

· 临床检验研究论著 ·

胃癌手术前后血循环 miR-21 表达与胃癌临床病理特征的关系研究

顾荣民¹, 朱明², 文旭¹, 陈森清², 李金田², 马国建^{2△}

(江苏省肿瘤医院:1. 普通外科;2. 遗传与分子生物学研究室, 南京 210009)

摘要:目的 探讨胃癌手术前后外周血循环 miR-21 表达对胃癌临床病理特征的影响。方法 42 例原发性胃癌手术当日及术后 1 周抽取外周血, 应用实时荧光定量 PCR, 以 U6 为内参照基因, 检测血浆 miR-21 相对表达。结果 患者胃癌术后血浆 miR-21 表达与术前相比明显下调($P < 0.01$), 总体相对表达量平均下降了 28.2 倍; 并且发现, 有肿瘤家族史的患者术后 miR-21 表达上调, 而无家族史的胃癌患者术后比术前血浆 miR-21 表达平均下降 22 倍($P < 0.05$); 实验结果还发现, 随着患者分化程度由高向低的变化, 患者淋巴结转移率逐步上升, 同时术后平均 miR-21 表达由低向高转变, 表现出 miR-21 相对表达倍数在高、中、中低和低 4 个分化区上的分布, 分别与淋巴结转移率在 4 个分化区上的分布呈相关性。结论 循环外周血 miR-21 检测对胃癌早期辅助诊断及术后恶性程度判断有临床意义。

关键词: 外周血; 胃癌; 荧光定量 PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.008

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)24-3316-03

Relationship between blood circulation miR-21 expression and clinicopathological features of gastric cancer before and after gastric surgery

Gu Rongmin¹, Zhu Min², Wen Xu¹, Chen Senqing², Li Jintian², Ma Guojian^{2△}

(1. Department of General Surgery; 2. Department of Genetics and Molecular Biology, Jiangsu Provincial Tumor Hospital, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: **Objective** To investigate effect of peripheral blood miR-21 expression on the clinicopathological features of gastric cancer before and after gastric surgery. **Methods** The peripheral blood was collected on the operative day and postoperative 7 d in 42 patients with primary gastric cancer surgery. The real-time quantitative PCR was adopted to detect the relative expression of miR-21 in plasma with U6 as an internal reference gene. **Results** The plasma miR-21 expression level after gastric cancer operation was significantly down-regulated compared with before operation ($P < 0.01$), the overall relative expression level was dropped by an average of 18.2 times; and it was found that the postoperative miR-21 expression in the patients with the tumor family history was up-regulated, the postoperative plasma miR-21 expression in the patients without the tumor family history was decreased by 22 times compared with before operation ($P < 0.05$); the experimental results also found that as the patient's differentiation degree was changed from high to low, the lymph node metastasis rate was gradually increased, while postoperative average miR-21 expression was changed from low to high, showing the relative expression times of miR-21 were distributed in the four differentiated zones of high, middle, middle-low and low, which showed the correlation with the distribution of the lymph node metastasis rate in these four differentiation zones. **Conclusion** The peripheral blood miR-21 detection has the clinical significance to early auxiliary diagnosis and the judgement of postoperative malignant degree.

Key words: peripheral blood; gastric cancer; fluorescence quantitative PCR

研究显示, miRNA 与人类癌症的发病存在极为密切的联系, 超过 50% 的 miRNA 是位于癌症相关的基因组区域或脆性位点上^[1]。自从发现循环核酸开始, 人们就一直致力于循环核酸用于肿瘤的无创诊断应用研究。随着检测技术方法的不断进步, 外周血循环 miRNA 在肿瘤诊断和预后应用研究中取得了重要进展。循环 miRNA 作为肿瘤无创诊断生物学标志物的研究已成为肿瘤早期诊断研究中重要的研究方向^[2-4]。miR-21 已证实是具有原癌基因活性的 miRNA, 它是与人类肿瘤关联度最高的 miRNA 之一^[5-6]。miR-21 在多种实体肿瘤组织中的表达显著高于正常组织, 并且 miR-21 表达与肿瘤分化程度相关, 同时也与局部浸润和淋巴结转移相关, 但从外周血中提取循环 miR-21 作为胃癌早期诊断的研究尚未有明确报道。本研究采集原发性胃癌患者外周血浆, 用 qRT-PCR 检测血浆 miR-21 在胃癌手术前后表达情况, 探讨了胃癌血浆 miR-21 表达对胃癌发生风险的影响。

1 材料与方法**1.1 实验标本采集及血浆总 RNA 提取** 随机抽取本院临床

诊断的原发性胃癌患者 58 例, 术后病理学诊断确诊 42 例。分别于患者手术当日和术后 1 周, 无菌采集抗凝外周全血 3 mL/例, 抗凝血采集后在 1 h 内离心 (2 500 r/min 离心 10 min) 分装, 收集上层血浆, 用 RNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司), 按说明书提取血浆总 RNA, 于 -80 °C 保存备用。

