

胃癌患者血清miR-92a的表达水平及其临床意义

董奇观, 杨玉超

董奇观, 杨玉超, 抚顺矿务局总医院肿瘤内科 辽宁省抚顺市 113008

董奇观, 主要从事胃癌早期诊断及防治的研究。

作者贡献分布: 病例选择、临床资料整理、主要实验、数据分析及文章起草由董奇观完成; 课题设计、文章修改及审阅由杨玉超完成。

通讯作者: 杨玉超, 主治医师, 113008, 辽宁省抚顺市新抚区中央大街24号, 抚顺矿务局总医院肿瘤内科。

yangyuchao215@126.com

电话: 024-52533291

收稿日期: 2014-08-12 修回日期: 2014-08-23

接受日期: 2014-09-03 在线出版日期: 2014-10-18

Clinical significance of abnormal expression of miR-92a in serum of gastric cancer patients

Qi-Guan Dong, Yu-Chao Yang

Qi-Guan Dong, Yu-Chao Yang, Department of Medical Oncology, General Hospital of Fushun Mining Bureau, Fushun 113008, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yu-Chao Yang, Attending Physician, Department of Medical Oncology, General Hospital of Fushun Mining Bureau, 24 Centre Street, Xinfu District, Fushun 113008, Liaoning Province, China. yangyuchao215@126.com

Received: 2014-08-12 Revised: 2014-08-23

Accepted: 2014-09-03 Published online: 2014-10-18

Abstract

AIM: To investigate the abnormal expression of miR-92a in serum of gastric cancer patients and to assess its clinical significance.

METHODS: The expression of miR-92a in serum of 100 gastric cancer patients and 100 normal controls was detected by real-time quantitative PCR. The correlation between miR-92a expression and clinicopathological features of gastric cancer was analyzed.

RESULTS: The expression level of miR-92a in serum of gastric cancer patients was significantly higher than that in normal controls (4.58 ± 0.53 vs 4.14 ± 0.41 , $P = 0.002$). For detecting gastric cancer, the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve of miR-92a was 0.737, with a sensitivity of 64.0% and a specificity of

82.0%. Serum miR-92a expression was significantly associated with lymph node metastasis, distant metastasis, clinical stage and survival duration ($P = 0.000, 0.010, 0.008, 0.024$), but not with sex, age or tumor differentiation ($P = 0.221, 0.656, 0.051$).

CONCLUSION: Serum miR-92a testing may be helpful in the diagnosis and evaluation of prognosis of gastric cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: miR-92a; Biomarker; Gastric cancer; Diagnosis; Prognosis

Dong QG, Yang YC. Clinical significance of abnormal expression of miR-92a in serum of gastric cancer patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(29): 4487-4491
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4487.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i29.4487>

摘要

目的: 探讨胃癌患者血清miR-92a的表达及其临床意义。

方法: 采用实时荧光定量PCR法检测100例胃癌患者及100例健康人血清中miR-92a的表达水平, 分析胃癌和健康对照者血清中miR-92a表达差异及其与胃癌临床病理参数的关系。

结果: 胃癌患者血清中miR-92a的表达水平(4.58 ± 0.53)显著高于健康对照者(4.14 ± 0.41), $P = 0.002$, 其对胃癌诊断的敏感度和特异度分别为64.0%和82.0%; 在100例胃癌患者中, 血清miR-92a表达水平与性别、年龄、肿瘤分化程度无关($P = 0.221, 0.656, 0.051$), 而与肿瘤淋巴结/远处转移、临床分期及患者的生存期有关($P = 0.000, 0.010, 0.008, 0.024$)。

结论: 血清miR-92a的检测可能有助于胃癌的诊断和预后评估。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

背景资料

胃癌(gastric cancer, GC)是我国最常见的恶性肿瘤之一, 占我国主要恶性肿瘤死亡的第3位, 且发病率居高不下, 严重危害人类健康。筛选高度敏感而特异的血清标志物对于提高胃癌的早期诊断率、改善患者的预后意义重大。

