

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.005

肺癌相关肿瘤标记物及 miRNAs 在肺癌患者血清中的表达及意义^{*}

叶火林,高淑平,刘汉起,毕向军,孙成晖,谭艳玲

(广东省阳春市人民医院检验科 5236000)

摘要:**目的** 探讨肺癌相关肿瘤标记物及 miRNAs 在肺癌患者血清中的表达产物进行联合检测的意义。**方法** 选择 2016 年 4 月至 2017 年 8 月该院呼吸内科收治的患者与常规体检受试者 105 例进行回顾性分析。根据患者身体状况分为 3 组,对照组为肺部良性病变患者共 35 例,观察组患者为肺癌患者 35 例,健康组为在该院进行常规体检的健康受试者共 35 例。血清肿瘤标记物(sTM)选择细胞角蛋白 21-1 片段(CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、鳞状细胞癌相关抗原(SCC-Ag)、糖类抗原 125(CA125)、糖类抗原 153(CA153)进行检测。miRNAs 选择 miR-1、Let-7 指标进行检测。**结果** 3 组受试者 sTM 与 miRNAs 指标均有差异,且除 miR-1 与 Let-7 肺癌患者测得值明显低于其他组外,肺癌患者各指标测得值均明显高于其他两组($P<0.05$)。各 sTM 指标、miRNAs 指标单独检测与联合检测曲线下面积(AUC)值为 0.828~0.953,联合诊断 AUC 值最大($P<0.05$)。**结论** sTM 与相关 miRNA 的检测有助于发现早期肿瘤,提高肿瘤诊断的正确性和特异性,为临床早期诊断提供更充分的依据,为肺癌的治疗研究提供新的诊疗策略。

关键词:肺癌; 肿瘤标记物; miRNAs; 联合检测

中图法分类号:R734.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)18-2701-04

Expression and significance of lung cancer associated tumor markers and miRNAs in serum of patients with lung cancer^{*}

YE Huolin,GAO Shuping,LIU Hanqi,BI Xiangjun,SUN Chenghui,TAN Yanling

(Department of Clinical Laboratory,Yangchun People's Hospital,Yangchun,Guangdong 523600,China)

Abstract: Objective To investigate the significance of the expression of lung cancer-associated tumor markers and miRNAs in serum of patients with lung cancer. **Methods** Data of 105 cases of routine physical examination patients in respiratory medicine department from April 2016 to August 2017 in our hospital were retrospectively analyzed. According to the physical condition of the patients were divided into three groups, the control group of patients with benign lung lesions in 35 cases, the observation group of patients with fiberoptic bronchoscopic biopsy and pathological biopsy confirmed 35 cases of lung cancer patients, healthy group of subjects. A total of 35 healthy subjects were enrolled in our hospital. Cytokeratin 21-1 fragment (CYFRA21-1), neuron-specific enolase (NSE), squamous cell carcinoma-associated antigen (SCC-Ag), carbohydrate antigen 125 (CA125), carbohydrate antigen 153 (CA153) were chosen as the sTM indicator. miR-1, Let-7 were selected as miRNAs. **Results** The scores of sTM and miRNAs in the three groups were significantly different, and the measured values of the lung cancer patients were significantly higher than those of the other groups, in addition to the miR-1 and Let-7 of lung cancer patients significantly lower than other groups ($P<0.05$). The AUC value of each sTM index and miRNAs was between 0.828 and 0.953, and the AUC value was the highest in joint detection ($P<0.05$). **Conclusion** The combination of tumor markers and related miRNA detection can help to detect early tumors, improve the correctness and specificity of tumor diagnosis, provide a more adequate basis for clinical early diagnosis, and provide new diagnosis and treatment strategies for lung cancer treatment research.

