

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.20.017

## 胃癌患者血浆中 miR-203a 及其靶基因的表达差异与临床意义

李媛华<sup>1</sup>, 罗华友<sup>2,3</sup>, 舒若<sup>2,3</sup>, 龚方友<sup>2,4</sup>, 徐玉<sup>2,4</sup>, 孙亮<sup>2,4△</sup>

(1. 昆明医科大学第一附属医院麻醉科, 昆明 650032; 2. 昆明医科大学第一附属医院胃肠外科, 昆明 650032; 3. 云南省消化病研究所, 昆明 650032; 4. 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** 探讨血浆 miR-203a 及其靶基因在胃癌患者手术前后的表达变化及其与临床病理的相关性。**方法** 选取在昆明医科大学第一附属医院接受手术治疗的胃癌患者和健康体检者各 120 例, 收集胃癌患者手术前后的血浆和健康志愿者的血浆。利用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测血浆中 miR-203a、E2F 转录因子 3(E2F3)、毛细血管扩张性共济失调症突变基因(ATM)和转录因子蜗牛同源物 2(SNAI2)的表达量。统计分析其与胃癌患者病理特征和手术疗效的相关性。**结果** 与健康对照组比较, 胃癌患者血浆中 miR-203a 的表达量显著上升( $P < 0.01$ ), 而 E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达量则显著下降( $P < 0.01$ )。手术后, miR-203a 的表达量显著下调( $P < 0.01$ ), 而 E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达量则显著上调( $P < 0.05$ )。miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 的相对表达量与胃癌分化程度和 TNM 分期均显著相关( $P < 0.05$ )。miR-203a 低表达组患者的术后生存率优于高表达组( $P < 0.05$ ), 而 E2F3、ATM 和 SNAI2 高表达组患者的术后生存率较高。**结论** 胃癌患者血浆中 miR-203a 与其靶基因的表达呈负调控关系, 手术前后表达差异显著, 与临床病理特征和治疗预后具有显著相关性。

**[关键词]** 胃肿瘤; miR-203a; E2F 转录因子 3; 毛细血管扩张性共济失调症突变基因; 转录因子蜗牛同源物 2**[中图分类号]** R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)20-3493-04

### Expression difference and clinical significance of plasma miR-203a and its target genes in patients with gastric cancer

LI Yuanhua<sup>1</sup>, LUO Huayou<sup>2,3</sup>, SHU Ruo<sup>2,3</sup>, GONG Fangyou<sup>2,4</sup>, XU Yu<sup>2,4</sup>, SUN Liang<sup>2,4△</sup>

(1. Department of Anesthesiology; 2. Gastroenterology Surgery, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 3. Yunnan Provincial Institute of Digestive Diseases, Kunming, Yunnan 650032, China; 4. Yunnan Provincial Engineering Technology Research Center of Digestive Diseases, Kunming, Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression changes of plasma miR-203a and its target genes before and after operation in the patients with gastric cancer and their correlation with clinicopathology. **Methods** A total of 120 patients with gastric cancer receiving the surgery treatment in the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University and 120 persons undergoing the healthy physical examination were selected. And the plasma of healthy volunteers and before and after surgery in the patients with gastric cancer were collected. R The real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of miR-203a, E2F3, ATM and SNAI2 in plasma. Statistical analysis was conducted to identify their correlation with clinicopathological characteristics and surgical efficacy. **Results** Compared to the healthy control group, the expression level of serum miR-203a in gastric cancer patients was significantly increased ( $P < 0.01$ ), while the expression levels of E2F3, ATM and SNAI2 were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). After operation, the expression level of miR-203a was significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ), while the expression levels of E2F3, ATM and SNAI2 were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). The relative expression levels of miR-203a, E2F3, ATM and SNAI2 were significantly correlated with the tumor differentiation degree and TNM stages ( $P < 0.05$ ). The postoperative survival rate in the miR-203a low expression group was superior to that in the high expression group ( $P < 0.05$ ), while the patients in the E2F3, ATM and SNAI2 high expression group was higher survival rate. **Conclusion** The expression of miR-203a shows the negative regulation relation with its target genes in gastric cancer patients. Their expression level is significant variant before and after surgery, and has significant correlation to clinicopathological characteristics, treatment and prognosis.

