

• 论 著 •

非小细胞肺癌血清 miR-125b 水平变化及其临床意义

时广利, 孙 勇[#], 尹颜军, 宋长兴, 许绍发[△]

(首都医科大学附属北京胸科医院, 北京 101149)

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)患者血清中 miR-125b 的表达水平变化及其在 NSCLC 辅助诊断和疗效评估中的临床应用价值。方法 采用实时荧光定量 PCR 法检测 102 例 NSCLC 患者、45 例肺部良性疾病患者和 42 例健康对照者血清中 miR-125b 的表达量。结果 NSCLC 患者化疗前血清中 miR-125b 的表达水平明显高于健康人和肺部良性疾病组($P < 0.05$);血清 miR-125b 在Ⅲ期+Ⅳ期中的表达水平显著高于Ⅰ期+Ⅱ期($P < 0.01$)。与化疗前比较,晚期 NSCLC 患者化疗 2 个周期后,血清中 miR-125b 的表达量明显降低($P < 0.05$)。结论 血清 miR-125b 的检测对于 NSCLC 的辅助诊断和化疗疗效评价有一定的临床应用价值。

关键词:聚合酶链反应; 非小细胞肺癌; 微小 RNA; 辅助诊断; 疗效评估

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)14-2005-03

The clinical significance of serum microRNA-125b in non-small cell lung cancer

Shi Guangli, Sun Yong[#], Yin Yanjun, Song Changxing, Xu Shaofa[△]

(Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China)

Abstract: Objective To evaluate the serum level of miR-125b in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients and its clinical significance for diagnosis and evaluating efficacy of chemotherapy of NSCLC. **Methods** Real-time quantitative PCR method was used to examine the levels of serum miR-125b in 102 patients with NSCLC, 45 patients with lung benign disease and 42 healthy controls. **Results** The level of serum miR-125b in patients with NSCLC was significantly higher than that of patients with lung benign disease and healthy controls($P < 0.05$); The level of serum miR-125b was found to be significantly higher in stages Ⅲ and IV than stages Ⅰ and Ⅱ ($P < 0.01$); The serum miR-125b level of advanced NSCLC patients after two treatment course was significantly lower than that of pre-chemotherapy($P < 0.05$). **Conclusion** Detection of serum miR-125b has certain clinical values for diagnosis and evaluating efficacy of chemotherapy of NSCLC.

Key words: polymerase chain reaction; non-small cell lung cancer; microRNA; diagnosis; evaluating efficacy

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其病死率居各种恶性肿瘤之首^[1]。每年大概有 120 万新发肺癌病例,其中约 75%~80%是非小细胞肺癌(NSCLC),其 5 年存活率仅为 15%~20%^[2]。大约 75%肺癌患者在临床确诊时就已经属于晚期,失去了手术治疗时机,肺癌的早期诊断和早期治疗是降低肺癌病死率的关键^[3]。miRNA 是一类内源性高度保守的长度为 18~24 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,这些 miRNA 通常靶向一个或多个 mRNA,主要通过转录后机制调控靶基因的翻译或表达,在细胞的增殖、凋亡、肿瘤的发生、发展等多种生理和病理过程中发挥重要作用^[4]。随着对 miRNA 的深入研究,发现其可能成为新的肺癌早期诊断和癌症进程相关的标记物,有助于疾病的辅助诊断及疗效监测^[5]。本文重点研究 NSCLC 患者血清中 miR-125b 的表达水平变化,评价其对 NSCLC 辅助诊断和化疗疗效评估方面的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 11 月至 2013 年 10 月首都医科大学附属北京胸科医院收治的初治 NSCLC 患者 102 例,其中男 54 例、女 48 例,平均年龄(50.1 ± 7.8)岁。所有患者全部经细胞学或组织学确诊,既往未进行放疗或化疗。肺部良性疾病患者为首都医科大学附属北京胸科医院收治确诊的肺结核或肺炎患者 45 例,健康对照组为北京胸科医院体检健康职工 42 例,无高血压、高血脂、糖尿病等疾病。

