

综述

MicroRNA作为早期胃癌筛查潜在生物标志物的研究进展

田蕴珂, 张同悦, 邵晓娜, 朱悦楠, 张星亿, 沈建伟*

(宁波大学附属李惠利医院, 宁波市医疗中心李惠利医院, 宁波 315040)

摘要: 胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。早期诊断是胃癌患者预后良好的关键点。寻找胃癌筛查生物标志物有助于胃癌的早期识别并改善临床管理。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类功能强大的基因调节因子, 其在癌前病变及胃癌黏膜中的差异表达特征可用于提示不同的肿瘤发展阶段。此外, miRNA在血液、胃液、尿液等体液中的高稳定性及高敏感性也使其成为非侵入性检测的目标对象, 其可作为胃癌内窥镜检查前的风险评估工具, 是潜在的筛查标志物。本文通过简述miRNA在组织及不同体液中的筛查效能、作为筛查标志物的临床转化现状及当前的检测技术, 讨论了miRNA作为早期胃癌筛查标志物的临床应用价值, 为胃癌的早期筛查与诊断提供思路。

关键词: 胃癌; microRNA; 生物标志物; 筛查; 早期诊断

Research progress of microRNA as a potential biomarker for early gastric cancer screening

TIAN Yunke, Zhang Tongyue, SHAO Xiaona, ZHU Yuenan, ZHANG Xingyi, SHEN Jianwei*

(The Affiliated Lihuili Hospital of Ningbo University, Ningbo Medical Center Lihuili Hospital, Ningbo 315040, China)

Abstract: Gastric cancer is one of the most common malignant tumors in the world. Early diagnosis is the key point for patients with gastric cancer to get good prognosis. The research for screening biomarkers of gastric cancer can contribute to the early recognition of gastric cancer and improve the clinical management. MicroRNA (miRNA) is a powerful class of gene regulator, and its differential expression profiles in gastric mucosa of precancerous lesion and tumor suggest different stage of tumor development patterns. In addition, the high stability and sensitivity of miRNAs in body fluids, such as blood, gastric fluid, and urine, make it a target for non-invasive detection. It can be used as a risk assessment tool for gastric cancer endoscopy and a potential screening biomarker. This essay discusses the clinical application value of miRNA as a screening biomarker for early gastric cancer by briefly describing its screening efficacy in tissues and different body fluids, the current clinical translation status as a screening biomarker, and current detection technologies, providing ideas for early screening and diagnosis of gastric cancer.

Key Words: gastric cancer; microRNA; biomarker; screening; early diagnosis

胃癌是原发于胃的上皮源性恶性肿瘤, 其发病机制复杂, 与遗传、饮食、感染和环境等因素密

切相关^[1]。早期胃癌因缺乏特异性临床表现而难以识别, 进展期胃癌因肿瘤局部浸润及远处转移而

收稿日期: 2024-01-08

基金项目: 宁波市重点技术研发项目(2023Z159)

第一作者: E-mail: tianyunke_kk@163.com

*通信作者: E-mail: shenjiw1184@126.com

预后不良。因此, 提高胃癌早期诊断的准确性, 对于患者的诊治与预后十分重要。

胃癌的诊查手段包括影像学检查、组织病理学检查、实验室检查等。内镜下病理活检是胃癌诊断的金标准, 但受限于侵入性的检查方式和单次活检部位, 检查结果无法反映胃癌患者肿瘤异质性及肿瘤演变的动态过程^[2]。而实验室检验指标包括癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原(carbohydrate antigen, CA)199、CA724、CA125、CA242、胃蛋白酶原 I (pepsinogen I, PG I)、PG II、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)等, 对胃癌诊断的特异性和敏感性不足, 尚不能在胃癌早期及时进行疾病预警^[3,4]。因此, 寻找无创、特异性及敏感性高的肿瘤筛查生物标志物是胃癌早期诊断相关研究的重点。

微小RNA(microRNA, miRNA)是由17~25个核苷酸组成的内源性短链非编码RNA, 主要通过与其信使RNA(message RNA, mRNA)的3'非翻译区结合, 介导mRNA的降解或翻译, 从而发挥转录后基因表达所调控的生物学功能, 影响发育、分化、炎症、癌症等生物学过程发生^[5]。近年来, miRNA作为早期胃癌筛查标志物的相关研究受到了学者们的关注, 其在幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*,

Hp)感染性胃炎、萎缩性胃炎、肠化生等癌前疾病以及胃黏膜早期异型增生、浸润性胃癌中的差异表达特征对胃组织病理判定具有一定的指向作用^[6]。另有研究表明, miRNA可以在血液、胃液及尿液等体液中稳定存在^[7], 这使miRNA作为早期胃癌非侵入性筛查标志物成为可能。

本文讨论了miRNA作为生物标志物在早期胃癌筛查中的研究进展(图1)。通过阐述miRNA在胃黏膜组织及不同体液中的筛查诊断价值、miRNA的检测技术现状、miRNA检测产品的临床转化应用等内容探讨miRNA的应用价值, 以期胃癌的早期诊断提供思路。