1.2 RT-PCR 反应 以 20 μ L 反应体系, 采用 RT-PCR 转录逆转录试剂盒 (Qiagen 公司) 转录血浆总 RNA 为 cDNA。反应条件: 37 °C, 60 min, 95 °C, 5 min, -20 °C 保存扩增产物。

1.3 荧光实时定量 PCR 以 U6 为内参照基因, 采用相对定量法, 测定胃癌患者手术前后血浆 miR-21 表达。实时定量 PCR 引序列如下, miR-21, F: 5'-GCC CGC TAG CTT ATC AGA CTG ATG-3', R: 5'-GTG CAG GGT CCG AGG; T-U6, F: 5'-GCG CGT CGT GAA GCG TTC-3', R: 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3。总反应体系 25 μ L, SYBR (TaKaRa 公司) 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 模板 DNA 2 μ L, dH₂O 9.5 μ L, 扩增条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45 个循环。内参及待测 miRNA 实验分别重复设 3 孔, 用 Rotor Gene Q 荧

光定量 PCR 仪(Qiagen 公司)分别检测 miR-21 在手术前后胃癌血浆中的相对表达。

1.3 结果分析 miRNA 的表达水平用阈值循环数(*C_t*)检测,用 $\Delta\Delta C_t$ 法对目的 miRNA 进行相对定量,即 $\Delta C_t(\text{术前}) = \text{每个胃癌术前 } C_t \text{ 值} - \text{同组内参照 } U6C_t \text{ 值}$; $\Delta C_t(\text{术后}) = \text{每个胃癌术后 } C_t \text{ 值} - \text{同组内参照 } U6C_t \text{ 值}$ 。 $\Delta\Delta C_t$ 则是 $\Delta C_t(\text{术前}) - \Delta C_t(\text{术后})$,其变化的倍数(RQ 值)公式由 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

1.4 统计学处理 应用 SPSS11.0 处理实验数据,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 在胃癌手术前后血浆中的表达 手术后胃癌血浆中,miR-21 表达水平明显下调。经荧光实时定量 PCR 发现,42 例病例总体相对表达平均比术前降低 18.20 倍。有 27 例术后血浆 miR-21 表达低于术前,占全部病例的 64.2% (27/42),其平均相对表达量比术前降低了 28.20 倍。miR-21 在胃癌患者手术前后血浆相对表达比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);实验结果表明,血浆 miR-21 表达与肿瘤患者家庭史的有无存在一定关联,无家族史的患者术后血浆 miR-21 表达平均下降了 22.1 倍,手术前后 miR-21 表达比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),有家族史的患者平均术后血浆 miR-21 表达仅下降了 1.76 倍,手术前后比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 胃癌手术前后血浆 miR-21 Avg *C_t* 值变化*

项目	<i>n</i>	miR-21 平均 <i>C_t</i> 值		U6 平均 <i>C_t</i> 值		RQ	<i>P</i>
		术前	术后	术前	术后		
有效病例	27	25.69	28.35	35.35	35.06	28.20	< 0.01
无效病例	15	29.49	27.68	35.82	36.23	0.27	> 0.05
家族史	8	28.65	27.34	35.77	35.07	1.76	> 0.05
无家族史	34	26.67	28.29	35.46	35.57	22.11	< 0.05

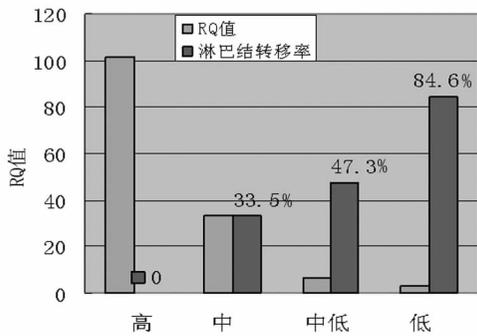


图 1 胃癌患者外周血 miR-21 相对表达与肿瘤分化及淋巴结转移的相关性

2.2 胃癌患者外周血 miR-21 相对表达与肿瘤分化及淋巴结转移的相关性 分析胃癌病例中分化与转移的完整资料发现,在高、中、中低、低 4 个分化区中,高分化 4 例,中分化 6 例,中低分化 18 例,低分化 14 例。平均 miR-21 表达术后比术前降低变化倍数分别为 101.4 倍、33.2 倍、6.3 倍和 3.1 倍。相应淋巴结转移率在四个分化区域内分别为 0(0/4)、33.5% (2/6)、47.3% (9/19) 和 84.6% (11/13)。从分析结果可看出,随着患者分化程度由高 \rightarrow 中 \rightarrow 中低 \rightarrow 低的变化,术后平均 miR-21 表达由低向高转变(RQ 值逐下降),表现出 miR-21 相对表达倍数在 4 个分化区上的分布,分别与淋巴结转移率在 4 个分化区上的分布呈负相关 ($r = -0.8925, P < 0.05$),见图 1。