1.2 标本采集 用带血清分离胶的真空采血管收集 NSCLC 患者、肺部良性疾病患者和健康者空腹静脉血 4 mL。所有标

本经 4 000 r/min 离心后分离出血清,−80 ℃冻存,集中进行检测。

1.3 方法

1.3.1 血清标本 miRNA 提取 按照天根生化科技有限公司生产的 miRNA 提取分离试剂盒(DP501)的操作程序提取所有血清标本 miRNA。包括裂解、漩涡振荡、离心、氯仿-无水乙醇抽提、吸附柱吸附、漂洗等步骤,获得的 miRNA 溶液于−80 ℃保存备用。

1.3.2 miRNA 分子 3'端 poly(A)化及逆转录 按照天根生化科技有限公司生产的 miRNA 逆转录 cDNA 合成试剂盒的操作程序进行,miRNA 分子 3'端 poly(A)化反应为 20 μL 体系,ploy(A)已修饰的 miRNA 逆转录反应为 11.5 μL 体系。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 以合成的 cDNA 为模板,应用 miRNA 荧光定量 PCR(Sybr Green)试剂盒进行实时荧光定量 PCR,同时以 miR-16 作为内参照。miRNA 荧光定量 PCR 反应为 20 μL 体系,PCR 反应循环条件:94 ℃预热 2 min,94 ℃ 20 s,60 ℃ 34 s,共进行 45 个循环。miR-125b 的相对表达量用 $2^{-\Delta Ct}$ 表示,各样本的 ΔCt 值=(目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以中位数(四分位数)表示,多组间血清 miR-125b 相对表达量比较采用 Kruskal Wallis 检验,两组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。通过受试者操作特征曲线(ROC)分析 miR-125b 表达水平对 NSCLC 诊断的敏感性和特异性。

2 结 果

2.1 血清 miR-125b 相对表达量检测结果 如表 1 所示, NSCLC 患者化疗前血清中 miR-125b 的表达量显著高于健康对照组和肺部良性疾病组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 健康对照组和肺部良性疾病组血清中 miR-125b 的表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。血清 miR-125b 在Ⅲ期+Ⅳ期中的表达水平显著高于Ⅰ期+Ⅱ期, 差异有统计学意义($P<0.05$); 血清 miR-125b 在腺癌中的表达水平显著高于鳞癌, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 血清 miR-125b 相对表达量 M(QR)

组别	<i>n</i>	miR-125b 表达量	<i>Z</i>	<i>P</i>
健康人	42	0.55(0.08~1.22)		
肺部良性疾病	45	0.57(0.09~1.28)	0.302	0.762 ^a
NSCLC	102	0.98(0.13~2.29)	2.207	0.027 ^b
Ⅰ期+Ⅱ期	36	0.69(0.11~1.45)		
Ⅲ期+Ⅳ期	66	1.28(0.31~2.92)	2.888	0.004 ^d
鳞癌	57	0.76(0.12~1.74)		
腺癌	45	1.19(0.22~2.64)	2.176	0.03 ^c

^a: $P>0.05$ 肺部良性疾病与健康对照组比较; ^b: $P<0.05$ NSCLC 组与健康对照组比较; ^c: $P<0.05$ 腺癌与鳞癌比较; ^d: $P<0.01$ Ⅲ期+Ⅳ期与Ⅰ期+Ⅱ期比较。

2.2 血清 miR-125b 对 NSCLC 检测的敏感性、特异性 如表 2 所示, 血清 miR-125b 对腺癌检测的敏感性明显高于鳞癌, 差异有统计学意义($P<0.05$); 血清 miR-125b 对Ⅲ期+Ⅳ期 NSCLC 检测的敏感性明显高于Ⅰ期+Ⅱ期, 差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 2 miR-125b 对 NSCLC 检测的敏感性、特异性(%)

组别	<i>n</i>	敏感性(%)	特异性(%)	χ^2	<i>P</i>
NSCLC	102	52.9	82.1		
Ⅰ期+Ⅱ期	36	33.3	81.4		
Ⅲ期+Ⅳ期	66	63.6	83.2	8.586	0.003 ^b
鳞癌	57	43.9	81.2		
腺癌	45	64.4	83.7	4.277	0.039 ^a

