

唾液 miRNA-144 miRNA-21 联合检测对食管癌的诊断价值

古佳升, 吴伟东, 刘清峰, 桃卓嫣

基金项目: 广州市科技计划项目(编号:201902010003)

作者单位: 510220 广州, 暨南大学附属广州红十字会医院心胸外科

作者简介: 古佳升(1994-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 早期食管癌关键标志物的研究及检测。E-mail: 598425484@qq.com

通讯作者: 吴伟东(1967-), 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 食管癌关键标志物的机制研究及检测试剂盒开发。E-mail: william0406@163.com

[摘要] **目的** 探讨唾液中 miRNA-144、miRNA-21 的表达水平及其联合检测对食管癌的诊断价值。**方法** 选择 2015 年 1 月至 2019 年 5 月暨南大学附属广州市红十字会医院心胸外科收治的食管癌患者 85 例(病例组), 均经病理活检与免疫组化检查确诊; 另选择同期健康志愿者 32 名(对照组), 两组年龄均 > 60 岁。采用聚合酶链式反应(PCR)检测两组唾液的 miRNA-144、miRNA-21 表达水平, 采用受试者工作特征(ROC)曲线法评估两者对食管癌的诊断价值。**结果** 病例组唾液中 miRNA-144、miRNA-21 的表达水平显著高于对照组($P < 0.05$), 且与病理分期具有相关性($P < 0.05$)。ROC 分析结果显示, 唾液中 miRNA-21 诊断食管癌的曲线下面积为 0.785, miRNA-144 为 0.777, 具有诊断价值, 且联合两个指标进行检测可进一步提高诊断效能(曲线下面积为 0.851)。**结论** 食管癌患者唾液中的 miRNA-144、miRNA-21 呈高表达, 联合两者检测具有应用于食管癌筛查诊断的前景。

[关键词] miRNA-144; miRNA-21; 唾液; 食管癌; 联合检测

[中图分类号] R 735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2021)06-0570-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2021.06.09

Diagnostic value of the combined detection of miRNA-144 and miRNA-21 in saliva for esophageal cancer GU Jia-sheng, WU Wei-dong, LIU Qing-feng, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital Affiliated to Jinan University, Guangzhou 510220, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression levels of micro ribonucleic acid 144(miRNA-144) and micro ribonucleic acid 21(miRNA-21) in saliva and their combined detection value for the diagnosis of esophageal cancer. **Methods** Eighty-five patients with esophageal cancer admitted to the Department of Cardiothoracic Surgery of Guangzhou Red Cross Hospital Affiliated to Jinan University from January 2015 to May 2019 were selected as the case group, all of whom were diagnosed by pathological biopsy and immunohistochemical examination. Thirty-two healthy volunteers were selected as the control group during the same period. The patients in both groups were older than 60 years. Polymerase chain reaction(PCR) was used to detect the expression levels of miRNA-144 and miRNA-21 in the saliva of the two groups. The receiver operating characteristic(ROC) curve method was used to evaluate the diagnostic value of the two indicators for esophageal cancer. **Results** The expression levels of miRNA-144 and miRNA-21 in the saliva of the case group were significantly higher than those of the control group($P < 0.05$), and were related to pathological staging($P < 0.05$). The results of ROC analysis showed that the areas under the curve of miRNA-21 and miRNA-144 in saliva for diagnosing esophageal cancer was 0.785 and 0.777, respectively, which had diagnostic value, and the combined detection of the two indicators could further improve the diagnostic efficiency(the area under the curve was 0.851). **Conclusion** miRNA-144 and miRNA-21 are highly expressed in the saliva of patients with esophageal cancer, and the combined detection of miRNA-21 and miRNA-144 has a prospect of application in screening and diagnosing esophageal cancer.

