

血清 miR-92a 表达水平与胃腺癌患者无进展生存期的关系

李秋田¹ 翟弥弥² 焦鑫³ 王玉³ 张力³ 张国友^{3△}

(¹ 潍坊医学院外科学教研室, 潍坊 261053; ² 潍坊医学院第一附属医院(潍坊市人民医院), 潍坊 261031;

³ 潍坊医学院附属医院, 潍坊 261031)

摘要 目的 探讨 miR-92a 在胃腺癌患者血清中的表达情况及其与临床病理特征、患者无进展生存期的关系。方法 对 87 例胃腺癌患者和 78 例健康对照者的血清样本进行实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR), 检测 miR-92a 表达水平, 并分析 miR-92a 表达水平与胃癌临床病理特征以及与胃腺癌患者无进展生存期的关系。结果 胃腺癌患者血清 miR-92a 水平明显高于健康对照组, 差异有统计学意义($t=19.720, P<0.001$); miR-92a 在血清中的表达水平与胃腺癌患者的性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤大小、分化程度无明显关系, 而与胃腺癌的浸润深度、淋巴结转移、远处转移、临床分期等临床病理特征关系密切, 且差异具有统计学意义。Kaplan-Meier 生存分析表明, 胃腺癌患者中血清 miR-92a 高表达组中位无进展生存期(15 个月)低于 miR-92a 低表达组(23 个月), 两组间生存曲线存在统计学差异($\chi^2=9.06, P<0.001$)。血清 miR-92a 高表达组的死亡风险是低表达组的 1.97 倍($HR=1.97, P<0.05$)。结论 血清 miR-92a 在胃腺癌患者血清中表达升高, 与胃腺癌患者无进展生存期密切相关。

关键词 miR-92a; 胃腺癌; 血清; 无进展生存期

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2021)04-084-05

Association between serum miR-92a expression and progression free survival inpatients with gastric adenocarcinoma

Li Qiutian¹, ZHAI Mimi², JIAO Xin³, WANG Yu³, ZHANG Li³, ZHANG Guoyou^{3△}

(¹ Department of Surgery, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

² First Affiliated Hospital of Weifang Medical University (Weifang People's Hospital), Weifang 261031, China;

³ Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261031, China)

Abstract: Objective To study the expression of miR-92a in the serum of patients with gastric adenocarcinoma and its relationship with clinical pathological characteristics and the non-progression survival of patients with gastric adenocarcinoma. **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was carried out on serum samples from 87 patients with gastric adenocarcinoma and 78 healthy controls. The expression level of miR-92a was detected, and the relationship between miR-92a expression level and the clinical pathological characteristics of gastric adenocarcinoma and the non-progressive survival of patients with gastric adenocarcinoma was analyzed. **Results** The expression level of miR-92a in serum of gastric adenocarcinoma patients was significantly higher than that of healthy controls ($t=19.720, P<0.001$). The expression levels of miR-92a were not different in gender, age, tumor location, tumor size and differentiation degree, while were different in the depth of invasion, lymph node metastasis, distant metastasis and clinical stage. Kaplan-Meier survival analysis showed that the median progression free survival (PFS) of gastric adenocarcino-

△[通信作者]张国友, E-mail: ZGUOYOU@126.com

ma patients with high expression of mir-92a (15 months) was lower than that of gastric cancer patients with low expression of mir-92a (23 months), and there was significant difference in the survival curve between the two groups ($\chi^2=9.06, P<0.001$). The risk of death in the high expression group was 1.97 times higher than that in the low expression group ($HR=1.97, P<0.05$). **Conclusion** Serum miR-92a showed elevated expression in the serum of patients with gastric adenocarcinoma, which was closely related to the non-progressive survival of patients with gastric adenocarcinoma.

