

胃癌淋巴结转移相关外周血 MicroRNA 分子标记物的临床价值*

郑君华, 王永兵, 顾天来, 罗芸葆(上海市浦东新区人民医院普外科 201200)

【摘要】 目的 分析不同时期胃癌患者外周血中 MicroRNA(miRNA)的表达差异,以寻找一种特异性高的肿瘤标记物。**方法** 选取 2010 年 5 月至 2012 年 12 月上海浦东新区人民医院普外科住院治疗的 80 例胃癌患者,将其按照淋巴结转移数目分为 N0 组(无淋巴结转移)46 例、N3 组(淋巴结转移大于 7 枚)34 例,并选取同一时期的体检健康者 40 例为健康对照组。取外周血进行基因芯片检测,并选择在 N0 组与 N3 组表达差异显著的 hsa-miR-106a,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)扩大标本量进行检测。**结果** qRT-PCR 检测结果显示,N3 组的外周血 hsa-miR-106a 表达水平较 N0 组及健康对照组明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 N0 组与健康对照组外周血 hsa-miR-106a 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。hsa-miR-106a 表达水平除了与胃癌淋巴结转移有关外($P < 0.05$),与患者性别、年龄、肿瘤大小、部位、组织学类型、肿瘤类型及分化程度都无关($P > 0.05$)。**结论** hsa-miR-106a 在有淋巴结转移的胃癌患者外周血中高表达,可作为胃癌筛查的重要肿瘤标记物。

【关键词】 胃癌; 淋巴结转移; hsa-miRNA-106a; miRNA 基因芯片; 实时荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.06.006 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)06-0734-03

Analysis of MicroRNA molecular markers correlated with lymph node metastasis of gastric cancer* ZHENG Jun-hua, WANG Yong-bing, GU Tian-lai, LUO Yun-bao (Department of General Surgery, People's Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201200, China)

【Abstract】 Objective To analyze the expression differences of MicroRNA (miRNA) in peripheral blood of patients with gastric carcinoma at different stages, and to find tumor markers with high specificity. **Methods** A total of 80 patients with gastric cancer were divided into N0 group (without lymph node metastasis) of 46 cases and N3 group (with metastasis of more than 7 lymph nodes) of 34 cases. A total of 40 healthy subjects were enrolled as control group. miRNA with significantly different expression level between N0 and N3 group was identified by gene chip analysis, and quantitative real-time fluorescent polymerase chain reaction (qRT-PCR) were performed for detection of expanded quantity of samples. **Results** hsa-miR-106a was identified as the miRNA with significantly different expression level between N0 and N3 group, with higher expression level in N3 group, compared with N0 group and control group ($P < 0.05$), but there was no statistical difference between N0 group and control group ($P > 0.05$). Expression level of hsa-miR-106a was correlated with lymph node metastasis of gastric cancer, but not correlated with gender and age of patients and size, location, histological type and general type of tumor ($P > 0.05$). **Conclusion** Expression level of hsa-miR-106a in patients with lymph node metastasis of gastric cancer might be relatively high, which could be used as tumor marker for screening of gastric cancer.

【Key words】 gastric cancer; lymph node metastasis; hsa-miRNA-106a; miRNA gene chip; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction

中国是胃癌高发区,特别是在农村地区,胃癌的总发病率在各类恶性肿瘤中居首位^[1]。早期胃癌患者多无特异性症状,约三分之二的患者在确诊时便处于中晚期或出现转移^[2]。影像学检查在微小病灶方面有一定的局限性^[3]。而肿瘤标记物如癌胚抗原、糖链抗原(CA)72-4 和 CA19-9 的异常一般在晚期胃癌患者中才能检出,且其阳性率不到 50%^[4]。MicroRNA(miRNA)在组织和细胞中的表达与肿瘤呈现显著的相关性、组织特异性和表达稳定性,并且在外周血中的表达与肿瘤中的表达具有一定的一致性^[5]。目前已经证实,有 5 种血清 miRNA(miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34 和 miR-423-5p)是胃癌的诊断标志物,且其表达水平与肿瘤的分期相关^[6]。本研究选择 hsa-miR-106a 进行实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

检测,评估 hsa-miR-106a 作为外周血中与胃癌淋巴结转移相关的分子标志物,用于临床胃癌筛查的应用前景。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 5 月至 2012 年 12 月本院普外科住院、术前行胃镜及病理检查确诊并行根治性手术治疗的 80 例胃癌患者为研究对象,其中男 52 例,女 28 例;年龄 31~82 岁,平均年龄(53.6±8.3)岁。将胃癌患者按照淋巴结转移数目分为 N0 组(无淋巴结转移)46 例,其中男 31 例,女 15 例,平均年龄(56.0±13.2)岁;N3 组(淋巴结转移大于 7 枚)34 例,其中男 21 例,女 13 例,平均年龄(52.6±15.5)岁。并选取同一时期的体检健康者 40 例为健康对照组,其中男 25 例,女

