

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.07.018

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190131.0939.009.html(2019-01-31)

miR-216a 在胃癌组织和患者血浆中的表达变化及临床意义*

张同,李庆,舒若,徐玉,施承民,曾玉剑,孙亮,田衍,肖博凯,王昆华,罗华友
(昆明医科大学第一附属医院胃肠与疝外科/云南省消化病研究所/云南省消化道疾病防治工程技术研究中心,昆明 650032)

[摘要] **目的** 检测胃癌患者肿瘤组织及血浆 miR-216a 的表达水平,探讨其与临床病理特征和手术治疗预后的关系。**方法** 选取 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在该院接受手术治疗的胃癌患者 120 例,收集肿瘤和癌旁组织标本,采集手术前后患者血浆和健康志愿者(120 例)血浆。采用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-216a 在组织和血浆标本中的表达情况,统计分析 miR-216a 表达水平与胃癌患者临床病理特征和手术预后的关系。**结果** miR-216a 在胃癌组织中的表达水平低于癌旁组织($P < 0.01$)。手术前,胃癌患者血浆 miR-216a 表达水平高于健康人群($P < 0.01$);术后,患者血浆 miR-216a 表达水平较手术前明显降低($P < 0.05$)。胃癌组织中 miR-216a 相对表达水平与肿瘤分化程度和 TNM 分期相关($P < 0.05$)。患者血浆 miR-216a 相对表达水平与肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和肿瘤大小均相关($P < 0.05$)。胃癌组织 miR-216a 高表达患者术后复发率和生存率优于胃癌组织 miR-216a 低表达患者,差异无统计学意义($P > 0.05$);血浆 miR-216a 低表达患者的复发率和生存率优于血浆 miR-216a 高表达患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 胃癌患者肿瘤组织和血浆中 miR-216a 的表达变化差异明显,与肿瘤分化和分期等相关,且在血浆中的表达与手术预后相关,在胃癌早期诊治和预后判断中有潜在价值。

[关键词] 胃肿瘤;miR-216a;癌组织;血浆;预后

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)07-1155-04

Different expression and clinical significance of miR-216a in tissue and plasma of gastric cancer patients*

ZHANG Tong, LI Qing, SHU Ruo, XU Yu, SHI Chengmin, ZENG Yujian, SUN Liang,
TIAN Yan, XIAO Bokai, WANG Kunhua, LUO Huayou

(Department of Gastrointestinal and Hernia Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Institute of Digestive Diseases/Yunnan Engineering Technology Center of Digestive Disease, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To detect tumor tissue and plasma miR-216a expression levels in patients with gastric cancer, and explore its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis after surgery. **Methods** A total of 120 cases of patients with gastric cancer undergoing surgical treatment in this hospital from January 2012 to December 2014 were selected. Tumor tissue and adjacent tissue samples, plasma specimens of patients before and after surgery, and plasma specimens of healthy volunteers (120 cases) were collected. The expression levels of miR-216a in tissue and plasma samples were detected by RT-qPCR, and their relationships to clinicopathological characteristics and prognosis of gastric cancer were statistically analyzed. **Results** The expression level of miR-216a in gastric cancer tissue samples was significantly lower than that in adjacent tissue samples ($P < 0.01$). Before surgery, the plasma level of miR-216a in patients with gastric cancer was significantly higher than that in healthy volunteers ($P < 0.01$). Compared with before surgery, the plasma level of miR-216a in patients with gastric cancer was significantly decreased after surgery ($P < 0.05$). The relative expression level of miR-216a in gastric cancer tissues was correlated to tumor differentiation and TNM stage ($P < 0.05$). The relative expression level of miR-216a in plasma was correlated to tumor differentiation, TNM stage, lymph node metastasis and tumor size ($P < 0.05$). Patients with high expression of miR-216a in gastric cancer tissues had lower recurrence rate and higher survival rate than patients with low expression of miR-216a in gastric cancer tissues, no statistically significant difference was observed ($P > 0.05$). However, patients with low plasma level of miR-216a had lower recurrence rate and higher survival rate than patients with high plasma level of miR-216a, there was statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** The

* 基金项目:云南省消化病研究所内设机构项目(2016NS0085);云岭学者项目(YLXL20170002);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项面上项目[2017FE467(-038)]。 作者简介:张同(1988-),住院医师,硕士,主要从事胃肠消化道疾病方面的研究。

expression of miR-216a in tissues and plasma of patients with gastric cancer is significantly different, which is related to tumor differentiation and staging, and its expression in plasma is related to the prognosis. The plasma miR-216a has potential value in early diagnosis and treatment and prognosis judgement of gastric cancer.

