

- [11] Jang GB, Hong IS, Kim RJ, et al. Wnt/beta-catenin small molecule inhibitor CWP232228 preferentially inhibits the growth of breast cancer stem-like cells[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(8):1691-1702.
- [12] Hsu TH, Jiang SY, Chan WL, et al. Involvement of RARRES3 in the regulation of Wnt proteins acylation and signaling activities in human breast cancer cells[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 22(5):801-814.
- [13] Zhao Z, Lu P, Zhang H, et al. Nestin positively regulates the Wnt/beta-catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(4):408.
- [14] Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5/6):477-487.
- [15] Wu QW, Yang QM, Huang YF, et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 in lymphatic invasiveness and metastasis of breast cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):97804.
- [16] 张君微, 张毅, 穆长征. MMP-2、MMP-9 和 VEGF 与乳腺癌侵袭转移关系的研究[J]. *中国医师杂志*, 2010, 12(11):1490-1493.
- [17] Gupta I, Abdraboh ME, Hollenbach AD, et al. The interplay between the cell adhesion molecules Cd44 and Cd146 in breast cancer metastasis[J]. *Annals of Oncology*, 2014, 25(1):23-24.
- [18] 马晓艳, 张蕾, 高冬玲, et al. E-cadherin 在乳腺组织中的表达及临床意义[J]. *河南职工医学院学报*, 2008, 21(3):221-223.
- [19] Laezza C, D'Alessandro A, Paladino S, et al. Anandamide inhibits the Wnt/beta-catenin signalling pathway in human breast cancer MDA MB 231 cells[J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(16):3112-3122.
- [20] Gong C, Qu S, Lv XB, et al. BRMS1L suppresses breast cancer metastasis by inducing epigenetic silence of FZD10[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1):5406.
- [21] Liu W, Xing F, Iizumi-Gairani M, et al. N-myc downstream regulated gene 1 modulates Wnt-beta-catenin signalling and pleiotropically suppresses metastasis[J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(2):93-108.
- [22] Zhang H, Zhang X, Wu X, et al. Interference of Frizzled 1 (FZD1) reverses multidrug resistance in breast cancer cells through the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Cancer Lett*, 2012, 323(1):106-113.
- [23] Hung TH, Hsu SC, Cheng CY, et al. Wnt5A regulates ABCB1 expression in multidrug-resistant cancer cells through activation of the non-canonical PKA/beta-catenin pathway [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(23):12273-12290.
- [24] Loh YN, Hedditch EL, Baker LA, et al. The Wnt signalling pathway is upregulated in an in vitro model of acquired tamoxifen resistant breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(2):174.
- [25] Wu Y, Ginther C, Kim J, et al. Expression of Wnt3 activates Wnt/beta-catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(12):1597-1606.
- [26] Gangopadhyay S, Nandy A, Hor P, et al. Breast cancer stem cells: a novel therapeutic target[J]. *Clin Breast Cancer*, 2013, 13(1):7-15.
- [27] Piva M, Domenici G, Iriondo O, et al. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells[J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(1):66-79.

(收稿日期:2015-03-06)

• 综 述 •

血清游离 DNA、微小 RNA 在胃癌诊断中的研究进展

张 振 综述, 潘 晴[△] 审校

(淮安市淮阴医院检验科, 江苏淮安 223300)

关键词: 胃癌; 血清游离 DNA; 微小 RNA; 肿瘤标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.055

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2419-03

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤,病死率高,严重危害着人类的健康。胃癌起病隐匿,难以早期发现,且胃癌病程的早晚与胃癌患者的治疗及预后密切相关,胃癌早期患者 5 年生存率大约为 90%,而胃癌晚期患者疗效较差,5 年生存率不足 20%^[1]。肿瘤标志物(TM)是指肿瘤发生、发展过程中释放的可预示肿瘤存在或区分肿瘤和正常组织的一类物质,存在于体液、组织或细胞中。临床上常将 TM 分为两大类,分别为肿瘤基因表型标志物和肿瘤基因标志物。其中肿瘤基因表型标志物包括抗原类 TM(如 AFP、CEA)、糖类抗原类 TM(如 CA-199、CA-724)、激素和异位激素类 TM(如 ER、-HCG)、酶和同工酶类 TM(如 GT、NSE)、肿瘤相关病毒类 TM(如 HBV、HPV)、蛋白及多肽类 TM(如 BJP、TPA);肿瘤基因标志物包括癌基因、抑癌基因及其产物类 TM(如 EGFR、p53)^[2]。与胃癌相关的传统 TM 为 CEA、CA-724、CA-199 等,但是传统 TM 在胃癌中的敏感性和特异性较低,极大制约了其临床应用价值^[3]。