* 基金项目:上海浦东新区卫生局卫生科技项目(PW2010A-8)。

作者简介:郑君华,女,副主任医师,本科,主要从事乳腺疾病治疗研究工作。

15 例,平均年龄(47.2±11.2)岁。并做 miRNA 芯片检测。3 组一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 外周血 miRNA 的抽提及检测 分别采集研究对象 3 mL 全血,置乙二胺四乙酸盐(EDTA)抗凝管中,常温下 1 500 r/min 离心 15 min。将上层血浆(约 1.5 mL)转移到 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管中,−80 ℃冰箱保存备用。按照说明书步骤,用 Ambion 公司的 mirVana miRNA Isolation Kit 抽提外周血 miRNA,并检测 miRNA 的质量。按照说明书上的步骤,采用 FlashTag Biotin RNA Labeling Kit 进行样品标记,再采用 GeneChip miRNA 2.0 进行 miRNA 检测。实验由博奥生物有限公司完成。

1.2.2 qRT-PCR 检测 检测对象包括 N0 组 46 例、N3 组 34 例,健康对照组 40 例。应用 miRNA qRT-PCR 引物试剂盒(美国 AB 公司)PCR 扩增。先逆转录成熟的 miRNA,反应结束后,将逆转录产物 10 倍稀释进行 PCR 反应。PCR 体系为: TaqMan MicroRNA Assay 20×1.0 μL,Product from RT reaction(Minimum 1 : 10 Dilution)2.0 μL, TaqMan 2× Universal PCR Master Mix 10 μL,Nuclease free water 7 μL,总共 20 μL。95 ℃预变性 10 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火延伸 20 s,重复 40 个循环,70~95 ℃绘制融解曲线结果分析以 U6 snRNA 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算不同组之间 hsa-miR-106a 的表达差异。其中, $\Delta Ct=Ct\text{ miRNA}-CtU6$, $\Delta\Delta Ct=\Delta CtM-\Delta Ct\text{ NM}$ 。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 使用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,计量及计数资料分别采用 $\bar{x}\pm s$ 或百分率表示,组间比较采用独立样本的 t 检验或 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

