

- [10] SAGE PT, SCHILDBERG FA, SOBEL RA, et al. Dendritic cell PD-L1 limits autoimmunity and follicular T cell differentiation and function[J]. J Immunol, 2018, 200(8):2592-2602.
- [11] 李欣颖. PD-L1 与 Treg 细胞在肿瘤免疫中的作用及联系[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(2):198-203.
- [12] MCALEES JW, LAJOIE S, DIENGER K, et al. Differential control of CD4(+) T-cell subsets by the PD-1/PD-L1 axis in a mouse model of allergic asthma[J]. Eur J Immunol, 2015, 45(4):1019-1029.
- [13] XI X, LIU JM, GUO JY. Correlation of PD-1/PD-L1 signaling pathway with Treg/Th17 imbalance from asthmatic children [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2018, 176(3/4):255-267.
- [14] 顾颖, 卢慧宇, 林雯. FeNO 在支气管哮喘患者中的应用价值[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(11):2012-2014.
- [15] 刘勇, 刘丹, 柴文成. 桔贝合剂联合氨茶碱对重症哮喘急性发作患者呼吸道纤毛清除功能及 IFN- γ /IL-4、Th1/Th2 的影响[J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(5):580-583.
- [16] 宋小芳, 贾玲, 兰芙蓉. 急性支气管哮喘患儿血清 LTB₄、IL-17 水平和肺功能的变化及意义[J]. 医学临床研究, 2019, 36(6):1084-1086.
- [17] 张宏宇, 张晓刚, 何梅芳, 等. PD-1/PD-L1 在自身免疫性肝炎患者外周血 T 淋巴细胞中的表达及意义[J]. 广东医学, 2016, 37(1):101-103.
- [18] 冯雪, 田庆玲, 张双, 等. 特异性免疫疗法在哮喘患儿中的临床效果及对机体免疫水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(13):3020-3023.
- [19] ŽIVKOVIĆ Z, IVANA Đ, SNEŽANA Ž. Current issues on sublingual allergen-specific immunotherapy in children with asthma and allergic rhinitis[J]. Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo, 2016, 144(5/6):345-350.
- (收稿日期:2020-12-02, 修回日期:2020-12-22)

引用本文:姜孝奎,李振想,孟鑫,等.微小RNA-203 预测胃癌肝转移及预后的临床价值[J].安徽医药,2022,26(10):2009-2012.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.10.024.

◇临床医学◇



微小RNA-203 预测胃癌肝转移及预后的临床价值

姜孝奎,李振想,孟鑫,李韶山

作者单位:新乡医学院第三附属医院普外科,河南 新乡 453000

摘要: **目的** 检测胃癌病人血清中循环微小RNA-203(miR-203)对胃癌肝转移和预后的评估价值。**方法** 收集2015年1月至2017年12月在新乡医学院第三附属医院接受手术治疗的胃癌病人115例,非胃癌病人40例。qRT-PCR检测胃癌病人和非胃癌病人外周血中miR-203的表达水平,并比较胃癌病人不同病理特征组间miR-203的表达水平。logistic单因素和多因素回归分析影响胃癌肝转移的危险因素,Cox单因素和多因素回归分析影响胃癌术后3年死亡的危险因素,受试者工作曲线(ROC)检测外周血中miR-203预测胃癌肝转移和胃癌术后3年死亡的临床价值。**结果** 胃癌病人外周血中miR-203的表达水平为 0.482 ± 0.107 ,低于非胃癌病人外周血中的水平 1.529 ± 0.154 ($t=8.20, P<0.001$)。胃癌病人的区域淋巴结(N)分期、远处转移(M)分期、原发肿瘤区、区域淋巴结、远处转移(TNM)分期、肝转移、腹膜转移和术后3年存活情况与miR-203的表达水平有关($P<0.05$)。N分期、M分期、TNM分期和miR-203为影响胃癌肝转移的独立危险因素。N分期、M分期、TNM分期、肝转移、腹膜转移和miR-203为影响胃癌术后3年内死亡的独立危险因素。外周血中miR-203预测胃癌肝转移的曲线下面积(95%CI)为0.91(0.86,0.92),特异度为81.4%,灵敏度为80.3%,预测胃癌术后3年内病人死亡的曲线下面积(95%CI)为0.85(0.81,0.89),特异度为72.4%,灵敏度为89.3%,均具有一定临床价值。**结论** 胃癌外周血中miR-203水平的降低对肝转移和术后3年死亡具有一定的临床预测价值。

