

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.17.024

# miR-181b-3p 在胃癌患者血清中的表达及其靶基因预测

陈木龙, 陈红虹

广东省梅州市第二中医医院检验科, 广东梅州 514011

**摘要:****目的** 研究血清 miR-181b-3p 检测在胃癌诊断中的价值。**方法** 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 35 例胃癌患者(研究组)和 45 例健康志愿者(对照组)血清中 miR-181b-3p 的相对表达水平,并比较不同年龄、性别、临床及病理学特征胃癌患者血清中的 miR-181b-3p 相对表达水平。绘制受试者工作特征(ROC)曲线计算曲线下面积,评价 miR-181b-3p 对胃癌的诊断效能。结合 miRDB、miRWalk、TargetScan 和 DIANA TOOLS 数据库预测 miR-181b-3p 的靶基因,并绘制蛋白互作网络图。**结果** 与对照组比较,研究组血清中 miR-181b-3p 的相对表达水平明显升高,差异有统计学意义( $t=7.943, P<0.05$ )。未/低分化程度、有淋巴结转移、TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期胃癌患者血清中 miR-181b-3p 相对表达水平明显高于中/高分化程度、无淋巴结转移、TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期胃癌患者,差异有统计学意义( $t=3.509, P<0.001, t=3.080, P=0.004, t=2.641, P=0.013$ )。血清 miR-181b-3p 检测诊断胃癌的 ROC 曲线下面积为 0.886 (95%CI:0.815~0.956),灵敏度为 68.8%,特异度为 91.1%。miR-181b-3p 预测靶基因所编码蛋白质间相互作用关系较复杂。**结论** 血清 miR-181b-3p 在胃癌患者中表达上调,且能够有效区分胃癌患者和健康人群,有望作为诊断胃癌的生物标志物。

**关键词:**miR-181b-3p; 胃癌; 靶基因

中图法分类号:R735.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)17-2549-04

## Expression of miR-181b-3p in serum of patients with gastric cancer and target gene prediction

CHEN Mulong, CHEN Honghong

Department of Clinical Laboratory, Meizhou Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Meizhou, Guangdong 514011, China

**Abstract:****Objective** To investigate the diagnostic value of expression of miR-181b-3p in the serum of gastric cancer patients. **Methods** The relative expression level of miR-181b-3p in serum of 35 patients with gastric cancer (study group) and 45 healthy volunteers (control group) was detected by RT-PCR, and the relative expression levels of miR-181b-3p in serum of patients with gastric cancer with different age, gender, clinical and pathological characteristics were compared. Receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to calculate the area under the curve, and the diagnostic efficiency of miR-181b-3p was evaluated. The target genes of miR-181b-3p were predicted by miRDB, miRWalk, TargetScan and DIANA TOOLS. Meanwhile, protein-protein interaction network was constructed. **Results** The relative expression level of miR-181b-3p in study group was significant higher than that in control group ( $t=7.943, P<0.05$ ). The relative expression level of miR-181b-3p in serum of gastric cancer patients with no/low degree of differentiation, lymph node metastasis, and TNM Ⅲ-Ⅳ stage were significantly higher than those of gastric cancer patients with medium/high degree of differentiation, no lymph node metastasis, and TNM Ⅰ-Ⅱ stage, and the differences were statistically significant ( $t=3.509, P<0.001; t=3.080, P=0.004; t=2.641, P=0.013$ ). The area under the ROC curve of miR-181b-3p was 0.886 (95%CI:0.815-0.956), the sensitivity and specificity of miR-181b-3p were 68.8% and 91.1% respectively. Protein interaction analysis showed that the interaction was more complex between the proteins encoded by the predicted miR-181b-3p target genes. **Conclusion** The level of miR-181b-3p up-regulated in gastric cancer patients and which could be used to distinguish gastric cancer patients from healthy people. miR-181b-3p is expected to be one of biomarkers for early diagnosis of gastric cancer.

**Key words:**miR-181b-3p; gastric cancer; target gene

胃癌是消化系统常见恶性肿瘤,其病死率在全球 国占 42%,全球死亡人数约 80 万,中国占 35%<sup>[1]</sup>。胃癌 I 期患者 5 年生存率可达 90%,而 IV 期患者 5 年生

作者简介:陈木龙,男,主管技师,主要从事临床检验研究。

本文引用格式:陈木龙,陈红虹. miR-181b-3p 在胃癌患者血清中的表达及其靶基因预测[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(17): 2549-2552.