1 MicroRNA与胃癌发生发展

MiRNA是参与肿瘤发生发展的信号通路调节剂, 通过与通路中的某些基因互作, 抑制或诱导肿瘤增殖、侵袭、迁移、集落形成等生物学过程发生^[8]。例如, miR-101-2、miR-125b-2和miR-451a可通过调节PI3K/AKT/mTOR通路抑制肿瘤生长, 是潜在的肿瘤抑制因子^[9]。MiR-379可靶向AKT基因调控胃癌上皮-间充质转化和肿瘤转移^[10]。MiR-27可触发由肿瘤抑制基因APC表达介导的Wnt/ β -Catenin通路来引发上皮-间充质转化过程^[11]。

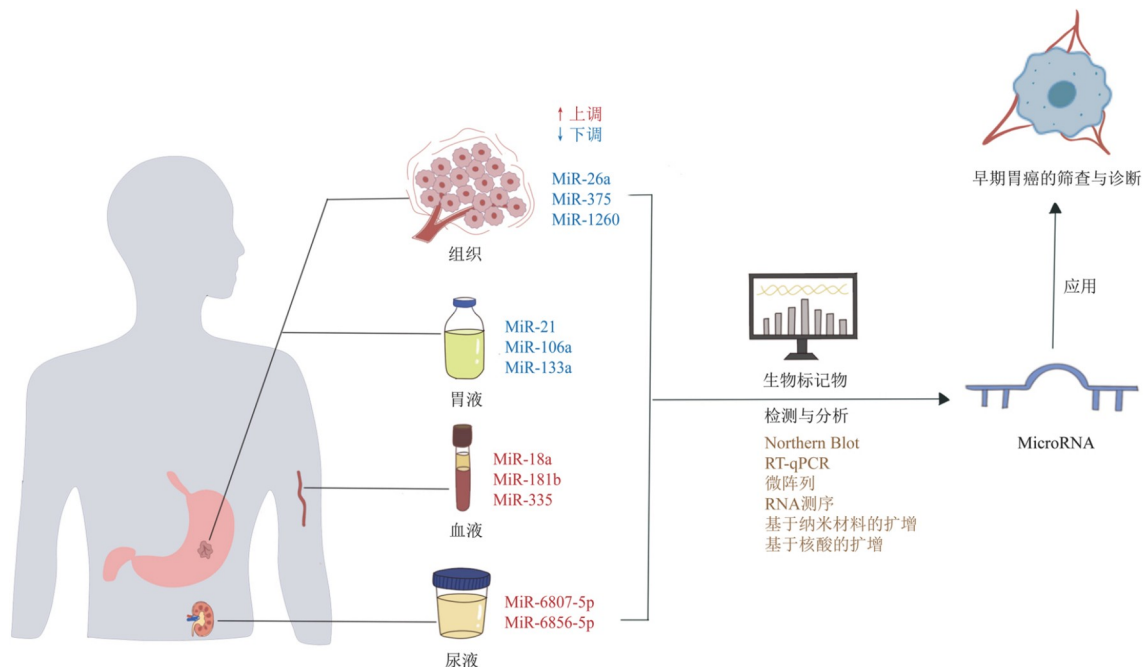


图1 MicroRNA作为早期筛查生物标志物在胃癌中的应用

MiRNA对信号通路调控的相关研究提供了有关胃癌发生机制的具体信息，也为胃癌早期筛查生物标志物的建立提供了理论依据。

2 MicroRNA与胃癌早期筛查

在癌症预防与早期诊断的精准医学时代，识别早期分子事件和临床适用的生物标志物十分重要。异常miRNA表达模式可对胃癌前病变及早期胃癌进行风险预警，从而实现更精确和个体化的疾病监测。胃黏膜组织及体液是miRNA检测可靠的样本来源，为其成为理想的癌症筛查生物标志物提供了可能(表1)。

2.1 MicroRNA与胃癌早期筛查组织诊断价值

MiRNA在癌细胞中具有特异性表达谱，可通过细胞释放作用进入体液循环，成为体液检测胃

癌生物标志物的对象之一。近年来，学者们从胃黏膜组织检测到的miRNA入手对其作为胃癌筛查生物标志物的价值进行了探索。

为了实现早期胃癌分子事件的识别，Kim等^[12]基于胃易癌环境理论对胃非肿瘤黏膜进行了研究。易癌环境是一种组织病理学正常但伴有不可见的遗传或表观遗传改变，并存在肿瘤恶性转变趋势的微环境。MiRNA参与胃癌的发生发展，但其与胃癌易癌环境的关系尚未得到明确证实。基于此，研究者对正常胃黏膜miRNA表达及胃癌患者非肿瘤组织及肿瘤组织的miRNA表达情况进行了比较。结果表明，与正常胃黏膜相比，早期非肿瘤性胃黏膜存在miRNA表达水平下调(miR-26a、miR-375、miR-1260)，且进一步的基因研究证明上述miRNA所指向的靶基因失调与胃癌发生密切相关。