^a: $P<0.05$ 腺癌与鳞癌比较; ^b: $P<0.01$ Ⅲ期+Ⅳ期与Ⅰ期+Ⅱ期比较。

2.3 晚期 NSCLC 患者化疗后血清中 miR-125b 的表达量变化 如表 3 所示, 与化疗前比较, 晚期(Ⅲ期+Ⅳ期) NSCLC 患者化疗 2 个周期后, 血清中 miR-125b 的表达量明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 NSCLC 患者化疗前、化疗后血清中 miR-125b 的表达量 M(QR)

组别	<i>n</i>	miR-125b 表达量	<i>Z</i>	<i>P</i>
化疗前	66	1.28(0.31~2.92)		
化疗后 2 个周期	66	0.85(0.13~2.16)	2.544	0.011 ^a

^a: $P<0.05$ 与化疗前比较。

2.4 NSCLC 患者血清 miR-125b 的 ROC 曲线分析 应用 ROC 分析 102 例 NSCLC 患者、45 例肺部良性疾病患者和 42 名健康人血清中 miR-125b 的表达量在 NSCLC 诊断中的敏感性和特异性, 分析结果显示 miR-125b 最佳相对表达量的临界值为 0.45, 其敏感性为 52.9%, 特异性为 82.1%, 曲线下面积(AUC)为 0.756。

3 讨 论

目前大量的研究表明, 特异性的 miRNA 在肿瘤的发生发展过程中起着“致癌 miRNA”和“抑癌 miRNA”的不同作用^[6]。另外, 由于血清中内源性 RNA 酶对 miRNA 不起作用,

使得 miRNA 在血清中可以稳定表达, 提示 miRNA 可以作为潜在的特异性肿瘤标志物^[7]。由于血清 miRNA 作为肿瘤标志物具有创伤小、取材便捷等优点, 因此 miRNA 在癌症中被认为是新一代的循环肿瘤标志^[8]。陈飞等^[9]的研究发现, NSCLC 患者血清中 miR-21 的表达量明显高于对照组, 而 Let-7 的表达量明显低于对照组。Hennessey 等^[10]的研究结果发现, 血清 miR-15b 和 miR-27b 在 NSCLC 和健康对照组中的表达有明显差异, 其敏感性为 84%, 特异性为 100%。但是, 关于血清 miR-125b 在 NSCLC 患者中的表达情况方面却未见报导。

本研究应用实时荧光定量 PCR 法检测了 NSCLC 患者化疗前后血清中 miR-125b 的表达情况。研究结果显示, NSCLC 患者化疗前血清中 miR-125b 的表达量明显高于肺部良性疾病组和正常人组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 表明血清 miR-125b 对于 NSCLC 的辅助诊断和鉴别诊断有一定的临床意义。肺癌组经病理分型后, 血清 miR-125b 在腺癌中的表达水平以及对腺癌检测的敏感性均明显高于鳞癌($P<0.05$), 表明血清 miR-125b 对肺腺癌的辅助诊断更具有临床价值。本研究结果还发现, 血清 miR-125b 在晚期 NSCLC(Ⅲ期+Ⅳ期)中的表达水平和检测的敏感性明显高于早期 NSCLC(Ⅰ期+Ⅱ期)($P<0.01$), 原因可能是因为 NSCLC 越晚期, 癌组织坏死和凋亡后溶解释放到血液中的 miR-125b 就越多所致。另外, 血清 miR-125b 对早期 NSCLC 检测的敏感性为 33.3%, 特异性为 81.4%, 表明血清 miR-125b 对 NSCLC 的早期诊断也可能同样具有一定的临床意义。

肿瘤标志物最重要的作用之一是疗效评价。本研究结果显示, 与化疗前比较, 晚期(Ⅲ期+Ⅳ期) NSCLC 患者化疗 2 个周期后, 血清中 miR-125b 的表达量明显降低($P<0.05$)。表明血清 miR-125b 对于晚期 NSCLC 化疗疗效评估有一定的临床参考价值。Nishida 等^[11]的研究发现, miR-125b 在大肠癌患者组织中的表达量明显升高。Mar-Aguilar 等^[12]的研究证实, miR-125b 在乳腺癌组织中的表达量显著高于癌旁组织。本研究应用 ROC 曲线得出血清 miR-125b 的敏感性为 52.9%, 特异性为 82.1%, AUC 为 0.756, 进一步支持了血清 miR-125b 作为 NSCLC 的肿瘤标志物有一定的可行性。

总之, 本研究结果显示, 血清 miR-125b 对 NSCLC 有较好的辅助诊断价值, 并能够反映实际化疗效果, 值得进一步的深入研究。未来可能通过检测一种或几种血清 miRNA 来对肺癌患者进行初筛, 将是对目前肺癌辅助诊断方法和疗效评估的一个重要的补充。

参考文献

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(1): 69-90.

