

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.10.005

文章编号: 1005-8982 (2019) 10-0027-06

## 血清 microRNA-4286 表达与胃癌临床病理特征的关系及其临床意义 \*

郭红艳<sup>1</sup>, 高勇<sup>2</sup>, 张春晶<sup>1</sup>, 李淑艳<sup>1</sup>, 吴琦<sup>1</sup>, 黄常志<sup>3</sup>, 孙晓杰<sup>1</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院 生物化学教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔医学院第三附属医院 检验科, 黑龙江 齐齐哈尔 161002; 3. 中国医学科学院北京协和医学院 肿瘤医院 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**摘要: 目的** 探讨胃癌患者血清 microRNA-4286 (miR-4286) 的表达水平与胃癌临床病理特征的关系, 分析其对胃癌的临床诊断效能及意义。**方法** 通过实时荧光定量聚合酶链反应检测健康体检者 (对照组) 和胃癌患者 (胃癌组) 血清 miR-4286 的表达, 分析 miR-4286 的表达量与胃癌临床病理特征的关系; 通过受试者工作特征曲线和危险分数分析法评估 miR-4286 对胃癌的诊断效能; 通过电化学发光免疫分析法检测血清肿瘤标志物 CEA、CA19-9 和 CA72-4 的表达。**结果** 胃癌组患者血清中 miR-4286 表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ )。miR-4286 的表达水平与胃癌患者的临床分期、淋巴结转移及远处转移等无关 ( $P > 0.05$ ), 与肿瘤细胞分化程度有关 ( $P < 0.05$ )。两组血清中 CEA、CA19-9 表达量比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 胃癌组 CA72-4 表达量较对照组升高 ( $P < 0.05$ )。miR-4286 诊断胃癌的曲线下面积为 0.727, 特异性和阳性预测值分别为 90% 和 0.872, 高于肿瘤标志物 CA72-4。**结论** miR-4286 在胃癌血清中高表达, 其表达水平与病理分化程度有关, 可能成为胃癌临床诊断的潜在指标。

**关键词:** 胃肿瘤; microRNA-4286/microRNAs; ROC 曲线; 癌胚抗原; 抗原, 肿瘤相关, 碳水化合物

**中图分类号:** R735.2; R446.1

**文献标识码:** A

## Correlation between serum miR-4286 expression and clinicopathological characteristics of gastric cancer and its clinical significance\*

Hong-yan Guo<sup>1</sup>, Yong Gao<sup>2</sup>, Chun-jing Zhang<sup>1</sup>, Shu-yan Li<sup>1</sup>, Qi Wu<sup>1</sup>, Chang-zhi Huang<sup>3</sup>, Xiao-jie Sun<sup>1</sup>  
(1. Department of Clinical Biochemistry, Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China;  
2. Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161002, China; 3. State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Center/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the correlation between the expression level of serum miR-4286 and clinicopathological characteristics of gastric cancer, and analyze its efficacy and significance in clinical diagnosis of gastric cancer. **Methods** Real time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of miR-4286 in serum samples of healthy control group and gastric cancer group. The correlation between the expression of miR-4286 and the clinicopathological features of gastric cancer was analyzed by statistical methods; Diagnostic efficacy of miR-4286 for gastric cancer was assessed by receiver operating characteristic curve and risk score analysis; Expression of tumor markers CEA, CA19-9, and CA72-4 were detected by electrochemiluminescence immunoassay. **Results** The

收稿日期: 2018-11-26

\* 基金项目: 齐齐哈尔医学院院内科基金 (No: QY2016M-05)

[通信作者] 孙晓杰, E-mail: 389581415@qq.com; Tel: 0452-2663151

expression of miR-4286 in the serum of gastric cancer group was higher than that in healthy control group ( $Z = -4.644$ ,  $P < 0.0001$ ). The expression level of miR-4286 in gastric cancer group was not related to tumor clinical stage, lymph node metastasis and distant metastasis ( $P > 0.05$ ), but it was negatively correlated with the degree of pathological differentiation of tumor cells ( $Z = -2.661$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the control group, there was no significant difference in the expression of CEA and CA19-9 in the serum of gastric cancer group ( $P > 0.05$ ), but the expression of CA72-4 was increased ( $Z = -3.324$ ,  $P < 0.01$ ). The area under the curve of miR-4286 for diagnosing gastric cancer was 0.727, and its specificity and positive predictive value were 90% and 0.872, respectively, which was higher than that of tumor marker CA72-4. **Conclusions** MiR-4286 is highly expressed in gastric cancer serum, and its expression level is negatively correlated with pathological differentiation. It may be a potential diagnostic marker for gastric cancer.

