

非小细胞肺癌纤维支气管镜活检物中 microRNA21 的表达及意义*

曹 瑜¹, 朱晔涵² (1. 苏州市立医院呼吸科, 江苏苏州 215000; 2. 苏州大学附属第一医院呼吸科, 江苏苏州 215006)

【摘要】 目的 探讨非小细胞肺癌纤维支气管镜活检物中 microRNA21 的表达及意义。**方法** 选取 30 例非小细胞肺癌患者为病例组, 另外选取同期体检的年龄健康人群 30 例为对照组。实时荧光定量 PCR 检测 microRNA21 表达水平。**结果** 病例组 microRNA21 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.001$); 腺癌患者 microRNA21 表达水平显著高于鳞癌患者 ($P < 0.001$)。非小细胞肺癌组织中 microRNA21 表达水平与 TNM 分期有关 ($P = 0.004$), 与性别、年龄、分化程度和淋巴转移无关 ($P > 0.05$)。**结论** microRNA21 在非小细胞肺癌纤维支气管镜活检物中表达上调, 且与病理类型和临床分期相关, 可作为肺腺癌的特异性的肿瘤标志物。

【关键词】 非小细胞肺癌; 纤维支气管镜; microRNA21

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.08.007 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)08-1025-02

Expression and significance of microRNA21 in non-small cell lung cancer tissue sample by bronchoscopy biopsy* CAO Yu¹, ZHU Ye-han² (1. Department of Respiration, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, Jiangsu 215000, China; 2. Department of Respiration, First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression level and significance of microRNA21 in non small cell lung cancer tissue sample by bronchoscopy biopsy. **Methods** Thirty cases of non-small cell lung cancer were selected as the case group and contemporaneous 30 same age persons undergoing the health physical examination were chosen as the control group. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to determine the microRNA21 expression level. **Results** The microRNA21 expression level of the case group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), so did adenocarcinoma compared with squamous carcinoma ($P < 0.05$). The microRNA21 expression level was correlated with TNM stage in non small cell lung cancer tissue ($P < 0.05$), but not related with the gender, age, degree of differentiation and lymph node metastasis ($P > 0.05$). **Conclusion** MicroRNA21 is up-regulated in non-small cell lung cancer bronchoscopy biopsy, which is related with the clinical stage and pathological type, and could be regarded as a specific tumor marker of lung adenocarcinoma.

【Key words】 non-small cell lung cancer; bronchoscopy biopsy; microRNA21

肺癌是常见的恶性肿瘤之一, 病死率位居所有恶性肿瘤首位, 是威胁人类健康的恶性肿瘤之一^[1]。近年来, 全世界范围内, 肺癌的发病率和病死率均迅速上升^[2]。尽管对肺癌的综合治疗方案已经取得了显著的疗效, 但是肺癌的 5 年生存率依然很低, 尤其是非小细胞肺癌 (NSCLC)^[3]。统计显示, 肺癌在我国的发病率不断上升, 其病死率居恶性肿瘤之首。多年以来, 肺癌的 5 年生存率并没有明显改善, 其最主要原因是多数患者就诊时已处于较晚时期^[4]。早发现、早诊断、早治疗是降低肺癌病死率的根本措施。随着分子生物学的进展, 人们发现肺癌发生、发展涉及多个原癌基因、抑癌基因以及蛋白质的改变。利用分子生物学方法来进行肺癌研究现已成为肺癌早期诊断、判断预后、治疗及预防的重要手段和途径。纤维支气管镜是获取肺癌组织标本的重要技术手段, 本文探讨纤维支气管镜活检组织中 microRNA21 的表达水平及其对肺癌诊断的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取苏州市立医院呼吸科 2013 年 1 月至 2015 年 1 月收治的 30 例 NSCLC 患者为病例组, 其中男 18 例, 女 12 例, 年龄 56~82 岁, 平均年龄 (65.2 ± 10.4) 岁; 30 例患者中包含腺癌 13 例、鳞癌 17 例。病例组的纳入标准: 既往

未行抗癌治疗; 为肺部原发肿瘤, 均未行放化疗; 按 1997 年国际肺癌研究协会肺癌新 TNM 分期标准为 I~IV 期; 病历资料齐全; 知情同意。排除合并其他恶性肿瘤者; 严重感染及心肝肾肾功能不全者。选取同期体检的年龄健康人群 30 例作为对照组, 其中男 18 例, 女 12 例; 年龄 55~83 岁, 平均年龄 (66.1 ± 10.8) 岁。病例组和对照组在性别、年龄方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 纤维支气管镜活检 术前禁食 6 h, 术前 30 min 静脉滴注阿托品 0.02~0.03 mg/kg 减少气道分泌物, 咪达唑仑 0.2~0.5 mg/kg 镇静, 供氧, 监测氧合。患者取仰卧位, 根据年龄和术中情况选择纤维支气管镜。在异丙酚静脉复合麻醉下经鼻腔插入支气管镜, 根据胸片或 CT 结果对肿瘤部位仔细探查, 取部分组织立即放入含 RNA lysis 试剂的冻存管中, 然后 -80 °C 长期冻存备用^[5]。

