

• 论 著 •

miR-16 联合 Cripto-1、ANXA7 诊断胃癌及其淋巴结转移的临床价值研究^{*}

谢 宇¹, 李会颖¹, 林永娟¹, 孙 岩^{2△}

1. 南京大学医学院附属鼓楼医院老年医学科; 江苏南京 210008;

2. 江苏省肿瘤医院内科, 江苏南京 210009

摘 要:目的 探讨 microRNA-16(miR-16)联合畸胎瘤衍生生长因子(Cripto-1)、膜联蛋白 A7(ANXA7)诊断胃癌及其淋巴结转移的临床价值。**方法** 选取 2017 年 6 月至 2019 年 9 月南京大学医学院附属鼓楼医院内科治疗的胃部疾病患者 546 例,根据胃癌诊断标准分为胃癌组(121 例)和非胃癌组(425 例)。所有胃癌患者根据胃癌进展分为早期胃癌组(44 例)、进展期胃癌组(77 例),根据淋巴结是否转移分为淋巴结转移组(71 例)、无淋巴结转移组(50 例)。选择同期该院健康体检者 50 例作为对照组。采用实时荧光定量 PCR 检测血清 miR-16 水平;采用酶联免疫吸附测定检测 ANXA7 和 Cripto-1 水平;采用 Pearson 相关分析胃癌患者血清 miR-16 水平与 ANXA7、Cripto-1 水平的相关性。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析 miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌及其淋巴结转移的价值。**结果** 胃癌组血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平均高于非胃癌组和对照组($P<0.05$);进展期胃癌组血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平均高于早期胃癌组($P<0.05$);淋巴结转移组血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平均高于无淋巴结转移组($P<0.05$);miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌的最佳临界值分别为 11.81、71.51 $\mu\text{g/L}$ 、2.26 $\mu\text{g/L}$,3 项指标联合诊断胃癌的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.996,其灵敏度(95.04%)和特异度(97.26%)较高;miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌淋巴结转移的最佳临界值分别为 18.95、78.93 $\mu\text{g/L}$ 、3.73 $\mu\text{g/L}$,3 项指标联合诊断胃癌淋巴结转移的 AUC 为 0.996,其灵敏度(97.18%)和特异度(96.00%)较高;胃癌患者血清 miR-16 水平与 ANXA7、Cripto-1 水平均呈正相关($r=0.465, 0.519, P<0.05$)。**结论** 血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平在胃癌患者中明显升高,且与胃癌发生发展相关,3 项指标联合检测在诊断胃癌及其淋巴结转移中有一定价值。

关键词: microRNA-16; 畸胎瘤衍生生长因子; 膜联蛋白 A7; 胃癌; 淋巴结转移

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.007

中图法分类号: R735.2

文章编号: 1673-4130(2021)07-0797-04

文献标志码: A

The clinical value of miR-16 combined with Cripto-1 and ANXA7 in the diagnosis of gastric cancer and its lymph node metastasis^{*}

XIE Yu¹, LI Huiying¹, LIN Yongjuan¹, SUN Yan^{2△}

1. Department of Geriatrics, Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. Department of Internal Medicine, Jiangsu Cancer Hospital,

Nanjing, Jiangsu 210009, China

Abstract: Objective To investigate the clinical value of microRNA-16 (miR-16) combined with teratoma-derived growth factor (Cripto-1) and Annexin A7 (ANXA7) in the diagnosis of gastric cancer and its lymph node metastasis. **Methods** A total of 546 patients with gastric diseases treated by the Drum Tower Hospital Affiliated Nanjing University Medical School from June 2017 to September 2019 were divided into gastric cancer group (121 cases) and non-gastric cancer group (425 cases) according to the diagnostic criteria for gastric cancer. All gastric cancer patients were divided into early gastric cancer group (44 cases) and advanced gastric cancer group (77 cases) according to the progress of gastric cancer; according to whether the lymph node metastasis or not, there were divided into lymph node metastasis group (71 cases) and non-lymph node metastasis group (50 cases). Selected 50 cases of healthy physical examination in this hospital during the same

