

荧光定量PCR法在胃癌血清miR-21检测中的应用

朱 伦, 杨少芳, 余 算, 郑阿迈, 徐荣伟

朱伦, 杨少芳, 余算, 郑阿迈, 徐荣伟, 浙江省乐清市第三人民医院检验科 浙江省乐清市 325600

朱伦, 主管技师, 主要从事临床检验医学的研究.

作者贡献分布: 朱伦负责论文研究的设计和论文写作; 杨少芳负责资料收集; 余算与郑阿迈负责实验研究; 徐荣伟负责文章的审核、校对以及论文写作指导.

通讯作者: 朱伦, 主管检验师, 325600, 浙江省乐清市乐柳市前市街335号, 乐清第三人民医院检验科.

yanghuaiy4238@126.com

收稿日期: 2014-03-12 修回日期: 2014-04-15

接受日期: 2014-04-20 在线出版日期: 2014-05-28

Clinical significance of quantitative PCR detection of serum miR-21 in patients with gastric cancer

Lun Zhu, Shao-Fang Yang, Suan Yu, A-Mai Zheng, Rong-Wei Xu

Lun Zhu, Shao-Fang Yang, Suan Yu, A-Mai Zheng, Rong-Wei Xu, the Third People's Hospital of Yueqing City, Leqing 325600, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Lun Zhu, the Third People's Hospital of Yueqing City, 335 Qianshi Street, Leqing 325600, Zhejiang Province, China. yanghuaiy4238@126.com

Received: 2014-03-12 Revised: 2014-04-15

Accepted: 2014-04-20 Published online: 2014-05-28

Abstract

AIM: To explore the significance of serum miR-21 detection for non-invasive diagnosis of gastric cancer and evaluation of surgery results.

METHODS: Serum samples from normal medical personnel, patients with antral ulcers, those with gastric inflammatory polyps, those with intestinal metaplasia, and those with gastric cancer were collected, and fluorescence quantitative PCR was used to detect miR-21 expression in the above serum samples and matched gastric tissues.

RESULTS: Serum miR-21 levels had a positive correlation with those in gastric tissues in all the subjects ($r = 0.826$, $P < 0.001$). Serum levels of miR-21 were significantly higher in patients with gastric cancer than in normal controls. Postoperative serum levels of miR-21 were significantly lower than preoperative levels in gastric cancer

patients ($t = 0.511$, $P = 0.030$). Serum miR-21 levels differed significantly among the five groups of subjects ($\chi^2 = 10.841$, $P = 0.028$).

CONCLUSION: Detection of serum miR-21 is helpful for noninvasive diagnosis of gastric cancer and evaluation of surgical effects.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Quantitative PCR; Gastric cancer; MiR-21; Non-invasive diagnosis

Zhu L, Yang SF, Yu S, Zheng AM. Xu RW. Clinical significance of quantitative PCR detection of serum miR-21 in patients with gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(15): 2155-2158 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2155.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i15.2155>

摘要

目的: 探讨miR-21对胃癌无创性诊断以及对手术效果的评判.

方法: 选取5类人员胃肠消化系统样本血清, 通过荧光定量PCR方法对miR-21表达情况进行检测, 对照分析正常体检人员和胃窦溃疡患者、胃窦炎性息肉患者、肠上皮化生人员以及胃癌患者的血清样本中分别与配对的胃组织miR-21表达情况.

结果: 通过对照分析, 不同人员的血清中miR-21含量分别和配对的胃肠组织中表达的量具有正相关性($r = 0.826$, $P < 0.001$). 经过检测, 和正常对照组进行比较, miR-21在胃癌患者的血清中含量出现明显升高, 且术后, 血清中miR-21的含量和手术之前比较降低明显($t = 0.511$, $P = 0.030$). 另外, miR-21在五组研究对象的血清中含量具有明显差异, 具有统计学意义($\chi^2 = 10.841$, $P = 0.028$).

结论: 通过分析, 利用检测血清中miR-21含量变化, 可以无创性的诊断胃癌, 并通过miR-21含量变化对手术的效果进行评价, 临床上具有重要意义.

■背景资料

临床上, 对于胃癌的诊断, 一般通过胃镜检查以及病理学分析等, 但是耐受性较差. 而无创性诊断应用广泛的是利用血清肿瘤标志物, 但灵敏性较低, 特异性不强. 研究发现, miRNA中miR-21在胃癌肿瘤组织中表达具有特异性, 且血清中表达水平和组织中表达水平具有正相关性. 当前, 关于miR-21等miRNA在胃癌诊断以及手术效果评价中的应用, 在国内外已开展了广泛的临床研究, 取得了理想的临床效果. 因此, 使用miR-21对胃癌诊断以及手术效果进行评价是一种较为科学、高效的诊断途径.