[Key words] stomach neoplasms; miR-216a; cancer tissue; plasma; prognosis

胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,具有较高的致死率,并且在我国发病率较高。近年来,手术治疗、放射治疗和化学治疗等取得了一定成效^[1-2],但是淋巴转移和预后不良等问题依然严重^[3]。miRNA 通过与靶基因相互作用,在肿瘤发生过程中起着重要的调控作用^[4-6]。许多 miRNA 已经在胃癌相关方面研究中应用,如 miR-21^[6]、miR-141^[3]和 miR-30b^[7]等。miR-216a 最初报道与急性胰腺炎相关^[8],而后报道参与了胰腺癌^[9-11]、肝癌^[12]、肺癌^[13]、卵巢癌^[14]和肾癌^[15]等的发生。miR-216a 在胃癌方面的研究多在细胞水平进行^[16-18],临床研究报道较少,且关于其在胃癌组织中的表达变化存在分歧^[18-19]。因此,本研究比较分析 miR-216a 在胃癌组织和患者血浆中的表达水平,以及手术前后的表达变化,旨在为胃癌的临床诊断和治疗预后提供一些参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在本院接受手术治疗的胃癌患者 120 例作为观察组,同时选取 120 例健康志愿者作为对照组。纳入标准:病理学诊断为腺癌;患者术前未行放射治疗、化学治疗、靶向治疗等抗肿瘤治疗;患者或其家属自愿签署知情同意书。排除标准:病理学诊断为非腺癌;术后 3 年的随访资料不完整。观察组男 79,女 41,平均年龄(61.52±8.96)岁。对照组男 66 例,女 54 例,平均年龄(55.24±7.46)岁。两组性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 样品收集 采集胃癌患者的肿瘤组织(非坏死部分)和对应的癌旁组织(距肿瘤组织 5~10 cm)约 0.2 g,手术切除标本立即放入液氮中,随后置入-80℃冰箱冷冻保存备用。采集胃癌患者手术前、手术后第 7 天血液,以及健康志愿者血液各 3 mL。血液样品在乙二胺四乙酸(EDTA)采血管中室温静置约 30 min 后,4℃下 3 500 r/min 离心 5 min,收集血清,然后 4℃12 000 r/min 离心 10 min,去除细胞成分,收集上层血浆,置于-80℃保存备用。

1.2.2 RNA 提取 按照 GenElute™ Plasma/Serum RNA Purification Mini Kit 试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司)方法抽提、保存患者胃癌组织标本和血浆标本中的总 RNA,利用荧光分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)测定血浆 RNA 水平。提取的 RNA 置于-80℃保存备用。参照 Taq-Man miRNA Reverse Transcription 试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)说明合成 cDNA,miR-216a 和 U6 的特异性引物见表 1。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 利用 SYBR Master mix 试剂盒(日本 Toyobo 公司)在 ABI 7500 RT-PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)上对上述合成的 cDNA 进行检测。每个反应重复 3 次。miR-216a 和 U6 的 RT-qPCR 引物序列见表 1。以 U6 小环 RNA 作为内参^[17,20],结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法^[21]计算。

表 1 RT-qPCR 所用引物序列

名称	方向	引物序列
miR216a	RT	5'-GTCGTATCCAGTGC GTGTCGTGGAGTCGG CAATTGCACTGGATACGACTCACAGT -3'
U6	RT	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT -3'
miR216a	F	5'-ATCCAGTGC GTGTCGTG -3'
	R	5'-TGCTTAATCTCAGCTGGCA -3'
U6	F	5'-GCTTCCGAGCAGCACA TATACTAAAAT -3'
	R	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT -3'

