

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160638

## 胃癌患者血清 miRNA-223 的表达水平及其诊断价值

刘海宁<sup>△</sup>, 朱新宇<sup>△</sup>, 吴昊, 陈玉琢, 英和娜拉, 刘韬韬\*

复旦大学附属中山医院消化内科, 上海 200032

**[摘要]** 目的:探讨胃癌患者血清中 miRNA-223 的表达水平及其诊断价值。方法:采用实时定量 PCR 法检测 50 例胃癌患者和 50 名健康对照组血清 miRNA-223 的表达量,分析 miRNA-223 与胃癌临床病理参数的关系。构建受试者工作特征(ROC)曲线,比较 miRNA-223 与癌胚抗原(CEA)的诊断效能。结果:胃癌患者血清 miRNA-223 水平高于健康对照组( $P < 0.05$ )。ROC 曲线显示,miRNA-223 诊断胃癌的曲线下面积(AUC)达 0.636(95%CI 0.526~0.746),灵敏度、特异度分别为 48%、82%;miRNA-223 联合 CEA 诊断胃癌的 AUC 达 0.769(95%CI 0.675~0.862),灵敏度、特异度分别为 70%、78%。结论:miRNA-223 联合 CEA 有助于胃癌的诊断。

**[关键词]** 胃癌;miRNA-223;诊断价值

**[中图分类号]** R 735.2 **[文献标志码]** A

### Diagnostic value and expression of serum miRNA-223 in patients with gastric cancer

LIU Hai-ning<sup>△</sup>, ZHU Xin-yu<sup>△</sup>, WU Hao, CHEN Yu-zhuo, Enkhnanan Bilegsaikhan, LIU Tao-tao\*

Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the expression and diagnostic value of miRNA-223 in patients with gastric cancer. **Methods:** The expression of serum miRNA-223 was detected in 50 patients with gastric cancer and 50 healthy controls by using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The relationship of miRNA-223 and clinicopathological parameter of gastric cancer was analyzed. The receiver operating curve (ROC) was constructed and the diagnostic value of miRNA-223 and carcinoembryonic antigen (CEA) was compared. **Results:** The serum miRNA-223 in patients with gastric cancer was significantly higher than control group. The ROC indicated that area under the ROC curve (AUC) of miRNA-223 was 0.636 (95%CI 0.526-0.746) with sensitivity of 48% and specificity of 82% while AUC of combination of miRNA-223 and CEA was 0.769 (95%CI 0.675-0.862) with sensitivity of 70% and specificity of 78%. **Conclusions:** Combining miRNA-223 and CEA can be used to diagnosis gastric cancer.

**[Key Words]** gastric cancer;miRNA-223;diagnostic value

胃癌是全球范围内发病率占第 4 位的恶性肿瘤,在东亚地区的发病率远高于其他地区<sup>[1]</sup>。多数胃癌患者在明确诊断时已为晚期,预后较差。因此,寻找胃癌的早期诊断标志物对于提高其早期诊断率与降低病死率显得尤为重要。微小 RNA (microRNA) 是一类非编码的单链 RNA,包含 20~24 个核苷酸,可精细调控基因的表达。血液中多种 microRNA 可以作为胃癌的早期诊断标志物。miRNA-223 在多种恶性肿瘤中表达增加。本研究通过检测胃癌患者及健康对照血清中 miRNA-223 的表达量,评价其对胃癌的诊断效能。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 7 月—9 月在复旦大学附属中山医院就诊的胃癌患者。所有病例均经病理证实,且均无手术或放化疗史。50 例患者中,男性 33 例,女性 17 例;年龄(64.5±10.0)岁。诊断依据胃镜或手术后病理活检结果。TNM 分期依据国际抗癌联盟第 7 版标准,Ⅰ期 13 例,Ⅱ期 13 例,Ⅲ期 18 例,Ⅳ期 6 例。病理分期以病变仅侵及黏膜及黏膜下层为早期胃癌<sup>[2]</sup>,相当于 T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> 期。本研究中,早期胃癌 12 例,进展期胃癌 38 例。另选择

**[收稿日期]** 2016-05-29 **[接受日期]** 2016-08-01

**[作者简介]** 刘海宁, 博士生. E-mail: lhn0116@126.com; 朱新宇, 主管护师. E-mail: zhu.xinyu@zs-hospital.sh.cn

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors).

