

# 检测支气管肺泡灌洗液中的肿瘤标志物和 miR-29a、miR-34a 对肺癌诊断和分型的作用

王海, 周丽娜, 刁宏燕

**摘要:** 目的 探讨检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中的CEA、CA125、NSE、CyFRA21-1肿瘤标志物和miR-29a、miR-34a对肺癌诊断和分型的作用。方法 收集105例疑似肺癌患者BALF,分为肺部良性疾病组(C组)25例、小细胞肺癌组(SCLC组)22例、鳞癌组(SQ组)34例、腺癌组(AC组)24例,分别检测各组CEA、CA125、NSE、CyFRA21-1和miR-29a、miR-34a的水平,并对各组的数据进行统计学处理和比较。结果 SCLC组、SQ组、AC组3组的BALF中的CEA、CA125、NSE、CyFRA21-1水平均显著高于肺部良性疾病组( $P < 0.05$ ),而SCLC组、SQ组、AC组3组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ );SCLC组BALF中的miR-29a表达较SQ和AC两组显著下调( $P < 0.05$ ),而SQ和AC两组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ );AC组BALF中的miR-34a表达较SCLC和SQ两组显著下调( $P < 0.05$ ),而SCLC和SQ两组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 检测BALF中的肿瘤标志物和miR-29a、miR-34a对肺癌的诊断和分型具有重要的临床意义。

**关键词:** 支气管肺泡灌洗液; miR-29a; miR-34a; 肿瘤标志物; 肺癌分型

**中图分类号:** R734.2 R730.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2014)06-0971-03

## Effects of detecting tumor markers ,mir-29a and mir-34a in balf for lung cancer diagnosis and classification

WANG Hai ,ZHOU Li-na ,DIAO Hong-yan. Department of Clinical Laboratory ,Tongde Hospital of Zhejiang ,Hangzhou 310012 Zhejiang ,China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of detecting tumor markers(CEA ,CA125 ,NSE ,CyFRA21-1) ,miR-29a and miR-34a in BALF for lung cancer diagnosis and classification. **Methods** To analyze the levels of CEA ,CA125 ,NSE ,CyFRA21-1 and miR-29a ,miR-34a in BALF of 105 suspected patients with lung cancer ,the patients were divided into four groups( 25 patients with benign lung disease ,22 with SCLC ,34 with SQ and 24 with AC ); the data of these groups were analyzed statistically and compared. **Results** Compared with the benign lung disease group ,the levels of CEA ,CA125 ,NSE ,CyFRA21-1 in BALF of patients in SCLC ,SQ and AC group were significantly increased( $P < 0.05$ ) , while there were no significant differences in SCLC ,SQ and AC group. Compared with the SQ group and the AC group , the levels of miR-29a in BALF of the SCLC group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) ,while there were no significant differences between the SQ group and the AC group. Compared with the SCLC group and the SQ group ,the levels of miR-34a in BALF of the AC group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) ,while there were no significant differences between the SCLC group and the SQ group. **Conclusion** The levels of tumor markers ,miR-29a and miR-34a in BALF had a great clinical value for lung cancer diagnosis and classification.

**Key words:** BALF; miR-29a; miR-34a; Tumor markers; Lung cancer classification

自1985年以来,肺癌已成为全世界发病率和病死率最高的恶性肿瘤,虽然目前外科手术及联合治疗有了很大的进展<sup>[1]</sup>,但是肺癌的5年生存率仍然只有约15%<sup>[2]</sup>。要提高肺癌的5年生存率有两种方法,一是早期诊断、早期手术治疗<sup>[3]</sup>;二是针对不同类型的肺癌采用不同的治疗方案<sup>[4]</sup>。分子靶向治疗被认为是特异性最高的肺癌个体化治疗方案<sup>[5]</sup>,但这要求对肺癌进行准确分型。本文笔者通过对105例疑似肺癌患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中的CEA、CA125、NSE、CyFRA21-1肿瘤标志物和miR-29a、miR-34a的表达情况进行检测,以探讨其在肺癌诊断和分型中的应用价值,现将本研究结果报告如下。

基金项目:浙江省公益技术应用研究项目(2013C37066)

