

中西医联合治疗对晚期 NSCLC miRNA 表达谱的影响

李元滨^{1△} 林丽珠² 关洁珊² 陈昌明¹ 左 谦¹ 林宝琪¹

摘要 目的 对中西医联合治疗晚期非小细胞肺癌(NSCLC)获益血清 miRNA 表达谱进行初步研究,探讨晚期 NSCLC 疗效监测和预测分子标记物。**方法** 选取 5 例接受中西医联合治疗且疗效获益的晚期 NSCLC 患者(简称治疗组)和 3 例晚期 NSCLC 初治患者(简称肺癌组)及 3 名健康体检者(简称对照组),采集血清标本并用 Trizol 法提取总 RNA,运用 Exiqon 公司 microRNA PCR ARRAY 芯片技术筛选检测肺癌组血清与对照组血清中差异 miRNA 表达谱、治疗组血清与肺癌组血清差异 miRNA 表达谱,基于聚类分析及对比分析,进一步得到中西医联合治疗晚期 NSCLC 获益 miRNA 表达谱。**结果** 经 microRNA PCR ARRAY 检测 and 数据分析处理后,肺癌组与对照组共筛选出 42 个差异在 2 倍以上的 miRNAs,其中 29 个为上调的 miRNAs,13 个为下调的 miRNAs;且 miR-10b-5p、miR-21-5p、miR-182-5p、miR-361-3p、miR-382-5p 差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组与肺癌组筛选出 45 个差异在 2 倍以上的 miRNAs,其中 12 个上调的 miRNAs,33 个下调的 miRNAs;miR-137-3p、miR-182-5p、miR-376a-3p、miR-382-5p、miR-409-3p、miR-10a-5p、miR-21-5p、miR-29a-3p、miR-141-3p、miR-150-5p、miR-200c-3p、miR-342-3p、miR-365a-3p、miR-375、miR-502-3p 15 个 miRNAs 差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组与肺癌组差异倍数 > 2 倍,与对照组差异倍数 ≤ 2 倍的血清 miRNA 共筛选出 22 个,其中 7 个为上调 miRNAs,15 个为下调 miRNAs;miR-127-3p、miR-182-5p、miR-382-5p、miR-409-3p、miR-10a-5p、miR-21-5p、miR-141-3p、miR-342-3p 8 个 miRNAs 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 包括 miR-21-5p、miR-182-5p、miR-382-5p 在内的差异 miRNAs 有望成为中西医联合治疗晚期 NSCLC 疗效监测和预测分子标记物;为中西医联合治疗晚期 NSCLC 个体化治疗提供参考。

关键词 晚期非小细胞肺癌;血清 miRNA;中西医联合

TCM Combined Western Medicine Treatment of Advanced NSCLC: a Preliminary Study of miRNA Expression Profiles LI Yuan-bin¹, LIN Li-zhu², GUAN Jie-shan², CHEN Chang-ming¹, ZUO Qian¹, and LIN Bao-qi¹ 1 First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 2 Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405)

ABSTRACT Objective To preliminarily observe miRNA gene profiles in benefit serum of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) treated by TCM combined Western medicine (WM), and to seek for molecular markers for its efficacy monitoring and prediction. **Methods** Recruited were 5 advanced NSCLC patients who received TCM combined WM treatment and obtained efficacy benefit (as the treatment group), 3 advanced NSCLC patients who received early treatment (as the lung cancer group), and 3 healthy subjects (as the control group). Serum samples were collected and total RNA was extracted using Trizol method. Using microRNA PCR ARRAY chip technology (product of Exiqon Company), differentially miRNA expression profiling in serum between the lung cancer group and the control group, and between the treatment group and the lung cancer group were detected. Benefit miRNA expression profiling was obtained based on cluster analysis and comparative analysis. **Results** After tested by miRNA PCR ARRAY

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273963)

作者单位:1.广州中医药大学第一临床医学院(广州 510405);2.广州中医药大学第一附属医院肿瘤科(广州 510405)

通讯作者:林丽珠, Tel: 020-36591039, E-mail: lizhulin903@21cn.com

△河北大学医学院附属医院中西医结合科(河北保定 071000)

