

# 胃癌患者血清 miR-20a 的表达及其与临床病理特征的关系

杨瑞瑞<sup>1</sup>, 向梦琴<sup>1</sup>, 周秀田<sup>1</sup>, 扶云<sup>1</sup>, 徐海帆<sup>2</sup>, 陈卓<sup>2</sup>, 游琴<sup>1</sup>, 王佩华<sup>1</sup>, 曾敏<sup>1</sup>, 徐迎晖<sup>1</sup>, 曾希<sup>1\*</sup>  
(1. 南华大学医学院肿瘤研究所, 湖南衡阳 421001; 2. 南华大学附属第一医院肿瘤外科)

**摘要:** **目的** 探讨胃癌初诊患者血清 miR-20a 的表达情况及其与临床病理特征的关系。 **方法** 采集 45 例原发性胃癌初诊患者血清, 应用实时定量 PCR (qRT-PCR), 加入 cel-miR-39 作为数据标准化指标, 检测血清 miR-20a 的表达量。 **结果** 胃癌患者血清中 miR-20a 表达与胃癌分化程度、TNM 分期及淋巴结转移密切相关 ( $P < 0.05$ )。低分化组血清 miR-20a 表达水平明显高于中分化组和高分化组。miR-20a 在 II、III、IV 期患者血清中的表达水平明显高于 I 期, 有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组。miR-20a 的表达与患者的性别、年龄无明显相关性。 **结论** 胃癌患者血清 miR-20a 表达与胃癌分化程度、临床分期及淋巴结转移相关, 可能用于胃癌早期诊断和病情监测。

**关键词:** 胃癌; 血清标志物; miR-20a; 实时定量 PCR

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

## Relationship Between Serum miR-20a Expression and Clinicopathological Features in Gastric Cancer

YANG Ruirui, XIANG Mengqin, ZHOU Xiutian, et al

(Cancer Research Institute, University of Southern China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the relationship between serum miR-20a expression and clinicopathological features in gastric cancer. **Methods** Serum was collected in 45 primary gastric cancer patients who were untreated. Real-time quantitative PCR was adopted to detect the expression of miR-20a in serum using C. elegans miR-39 as an internal reference gene. **Results** In this case, we analyzed the relationship between the serum miR-20a expression level and clinicopathological features. The results showed that expression of miR-20a was related with tumor differentiation, TNM stages and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The expression level of serum miR-20a was significantly higher in poorly differentiated gastric cancer patients than that in moderately differentiated and well differentiated gastric cancer patients. Moreover, miR-20a level was significantly higher in stage II, III and III than stage I, also higher in lymph node metastasis group than those patients without lymph node metastasis. **Conclusion** The expression level of miR-20a is related with tumor differentiation, TNM stages and lymph node metastasis. MiR-20a is a candidate biomarker for detecting and monitoring gastric cancer.

**Key words:** gastric cancer; serum biomarker; miR-20a; qRT-PCR

国际癌症研究机构最新数据显示, 全球每年胃癌新发病例为 10 万例, 占有所有癌症新发病例的 8.9%, 仅次于肺癌、乳腺癌和结、直肠癌。每年因胃癌而死亡的病例为 75 万例, 占癌症相关死亡的 9.7%, 仅次于肺癌。而全球有将近 50% 的胃癌诊断来源于中国, 且胃癌发病年龄逐渐趋于年轻

化<sup>[1]</sup>。因胃癌早期无明显症状, 就诊时 80% 患者已处于中晚期, 治疗效果及预后差, 5 年生存率极低。由于传统的胃镜检查不易普及, 并且部分患者不适宜行该项检查。因此, 寻找新型的非侵入性的且具有较高敏感性和特异性的胃癌早期诊断分子标志物是目前亟待解决的难题。循环 miRNA 作为肿瘤无创诊断分子标志物的研究已成为肿瘤早期诊断研究中一个非常重要的研究方向<sup>[2]</sup>, 近几年来研究者们发现循环 miRNA 在许多肿瘤中扮演着类似癌基因或抑癌基因的角色, 并已表明循环 miRNA 具有成为