存率仅为 5%<sup>[2]</sup>。目前,对胃癌的早期诊断及治疗方案的选择均缺少有指导意义的特异性指标,从而导致胃癌的 5 年生存率并无明显改善。因此,探索能反映胃癌发生、发展情况的标志物,对早期防治胃癌和改善胃癌预后具有重要意义。微小 RNA(miRNA) 是长度为 19~24 个核苷酸的内源性短链 RNA,在个体发育、细胞分化、增殖及凋亡等过程中起重要调控作用。近年来有研究发现,人类 30% 以上的蛋白质编码基因可能受 miRNA 的调控,大约 50% 的 miRNA 位于肿瘤相关的基因组区域,广泛参与肿瘤发生,因此,miRNA 可以作为临床辅助诊断肿瘤和预后判断的分子标志物<sup>[3]</sup>。miR-181b-3p 在不同类型肿瘤中的研究均有报道,例如 miR-181b-3p 在非小细胞肺癌<sup>[4]</sup>、星形细胞瘤<sup>[5]</sup> 中低表达,但在乳腺癌<sup>[6]</sup>、骨肉瘤<sup>[7]</sup> 中高表达。本研究通过分析胃癌患者血清中的 miR-181b-3p 相对表达水平,以及诊断效能,为寻找有效的胃癌诊断生物标志物提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2019 年 6 月至 2020 年 6 月收治的胃癌患者 35 例作为研究组,其中男 23 例,女 12 例;平均年龄(57.51±6.84)岁。同期健康志愿者 45 例作为对照组,其中男 25 例,女 20 例;平均年龄(56.71±6.87)岁。胃癌患者均经胃镜病理检查确诊,且均为初诊;近 3 个月未规律服用过抑酸药、胃黏膜保护剂、非甾体类药物、抗菌药物。

1.2 试剂 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。miR-181b-3p 和内参 U6 引物均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 检测方法 采集所有研究对象空腹外周静脉血 5 mL,在 2 h 内离心 15 min(3 000 r/min、室温),分离出血清作为标本,置于-80 ℃冰箱中保存备用。取血清,加入 Trizol 进行裂解。总 RNA 提取根据总 RNA 提取试剂盒说明书步骤进行。测定所提取的 RNA 水平后,利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,使用 RT-PCR 试剂盒进行 PCR 扩增。U6 为内参。用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算血清 miR-181b-3p 的相对表达水平。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;绘制受试者工作特征(ROC)曲线分析 miR-181b-3p 诊断胃癌的灵敏度和特异度。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。使用 miRDB、miRWalk、TargetScan 和 DIANA TOOLS 数据库预测 miR-181b-3p 的靶基因,然后用 Veney 2.1.0 软件绘制韦恩图,运用 Cytoscape\_v3.6.1 软件绘制出蛋白互作(PPI)网络图。

2 结 果

2.1 两组血清中 miR-181b-3p 相对表达水平比较

对照组与研究组 miR-181b-3p 相对表达水平分别为 1.01±0.31、1.89±0.66,研究组较对照组明显升高,差异有统计学意义(*t* = 7.943, *P* < 0.05)。

2.2 不同特征胃癌患者血清中 miR-181b-3p 的相对表达水平 不同性别、年龄和肿瘤最大径胃癌患者血清中 miR-181b-3p 相对表达水平比较,差异无统计学意义(*t* = 0.906, *P* = 0.372, *t* = 0.251, *P* = 0.803, *t* = 0.397, *P* = 0.694)。未/低分化程度、有淋巴结转移、TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期胃癌患者血清中 miR-181b-3p 相对表达水平明显高于中/高分化程度、无淋巴结转移、TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期胃癌患者,差异有统计学意义(*t* = 3.509, *P* < 0.001, *t* = 3.080, *P* = 0.004, *t* = 2.641, *P* = 0.013)。见表 1。

