94°C 15 min, 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 共循环 40 次; 最后 72°C 延伸 8 min。每组样品重复 3 次, 实验重复 3 次, 分析各标本中 miR-498、miR-21、miR-137、miR-206、miR-138、miR-32 及 miR-125b 的表达。

1.3 统计学方法

采用 Medcalc 和 GraphPad Prism6.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析, 计数资料间比较用 χ^2 检验, ROC 曲线分析用于各 miRNA 对诊断肺腺癌的敏感性与特异性分析, 采用多元 Logistic 回归分析进行 miR-498、miR-21、miR-137 3 者联合的 ROC 曲线分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌相关的 miRNAs 在两组患者中的表达情况

肺腺癌患者血清中 miR-21、miR-137 和 miR-498 表达量与正常体检人群比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 肺腺癌患者增加; miR-206、miR-138、miR-32、miR-125b 的表达量两组之间比较, 差异无

统计学意义 ($P > 0.05$)。见表1。

2.2 miR-498、miR-21 及 miR-137 在肺腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

为了进一步评价血清 miRNAs 在肺腺癌诊断中的应用, 本研究继续对 miR-498、miR-21 及 miR-137 这3种两组间表达有差异的 miRNA 做了 ROC 曲线

分析。结果显示 miR-498 的曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.73 (95%CI, 0.63 ~ 0.81), miR-21 的 AUC 为 0.83 (95%CI, 0.74 ~ 0.90), miR-137 的 AUC 为 0.74 (95%CI, 0.64 ~ 0.82) (见图 1~3)。根据 ROC 曲线分析, 本研究进一步确定 miR-498、miR-21 及 miR-137 用于诊断肺腺癌的最佳 cut-off 值,

表 1 两组患者血清中 7 种 miRNAs 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-498	miR-21	miR-137	miR-206	miR-138	miR-32	miR-125b
正常体检人群 ($n=40$)	2.12 ± 0.74	3.58 ± 1.35	6.43 ± 2.39	0.35 ± 0.03	0.38 ± 0.13	7.84 ± 1.39	1.44 ± 0.15
肺腺癌患者 ($n=59$)	2.84 ± 0.90	5.90 ± 1.95	8.29 ± 2.88	0.35 ± 0.11	0.41 ± 0.22	8.17 ± 1.32	1.51 ± 0.17
F 值	17.45	42.27	11.39	1.79	1.57	1.21	0.46
P 值	0.000	0.000	0.001	0.174	0.243	0.313	0.501