同行评议者

赵春玲, 副教授, 潍坊医学院细胞生物学教研室

研发前沿

微小RNA(microRNAs, miRNAs)作为一种内源性非编码RNA,通过在转录后水平调控靶基因的表达,参与多种肿瘤的发生发展,并且稳定存在于血清或血浆中,有潜力成为肿瘤诊断和预后评估的生物标志物。

关键词: miR-92a; 生物标志物; 胃癌; 诊断; 预后

核心提示: 本研究发现miR-92a在胃癌患者血清中高表达,其表达升高程度与肿瘤的临床分期、转移及预后相关,表明miR-92a有可能成为胃癌诊断和预后评估的标志物之一。

董奇观, 杨玉超. 胃癌患者血清miR-92a的表达水平及其临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(29): 4487-4491 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4487.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i29.4487>

0 引言

胃癌(gastric cancer, GC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,占我国主要恶性肿瘤死亡之第3位. 筛选高度敏感而特异的血清标志物对于提高胃癌的早期诊断率、改善患者的预后意义重大. 近期研究发现,微小RNA(microRNAs, miRNAs)在血清或血浆中稳定存在,通过在转录后水平调控靶基因的表达,参与多种肿瘤的发生、发展,可以作为肿瘤诊断和预后评估的生物标志物^[1-3]. miR-92a属于miR-17-92基因簇,在肝癌、结肠癌等恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的增殖、凋亡、转移等众多生物学过程相关^[4,5]. 然而,miR-92a在胃癌患者血清中的表达水平及与胃癌的临床病理特征之间的关系,目前尚不清楚. 本研究通过检测miR-92a在胃癌患者血清中的表达水平,分析其与胃癌临床病理特征及胃癌患者生存期之间的关系,探讨血清miR-92a作为胃癌早期诊断及预后评估标志物的可能性及临床应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2012-01-01/2012-04-01抚顺矿务局总医院100例胃癌患者血清标本,均经病理检查确诊,且无其他肿瘤病史. 其中男性59例,女性41例,年龄27-80岁,平均年龄62岁±11.0岁;临床分期按国际抗癌联盟TNM标准: I期和II期共44例,III期和IV期共56例;世界卫生组织(World Health Organization, WHO)组织学分型: 高、中分化42例,低分化58例;有淋巴结转移者63例,无淋巴结转移者37例;有远处转移者51例,无远处转移者49例. 100例对照组血清标本来自抚顺矿务局总医院体检中心胃镜检查及各项化验指标均正常者,其中男性54例,女性46例,年龄30-85岁,平均年龄60岁±10.9岁. 本研究经抚顺矿务局总医院伦理委员会批准,所有标本均

签署知情同意书. 采集受检者空腹静脉血5 mL,分离血清-80 °C保存待测. 采取标本前患者均未接受放射治疗和化学治疗. 同时收集患者的临床及随访资料.

1.2 方法

1.2.1 RNA提取: 利用酸性酚/氯仿法从200 μL血清中抽提总RNA. 紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000)测RNA浓度及纯度.

1.2.2 cDNA合成: 利用miRNA cDNA合成试剂盒(大连宝生物公司)进行逆转录. 反应体系: 2×miRNA Reaction Buffer Mix 10 μL, 0.1%BSA 2 μL, miRNA PrimeScript RT Enzyme Mix 2 μL, 总RNA 6 μL, 反应条件: 37 °C 60 min; 85 °C 5 s.