新型肿瘤分子标志物的最佳条件<sup>[3-4]</sup>。

研究发现,miR-20a 与人类肿瘤关系密切,在宫颈癌、前列腺癌、卵巢癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中表达显著上调,并和肿瘤的生长、迁移侵袭、浸润及预后相关<sup>[5-8]</sup>。Li 等<sup>[9]</sup>研究发现 miR-20a 在胃癌细胞系和组织中表达均上调,其高表达可以增强胃癌细胞增殖、迁移、侵袭能力。本课题组在之前的研究中建立了一定规模的肿瘤血清样本库,并在不断完善<sup>[10]</sup>。本研究在此基础上,应用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)对胃癌初诊患者血清中 miR-20a 表达情况进行检测,结合患者的临床病理特征,分析 miR-20a 表达水平与胃癌临床病理特征之间的关系,探讨血清 miR-20a 在胃癌诊断和病情监测中的意义。

## 1 材料与方法

**1.1 血液样本的收集及血清总 RNA 的提取** 选择南华大学附属第一医院临床诊断的原发胃癌患者,征得患者同意,在治疗前采集清晨空腹静脉全血 4 mL 至血清采集管中,室温下静置 1 h 后离心(4 ℃,1 200 g,10 min)。为进一步去除细胞碎片,离心后将上层血清移至一个新的 EP 管,再次进行离心(4 ℃,12 000 g,5 min)。然后使用 miRNeasy Serum/Plasma Kit 试剂盒(QIAGEN),按说明书步骤提取血清总 RNA,于 -80 ℃ 保存备用。所有患者经术后病理诊断确诊为原发胃癌。胃癌临床分期采用 AJCC 第七版胃癌 TNM 分期标准<sup>[11]</sup>。

**1.2 逆转录** 以 20 μL 逆转录反应体系,采用 qRT-PCR 逆转录试剂盒 miScript II RT Kit(QIAGEN)转录血清总 RNA 为 cDNA,操作步骤及注意事项严格按照 miScript II RT Kit 试剂盒说明书进行。反应条件为:37 ℃,60 min,充分活化试剂中的逆转录酶,逆转录;95 ℃,5 min,抑制逆转录酶作用。反应结束后将反应体系在冰上放置 5~10 min。然后加入 200 μL 无酶水到逆转录反应体系进行稀释,充分混合。将 cDNA 进行分装,避免反复冻融和污染,-20 ℃ 保存备用。

**1.3 实时荧光定量 PCR** 由于血清 miRNA 的检测尚无公认可靠的内参,本课题采用加入外源性 cel-miR-39 作为内参<sup>[12]</sup>。使用相对定量法来测定 miR-20a 在胃癌患者手术前后的表达差异。miR-20a 引物序列如下,F:5'-UAA AGU GCU UAU AGU

GCA GGU AG-3',R:5'-GCT AAA GTG CTT ATA GTG CAG GT-3'。实时荧光定量 PCR 使用的是 miScript SYBR Green PCR Kit 试剂盒(QIAGEN),总反应体系为 10 μL,其中 2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 为 5 μL,10 × miScript Universal Primer 量为 1 μL,10 × miScript Primer Assay 1 μL,RNase-free water 2 μL,Template cDNA 1 μL。PCR 扩增条件为:95 ℃,15 min;94 ℃,15 s,55 ℃,30 s,70 ℃,30 s,40 个循环,内参及待测 miRNA 分别设 3 个复孔,同时添加溶解曲线,温度从 55~95 ℃,在温度逐渐攀升的过程中对荧光强度的变化进行实时的检测,使用美国 illumina 公司 Eco 荧光定量 PCR 仪检测。

**1.4 数据筛选和统计分析** 采用 Illumina Eco 荧光定量 PCR 系统配套软件对采集的原始荧光数据进行相对定量分析。每一次检测都加入等量外源性 *C. elegans* miR-39(cel-miR-39)作为数据归一化标准。为了使结果更加真实可靠,每一个样本相对应的 miRNA 均进行了三次 PCR 扩增,对所得的三个复孔的 Ct 值取算数平均值即为该 miRNA 扩增的最终 Ct 值,计算出  $\Delta Ct$ ( $\Delta Ct = C_{tmiR-20a} - C_{tcel-miR-39}$ ),根据  $\Delta Ct$  值相对定量,比较分析目的 miR-20a 在不同胃癌患者血清中的表达水平,采用相对表达量(Relative expression)表示<sup>[13]</sup>。