| 表 1 不同特征胃癌患者血清中 miR-181b-3p 的相对表达水平 |          |                    |          |          |
|-------------------------------------|----------|--------------------|----------|----------|
| 特征                                  | <i>n</i> | miR-181b-3p 相对表达水平 | <i>t</i> | <i>P</i> |
| 性别                                  |          |                    | 0.906    | 0.372    |
| 男                                   | 23       | 1.96±0.625         |          |          |
| 女                                   | 12       | 1.75±0.729         |          |          |
| 年龄(岁)                               |          |                    | 0.251    | 0.803    |
| ≤57                                 | 18       | 1.92±0.674         |          |          |
| >57                                 | 17       | 1.82±0.655         |          |          |
| 肿瘤最大径(cm)                           |          |                    | 0.397    | 0.694    |
| ≤3                                  | 21       | 1.85±0.612         |          |          |
| >3                                  | 14       | 1.95±0.746         |          |          |
| 分化程度                                |          |                    | 3.509    | <0.001   |
| 中/高分化                               | 22       | 1.63±0.570         |          |          |
| 未/低分化                               | 13       | 2.33±0.574         |          |          |
| 淋巴结转移                               |          |                    | 3.080    | 0.004    |
| 有                                   | 26       | 2.07±0.604         |          |          |
| 无                                   | 9        | 1.37±0.543         |          |          |
| TNM 分期                              |          |                    | 2.641    | 0.013    |
| Ⅰ~Ⅱ                                 | 17       | 1.61±0.683         |          |          |
| Ⅲ~Ⅳ                                 | 18       | 2.15±0.528         |          |          |

2.3 血清 miR-181b-3p 检测在胃癌中的诊断价值 血清 miR-181b-3p 诊断胃癌的 ROC 曲线下面积为 0.886,95% 可信区间(95%CI)为 0.815~0.956,灵敏度为 68.8%,特异度为 91.1%,最佳截断值为 0.597。见图 1。

2.4 miR-181b-3p 靶基因的预测 使用数据库 miRDB、miRWalk、TargetScan 和 DIANA TOOLS 数据库预测 miR-181b-3p 的靶基因,预测的个数分别为 743、2 061、4 995 和 1 092 个,然后用 Veney 2.1.0 软件绘制韦恩图,结果显示 4 个数据库预测靶基因的交集有 95 个,占各预测软件预测靶基因总和的 1.5%。运用 Cytoscape\_v3.6.1 软件,绘制出 PPI 网

络图,结果表明,miR-181b-3p 的靶基因集合编码蛋白质之间的相互作用关系较复杂,有 20 个编码蛋白质之间的相互作用关系较稳定。见图 2、3。

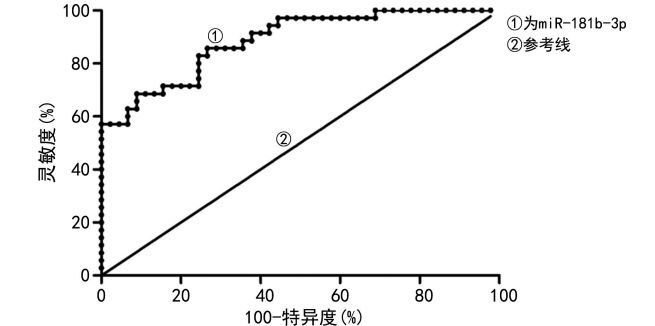


图 1 血清 miR-181b-3p 诊断胃癌的 ROC 曲线

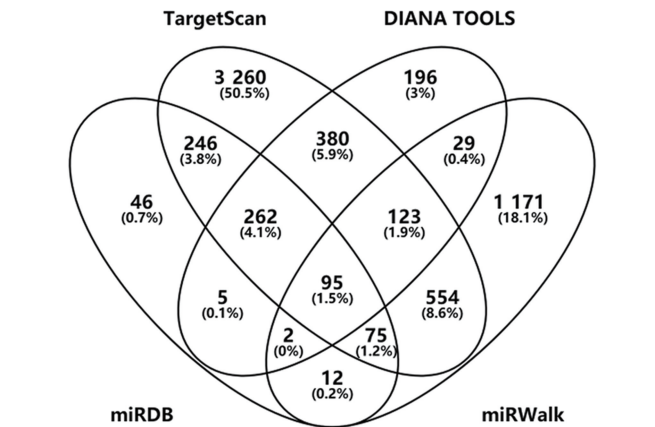


图 2 miR-181b-3p 靶基因预测的韦恩图

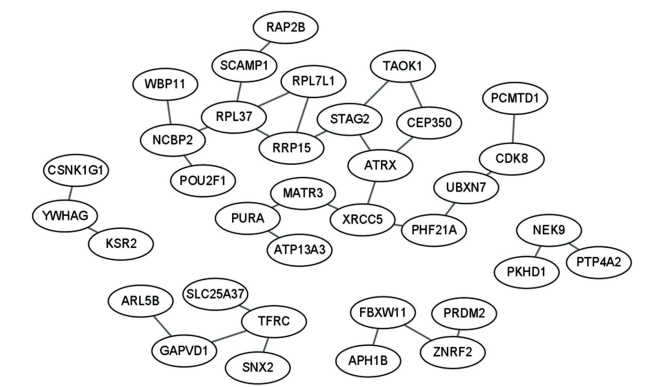


图 3 miR-181b-3p 预测靶基因所编码蛋白质的 PPI 网络图

3 讨 论

随着胃癌诊治技术的不断发展,胃癌的治疗效果已经有所提升,但是胃癌患者 5 年生存率依然很低,主要原因是大多数胃癌患者在晚期时才被诊断,错过了最佳诊治时期。因此,提高胃癌早期诊断率具有重要意义,探索有效的诊断指标是关键环节。

