

血浆外泌体 miR-19b、miR-126 检测鉴别 肺结节良恶性的临床研究*

李孝鹏¹ 王章桂¹ 王海洋² 董肇楠³

(1. 安徽省第二人民医院肿瘤放疗科, 安徽 合肥 230041; 2. 安徽省第二人民医院胸外科, 安徽 合肥 230041;

3. 江苏省肿瘤分子诊断工程技术研究中心, 江苏 苏州 215123)

【摘要】 目的 利用液态活检技术, 寻找合适的外泌体 miRNA 肿瘤生物标志物, 用于肺结节良恶性鉴别诊断。方法 选取 2019 年 1 月—12 月安徽省第二人民医院初诊肺癌术后的 24 对肺癌组织及癌旁组织样本, 筛选出差异性表达的 miRNA 标志物 miR-19b 和 miR-126。选取 2020 年 1 月—2022 年 12 月初诊肺恶性结节患者 58 例为观察组, 良性结节患者 31 例为对照组, 检测血浆外泌体 miR-19b、miR-126 在两组的表达量, 以 miR-16 为内参, 分析血浆外泌体 miR-19b 和 miR-126 表达量差异在肺结节良恶性鉴别中的应用价值。结果 肺癌组织中 miR-19b 表达水平为 (45.91 ± 13.73) , 与癌旁组织 (11.61 ± 3.87) 相比显著升高 ($P < 0.05$); miR-126 表达水平为 (0.70 ± 0.22) , 与癌旁组织 (2.56 ± 0.75) 相比显著降低 ($P < 0.05$)。miR-19b 和 miR-126 在观察组血浆外泌体表达水平分别为 (1.83 ± 0.49) 和 (0.83 ± 0.26) , 显著高于对照组 [(0.93 ± 0.31) 和 (0.40 ± 0.12)] ($P < 0.05$); 血浆外泌体 miR-19b 在观察组和对照组鉴别的曲线下面积 [AUC: $0.808(95\%CI: 0.718 \sim 0.898, P < 0.001)$], 取 cutoff 值为 0.936, 灵敏度为 82.8%, 特异性为 64.5%, 高于 miR-126 的检测。对 miR-19b 和 miR-126 相对定量值进行秩和检验, 按肿瘤大小和肿瘤浸润性分组, miR-19b 表达水平有显著性差异 ($P < 0.05$), 按肿瘤浸润性分组, miR-126 表达水平有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 血浆外泌体 miR-19b、miR-126 的表达量值可辅助鉴别肺结节良恶性。

【关键词】 外泌体; miRNA; miR-19b; miR-126; 肺结节; 肺癌; 鉴别诊断

【中图分类号】 R446; R563 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2024.07.016

Analysis of plasma exosome miR-19b and miR-126 to differentiate malignant from benign pulmonary nodules

LI Xiaopeng¹, WANG Zhangui¹, WANG Haiyang², DONG Zhaonan³

(1. Department of Radiation Oncology, The Second Hospital of Anhui Province, Hefei 230041, China;

2. Department of Thoracic Surgery, The Second Hospital of Anhui Province, Hefei 230041, China;

3. Jiangsu Engineering Research Center for Tumor Molecular Diagnosis, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

【Abstract】 **Objective** Liquid biopsy technology was used to find suitable exosome-derived miRNAs as tumor biomarkers for the differential diagnosis of benign and malignant pulmonary nodules. **Methods** The differentially expressed miRNA markers miR-19b and miR-126 were screened by testing 24 pairs of lung cancer tissues and adjacent normal tissues. 58 patients with malignant nodules and 31 patients with benign nodules were divided into the experimental group and the control group respectively. Plasma exosome miR-19b and miR-16 between the two groups were evaluated. With miR-16 as the internal reference, differential expression of plasma exosome miR-19b and miR-126 was statistically analyzed to explore the diagnostic value in pulmonary nodules. **Results** The level of miR-19b in lung cancer tissues was (45.91 ± 13.73) , which was significantly higher than that in adjacent tissues (11.61 ± 3.87) ($P < 0.05$). The level of miR-126 was (0.70 ± 0.22) , which was significantly lower than that of adjacent tissues (2.56 ± 0.75) ($P < 0.05$). The plasma exosome of miR-19b and miR-126 in the experimental group were (1.83 ± 0.49) and (0.83 ± 0.26) respectively, which were significantly higher than those in the control group (0.93 ± 0.31) and (0.40 ± 0.12) ($P < 0.05$). The area

基金项目: 安徽医科大学临床科学基金资助项目(2021xkj240)