2.3 miR-21 表达与其他临床病理特征的关系 42 例胃癌患者临床病理学资料见表 2,结果分析表明,患者手术前后外周血 miR-21 表达与年龄、性别无明显关联,并且在患者不同病理类型间比较,差异也无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 42 例胃癌患者临床病理学特征资料

因素	项目	性别	<i>n</i>	年龄
部位	胃小弯	男	7	41~76
		女	3	44~62
		男	5	61~75
	胃角	女	1	47
		男	8	52~80
	胃窦	女	3	58~62
		男	3	48~67
	贲门	女	0	—
		男	9	44~77
胃体	女	3	41~77	
	男	7	43~68	
病理	溃疡型低分化癌	女	2	44,55
		男	6	41~75
	表面凹陷型细胞癌	女	0	—
		男	4	41~80
	管状腺癌	女	0	—
		男	7	52~70
	溃疡型管状腺癌	女	1	64
		男	5	52~76
	溃疡型管状乳头状腺癌	女	3	62~77
		男	4	49~76
	其它病理类型	女	3	55~68

—:无数据。

3 讨论

miR-21 与人类肿瘤关系密切,在乳腺癌、肝癌、肺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中表达显著上调,和肿瘤的浸润转移及预后相关^[7-9]。胃癌现有的研究表明:在免疫组化检测中,miR-21 表达在肿瘤组织中显著高于非瘤组织,并且高表达的 miR-21 明显和肿瘤大小和深度相关^[10-11],但直接从外周血中提取循环 miR-21 作为胃癌早期诊断的研究尚未有明确报告。本研究以微创采集的外周血为检测对象,通过相应循环血 RNA 提取技术、qRT-PCR 等技术手段,检测出胃癌患者手术前后外周血循环 miR-21 表达发生明显改变,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);实验结果还发现,随着患者分化程度由高向低的变化,患者淋巴结转移率逐步上升,同时术后平均 miR-21 表达由低向高转变,表现出 miR-21 相对表达倍数在高、中、中低和低 4 个分化区上的分布,分别与淋巴结转移率在 4 个分化区上的分布呈相关性,对此研究目前未见有类似报道。

胃癌发生是多基因、多因素、多步骤发展的综合结果。在这个过程中,肿瘤家族史的有无,对胃癌的发病是一个重要的促进因素。超过 1/3 的胃癌患者存在肿瘤家族史,但并不和患者的性别、发病年龄以及临床病理类型相关^[12]。胃癌发病相关危险度调查中发现,肿瘤家族史是一个重要的胃癌发病因素之一 ($OR = 2.254, P = 0.007$)^[13]。有研究也发现,具有肿瘤家族史的胃癌患者,c-myc 基因表达显著高于无家族史的胃癌患者,并且病灶切除后,无家族史的胃癌患者 c-myc 基因表达明显下调,反之有家族史则无明显下降^[14-15]。其中可能机制是肿瘤家族史的遗传基因型,可造成患者对基因表达和某些信号通路传导的差异,如 G-蛋白通路和响应性有关^[16-17]。本研究还发现:有肿瘤家族史的患者术后 miR-21 表达上调,而无家族史的胃癌患者术后比术前血浆 miR-21 表达平均下降 22.1 倍

($P < 0.05$), 目前胃癌病例中肿瘤家族史与 miRNAs 的相互关系, 本研究尚属首次报告。

肿瘤组织的凋亡或坏死的细胞, 以及循环细胞的裂解, 都可以多种形式向循环外周血中释放 RNA^[18-19]。但由于循环 RNA 的水平一般较低, 在一定程度上限制了体液中 RNA 分子作为生物标志物的应用。随着研究的深入, 发现循环 miRNA 在血清和血浆中通常是与蛋白质结合在一起, 具有良好的稳定性^[20-21]。另外, 内源循环 miRNA 分子多数不是以游离形式存在的, 常与蛋白等构成颗粒存在, 因而内源性的循环 RNA 分子具有良好的抗 RNase 降解能力^[22]。这一特点为循环 RNA 发挥生物学功能提供了前提保证, 同时也为循环 miRNA 作为生物标志物进行检测提供了可能^[23-24]。本研究实验结果也表明利用 qRT-PCR 及相应手段, 可以从胃癌患者外周血中检测出循环 miR-21。这可能为胃癌预后提供依据, 同时也为早期辅助诊断及胃癌高危人群筛选提供了微创普查手段, 但还需要进一步扩大其他相关血浆 miRNAs 检测实验及病例实践加以证实。

参考文献

[1] Calin GA, Sevignani C, Dan DC, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(28): 2999-3004.