血清游离 DNA(cf-DNA)、微小 RNA(miRNA)是外周血循环核酸的主要组成部分,是目前作为新型肿瘤标志物的研究热点。cf-DNA 是一种自由细胞的胞外 DNA,可由肝脏和肾脏代谢,生成与清除相对恒定,能够相对稳定地存在于外周血循环中。目前研究表明,cf-DNA 在肿瘤、自身免疫性疾病、产前诊断等方面有较好的临床应用价值。miRNA 是一类非编码单链小分子 RNA,具有高度保守性。miRNA 能够稳定的存在于外周血中,通常以蛋白复合形式存在,很难被 RNA 酶降解。miRNA 与肿瘤密切相关,正常组织和肿瘤组织的 miRNA 表达水平相比有显著性差异,而且具有一定的组织特异性。在肿瘤发生的早期,有一定数量的 cf-DNA 和 miRNA 释放入血,并且水平远高于健康者,是一种特异性的核酸改变^[4]。cf-DNA 和 miRNA 均为无创检测技术,对于肿瘤的早期临床诊断、病程病情的判断和预后有很积极的指导作用,是很有发展意义的新型肿瘤分子标志物。本文将对 cf-DNA、miRNA 在胃癌诊断中的研究进展作一综述。

1 cf-DNA 与胃癌

1.1 cf-DNA 的检测方法 得益于分子生物学和分子诊断学的不断发展, cf-DNA 成为了新型肿瘤分子标志物的研究热点。相关研究表明, 血液中 DNA 水平的升高主要来自肿瘤的释放, 且肿瘤细胞释放出的 DNA 片段大小并不一致; 同时血循环中 DNA 含有与肿瘤组织相一致的基因特异性改变^[5]。cf-DNA 的检测方法主要有实时荧光定量 PCR 法、Southern 杂交法、Northern 杂交法、毛细管电泳法以及荧光染料法等。利用这些技术可以检测到多种外周血的甲基化等肿瘤相关改变, 并通过这些改变判断对应的临床意义。

1.2 cf-DNA 与胃癌诊断 cf-DNA 能够稳定地存在于外周血循环中, 且含有与肿瘤组织相一致的基因特异性改变, 有成为新型分子标志物的潜力。Kyongchol 等^[6]研究发现, 健康对照组、早期胃癌患者及进展期胃癌患者血清中 cf-DNA 的水平逐渐升高, 三者之间的差异有统计学意义($P < 0.05$); 肿瘤的大小、TNM 分期及根治性切除术后等相关事件也与 cf-DNA 的水平密切相关; 手术后 24 h 与术前相比, 血液中 cf-DNA 的水平有显著性的下降($P < 0.05$)。Kyongchol 等^[6]研究表明 cf-DNA 的水平变化可以作为胃癌的可靠分子标志物, 并且与胃癌的进程、胃癌切除术效果及预后密切相关。Kolesnikova 等^[7]和 Sai 等^[8]的研究发现, 胃癌组的 cf-DNA 水平显著高于胃良性肿瘤组及对照组, 而胃良性肿瘤组与对照组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明了 cf-DNA 主要来源于肿瘤的释放或肿瘤细胞的坏死, cf-DNA 定量结果可能对于胃癌的诊断提供有价值的线索。吴晓燕等^[9]利用分支 DNA 技术检测 99 例胃癌患者 cf-DNA 水平发现, 胃癌组 cf-DNA 水平显著高于胃良性肿瘤组及对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 胃良性肿瘤组与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。胃癌患者血清 cf-DNA 水平在肿瘤部位、肿瘤分化程度、肿瘤淋巴转移分类中的差异无统计学意义($P > 0.05$); cf-DNA 的诊断灵敏度明显好于 CEA、CA-199、CA-724 等传统肿瘤标志物, 但特异性没有明显差异, 这表明了 cf-DNA 的定量检测对于胃癌的实验室诊断以及良、恶性肿瘤的鉴别有一定的指导意义。基因突变的检测是 cf-DNA 作为肿瘤标志物较早研究的方向。Kras、P53、EGFR 等基因的突变可在多种肿瘤中检测到。但是由于基因突变对检测的要求较高以及提取过程中易丢失等特殊性质决定了目前基因突变的检测不能作为肿瘤分子标志物来被广泛应用^[10]。相比于基因突变, DNA 的甲基化检测技术则相对成熟、稳定。DNA 的甲基化是指在 DNA 甲基转移酶的作用下, 以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体, 将甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤双核苷酸的胞嘧啶上^[11], 是目前研究最为广泛的表观遗传学现象之一。肿瘤中存在着广泛的甲基化现象, 并且甲基化现象贯穿于细胞癌变的各个阶段, 有一定的组织特异性, 某些基因的甲基化可以作为肿瘤早期诊断标记物。研究表明, 胃癌患者外周血及癌组织中存在 P16、P15、GSTP1、E-cadherin 和 DAP-kinase 基因的甲基化, 并且两者之间有很好的相关性, 这表明了在一定程度上, 外周血甲基化能够较好反映胃癌组织的甲基化^[12]。王燕等^[13]利用巢式甲基化特异性 PCR 检测 69 例胃癌患者, p16、MGMT 基因启动子的甲基化率分别为 30.4% 和 17.4%, 对照组未见甲基化现象; p16 基因启动子甲基化与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 表明了 p16 基因可以作为潜在的分子标志物应用于胃癌的诊断。Ling 等^[14]研究发现, 在 69.8% 的胃癌患者中发现 cf-DNA XAF1 的甲基化, 而且 XAF1 的甲基化与胃癌的预后密切相关; XAF1 的甲基化在胃癌中有较好的敏感性与特异性,