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院

■研发前沿

通过研究血清中miR-21表达水平和肿瘤组织中miR-21表达水平的相关性,分析利用检测血清中miR-21来诊断胃癌或评价手术效果利用价值,将能够为胃癌诊断提供临床参考。寻求高效、安全的诊断方法,有效降低患者检测痛苦以及诊断费用,且大大提高确诊率。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 荧光定量PCR法; 胃癌; MiR-21; 无创性诊断

核心提示: 微小RNA(miRNA)在一些恶性肿瘤的靶基因中发挥重要作用,对于胃癌患者,肿瘤组织中有一定的miR-21的表达,而血清中miR-21的表达水平和肿瘤组织中表达水平具有相关性。因此,通过对血清中miR-21含量进行测定,对无创性诊断胃癌具有重要意义。

朱伦, 杨少芳, 余算, 郑阿迈, 徐荣伟. 荧光定量PCR法在胃癌血清miR-21检测中的应用. 世界华人消化杂志 2014; 22(15): 2155-2158 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2155.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i15.2155>

0 引言

当前,社会发展速度不断提升,人们生活节奏加快,胃肠疾病发病率不断攀升,因胃黏膜的上皮细胞发生恶性肿瘤变化而引起胃癌患者越来越多,约占胃部恶性肿瘤的96%左右。临床上,对于胃癌的诊断一直把胃镜检查 and 病理学分析诊断作为诊断标准,但存在患者耐受性差等缺点。临床上,引入微小RNA后,为无创性恶性肿瘤诊断开辟了新路径。微小RNA,即miRNAs,在多种生物体细胞中普遍存在,属于内源性且为非编码的RNA微小分子,一般只有20个左右的核苷酸组成,只占到全部基因的五分之一,但mRNA通过剪切或者抑制翻译对生物体的许多生理过程进行调控,在生物体细胞的凋亡、脂肪的代谢、神经元的发育以及细胞分化、激素分泌等过程中扮演重要角色^[1,2]。其中被发现最早且应用较为广泛的miRNA是miR-21,对许多胃部、肺部、膀胱的恶性肿瘤的靶基因中发挥着重要的作用^[3-5]。国外研究^[6]发现在人体的血清中miRNAs的含量具有一定的稳定性,但由于疾病种类和病程变化,相关器官组织和血清中miRNAs水平会有一定的差异。我院通过荧光定量PCR方法探讨人体血清和配对组织中的miR-21含量变化,对胃癌患者进行无创性诊断,并探讨在评价手术效果方面的作用,取得令人满意的效果,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2012-01/2013-06我院收治的30例胃癌患者,患者均未接受放化疗等手段治疗,其中男性患者22例,女性患者8例,患者年龄40-65岁,平均年龄为53.8岁±5.1岁。分别采集患者术

前和术后3 mo的外周血,取部分癌组织,同时切取癌组织5 cm外的正常组织。作为对照,选择同期的接受消化系统体检的正常人员共26例,平均年龄为51.2岁±6.5岁;选取胃溃疡患者24例,平均年龄为52.8岁±3.6岁;选取炎性息肉19例患者,平均年龄为53.5岁±4.8岁;选择肠上皮化生22例患者,平均年龄54.5岁±5.2岁。以上对照组病例经诊断证实,经患者及亲属同意,以上对照组人员均切取胃窦组织和外周血接受检测。全部组织标本有效浸入到保护液中保护RNA,在4℃的环境下过夜后,拿出放入-80℃环境保存。外周血经过离心之后,将血清加入到EP管中,同样在-80℃环境中保存,等待检测。

1.2 方法

1.2.1 提取RNA: 从组织中提取mRNAs, mRNAs提取试剂盒由诺伦生物医药公司生产,从每份约50 mg标本组织中正确提取出miRNAs;从血清中提取总RNA,从约200 μL的血清中成功提取出总RNA。

1.2.2 检测miR-21: 检测方法为荧光定量PCR法,利用两步法对miR-21进行检测,通过利用诺伦生物医药公司生产的试剂盒对RNA进行反转录,然后开展荧光定量PCR。对目的miRNAs使用一般通用的反转录条件进行转录。荧光定量PCR仪为美国AB公司生产的7500Fast型实施PCR反应。条件要求为: 3 min 94℃, 94℃ 20 s, 62℃ 40 s, 循环40次。