近年来,随着各种高通量测序平台用于分析全基因组 miRNA 基因的表达,有研究者指出,miRNA 的异常表达与肿瘤密切相关,并有望成为新的具有巨大潜力的肿瘤生物标志物<sup>[8]</sup>。miRNA 可通过形成 RNA 诱导沉默复合体与靶基因 miRNA 的 3' 端非编码区互补结合,在转录后水平调控靶基因的翻译和表

达<sup>[9]</sup>。一般情况下,单个 miRNA 可以调控多个靶基因的表达,既可能调控癌基因,也可能调控抑癌基因,参与肿瘤的发生、发展过程。

多种 miRNA 在胃癌的发生、发展中发挥重要作用,例如 miR-155 通过靶向 SMAD2、FADD 抑制胃癌细胞凋亡<sup>[10]</sup>;miR-218 可通过 SLIT/ROBO1 信号通路促进胃癌细胞的侵袭和迁移<sup>[11]</sup>;miR-21 通过下调抑癌基因 RECK 的表达促进胃癌细胞的增殖与侵袭<sup>[12]</sup>。miR-181 家族也是受到众多关注的 miRNA 之一,目前已知的 miR-181 家族重要成员有 miR-181a、miR-181b-3p、miR-181c 和 miRNA-181d。在胃癌的相关研究中,安娟等<sup>[13]</sup>指出胃癌患者血清中的 miR-181d 相对表达水平明显高于健康对照者,且可能通过 PDCD4 发挥负向调控作用;谭玲等<sup>[14]</sup>在细胞水平证实 miR-181c 可能参与幽门螺杆菌(Hp)相关胃癌的发生、发展;GUO 等<sup>[15]</sup>在细胞水平揭示 miR-181b-3p 能通过调节 TIMP-3 的表达,调控胃癌细胞的增殖和侵袭;ZHANG 等<sup>[16]</sup>发现 miR-181a 能通过调节肿瘤抑制基因 KLF6 促进胃癌细胞的增殖及转移。

本研究结果表明,与健康志愿者相比,胃癌患者血清中 miR-181b-3p 呈高表达。同时,通过对胃癌患者特征分析表明,不同性别、年龄、肿瘤最大径患者的 miR-181b-3p 相对表达水平比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),不同淋巴结转移情况、分化程度和 TNM 分期患者的 miR-181b-3p 相对表达水平比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。这些结果表明,miR-181b-3p 可能作为癌基因参与胃癌的发生、发展,这也从临床上进一步验证了 miRNA 在胃癌发展过程中的作用。为了进一步探讨血清 miR-181b-3p 检测在胃癌中的诊断效能,本研究绘制 ROC 曲线确定 miR-181b-3p 检测的最佳截断值为 0.597,表明 miR-181b-3p 对胃癌具有一定的诊断价值。但是,miR-181b-3p 与胃癌的作用机制尚不清楚,本研究通过结合多个靶基因预测数据库对 miR-181b-3p 进行靶基因预测及相应的蛋白相互作用分析,为后续的作用机制研究提供切入点。邓珊珊等<sup>[17]</sup>的研究证实细胞基质蛋白 3 (MATR3)参与调控病毒 RNA 的核输出、病毒基因组的稳定性和表达。SUN 等<sup>[18]</sup>和 SONG 等<sup>[19]</sup>分别指出 miR-193a-5p 和 miR-107 通过靶向细胞周期蛋白依赖性激酶 8(CDK8)加速胃癌的恶化。本研究绘制的 PPI 网络图显示, MATR3 和 CDK8 均与 miR-181b-3p 存在相互关系,因此,推测 miR-181b-3p 可能通过 MATR3 或 CDK8 参与胃癌的发生,这一推测尚需要后续研究进一步证实。

