

胃癌患者血清 miR-486 的表达水平及其意义

王丽丽¹, 申娴娟², 张金业^{1*}, 鞠少卿^{2,3*}

(¹南通市肿瘤医院检验科, 江苏 南通 226361; ²南通大学附属医院外科综合实验室, ³检验科, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:探讨胃癌患者血清 miR-486 的表达水平及其辅助诊断的价值。方法:收集经病理确诊的 100 例胃癌患者、30 例胃息肉患者及 50 例健康对照者的血清标本。采用荧光定量 PCR 方法定量检测血清 miR-486 的表达水平, 用化学发光法检测 CEA、CA199、CA724 的含量。采用 Mann-Whitney *U* 检验比较不同组间血清 miR-486 水平的差异, 采用 χ^2 检验分析胃癌患者血清 miR-486 水平与其临床病理特征之间的关系。采用 Spearman 相关性分析胃癌患者血清 miR-486 水平与 CEA、CA199 及 CA724 的关系, 应用 ROC 曲线及 AUC(95%CI)评估它们作为诊断指标的诊断效能。结果:胃癌、胃息肉患者和健康对照者血清 miR-486 的含量分别为 0.454(0.225, 0.653)、0.121(0.083, 0.166)和 0.063(0.013, 0.119);胃癌患者血清 miR-486 的含量显著高于胃息肉患者和健康对照者, 差异均具有统计学意义(P 均 < 0.001);而胃息肉患者与健康对照者血清 miR-486 的含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。胃癌患者血清 miR-486 的表达水平在不同年龄、性别、胃癌部位无统计学差异($P > 0.05$), 在分化程度($P=0.046$)、TNM 分期($P=0.013$)、淋巴结是否转移($P=0.006$)差异均有统计学意义。胃癌患者血清 miR-486 含量与 CEA($r=0.213, P=0.034$)、CA724($r=0.297, P=0.003$)有相关性, 与 CA199($r=0.037, P=0.714$)无相关性。胃癌组与健康对照组比较, 血清 miR-486 的 AUC 0.839, 95%CI 为 0.774~0.904。结论:胃癌患者血清 miR-486 含量显著高于胃息肉患者和健康对照者, miR-486 可能是胃癌辅助诊断的一个重要生物学指标。

[关键词] 胃癌; miR-486; CEA; CA199; CA724; 实时荧光定量 PCR

[中图分类号] R730.43

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)05-524-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160503

Expression of miR-486 in serum of patients with gastric cancer and its significance

Wang Lili¹, Zhang Jinye¹, Shen Xianjuan², Ju Shaoqing^{2,3*}

(¹Department of Clinical Laboratory, Nantong Tumor Hospital, Nantong 226361; ²Surgical Comprehensive Laboratory; ³Laboratory Medicine Center, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of miR-486 in serum of patients with gastric cancer and its value to auxiliary diagnosis. **Methods:** The serum of 100 patients with pathological confirmed GC, 30 gastric polyps and 50 healthy controls were recruited. Serum miR-486 expression was determined by fluorescent quantity PCR. Serum CEA, CA199 and CA724 were determined by chemiluminescence method. Comparison of differences of serum miR-486 between groups was performed by Mann-Whitney *U* test. Analysis the relationship between serum expression of miR-486 in gastric cancer patients and its clinical pathological characteristics was performed by χ^2 test. The relationships between miR-486 and CEA, CA199, CA724 were examined by Spearman correlation analysis. ROC curve and AUC (95% CI) were used to evaluate their diagnosis efficiency. **Results:** The relative expression of miR-486 in GC, gastric polyps, healthy controls were 0.454 (0.225, 0.653), 0.121 (0.083, 0.166), 0.063 (0.013, 0.119), respectively. The relative expression of miR-486 in GC was significantly higher than that in gastric polyps and healthy controls ($P < 0.001$). The difference between gastric polyps and healthy controls is not significant ($P > 0.05$). The differences of expression of miR-486 in serum of GC in tumor differentiation ($P=0.046$), TNM ($P=0.013$) and the occurrence of lymph node metastases ($P=0.006$) were statistically significant except for age, gender, tumor area ($P > 0.05$). The relative expression of miR-486 in GC had a correlation with CEA ($r=0.213, P=0.034$), CA724 ($r=0.297, P=0.003$) but no obvious correlation with CA199 ($r=0.037, P=0.714$). AUC of serum miR-486 was 0.839, 0.774~0.904 (95% CI) in discriminating GC from healthy controls. **Conclusion:** The relative expression of miR-486 in GC was significantly higher than that in gastric polyps and healthy controls, serum miR-486 may be a biomarker for the auxiliary diagnosis of GC.