关键词: 胃肿瘤; 肝转移; 循环微小RNA-203; 预后

Clinical value of microRNA-203 in predicting liver metastasis and prognosis of gastric cancer

JIANG Xiaokui, LI Zhenxiang, MENG Xin, LI Shaoshan

Author Affiliation: Department of General Surgery, The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453000, China

Abstract: **Objective** To detect the value of circulating microRNA-203 (miR-203) in the serum of patients with gastric cancer in evaluating liver metastasis and prognosis of gastric cancer. **Methods** A total of 115 gastric cancer patients and 40 non-gastric cancer patients who underwent surgery in The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College from January 2015 to December 2017 were enrolled in the study. The expression levels of miR-203 in peripheral blood of gastric cancer patients and non-gastric cancer

patients were detected by qRT-PCR, and the expression levels of miR-203 in different pathological groups of patients with gastric cancer was compared. Logistic univariate and multivariate regression analysis were used to analyze the risk factors for liver metastasis of gastric cancer, Cox univariate and multivariate regression analysis were used to analyze the risk factors for 3-year postoperative death of gastric cancer, and receiver operating curve (ROC) was used to detect the clinical value of miR-203 in peripheral blood to predict liver metastasis and 3-year postoperative death of gastric cancer. **Results** The expression level of miR-203 in peripheral blood of patients with gastric cancer was 0.482 ± 0.107 , which was lower than the level of 1.529 ± 0.154 in peripheral blood of patients with non-gastric cancer ($t=8.20$, $P<0.001$). The expression of miR-203 was correlated with Lymph node (N) staging, distant metastasis (M) staging, primary tumour area, regional lymph nodes, TNM staging, liver metastasis, peritoneal metastasis and 3-year survival of gastric cancer patients ($P<0.05$). Lymph node (N) staging, distant metastasis (M) staging, TNM staging, and miR-203 were independent risk factors for liver metastasis of gastric cancer. N staging, M staging, TNM staging, liver metastasis, peritoneal metastasis and miR-203 were independent risk factors for death within 3 years after gastric cancer surgery. The area under the curve (95%CI) of miR-203 in peripheral blood for predicting liver metastasis of gastric cancer was 0.91 (0.86, 0.92), the specificity was 81.4%, and the sensitivity was 80.3%. The area under the curve (95%CI) for predicting death within 3 years after operation was 0.85 (0.81, 0.89), the specificity was 72.4%, and the sensitivity was 89.3%. All showed certain clinical values. **Conclusion** The decrease of miR-203 level in peripheral blood of gastric cancer patients has certain clinical predictive value for liver metastasis and death within 3 years after operation.

Key words: Stomach neoplasms; Liver metastasis; Circulating microRNA-203; Prognosis

胃癌(gastric cancer, GC)是一种高发病率和高死亡率的恶性肿瘤,被列为癌症相关死亡的第二大诱因,并在全球造成较大的健康负担^[1]。尽管在GC的治疗上已经取得了较大的进步,但由于频繁复发和远处转移使GC病人的预后仍令人沮丧,肝脏是晚期胃癌血行转移的常见部位^[2-3]。为了克服这些临床问题,显然需要识别早期复发或预后不良的生物标志物^[4]。miR-203对胃癌转移和临床预后的评估价值还未有研究,本研究通过细胞实验证实miR-203为外泌型miRNA,检测病人外周血中miR-203的水平,分析不同病理特征间的表达差异及对胃癌肝转移和术后3年死亡的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2015年1月至2017年12月在新乡医学院第三附属医院接受手术治疗的胃癌病人115例,男74例,女41例,年龄(56.7 ± 11.3)岁,范围为32~75岁。纳入标准:①术后经病理学诊断为胃癌;②原发性胃癌;③术前未经过放化疗。排除标准:①有传染性疾病、自身免疫病或其他肿瘤;②术后未完成放化疗;③失访病人。同时收集健康志愿者40例为非胃癌病人组,男23例,女17例,年龄(54.7 ± 12.6)岁,范围为34~70岁。

