·论　　著·

miR-20a 对 NSCLC 细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响及与血清肿瘤标志物联合检测的诊断效能

杨文玲，陈宗涛△

陆军军医大学第一附属医院健康管理科，重庆 400038

摘　要：目的　探讨 miR-20a 对非小细胞肺癌（NSCLC）细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响及血清肿瘤标志物联合 miR-20a 检测在 NSCLC 诊断中的价值。**方法**　选取该院 2013 年 1 月至 2015 年 1 月收治的 NSCLC 患者 112 例，肺部良性疾病患者 94 例，采用电化学发光法检测血清癌胚抗原（CEA）、神经元特异性烯醇化酶（NSE）、糖类抗原（CA）125 的表达水平；采用实时荧光定量 PCR 法检测患者血浆 miR-20a 的表达水平；对血清肿瘤标志物和 miR-20a 单独及联合检测在 NSCLC 诊断中的效能进行分析。**结果**　miR-20a 高表达于 NSCLC 组织，且 A594 细胞中过表达 miR-20a 可显著促进细胞增殖、迁移与侵袭（$P<0.05$）。NSCLC 患者血清 CEA、NSE、CA125 及血浆 miR-20a 的表达水平明显高于肺部良性疾病患者（$P<0.05$）。CEA、NSE、CA125 及 miR-20a 联合检测诊断 NSCLC 的特异度和灵敏度明显高于各肿瘤标志物及 miR-20a 单独检测（$P<0.05$）。**结论**　血清肿瘤标志物与 miR-20a 联合检测对 NSCLC 具有较高的诊断效能，有较高的临床应用价值。

关键词：非小细胞肺癌；　癌胚抗原；　神经元特异性烯醇化酶；　糖类抗原 125；　miR-20a；　诊断效能

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2021.02.018　　**中图法分类号：**R734.2

文章编号：1673-4130(2021)02-0206-05　　**文献标志码：**A

Effect of miR-20a on proliferation, migration, invasion and apoptosis of non-small cell lung cancer cells and diagnostic efficiency of serum tumor markers combined detection

YANG Wenling, CHEN Zongtao△

Department of Health Management, First Affiliated Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400038, *China*

Abstract: Objective　To investigate the effect of miR-20a on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of non-small lung cell carcinoma (NSCLC) cells and the value of serum tumor markers combined with miR-20a detection in the diagnosis of NSCLC. **Methods**　One hundred and twelve patients with NSCLC and 94 patients with lung benign diseases diagnosed and treated in this hospital from January 2013 to January 2015 were selected. The expression levels of serum CEA, NSE and CA125 were detected by adopting the electrochemiluminescence assay. The expression level of miR-20a was detected by adopting the real-time fluorescent quantitative PCR. The diagnostic efficiency of single detection and combined detection of serum tumor markers and miR-20a in the diagnosis of NSCLC was analyzed. **Results**　miR-20a was highly expressed in the NSCLC tissues, moreover the miR-20a overexpression in A594 cells could significantly promote the cell proliferation, migration and invasion ($P<0.05$). The expression levels of serum CEA, NSE, CA125 and plasma miR-20a in the patients with NSCLC were significantly higher than those in the patients with lung benign disease ($P<0.05$). The specificity and sensitivity of CEA, NSE, CA125 and miR-20a combined detection for diagnosing NSCLC were significantly higher than those of single detection of various tumor markers and miR-20a ($P<0.05$). **Conclusion**　The combined detection of serum tumor markers and miR-20a has high diagnostic efficiency for NSCLC and possesses a high clinical application value.

Key words: non-small cell lung cancer;　carcinoembryonic antigen;　NSE;　CA125;　miR-20a;　diagnostic efficiency

---

作者简介：杨文玲，女，主治医师，主要从事肿瘤等常见慢性疾病的健康管理相关研究。　△　**通信作者**，E-mail：2398506395@qq.com。

本文引用格式：杨文玲，陈宗涛. miR-20a 对 NSCLC 细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响及与血清肿瘤标志物联合检测的诊断效能[J]. 国际检验医学杂志，2021，42(2)：206-209.