统计学处理 利用SPSS17.0统计包对数据进行统计学分析。利用多个独立的样本比较五组标本的血清和配对组织内miR-21的含量水平差异,采用Spearman秩相关对血清中的miR-21含量和配对组织标本中含量水平的相关性进行分析,配对资料利用t检验分析胃癌患者术前与术后的血清中miRNAs水平的差异,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5组血清及配对组织中miR-21含量比较 通过对照分析实验数据,不同人员的血清中miR-21含量分别和配对的胃肠组织中表达的量差异不具有统计学意义(P>0.05)。但是正常对照组和胃癌组进行比较,miR-21在胃癌患者血清中含量升高明显,具有统计学意义(P<0.05)(表1)。

2.2 miR-21在血清中及在相应配对组织中表达量关系 通过分析,血清中微小RNA中miR-21的含量水平和配对的组织中含量表达量有相关

■相关报道

目前,国内外关于miR-21在胃癌诊断以及胃癌手术效果评价价值已有大量报道,均充分肯定了miR-21的准确性和高效性。miR-21在胃癌诊断以及胃癌手术效果评价方面具有较高的临床价值。

表 1 5组血清及配对组织中miR-21的含量比较 (fmol/L)

分组	n	血清中miR-21水平	配对组织中miR-21水平
正常对照组	26	2.54 ± 0.45	2.18 ± 0.32
溃疡组	24	2.67 ± 0.69	3.52 ± 0.41
炎性息肉组	19	3.03 ± 0.74	3.74 ± 1.05
肠上皮化生组	22	2.98 ± 1.52	3.44 ± 0.77
胃癌组	30	6.01 ± 0.79	5.94 ± 1.01
(正常组与胃癌组)t值		9.811	10.117
(正常组与胃癌组)P值		<0.05	<0.05

性。且胃癌组患者miR-21水平和其余组别相比较, 不论是血清中还是配对组织中表达水平明显升高, 且差异具有统计学意义, 说明检测血清miR-21水平对于诊断胃癌具有实际意义。

2.3 胃癌患者手术前后miR-21表达情况 胃癌患者在术前和术后的血清miR-21表达含量相比较显著不同, 血清中术后miR-21含量为45.88 fmol/L ± 9.29 fmol/L, 术前含量为54.32 fmol/L ± 10.79 fmol/L, 相比降低较为明显($t = 0.511, P = 0.030$)。

3 讨论

在当前全球发现的恶性肿瘤中, 胃癌是死亡率最高的几种疾病之一, 对于胃癌的临床诊断金标准是通过胃镜进行检查, 虽然诊断准确率最高, 但是侵入性的操作使患者感到极大的不便。因此, 难以以常规检查形式开展胃癌筛查, 且通过影像检查对于胃癌早期症状以及发现微小病灶存在着局限性。而利用传统的检测血清中肿瘤标志物变化是一种伤害性较小的方法, 但普遍存在敏感性以及特异性较差等缺点, 临床上对胃癌的诊断率较低。因此, 寻求一种对胃癌敏感性较强且具有特异性的检测方法, 对患者依从性和耐受性要求较低的检查方法, 对早发现、早治疗胃癌, 减低死亡率意义重大。

国内外文献^[7,8]资料显示, 检测和肿瘤相关miRNAs已经收到医学界的广泛关注, miRNAs研究也被逐步引入到胃癌诊断领域, 研究资料^[9,10]证实miR-21在胃癌的组织中具有相对较高的含量。但是需要切取患者的胃黏膜样本, 不仅需要利用内镜侵入性观察, 有的需要手术获取组织, 对于患者来说创伤大, 同时, 胃癌组织的获取包含的细胞数目不同, 对于组织miRNAs情况只能开展相对的定量计算, 真正应用于临床具有较大难度。而本研究则是研究通过获取血清中的miRNAs来进行诊断, 效果较为优良。不

仅容易获取标本, 而且血清中miRNAs具有稳定性, 耐酶能力强, 经过反复的冻融以及酸碱环境对血清中miRNAs影响不大, 便于开展绝对定量的检测^[6,11]。根据国外文献^[12]介绍: 对胃癌患者实施根治手术之后1 mo, 患者的血清中miR-21含量出现下降。另外, 有研究^[13]认为胃癌患者血清中miR-21含量水平相比较良性胃部疾病普遍较高, 但正常人员和胃肠良性疾病患者的血清中关于miR-21含量关系不具有明显差异。

通过实验分析, 显示血清中的miR-21水平与配对的组织标本中含量水平具有一致性, 且含量水平根据患者病情的变化, 表明研究血清miRNAs诊断胃癌具有可行性。通过对五组人员的血清miRNAs情况开展分析, 显示正常组和胃癌组两者在血清中miR-21表达水平差异具有统计学意义($P < 0.01$), 证明临床上对诊断胃癌和评价手术疗效时, 利用血清miR-21可以成为新生物标志物。研究中还发现, 正常组和良性胃肠疾病患者在血清中miR-21含量水平差异不明显, 说明血清miR-21对良性病变没有区分度, 对于诊断良性胃病变价值不大。