[基金项目] 国家自然科学基金(81271920, 81301498)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jsq814@hotmail.com

[Key words] gastric cancer; miR-486; CEA; CA199; CA724; fluorescent quantity PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05): 524-528]

胃癌(gastric cancer, GC)是高度侵袭性和致命的恶性肿瘤。GC 诊断的“金标准”是胃镜^[1],但患者的依从性差,限制了其作为 GC 筛查的主要工具,在发现早期 GC 及微小病灶方面,影像学检查存在局限性^[2]。早期 GC 经治疗后 5 年生存率达 90%,而晚期 GC 患者,治疗后 5 年生存率不足 5%。因此,早发现是改善疗效、提高生存率的关键。目前临床上诊断 GC 的标志物主要有 CEA、CA199 和 CA724,但其阳性率达不到 40%。因此寻找 GC 新的肿瘤标志物很有必要。

MicroRNA 是一类长 19~25 nt 的非编码单链小分子 RNA,在细胞的发育、分化、应激反应、凋亡和增殖方面发挥重要的生物学作用。研究发现 miRNAs 在血浆或血清中可长期稳定存在,耐 RNA 酶的降解、煮沸、反复冻融、酸碱环境、长期保存等各种处理方法均不会造成血浆或血清等循环 miRNAs 的损失^[3],血浆或血清 miRNAs 的含量变化与肿瘤的发生发展密切相关,可以作为一种新的肿瘤标志物。Oh 等^[4]在原发 GC 标本中,观察到 25%~30%出现 miR-486 的降低。但国内暂无研究关于 miR-486 与 GC 诊断之间关联的研究,值得深入探讨。本研究旨在探讨 miR-486 在 GC 患者血清中的表达情况,与常规指标 CEA、CA199、CA724 比较,探讨其在 GC 诊断方面的应用价值。

1 对象和方法

1.1 对象

收集南通市肿瘤医院 2012 年 8 月—2013 年 12 月间病理确诊的 100 例 GC 患者血清,男 73 例,女 27 例,平均年龄为 59(45~74)岁,所有患者均经病理检查确诊为 GC,并未经手术、放射或化学药物治疗。按照 WHO 标准 2004 版进行组织学分类及 UICC 2009 年第 7 版准进行 TNM 分期。同时收集 30 例平均年龄 56(43~68)岁的胃息肉良性对照组(男 20 例,女 10 例),和 50 例平均年龄 58(40~78)岁的健康对照组(男 35 例,女 15 例)血清标本。本研究经医院伦理委员会批准,所有受试者知情同意。

采用分离胶的真空采集管收集受试者的血液标本,以 1 000 r/min 离心 10 min 后,将上层血清分装于无酶的离心管中,置于-80℃保存备用。采用美

国生命技术公司的血清 RNA 提取试剂盒提取血清总 RNA,经紫外分光光度计测量浓度和纯度合格后,立即保存于-80℃或在 1 d 内反转录成互补 DNA。

1.2 方法

1.2.1 RNA 逆转录合成互补 DNA

采用美国赛默飞公司提供的逆转录试剂和上海捷瑞生物科技有限公司提供的 miR-486 及内参 U6 的茎环状反转录引物,将提取的总 RNA 反转录成互补 DNA。逆转录反应体系为 62.5 nmol/L,茎环状反转录引物 2 μL,5×Reaction Buffer 4 μL, dNTP 2 μL, RNase inhibitor(20 U/μL)1 μL, Reverse Transcriptase(200 U/μL)1 μL, RNA 10 μL,混匀,瞬时离心。合成的互补 DNA 置于-20℃保存备用。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 miR-486