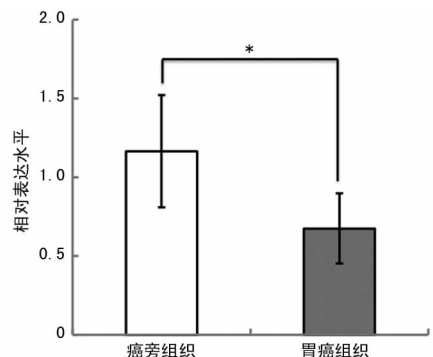
F:正向;R:反向

1.2.4 其他方法及术后随访 本试验选取的胃癌患者均采用腹腔镜或开腹胃癌根治术^[1-2]进行治疗。胃癌组织幽门螺杆菌(Hp)采用硼酸亚甲蓝染色方法^[22]检测。术后 3 年内平均每 3 个月随访 1 次,记录肿瘤复发和患者死亡等情况。

1.3 统计学处理 所有数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验;计数资料以例数或百分比表示,比较采用 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-216a 在胃癌组织中的表达降低 RT-qPCR 检测结果表明,miR-216a 在胃癌患者非坏死胃癌组织中的相对表达水平低于对应的癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1。



*: $P<0.01$

图 1 miR-216a 在癌旁组织和胃癌组织中的表达水平比较

2.2 手术前后 miR-216a 在胃癌患者血浆中的表达变化 手术前,观察组胃癌患者血浆 miR-216a 表达水平高于对照组健康人群,差异有统计学意义($P<$

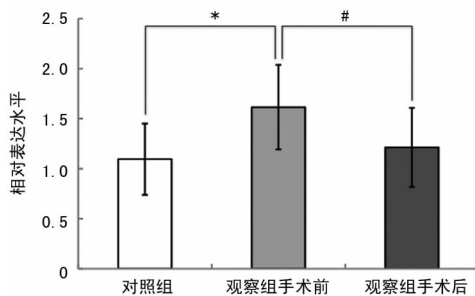
0.01)。手术后,胃癌患者血浆 miR-216a 表达水平低于手术前,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

表 2 胃癌患者临床病理特征与 miR-216a 相对表达水平的相关性($\bar{x} \pm s$)

类别	n	胃癌组织		术前血浆	
		相对表达水平	P	相对表达水平	P
性别			0.882		0.442
男	79	0.689±0.252		1.571±0.527	
女	41	0.661±0.229		1.660±0.549	
年龄			0.745		0.324
<60 岁	54	0.658±0.234		1.631±0.541	
≥60 岁	66	0.693±0.247		1.599±0.487	
分化程度			0.048		0.041
未+低	69	0.562±0.231		1.832±0.573	
中+高	51	0.787±0.257		1.397±0.474	
TNM 分期			0.032		0.002
I+II	52	0.813±0.218		1.379±0.451	
III+IV	68	0.536±0.210		1.850±0.547	
Laurén 分型			0.104		0.418
肠型	74	0.649±0.218		1.567±0.472	
弥漫型	46	0.702±0.239		1.664±0.489	
淋巴结转移			0.106		0.026
有	76	0.643±0.209		1.817±0.512	
无	44	0.706±0.241		1.412±0.495	
肿瘤大小			0.085		0.037
<3 cm	72	0.639±0.195		1.875±0.482	
≥3 cm	48	0.711±0.249		1.354±0.516	
Hp 感染			0.540		0.733
阳性	37	0.659±0.202		1.625±0.437	
阴性	83	0.691±0.217		1.608±0.496	

2.3 miR-216a 的表达水平与胃癌患者临床病理特征的相关性 胃癌组织中 miR-216a 相对表达水平与患

者性别、年龄、Laurén 分型、Hp 感染、淋巴结转移和肿瘤大小均无关($P > 0.05$)。胃癌患者术前血浆 miR-216a 相对表达水平与性别、年龄、Laurén 分型和 Hp 感染均无关($P > 0.05$)。胃癌组织 miR-216a 相对表达水平与肿瘤分化程度和 TNM 分期相关($P < 0.05$)。术前血浆 miR-216a 相对表达水平与肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和肿瘤大小均相关($P < 0.05$),见表 2。