作为一种新的肿瘤标志物, 检测血清中的miRNAs广泛运用于临床, 仍有较多问题需要研究解决: 一是miRNAs有限, 由于miRNAs调节能力较为广泛, 不仅已知的miRNAs有限, 且对其功能的了解程度也有限, 需要继续深化研究。二是血清中出现miRNAs机制尚不够明确。有的研究^[8,14]认为是凋亡细胞的主动释放, 有的认为是循环细胞的裂解而产生, miRNAs进入到血液之后和蛋白质共同形成颗粒, 这些外切酶颗粒被内吞至受体细胞, 包被被去除, 从而释放miRNAs, 发挥出其生物学的作用。以上结论有待实验进一步证实。三是患者血清的miRNAs变化和胃癌没有特异性^[15], miR-21对于多种恶性肿瘤患者的血清中水平平均差异明显。单一miRNA特

■创新盘点

使用血清miR-21对胃癌诊断以及胃癌手术效果评价, 并将其胃癌肿瘤组织miR-21表达水平进行对比, 同时, 设置正常组和良性胃肠疾病对照组, 以从更加科学、合理的角度评价miR-21临床应用优势, 对临床上无创性胃癌诊断以及对手术效果评价有较高临床意义。

■应用要点

以血清中miR-21表达水平检测为主要检查手段, 对胃癌诊断以及胃癌手术效果评价价值进行分析, 并着重分析血清中miR-21临床诊断价值, 并设置正常组和良性胃肠疾病对照。

■同行评价

本文给临床医生在早期诊断胃癌以及判断预后提供了一条新的途径,具有一定临床指导意义。

异性较弱。

总之,随着认识深入,相信血清中miRNAs将在诊断胃癌和评价术后效果方面发挥出应用的价值。

4 参考文献

- 1 Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005; 120: 21-24 [PMID: 15652478 DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.031]
- 2 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297 [PMID: 14744438]
- 3 Zhang BG, Li JF, Yu BQ, Zhu ZG, Liu BY, Yan M. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. *Oncol Rep* 2012; 27: 1019-1026 [PMID: 22267008 DOI: 10.3892/or.2012.1645]
- 4 Gao W, Xu J, Liu L, Shen H, Zeng H, Shu Y. A systematic-analysis of predicted miR-21 targets identifies a signature for lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2012; 66: 21-28 [PMID: 22244963 DOI: 10.1016/j.biopha.2011.09.004]
- 5 Zhou H, Guo JM, Lou YR, Zhang XJ, Zhong FD, Jiang Z, Cheng J, Xiao BX. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA as a marker. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88: 709-717 [PMID: 20349219 DOI: 10.1007/s00109-010-0617-2]
- 6 Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006 [PMID: 18766170 DOI: 10.1038/cr.2008.282]
- 7 Zhou LY, Lin SR, Li Y, Geng QM, Ding SG, Meng LM, Sun XN, Wang JT, Xu ZJ, Guo HL, Li CG, Cui RL. The intrinsic fluorescence spectrum of dilute gastric juice as a novel diagnostic tool for gastric cancer. *J Dig Dis* 2011; 12: 279-285 [PMID: 21791022 DOI: 10.1111/j.1751-2980.2011.00507.x]
- 8 Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 672-675 [PMID: 18318758 DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x]
- 9 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-2261 [PMID: 16461460 DOI: 10.1073/pnas.0510565103]
- 10 Yang Q, Jie Z, Cao H, Greenlee AR, Yang C, Zou F, Jiang Y. Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. *Carcinogenesis* 2011; 32: 713-722 [PMID: 21349817 DOI: 10.1093/carcin/bgr035]
- 11 Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3: e3148 [PMID: 18773077 DOI: 10.1371/journal.pone.0003148]
- 12 Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010; 102: 1174-1179 [PMID: 20234369 DOI: 10.1038/sj.bjc.6605608]
- 13 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866 [PMID: 17060945 DOI: 10.1038/nrc1997]
- 14 El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, Godfrey TE. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2004; 50: 564-573 [PMID: 14718398 DOI: 10.1373/clinchem.2003.028506]
- 15 Miki K. Gastric cancer screening by combined assay for serum anti-Helicobacter pylori IgG antibody and serum pepsinogen levels - "ABC method". *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2011; 87: 405-414 [PMID: 21785258 DOI: 10.2183/pjab.87.405]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