**Keywords:** gastric neoplasms; microRNA-4286/ microRNAs; ROC curve; carcinoembryonic antigen; antigens, tumor-associated, carbohydrate

胃癌是世界第 3 大癌症死亡原因, 约 50% 胃癌发生在中国, 且年轻患者死亡率呈逐年上升的趋势<sup>[1-2]</sup>。microRNAs (miRNAs) 与人类肿瘤的发生、发展关系密切, 是新型基因诊断标志物<sup>[3-4]</sup>。MicroRNA-4286 (miR-4286) 定位于人类染色体 8p23.1, 在恶性黑色素瘤等肿瘤组织中表达上调<sup>[5-6]</sup>, 但 miR-4286 在胃癌中的表达及其与胃癌发生、发展的关系国内外却未见报道。本文通过实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测胃癌血清样本中 miR-4286 的表达, 分析其与胃癌临床病理特征的关系, 初步探讨其对胃癌的临床诊断效能及意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取 2017 年 3 月—2017 年 6 月在中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院住院的胃癌患者 (胃癌组, 84 例) 和健康体检者 (对照组, 60 例)。其中对照组男性 19 例, 女性 41 例, 平均年龄 ( $48.71 \pm 10.53$ ) 岁; 胃癌组男性 66 例, 女性 18 例, 平均年龄 ( $59.57 \pm 9.28$ ) 岁。胃癌组样本在收集前患者均未进行手术、放疗和化疗等相关治疗。癌症诊断和肿瘤分期根据手术结果, 按照美国癌症联合委员会癌症的 TNM 分期系统第 6 版确定<sup>[7]</sup>。不适合手术治疗的患者, 通过组织活检及影像学检查确定临床诊断和肿瘤分期。本研究经过本院伦理会批准, 所有研究对象签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 血清标本收集** 用血清收集管分别收集 5 ml 胃癌组 and 对照组静脉血, 室温静止 1 h 后,  $4^{\circ}\text{C}$ 、3 500 r/min 离心 10 min。将上层血清转移到新的收集管,  $4^{\circ}\text{C}$ 、16 000 r/min 离心 10 min, 除去细胞碎片,

于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.2 血清总 RNA 提取** 采用 Trizol LS 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 从血清中提取总 RNA, 按照试剂盒说明书进行操作。取 250  $\mu\text{l}$  血清, 加入 750  $\mu\text{l}$  Trizol LS, 室温裂解后分别加入三氯甲烷、异丙醇及 75% 乙醇 (北京化工厂) 等试剂提取总 RNA, 用 10  $\mu\text{l}$  RNase free ddH<sub>2</sub>O (美国 Sigma 公司) 溶解 RNA, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

**1.2.3 qRT-PCR** 将血清总 RNA 采用 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis 和 SYBR qRT-PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 逆转录生成 cDNA。逆转录总反应体系为 10  $\mu\text{l}$ , 包含 5.00  $\mu\text{l}$  mRQ 缓冲液、1.25  $\mu\text{l}$  mRQ 酶、3.75  $\mu\text{l}$  RNA 模板, 逆转录反应条件:  $37^{\circ}\text{C}$ 、60 min,  $85^{\circ}\text{C}$ 、5 min。反应生成的 cDNA 模板 10 倍稀释后进行 qRT-PCR。PCR 反应体系总体积 20  $\mu\text{l}$ , miR-4286 正向引物由美国 Invitrogen 公司合成, 引物序列:  $5' - \text{ACCCCACTCCTGCTACC} - 3'$ , 通用引物和 U6 引物均为试剂盒自带。使用 QuantStudio™ 7 Flex qRT-PCR 仪 (美国 ABI 公司) 进行 PCR 扩增, 反应条件为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10 s,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火及延伸 20 s, 共 40 个循环。每个样品设置 3 个复孔, 以 U6 为内参照基因, 基因相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算。