是胃癌诊断及预后有价值的分子标志物。Cheung 等^[15]于 2012 年发表于 Cancer 杂志的研究发现, 胃癌组织中可以检测到 RNF180 的甲基化, 而正常胃组织、结肠癌等肿瘤组织中并没有明显的甲基化; 并且胃癌患者外周血 RNF180 甲基化检测的敏感性和特异性分别为 63% 和 91%, 研究证明了 RNF180 有较好的敏感性和特异性, 是胃癌理想的分子诊断标志物。李琳等^[10]的文章总结了外周血相关甲基化标志物的研究进展, 提示了 DNA 甲基化可以作为胃癌诊断的标志物(如 Reprimo 在胃癌中的检出率较高); 并且联合检测多个 DNA 甲基化状态可以提高诊断的效率(如 FAM5C、MYLK 联合检测的敏感性和特异性分别为 77.6% 和 90%)。以上研究表明, cf-DNA 可作为胃癌诊断的新型分子标志物, 有较好的研究价值与应用前景。

2 miRNA 与胃癌

2.1 miRNA 的作用机制和检测方法 miRNA 是新型肿瘤标志物的又一研究热点。miRNA 是单链非编码 RNA, 大小约为 21 个核苷酸左右, 可通过与靶 mRNA 的 3' UTR 区结合, 诱导 mRNA 的降解或阻止其转录翻译, 完成对靶基因的调控。miRNA 稳定表达于血液、胃液、尿液等体液中, 可表现为原癌或抑癌基因两种形式, 影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移、代谢等^[16]。在胃癌发生早期, 就已经发生 miRNA 表达变化, 所以追踪 miRNA 表达情况, 可以在胃癌早期对其做出诊断^[17]。实时荧光定量 PCR 是目前检测 miRNA 最为常用的方法, 可对 miRNA 进行准确定量, 通过 miRNA 定量分析出可能的生物学效应。