[Key words] Micro ribonucleic acid 144(miRNA-144); Micro ribonucleic acid 21(miRNA-21); Saliva; Esophageal cancer; Combined detection

食管癌是一种较常见的消化道恶性肿瘤,根据世界卫生组织(World Health Organization,WHO)发布的报告^[1]估计,全球每年食管癌新发患者约57.2万例,病死人数约50.9万例,其中有近一半新发病例和超过一半的死亡病例发生在亚洲地区,而中国的食管癌患者人数居全球首位。广州市疾病预防控制中心2020年发布的《2004-2016年广州市食管癌发病趋势分析》^[2]表明,相比于城区,郊县和农村地区的食管癌发病率上升趋势明显。治疗食管癌的关键在于早期发现、早期诊断、早期治疗。miRNAs作为一种参与了细胞间信号传递的非编码RNA在细胞信号转导方面发挥着极为重要的作用。miRNA-144是一种新发现的食管癌标志物,但关于其作用机制尚未形成完善的结论。本课题组的前期研究^[3]发现,食管癌患者唾液中miRNA-144呈高表达,且特异度高。检测唾液中的miRNA具有成为诊断食管癌新方法的潜力^[4]。miRNA-21与多种恶性肿瘤的血管侵袭能力有关,其在恶性肿瘤患者血浆中呈明显高表达,且由于唾液腺有丰富的血供,故其在唾液中也可检出^[5-6]。鉴此,本研究旨在分析miRNA-144、miRNA-21在食管癌患者唾液中的表达情况,探讨这两种miRNA基因标志物的联合检测在食管癌早期诊断中的价值及意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择2015年1月至2019年5月暨南大学附属广州市红十字会医院心胸外科收治的食管癌患者85例(病例组),均经病理活检与免疫组化检查确诊,其中男37例,女48例,年龄均>60岁。根据美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer,AJCC)和国际抗癌联盟(International Union Against Cancer,UICC)分期标准^[7],0期14例,I期22例,II期11例,III期11例,IVA期15例,IVB期12例。另同期招募本地社区来我院体检的健康志愿者32名作为对照组,其中男18名,女14名,年龄均>60岁。两组排除标准:(1)有高血压、糖尿病及冠心病等慢性病史者;(2)有肝炎、结核及艾滋病等传染性疾病者;(3)有染色体异常等遗传病史者;(4)有其他恶性肿瘤者;(5)标本采集期间有口腔溃疡、口腔恶性肿瘤、牙周炎等口腔相关疾病者。

1.2 样本采集 在唾液标本采集之前4 h内,受试者须禁食、禁饮,无抽烟、喝酒行为。棉签蘸取2%的柠檬酸后轻轻擦拭唾液腺开口处,每30 s擦拭1次,待唾液流出时使用无菌负压吸痰器收集唾液,共5次,每次收集约2 ml唾液,共采集10 ml。在完成标本

收集工作2 h内,将收集好的唾液置入4℃容器中,以3 000 r/min离心15 min以去除细胞沉淀以及食物残渣,-80℃保存备用。

1.3 唾液 miRNA-144、miRNA-21 检测 参考既往研究^[4]方法,取恒温箱保存的唾液标本置入1.5 ml EP管,采用Trizol法提取总RNA。应用cDNA反转录试剂盒(MBI Fermentas,加拿大)进行反转录,操作严格按照试剂盒说明书进行。应用Bio-Rad CFX96的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)仪,以获得的cDNA为模板进行PCR扩增(50 μl体系),miRNA-144、miRNA-21引物序列见表1,并以3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,G3PD)作为内参,结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,以溴化乙锭染色,采用凝胶成像仪进行扫膜成像。

表1 miRNA-144、miRNA-21引物序列

引物名称		序列
miRNA-144	正向	5'-TCGTCTTCGCCGCTTCTCTCAG-3'
	反向	5'-CTGGATCAGGCCCTTGAGTTT-3'
miRNA-21	正向	5'-CGGCCGTAGCTTATCAGACTCA-3'
	反向	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

1.4 统计学方法 应用SPSS13.0统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析;不符合正态分布的计量资料以中位数(下四分位数,上四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用秩和检验。采用Spearman秩相关分析探讨miRNA-144、miRNA-21与临床分期的相关性。采用受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线法探讨miRNA-21和miRNA-144对食管癌诊断的应用价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组唾液中miRNA-144、miRNA-21表达水平比较 病例组唾液中miRNA-144、miRNA-21的表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组唾液中miRNA-144、miRNA-21表达水平比较
[$M(P_{25}, P_{75})$, 相对表达量]

组别	例数	miRNA-144	miRNA-21
病例组	85	125.47(85.99,150.91)	25.48(18.12,29.45)
对照组	32	75.34(21.76,101.17)	11.78(4.38,22.56)
Z	-	-4.788	-5.037
P	-	0.000	0.000