**1.2.4 肿瘤标志物的检测** 采用全自动电化学发光免疫分析仪 (瑞士罗氏公司) 测定血清样本中肿瘤标志物癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原 19-9 (carbohydrate antigen 19-9, CA19-9) 和糖类抗原 72-4 (carbohydrate antigen 72-4, CA72-4) 的表达量, 检测结果通过查阅临床病例资料获得, 上限值分别为 5.0 ng/ml、39 u/ml 和 8.2 u/ml。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。正态分布的

计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 非正态分布的计量资料用非参数秩和检验 (Mann-Whitney U); 计数资料以率或百分比表示, 用 Fisher 确切概率法; 绘制受试者工作特征曲线 (ROC),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌患者血清 miR-4286 表达升高

qRT-PCR 结果显示, miR-4286 在对照组和胃癌组患者血清中的表达量分别为 ( $1.810 \pm 2.099$ ) 和 ( $4.707 \pm 4.649$ ), 经秩和检验, 差异有统计学意义 ( $Z = -4.644, P = 0.000$ ), 胃癌组平均升高 2.601 倍。见图 1。

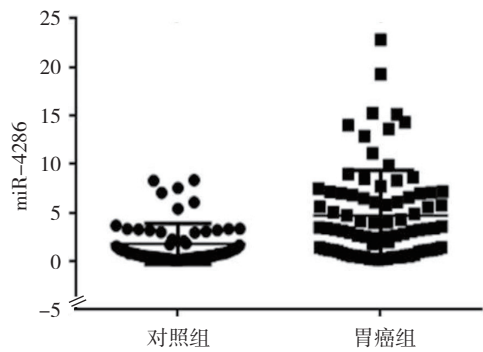


图 1 两组 miR-4286 表达水平比较

2.2 miR-4286 的 ROC 曲线诊断性能

绘制 ROC 曲线, 计算出约登指数, 最大约登指数的对应值即为最佳预测值 (Cut off 值)。经计算确定 Cut off 值为 3.381, 此时曲线下面积 (AUC) 为 0.727 (95%CI: 0.645, 0.810), 敏感性和特异性分别为 48.8% 和 88.3%。以 3.381 为诊断阈值 (即危险分数), 将样本划分为两组, 即高危风险组和低危风险组, 前者代表胃癌患者, 后者健康体检者, 进行危险分数分析, 结果显示血清 miR-4286 诊断胃癌的阳性预测值和阴性预测值分别为 0.872 和 0.557。见表 1 和图 2。

2.3 血清 miR-4286 表达与胃癌临床病理特征的关系

将胃癌组根据性别、年龄、TNM 分期及病理分化程度等进行分类统计。Fisher 确切概率法结果表明, miR-4286 表达水平与肿瘤分化程度相关 ( $P < 0.05$ ), 与性别、年龄、淋巴结转移、远处转移、临床分期无关 (见表 2)。秩和检验结果显

表 1 胃癌患者和健康对照者的危险分数分析

| 组别  | n  | 危险分数   |        | 阳性预测值 | 阴性预测值 |
|-----|----|--------|--------|-------|-------|
|     |    | <3.381 | >3.381 |       |       |
| 对照组 | 60 | 54     | 6      | 0.872 | 0.557 |
| 胃癌组 | 84 | 43     | 41     |       |       |

