

DOI: 10.3969/j.issn.1007-1989.2020.09.003

文章编号: 1007-1989 (2020) 09-0011-08

论 著

## miR-93 表达与内镜黏膜下剥离术治疗老年早期胃癌 预后的关系及其靶向抑癌基因的生物信息学分析\*

杨洁, 彭志红, 吴宏博

[陆军军医大学第一附属医院 (重庆西南医院) 消化内科, 重庆 400038]

**摘要: 目的** 研究 miR-93 表达与内镜黏膜下剥离术 (ESD) 治疗老年早期胃癌预后的关系, 利用生物信息学分析 miR-93 的靶向抑癌基因。**方法** 选择 2015 年 1 月—2017 年 12 月在该院接受 ESD 的老年胃癌患者, 收集早期胃癌组织并检测 miR-93、PTEN 和 TIMP2 的表达量, 随访术后复发情况; 另取同期经病理证实为正常胃黏膜的组织作为对照, 检测 miR-93、PTEN 和 TIMP2 的表达量。**结果** 早期胃癌组织中 miR-93 的表达量高于正常胃黏膜组织, PTEN 和 TIMP2 的表达量低于正常胃黏膜组织 ( $P < 0.05$ ), 且 miR-93 的表达量与 PTEN 和 TIMP2 的表达量呈负相关,  $T_2$  期、低分化和未分化、黏膜下浸润、发生复发的早期胃癌组织中 miR-93 的表达量高于  $T_1$  期、中分化和高分化、黏膜内浸润、未复发的早期胃癌组织, PTEN、TIMP2 的表达量明显低于  $T_1$  期、中分化和高分化、黏膜内浸润、未复发的早期胃癌组织 ( $P < 0.05$ ); 黏膜下浸润、miR-93 表达增多、PTEN 及 TIMP2 表达减少是早期胃癌患者术后复发的危险因素; miR-93 高表达的早期胃癌患者未复发率低于 miR-93 低表达患者; miR-93 预测早期胃癌复发的最佳截点为 0.72。**结论** miR-93 表达是早期胃癌患者 ESD 后复发的危险因素, 对术后复发具有预测价值, 靶向抑癌基因 PTEN、TIMP2 是其可能的生物学作用。

**关键词:** 早期胃癌; 内镜黏膜下剥离术; miR-93; PTEN; TIMP2

**中图分类号:** R735.2

## Relationship between the expression of miR-93 and the prognosis of endoscopic submucosal dissection in the treatment of elderly early gastric cancer and the bioinformatics analysis of its targeted tumor suppressor genes\*

Jie Yang, Zhi-hong Peng, Hong-bo Wu

[Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated to Army Medical University  
(Southwest Hospital), Chongqing 400038, China]

**Abstract: Objective** To study the relationship between the expression of miR-93 and the prognosis of endoscopic submucosal dissection in the treatment of elderly early gastric cancer and analyze its targeted tumor suppressor genes by bioinformatics. **Methods** The elderly patients with early gastric cancer who underwent endoscopic submucosal dissection from January 2015 to December 2017 were selected, the expression of miR-93, PTEN, TIMP2 were determined in early gastric cancer tissues, postoperative recurrence was followed-up; Meanwhile, the normal gastric mucosa tissues confirmed by pathology at the same time were taken as the control

收稿日期: 2020-02-18

\* 基金项目: 国家重点研发计划课题 (No: 2017YFC0112305)