作者单位:310012 杭州市,浙江省立同德医院检验科(王海);  
肿瘤科(周丽娜);浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室(刁宏燕)

通讯作者:王海 E-mail: wanghai.5188@163.com

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

1.1.1 实验标本的收集 应用Olympus BFB3R型纤维支气管镜(纤支镜)行常规检查,于活检和刷检前做支气管肺泡灌洗,回收的BALF经单层纱布过滤2次,4℃ 1200 r/min离心10 min,弃上清,沉渣置液氮中保存(-80℃)。共收集105名疑似肺癌患者的BALF。

1.1.2 实验分组 经组织学和细胞学确诊,105例疑似肺癌患者被分成4组:肺部良性病变组(C组)25例、小细胞肺癌组(SCLC组)22例、肺鳞癌组(SQ组)34例和肺腺癌组(AC组)24例;肺部良性病变组作为对照组(C组),其余各组为观察组。所有患者的诊断均符合美国胸科医师协会(ACCP)《肺癌诊断和治疗指南》的标准。

1.2 仪器与试剂 雅培I2000全自动微粒子化学发光免疫分析仪及原装试剂;新产业MAGLUMI 2000全自动化学发光免疫分析仪及原装试剂;BIO-RAD CFX96实时荧光PCR仪,miR-29a和miR-34a试剂盒购自上海冠泰生物科技有限公司。

### 1.3 研究方法

1.3.1 肿瘤标志物检测 采用雅培 I2000 全自动微粒子化学发光免疫分析仪检测 BALF 中的 CEA 和 CA125; 采用新产业 MAGLUMI 2000 全自动化学发光免疫分析仪检测 BALF 中的 NSE 和 CyFRA21-1。

1.3.2 miR-29a 和 miR-34a 检测 运用分子信息学方法获取 miR-29a 和 miR-34a 的序列信息; 使用 primer 5 引物设计软件设计 miR-29a 和 miR-34a 特异性引物; RNA 的分离提取按 TRIzol 试剂说明书进行, 逆转录产物采用荧光 PCR 仪进行荧光定量 PCR, 用 SYBR Green Mater Mix 试剂检测待测的基因的 mRNA 水平, 共重复检查 3 次, mRNA 水平用管家基因(U6)引物作内对照, 反应条件: 95 °C 10 min, 94 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 90 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 1 min。基因的表达

采用  $\Delta Ct$  方法定量分析,  $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{U6}$  反应各组 BALF 中 miR-29a 和 miR-34a 的表达情况。

1.4 统计学方法 数据均采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 对于符合正态性分布的数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 2 组间比较采用独立样本  $t$  检验, 取  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组支气管肺泡灌洗液中的肿瘤标志物检测结果 详见表 1。由表 1 结果可见: SCLC 组、SQ 组、AC 组 3 组的 CEA、CA125、NSE、CyFRA21-1 水平均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 而 SCLC 组、SQ 组、AC 组 3 组之间的 CEA、CA125、NSE、CyFRA21-1 水平均差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组疑似肺癌患者支气管肺泡灌洗液中的肿瘤标志物的浓度 (ng/ml)

组别	例数	CEA	$t$ 值	$P$ 值	CA125	$t$ 值	$P$ 值	NSE	$t$ 值	$P$ 值	CyFRA21-1	$t$ 值	$P$ 值
C 组	25	12.55 ± 6.52			93.47 ± 38.82			6.17 ± 2.19			19.54 ± 5.17		
SCLC 组	22	48.63 ± 17.55 <sup>a</sup>	9.57	<0.05	489.80 ± 43.54 <sup>a</sup>	35.57	<0.05	39.06 ± 17.83 <sup>a</sup>	10.68	<0.05	68.43 ± 30.23 <sup>a</sup>	4.32	<0.05
SQ 组	34	53.52 ± 19.26 <sup>a</sup>	10.19	<0.05	512.61 ± 83.59 <sup>a</sup>	23.26	<0.05	34.38 ± 17.34 <sup>a</sup>	8.07	<0.05	88.61 ± 44.78 <sup>a</sup>	7.66	<0.05
AC 组	24	46.58 ± 15.21 <sup>a</sup>	10.25	<0.05	497.67 ± 69.15 <sup>a</sup>	25.31	<0.05	31.42 ± 16.67 <sup>a</sup>	7.36	<0.05	82.88 ± 38.76 <sup>a</sup>	8.09	<0.05