^{*} 基金项目:江苏省干部保健科研课题(BJ19001)。

作者简介:谢宇,女,主治医师,主要从事消化道肿瘤的发生及转移机制研究。△ 通信作者, E-mail: sunyan@188.com。

本文引用格式:谢宇,李会颖,林永娟,等. miR-16 联合 Cripto-1、ANXA7 诊断胃癌及其淋巴结转移的临床价值研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(7): 797-800.

period as the control group. Real-time fluorescence quantitative was used to detect the level of miR-16; enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of ANXA7 and Cripto-1; Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between serum miR-16, ANXA7 and Cripto-1 levels in patients with gastric cancer. The receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to analyze the value of miR-16, ANXA7, and Cripto-1 in the diagnosis of gastric cancer and its lymph node metastasis. **Results** The levels of serum miR-16, ANXA7 and Cripto-1 in the gastric cancer group were higher than those in the non-gastric cancer group and the control group ($P<0.05$). The levels of serum miR-16, ANXA7 and Cripto-1 in the advanced gastric cancer group were higher than those in the early gastric cancer group ($P<0.05$). The levels of serum miR-16, ANXA7 and Cripto-1 in the lymph node metastasis group were higher than those in the non-lymph node metastasis group ($P<0.05$). The optimal cut-off values of miR-16, ANXA7, and Cripto-1 for the diagnosis of gastric cancer were 11.81, 71.51 $\mu\text{g/L}$, and 2.26 $\mu\text{g/L}$, respectively. The area under the curve (AUC) for the combined diagnosis of gastric cancer by the three indicators was 0.996, and its sensitivity (95.04%) and specificity (97.26%) were higher. The optimal cut-off values of miR-16, ANXA7, and Cripto-1 for diagnosing gastric cancer lymph node metastasis were 18.95, 78.93 $\mu\text{g/L}$, and 3.73 $\mu\text{g/L}$, respectively. The AUC of the three indicators combined to diagnose gastric cancer lymph node metastasis was 0.996, and its sensitivity (97.18%) and specificity (96.00%) were higher. Serum miR-16 level in patients with gastric cancer was positively correlated with ANXA7 and Cripto-1 levels ($r=0.465, 0.519, P<0.05$). **Conclusion** The levels of serum miR-16, ANXA7 and Cripto-1 are significantly increased in patients with gastric cancer and are related to the occurrence and development of gastric cancer. The combined detection of the three indicators has certain value in the diagnosis of gastric cancer and its lymph node metastasis.

Key words: microRNA-16; teratoma-derived growth factor; Annexin A7; gastric cancer; lymph node metastasis

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤,我国是胃癌的高发国家,其每年新发病例数占全球的 40% 以上^[1]。多数胃癌患者在发现时已处于癌症中晚期,导致患者临床预后不佳^[2]。目前一致认为,早期发现胃癌并采用合理的方案进行干预治疗,有助于提高患者生存率,并改善预后^[3]。微小核糖核酸(miRNA)是可控基因转录和表达的非编码 RNA,有研究结果证实其在肿瘤的凋亡、增殖、转移和侵袭过程中扮演十分重要的角色^[4]。研究表明,miR-16 在胰腺癌、结肠癌、乳腺癌等患者体内水平异常,其可能在恶性肿瘤的诊断和评估中起重要作用^[5]。畸胎瘤衍生生长因子(Cripto-1)是可有效维持胚胎干细胞和多能性干细胞的标志物,有学者指出,在多种肿瘤组织中 Cripto-1 表达处于异常活跃状态,且在癌变前其水平即会出现明显升高^[6]。膜联蛋白 A7(ANXA7)是近年来被广泛研究的热点,具有调节细胞分化、膜转运、凋亡、钙离子信号及生长等生物学功能,且在多种肿瘤中均呈现明显异常表达状态^[7]。目前,miR-16 联合 Cripto-1、ANXA7 在胃癌早期诊断中的应用报道较少,因而本研究对南京大学医学院附属鼓楼医院收治的胃癌患者进行分析,探讨 miR-16 联合 Cripto-1、ANXA7 诊断胃癌及其淋巴结转移的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 6 月至 2019 年 9 月于南京大学医学院附属鼓楼医院内科治疗的胃部疾病