[2] Tiseo M, Ardizzoni A, Cafferata MA, et al. Predictive and prognostic significance of neuron-specific enolase(NSE) in Non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2008, 28(5): 507-513.

[3] 张晓丰. 肺癌标志物临床研究点评[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(7): 997-999.

[4] Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs[J]. J Cell Physiol, 2010, 222(5): 540-545.

[5] Olson P, Lu J, Zhang H, et al. MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer[J]. Genes Dev, 2009, 23(18): 2152-2165.

[6] Lin Y, Zeng Y, Zhang F, et al. Characterization of microRNA expression profiles and the discovery of novel microRNAs involved in cancer during human embryonic development[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e69230.

(下转第 2008 页)

验证,作为参比系统,X)、Beckman AU5421-1 Unit2(比较系统 Y1)、Beckman AU5421-2 Unit1(比较系统 Y2)、Beckman AU5421-2 Unit2(比较系统 Y3)、Beckman AU5811(比较系统 Y4)。

1.3 方法

1.3.1 精密度评价 BIO-RAD 生化分析质控品高值、低值 2 个浓度,每天分析 1 个批次,2 个浓度,每个浓度重复测定 4 次,连续测定 5 天。根据公式计算 $S_{\text{批内}}$ 、 $CV_{\text{批内}}$ 、 $S_{\text{批间}}$ 、 $CV_{\text{批间}}$,参照各项目 CLIA'88 总 TEa,批内精密度采用 $1/4TEaCLIA'88$ 要求,批间精密度采用 $1/3TEaCLIA'88$ 要求,判断精密度是否可接受,若均小于验证值,厂家声明的批内精密度、批间精密度通过验证。

1.3.2 X、Y1、Y2、Y3、Y4 血脂 6 项可比性分析 每半年执行一次比对,收集患者血清 20 份,5 套检测系统分别同时检测 5 个样本,连续检测 4 天,完成这 20 份标本的检测;分别计算平均偏倚、回归分析,比较偏倚采用 $1/2CLIA'88$,若比较评估的系统误差(SE)或预期的偏倚小于 $1/2TEa$,认为检测系统间的系统误差或相对偏差属临床可接受范围。操作者应充分熟练掌握仪器的操作程序、保养程序、样本准备方法、校准以及检测程序。

1.3.3 不确定度的评估 检验人员对 2 个浓度的质控品进行 20 次(批内、批间)的重复检测,得到随机效应引起的相对标准不确定度的平方: $Ur^2(ran)=Ur^2(CV_{\text{批内}})+Ur^2(CV_{\text{批间}})$;得到系统效应引起的相对标准不确定度: $Ur(sys)=Sr(bias)$ 多次质评结果的相对标准偏倚(bias%)。 $Ucr^2=Ur^2(ran)+Ur^2(sys)$ 此为 A 类评定。确定校准品赋值的标准不确定度 $Ucal$,来源于校准品厂家提供的说明书, $Ucal=Ucal/\text{扩展因子}$,此为 B 类评定。计算合成相对不确定度: $\sqrt{Ur^2(ran)+Ur^2(sys)+Urcal^2}$,扩展相对不确定度 $2Ucr$,扩展因子 $k=2(95\%$ 的置信水平, $k=2)$ 。计算合成不确定度: $(\bar{x})$,扩展不确定度 $2Uc$,扩展因子 $k=2(95\%$ 的置信水平, $k=2)$ 。

2 结 果

2.1 精密度验证结果 5 套检测系统每两个浓度不平的批内和批间(天间)精密度均符合要求,可被接受,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.2 可比性分析结果 5 套检测系统血脂 6 项检测结果一致, $r^2>0.95$,可比,见表 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.3 不确定度评估结果 血脂 6 项 2 个水平浓度的扩展相对不确定度、扩展不确定度,见表 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