1.2 临床资料收集及术后随访 收集病人的一般临床资料,主要包括:性别、年龄、原发肿瘤(T)分期、淋巴结(N)分期、远处转移(M)分期、原发肿瘤、淋巴结、远处转移(TNM)分期、胃癌肝转移、腹膜转移、肿瘤长径、术后3年存活情况。以门诊和电话相结合的方式术后随访,最短随访时间14个月,最长随访时间36个月。

1.3 qRT-PCR检测外周血中miR-203的表达水平

收集病人外周血5 mL,以3 000 r/min的速度离心15 min,留取上清放置-80℃冰箱中待用。TRIzol法提取细胞总RNA,使用miRNA分离试剂盒从血清和培养基样品中提取miRNA,经紫外分光光度计鉴定,OD260/OD280为1.8~2.0时视为合格品,将提取的总RNA逆转录为cDNA。逆转录条件:40℃、40 min, 30℃、10 min。以cDNA为模板。引物序列:miR-203正向引物序列为5'-CTTGC-TACTTCATTCAACCAC-3'、反向引物序列为5'-AGTTTGACGTTAGTCCAA-3', U6正向引物序列为5'-CTGCGTAATCCTCTGCCTAT-3'、反向引物序列为5'-GTCCCACCGTGTGGTAACCG-3'。PCR反应体系共25 μL: 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 模板DNA 1 μL, 上下游引物各1 μL, 双蒸水9.5 μL。反应条件:95℃、20 s, 95℃、10 s, 60℃、20 s共40个循环,最后70℃、10 s。反应结束,统计每样本循环阈值(CT)。以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-203相对表达量。实验重复3次,取平均值。

1.4 统计学方法 采用SPSS 21.0软件,计量资料行正态性检测,符合正态分布的资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用SNK- q 检验的方法,计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,单因素和多因素logistic回归分析和Cox回归分析检测影响胃癌肝转移和胃癌术后3年内死亡的危险因素,ROC分析miR-203对胃癌肝转移和胃癌术后3年内死亡的预测价值。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌病人外周血中 miR-203 的表达水平与病人临床病例特征的关系 胃癌病人外周血中 miR-203 的表达水平为 0.482 ± 0.107 , 低于非胃癌病人外周血中的水平 1.529 ± 0.154 ($t=8.20, P<0.001$)。胃癌病人的 N 分期、M 分期、TNM 分期、肝转移、腹膜转移、术后 3 年存活情况与 miR-203 的表达水平有关 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 胃癌 115 例外周血中 miR-203 的表达水平与临床病例特征的关系 $\bar{x} \pm s$

病例特征	例数	miR-203 水平	t 值	P 值
年龄			1.95	0.098
<60 岁	60	0.504 ± 0.185		
≥60 岁	55	0.402 ± 0.143		
性别			1.02	0.132
男	74	0.471 ± 0.114		
女	41	0.435 ± 0.107		
T 分期			0.95	0.541
T1/T2	37	0.481 ± 0.154		
T3/T4	78	0.425 ± 0.130		
N 分期			5.30	<0.001
N0	67	0.691 ± 0.251		
N1/N2/N3	48	0.215 ± 0.117		
M 分期			5.02	<0.001
M0	84	0.652 ± 0.273		
M1	31	0.254 ± 0.105		
TNM 分期			6.34	<0.001
I ~ II	58	0.745 ± 0.214		
III ~ IV	57	0.235 ± 0.084		
肝转移			6.32	<0.001
阴性	90	0.705 ± 0.087		
阳性	25	0.201 ± 0.207		
腹膜转移			6.82	<0.001
阴性	103	0.734 ± 0.063		
阳性	12	0.172 ± 0.102		
肿瘤长径			1.35	0.105
<3 cm	81	0.487 ± 0.124		
≥3 cm	34	0.419 ± 0.082		
术后 3 年存活情况			4.32	<0.001
存活	93	0.594 ± 0.110		
死亡	22	0.312 ± 0.104		

2.2 logistic 回归分析影响胃癌肝转移的因素 以胃癌是否发生肝转移为自变量, 将表 1 中的因素和 miR-203 水平代入 logistic 单因素回归模型中, 结果显示 T 分期、N 分期、M 分期、TNM 分期和 miR-203 对胃癌肝转移有影响, 将对胃癌肝转移有影响的因素代入 logistic 多因素回归模型中, 结果显示 N 分期、M 分期、TNM 分期和 miR-203 为影响胃癌术后肝转移的独立危险因素, 见表 2。