Key words: lung cancer; tumor markers; miRNAs; combined detection

肺癌是病死率最高的恶性肿瘤,国家癌症中心统计数据显示,我国肺癌患者 5 年生存率仅为 16.1%,大部分的患者属于非小细胞肺癌,非小细胞肺癌主要

分为腺癌和鳞癌两大类^[1]。虽然目前对于肺癌的治疗技术已经有了较大的发展,但肺癌患者的病死率仍然较高,据不完全统计肺癌早期患者 5 年生存率达到

^{*} 基金项目:广东省阳江市科技计划项目(社发【2016】45)。

作者简介:叶火林,男,副主任技师,主要从事生化检验和临床医学检验方面的研究。

45%~65%，而晚期肺癌患者 5 年生存率为 14%，由此可见肺癌早发现和早治疗能够明显降低肺癌患者的病死率^[2]。因肺癌早期症状并不明显即使有症状也不典型，影像学检查发现肺部结节的患者有 50%的均为良性，且针对早期病变不明显者也不易发现，所以对提高肺癌早期诊断率并没有太大的帮助，若果进行超声内镜、纤维支气管镜或肺穿刺活检等检查方式则对患者创伤较大且只是针对已经有影像学改变的患者，部分患者不愿意接受^[3]。血清肿瘤标记物(sTM)检测简便快捷，且只进行抽血检查，对患者创伤小，目前已被广泛地运用于肺癌的辅助诊断、疗效评价及预后判断^[4]。miRNAs 是一种高度保守的非编码调控短链 RNA，长度为 20~24 nt，主要与发育、造血、器官的形成、凋亡和癌症的发生、发展有关，最新的研究发现，血清/血浆中存在有大量稳定的 miRNAs 可为肺癌的诊断提供参考^[5]。目前对于血清肿瘤标记物(sTM)与 miRNAs 的检测均以单独检测的形式进行，联合检测方面并未见有文献报道，本文将 sTM 与 miRNAs 进行联合检测旨在进一步提高肺癌的早期诊断率提供参考，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 4 月至 2017 年 8 月本院呼吸内科收治的患者与常规体检受试者 105 例进行回顾性分析。根据患者身体状况分为 3 组，对照组为肺部良性病变患者共 35 例，其中男 17 例，女 18 例；肺结核瘤 5 例，肺炎 9 例，支气管囊肿 4 例，错构瘤 8 例，支气管扩张 9 例。观察组患者为经纤维支气管镜取样活检和病理切片检验确诊为肺癌的患者 35 例，其中男 20 例，女 15 例；鳞癌 13 例，腺癌 17 例，小细胞肺癌 5 例；TNM I 期 5 例，II 12 例，III 13 例，IV 5 例。健康组为本院进行常规体检的健康受试者共 35 例，经影像学等检查未发现癌症，且无癌症家族史。

1.2 仪器与试剂 由美国 R&D Systems 公司生产的 Luminex 200 流式荧光检测仪，在检测前先用仪器专用配套的校准品和质控品进行校准，在进行校准质控后方可进行标本的检测。sTM 指标选择细胞角蛋白 21-1 片段(CYFRA21-1)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、鳞状细胞癌相关抗原(SCC-Ag)、糖类抗原 125(CA125)、糖类抗原 153(CA153)的检测试剂均购于 R&D Systems 公司。QPCR 分析仪由美国赛默飞世尔公司生产，UVmini-1240 型紫外-可见分光光度计由日本岛津公司生产，miRcute miRNA 提取分离试剂盒与荧光定量 PCR 检测试剂盒均购自于美国赛

默飞世尔公司，miR-1、Let-7 及表达内参 miR-22 引物由广州锐博生物科技有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 sTM 检测方法 取患者清晨静脉血 5 mL，在 3 000 r/min 下进行离心 10 min，取血清置-20℃冰箱中保存备用，当天完成检测。采用电化学发光法检测 CYFRA21-1、NSE、SCC-Ag、CA125、CA153，具体的检测参数均按说明书要求进行设置。阳性参考值采用 R&D Systems 公司推荐标准：CYFRA21-1>3.3 ng/L、NSE>16.3 ng/L、SCC-Ag>1.5 ng/L、CA125>35 U/mL、CA153>40 U/mL。

1.3.2 miRNAs 检测方法 (1)将冷冻保存的血清标本迅速地进行复温处理，复温完成后取 400 μL 融解血清进行 RNA 样本的制备，具体操作按 miRcute miRNA 试剂盒的要求进行，RNA 最终用焦碳酸二乙酯(DEPC)水融解，在紫外-可见分光光度计下进行 RNA 提取纯度检测，纯度达到吸光度(OD)_{260/280}>1.8方可进行下步操作。(2)对目标基因进行 PCR 扩增，采用 20 μL 反应体系 dNTPmix(100 mmol/L)0.2 μL，Multiscribe 逆转录酶(50 U/μL)1.0 μL，10×逆转录缓冲液 2 μL，RNA 酶抑制剂(20 U/μL)1 μL，去核酸酶水 9.8 L，混合逆转录物 1 μL 引物，RNA5 μL。具体操作按 Takara 公司试剂盒要求进行，混匀后离心在冰上放置。RT-PCR 反应条件：16℃，5 min；42℃，30 min；85℃，5 min；4℃保存。(3)以 2×SYBR Green 荧光定量预混合液 10 μL，PCR 扩增产物(以 1：20 进行稀释)2 μL，去核酸酶水 7.0 μL，引物 1 μL。QPCR 分析仪进行实时荧光定量 PCR 检测。反应参数：95℃，1 min；95℃，15 s；60℃，45 s 共 40 个循环。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计学软件进行数据分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，3 组之间比较采用 F 方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。诊断效能比较采用受试者工作特征曲线(ROC)下面积(AUC)进行分析，根据单独检测与联合检测的敏感度进行计算和比较。