[通信作者] 吴宏博, E-mail: tira26@foxmail.com; Tel: 13752976768

and the expression of miR-93, PTEN, TIMP2 were detected. **Results** The expression of miR-93 in early gastric cancer tissue was higher than that in normal gastric mucosa tissue, the expression of PTEN and TIMP2 was lower than that in normal gastric mucosa ( $P < 0.05$ ) and the expression of miR-93 was negatively correlated with the expression of PTEN and TIMP2, the expression of miR-93 in early gastric cancer with T<sub>2</sub> stage, low differentiation and undifferentiation, submucosal infiltration, recurrence was higher than that in early gastric cancer with T<sub>1</sub> stage, medium differentiation and high differentiation, intramucosal infiltration and non recurrence, the expression of PTEN and TIMP2 was lower than those in early gastric cancer with T<sub>1</sub> stage, medium differentiation and high differentiation, intramucosal infiltration and non recurrence ( $P < 0.05$ ); Submucosal infiltration, increased expression of miR-93, decreased expression of PTEN and TIMP2 were risk factors for postoperative recurrence of early gastric cancer; the unrecurring rate of early gastric cancer with high expression of miR-93 was lower than that with low expression of miR-93; the best cut-off point for miR-93 to predict the recurrence of early gastric cancer was 0.72. **Conclusion** The expression of miR-93 is a risk factor for the recurrence of early gastric cancer patients after endoscopic submucosal dissection and has a predictive value for the recurrence. Targeting tumor suppressor genes PTEN and TIMP2 is a possible biological role.

**Keywords:** early gastric cancer; endoscopic submucosal dissection; miR-93; PTEN; TIMP2

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一，随着胃镜检查的普及，早期胃癌的检出率有所提高，在胃癌局限于黏膜或黏膜下层的早期阶段进行治疗，能够明显改善预后，5年生存率可超过90.0%。内镜黏膜下剥离术（endoscopic submucosal dissection, ESD）是近年发展起来的治疗手段，可以一次性大块、完整的切除直径2 cm以上的黏膜病变，用于早期胃癌的治疗能取得组织学治愈性切除，远期疗效理想<sup>[1]</sup>。也有研究<sup>[2]</sup>报道，ESD治疗早期胃癌后仍有3.2%的患者存在术后复发的可能；国内刘黎等<sup>[3]</sup>的临床研究显示，胃癌浸润深度是早期胃癌术后复发的独立危险因素。因此，对可能复发的高危人群进行早期预警，并给予相应的辅助治疗或靶向治疗，对改善预后、降低复发率具有积极价值。

微小RNA（micro RNAs, miRs）是在转录后水平调节基因表达的非编码小分子RNA，具有广泛的生物学效应，与多种恶性肿瘤的发生有着密切关系。相关临床研究<sup>[4]</sup>证实，miR-21、miR-25、miR-93和miR-106b在胃癌组织中表达增多，其中miR-93是具有促癌作用的miR；有细胞研究<sup>[5-6]</sup>证实，miR-93能够靶向胃癌细胞中的抑癌基因PTEN和TIMP2，并发挥促癌作用，与其在早期胃癌中高表达的趋势相吻合。但早期胃癌中高表达的miR-93是否对术后复发具有预测价值仍未明确。本研究选取接受ESD的老年早期胃癌患者作为研究对象，分析miR-93表达与预后的关系，并利用生物信息

学初步探究miR-93的靶向抑癌基因。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2015年1月—2017年12月本院确诊为早期胃癌的老年患者268例。其中，男139例，女129例，年龄61~70岁，平均（62.82±12.95）岁。另取同期在本院接受内镜下胃黏膜活检、经病理证实为正常胃黏膜、且一般资料匹配的受试者95例作为对照组。其中，男55例，女40例，年龄60~67岁，平均（63.34±12.19）岁。早期胃癌患者和正常胃黏膜受试者一般资料比较，差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），具有可比性。纳入标准：①接受ESD治疗；②术后病理学检查诊断为胃癌；③TNM分期为T<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>期；④年龄≥60岁；临床病理资料完整；⑤随访资料完整。排除标准：①术前接受过放疗；②术后接受放疗；③既往有其他恶性肿瘤病史；④随访过程中发生失访。