通讯作者: 王章桂, E-mail: wzg79@zju.edu.cn

引用本文: 李孝鹏, 王章桂, 王海洋, 等. 血浆外泌体 miR-19b、miR-126 检测鉴别肺结节良恶性的临床研究 [J]. 西部医学, 2024, 36(7): 1021-

1025, 1030. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2024.07.016

under the curve (AUC) of miR-19b was 0.775 in differential diagnosis between the experimental group and the control group [AUC: 0.808 (95% CI: 0.718~0.898, $P < 0.001$)], with a cutoff point of 0.936, a sensitivity of 82.8% and a specificity of 64.5%, which was higher than that of miR-126. Rank sum test was performed on the relative quantitative values of miR-19b and miR-126. In tumor size and tumor invasion group, the relative quantitative values of miR-19b were significantly different ($P < 0.05$). In tumor infiltration group, the relative quantitative values of miR-126 were significantly different ($P < 0.05$). **Conclusion** The relative quantification of plasma exosomal miR-19b and miR-126 can assist in the identification of benign and malignant pulmonary nodules.

【Key words】 Exosome; miRNA; miR-19b; miR-126; Pulmonary nodule; Lung cancer; Differentiate

肺癌是全世界发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一,2015 年中国男性新发肺癌 52.0 万例,女性 26.7 万例。中国男性肺癌 5 年生存率为 16.8%,女性为 25.1%^[1-2]。肺癌早期症状不典型,57% 的患者在确诊时已发生远处转移,这是肺癌治疗效果差的重要原因之一。通过体检发现的 I 期肺癌且在 1 个月内接受手术治疗,10 年生存率高达 92%,将肺癌诊断与治疗窗口提前,是提高肺癌患者总生存率的根本方法。早期肺癌大多表现为肺结节,肺癌高危人群行低剂量 CT 筛查,肺结节发现率为 24.2%,但假阳性率高达 96.4%,因此临床迫切需要提高肺结节良恶性鉴别诊断水平^[3]。外泌体是活细胞分泌的大小为 30~120 nm 的微小囊泡,广泛存在于唾液、血液、尿液等生物体液中,包含蛋白质、脂肪、mRNA、miRNA 等成分,可介导细胞间的物质传递与信息交流^[4-6]。受体细胞摄入外泌体中的 miRNA 后,可诱导细胞迁移、促进血管发生、影响肿瘤微环境及促进转移等作用。肿瘤患者体内的外泌体是正常人的两倍,携带大量特异性 miRNA,尤其是血浆外泌体,生物稳定性高,已成为一类新的肿瘤生物标志物,在肺结节的良恶性鉴别诊断中有潜在的临床应用价值^[7-9]。本研究首先检索文献,验证并筛选与肺癌发生、发展相关的 miR-19b、miR-126 作为候选标志物,以 miR-16 作为内参对照,对肺癌组织及癌旁组织行候选 miRNA 靶标定量检测验证。结果显示,miR-19b/miR-16 和 miR-126/miR-16 的相对表达量具有显著差异。然后选取肺结节患者行血浆外泌体 miRNA 检测,评价 miR-19b 和 miR-126 对肺良恶性结节的鉴别诊断效能。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 1 月—12 月安徽省第二人民医院初诊肺癌术后样本 24 例,对候选靶标行定量检测验证。选取 2020 年 1 月—2022 年 12 月接受穿刺或手术,且病理为肺癌的恶性结节患者共 58 例为观察组,病理为良性结节的患者 31 例为对照组。本研究通过医院伦理委员会审核。

1.2 主要试剂与仪器 提取纯化组织 miRNA 试剂盒(E. Z. N. A.® miRNA Isolation Kit,货号:R6842-

01,索莱宝);富集纯化血浆总外泌体试剂盒(Total Exosome Isolation Kit,货号:4484450,Thermo);提取纯化外泌体 miRNA 试剂盒(miRNeasy Mini Kit,货号:217004,Qiagen);miRNA 逆转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,货号:K1622,Fermentas)。纳米粒度分析仪器 Nansight NS300 (Malvern 公司,英国)鉴定外泌体粒径和浓度;透射电子显微镜(Hitachi 公司,日本)鉴定外泌体形态学特征;ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司,美国)进行 miRNA 表达量检测。

1.3 方法

1.3.1 纳米粒度分析 取血浆外泌体 10 μ L,以 0.025% TEA 和 0.004 g/L NaOH 混合溶液为溶剂稀释 50 倍,将稀释液加入 1 mL 注射器,再将其加入到检测槽中,使用纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径分布及浓度。