患者 546 例作为研究对象,根据是否符合胃癌诊断标准^[1]分为胃癌组(121 例)和非胃癌组(425 例)。其中胃癌组患者根据胃癌进展情况分为早期胃癌组(44 例)和进展期胃癌组(77 例);根据淋巴结是否转移分为淋巴结转移组(71 例)和无淋巴结转移组(50 例)。非胃癌组中男 261 例,女 164 例;平均年龄(67.38±8.32)岁;胃炎 206 例、胃溃疡 182、其他 37 例。选择同期该院体检健康者 50 例作为对照组,其中男 29 例、女 21 例,平均年龄(68.03±6.31)岁。各组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。胃癌组纳入标准:(1)组织病理学检查确诊为胃癌;(2)入组前未接受化疗、放疗、免疫疗法治疗。排除标准:(1)合并严重肝、肾系统疾病;(2)合并其他结缔组织病;(3)精神异常无法配合本研究。

1.2 方法 晨起空腹时抽取静脉血 3 mL 置于离心管中,2 500 r/min 离心 15 min,取上清液 500 μL 至小型离心管中保存,按照总 RNA 快速提取试剂盒说明书从中提取总 RNA。采用实时荧光定量 PCR 检测血清 miR-16 水平,并以 U6 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 miR-16 水平,所用引物均购自南京金斯瑞生物科技有限公司。miR-16 引物设计如下,上游:5'-ATC AAG CTT ATC AGA CAA GC-3',下游:5'-ATG TGC CCG GTC AGA GGC-3'。采用酶联免疫吸附测定检测血清 ANXA7、Cripto-1 水平,试剂盒购自南京福麦斯生物科技有限公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行处理分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析或 t 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Pearson 相关分析胃癌患者血清 miR-16 水平与 ANXA7、Cripto-1 水平的相关性;采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析 miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌及其淋巴结转移的价值。

2 结 果

2.1 各组 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平比较 胃癌组血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平高于对照组和非胃癌组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	miR-16	ANXA7($\mu\text{g/L}$)	Cripto-1($\mu\text{g/L}$)
胃癌组	121	19.24 $\pm$ 4.85	79.59 $\pm$ 5.36	3.78 $\pm$ 0.39
非胃癌组	425	6.47 $\pm$ 1.01	63.42 $\pm$ 4.15	0.75 $\pm$ 0.15
对照组	50	5.11 $\pm$ 0.89	50.03 $\pm$ 5.97	0.31 $\pm$ 0.11
<i>F</i>		1 454.87	897.42	9 623.52
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同胃癌亚组患者 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平比较 进展期胃癌组血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平均高于早期胃癌组($P < 0.05$),淋巴结转移组血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平均高于无淋巴结转移组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同胃癌亚组患者 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	miR-16	ANXA7($\mu\text{g/L}$)	Cripto-1($\mu\text{g/L}$)
早期胃癌组	44	17.31 $\pm$ 1.62	75.69 $\pm$ 3.15	3.16 $\pm$ 0.24
进展期胃癌组	77	20.34 $\pm$ 2.03	81.82 $\pm$ 2.06	4.13 $\pm$ 0.16
<i>t</i>		8.47	11.57	23.94
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001
淋巴结转移组	71	20.63 $\pm$ 1.97	80.89 $\pm$ 2.14	3.98 $\pm$ 0.19
无淋巴结转移组	50	17.27 $\pm$ 1.35	77.74 $\pm$ 2.57	3.50 $\pm$ 0.17
<i>t</i>		11.13	7.33	14.28
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌的价值 miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌的最佳临界值分别为 11.81、71.51 $\mu\text{g/L}$ 、2.26 $\mu\text{g/L}$,3 项指标联合诊断胃癌的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.996,其灵敏度(95.04%)和特异度(97.26%)较高,见表 3。

2.4 miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌淋巴结转移的价值 miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌淋巴结转移的最佳临界值分别为 18.95、78.93 $\mu\text{g/L}$ 、3.73 $\mu\text{g/L}$,3 项指标联合诊断胃癌淋巴结转移的 AUC 为 0.996,其灵敏度(97.18%)和特异度(96.00%)较高,

