

粪便 miRNA 对结直肠进展期腺瘤 无创筛查的临床价值

崔倩倩¹, 李金鹏¹, 吴豫丹¹, 侯志平², 孙玮螺³, 崔盼盼³, 何培元³

(1.承德医学院研究生学院,河北承德067000;2.承德医学院基础医学院,河北承德067000;

3.承德医学院附属医院消化内科,河北承德067000)

摘要:目的 筛选粪便中与结直肠进展期腺瘤发生相关的 microRNAs(miRNAs),评估其在进展期腺瘤筛查及诊断中的临床价值。方法 选取2022年6月至2023年12月承德医学院附属医院收治的110例结直肠癌患者(结直肠癌组)和94例进展期腺瘤患者(进展期腺瘤组),另选取80例健康体检者(对照组)。送检5例结直肠癌患者癌组织与癌旁组织进行二代测序发现异常表达 miRNAs;收集20例健康体检者和30例结直肠癌患者粪便样本,采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)法对异常表达 miRNAs 进行检测,以获得粪便异常 miRNA;将结直肠癌组、进展期腺瘤组和对照组按照7:3比例随机分为训练队列和验证队列,采用 qRT-PCR 法对训练队列和验证队列中粪便异常 miRNA 表达进行检测,并通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评估 miR-29a-3p 的筛查及诊断效能。为验证 miR-29a-3p 的筛查和诊断效能,将同期接受结肠镜检查的3039例受试者作为观察组,必要时检查病理,计算进展期腺瘤检出率;另选取81例受试者作为筛查组,先检测粪便 miR-29a-3p,再检查结肠镜及必要的病理学,计算粪便 miR-29a-3p 升高者进展期腺瘤检出率。采用 χ^2 检验对观察组和筛查组检出率进行比较。结果 miRNA 组学检测发现5个差异表达的 miRNAs(let-7c-5p、miR-203a-3p、miR-122-5p、miR-29a-3p、miR-92b-3p);通过训练队列证实,miR-29a-3p 在进展期腺瘤组粪便中明显上调($P < 0.05$),粪便 miR-29a-3p 联合粪便隐血试验、性别及吸烟史用于进展期腺瘤诊断时 ROC 曲线下面积(area under curve, AUC)为0.840。通过验证队列进一步证实,miR-29a-3p 在进展期腺瘤组粪便中高表达($P < 0.05$),粪便 miR-29a-3p 联合粪便隐血试验、性别及吸烟史可用于进展期腺瘤诊断(AUC值为0.807)。以粪便 miR-29a-3p 升高作为筛查指标的筛查组进展期腺瘤的结肠镜检出率为39.2%,与观察组差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 miR-29a-3p 在进展期腺瘤组粪便中表达显著增高,粪便 miR-29a-3p 与粪便隐血试验、性别和吸烟史联合构建的预测模型对进展期腺瘤筛查和诊断有一定的临床应用价值。

关键词:进展期腺瘤;结直肠癌;粪便;诊断;生物标志物;microRNA-29a-3p

中图分类号:R735.3

文献标志码:A

Clinical value of fecal miRNA for non-invasive screening of advanced colorectal adenomas

CUI Qianqian¹, LI Jinpeng¹, WU Yudan¹, HOU Zhiping², SUN Weilu³, CUI Panpan³, HE Peiyuan³

(1. Graduate School, Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei, China; 2. Department of Basic Medical Science, Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei, China; 3. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei, China)

Abstract: Objective To screen out the candidate fecal microRNAs(miRNAs) that play a crucial role in the occurrence of advanced adenoma and evaluate their clinical value in the screening and diagnosis of advanced adenoma.

Methods From June 2022 to December 2023, 110 patients with colorectal cancer treated at the Affiliated Hospital of Chengde Medical University were selected as the colorectal cancer group, 94 patients with advanced adenoma as the

advanced adenoma group, and 80 healthy individuals undergoing physical examinations as the control group. Five colorectal cancer patients' cancerous and adjacent tissues were sequenced using next-generation sequencing to identify abnormally expressed miRNAs. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of abnormally expressed miRNAs in the faeces of 30 patients in the colorectal cancer group and 20 in the control group to obtain abnormal miRNAs in faeces. The colorectal cancer group, advanced adenoma group, and control group were randomly divided into a training cohort and a validation cohort in a 7:3 ratio. qRT-PCR was used to detect the expression of abnormal miRNAs in faeces in both cohorts, and the screening and diagnostic efficacy of miR-29a-3p was evaluated using the receiver operating characteristic (ROC) curve. To verify the screening and diagnostic efficacy of miR-29a-3p, 3,039 subjects who underwent colonoscopy during the same period were used as the observation group, with direct colonoscopy and pathological examination when necessary to calculate the detection rate of advanced adenomas. Eighty-one subjects were used as the screening group, with faecal miR-29a-3p detection followed by colonoscopy and pathology if necessary, to calculate the detection rate of advanced adenomas in those with elevated faecal miR-29a-3p. The chi-squared test was used to compare the detection rates of the observation and screening groups. **Results** Five miRNAs (let-7c-5p, miR-203a-3p, miR-122-5p, miR-29a-3p, miR-92b-3p) were significantly higher in cancer tissues than adjacent tissues. Through the training cohort, it was confirmed that miR-29a-3p was significantly upregulated in feces of the advanced adenoma group ($P<0.05$), and the area under the ROC curve (AUC) for the diagnosis of advanced adenomas using faecal miR-29a-3p in combination with faecal occult blood test, gender and smoking history was 0.840. Further confirmation by the validation cohort showed that miR-29a-3p was highly expressed in faeces of the advanced adenoma group ($P<0.05$), and the combination of faecal miR-29a-3p with fecal occult blood test, gender and smoking history could be used for the diagnosis of advanced adenomas (AUC=0.807). The colonoscopy detection rate of advanced adenomas in the screening group using elevated fecal miR-29a-3p as a screening indicator was 39.2%, which was statistically different from the observation group ($P<0.05$). **Conclusion** miR-29a-3p is significantly upregulated in feces of advanced adenoma patients, and fecal miR-29a-3p has a high clinical diagnostic value for advanced adenoma.