表 1 MicroRNA在胃癌早期筛查中的应用

MiRNA	鉴别	来源	敏感性/特异性	AUC值	参考文献
MiR-26a	正常黏膜、癌旁黏膜	组织	—	0.80	[12]
MiR-375	正常黏膜、癌旁黏膜	组织	—	0.82	[12]
MiR-1260	正常黏膜、癌旁黏膜	组织	—	0.87	[12]
MiR-26a、miR-1260	正常黏膜、癌旁黏膜	组织	—	0.89	[12]
MiR-7	Hp感染相关胃癌、癌旁黏膜	组织	—	0.97	[13]
MiR-153	Hp感染相关胃癌、癌旁黏膜	组织	—	0.93	[13]
MiR-18a、miR-181b、miR-335	正常黏膜、早期胃癌	血清	72.0%/88.0%	0.85	[14]
外泌体miR-590-5p	正常黏膜、胃癌	血清	63.7%/86.0%	0.81	[15]
Hsa-miR-129-1-3p	正常黏膜、萎缩性胃炎、胃癌	血浆	—	正常黏膜与萎缩性胃炎、正常黏膜与胃癌、萎缩性胃炎与胃癌(0.68、0.83、0.78)	[16]
Hsa-miR-196a-5p	正常黏膜、萎缩性胃炎、胃癌	血浆	—	正常黏膜与萎缩性胃炎、正常黏膜与胃癌、萎缩性胃炎与胃癌(0.88、0.93、0.66)	[16]
MiR-7641、miR-425-5p、miR-1180-3p、miR-122-5p	正常黏膜、胃癌	血浆	—	0.79	[17]
MiR-425-5p、miR-24-3p、miR-1180-3p、miR-122-5p	正常黏膜、早期胃癌	血浆	—	0.83	[17]
Hsa-miR-320a	正常黏膜、胃癌	血浆	99.1%/88.8%	0.96	[18]
Hsa-miR-1260b	正常黏膜、胃癌	血浆	97.4%/89.6%	0.97	[18]
Hsa-miR-6515-5p	正常黏膜、胃癌	血浆	92.2%/88.7%	0.95	[18]
MiR-21	非癌黏膜、胃癌	胃液	85.7%/97.8%	0.97	[19]
MiR-106a	非癌黏膜、胃癌	胃液	73.8%/89.3%	0.87	[19]
MiR-133a	非癌黏膜、胃癌	胃液	85.9%/84.8%	0.91	[20]
MiR-421	非癌黏膜、胃癌	胃液	71.4%/71.7%	0.77	[20]
MiR-129-1-3p、miR-129-2-3p	非癌黏膜、胃癌	胃液	68.7%/71.9%	0.66	[21]
MiR-6807-5p、miR-6856-5p	正常黏膜、I期胃癌	尿液	—	0.68	[22]

注：曲线下面积(area under the curve, AUC)；—：未检测

进一步的研究发现, 在胃癌黏膜与癌旁非肿瘤黏膜中可检测到相同的miRNA表达(miR-1260), 且其在非肿瘤黏膜中的表达水平随着肿瘤距离的增大而减少。上述结果表明, 在靠近胃癌的非癌黏膜中已经形成了易癌环境, 失调的miRNA存在于易癌环境, 并参与胃癌的发生。早期非肿瘤性胃黏膜中出现失调的miRNA, 可被当作预测癌症易感环境的生物标志物, 以实现早期胃癌发生的有效监测。

为了实现胃癌癌前病变至癌症阶段肿瘤发生的早期监测, Min等^[23]观察了小鼠和人胃黏膜组织中miR-30a自正常胃黏膜到解痉多肽表达化生(spasmolytic polypeptide expressing metaplasia, SPEM)和早期胃癌的表达变化。SPEM作为一种胃黏膜化生方式可进展至胃异型增生, 最终导致胃癌发生。MiR-30a是胃癌中显著下调的miRNA, 它作为肿瘤抑制因子, 可通过靶向*IGF1R*致癌基因抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和耐药性。研究发现, miR-30a在主细胞转分化为SPEM的过程中下降, 其表达水平在胃癌早期持续降低, 在进展期胃癌阶段保持不变。同时发现, miR-30a通过靶向*ITGA2*基因在胃中发挥肿瘤抑制功能, miR-30a-*ITGA2*轴的协调可能是胃癌前病变向肠型胃癌发展的重要机制。以上结果提示, 检测miR-30a水平可能为胃癌发生进行早期预警。