2 结果

2.1 3 组受试者 sTM 与 miRNAs 测量值对比 3 组受试者 sTM 与 miRNAs 比较差异均有统计学意义($P<0.05$)，且除 miR-1 与 Let-7 肺癌患者测得值明显低于其他组外，肺癌患者各指标测得值均明显高于其他两组($P<0.05$)，见表 1、2。

表 1 3 组受试者 sTM 指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CYFRA21-1(ng/L)	NSE(ng/L)	SCC-Ag(ng/L)	CA125(U/mL)	CA153(U/mL)
对照组	35	2.45±1.91	10.81±3.94	2.11±0.81	16.13±13.21	15.31±10.92
观察组	35	2.61±2.52	12.41±6.92	2.45±1.23	20.54±15.72	19.83±16.20

续表 1 3 组受试者 sTM 指标均值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CYFRA21-1(ng/L)	NSE(ng/L)	SCC-Ag(ng/L)	CA125(U/mL)	CA153(U/mL)
健康组	35	29.63±17.29	46.15±20.91	12.32±4.26	119.66±54.71	120.81±53.14
F		7.901	6.925	8.107	10.427	13.614
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 3 组受试者 miRNAs 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-1	Let-7
对照组	35	3.05±0.42	0.78±0.19
观察组	35	1.06±0.63	0.34±0.33
健康组	35	3.10±0.83	0.81±0.29
F		7.901	6.925
P		<0.05	<0.05

2.2 3 组受试者 sTM 指标、miRNAs 指标单独检测与联合检测对肺癌诊断效能对比 各 sTM 指标、miRNAs 指标单独检测与联合检测 AUC 值为 0.828~0.953,联合诊断 AUC 值最大($P<0.05$),见表 3、图 1。

表 3 3 组受试者 sTM 指标、miRNAs 指标与联合检测对肺癌诊断效能对比

指标	AUC	标准误	P	95%CI
CYFRA21-1	0.915	0.048	<0.05	0.805~0.964
NSE	0.830	0.069	0.002	0.695~0.995
SCC-Ag	0.917	0.047	0.001	0.809~0.989
CA125	0.828	0.085	<0.05	0.662~0.991
CA153	0.888	0.055	0.002	0.779~0.955
miR-1	0.851	0.085	<0.05	0.654~0.988
Let-7	0.913	0.052	0.001	0.761~0.972
联合检测	0.953	0.034	<0.05	0.859~0.997

