

# MiR-138 在胃癌患者血清中的表达和临床意义

王军, 王蓓

英山县人民医院普外科, 湖北 黄冈 438000

**【摘要】** 目的 探讨胃癌患者血清 miR-138 表达水平及其临床意义。方法 采用实时荧光定量 PCR (Real time Quantitative PCR, qRT-PCR) 检测 60 例胃癌患者和 60 例健康体检者血清 miR-138 表达水平, 分析 miR-138 与胃癌临床病理参数之间的关系。利用受试者工作曲线 (Receiver Operating characteristic curves, ROC) 评估 miR-138 诊断胃癌的敏感性及其特异性。结果 胃癌患者血清 miR-138 水平明显低于健康对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); miR-138 在血清中的表达水平与胃癌的分期以及是否发生转移有关, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但与患者性别、年龄、分化程度和有无 Hp 感染无关 ( $P > 0.05$ ); ROC 曲线下区域面积 (AUC) 为 0.981 (95% CI=0.962-1.000), 其诊断胃癌的截断值为 3.67, 诊断敏感性为 88.3%、特异性是 95.0%。结论 miR-138 作为抑癌基因可以作为早期胃癌的诊断标记物, 且其表达下降与胃癌的转移以及分期有关, 有着较高的临床诊断价值。

**【关键词】** miR-138; 胃癌; 诊断价值

## Expression of serum miR-138 in gastric cancer and its clinical value

WANG Jun, WANG Bei

General Surgery Department, Yingshan People's Hospital, Huanggang 438000, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the expression of miR-138 in the serum of gastric cancer patients and clinical value. **Methods** The expression of miR-138 in serum of 60 patients with gastric cancer and 60 healthy people were detected by Real time Quantitative PCR (qRT-PCR); The relationship between miRNA-138 and clinicopathological parameters of gastric cancer was analyzed; Receiver Operating Characteristic Curves (ROC) was used to determine the diagnostic value of gastric cancer. **Results** The level of serum miRNA-138 in patients with gastric cancer was significantly lower than in healthy controls ( $P < 0.01$ ); The expression level of miR-138 in serum was correlated with the stage and metastasis of gastric cancer ( $P < 0.05$ ), but not with gender, age, differentiation degree and Hp infection ( $P > 0.05$ ); The area under curve (AUC) was 0.981 (95% CI=0.962-1.000) and when the cut-off value was 3.67, the sensitivity and specificity were 88.3% and 95.0% respectively. **Conclusion** MiR-138 for a tumor suppressor gene can be used as a diagnostic marker for early gastric cancer, and its expression is related to the metastasis and staging of gastric cancer, which has a high diagnostic value.

**【Key words】** Gastric Cancer; MiR-138; Diagnostic Value

## 1 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 随着人们饮食习惯以及生活方式的变化, 胃癌发病率不断升高。据最新统计资料显示, 在全球范围内每年胃癌病人新发约 95 万, 占癌症新发病例第四位<sup>[1]</sup>, 我

国属胃癌高发地区, 其胃癌人数占世界胃癌总人数的一半<sup>[2]</sup>。胃癌患者早期通常缺乏典型症状, 确诊时已经发展到疾病的晚期, 预后较差, 5 年生存率仅为 40%, 而伴有远处转移的患者 5 年生存率不到 5%<sup>[3]</sup>。因此, 亟需寻找一种能够早期诊断胃癌的生物标志物。

MicroRNA(miRNA)是一类长度约为 20~24 个核苷酸的非编码单链小 RNA, 参加转录后基因表达的调控<sup>[4]</sup>以及细胞生长发育的各个阶段<sup>[5]</sup>。miRNA

作者简介: 王军, 主治医师, E-mail: wb19861986@126.com

通讯作者: 王蓓, 主治医师, E-mail: wangjun19841984@126.com

表达与多种癌症相关,其在基因组上多定位于与肿瘤相关的脆性位点,并作为抑癌基因或癌基因在肿瘤发生发展过程中起至关重要的作用<sup>[6]</sup>。外周血 miRNA 测定因其操作方便以及特异性与灵敏度高的特点正逐渐运用到肿瘤早期诊断的研究中<sup>[7]</sup>。miR-138 是肿瘤中重要的调控因子,其在胃黏膜癌变过程中表达逐渐降低<sup>[8]</sup>,但外周血清表达的变化还未见报道。因此,本研究旨在通过 qRT-PCR 方法检测胃癌患者血清 miR-138 的表达,分析其表达水平与临床病理特征之间的关系,以期作为胃癌的早期诊断提供一种崭新的生物标记物。