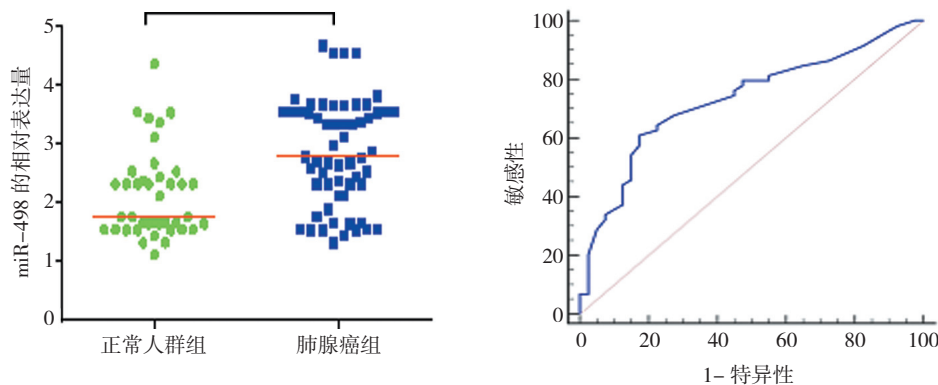


图 1 miR-498 的表达情况以及在肺腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

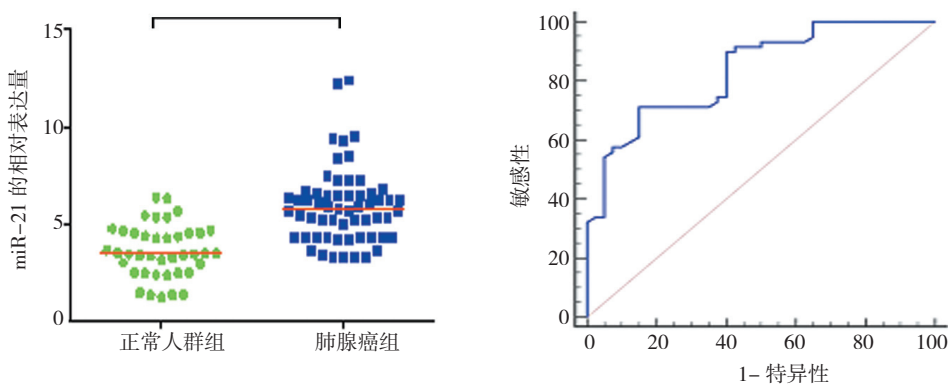


图 2 miR-21 的表达情况以及在肺腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

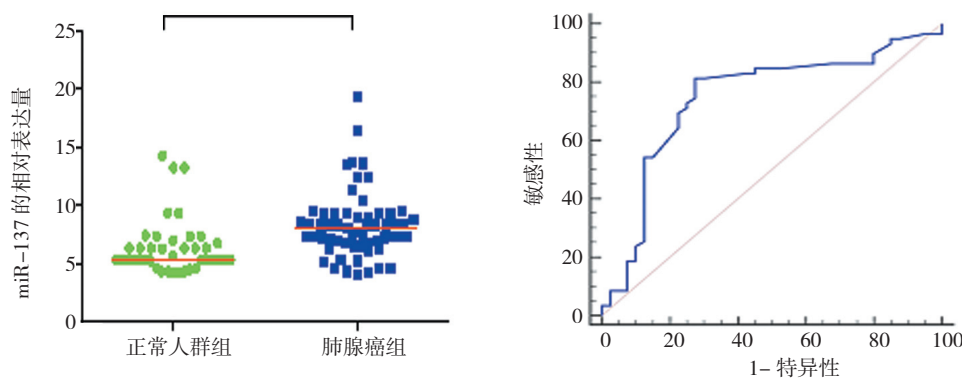


图 3 miR-137 的表达情况及在肺腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

以及其在肺腺癌诊断中的敏感性和特异性（见表 2）。对 3 种血清 miRNAs 肺腺癌诊断中做 ROC 曲线对比，结果显示 miR-498、miR-21 及 miR-137 之间差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）（见图 4）。

2.3 miR-498、miR-21 及 miR-137 3 者联合在肺腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

采用多元 Logistic 回归分析得出用 miR-498、miR-21 及 miR-137 3 者联合在肺腺癌诊断时其前的系数（miR-498、miR-21 及 miR-137）= $-12.0668 + 1.46085 \times \text{miR-498} + 1.38797 \times \text{miR-21} + 0.33292 \times \text{miR-137}$ 。miR-498、miR-21 及 miR-137 3 者联合在肺腺癌诊断中的 ROC 分析结果见表 3。miR-498、miR-21 及 miR-137 的 AUC 值大于单一检测任一

miRNA，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。见图 5。

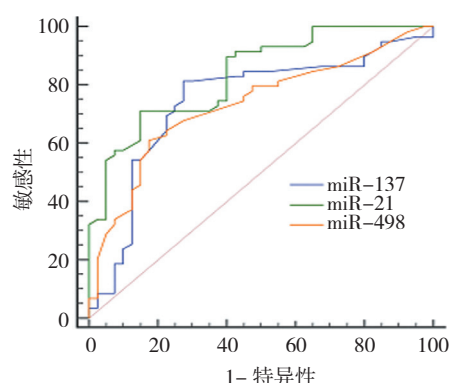


图 4 miR-498、miR-21 及 miR-137 在肺腺癌诊断中的 ROC 曲线分析比较

表 2 ROC 曲线分析比较

miRNAs	auROC	95%CI		P 值	约登值	分界点	敏感性 /%	特异性 /%
		下限	上限					
miR-498	0.73	0.63	0.81	0.000	0.44	2.53	61.02	82.50
miR-21	0.83	0.74	0.90	0.000	0.56	4.74	71.19	85.00
miR-137	0.74	0.64	0.82	0.000	0.53	6.35	81.36	72.50

表 3 miR-498、miR-21 及 miR-137 在肺腺癌诊断中的 ROC 曲线分析

miRNAs	auROC	95%CI		P 值	约登值	敏感性 /%	特异性 /%
		下限	上限				
miR-498& miR-21& miR-137	0.93	0.85	0.97	0.000	0.71	93.22	77.50