1.2.3 定量PCR: 利用实时荧光定量PCR法对miR-92a的表达进行检测. 反应在Real time PCR System(TAKARA公司)上进行. 化学合成已知拷贝数的miR-92a寡核苷酸作为标准品,反转录成cDNA,与待测样品同时进行定量PCR反应,将待测样品的Ct值代入标准曲线,计算miR-92a的表达量. 反应体系: 2×miRcute miRNA premix 10 μL, Forward primer(10 μmol/L) 0.4 μL, Reverse primer(10 μmol/L) 0.4 μL, miRNA第一链cDNA 2 μL, ddH₂O至20 μL. 反应条件: 预变性94 °C 2 min; 变性94 °C 20 s; 退火、延伸60 °C 34 s, 共45个循环. 所有反应设置3个复孔和无模板的阴性对照,所有PCR产物均经融解曲线分析以分辨目的产物与非特异产物以及引物二聚体,并再经3%琼脂糖凝胶电泳证实.

1.2.4 随访: 随访方法包括电话随访及患者来院复诊. 随访截止时间为2014-04-01,总随访时间为24 mo,中位随访时间为20 mo,其中失访5例(5%),死于其他疾病患者2例(2%). 最后失访的时间或死于其他疾病的时间作为终结时间.

统计学处理 采用SPSS13.0软件对数据进行统计分析,对血清miRNA的拷贝数取对数,经单样本K-S检验分析发现胃癌及健康对照组数据均服从正态分布,因此,利用独立样本的t检验分析比较miR-92a在两组血清中的表达差异;用两独立样本的秩和检验(Mann-Whitney U检验)分析血清miR-92a表达水平与胃癌临床病理参数间的关系;用Kaplan-Meier生存分析和Log-rank检验分析血清miR-92a表达水平和胃癌患者生存期的相关性;用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC曲线)的曲线下面积评估血清miR-92a作为胃癌诊断及预后评

相关报道

Zhou等发现miR-92a在结肠癌组织中过表达,其表达升高程度与肿瘤的TNM分期、淋巴结、远处转移及生存期相关. 奉林等研究发现miR-92a在结肠癌患者血清中表达水平亦显著升高,并可以鉴别鉴别转移性与非转移性结肠癌.

表 1 研究对象基本信息 ($n = 100$)

变量	健康对照组	胃癌组	P 值
性别(n (%))			0.476
男	54(54)	59(59)	
女	46(46)	41(41)	
年龄(岁)			0.903
平均值	60.0 ± 10.9	62.0 ± 11.0	
范围	30-85	27-80	

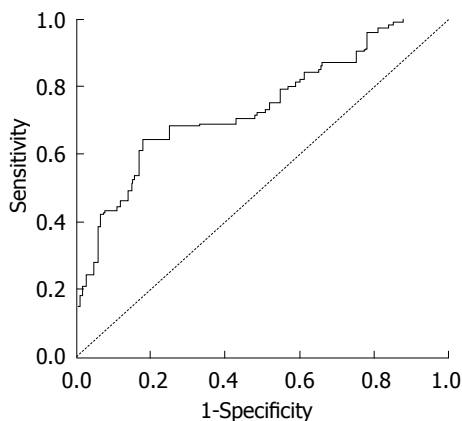


图 1 血清miR-92a区分胃癌与健康人的ROC曲线.

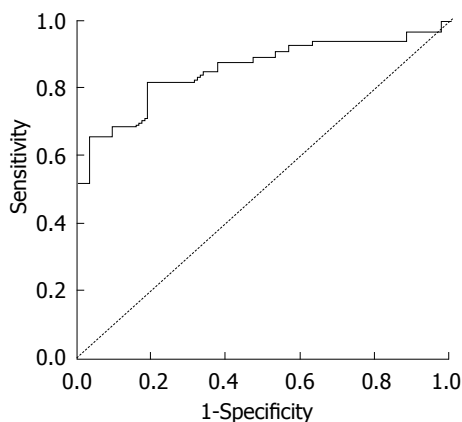


图 2 血清miR-92a区分转移性与非转移性胃癌的ROC曲线.

估标志物的特异度和敏感度. 检验水准 $\alpha = 0.05$. $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 研究对象基本信息 研究对象包括100例胃癌及100例健康对照者. 两组间年龄、性别构成上差异无统计学意义(表1).