## 2 资料与方法

**2.1 临床资料及血清标本的收集** 收集 2015 年 1 月至 2017 年 1 月湖北省英山市人民医院普外科收治住院的 60 例胃癌确诊患者(实验组)的血清及临床资料,同时收集本院体检中心 60 例健康体检者(对照组)血清作为对照,实验组和对照组在一般资料比较上无明显差异, ( $P>0.05$ ) 如表 1 示。胃癌患者纳入标准:①无严重基础疾病;②均通过组织病理学证实;③所有胃癌患者标本采集前均未接受放化疗或手术治疗;④临床病历资料完整。排除标准:①患者曾经有其他胃肠道疾病;②近期有感染及炎症;③已经接受治疗;④合并其他恶性肿瘤。TNM 分期按照美国癌症联合委员会 (american joint committee on cancer, AJCC) 胃癌 TNM 分期第 7 版标准,60 例患者中 I 期 8 例、II 其 12 例、III 期 26 例、IV 期 14 例。健康体检者各项检测指标均在正常参考范围内且体格及影像学检查均无异常,本研究所有纳入患者均已知情且获

得英山市人民医院医学伦理委员会同意。本研究所收集胃癌患者的临床病例资料详见表 2。所有检测者晨起空腹抽取 4 ml 全血,立即置于 4 °C 离心机中以 3000 r/min 离心 10 min,取上清液,-80 °C 保存于无 RNA 酶的 Ep 管中。

**2.2 血清 microRNA 的提取及 qRT-PCR 检测** 提取血清总 RNA;按照 miRNA Isolation Kit-Biofluids 提取分离试剂盒 (EXIQON 公司, Japan) 说明书中的标准操作流程分离提取血清标本中的总 RNA。miRNA 逆转录:以 RNA 为模板,通过 RevertAid First Strand cDNA 试剂盒 (Thermo Scientific Inc, USA) 逆转录合成 cDNA,其具体方法为取 1  $\mu$ L 总 RNA、1  $\mu$ L 反转录引物、3  $\mu$ L DEPC H<sub>2</sub>O 置于 EP 管中,充分混匀后于 70 °C 孵育 5 min,立即置于冰上 5 min;向上述混合物中依次加入 1  $\mu$ L 逆转录酶、0.5  $\mu$ L RNase 抑制剂、4  $\mu$ L dNTP 以及 5  $\mu$ L 逆转录缓冲液,DEPC 水补足至 20  $\mu$ L,充分混匀后按 42 °C 80 min,96 °C 5 min 反应。qRT-PCR 检测 miRNA:参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TAKARA 宝生物工程(中国)有限公司)试剂盒,于 ABI7300 型荧光定量 PCR 仪上 (ABI 公司,美国) 对两组血清样本中 miR-138 的表达水平进行检测,其反应体系如下 (20  $\mu$ L):1  $\mu$ L cDNA 模版,9  $\mu$ L SYBR Green PCR Master Mix,1  $\mu$ L 上游引物 (10  $\mu$ mol/L),1  $\mu$ L 下游引物引物 (10  $\mu$ mol/L),9  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O;反应条件如下:95 °C 10 min,95 °C 20 s,60 °C 25 s,70 °C 40 s,共 40 个循环。所有检测结果均采用 2<sup>- $\Delta\Delta$</sup>  的方法进行分析。反应中所使用引物均购自宝生物工程(中国)有限公司,其具体序列设计如下表 2。

**2.3 统计学分析** 采用 SPSS19.0 统计软件对本

表 1 对照组和实验组患者一般资料比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	N(例)	年龄(岁)	BMI(Kg/m <sup>2</sup> )	性别(例)	吸烟史(例)	饮酒史(例)
实验组	60	45.6 $\pm$ 3.86	18.61 $\pm$ 2.35	男(42) 女(18)	39	36
对照组	60	44.3 $\pm$ 7.59	19.56 $\pm$ 3.43	男(39) 女(21)	38	34
P		0.239	0.079	0.559	0.562	0.711

表 2 miR-138 以及内参 U6 引物序列

	miR-138(5'→3')	U6(5'→3')
逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT TCGCACTGGATACGACCGGCTT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT TCGCACTGGATACGACAAATATG
上游引物	CGAGAGCTGCTGTGTGAAT	GTAGCGTCTGAAGCGTTC
下游引物	GTGCAGGGTCCGAGGTAT	GTGCAGGGTCCGAGGTAT

研究中所获得的实验数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料采取均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )描述,两组间比较采用独立样本的 $t$ 检验;计数资料采用以率(百分比)描述,两组间比较采用 $\chi^2$ 检验。利用ROC曲线计算其截断值、敏感性和特异性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 胃癌患者与健康体检者血清 miR-138 表达水平 通过 qRT-PCR 检测胃癌患者和健康体检者血清中 miR-138 表达水平,结果显示:与健康体检者相比,胃癌患者血清中 miR-138 表达水平明显降低(胃癌患者:2.44 $\pm$ 0.88;健康体检者:5.26 $\pm$ 1.14),差异有统计学意义, $P<0.01$ 。