Song等^[13]从胃癌发生的高危感染因素入手, 对异常miRNA表达在Hp感染相关胃癌中的诊断作用进行了研究。细胞毒素相关基因A(*CagA*)是Hp慢性感染导致胃黏膜癌变的关键影响因素, 其通过与胞内蛋白相互作用, 扰乱胞内信号通路, 促进宿主细胞的恶性转化^[24]。基于上述理论, 该研究先通过基因测序技术鉴定出在Hp感染胃癌组织中特异性表达的miRNA, 再通过基因敲除实验发现与*CagA*作用相关的miR-153和miR-7。功能研究实验进一步发现, miR-7和miR-153可以促进细胞凋亡和自噬, 抑制Hp感染胃黏膜细胞的炎症反应及胃癌细胞的增殖作用, 证实miR-7和miR-153的下调参与Hp *CagA*诱导胃癌的发生与进展, 其联合可作为Hp感染相关性胃癌早期诊断的潜在候选标志物。

上述研究提示, miRNA在胃癌发生阶段存在

明显的失调, 检测与胃癌风险相关的miRNA黏膜表达谱, 有助于对癌症发展进程进行精准监测, 也为体液miRNA的检测有效性提供了理论依据。

2.2 MicroRNA与胃癌早期筛查体液诊断价值

液体活检技术在胃癌的应用研究中广受关注。无创液体活检需要的样本量少, 可重复性高, 可通过动态监测肿瘤标志物的实时变化追踪疾病发展的肿瘤负荷和遗传改变。MiRNA能在血液、胃液、尿液等多种体液中稳定存在^[25]。因此, 以液体活检技术为基础寻找对早期胃癌具有筛查效益的miRNA具有很大的研究应用价值。

2.2.1 MicroRNA与胃癌早期筛查血液诊断价值

血液样本采样方便、创伤性小、成本低, 在临床中可应用于较大规模的筛查。近年来, 诸多研究探讨了血液miRNA作为胃癌筛查生物标志物的应用价值。

Jzumi等^[14]建立了早期胃癌血清3-miRNA检测组合(miR-18a、miR-181b、miR-335), 在多中心患者队列的回顾性研究和前瞻性验证中发现, 与传统的肿瘤标志物CEA和CA199相比, 该组合识别健康患者与I期胃癌患者具有更高的诊断准确性, 为无创胃癌早期监测提供了高效经济的检测方式。

Varkalaite等^[16]发现, hsa-miR-129-1-3p和hsa-miR-196a-5p在胃癌发生级联阶段逐渐失调。研究者基于下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)及定量实时聚合酶链锁反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)数据对健康受试者、慢性萎缩性胃炎、胃癌患者的血浆样本进行了分析, 曲线下面积(area under the curve, AUC)结果提示, 可依据hsa-miR-196a-5p表达水平对上述三个队列进行区分。此外, 与慢性萎缩性胃炎相比, hsa-miR-129-1-3p的表达量在胃癌中显著下调。综上, hsa-miR-129-1-3p和hsa-miR-196a-5p的异常表达可在癌变早期对胃癌进行风险预警。

除此之外, Zhu等^[17]发现, 通过分析血浆miR-425-5p、miR-1180-3p、miR-122-5p、miR-24-3p和miR-4632-5p表达可对良性胃炎、早期胃癌、进展期胃癌患者进行区分。Zheng等^[15]发现, 可根据外泌体miR-590-5p表达水平区分健康受试者与胃癌患者。Yao等^[18]通过分析血浆样品的miRNA谱鉴定了hsa-miR-320a、hsa-miR-1260b、hsa-miR-6515-5p三

种miRNA以区分胃癌病例和非胃癌病例。以上研究证实了循环miRNA作为胃癌非侵入性筛查标志物的可行性,通过分析目标miRNA的表达水平可进行胃癌的风险分层,进一步提高胃癌的检测效能。

2.2.2 MicroRNA与胃癌早期筛查胃液诊断价值

胃液是另一种可用于检测胃癌miRNA表达的生物体液。MiRNA存在于细胞质、细胞核,可通过囊泡结构分泌到胃液中,参与肿瘤微环境的串扰过程^[26]。携带miRNA的微囊泡结构可通过抵抗胃内源性核酸酶及胃酸消化,使miRNA在胃液中保持高度稳定。由于与癌灶直接接触,胃液中来自胃癌细胞和微环境细胞的miRNA较其他体液浓度更高^[25]。因此,胃液miRNA作为具有一定检测灵敏度及特异性的胃癌筛查标志物具有较高的研究价值。

鉴于上述研究基础,学者们对胃液miRNA进行了相关研究。Skryabin等^[27]发现,胃癌患者细胞外囊泡miR-135b-3p、miR-199a-3p较健康志愿者显著增加,而miR-451a水平降低。Cui等^[19]发现,胃癌患者胃液中的miR-21和miR-106a表达水平与胃良性疾病,如浅表性胃炎、萎缩性胃炎、胃溃疡相比显著降低,而两者阳性检出率均高于胃液CEA,联合胃液miR-21、miR-106a、CEA检测早期胃癌,敏感性可高达85.7%。另有研究表明,由胃液样本检出的miR-133a^[20]、miR-129-1-3p及miR-129-2-3p^[21]、miR-421^[26]也可对早期胃癌进行诊断。上述研究结果都论证了胃液miRNA在早期胃癌诊断中具有较好的研究应用价值。