[2] Huang Z, Huang D, Ni S, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 127(1): 118-126.

[3] Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, et al. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(12): 1324-1334.

[4] Chan M, Liaw CS, Ji SM, et al. Identification of Circulating MicroRNA Signatures For Breast Cancer Detection[J]. Clin Cancer Res, 2013, 29(1): 118-120.

[5] Liu J, Lei DP, Jin T, et al. Altered Expression of miR-21 and PTEN in Human Laryngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinomas [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(10): 2653-2657.

[6] Ma WJ, Lv GD, Tuersun A, et al. Role of microRNA-21 and effect on PTEN in Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(30): 3253-3260.

[7] Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(116): 1915-1922.

[8] Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, et al. MicroRNA-21(miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer(NSCLC) [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(11-12): 846-852.

[9] Zhang BG, Li JF, Yu BQ, et al. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN [J]. Oncol Rep, 2012, 27(10): 1019-1026.

[10] Motoyama K, Inoue H, Mimori K, et al. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2010, 36(5): 1089-1095.

[11] Chen Z, Saad R, Jia P, et al. Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma [J]. Cancer, 2013, 119(18): 1985-1993.

[12] Yu J, Fu B, Zhao Q, et al. Family history of malignant neoplasm and its relation with clinicopathologic features of gastric cancer patients[J]. World J Surg Oncol, 2013, 11(2): 201-211.

[13] Gong EJ, Ahn JY, Jung HY, et al. Risk Factors and Clinical Outcomes of Gastric Cancer Identified by Screening Endoscopy; a Case-control Study[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(2): 189-190.

[14] Wen YY, Pan XF, Loh M, et al. Association of the IL-1B +3954 C/T polymorphism with the risk of gastric cancer in a population in Western China[J]. Eur J Cancer Prev, 2013, 34(2): 176-178.

[15] Tracz AF, Peczek B, Zuk K, et al. Effect of Helicobacter pylori eradication on the expression level of SATB1 and c-Myc genes in gastric mucosa of patients with family history of gastric cancer [J]. Pol Merkur Lekarski, 2013, 34(2): 269-276.

[16] Zuk K, Peczek L, Stec-Michalska K, et al. Family history of gastric cancer correlates with decreased expression of HINT1 tumor suppressor gene in gastric mucosa of dyspeptic patients[J]. Oncol Lett, 2012, 3(2): 219-223.

[17] Marcon F, Silvestrini F, Siniscalchi E, et al. Gene expression in response to ionizing radiation and family history of gastric cancer [J]. Fam Cancer, 2010, 128(1): 9-10.

[18] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes; composition, biogenesis and function[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(8): 569-579.

[19] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more[J]. Trends Cell Biol, 2009, 19(1): 43-51.

[20] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10513-10518.

[21] 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.

[22] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(49): 5003-5008.

[23] Deddens JC, Colijn JM, Oerlemans MI, et al. Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers for the Early Diagnosis of Acute Coronary Syndrome[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2013, 27(3): 301-304.

[24] Tambyah PA, Sepramaniam S, Mohamed A J, et al. MicroRNAs in circulation are altered in response to influenza A virus infection in humans[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76811.

(收稿日期: 2014-03-25)

(上接第 3315 页)

术期 N 末端脑钠素原浓度的变化[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(8): 896-898.

[8] Reyes G, Fores G, Hugo R, et al. NT-proBNP in cardiac surgery: a new tool for the management of our patients? [J]. Interactive Cardio Vas Thorac Surg, 2005, 4(3): 242-247.

[9] Eliasdottir SB, Klemenzson G, Torfason B, et al. Brain natriuretic peptide is a good Predictor for outcome in cardiac surgery[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2008, 52(2): 182-187.

[10] 迪丽努尔·塔吉, 阿布力米提·米吉提. 心功能不全患者血浆 N-

末端脑钠肽前体及血清尿酸浓度的相关性[J]. 心血管康复医学杂志, 2010, 19(02): 125-127.

[11] 董静, 黄亚萍, 赵玉兰. 轻度心功能不全患者肾小球滤过率及血浆 N 末端脑钠肽前体水平的变化[J]. 中国医药导报, 2013, 10(1): 71-73.

[12] 刘德贝, 赵春林, 邹飞扬. 慢性心力衰竭患者血清 APN 与 NT-proBNP 相关性研究[J]. 医学临床研究, 2012, 25(10): 1972-1974.

(收稿日期: 2014-03-11)