3.2 血清 miR-138 表达水平与胃癌临床病理参数的关系 胃癌患者血清 miR-138 的表达与年龄、性别、是否 Hp 感染以及肿瘤细胞分化程度无关( $P>0.05$ ),但是与肿瘤分期和有无淋巴结及远处转移有关,具体表现在有淋巴和远处转移者较非转移者 miR-13 表达明显降低;Ⅲ+Ⅳ期者较Ⅰ+Ⅱ者 miR-138 表达明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。另外,早期胃癌患者(Ⅰ+Ⅱ)miR-138 表达量相比健康体检者明显减少,差异具有统计

学意义( $P<0.01$ ),提示早期胃癌患者外周血清 miR-138 表达已经下调。具体结果如表 3 示。

3.3 血清 miR-138 对胃癌诊断价值的 ROC 分析 通过 ROC 曲线(图 1 示)评估血清 miR-138 是否能够作为胃癌诊断的标志物,结果发现:曲线下区域面积(AUC)为 0.981(95%CI=0.962-1.000, $P=0.000$ );根据约登指数(cut-off)确定诊断胃癌的 miR-138 临界阈值即截断值为 3.67,其诊断胃癌的灵敏度为 88.3%、特异性是 95.0%。表明 miR-138 作为诊断胃癌的标志物具有较高的诊断效率。

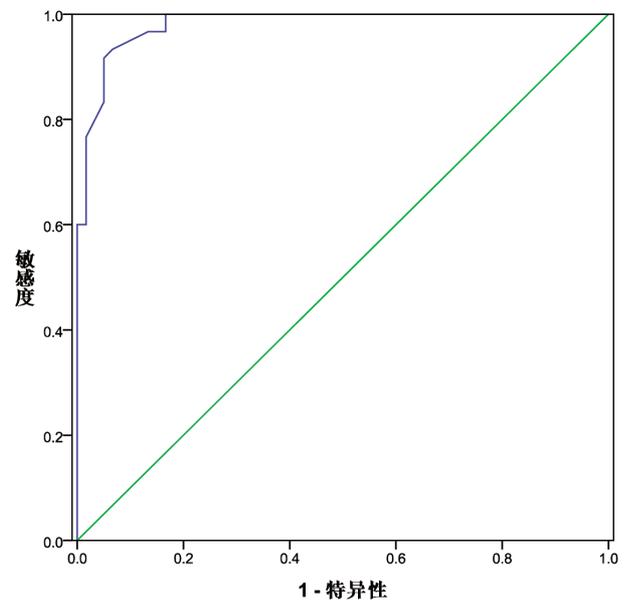


图 1 miR-138 诊断胃癌的 ROC 曲线

表 3 胃癌患者临床相关资料统计分析

项目	总例数(n)	miR-138 表达量	P
年龄(岁)			0.218
<50	26	2.56 $\pm$ 1.02	
$\geq$ 50	34	2.32 $\pm$ 0.98	
性别			0.686
男	42	2.91 $\pm$ 1.02	
女	18	2.13 $\pm$ 0.56	
分化程度			0.224
高/中	20	2.75 $\pm$ 1.05	
低/未	40	2.41 $\pm$ 0.99	
HP 感染			0.266
阴性	24	2.36 $\pm$ 0.63	
阳性	36	2.85 $\pm$ 0.65	
有无淋巴			0.029
无	29	3.25 $\pm$ 0.56	
有	31	1.66 $\pm$ 0.85	
TNM 分期			0.000
Ⅰ-Ⅱ	20	3.15 $\pm$ 1.12	
Ⅲ-Ⅳ	40	1.51 $\pm$ 0.38	
远处转移			0.000
无	28	2.96 $\pm$ 0.98	
有	32	1.87 $\pm$ 0.56	

### 4 讨论

胃癌是世界上发病率和致死率较高的恶性肿瘤之一。早期胃癌通过根治术,通常都能取得比较好的预后,5 年生存率高于 90%<sup>[9]</sup>;然而对于中晚期胃癌虽然采取手术切除+扩大淋巴结清扫,但术后癌症复发率和转移率任然非常高,即使采取术后预防性放化疗,患者 5 年生存率也只有 30%-40%<sup>[3]</sup>。因此,胃癌的早期诊断对于其预后就显得尤为重要。早期胃癌多缺乏特异性的临床表现,传统胃癌的诊断方法包括胃镜、钡餐以及血清肿瘤标记物都存在自身不足,如胃镜作为胃癌诊断的金标准具有创伤性、患者不适反应比较多;钡餐检查繁琐、有辐射、灵敏度低;临床上检测的血清肿瘤生物标志物包括 CEA、CA19-9、CA-724 虽然操作方便、经济、快捷,但是敏感性比较低<sup>[10]</sup>。因此,急需寻找一种更合适的具有早期诊断价值的分子