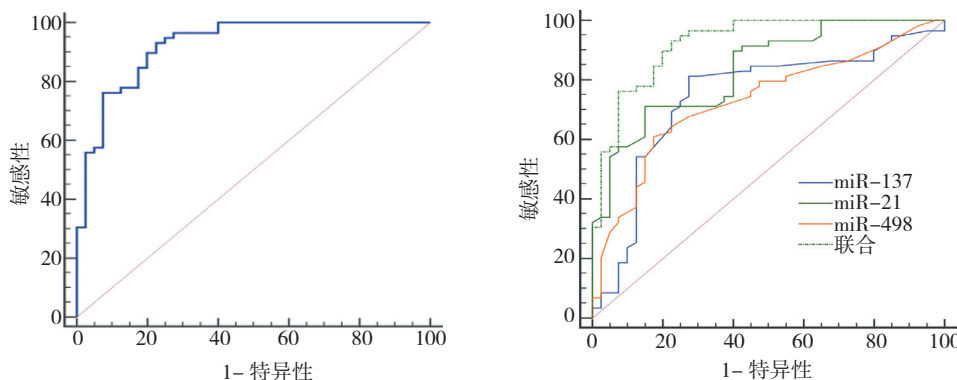


图 5 miR-498、miR-21 及 miR-137 在肺腺癌诊断中的 ROC 曲线分析比较

3 讨论

MiRNAs 是一类进化上高度保守的非编码小分子单链 RNA，不仅可以游离于细胞之外，还能稳定的存在于血清中，研究表明血清 miRNA 耐 RNA 酶降解，煮沸、反复冻融、酸碱环境及长期保存等各种处理方法均不会造成血清 miRNAs 的损失，其具备作为疾病

分子生物标志物的许多优点^[9-10]。虽然血清 miRNAs 的来源尚无定论，但是 miRNAs 在不同疾病及病理进程中具有特定的表达谱，已经在多种肿瘤、自身免疫性疾病及炎症等多种疾病的诊断和预后中显示了独特的价值。

本研究选取了目前在肺腺癌领域研究热门的 7 种

miRNAs, 包括 miR-498、miR-21、miR-137、miR-206、miR-138、miR-32 及 miR-125b, 检测其在正常人群及肺腺癌患者血清中的表达情况, 发现 miR-498、miR-21 及 miR-137 在肺腺癌患者血清中表达增加。MIMA 等^[11]的研究显示, 相比于正常结肠组织, 在结肠癌组织中, miR-21 表达增加, 并与结肠癌的浸润程度以及预后相关, 之后他们进一步通过用 miR-21 干预结肠癌细胞, 发现 miR-21 可以增加肿瘤细胞的增殖和侵袭^[12]。同样的, LEITE 等^[13]的研究发现在前列腺癌细胞中, miR-21 通过控制 RECK 通路, 从而增加前列腺癌细胞中 MMP-9 的表达, 增加肿瘤细胞的侵袭能力。与本实验的研究结果相符, JIANG 等^[7]的研究也发现肺腺癌患者血清中以及肺腺组织中 miR-21 的表达都升高, 并在细胞实验中进一步证实 miR-21 可以靶向结合缺氧诱导因子 α , 不仅可以作为肺腺癌诊断及疗效评估的 1 个标志, 而且还在肺腺癌的进展中发挥重要的调控作用。MiR-498 是一种抑癌 miRNAs, 可调节多种与肺癌、结肠癌及宫颈癌等多种肿瘤的生长、侵袭和转移调节有关的抑癌基因或蛋白, 从而调控多种肿瘤的发生发展^[14-17]。最近, WANG 及其团队的研究结果^[14]发现 miR-498 在非肺小细胞肺癌中表达减少, 而且 miR-498 的表达情况与肿瘤的侵袭程度呈负相关。

为了进一步评估 miR-498、miR-21 及 miR-137 在肺腺癌诊断中的临床应用价值, 本研究进一步对这 3 种 miRNAs 做 ROC 曲线分析, 发现血清 miR-498、miR-21 及 miR-137 的表达情况在肺腺癌诊断中具有较高的 AUC 值, 分别为 0.73、0.83 及 0.74。之后笔者采用多元 Logistic 回归分析得出用 miR-498 & miR-21 & miR-137 在肺腺癌诊断时其前的系数, 对 (miR-498 & miR-21 & miR-137) 行 ROC 曲线分析发现其 AUC 值为 0.93, 优于单一使用任一 miRNA 来诊断肺腺癌。与笔者的研究结果相符, ZUO 等^[18]的研究发现在检测 AFP 的基础上, 联合检测血清 miR-125b 和 miR-27a 的水平, 可以大大提高早期肝癌患者诊断的敏感性和特异性。GU 及其团队的研究^[19]也发现联合检测血清 miR-182、miR-200c 及 miR-221 的水平可以提到前列腺癌的检出水平。随着现在检测技术和设备的提升, 在少量的样本中快速、灵敏的对 miR-498、miR-21 和 miR-137 同时进行检测已成为可能^[20]。miR-498、miR-21 和 miR-137 联合检测可以大大提

