

# 胃癌患者血清 miR-181b 和 PDCD4 水平表达与幽门螺杆菌感染的关系

饶向东<sup>1</sup>, 刘振宇<sup>1</sup>, 汤红亮<sup>1</sup>, 张 慧<sup>1</sup>, 白 雪<sup>2</sup>, 项梦琦<sup>2</sup>, 谢瑞霞<sup>2</sup>, 徐 龙<sup>2</sup>

(1. 湖北省孝昌县第一人民医院消化内科, 湖北孝感 432900; 2. 深圳大学总医院消化内科, 深圳大学临床科学研究院, 深圳大学国际肿瘤中心, 广东深圳 518055)

**摘要:** 目的 探讨胃癌患者血清中 miR-181b, 程序性细胞死亡因子 4 (PDCD4) 表达水平与幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, Hp) 感染的关系。方法 选取 2017 年 12 月 ~ 2019 年 12 月湖北省孝昌县第一人民医院收治的胃癌患者 82 例为胃癌组, 同期选择该院健康体检者 91 例为对照组。采用 <sup>13</sup>C 呼气试验检测受试者 Hp 感染情况, 采用实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR) 测定受试者血清中 miR-181b, PDCD4 表达水平, 根据光学显微镜下胃癌患者的胃黏膜中 Hp 感染密度将患者分为 Hp 感染轻、中、重组, Spearman 法分析胃癌患者血清中 miR-181b 和 PDCD4 表达水平与 Hp 感染的相关性。结果 与对照组相比, 胃癌组 Hp 感染阳性率显著增高 ( $\chi^2=68.571$ ,  $P<0.05$ ), 胃癌组 Hp 阴性及 Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表达水平均显著升高 ( $t=13.799, 8.158$ , 均  $P<0.05$ ), PDCD4 表达水平均显著降低 ( $t=8.432, 19.087$ , 均  $P<0.05$ ), 且胃癌组及对照组 Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表达水平高于 Hp 阴性患者 ( $t=3.469, 4.163$ ,  $P<0.05$ ), PDCD4 表达水平低于 Hp 阴性患者 ( $t=8.878, 16.470$ , 均  $P<0.05$ )。随着胃癌患者 Hp 感染密度的增加, Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表达水平呈依次升高趋势 ( $t=5.476, 7.479, 2.227$ , 均  $P<0.05$ ), PDCD4 表达水平均呈依次降低趋势 ( $t=10.216, 14.014, 9.199$ , 均  $P<0.05$ ), 差异有统计学意义。Spearman 相关性分析结果显示血清中 miR-181b 与胃癌患者 Hp 感染呈正相关性 ( $r=0.659, 0.685$ , 均  $P<0.05$ ), 血清中 PDCD4 与胃癌患者 Hp 感染呈负相关性 ( $r=-0.611, -0.702$ , 均  $P<0.05$ )。结论 胃癌患者血清中 miR-181b, PDCD4 表达水平与 Hp 感染密切相关, 对于临床 Hp 感染具有潜在鉴别价值。

**关键词:** 胃癌; miR-181b; 程序性细胞死亡因子 4; 幽门螺杆菌

中图分类号: R735.2; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 04-001-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.001

## Relationship between the Expression of miR-181b, PDCD4 and *Helicobacter Pylori* Infection in Patients with Gastric Cancer

RAO Xiang-dong<sup>1</sup>, LIU Zhen-yu<sup>1</sup>, TANG Hong-liang<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, BAI Xue<sup>2</sup>,  
XIANG Meng-qi<sup>2</sup>, XIE Rui-xia<sup>2</sup>, XU Long<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Xiaochang County, Hubei Xiaogan 432900, China;

2. Department of Gastroenterology, Shenzhen University General Hospital, Institute of Clinical Sciences, Shenzhen University, International Cancer Center, Shenzhen University, Guangdong Shenzhen 518055, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between the expression levels of miR-181b, programmed cell death factor 4 (PDCD4) and *Helicobacter pylori* (Hp) infection in patients with gastric cancer. **Methods** A total of 82 patients with gastric cancer admitted to the First People's Hospital of Xiaochang County from December 2017 to December 2019 were selected as the gastric cancer group, and 91 healthy people in the hospital were selected as the healthy control group. Hp infection was detected by <sup>13</sup>C breath test, the expression levels of miR-181b and PDCD4 in serum were measured by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), according to the density of Hp infection in gastric mucosa of patients with gastric cancer under optical microscope, the patients were divided into mild, moderate and severe Hp infection groups, and Spearman method was used to analyze the correlation between the expression levels of miR-181b and PDCD4, and Hp infection in patients with gastric cancer. **Results** Compared with those in the control group, the positive rate of Hp infection in gastric cancer group was significantly higher ( $\chi^2=68.571$ ,  $P<0.05$ ), the expression levels of miR-181b in serum of HP negative and HP positive patients in gastric