### 1.2 试剂及仪器

miRNA提取分离试剂盒、miRNA cDNA第一链合成试剂盒、miRNA荧光定量检测试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司，RIPA裂解液购自上海碧云天公司，兔单克隆PTEN和TIMP2一抗购自Abcam公司。荧光定量PCR仪为Bio-Rad公司，凝胶成像仪为上海勤翔科学仪器公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 荧光定量PCR检测miR-93的表达** 取早期胃癌组织和正常胃黏膜组织,使用miRNA提取分离试剂盒提取组织样本中的miRNA。使用miRNA cDNA第一链合成试剂盒配置反转录体系,将miR反转录为cDNA;miRNA荧光定量检测试剂盒配置荧光定量PCR体系:cDNA 2 μL、混合液10.0 μL、10 μmol/L上游引物0.6 μL、10 μmol/L通用下游引物0.6 μL、去离子水6.8 μL,在PCR仪上按照95℃预变性,3 min后按95℃ 5 s、60℃ 15 s的程序反应40个循环,根据循环曲线计算miR-93的表达量。

**1.3.2 Western blot检测PTEN和TIMP2的表达** 取早期胃癌组织和正常胃黏膜组织,加入RIPA裂解液后充分研磨、提取蛋白,测定蛋白含量后,取30 μg蛋白样本进行Western blot检测,将蛋白样本加入SDS-PAGE,电泳后电转移至NC膜,5%脱脂牛奶在室温下封闭NC膜1 h,1:1 000稀释的PTEN和TIMP2单克隆抗体4℃孵育NC膜过夜;第2天以1:1 000稀释的HRP二抗孵育NC膜1 h,最后在凝胶成像仪中显影得到蛋白条带,根据条带的灰度值计算PTEN和TIMP2的表达量。

### 1.4 术后随访

所有早期胃癌患者在术后3个月内每个月复查1次,术后3~12个月则每3个月复查1次,1年后每6个月复查1次,复查项目包括血常规、生化和胃镜等。随访截止日期2019年10月31日,记录患者的复发情况。

### 1.5 生物信息学分析

在Targetscan网站上进行miR-93靶向PTEN、TIMP2的生物信息学分析。

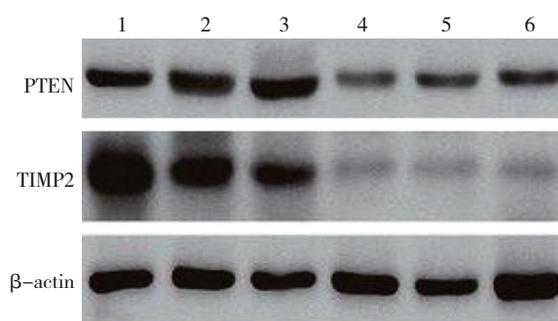
### 1.6 统计学方法

采用SPSS 21.0软件录入数据,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用t检验;两计量资料间的相关性分析采用Pearson检验;复发影响因素采用COX回归模型分析;复发率的比较采用Kaplan-Meier曲线;miR-93预测复发的价值采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 早期胃癌组织和正常胃黏膜组织中miR-93、PTEN和TIMP2表达量比较

与正常胃黏膜组织比较,早期胃癌组织中miR-93的表达量明显增加,PTEN和TIMP2的表达量明显减少,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图1和表1。经Pearson检验,早期胃癌组织中miR-93的表达量与PTEN和TIMP2的表达量呈负相关,相关系数分别为-0.412和-0.384( $P < 0.05$ )。



1~3为正常胃黏膜组织,4~6为早期胃癌组织

图1 早期胃癌组织和正常胃黏膜组织中PTEN和TIMP2的蛋白条带

Fig.1 Protein bands of PTEN and TIMP2 in early gastric cancer and normal gastric mucosa tissue

表1 早期胃癌组织和正常胃黏膜组织中miR-93、PTEN和TIMP2表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of expression of miR-93, PTEN and TIMP2 in early gastric cancer and normal gastric mucosa tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

类别	miR-93	PTEN	TIMP2
早期胃癌组织(n=268)	0.60±0.24	0.52±0.11	0.45±0.10
正常胃黏膜组织(n=95)	0.41±0.09	0.93±0.18	1.32±0.32
t值	7.53	26.04	39.48
P值	0.000	0.000	0.000

