·临床研究·

血浆miRNA甲基化修饰检测在胃癌筛查中的应用

赵乔飞，杨翀，周勇

【摘要】目的 通过测定胃癌与非胃癌患者血浆miRNA甲基化修饰差异，探讨血浆miRNA循环数差异筛查胃癌的可行性。方法 收集2020年1月至2021年9月盐城市第一人民医院同期收治的胃癌与非胃癌病例血浆，提取RNA后行氧化处理并测序，筛选出两组氧化前后甲基化修饰差异显著的miRNA（miR-451、miR-21、miR-92a）；通过茎环加尾法RT-qPCR技术检测上述血浆miRNA，比较两组间ΔCt差异；采用受试者工作特征（ROC）曲线分析miRNAΔCt、癌胚抗原（CEA）、糖抗原（CA）-199用于预测胃癌的可行性，并比较单独检测和联合检测对胃癌的筛查能力。结果 两组血浆miRNA甲基化修饰测序结果差异有统计学意义（$P<0.05$），实验组miR-451ΔCt值高于对照组（$P<0.05$）。ROC曲线显示，CA-199、miRNAΔCt可对胃癌进行预测（均$P<0.05$）；在单独检测中，miR-451ΔCt对胃癌的预测能力最好；在联合检测中，miR-451ΔCt+miR-92aΔCt的预测能力最佳，再联合CA-199检测效能可进一步提高。结论 血浆miRNA甲基化修饰检测可用于胃癌筛查，联合常规的肿瘤指标能提高检测效能。

【关键词】 胃癌；血浆miRNA；3’-2’-Ome
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.07.013
【中图分类号】 R735.6 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2025)07-0711-04

胃癌（gastric cancer，GC）是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤，是目前全球公认的第五大常见癌症和第三大癌症致死原因，尤其在东亚和中欧地区高发。我国人口基数巨大，GC发生数和死亡数在全球占比近一半[1-3]。仅20%的GC患者诊断发现为早期阶段，干预后5年生存率高达67%[4-5]。近期研究表明微小RNA（miRNA）上存在甲基化、乙酰化等多种修饰，3’末端2’-O-甲基化修饰（3’-2’-Ome）就是一种发生在miRNA 3’末端的常见甲基化修饰，对miRNA的产生和降解起到调控作用[6-7]。目前甲基化修饰检测多需要通过测序完成，由于测序方法操作繁琐、成本高昂，无法满足临床筛查的需要，极大程度地限制了甲基化检测在临床中的应用[8]。随着对miRNA甲基化修饰研究的深入，Wang等[9]研究发现miRNA的3’-2’-Ome会由于空间位阻的存在而影响加尾法逆转录实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）的加尾效率。根据以上理论，本文提出一种新的用于疾病筛查的液体活检方法（茎环加尾法RT-qPCR技术）来对具有3’-2’-Ome修饰的血浆miRNA进行检测，并探讨其在GC检测中的应用，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2020年1月至2021年9月盐城市第一人民医院收治的GC患者为实验组，并选择同期非GC患者作为对照组，两组各40例。其中，实验组进一步分为早期和晚期GC患者，各20例；对照组进一步分为癌前病变者和正常体检者，各20例。本研究获得盐城市第一人民医院伦理委员会批准，所有研究者均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 纳入、排除标准 纳入标准：（1）实验组患者为首次行手术治疗者；（2）年龄30～80岁；（3）临床资料完整；（4）实验组患者经病理确诊为原发性GC，早期病变局限于黏膜或黏膜下，晚期病变为已突破黏膜或已发生转移者；（5）对照组癌前病变病例均经病理确诊为胃息肉（gastric polyps，GP）。排除标准：（1）既往有手术史或已进行放化疗等任何肿瘤相关治疗者；（2）伴有严重心肺功能不全等基础疾病者；（3）伴有其他恶性肿瘤者。

作者单位：310005 杭州，杭州市红十字会医院（赵乔飞、杨翀）；盐城市第一人民医院（周勇）
通信作者：赵乔飞，Email：zhao18368140653@163.com

Modern Practical Medicine, July 2025, Vol. 37, No. 7

1.3 方法 抽取空腹外周血 2 ml，离心完成血浆分离后冷冻；随机选取实验组早期 GC、晚期 GC 病例和对照组癌前病变、正常体检者各 5 例血浆进行预实验，完成初步测序筛选。使用 TRIzol™ 试剂（美国 Thermo Fisher 科技公司，批号：15596018CN）提取血浆 RNA，提取后均分成 2 份，1 份进行高碘酸钠氧化处理，1 份不进行处理。对 2 份血浆 RNA 行测序，通过计算测序结果 reads 变化倍数 F 即可得到两组之间发生甲基化的 miRNA 比例的差异。