标记物。

miRNA作为一种内源性非编码小RNA参与多种生物学行为的调控。近年来研究发现miRNAs在肿瘤的发生发展过程中发挥了重要的作用,既可作为抑癌基因参与调控,也可作为癌基因参与肿瘤的进程<sup>[11]</sup>。miRNA在人体组织和体液中稳定存在,因此外周血游离miRNA测定被认为是有价值的肿瘤检测指标之一。目前认为外周血miRNA一部分来自血细胞产生的正常miRNA;另一部分由肿瘤组织的外泌体和外周血液中肿瘤细胞所释放,主要来自于肿瘤组织<sup>[7]</sup>。因此,肿瘤组织和细胞miRNA表达的变化势必会导致外周血清miRNA表达的改变。

miR-138是近年来新发现的一类具有肿瘤调控作用的miRNA,在多种肿瘤组织中<sup>[12-13]</sup>呈现低表达,发挥抑癌基因的作用。外周血miR-138表达含量的检测可以作为肿瘤诊断及预后判断的参考指标,具有重要的临床价值。如HAN等<sup>[14]</sup>报道,与健康对照组比较在非小细胞肺癌患者血清中miR-138表达水平明显下降,且与淋巴转移密切相关;CHAO等<sup>[15]</sup>报道,卵巢透明细胞癌患者术前血清中has-miR-138表达明显高于术后等。miR-138在胃癌的发生发展过程中也具有重要作用。有文献报道伴随着胃黏膜病变程度的加重,胃组织miR-138表达逐渐下降,且都低于正常胃黏膜,也就表明miR-138表达丰度的下降是胃黏膜癌变过程中的早期事件<sup>[8]</sup>。然而,对于胃癌患者外周血清miR-138表达的变化还不清楚。通过本实验研究发现胃癌患者血清miR-138表达明显低于健康体检者( $P<0.01$ ),且血清miR-138表达水平与肿瘤是否转移以及分期有关( $P<0.05$ ),与性别、年龄、是否Hp感染以及肿瘤细胞分化程度无关( $P>0.05$ );另外,早期胃癌患者(I+II)miR-138表达量相比健康体检者明显减少。说明miR-138作为抑癌基因可以作为早期胃癌的诊断标记物,且其血清的表达下降与胃癌的转移以及分期有关,通常提示预后比较差。本文通过ROC曲线表明曲线下面积达到0.981,利用约登指数确定miR-138最佳截断值为3.67,其诊断胃癌的敏感性和特异性分别为88.3%和95.0%,说明血清miR-138检测对胃癌诊断的准确性较高。

综上所述,本实验研究结果说明miR-138极

有可能是作为一种抑癌基因在胃癌的发生发展过程中扮演着重要的作用,且有望成为潜在的临床早期诊断及预后评价的重要指标。

#### 参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics [J]. *Cancer J Clin*, 2015, 65(2):87-108.
- [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] Chu D, Zhao Z, Li Y, et al. Increased microRNA-630 expression in gastric cancer is associated with poor overall survival [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):90526.
- [4] He XX, Kuang SZ, Liao JZ, et al. The regulation of microRNA expression by DNA methylation in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(2):532-9.
- [5] Huang N, Lin J, Ruan J, et al. MiR-219-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting glypican-3 [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(6):884-91.
- [6] Giordano S, Columbano A. MicroRNAs: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2013, 57(2):840-7.
- [7] Mitchell P S, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30):10513-10518.
- [8] 李学成, 王宗华, 梁光萍, 等. miR-138在胃黏膜癌变过程中的表达及意义 [J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(7):520-522.
- [9] Wang J, Wang Q, Liu H, et al. MicroRNA expression and its implication for the some diagnosis and therapeutic strategies of gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2010, 297(2):137-143.
- [10] Shimada H, Noie T, Ohashi M, et al. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association [J]. *Gastric Cancer*, 2014, 17(1):26-33.
- [11] Melo SA, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(13):2087-2099.
- [12] Zhang H, Zhang H, Zhao M, et al. Mir-138 inhibits tumor growth through repression of EZH2 in non-small cell lung cancer [J]. *cell physiol biochem*, 2013, 31(1):56-65.
- [13] Sun DK, Wang JM, Zhang P, et al. MicroRNA-138 regulates metastatic potential of bladder cancer through ZEB2 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(6):2366-2374.
- [14] Han L, Zhang G, Zhang N, et al. Prognostic of microRNA-138 and its target mRNA PDK1 in sera for patients with non-small cell lung cancer [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(9):129.
- [15] Chao A, Lai CH, Chen HC, et al. Serum microRNAs in clear cell carcinoma of the ovary [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2014, 53(4):536-541.