Keywords: MiR-92a; Gastric adenocarcinoma; Serum; Progressionfree survival

胃癌(gastric carcinoma, GC)是目前位于世界上最常见癌症的第五位,也是导致癌症相关死亡率第三高的原因^[1]。早期胃癌患者常无明显特异性症状,大部分胃癌患者发现时已是进展期或存在远处转移,总体 5 年生存率不足 50%^[2]。

近年来,有证据表明 microRNA(miRNA)在恶性肿瘤中表达失调^[3-4]。miR-92a 在多种恶性肿瘤中如肺、前列腺、直肠和胰腺等肿瘤组织细胞中呈高表达、过度表达,具有致癌作用^[5]。目前关于 miR-92a 在胃腺癌患者血清中的表达水平及其与临床病理特征和预后关系的报道尚少。本研究拟通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测胃腺癌患者血清中 miR-92a 的表达情况,并分析其与胃腺癌患者临床病理特征和生存期的关系,探讨血清 miR-92a 是否有助于胃腺癌预后评价。

1 资料与方法

1.1 一般资料

胃腺癌组:2018 年 5 月—2018 年 10 月在潍坊医学院附属医院就诊的胃腺癌患者作为胃癌组。纳入标准:1)经病理金标准确诊为胃腺癌;2)术前未行任何放化疗。排除标准:1)患有其他肿瘤疾病;2)术前进行过放化疗;3)随访过程中失访,有重要信息缺失。最终纳入 87 例胃腺癌患者,其中男性 47 例,女性 40 例;年龄 31~85 岁,平均年龄(61.1±12.1)岁。健康对照组:选取同一时期在潍坊医学院附属医院行胃镜检查正常的体检者为对照组,纳入标准为不患有胃腺癌及其他肿瘤疾病。最终纳入 78 例健康对照,其中男性 41 例,女性 37 例,年龄 35~82 岁,平均年龄(62.9±11.9)岁。两组间年龄($t=-0.961, P=0.338$)、性别($\chi^2=0.035, P=0.851$)差异无统计学意义。本研究获得医院医学伦理学委员会批准,且研究对象已签署知情同意。

1.2 方法

1.2.1 miR-92a 检测 所有研究对象均于清晨采集空腹外周静脉血 3~4ml 于真空促凝管中,在水浴箱(37℃)中静置 10min,使用常温离心机 3000r/min 离心 10min,收集上层血清约 1ml 到新 EP 管中,置于-80℃冰箱中保存备用。按照总 RNA 抽提试剂(Trizol 试剂)说明书提取总 RNA,用分光光度计测量提取的 RNA 样品的纯度,使其 OD260/OD280 的比值在 1.8~2.1 之间。提取总 RNA 在-80℃的条件下保存,以备后续的实验使用。按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA,反应体系:RNA 引物混合物 13μl, 5×RT Reaction Buffer 4μl, RNaseinhibitor 1μl, dNTP 1μl, M-MLV RTase 1μl, ddH₂O 5μl,将 cDNA 样本置于-20℃环境中保存。miR-92a 正向引物为 5'-AGCTCTACGACTGTCCTCG-3',反向引物为 5'-GTATGCATTCTATCGTAG-3';内参正向引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',内参反向引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。实时荧光定量 PCR 建立实时荧光定量 PCR 扩增反应体系以 U6 为内参基因,反应体系为:2×All-in-one™ qPCR Mix 10μl, cDNA 模板 2μl,正向引物 2μl,反向引物 2μl, 50×Rox Reference Dye0.4μl, ddH₂O (RNase/DNase free) 3.6μl。反应条件为:95℃预变性 10min,1 个循环;95℃变性 15s,60℃退火 30s,72℃延伸 10s,40 个循环。

1.2.2 miR-92a 表达水平判定 采用 2 $\Delta\Delta$ Ct 法计算血清 miR-92a 的表达情况: $\Delta\Delta$ Ct = (Ct_{miR-92a} - Ct_{U6})_{待测样本} - (Ct_{miR-92a} - Ct_{U6})_{对照组}。循环阈值(Cycle threshold, Ct 值)为每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。