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990-2070, E-mail: liu.taotao@zs-hospital.sh.cn

2015年4月在复旦大学附属中山医院体检中心体检的50名健康志愿者作为对照,其中,男性29例,女性21例;年龄( $34.8 \pm 7.2$ )岁;排除肿瘤性疾病。本研究通过医院医学伦理委员会审核,所有患者及健康志愿者均知情同意并填写知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 血清收集及DNA提取** 清晨,空腹条件下,用SST血清分离胶管(BD公司,美国)抽取外周静脉血约3 mL,血清析出后以 $1\ 000 \times g$ 离心,吸取上层血清保存至 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱。秀丽隐杆线虫miRNA-39(ce1-miRNA-39)作为外参,加入100 mL血清中。用miRNA提取分离试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取血清中总RNA。

**1.2.2 miR-223定量检测** 用cDNA第一链合成试剂盒和miRNA荧光定量检测试剂盒进行反转录及实时定量PCR检测[试剂盒及引物均购自天根生化科技(北京)有限公司]。miR-223序列为5'-UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA-3'。实时定量PCR仪购自Applied Biosystems公司(7500型,美国)。

**1.2.3 Ct值的处理** PCR反应结束后,融解曲线显示引物特异性良好。以Applied Biosystems 7500型实时定量PCR仪默认的阈值为标准,可得到目的基因在该样本中扩增的Ct值。所有样品均设3个副孔,取平均Ct值。相对表达量以ce1-miR-39为外参,以 $\log_{10}(2^{-\Delta Ct})$ 方法计算miRNA-223的相对表达量<sup>[3]</sup>。

**1.2.4 血清癌胚抗原(CEA)检测** 全自动化学发光免疫分析仪测定血清标本的CEA浓度。CEA $< 50\text{ ng/L}$ 为正常。

**1.3 统计学处理** 采用Stata 12.0及SPSS 19.0软件进行数据分析。胃癌组与健康对照组的miRNA-223表达量采用成组两样本 $t$ 检验,CEA浓度采用成组两样本Wilcoxon秩和检验。胃癌患者miRNA-223表达量与性别的关系采用成组两样本Wilcoxon秩和检验,与有无淋巴结转移、TNM分期、病理分期的关系采用成组两样本 $t$ 检验,与年龄、肿瘤直径的关系采用Pearson线性相关分析。用受试者工作特征(ROC)曲线及其曲线下面积(AUC)评估miRNA-223及CEA的诊断效能。所有检验均为双侧检验。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

**2.1 两组血清miRNA-223表达水平及CEA浓度的比较** 胃癌组患者血清miRNA-223的表达量为

$3.64 \pm 0.62$ ,健康对照组为 $3.35 \pm 0.54$ ,两组差异有统计学意义( $t = -2.518, P = 0.013$ )。胃癌组血清CEA中位浓度为 $2.2\text{ ng/L}$ ,健康对照组中位浓度为 $1.2\text{ ng/L}$ ,两组差异有统计学意义( $Z = -4.264, P < 0.001$ )。两组miRNA-223的表达水平见图1。

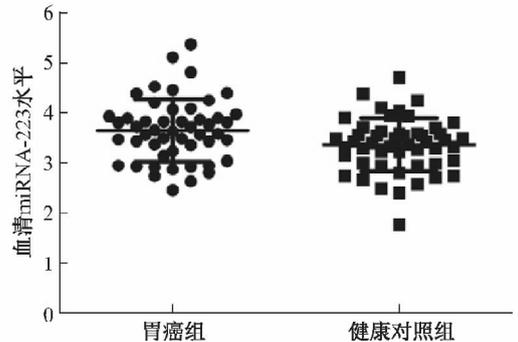


图1 胃癌组及健康对照组血清miRNA-223表达水平

**2.2 胃癌患者血清miRNA-223表达水平与临床病理参数的相关性** 胃癌患者血清miRNA-223表达水平与性别、年龄、肿瘤大小、有无淋巴结转移、TNM分期、病理分期无关(表1)。胃癌患者不同TNM分期的血清miRNA-223表达水平见图2。

表1 胃癌患者miRNA-223的相对表达量与临床病理参数的相关性  $N=50$

临床病理参数	$n$	$t$ 值/ $Z$ 值	$P$ 值
性别		$Z = -0.297$	0.767
男	33		
女	17		
年龄	50	$t = 0.75$	0.458
肿瘤直径	45	$t = -0.92$	0.363
淋巴结转移		$t = 1.480$	0.145
有	27		
无	23		
TNM分期		$t = 1.258$	0.215
I~II期	26		
III~IV期	24		
病理分期		$Z = 1.386$	0.166
早期	12		
进展期	38		

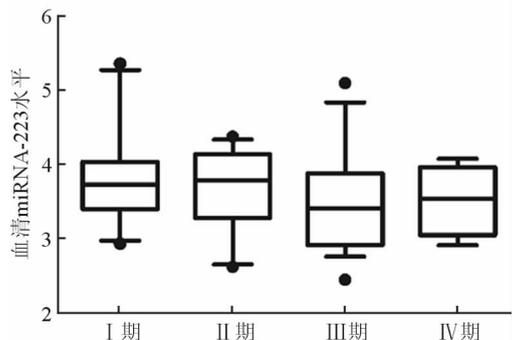


图2 胃癌患者不同TNM分期血清miRNA-223的表达水平

2.3 血清 miRNA-223 的诊断价值 ROC 分析(图3)显示:miRNA-223 诊断胃癌的 AUC 为 0.636 (95%CI 0.526~0.746);当临界阈值为 3.71 时,约登指数最高,诊断胃癌的灵敏度为 48%、特异度为 82%、阳性预测值为 72.7%、阴性预测值为 61.2%。以 CEA<50 ng/L 作为正常参考值,CEA 诊断胃癌的灵敏度为 16%、特异度为 100%。miRNA-223 联合 CEA 诊断胃癌的 AUC 达 0.769 (95% CI 0.675~0.862)。联合诊断的计算式为: $0.719 \times \text{miRNA-223} + 0.874 \times \text{CEA}$ 。当临界阈值为 4.16 时,约登指数最高,两者联合诊断胃癌的灵敏度为 70%、特异度为 78%、阳性预测值为 76.1%、阴性预测值为 72.2%。