1.2.2 microRNA21 表达水平检测 采用 miRNA Vana™ miRNA isolation kit (美国 ABI 公司) 提取总 RNA, 于分光光度仪上检测 RNA 浓度及纯度 (A260/A280 在 1.8~2.1 合格)。采用 TaqMan miRNA reverse transcription (RT) kit (美国 ABI

* 基金项目: 苏州市科教兴卫青年科技项目 (KJXW2012023)。

作者简介: 曹瑜, 女, 主治医师, 本科, 主要从事肺癌诊治研究。

公司)合成全长互补脱氧核糖核酸(cDNAs)。RT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)进行实时荧光定量 PCR, U6B 作为内参反应体系, 反应条件: 16 °C 30 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 4 °C 储存。microRNA21 的相对表达水平表示为 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = \text{肺癌 Ct}(\text{microRNA21} - \text{U6B}) - \text{对照组 Ct}(\text{microRNA21} - \text{U6B})$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行资料分析处理。microRNA21 的相对表达水平为计量资料, 采用均 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较为成组 *t* 检验。部分计数资料比较为常规 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 microRNA21 表达水平 病例组 microRNA21 表达水平 (8.23 ± 3.12) 显著高于对照组 (1.13 ± 0.35), 差异有统计学意义 ($t = 12.387, P < 0.001$); 腺癌患者 microRNA21 表达水平 (15.36 ± 5.65) 显著高于鳞癌患者 (3.05 ± 1.02), 差异有统计学意义 ($t = 7.760, P < 0.001$)。

2.2 microRNA21 表达水平与临床病理参数的关系 NSCLC 组织中 microRNA21 表达水平与 TNM 分期有关, 表现为 TNM 分期升高, microRNA21 表达水平上升 ($P = 0.004$)。此外, microRNA21 表达水平与性别、年龄、分化程度和淋巴转移无明显关联, 说明 microRNA21 表达水平并不随这些参数值的变化而出现明显升降 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 microRNA21 表达与临床病理参数的关系 ($\bar{x} \pm s$)

参数	n	microRNA21 水平	t	P
性别				
男	18	8.44 ± 3.55	0.450	0.656
女	12	7.91 ± 2.43		
年龄				
<60 岁	13	7.69 ± 3.16	0.831	0.413
≥60 岁	17	8.65 ± 3.12		
分化程度				
低	10	7.76 ± 3.09	0.582	0.565
高、中	20	8.47 ± 3.18		
淋巴转移				
是	18	8.38 ± 3.25	0.322	0.750
否	12	8.00 ± 3.04		
TNM 分期				
I 或 II	14	6.56 ± 2.00	3.134	0.004
III 或 IV	16	9.69 ± 3.23		

3 讨 论

microRNA 是一类高度保守的非编 RNA, 长度一般为 18~25 个核苷酸内源性单链 RNA, 由高等真核生物基因组编码, 通过调节基因的表达参与一系列生命过程^[6]。miRNA 基因以单拷贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中, 是具有调节其他基因表达的活性, 可调节生物的发育过程^[7]。microRNA 参与调节细胞周期、分化、发育、免疫调控及肿瘤发生等许多重要生物学过程, 尤其与肿瘤的发生密切相关。microRNA 与多种恶性肿瘤的发生、发展和预后相关, 如肝癌、肺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌和结直肠癌等。

本文探讨 microRNA21 在 NSCLC 纤维支气管镜活检物中的表达水平, 结果显示, 病例组 microRNA21 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.001$), 表明 microRNA21 在 NSCLC 组织中表达上调。microRNA21 是研究较为深入的 miRNAs 中的一

种。microRNA21 是一种具有抗凋亡作用, 扮演着癌基因的角色, 其在胃癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌均呈过表达的状态^[8]。既往研究表明, 通过采用反义寡核苷酸抑制 microRNA21, 含半胱氨酸的 caspase-3 及 caspase-7 表达水平上调, 因此, microRNA21 可能通过凋亡相关基因的表达从而与肿瘤的发生、发展相关。王佳佳等^[9]同样对 NSCLC 纤维支气管镜活检物中 microRNA21 的表达水平进行分析, 发现 microRNA21 在 NSCLC 患者纤维支气管镜活检组织中有较高的表达率, 认为 microRNA21 与 NSCLC 的发生、发展和转移有关, 与本文结果一致。Gao 等^[10]报道称 microRNA21 在 NSCLC 组织中的表达水平显著高于癌旁组织, 且其表达水平与 NSCLC 患者预后相关, 认为 microRNA21 可作为 NSCLC 患者预后的指标。

