

血清 miR-101、miR-204 对胃癌的诊断价值及其与幽门螺旋杆菌感染的关系

袁锡裕, 李庆贤, 黄东, 龚时文

南方医科大学附属东莞市人民医院普外科, 广东 东莞 523000

【摘要】 目的 检测胃癌患者血清中 miR-101、miR-204 的表达水平, 探讨其与胃癌患者临床病理特征及幽门螺旋杆菌(Hp)感染的关系, 评价血清 miR-101、miR-204 对胃癌的诊断价值, 为胃癌的临床诊断提供参考。方法 选取东莞市人民医院普外科 2016 年 5 月~2018 年 2 月收治的 72 例胃癌患者作为此次研究的观察组, 另选取 70 例慢性浅表性胃炎患者作为此次研究的对照组。检测两组患者 Hp 感染情况以及血清中 miR-101、miR-204 的表达水平。分析血清 miR-101、miR-204 表达水平与 Hp 感染以及胃癌患者临床病理特征的关系, 采用受试者工作特征曲线(ROC)分析其对胃癌的诊断价值。结果 观察组血清 miR-101、miR-204 表达水平均明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组 Hp 感染为阳性的患者血清 miR-101、miR-204 表达水平均明显低于 Hp 感染为阴性的患者, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组患者中有淋巴结转移的患者以及 TNM 分期为 III~IV 期的患者的血清 miR-101、miR-204 表达水平明显降低($P < 0.05$)。血清 miR-101 诊断胃癌的敏感度和特异度分别为 71.35% 和 84.61%, 血清 miR-204 诊断胃癌的敏感度和特异度分别为 70.41% 和 82.83%, 血清 miR-101 联合 miR-204 诊断胃癌的敏感度和特异度分别为 73.76% 和 88.62%。结论 血清中 miR-101、miR-204 的表达水平在 Hp 感染为阳性以及病情程度较为严重的胃癌患者中明显降低, 其可作为胃癌诊断的新型标志物。

【关键词】 血清; miR-101; miR-204; 胃癌; 诊断; 幽门螺旋杆菌; 感染

Diagnostic value of serum miR-101 and miR-204 in gastric cancer and its relationship with Helicobacter pylori infection

YUAN Xi-yu, LI Qing-xian, HUANG Dong, GONG Shi-wen

Department of General Surgery, Affiliated Dongguan People's Hospital, Southern Medical University, Dongguan 523000, China

【Abstract】 **Objective** To observe the expression of miR-101 and miR-204 in the serum of gastric cancer patients, to explore the relationship with the clinical features of gastric cancer patients and the infection of Helicobacter pylori (Hp), to evaluate the diagnostic value of serum miR-101 and miR-204 in gastric cancer, and provide reference for clinical diagnosis of gastric cancer. **Methods** 72 cases of gastric cancer who were treated in our hospital from May 2016 to February 2018 were selected as the observation group of this study, and 70 cases of chronic superficial gastritis were selected as the control group. The Hp infection and the expression levels of miR-101 and miR-204 in the two groups were detected. The serum levels of miR-101 and miR-204 in the observation group and the control group, receiver operating characteristic curve (ROC) was used to analyze the diagnostic value of gastric cancer. **Results** The serum levels of miR-101 and miR-204 in the observation group were significantly lower than those in the control group, the differences are statistically significant ($P < 0.05$). In the two groups, the serum miR-101 and miR-204 levels of the patients with positive Hp infection were significantly lower than those with negative Hp infection, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of miR-101 and miR-204 in patients with lymph node metastasis in the observation group and those with TNM stage III~IV stage were significantly decreased ($P < 0.05$). The sensitivity and specificity of serum miR-101 in the diagnosis of gastric cancer were 71.35% and 84.61% respectively. The sensitivity and specificity of serum miR-204 in the diagnosis of

gastric cancer were 70.41% and 82.83% respectively. The sensitivity and specificity of serum miR-101 combined with miR-204 for the diagnosis of gastric cancer were 73.76% and 88.62%, respectively.