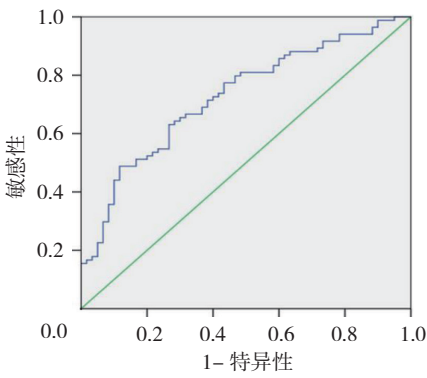


图 2 miR-4286 的 ROC 曲线

表 2 胃癌临床因素与 miR-4286 表达水平的关系 例

| 因素               | n  | miR-4286 |     | P 值   |
|------------------|----|----------|-----|-------|
|                  |    | 低表达      | 高表达 |       |
| 性别               |    |          |     |       |
| 男                | 66 | 33       | 33  | 0.792 |
| 女                | 18 | 10       | 8   |       |
| 年龄               |    |          |     |       |
| <60 岁            | 38 | 21       | 17  | 0.519 |
| ≥ 60 岁           | 46 | 22       | 24  |       |
| 淋巴结转移            |    |          |     |       |
| N <sub>0</sub>   | 30 | 18       | 12  | 0.261 |
| N <sub>1-3</sub> | 54 | 25       | 29  |       |
| 远处转移             |    |          |     |       |
| M <sub>0</sub>   | 77 | 40       | 37  | 0.710 |
| M <sub>1</sub>   | 7  | 3        | 4   |       |
| 临床分期             |    |          |     |       |
| I、II             | 29 | 18       | 11  | 0.173 |
| III、IV           | 55 | 25       | 30  |       |
| 肿瘤分化程度           |    |          |     |       |
| 低分化              | 50 | 20       | 30  | 0.015 |
| 中、高分化            | 34 | 23       | 11  |       |

示,胃癌血清中 miR-4286 的表达量与淋巴结转移与否、远处转移与否及肿瘤临床分期 (I ~ IV) 无关 ( $Z = -1.270$ 、 $-1.432$  和  $-1.218$ ,  $P = 0.204$ 、 $0.152$  和  $0.223$ ), 但其在低分化胃癌患者血清中的表达量高于中、高分化胃癌患者 ( $Z = -2.661$ ,  $P = 0.008$ ) (见图 3)。

## 2.4 肿瘤标志物 CA19-9、CEA 和 CA72-4 在胃癌患者血清中的表达

通过查阅病例,对胃癌组和对照组样本的肿瘤标志物 CA19-9、CEA 和 CA72-4 检测结果进行统计分析。秩和检验结果显示,胃癌血清中 CA72-4 表达量较对照组升高 ( $Z = -3.324$ ,  $P = 0.001$ ); 两组 CA19-9

和 CEA 比较,差异无统计学意义 ( $Z = -1.315$  和  $-1.400$ ,  $P = 0.188$  和  $0.161$ ) (见图 4)。ROC 曲线结果显示,CA19-9、CEA 和 CA72-4 诊断胃癌的 AUC 分别为  $0.574$  (95% CI:  $0.465, 0.683$ )、 $0.579$  (95% CI:  $0.469, 0.689$ ) 和  $0.691$  (95% CI:  $0.587, 0.795$ ) (见图 5)。

## 2.5 miR-4286 与 CA72-4 对胃癌诊断的效能比较

以病理诊断为金标准,将 miR-4286 与肿瘤标志物 CA72-4 对胃癌的诊断效能进行比较,结果显示,miR-4286 诊断胃癌的特异性和阳性预测值高于临床常用肿瘤标志物 CA72-4。见表 3。