综上所述,胃癌患者血清 miR-181b-3p 相对表达水平与胃癌有密切联系,对胃癌的诊断和机制研究具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 林建姣,刘艳,许育君,等. 血清 miR-188-3p 诊断胃癌的临床价值研究[J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(8): 1115-1118.
  - [2] SASAKO M, SAKURAMOTO S, KATAI H, et al. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(33): 4387-4393.
  - [3] BACKES C, MEESE E, KELLER A. Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(6): 509-518.
  - [4] WANG X, MENG Q, QIAO W, et al. miR-181b-3p/Notch2 overcome chemoresistance by regulating cancer stem cell-like properties in NSCLC[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 327.
  - [5] LIU Y S, LIN H Y, LAI S W, et al. miR-181b-3p modulates EGFR-dependent VCAM-1 expression and monocyte adhesion in glioblastoma[J]. Oncogene, 2017, 36(35): 5006-5022.
  - [6] ANDALIB A, RASHED S, DEHBASHI M, et al. The up-regulation of hsa-mir-181b-3p-1 and downregulation of its target cyld in the late-stage of tumor progression of breast cancer[J]. Indian J Clin Biochem, 2020, 35(3): 312-321.
  - [7] WAN J, LONG F, ZHANG C, et al. miR-181b-3p-p53 negative feedback axis regulates osteosarcoma cell proliferation and invasion[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(6): 1803-1813.
  - [8] LI M, LIU Y, ZHANG X, et al. Transcriptomic analysis of high-throughput sequencing about circRNA, lncRNA and mRNA in bladder cancer[J]. Gene, 2018, 677: 189-197.
  - [9] HUANG W. microRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1617: 57-67.
  - [10] XIAO B, LIU Z, LI B S, et al. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response[J]. J Infect Dis, 2009, 200(6): 916-925.
  - [11] GAO C, ZHANG Z, LIU W, et al. Reduced micro-RNA-218 expression is associated with high nuclear factor kappa B activation in gastric cancer[J]. Cancer, 2010, 116(1): 41-49.
  - [12] ZHANG Z, LI Z, GAO C, et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression[J]. Lab Invest, 2008, 88(12): 1358-1366.
  - [13] 安娟,潘元明,康倩,等. 胃癌患者血清 miR-181d 与 PD-CD4 的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(2): 131-137.
  - [14] 谭玲,陈扬,李昌平. 幽门螺杆菌感染诱导微小 RNA-181c 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(2): 121-126.
  - [15] GUO J X, TAO Q S, LOU P R, et al. miR-181b-3p as a potential molecular target for anticancer therapy of gastric neoplasms[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(5): 2263-2267.
  - [16] ZHANG X, NIE Y, DU Y, et al. microRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6[J]. Tumour Biol, 2012, 33(5): 1589-1597.
  - [17] 邓珊珊,段志强,嵇辛勤. 细胞基质蛋白 3 的功能及其参与病毒复制的分子机制[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(2): 281-288.
  - [18] SUN H, YAN J H, TIAN G Y, et al. LINC01224 accelerates malignant transformation via miR-193a-5p/CDK8 axis in gastric cancer[J]. Cancer Med, 2021, 10(4): 1377-1393.
  - [19] SONG Y Q, MA X H, MA G L, et al. microRNA-107 promotes proliferation of gastric cancer cells by targeting cyclin dependent kinase 8[J]. Diagn Pathol, 2014, 9: 164-170.
- 
- (收稿日期: 2020-12-10      修回日期: 2021-06-09)
- (上接第 2548 页)
- [13] 杨玉琪,刘家云,徐修礼,等. 某院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床分布特点及药物敏感性分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 1-5.
  - [14] VAN LOON K, VOOR IN'T HOLT A F, VOS M C. A systematic review and meta-analyses of the clinical epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae[J]. Antimicrob Agents Ch, 2017, 62(1): e01730-17.
  - [15] ZHANG R, LIU L, ZHOU H, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China[J]. EBioMedicine, 2017, 19: 98-106.
  - [16] SHEU C C, CHANG Y T, LIN S Y, et al. Infections caused by carbapenem-resistant enterobacteriaceae: an update on therapeutic options[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 80.
  - [17] 史庆丰,胡必杰,沈燕,等. 不同城市临床医师对碳青霉烯耐药肠杆菌认知和实践的调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(20): 3141-3144.
  - [18]  $\beta$ -内酰胺类抗生素/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂临床应用专家共识编写专家组.  $\beta$ -内酰胺类抗生素/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂临床应用专家共识(2020 年版)[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(10): 738-747.
  - [19] PANTEL A, RICHAUD-MOREL B, CAZABAN M, et al. Environmental persistence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French intensive care unit[J]. Am J Infect Control, 2016, 44(3): 366-368.
- (收稿日期: 2020-12-30      修回日期: 2021-04-09)