

MicroRNA-100在胃癌患者血清中的表达及临床意义

王利平 王启之 邓敏 燕善军 汪建超 李大鹏 汪强武

摘要 目的:探讨MicroRNA-100(miR-100)在胃癌患者血清中的表达及临床意义。**方法:**选择蚌埠医学院第一附属医院手术及随访资料完整的胃癌患者(40例)和健康对照者(40例)为研究对象,提取血清总miRNA,在建立了稳定、敏感的血清miR-100绝对定量检测方法(qRT-PCR)的基础上,检测胃癌和健康对照者血清中miR-100表达水平。分析胃癌和健康对照者血清中miR-100表达差异及血清中miR-100表达水平与胃癌临床病理参数的关系。**结果:**胃癌患者血清中miR-100的表达水平为 (2.78 ± 1.92) fmol/L,显著高于健康对照者 $[(0.19\pm 0.15)$ fmol/L, $P<0.01$],同时miR-100的受试者工作特征曲线显示,血清miR-100对胃癌诊断具有良好的特异度和敏感度(曲线下面积0.985);进一步分析发现:血清中miR-100的表达与性别、年龄、肿瘤直径大小、浸润深度、分化程度、淋巴结转移数量、TNM分期等无明显差异($P>0.05$)。**结论:**血清miR-100的检测可能有助于胃癌的诊断。

关键词 MicroRNA miR-100 肿瘤标记物 胃肿瘤 敏感性与特异性

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20140777

Expression and clinical significance of serum microRNA-100 in gastric cancer patients

Liping WANG, Qizhi WANG, Min DENG, Shanjun YAN, Jianchao WANG, Dapeng LI, Qiangwu WANG

Correspondence to: Qizhi WANG; E-mail: wangqz2004@sina.com

Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China

Abstract Objective: To investigate the expression of microRNA-100 (miR-100) in the serum of gastric cancer patients and its clinical significance. **Methods:** At The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, 40 gastric cancer patients who underwent surgery with complete follow-up data and 40 healthy controls were selected as research subjects. Total miRNA was isolated from the serum samples of the cancer patients. A stable and sensitive detection method for the absolute quantification of miR-100 was established. The serum levels of miR-100 in the patients and healthy controls were tested according to this novel method. Differences of the miR-100 expression in the serum samples of the patients and healthy controls were analyzed using statistical analysis. The correlation between miR-100 expression levels and the clinicopathological features of gastric cancer was also analyzed. **Results:** The expression level of miR-100 in the serum was significantly higher in cancer patients $[(2.78\pm 1.92)$ fmol/L] than in the healthy controls $[(0.19\pm 0.15)$ fmol/L, $P<0.01$]. The receiver operating characteristic curve of miR-100 indicated that serum miR-100 has satisfactory specificity and sensitivity for the diagnosis of gastric cancer (AUC=0.985). Further analytical results indicated that no significant differences were found among the expression levels of serum miR-100 with respect to the gender, age, tumor diameter, infiltrating depth, differentiation degree, frequency of lymph-node metastasis, and TNM stage ($P>0.05$). **Conclusion:** Serum miR-100 testing may be helpful in the diagnosis of gastric cancer.

Keywords: MicroRNA, miR-100, tumor marker, stomach neoplasm, sensitivity and specificity

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,死亡率居全部恶性肿瘤的第二位^[1]。2008年调查显示大约每年有98.9万新发病例,73.8万死亡病例。超过70%的病例(约每年71.4万例)在发展中国家,大约有50%的胃癌发生在亚洲东部^[2]。究其原因,主要是胃癌患者就诊时,大多数已经处于中晚期,耽误了最佳治疗时机,预后较差。目前临床中常用于胃癌检测的肿

瘤标记物有CEA、CA199等,但敏感度和特异性均不能令人满意,很多学者想到联合检测多种肿瘤标记物,但结果仍不理想^[3]。所以亟待寻找一种特异、敏感的胃癌血清生物标志物来提高胃癌的早期诊断、改善胃癌患者预后。