提取所有研究者血浆 miRNA，使用 miRcute 血清/血浆 miRNA 提取分离试剂盒（北京天根生化科技有限公司，批号：DP503）提取 miRNA；茎环法测定试剂盒采用 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit（by stem-loop）（批号：MR101）、miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix（批号：MQ101），均购自南京诺唯赞生物科技有限公司；加尾法测定试剂盒采用 miScript SYBR Green PCR Kit（批号：339340）、miScript II RT Kit（批号：339345），均购自德国 Qiagen 生物公司。血浆 miRNA 进行茎环法和加尾法 RT-qPCR 实验，将加尾法测得的循环数（Ct 值）减去茎环法的 Ct 值即为两种方法的检测结果差值ΔCt，ΔCt= Ct 加尾−Ct 茎环。

1.4 观察指标 记录两组一般资料，包括性别、年龄、体质量指数和基础疾病等；记录两组间肿瘤指标，包括癌胚抗原（CEA）、糖抗原（CA）199；记录两组血浆 miRNAΔCt 差异，及其对 GC 的预测能力。变化倍数（F）越大即代表实验组血浆中该 miRNA 发生甲基化的比例越高。

1.5 统计方法 采用 SPSS 26.0 和 Graphpad Prism5 统计软件对数据进行统计分析，其中计数资料采用 χ^2 检验；计量资料均数±标准差表示，采用 t 检验。绘制工作特征（ROC）曲线计算曲线下面积（*AUC*），评估血浆 miRNAΔCt 差异对 GC 的预测能力。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料比较 两组年龄、性别、基础疾病及体质量指数差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$）；两组 CEA、CA-199 差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$），见表 1。

2.2 甲基化测序结果 两组甲基化无显著差异（F1、F6≈1）。两组 miR-451、miR-21、miR-92a 的 F 值（F2、F3、F4、F5）≥15，见表 2。

2.3 茎环加尾法ΔCt 比较 实验组血浆 miR-451、miR-21、miR-92a 的ΔCt 值均较对照组升高（均 $P < 0.05$），miR-451ΔCt 值差异最为显著（$P < 0.05$），见图 1。

2.4 预测效能分析 血浆 miRNAΔCt 联合检测的

表 1 两组临床资料比较

指标		对照组（n=40）	实验组（n=40）	t（χ^2）值	P 值
年龄（岁）		62.2±9.0	62.6±9.9	0.17	＞0.05
性别[例（%）]	男	20（50.00）	26（65.00）	（1.84）	＞0.05
	女	20（50.00）	14（35.00）		
体质量指数（kg/m²）		20.48±1.78	20.72±1.58	0.63	＞0.05
基础性疾病[例（%）]	有	7（17.50）	6（15.00）	（0.09）	＞0.05
	无	33（82.50）	34（85.00）		
肿瘤指标	癌胚抗原（ng/ml）	1.68±0.73	2.27±1.48	2.24	＜0.05
	糖类抗原 199（U/ml）	7.77±2.89	12.82±7.39	4.03	＜0.05

表 2 miRNA 甲基化测序结果

miRNAs	miR-451	miR-92a	miR-21	miR-126	let-7a	let-7b
F1（t1/t2）	0.77	0.66	0.92	0.92	0.65	0.76
F2（t1/t3）	69.15	24.81	20.56	0.37	5.94	0.34
F3（t1/t4）	77.94	19.02	16.07	0.31	2.88	0.23
F4（t2/t3）	89.99	37.73	22.45	0.40	9.19	0.45
F5（t2/t4）	101.43	28.93	17.55	0.34	4.46	0.31
F6（t3/t4）	1.13	0.77	0.78	0.83	0.49	0.68