1.3.2 电镜扫描 外泌体悬液滴于塑料薄膜上,将电镜铜网扣在液滴上,常温静置 10 min,去离子水洗涤;1%戊二醛处理 2 min,去离子水洗涤;醋酸双氧铀负染 90 s,自然干燥,上机检测、拍照。

1.3.3 血浆外泌体提取 采用 EDTA 抗凝采血管采集患者外周血 5 mL,4 h 内 400 g 离心 20 min,将上清移入新 EP 管中,800 g 离心 20 min。得到的上清 1 mL,然后采用试剂盒富集血浆总外泌体。

1.3.4 RT-qPCR 检测组织和血浆外泌体 miRNA 表达量 采用逆转录试剂盒建立逆转录体系(20 μ L 体系反应条件:42 $^{\circ}$ C,60 min;85 $^{\circ}$ C,5 min;4 $^{\circ}$ C,保存)。热循环参数(37 $^{\circ}$ C,5 min;94 $^{\circ}$ C,5 min 预变性;变性 94 $^{\circ}$ C,15 s 和退火 60 $^{\circ}$ C,30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C,15 s 共 50 个循环;结束 50 $^{\circ}$ C,30 s)。根据 GAPDH 的 CP 值对样本进行质控,剔除质控不合格的样本。miRNA (miR-19b、miR-126 和 miR-16)标志物标准品梯度稀释 10 倍($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^2$)检测,用以对样本表达量赋值并评价 PCR 扩增效率。

1.4 统计学分析 通过 PCR 上机数据获得 miRNA 检测的 CP 值和相对表达丰度值,根据相对定量公式计算 miRNA 靶标的表达量: $\Delta\Delta CP = \Delta CP(\text{miRNA}$

标志物) - $\Delta\Delta CP$ (miRNA 内参), 相对定量 = $2^{-\Delta\Delta CP}$, 将检测结果与肺结节病理诊断对比统计分析。采用 Graphpad Prism 7.0 软件绘制差异性散点图; 采用 SPSS 20 软件和 MedCalc V19.4.0 做出 ROC 曲线, 得出 cutoff 值, 计算符合率。计量资料比较采用 Mann-Whitney U 检验, 采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示; 计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆外泌体鉴定 纳米颗粒跟踪分析显示, 外泌体平均粒径 103 nm, 浓度为 $2.2E+10$ (Particles/mL), 电镜下呈圆形囊泡状, 有双层膜结构。见图 1。

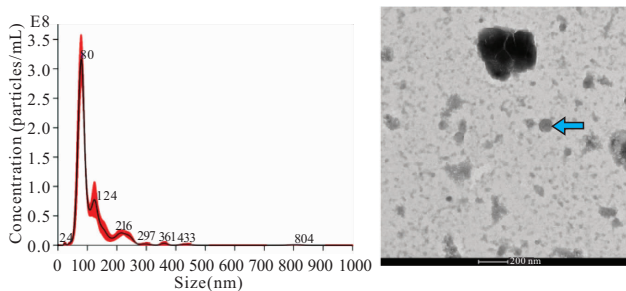


图 1 血浆外泌体粒径分析及透射电镜图 (36 000 \times)

Figure 1 Analyzing plasma exosomes through nanoparticle size analysis and transmission electron microscopy

2.2 组织 miRNA 差异性检测 以 miR-16 为内参, 通过荧光定量 PCR 检测 24 对肺癌组织及癌旁组织中 miR-19b, miR-126 相对表达量。肺癌组织中 miR-19b 表达水平为 (45.91 ± 13.73) , 与癌旁组织 (11.61 ± 3.87) 相比显著升高 ($P < 0.05$); miR-126 表达水平为 (0.70 ± 0.22) , 与癌旁组织 (2.56 ± 0.75) 相比显著降低 ($P < 0.05$) (图 2A)。分别制作 ROC 曲线评价其对肺癌组织和癌旁组织的预测能力。基于 miR-19b/miR-16 相对定量的 ROC 曲线, AUC 为 0.927 (95% CI: 0.854~1.000, $P < 0.001$), cutoff 值取 18.90, 灵敏度为 91.7%, 特异性为 88.8%; 基于 miR-126/miR-16 相对定量的 ROC 曲线, AUC 为 0.815 (95% CI: 0.696~0.935, $P < 0.001$), cutoff 值取 0.205, 灵敏度为 91.7%, 特异性为 58.3% (图 2B)。结果显示, 检测靶标 miR-19b 和 miR-126 可以用来鉴别肺癌组织和癌旁组织, 其中 miR-19b 的 ROC 曲线下面积更大。

