

- fects on blood pressure variability: which method and which index [J]. Journal of Hypertension, 2014, 32(6): 1197.
- [24] FULLER G, HASLER R M, MEALING N, et al. The association between admission systolic blood pressure and mortality in significant traumatic brain injury: a multi-centre cohort study [J]. Injury - international Journal of the Care of the Injured, 2014, 45(3): 612-617.
- [25] SPAITE DW, HU C, BOBROW BJ, et al. Mortality and prehospital blood pressure in patients with major traumatic brain injury [J]. JAMA Surgery, 2017, 152(4): 360-368.
- (收稿日期: 2018-04-29, 修回日期: 2018-11-08)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.01.010

◇ 脑心血管疾病 ◇

微 RNA-375 对非小细胞肺癌脑转移的诊断价值

王大鹏, 夏庆欣

作者单位: 郑州大学附属肿瘤医院病理科, 河南 郑州 450000

通信作者: 夏庆欣, 女, 主任医师, 研究方向为肿瘤病理诊断, E-mail: 280687264@qq.com

摘要:目的 分析微RNA(miR)-375作为血清标志物诊断非小细胞肺癌(NSCLC)病人发生脑转移的临床价值。方法 选取2013年2月至2015年2月郑州大学附属肿瘤医院收治的185例初诊NSCLC病人为研究对象,其中合并脑转移病人78例纳入转移组,未发生脑转移病人107例纳入未转移组,另选择80例同期健康体检者为对照组,采用实时荧光定量PCR检测受试者血清miR-375表达水平,分析其表达水平对NSCLC病人发生脑转移的诊断价值及与临床病理特征、预后的关系。结果 转移组(0.32±0.07)和未转移组(0.73±0.18)血清miR-375表达水平均显著低于对照组(1.15±0.33)($P < 0.05$),转移组血清miR-375表达水平(0.32±0.07)显著低于未转移组(0.73±0.18)($P < 0.05$);NSCLC病人血清miR-375表达水平与临床分期、淋巴结转移显著相关($P < 0.05$);ROC曲线分析显示,血清miR-375表达水平诊断NSCLC病人发生脑转移的曲线下面积(AUC)为0.975,灵敏度、特异度、准确率、阳性预测值、阴性预测值分别为89.74%、94.39%、92.43%、92.11%、92.66%;多因素Cox回归分析显示,临床分期、脑转移、血清miR-375表达水平是影响NSCLC病人预后的独立危险因素($P < 0.05$),其他因素不是影响NSCLC病人预后的重要因素($P > 0.05$)。结论 血清miR-375表达水平下调与NSCLC病人发生脑转移有关,可能是诊断NSCLC脑转移及NSCLC病人预后判断的潜在生物标志物。

关键词: 癌,非小细胞肺/诊断; 肿瘤转移; 肿瘤标记,生物学; 预后; 微RNA-375

Diagnostic value of micro-RNA-375 in brain metastases of non-small cell lung cancer

WANG Dapeng, XIA Qingxin

Author Affiliation: Department of Pathology, Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China

Abstract: Objective To analyze the clinical value of micro-RNA (miR)-375 as serum marker in the diagnosis of brain metastases in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A total of 185 newly-diagnosed NSCLC patients admitted to Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University from February 2013 to February 2015 were selected for the study. Among them, 78 patients with brain metastases were included in metastasis group, and 107 patients without brain metastases were included in non-metastasis group, and another 80 healthy examiners at the same period were set as control group. The expression level of serum miR-375 was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The diagnostic value of miR-375 expression level on brain metastases in patients with NSCLC and its relationship with clinicopathological features and prognosis were analyzed. **Results** The expression level of serum miR-375 in metastasis group and non-metastasis group was significantly lower than that in control group [(0.32±0.07) vs. (0.73±0.18) vs. (1.15±0.33)] ($P < 0.05$), and the expression level of serum miR-375 in metastasis group was significantly lower than that in non-metastasis group ($P < 0.05$). The expression level of serum miR-375 in patients with NSCLC was significantly correlated with clinical stages and lymph node metastasis ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC) of serum miR-375 expression level for brain metastases in patients with NSCLC was 0.975, and the sensitivity, specificity, accuracy rate, positive predictive value and negative predictive value were 89.74%, 94.39%, 92.43%, 92.11% and 92.66%, respectively. Multivariate Cox regression analysis showed that clinical stages, brain metastases and serum miR-375 expres-

sion level were independent risk factors for the prognosis of patients with NSCLC ($P < 0.05$), and other factors were not important factors affecting the prognosis of patients with NSCLC ($P > 0.05$). **Conclusion** The down-regulation of serum miR-375 expression level is associated with brain metastases in patients with NSCLC, and it may be a potential biomarker for the diagnosis of NSCLC brain metastases and judgement of prognosis in patients with NSCLC.