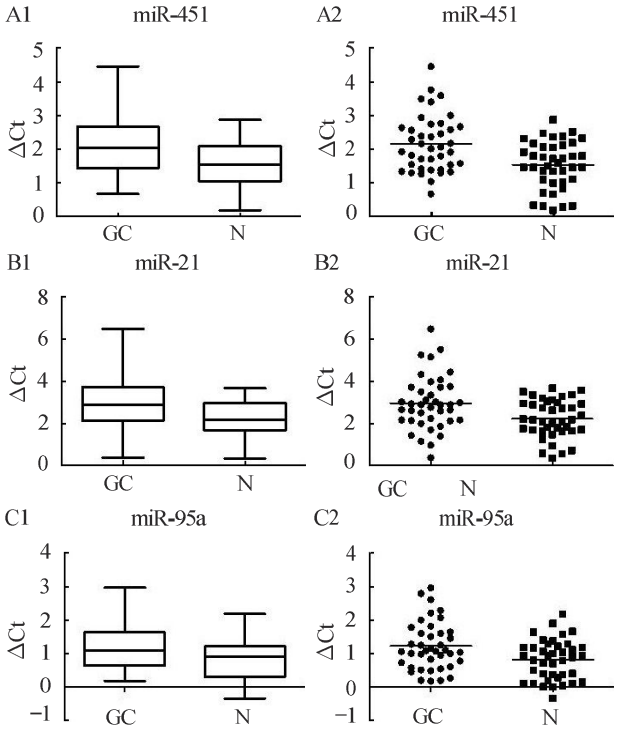
注：miRNA 为微小核糖核酸；t1、t2、t3、t4 分别代表早期胃癌、晚期胃癌、癌前病变和正常人群血浆 miRNA 氧化前后发生甲基化的比例；F1～F6 即为两类人群之间甲基化结果测序差异，F 值越大表明甲基化差异越显著。

AUC 值明显高于单独检测，miR-451ΔCt +miR-92a ΔCt *AUC* 值最高，灵敏度和特异度均为 70%；miR-21ΔCt+miR-92aΔCt 次之，灵敏度为 62.5%，特异度为 72.5%；miR-451ΔCt+miR-21ΔCt 的 *AUC* 值与 miR-451ΔCt 相同，灵敏度为 40%，特异度为 90%；CA-199 的 *AUC* 值较血浆 miRNA 甲基化修饰的单独检测高，但又低于联合检测，最灵敏度和特异度为 60%、82.5%，见表 3。

3　讨论

GC 是常见的消化道肿瘤，其发生率和死亡率在所有肿瘤中均位于前列，我国作为人口大国，GC 发生数和死亡数一直居高不下，带来了严重的公共卫生压力。临床研究指出 GC 在中老年人群高发，其中男性发生率为女性的 1.5 ～ 3 倍，与本研究结果一致[10-12]。现阶段 GC 筛查主要采用胃镜，但其作为侵入性检查，患者在检查时感受较为痛苦，导致人群对胃镜检查接受度不高，给大范围的 GC 筛查造成困难[13]。与胃镜活检相比，液体活检技术作为无创性检查，操作更为简便，具有创伤小、成本低及依从性好等优点。但是，当前仍以传统的血浆肿瘤标志物为主，漏诊误诊率较高，研究表明 CEA、CA-199 等现有肿瘤指标无法很好地完成 GC 筛查[14-15]。

miRNA 作为基因表达调控的关键分子，肿瘤细胞分泌循环 miRNA 作为一种无创诊断标志物越来越受到人们的重视[16-17]。近来，Liang 等[18]研究发现 miRNA 分子发生甲基化修饰可以使其免受细胞中多种核酸外切酶、连接酶、末端转移酶以及聚合酶等多种酶的攻击，在 miRNA 的稳定和功能调节方面均具有重要意义；同时，Wang 等[9]发现 miRNA 3’-2’-Ome 修饰影响加尾效率，并与 miRNA 茎环加尾法结果ΔCt 呈正相关。以上这些研究都支持血浆 miRNA 3’-2’-Ome 修饰检测可用于 GC 筛查，据此本研究尝试通过茎环加尾法 RT-qPCR 技术检测血浆 miRNA 3’-2’-Ome 修饰进行 GC 筛查。结果显示，



注：对实验组和对照组各 40 例血浆 miRNAΔCt 值进行统计分析，GC 为实验组，N 为对照组；A1、A2 为 miR-451 的箱线图和散点图，B1、B2 为 miR-21 的箱线图和散点图，C1、C2 为 miR-92a 的箱线图和散点图；与对照组相比，实验组血浆 miR-451、miR-21、miR-92a 的ΔCt 值较对照组升高（均 $P < 0.05$），miR-451ΔCt 值差异最为显著（$P < 0.05$）

图 1　血浆 miRNA 茎环加尾法结果箱线图、散点图

表 3　预测效能分析

指标	*AUC*	标准误	*OR* 值	95%*CI*	
				下限	上限
CEA	0.596	0.066	0.138	0.468	0.725
miR-92a	0.655	0.061	0.017	0.537	0.774
miR-21	0.661	0.061	0.013	0.542	0.780
miR-451	0.693	0.058	0.003	0.578	0.807
miR-451+miR-21	0.693	0.058	0.003	0.578	0.807
CA-199	0.710	0.060	0.001	0.593	0.827
miR-21+miR-92a	0.729	0.056	0.000	0.620	0.838
miR-451+miR-92a	0.744	0.055	0.000	0.636	0.851
miR-451+miR-21+miR-92a	0.744	0.055	0.000	0.636	0.851
miR-451+miR-92a+CA-199	0.781	0.051	0.000	0.681	0.882