采用 SPSS 18.0 对实验数据进行处理,两组比较采用 *t* 检验,3 组或以上比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 qRT-PCR 检测血清 miR-20a 表达的可靠性分析** 通过 qRT-PCR 检测胃癌初诊患者血清中 miR-20a 的表达。图 1 显示:实时荧光定量 PCR 的扩增曲线标准、平台期前呈指数增长,提示扩增效率理想。溶解曲线存在陡峭变化段、只存在一个溶解峰、无肩峰、且溶解峰在同一位置,提示 miR-20a 引物特异性好、不形成引物二聚体、扩增有高度特异性,能正确地检测胃癌患者血清中 miR-20a 的表达。

**2.2 血清 miR-20a 表达与胃癌临床病理特征的关系** 以胃癌患者血清中 miR-20a 表达值的中位数(median value = 0.135)为临界值将其分为低表达组和高表达组<sup>[13-14]</sup>,miR-20a 的表达值小于 0.135 为低表达,大于等于 0.135 则为高表达。结果显示

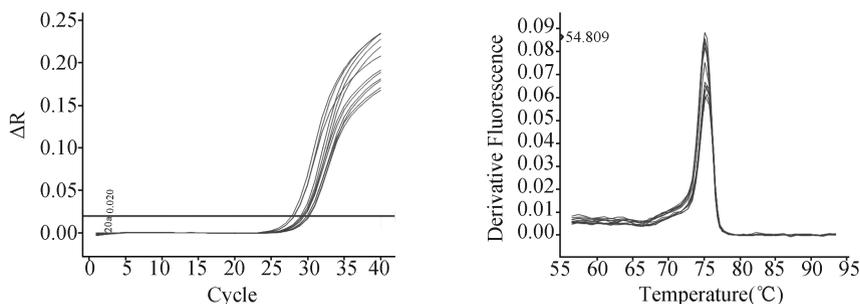


图 1 qRT-PCR 检测 12 例患者血清中 mi-20a 表达的扩增情况。左为扩增曲线,中、右为溶解曲线

miR-20a 在 45 例胃癌患者血清中有 22 例低表达 (48.9%), 23 例高表达 (51.1%)。采用软件分析发现胃癌患者血清 miR-20a 的表达与患者性别、年龄 (60 岁为界)、肿瘤大小 (3 cm 为界) 无明显关系 ( $P > 0.05$ ); 然而, 单因素方差分析显示血清 miR-20a 的表达受肿瘤分化程度和患者临床分期的影响 ( $P < 0.05$ )。此外, 低分化组血清 miR-20a 的表达明显高于中分化组及高分化组 ( $P < 0.05$ ), 并且在临床分期中 II、III、IV 期血清 miR-20a 的表达水平显著高于 I 期 ( $P < 0.05$ ); 同时在有淋巴结转移组的胃癌患者中血清 miR-20a 的表达要明显高于无淋巴结转移组 ( $P < 0.05$ )。以上结果提示, miR-20a 在胃癌血清中表达与其分化程度、临床分期及淋巴结转移相关 (表 1, 图 2)。

表 1 胃癌血清 miR-20a 的表达与其临床病理参数的关系 ( $n = 45$ )

指标	例数	miR-20a		P 值
		低表达	高表达	
性别				0.258
男	27	14	13	
女	18	8	10	
年龄 (岁)				0.322
$\geq 60$	26	12	14	
$< 60$	19	10	9	
分化程度				0.001
低分化	22	8	14	
中分化	14	6	8	
高分化	9	8	1	
临床分期				0.000
I	15	11	4	
II	11	3	8	
III	10	3	7	
IV	9	5	4	
淋巴结转移				0.000
有	26	9	17	
无	19	13	6	
肿瘤大小				0.090
$\geq 3$ cm	27	12	15	
$< 3$ cm	18	10	8	