Key words: Advanced adenomas; Colorectal cancer; Faeces; Diagnosis; Biomarker; microRNA-29a-3p

进展期腺瘤是结直肠癌重要的癌前病变^[1],需及时治疗,否则可能在5年内出现癌变^[2],及早识别并干预进展期腺瘤,能达到理想的肠癌预防效果,也是通过筛查降低结直肠癌发病率的关键。进展期腺瘤需满足以下1项或多项:①息肉或病变直径 ≥ 10 mm;②绒毛状腺瘤或混合性腺瘤中绒毛样结构超过25%;③伴高级别上皮内瘤变者^[3]。目前内镜治疗被认为是进展期腺瘤及早期结直肠癌的一线治疗方案。相关研究提示,进展期腺瘤的5年生存率100%,早期结直肠癌的内镜下根治性切除率高达96.8%,5年生存率超过90%^[4],越早发现结直肠癌及癌前病变,患者的生存率越高^[5],在进展期腺瘤阶段进行干预治疗不仅医疗成本低而且预后好。通过筛查发现并切除进展期腺瘤,可显著降低结直肠癌的发病率及死亡率^[6]。由于设备及内镜医师数量等限制,结肠镜检查目前还远远不能达到应检尽检。临床迫切需求简便易行的无创进展期腺瘤筛查方法,从人群中筛选出易患进展期腺瘤的高危患者,以提高进展期腺瘤检出率优化医疗资源的应用。

研究表明,包括进展期腺瘤在内的癌前病变、早期结直肠癌及进展期结直肠癌各阶段都存在异常microRNAs(miRNAs),粪便miRNAs来源于肠道脱

落细胞,因此粪便中也可以检测到源于肿瘤细胞的异常miRNAs,甚至可以发现癌前病变^[7],加之miRNA非常稳定、不易降解,使之成为一种很有临床应用潜力的检测指标。本研究前期结肠癌miRNA组学检测结果发现,miR-29a-3p等多种miRNAs存在异常表达,但在进展期腺瘤及结直肠癌患者粪便中的表达尚不明确。本研究旨在探讨进展期腺瘤和结直肠癌患者粪便中的异常表达miRNAs,构建进展期腺瘤及结直肠癌的诊断模型,分析其在进展期腺瘤及结直肠癌筛查和诊断中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 研究对象

选取2022年6月至2023年12月承德医学院附属医院胃肠外科就诊的结直肠癌患者110例(结直肠癌组),其中男59例,女51例,32~88岁,平均63岁;选取同期消化内科就诊的进展期腺瘤患者94例(进展期腺瘤组),其中男61例,女33例,24~87岁,平均59岁。另选取健康体检者80例(对照

组),其中男 30 例,女 50 例,33~72 岁,平均 55 岁。送检 5 例结直肠癌患者癌组织与癌旁组织进行二代测序发现异常表达 miRNAs。收集对照组 20 例和结直肠癌组 30 例粪便样本,采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 法对异常表达 miRNAs (Log_2 |差异倍数| > 1.5 或 < -1.5, $P < 0.05$) 进行检测。将结直肠癌组、进展期腺瘤组和对照组按照 7:3 的比例通过随机数字表法分为训练队列与验证队列,采用 qRT-PCR 法及 ROC 曲线评估其诊断效能。同期收集在我院消化内镜中心接受结肠镜和病理检查患者 3 039 例(观察组),用于计算我院进展期腺瘤及结直肠癌内镜检出率。同时收集先检测粪便 miR-29a-3p,再接受结肠镜和病理检查患者 81 例(筛查组),以计算粪便 miR-29a-3p 升高者进展期腺瘤及结直肠癌内镜检出率。