非小细胞肺癌(NSCLC)是临床上常见的恶性肿瘤,其发病率较高,约占肺癌总发病率的 84%[1]。NSCLC 的疗效及预后与诊断有着密切关系,由于 NSCLC 早期并无明显的临床症状,临床诊断过程中常出现漏诊或者误诊的情况,从而延误最佳治疗时机[2-3]。近年来,肿瘤标志物在临床应用中受到越来越多的关注,有研究表明,肿瘤标志物联合检测可提高 NSCLC 的诊断效能,但是这些标志物并非是 NSCLC 的特异性标志物,所以其在 NSCLC 诊断中的应用仍需不断探讨、考证[4]。本研究旨在探讨血清肿瘤标志物和 miR-20a 联合检测在 NSCLC 诊断中的价值,以期为 NSCLC 的临床早期诊疗提供可靠的依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取本院 2013 年 1 月至 2015 年 1 月收治的肺部疾病患者共 206 例,其中 NSCLC 患者[NSCLC 组,在进行手术切除时保留癌组织和癌旁组织(距癌组织>5 cm)标本]112 例,肺部良性疾病患者(良性肺病组)94 例。NSCLC 组中男 58 例,女 54 例;年龄 45～76 岁,平均(56.82±13.21)岁;肿瘤直径为 1.6～5.9 cm,平均(3.45±1.25)cm。良性肺病组中男 48 例,女 46 例;年龄 44～75 岁,平均(54.72±12.11)岁。所有患者均经本院病理科明确诊断。排除标准:(1)心、肝、肾功能严重受损者;(2)近期接受过相关治疗者;(3)长期使用免疫抑制剂及糖皮质激素治疗者;(4)精神疾病患者;(5)其他癌症患者。受试者均签署知情同意书,本研究获得本院伦理委员会审核通过。

1.2　方法

1.2.1　标本采集　抽取 10 mL 空腹静脉血于非抗凝管中,然后 4 000 r/min 离心 10 min 分离血清,储存于－80 ℃冰箱,用于癌胚抗原(CEA)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)等肿瘤标志物的检测。抽取 10 mL 空腹静脉血于抗凝管中,然后 4 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,储存于－80 ℃冰箱,用于 miR-20a 检测。

1.2.2　血清肿瘤标志物及 miR-20a 水平检测　采用电化学发光法(Roche Elecsys 2010)检测血清 CEA、NSE、糖类抗原(CA)125 水平。采用 TaqMan 试剂盒(赛默飞世尔;ID:000580;序列:UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG)在实时荧光定量 PCR 仪上检测 miR-20a 的表达水平。

1.2.3　细胞培养、分组及转染　将细胞加入 DMEM 培养基,于 37 ℃、5%CO_2 的条件下培养于培养箱中,48 h 后消化传代。采用 Lipofectamine™2000 试剂将 miR-20a 类似物(mimic-miR-20a)转染至 A549 细胞(该细胞来源于 NSCLC 细胞系)中,即 mimic-miR-20a 组,以仅加入 Lipofectamine™2000 试剂而未转染 miRNA 模拟物/抑制剂(mimics/inhibitor)的细胞为对照,即 mimic-NC 组。等量接种 A549 细胞于 6 孔板中,过夜培养 A549 细胞贴壁生长至 80%～90%的融合度,mimic-miR-20a 组用 mimics(终水平为 50 nmol/L)转染的完全培养基培养约 24 h。