采用德国罗氏公司提供的 FastStart Universal SYBR Green I Master (PCR 反应混合物)和美国 ABI 公司的 7500 实时定量 PCR 扩增仪进行荧光定量 PCR 检测。miR-486 引物序列:正向引物:5'-A-CACTCCAGCTGGGTCTGTACTGAGCTGC-3';反向引物:5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3'。U6 引物序列:正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

反应体系:SYBR Green I 混合液 10 μL,互补 DNA 6 μL,正向引物 0.5 μL,反向引物 0.5 μL,无 RNA 酶水 3 μL。混匀以上体系,瞬时离心。反应条件:95℃ 10 min;95℃ 15 s;60℃ 1 min,共 40 个循环。每个样本做 3 个复孔,结果取其均值。miR-486 的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, $\Delta\Delta Ct$ =实验组(CtmiRNA-CtU6)均值-对照组(CtmiRNA-CtU6)均值。

1.2.3 CEA、CA199 和 CA724 水平的检测

采用德国罗氏诊断有限公司的 E170 电化学发光仪检测 CEA、CA199 和 CA724 表达水平。

1.3 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计软件进行分析。数据以中位数(下四分位数,上四分位数)表示。血清 miR-486 水平在胃癌患者与胃息肉患者及健康对照组间两两比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。胃癌患者 miR-486 与各临床病理特征水平与其临床病理特征之间的关系采用 χ^2 检验。采用 Spearman 相关性分析胃癌患者 miR-486 水平与 CEA、CA199 和 CA724 的关

系,应用 ROC 曲线及 AUC(95%CI)评估它们作为诊断指标的效能。 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-486 在 GC、胃息肉和健康对照者血清中的相对表达量

以 U6 为内参,用荧光定量 PCR 对 100 例 GC、30 例胃息肉患者及 50 例健康对照者血清 miR-486 的相对表达量进行检测,其相对表达量分别为 0.454 (0.225,0.653)、0.121 (0.083,0.166) 和 0.063 (0.013,0.119)(图 1)。GC 血清 miR-486 的含量显著高于胃息肉患者及健康对照者,差异均有统计学意义(U 值分别为 116,252, P 均 < 0.001)。胃息肉患者与健康对照者血清 miR-486 的表达量差异无统计学意义($U=95, P=0.811$)。

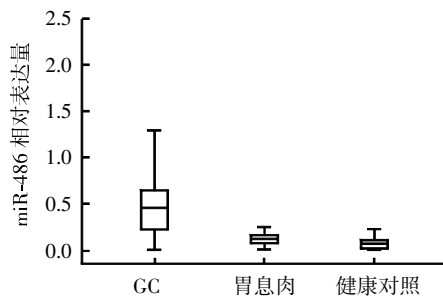


图 1 GC 组、胃息肉组和健康对照者血清 miR-486 的相对表达量

Figure 1 Relative expression of miR-486 in serum of gastric cancer group, the gastric polyps group and healthy controls

2.2 GC 患者血清 miR-486 的含量与临床病理特征的关系

将 100 例 GC 按性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤分化程度、淋巴结是否转移和 TNM 分期等临床资料进行分组,统计各资料分组间 miR-486(0.202 5 为临界值)高表达和低表达的例数。根据 χ^2 检验,GC 血清 miR-486 的含量与 GC 分化程度、TNM 分期、是否淋巴结转移密切相关,差异有统计学意义($P < 0.05$); GC 血清 miR-486 的含量与 GC 的性别、年龄、GC 部位无关($P > 0.05$,表 1)。

2.3 GC 患者血清 miR-486 相对表达量与 CEA、CA199 和 CA724 的相关性

CEA、CA199、CA724 在 GC 组、胃息肉组及健康对照组血清中的表达水平见表 2。GC 患者血清 miR-486 相对表达量与 CEA($r=0.213, P=0.034$)、CA724 ($r=0.297, P=0.003$) 有相关性,与 CA199 ($r=0.037, P=0.714$) 无相关性(图 2)。