## 2.2 不同临床病理特征早期胃癌组织中 miR-93、PTEN 和 TIMP2 表达量比较

不同性别、年龄患者的早期胃癌组织中 miR-93、PTEN 和 TIMP2 表达量比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); T<sub>2</sub>期、低分化和未分化、黏

膜下早期胃癌组织中 miR-93 的表达量高于 T<sub>1</sub>期、中分化和高分化、黏膜内早期胃癌组织, PTEN 和 TIMP2 的表达量明显低于 T<sub>1</sub>期、中分化和高分化、黏膜内早期胃癌组织, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 不同临床病理特征早期胃癌组织中 miR-93、PTEN 和 TIMP2 表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of expression of miR-93, PTEN and TIMP2 in early gastric cancer tissue with different clinicopathological features ( $\bar{x} \pm s$ )

类别	miR-93	PTEN	TIMP2
<b>性别</b>			
男( $n = 139$ )	0.57±0.22	0.51±0.09	0.46±0.08
女( $n = 129$ )	0.63±0.28	0.53±0.12	0.44±0.13
<i>t</i> 值	1.96	1.40	1.53
<i>P</i> 值	0.051	0.162	0.128
<b>年龄</b>			
≤65岁( $n = 101$ )	0.58±0.21	0.50±0.08	0.46±0.09
>65岁( $n = 167$ )	0.61±0.30	0.52±0.13	0.44±0.12
<i>t</i> 值	0.88	1.39	1.45
<i>P</i> 值	0.378	0.164	0.149
<b>T分期</b>			
T <sub>1</sub> 期( $n = 98$ )	0.46±0.17	0.64±0.13	0.66±0.13
T <sub>2</sub> 期( $n = 170$ )	0.68±0.29	0.45±0.06	0.33±0.08
<i>t</i> 值	6.86	16.30	26.73
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000
<b>分化程度</b>			
中分化和高分化( $n = 102$ )	0.44±0.19	0.61±0.12	0.60±0.12
低分化和未分化( $n = 166$ )	0.70±0.28	0.46±0.08	0.36±0.07
<i>t</i> 值	8.28	12.27	20.67
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000
<b>浸润深度</b>			
黏膜内( $n = 182$ )	0.54±0.16	0.57±0.14	0.54±0.11
黏膜下( $n = 86$ )	0.71±0.30	0.42±0.07	0.26±0.08
<i>t</i> 值	6.05	9.39	21.11
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

### 2.3 复发与未复发患者早期胃癌组织中miR-93、PTEN和TIMP2表达量比较

与未复发患者比较,复发患者早期胃癌组织中miR-93的表达量明显增加,PTEN和TIMP2表达量明显减少,两者比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表3。

### 2.4 早期胃癌患者术后复发影响因素COX回归分析

以是否复发为应变量,性别、年龄、T分期、分化程度、浸润深度、miR-93、PTEN和TIMP2为自变量,进行COX回归分析,结果显示:黏膜下浸润、miR-93表达增多、PTEN及TIMP2表达减少是早期胃癌患者术后复发的危险因素。见表4。

### 2.5 miR-93预测早期胃癌患者术后复发的Kaplan-Meier曲线及ROC曲线分析

根据早期胃癌组织中miR-93表达量的中位数分为miR-93低表达和高表达,绘制未复发的Kaplan-Meier曲线,与miR-93低表达患者比较,miR-93高表达患者的未复发率较低( $P < 0.05$ );绘制miR-93表达量预测早期胃癌患者复发的ROC曲线,曲线下面积为0.7015(95%CI: 0.583 ~ 0.820),根据约登指数最大值确定最佳截点为0.72,灵敏度和特异度分别为66.02%和66.67%。见图2和3。

### 2.6 miR-93靶向PTEN和TIMP2的生物信息学分析

miR-93靶向PTEN基因为mRNA 3' UTR序列的第272-278碱基,靶向TIMP2基因为mRNA 3' UTR序列的第1961-1967碱基。见图4。