1.2.4　细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭能力检测　(1)CCK8 细胞增殖检测:将密度为 10^5 个/毫升的细胞悬液接种于 96 孔板中,每孔接种 200 μL。培养 48 h 后加入 10 μL 的 CCK8 试剂,孵育 2 h 后用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度,检测细胞的增殖情况。(2)Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测:将收集到的细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次后用 400 μL 的结合缓冲液(binding buffer)重悬,然后分别加入 10 μL 的 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI),避光孵育 20 min,采用流式细胞术检测细胞的凋亡水平。(3)细胞划痕实验:按照 2×10^6 个/孔的密度将细胞接种于 6 孔板中,培养 48 h 后用 20 μL 的枪头在 6 孔板上划出划痕,在 0 h 和 24 h 这两个时间点进行拍照,量取细胞的迁移距离。(4)碳酸脂膜(Transwell)侵袭实验:用基质胶(matrigel)包被 Transwell 上层小室,加入 200 μL DMEM 重悬的密度为 10^5 个/毫升的细胞悬液,下层用含有 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 填满,培养 48 h 后将侵袭的细胞固定,用结晶紫染色,对侵袭细胞进行计数。

1.3　判断标准　以病理检查结果为金标准。联合检测时,CEA、NSE、CA125 和 miR-20a 任意一项水平超过其临界值判定为阳性;全部指标水平低于其临界值判定为阴性。

1.4　统计学处理　采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理和分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。采用 Kaplan-Meier 曲线进行生存分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

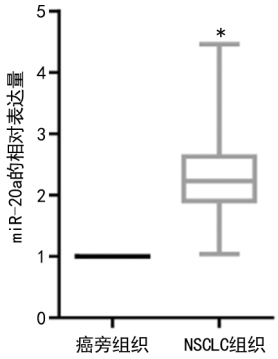
2　结　　果

2.1　miR-20a 在 NSCLC 组织中的表达水平及与患者生存率的相关性　与癌旁组织相比,miR-20a 在 NSCLC 组织中的表达水平明显升高($P<0.05$)。经过 5 年的随访,47 例患者因肺癌死亡。采用 Kaplan-Meier 曲线分析 miR-20a 表达水平与患者生存率之间的相关性,结果表明,miR-20a 的表达水平与患者的生存率呈负相关($P<0.05$)。见图 1～2。

2.2　miR-20a 对 A594 细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的调控作用　在 A594 细胞中过表达 miR-20a,实时荧光定量 PCR 结果表明,miR-20a 在 A594 细胞中有着较高的过表达效率(图 3A)。CCK8 细胞增殖检测结果表明,过表达 miR-20a 可明显促进 A594 细胞的增殖(图 3B),且流式细胞术结果证明过表达 miR-20a 后,A594 细胞的凋亡水平明显降低(图 3C)。此外,细胞划痕实验和 Transwell 侵袭实验结果表明,在

A594 细胞中过表达 miR-20a 可明显促进细胞的迁移与侵袭(图 3D～E)。

2.3 两组血清肿瘤标志物及 miR-20a 表达水平比较　NSCLC 组患者血清 CEA、CA125 以及 NSE 的表达水平明显高于良性肺病组($P<0.05$);另外,NSCLC 组患者血浆 miR-20a 的表达水平明显高于良性肺病组($P<0.05$)。见表 1。