表 2 胃癌 115 例术后肝转移单因素和多因素 logistic 回归分析

特征	单因素			多因素		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
年龄	0.74	(0.62, 1.03)	0.324	—	—	—
性别	0.85	(0.81, 1.04)	0.365	—	—	—
T 分期	1.65	(1.24, 2.10)	0.021	1.03	(0.91, 1.20)	0.105
N 分期	10.20	(6.30, 22.01)	<0.001	5.62	(3.20, 8.20)	<0.001
M 分期	12.63	(8.20, 32.05)	<0.001	8.32	(5.20, 15.30)	<0.001
TNM 分期	20.32	(15.20, 30.63)	<0.001	10.20	(8.41, 15.36)	<0.001
肿瘤长径	0.95	(0.90, 1.02)	0.225	—	—	—
miR-203	12.52	(6.35, 19.20)	<0.001	10.32	(8.65, 13.20)	<0.001

注: “—”为单因素分析无意义, 未进行多因素分析。

2.3 Cox 回归分析影响胃癌术后 3 年死亡的因素 以胃癌术后 3 年内是否死亡为自变量, 将表 1 中的因素和 miR-203 水平代入 Cox 单因素回归模型中, 结果显示 N 分期、M 分期、TNM 分期、肝转移、腹膜转移和 miR-203 对胃癌术后 3 年内死亡有影响, 将对胃癌术后 3 年内死亡有影响的因素代入 Cox 多因素回归模型中, 结果显示 N 分期、M 分期、TNM 分期、肝转移、腹膜转移和 miR-203 为影响胃癌术后 3 年内死亡的独立危险因素, 见表 3。

表 3 胃癌 115 例术后 3 年死亡单因素和多因素 Cox 回归分析

特征	单因素			多因素		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
年龄	0.84	(0.54, 1.12)	0.714	—	—	—
性别	0.79	(0.50, 1.04)	0.754	—	—	—
T 分期	0.93	(0.90, 1.02)	0.526	—	—	—
N 分期	3.25	(1.02, 5.32)	0.008	2.95	(2.04, 4.32)	0.024
M 分期	5.36	(3.21, 8.32)	<0.001	3.03	(2.15, 6.32)	<0.001
TNM 分期	6.32	(4.20, 10.32)	<0.001	4.02	(3.01, 6.32)	<0.001
肝转移	10.30	(5.63, 18.20)	<0.001	7.01	(5.20, 9.20)	<0.001
腹膜转移	8.62	(5.36, 14.20)	<0.001	6.32	(5.02, 10.50)	<0.001
miR-203	13.21	(7.50, 17.20)	<0.001	8.20	(6.32, 10.20)	<0.001

注: “—”为单因素分析无意义, 未进行多因素分析。

2.4 外周血中 miR-203 预测胃癌肝转移、胃癌术后预后不良的临床价值 外周血中 miR-203 预测胃癌术后肝转移的曲线下面积 (95%CI) 为 0.91 (0.86, 0.92), 特异度为 81.4%, 灵敏度为 80.3%。预测胃癌术后 3 年内病人死亡的曲线下面积 (95%CI) 为 0.85 (0.81, 0.89), 特异度为 72.4%, 灵敏度为 89.3%。

3 讨论

胃癌是一种致命的恶性肿瘤, 临床治疗面临巨大挑战^[5-6]。尽管人们对遗传和表观遗传学的癌症事件的了解越来越多, 但缺乏早期评估 GC 转移和预后的非侵入性方法或生物标记物。非编码 RNA 特别是 miRNA 进入“癌症领域”已有 10 多年的历史, miRNA 是内源性的小非编码 RNA 分子, 长度为

19-22个核苷酸^[7]。超过50%的人类miRNA位于脆弱位点,这些位点与癌症的发生和发展有关^[8-9]。多项研究显示,胃癌组织中多种miRNA表达失调,更重要的是有些可以在体循环中被检测到。循环系统中miRNA水平的改变可能与GC病人的生理和病理改变直接相关^[10-12]。