2.3 血浆外泌体 miRNA 差异性检测 检测 58 例观察组和 31 例对照组血浆外泌体 miR-19b, miR-126 的相对表达量。miR-19b 和 miR-126 在观察组血浆外泌体表达水平分别为 (1.83 ± 0.49) 和 (0.83 ± 0.26) , 显著高于对照组 [(0.93 ± 0.31) 和 (0.40 ± 0.12)] ($P < 0.05$) (图 3A)。分别制作 ROC 曲线评价其对肺结节

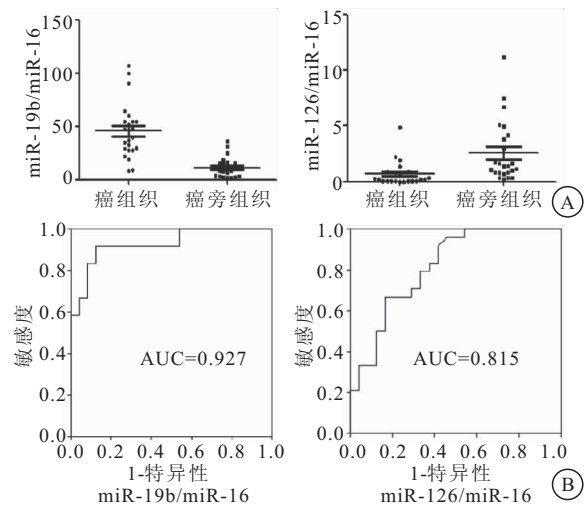


图 2 实时定量 PCR 检测组织 miRNA

Figure 2 Quantitative Real-time PCR detection of miRNA differences in each group of tissue

注: A. 组织 miRNA 差异性散点图; B. 组织 miRNA 差异性 ROC 曲线图。

良恶性的鉴别诊断能力。基于 miR-19b/miR-16 相对定量的 ROC 曲线, AUC 为 0.808 (95% CI: 0.718~0.898, $P < 0.001$), cutoff 值取 0.936, 灵敏度为 82.8%, 特异性为 64.5%; 基于 miR-126/miR-16 相对定量的 ROC 曲线, AUC 为 0.741 (95% CI: 0.633~0.850, $P < 0.001$), cutoff 值取 0.343, 灵敏度为 86.2%, 特异性为 61.3% (图 3B)。结果显示, 外泌体 miR-19b 和 miR-126 可以用来鉴别诊断肺结节良恶性, 其中外泌体 miR-19b 鉴别效能优于 miR-126。

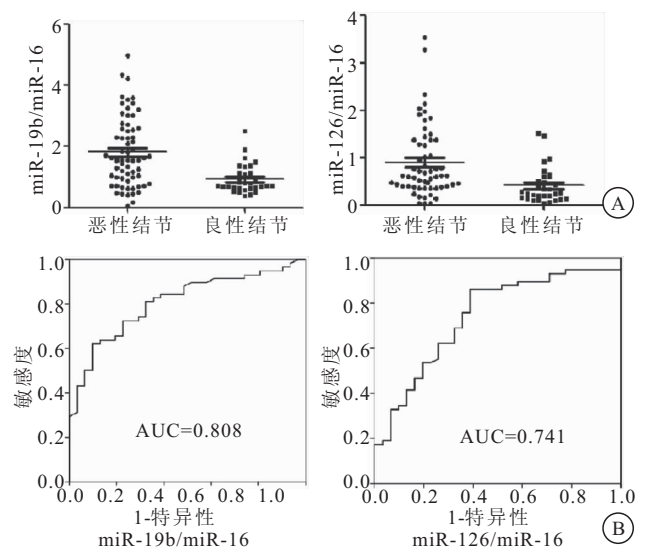


图 3 实时定量 PCR 检测血浆外泌体 miRNA

Figure 3 Quantitative Real-time PCR detection of miRNA differences in each group of plasma exosome

注: A. 血浆外泌体 miRNA 差异性散点图; B. 血浆外泌体 miRNA 差异性 ROC 曲线图。

2.4 典型影像及病理表现 本研究共纳入 89 例肺结节患者,良性结节患者 31 例,包括出血、结核性肉芽肿、炎性肉芽肿、错构瘤、纤维结节碳末沉积等。恶性结节 58 例,主要为原位腺癌、微浸润腺癌和浸润性腺癌,虽然原位腺癌是癌前病变,但从肺癌病理演变

的角度来看,本研究仍将这一类归为恶性结节。58 例恶性结节中,10 个为纯磨玻璃结节,18 个为混合性磨玻璃结节,29 个为实性结节。典型影像学表现和病理信息见图 4。