注:与癌旁组织比较,* $P<0.05$。

图 1　miR-20a 在 NSCLC 组织及癌旁组织中的表达

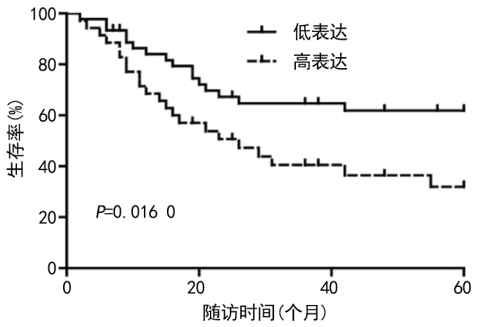
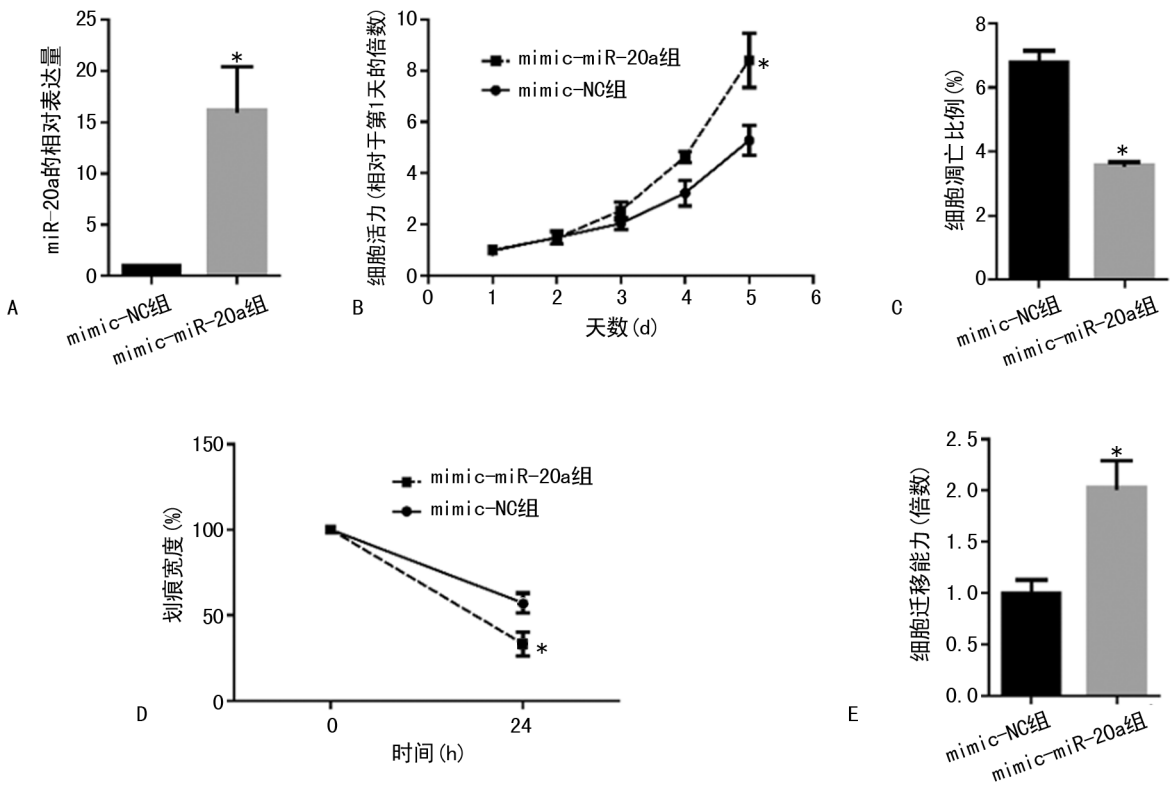


图 2　miR-20a 的表达水平与 NSCLC 患者生存率的相关性

2.4 血清肿瘤标志物以及 miR-20a 在各组的检出情况比较　NSCLC 组患者 CEA、NSE、CA125 以及 miR-20a 的阳性检出率明显高于良性肺病组;联合检测结果为阳性(上述指标任意一项水平超过其临界值)的患者在 NSCLC 组中所占的比例明显高于良性肺病组。见表 2。



注:A 为 miR-20a 在 A594 细胞中的过表达效率;B 为 miR-20a 对 A594 细胞增殖能力的调控作用;C 为 miR-20a 对 A594 细胞凋亡水平的调控作用;D 为 miR-20a 对 A594 细胞迁移能力的调控作用,以 0 h 作为参照;E 为 miR-20a 对细胞侵袭能力的调控作用;* $P<0.05$。

图 3　miR-20a 对 A594 细胞增殖、凋亡、迁移与侵袭的调控作用

表 1　两组血清肿瘤标志物及 miR-20a 的表达水平比较($\overline{x}\pm s$)