DOI: 10.7661/CJIM.2016.09.1076

and managed by data analysis, a total of 42 miRNAs with more than 2 folds difference were screened in the lung cancer group and the control group, including 29 up-regulated and 12 down-regulated miRNAs. Besides, miR-10b-5p, miR-21-5p, miR-182-5p, miR-361-3p, and miR-382-5p were statistically different ($P < 0.05$). A total of 45 miRNAs with more than 2 folds difference were screened in the treatment group and the lung cancer group, including 12 up-regulated and 33 down-regulated miRNAs. Fifteen miRNAs were statistically different including miR-137-3p, miR-182-5p, miR-376a-3p, miR-382-5p, miR-409-3p, miR-10a-5p, miR-21-5p, miR-29a-3p, miR-141-3p, miR-150-5p, miR-200c-3p, miR-342-3p, miR-365a-3p, miR-375, miR-502-3p ($P < 0.05$). Totally 22 miRNAs were screened in the treatment group with more than 2 folds difference as compared with the lung cancer group and with less than or equivalent to 2 folds difference as compared with the control group, including 7 up-regulated and 15 down-regulated miRNAs, of which, miR-127-3p, miR-182-5p, miR-382-5p, miR-409-3p, miR-10a-5p, miR-21-5p, miR-141-3p, miR-342-3p were statistically different ($P < 0.05$). Conclusion miRNAs including miR-21-5p, miR-182-5p, miR-382-5p are promising to become molecular markers for efficacy monitoring and prediction of advanced NSCLC treated by TCM combined WM, which provides reference for individualized treating advanced NSCLC.

KEYWORDS advanced non-small cell lung cancer; serum miRNA; traditional Chinese medicine combined Western medicine

肺癌(lung cancer, LC)由于早期临床表现不典型,多数患者确诊时已至中晚期,失去彻底治愈的机会,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)超过 80%^[1],采用多学科综合治疗方案延缓患者病情进展、提高患者生活质量是目前医学干预的重点。中西医结合治疗是大多数临床晚期 NSCLC 患者选择的治疗模式。但目前临床上所用的肿瘤分子标志物检测缺乏特异性,反复的影像学检查对患者身体不利,寻找简单、无创、特异性的疗效监测与预测指标势在必行。

miRNAs 是一类长约 19~24 个核苷酸的内源性非编码单链小 RNA,在循环血中稳定存在,具有组织特异性^[2],为 NSCLC 患者寻找无创、特异性疗效监测分子标志物提供了新途径。本研究拟通过 microRNA PCR ARRAY 芯片技术,筛选出中西医结合治疗晚期 NSCLC 获益血清 miRNAs,为临床晚期 NSCLC 的中西医结合治疗提供分子生物学疗效预测线索,并为基于 miRNA 的中西医联合个体化治疗策略提供理论依据。

资料与方法

1 诊断标准 LC 诊断及临床分期标准均参照原发性肺癌诊疗规范^[3];中医辨证根据《中医肿瘤学》分型标准^[4],分为肺郁痰瘀、脾虚痰湿、阴虚痰热、气阴两虚 4 型。

2 纳入标准 肺癌组:(1)符合原发性肺癌诊断标准,经病理学或细胞学确诊为 NSCLC 的患者;(2)TNM 分期为Ⅲb~Ⅳ期;(3)至少有 1 个客观可测量肿

瘤病灶;(4)PS 评分 ≤ 2 分;(5)年龄 18~80 岁;(6)无手术适应证或不愿意行手术治疗者;(7)预计生存期 ≥ 3 个月;(8)未接受治疗者。治疗组:(1)符合上述晚期 NSCLC 诊断标准;(2)接受中西医结合治疗,其中含铂两类方案化疗至少 2 个疗程,中医药治疗至少 1 个月;(3)采用 2009 年 RECIST 疗效标准 1.1 版评价为稳定(SD)或部分缓解(PR)者。对照组:体检中心健康体检者。

3 排除标准 肺癌组:(1)肺癌为其他肿瘤转移病灶;(2)仅有不可测量的病灶如胸水、肺源性淋巴管炎、腹水、腹膜癌性病变等;(3)有严重、未控制的器质性病变或感染,如失代偿的心、肺、肾功能衰竭等导致不能耐受化疗的患者;(4)精神病患者。治疗组:(1)应用如放疗、粒子植入、射频消融等其它非药物治疗手段;(2)中医药治疗中包括针灸等非药物治疗者;(3)对化疗药物过敏者;(4)精神病患者。