1.2.3 随访与观察指标 采用前瞻性研究方法对胃腺癌患者进行随访,以无进展生存期(progres-

sion-free survival, PFS) 作为疗效评价指标。PFS 定义为术后第 1 天起, 未发生复发、原发器官肿瘤转移及其他原因引起死亡的时间。

早期胃癌每 6 个月随访 1 次, 进展期胃癌每 3 个月随访 1 次, 随访起始时间自患者术后第 1 天开始, 通过电话或门诊等方式对患者进行调查, 随访时长为 2 年。随访内容包括患者完整的临床资料、体格检查、血液学检查、体重监测、影像学检查或内镜检查等资料。

1.3 统计学方法

采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析, 数据服从正态分布, 使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用独立样本的 t 检验比较 miR-92a 在血清中表达的组间差异; 用 Kaplan-Meier 生存分析探索血清 miR-92a 表达水平和胃癌患者无进展生存期的关系, Log-rank 检验比较 miR-92a 高表达组与低表达组中位无进展生存期。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 miR-92a 表达水平

胃癌患者血清 miR-92a 相对表达量 (3.378 ± 1.031) 高于健康对照组相对表达量 (1.062 ± 0.117), 差异有统计学意义 ($t = 19.720, P < 0.001$)。

2.2 miR-92a 表达与患者临床病理特征的关系

血清 miR-92a 的表达水平与胃癌患者的性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤大小、分化程度无明显关系, 而与胃癌的浸润深度、淋巴结转移、远处转移临床分期等临床病理特征关系密切, 且差异具有统计学意义。见表 1。

2.3 血清 miR-92a 表达水平和胃癌患者无进展生存期的关系

根据既往研究及参考文献, 以所有胃癌患者血清中 miR-92a 表达量的平均值 3.378 为界限, 将血清 miR-92a 表达量 ≥ 3.378 胃癌患者纳入高表达组, 将血清 miR-92a 表达量 < 3.378 胃癌患者纳入低表达组。miR-92a 高表达组 55 例, 低表达组 32 例。Kaplan-Meier 生存曲线分析血清 miR-92a 表达水平的高低和胃癌患者生存期的相关性, 胃癌患者血清 miR-92a 高表达组中位无进展生存期 (15 个月) 低于 miR-92a 低表达组 (23 个

月)。两组患者的生存曲线存在显著差异 ($\chi^2 = 9.06, P < 0.001$)。见图 1。

表 1 不同特征胃癌患者 miRNA-92a 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	miRNA-92a 相对表达量	t	P
性别				
男	47	3.12±1.02	0.650	0.518
女	40	2.98±0.98		
年龄/岁				
31~	32	2.97±1.01	0.902	0.370
60~	55	2.77±0.99		
肿瘤位置				
贲门	27	2.73±0.75	-1.764	0.081
非贲门	60	3.16±1.16		
肿瘤大小/cm				
0~	35	3.01±1.20	-1.166	0.247
4~	52	3.31±1.27		
分化程度				
高-中分化	51	2.21±0.23	1.143	0.256
低分化	36	2.16±0.15		
浸润深度				
T ₁ , T ₂	28	2.51±0.47	-4.040	<0.001
T ₃ , T ₄	59	3.17±0.80		
淋巴结转移				
有	68	3.21±0.85	2.338	0.022
无	19	2.71±0.72		
远处转移				
有	5	2.15±1.12	-3.893	<0.001
无	82	3.55±0.76		
临床分期				
I, II	30	2.61±0.87	-2.812	0.006
III, IV	57	3.20±0.96		