本组数据表明, NSCLC 组织中 microRNA21 表达水平与 TNM 分期有关 ($P < 0.004$), 腺癌患者 microRNA21 表达水平显著高于鳞癌患者 ($P < 0.001$), 与性别、年龄、分化程度和淋巴转移无关 ($P > 0.05$), 表明 microRNA21 可作为肺腺癌的特异性的肿瘤标志物, 对肺腺癌的诊断具有一定的应用价值, 且其可能与患者预后相关。由于本文并未进行长期的跟踪随访, 且样本数量有限, microRNA21 表达水平与预后的关系尚有待于进一步大样本长期跟踪随访的研究证实。microRNA2 与多种肿瘤的预后相关。Ribas 等^[11]报道称 microRNA21 在前列腺癌组织的表达水平显著高于正常组织, 且与预后相关。本文将纤维支气管镜与 microRNA21 定量检测联用, 纤维支气管镜具有镜体较柔软细小, 可前后弯曲, 可视范围大, 检查阳性率高, 适应证较广, 患儿痛苦减小, 并发症较少, 简单易操作等诸多优点^[12-14]。因此, 采用纤维支气管镜活检, 定量分析 microRNA21 表达水平, 对于 NSCLC 的鉴别、诊断和预后判断具有重要的临床意义。

综上所述, microRNA21 在 NSCLC 纤维支气管镜活检物中表达上调, 且与病理类型和临床分期相关, 可作为肺腺癌的特异性的肿瘤标志物。

参考文献

- [1] 李科, 洪志鹏, 李云霞, 等. 非小细胞肺癌组织 CD151 蛋白表达临床意义探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(1): 34-38.
- [2] 李科, 洪志鹏, 沈丽达, 等. CD151 和整合素 $\alpha 3\beta 1$ 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 中国全科医学, 2014, 17(5): 531-535.
- [3] 白晶, 钟小宁, 唐海娟, 等. 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 和细胞外信号调节激酶信号传导通路在非小细胞肺癌中的作用及其相关性研究[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(22): 1370-1375.
- [4] Ke AW, Shi GM, Zhou J, et al. Role of overexpression of CD151 and/or c-Met in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(2): 491-503.
- [5] 李劲松, 段宝珍, 胡文婷. 纤维支气管镜在小儿肺不张诊治中的应用价值[J]. 中国妇幼保健, 2011, 12(26): 1899-1900.
- [6] 占一姗, 陈幼祥. microRNA 在结直肠癌的研究进展[J]. 南昌大学学报, 2013, 53(5): 82-86.
- [7] 俞焜秦, 刘炳亚. miRNA 的生物学特性和功能[J]. 上海交通大学学报, 2007, 27(5): 621-623.
- [8] 王佳佳. microRNA-21、microRNA-205 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
- [9] 王佳佳, 黄建安, 穆传勇, 等. MicroRNA-(下转第 1029 页)

及降低费用。连续臂丛神经阻滞作为另一种术后镇痛方式,日益为人们所重视^[4]。国内外有学者研究表明,超声引导连续锁骨下臂丛神经阻滞用于成人或婴幼儿阻滞效果完善,气胸等并发症少,还有一优势是置管方便固定,不易脱管,术后镇痛效果佳^[5-7]。本研究采用平面内技术进针,在超声实时引导下使针尖尽量靠近目标神经注射局麻药并可观察药液扩散;在置管时可使导管尽量接近神经而获得良好的镇痛效果;也避免了针尖损伤神经或血管。超声定位保证了良好的镇痛效果和较少的不良反应,避免复合阿片类药物引起的恶心、呕吐等并发症,提高患者的舒适度。

罗哌卡因具有运动与感觉分离的特点,即在不影响运动的情况下阻滞感觉神经,使躯体不产生痛觉。在术后镇痛领域,有着独特的优势。有研究称 0.2% 罗哌卡因即可满足术后镇痛的需要,相对运动阻滞发生较少,可以有相对良好的肌力;对于术后需立即进行功能锻炼的患者,0.3% 罗哌卡因在 24 h 内的早期锻炼中能提供更完善的运动镇痛^[8]。本研究采用 0.2% 罗哌卡因进行连续臂丛神经阻滞作为术后镇痛,与自控静脉镇痛相比,在术后 12、24 h 静息 VAS 评分和术后 12、24、48 h 主动运动 VAS 评分均较低,说明连续臂丛神经阻滞的镇痛效果明显优于自控静脉镇痛,特别是在运动时的镇痛效果优势更为明显,有利于患者术后进行早期功能锻炼。考虑机制可能与直接阻断痛觉神经冲动的上传,改善痛觉过敏有关。这与苏建林等^[9]的研究结果相类似。