表3 复发与未复发患者早期胃癌组织中miR-93、PTEN和TIMP2表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of expression of miR-93, PTEN and TIMP2 in early gastric cancer tissues of patients with and without recurrence ( $\bar{x} \pm s$ )

类别	miR-93	PTEN	TIMP2
未复发(n = 256)	0.59±0.24	0.73±0.18	0.88±0.17
复发(n = 12)	0.76±0.19	0.51±0.07	0.43±0.06
t值	2.99	9.59	22.35
P值	0.003	0.000	0.000

表4 早期胃癌患者术后复发影响因素COX回归分析

Table 4 Cox regression analysis of influencing factors of postoperative recurrence in patients with early gastric cancer

因素	B	SE	HR	95%CI	Wald $\chi^2$ 值	P值
男性	0.318	0.475	0.917	0.734 ~ 1.585	1.228	0.098
年龄≥65岁	0.215	0.641	0.928	0.831 ~ 1.938	0.922	0.122
T <sub>2</sub> 分期	0.441	0.238	1.127	0.910 ~ 2.282	0.739	0.185
低分化和未分化	0.209	0.575	1.281	0.889 ~ 1.921	1.018	0.108
黏膜下浸润	0.374	0.532	1.552	1.221 ~ 2.484	8.282	0.000
miR-93表达	0.585	0.425	1.474	1.183 ~ 2.859	6.676	0.005
PTEN表达	-0.384	0.558	0.818	0.771 ~ 0.984	4.974	0.009
TIMP2表达	-0.461	0.612	0.854	0.663 ~ 0.912	7.796	0.002



危险因素。本研究对早期胃癌患者ESD后复发情况进行随访及分析,复发的早期胃癌患者中miR-93表达增加,而抑癌基因PTEN、TIMP2表达减少,提示:miR-93及受其调控的PTEN、TIMP2表达异常,可能与早期胃癌术后复发有关。进一步通过COX回归模型验证,黏膜下浸润、miR-93表达增多、PTEN及TIMP2表达减少均是早期胃癌术后复发的危险因素;黏膜下浸润作为危险因素、与刘黎等<sup>[3]</sup>报道一致;miR-93高表达、PTEN及TIMP2表达减少作为危险因素,与相应的生物学功能吻合。

miR-93的促癌作用被广泛证实,可能在癌细胞恶性生物学行为中处于上游调控地位,通过调控下游包括PTEN、TIMP2在内的多种靶基因来增强癌细胞恶性生物学行为。因此,miR-93表达的改变,可以通过复杂的下游机制来造成早期胃癌的发生发展,同时也影响远期预后,造成局部复发。在COX回归模型验证了miR-93表达增加与早期胃癌术后复发的关系后,本研究还通过Kaplan-Meier曲线及ROC曲线分析了miR-93预测复发的价值,结果显示,miR-93高表达的早期胃癌患者术后复发率更高,且miR-93的表达对早期胃癌术后复发具有预测价值。因此,miR-93的表达可能成为预测早期胃癌术后复发、筛查早期胃癌术后复发高危人群的标志物,也可能成为治疗早期胃癌、预防复发的治疗靶点。

综上所述,早期胃癌中miR-93表达增多与病理特征恶化、抑癌基因PTEN及TIMP2表达减少以及ESD术后复发有关;miR-93高表达是早期胃癌患者ESD术后复发的危险因素,对术后复发具有预测价值,靶向抑癌基因PTEN和TIMP2是其可能的生物学作用。本研究的不足之处是随访时间较短,今后将进一步延长随访时间,并深入挖掘miR-93在早期胃癌发生发展中的作用及可能机制。