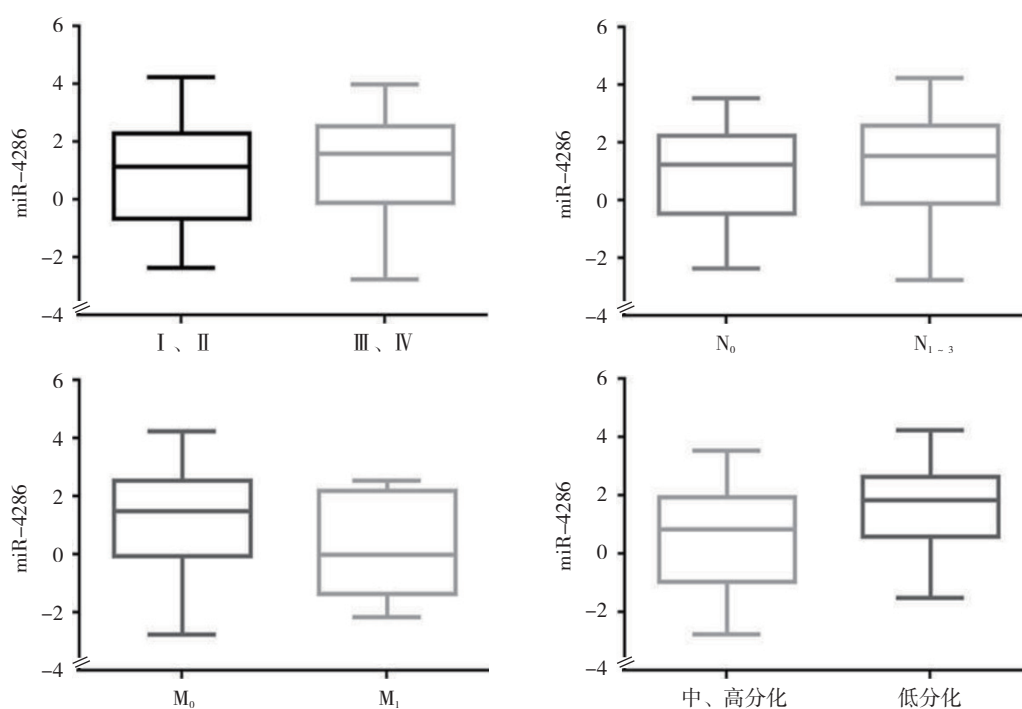


图 3 miR-4286 表达水平与胃癌临床病理特征的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

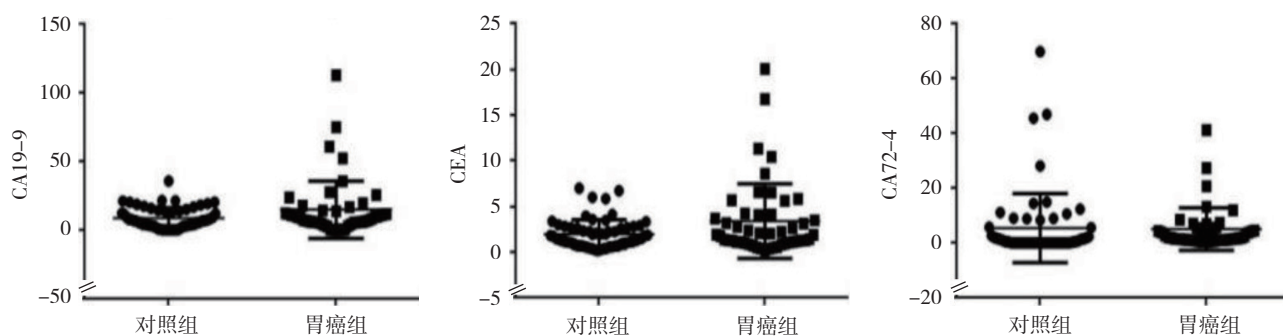


图 4 两组肿瘤标志物的表达水平比较



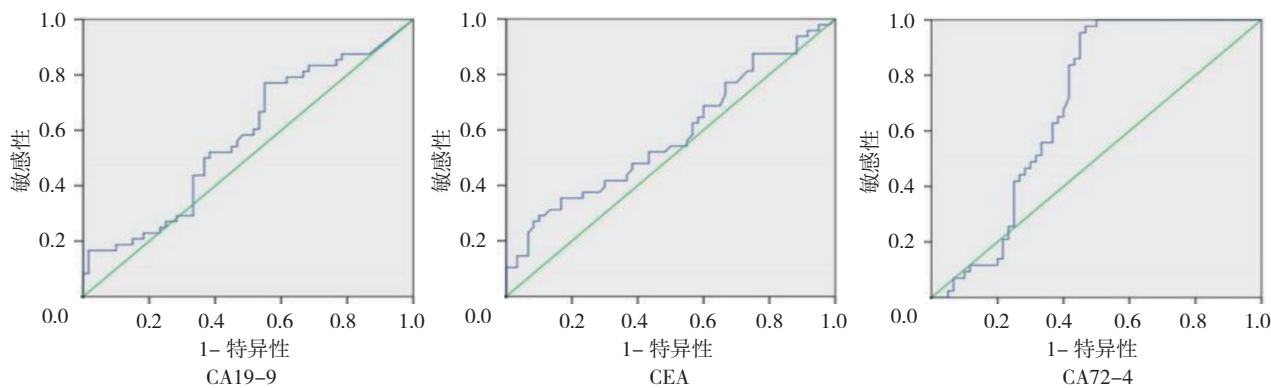


图 5 CA19-9、CEA、CA72-4 的 ROC 曲线

表 3 血清 miR-4286、CA72-4 诊断胃癌的敏感性和特异性比较

| 指标       | 对照组 / 例 | 胃癌组 / 例 | 敏感性 /% | 特异性 /% | 阳性预测值 | 阴性预测值 |
|----------|---------|---------|--------|--------|-------|-------|
| 病理诊断     | 60      | 84      | 100.00 | 100.00 | 1.000 | 1.000 |
| miR-4286 |         |         |        |        |       |       |
| 阳性       | 6       | 41      | 48.81  | 90.00  | 0.872 | 0.557 |
| 阴性       | 54      | 43      |        |        |       |       |
| CA72-4   |         |         |        |        |       |       |
| 阳性       | 13      | 6       | 31.57  | 55.95  | 0.316 | 0.559 |
| 阴性       | 47      | 37      |        |        |       |       |

3 讨论

