

粪便 miR-92a 在结直肠癌患者术后复发转移中的诊断价值研究

黄瑶¹, 杨成¹, 汪蓉¹, 郑清琼¹, 杨旭丹²

1. 成都市温江区人民医院, 四川 成都 611100; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学附属医院), 四川 成都 610072

【摘要】目的 探讨粪便 miR-92a 在结直肠癌患者术后复发转移的诊断价值。**方法** 选取 2019 年 1 月至 2021 年 12 月间在成都市温江区人民医院就诊并完成手术的结直肠癌患者 83 例为研究组, 同期在该院行健康体检的健康个体 39 例为对照组, 检测两组粪便 miR-92a。术后对患者进行 2 年随访, 观察其 PFS 情况并分析 miR-92a 对患者术后 PFS 的预测价值。**结果** 研究组 miR-92a CT 值低于对照组, 复发转移患者 miR-92a CT 值低于无复发转移患者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Cox 回归分析显示, miR-92a 联合 TNM 是患者术后 PFS 的重要影响因素 ($P < 0.05$)。ROC 结果显示, miR-92a 预测患者术后 PFS 的 AUC 为 0.892。miR-92a 低 CT 值的患者 PFS 更短 ($P < 0.05$)。**结论** 粪便 miR-92a 在结直肠癌患者术后复发转移患者中 CT 值显著偏低, 结合 TNM 分期是患者术后 PFS 的重要影响因素, 可有效预测患者预后。

【关键词】 miR-92a; 结直肠癌; 术后复发转移; 预测效能

【中图分类号】 R735.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-6170(2025)01-0135-0

The diagnostic value of fecal miR-92a in postoperative recurrence and metastasis of colorectal cancer patients

HUANG Yao¹, YANG Cheng¹, WANG Rong¹, ZHENG Qing-qiong¹, YANG Xu-dan²

1. Wenjiang District People's Hospital, Chengdu 611100, China; 2. Sichuan Academy of Medical Sciences · Sichuan Provincial People's Hospital (Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology of China), Chengdu 610031, China

【Corresponding author】 YANG Xu-dan

【Abstract】Objective To investigate the diagnostic value of fecal miR-92a in postoperative recurrence and metastasis of colorectal cancer patients. **Methods** A total of 83 patients with colorectal cancer who received treatment and completed surgery in our hospital from January 2019 to December 2021 were selected as a study group. At the same time, 39 healthy individuals who underwent physical examination were selected as a control group. The fecal miR-92a was detected. The patients were followed up for 2 years after surgery to observe their progression-free-survival (PFS) status and analyze the predictive value of miR-92a for postoperative PFS. **Results** The CT value of miR-92a in the study group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The CT value of miR-92a in patients with recurrence and metastasis was lower than that in patients without recurrence and metastasis ($P < 0.05$). Cox analysis showed that miR-92a combined with TNM stage was an important factor affecting postoperative PFS in patients ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the curve of postoperative PFS predicted by miR-92a was 0.892. Patients with low CT values of miR-92a had shorter PFS. **Conclusion** The CT value of fecal miR-92a is significantly lower in patients with colon cancer and postoperative recurrence and metastasis. Combined with TNM stage, miR-92a is an important factor affecting postoperative PFS of patients. Therefore, it can be used as a diagnostic marker for the prognosis of patients.

【Key words】 miR-92a; Colorectal cancer; Postoperative recurrence and metastasis; Predictive effectiveness

结直肠癌发病率在恶性肿瘤中位居第三位, 死亡率位居第二位^[1], 2020 年中国新增结直肠癌患者数量突破 55.5 万例, 死亡人数达约 28.6 万人^[2]。某些西方国家在结直肠癌方面取得了显著进展, 其发病及致死率均展现出明显的下降态势。但我国的情况仍不容乐观, 结直肠癌的发病率与死亡率仍保持着上升的趋势^[3]。对于早期阶段的结直肠癌患者, 采取手术治疗能够精确且有效地移除肿瘤组织, 达到较为理想的治疗效果^[4], 但术后仍存在不容忽视的复发与转移风险, 这些风险可能对患者的预后产生不利影响, 甚至危及患者生命^[5]。因此, 找到结直肠癌复发监测分子生物标志物并检测至关重要。