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

2.2 各型肺癌组支气管肺泡灌洗液中的 miR-29a、miR-34a 的表达水平 详见表 2。由表 2 结果可见: SCLC 组 BALF 中的 miR-29a 表达较 SQ 组和 AC 组均显著下调 ( $P < 0.05$ ), AC 组 BALF 中的 miR-34a 表达较 SCLC 组显著下调 ( $P < 0.05$ ), 但 SQ 组和 SCLC 组之间 miR-34a 的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各型肺癌组支气管肺泡灌洗液中的 miR-29a、miR-34a 的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	miR-29a	$t$ 值	$P$ 值	miR-34a	$t$ 值	$P$ 值
SCLC 组	22	-2.52 ± 0.52			-3.42 ± 0.57		
SQ 组	34	-5.55 ± 0.69 <sup>a</sup>	-17.60	<0.05	-3.15 ± 0.46	1.95	>0.05
AC 组	24	-5.78 ± 0.78 <sup>a</sup>	-16.52	<0.05	-1.20 ± 0.85 <sup>a</sup>	10.77	<0.05

注: 与 SCLC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 SQ 组和 AC 组支气管肺泡灌洗液中的 miR-29a、miR-34a 的表达水平 详见表 3。由表 3 结果可见: SQ 组和 AC 组之间 miR-29a 的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而 AC 组 BALF 中的 miR-34a 表达较 SQ 组显著下调 ( $P < 0.05$ )。

表 3 SQ 组和 AC 组支气管肺泡灌洗液中的 miR-29a、miR-34a 的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	miR-29a	miR-34a
SQ 组	34	-5.55 ± 0.69	-3.15 ± 0.46
AC 组	24	-5.78 ± 0.78	-1.20 ± 0.85 <sup>a</sup>
$t$ 值		-1.18	10.84
$P$ 值		>0.05	<0.05

注: 与 SQ 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

肺癌早期肿瘤标志物产生量较少, 在血清中难以检测出来, 而 BALF 取自病变局部的支气管肺泡内, 所以 BALF 中的肿瘤标志物比血清中出现的更早、浓度更高<sup>[6]</sup>。相对来说, 检测 BALF 中的肿瘤标志物对于肺癌的早期诊断更有意义。本研究结果显示, SCLC、SQ、AC 3 型肺癌患者 BALF 中的 CEA、CA125、NSE、Cy-

FRA21-1 浓度均显著高于肺部良性病变患者 ( $P < 0.05$ )。这与有关报道<sup>[7-8]</sup>是一致的, 因此检测 BALF 中的肿瘤标志物对肺癌的诊断具有重要的意义, 这种检测方法很有可能作为新的、无创伤的肺癌检测手段应用于临床; 而 SCLC、SQ、AC 3 型肺癌患者之间肿瘤标志物浓度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 因此检测 BALF 中的肿瘤标志物不具有肺癌分型的作用。

治疗肺癌的手段有多种, 其中肺癌分子靶向治疗已经成为肺癌治疗的一个新的热点, 而对肺癌患者进行分子靶向治疗的前提是肺癌的准确分型<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, SCLC 组 BALF 中的 miR-29a 表达较 SQ 组和 AC 组显著下调 ( $P < 0.05$ ), AC 组 BALF 中的 miR-34a 表达较 SCLC 组和 SQ 组显著下调 ( $P < 0.05$ ), 这与 Huang W 等<sup>[10]</sup>在用 2 种 miRNA 对肺癌支气管刷检标本进行 3 种肺癌亚型的区分中报告的结论是一致的。本研究结果同时还显示, miR-29a 在 SQ 组和 AC 组的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), miR-34a 在 SCLC 组和 SQ 组的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。因此我们可以利用以上这些特点, 通过检测肺癌患者 BALF 中 miR-29a 和 miR-34a 的表达情况来区分肺癌的类型, 进而为临床选择最佳治疗方案提供理论依据。国内外多数采用组织活检标本<sup>[11-12]</sup>研究肺癌 miRNAs, 而本研究中采用的是 BALF, 这种检测方法不仅避免了肿瘤活检组织的样本量小、采集难度大的缺点, 而且也避免了手术存在的医疗风险。这种检测方法不仅适用于手术患者, 也适用于非手术患者、无法通过穿刺采集组织的患者以及无法通过支气管镜采集组织的患者, 极大的提高了检测范围。