2.2 食管癌患者唾液中miRNA-144、miRNA-21表达水平与病理分期的关联性分析结果 食管癌患者唾液中miRNA-144、miRNA-21表达水平与病理分期存在关联性($P < 0.05$)。见表3。在0期~IVB期,miRNA-144、

miRNA-21 表达水平呈上升趋势。Spearman 秩相关分析结果显示,miRNA-144 和 miRNA-21 与临床分期呈正相关($r_s = 0.556, P = 0.000; r_s = 0.575, P = 0.000$)。

表 3 食管癌患者唾液 miRNA-144, miRNA-21 在各分期中的表达水平比较[($\bar{x} \pm s$), 相对表达量]

分期	例数	miRNA-144	miRNA-21
0 期	14	84.71 ± 47.35	15.84 ± 6.85
I 期	22	104.34 ± 58.65	21.57 ± 7.50
II 期	11	115.12 ± 48.63	25.63 ± 6.61
III 期	11	141.08 ± 45.53	27.28 ± 4.51
IVA 期	15	167.01 ± 65.09	26.85 ± 9.33
IVB 期	12	173.51 ± 49.46	35.08 ± 10.64
F	-	6.125	8.920
P	-	0.000	0.000

2.3 唾液中 miRNA-144 和 miRNA-21 联合检测在食管癌患者中的诊断价值 以病理活检结果作为金标准,ROC 曲线法分析结果显示,唾液中 miRNA-144 和 miRNA-21 对食管癌均具有较好的诊断价值,且当联合两指标时,诊断效能进一步提升。见图 1,2;表 4。

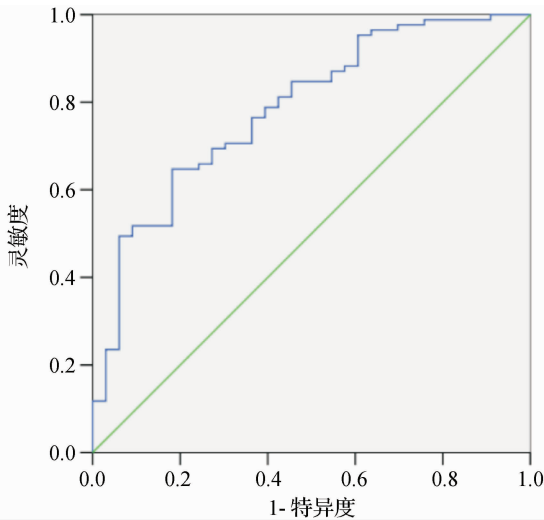


图 1 食管癌患者唾液中 miRNA-144 的 ROC 曲线图

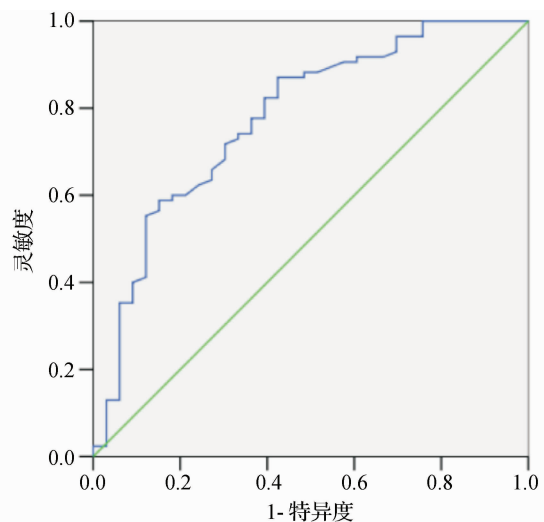


图 2 食管癌患者唾液中 miRNA-21 的 ROC 曲线图

表 4 唾液中 miRNA-144 和 miRNA-21 对食管癌的诊断价值

指标	截止值 ($\mu\text{g/ml}$)	特异度 (%)	灵敏度 (%)	曲线下面积	约登指数
miRNA-21	13.5	57.6	87.1	0.785	0.45
miRNA-144	107.0	81.8	64.7	0.777	0.47
miRNA-144 + miRNA-21	-	75.3	88.1	0.851	0.63