微小核糖核酸 (microRNAs, miRNA) 是一种小的非编码 RNA, 是基因表达的主要调节因子之一。它广泛地影响着遗传和细胞过程, 包括增殖、发育、分化、凋亡、炎症和应激反应等^[6,7]。miRNA 失调可具有肿瘤抑制因子或癌基因的功能^[8], 其通过下调不同的癌基因以促进细胞增殖、侵袭和转移、或受癌基因和肿瘤抑制基因的调控在肿瘤发生中发挥作用^[9]。对 miR-17/92 簇成员 miRNA-92a 的深入探究揭示, 此微小 RNA 分子在调节肿瘤形成的过程中扮演着至关重要的角色, 且在多种癌症类型中发生异常高表达现象, 其中包括但不限于结直肠癌^[10]。有研究发现, miR-92a 不仅在结直肠癌的早期筛查中具有一定的效果, 其在临床辅助诊断中也表现出显著的潜力^[11] (目前, 应用于结直肠癌的粪便 miR-92a 检测已通过国家药品监督管理局审批),

【基金项目】 成都市医学科研课题 (编号: 2022594)

【通讯作者】 杨旭丹

但其在术后复发转移领域暂无相关研究。Ki-67 是一类细胞增殖标志物,许多研究者因其增殖性将 Ki-67 作为肿瘤研究的辅助指标^[12]。研究发现,Ki-67 高表达可能是含有侵袭性癌细胞转移的生物标志物^[13]。因此,本研究收集我院结直肠癌患者进行粪便 miR-92a 水平检测,旨在探索其在术后复发与转移风险评估中的预测能力和效用,以期为该疾病的治疗方案优化和预后管理提供新的视角和依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 成都市温江区人民医院病理科 2019 年 1 月至 2021 年 12 月收治行手术治疗的结直肠癌患者 83 例。其中,男 53 例,女 30 例。年龄 35 ~ 96 岁[(66.41±13.22)岁]。纳入标准:①符合结直肠癌诊断标准^[14];②均接受手术治疗;③TNM 分期为 I ~ IV 期;④术前未接受生物治疗与放化疗。排除标准:①凝血功能障碍;②接受过结直肠癌相关治疗的结直肠癌患者;③患有其他恶性肿瘤,或患有其他严重影响身体机能的重大疾病,如免疫类疾病、脏器损伤或不全等。对照组 39 例为健康人群,男 22 例,女 17 例。年龄 39 ~ 77 岁[(62.47±10.81)岁]。研究组与对照组的年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者均签署知情同意书。本研究经伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 miR-92a 检测 本次收集的样本均为无创粪便样本。第一步:核酸提取。该步骤采用核酸提取试剂(深圳市晋百慧生物有限公司,货号:G06.0010.01)对目标样本进行提取。具体步骤如下:取 0.3 ~ 0.5 g 粪便样本放入离心管中。加入 0.9 ml 缓冲液 A,振荡 10 s,室温静置 5 min 使样品均匀分布,室温静置 5 min,4 °C 离心 2 min 后,吸取 0.5 ml 上清液至新的离心管中。继续加入 0.5 ml 缓冲液 B(Buffer B),振荡 10 s 混匀,室温静置 8 min;加入 0.2 ml 氯仿激烈振荡 10 s,静置 10 min。13000 rpm,4 °C,离心 10 min 后;吸取上清液 0.6 ml 至新的离心管中待用。在 96 孔板第一列孔中加入 500 μ l 无水乙醇、40 μ l 磁珠(Beads A)及 280 μ l 上清液(若上清液不足,补加 PBS 至 280 μ l),并记录样本孔位。在 96 孔板第二和第三列孔中加入 800 μ l 洗脱液 A(Wash A),第四和第五列孔加入 800 μ l 洗脱液 B(Wash B),第六列孔加入 120 μ l 0.1% DEPC 水。将已准备好的 96 孔板放入核酸提取仪中,进行目标 RNA 提取。第二步:反转录。具体步骤如下:反转录混合液严格按照说明书进行计算与分装将提取的 RNA 稀释到 6 ng/ μ l,取 5 μ l 加入装有 miR-92a 反转录混合液的 PCR 管(装有 miR-92a 反转录混合液)中,并加入 5

μ l 质控品 1、2 作为质控。随后进行反转录。反转录条件:16 °C 30 min;42 °C 30 min;85 °C 5 min;4 °C 2 min。第三步:PCR 扩增。该步骤采用 miR-92a 检测试剂盒(深圳市晋百慧生物有限公司,货号:G01.0001.01)通过实时荧光定量 PCR 分析仪(QIAGEN,型号:Rotor-Gene Q MDx)检测样本中 miR-92a 含量。基因扩增条件:①95 °C 预变性 2 min,1 个循环;②95 °C 8 s,60 °C 30 s,45 个循环。检测操作严格按照产品说明书操作。