2.2 miR-92a在胃癌和健康对照者血清中的表达差异 miR-92a在所有血清标本中均有表达, 在健康对照者血清中平均拷贝数为 4.14 ± 0.41 , 在

表 2 血清miR-92a表达水平与胃癌临床病理参数关系 (mean ± SD)

临床病理参数	n	miR-92a表达量	P 值
性别			0.221
男	59	4.73 ± 0.54	
女	41	4.38 ± 0.46	
年龄(岁)			0.656
60	54	4.66 ± 0.54	
<60	46	4.49 ± 0.52	
分化程度			0.051
高、中分化	42	4.39 ± 0.43	
低分化	58	4.73 ± 0.56	
淋巴结转移			0.000
无	37	4.23 ± 0.25	
有	63	4.79 ± 0.55	
远处转移			0.010
无	49	4.36 ± 0.39	
有	51	4.80 ± 0.57	
临床分期(期)			0.008
I、II	44	4.33 ± 0.38	
III、IV	56	4.78 ± 0.55	

胃癌患者血清中平均拷贝数为 4.58 ± 0.53 , 差异有统计学意义($t = 6.70$, $P = 0.002$). miR-92a受试者工作特征曲线显示miR-92a诊断胃癌的敏感度为64.0%, 特异度为82.0%, ROC曲线下面积为0.737(图1).

2.3 miR-92a表达与胃癌临床病理参数的关系 血清miR-92a表达水平与性别、年龄、肿瘤分化程度无关($P = 0.221, 0.656, 0.051$); 而与肿瘤淋巴结/远处转移、临床分期有关($P = 0.000, 0.010, 0.008$), 发生淋巴结或远处转移及III、IV期胃癌患者血清miR-92a表达水平显著高于无淋巴结或远处转移及I、II期胃癌患者(表2), 其鉴别转移与非转移性胃癌的敏感度为80.9%, 特异度为81.2%, ROC曲线下面积为0.847(图2).

2.4 miR-92a表达与胃癌患者生存期的关系 以胃癌患者血清miR-92a的浓度均值为标准, 将100例胃癌患者分为miR-92a高表达组和低表达组, 用Kaplan-Meier生存分析和Log-rank检验分析血清miR-92a表达水平和胃癌患者生存期的相关性. 结果表明, 血清miR-92a高表达组胃癌患者生存期短于miR-92a低表达组胃癌患者, 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.08$, $P = 0.024$)(图3).

3 讨论

胃癌的早期发现与治疗是降低其死亡率的关键,

创新盘点

本研究利用实时荧光定量PCR检测方法系统地分析了血清miR-92a表达水平与胃癌临床病理特征及患者生存期之间的关系. 首次发现血清miR-92a表达与胃癌的临床分期、转移及预后密切相关.

应用要点

miR-92a作为胃癌相关血清miRNAs之一, 有可能成为胃癌诊断和预后评估的标志物, 结合其他在胃癌患者血清中特异表达的miRNAs, 有望建立胃癌的miRNAs诊断模型, 使血清miRNAs成为胃癌早期诊断及预后评估的非侵入性标志物.

名词解释
miR-17-92基因簇：位于人染色体13q31.3处，可产生miR-17、miR-18、miR-19a、miR-20、miR-19b和miR-92等6个成熟的miRNA。miR-17-92基因簇通过调控30多种靶基因参与肿瘤的发生发展。