微小核糖核酸(miRNA)是近年来新发现的一种肿瘤标志物,与肿瘤的发生发展密切相关。研究发

现,miRNA不仅在肿瘤组织中表达异常,在肿瘤患者血清中也能稳定存在^[4-7]。前期研究发现,miR-100在胃癌中表达较癌旁组织中明显升高,本研究旨在探讨miR-100在胃癌患者血清中的表达变化及与临床病理参数的关系,有助于胃癌的早期诊断。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 40例胃腺癌患者血清标本均来自蚌埠医学院第一附属医院2013年6月至2013年11月住院患者,均经术后病理证实为胃腺癌。收集标本前患者均未接受放射治疗和化学药物治疗。其中男性27例,女性13例;年龄38~82岁,平均(63.03±11.39)岁;临床分期按2010年国际抗癌联盟(UICC)TNM标准分期:I/II期20例,III/IV期20例;病理分级:高、中分化为18例,低分化为22例;N₀/N₁共17例,N₂/N₃共17例。40例健康对照组血清标本来自健康体检者。本研究经蚌埠医学院伦理委员会批准,所有标本均获知情同意书。

1.1.2 血液标本收集 用无菌注射器抽取患者静脉血5 mL,注入离心管中,常温放置60 min,2 h内血清的离心完成,4℃,2 000 r/min,离心10 min,吸取上层血清转入无RNA酶的1.5 mL EP管中,冷冻于-80℃冰箱。同时收集患者的临床及随访资料用于病理参数的分析。

1.1.3 试剂 血清miRNA快速提取试剂盒试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司,miRNA逆转录试剂盒,universal master mix,miRNA探针购自美国生命科技公司。

1.2 方法

1.2.1 血清中总miRNA的提取 参考血清miRNA快速提取试剂盒试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)的使用说明书提取血清总miRNA。

1.2.2 逆转录反应 参照TaqMan miRNA逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应,反应条件如下:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,程序结束后即miRNA的逆转录完成。

1.2.3 绝对定量PCR(qRT-PCR) 参照绝对定量PCR反应试剂盒说明书对miR-100进行绝对定量检测,用化学合成的has-miR-100作为标准品进行10倍的梯度稀释,制作标准曲线。Real-time PCR程序:95℃ 10 min,95℃ 5 s,60℃ 1 min,设置为40个循环。扩增反应在实时荧光定量PCR仪上进行扩增,实时荧光定量PCR扩增反应每个样本均做复管,重复3次,取平均值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件对数据进行分析,用配对样

本的t检验分析比较miR-100在胃癌患者和健康对照者血清中的表达差异,用两独立样本的t检验或者单因素方差分析比较血清miR-100表达水平与胃癌临床病理参数间的关系,用受试者工作特征曲线(ROC)计算并评价血清miR-100作为胃癌诊断分子标记的特异度和敏感度。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清miR-100绝对定量检测方法

将人工合成的has-miR-100制备成浓度分别为10⁻²、10⁻¹、10⁰、10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ fmol/L的标准反应样本,分别进行逆转录反应及RT-PCR反应,记录不同浓度样本的CT值,以浓度对数值为X轴,CT值为Y轴作散点图,线性拟合,得出线性方程为Y=-3.259log X+33.777(R²=0.9880),从而建立了稳定、敏感的血清miR-100绝对定量PCR检测体系。

2.2 胃癌患者组血清miR-100与健康对照组比较

用上述定量检测方法对40例胃癌患者组和40例健康对照组血清中miR-100的表达水平进行了检测。结果表明,胃癌患者组血清miR-100平均浓度较健康对照组高,胃癌组与健康对照组比较差异均有统计学意义(P<0.01,表1)。

表1 胃癌组和健康对照组血清中miR-100的表达差异

Table 1 Differential expression of miR-100 in the serum of gastric cancer patients and healthy controls

Group	n	miR-100 ($\bar{x}\pm s$, fmol/L)	P
Gastric cancer	40	2.78±1.92	<0.01
Healthy controls	40	0.19±0.15	

2.3 血清miR-100表达水平与胃癌临床病理参数的关系

通过比较发现分化程度越低以及有淋巴结转移的患者,miR-100的表达量较高,但均无显著性统计学差异(P>0.05)。进一步分析发现miR-100与胃癌患者的性别、年龄、肿瘤位置、直径大小、临床TNM分期等无相关性(P>0.05,表2)。

2.4 血清中miR-100、CEA、CA199诊断胃癌可靠性的比较

受试者工作曲线(ROC曲线)分析显示:血清中各检测指标诊断胃癌的曲线下面积(AUC)从小到大依次分别为CA199、CEA、miR-100,结果分别为0.729、0.814、0.985。诊断胃癌的最佳miR-100浓度截断值为0.48 fmol/L,其灵敏度和特异性分别为95%、97.5%(图1,表3)。