4 一般资料 病例均来源于 2013 年 5—9 月广州中医药大学第一附属医院肿瘤科,共纳入研究病例 11 例:肺癌组(晚期 NSCLC 初治者)3 例,均为男性,平均年龄(60.00 ± 4.65)岁,鳞癌 1 例,腺癌 2 例,均为Ⅳ期;治疗组(接受中西医结合治疗且获益者)5 例,其中,男性 3 例,女性 2 例,平均年龄(57.20 ± 8.89)岁,鳞癌 2 例,腺癌 3 例,均为Ⅳ期,疗效评价为 SD;对照组(健康体检者)3 名,其中,男性 2 名,女性 1 名,平均年龄(53.00 ± 5.20)岁。

5 治疗方案 治疗组:第 1 例:中医辨证为肺郁痰瘀型,以宣肺理气、化痰逐瘀为法,选用太子参 30 g 白术 15 g 茯苓 20 g 浙贝母 10 g 木香 10 g 姜

厚朴 15 g 盐蛇干 6 g 蜈蚣 2 条 山慈菇 15 g 丹参 15 g 燀桃仁 10 g 川芎 10 g 薏苡仁 30 g 麦冬 15 g 炙甘草 6 g; 每日 1 剂, 分早、晚两次口服。同时予鹤蟾片(每片 0.37 g, 广州白云山中一药业有限公司)6 片, 口服, 每日 3 次。西医化疗: 多西他赛(艾素 20 mg/支, 江苏恒瑞医药股份有限公司)100 mg 静脉滴注, 第 1 天; 顺铂(20 mg/支, 南京制药厂有限公司)40 mg 静脉滴注, 第 1 天, 30 mg 静脉滴注, 第 2、3 天。共 4 个疗程。第 2 例: 中医辨证为气阴两虚型, 以益气养阴、化痰散结为法, 选用熟党参 20 g 茯苓 15 g 法半夏 10 g 陈皮 5 g 枳壳 10 g 竹茹 15 g 牡蛎 30 g 浮小麦 30 g 麦冬 15 g 五味子 10 g 乌梅 15 g 炙甘草 6 g; 每日 1 剂, 分早、晚两次口服。同时予贞芪扶正颗粒(5 g × 14 袋/盒, 修正药业集团四川制药有限公司)1 袋, 口服, 每日 2 次, 鸦胆子油软胶囊(0.53 g × 24 粒/盒, 江西三九药业有限公司)4 粒, 口服, 每日 3 次。西医化疗: 培美曲塞(0.2 g/支, 江苏豪森药业股份有限公司)800 mg 静脉滴注, 第 1 天; 奈达铂(10 mg/支, 江苏奥赛康药业股份有限公司)40 mg 静脉滴注, 第 1~3 天; 贝伐珠单抗(100 mg/支, 瑞士罗氏制药公司)400 mg 静脉滴注, 第 1 天。共 2 个疗程。第 3 例: 中医辨证为脾虚痰湿型, 以健脾燥湿、理气化痰为法, 选用熟党参 20 g 白术 15 g 茯苓 15 g 法半夏 15 g 浙贝母 15 g 陈皮 5 g 桔梗 10 g 盐蛇干 6 g 廔虫 6 g 薏苡仁 30 g 鱼腥草 15 g 炙甘草 6 g; 每日 1 剂, 分早、晚两次口服。同时予康艾注射液(10 mL/支, 长白山制药股份有限公司)50 mL 静脉滴注, 每日 1 次, 金龙胶囊(0.25 g × 30 粒/盒, 北京建生药业有限公司)4 粒, 口服, 每日 3 次。西医化疗: 多西他赛(泰索帝 20 mg/支, Aventis Pharma Dagenham)110 mg, 静脉滴注, 第 1 天; 奈达铂 30 mg 静脉滴注, 第 1 天, 40 mg 静脉滴注, 第 2~3 天。共 2 个疗程。第 4 例: 中医辨证为肺郁痰瘀型, 以宣肺理气、化痰逐瘀为法, 予安康欣胶囊(0.5 g × 45 粒/盒, 安徽高山药业有限公司)5 粒, 口服, 每日 3 次。西医化疗: 吉西他滨(健择 200 mg/支, LILLY France)1.6 g 静脉滴注, 第 1、8 天; 奈达铂 50 mg 静脉滴注, 第 1 天, 40 mg 静脉滴注, 第 2~3 天; 重组人血管内皮抑制素注射液(15 mg/支, 山东先声麦得津生物制药有限公司)15 mg 静脉滴注, 第 1~14 天。共 2 个疗程。第 5 例: 中医辨证为脾虚痰湿型, 以健脾燥湿、理气化痰为法, 选用熟党参 15 g 白术 15 g 茯苓 25 g 浙贝母 10 g 桔梗 10 g 枳壳 15 g 预知子 15 g 山慈菇 15 g 半枝莲 15 g 盐蛇干 6 g 炒僵蚕 10 g 地龙 10 g