胃液是用于检测胃癌miRNA的良好体液,其与胃癌癌灶直接接触,较血液等体液而言可接收到更多肿瘤特异性miRNA。与此同时,胃液miRNA检测避免了循环稀释作用与肝脏清除作用所造成的miRNA缺失,一定程度上提高了胃癌早期筛查的敏感性,可作为内镜检查的补充项目,从微观层面捕捉到疾病发生的早期信号^[20]。胃液miRNA作为疾病特异性生物标志物极具应用潜力。

2.2.3 MicroRNA与胃癌早期筛查尿液诊断价值

尿液也是用于检测胃癌miRNA的体液之一。源自胃黏膜组织的miRNA通过细胞分泌、胃黏膜上皮吸收、血液循环等过程运输至全身。循环

miRNA通过与RNA结合蛋白连接或经微泡沉淀等生物学过程被携带至肾脏并最终排入尿液^[22]。

尿液miRNA在常规储存条件下不易降解^[28],其储存稳定性和尿液检测的无创性及低成本性使得尿液miRNA成为胃癌筛查理想的生物标志物。

有学者对尿液miRNA胃癌检测的可行性进行了探索。Iwasaki等^[22]对健康受试者和胃癌患者的尿液miRNA进行了检测,结果发现,相较于健康对照而言,胃癌患者尿液miR-6807-5p和miR-6856-5p的表达水平显著升高,在根治性胃切除后,两者的表达水平可降低至检测不到的水平,将miR-6807-5p和miR-6856-5p作为诊断标志物组合可诊断出I期胃癌患者(AUC: 0.748)。另有研究表明,胃癌患者尿中miR-21-5p水平升高,行胃癌根治术后降低^[29]。上述研究结果证实了尿液miRNA的胃癌检测有效性。

尿液miRNA生物标志物组合可以为早期识别及检测胃癌提供帮助。然而,目前的研究结果都是基于小样本人群的试点研究,未来仍需扩大研究规模,对尿液miRNA的诊断潜力进行验证。

3 MicroRNA在胃癌病理及分期中的诊断价值

传统的胃癌病理分型依据肿瘤起源、腺体结构、细胞形态等特征,可将胃癌分为肠型胃癌、弥漫型胃癌、混合型胃癌等。新型胃癌分型方式依据全基因组分子特征,可将胃癌分为EB病毒阳性型、微卫星不稳定型、基因组稳定型、染色体不稳定型^[30]。虽然miRNA与胃癌的发生发展密切相关,但目前尚无证据支持miRNA可进行胃癌病理的精准判断。然而,有学者提出可应用胃癌miRNA表达谱所提供的分子微观信息辅助进行胃癌病理判断。例如, Camargo等^[31]将miRNA测序与全基因组、全外显子组、mRNA测序技术运用于EB病毒阳性型胃癌的判定,通过测序结果确定了可用于区分EB病毒阳性型胃癌与其他分子亚型胃癌的检测截断值,同时通过常规病毒核酸原位杂交技术验证了该检测截断值的诊断准确性。除此之外, Ueda等^[32]发现,不同的miRNA表达谱可提示不同的胃癌组织学亚型,如弥漫性胃癌中有8种miRNA(miR-145、miR-133a、miR-125b、miR-

99a、miR-105、miR-143、miR-199a、miR-100)表达增加, 肠型胃癌中有4种miRNA(miR-202、miR-494、miR-373、miR-498)表达增加, 通过上述miRNA表达特征可侧面推断胃癌的病理类型。上述研究结果证明了miRNA在胃癌病理诊断中提供的辅助作用。

MiRNA表达与胃癌分期诊断也存在一定的关联。近年来, 一些学者对miRNA与胃癌分期间的关系进行了探索, 如miR-647^[33]、miR-1^[34]、miR-146a^[34]、miR-335^[34]、miR-144-3p^[35]等miRNA表达程度被发现与肿瘤体积、肿瘤浸润深度、淋巴结受累、血管浸润、远处转移等多个因素相关, 某些miRNA如miR-125b、miR-199a和miR-100在胃癌组织中的表达水平随着胃癌分期进展而增加, 与胃癌的恶性程度呈正相关^[32]。综上所述, 不同分期胃癌在miRNA表达谱上存在的差异, 反映了胃癌的侵袭性、转移能力等多方面的特征。通过分析miRNA的表达谱, 可以间接地了解胃癌的分期情况。