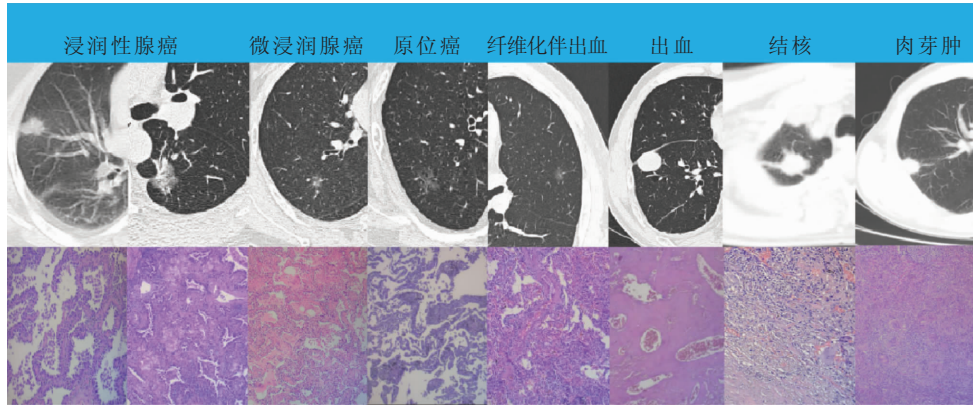


图 4 典型 CT 影像和病理图片

Figure 4 Representative CT images and pathological information

2.5 血浆外泌体 miRNA 相对定量值与临床因素的关系 将全部 89 例样本以外泌体 miR-19b 相对定量值的 cutoff 值(0.936)作为分组指标,分为高值组和低值组,对临床数据进行分析,发现不同性别和年龄组之间无显著性差异($P>0.05$);以外泌体 miR-126 相对定量值的 cutoff 值(0.343)作为分组指标,不同性别和年龄组之间也无显著性差异($P>0.05$)(表 1)。表明性别和年龄对外泌体 miR-19b 和 miR-126 相对定量值作为肺结节良恶性鉴别诊断没有影响。

表 1 不同血浆外泌体 miRNA 相对定量值临床资料比较(n)

Table 1 Comparison of clinical data on relative quantitative values of miRNAs from different plasma exosome

变量	miR-19b/miR-16 相对定量值		miR-126/miR-16 相对定量值	
	高值组	低值组	高值组	低值组
性别			χ^2	P
男	44	22	0.016	0.899
女	15	8	0.619	0.431
年龄(岁)			χ^2	P
≥60	22	11	1.228	0.268
<60	37	19	0.619	0.431

2.6 血浆外泌体 miRNA 相对定量值与病理因素的关系 以观察组结节大小、病理类型、浸润性、TNM 分期作为分组变量,分别对外泌体 miR-19b 和 miR-126 相对定量值进行秩和检验。按结节大小和浸润性分组,外泌体 miR-19b 相对定量值有显著性差异($P<0.05$),其余分组与检测值无统计学差异($P>0.05$),表明结节大小和浸润性与外泌体 miR-19b 的表达量有相关性。按结节浸润性分组,外泌体 miR-126 相对

定量值有显著性差异($P<0.05$),其余分组与检测值无统计学差异($P>0.05$),表明结节浸润性与外泌体 miR-126 的表达量有相关性。见表 2。

表 2 不同血浆外泌体 miRNA 相对定量值病理资料比较

Table 2 Comparison of pathological data on relative quantitative values of miRNAs from different plasma exosome

变量	miR-19b/miR-16 相对定量值		miR-126/miR-16 相对定量值	
	$M(P_{25}, P_{75})$	P	$M(P_{25}, P_{75})$	P
肿瘤大小(cm)		0.003		0.332
≤1	0.566 0(0.500, 0.712)		0.272 0(0.158, 0.707)	
1~2	1.010 5(0.658, 1.791)		0.434 0(0.193, 0.614)	
≥2	1.329 0(0.945, 2.389)		0.497 0(0.235, 1.229)	
病理类型		0.522		0.676
腺癌	1.542 5(0.979, 2.497)		0.605 0(0.361, 1.042)	
非腺癌	2.085 0(1.539, 2.748)		0.467 0(0.429, 1.909)	
肿瘤浸润性		0.02		0.002
原位癌	0.996 0(0.635, 2.289)		0.381 0(0.174, 0.602)	
浸润性癌	1.828 0(1.248, 3.031)		0.774 0(0.467, 1.613)	
肿瘤 TNM 分期		0.116		0.145
I 期	1.424 0(0.964, 2.282)		0.467 0(0.344, 0.774)	
II 期	1.982 0(1.266, 2.751)		0.991 0(0.497, 1.613)	