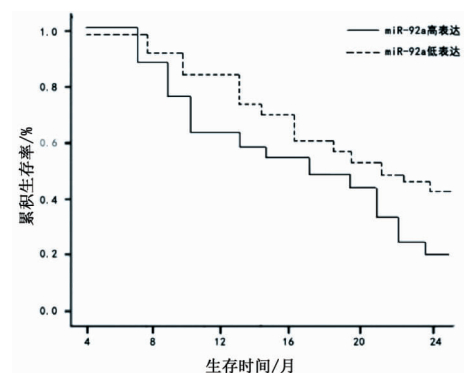


图 1 miR-92a 表达与无进展生存期的关系

2.4 血清 miR-92a 不同表达水平胃癌患者的死亡风险

随访结束时, miR-92a 高表达组死亡 10 例, 生存 45 例, miR-92a 低表达组死亡 3 例, 生存 29 例。

血清 miR-92a 高表达组的死亡风险是低表达组的 1.97 倍($HR = 1.97, P < 0.05$)。

3 讨论

胃癌作为全球第三大癌症死亡原因,早发现、早治疗是降低其死亡率的关键。既往由于缺乏高度敏感和无创性的诊断生物标志物,胃癌的死亡率居高不下。miRNA 功能异常与肿瘤的发生发展密切相关,是肿瘤一个重要发病机制。miRNA 是一类长度约为 20~24 个核苷酸的具有高度物种保守性的内源性非编码小 RNA,miRNA 在细胞早期发育、增殖、分化、死亡以及脂肪代谢等生命进程中起着关键性的作用^[6-9]。在肿瘤的发生发展中表现为癌基因或抑癌基因,通过调控肿瘤细胞的分化、增殖、凋亡和侵袭等调控肿瘤的生物学行为^[4]。因此,miRNA 的出现为胃癌早期筛查提供了更多的可能。miRNAs 可以通过分泌胞外体颗粒从癌细胞释放到体液中,这可以保护它们在循环中不被 RNase 降解。在血清、血浆、尿液、泪液、羊水和胃液中可检测到多种 miRNA^[10-11]。Ueda 等^[12]报告低表达 let-7g、miR-433 和 miR-214 的高表达与低生存率相关,与临床相关变量无关,包括淋巴结转移和分期。Li 等^[13]用实时 PCR 技术分析了 100 例胃癌患者的 7 种 miRNAs 表达谱,结果表明 7 种 miRNAs 可以预测胃癌患者的无复发和总生存率。因此,miRNAs 可用于判断胃癌患者的预后,预测胃癌患者的生存率和复发率。

miR-92a 家族是近年来发现的新型 miRNA,目前研究认为,miR-92a 家族基因与血管内皮细胞形成有关^[14],其表达紊乱与肿瘤的发生发展密切相关。miR-92a 在多种恶性肿瘤中过表达,具有致癌作用。研究发现 miR-92a 在肺、胃、前列腺、直肠和胰腺等肿瘤组织细胞中呈高表达^[5]。Shigoka 等^[15]研究发现 miR-92a 在肝癌细胞中过度表达,但在肝细胞癌周围的非癌性肝细胞中未检测到 miR-92a 表达,其表达程度与患者的年龄、性别、病毒类型、临床分期和肿瘤分化无关。Motawi 等^[16]研究表明,与对照组相比,膀胱癌患者中 miR-92a, miR-100 和 miR-143 的定量表达水平显著降低,且这 3 种 miRNA 的表达水平与年龄、胆道疾病、TNM 分期和等级之间均无相关性。Wu 等^[17]研究表明,

基于粪便的 miRNA 具有良好的稳定性和高度可重复的检测性,与正常对照组相比,结直肠癌患者中的粪便 miR-92a 水平过表达。此外,粪便 miR-92a 水平对远端结直肠癌的敏感性高于近端结直肠癌。切除肿瘤或晚期腺瘤导致粪便 miR-92a 水平降低。Chen^[18]等研究发现食管鳞癌患者癌组织中 miR-92a 的高表达可以促进食管鳞癌患者的淋巴结转移并预示食管鳞癌患者的生存期较短。

为分析 miR-92a 与胃腺癌发生、发展的关系,本研究通过实时荧光定量 PCR 手段检测出胃腺癌患者与健康者中血清 miR-92a 的 Ct 值,发现 miR-92a 在胃腺癌患者血清中表达明显升高。通过研究 miR-RNA 与临床病理特征的关系,结果显示血清 miR-92a 与胃腺癌患者的发病年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、分化程度无统计学意义,而与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移、远处转移和临床分期等临床病理特征密切相关,推测血清 miR-92a 的高表达可能会导致胃肿瘤细胞的侵袭和转移。