蜈蚣 3 条 仙鹤草 30 g 红豆杉 6 g 甘草 6 g; 每日 1 剂, 分早、晚 2 次口服。同时予安康欣胶囊 5 粒, 口服, 每日 3 次。西医治疗: 吉西他滨(泽菲 0.2 g/支, 江苏豪森药业股份有限公司)1.7 g 静脉滴注, 第 1、8 天; 奈达铂 40 mg 静脉滴注, 第 1 天, 50 mg 静脉滴注, 第 2~3 天。共 2 个疗程。

6 观察项目及检测方法 常规静脉采取患者 5 mL 外周血; 3 000 r/min 离心 15 min, 采集血清标本并用 Trizol 法提取总 RNA, 运用 Exiqon 公司 microRNA PCR ARRAY 芯片检测筛选肺癌组、治疗组血清差异 miRNAs。

7 统计学方法 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法, 使用 PCR 仪器附带的软件进行初步数据分析, 获得原始的 Ct 值。使用 GenEx qPCR 分析软件(www.exiqon.com/mirna-pcr-analysis)对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 晚期 NSCLC 患者血清 miRNA 表达谱(表 1) 肺癌组与对照组经 miRNA PCR ARRAY 检测和分析数据后, 共筛选出 42 个差异在 2 倍以上的 miRNAs, 其中包括 29 个在肺癌血清上调的 miRNAs 以及 13 个下调的 miRNAs; 其中 miR-10b-5p、miR-21-5p、miR-182-5p、miR-361-3p、miR-382-5p 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2 晚期 NSCLC 治疗后患者血清 miRNA 表达谱(表 2) 治疗组与肺癌组经 miRNA PCR ARRAY 检测和分析数据后, 筛选出 45 个差异在 2 倍以上的 miRNAs, 其中 12 个上调的 miRNAs, 33 个下调的 miRNAs; miR-137-3p、miR-182-5p、miR-376a-3p、miR-382-5p、miR-409-3p、miR-10a-5p、miR-21-5p、miR-29a-3p、miR-141-3p、miR-150-5p、miR-200c-3p、miR-342-3p、miR-365a-3p、miR-375、miR-502-3p 15 个 miRNAs 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 晚期 NSCLC 患者治疗后获益血清 miRNA 表达谱(表 3) 基于 3 组差异表达 miRNAs 聚类分析及进一步对比分析可见, 治疗组与肺癌组差异倍数 > 2 倍, 且与对照组差异倍数 ≤ 2 倍的血清 miRNA 共筛选出 22 个。miRNAs 7 个上调, 15 个下调; 其中 miR-127-3p、miR-182-5p、miR-382-5p、miR-409-3p、miR-10a-5p、miR-21-5p、miR-141-3p、miR-342-3p 8 个 miRNAs 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 肺癌组与对照组血清表达差异倍数
大于 2 倍 miRNA 列表