MiR-203是公认的抑癌基因,也是启动子甲基化过度的靶标,已被证实可以抑制多种肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移和肿瘤血管生成^[13-15]。尽管miR-203在GC中已有报道,对miR-203的上皮间质转化和侵袭有影响,但未有研究探讨其作为血清生物标志物的可行性^[16]。本研究外周血中miR-203表达水平与N分期、M分期、TNM分期、肝转移、腹膜转移、术后3年存活情况有关,此结果与以往的研究结果有相似之处^[17-18]。本研究显示在肝转移、淋巴结转移、腹膜转移和远处转移的病人血清miR-203水平均较低,说明miR-203水平降低有利于转移。MiR-203发挥肿瘤抑制作用^[19-20],可能在GC细胞中被下调,因此GC细胞不能在细胞外环境中产生足量的miR-203,导致其在外周血中的水平降低。以上结果表明,发生肝转移和胃癌术后3年内死亡的病人外周血中可检测到低水平的miR-203,临床对外周血中miR-203监测,对预测GC转移和术后的存活可能具有一定的临床价值。同时回归分析显示,miR-203为胃癌肝转移和胃癌术后3年内死亡的独立危险因素,miR-203对胃癌肝转移和胃癌术后3年内死亡具有一定的预测价值。

综上所述,miR-203在胃癌外周血中的表达水平降低对胃癌肝转移和胃癌术后3年内死亡具有一定的预测价值。

参考文献

- [1] VAN CUTSEM E, SAGAERT X, TOPAL B, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2016, 388: 2654-2664.
- [2] RIIHIMAKI M, HEMMINKI A, SUNDQUIST K, et al. Metastatic spread in patients with gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (32): 52307-52316.
- [3] KAKAHARA K, MAKINO H, KAMETAKA H, et al. Outcomes of surgical resection for gastric cancer liver metastases: a retrospective analysis [J]. *World J Surg Oncol*, 2020, 18(1): 41.
- [4] JIANG H, YU D, YANG P, et al. Revealing the transcriptional heterogeneity of organ-specific metastasis in human gastric cancer using single-cell RNA Sequencing [J/OL]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(2): e730. DOI: 10.1002/ctm.2.730.
- [5] TAN ZY. Recent advances in the surgical treatment of advanced gastric cancer: a review [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 3537-3541.
- [6] SMYTH EC, NILSSON M, GRABSCH HI, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.
- [7] CHEN L, HEIKKINEN L, WANG C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(5): 1836-1852.
- [8] QADIR MI, FAHEEM A. miRNA: a diagnostic and therapeutic tool for pancreatic cancer [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2017, 27(3): 197-204.
- [9] HE B, ZHAO Z, CAI Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2628-2647.
- [10] LINK A, KUPCINSKAS J. MicroRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer: current insights and future perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(30): 3313-3329.
- [11] CARRERAS-BADOSA G, BONMATI A, ORTEGA FJ, et al. Altered circulating miRNA expression profile in pregestational and gestational obesity [J/OL]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100 (11): e1446-e1456. DOI: 10.1210/jc.2015-2872.
- [12] CHEN J, WU L, SUN Y, et al. Diagnostic value and clinical significance of circulating miR-650 and CA211 in detecting of gastric carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5): 254.
- [13] DIAO Y, GUO X, JIANG L, et al. miR-203, a tumor suppressor frequently downregulated by promoter hypermethylation in rhabdomyosarcoma [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(1): 529-539.
- [14] ZHU XY, ER K, MAO C, et al. miR-203 suppresses tumor growth and angiogenesis by targeting VEGFA in cervical cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(1): 64-73.
- [15] LI J, ZHANG B, CUI J, LIANG Z, et al. MiR-203 inhibits the invasion and EMT of gastric cancer cells by directly targeting annexin A4 [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(7): 789-799.
- [16] HUR K, TOIYAMA Y, OKUGAWA Y, et al. Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer [J]. *Gut*, 2017, 66(4): 654-665.
- [17] IMOKA 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.
- [18] TAKANO Y, MASUDA T, IINUMA H, et al. Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45): 78598-78613.
- [19] DAI Y, ZANG Y, LI J, et al. miR-181a and miR-203 inhibit migration and invasion of laryngeal carcinoma cells by interacting with ATF2 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(1): 133-141.
- [20] ZHU X, ER K, MAO C, et al. miR-203 suppresses tumor growth and angiogenesis by targeting VEGFA in cervical cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(1): 64-73.

(收稿日期: 2021-07-29, 修回日期: 2022-06-21)