注：miR-451、miR-21、miR-92a 分别代表各血浆 miRNAΔCt 值结果

血浆miRNA检测值ΔCt均表现为正值，即加尾法Ct值结果均大于茎环法，两组血浆miRNAΔCt值差异有统计学意义（$P < 0.05$），其中miR-451ΔCt值差异最为显著。表明血浆miRNA的甲基化修饰检测对现有的GC检测方式有着很好地补充增强作用，可以与现有的血清学指标进行联合检测以提高GC诊断灵敏度和特异性。

综上所述，血浆miRNA的甲基化修饰检测具有成为GC新的血清学筛查指标的价值，可以提高现有的肿瘤指标对GC的检出率。若能在正常人、癌前病变患者和不同阶段GC患者中系统完善地阐明血浆miRNA 3'-2'-Ome修饰差异，将极大地帮助阐明GC发病机制；后续将通过进行多中心大样本的临床研究，建立起一个规范科学化标准，在普通人群中进行无介入健康筛查，实现胃癌的早诊断、早治疗。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 赵乔飞：实验操作、论文撰写；杨翀：数据整理、统计学分析；周勇：研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] KUMAR S, MANTERO A, DELGADO C, et al. Eastern European and Asian-born populations are prone to gastric cancer: An epidemiologic analysis of foreign-born populations and gastric cancer[J]. Ann Gastroenterol, 2021, 34(5): 669-674.

[3] GAO K, WU J. National trend of gastric cancer mortality in China (2003-2015): A population-based study[J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 24.

[4] MACHLOWSKA J, BAJ J, SITARZ M, et al. Gastric cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4012.

[5] HUANG R J, HWANG J H. Improving the early diagnosis of gastric cancer[J]. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2021, 31(3): 503-517.

[6] MOTORIN Y, MARCHAND V. Analysis of RNA modifications by second- and third-generation deep sequencing: 2020 update[J]. Genes (Basel), 2021, 12(2): 278.

[7] LI Q H, HE W L, WAN G H. Methyladenosine modification in RNAs: Classification and roles in gastrointestinal cancers[J]. Front Oncol, 2021, 10: 586789.

[8] MOTORIN Y, MARCHAND V. Detection and analysis of RNA ribose 2'-O-methylations: Challenges and solutions[J]. Genes (Basel), 2018, 9(12): 642.

[9] WANG N, QU S, SUN W, et al. Direct quantification of 3' terminal 2'- O-methylation of small RNAs by RT-qPCR[J]. RNA, 2018, 24 (11): 1520-1529.

[10] SANTUCCI C, CARIOLI G, BERTUCCIO P, et al. Progress in cancer mortality, incidence, and survival: A global overview[J]. Eur J Cancer Prev, 2020, 29(5): 367-381.

[11] ZHANG T C, CHEN H, YIN X L, et al. Changing trends of disease burden of gastric cancer in China from 1990 to 2019 and its predictions: Findings from Global Burden of Disease Study[J]. Chin J Cancer Res, 2021, 33(1): 11-26.

[12] LYONS K, LE L C, PHAM Y T, et al. Gastric cancer: Epidemiology, biology, and prevention: A mini review[J]. Eur J Cancer Prev, 2019, 28(5): 397-412.

[13] TAO M G, ZHOU X B, HU M Q, et al. Endoscopic submucosal dissection versus endoscopic mucosal resection for patients with early gastric cancer: A meta-analysis[J]. BMJ Open, 2019, 9(12): e025803.

[14] SEKIGUCHI M, MATSUDA T. Limited usefulness of serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels for gastrointestinal and whole-body cancer screening[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 18202.

[15] FENG F, TIAN Y Z, XU G H, et al. Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 737.

[16] SO J B Y, KAPOOR R, ZHU F, et al. Development and validation of a serum microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer in a high-risk population[J]. Gut, 2021, 70(5): 829-837.

[17] OHTSUKA M, IWAMOTO K, NAITO A, et al. Circulating microRNAs in gastrointestinal cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13 (13): 3348.

[18] LIANG H W, JIAO Z C, RONG W W, et al. 3'-Terminal 2'-O-methylation of lung cancer miR-21-5p enhances its stability and association with Argonaute 2[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(13): 7027-7040.

收稿日期：2025-02-11

（本文编辑：吴迪汉）