miRNA ID	倍数差异	P 值	差异上/下调
hsa-miR-1	3.33	0.215 8	3.33
hsa-miR-10a-5p	4.23	0.055 9	4.23
hsa-miR-10b-5p	3.93	0.001 2	3.93
hsa-miR-21-5p	2.56	0.038 8	2.56
hsa-miR-29c-3p	2.14	0.154 5	2.14
hsa-miR-30a-5p	2.35	0.377 8	2.35
hsa-miR-34a-5p	3.34	0.303 5	3.34
hsa-miR-99a-5p	2.21	0.433 5	2.21
hsa-miR-122-5p	2.48	0.572 3	2.48
hsa-miR-125b-5p	2.13	0.436 8	2.13
hsa-miR-126-3p	2.27	0.089 8	2.27
hsa-miR-132-3p	2.42	0.290 4	2.42
hsa-miR-136-5p	6.86	0.250 3	6.86
hsa-miR-141-3p	10.43	0.093 7	10.43
hsa-miR-152	2.68	0.148 6	2.68
hsa-miR-192-5p	2.48	0.370 3	2.48
hsa-miR-194-5p	3.17	0.302 3	3.17
hsa-miR-195-5p	3.45	0.382 4	3.45
hsa-miR-200a-3p	2.16	0.488 5	2.16
hsa-miR-200c-3p	8.77	0.136 1	8.77
hsa-miR-210	2.12	0.229 9	2.12
hsa-miR-335-5p	2.68	0.262 8	2.68
hsa-miR-342-3p	2.52	0.144 9	2.52
hsa-miR-346	2.89	0.457 0	2.89
hsa-miR-375	4.84	0.258 0	4.84
hsa-miR-495-3p	2.41	0.267 7	2.41
hsa-miR-497-5p	4.43	0.159 1	4.43
hsa-miR-605	2.43	0.089 8	2.43
hsa-miR-885-5p	2.17	0.532 2	2.17
hsa-miR-16-2-3p	0.41	0.113 5	-2.41
hsa-miR-17-5p	0.43	0.297 3	-2.32
hsa-miR-27a-3p	0.21	0.248 9	-4.86
hsa-miR-127-3p	0.16	0.052 1	-6.24
hsa-miR-182-5p	0.36	0.027 0	-2.78
hsa-miR-221-3p	0.23	0.289 2	-4.31
hsa-miR-361-3p	0.34	0.019 9	-2.97
hsa-miR-382-5p	0.10	0.048 4	-10.27
hsa-miR-409-3p	0.16	0.133 7	-6.40
hsa-miR-500a-5p	0.39	0.347 4	-2.59
hsa-miR-532-5p	0.48	0.092 6	-2.07
hsa-miR-543	0.17	0.059 3	-5.81
hsa-miR-629-5p	0.18	0.059 5	-5.57

表 2 治疗组与肺癌组血清表达差异倍数
大于 2 倍 miRNA 列表

miRNA ID	倍数差异	P 值	差异上/下调
hsa-miR-16-2-3p	2.71	0.098 4	2.71
hsa-miR-29b-2-5p	2.22	0.337 4	2.22
hsa-miR-127-3p	8.58	0.002 6	8.58
hsa-miR-182-5p	3.22	0.001 2	3.22
hsa-miR-221-3p	4.76	0.135 6	4.76
hsa-miR-376a-3p	2.65	0.000 1	2.65
hsa-miR-382-5p	17.59	0.000 0	17.59
hsa-miR-409-3p	10.60	0.006 8	10.60
hsa-miR-421	2.30	0.276 4	2.30
hsa-miR-485-3p	2.88	0.103 2	2.88
hsa-miR-543	4.98	0.065 4	4.98
hsa-miR-629-5p	2.41	0.411 7	2.41
hsa-miR-1	0.31	0.169 4	-3.19
hsa-miR-10a-5p	0.22	0.005 5	-4.52
hsa-miR-10b-5p	0.47	0.206 3	-2.13
hsa-miR-20b-5p	0.40	0.188 2	-2.50
hsa-miR-21-5p	0.40	0.005 0	-2.48
hsa-miR-29a-3p	0.39	0.009 4	-2.54
hsa-miR-29c-3p	0.41	0.057 3	-2.44
hsa-miR-30e-3p	0.48	0.095 2	-2.10
hsa-miR-99a-5p	0.25	0.073 5	-4.01
hsa-miR-122-5p	0.13	0.082 6	-7.70
hsa-miR-125b-5p	0.30	0.088 4	-3.32
hsa-miR-141-3p	0.08	0.013 8	-13.03
hsa-miR-148a-3p	0.46	0.105 3	-2.15
hsa-miR-150-5p	0.24	0.012 1	-4.10
hsa-miR-152	0.42	0.083 1	-2.37
hsa-miR-192-5p	0.35	0.179 2	-2.86
hsa-miR-193-3p	0.29	0.113 3	-3.44
hsa-miR-194-5p	0.25	0.080 1	-3.93
hsa-miR-200a-3p	0.25	0.261 7	-3.99
hsa-miR-200c-3p	0.24	0.013 7	-4.25
hsa-miR-215	0.39	0.266 1	-2.54
hsa-miR-222-3p	0.48	0.117 8	-2.07
hsa-miR-223-3p	0.42	0.059 0	-2.41
hsa-miR-335-5p	0.42	0.174 3	-2.37
hsa-miR-342-3p	0.23	0.011 7	-4.30
hsa-miR-346	0.34	0.241 8	-2.98
hsa-miR-365a-3p	0.35	0.020 1	-2.89
hsa-miR-375	0.07	0.007 5	-13.58
hsa-miR-424-5p	0.39	0.123 1	-2.59
hsa-miR-502-3p	0.38	0.022 9	-2.60
hsa-miR-551b-3p	0.18	0.125 1	-5.45
hsa-miR-574-3p	0.40	0.071 0	-2.53
hsa-miR-885-5p	0.16	0.057 1	-6.21