2.2 miRNA 与胃癌诊断 miRNA 参与到肿瘤的发生发展中, 正常组织 miRNA 的表达水平与肿瘤组织 miRNA 的表达水平相比差异显著, 而且具有一定的组织特异性。韩静等^[18]利用基因芯片技术筛选早期胃癌特征 miRNA 结果显示, miRNA-9-1、miRNA-103、miRNA-141 等表达量相对降低, miRNA-196a、miRNA-142-3p、miRNA-25 等表达量相对升高, 并将筛选出差异显著的 miRNA 进行联合检测时发现, miRNA 的联合检测可以提高胃癌的诊断效率。李红等^[19]利用 qRT-PCR 检测 79 名胃癌患者及 38 名健康对照组中血清 miR-17-92 簇(miR-17-3p、miR-17-5p、miR-18a-5p、miR-19a-3p、miR-19b-3p、miR-20a-5p 及 miR-92a-3p) 的表达水平发现, 在胃癌患者中 miR-17-92 簇的表达水平平均高于健康对照组($P < 0.05$); ROC 曲线分析发现, miR-17-3p 在 miR-17-92 簇中的 ROC 曲线下面积最大, 且诊断特异性达 89.00%; 联合检测 miR-17-3p 和 miR-19a-3p 可以明显提高胃癌诊断的特异性(94.70%)及敏感性(63.16%); 在对不同分期的 miR-17-92 簇的统计分析发现, miR-17-92 簇与胃癌的分期及淋巴结转移有关, 与患者的年龄、性别、分化程度等无关。李红等^[19]的研究表明, miR-17-92 簇有作为胃癌新型分子诊断标志物的潜力, 辅助胃癌的临床诊断。国芳等^[20]利用 qRT-PCR 法检测胃癌患者、癌前变化患者、健康对照者的血清 miR-1、miR-20a、miR-27a、miR-34a、miR-423-5p 表达水平发现, 胃癌患者血清 miR-1、miR-20a、miR-34a、miR-423-5p 表达显著升高($P < 0.05$); 早期胃癌中 miR-1 和 miR-20a 的表达明显升高($P < 0.05$); 进展期胃癌中 miR-1 的表达显著高于早期胃癌($P < 0.05$), 且术后表达明显降低($P < 0.05$), 此研究表明 miR-1、miR-20a、miR-34a、miR-423-5p 可作为胃癌分子标记物, 且 miR-1、miR-20a 可作为胃癌早期诊断标记物。Cai 等^[21]的研究发现, 胃癌患者血清中 miRNA-20a、miRNA-221 和 miRNA-106b 的表达水平明显高于对照组, ROC 下面积分别为 0.859 3、0.796 0、0.773 3, 表明了 miRNA-

20a、miRNA-221 和 miRNA-106b 有可能作为胃癌诊断的新型分子标志物。孙秀静等^[22]对胃癌组、胃癌前病变组和健康对照组的 miRNA-23b 研究发现,胃癌组 miRNA-23b 的 Log2 Ct 值低于胃癌前病变组,差异有统计学意义($P < 0.05$);胃癌前病变组 miRNA-23b 的 Log2 Ct 值低于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);胃癌组的阳性率显著高于胃癌前病变组,胃癌前病变组阳性率显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这表明 miRNA-23b 对于胃癌有较高的诊断价值,有可能用于胃癌的早期诊断。Tsujiura 等^[23]的研究发现,miRNA-17-5p、miRNA-21、miRNA-106a 与 miRNA-106b 在胃癌中的表达量明显高于健康对照组,let-7a 表达量降低,而且胃癌术后升高的 miRNA 水平明显下降,这表明了 miRNA-17-5p 等很可能是胃癌理想的分子诊断标志物。杨普等^[24]的研究发现,胃癌组织中 miRNA-106a 的表达量显著高于癌旁胃组织;转染 miRNA-106a mimics 的胃癌组织中,CDK1 和 E2F1 的表达量分别显著高于对照组,Rb1 和 TIMP-2 的表达量显著低于对照组($P < 0.05$);MTT 结果显示,miRNA-106a 高表达促进了胃癌细胞的增殖;Annexin V/PI 结果显示,经 miRNA-106a 转染后,细胞凋亡率与对照组相比有显著性下降($P < 0.05$);Transwell 实验表明,miR-106a 高表达可提高胃癌细胞的侵袭能力($P < 0.05$),该研究表明了 miR-106a 表达量的升高对于胃癌的诊断以及胃癌的发生、发展有重要的研究价值和临床意义。除了血液中 miRNA 可能作为新型肿瘤分子标志物,胃液中也存在 miRNA 的表达量异常的状态,也可能作为潜在的肿瘤分子标志物。Yu 等^[25]和 Cui 等^[26]研究发现,在胃癌患者中,胃液中 miRNA-129-1-3p、miRNA-129-2-3p、miRNA-21、miRNA-106a 的表达水平与胃良性病变相比,有显著性差异($P < 0.05$)。这表明在胃液中,某些 miRNA 表达量的异常可能对于胃癌的诊断有一定的指导意义。以上研究表明,miRNA 对胃癌诊断有较好的临床应用价值,高危人群如果可以通过检测 miRNA 来提高胃癌的早期诊断率,将会提高胃癌的治疗效果。