1.1.2 纳入标准与排除标准

纳入标准:①术后结肠镜活检组织病理确诊为结直肠癌或进展期腺瘤,且为首次确诊;②既往均未接受任何放、化疗及生物治疗;③均对本研究知情同意。排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②合并胆囊切除史;③资料不完善;④既往接受消化道手术者;⑤存在严重肝肾功能损害及免疫缺陷。本研究经承德医学院附属医院医学伦理委员会批准(伦理批号:CYFYLL2023171)。所有研究对象均签署知情同意书。

1.1.3 主要试剂与仪器

粪便 RNA 提取试剂盒购自山东生物科技有限公司,miRcute 增强型 miRNAcDNA 第一链合成试剂盒、miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒均购自北京天根生化科技公司,大便隐血检测试剂盒(胶体金法)购自珠海科域生物工程股份有限公司。分光光度计(Nano Drop 2000)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,T100TM Thermal Cycler、CFX96TM Real-Time System 购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 粪便样本的处理

取所有受试者黄豆粒大小成型粪便样本于 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管,使用粪便 RNA 提取试剂盒提取粪便样本中的总 RNA,用 NanoVue plus 微量紫外分光光度计测量总 RNA 的浓度及纯度,将检测合格的总 RNA 使用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(天根)合成 cDNA。反应体系:RNA 3.75 L, 2×miRNA 反转录缓冲液 7.5 μL, miRNA 反转录混合酶 1.5 μL,无 RNA 酶双蒸水补齐至 15 μL。反应条件:42 °C, 60 min(miRNA 加尾及逆转录);95 °C,

3 min(酶灭活);4 °C(终止)。反应结束,将 cDNA 稀释 10 倍,用于 RT-qPCR 实验或储存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2.2 采用二代测序法检测癌组织中异常表达的 miRNAs

送检 5 例结直肠癌患者癌组织和癌旁组织,由深圳华大基因科技服务有限公司进行测序。测序结束后,以 Log_2 |差异倍数| > 1.5 或 < -1.5, $P < 0.05$ 为阈值,筛选差异表达的 miRNAs 分子。

1.2.3 采用 qRT-PCR 法检测粪便中 miRNAs 的表达

采用 miRNA 荧光定量检测试剂盒(天根)对上述 cDNA 进行 miRNA 荧光定量检测。反应条件:95 °C 预变性 15 min,94 °C 变性 20 s,60 °C 退火、延伸 34 s,42 个循环。miRNAs 的反向引物为荧光定量试剂盒中的通用引物。正向引物序列如下(5'-3'): U6: GCTTCGGCAGCACATATACTAAA; let-7c-5p: TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT; miR-203a-3p: GT-GAAATGTTTAGGACCACTAG; miR-122-5p: TGG-AGTGTGACAATGGTGTGGTT; miR-29a-3p: TAGCA-CCATCTGAAATCGGTTA; miR-92b-3p: TATTG-CACTCGTCCCGGCCTCC。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算粪便样本中 miRNA 的相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计学软件。计量资料通过 Kolmogorov-Smirno 检验判断是否服从正态分布。符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析。组间进行进一步两两比较时,方差齐采用 LSD 分析。计量资料不符合正态分布以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数检验。计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验。多因素 Logistic 回归分析进展期腺瘤和结直肠癌发生的影响因素。将受试者按照 7:3 的比例通过随机数字表法分为训练队列与验证队列。采用受试者工作曲线(receiver operating characteristic, ROC) 及 ROC 曲线下面积(area under curve, AUC) 评价 miR-29a-3p 预测模型在进展期腺瘤及结直肠癌筛查和诊断中的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较

结直肠癌组、进展期腺瘤组和对照组间年龄、性别、吸烟史、糖尿病史和高血压史差异有统计学意义($H/\chi^2 = 22.695, 13.062, 32.926, 22.170, 32.625, P$ 均 < 0.05),见表 1。

表1 患者一般情况比较/ $n(\%)$
Table 1 Comparison of the general condition of patients/ $n(\%)$

项目	对照组($n=80$)	进展期腺瘤组($n=94$)	结直肠癌组($n=110$)	$F/H/\chi^2$	P
年龄/岁	55(47.25,61.75)	59(52.00,65.25)	63(55,68)	22.695	<0.001
体质指数	24.10±1.70	24.41±2.74	24.54±4.05	0.462	0.631
性别				13.062	0.001
男	30(37.50)	61(64.89)	59(53.64)		
女	50(62.50)	33(35.11)	51(46.36)		
民族				5.420	0.067
汉族	58(72.50)	56(59.57)	81(73.64)		
非汉族	22(27.50)	38(40.43)	29(26.36)		
吸烟史				32.926	<0.001
是	8(10.00)	46(48.94)	28(25.45)		
否	72(90.00)	48(51.06)	82(74.55)		
饮酒史				5.559	0.062
是	25(31.25)	40(42.55)	30(27.27)		
否	55(68.75)	54(57.45)	80(72.73)		
家族史				4.357	0.113
是	2(2.50)	0(0.00)	5(4.55)		
否	78(97.50)	94(100.00)	105(95.45)		
糖尿病史				22.170	<0.001
是	7(8.75)	11(11.70)	36(32.73)		
否	73(91.25)	83(88.30)	74(67.27)		
高血压史				32.625	<0.001
是	26(32.50)	30(31.91)	4(3.64)		
否	54(67.50)	64(68.09)	106(96.36)		