3 讨论

外泌体是由肿瘤细胞等多种细胞分泌的内源性小囊泡,小囊泡内容物与亲代细胞的成分密切相关,受脂质双层膜的保护,难以被降解,稳定性强。miRNA 是一种非编码、单链的 RNA,调节基因的转录和翻译,恶性肿瘤细胞的外泌体 miRNA 的表达谱与肿瘤细胞中 miRNA 的表达谱几乎相同,因此在肿瘤诊断中具有高度敏感性和特异性。血浆外泌体检测具有采样简单、重复性强、无创伤性等特点,在肺结节良恶性鉴别的敏感性为 59.3%~85.1%和特异性为

75%~100%^[10-12]。

本研究在组织学水平发现肺癌组织中 miR-19b 表达水平上调, miR-126 表达水平下调, 说明 miR-19b 和 miR-126 具有区分肺癌组织与正常组织的潜力。研究已证实 miR-19b 是一种致癌基因, 在肺癌组织中表达上调, 通过 EGFR 信号通路靶向 PP2A 和 BIM 增强肺癌细胞的增殖和抗凋亡作用^[13-14]。Borzi 等^[15]发现, 肺癌来源的外泌体, 通过癌蛋白 c-Myc 诱导 miR-19b 表达量上调, 进而破坏受体细胞中 TGFB 信号通路, 影响支气管细胞增殖。miR-126 在非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 组织中下调, 具有抑癌作用, miR-126-5p 可抑制 MDH1 的酶促活性和线粒体呼吸作用, 诱导肿瘤细胞凋亡^[16]。但 miR-126 在肺癌血浆外泌体中呈上调趋势, 该结果与组织学水平的检测正好相反。Grimolizzi 等^[17]发现, 在健康人中, miR-126 在外泌体和无外泌体血清之间均匀分布, 而在早期 NSCLC 患者中, miR-126 主要存在于外泌体中。循环中 miR-126 的不同片段可反映肿瘤形成过程中的不同条件, 所以推测早期肺癌血浆外泌体中 miR-126 呈上升趋势, 可能是肿瘤细胞将有抑癌作用的 miR-126 以外泌体方式分泌出去, 使肿瘤细胞获得免疫逃逸。miR-16 在人体不同组织、外周血中表达水平相对稳定, 在 miRNA 分子诊断中常被用作内参基因^[18-19], 在本研究中作为内参基因与 miRNA 靶标联合检测具有良好的区分效果。

本研究发现性别和年龄对 miR-19b 和 miR-126 相对定量值没有影响, 而按结节大小和浸润性分组, miR-19b 相对定量值有显著性差异, 表明结节大小和浸润性与 miR-19b 的值有相关性。按结节浸润性分组, miR-126 相对定量值有显著性差异, 表明结节浸润性与 miR-126 的相对定量值有相关性。既往研究表明, miR-19 家族中的 miR-19b 是 miR-17-92 簇的关键致癌成分, 与 NSCLC 患者的预后不良有关^[20]。miR-19b 可触发肺癌的上皮间质转化 (EMT)^[21], 致癌基因 miR-19a 和 miR-19b 共同调节肿瘤抑制因子 MTUS1, 进而促进肺癌细胞的增殖和迁移^[22]。Zhu 等^[23]发现 miR-19a/19b 通过直接靶向 GSK3 β 激活 Wnt/ β -catenin 通路, 增强肺肿瘤球形成的能力; 相反, miR-19 的下调抑制了肺癌干细胞活性和 Wnt/ β -catenin 通路活化。来自早期 NSCLC 患者的外泌体 miR-126 可孵化诱导人支气管上皮细胞中的血管形成和恶性转化, 而来自正常内皮细胞的外泌体 miR-126 抑制细胞生长并诱导 NSCLC 细胞的去恶性。这表明 NSCLC 患者外泌体 miRNA 水平与肿瘤的恶性和发

展程度有一定相关性。总之, 外分泌体 miRNA 参与肺癌细胞的发生、增殖、上皮间质转化、血管生成, 促进肿瘤生长和转移^[24]。

本研究也存在一些局限性。首先, 样本来源相对单一, 需在不同的医学中心进一步验证, 明确本研究检测的外泌体 miRNA 在肺结节患者中的诊断价值。其次, 需进一步研究血浆外泌体 miRNA 在复发监控、疗效评估方面的预测价值。最后, 本研究纳入的均为初诊肺癌患者, 生存期长, 故缺乏预后信息。