### 3 讨 论

近年来发现, 血清或血浆中存在 miRNA (循环 miRNA), 这些 miRNA 在复杂的血液环境中能稳定存在, 不被 RNases 降解, 在室温下较长时间放置和反复的冻融后, 其中的 miRNA 量无明显变化, 并且还能耐受酸碱环境<sup>[15]</sup>。此外, 不同健康个体的循环 miRNA 表达总体水平相当一致, 没有明显个体差异, 而疾病能明显影响循环中 miRNA 的表达, 使其具有良好的重复性和可比性<sup>[16]</sup>。由于其极高的理化稳定性和疾病相关性, 血清或血浆 miRNA 作为疾病标志物的研究广泛兴起, 特别是在肿瘤性疾病中。早在 2008 年 Lawrie 等人就发现在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤病人血液循环中 miR-155、miR-210、miR-21 表达明显上调, 并且 miR-21 的表达与患者无复发生存明显相关<sup>[17]</sup>。最近 Antolin 等<sup>[18]</sup> 人用 qRT-PCR 检测了 57 例乳腺癌患者和 20 例健康人群血清, 发现 miR-200c 和 miR-141 在乳腺癌患者血清中表达明显失调, 且与乳腺癌患者预后不良相关, 可以作为判断预后的独立因子。Fang 等<sup>[19]</sup> 研究表明血浆 miR-24、miR-320a、miR-423-5p 在结直肠癌患者循环血中明显下调, 且早期诊断敏感性较高, 可用于结直肠癌患者早期诊断的标志物。综上所述, 这些研究表明循环 miRNA 很有潜力成为肿瘤早期诊断、预后判断或复发监测的分子标志物。

然而, 由于研究时间不长, 循环 miRNA 的研究也存在一些问题。由于目前循环 miRNA 研究无公认可靠的内参, 本研究中采取目前公认的加入外源性内参的方法对数据进行归一化处理。此外, 血清中 miRNA 含量相对组织和细胞中 miRNA 低得多, 而且提取相对困难。本研究采用专为提取血清和血浆中 miRNA 开发的商品化试剂盒提取胃癌患者血清中 miRNA。扩增曲线和溶解曲线证实提取 miRNA 质量理