#### 参 考 文 献 :

- [1] 北京市科委重大项目《早期胃癌治疗规范研究》专家组. 早期胃癌内镜下规范化切除的专家共识意见 (2018,北京)[J]. 中华消化内镜杂志, 2019, 36(6): 381-392.
- [2] 白顺滢,肖思洁,吴俊超,等. 内镜黏膜下剥离术和黏膜切除术治疗早期胃癌的临床对比分析[J]. 中国内镜杂志, 2014, 20(8): 873-877.
- [3] 刘黎,董华琼,张匠,等.  $\beta$ -catenin和E-cadherin表达预测早期胃癌切除术后复发的临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2018, 23(8): 701-705.
- [4] LIU L, DONG H Q, ZHANG J, et al. Clinical significance of expression of  $\beta$ -catenin and E-cadherin in predicting recurrence after resection of gastric cancer[J]. Chinese Clinical Oncology, 2018, 23(8): 701-705. Chinese
- [5] LARKI P, AHADI A, ZARE A, et al. Up-regulation of miR-21, miR-25, miR-93, and miR-106b in gastric cancer[J]. Iran Biomed J, 2018, 22(6): 367-373.
- [6] GUAN H, LI W, LI Y, et al. MicroRNA-93 promotes proliferation and metastasis of gastric cancer via targeting TIMP2[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189490.
- [7] ZHANG R, GUO Y, MA Z, et al. Long non-coding RNA PTENP1 functions as a ceRNA to modulate PTEN level by decoying miR-106b and miR-93 in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(16): 26079-26089.
- [8] GAO Y, DENG K, LIU X, et al. Molecular mechanism and role of microRNA-93 in human cancers: a study based on bioinformatics analysis, Meta-analysis, and quantitative polymerase chain reaction validation[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 6370-6383.
- [9] PELLATT D F, STEVENS J R, WOLFF R K, et al. Expression profiles of mirna subsets distinguish human colorectal carcinoma and normal colonic mucosa[J]. Clin Transl Gastroenterol, 2016, 10(7): e152.
- [10] JAFARI N, ABEDIANKENARI S, HOSSEINI-KHAH Z, et al. Expression patterns of seven key genes, including  $\beta$ -catenin, Notch1, GATA6, CDX2, miR-34a, miR-181a and miR-93 in gastric cancer[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 12342.
- [11] ANSARI M H, IRANI S, EDALAT H, et al. Deregulation of miR-93 and miR-143 in human esophageal cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 3097-3103.
- [12] 王文尖,罗琼,覃世运,等. 三种microRNA在胃癌患者中的表达及临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(11): 1363-1367.
- [13] WANG W J, LUO Q, QIN S Y, et al. Expression and clinical significance of three microRNA in gastric cancer patients[J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(11): 1363-1367. Chinese
- [14] ZHAO C, TAO T, YANG L, et al. Loss of PDZK1 expression activates PI3K/AKT signaling via PTEN phosphorylation in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2019, 453: 107-121.

- [13] HU M, ZHU S, XIONG S, et al. MicroRNAs and the PTEN/PI3K/Akt pathway in gastric cancer (review) [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1439-1454.
- [14] WANG W, LI D, XIANG L, et al. TIMP-2 inhibits metastasis and predicts prognosis of colorectal cancer via regulating MMP-9[J]. *Cell Adh Migr*, 2019, 13(1): 273-284.
- [15] YAMADA S, HATTA W, SHIMOSEGAWA T, et al. Different risk factors between early and late cancer recurrences in patients without additional surgery after noncurative endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer[J]. *Gastrointest Endosc*, 2019, 89(5): 950-960.
- [16] JEON M Y, PARK J C, HAHN K Y, et al. Long-term outcomes after noncurative endoscopic resection of early gastric cancer: the optimal time for additional endoscopic treatment[J].

*Gastrointest Endosc*, 2018, 87(4): 1003-1013.

(吴静 编辑)

**本文引用格式:**

杨洁, 彭志红, 吴宏博. miR-93 表达与内镜黏膜下剥离术治疗老年早期胃癌预后的关系及其靶向抑癌基因的生物信息学分析[J]. *中国内镜杂志*, 2020, 26(9):11-18.

YANG J, PENG Z H, WU H B. Relationship between the expression of miR-93 and the prognosis of endoscopic submucosal dissection in the treatment of elderly early gastric cancer and the bioinformatics analysis of its targeted tumor suppressor genes[J]. *China Journal of Endoscopy*, 2020, 26(9):11-18. Chinese