3 小 结

科技的发展使得现有的肿瘤标志物已经不能满足临床的需要,如何提高肿瘤的诊断效率是提高肿瘤患者治疗效果、延长生存时间和改善预后的关键。基础研究对 cf-DNA 和 miRNA 已经取得了一定的进展,但是如何将基础研究的成果转化为临床应用还有很长的路要走。相信在大量基础科研工作者以及临床工作者的共同努力下,未来将会出现越来越多的特异性分子诊断标志物来提高肿瘤诊断效率,造福于肿瘤患者。

参考文献

- [1] 赵青川,洪流.胃癌新的手术方式[J].中华普通外科杂志,2014,29(6):409-411.
- [2] 潘世扬.临床分子诊断学[M].北京:人民卫生出版社,2013:368-370.
- [3] Strong VE, D'Amico TA, Kleinberg L, et al. Impact of the 7th Edition AJCC staging classification on the NCCN clinical practice guidelines in oncology for gastric and esophageal cancers[J]. Natl Compr Canc Netw, 2013, 11(2): 60-66.
- [4] De Mattos-Arruda L, Olmos D, Tabernero J. Prognostic and predictive roles for circulating biomarkers in gastrointestinal cancer [J]. Future Oncol, 2011, 7(1): 1385-1397.
- [5] Kohler C, Radpour R, Berekati Z, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors[J]. Mol Cancer, 2009, 8(2): 105.

- [6] Kyongchol K, Dong GS, Min KP, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer; diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection[J]. Annals of Surgical Treatment and Research, 2014, 86(3): 136-142.
- [7] Kolesnikova EV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, et al. Circulating DNA in the blood of gastric cancer patients[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 11(3): 226-231.
- [8] Sai S, Ichikawa D, Tomita H, et al. Quantification of plasma cell-free DNA in patients with gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2007, 27(3): 2747-2751.
- [9] 吴晓燕,张金业,钱晨,等.分支 DNA 技术检测胃癌患者血清游离 DNA 的应用价值[J].中华检验医学杂志,2013,36(8):699-703.
- [10] 李琳,张连海,季加孚.外周血循环核酸作为肿瘤标志物在胃癌中的应用现状[J].中华胃肠外科杂志,2014,17(1):21-25.
- [11] Toiyama Y, Okugawa Y, Goel A. DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 455(1/2): 43-57.
- [12] Lee TL, Leung WK, Chan MW, et al. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(1): 1761-1766.
- [13] 王燕,周力,陈晓琴,等.巢式 MSP 法检测胃癌患者血浆 p16、MGMT 基因甲基化[J].世界华人消化杂志,2010,18(4):384-387.
- [14] Ling ZQ, Lv P, Lu XX, et al. Circulating Methylated XAF1 DNA Indicates Poor Prognosis for Gastric Cancer [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67195.
- [15] Cheung KF, Lam CN, Wu K, et al. Characterization of the gene structure, functional significance, and clinical application of RNF180, a novel gene in gastric cancer [J]. Cancer, 2012, 118(7): 947-959.
- [16] Ichikawa D, Komatsu S, Konishi H, et al. Circulating microRNA in digestive tract cancers [J]. Gastroenterology, 2012, 142: 1074.
- [17] Liu H, Zhu L, Liu B, et al. Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer [J]. cancer Lett, 2012, 316(2): 196-203.
- [18] 韩静,余江流,凌志强.早期胃癌特征性 miRNA 筛选[J].中华胃肠外科杂志,2014,17(2):175-179.
- [19] 李红,李铤,刘常浩,等.循环血清 miR-17-92 簇:一种新的胃癌诊断标志物[J].现代肿瘤医学,2014,22(3):581-585.
- [20] 国芳,姚玮艳,戴欣,等.血清 miRNA 作为胃癌早期诊断标志物的初步研究[J].胃肠病学,2014,19(4):198-202.
- [21] 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.
- [22] 孙秀静,张莹,徐有青.外周血 microRNA-23b 作为胃癌筛查分子标志物的价值和应用研究[J].中国实验诊断学,2014,18(6):896-898.
- [23] Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers[J]. Br J Cancer, 2010, 102(7): 1174-1179.
- [24] 杨普,古学萍,张中冕,等.微小 RNA-106a 在胃癌组织中的表达及其对肿瘤生物学行为的影响[J].中华实验外科杂志,2014,31(6):1325-1327.
- [25] Yu X, Luo L, Wu Y, et al. Gastric juice miR-129 as a potential biomarker for screening gastric cancer [J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 365.
- [26] Cui L, Zhang X, Ye G, et al. Gastric juice microRNAs as potential biomarkers for the screening of gastric cancer [J]. Cancer, 2013, 119(9): 1618-1626.