2.4 miR-486、CEA、CA199 及 CA724 对诊断胃癌的 ROC 曲线分析

将 miR-486、CEA、CA199、CA724 含量结合 GC 组和健康对照组作 ROC 曲线(图 3)分析各指标对 GC 诊断的特异度和灵敏度,并计算其准确度、阳性及阴性预测值(表 3)。结果显示,GC 组与健康对照组比较,miR-486 的敏感度、特异度和准确度分别为 76.0%、98% 和 83.3%,高于 CEA、CA199 和 CA724。miR-486、CEA、CA199、CA724 对 GC 诊断价值通过

表 1 GC 血清 miR-486 的含量与临床病理特征的关系
Table 1 Relationship between GC content of serum miR-486 with clinical pathological features

主要临床病理资料	miR-486		χ^2	P 值
	低表达(n)	高表达(n)		
性别			0.609	0.435
男	19	54		
女	5	22		
年龄(岁)			1.072	0.300
≤60	13	32		
>60	11	44		
部位			4.542	0.103
胃上部	7	35		
胃中部	4	18		
胃下部	13	23		
分化			6.142	0.046
低分化	7	41		
中分化	13	21		
高分化	4	14		
淋巴结转移			7.468	0.006
否	6	3		
是	18	73		
分期			6.136	0.013
I + II + III	18	35		
IV	6	41		

表 2 CEA、CA199、CA724 在胃癌组、胃息肉组及健康对照组血清中的表达水平

Table 2 CEA, CA199, CA724 serum expression level in gastric cancer, gastric polyps group and healthy controls

组别	例数	CEA(ng/mL)	CA199(U/mL)	CA724(U/mL)
GC 患者	100	2.80(2.20,3.43)	11.49(6.32,23.98)	4.18(2.09,11.33)
健康对照者	50	1.85(1.40,3.20)	7.25(6.18,9.68)	3.15(1.90,3.83)
胃息肉患者	30	2.67(1.60,5.19)	10.15(6.18,14.58)	3.55(2.70,4.90)

AUC 表示分别为 0.839、0.626、0.638、0.649。所以, miR-486 对 GC 的诊断价值均高于 CEA、CA199 和 CA724。

3 讨论

GC 常用的肿瘤标记物有 CEA、CA199、CA724。CEA 特异性不强,多种肿瘤均可升高,在 GC 中阳性率 20%~30%,CA199 在多种消化系肿瘤均可升高,在 GC 中阳性率 30%~40%,CA724 对 GC 特异性比较高,目前认为是诊断的首选指标。本文中 CA724 对 GC 的诊断效率 AUC 为 0.649,明显高于 CEA、CA199。