4 MicroRNA的胃癌早期筛查临床转化现状

虽然miRNA作为胃癌早筛生物标志物具有明

显的优势, 但目前成功进入临床研发的miRNA仍较少。2020年, 全球首个应用于胃癌早筛的血液检测产品“GASTROClear”在新加坡上市, 产品主要通过检测血液12-miRNA(miR-140、miR-183、miR-30e, miR-103a、miR-126、miR-93、miR-142、miR-21、miR-29c、miR-424、miR-181a、miR-340)的综合表达情况, 评估健康人群罹患胃癌的风险。该产品的多变量评估模式一定程度降低了肿瘤异质性带来的检测难题, 使得胃癌检出准确性高达87%, 高于以往用于胃癌筛查的其他生物标志物(胃蛋白酶原、CEA、CA19-9等)^[36]。MiRNA从实验室到临床的应用转化需要克服检测平台及检测技术等多重挑战, 未来仍需做出更多尝试。

5 MicroRNA的检测技术现状

MiRNA作为胃癌早筛生物标志物具有重要价值, 因此, 探索具有良好检测性能的miRNA检测技术也成为近年来学者们关注的主题之一。下文将对miRNA的检测技术现状进行简单的介绍(表2)。

目前的miRNA检测技术可以分为传统方式和

表2 MicroRNA的检测技术现状

检测方式	检测原理	检测策略	优点	缺点
Northern blot	RNA通过电泳分离转移至固相载体, 应用DNA探针杂交鉴定其片段大小及含量	探针杂交	(1)可区分成熟及前体miRNA; (2)可检测miRNA的相对分子大小及丰度; (3)可允许探针的部分不配对性; (4)杂交后的膜经处理除去探针后可再次使用	(1)灵敏度低、特异性差; (2)RNA消耗量大; (3)操作繁琐、耗时; (4)半定量、低通量
RT-qPCR	以RNA为模板, 通过反转录得到cDNA, 再通过荧光定量PCR进行核酸定量检测, 可通过标准曲线对原始模板进行定量	扩增	(1)检测灵敏度高、特异性强; (2)样品消耗量少; (3)操作快速、简单	(1)引物设计困难; (2)检测假阳性率高; (3)RNA准确定量依赖于多个步骤的熟练衔接
微阵列	提取总RNA, 构建cDNA文库, 与带荧光标记的DNA探针在固相表面杂交。通过检测不同基因探针的荧光强度获得各基因的相对表达谱	探针杂交	(1)高通量; (2)探针可区分成熟及前体miRNA; (3)检测无需分离miRNA, 减少损耗	(1)检测准确性与已知序列及探针杂交的亲合力有关; (2)常伴随探针交叉杂交、非特异性杂交等; (3)无法检测结构变异和新基因
RNA测序	提取总RNA, 构建cDNA文库, 获得测序序列后比对参考基因组, 定量基因表达	扩增	(1)高通量; (2)不依赖预先设计的探针或已知基因序列	(1)成本高; (2)存在二代测序的非特异性扩增
基于纳米材料的扩增	将纳米材料作为生物传感器助力核酸扩增。新型纳米材料包括金纳米颗粒、银纳米颗粒、铜纳米颗粒、碳纳米颗粒等	电化学、光学传感	(1)检测灵敏度高、特异性强; (2)表面积大、导电性优异、化学稳定性强	技术复杂, 投入使用仍需探索实践
基于核酸的扩增	核酸扩增方式包括滚环扩增、基于双链特异性核酸酶的扩增、环介导的等温扩增、指数扩增、链位移扩增等	杂交、分离、扩增	核酸产物可以通过多种信号读出技术进行检测	技术复杂, 投入使用仍需探索实践

新方式两大类。传统检测方式包括Northern Blot、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR)、微阵列技术、RNA测序等^[37], 这些检测以RNA提取为起点, 技术依赖于扩增策略、互补探针、杂交或测序。新的miRNA检测技术借助于新型生物材料或新型扩增技术以实现检测性能的提升, 技术包含基于纳米材料的扩增、基于核酸的扩增等^[38]。上述检测策略在一定程度上弥补了传统检测方式的不足, 如样品制备步骤长、特异性和敏感性低等^[39], 为胃癌miRNA的研究与应用提供了很大的助力。

近年来, 研究者们也尝试将新检测技术应用于科学研究中。Zhou等^[40]提出一种将CRISPR/Cas12a系统与滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)相结合的miRNA检测方式(T-ERCA/Cas12a), 该方法通过引入具有两个酶识别位点的哑铃探针, 将指数扩增与RCA相结合, 应用于miR-155的灵敏检测。MiR-155靶标是触发T-ERCA反应实现指数循环扩增以产生大量环状单链DNA的激活剂。环状单链DNA可进一步激活Cas12a以切割附近的荧光探针从而放大miR-155的检测信号。因此, 基于T-ERCA的CRISPR/Cas12a系统可以实现核酸检测的双重扩增效应, 完成对miR-155的高灵敏度检测。Cai等^[41]采用金纳米颗粒(AuNP) RNA偶联物比色检测胃癌中的miR-148a, 在该检测系统中, AuNP与RNA探针通过金硫键(Au-S), 以尾对尾的方式排列在靶RNA上, 当引入miR-148a时, 在AuNP-RNA探针偶联物和靶标miRNA之间可出现夹心杂交反应, 致使AuNP溶液的表面形成等离子共振吸收带, 引起微观分布和宏观颜色发生变化, 根据这一原理, 该比色法能够灵敏地检测到miRNA-148a, 表现出较好的检测效能。MiRNA最新检测技术的发展为其作为早期胃癌筛查标志物提供了指导与帮助。