3 讨论

3.1 食管癌是一种比较常见的消化道恶性肿瘤,由于中国人口基数大,全球有近一半的食管癌发生于我国,人数居全球首位^[1]。食管癌早期症状不明显,故其早期筛查和诊断主要采用有创伤性方法,包括食管拉网脱落细胞检测技术、消化道内镜技术等^[8-9]。这些筛查技术在检查的过程中会给患者造成创伤,且检查费用较高,难以实现较大规模的人群筛查,早期筛查率低。大部分食管癌患者确诊时已属中晚期,失去根治性手术机会^[10]。而如果患者能在早期通过准确、有效的检测手段发现病灶,并接受手术切除或免疫治疗等方式,生存率可高达 90%^[11]。因此,为了实施预防管理和提高食管癌的治疗效果,探寻一种检测精准、便捷且成本低廉的食管癌无创筛查技术和产品,具有重要意义。

3.2 唾液是一种唾液腺分泌的弱酸性液体,由于唾液腺血供丰富,唾液中含有广泛的蛋白质、电解质和核酸,且这些物质来源广泛,可反映个体的生理状态^[12-15]。miRNAs 参与了细胞的生长、分化、凋亡和免疫过程,并在恶性肿瘤的发生、发展中也发挥着重要的作用^[13,16-18]。2009 年 Park 等^[19]研究发现,口腔癌患者唾液及唾液上清液中至少有 50 种 miRNA 呈高表达,且其降解速度慢,稳定性较好。这为以 miRNAs 为标志物对消化道肿瘤进行早期鉴别提供了思路。

3.3 如今,唾液检测作为一种无创性的检测技术,愈来愈多的研究集中于相关标志物的开发,其中包括对远端组织和器官恶性肿瘤的检测^[15,18,20]。Setti 等^[21]通过系统评价的方式验证了唾液中的 miRNAs 可作为癌症诊断的可靠生物标志物。为了保证实验结果的可靠性,本研究方法参考了最新的唾液分离与定量检测方法^[22]。本课题组的既往研究^[4]发现,miRNA-144 在食管癌患者的唾液及唾液上清液中呈高表达,为进一步研究其在食管癌早期筛查中的应用价值提供了理论依据。而近期也有研究^[3]间接验证了 miRNA-144 是影响食管癌患者预后的一个独立危险因素。另外,有多项研究^[6,23]表明,miRNA-21 在消化道恶性肿瘤患者的血液中呈高表达,同时也有研究^[5,24]显示其

在唾液中可以检出。本研究结果显示,与健康者相比,食管癌患者唾液中 miRNA-144、miRNA-21 的表达水平显著提高,且与患者的病理分期存在关联性,随着肿瘤浸润进展以及远处转移的增加,唾液中两种 miRNA 的表达水平上升。ROC 曲线分析结果显示,miRNA-21 和 miRNA-144 诊断食管癌的 ROC 曲线下面积分别为 0.785、0.777,提示两种标志物均具有较好的诊断价值,且当联合两者检测时,诊断效能进一步提升。

3.4 相比于内镜活检等检查,目前唾液检测对于远处肿瘤的诊断价值仍然有限,但其易采集、非侵入的优势值得关注,且患者更易接受,更适宜大规模人群的筛查。本研究针对 miRNA-144、miRNA-21 的发现可作为未来开发食管癌快速检测试剂盒及仪器的理论基础。但是本研究也存在一些不足之处:(1) 研究针对 >60 岁的健康人群及食管癌确诊患者进行检测,没有纳入良性病变组,这使得研究结论难以在鉴别食管异常增生或溃疡的良恶性方面推广。(2) 研究未能在手术后或化疗治疗后随访患者唾液中 miRNA-144、miRNA-21 表达水平的变化情况,未能评判 miRNA-144、miRNA-21 对于预测患者预后的价值。在后续的研究中,我们将对此进行完善,以进一步评价 miRNA-144、miRNA-21 在食管癌患者早期筛查诊断及预后预测中的价值。

综上所述,食管癌患者唾液中 miRNA-144、miRNA-21 的表达水平呈高表达,其联合检测具有应用于食管癌早期筛查诊断的潜力。

参考文献

[1] 王宁,刘硕,杨雷,等. 2018 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2019,5(1):87-97.