1.2.2 Ki67 检测 本次检测样本为研究组术后石蜡组织样本。操作如下:将切片置于电热恒温干燥箱在 60 °C 下烤片 1 小时,随后将切片依次置于脱蜡液 I、II、III 内分别浸泡 5 min,于梯度酒精中各浸泡 2 min,纯水冲洗 30 s。将切片置于 3% 过氧化氢水溶液中浸泡 5 min,纯水冲洗 10 s。将切片放入装有抗原修复缓冲液的修复盒中,再把修复盒放入水浴锅中,沸腾加热 18 min,取出并自然降温 30 min,清洗液浸泡 5 min(2 次)。甩掉玻片上的液体,再用吸水纸吸干组织块边缘的液体,用免疫组化笔沿组织切片边缘划出阻水区域。按切片上的标记,滴加 Ki67 抗体试剂(厦门通灵生物医药科技股份有限公司)至完全覆盖标本,湿盒中室温下孵育 30 min。随后,清洗液浸泡 5 min(2 次)并滴加免疫显色试剂,室温孵育 20 min。随后,清洗液浸泡 5 min(2 次),甩去清洗液,滴加 DAB 染色液至完全覆盖标本,显色 5 min,纯水冲洗终止显色。甩去切片表面多余的液体,滴加苏木素染色液至完全覆盖标本,室温下染色 3 min,去除多余苏木素,纯水冲洗 30 s, PBS 浸泡 3 min 返蓝。切片依次在梯度酒精中各浸泡 2 min,用香味封片剂进行封片,封片后的切片置于晾片板,并于显微镜下观察切片的染色结果。

1.2.3 随访方法 每隔三月给患者打电话随访其复发情况,并记录其复发状况与复发时间。

1.2.4 观察指标 收集汇报复发患者的肠镜检查报告,临床确认复发后,纳入复发队列。

1.3 统计学方法 研究数据均用 SPSS 26.0 分析。计量资料采用均数±标准差表示,组间采用 t 检验,计数资料表示方法采用例数,采用 χ^2 检验。采用 Cox 分析患者术后复发转移的影响因素,使用 ROC 分析 miR-92a CT 值对术后复发转移的预测效能,并运用 Kaplan-Meier 分析生存曲线。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究组和对照组的 miRNA-92a CT 值比较 研究组 miR-92a CT 值(27.69±2.02)低于对照组(32.32±2.80),差异有统计学意义($t=9.213$, $P<0.05$)。

2.2 是否复发转移患者 miRNA-92a CT 值比较

术后对患者进行为期 2 年的随访,83 例患者失联 4 例,随访率 95.18%。79 例患者中,出现复发转移 27 例(34.18%)。复发转移患者 miR-92a CT 值均

低于无复发转移患者,差异有统计学意义($t = 7.327, P < 0.05$)。复发转移组与非复发转移组的一般情况比较见表 1。

表 1 复发转移组与非复发转移组的临床资料比较

临床资料	复发转移组(n=27)	未复发转移组(n=52)	统计量	P
年龄 ≥60 岁	22	36	$\chi^2 = 1.367$	0.242
<60 岁	5	16		
男性	18	33	$\chi^2 = 0.008$	0.978
TNM I ~ II 期	4	20	$\chi^2 = 4.699$	0.031
III ~ IV 期	23	32		
Ki67 ≥47.5%	13	16	$\chi^2 = 2.310$	0.129
<47.5%	14	36		
miRNA-92a CT 值	25.89±1.72	28.70±1.40	$t = 7.327$	<0.001

2.3 患者术后复发转移的影响因素的 Cox 回归分析

Cox 回归分析显示,TNM、miRNA-92a CT 值结合 TNM、Ki67 结合 miRNA-92a CT 值和 TNM 是患者术后复发转移的影响因素($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 影响患者复发的因素分析

因素	β	Wald χ^2	P	OR	95% CI
TNM(I vs II vs III vs IV)	0.786	5.316	0.021	2.194	1.125 ~ 4.277
Ki67 结合 miRNA-92a CT 值和 TNM	0.618	5.097	0.015	1.855	1.127 ~ 3.053
miRNA-92a CT 值结合 TNM	1.184	19.813	<0.001	3.266	1.939 ~ 5.500