Conclusion The expression levels of miR-101 and miR-204 in serum are significantly lower in patients with positive Hp infection and more severe patients with gastric cancer, which can be used as a new marker for the diagnosis of gastric cancer.

【Key words】 Serum; miR-101; miR-204; Gastric cancer; Diagnosis; Helicobacter pylori; Infection

胃癌起源于胃黏膜上皮,是我国最常见的恶性肿瘤之一。研究表明^[1],早期胃癌的5年生存率可达90%以上,而晚期胃癌的5年生存率降低至20%左右,对患者的生命健康有重大威胁。因此,了解胃癌的发生机制、寻找胃癌早期诊断的临床标志物具有重要意义。胃癌的发生是由遗传因素、环境因素、不同个体情况等多种病因相互作用的结果^[2]。幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染作为环境因素之一,已有越来越多的研究报道其与胃癌发生、发展联系密切^[3]。微小RNA(miRNA)具有高度的保守性和非编码性,是一种单链RNA,诸多研究表明^[4,5],miRNA在胃癌患者的组织细胞中出现了较为明显的变化,可起到致癌基因或抑癌基因的作用。因此,检测胃癌患者血清中miRNA水平可能对胃癌的诊断有重要意义。本研究对胃癌患者血清中的miR-101、miR-204进行检测,并分析其与Hp感染的关系,旨在探讨胃癌可能的发生机制及为临床诊断标志物的选择提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取东莞市人民医院普外科2016年5月~2018年2月收治的72例胃癌患者作为此次研究的观察组,另选取70例慢性浅表性胃炎患者作为此次研究的对照组。观察组中男性42例,女性30例,年龄47~78岁,平均(61.67±5.48)岁。对照组中男性39例,女性31例,年龄44~77岁,平均(62.35±5.82)岁。两组患者性别、年龄比较无显著性差异($P>0.05$)。本研究经我院伦理委员会批准通过。

1.2 纳入排除标准 观察组纳入标准:①患者均经胃镜病理证实,且首次诊断为胃癌;②采用手术治疗;③均未经生物治疗、放疗、化疗等。对照组纳入标准:①患者均经胃镜病理证实为慢性浅表性胃炎;②处于炎症反应稳定期。两组均排除:①合并其它恶性肿瘤者;②合并血液、免疫系统性疾病

者;③肝、肾、心功能不全者;④近半年服用过非甾体类抗炎药、抗生素、胃黏膜保护剂等患者。

1.3 研究方法

1.3.1 Hp感染检测^[6] 采用¹³C呼气试验检测所有研究对象的Hp感染情况:受试者均于空腹状态下服用¹³C尿素胶囊,30 min后采用红外能谱仪进行呼气试验,呼出气¹³C原子峰超出基线5%即为Hp感染阳性。

1.3.2 血清标本采集 采集观察组患者手术前1 d的空腹静脉血5 ml,以及对照组患者行胃镜检查后3 d的空腹静脉血5 ml,置于抗凝管中。3000 r/min离心15 min后取上清液置于-80℃条件下保存待测。

1.3.3 血清miR-101、miR-204检测 (1)提取总RNA:冷冻保存的血清标本于冰上复溶混匀后取200μl置于EP管,加入800μl Trizol试剂(invitrogen)颠倒混合均匀;将裂解液加入EP管中静置,随后加入氯仿(北京鑫鼎鹏飞科技发展有限公司)200μl,振荡30 s、静置10 min,离心15 min,去上层水后加入新的EP管中;加入异丙醇试剂(广州市麒旭化工有限公司)并静置,离心10 min去除上清液;加入1 ml 100%乙醇洗涤、离心5 min,去除上清液;在室温下使沉淀中的RNA自然干燥,Rnase-free水20μl溶解RNA沉淀,将溶液置于-80℃条件下保存待测。(2)RNA纯度及质量浓度鉴定:取总RNA溶液5μl,加入Rnase-free dd水稀释20倍,用分光光度计测定260 nm、280 nm波长吸光度值,当其比值(A260/A280)=2.0±0.1时认为纯度合格。(3)PCR反转录反应:按照反转录试剂盒(杭州主诺生物科技有限公司)说明书配置总体积为10μl的反应体系,分别在16℃30 min、42℃30 min、85℃5 min的条件下进行反应,每个反应设一复孔。95℃10 s、60℃33 s条件下循环40次进行PCR扩增;加入premix、探针,以合成的cDNA为模板进行反应,将U6 sRNA作为内参,采集荧光检测miR-101、miR-204表达水平,表达水平进行 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算并进行对数转换。