4 结论

血浆外泌体 miR-19b 联合 miR-126 检测的相对定量值可作为肺结节良恶性鉴别的一种手段。

【参考文献】

- [1] BARTA J A, POWELL C A, WISNIVESKY J P. Global Epidemiology of Lung Cancer[J]. Ann Glob Health, 2019, 85(1): 8.
- [2] LUO Y H, CHIU C H, SCOTT KUO C H, *et al.* Lung Cancer in Republic of China [J]. J Thorac Oncol, 2021, 16(4): 519-527.
- [3] 鄢骑兵, 喻茂文, 谭辉. 良恶性肺结节患者的 CT 影像学指标、血清学指标及呼出气体中 VOCS[J]. 影像科学与光化学, 2023, 41(1): 147-152.
- [4] YU W, HURLEY J, ROBERTS D, *et al.* Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges[J]. Ann Oncol, 2021, 32(4): 466-477.
- [5] ZHANG H, LU J, LIU J, *et al.* Advances in the discovery of exosome inhibitors in cancer [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2020, 35(1): 1322-1330.
- [6] 钟荣斌, 李捷, 易绍琼, 等. 肺癌患者血浆外泌体蛋白质组分析 [J]. 生物技术通讯, 2019, 30(1): 58-62, 133.
- [7] 刘超, 裴圣林. 外泌体调控肺癌肿瘤微环境机制和临床应用的研究进展 [J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(3): 464-470.
- [8] 张旭, 魏华华, 王伟, 等. 非小细胞肺癌血清外泌体 miR-152-5p 和 AGAP2-AS1 水平变化及其预后评估价值 [J]. 西部医学, 2021, 33(12): 1844-1848, 1853.
- [9] THAKUR A, PARRA D C, MOTALLEBNEJAD P, *et al.* Exosomes: Small vesicles with big roles in cancer, vaccine development, and therapeutics [J]. Bioact Mater, 2021, 10: 281-294.
- [10] IQBAL M A, ARORA S, PRAKASAM G, *et al.* MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance [J]. Mol Aspects Med, 2019, 70: 3-20.
- [11] ZHANG J T, QIN H, MAN CHEUNG F K, *et al.* Plasma extracellular vesicle microRNAs for pulmonary ground-glass nodules [J]. J Extracell Vesicles, 2019, 8(1): 1663-1666.
- [12] 李星, 何彩一, 刘亮. 外泌体调控肿瘤侵袭转移的研究进展 [J]. 生命的化学, 2023, 43(12): 1927-1933.
- [13] BAUMGARTNER U, BERGER F, HASHEMI GHEINANI A, *et al.* miR-19b enhances proliferation and apoptosis resistance via the EGFR signaling pathway by targeting PP2A and BIM in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 44.