讨 论

miRNA 芯片技术是一种快速有效的检测分析 miRNA 表达谱的方法。由于循环血清 miRNA 具有高度的特异性和稳定性,以及检测方法的无创性,使其作为肿瘤个体化疗效监测和预测的生物标记物变得可能^[2]。本研究采用丹麦 Exiqon 公司血清/血浆 mi-croRNA PCR ARRAY 芯片,此芯片覆盖了在循环血

中较高表达的 179 个 miRNAs,检测结果无需 RT-PCR 验证,且同一种 miRNA 的检测结果具有极好的稳定性。目前国内外对肺癌 miRNA 表达谱大多集中在肺癌早期阶段的研究中,而对肺癌晚期 miRNA 表达谱的研究甚少。

目前公认的 miRNA 表达水平变化有生物学意义的倍数是 2 倍,本研究运用 microRNA PCR ARRAY 芯片技术检测分析了晚期 NSCLC 患者和健康体检者

表 3 治疗组获益血清 miRNA 列表

miRNA ID	倍数差异	P 值	差异上/下调
hsa-miR-16-2-3p	2.71	0.098 4	2.71
hsa-miR-127-3p	8.58	0.002 6	8.58
hsa-miR-182-5p	3.22	0.001 2	3.22
hsa-miR-221-3p	4.76	0.135 6	4.76
hsa-miR-382-5p	17.59	0.000 0	17.59
hsa-miR-409-3p	10.60	0.006 8	10.60
hsa-miR-543	4.98	0.065 4	4.98
hsa-miR-1	0.31	0.169 4	-3.19
hsa-miR-10a-5p	0.22	0.005 5	-4.52
hsa-miR-10b-5p	0.47	0.206 3	-2.13
hsa-miR-21-5p	0.40	0.005 0	-2.48
hsa-miR-29c-3p	0.41	0.057 3	-2.44
hsa-miR-99a-5p	0.25	0.073 5	-4.01
hsa-miR-125b-5p	0.30	0.088 4	-3.32
hsa-miR-141-3p	0.08	0.013 8	-13.03
hsa-miR-152	0.42	0.083 1	-2.37
hsa-miR-192-5p	0.35	0.179 2	-2.86
hsa-miR-194-5p	0.25	0.080 1	-3.93
hsa-miR-200a-3p	0.25	0.261 7	-3.99
hsa-miR-335-5p	0.42	0.174 3	-2.37
hsa-miR-342-3p	0.23	0.011 7	-4.30
hsa-miR-346	0.34	0.241 8	-2.98