1.4 统计学方法 研究数据采用 SPSS20.0 软件进行统计处理,计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验,计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验。此外,应用 ROC 曲线分析血清 miR-101、miR-204 对胃癌的诊断价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hp 感染检测结果 观察组患者 Hp 感染检测结果阳性 56 例,阳性率为 77.78%;对照组患者 Hp 感染检测结果阳性 31 例,阳性率为 44.29%。观察组 Hp 感染阳性率明显高于对照组 ($\chi^2=16.777, P=0.000$)。

2.2 血清 miR-101、miR-204 检测结果 观察组血清 miR-101、miR-204 表达水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组血清 miR-101、miR-204 检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	miR-101	miR-204
对照组	70	1.441 \pm 0.307	1.267 \pm 0.281
观察组	72	0.574 \pm 0.153	0.448 \pm 0.116
t	-	21.206	22.586
P	-	<0.001	<0.001

2.3 血清 miR-101、miR-204 表达与 Hp 感染的关系 对照组 Hp 感染为阳性的患者血清 miR-101、miR-204 表达水平明显低于 Hp 感染为阴性的患者,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。观察组 Hp 感染为阳性的患者血清 miR-101、miR-204 表达水平明显低于 Hp 感染为阴性的患者,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.4 观察组患者血清 miR-101、miR-204 表达与临床病理特征的关系 观察组患者血清 miR-101、miR-204 表达水平与性别、年龄、分化程度无关(均 $P>0.05$),而与淋巴结转移和 TNM 分期有关

表 2 对照组患者血清 miR-101、miR-204 表达与 Hp 感染的关系($\bar{x}\pm s$)

Hp 感染	例数	miR-101	miR-204
阳性	31	1.121 \pm 0.272	0.912 \pm 0.167
阴性	39	1.695 \pm 0.347	1.549 \pm 0.298
t	-	7.546	11.302
P	-	<0.001	<0.001

表 3 观察组患者血清 miR-101、miR-204 表达与 Hp 感染的关系($\bar{x}\pm s$)

Hp 感染	例数	miR-101	miR-204
阳性	56	0.493 \pm 0.116	0.338 \pm 0.104
阴性	16	0.857 \pm 0.183	0.697 \pm 0.191
t	-	7.535	7.219
P	-	<0.001	<0.001

($P<0.05$)。有淋巴结转移的患者以及 TNM 分期为 III~IV 期的患者的血清 miR-101、miR-204 表达水平明显降低($P<0.05$)。见表 4。

2.5 血清 miR-101、miR-204 对胃癌的诊断价值 以本研究的观察组(阳性样本)和对照组(阴性样本)资料为样本,建立 ROC 分析模型,探讨血清 miR-101、miR-204 对胃癌的诊断价值,结果表明:血清 miR-101 诊断胃癌的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.834(95%CI:0.764~0.937),诊断阈值为 0.80(理论阈值取整),对应的敏感度和特异度分别为 71.35%和 84.61%;血清 miR-204 诊断胃癌的 AUC 为 0.817(95%CI:0.716~0.902),诊断阈值为 0.65(理论阈值取整),对应的敏感度和特异度分别为 70.41%和 82.83%;此外,建立上述二指标联合诊断模式(串联联合诊断),以本研究样本结果进行统计,结果显示:血清 miR-101 联合 miR-204 诊断胃癌的敏感度和特异度分别为 73.76%和 88.62%,提示联合诊断和两指标独立应用效果相近,并无明显的提高。ROC 曲线见图 1。