见表 4。

表 3 miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌的价值					
指标	最佳 临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC(95%CI)	<i>P</i>
miR-16	11.81	71.07	85.16	0.858(0.804~0.913)	0.028
ANXA7($\mu\text{g/L}$)	71.51	81.82	83.79	0.895(0.847~0.944)	0.025
Cripto-1($\mu\text{g/L}$)	2.26	76.03	87.37	0.854(0.797~0.911)	0.029
miR-16+Cripto-1+ ANXA7	—	95.04	97.26	0.996(0.992~0.998)	0.002

注:—为该项无数据。

表 4 miR-16、ANXA7、Cripto-1 诊断胃癌 淋巴结转移的价值					
指标	最佳 临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC(95%CI)	<i>P</i>
miR-16	18.95	87.32	82.00	0.871(0.821~0.921)	0.026
ANXA7($\mu\text{g/L}$)	78.93	81.69	88.00	0.897(0.852~0.942)	0.023
Cripto-1($\mu\text{g/L}$)	3.73	88.73	84.00	0.864(0.812~0.917)	0.027
miR-16+Cripto-1+ ANXA7	—	97.18	96.00	0.996(0.991~0.998)	0.003

注:—为该项无数据。

2.5 血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平的相关性分析 胃癌患者血清 miR-16 水平与 ANXA7、Cripto-1 水平均呈正相关($r = 0.465$ 、 0.519 ,均 $P < 0.05$)。

3 讨 论

胃癌是现阶段我国最为常见的消化系统恶性肿瘤,目前呈现明显的年轻化趋势,且临床发病率逐年升高。有研究指出,胃癌早期缺乏特异性的体征和症状,导致无法被及时发现,当患者出现临床表现进行诊治时,大多数患者已发展到进展期或发生远处转移,错失了最佳手术时机^[8]。因而有学者指出对胃癌进行早期诊断和评估,并及时预测淋巴结转移对临床救治具有十分重要的意义^[9]。胃癌的发生、发展、转归属于连续性、多阶段、多因素的病理过程,发病机制较为复杂,涉及原癌基因及抑癌基因的遗传学和表观遗传学变化,所以选择合适的生物学指标对胃癌进行判断,具有一定的理论依据^[10]。

有研究表明,miR-16 在多种恶性肿瘤患者体内均呈现异常表达状态,包括 miR-16 在内的多种 miRNA 具有评估恶性肿瘤患者转移、分期和预后的价值^[11]。ANXA7 在恶性胶质瘤、黑色素瘤、多形性胶质母细胞瘤、前列腺癌、肝癌、结直肠癌等多种肿瘤细胞中均呈现明显的异常表达状态,在肿瘤的发生发展过程中起重要作用^[12]。Cripto-1 是从人类 NTERA-2 畸胎瘤 cDNA 中分离和克隆的表皮生长因子家族结构相关蛋白,在胚胎发育过程中起不可或缺的作用^[13],有效参与并调控肿瘤细胞上皮间质转化,促进

肿瘤细胞转移和浸润^[14]。本研究表明胃癌组患者血清 ANXA7、miR-16、Cripto-1 水平高于对照组及非胃癌组,有相关研究显示,在胃癌细胞中 ANXA7 蛋白定位于细胞质和细胞核,呈线网状或黄色颗粒分布,且其在胃癌细胞中的水平明显高于正常细胞^[12-14]。进展期胃癌组血清 miR-16、ANXA7、Cripto-1 水平高于早期胃癌组。进一步分析显示,miR-16、ANXA7、Cripto-1 这 3 项指标联合诊断胃癌的 AUC 为 0.996,有较高的灵敏度和特异度,3 项指标联合诊断胃癌淋巴结转移的 AUC 为 0.996,也有较高的灵敏度和特异度。Pearson 相关分析结果显示,胃癌患者血清 miR-16 水平与 ANXA7、Cripto-1 水平均呈正相关。此前,有相关报道也显示在胃癌组织中多种 miRNA 呈现明显的异常表达状态,且相关 miRNA 水平随淋巴结的转移而升高,因而推测 miRNA 可作为影响胃癌患者病情进展的独立危险因素^[15]。Cripto-1 可与膜相关磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1 特异性结合,激活酪氨酸激酶,并活化 Akt 信号通路,具有促进细胞迁移、增殖和浸润的作用。此外,生长因子 β 配体还可与 Cripto-1 形成复合物,抑制转化生长因子- β 信号传导,加速肿瘤细胞增殖。分析认为 miR-16、ANXA7、Cripto-1 相互影响,且可能随着患者病情进入进展期和淋巴结的转移,患者的肿瘤负荷增大,导致肿瘤组织释放大量的 miRNA 和蛋白质进入血液,引起各指标水平明显升高。3 项指标联合应用可有效诊断胃癌及其淋巴结转移,可从多角度对患者体内肿瘤细胞的变化状态进行有效评估,所评估的结果相对更为精准。