Kaplan-Meier 生存分析示血清 miR-92a 高表达组胃腺癌患者无进展生存期短于 miR-92a 低表达组,说明血清 miR-92a 高表达胃腺癌患者预后更差。Log-rank 检验示,两组患者的生存曲线存在显著差异,且血清 miR-92a 高表达组胃腺癌患者的死亡风险更高,是低表达组的 1.97 倍。

综上所述,血清 miR-92a 水平成为胃癌判断预后的标志物之一,尚需进一步开展大样本的纵向研究确定其临床价值。本实验病例数尚少,血清中 miR-92a 浓度低,miRNAs 检测方法的标准化和诊断阈值的确定仍是本次实验的难题,因此应在下一步的研究中扩充样本量,进行标准化检测。此外,miR-92a 在胃癌发生发展中的具体的生物学机制尚不完全清楚,因此在下一步的研究中应寻找 miR-92a 在胃癌的发生和发展中的靶向调控机制,为 miR-92a 作为胃癌的早期诊断及预后评价指标提供理论依据。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424. DOI: 10.

- 3322/caac. 21492.
- [2] 胃癌诊疗规范(2018 年版)[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, (1): 55-82. DOI: 10. 12151/JMCM. 2019. 01-08.
 - [3] Verma HK, Ratre YK, LVKS B, et al. Erythrocyte microRNAs: a tiny magic bullet with great potential for sickle cell disease therapy[J]. Ann Hematol, 2021, 100(3): 607-614. DOI: 10. 1007/s00277-020-04390-y.
 - [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297. DOI: 10. 1016/s0092-8674(04)00045-5.
 - [5] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(7): 2257-2261. DOI: 10. 1073/pnas. 0510565103.
 - [6] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906. DOI: 10. 1038/35002607.
 - [7] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*[J]. Cell, 2003, 113(1): 25-36. DOI: 10. 1016 / s0092-8674(03)00231-9.
 - [8] Xu P, Vernooij SY, Guo M, et al. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism[J]. Curr Biol, 2003, 13(9): 790-795. DOI: 10. 1016/s0960-9822(03)00250-1.
 - [9] Kawasaki H, Taira K. Functional analysis of microRNAs during the retinoic acid-induced neuronal differentiation of human NT2 cells[J]. Nucleic Acids Res Suppl, 2003, (3): 243-244. DOI: 10. 1093/nass/3. 1. 243.
 - [10] 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. DOI: 10. 1038/cr. 2008. 282.
 - [11] Mitchell PS, 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. DOI: 10. 1073/pnas. 0804549105.
 - [12] Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 136-146. DOI: 10. 1016/S1470-2045(09)70343-2.
 - [13] Li X, Zhang Y, Zhang Y, et al. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature[J]. Gut, 2010, 59(5): 579-585. DOI: 10. 1136/gut. 2008. 175497.
 - [14] Santoro MM, Nicoli S. miRNAs in endothelial cell signaling: the endomiRNAs[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(9): 1324-1330. DOI: 10. 1016/j. yexcr. 2012. 12. 009.
 - [15] Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, et al. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development[J]. Pathol Int, 2010, 60(5): 351-357. DOI: 10. 1111/j. 1440-1827. 2010. 02526. x.
 - [16] Motawi TK, Rizk SM, Ibrahim TM, et al. Circulating microRNAs, miR-92a, miR-100 and miR-143, as non-invasive biomarkers for bladder cancer diagnosis[J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(3): 142-148. DOI: 10. 1002/cbf. 3171.
 - [17] Wu CW, Ng SS, Dong YJ, et al. Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps[J]. Gut, 2012, 61(5): 739-745. DOI: 10. 1136/gut. 2011. 239236.
 - [18] Chen ZL, Zhao XH, Wang JW, et al. microRNA-92a promotes lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via E-cadherin[J]. J Biol Chem, 2011, 286(12): 10725-10734. DOI: 10. 1074/jbc. M110. 165654.

(收稿日期 2020-12-29)

(本文编辑:甘慧敏)