表 4 观察组患者血清 miR-101、miR-204 表达与临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s$)

		例数	miR-101	t	P	miR-204	t	P
性别	男	42	0.586 \pm 0.141	0.876	0.384	0.431 \pm 0.107	1.659	0.102
	女	30	0.557 \pm 0.135			0.472 \pm 0.098		
年龄(岁)	≥ 60	38	0.552 \pm 0.137	1.339	0.185	0.461 \pm 0.096	1.215	0.228
	<60	34	0.594 \pm 0.128			0.434 \pm 0.092		
分化程度	高分化	19	0.607 \pm 0.129	1.290	0.201	0.501 \pm 0.148	1.935	0.057
	中低分化	53	0.562 \pm 0.131			0.429 \pm 0.136		
淋巴结转移	是	45	0.482 \pm 0.146	6.771	<0.001	0.289 \pm 0.132	14.236	<0.001
	否	27	0.727 \pm 0.153			0.713 \pm 0.104		
TNM 分期	I~II	21	0.683 \pm 0.147	4.309	<0.001	0.584 \pm 0.127	6.357	<0.001
	III~IV	51	0.529 \pm 0.134			0.392 \pm 0.112		

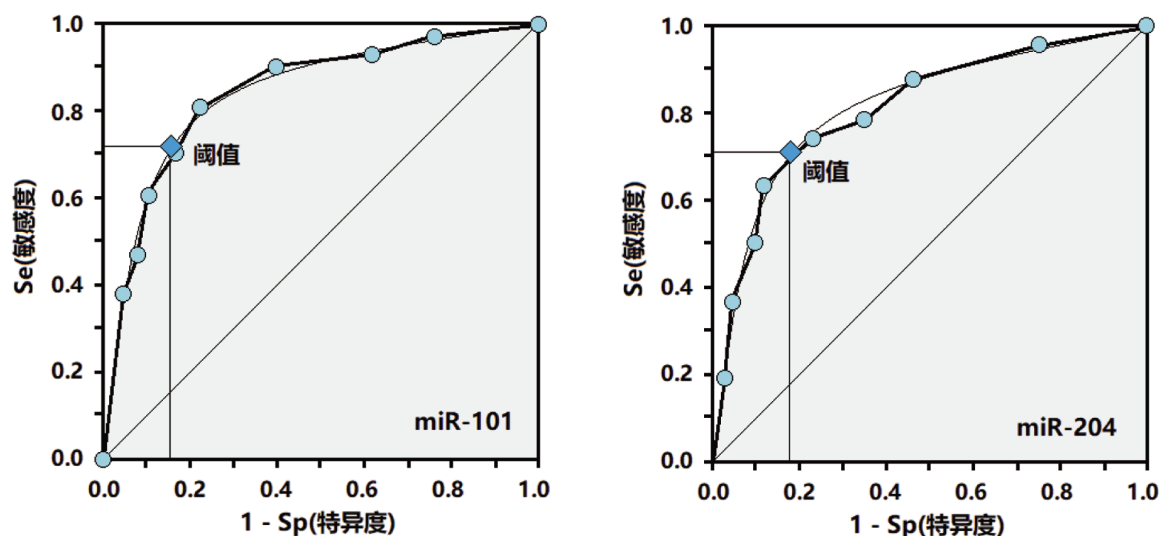


图1 血清 miR-101 及 miR-204 诊断胃癌的 ROC 曲线

3 讨论

Hp 定植于人体胃部,是一种呈螺旋状的需氧革兰氏阴性菌。世界卫生组织国际癌症研究中心在 1994 年将 Hp 列为 I 类致癌原^[7],近年来许多学者就 Hp 感染与胃癌的关系进行了报道。Cai H 等人^[8]发现胃癌患者的 Hp 抗原的血清阳性率与胃癌发病率相关,可作为胃癌发生的预测指标。Piao JY 等人^[9]观察到胃癌中 Hp 感染在转录激活因子 3(STAT3)的活化起到重要作用,其可能通过触发 Stat3 的磷酸化,进一步使 Stat3 炎性信号通路激活,从而影响到胃癌的发生、发展及预后。曾涛等人^[10]的报道认为 Hp 感染量增大时胃癌患者的生存状况变差,且 Hp 感染与患者的临床病理特征存在一定联系。本研究中观察组 Hp 感染阳性率为 77.78%,明显高于对照组的 44.29%,提示胃癌患者具有较高的 Hp 感染率。结合上述相关研究^[8-10]可推测控制 Hp 感染是预防胃癌的一个重要环节。