组别	n	CEA(ng/mL)	NSE(ng/mL)	CA125(U/mL)	miR-20a
NSCLC 组	112	5.84±2.76[a]	19.23±4.66[a]	45.81±10.36[a]	36.15±8.58[a]
良性肺病组	94	3.12±1.42	13.56±4.21	19.25±7.51	14.11±5.62

注:与良性肺病组比较,[a] $P<0.05$。

表 2　两组血清肿瘤标志物及 miR-20a 检出情况比较(n)

组别	n	CEA		NSE		CA125		miR-20a		联合检测	
		+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
NSCLC 组	112	52	60	54	58	36	76	65	57	82	30
良性肺病组	94	29	65	21	73	13	81	18	76	8	86

2.5　血清肿瘤标志物与 miR-20a 联合检测在 NSCLC 诊断中的价值　NSE 诊断 NSCLC 的灵敏度为 61.28%，特异度为 84.66%，明显高于其他血清肿瘤标志物；miR-20a 对 NSCLC 也有较高的灵敏度与特异度。CEA、NSE、CA125、miR-20a 联合检测对 NSCLC 的诊断效能远高于各肿瘤标志物单独检测，其灵敏度达 73.21%，特异度达 91.49%，见表 3。

表 3　各指标单独及联合检测的诊断效能(%)

项目	灵敏度	特异度
CEA	46.43	69.15
NSE	61.28	84.66
CA125	51.79	75.26
miR-20a	58.04	80.85
联合检测	73.21	91.49

3　讨　论

miRNA 是一类不能编码蛋白质、长度小于 25 个核苷酸的小 RNA，研究表明，miRNA 的异常表达与癌症的发生、发展有着紧密的联系[5]。本研究表明，miR-20a 高表达于 NSCLC 组织中，且过表达的 miR-20a 可显著促进 A594 细胞的增殖、侵袭与迁移。许荣誉等[6]研究表明，miR-20a 在 NSCLC 组患者血浆中的表达水平及阳性检出率明显高于良性肺病组患者，且 miR-20a 的表达水平与肿瘤的分化程度、临床分期以及淋巴结转移有着密切关系，与本研究结果基本一致。

鉴于 miR-20a 在 NSCLC 组织中的生物作用，笔者认为 miR-20a 还可以在 NSCLC 的诊断试验中起作用。本研究发现，miR-20a 在 NSCLC 组患者血浆中的表达水平明显高于良性肺病组患者，并且其灵敏度为 58.04%，特异度为 80.85%。因此，笔者认为 miR-20a 可以作为 NSCLC 诊断试验中的一个生物标志物。

此外，本研究还探讨了 CEA、NSE 和 CA125 在 NSCLC 诊断中的价值，结果显示，CEA 高表达于 NSCLC 患者血清，NSCLC 患者 CEA 阳性检出率明显高于肺部良性疾病患者，但是其对 NSCLC 的特异度和灵敏度较低。CEA 是一种由胃肠道分泌的糖蛋白，具有胚胎抗原特异性。早期的研究表明，血清中 CEA 的高表达与大肠癌的发病息息相关，因此可作为大肠癌的特异性标志物应用于临床诊断[7-8]。随着研究的深入，CEA 在胃癌、乳腺癌、胰腺癌、肺癌等恶性肿瘤中的异常表达逐渐被发现，因此 CEA 被当作肿瘤诊断标志物广泛应用于临床，并且许多研究报道指出，其在 NSCLC 的诊断中有重要意义[9-10]。

本研究中 NSCLC 患者血清 NSE 水平以及阳性检出率均明显高于肺部良性疾病患者，并且其特异度和灵敏度较高，分别为 84.56%、61.28%。NSE 特异性地存在于中枢及周围神经系统，由于 NSCLC 属于神经内分泌类肿瘤，因此 NSE 对 NSCLC 的诊断具有较高的特异度与灵敏度[11]。