血清 miRNA 分子,结果显示,与健康体检者血清 miRNA 分子相比,有 42 个差异表达倍数大于 2 倍的 miRNAs 位点,包括上调的 miR-21-5p、miR-126-3p、miR-210。显示有统计学意义($P < 0.05$)的有 5 个,分别为上调的 miR-10b-5p、miR-21-5p,下调的 miR-182-5p、miR-361-3p、miR-382-5p。对血清 miRNA 的研究发现,使用 miRNA-21、miRNA-126、miRNA-210 和 miRNA-486-5p 组成的表达谱诊断 NSCLC 的敏感度为 86.22%,特异性为 96.55%,诊断 I 期 NSCLC 的敏感度为 73.33%,特异性为 96.55%^[5]。本研究晚期 NSCLC 血清 miRNA 表达谱中亦包括 miR-21、miR-126、miR-210,而 miRNA-486-5p 则不在其列,可能与 NSCLC 不同分期有关。但也有部分不同,如 Acunzo M 等^[6]研究显示肺癌细胞中 miR-221 及 miR-222 呈高表达状态,而我们的研究显示 miR221 在晚期 NSCLC 患者血清中呈现低表达。分析原因可能:(1)与不同标本来源、不同肺癌分期以及患者个体生物学差异有关;(2)本实验属探索性研究,选取的样本量少,具有一定的局限性;(3)研究技术方法不同。本实验筛选出的 miRNA 位点可能与晚期 NSCLC 的发展相关联,补充了 NSCLC 相关 miRNA 表达谱数据库,可能为基于 miRNA 的临床晚期 NSCLC 的诊治带来新的希望。

晚期 NSCLC 药物治疗以含铂两药方案为标准的

一线治疗;EGFR 突变患者,可选择靶向药物的治疗;有条件者,在化疗基础上可联合抗肿瘤血管药物^[3]。多项研究表明,中医药治疗肺癌有一定优势,尤其是在减轻西药的副作用、辅助放化疗方面发挥了重要作用,并能使一部分患者达到长期“带瘤生存”的理想疗效^[7,8]。采用多学科综合治疗方案延缓患者病情进展、提高患者生存质量是目前医学干预的重点。中西医联合治疗是大多数临床晚期 NSCLC 患者选择的治疗模式。

张辉等^[9]认为中医药治疗肿瘤的整体观念与 miRNA 在基因调控网络中的核心地位相类,miRNA 的动态失衡及调控机制出现生克制化的异常参与癌症的发生发展过程。“损其有余,补其不足”,恢复 miRNA 的动态平衡,可能成为治疗癌症的重要手段之一。本研究通过检测中西医结合治疗晚期 NSCLC 显效患者与晚期 NSCLC 初治患者及健康体检者血清中 miRNA 表达谱的差异,筛选出包括 miR-127-3p、miR-182-5p、miR-382-5p、miR-409-3p、miR-10a-5p、miR-21-5p、miR-141-3p、miR-342-3p 在内的中西医结合治疗晚期 NSCLC miRNA 表达谱。研究表明,miR-21 在多种实体瘤中表达升高,miR-21 通过下调抑癌基因如,凋亡相关蛋白 4 (programmed, PDCD4)、Fas 配体、金属蛋白酶抑制剂 3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3, TIMP3) 以及原肌球蛋白 1 (tropomyosin 1, TPM1) 的表达,上调致癌基因如,抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,起到促进细胞增殖和抑制凋亡的作用^[10]。miR-21 的过表达还与临床分期、淋巴结转移及预后不良等有关。与健康体检者比较,NSCLC 患者循环血清 miR-21 表达水平显著增高^[11],在 NSCLC 患者中,高表达的血清 miR-21 与肿瘤分期、侵袭转移及是否侵犯淋巴结等密切相关^[12,13]。Zhang L 等^[14]研究报道显示人皮层激动相关蛋白 cortactin 蛋白和 CT TN mRNA 在转染 miR-182 质粒的 A549 细胞中表达降低,miR-182 靶向 CT TN 3'-UTR 抑制 cortactin 的表达。cortactin 蛋白、CT TN 在肿瘤增殖、侵袭方面起枢纽作用。内源性成熟 miR-182 表达通过干扰靶基因 CT TN 在肺癌的发病机制中发挥重要作用。进一步实验结果显示 miR-182 可调控细胞周期,转染 miR-182 的肺腺癌细胞大部分被停滞在 G0/G1 期,S 期、G2/M 期比例显著下降。细胞增殖实验显示 miR-182 抑制体外肺癌细胞增殖,体内移植瘤生长,其原因与促进细胞凋亡有关。而 Hirata H 等^[15]在对膀胱癌的研究中发现,与正常组织相比,miR-182-5p 在膀胱癌中表达显著升高,且高表达的 miR-182-5p 与膀胱癌患者较短的生存期有