综上所述,血清 miR-16、Cripto-1、ANXA7 在胃癌患者中水平升高,且进展期患者和淋巴结转移患者的上述指标水平明显高于早期胃癌患者和无淋巴结转移患者,表明随着病情加重,血清 miR-16、Cripto-1、ANXA7 水平升高,miR-16 水平与 Cripto-1、ANXA7 水平呈正相关,3 项指标联合应用可有效诊断胃癌及其淋巴结转移,具有较高的临床价值。

参考文献

[1] LI J, DONG D, FANG M J, et al. Dual-energy CT-based deep learning radiomics can improve lymph node metastasis risk prediction for gastric cancer[J]. *Eur Radiol*, 2020, 30(4):2324-2333.

[2] 程思楠,马妮,肖丽,等. FAK 调节胃癌、肝癌细胞恶性行为及相关基因表达的体外研究[J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(2):74-80.

[3] SIRKISOON S R, CARPENTER R L, RIMKUS T, et al. TGLI1 transcription factor mediates breast cancer brain

metastasis via activating metastasis-initiating cancer stem cells and astrocytes in the tumor microenvironment[J]. *Oncogene*, 2020, 39(1):64-78.

[4] 吕品,薛源,王付强. 微 RNA-21 靶向调控 SOX7 基因影响胃癌 BGC-823 细胞增殖、迁移和侵袭[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2019, 25(5):565-570.

[5] HUANG Z, CHEN W, DU Y, et al. Serum miR-16 as a potential biomarker for human cancer diagnosis: results from a large-scale population[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(3):787-796.

[6] HUANG T, GUO Y Z, YUE X, et al. Cripto-1 promotes tumor invasion and predicts poor outcomes in hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(5):571-581.

[7] 张敏,周晓晴,李保华,等. 血清 ANXA7、miR-211 水平及 RAGE 基因多态性与吸烟诱导胃癌 ESD 术后复发的相关性研究[J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(14):1070-1073.

[8] 甘建,纪翠峰,王韶峰,等. 新型胃癌筛查评分系统对本地区早期胃癌患者的筛查价值[J]. *胃肠病学*, 2019, 24(8):475-479.

[9] ONAL C, YILDIRIM B A, SARI S Y, et al. Treatment outcomes of endometrial cancer patients with paraaortic lymph node metastasis: a multi-institutional analysis[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2019, 29(1):94-101.

[10] MULTINU F, DUCIE J A, ERIKSSON A G, et al. Role of lymphadenectomy in endometrial cancer with nonbulky lymph node metastasis: comparison of comprehensive surgical staging and sentinel lymph node algorithm[J]. *Gynecol Oncol*, 2019, 155(2):177-185.

[11] ZHANG H M, LI H, WANG G X, et al. MKL1/miR-5100/CAAP1 loop regulates autophagy and apoptosis in gastric cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2020, 22(5):220-230.

[12] 刘恩智,邵晓光,盛巍. 胶质瘤组织中 let-7b, Anxa7 表达水平变化及其与临床病理特征、预后的关系[J]. *卒中与神经疾病*, 2020, 27(5):639-643.

[13] LI Y, DONG W, YANG H, et al. Propofol suppresses proliferation and metastasis of colorectal cancer cells by regulating miR-124-3p. 1/AKT3 [J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(3):493-504.

[14] LI Q, DAI Z, XIA C M, et al. Suppression of long non-coding RNA MALAT1 inhibits survival and metastasis of esophagus cancer cells by sponging miR-1-3p/CO-RO1C/TPM3 axis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 470(1/2):165-174.

[15] LEE J M, KIM T, KIM E Y, et al. Methionyl-tRNA synthetase is a useful diagnostic marker for lymph node metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(11):1005-1012.