相较于肺部良性疾病患者，NSCLC 患者血清 CA125 水平和阳性检出率明显升高，且 CA125 诊断 NSCLC 的灵敏度达 51.79%，特异度达 75.26%。CA125 是一种储存于细胞内的糖蛋白，正常情况下由于细胞间连接和基底膜的阻挡，CA125 无法进入血液循环，因此健康人血液中 CA125 水平极低。当组织出现癌性病变时，细胞之间的连接及基底膜遭到破坏，血液中的 CA125 水平会明显升高[12-14]。随着研究的深入，不少报道指出，其在肺癌患者血清中的阳性检出率偏高，且其诊断肺癌的灵敏度为 30%～60%，特异度为 34%～67%[15]，这与本研究结果基本一致。

综上所述，CEA、NSE、CA125 及 miR-20a 作为 NSCLC 的诊断标志物各有优点，但是单独使用时的特异度和灵敏度并不理想。本研究将 3 种血清肿瘤标志物与血浆 miR-20a 联用，发现联合检测对于诊断 NSCLC 的灵敏度和特异度均高于各指标单独检测，这提示 miR-20a、CEA、NSE 及 CA125 联合检测可能更具有诊断价值。

参考文献

[1] 刘华蓉，刘尚义. 化癥扶正汤治疗老年中晚期非小细胞肺癌的临床疗效及对生活质量的影响[J]. 中国老年学杂志，2016，36(24)：6167-6169.

[2] 卢兴兵，石佳，李勤，等. 6 种血清肿瘤标志物在肺癌辅助诊断中的应用评价[J]. 检验医学与临床，2018，15(18)：2768-2772.

[3] 王晓燕，吴丽丽，曹雪珍，等. 血清肿瘤标志物水平与晚期非小细胞肺癌患者靶向治疗有效性的相关分析[J]. 数理医药学杂志，2019，32(6)：827-828.

[4] 刘奕. 肿瘤标志物 CEA、NSE、SCC-Ag、CYFRA21-1 与 D-D 联合检测在非小细胞肺癌早期诊断中的应用[J]. 泰山医学院学报，2019，40(3)：203-206.　(下转第 213 页)

144-146.
[5] MUNOZ D F, XU C, PLEVRITIS S K. A molecular subtype-specific stochastic simulation model of US breast cancer incidence, survival, and mortality trends from 1975 to 2010[J]. Med Decis Making, 2018, 38(1 Suppl): S89-S98.
[6] 汪梅，郭宇飞，张娟. 早期乳腺癌手术方案、循证护理对策对血清 VCAM-1 水平和远期疗效的影响[J]. 中国老年学杂志，2018，38(12)：2859-2861.
[7] 张亚珍，何贵省，吴晓明，等. miR-103a-3p 在乳腺癌组织和血清中的表达及通过下调 PDK4 抑制乳腺癌细胞的有氧糖酵解及增殖[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2018，128(5)：56-62.
[8] SAMALA R K, CHAN H P, HADJIISKI L, et al. Breast cancer diagnosis in digital breast tomosynthesis: effects of training sample size on multi-stage transfer learning using deep neural nets[J]. IEEE Trans Med Imaging, 2019, 38(3): 686-696.
[9] 廖柳清，唐艳青，钟荣德，等. 血清 NGF、MT-1E 水平变化与乳腺癌病理学特征的关系[J]. 山东医药，2019，59(2)：76-78.
[10] 王一，廖宏伟，宋扬. 三阴型乳腺癌患者血清 VitD 水平与瘤组织 Ki-67、p53 蛋白表达变化及其相关性[J]. 山东医药，2018，58(11)：83-85.
[11] TSENG Y J, HUANG C E, WEN C N, et al. Predicting breast cancer metastasis by using serum biomarkers and clinicopathological data with machine learning technologies[J]. Int J Med Inform, 2019, 128: 79-86.
[12] 冯岚，景香香，陶阳，等. 超声弹性成像联合检测 CEA 与 CA15-3 在乳腺癌诊断中的价值分析[J]. 重庆医学，2018，47(26)：56-59.
[13] LEE S J, LI X, HUANG H, et al. The dana-farber CISNET model for breast cancer screening strategies: an update[J]. Med Decis Making, 2018, 38(1 Suppl): S44-S53.
[14] 舒耀，吴斌，宋俊. 乳腺癌患者血清中 miRNA-21、miRNA-210、miRNA-1246 的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志，2018，28(12)：42-48.
[15] GOUDARZI M, MAGHOOLI K. Extraction of fuzzy rules at different concept levels related to image features of mammography for diagnosis of breast cancer[J]. Biocyb Biomed Engin, 2018, 38(4): 1004-1014.
[16] 沈春云，秦信，汪珺莉，等. 自动乳腺全容积成像联合彩色多普勒超声对早期乳腺癌诊断价值研究[J]. 皖南医学院学报，2018，37(5)：85-88.
[17] 王刚，张国富. 术前磁共振 T2WI 瘤周水肿征象对浸润性乳腺癌早期复发的诊断价值[J]. 临床肿瘤学杂志，2019，24(1)：66-70.
[18] 沈坤炜，曹健，李宏为. 新一代信息技术与乳腺癌诊治模式的变革[J]. 外科理论与实践，2019，11(5)：377.
[19] 孙应实，曲玉虹. 重视乳腺影像学技术的发展，提升乳腺癌影像学诊断水平[J]. 中国医学影像技术，2019，35(4)：6-8.
[20] 孙亚冬，王家祥，崔树德. 基于 SELDI-TOF-MS 技术筛选乳腺癌血清蛋白标志物[J]. 中国实验诊断学，2019，19(9)：1512-1517.