研究表明人类肿瘤发生发展与 miRNA^[5]相关。

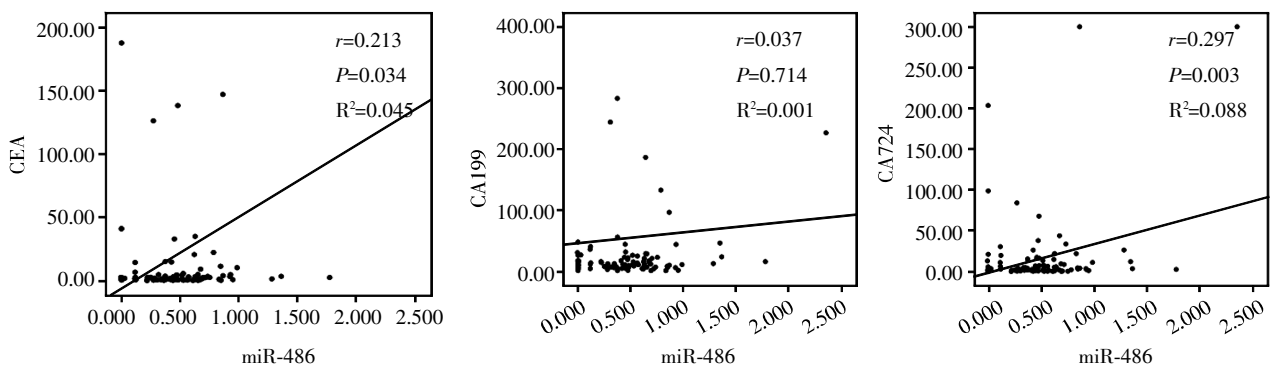


图 2 miR-486 与 CEA、CA199 和 CA724 的相关性分析

Figure 2 Correlation analysis of miR-486 and CEA, CA199 and CA724

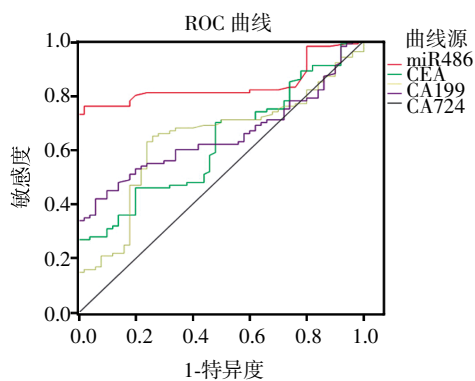


图 3 miR-486、CEA、CA199 及 CA724 对诊断 GC 的 ROC 曲线

Figure 3 miR-486, CEA, CA199, CA724 ROC curve for diagnosis of gastric cancer

表 3 miR-486、CEA、CA199 及 CA724 对诊断胃癌的 ROC 曲线分析

Table 3 MiR-486, CEA, CA199, CA724 ROC curve analysis of the diagnosis of gastric cancer

检测指标	临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	准确度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	AUC
miR-486	0.202 5	76.0(76/100)	98(49/50)	83.3(125/150)	98.7(76/77)	67.1(49/73)	0.839
CEA	4.55(μg/L)	27(27/100)	98(49/50)	50.7(76/150)	96.4(27/28)	40.2(49/122)	0.626
CA199	9.325(U/mL)	63(63/100)	76(38/50)	67.3(101/150)	84(63/75)	51(38/75)	0.638
CA724	4.935(U/mL)	42(42/100)	94(47/50)	59(89/150)	93(42/45)	45(47/105)	0.649
联合诊断		82(82/100)	100(50/50)	88(132/150)	100(82/82)	74(50/68)	

不同肿瘤细胞其 miRNA 表达谱不同,故可以通过比较正常组织和肿瘤组织 miRNA 表达谱来鉴别肿瘤,辅助肿瘤的早期诊断^[6]。研究表明 miR-195 和 miR-378 在 GC 组织和细胞系中均显著下调,充当抑癌基因作用,miR-195 和 miR-378 的低表达与启动子 CPG 岛甲基化相关,去甲基试剂 5-aza-dC 显著恢复 miR-195 和 miR-378 在 GC 细胞中的表达^[7]。miR-17-5p/20a 在 GC 组织中上调^[8],充当癌基因的作用,miR-17-5p/20a 的过表达促进 GC 细胞增殖、抑制细胞凋亡。因此,miRNA 在 GC 的发生中发挥重要作用。

miR-486 最先在造血分化最旺盛的胎肝组织中发现。孙燕等^[9]研究发现,miR-486 参与造血干细胞

的分化调节,其与红系造血密切相关,并通过靶基因 ARID4B 发挥生物学功能。Song 等^[10]研究表明 miR-486 可能通过干扰 NF-κB 负反馈环的机制发挥作用。新近研究表明 miR-486 与肾细胞癌、乳腺癌、人类黏液样脂肪肉瘤的发生与发展密切相关^[11-13]。研究表明 miR-486-5p 作用于靶基因 ARHGAP5 抑制 NSCLC 的进展与转移,可能作为 NSCLC 诊断和治疗的靶点^[14]。但是,miR-486 在 GC 中的表达及作用机制尚未清楚。

本课题采用荧光定量 PCR,对 100 例 GC、30 例胃息肉患者及 50 例健康对照者血清 miR-486 含量进行检测,结果显示 GC 血清 miR-486 含量显著高于

胃息肉患者和健康对照者,均具有统计学意义($P < 0.001$)。胃息肉患者组和健康对照组的血清 miR-486 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。GC 血清 miR-486 的含量在 GC 分化程度、TNM 分期、淋巴结是否转移有统计学差异($P < 0.05$)。说明肿瘤晚期、分化差的 GC 患者血清 miR-486 有升高的趋势,提示监测其水平可能对患者的病情发展和预后判断有一定意义。