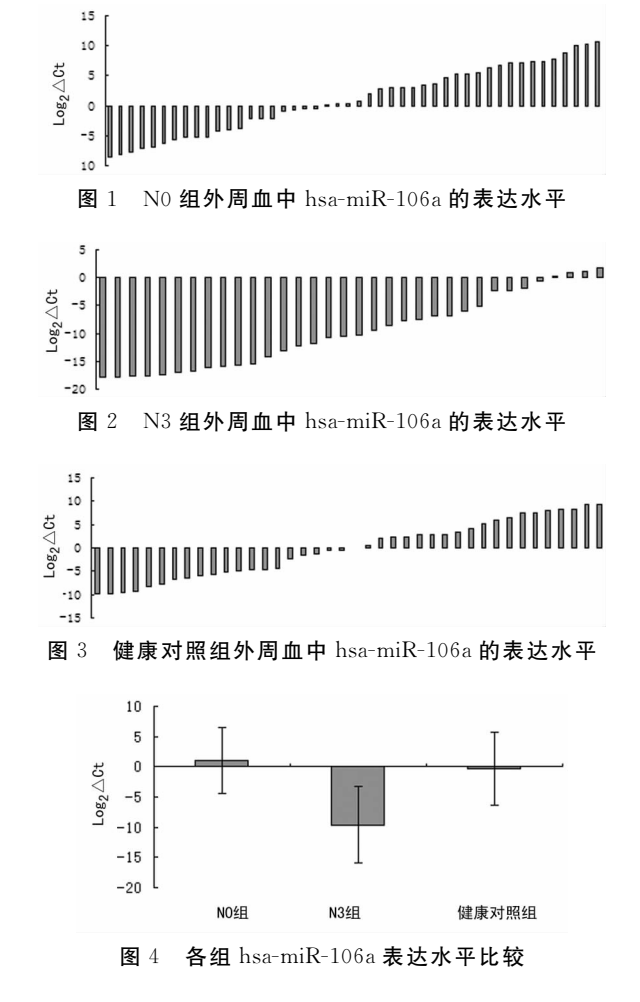
2 结 果

2.1 miRNA 芯片检测结果 在 N3、N0 组胃癌患者中均明显上调的 miRNA 包括 hsa-miR-16、hsa-miR-190、hsa-miR-101、hsa-miR-122、hsa-miR-149、hsa-miR-1、hsa-miR-20a;在 N3、N0 组胃癌患者中均明显下调的 miRNA 包括 hsa-miR-148a、hsa-miRplus-C1110、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-7、hsa-miR-877、hsa-miR-185、hsa-miR-365;在 N3 组患者表达上调最为明显而在 N0 组患者中无明显变化的 miRNA 包括 hsa-miRNA-218、hsa-miR-106a、hsa-miR-103a、hsa-miR-130b、hsa-miR-141、hsa-miR-203、hsa-miR-222、hsa-miR-29b。其中 hsa-miR-106a 最符合作为分子标记物的条件。具体见表 1。

表 1 miRNA 芯片检测 N3 组与 N0 组中 miRNA 表达情况($\bar{x}\pm s$)			
表达情况	miRNAs	N3 组	N0 组
N3 组与 N0 组均上调	hsa-miR-16	1.99±0.15	2.19±0.23
	hsa-miR-190	9.83±0.41	6.98±0.73
	hsa-miR-101	2.18±0.15	1.95±0.21
	hsa-miR-122	4.56±0.21	5.07±0.38
	hsa-miR-149	16.33±1.72	27.35±2.71
	hsa-miR-1	2.56±0.23	2.43±0.09
	hsa-miR-20a	3.50±0.11	6.12±0.30
N3 组与 N0 组均下调	hsa-miR-148a	0.05±0.00	0.08±0.01
	hsa-miRplus-C1110	0.42±0.04	0.22±0.02
	hsa-miR-423-5p	0.34±0.01	0.36±0.03

续表 1 miRNA 芯片分析 N3 组与 N0 组中 miRNA 表达情况($\bar{x}\pm s$)			
表达情况	miRNAs	N3 组	N0 组
N3 组上调,N0 组基本不变	hsa-miR-7	0.22±0.02	0.43±0.03
	hsa-miR-877	0.05±0.00	0.03±0.00
	hsa-miR-185	0.09±0.01	0.20±0.01
	hsa-miR-365	0.42±0.04	0.14±0.01
	hsa-miR-106a	97.52±8.91	1.28±0.23
	hsa-miR-203	62.16±3.12	0.98±0.05
	hsa-miR-130b	3.64±0.18	0.88±0.08
	hsa-miR-141	45.14±3.67	2.36±0.12
	hsa-miR-222	4.05±0.35	1.09±0.11
	hsa-miR-29b	2.34±0.25	0.85±0.03

2.2 hsa-miR-106a qRT-PCR 结果 46 例 N0 组胃癌患者、34 例 N3 组胃癌患者及 40 例健康者外周血中 hsa-miR-106a 的表达情况分别见图 1、图 2、图 3。N0 组外周血 hsa-miR-106a 表达水平平均值为(0.990±5.576),N3 组外周血 hsa-miR-106a 均值为(−9.698±6.485),健康对照组均值为(−0.279±6.041)。经独立样本 t 检验分析,N3 组的外周血 hsa-miR-106a 的表达水平与 N0 组及健康对照组比较显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$),但 N0 组与健康对照组之间外周血 hsa-miR-106a 的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4。



2.3 胃癌患者外周血 hsa-miR-106a 的表达与临床病理参数的关系 hsa-miR-106a 的表达水平除了与胃癌淋巴结转移有关外($P<0.05$),与患者性别、年龄、肿瘤大小、部位、组织学类型、肿瘤类型及分化程度等均无关($P>0.05$)。

3 讨 论

在不同肿瘤疾病中,miRNA 具有特定的表达模式,这些特点在肝癌、肺癌、肠癌、卵巢癌和白血病等多种恶性肿瘤中得到了证实^[7],也使 miRNA 成为肿瘤诊断的新生物学标记和治疗靶标。外周血 miRNA 在胃癌中的检测已有一些研究。例如通过生物芯片分析技术比较胃肿瘤组织 miRNA 和血浆 miRNA,对 hsa-miR-17-5p、hsa-miR-21、hsa-miR-106a、miR-106b 和 let-7a 等外周血 miRNA 进行检测,发现血浆中 miRNA 的表达水平与大部分肿瘤组织 miRNA 的表达水平一致^[8]。采用常规 RNA 提取方法便可以从血清中获得满足实验需要的 miRNA,这也为外周血 miRNA 的临床检测奠定了基础。