（收稿日期：2020-05-12　修回日期：2020-09-10）

（上接第 209 页）

[5] 杜宁，王培礼，王猛，等. miR-367-3p 在非小细胞肺癌组织中的表达及对细胞功能的影响[J]. 现代肿瘤医学，2019，27(15)：2623-2627.
[6] 许荣誉，何荣琦. miR-20a 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 慢性病学杂志，2018，19(8)：1053-1055.
[7] CHEN F, WANG X Y, HAN X H, et al. Diagnostic value of Cyfra21-1, Scc and Cea for differentiation of early-stage NSCLC from benign lung disease[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7): 11295-11300.
[8] 曾聪，全国莉，王春莲. 联合检测 6 种血清肿瘤标志物在肺癌诊断中的意义[J]. 广东医学，2012，33(6)：808-810.
[9] 牛玉峰，施城东. 血清 CEA、CYFRA21-1 及 TK1 联合早期诊断非小细胞肺癌研究[J]. 河北医药，2019，41(10)：1546-1548.
[10] 赵宝祥，李华，张亚君，等. 血清癌胚抗原、神经元特异性烯醇化酶、microRNA-20a 和 microRNA-210 联合检测对早期小细胞肺癌的诊断价值[J]. 新乡医学院学报，2019，36(5)：452-454.
[11] 余建洪，朱晓丽. ROC 曲线评价 4 项指标对肺癌的鉴别诊断价值[J]. 检验医学与临床，2017，14(3)：361-363.
[12] 南永刚，王晓敏，陆建荣，等. CA125 在肿瘤患者细胞和血清中表达相关性的研究[J]. 现代肿瘤医学，2016，24(17)：2798-2800.
[13] 耿雪霏，邢汝东. CA125 作为肿瘤标志物的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志，2011，38(1)：106-108.
[14] 颜宇博，李丹. CA125 单项与多项肿瘤指标联合检测在卵巢癌诊断中的比较[J]. 中国实用医药，2016，11(11)：35-36.
[15] DAVID S, BORIS Z, BAR-GIL S A, et al. Diagnostic value of Cyfra 21-1, CEA, CA19-9, CA 15-3 and CA 125 assays in pleural effusions: analysis of 116 cases and review of the literature[J]. Oncologist, 2005, 10(7): 501-507.

（收稿日期：2020-05-20　修回日期：2020-08-19）