**[Key words]** gastric cancer; miR-203a; E2F3; ATM; SNAI2

近年来,微小 RNA (microRNA)在许多癌症相关的报道中被证实,其参与了多种肿瘤的发生、发展、侵袭和转移等过程<sup>[1]</sup>。胃癌是世界范围内病死率较高的恶性肿瘤之一,其发病机制尚不十分明确。近期研究表明微小 RNA 在胃癌的早期诊断、治疗预后和生物靶标等方面可能存在潜在的临床价值<sup>[1-3]</sup>。而 miR-203a 被报道在胃癌<sup>[4-6]</sup>、结肠直肠癌<sup>[7]</sup>、宫颈癌<sup>[8]</sup>、乳腺癌<sup>[9]</sup>、卵巢癌<sup>[10]</sup>、肝癌<sup>[11]</sup>、肺癌<sup>[12]</sup>、舌癌<sup>[13]</sup>、食管癌<sup>[14]</sup>、肾癌<sup>[15]</sup>和膀胱癌<sup>[16]</sup>等肿瘤的发生和发展过程中作为肿瘤抑制因子起调控作用。并且,新近研究还发现了一些 miR-203a 的新靶向基因,如 E2F 转录因子 3(E2F3)<sup>[17-18]</sup>、毛细血管扩张性共济失调症突变基因(ATM)<sup>[7,19]</sup>和转录因子蜗牛同源物 2(SNAI2)<sup>[4,6,20]</sup>等。由于前期研究多在癌细胞水平开展实验<sup>[4,6,18,21]</sup>,其是否适合作为标志物或作用靶点等尚需更多的临床试验验证。本研究比较分析 miR-203a 及其靶基因在胃癌患者和健康人群血浆中的表达差异,在胃癌患者手术前后血浆中的表达变化,及其与临床病理的相关性,旨在为胃癌的临床诊断和治疗提供一些参考依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在昆明医科大学第一附属医院接受手术治疗的胃癌患者 120 例作为试验组,术前均未行放疗或化疗。同时选取 120 例健康体检者作为对照组。试验组患者的平均年龄为(58.21±8.74)岁,其中男 65 例,女 55 例。对照组的平均年龄为(56.02±7.95)岁,其中男 58 例,女 62 例。两组人群的年龄和性别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 血浆采集及总 RNA 提取** 静脉采集手术前、手术后第 7 天的血液各 2 mL,采集对照组血液 2 mL。血液样本快速转入乙二胺四乙酸(EDTA)采血管,室温静置约 30 min 后,4℃下 1 200 r/min 离心 10 min,转移上清液至新的离心管。然后,4℃下 1 200 r/min 离心 10 min,去除细胞成分,收集上层血浆至新的离心管。取 200 μL 血浆样本,按 GenElute™ Plasma/Serum RNA Purification Mini Kit 试剂盒(SIGMA-ALDRICH)的方法、步骤抽提血浆中的总 RNA,利用荧光分光光度计(Thermo Fisher)测定血浆 RNA 浓度。提取的 RNA 置于-80℃保存备用。

**1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测** 参照 Taq-Man miRNA Reverse Transcription 试剂盒(Applied Bio Systems)的说明合成第一链 cDNA。参照赵珊等<sup>[8]</sup>和曾玉等<sup>[10]</sup>在血浆中检测 miR-203a 的方法,设计了 miR-203a 的特异性引物序列,见表 1。并且根据 miR-203a 在其他癌症患者血浆中的表达水平选择以 U6 小环 RNA 作为内参<sup>[12,18]</sup>。靶基因 E2F3、ATM 和 SNAI2 的引物序列见表 1。参照之前的研究<sup>[17,19-20]</sup>报道,靶基因的表达量分析选择以

GAPDH 作为内参。以上引物均由广州锐博生物公司合成。利用 SYBR Master Mix 试剂盒(Toyobo)在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Applied BioSystems)上对上述合成的 cDNA 进行 RT-qPCR 检测。每个反应重复 3 次。结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  相对定量法<sup>[22]</sup>计算。