表2 miR-100的表达水平与临床病理参数之间的关系

Table 2 Relationship between miR-100 expression and the clinicopathologic parameters

Characteristic	n	miR-100 ($\bar{x}\pm s$, fmol/L)	P
Age (years)			
<65	22	2.37±1.57	0.16
≥65	18	3.24±2.25	
Gender			
Male	27	2.49±1.65	0.19
Female	13	3.36±2.35	
Lesion location			
Gastric bottom	14	2.11±1.56	0.16
Gstic body	19	3.38±2.07	
Antrum	7	2.49±1.88	
Tumor size d (cm)			
<5	24	2.78±1.46	0.99
≥5	16	2.79±2.51	
Differentiation			
Well differentiated	18	2.61±1.69	0.61
Poorly differentiated	22	2.92±2.12	
T stage			
T ₁ , T ₂	10	2.83±1.62	0.92
T ₃ , T ₄	30	2.76±2.04	
N stage			
N ₀ , N ₁	17	2.71±1.48	0.84
N ₂ , N ₃	23	2.83±2.22	
TNM stage			
I, II	20	2.85±1.60	0.82
III, IV	20	2.71±2.23	

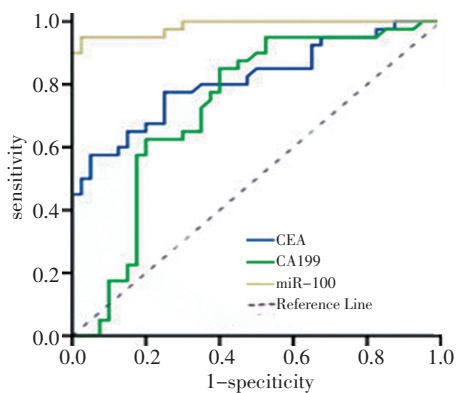


图1 miR-100与CEA、CA199诊断胃癌的ROC曲线比较
Figure 1 Comparison of miR-100 levels with the Receiver Operating Characteristic curves of CEA and CA199 for the diagnosis of gastric cancer

表3 CEA、CA199、miR-100诊断胃癌曲线下面积(AUC)差异

Table 3 Differences of the area under curves among the CEA, CA199, and miR-100 for the diagnosis of gastric cancer

Gastric cancer diagnosis index	AUC	Standard error	95%, CI
miR-100	0.985	0.014	0.928-0.998
CEA	0.814	0.048	0.711-0.892
CA199	0.729	0.056	0.618-0.822

3 讨论

miRNA是新近发现的长约19~25 nt的内源性非编码小分子RNA,广泛存在于真核细胞中,它的发现揭示了一种新的基因表达调控方式。近年大量的研究发现,血浆中的miRNA很早就被用作于肿瘤生物诊断标记物^[8]。Mitchell等^[9]研究发现,miRNA能够在外周血中稳定存在,同时认为正常情况下血清中的miRNAs来自血细胞,而与肿瘤相关的miRNAs并非来源于血细胞,可能来自肿瘤组织。进一步研究指出,miR-141在前列腺癌患者血清中较对照组明显升高,并且与前列腺抗原密切相关,以miR-141作为肿瘤标记物诊断前列腺癌的敏感度和特异性(60%、100%)。

Mourelatos等^[10]通过基因测序首先发现成熟miR-100在人类的基因序列为“AACCCGUAUCC-GAACUUGUG”22个碱基,并定位于11号染色体。miR-100是人类发现较早miRNA中的一员,在多种肿瘤组织和细胞中表达异常^[11-16]。Volinia等^[17]在对胃癌等6种人类肿瘤的540例组织标本的研究发现,相对于正常胃黏膜组织,miR-100在胃癌组织中表达上升。Ueda等^[18]也发现miR-100在胃癌中明显升高,起到促癌基因的作用。前期研究也证实了miR-100在胃癌组织中是明显上调的。

本研究发现,与健康者相比,胃癌患者血清miR-100的表达明显升高,发现分化程度越低的患者,miR-100的浓度越高,但都无统计学意义($P>0.05$)。推测可能与miRNA表达特异性或者是样本量较少有关。ROC曲线分析指出,诊断胃癌的最佳miR-100浓度截断值为0.48 fmol/L,其灵敏度和特异度分别为95%与97.5%,曲线下面积0.985,说明血清miR-100对胃癌诊断具有良好的特异性和敏感性。