2.2 二代测序异常表达 miRNAs

与癌旁组织相比,5个 miRNAs 分子(let-7c-5p、miR-203a-3p、miR-122-5p、miR-29a-3p、miR-92b-3p)

在结直肠癌组织中存在差异性表达。筛选条件为 Log_2 |差异倍数| > 1.5 或 < -1.5, $P < 0.05$, 差异性 miRNAs 分子的表达见表 2。

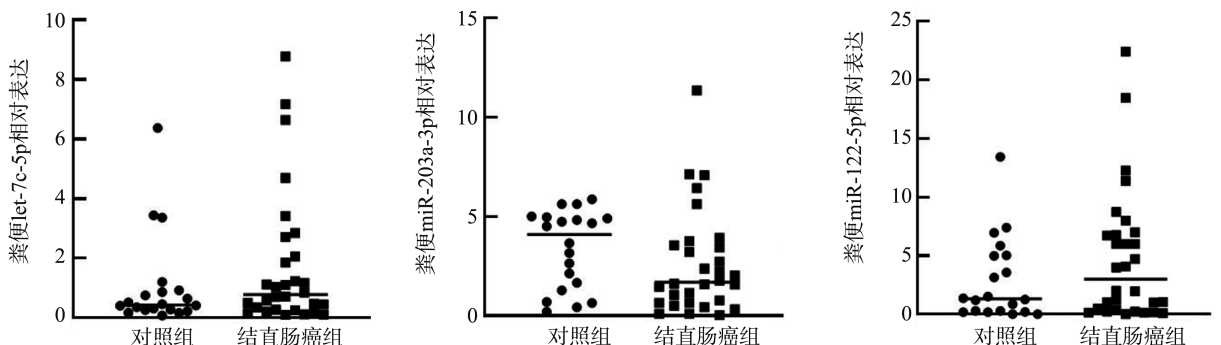
表2 RNA 测序结果中差异性 miRNAs 的表达
Table 2 Differential miRNAs in the RNA sequencing analysis

miRNAs	Log_2 差异倍数 (>1.5 或 <-1.5)	P	结直肠癌组 vs. 对照组
let-7c-5p	2.782	0.047	上调
miR-203a-3p	2.009	0.028	上调
miR-122-5p	-5.099	0.038	下调
miR-29a-3p	6.861	0.037	上调
miR-92b-3p	7.026	0.009	上调

2.3 异常 miRNAs 在粪便中的表达

qRT-PCR 检测结果显示,结直肠癌组和对照组中的粪便 let-7c-5p、miR-203a-3p、miR-122-5p 及

miR-92b-3p 表达无明显差异,将其从后续研究中剔除。结直肠癌组粪便 miR-29a-3p 较对照组表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



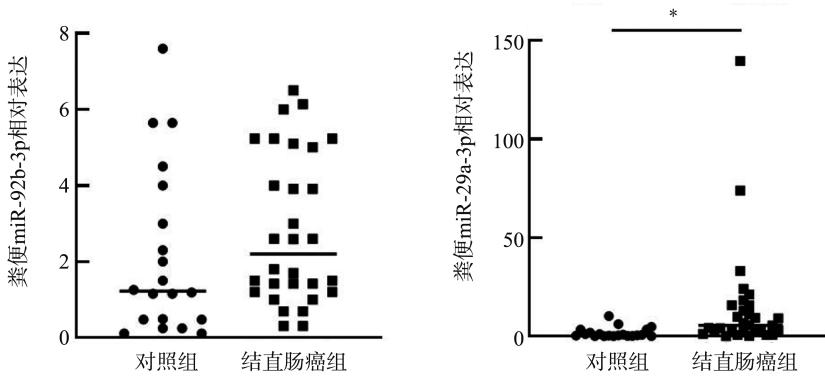


图1 异常 miRNAs 在粪便中的表达 (* $P < 0.05$ vs. 对照组)

Figure 1 Abnormal miRNAs expressed in faeces (* $P < 0.05$ vs. control group)

2.4 miR-29a-3p 在对照组、进展期腺瘤组和结直肠癌组粪便中的表达

对照组粪便 miR-29a-3p 的相对表达水平为 1.23 (0.29, 5.02), 进展期腺瘤组粪便 miR-29a-3p 的相对表达水平为 3.70 (0.53, 11.05), 结直肠癌组粪便 miR-29a-3p 的相对表达水平为 6.44 (2.58, 20.06), 3 组经非参数 Kruskal-Wallis H 检验比较, 差异有统计学意义 ($H = 39.678, P < 0.001$), 见图 2。

2.5 粪便 miR-29a-3p 表达与进展期腺瘤和结直肠癌患者临床特征相关性分析

粪便 miR-29a-3p 表达与性别、糖尿病史呈正相关 ($P < 0.05$), 而与年龄、民族、吸烟史、饮酒史及高血压史无明显相关性 ($P > 0.05$)。