6 总结和展望

本文简述了通过调节关键途径影响胃癌特征的miRNA, 对近年来发表的基于胃组织及不同体液样本的早期胃癌筛查潜在的miRNA进行了总结。目前完成miRNA从实验室到临床应用转化的产品

仍较少, 其中最大的原因是多项研究存在的高度异质性。MiRNA新检测技术的出现、不同扩增策略的组合很大程度上改进了传统技术的不足。新型生物标志物的出现也为胃癌早期筛查的实施提供了更多的选择。综上所述, miRNA的特性使其成为早期胃癌筛查生物标志物的良好选择。

除了miRNA之外, 循环肿瘤细胞、长链非编码RNA、游离DNA等新型生物标志物也是早期胃癌筛查的选择来源。然而, 上述标志物也存在自身不足, 如循环肿瘤细胞的高度异质性, 长链非编码RNA的丰度低、易降解、不稳定性等^[42]。相较于其他分子标志物, miRNA由于检测稳定性和高灵敏度及高准确性而受到研究者的青睐, 成为目前胃癌领域的分子研究热点。MiRNA与上述多种肿瘤生物标志物的组合或可成为未来胃癌标志物研究的新方向。

精准肿瘤学改善肿瘤诊断依赖于肿瘤的分子谱分析, 这就要求在研究中应该提供关于肿瘤分子特征具体的分层数据, 以实现miRNA研究成果在后续研究中的有效借鉴与发展。为实现研究结果的可应用性, 应做到: 第一, 规范各研究样本收集和处理的方法; 第二, 标准化前变量分析和数据统计; 第三, 设计大规模多中心规范化研究, 实现各机构研究成果共享及可比。下一代miRNA生物传感要求实现检测单个细胞单个颗粒的超灵敏度及识别miRNA单个核苷酸差异的超特异性。未来纳米技术与核酸扩增技术的探索与结合, 有望产生协同效应, 为下一代miRNA生物传感提供技术支持。

MiRNA正在成为细胞生物学和基因表达调控的关键参与者, 其研究转化将为胃癌早期筛查相关临床实践带来突破。

参考文献

- [1] Machlowska J, Baj J, Sitarz M, et al. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (11): 4012
- [2] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multi-region sequencing. *N Engl J Med*, 2012, 366(10): 883-892
- [3] Jin Z, Jiang W, Wang L. Biomarkers for gastric cancer:

- progression in early diagnosis and prognosis (Review). *Oncol Lett*, 2015, 9(4): 1502-1508
- [4] Dolscheid-pommerich RC, Manekeller S, Walgenbach-brünagel G, et al. Clinical performance of CEA, CA19-9, CA15-3, CA125 and AFP in gastrointestinal cancer using LOCI-based assays. *Anticancer Res*, 2017, 37(1): 353-360
- [5] Cholewinski G, Waluga M. The role of microRNAs in carcinogenesis and the utility of microRNA determination in diagnosis of gastric cancer development. *J Physiol Pharmacol*, 2022, 73(6): 689-697
- [6] Necula L, Matei L, Dragu D, et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(17): 2029-2044
- [7] Ma S, Zhou M, Xu Y, et al. Clinical application and detection techniques of liquid biopsy in gastric cancer. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 7
- [8] Kipkeeva F, Muzaffarova T, Korotaeva A, et al. MicroRNA in gastric cancer development: mechanisms and biomarkers. *Diagnostics*, 2020, 10(11): 891
- [9] Riquelme I, Tapia O, Leal P, et al. MiR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cell Oncol*, 2016, 39(1): 23-33
- [10] Xu M, Qin S, Cao F, et al. MicroRNA-379 inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition via targeting FAK/AKT signaling in gastric cancer. *Int J Oncol*, 2017, 51(3): 867-876
- [11] Zhang Z, Liu S, Shi R, et al. miR-27 promotes human gastric cancer cell metastasis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Genet*, 2011, 204(9): 486-491
- [12] Kim B, Jang J, Heo YJ, et al. Dysregulated miRNA in a cancer-prone environment: a study of gastric non-neoplastic mucosa. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6600
- [13] Song Y, Guo D, Liu JF, et al. Downregulation of miR-7 and miR-153 is involved in *Helicobacter pylori* CagA induced gastric carcinogenesis and progression. *Int J Oncol*, 2023, 63(1): 79
- [14] Izumi D, Zhu Z, Chen Y, et al. Assessment of the diagnostic efficiency of a liquid biopsy assay for early detection of gastric cancer. *JAMA Netw Open*, 2021, 4(8): e2121129
- [15] Zheng GD, Xu ZY, Hu C, et al. Exosomal miR-590-5p in serum as a biomarker for the diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 636566
- [16] Varkalaite G, Vaitkeviciute E, Inciuraite R, et al. Atrophic gastritis and gastric cancer tissue miRNome analysis reveal hsa-miR-129-1 and hsa-miR-196a as potential early diagnostic biomarkers. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(6): 653-663
- [17] Zhu XL, Ren LF, Wang HP, et al. Plasma microRNAs as potential new biomarkers for early detection of early gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(13): 1580-1591
- [18] Yao Y, Ding Y, Bai Y, et al. Identification of serum circulating microRNAs as novel diagnostic biomarkers of gastric cancer. *Front Genet*, 2020, 11: 591515
- [19] Cui L, Zhang X, Ye G, et al. Gastric juice microRNAs as potential biomarkers for the screening of gastric cancer. *Cancer*, 2013, 119(9): 1618-1626
- [20] Felipez N, Montori S, Mendizuri N, et al. The human gastric juice: a promising source for gastric cancer biomarkers. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9131
- [21] Yu X, Luo L, Wu Y, et al. Gastric juice miR-129 as a potential biomarker for screening gastric cancer. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 365
- [22] Iwasaki H, Shimura T, Yamada T, et al. A novel urinary microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer. *J Gastroenterol*, 2019, 54(12): 1061-1069
- [23] Min J, Han TS, Sohn Y, et al. MicroRNA-30a arbitrates intestinal-type early gastric carcinogenesis by directly targeting ITGA2. *Gastric Cancer*, 2020, 23(4): 600-613
- [24] Takahashi-Kanemitsu A, Knight CT, Hatakeyama M. Molecular anatomy and pathogenic actions of *Helicobacter pylori* CagA that underpin gastric carcinogenesis. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(1): 50-63
- [25] Lopes C, Chaves J, Ortigão R, et al. Gastric cancer detection by non-blood-based liquid biopsies: a systematic review looking into the last decade of research. *United European Gastroenterol J*, 2023, 11(1): 114-130
- [26] Gareev I, Ahmad A, Wang J, et al. Gastric juice non-coding RNAs as potential biomarkers for gastric cancer. *Front Physiol*, 2023, 14: 1179582
- [27] Skryabin GO, Vinokurova SV, Galetsky SA, et al. Isolation and characterization of extracellular vesicles from gastric juice. *Cancers*, 2022, 14(14): 3314
- [28] Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B, et al. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark Med*, 2013, 7(4): 623-631
- [29] Li D, Yan L, Lin F, et al. Urinary biomarkers for the noninvasive detection of gastric cancer. *J Gastric Cancer*, 2022, 22(4): 306-318
- [30] Alessandrini L, Manchi M, De Re V, et al. Proposed molecular and miRNA classification of gastric cancer. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1683
- [31] Camargo MC, Bowlby R, Chu A, et al. Validation and calibration of next-generation sequencing to identify Epstein-Barr virus-positive gastric cancer in the cancer genome atlas. *Gastric Cancer*, 2016, 19(2): 676-681
- [32] Ueda T, Volinia S, Okumura H, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of

- gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 136-146
- [33] Cao W, Wei W, Zhan Z, et al. Role of miR-647 in human gastric cancer suppression. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1401-1411
- [34] Liu X, Zhang X, Zhang Z, et al. Plasma microRNA-based signatures to predict 3-year postoperative recurrence risk for stage II and III gastric cancer. *Intl J Cancer*, 2017, 141(10): 2093-2102
- [35] Li B, Zhang S, Shen H, et al. MicroRNA-144-3p suppresses gastric cancer progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition through targeting PBX3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(2): 241-247
- [36] So JBY, Kapoor R, Zhu F, et al. Development and validation of a serum microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer in a high-risk population. *Gut*, 2021, 70(5): 829-837
- [37] Martino S, Tammaro C, Misso G, et al. MicroRNA detection via nanostructured biochips for early cancer diagnostics. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 7762
- [38] Ye J, Xu M, Tian X, et al. Research advances in the detection of miRNA. *J Pharm Anal*, 2019, 9(4): 217-226
- [39] Takeuchi T, Kawasaki H, Luce A, et al. Insight toward the microRNA profiling of laryngeal cancers: biological role and clinical impact. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3693
- [40] Zhou S, Sun H, Dong J, et al. Highly sensitive and facile microRNA detection based on target triggered exponential rolling-circle amplification coupling with CRISPR/Cas12a. *Anal Chim Acta*, 2023, 1265: 341278
- [41] Cai J, Ding L, Gong P, et al. A colorimetric detection of microRNA-148a in gastric cancer by gold nanoparticle-RNA conjugates. *Nanotechnology*, 2020, 31(9): 095501
- [42] Lee MW, Kim GH, Jeon HK, et al. Clinical application of circulating tumor cells in gastric cancer. *Gut Liver*, 2019, 13(4): 394-401