高肺腺癌诊断的敏感性和特异性, 在肺腺癌的诊断中具有潜在的应用价值。

本研究存在不足之处, 由于成本问题, 本研究纳入的样本量相对较少, 无法对大规模的样本进行初步筛选, 将在后续的研究中针对 miR-498、miR-21 和 miR-137, 采取前瞻性研究的方法, 进一步验证其在肺腺癌诊断及预后中的价值。

参 考 文 献:

- [1] LI Y, XUAN J, SONG Y, et al. Nanoporous glass integrated in volumetric bar-chart chip for point-of-care diagnostics of non-small cell lung cancer[J]. ACS Nano, 2016, 10(1): 1640-1647.
- [2] IWAKAWA H O, TOMARI Y. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression[J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(11): 651-665.
- [3] SHEN H, WANG L, GE X, et al. MicroRNA-137 inhibits tumor growth and sensitizes chemosensitivity to paclitaxel and cisplatin in lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20728-20742.
- [4] LIU Z, CHEN X, WU Q, et al. miR-125b inhibits goblet cell differentiation in allergic airway inflammation by targeting SPDEF[J]. Eur J Pharmacol, 2016, (782): 14-20.
- [5] LI L, WU D. miR-32 inhibits proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis by targeting TWIST1 in non-small-cell lung cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2016, (9): 1489-1498.
- [6] JIN Z, GUAN L, SONG Y, et al. MicroRNA-138 regulates chemoresistance in human non-small cell lung cancer via epithelial mesenchymal transition[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(6): 1080-1086.
- [7] JIANG S, WANG R, YAN H, et al. MicroRNA-21 modulates radiation resistance through upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α -promoted glycolysis in non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(5): 4101-4107.
- [8] CHEN Q Y, JIAO D M, WANG J, et al. miR-206 regulates cisplatin resistance and EMT in human lung adenocarcinoma cells partly by targeting MET[J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 24510.
- [9] ZHOU X, WEN W, SHAN X, et al. MiR-28-3p as a potential plasma marker in diagnosis of pulmonary embolism[J]. Thromb Res, 2016, (138): 91-95.
- [10] ZHOU X, JI G, CHEN H, et al. Clinical role of circulating miR-223 as a novel biomarker in early diagnosis of cancer patients[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 16890-16898.
- [11] MIMA K, NISHIHARA R, YANG J, et al. MicroRNA MIR21 (miR-21) and PTGS2 expression in colorectal cancer and patient survival[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(15): 3841.
- [12] MIMA K, NISHIHARA R, NOWAK J A, et al. MicroRNA MIR21 and T cells in colorectal cancer[J]. Cancer Immunol Res, 2016, 4(1): 33-40.
- [13] LEITE K R, REIS S T, VIANA N, et al. Controlling RECK miR21 promotes tumor cell invasion and is related to biochemical recurrence in prostate cancer[J]. J Cancer, 2015, 6(3): 292-301.

- [14] WANG M, ZHANG Q, WANG J, et al. MicroRNA-498 is downregulated in non-small cell lung cancer and correlates with tumor progression[J]. *J Cancer Res Ther*, 2015, 11 Suppl 1: C107-111.
- [15] MATAMALA N, VARGAS M T, GONZALEZ-CAMPORA R, et al. MicroRNA deregulation in triple negative breast cancer reveals a role of miR-498 in regulating BRCA1 expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20068-20079.
- [16] LIU R, LIU F, LI L, et al. MiR-498 regulated FOXO3 expression and inhibited the proliferation of human ovarian cancer cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015(72): 52-57.
- [17] GOPALAN V, SMITH R A, LAM A K. Downregulation of microRNA-498 in colorectal cancers and its cellular effects[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 330(2): 423-428.
- [18] ZUO D, CHEN L, LIU X, et al. Combination of miR-125b and miR-27a enhances sensitivity and specificity of AFP-based diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 37(5): 6539.
- [19] GU Y, LEI D, QIN X, et al. Integrated analysis reveals together miR-182, miR-200c and miR-221 can help in the diagnosis of prostate cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140862.
- [20] BUCHWALD U K, ADETIFA I M, BOTTOMLEY C, et al. Broad adaptive immune responses to M. tuberculosis antigens precede TST conversion in tuberculosis exposed household contacts in a TB-endemic setting[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e116268.

(张蕾 编辑)