Key words: Carcinoma, non-small cell lung/diagnosis; Neoplasm metastasis; Tumor markers, biological; Prognosis; Micro-RNA-375

肺癌居全球范围内癌症发病率和死亡率的首位,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占80%~85%。我国近年来肺癌的发病率和死亡率明显升高^[1]。肺组织淋巴和血供非常丰富,癌细胞极容易经邻近的淋巴管或血管转移至远处器官,肺血管和椎静脉间常有吻合支,因而更容易转移至脑部^[2]。据报道,NSCLC病人脑转移的发生率约20%~40%,其中同时性脑转移占10%~30%,即病人在初次确诊时已经出现脑转移,异时性脑转移占70%~90%,即在治疗后和随访过程中发生脑转移^[3]。miRNA(miR)是真核生物体内的一类非编码小RNA分子,具有良好的稳定性,广泛参与肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡等生理过程,miR已逐渐被用于表征肿瘤,miR的调节失调与多种癌症的发生、发展有关,但miR-375在脑转移中的作用是一个全新的研究领域^[4]。本研究采用实时荧光定量PCR检测受试者血清miR-375表达水平,并探讨其在NSCLC脑转移的诊断和预后评估中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2013年2月至2015年2月郑州大学附属肿瘤医院收治的185例初诊NSCLC病人为研究对象,纳入标准:①符合NSCLC的诊断标准^[5];②经细胞学或病理学确诊为NSCLC;③初次确诊;④预计生存时间超过3个月;⑤入院前未接受过抗肿瘤治疗。排除标准:①合并其他器官功能障碍;②合并其他恶性肿瘤史;③先前有或继发性恶性肿瘤;④曾接受过免疫治疗或放化疗。其中发生脑转移病人78例纳入转移组,年龄范围为30~78岁,年龄(58.63 ± 12.15)岁;男性53例,女性25例;病理类型:腺癌50例,鳞癌28例;临床分期:Ⅳ期78例;淋巴结转移:29例N0,14例N1~2,35例N3。未发生脑转移病人107例纳入未转移组,年龄范围为30~80岁,年龄(59.24 ± 12.33)岁;男性71例,女性36例;病理类型:腺癌69例,鳞癌38例;临床分期:Ⅰ期13例,Ⅱ期14例,Ⅲ46期例,Ⅳ期34例;淋巴结转移:16例N0,35例N1~2,56例N3。另选择80同期健康体检者为对照组,年龄范围为31~80岁,年龄(59.29 ± 12.37)岁。三组年龄、性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究获得病人及家属知情同意,且符

合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 采集受试者空腹静脉血5 mL,4℃下3 000 r/min离心15 min,吸取上清液至2 mL EP管中,于-80℃冰箱中保存。

1.2.2 血清miR-375的检测 (1)血清总RNA提取:吸取200 μL血清,按照mir Vana™ PARIS试剂盒(Ambion,美国)说明书操作完成总RNA提取。(2)RT反应合成cDNA:吸取100 ng RNA,按照miRNA逆转录试剂盒(Thermo Fisher公司)操作依次加入5X Reaction Buffer(4 μL)、RiboLock RNase Inhibitor(20 U/μL, 1 μL)、10 mM dNTP Mix(2 μL)、RevertAid M-MμIV RT(200 U/μL, 1 μL)、miRNA(10 μL)、Primer(2 μL)、Total volume(20 μL),逆转录条件为42℃ 60 min,70℃ 5 min,4℃ 5 min。(3)实时定量PCR:SYBR Green实时定量PCR试剂盒购于美国Genecopoeia公司,引物及探针购自美国abi公司,以U6 snRNA为内参,反应体系:0.1%DEPC水6.8 μL,50×ROX Reference Dye 0.4 μL,Power SYBR Green PCR Master 10 μL,基因组DNA模板2 μL,正向引物0.4 μL,反向引物0.4 μL,总体积20 μL。反应条件:预变性(1个循环)95℃ 30 s;扩增(40个循环),变性95℃ 5 s,退火60℃ 35 s;溶解曲线(1个循环),95℃ 15 s,退火60℃ 1 min,延伸95℃ 15 s;按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-375表达水平。