2.6 进展期腺瘤和结直肠癌影响因素的多因素 Logistic 回归分析

以 miR-29a-3p 表达、年龄、性别、吸烟史、高血压史和糖尿病史为自变量, 以是否发生进展期

腺瘤或结直肠癌为因变量, 进行多因素 Logistic 回归分析结果显示, miR-29a-3p 表达和吸烟史是发生进展期腺瘤的独立影响因素, 年龄、miR-29a-3p 表达、吸烟史、糖尿病史、高血压史均是发生结直肠癌的独立影响因素, 见表 3。

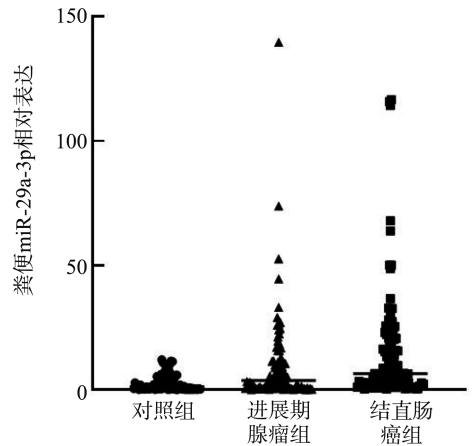


图2 3 组粪便中 miR-29a-3p 的表达

Figure 2 Fecal miR-29a-3p expression in three groups

表3 多因素 Logistic 回归分析结果

Table 3 Multivariate Logistic regression analysis results

组称	项目	β	$S.E$	$Wald \chi^2$	OR	$95\%CI$	P
进展期腺瘤组	年龄	0.020	0.017	1.378	1.021	0.986~1.056	0.240
	miR-29a-3p	0.129	0.034	14.600	1.138	1.065~1.216	<0.001
	性别	0.152	0.399	0.145	1.164	0.533~2.543	0.703
	吸烟史	2.242	0.515	18.919	9.411	3.427~25.843	<0.001
	糖尿病史	-0.106	0.570	0.034	0.900	0.294~2.751	0.853
	高血压史	-0.484	0.404	1.439	0.616	0.279~1.359	0.230
结直肠癌组	年龄	0.068	0.019	12.792	1.070	1.031~1.110	<0.001
	miR-29a-3p	0.142	0.034	17.529	1.152	1.078~1.231	<0.001
	性别	0.085	0.395	0.046	1.089	0.502~2.361	0.830
	吸烟史	1.392	0.552	6.364	4.024	1.364~11.870	0.012
	糖尿病史	1.319	0.521	6.406	3.739	1.347~10.382	0.011
	高血压史	-3.044	0.637	22.853	0.048	0.014~0.166	<0.001

2.7 训练队列中粪便 miR-29a-3p 的表达及诊断价值评估

与对照组相比,miR-29a-3p 在进展期腺瘤组和结直肠癌组粪便中均显著升高($P < 0.05$)。ROC 分析结果显示,miR-29a-3p 单一指标的诊断效能不够理想;miR-29a-3p 联合性别、吸烟史及粪便隐血试

验用于进展期腺瘤诊断时敏感性为 78.8%,特异性为 85.5%,最佳临界值为 0.522 时,诊断进展期腺瘤的 AUC 为 0.840(95% CI:0.767~0.914);用于结直肠癌诊断时敏感性为 92.4%,特异性为 94.5%,最佳临界值为 0.700 时诊断结直肠癌的 AUC 为 0.973(95% CI:0.947~0.999)。见图 3。

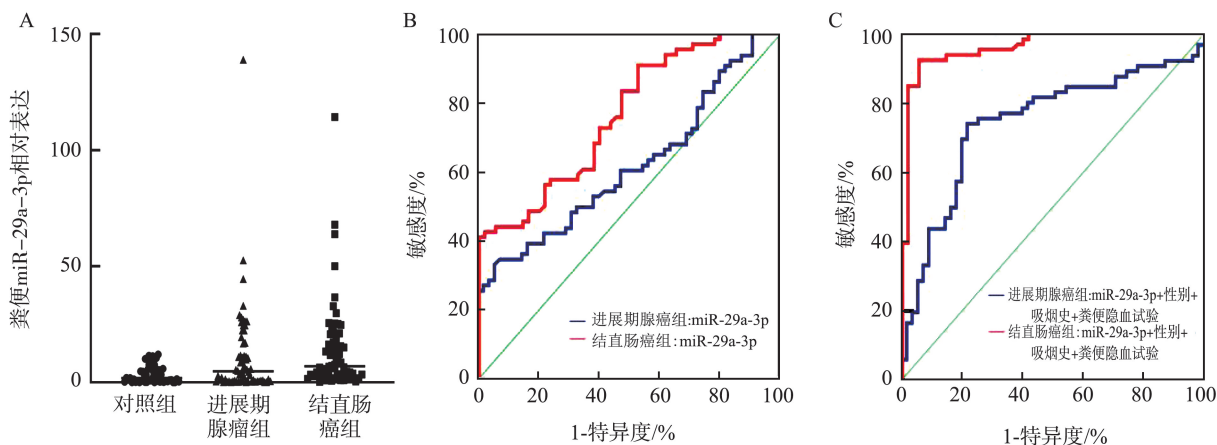


图 3 训练队列粪便 miR-29a-3p 的表达及诊断价值评估

A: 训练队列粪便 miR-29a-3p 相对表达量; B: 训练队列粪便 miR-29a-3p 诊断进展期腺瘤及结直肠癌的 ROC 曲线; C: 训练队列粪便 miR-29a-3p 联合临床特征诊断进展期腺瘤及结直肠癌的 ROC 曲线。