miRNA 是通过干扰 1 个或多个靶 mRNA 的翻译来调节转录后基因表达的微小非编码 RNA，参与细胞生长、增殖、分化、凋亡和衰老等生理、病理过程<sup>[7]</sup>。miRNA 通过影响癌基因和肿瘤抑制基因的表达成为人类致癌的重要调节因子，其异常调节可能与所有类型癌症的发病机制相关<sup>[8-9]</sup>，其表达水平在胃癌等多种恶性肿瘤中可作为潜在的诊断和预后生物标志物<sup>[10-12]</sup>。

miR-4286 是近年来发现的 miRNAs，其在恶性黑色素瘤及食管癌组织中表达升高，miR-4286 通过靶向 *INPP4A* 基因激活 JAK2/STAT3 信号通路，促进食管癌的发生，与食管癌患者的预后生存期高风险密切相关，有望成为食管癌治疗的靶点<sup>[13-14]</sup>。但 miR-4286 与其他肿瘤发生及诊断预后的关系未见报道。本研究通过 qRT-PCR 实验发现，miR-4286 在胃癌血清中的表达量高于对照组，且其表达水平与肿瘤分化程度相关。笔者据此推测，miR-4286 可能参与胃癌细胞的恶性转化过程，但其发挥作用的分子机制还需进一步实验研究。

目前临床常用的胃肠道肿瘤标志物主要有 CEA、

CA19-9 和 CA72-4，但其对胃癌诊断的敏感性和特异性都不高，如 LIANG 等<sup>[15]</sup>对 2 288 例胃癌患者和 1 869 例对照组进行分析，发现 CEA、CA19-9 和 CA724 独立诊断胃癌的敏感性仅为 20.1% ~ 27.6%，而 3 者联合诊断可将敏感性提高至 48.2%。YU 等<sup>[16]</sup>对 216 例胃癌患者的临床检测结果进行统计，结果 CEA、CA19-9 和 CA72-4 独立诊断的敏感性分别为 22.69%、18.98% 和 22.69%，而 3 者联合诊断的敏感性达 44.91%。GUO 等<sup>[17]</sup>对 1 566 例胃癌患者的临床检测结果进行 ROC 曲线分析，结果 CEA、CA19-9 和 CA724 区分胃癌和健康人的 AUC 分别为 0.582、0.571 和 0.544。本研究发现，CA724 诊断的 AUC 为 0.691，高于文献报道<sup>[17]</sup>，但其独立诊断的敏感性和特异性分别为 31.57% 和 55.95%，作为诊断标志物导致较高的漏诊率；而 miR-4286 诊断胃癌的 AUC 为 0.727，诊断的特异性高达 90%，阳性预测值为 0.872，高于 CA72-4，因此可能具有潜在的临床应用前景。