表 1 用于 RT-qPCR 检测用的引物序列

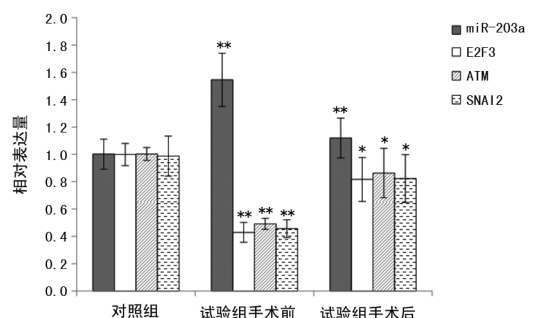
名称	正向引物	反向引物
miR-203a	5'-GTGCAGGGTCCGAG-GT-3'	5'-GCCCGGTGAAAT-GTTTAGG-3'
E2F3	5'-GATGGGGTCAGATG-GAGAGA-3'	5'-GAGACAC-CCTG-GCATTGTTT-3'
ATM	5'-AGACCGCGTGATACT-GGATG-3'	5'-ACTGTCACTG-CACCTCGGAAG-3'
SNAI2	5'-CTTCCTGGT-CAAGAAGCA-3'	5'-GGGAAATAATCACTG-TATGTGTG-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCA-CA-3'	5'-AACGCT-TCACGAATTGCGT-3'
GAPDH	5'-CAAGGTCATCCATGA-CAACTTTG-3'	5'-GTCCACCACCCTGTT-GCTGTAG-3'

**1.2.3 手术方法及术后随访** 本试验选取的胃癌患者均采用腹腔镜或开腹胃癌根治术<sup>[23]</sup>进行治疗。胃癌组织幽门螺杆菌(helicobacter pylori, HP)采用硼酸亚甲蓝染色法<sup>[24]</sup>检测。术后 3 年内平均每 3 个月随访 1 次,记录患者生存等情况。

**1.3 统计学处理** 数据应用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组比较采用  $t$  检验,多组数据的比较采用单因素方差分析。计数资料以百分率表示,采用  $\chi^2$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胃癌患者手术前后 miR-203a 及其靶基因的表达量比较** 在实施手术前,试验组血液中 miR-203a 的表达量显著高于对照组,而试验组血液中 E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达量则显著低于对照组,差异均具有统计学意义( $P<0.01$ )。试验组手术后与试验组手术前相比,miR-203a 的表达量显著下调( $P<0.01$ ),而 E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达量则显著上调( $P<0.05$ ),见图 1。



\*\* :  $P<0.01$ , 与对照组及试验组手术后比较; \* :  $P<0.05$ , 与试验组手术前比较

图 1 两组人群血浆中 miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达量

表 2 胃癌临床病理特征与 miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 相对表达量的关系

类别	组别	n	miR-203a	P	E2F3	P	ATM	P	SNAI2	P
性别	男	65	1.528±0.507	0.583	0.408±0.259	0.358	0.508±0.229	0.622	0.482±0.252	0.234
	女	55	1.563±0.519		0.369±0.243		0.495±0.231		0.450±0.229	
年龄	≥60 岁	53	1.590±0.514	0.457	0.381±0.245	0.783	0.465±0.193	0.328	0.451±0.224	0.334
	<60 岁	67	1.501±0.487		0.396±0.286		0.535±0.243		0.479±0.247	
肿瘤大小	<3 cm	72	1.347±0.473	0.024	0.529±0.285	0.027	0.529±0.236	0.361	0.540±0.261	0.066
	≥3 cm	48	1.745±0.534		0.248±0.197		0.473±0.186		0.389±0.207	
分化程度	未+低	52	1.388±0.494	0.043	0.511±0.282	0.047	0.625±0.248	0.036	0.567±0.272	0.028
	中+高	68	1.704±0.527		0.266±0.203		0.456±0.177		0.366±0.201	
TNM 分期	I + II	49	1.372±0.472	0.033	0.518±0.283	0.038	0.668±0.254	0.016	0.580±0.281	0.042
	III + IV	71	1.720±0.529		0.259±0.193		0.334±0.162		0.351±0.193	
Laurén 分型	肠型	75	1.586±0.512	0.371	0.360±0.247	0.322	0.381±0.170	0.045	0.429±0.219	0.343
	弥漫型	45	1.506±0.495		0.417±0.256		0.620±0.248		0.501±0.231	
淋巴结转移	有	69	1.783±0.542	0.003	0.329±0.221	0.121	0.345±0.165	0.034	0.401±0.195	0.166
	无	51	1.309±0.466		0.448±0.273		0.656±0.251		0.528±0.249	
幽门螺杆菌感染	阳性	42	1.623±0.527	0.455	0.345±0.232	0.231	0.457±0.201	0.203	0.422±0.212	0.451
	阴性	78	1.468±0.496		0.434±0.262		0.545±0.236		0.509±0.237	