Figure 3 Expression and diagnostic value of faecal miR-29a-3p in the training cohort

A: qRT-PCR analysis of faecal miR-29a-3p expression in the training cohort; B: ROC curve of the diagnostic value of faecal miR-29a-3p for advanced adenoma and colorectal cancer in the training cohort; C: ROC curve of the diagnostic value of faecal miR-29a-3p combined clinical features for advanced adenoma and colorectal cancer in the training cohort.

2.8 验证队列粪便 miR-29a-3p 的表达及诊断价值评估

与训练队列结果一致,验证队列中进展期腺瘤组和结直肠癌组粪便 miR-29a-3p 表达水平均较对照组明显上调($P < 0.05$)。ROC 分析结果显示,

miR-29a-3p 联合性别、吸烟史及粪便隐血试验用于进展期腺瘤诊断时敏感性为 75%,特异性为 84%,AUC 为 0.807(95% CI:0.687~0.928);用于结直肠癌诊断时敏感性为 96.4%,特异性为 96.0%,AUC 为 0.980(95% CI:0.949~0.999)。见图 4。

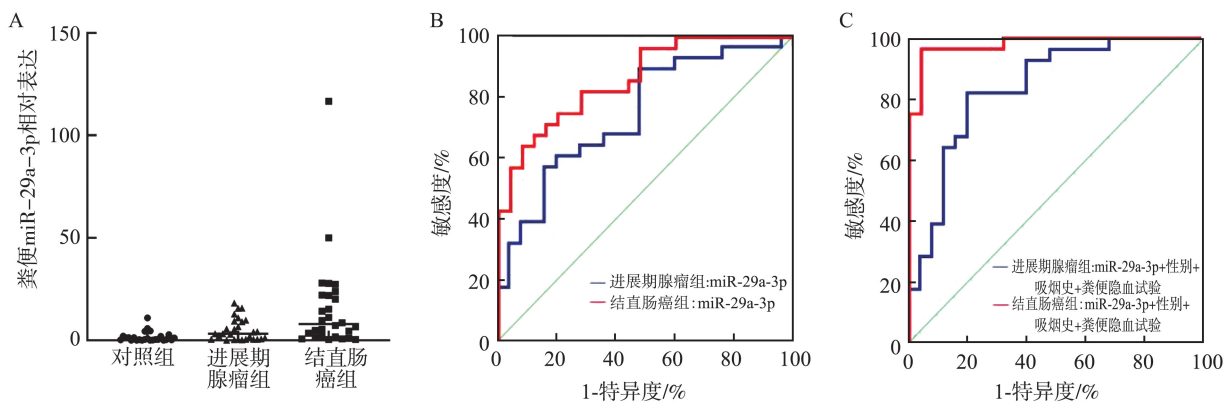


图 4 验证队列粪便 miR-29a-3p 的表达及诊断价值评估

A: 验证队列粪便 miR-29a-3p 相对表达量; B: 验证队列粪便 miR-29a-3p 诊断进展期腺瘤及结直肠癌的 ROC 曲线; C: 验证队列粪便 miR-29a-3p 联合临床特征诊断进展期腺瘤及结直肠癌的 ROC 曲线。

Figure 4 Expression and diagnostic value of faecal miR-29a-3p in the validation cohort

A: qRT-PCR analysis of faecal miR-29a-3p expression in the validation cohort; B: ROC curve of the diagnostic value of faecal miR-29a-3p for advanced adenoma and colorectal cancer in the validation cohort; C: ROC curve of the diagnostic value of faecal miR-29a-3p combined clinical features for advanced adenoma and colorectal cancer in the validation cohort.

2.9 进展期腺瘤结肠镜检出率

观察组 3 039 例结肠镜受检者中检出进展期腺

瘤 183 例,检出率 6.02%;筛查组 81 例,以 0.522 为进展期腺瘤诊断模型最佳临界值,0.700 为结直肠癌

诊断模型最佳临界值,得出粪便 miRNA 高表达者共 51 例,检出进展期腺瘤和结直肠癌共 47 例,其中进展期腺瘤 20 例,检出率 39.2%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