* : $P < 0.01$; # : $P < 0.05$

图 2 手术前后 miR-216a 在胃癌患者血浆中的表达水平

2.4 miR-216a 表达水平与胃癌患者治疗预后的相关性 按照 miR-216a 的相对表达水平将胃癌患者划分为高值组和低值组,相对表达水平大于或等于平均相对表达水平的患者归为高值组,相对表达水平小于平均相对表达水平的患者归为低值组。分组及胃癌患者术后 3 年内的复发率和生存率见表 3。胃癌组织 miR-216a 高值组的术后复发率和生存率较优,差异无统计学意义($P > 0.05$)。患者血浆 miR-216a 低值组的复发率和生存率优于高值组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 miR-216a 表达水平与胃癌手术治疗预后的关系

组别	胃癌组织				术前血浆			
	总例数(n)	复发率[n(%)]	死亡例数(n)	生存率[n(%)]	总例数(n)	复发率[n(%)]	死亡例数(n)	生存率[n(%)]
高值组	53	5(9.4)	4	49(92.4)	62	14(22.6)	11	51(82.2)
低值组	67	14(20.9)	9	58(86.6)	58	5(8.6)	2	56(96.6)
P		0.087	—	0.302		0.036	—	0.011

—:无数据

3 讨 论

胃癌是全球发病率最高的恶性肿瘤之一,在发展中国家致死率尤其高。有研究报道,早期诊治的胃癌患者其生存率可以有效提高^[2,4]。此外,由于预后不良,即使是经根治性切除手术,或者联合放射治疗、化学治疗等方式,胃癌患者的生存率也不高^[1,5]。因此,探寻新的生物靶点或标记物在胃癌早期诊断、治疗预后等方面有重要意义^[4,6]。

本研究同时收集了胃癌患者的肿瘤组织、癌旁组织和手术前后患者血浆,利用 RT-qPCR 技术对 miR-216a 的表达水平进行了检测。研究结果显示,miR-216a 在患者胃癌组织中的相对表达水平明显低于癌

旁组织($P < 0.01$),这与 miR-216a 在胰腺癌和卵巢癌等其他癌症患者肿瘤组织中的表达结果一致^[9,14,18]。此外,miR-216a 在胃癌患者手术前血浆中的相对表达水平明显高于对照组健康人群($P < 0.01$),这也与其在胰腺炎等患者血浆中观测的表达结果一致^[23]。相关性分析结果显示,胃癌组织和患者血浆中 miR-216a 的相对表达水平均与肿瘤分化程度和 TNM 分期有关($P < 0.05$)。但是,未+低分化和 III+IV 分期患者组织中 miR-216a 表达分别低于中+高分化和 I+II 分期患者,而血浆中 miR-216a 表达与此相反。这可能与 miR-216a 作为抑癌因子抑制胃癌细胞的增殖和侵袭有关^[16,18],而由于组织和血浆中 miR-216 对癌变

响应的时效性不同^[8],使得它们在相同分化程度和分期患者中的表达差异明显。这与其他抑癌因子如 miR-141-3p 等的表达模式类似^[3]。这些结果表明,miR-216a 在患者胃癌组织和血浆中的表达变化差异均较为明显,且与胃癌临床病理特征存在相关性。因此,miR-216a 可能在胃癌的早期诊断中有一定的临床价值。

进一步分析表明,接受手术治疗后,胃癌患者血浆 miR-216a 相对表达水平明显低于手术前($P < 0.05$)。目前,对 miR-216a 在胃癌或其他癌症患者手术前后血浆中的表达变化研究较少,难以对此趋势作比较验证。但是,该结果说明 miR-216a 可以作为胃癌手术疗效评价的相关指标。并且,miR-216a 在胃癌患者血浆中的相对表达水平与患者术后复发率和生存率存在相关性。本研究结果显示,手术前血浆 miR-216a 低表达患者的术后复发率和生存率均优于高表达患者($P < 0.05$)。此外,由于无创、稳定性好、检测结果可靠等特点^[4],临床检测胃癌患者血浆 miR-216a 表达水平对胃癌早期诊断和治疗预后具有潜在的重要意义。

参考文献

[1] 程康文,王贵和,束宽山,等.腹腔镜辅助与开腹胃癌根治术临床效果及对肠道屏障功能影响的比较[J].中国普通外科杂志,2017,26(4):450-456.

[2] 徐其银,黄君,陈伟平.腹腔镜与开腹手术治疗胃癌患者的疗效及对患者凝血状态的影响[J].中国普外基础与临床杂志,2017,6(6):716-721.