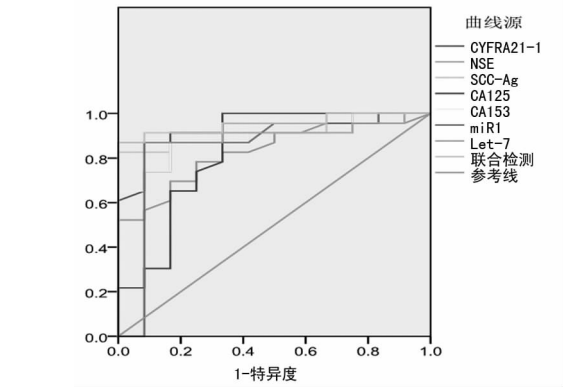


图 1 3 组受试者 sTM 指标、miRNAs 指标与联合检测对肺癌诊断效能 ROC 曲线

3 讨论

肺癌是临床上常见的恶性肿瘤,其病死率极高,提高治疗成功率的关键是早诊断与早治疗,目前最为可靠的肺癌诊断方法为纤维支气管镜、纵隔镜或胸腔

穿刺等方法取样活检,但活检对患者创伤较大,耗时长、费用高,且一般用于怀疑恶性肿瘤者,对于早期癌症筛查和连续性监测则无能为力^[6-8]。sTM 是指特征性存在于恶性肿瘤细胞或因恶性肿瘤细胞异常增殖、宿主对肿瘤刺激反应等产生,并能反映肿瘤的发生,用于监测肿瘤状态的一类物质,在肿瘤普查、诊断及预后预测等方面扮演着越来越重要的角色,其检测费用较低、方便快捷^[9]。sTM 的检测方法主要有放射免疫分析、酶联免疫法、化学发光免疫法、电化学发光免疫分析等,但这些所得到的结果一般都以单指标的形式进行检测分析,而单一指标检测特异性不强,对于早期癌症检出率不高,容易出现漏诊而延误患者的病情。大部分癌症患者体内可能存在多种的 sTM,而一种 sTM 也可能存在与多种肿瘤中,因此单指标检测仍无法满足对癌症的诊断要求。miRNA 属于小分子 RNA 的一种,其核苷酸片段只有 21~24 个,主要起到调控蛋白质合成的作用,与细胞的发育、分化及凋亡均有密切关系,逐渐被应用于癌症的诊断。为提高肺癌的早期检出率,临床上常对 sTM 进行联合检测,而对于 sTM 与 miRNAs 联合检测的文献报道并不多,本文对 sTM 与 miRNAs 进行联合检测旨在为肺癌的诊断提供参考。

3 组受试者 sTM 与 miRNAs 指标均有差异,且除 miR-1 与 Let-7 肺癌患者测得值明显低于其他组外,肺癌患者各指标测得值均明显高于其他两组($P<0.05$)。本文结果显示肺癌患者体内 miR-1 水平明显低于肺部良性病变患者与健康受试者,与文献^[11]报道称 miR-1 在肺癌原发病灶阳性率明显低于癌旁和正常组织的结果相似,miR-1 是近年来新被发现的肿瘤抑制因子,研究显示 miR-1 在肺癌细胞中表达较低,转染 miR-1 后肺癌细胞的生长会被明显抑制,提示 miR-1 与肺癌的发生与疾病进展呈负相关。Let-7 是最早被发现与癌症相关联的 miRNA,有研究者曾将稳定表达 Let-7 的肺癌细胞注入大鼠体内,发现与未注射的大鼠相比,肿瘤的生长明显得到了抑制,从该实验的数据还发现 Let-7 在肿瘤组织中的表达量与原发肿瘤大小与淋巴结转移数量呈负相关,本文单独测试结果与该结论相一致^[12]。CYFRA21-1 是一种酸性蛋白质,主要存在于肺癌、食管癌等上皮起源的肿瘤细胞内,当肿瘤细胞溶解或坏死时可将 CYFRA21-1 释放到血液中,研究发现 CYFRA21-1 在鳞癌的表达水平明显高于腺癌和小细胞肺癌所以被认为是肺

鳞癌的最佳诊断标志物之一,同时 CYFRA21-1 还可敏感地反映肿瘤体积大小的变化,可作为进展期肺癌患者化疗疗效评价指标以减少对患者进行影像学检查^[13]。NSE 主要在神经分泌细胞与神经源肿瘤细胞中,而肺癌中,小细胞肺癌属于神经源肿瘤中的一种,因此本文选择 NSE 作为诊断指标之一,研究数据显示 NSE 与临床分期的关系并不明显,但与疾病的预后有着较为密切的关系^[14]。SCC-Ag 主要存在与宫颈癌、肺癌、食管癌等多种鳞状细胞癌中,具有较高的特异性,有研究者曾将 SCC-Ag 与 CYFRA21-1 联合检测,其对鳞癌型肺癌患者的阳性检出率达到 100% 阳性,有利于提高肺癌中鳞癌的诊断^[15]。CA125、CA153 均是由腺体分泌的上皮黏蛋白,在乳腺癌、肺癌、卵巢癌等多种腺癌中均有较高的表达,目前作为上皮性卵巢癌与子宫内膜癌的标志物,虽然不是诊断肺癌的特异性指标,但临床数据显示肺癌患者体内 CA153、CA125 水平也高于健康人群,可能是因为 CA153、CA125 属于肿瘤相关抗原在肺癌组织内自行合成与分泌,同时基膜被病灶侵袭下阻挡作用消失导致抗原进入血液,对不同类型肺癌患者检测显示腺癌患者 CA153、CA125 值均明显高于鳞癌与小细胞肺癌的患者,所以该指标对于腺癌类肺癌的诊断有较高的参考价值^[16]。