3 讨 论

结果准确性与及时性是评价检验质量的两大指标,同一实验室内多套检测系统能极大缩短 TAT,控制多套检测系统准确性及同一项目结果的一致性室内质量控制指标,同时也提高了检测项目对临床诊断与治疗的能效。

精密度、可比性分析通常采用 EP9A2 或 EP15A2 方案进行评价,由于本科室采用的是原装配套试剂、试剂配套校准品,为“A+A+A”分析模式,综合实际工作(多套检测系统与工作量)与评价成本,本研究选用 EP15A2 验证、分析室内 5 套检测系统的不精密度及同一项目检测结果的一致性。5 套检测系统 TG、TCHO、HDL-C、LDL-C、APOA1、APOB 批内不精密度均 $<1/4TEa$,批间(天间)不精密度均 $<1/3TEa$,与参比系统 X 相比较,相同项目 Y1、Y2、Y3、Y4 检测系统测定结果相关回归分析, $r^2>0.95$,说明检测样本浓度分布合理,结果一致具有可比性。

不确定度是对正确结果正确性的可疑程度,表征被测量之值的分散性,提供了在一定包含概率中真值存在的区间,正确评估实验室测量不确定度能客观反映测量结果的可靠性^[1],但目前国内实验室广泛使用多种品牌自动化生化分析仪,其不确定度来源比一般的化学测量实验室更复杂,主要有:不精密度、校准品测量不确定度、基体效应、试剂、校准品和参考物质的批间差、不同操作者、仪器维护、环境变化(如温度、湿度)等^[2],科学地选择适宜自己实验室的评估方式尤其重要。目前常用的有两种方法:自下而上的方法(bottom-up)即 GUM 模式办法^[3-5],自上而下的方法(top-down)。其中自上而下的方法是在控制不确定度来源或程序的前提下评定,典型方法是依据特定方案(正确度评估和校准方案)的试验数、QC 数据或方法验证试验数据进行的,常规医学实验室常将这两者与系统误差和随机误差相联系。本实验室采用利用校准品不确定度、基于室内质评等数据评估血脂 6 项的不确定度,这种评定方式可行,大大减少了评估测量不确定度的工作量。各项测量不确定度的评估将会为实验室的质量改进工作提供依据,努力改进主要影响因素来降低测量不确定度。

参考文献

[1] Fuentes-Ardefiu X. Uncertainty of measurement in clinical laboratory sciences[J]. Clin Chem, 2000, 46(14): 1437-1438.
[2] 张晓红,鲁辛辛.依据 Nordtest 准则评估测量不确定度更适合于临床实验室[J].中华检验医学杂志,2012,35(5):404-406.
[3] 秦绪珍,高学慧,徐二木,等.ELISA 方法检测 CA242 的不确定度评估[J].中国卫生检验杂志,2010,20(8):894-896.
[4] 鲁涛,李江,赵必波,等.临床生物化学实验室测量不确定度的评估[J].临床检验杂志,2010,28(2):224-226.
[5] Kristiansen J. Description of a generally applicable model for the evaluation of Uncertainty of measurement in clinical chemistry [J]. Clin Chem Lab Med, 2001, 39(9): 920-931.

(收稿日期:2015-02-18)



(上接第 2006 页)

[7] Wang J, Zhang KY, Liu SM, et al. Tumor associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer[J]. Molecules, 2014, 2(19): 1912-1938.
[8] Chin LJ, Slack FJ. A truth serum for cancer microRNAs have major potential as cancer biomarkers[J]. Cell Res, 2008, 18(10): 981-984.
[9] 陈飞,卢火俭,臧发荣,等.3 种 miRNA 血清水平与非小细胞肺癌的相关性研究[J].中国现代医生,2012,50(25):56-59.
[10] Hennessey Pr, Sanford T, Choudhary A, et al. Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer[J]. PLOS

one, 2012, 7(2): e32307.
[11] Nishida N, Yokobori T, Mimori K, et al. MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2011, 38(14): 1437-1443.
[12] Mar-Aguilar F, Luna-Aguirre CM, Moreno-Rocha, et al. Differential expression of miR-21, miR-125b and miR-191 in breast cancer tissue[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2013, 9(1): 53-59.

(收稿日期:2015-02-20)