[3] 周欣亮,赵日暘,韩晶,等. miR-141-3p 在胃癌组织和患者血浆中的表达及其临床意义[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24(10):1112-1117.

[4] LIU W, MA R, YUAN Y. Post-transcriptional regulation of genes related to biological behaviors of gastric cancer by long noncoding RNAs and microRNAs[J]. J Cancer, 2017,8(19):4141-4154.

[5] 杨平,倪超,陈思,等.环状 RNA 及其在胃癌中作用的研究进展[J].中国细胞生物学学报,2017,39(12):1-8.

[6] 王霖沛,汤雅玲,马筱秋,等.胃癌 miRNAs 表达谱及胃癌组织 miR-21 表达临床意义探讨[J].中华肿瘤防治杂志,2012,19(19):1441-1444.

[7] 李建华,邓爱民,张洪杰. miRNA-30b 对抑制胃癌细胞增殖及侵袭的作用研究[J].中国现代医学杂志,2017,27(27):46-50.

[8] 陆攀,宋佳希,王锋,等.血清 miR-216a 检测在急性胰腺炎诊断及预后监测中的价值[J].临床检验杂志,2017,35(8):579-582.

[9] 侯宝华,简志祥,崔鹏,等. miR-216a 在胰腺癌组织中的表达及临床意义[J].南方医科大学学报,2012,32(11):1628-1631.

[10] 赵银瑞,张连峰,赵萍,等. miR216a 及其靶基因 JAK2、CSK 在胰腺癌中的表达及临床意义[J].世界华人消化杂志,2015,23(34):5458-5464.

[11] LU J, LI X, WANG F, et al. YB-1 expression promotes pancreatic cancer metastasis that is inhibited by microRNA-216a[J]. Exp Cell Res, 2017,359(2):319-326.

[12] CHEN Z L, MA T T, HUANG C, et al. MicroRNA-216a: a potential therapeutic target for drug resistance and recurrent of liver cancer[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2013,12(6):661.

[13] 安宁,李宏敏,于瑞莲,等. miR-216a-5p 通过下调 MMP16 表达抑制肺癌细胞的侵袭[J].中国癌症杂志,2015,25(8):588-594.

[14] LIU H, PAN Y, HAN X, et al. MicroRNA-216a promotes the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer by suppressing the PTEN/AKT pathway [J]. Onco Targets Ther, 2017,10:2701-2709.

[15] 董道全,周靖程,江淑祺,等. miR-216a 在肾癌中的表达与临床意义[J].中华临床医师杂志,2017,11(10):1660-1664.

[16] 张雪梅,兰辉,刘方,等. miR-216a 通过靶向调控 PKC α 促进胃癌细胞凋亡的研究[J].重庆医学,2013,42(33):4051-4052,4055.

[17] GONG D, CHENG H P, XIE W, et al. Cystathionine γ -lyase(CSE)/hydrogen sulfide system is regulated by miR-216a and influences cholesterol efflux in macrophages via the PI3K/AKT/ABCA1 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016,470(1):107-116.

[18] TAO Y, YANG S, WU Y, et al. MicroRNA-216a inhibits the metastasis of gastric cancer cells by targeting JAK2/STAT3-mediated EMT process [J]. Oncotarget, 2017, 8(51):88870-88881.

[19] SAFARALIZADEH R, AJAMI N, NEMATI M, et al. Disregulation of miR-216a and miR-217 in gastric cancer and their clinical significance [J]. J Gastrointest Cance, 2019,50(1):78-83.

[20] ZHANG Y, TANG X, SHI M, et al. MiR-216a decreases MALAT1 expression, induces G2/M arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017,483(2):816-822.

[21] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. Nat Protoc, 2008,3(6):1101-1108.

[22] 殷正进,李桂梅,曹晓卉.幽门螺杆菌三种检测方法的比较[J].诊断病理学杂志,2015,22(10):647-648.

[23] 王春全,陈景祥,杨进军,等. miR-216a 在急性胰腺炎患者外周血的表达及临床意义[J].免疫学杂志,2013,29(1):47-49.

(收稿日期:2018-10-08 修回日期:2018-12-02)