1.3 随访及资料收集 随访截止时间为2018年8月,收集病人的临床资料及随访资料,包括年龄、性别、病理类型、临床分期、淋巴结转移、脑转移等,随访期间出现死亡即认为预后不良。

1.4 统计学方法 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,服从正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组间比较行单因素方差分析,进一步的组间两两比较采用LSD-*t*检验,两组间比较采用成组*t*检验;计数数据以例(%)表示,组间比较行 χ^2 检验,采用受试者工作特征曲线(ROC)评估miR-375诊断NSCLC病人发生脑转移的临床价值,采用逐步回归筛选变量进行多因素COX回归分析,以优势比(OR)和95%置信区间(95%CI)表示各因素对NSCLC病人预后的影响。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 miR-375 表达水平 转移组和未转移组血清 miR-375 表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 转移组血清 miR-375 表达水平显著低于未转移组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 血清 miR-375 表达水平与 NSCLC 病人临床病理特征的关系 NSCLC 病人血清 miR-375 表达水平与临床分期、淋巴结转移显著相关 ($P < 0.05$), 与病人年龄、病理类型无关 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 非小细胞肺癌 185 例和 80 例同期健康体检者(对照组)血清 miR-375 表达水平比较

组别	例数	miR-375/ $\bar{x} \pm s$
对照组	80	1.15±0.33
非小细胞肺癌		
转移组	78	0.32±0.07 ^{ab}
未转移组	107	0.73±0.18 ^a
F值		287.159
P值		< 0.001

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与未转移组比较, ^b $P < 0.05$

表 2 非小细胞肺癌 185 例血清 miR-375 表达水平与临床病理特征的关系/ $\bar{x} \pm s$

类别	例数	miR-375	F(t)值	P值
年龄			(1.165)	0.246
≤60岁	65	0.58±0.18		
>60岁	120	0.55±0.16		
临床分期			39.963	< 0.001
I期	13	0.88±0.23		
II期	14	0.74±0.21		
III期	46	0.65±0.18		
IV期	112	0.46±0.15		
病理类型			(1.174)	0.242
腺癌	119	0.57±0.17		
鳞癌	66	0.54±0.16		
淋巴结转移			72.492	< 0.001
N0	45	0.81±0.24		
N1~2	49	0.62±0.19		
N3	91	0.40±0.12		

2.3 miR-375 诊断 NSCLC 病人发生脑转移的临床价值 ROC 曲线分析显示, 血清 miR-375 表达水平诊断 NSCLC 病人发生脑转移的曲线下面积(AUC)为 0.975, 灵敏度、特异度、准确率、阳性预测值、阴性预测值分别为 89.74%、94.39%、92.43%、92.11%、92.66%。见图 1。

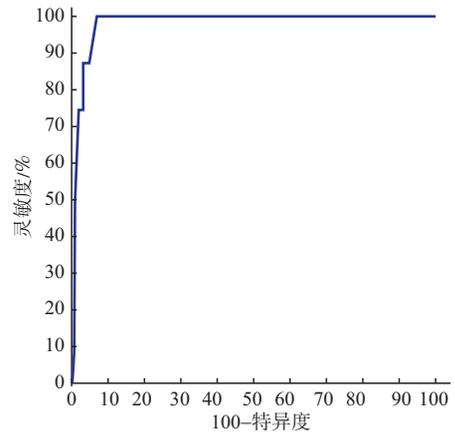


图 1 miR-375 诊断非小细胞肺癌 185 例发生脑转移的 ROC 曲线

2.4 影响 NSCLC 病人预后的多因素 Cox 回归分析 多因素 Cox 回归分析显示, 临床分期、脑转移、血清 miR-375 表达水平是影响 NSCLC 病人预后的独立危险因素 ($P < 0.05$), 其他因素不是影响 NSCLC 病人预后的重要因素 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 影响非小细胞肺癌 185 例预后的多因素 Cox 回归分析