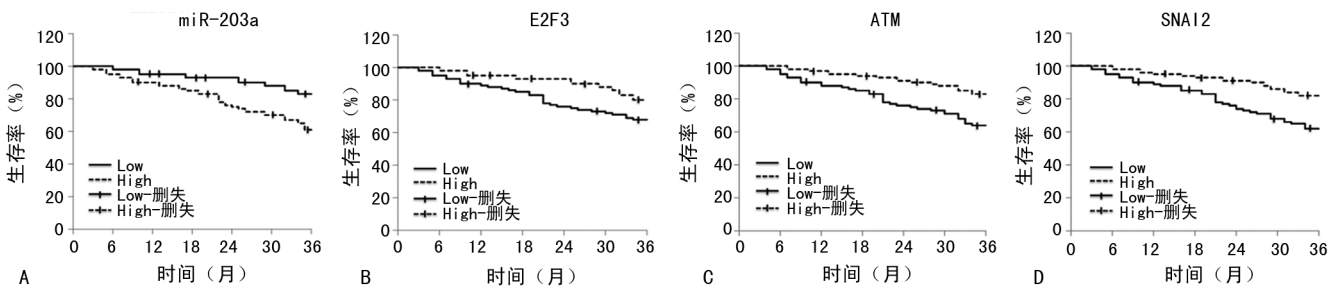


图 2 miR-203a 及其靶基因的表达与患者生存率的关系

2.2 胃癌患者血浆中 miR-203a 及其靶基因的表达与临床病理特征的关系 血浆中 miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 的相对表达量与胃癌患者性别、年龄和幽门螺杆菌感染均无关(表 2),而与分化程度和 TNM 分期均显著相关( $P < 0.05$ )。此外,miR-203a 的表达量与肿瘤大小和淋巴结转移显著相关( $P < 0.05$ ),E2F3 的表达量与肿瘤大小显著相关( $P < 0.05$ ),ATM 的表达量与 Laurén 分型和淋巴结转移显著相关( $P < 0.05$ )。

2.3 miR-203a 及其靶基因的表达与生存率的预后分析 分别按 miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 的相对表达量将试验组分为高值组和低值组。相对表达值大于等于平均相对表达值的患者归为高值组,相对表达值小于平均相对表达值的患者归为低值组。各分组患者术后 3 年内生存率的比较见图 2。miR-203a 低值组患者的生存率显著高于高值组( $P < 0.05$ );而 ATM 和 SNAI2 高值组患者的生存率显著高于低值组( $P < 0.05$ );E2F3 高值组患者的生存率高于低值组,但差异无统计学意义。

3 讨论

从不典型增生到癌变、肿瘤转移等过程中,微波 RNA 及其靶基因在胃癌的每一个发病阶段均表现出

差异的表达模式。研究它们的相互调控关系,可以了解胃癌的发生机制,为癌症治疗提供新的靶点,为临床诊断提供准确的标志物<sup>[1-2]</sup>。目前,miR-203a 作为肿瘤抑制因子在胃癌方面的研究报道较多,并且其很可能作用于靶基因 E2F3、ATM 和 SNAI2 等调控胃癌发病过程<sup>[18-20]</sup>。

本研究利用 RT-qPCR 技术对 miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 在胃癌患者血浆中的表达进行了检测。结果显示,试验组手术前血浆中 miR-203a 的表达显著高于对照组( $P < 0.01$ ),而 E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达显著低于对照组( $P < 0.01$ )。这与它们分别在胃癌和结直肠癌等癌症中的表达情况基本类似<sup>[4,7,17]</sup>。试验组手术后,检测其血浆中 miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达量。结果显示,术后 miR-203a 的表达量比术前显著下调( $P < 0.01$ ),而术后 E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达量比术前显著上调( $P < 0.05$ )。这说明 miR-203a 与靶基因 E2F3、ATM 和 SNAI2 的表达呈负调控关系,与之前报道的 miR-203a 通过调节靶基因抑制肿瘤发生和转移等结果基本一致<sup>[18-20]</sup>。这些结果说明 miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 可能参与了胃癌的发生和发展等过程。

本研究进一步分析了 miR-203a 及其靶基因的表达

达量与胃癌临床病理特征的关系。结果显示,miR-203a、E2F3、ATM 和 SNAI2 的相对表达量与患者性别、年龄和幽门螺杆菌感染均无关( $P>0.05$ ),但都与分化程度和 TNM 分期有显著相关性( $P<0.05$ )。miR-203a 和 E2F3 的表达量与胃癌肿瘤大小显著相关( $P<0.05$ ),miR-203a 和 ATM 的表达量与淋巴结转移显著相关( $P<0.05$ ),ATM 还可能与胃癌 Laurén 分型相关( $P<0.05$ )。按相对表达量分组分析的结果显示,miR-203a 低表达组的术后生存率高,而 E2F3、ATM 和 SNAI2 高表达组的术后生存率高。以上分析表明,miR-203a 及其靶基因在胃癌患者手术前后表达差异显著,且与胃癌的分化程度、TNM 分期、术后生存率等临床病理特征有显著和稳定的相关性。因此,对血浆中 miR-203a 及其靶基因的研究可能有助于胃癌的早期诊断、辅助治疗和患者预后。