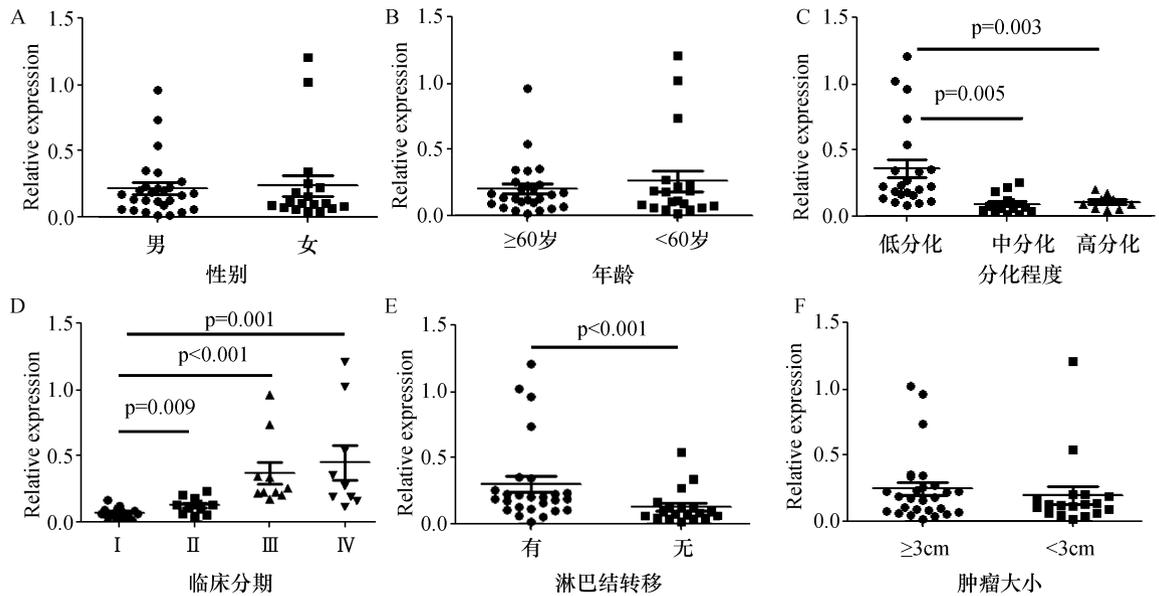


图2 45例胃癌患者血清 miR-20a 在不同分组中的表达分布情况

想,扩增特异性高,结果可靠。

qRT-PCR 是目前检测 miRNA 最理想的方法。本研究采用 qRT-PCR 技术对胃癌患者血清中 miR-20a 进行检测并结合临床病理特征参数进行分析。实验结果显示 miR-20a 的表达与患者的年龄、性别及肿瘤大小无明显相关性,而与胃癌的分化程度、临床分期及淋巴结转移密切相关,提示血清 miR-20a 水平可反映胃癌患者的病情进展情况,可能用于胃癌患者的病情监测。此外,在临床分期中,II、III、IV 期胃癌患者血清 miR-20a 的表达水平显著高于 I 期。Wang 等<sup>[14]</sup>在胃癌患者血浆中的研究也得到了类似的结果。这些研究表明血清 miR-20a 的改变是胃癌发生的早期事件,可能用于胃癌早期诊断,并希望成为胃癌早期诊断的分子标志物。本文为血清 miR-20a 用于胃癌的监测与诊断提供了良好的启示和一定的实验依据,但其效率如何、最终能否应用于临床仍需扩大样本进行进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] Luyimbazi D, Nelson RA, Choi AH, et al. Estimates of conditional survival in gastric cancer reveal a reduction of racial disparities with long-term follow-up[J]. *J Gastrointest Surg*, 2015, 19(2): 251-257.
- [2] El-Abd NE, Fawzy NA, El-Sheikh SM, et al. Circulating miRNA-122, miRNA-199a, and miRNA-16 as biomarkers for early detection of hepatocellular carcinoma in Egyptian

patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. *Mol Diagn Ther*, 2015, 19(4): 213-220.

- [3] de Candia P, Torri A, Pagani M, et al. Serum microRNAs as biomarkers of human lymphocyte activation in health and disease[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 43.
- [4] Allen-Rhoades W, Kurenbekova L, Satterfield L, et al. Cross-species identification of a plasma microRNA signature for detection, therapeutic monitoring, and prognosis in osteosarcoma[J]. *Cancer Med*, 2015, 4(7): 977-988.
- [5] Zhao S, Yao D, Chen J, et al. MiR-20a promotes cervical cancer proliferation and metastasis in vitro and in vivo[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120905.
- [6] Qiang XF, Zhang ZW, Liu Q, et al. miR-20a promotes prostate cancer invasion and migration through targeting ABL2[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(7): 1269-1276.
- [7] Fan X, Liu Y, Jiang J, et al. miR-20a promotes proliferation and invasion by targeting APP in human ovarian cancer cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, 42(5): 318-324.
- [8] Chai H, Liu M, Tian R, et al. miR-20a targets BNIP2 and contributes chemotherapeutic resistance in colorectal adenocarcinoma SW480 and SW620 cell lines[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43(3): 217-225.
- [9] Li X, Zhang Z, Yu M, et al. Involvement of miR-20a in promoting gastric cancer progression by targeting early growth response 2 (EGR2)[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8): 16226-16239.

(上接第 604 页)

- [10] Xiang MQ,Zeng Y,Yang RR,et al. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2014, 454 (1):210-214.
- [11] Washington K. 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Stomach [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17: 3077-3079.
- [12] Cai H,Yuan Y,Hao YF,et al. Plasma microRNAs serve as novel potential biomarkers for early detection of gastric cancer[J]. *Med Oncol*,2013,30(1):452.
- [13] Zeng X,Xiang J,Wu M,et al. Circulating miR-17, miR-20a, miR-29c, and miR-223 combined as non-invasive biomarkers in nasopharyngeal carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012,7(10):e46367.
- [14] Wang M, Gu H, Wang S, et al. Circulating miR-17-5p and miR-20a: molecular markers for gastric cancer[J]. *Mol Med Rep*,2012,5(6):1514-1520.
- [15] Baulande S,Criqui A,Duthieu M. Circulating miRNAs as a new class of biomedical markers [J]. *Med Sci*, 2014,30(3):289-296.
- [16] Ganepola GA,Rutledge JR,Suman P,et al. Novel blood-based microRNA biomarker panel for early diagnosis of pancreatic cancer[J]. *World J Gastrointest Oncol*,2014, 6(1):22-33.
- [17] Lawrie CH,Gal S,Dunlop HM,et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Br J Haematol*,2008,141(5):672-675.
- [18] Antolin S, Calvo L, Blanco-Calvo M, et al. Circulating miR-200c and miR-141 and outcomes in patients with breast cancer[J]. *BMC Cancer*,2015,15:297.
- [19] Fang Z,Tang J,Bai Y,et al. Plasma levels of microRNA-24, microRNA-320a, and microRNA-423-5p are potential biomarkers for colorectal carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2015,34(1):86.

(此文编辑:蒋湘莲)