因素	β 值	SE值	Wald χ^2 值	P值	OR值	95%CI值
年龄	0.245	0.172	2.029	0.155	1.278	0.912~1.790
性别	-0.168	0.113	2.210	0.139	0.845	0.677~1.055
病理类型	0.127	0.086	2.181	0.140	1.135	0.959~1.344
临床分期	0.948	0.351	7.295	0.007	2.581	1.297~5.134
淋巴结转移	0.347	0.295	1.384	0.240	1.415	0.794~2.522
脑转移	1.025	0.318	10.389	0.001	2.787	1.494~5.198
miR-375	1.538	0.449	11.733	0.001	4.655	1.931~11.224
常项	12.273	26.294	0.234	0.629	-	-

3 讨论

中枢神经系统是 NSCLC 病人发生转移的常见部位, 肿瘤细胞从血管外溢到脑组织, 故肿瘤细胞的转移部位常与局部血流量呈正相关, 约 80% 的脑转移发生在大脑半球^[6]。诱导性头痛是病人发生脑转移后最主要的临床症状, 受机体能量消耗较大、癌细胞侵犯、免疫力下降等因素影响, 病人出现体质量下降、疲劳乏力等症状, 此外, 可能还会出现刺激性咳嗽、呕吐、认知改变、视力障碍、耳鸣、耳聋、语言缺失等临床症状^[7-8]。NSCLC 病人发生脑转移后神经功能受损, 生活质量严重下降, 虽然治疗技术在不断的提高, 但脑转移病人的生存率仍不理想, 因此, 早期诊断 NSCLC 脑转移显得尤为重要^[9-10]。外周血检测生物标志物具有方便、快捷、无创、重复性好等优点, 是临床中癌症诊断和随访最理想的工具之一^[11]。

miRNAs 是重要的调控分子, 30% 哺乳动物的

蛋白编码基因可能受 miRNAs 的调控, miR-375 位于人 2 号染色体 q35, cryba2 和 Ccdc108 之间, 属于 miRNAs 家族中的一员, 在生物体内具有基因表达调控作用^[12-13]。miR-375 最早是在胰岛 β 细胞内被发现的, 随着深究的深入, 血清 miR-375 已被证实在胃癌、前列腺癌、肝癌、宫颈癌等病人体内呈低表达, 为肿瘤的早期无创性诊断开辟了一条新途径^[14]。付婷等^[15]研究显示, 肝癌组织中 miR-375 表达水平显著低于癌旁组织, 星形胶质细胞升高基因 1(AEG-1) 是重要的癌基因, 是 miR-375 信号途径下游的直接靶点, miR-375 可通过靶向 AEG-1 抑制肝癌细胞的生长、转移和侵袭。王月秋等^[16]阐明多种 miRNA 参与 PI3k/Akt 信号通路的调控, 推测 miR-375 可能是 PI3k/Akt 信号通路重要的调控因子, 胰岛素样生长因子 1 受体(IGF1R) 是其肿瘤抑制作用的新靶点。

目前, 国内外关于血清 miR-375 表达水平与脑转移发病风险关系较少, 本研究发现转移组和未转移组血清 miR-375 表达水平均显著低于对照组, 而转移组血清 miR-375 表达水平显著低于对照组; 说明 NSCLC 病人血清 miR-375 表达显著失调, miR-375 可能是 NSCLC 病人发生脑转移的预测因子^[17]。我们还分析了 miR-375 与 NSCLC 病人临床病理特征的关系, NSCLC 病人血清 miR-375 表达水平与临床分期、淋巴结转移显著相关, 与病人年龄、病理类型无关, 提示血清 miR-375 低表达可能与 NSCLC 的疾病进展密切相关。ROC 曲线分析显示, 血清 miR-375 表达水平诊断 NSCLC 病人发生脑转移的 AUC 为 0.975, 灵敏度、特异度、准确率均较高, 进一步说明血清 miR-375 表达水平诊断病人发生脑转移的临床价值较高。另外, 多因素 Cox 回归分析显示, 临床分期、脑转移、血清 miR-375 表达水平是影响 NSCLC 病人预后的独立危险因素, 即血清 miR-375 低表达预示着 NSCLC 病人预后不良。