进展期腺瘤是发展为结直肠癌的关键环节^[8],大部分结直肠癌的发生遵循腺瘤-进展期腺瘤-癌序列,腺瘤-癌的进展周期给予了患者早诊早筛的机会。2008 年美国有关结直肠癌和腺瘤性息肉筛查的联合指南^[9]提出,结直肠癌筛查不但要检测出早期癌,更应该注重筛查腺瘤性息肉,早期诊断及治疗进展期腺瘤有助于阻断腺瘤癌变过程,从而降低结直肠癌的发病率及死亡率^[6]。近年来,随着无创筛查技术的成熟及研究深入,粪便 miRNA 在疾病发生发展中的作用逐渐被揭示。自 2008 年首次检测出粪便 miRNA 以来,研究已证实,miR-607-5p、miR-1246 等粪便 miRNA 的失调与结直肠癌的发生发展密切相关^[7]。miRNA 不仅参与正常生理过程,其在肿瘤等多种疾病的发生发展中同样发挥着重要作用^[10]。结直肠肿瘤分泌的 miRNA 直接且持续地释放到肠道中,RNA 谱可能随着结直肠癌及癌前病变的存在而改变^[11]。miRNA 非常稳定,能够在粪便中准确检测,且无特殊要求^[12],同时与外周血液相比,粪便 miRNA 具有高特异性、高敏感性、癌前病变检出率高和操作简便等优点^[13],可以更早地发现肿瘤细胞及多数肿瘤标志物^[14]。因此,粪便 miRNAs 脱颖而出,成为近年来消化道肿瘤无创筛查的热点,其可能是较好的诊断性生物标志物^[15-16]。

miR-29a-3p 位于人染色体 7q32 上,是 miR-29 家族成员。近年研究表明,miR-29a-3p 在结直肠癌的发生发展中可能通过促癌或抑癌基因功能发挥重要作用。Kim 等^[17]研究发现,miR-29a-3p 能够抑制 MMP2 表达,并抑制结直肠癌细胞的上皮-间充质转化。另有研究表明,miR-29a-3p 能够通过靶向 KLF4 抑制结直肠癌细胞的增殖^[18]。然而,目前关于 miR-29a-3p 在结直肠癌发生发展中的具体作用机制,研究较少,且 miR-29a-3p 在进展期腺瘤患者粪便中的表达及诊断价值尚不明确。本研究为探寻粪便中可用于进展期腺瘤筛查及诊断的 miRNAs,对 5 例结直肠癌患者癌组织及癌旁组织进行了 miRNA 组学检测,结果发现,miR-29a-3p 在癌组织中明显上调。通过 qRT-PCR 验证,miR-29a-3p 在进展期腺

瘤患者粪便样本中存在异常高表达。既往研究表明,miR-29a-3p 在进展期腺瘤患者的组织^[19]和血液^[20]样本中均呈高表达。与之相比,本研究招募了大量结直肠癌、进展期腺瘤患者和健康志愿者,对粪便 miR-29a-3p 的表达进行检测,样本量较大,准确性更高。

内镜治疗目前被认为是早期结直肠癌及癌前病变的一线治疗方案^[21],相较于传统外科手术,内镜下切除具有操作简单、并发症少、恢复快等优点。研究显示,进展期腺瘤 5 年生存率可达 100%,早期结直肠癌经治疗后,5 年生存率可超过 95%,部分患者甚至完全康复^[22]。通过精筛早期识别并切除进展期腺瘤,可有效阻止疾病进展及恶化,显著降低结直肠癌的发病率及死亡率。本研究结果显示,miR-29a-3p 在进展期腺瘤患者粪便中表达水平显著升高。ROC 曲线分析结果显示,miR-29a-3p 单一指标的诊断效能不够理想。既往有研究显示,将粪便隐血试验与临床危险因素相结合可以优化模型^[23]。本研究多因素 Logistic 回归分析结果显示,miR-29a-3p 与吸烟史为进展期腺瘤发生的独立危险因素,与既往研究结果一致^[24-25],将 miR-29a-3p、粪便隐血试验及临床特征纳入预测模型,ROC 曲线分析结果显示,miR-29a-3p 联合性别、吸烟史及粪便隐血试验用于进展期腺瘤诊断时敏感性为 75%,特异性为 84%,AUC 为 0.807,显示粪便 miR-29a-3p 可成为进展期腺瘤诊断的分子标志物。既往研究发现,在 $\geq 10 \mu\text{g Hb/g}$ 粪便阈值下,FIT 对进展期腺瘤的敏感性仅为 40%^[26],低于本研究结果。同时为研究粪便 miR-29a-3p 对进展期腺瘤筛查的临床应用价值,本研究以同一段时间内所有接受结肠镜检查的受试者为研究对象,进展期腺瘤检出率为 6.02%,而粪便 miR-29a-3p 升高者中进展期腺瘤检出率为 39.2%,显著高于前者,表明先以粪便 miR-29a-3p 检测筛选高危人群再进行结肠镜检查可以明显提高进展期腺瘤的检出率,有较好的临床应用价值。