miRNA 的表达可影响细胞的增殖、分化以及细胞内部的物质能量代谢,目前的研究^[11]已发现多种 miRNA 的异常表达对胃癌的发生、发展起到抑癌或致癌的作用。本研究中,观察组血清 miR-101、miR-204 表达水平明显低于对照组,且两组中 Hp 感染为阳性的患者 miR-101、miR-204 表达水平明显低于 Hp 感染为阴性的患者,提示 miR-101、miR-204 表达水平的下降可能导致胃癌发生风险的增加,同时 Hp 感染可能是 miR-101、

miR-204 表达水平下降的重要影响因素。推测其原因,miR-101 是一种具有抑癌作用的 miRNA,研究发现,其在乳腺癌^[12]、结直肠癌^[13]等多种恶性肿瘤中可通过抑制多种靶基因的表达起到抑制癌细胞增长的作用。miR-204 在不同肿瘤中发挥着不同的作用,其在前列腺癌^[14]、肾癌^[15]等肿瘤中呈高表达,可促进肿瘤的增殖和转移,但在大肠癌^[16]、鼻咽癌^[17]等肿瘤中的表达下调,起到抑癌基因的作用,而在胃癌中,miR-204 已被证实具有抑癌的作用^[18]。当胃癌发生时,患者血清 miR-101、miR-204 表达受到抑制,抑癌作用降低。此外,Hp 感染可能通过促进胃癌患者尿素酶、细胞空泡毒素等物质的分泌,进一步刺激胃黏膜组织加剧炎症反应、激活免疫系统^[19],从而导致 miR-101、miR-204 表达水平进一步降低。

本研究进一步观察发现,有淋巴结转移以及 TNM 分期较高的胃癌患者的血清 miR-101、miR-204 表达水平明显降低,说明 miR-101、miR-204 对胃癌的发展具有调控作用。miR-101 对癌细胞上皮-间质转化过程具有抑制作用,可以有效阻止这一过程中细胞间黏附蛋白的减少,从而阻止癌细胞的转移、扩散^[20]。另有研究表明^[21],B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的 miRNA 上存在着能与 miR-204 相结合的 3'-UTR,因此 miR-204 可通过下调 Bcl-2 的表达,对胃癌细胞的增殖起到抑制作用。因此,当血清 miR-101、miR-204 表达水平下降时,其对胃癌患者癌细胞的增殖、转移的抑制作用也明显降低。而 miR-101、miR-204 究竟通过何种

信号通路或分子机制对胃癌细胞的增殖、转移进行调节仍有待于进一步的实验研究予以明确。ROC曲线分析显示,血清 miR-101、miR-204 诊断胃癌具有较高的特异度和敏感度,但联合诊断(串联模式)的敏感度仅为 73.76%,提示血清 miR-101、miR-204 对胃癌有一定的诊断价值,可与其它诊断方法结合进行诊断。

综上所述,miR-101 和 miR-204 作为抑癌基因参与了胃癌的发生发展过程,Hp 感染以及病情的加重都可导致胃癌患者 miR-101、miR-204 表达水平下降。miR-101、miR-204 在不同病情的胃癌患者血清中的表达有显著差异,其水平可作为胃癌患者病情的判断依据。同时 miR-101、miR-204 的检测具有非侵入性、易于操作等优点,易于成为新的胃癌诊断的标志物。