综上所述, miR-375 在 NSCLC 中起肿瘤抑制作用, 血清 miR-375 表达水平下调与 NSCLC 病人发生脑转移有关, 可能是诊断 NSCLC 脑转移及 NSCLC 病人预后判断的潜在生物标志物, 但 miR-375 的肿瘤抑制机制尚不清楚, 我们应进一步研究其临床应用潜力。

参考文献

[1] 王超, 刘侠, 董迪, 等. 基于影像组学的非小细胞肺癌淋巴结转移预测[J]. 自动化学报, 2019, 45(6): 1087-1093.
[2] 安云霞, 刘畅, 程相松, 等. 含铂同步化疗与靶向治疗对非小细胞肺癌脑转移患者疗效的比较[J]. 实用癌症杂志, 2018, 33

(7): 1158-1160, 1164.
[3] 冯淑娟, 杨文龙. 同步放化疗及序贯放化疗治疗非小细胞肺癌脑转移的疗效及生存质量分析[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(4): 527-529.
[4] 李元滨, 林丽珠, 关洁珊, 等. 中西医结合治疗对晚期 NSCLC miRNA 表达谱的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(9): 1076-1081.
[5] 何建行, 钟南山, 杨海虹. 美国国家综合癌症网络 2008 V2 非小细胞肺癌临床实践指南精确解读[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(40): 2814-2816.
[6] CHEN YM, LIN MC, LAI CH, et al. 172P Antacid and de novo brain metastases in EGFR-mutant NSCLC patients treated with first-line, first-generation EGFR-TKIs[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2016, 11(4): S132.
[7] 徐佳, 刘爱宁, 严霜红. 血清 TGF- β 1 和 VEGF 水平判定吉西他滨联合卡铂治疗非小细胞肺癌患者反应性临床研究[J]. 河北医学, 2016, 22(1): 55-59.
[8] WU D, LIU J, CHEN J, et al. MiR-449a Suppresses tumor growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer by targeting a hmgb1-mediated nf- κ b signaling pathway [J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 2019, 27(2): 227-235.
[9] SHAW AT, SPIGEL DR, TAN DS, et al. Whole body and Intracranial efficacy of Ceritinib in ALK-inhibitor Na⁺ve patients with ALK+ NSCLC and brain metastases: results of ASCEND 1 and 3: Topic: medical oncology. [J]. Journal of Thoracic Oncology, 2016, 11(11): S256.
[10] FENSKE DC, PRICE GL, HESS L M, et al. Systematic Review of brain metastases in patients with Non-small-cell lung cancer in the united states, european union, and Japan [J]. Clinical Lung Cancer, 2017, 18(6): 607-614.
[11] 陈昌国, 赵强元. RNA 采集系统在血液分子诊断生物标志物检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(7): 559-561.
[12] OSAKO Y, SEKI N, KITA Y, et al. Regulation of MMP13 by anti-tumor microRNA-375 markedly inhibits cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2016, 49(6): 2255-2264.
[13] 陈贝贝, 吕慧芳, 别良玉, 等. MicroRNA-375 表达对大肠癌细胞生物学特性的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(22): 3558-3563.
[14] 姜波, 文进, 刘全新, 等. 血清 miRNA let-7e 和 miRNA-375 表达在食管腺癌早期诊断中的临床意义[J]. 慢性病学杂志, 2018, 19(3): 254-258.
[15] 付婷, 刘坤, 张维璐, 等. miR-375 在 HBV 相关性肝细胞癌肿瘤组织与癌旁组织中的表达[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(2): 271-274.
[16] 王月秋, 王丽宏, 车慧, 等. 微小 RNA 与胰岛素 PI3K/AKT 信号传导通路[J]. 新医学, 2017, 48(7): 438-442.
[17] 焉春华, 史晓东, 于方飞, 等. MicroRNA-575 靶向抑制 BLID 促进非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(23): 4432-4436.

(收稿日期: 2019-01-04, 修回日期: 2019-10-22)