## 参考文献

- [1] HUANG S K, WANG J, LI J, et al. Serum microRNA expression profile as a diagnostic panel for gastric cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2016, 46(9): 811-818.
- [2] IMAOKA H, TOIYAMA Y, OKIGAMI M, et al. Circulating microRNA-203 predicts metastases, early recurrence, and poor prognosis in human gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(3): 744-753.
- [3] ZHENG Y, LIU W, GUO L C, et al. The expression level of miR-203 in patients with gastric cancer and its clinical significance [J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(12): 1515-1518.
- [4] 胡俊华, 王琦, 杨艳果, 等. MiR-203 通过 SNAI2 的靶向作用对胃癌细胞 SGC7901 侵袭和凋亡的影响 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2014, 35(6): 857-861, 888.
- [5] 蒋洁, 张静, 苗毅, 等. MicroRNA 203 对胃癌中 EIF5A2 表达的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(22): 3587-3590.
- [6] GAO P, WANG S J, JING F C, et al. microRNA-203 suppresses invasion of gastric cancer cells by targeting ERK1/2/slug/e-cadherin signaling [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 19(1): 11-20.
- [7] ZHOU Y, WAN G, SPIZZO R, et al. miR-203 induces oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells by negatively regulating ATM kinase [J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(1): 83-92.
- [8] 赵珊, 姚德生, 陈军莹, 等. 血清 miR-203 与宫颈临床病理特征的关系 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(8): 972-975.
- [9] GOMES B C, MARTINS M, LOPES P, et al. Prognostic value of microRNA-203a expression in breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(3): 1748-1756.
- [10] 曾玉, 陈辰, 吴畏, 等. 血清 miRNA-21 和 miRNA-203 在上皮性卵巢癌中的表达及诊断价值 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2016, 21(8): 722-726.
- [11] 夏芊, 陈永亮, 张荣强, 等. miR-203 在肝细胞肝癌中的表达及其对肿瘤细胞增殖及侵袭能力的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(25): 4819-4821.
- [12] 张振华, 张伟, 刘伟良, 等. 非小细胞肺癌血清 miR-197 和 miR-203 的表达及意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(19): 3057-3059.
- [13] 郑红, 张文玲, 林波, 等. miR-203 在舌癌组织中的表达及其对 Tca8113 细胞活力和侵袭的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(10): 1896-1899, 1904.
- [14] 尹薇, 刘天宇, 唐毅, 等. miRNA203 在 Barrett 食管和食管癌中的表达及相关性研究 [J]. *西部医学*, 2017, 29(7): 921-926.
- [15] HU G H, LAI P, LIU M, et al. miR-203a regulates proliferation, migration, and apoptosis by targeting glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in human renal cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11443-11453.
- [16] 林焱, 沈洲, 牛三强, 等. 膀胱癌中 miR-203 的表达及其对吉西他滨化疗敏感性的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(1): 71-75.
- [17] 李伟, 吕西香, 王晓燕, 等. 转录因子 E2F3 在胃癌组织中的表达及其预后价值 [J]. *实用医药杂志*, 2017, 34(2): 107-109.
- [18] YANG H Q, WANG L X, TANG X L, et al. miR-203a suppresses cell proliferation by targeting E2F transcription factor 3 in human gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7687-7690.
- [19] ZHOU P, JIANG N, ZHANG G X, et al. MiR-203 inhibits tumor invasion and metastasis in gastric cancer by ATM [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(8): 696-703.
- [20] MA X, LI L, JIA T, et al. miR-203a controls keratinocyte proliferation and differentiation via targeting the stemness-associated factor  $\Delta$ Np63 and establishing a regulatory circuit with SNAI2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(2): 241-249.
- [21] 吴晓斌, 许红英, 徐慧. miR-203a-3p 通过靶向 PRMT5 抑制胃癌细胞增殖 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(14): 2226-2230.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.

(收稿日期: 2019-02-04 修回日期: 2019-05-25)