关。进一步研究还发现 miR-182-5p 通过敲除 RECK 和 Smad4 基因,导致 Wnt- β -catenin 信号传导途径活化而在膀胱癌中发挥着一种类似致癌基因的重要作用。Wang YQ 等^[16]证实,miR-182 直接负向调控 PDCD4,且与卵巢癌的转移与侵袭有关,另外还可降低卵巢癌细胞对顺铂与紫杉醇的化疗敏感性,其机制可能与其抗凋亡活性有关。一个 miRNA 调控多个靶基因,多个 miRNA 调控一个靶基因,以及各个靶基因之间的相互作用,可能都会影响实基因的实际表达。由于疾病种类、标本来源不同以及患者个体化差异,其激活的信号通路也会不同。miR-382 在肿瘤领域研究尚少,本研究显示,miR-382 在晚期 NSCLC 表达下调,经治疗后呈现上调表达,表明 miR-382 可能发挥抑癌基因作用,待进一步研究。

与健康体检者比较,特异性上调的 miRNAs 经治疗后表达显著下调,而特异性下调的 miRNAs 经治疗后表达显著上调,说明中西医结合治疗或可双向调节特异性 miRNA 的表达,通过增加 miR-127-3p、miR-182-5p、miR-382-5p、miR-409-3p 表达,抑制 miR-10a-5p、miR-21-5p、miR-141-3p、miR-342-3p 表达来发挥抑癌基因作用,进而从基因角度为中西医结合治疗 NSCLC 提供参考。

参 考 文 献

- [1] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24 (14): 2137 - 2150.
- [2] Krauskopf J, Verheijen M, Kleinjans JC, et al. Development and regulatory application of microRNA biomarkers [J]. *Biomark Med*, 2015, 9 (11): 1137 - 1151.
- [3] 支修益,吴一龙,马胜林,等.原发性肺癌诊疗规范(2011 年版) [J]. *中国肺癌杂志*, 2012, 15 (12): 677 - 688.
- [4] 周岱翰主编. *中医肿瘤学* [M]. 北京:中国中医药出版社, 2011:200 - 201.
- [5] Shen J, Todd NW, Zhang H, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer [J]. *Lab Invest*, 2011, 91 (4): 579 - 587.
- [6] Acunzo M, Visone R, Romano G, et al. miR-130a targets MET and induces TRAIL-sensitivity in NSCLC by down-regulating miR-221&222 [J]. *Oncogene*, 2012, 31 (5): 634 - 642.
- [7] 林丽珠,周岱翰,郑心婷. 中医药提高晚期 NSCLC 患者生存质量的临床观察 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26 (5): 389 - 393.
- [8] 王淑美,林丽珠,张文亮,等. 中医标本理论在癌症姑息治疗中的应用及价值 [J]. *中医杂志*, 2011, 52 (12): 997 - 999.
- [9] 张辉,张成,苏式兵,等. miRNA 与中医药抗癌机制研究的思考 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15 (12): 960 - 962.
- [10] Davis BN, Hata A. microRNA in cancer—the involvement of aberrant microRNA biogenesis regulatory pathways [J]. *Genes Cancer*, 2010, 1 (11): 1100 - 1114.
- [11] Wei J, Gao W, Zhu CJ, et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer [J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30 (6): 407 - 414.
- [12] Wang ZX, Bian HB, Wang JR, et al. Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 104 (7): 847 - 851.
- [13] Liu XG, Zhu WY, Huang YY, et al. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer [J]. *Med Oncol*, 2012, 29 (2): 618 - 626.
- [14] Zhang L, Liu T, Huang Y, et al. microRNA-182 inhibits the proliferation and invasion of human lung adenocarcinoma cells through its effect on human cortical actin-associated protein [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28 (3): 381 - 388.
- [15] Hirata H, Ueno K, Shahryari V, et al. Oncogenic miRNA-182-5p targets Smad4 and RECK in human bladder cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (11): 1 - 8.
- [16] Wang YQ, Guo RD, Guo RM, et al. microRNA-182 promotes cell growth, invasion, and chemoresistance by targeting programmed cell death 4 in human ovarian carcinomas [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114 (7): 1464 - 1473.

(收稿:2015-03-09 修回:2016-01-18)