综上所述, 检测 BALF 中的 CEA、CA125、NSE、Cy-FRA21-1 肿瘤标志物和 miR-29a、miR-34a 对肺癌的诊断和分型具有重要意义, 可以为选择肺癌治疗方案提供理论依据。这种检测方法不仅简单易(下转第 990 页)

bladder[J]. *Int J Urol* 2008, 15(1): 62-67.

[4] 刘宁, 刘春林, 冯超, 等. 托特罗定联合盆底电刺激治疗女性膀胱过度活动症效果观察[J]. *中国综合临床* 2012, 28(8): 867-869.

[5] 许克新, 王建业. 膀胱过度活动症的现状及展望[J]. *中华泌尿外科杂志* 2012, 33(9): 708-710.

[6] Kaya S, Akbayrak T, Beksaç S. Comparison of different treatment protocols in the treatment of idiopathic detrusor overactivity: A randomized controlled trial[J]. *Clin Rehabil* 2011, 25: 327-333.

[7] Hashim H, Abrams P. How should patients with an overactive bladder manipulate their fluid intake[J]. *BJU Intl* 2008, 102: 62-64.

[8] 张晓红, 王建六, 崔恒. 生物反馈盆底肌肉训练治疗女性压力性尿失禁[J]. *中国妇产科临床杂志* 2004, 5(1): 12-14.

[9] 杨为民, 袁晓奕. 膀胱过度活动症的诊断与治疗进展[J]. *临床泌尿外科杂志* 2011, 26(1): 1-3.

[10] Giannantoni A, Rossi A, Mearini E, et al. Botulinum toxin A for overactive bladder and detrusor muscle overactivity in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy[J]. *J Urol* 2009, 182(4): 1453-1457.

[11] Chapple C, Herschorn S, Abrams P, et al. Tolterodine treatment improves storage symptoms suggestive of overactive bladder in men treated with alpha-blockers[J]. *Eur Urol* 2009, 56(3): 534-541.

[12] 王涛. 索利那新治疗膀胱过度活动症 198 例疗效分析[J]. *海南医学* 2012, 23(14): 75-76.

[13] Malhotra B, Darsey E, Crownover P, et al. Comparison of pharmacokinetic variability of fesoterodine vs. tolterodine extended release in cytochrome P450 2D6 extensive and poor metabolizers[J]. *Br J Clin Pharmacol* 2011, 72(2): 226-234.

[14] Kelleher CJ, Dmochowski RR, Berriman S, et al. Sustained improvement in patient-reported outcomes during long-term fesoterodine treatment for overactive bladder symptoms: pooled analysis of two open-label extension studies[J]. *BJUI* 2012, 110(3): 392-400.

[15] Hoti E, Censi R, Ricciutelli M, et al. Validation of an HPLC-MS method for rofecoxib tablet dissolution analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal* 2008, 47(2): 422-428.

[16] Hanchanale VS, Rao AR, Martin FL, et al. The unusual history and the urological applications of botulinum neurotoxin[J]. *Urol Int*, 2010, 85(2): 125-130.

[17] Mouttalib S, Khan S, Castel-Lacanal E, et al. Risk of urinary tract infection after detrusor botulinum toxin A injections for refractory neurogenic detrusor overactivity in patients with no antibiotic treatment [J]. *BJU Int* 2010, 106(11): 1677-1680.

[18] Mehnert U, Birzele J, Reuter K, et al. The effect of botulinum toxin type a on overactive bladder symptoms in patients with multiple sclerosis: a pilot study[J]. *J Urol* 2010, 184(3): 1011-1016.

[19] Kulaksizoglu H, Parman Y. Use of botulinum toxin-A for the treatment of overactive bladder symptoms in patients with Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord* 2010, 16(8): 531-534.

[20] Djavan B, Margreiter M, Dianat SS. An algorithm for medical management in male lower urinary tract symptoms[J]. *Curr Opin Urol*, 2011, 21(1): 5-12.