参考文献

- [1] 许林利,查名宝,李晟,等.中医药干预对 78 例进展期胃癌生存期影响的单因素和多因素分析 [J]. 安徽中医药大学学报,2017,36(6):14-17.
- [2] Chen XZ, Schöttker B, Castro FA, et al. Association of helicobacter pylori infection and chronic atrophic gastritis with risk of colonic, pancreatic and gastric cancer: A ten-year follow-up of the ESTHER cohort study [J]. *Oncotarget*,2016,7(13):17182-17193.
- [3] 刘岩.胃癌患者组织病理分型及 HP 感染相关性分析[J].实用癌症杂志,2017,32(4):627-628.
- [4] 杜亚琼,姜波健,俞继卫.miRNA 在胃癌发生发展中的作用[J].中国普外基础与临床杂志,2016,23(4):499-502.
- [5] Zhang R,Li F,Wang W,et al.The effect of antisense inhibitor of miRNA 106 b~25 on the proliferation, invasion, migration, and apoptosis of gastric cancer cell [J].*Tumour Biol*,2016,37(8):10507-10515.
- [6] 黄建民.~(13)C 呼气试验和血清学检测幽门螺旋杆菌的结果分析[J].标记免疫分析与临床,2016,23(12):1481-1482.
- [7] 齐从虎,杨景玉.益生菌治疗幽门螺旋杆菌感染的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2017,12(4):373-377.
- [8] Cai H,Ye F,Michel A,et al.Helicobacter pylori blood biomarker for gastric cancer risk in East Asia[J].*Int J Epidemiol*,2016,45(3):774-781.
- [9] Piao JY, Lee HG, Kim SJ, et al. Helicobacter pylori Activates IL-6-STAT3 Signaling in Human Gastric Cancer Cells: Potential Roles for Reactive Oxygen Species [J]. *Helicobacter*,2016,21(5):405-416.
- [10] 曾涛,翁永彬,杨宗梅.幽门螺杆菌感染与胃癌患者临床特征和生存状况的关系研究[J].癌症进展,2016,14(07):690-692.
- [11] 周明玉,岳双磊,何文杰,等.miRNA-214 在恶性肿瘤中的表达及相关性的研究进展[J].现代生物医学进展,2017,17(4):787-790.
- [12] 刘健,庞亚梅,王黄震,等.miR-101 通过抑制 DNA 甲基转移酶 3 a 抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(3):299-303.
- [13] 雷伟琦,胡谦,王思远,等.miR-101 在结直肠癌中的研究进展[J].中国普通外科杂志,2016,25(04):592-597.
- [14] 周小羽,刘媛媛,李玉华,等.微小 RNA-204 对前列腺癌细胞株 CL1 的生长调节及其机理研究[J].生殖与避孕,2014,34(12):968-972.
- [15] Xiong F,Liu K,Zhang F,et al.MiR-204 inhibits the proliferation and invasion of renal cell carcinoma by inhibiting RAB22A expression[J].*Oncol Rep*,2016,35(5):3000-3008.
- [16] Wu H,Liang Y,Shen L,et al.MicroRNA -204 modulates colorectal cancer cell sensitivity in response to 5-fluorouracil-based treatment by targeting high mobility group protein A2[J].*Biol Open*,2016,5(5):563-570.
- [17] 蒋成义,汪洪涛,周蕾,等.miRNA-204 在鼻咽癌中的表达及生物学意义研究[J].中国免疫学杂志,2015,31(6):822-826.
- [18] 马小芬,黄重发,朱清.miR-204 在胃癌生长中的作用及机制[J].现代肿瘤医学,2015,23(20):2994-2997.
- [19] Toyoda T,Shi L,Takasu S,et al.Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils [J].*Helicobacter*,2016,21(2):131-142.
- [20] Jiang W,Gu W,Qiu R,et al.miRNA-101 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Targeting HMGA2 in Pancreatic Cancer Cells [J].*Anticancer Agents Med Chem*,2016,16(4):432-439.
- [21] 吴昊,梅闪闪,叶艺旺,等.微小 RNA-204 靶向抑制 B 淋巴细胞瘤-2 影响非小细胞肺癌细胞的增殖、凋亡和迁移能力[J].中华实验外科杂志,2017,34(7):1160-1162.