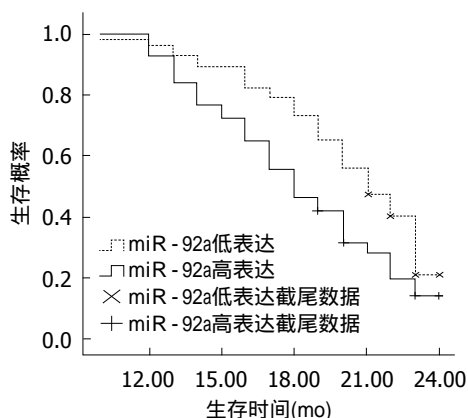


图3 血清miR-92a表达与胃癌患者生存预后关系。

目前仍缺乏高度敏感而特异的标志物。众多研究发现，血清miRNAs具有表达稳定性、肿瘤相关性和组织特异性等优点，早期肿瘤发生及转移的不同阶段伴随着血清miRNAs表达谱的变化^[6-9]。因此，miRNAs有潜力作为一种新的血清标志物应用于肿瘤诊断、疗效监测和预后评估等领域。

目前关于胃癌相关血清miRNAs的研究较少且结果并不一致。日本学者Tsujiura等^[10]研究显示miR-106a在胃癌患者血浆中高表达，而let-7a则呈低表达，二者的比值诊断胃癌的敏感度和特异度分别为85.5%和80.0%。我国Zhu等^[11]发现miR-92a、miR-16、miR-25、miR-451及miR-486-5p在胃癌患者血浆中表达水平升高，可以作为诊断胃癌的标志物。Liu等^[12]鉴定出miR-1等5个血清miRNAs可以构成识别胃癌的“指纹”，并指示肿瘤的分期。

本研究发现，miR-92a在胃癌患者血清中表达明显升高，其表达升高程度与胃癌的临床分期、转移、预后相关。miR-92a诊断胃癌的敏感度和特异度分别为64.0%和82.0%；其鉴别转移性与非转移性胃癌患者的敏感度和特异度分别为80.9%和81.2%。

据文献报道，miR-92a在众多肿瘤组织及血清中异常表达，发挥显著的致癌作用，对肿瘤的早期诊断及预后评估有一定临床价值。Chen等^[13]研究表明，miR-92a在食管癌组织中高表达，与淋巴结转移及TNM分期相关，通过抑制E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达促进肿瘤细胞的迁移和侵袭，可以作为独立的预后因子。Zhou等^[14]发现，miR-92a在结肠癌组织中过表达，其表达升高程度与肿瘤的TNM分期、淋巴结、远处转移及生存期相关。miR-92a在结直肠癌患者血清

中表达水平亦显著升高，并可以鉴别转移性与非转移性结直肠癌^[15]。李红等^[16]发现包括miR-92a在内的miR-17-92基因簇在胃癌患者血清中高表达，并与肿瘤的分期及淋巴结转移有关，本研究结果与上述结果一致，并进一步发现血清miR-92a表达与胃癌的远处转移及患者的生存期亦相关，为深入理解miR-92a的功能提供实验依据和理论参考，说明miR-92a具有更大的临床应用价值。然而，miR-92a通过何种机制参与胃癌的发生发展，尚需进一步的研究。

本研究显示miR-92a在胃癌患者血清中高表达，其表达升高程度与胃癌的临床分期、转移及预后相关，表明miR-92a有可能成为胃癌诊断和预后评估的标志物之一，但应用于临床还有一定距离。要实现这一目标：(1)需进一步扩大样本，验证和筛选胃癌特异性血清miRNAs及其组合，提高诊断的灵敏度和特异度；(2)应阐明胃癌相关血清miRNAs的生物靶标及其作用机制；(3)miRNAs检测方法的标准化和诊断阈值的确定，包括标准化的检测系统、标准品及质控品的研制和检测试剂盒的开发。相信随着研究的逐步深入和应用难题的解决，血清miRNAs将在胃癌早期诊断和预后评估等领域发挥更大的应用价值和更广阔的前景。