2.4 miRNA-92a CT 值对结直肠癌术后复发与转移预测效能的 ROC 曲线分析

miRNA-92a CT 值的检测敏感性为 74.1%,特异性为 88.5%,预测效能 AUC 为 0.892($P < 0.005$),且具有较高的敏感性和特异性截断值(cut-off value)为 27.2。势可能受多种因素影响,包括家族遗传倾向、不健康的饮食习惯、过度饮酒以及吸烟等,均被视为潜在的致病诱因。随着肿瘤的发生与发展,会出现便血、频繁腹泻、腹部疼痛等症状,威胁患者的生命健康^[15,16]。尽管手术治疗通常被视为结直肠癌患者的首选治疗方案,然而,值得注意的是,部分患者在接受手术后仍可能面临复发与转移的风险,这对患者的预后构成了不利影响。本研究中观察到结直肠癌患者在术后两年内复发与转移的发生率高达 34.18%,该数据进一步证实了临床复发与转移问题的严峻性。因此,探索并确立一种准确且可靠的预测标志物,对于提前识别高风险患者、优化治疗策略及最终改善患者的预后状况尤为重要。

2.5 miRNA-92a CT 值与患者 PFS 的关系

以 miRNA-92a CT 值截断值 27.2 为界,miRNA-92a CT 值分为高 CT 值(≥ 27.2)。miRNA-92a 高 CT 值患者术后复发转移 7 例;miRNA-92a 低 CT 值患者术后复发转移 20 例,两组差异有统计学意义($t = 72.578, P < 0.05$)。见图 1。

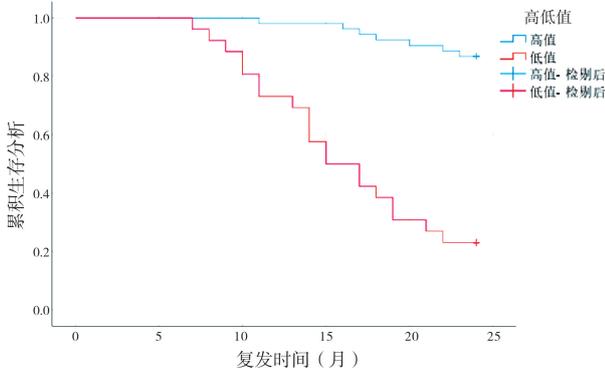


图 1 miR-92a CT 值与患者 PFS 关系

3 讨论

结直肠癌在中老年人群中具有较高的发病率。但近年来,其发病年龄正逐渐趋向年轻化。这一趋

目前已有研究成果揭示,粪便 miRNA 在结直肠癌早期诊断中展现出了巨大的潜力,为疾病的早期发现提供了新的可能^[17,18]。现有研究报道显示,在结直肠癌的诊断中,粪便 miR-92a 敏感度 87.3%,特异性 86.9%,具有一定的诊断价值^[19]。值得注意的是,在对结直肠癌患者行肿瘤切除手术后,患者粪便中的 miR-92a 水平显著下降,这进一步印证了其在监测疾病状态及治疗效果方面的潜力^[20]。在我国以肠镜为金标准的一项多中心临床试验研究中发现,miR-92a 在结直肠癌诊断中敏感度和特异性均高达 87%,早期检出率也达 84%,且术后患者粪便 miR-92a 水平显著下降^[19]。目前,miR-92a 粪便检测作为结直肠癌诊断的一种手段,已经顺利

通过了国家药品监督管理局的严格审核与批准,正式纳入临床应用的范畴。

中晚期阶段的 III ~ IV 期的结直肠癌患者多已错失了手术治疗的黄金时机。由于此阶段肿瘤往往展现出较高的恶性程度、较大的体积以及伴随的淋巴结转移等复杂情况,导致术后效果欠佳,难以达到完全清除肿瘤组织的目标。这使患者治疗后仍面临较高的肿瘤复发或远处转移的风险,对患者的长期生存和生活质量构成了严重威胁^[21]。Cox 分析显示, TNM (OR = 2.194)、miRNA-92a CT 值结合 TNM (OR = 3.266)、Ki67 结合 miRNA-92a CT 值和 TNM (OR = 1.855),说明肿瘤增殖因子 Ki67 不适用于结直肠癌的复发预测,而 miRNA-92a CT 值联合 TNM 分期是患者术后 SPF 的重要影响因素。因此,临床医生应对这类患者给予格外的重视,并积极采取适宜且高效的治疗策略,以减轻或规避因术后复发与转移所带来的潜在风险。本研究 ROC 曲线结果显示, miR-92a CT 值与患者 PFS 关系为 0.892,这说明 miR-92a 检测可作为一种预测术后复发与转移风险的手段,对患者的复发风险进行评估,并提前采取针对性的有效治疗措施。通过降低术后复发与转移的风险,进一步改善患者的预后情况^[22]。