[2] 李科,林国栋,许欢,等. 2004-2016 年广州市食管癌发病趋势分析[J]. 中国肿瘤,2020,29(9):672-676.

[3] 徐露娟,洪永贵,宋学坤,等. 血浆 miR-93、miR-144 检测在食管癌患者预后评估中的价值[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2020,29(12):1364-1368.

[4] 吴伟东,侯文进,吴哲凡,等. 唾液中 miRNA-144 可作为早期诊断食道癌的基因标志物[J]. 南方医科大学学报,2013,33(12):1783-1786.

[5] Xie ZJ, Chen G, Zhang XC, et al. Saliva supernatant miR-21: a novel potential biomarker for esophageal cancer detection[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012,13(12):6145-6149.

[6] 姚丽华,汪光蓉,蔡燕,等. miR-18a 和 miR-21 在食管癌中的表达及其对食管癌的诊断价值[J]. 中华肿瘤杂志,2019,41(2):107-111.

[7] Rice TW, Ishwaran H, Ferguson MK, et al. Cancer of the esophagus and esophagogastric junction: an eighth edition staging primer[J]. J Thorac Oncol, 2017,12(1):36-42.

[8] 易楠. 多原发食管癌的内镜诊断现状与展望[J]. 中国临床新医学,2018,11(10):1056-1060.

[9] 李国仁,戴建华. 我国早期食管癌筛查的研究进展[J]. 中华胸心血管外科杂志,2021,37(1):52-58.

[10] 孟茜茜,张子凡,程志远,等. 食管癌肿瘤标志物研究及临床应用进展[J]. 中国实用内科杂志,2019,39(7):634-639.

[11] 周益臣,马代远. 食管癌免疫治疗研究进展[J]. 中国临床新医学,2019,12(4):354-360.

[12] Kaczor-Urbanowicz KE, Wei F, Rao SL, et al. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019,1872(1):49-59.

[13] Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, et al. Saliva diagnostics—current views and directions[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2017,242(5):459-472.

[14] Sturque J, Berquet A, Loison-Robert LS, et al. Interest of studying the saliva metabolome, transcriptome and microbiome in screening for pancreatic cancer[J]. J Stomatol Oral Maxillofac Surg, 2019,120(6):554-558.

[15] Rapado-González Ó, Majem B, Muinelo-Romay L, et al. Human salivary microRNAs in cancer[J]. J Cancer, 2018,9(4):638-649.

[16] Zeng JH, Xiong DD, Pang YY, et al. Identification of molecular targets for esophageal carcinoma diagnosis using miRNA-seq and RNA-seq data from The Cancer Genome Atlas: a study of 187 cases[J]. Oncotarget, 2017,8(22):35681-35699.

[17] Zhong X, Huang G, Ma Q, et al. Identification of crucial miRNAs and genes in esophageal squamous cell carcinoma by miRNA-mRNA integrated analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2019,98(27):e16269.

[18] Kubfěková A, Slabý O. Use of salivary microRNAs for diagnosis of solid cancers[J]. Klin Onkol, 2018,31(4):249-259.

[19] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection[J]. Clin Cancer Res, 2009,15(17):5473-5477.

[20] Arantes LMRB, De Carvalho AC, Melendez ME, et al. Serum, plasma and saliva biomarkers for head and neck cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018,18(1):85-112.

[21] Setti G, Pezzi ME, Viani MV, et al. Salivary microRNA for diagnosis of cancer and systemic diseases: a systematic review[J]. Int J Mol Sci, 2020,21(3):907.

[22] Arunachalam SR, Tang KD, Punyadeera C. Isolation and quantification of microRNAs from human saliva[J]. Methods Mol Biol, 2019,2054:105-114.

[23] Sun G, Ye H, Wang X, et al. Autoantibodies against tumor-associated antigens combined with microRNAs in detecting esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Med, 2020,9(3):1173-1182.

[24] Xie Z, Chen G, Zhang X, et al. Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer[J]. PLoS One, 2013,8(4):e57502.

[收稿日期 2021-01-30][本文编辑 余军 吕文娟]

本文引用格式

古佳升,吴伟东,刘清峰,等. 唾液 miRNA-144 miRNA-21 联合检测对食管癌的诊断价值[J]. 中国临床新医学,2021,14(6):570-573.