4 参考文献

- 1 Sochor M, Basova P, Pesta M, Dusilkova N, Bartos J, Burda P, Pospisil V, Stopka T. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer* 2014; 14: 448 [PMID: 24938880 DOI: 10.1186/1471-2407-14-448]
- 2 蔡伟波, 沈秋丹, 刘仁涛, 吕明恩, 袁慕知, 韩迎利. 胃癌患者血清中miR-106a的表达及其临床意义. *临床肿瘤学杂志* 2012; 17: 485-489
- 3 胡俊庭, 鲍蕴文, 白艳, 吴博. 肺癌患者血清microRNA-21表达临床意义探讨. *中华肿瘤防治杂志* 2014; 21: 39-42
- 4 赵丹懿, 宋磊, 李曼奇, 李娜. 肝细胞癌中miR-92a的表达及其对HepG2细胞凋亡的影响. *现代生物医学进展* 2013; 13: 3811-3813
- 5 林娉婷, 侯亚义, 袁环. miR-17-92簇调控肿瘤细胞凋亡的研究进展. *肿瘤防治研究* 2012; 39: 596-599
- 6 Wang J, Huang SK, Zhao M, Yang M, Zhong JL, Gu YY, Peng H, Che YQ, Huang CZ. Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. *PLoS One* 2014; 9: e87451 [PMID: 24709885 DOI: 10.1371/journal.pone.0087451]
- 7 Wu C, Wang C, Guan X, Liu Y, Li D, Zhou X, Zhang Y, Chen X, Wang J, Zen K, Zhang CY, Zhang C. Diagnostic and prognostic implications of a serum miRNA panel in oesophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2014; 9: e92292 [PMID: 24651474 DOI: 10.1371/journal.pone.0092292]

- 8 周振华, 陈国栋, 杨林. 血清miRNA在肝细胞癌早期诊断、疗效监测及预后评估中的应用. 世界华人消化杂志 2014; 22: 782-787
- 9 刘寒梢, 马越云, 肖华胜. 血清微小RNA(miR-129-3p、miR-767-3p和miR-877*)在结直肠癌诊断中的价值. 肿瘤 2012; 32: 42-48
- 10 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]
- 11 Zhu C, Ren C, Han J, Ding Y, Du J, Dai N, Dai J, Ma H, Hu Z, Shen H, Xu Y, Jin G. A five-microRNA panel in plasma was identified as potential biomarker for early detection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2014; 110: 2291-2299 [PMID: 24595006 DOI: 10.1038/bjc.2014.119]
- 12 Liu R, Zhang C, Hu Z, Li G, Wang C, Yang C, Huang D, Chen X, Zhang H, Zhuang R, Deng T, Liu H, Yin J, Wang S, Zen K, Ba Y, Zhang CY. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer* 2011; 47: 784-791 [PMID: 21112772 DOI: 10.1016/j.ejca.2010.10.025]
- 13 Chen ZL, Zhao XH, Wang JW, Li BZ, Wang Z, Sun J, Tan FW, Ding DP, Xu XH, Zhou F, Tan XG, Hang J, Shi SS, Feng XL, He J. microRNA-92a promotes lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via E-cadherin. *J Biol Chem* 2011; 286: 10725-10734 [PMID: 21148309 DOI: 10.1074/jbc.M110.165654]
- 14 Zhou T, Zhang G, Liu Z, Xia S, Tian H. Overexpression of miR-92a correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28: 19-24 [PMID: 22772712 DOI: 10.1007/s00384-012-1528-1]
- 15 奉林, 庞智, 沙沙, 吴兵, 徐峰, 尹少朋. 血清中miR-29a和miR-92a在结直肠癌诊断和预后判断中的价值. 中国肿瘤临床与康复 2013; 20: 1313-1315
- 16 李红, 李铤, 刘常浩, 薛琳, 时永全, 丁杰. 循环血清miR-17-92簇: 一种新的胃癌诊断标志物. 现代肿瘤医学 2014; 22: 581-585

同行评价

本文针对miR-92a在胃癌患者血清中的表达展开研究, 发现miR-92a在胃癌患者血清中表达显著升高, 同时与患者的临床分期、转移及预后密切相关. 该研究条理分明, 结果可靠, 能够追踪最新的研究进展, 具有一定的科学性和创新性.

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