- cholangiography during laparoscopic cholecystectomy[J]. ANZ J Surg, 2020, 90(11): 2279-2284.
- [7] 董维峰, 庞尔君, 代镇岭. ERCP 联合 LC 治疗胆囊结石合并胆总管结石临床效果及术后胆总管结石复发影响因素分析[J]. 临床误诊误治, 2021, 34(5): 85-90.
- [8] TAZUMA S, UNNO M, IGARASHI Y, *et al.* Evidence-based clinical practice guidelines for cholelithiasis 2016[J]. J Gastroenterol, 2017, 52(3): 276-300.
- [9] LI D X, LI Q, LI F, *et al.* The clinical application of primary sinus tract sinus establishment combined with holmium laser lithotripsy in elderly patients with choledocholithiasis and stricture[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2020, 100(40): 3161-3163.
- [10] 吴炎炎, 燕善军, 李大鹏, 等. 回顾性研究 ERCP 与 LCBDE 治疗胆管结石临床特点及结石复发情况[J]. 中华全科医学, 2020, 18(2): 188-190, 207.
- [11] 姜永斌, 梁斌, 郑娇娇. 内镜下取石术后胆总管结石复发的危险因素分析[J]. 川北医学院学报, 2021, 36(10): 1371-1373.
- [12] 吴静, 廖振林, 卓振山, 等. 熊去氧胆酸联合清热利湿化石方预防 ERCP 术后胆总管结石复发的效果及对胆固醇代谢、胆汁成分的调节作用[J]. 临床误诊误治, 2022, 35(4): 31-35.
- [13] 王芳. 治疗性 ERCP 术后胆总管结石复发的影响因素分析[D]. 大连: 大连医科大学, 2021.
- [14] BRADLEY A, SAMI S, HEMADASA N, *et al.* Decision analysis of minimally invasive management options for cholecystocholedocholithiasis [J]. Surg Endosc, 2020, 34(12): 5211-5222.
- [15] 白济东, 薛荣泉, 白永乐, 等. 代谢综合征与胆囊结石的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(3): 701-703.
- [16] RYU S, JO I H, KIM S, *et al.* Clinical Impact of Common Bile Duct Angulation on the Recurrence of Common Bile Duct Stone: A Meta-analysis and Review[J]. Korean J Gastroenterol, 2020, 76(4): 199-205.
- [17] HOSHI K, IRISAWA A, TOMINAGA K, *et al.* Association of long-term endoscopic biliary stent placement with choledocholithiasis: a literature review[J]. Clin J Gastroenterol, 2021, 14(5): 1303-1307.
- [18] 殷国贤, 朱慧, 顾澄宇, 等. 腹腔镜胆囊切除联合胆总管切开取石 T 管引流术后结石复发情况及术后结石复发的相关危险因素分析[J]. 中华普外科手术学杂志(电子版), 2019, 13(5): 476-478.
- [19] 司宇光, 张国超. 胆囊结石合并胆总管结石病人 LC 联合 LCHTD 术后结石复发情况及其影响因素分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(2): 223-226.
- [20] HE Y G, GAO M F, LI J, *et al.* Cystic duct dilation through endoscopic retrograde cholangiopancreatography for treatment of gallstones and choledocholithiasis: Six case reports and review of literature[J]. World J Clin Cases, 2021, 9(3): 736-747.
- [21] CHIKAMORI F, UETA K, ONISHI K, *et al.* Stone removal by percutaneous papillary balloon dilatation for cystic duct and bile duct stones after cholecystectomy and distal gastrectomy with Roux-en-Y gastrojejunostomy[J]. Radiol Case Rep, 2022, 18(1): 100-107.
- [22] 黄博, 陈一帆, 翟敏, 等. 胆总管结石术后一期缝合与 T 管引流的疗效对比及复发因素分析[J]. 中国医刊, 2021, 56(9): 980-984.
- [23] 王梦洁, 王启之, 燕善军, 等. ERCP 术后胆总管结石复发的危险因素分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(5): 589-593.
- [24] 胡刚峰, 张美峰, 黄侠, 等. 腹腔镜胆囊切除术后胆总管结石复发的列线图预测模型构建与评估[J]. 腹腔镜外科杂志, 2022, 27(4): 263-267.
- [25] 徐雯, 王正峰, 王海平, 等. 经内镜逆行胰胆管造影术后胆总管结石复发危险因素分析及其预测模型的应用价值[J]. 中华消化外科杂志, 2021, 20(8): 890-897.

(收稿日期: 2023-01-13; 修回日期: 2024-04-29; 编辑: 刘灵敏)

(上接第 1025 页)

- [14] ZHONG S, GOLPON H, ZARDO P, *et al.* miRNAs in lung cancer. A systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer[J]. Transl Res, 2021, 230: 164-196.
- [15] BORZI C, CALZOLARI L, FERRETTI A M, *et al.* c-Myc shuttled by tumour-derived extracellular vesicles promotes lung bronchial cell proliferation through miR-19b and miR-92a[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(10): 759.
- [16] ZHOU W, NIE J, ZHANG D. Differential expression of miR-126-5p in lung adenocarcinoma and the possible mechanism[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2019, 39(10): 1186-1190.
- [17] GRIMOLIZZI F, MONACO F, LEONI F, *et al.* Exosomal miR-126 as a circulating biomarker in non-small-cell lung cancer regulating cancer progression[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15277.
- [18] BERSIMBAEV R, PULLIERO A, BULGAKOVA O, *et al.* Radon Biomonitoring and microRNA in Lung Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2154.
- [19] REID G, KIRSCHNER M B, VAN ZANDWIJK N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2011, 80(2): 193-208.
- [20] WU C, CAO Y, HE Z, *et al.* Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer[J]. Tohoku J Exp Med, 2014, 232(2): 85-95.
- [21] LI J, YANG S, YAN W, *et al.* MicroRNA-19 triggers epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells accompanied by growth inhibition[J]. Lab Invest, 2015, 95(9): 1056-1070.
- [22] GU Y, LIU S, ZHANG X, *et al.* Oncogenic miR-19a and miR-19b co-regulate tumor suppressor MTUS1 to promote cell proliferation and migration in lung cancer[J]. Protein Cell, 2017, 8(6): 455-466.
- [23] ZHU J, WANG S, CHEN Y, *et al.* miR-19 targeting of GSK3 β mediates sulforaphane suppression of lung cancer stem cells[J]. J Nutr Biochem, 2017, 44: 80-91.
- [24] 黄宁, 胡长平. 外泌体在肺部疾病中的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(11): 2006-2011.

(收稿日期: 2023-02-14; 修回日期: 2024-05-22; 编辑: 刘灵敏)