各 sTM 指标、miRNAs 指标单独检测与联合检测 AUC 值为 0.828~0.953,联合诊断 AUC 值最大 ($P<0.05$)。各指标 AUC 值均大于 0.7,说明本文所选择的各指标对肺癌诊断均有较大的诊断意义,而将 sTM 与 miRNAs 联合检测的 AUC 面积最大,说明联合检测对于肺癌的诊断效能最高。这可能与单独检测时各指标所针对的不同类型的肺癌特异性不同,单一指标检测的敏感性和特异性不足,导致诊断率不高,将 sTM 指标与 miRNAs 指标进行联合检测可弥补单项指标检测的不足,提高诊断效能。本文中单一指标检测对于肺癌的诊断虽均具有较大的意义,但每个指标所针对的肺癌类型敏感性不同,难免会出现漏诊而延误患者的病情,联合检测可对此进行补充。

综上所述,结合 sTM 与相关 miRNA 的检测有助于发现早期肿瘤,提高肿瘤诊断的正确性和特异性,为临床早期诊断提供更充分的依据,为肺癌的治疗研究提供新的诊疗策略。

参考文献

- [1] 林永志,梁贤明. 4 种肿瘤标志物在肺癌中的诊断价值[J]. 检验医学与临床,2015,12(24):3724-3726.
- [2] RAZI S S,JOHN M M,SAINATHAN S A. Sublobar resection is equivalent to lobectomy for T1a non-small cell lung cancer in the elderly: a surveillance, epidemiology, and end results database analysis[J]. J Surg Res, 2016, 200(2):683-689.
- [3] ADIGUZEL Y,KULAH H. Breath sensors for lung cancer diagnosis[J]. Biosens Bioelectron, 2015, 65(11):121-138.
- [4] MOLINA R,MARRADES R,REGUART N, et al. P1. 03; utility of a combined panel of six serum tumor markers for lung cancer: track: prevention, early detection, epidemiology and tobacco control[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(10):181-182.
- [5] MUNAGALA R,AQIL F,GUPTA R C. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(8):10703-10714.
- [6] 赵晓群,封敏,黄艳春. 肺癌标志物对汉族和维吾尔族肺癌患者的诊断价值比较[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(1):37-39.
- [7] 雷鸣,胡黎娅,王自米,等. 血小板活化标志物 CD62P、CD63 的表达与血小板参数对非小细胞肺癌患者的意义[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(10):1319-1321.
- [8] KIM H S,LEE K S,OHNO Y, et al. PET/CT versus MRI for diagnosis, staging, and follow-up of lung cancer[J]. J Magn Reson Imag, 2015, 42(2):247-260.
- [9] BARAK V,MEIROVITZ A,LEIBOVICI V, et al. The diagnostic and prognostic value of tumor markers (CEA, SCC, CYFRA 21-1, TPS) in head and neck cancer patients[J]. Anticancer Res, 2015, 35(10):5519-5524.
- [10] MCIVER S C,ROMAN S D,NIXON B, et al. miRNA and mammalian male germ cells[J]. Hum Reprod Update, 2012, 18(1):44-59.
- [11] HAN C,ZHOU Y B,AN Q, et al. MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting met[J]. Tumor Biology, 2015, 36(9):6715-6723.
- [12] STAHLHUT C,SLACK F J. Combinatorial action of MicroRNAs let-7 and miR-34 effectively synergizes with erlotinib to suppress non-small cell lung cancer cell proliferation[J]. Cell Cycle, 2015, 14(13):2171-2180.
- [13] ZHOU C C,CHEN Z L,DONG J S, et al. Combination of serum miRNAs with Cyfra21-1 for the diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. Cancer Lett, 2015, 367(2):138-146.
- [14] KUMARAKULASINGHE N B,VAN ZANWIJK N, SOO R A. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Respirology, 2015, 20(3):370-378.
- [15] YAMADA T,TERAZAKI Y,SAKAMOTO S, et al. Feasibility study of personalized peptide vaccination for advanced non-small cell lung cancer patients who failed two or more treatment regimens[J]. Int J Oncol, 2015, 46(1):55-62.
- [16] YING L,WU J,ZHANG D, et al. Preoperative serum CA125 is an Independent predictor for prognosis in operable patients with non-small cell lung cancer[J]. Neoplasma, 2015, 62(4):602-609.