本研究应用最新版本的 miRNA 生物芯片,筛选出几种具有较高差异表达水平的外周血 miRNA 胃癌标记物。这些 miRNA 在 N3 组表达上调,而在 N0 组基本不变,其中 hsa-miR-106a 最符合作为分子标记物的条件。hsa-miR-106a 定位于 X 染色体上,通常表达于由内胚层分化而来的组织干细胞中。通过序列搜索,已证实 hsa-miR-106a 潜在的目的基因超过 700 种,所表达的蛋白包括细胞周期调控蛋白、细胞凋亡调控蛋白、血管生成相关蛋白、肿瘤转移相关蛋白等。在乳腺癌转移研究中,发现层粘连蛋白 5 是基底膜的重要组成成分,而基底膜介导上皮细胞间的粘连。当层粘连蛋白 5 表达增加时,癌细胞转移减少。hsa-miR-106a 的过表达可下调层粘连蛋白 5 的表达,从而刺激癌细胞的转移^[9]。RB 可与甲基化转移酶组成复合物行使甲基转移的功能。而 RB 和 SUV420H1 同时受 hsa-miR-106a 的负调控,在 hsa-miR-106a 的作用下表达降低,从而促进基因的低甲基化^[10]。因此,本研究以 hsa-miR-106a 为研究对象,扩大标本量,通过 qRT-PCR 进行进一步的研究。经独立样本 t 检验分析,N3 组的外周血 hsa-miR-106a 表达水平与 N0 组与健康对照组比较显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$),但 N0 组与健康对照组之间外周血 hsa-miR-106a 的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。这与 Xiao 等^[11]研究中发现淋巴及远处转移的胃癌组织中 hsa-miR-106a 高表达相符。

胃癌的发病机制较为复杂,可能的病因包括幽门螺旋杆菌感染、环境因素以及遗传因素等^[12]。传统的胃癌肿瘤标记物在特异性与敏感性的兼容性方面都不是特别理想。相比之下 miRNA 具有高度的保守性、时序性和组织特异性,PCR 检测高灵敏度以及特异性引物的使用,使得 miRNA 兼容肿瘤诊断的特异性和敏感性成为可能。期望通过对 hsa-miRNA-106a

以及其他胃癌特异性 miRNA 的进一步研究,为胃癌的预防、临床诊断和治疗开辟一条新的道路。

参考文献

[1] Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation; the long and uncertain path to clinical utility[J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(8): 971-983.

[2] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(743): 834-838.

[3] Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2009, 24(4): 199-277.

[4] 樊代明. 肿瘤研究前沿[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2009: 160-170.

[5] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. Development, 2005, 132(21): 4653-4662.

[6] Liu R, Zhang C, Hu Z, et al. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric Cancer diagnosis[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(5): 784-791.

[7] Zhou L, Zhao YP, Liu WJ, et al. Circulating microRNAs in Cancer: diagnostic and prognostic significance[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12(2): 283-288.

[8] Bartel DP. MicroRNAs; target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.

[9] Mccave EJ, Cass CA, Burg KJ, et al. The normal microenvironment directs mammary gland development[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(3): 291-299.

[10] Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast Cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(1): 65-70.

[11] Xiao B, Guo J, Miao Y, et al. Detection of miR-106a in gastric carcinoma and its clinical significance[J]. Clin Chim Acta, 2009, 400(1/2): 97-102.

[12] James GF, Timothy CW. Inflammation, atrophy and gastric cancer[J]. J Clin Invest, 2007, 117(2): 60-69.

(收稿日期: 2013-09-04

修回日期: 2013-10-24)

(上接第 733 页)

类、蛋白质的关系[J]. 淮南职业技术学院学报, 2005, 5(4): 26-27.

[2] 温晓媛. 体育专业大学生营养知识、态度及行为现状调查[J]. 现代预防医学, 2011, 38(13): 2461-2462.

[3] 晏渠如, 龚妮姝. 大学生营养知识、态度与膳食行为的调查[J]. 现代预防医学, 2008, 35(3): 520-521.

[4] 刘军, 姜涛, 高新友, 等. 体育院校运动营养学课程内容优化与重构[J]. 西安体育学院学报, 2012, 29(6): 765-768.

[5] 白宝丰. 体育教育专业大学生膳食营养 KAP 调查[J]. 中

国食物与营养, 2012, 18(8): 85-88.

[6] 洪达. 高校体育专业学生营养现状分析[J]. 河南科技学院学报, 2012, 40(3): 106-108.

[7] 李育忠, 阳亚雄, 王进. 重庆体育专业学生营养知识及饮食态度行为调查研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 32(4): 129-132.

[8] 胡华成. 实行营养配餐 提高大学生健康素质[J]. 医学与社会, 1999, 12(6): 66-68.

(收稿日期: 2013-09-05

修回日期: 2013-10-26)