本实验中观察到胃癌组织中高表达的miR-100,同时患者血清中miR-100也高表达,另外由于血清miRNA的稳定性^[9],加之取材方便,这使得miR-100的血液检测成为可能。但临床广泛应用还有很多问题需要解决,如血清miR-100是否可以作为诊断胃癌的肿瘤检测指标;建立适合临床应用的标准化检测体系,包括质控和诊断阈值的确定;以及能否与其他血清肿瘤标志物联合检测以提高胃癌检测的敏感性和特异性,这些都有待于基础研究中组织特异性的miRNAs的发现以及更大样本的临床研究。

总之,与肿瘤相关的miRNA的研究仍处于初级阶段,随着研究的进一步深入,外周血miR-100的检测有望成为胃癌诊断以及预后评价的重要指标。

参考文献

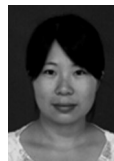
1 Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. The incidences and mortalities of

- major cancers in China, 2009[J]. Chin J Cancer, 2013, 32(3):106-112.
- 2 Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12):2893-2917.
 - 3 Łukaszewicz-Zajc M, Mroczko B, Gryko M, et al. Comparison between clinical significance of serum proinflammatory proteins (IL-6 and CRP) and classic tumor markers (CEA and CA 19-9) in gastric cancer[J]. Clin Exp Med, 2011, 11(2):89-96.
 - 4 Li X, Zhang Y, Ding J, et al. Survival prediction of gastric cancer by a seven microRNA signature[J]. Gut, 2010, 59(5):579-585.
 - 5 Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. Br J Haematol, 2008, 141(5):672-675.
 - 6 Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signature of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 112(1):13-21.
 - 7 Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18(10):997-1006.
 - 8 Chan KC, Lo YM. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers[J]. Br J Cancer, 2007, 96(5):681-685.
 - 9 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. PNAS, 2008, 105(30):10513-10518.
 - 10 Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs[J]. Genes Dev, 2002, 16(6):720-728.
 - 11 Nagaraja AK, Creighton CJ, Yu Z, et al. A link between miR-100 and FRAP1 mTOR in clear cell ovarian cancer[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(2):447-463.
 - 12 Li BH, Zhou JS, Ye F, et al. Reduced miR-100 expression in cervical cancer and precursors and its carcinogenic effect through targeting PLK1 protein[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(14):2166-2174.
 - 13 Shi W, Alajez NM, Bastianutto C, et al. Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 126(9):2036-2048.
 - 14 Gao W, Shen H, Liu L, et al. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(4):557-566.
 - 15 Dai Y, Xie C, Neis JP, et al. MicroRNA expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma with docetaxel-induced multidrug resistance[J]. Head Neck, 2011, 33(6):786-791.
 - 16 Sun J, Chen Z, Tan X, et al. MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Medical Oncology, 2013, 30(1):1-9.
 - 17 Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(7):2257-2261.
 - 18 Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2):136-146.

(2014-05-18收稿)

(2014-10-25修回)

(本文编辑:贾树明)



作者简介

王利平 专业方向为消化肿瘤内科的临床治疗和研究。

E-mail: wangliping3785@126.com

· 读者 · 作者 · 编者 ·

欢迎订阅《中国肿瘤临床》

《中国肿瘤临床》为中国科协主管、中国抗癌协会主办、国内外公开发行的肿瘤学专业学术期刊。秉承“引导创新、关注前沿、突出临床、讲求实用”的办刊宗旨,快速报道国内外肿瘤学领域优秀科研成果和临床诊疗经验,促进国内外肿瘤学领域学术交流,为肿瘤医学事业发展而服务。主要栏目:基础研究、临床研究与应用、特约综述、国家自然科学基金研究进展综述等。为中国中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、被 Chemical Abstracts(CA)、Biological Abstracts(BA)、《中国科学引文索引》、《中文核心期刊要目总览》等收录。

《中国肿瘤临床》为半月刊,全年出版24期,每月15日和30日出版,国内外公开发行。国内定价16.8元/册。国内刊号:CN12-1099/R,国际刊号:ISSN 1000-8179,邮发代号:6-18,国外代号:M6690。全国各地邮局订购,也可向编辑部直接邮购。

编辑部地址:天津市河西区体院北环湖西路肿瘤医院C楼3层 邮编:300060

电话/传真:022-23527053 网址: http://www.cjco.cn

邮箱:cjcotj@sina.com cjco@cjco.cn