IL-6 和 IL-10 分别为促炎性和抗炎性细胞因子,机体处于创伤和炎症状态等可激发炎症反应。机体由于手术创伤、疼痛等伤害性刺激的过度应激,促炎性细胞因子大量释放,促/抗炎性细胞因子失衡。IL-6 介导机体防御机制和炎症反应,亦是导致术后免疫损伤的主要细胞因子;IL-10 主要通过抑制核因子(NF)- κ B 的活性来抑制促炎性细胞因子如 IL-6,发挥抑制性免疫调节作用。既往的研究表明,IL-6 的浓度与手术创伤刺激程度呈正相关^[10]。而本研究发现,在术后 12、24 h,治疗组 IL-6 的浓度较对照组降低,提示 0.2% 罗哌卡因连续臂丛神经阻滞术后镇痛,能有效缓解手术创伤刺激引起的伤害性疼痛传导,减轻了急性炎症反应程度。可能是由于局麻药能抑制 PGE2 释放和 PLA2 的活性,抑制前列腺素的生成,而罗哌卡因亦能减少 PGE2 释放,减轻炎症反应有关^[11-12]。

综上所述,采用超声引导下喙突旁入路连续锁骨下臂丛神经阻滞术后镇痛与舒芬太尼自控静脉镇痛相比,对上肢骨折手术患者术后镇痛的效果更好,恶心、呕吐发生率更低。能下调炎症因子 IL-6 水平和促进 IL-10 释放,预防因炎症反应引起的并发症具有重要意义,是一种安全、有效的术后镇痛方法。

参考文献

[1] Ivani G, Mossetti V. Continuous central and perineural infusions for postoperative pain control in children[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2010, 23(5): 637-642.

[2] 张骐, 陈长宝, 王爱忠, 等. 超声引导下连续锁骨上臂丛阻滞用于肘部手术后镇痛的临床效果[J]. *上海医学*, 2011, 34(6): 421-423.

[3] 余倩, 叶茂. 连续臂丛神经阻滞在儿童术后镇痛的应用进展[J]. *国际麻醉与复苏杂志*, 2014, 35(6): 555-571.

[4] Ganesh A, Rose JR, Wells L, et al. Continuous peripheral nerve blockade for inpatient and outpatient postoperative analgesia in children[J]. *Anesth Analg*, 2007, 105(5): 1234-1242.

[5] 田毅, 柳培雨. 超声引导下臂丛神经阻滞在全麻患者中的应用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2009, 25(3): 230-232.

[6] Ootaki C, Hayashi H, Amano M. Ultrasound-guided infraclavicular brachial plexus block: an alternative technique to anatomical landmark-guided approaches [J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2000, 25(6): 600-604.

[7] Ponde VC. Continuous Infraclavicular brachial plexus block: A modified technique to better secure catheter position in infants and child[J]. *Anesth Analg*, 2008, 106(1): 94-96.

[8] 刘莹, 袁姝, 周雁, 等. 连续锁骨下臂丛神经阻滞用不同浓度罗哌卡因于肘关节松解手术后镇痛效果的差异[J]. *中国医刊*, 2014, 49(10): 77-80.

[9] 苏建林, 唐建东, 阳子华, 等. 上肢骨科手术患者连续肌间沟术后镇痛的评价[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2014, 20(5): 318-321.

[10] 余锦芬, 余凌, 叶小丰, 等. 舒芬太尼术后镇痛对新生儿外周血白细胞介素-6 和白细胞介素-10 的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2010, 26(6): 485-487.

[11] 张蔚青, 万政佐. 持续切口灌注罗哌卡因术后镇痛对局部炎症反应的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(4): 430-432.

[12] Beloeil H, Gentili M, Benhamou D, et al. The effect of a peripheral block on inflammation-induced prostaglandin E2 and cyclooxygenase expression in rats [J]. *Anesth Analg*, 2009, 109(3): 943-950.

(收稿日期: 2015-10-11 修回日期: 2015-12-15)

(上接第 1026 页)

21 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. *江苏医药*, 2012, 38(13): 1573-1575.

[10] Gao W, Yu Y, Cao H, et al. Deregulated expression of miRNA-21, miRNA-143 and miRNA-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(6): 399-408.

[11] Ribas J, M X, Haffner M, et al. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(18): 7165-7169.

[12] 杨泽玉. 纤维支气管镜在小儿呼吸道疾病诊治中的应用

研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2007: 22.

[13] Yang M, Shen H, Qiu C, et al. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer[J]. *Euro J Cancer*, 2013, 49(3): 604-615.

[14] Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, et al. Serum miRNA-21: Elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy [J]. *Prostate*, 2011, 71(3): 326-331.

(收稿日期: 2015-10-03 修回日期: 2015-12-05)