综上所述,miR-29a-3p 联合粪便隐血试验、性别和吸烟史所构建的诊断模型可能被用作筛查进展期腺瘤的有效工具。该模型有助于早期发现和治疗进展期腺瘤,从而降低结直肠癌的患病率和致死率。本研究 miRNA 不受环境和饮食等因素影响^[27],粪便样本可以长期保存在低温环境中。然而,这项研究也存在一定的局限。首先,研究对象未涵盖胃癌、食管癌等其他消化道肿瘤患者。其次,研究中还包括痔疮患者等可能干扰粪便隐血试验结果的人群。

此外,由于本研究采用了单中心样本,模型泛化能力较差。期待未来能进行规模更大的前瞻性队列研究以验证这些发现,对于进展期腺瘤及结直肠癌的早期筛查和诊断具有重要意义。总之,早期筛查和诊断进展期腺瘤对降低结直肠癌发病率及提高患者的生存率至关重要。随着医学技术的不断进步,希望通过新的早期筛查方法和治疗手段大幅度降低结直肠癌的发病率和死亡率。

参考文献:

- [1] 中国中西医结合学会消化内镜学专业委员会大肠癌早癌专家委员会. 结直肠腺瘤及早期结直肠癌中西医结合诊治专家共识(2021)[J]. 中医杂志, 2022, 63(10): 989-997. Early Colorectal Cancer Expert Committee of Digestive Endoscopy Committee of Chinese Association of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Expert consensus on diagnosis and treatment of colorectal adenoma and early colorectal cancer with integrated traditional Chinese and western medicine(2021)[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 63(10): 989-997.
- [2] 上海市抗癌协会大肠癌专业委员会. 结直肠癌早筛、早诊、早治上海方案(2023年版)[J]. 中国癌症杂志, 2024, 34(1): 13-66. Colorectal Cancer Special Committee of Shanghai Anti-Cancer Association. Shanghai plan for early screening, diagnosis and treatment of colorectal cancer (2023 edition)[J]. China Oncology, 2024, 34(1): 13-66.
- [3] 中华医学会消化内镜学分会, 中国抗癌协会肿瘤内镜学专业委员会. 中国早期结直肠癌筛查及内镜诊治指南(2014年,北京)[J]. 胃肠病学, 2015, 20(6): 345-365.
- [4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [5] Olenius T, Koskenvuo L, Koskensalo S, et al. Long-term survival among colorectal cancer patients in Finland, 1991-2015: a nationwide population-based registry study[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 356.
- [6] Lin JS, Perdue LA, Henrikson NB, et al. Screening for colorectal cancer: updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force[J]. JAMA, 2021, 325(19): 1978-1998.
- [7] Pardini B, Ferrero G, Tarallo S, et al. A fecal microRNA signature by small RNA sequencing accurately distinguishes colorectal cancers: results from a multicenter study[J]. Gastroenterology, 2023, 165(3): 582-599.
- [8] Click B, Pinsky PF, Hickey T, et al. Association of colonoscopy adenoma findings with long-term colorectal cancer incidence[J]. JAMA, 2018, 319(19): 2021-2031.
- [9] Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(3): 130-160.
- [10] Li L, Wang A, Cai M, et al. Identification of stool miR-135b-5p as a non-invasive diagnostic biomarker in later tumor stage of colorectal cancer[J]. Life Sci, 2020, 260: 118417. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118417.
- [11] Kim M, Vogtmann E, Ahlquist DA, et al. Fecal metabolomic signatures in colorectal adenoma patients are associated with gut microbiota and early events of colorectal cancer pathogenesis[J]. mBio, 2020, 11(1): e03186-e03119.
- [12] Naccarati A, Dragomir MP, Tarallo S, et al. Fecal miRNA profiles in colorectal cancers with mucinous morphology[J]. Mutagenesis, 2024: geae015. doi: 10.1093/mutage/geae015.
- [13] Duran-Sanchon S, Moreno L, Augé JM, et al. Identification and validation of microRNA profiles in fecal samples for detection of colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2020, 158(4): 947-957.
- [14] Hibner G, Kimsa-Furdzik M, Francuz T. Relevance of microRNAs as potential diagnostic and prognostic markers in colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): E2944.
- [15] 方茜, 曲爱林, 张欣, 等. 血清 miR-210 在结直肠癌患者血清中的表达及临床意义[J]. 山东大学学报(医学版), 2015, 53(6): 77-81. FANG Qian, QU Ailin, ZHANG Xin, et al. Expression and clinical significance of miR-210 in the serum of patients with colorectal cancer[J]. Journal of Shandong University(Health Sciences), 2015, 53(6): 77-81.
- [16] 周正然, 刘炫辉, 吴小剑. 无创液体组织活检技术在结直肠癌筛查中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2023, 50(23): 1221-1226. ZHOU Zhengran, LIU Xuanhui, WU Xiaojian. Research progress in non-invasive liquid tissue biopsy techniques for colorectal cancer screening[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2023, 50(23): 1221-1226.
- [17] Kim HY, Kim YM, Hong S. Astaxanthin suppresses the metastasis of colon cancer by inhibiting the MYC-mediated downregulation of microRNA-29a-3p and microRNA-200a[J]. Sci Rep, 2019, 9: 9457. doi: 10.1038/s41598-019-45924-3.