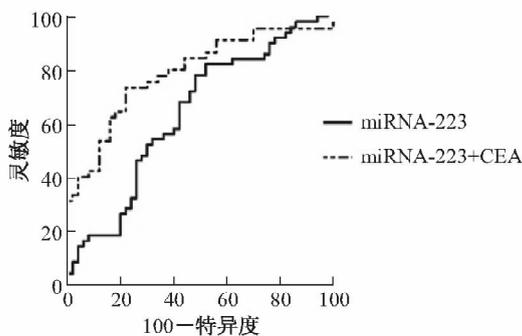


图3 miRNA-223 和(或)CEA 诊断胃癌的 ROC 曲线

### 3 讨论

miRNA-223 在多种恶性肿瘤患者血清中表达量升高,如胃癌<sup>[4]</sup>、结直肠癌<sup>[5]</sup>、肺癌<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>表明,肿瘤相关细胞(如树突状细胞、巨噬细胞、T 细胞)可通过释放含 miRNA-223 的外泌体来调控肿瘤细胞的增殖与侵袭。Zhou 等<sup>[8]</sup>的研究表明,miRNA-223 可通过 F 框/WD-40 域蛋白 7(FBXW7)调控胃癌细胞周期,促进其对顺铂的耐药。

本研究进一步表明,胃癌患者的血清 miRNA-223 表达水平较健康人显著升高,为健康人的 1.95 倍。miRNA-223 表达水平与性别、年龄、肿瘤大小、有无淋巴结转移、TNM 分期、病理分期无关,提示该指标作为分期、化疗后或术后疗效预测、预后标志物有局限性。miRNA-223 作为诊断标志物的曲线下面积为 0.636,诊断效能最高时灵敏度为 48%,特异度为 82%。需要指出,本研究胃癌组与健康对照组年龄有显著差异( $P < 0.001$ ),但 Zhou 等<sup>[8]</sup>的研究与本研究均认为,血清 miRNA-223 表达水平与年龄无关。

CEA 是传统的胃癌诊断标志物,但在多种消化系统恶性肿瘤、肺癌中均可能升高,因此诊断特异度不高,且易受到吸烟、感染等影响。本研究以<50 ng/L 作为 CEA 的正常参考值,CEA 的灵敏度仅为 16%,特异度为 100%。CEA 的特异度与既往研究不符,原因可能在于:由于其他癌症人群比例较健康人群过低而未纳入对照组,且<50 ng/L 为 95%健康人群的取值范围,而本研究仅纳入 50 例健康人为对照。联合 miRNA-223 与 CEA 可使诊断的 ROC 曲线下面积上升至 0.769,诊断效能最高时灵敏度为 70%、特异度为 78%。因此,miRNA-223 联合 CEA 可用于胃癌的诊断,并优于单独应用 miRNA-223 或 CEA。

然而,miRNA-223 及 CEA 水平在多种恶性肿瘤中升高,使其诊断胃癌的特异度降低,因此需先通过影像学检查进行定位诊断。

### 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011,61(2):69-90.
- [2] 吴孟超,吴在德.黄家骅外科学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2008,14:43.
- [3] 陈妍洁. 血浆 microRNA 检测在肝硬化早期诊断中的价值[D]. 上海:复旦大学,2014.
- [4] Juzėnas S, Saltenienė V, Kupcinskis J, et al. Analysis of deregulated microRNAs and their target genes in gastric cancer[J]. PLoS One, 2015,10(7):e132327.
- [5] Zheng G, Du L, Yang X, et al. Serum microRNA panel as biomarkers for early diagnosis of colorectal adenocarcinoma [J]. Br J Cancer, 2014,111(10):1985-1992.
- [6] Nian W, Ao X, Wu Y, et al. miR-223 functions as a potent tumor suppressor of the Lewis lung carcinoma cell line by targeting insulin-like growth factor-1 receptor and cyclin-dependent kinase 2[J]. Oncol Lett, 2013,6(2):359-366.
- [7] Ismail N, Wang Y, Dakhllallah D, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer[J]. Blood, 2013,121(6):984-995.
- [8] Zhou X, Jin W, Jia H, et al. MiR-223 promotes the cisplatin resistance of human gastric cancer cells via regulating cell cycle by targeting FBXW7[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34:28.
- [9] Zhou X, Ji G, Chen H, et al. Clinical role of circulating miR-223 as a novel biomarker in early diagnosis of cancer patients [J]. Int J Clin Exp Med, 2015,8(9):16890-16898.