[21] 李昆城. 男性膀胱过度活动症中医治疗进展[J]. *中华实用中西医杂志* 2008, 21(1): 51-54.

[22] Goldman HB, Amundsen CL, Mangel J, et al. Dorsal genital nerve stimulation for the treatment of overactive bladder symptoms[J]. *Neurourol Urodyn* 2008, 27(6): 499-503.

[23] Bannowsky A, Wefer B, Braun PM, et al. Urodynamic changes and response rates in patients treated with permanent electrodes compared to conventional wire electrodes in the peripheral nerve evaluation test[J]. *World J Urol* 2008, 26(6): 623-626.

[24] Sexton CC, Nottle SM, Maroulis C, et al. Persistence and adherence in the treatment of overactive bladder syndrome with anticholinergic therapy: a systematic review of the literature[J]. *Int J Clin Pract* 2011, 65(5): 567-585.

[25] Paquette A, Gou P, Tannenbaum C. Systematic review and meta-analysis: do clinical trials testing antimuscarinic agents for overactive bladder adequately measure central nervous system adverse events[J]. *J Am Geriatr Soc* 2011, 59(7): 1332-1339.

[26] Chancellor MB, Staskin DR, Kay GG, et al. Blood brain barrier permeation and efflux exclusion of anticholinergics used in the treatment of overactive bladder[J]. *Drugs Aging* 2012, 29(4): 259-273.

[27] Osman NI, Mangera A, Chapple CR. Overactive bladder syndrome: basic mechanisms and current therapy[J]. *Chinese Journal of Urology* 2012, 33(9): 699-704.

[28] Kullmann FA, Downs TR, Artim DE, et al. Urothelial beta-3 adrenergic receptors in the rat bladder[J]. *Neurourol Urodyn* 2011, 30(1): 144-150.

[29] 张爱健, 刘孝东. 膀胱粘膜上皮与膀胱过度活动症关系的研究进展[J]. *国际泌尿系统杂志* 2012, 32(5): 662-666.

收稿日期: 2013-05-07

(上接第 972 页)

行, 而且适用于几乎所有疑似肺癌患者, 值得临床推广应用。

参考文献

[1] 刘明强, 洪志鹏. 肺肿瘤手术治疗的现状与未来[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)* 2013, 6(1): 69-72.

[2] Li M, Liu L, Liu Z, et al. The status of KRAS mutations in patients with non-small cell lung cancers from mainland China[J]. *Oncol Rep* 2009, 22(5): 1013-1020.

[3] 黄佳, 赵晓菁, 林皓, 等. 单向四孔法全胸腔镜肺叶切除术治疗非小细胞肺癌的临床研究[J]. *中国胸心血管外科临床杂志* 2013, 19(2): 125-129.

[4] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380-2388.

[5] Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments[J]. *Clin Cancer Res* 2008, 14(4): 957-960.

[6] 张绍武, 宁洁. 肺泡灌洗液中肿瘤标志物的联合检测在肺癌诊断

中的价值[J]. *现代肿瘤医学* 2011, 19(5): 908-910.

[7] 凌丽. 血清及支气管肺泡灌洗液肿瘤标志物测定对肺癌的诊断意义[J]. *临床和实验医学杂志* 2009, 11(8): 13-14.

[8] 戚均超, 孟曙芳, 周海英. 血清和肺泡灌洗液中肿瘤标志物检测对肺癌的诊断价值分析[J]. *放射免疫学杂志* 2009, 15(3): 284-286.

[9] Jang TW, Oak CH, Chang HK, et al. EGFR and KRAS mutations in patients with adenocarcinoma of the lung[J]. *Korean Intern Med*, 2009, 24(1): 48-54.

[10] Huang W, Hu J, Yang DW, et al. Two microRNA panels to discriminate three subtypes of lung carcinoma in bronchial brushing specimens[J]. *Am Respir Crit Care Med* 2012, 186(11): 1160-1167.

[11] Mascaux C, Laes JF, Anthoine G, et al. Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis[J]. *Eur Respir* 2009, 33(5): 352-359.

[12] Yang Y, Yang Q, Wang X, et al. The role of microRNA in human lung squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Genet Cytogenet* 2010, 200(1): 127-133.

收稿日期: 2013-09-14