目前非编码 RNA 的研究正如火如荼，由于循环 miRNAs 反映癌症进展的状态，且其稳定性较好，因此可能是癌症快速检测和治疗的潜在生物标志物<sup>[18]</sup>。本

研究初步探讨 miR-4286 的表达水平与胃癌的关系, 为阐明 miR-4286 的生物学功能奠定了基础, 至于 miR-4286 的表达是否具有组织或器官特异性, 以及其在肿瘤发生、发展中作用的分子机制, 还需更深入的基础研究及大规模的临床样本进行验证。

#### 参 考 文 献:

- [1] NIE Y, WU K, YU J, et al. A global burden of gastric cancer: the major impact of China[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 11(7): 651-661.
- [2] YIN J, SONG J N, BAI Z G, et al. Gastric cancer mortality trends in China (2006-2013) reveal increasing mortality in young subjects[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 4671-4679.
- [3] PRATAP P, RAZA S T, ABBAS S, et al. MicroRNA-associated carcinogenesis in lung carcinoma[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(2): 249-254.
- [4] HU W, TAN C, HE Y, et al. Functional miRNAs in breast cancer drug resistance[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 1529-1541.
- [5] SAND M, SKRYGAN M, SAND D, et al. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi[J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 351(1): 85-98.
- [6] KOMINA A, PALKINA N, AKSENENKO M, et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of miR-4286 inhibition in melanoma cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168229.
- [7] VANNINI I, FANINI F, FABBRI M. Emerging roles of microRNAs in cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2018, 48: 128-133.
- [8] KIAN R, MORADI S, GHORBAN S. Role of components of microRNA machinery in carcinogenesis[J]. *Exp Oncol*, 2018, 40(1): 2-9.
- [9] HOSSEINAH LI N, AGHAPOUR M, DUIJF P H G, et al. Treating cancer with microRNA replacement therapy: a literature review[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8): 5574-5588.
- [10] DING B, GAO X, LI H, et al. A novel microRNA signature predicts survival in stomach adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 28144-28153.
- [11] VIRGILIO E, GIARNIERI E, GIOVAGNOLI M R, et al. Gastric juice micrornas as potential biomarkers for screening gastric cancer: a systematic review[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(2): 613-616.
- [12] WANG J, LIU Y, SUN W, et al. Plasma exosomes as novel biomarker for the early diagnosis of gastric cancer[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21(4): 805-812.
- [13] DRAHOS J, SCHWAMEIS K, ORZOLEK L D, et al. MicroRNA profiles of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: differences in glandular non-native epithelium[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016, 25(3): 429-437.
- [14] ZHAI R, WEI Y, SU L, et al. Whole-miRNome profiling identifies prognostic serum miRNAs in esophageal adenocarcinoma: the influence of Helicobacter pylori infection status[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(1): 87-93.
- [15] LIANG Y, WANG W, FANG C, et al. Clinical significance and diagnostic value of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 49565-49573.
- [16] YU J, ZHANG S, ZHAO B. Differences and correlation of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in gastric cancer[J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 4(3): 441-449.
- [17] GUO J, CHEN S, LI S, et al. A novel classifier based on three preoperative tumor markers predicting the cancer-specific survival of gastric cancer (CEA, CA19-9 and CA72-4)[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(4): 4814-4822.
- [18] SHEKARI N, BARADARAN B, SHANEHBANDI D, et al. Circulating microRNAs: valuable biomarkers for the diagnosis and prognosis of gastric cancer[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(6): 698-714.

(童颖丹 编辑)