综上所述,在结直肠癌患者及术后出现复发或转移的患者的粪便中 miR-92a CT 值显著降低,而 miR-92a 的 CT 值与患者 TNM 分期结合是预测患者术后是否会发生复发转移的独立危险因素,且 miRNA-92a CT 值低的患者预后较好。因此,miR-92a 在结直肠癌患者术后复发与转移的预测中具有较高的预测效能。但本研究样本量有限,结论具有一定的局限性,未来需要扩大样本量,以验证本研究的发现,为临床实践提供可靠的依据。

【参考文献】

- [1] Chan SCH, Liang JQ. Advances in tests for colorectal cancer screening and diagnosis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2022, 22(4): 449-460.
- [2] Chen H, Lu B, Dai M. Colorectal cancer screening in China: status, challenges, and prospects-China, 2022 [J]. *China CDC Wkly*, 2022, 4(15): 322-328.
- [3] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590.
- [4] Jeng FY, Yu JH, Yih JC, et al. Preoperative cancer inflammation prognostic index as a superior predictor of short-and long-term outcomes in patients with stage I-III colorectal cancer after curative surgery[J]. *Cancers*, 2022, 14(24): 6232.
- [5] Fumishi K, Yosuke T, Yoko Y, et al. Exploration of predictive biomarkers for postoperative recurrence of stage II/III colorectal cancer using genomic sequencing [J]. *Cancer Med*, 2022, 11(18): 3457-3470.
- [6] Hashemi A, Gorji-Bahri G. MicroRNA: promising roles in cancer therapy[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020, 21(12): 1186-1203.
- [7] Santos DAR, Gaitero C, Santos M, et al. MicroRNA biomarkers as promising tools for early colorectal cancer screening-a comprehensive review[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 11023.
- [8] Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, et al. MicroRNAs in human cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 774(2): 1-20.
- [9] Wang H. MicroRNAs and apoptosis in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5353.
- [10] Zhao W, Gupta A, Krawczyk J, et al. The miR-17-92 cluster: Yin and Yang in human cancers[J]. *Cancer Treat Res Commun*, 2022, 33: 100647.
- [11] Lin J, Zhang L, Chen M, et al. Evaluation of combined detection of multigene mutation and SDC2/SFRP1 methylation in stool specimens for colorectal cancer early diagnosis[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2022, 37(6): 1231-1238.
- [12] Wei F, Xu L. Research progress of the correlation between Ki-67, nm23 and colorectal cancer[J]. *Southwest Military Surgeon*, 2013, 15(6): 626-628.
- [13] Hayashi H, Beppu T, Sakamoto Y, et al. Prognostic value of Ki-67 expression in conversion therapy for colorectal liver-limited metastases[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(3): 1225-1233.
- [14] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2020年版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 40(6): 601-625.
- [15] Reichler C, Scheibe K, Schmie A, et al. STAT3 activation through IL-6/IL-11 in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal tumour development and correlates with poor prognosis [J]. *Gut*, 2020, 69(7): 1269-1282.
- [16] Sánchez Gómez CA, Tejido Sandoval C, de Vicente Bielza N, et al. Surgical complications in a population-based colorectal cancer screening program: Incidence and associated factors [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2022, 45(9): 660-667.
- [17] Ren A, Dong Y, Tsoi H, et al. Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 2810-2823.
- [18] Yau TO, Tang CM, Harriss EK, et al. Faecal microRNAs as a non-invasive tool in the diagnosis of colonic adenomas and colorectal cancer: A meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9491.
- [19] Chen Y, He W, Chen M, et al. MiR-92a expression profiling of exfoliated colonocytes isolated from feces for colorectal cancer screening [J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15(4): 2585-2597.
- [20] Wu CW, Ng SS, Dong YJ, et al. Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps[J]. *Gut*, 2012, 61(5): 739-745.
- [21] Jung HS, Ryoo SB, Lim HK, et al. Tumor Size > 5cm and Harvested LNs < 12 Are the Risk Factors for Recurrence in Stage I Colon and Rectal Cancer after Radical Resection[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(21): 5294.
- [22] 任斌, 吐达洪, 陈建新, 等. 粪便 SDC2 基因甲基化、血清 CY-FRA21-1 联合检测对结直肠癌术后复发转移的预测效能[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2023, 45(5): 493-497.

(收稿日期: 2024-07-12; 修回日期: 2024-10-16)

(本文编辑: 侯晓林)