本研究检测了 GC 患者的血清 miR-486、CEA 和 CA199 和 CA724 表达水平,并进行相关性分析。结果显示,miR-486 与 CEA、CA724 有相关性,与 CA199 无相关性。用 ROC 曲线分析 miR-486、CEA、CA199 及 CA724 对 GC 诊断效能,结果显示 miR-486 优于 CEA、CA199、CA724。4 种指标联合检测大大提高对 GC 诊断灵敏度和特异度。提示 miR-486 可能作为新的 GC 肿瘤标志物,在 GC 辅助诊断方面具有一定的价值。

Oh 等^[4]研究表明在 GC 组织中 miR-486 作为抑癌基因是低表达的,与本研究的 GC 患者血清 miR-486 高表达情况不一样。目前,对其机制还不清楚。一种假说是,miRNA 是有选择性的从组织释放到外周血的,例如 Ohshima 等^[15]提出 let-7 家族,一般作为抑癌基因,在 GC 组织中下调,高度侵袭性 GC 细胞选择性释放 let-7 到细胞外。第二种假说是正常的组织也可能释放 miRNA 到外周血循环。例如 Pigati 等^[16]指出,细胞外的 miRNA 与细胞内表达不一致,有可能外周 miRNA 来自于乳腺癌患者的正常上皮细胞。第 3 种假说是有些临床症状与血清 miRNA 表达情况相符。具体的原因机制尚待深入研究。

综上所述,GC 患者血清 miR-486 含量升高,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 GC 患者血清 miR-486 含量对 GC 的辅助诊断有一定价值。miR-486 可能是一个重要的诊断生物学指标,其在 GC 组织中的含量及其在 GC 中的具体作用机制仍有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 王亚农. 胃癌早治疗,生存率达 90%[J]. 自我保健, 2010, 10: 55
- [2] 冯菲菲. 外周血 microRNA-23b 作为胃癌筛查分子标志物的价值和应用研究[D]. 杭州:浙江大学医学院, 2012
- [3] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. Proc Natl

Acad Sci U S A, 2011, 108: 5003-5008

- [4] Oh HK, Tan AL, Das K, et al. Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer[J]. Clinical Cancer Res, 2011, 17 (9): 2657-2667
- [5] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Dev Biol, 2011, 302(1): 1-12
- [6] Rossi S, Sevignani C, Nnadi SC, et al. Cancer-associated genomic regions (CAGRs) and noncoding RNAs; bioinformatics and therapeutic implications[J]. Mamm Genome, 2010, 19(7-8): 526-540
- [7] Deng HX, Guo YN, Song HJ, et al. MicroRNA-195 and microRNA-378 mediate tumor growth suppression by epigenetical regulation in gastric cancer[J]. Gene, 2013, 518: 351-359
- [8] Wang M, Gu HB, Qian H, et al. miR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation [J]. Uropean Journal of Cancer, 2013, 49(8): 2010-2021
- [9] 孙燕. MicroRNA-486 在造血细胞红系分化中的表达及机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2013
- [10] Song L, Lin C, Gong H, et al. miR-486 sustains NF- κ B activity by disrupting multiple NF- κ B-negative feedback loops[J]. Cell Res, 2013, 23(2): 274-289
- [11] Goto K, Oue N, Shinmei S, et al. Expression of miR-486 is a potential factor after nephrectomy in advanced renal cell carcinoma[J]. Mol Clin Oncol Cancer, 2013, 1(2): 235-240
- [12] Gu YQ, Gong G, Xu ZL, et al. miRNA profiling reveals a potential role of milk stasis in breast carcinogenesis [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(5): 1243, 1249
- [13] Borjigin N, Ohno S, Wu W, et al. TLS-CHOP represses miR-486 expression, including upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427(2): 355-360
- [14] J Wang, X Tian, R Han, et al. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer [J]. Oncogene, 2014, 33: 1181-1189
- [15] Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line[J]. PLoS One, 2011, 5(10): e13247
- [16] Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13515

[收稿日期] 2016-01-03