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81800586)。

作者简介: 饶向东 (1975-), 男, 本科, 副主任医师, 主要从事消化内科方面研究工作, E-mail: rxd432900@163.com。

通讯作者: 徐龙 (1972-), 男, 博士, E-mail: dlxulong@aliyun.com。

cancer group were significantly increased ( $t=13.799, 8.158$ , all  $P<0.05$ ), the expression level of PDCD4 was significantly lower ( $t=8.432, 19.087$ , all  $P<0.05$ ), the expression level of miR-181b in Hp positive patients in gastric cancer group and control group was higher than that in Hp negative patients ( $t=3.469, 4.163$ , all  $P<0.05$ ), and PDCD4 expression level was lower than that in Hp negative patients ( $t=8.878, 16.470$ , all  $P<0.05$ ). With the increase of Hp infection density in gastric cancer patients, the expression level of miR-181b in the serum of Hp positive patients increased in turn ( $t=5.476, 7.479, 2.227$ , all  $P<0.05$ ), while the expression level of PDCD4 decreased in turn ( $t=10.216, 14.014, 9.199$ , all  $P<0.05$ ), the difference were statistically significant, respectively. Spearman correlation analysis showed that serum miR-181b was positively correlated with Hp infection in patients with gastric cancer ( $r=0.659, 0.685$ , all  $P<0.05$ ), while PDCD4 in serum was negatively correlated with Hp infection in patients with gastric cancer ( $r=-0.611, -0.702$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression levels of miR-181b and PDCD4 in serum of patients with gastric cancer were closely related to Hp infection, which has potential differential value for clinical Hp infection.

**Keywords:** gastric cancer; miR-181b; programmed cell death factor 4; *Helicobacter pylori*

胃癌是我国常见的起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,胃癌可发病于胃窦部、胃大、小弯等处,早期胃癌表现不明显,易错过最佳治疗期,晚期胃癌患者常有腹痛、贫血、消瘦、呕血等临床表现,生存率较低,对患者的生活质量及生命安全造成较大影响<sup>[1]</sup>。胃癌病情发展复杂,与遗传因素、个体因素、环境因素等多种因素均密切相关<sup>[2]</sup>,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种微厌氧的螺旋形病菌,是胃癌、胃炎等消化系统疾病的主要感染菌,患者感染Hp后, Hp相关的细胞毒素、酶类、细胞因子等均参与机体的不良反应,对胃黏膜病变、消化道溃疡、胃癌、胃炎等疾病的发生产生不利影响<sup>[3-4]</sup>。微小RNA是近年来发现的参与细胞增殖、肿瘤发生及转移等多种生理活动的非编码单链RNA,具有促进或抑制肿瘤发生等作用,miR-181家族在人体细胞中广泛存在,miR-181b是其中之一,与多种肿瘤疾病密切相关<sup>[5]</sup>。程序性细胞死亡因子4(programmed cell death factor 4, PDCD4)是近年来发现的抑癌基因,通过抑制细胞肿瘤性转化发挥肿瘤抑制作用,在胃癌组织中呈现低表达,与胃癌的发生发展密切相关<sup>[6]</sup>。本研究通过测定胃癌患者血清中miR-181b, PDCD4表达情况,分析二者与胃癌患者Hp感染情况之间的关系,为临床诊治胃癌提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取2017年12月~2019年12月湖北省孝昌县第一人民医院收治的胃癌患者82例为胃癌组,其中男性42例,女性40例,年龄42~79岁,平均年龄 $56.71 \pm 7.39$ 岁。同期选取本院健康体检者91例为对照组,其中男性46例,女性45例,年龄40~81岁,平均年龄 $58.38 \pm 8.16$ 岁,两组研究对象年龄、性别差异无统计学意义。纳入标准:①诊断标准参考《胃癌诊断标准》<sup>[7]</sup>;②首次确诊为胃癌;③未进行

生物治疗、放疗及化疗等。排除标准:①伴有其他部位恶性肿瘤患者;②伴有严重心、肺、肝功能不全者;③伴有严重血液疾病及免疫系统疾病等;④近6个月服用抗生素、抗炎、胃黏膜保护类药物等。本研究经医院道德伦理委员会批准通过,所有样品采集均取得患者及家属知情同意并签字,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》。

**1.2 仪器与试剂** RNA提取试剂盒购于美国Invitrogen公司; PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 购于日本TAKARA公司; miScript SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Kit 购于德国QIAGEN公司;引物,由上海生工生物工程有限公司合成;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪、全自动生化分析仪购于美国Bio-Rad公司;<sup>13</sup>C呼气试验红外光谱仪购于安徽养和医疗器械设备有限公司;光学显微镜购于上海兆仪光电科技有限公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 Hp感染检测:** 采用<sup>13</sup>C呼气试验<sup>[8]</sup>测定对照组及胃癌组受试者的Hp感染情况,受试者空腹服用<sup>13</sup>C尿素胶囊后30 min通过红外光谱仪进行呼气,呼出气中<sup>13</sup>C原子峰大于基线5%记为Hp感染阳性。

**1.3.2 Hp感染密度检测:** 参考文献[9],采集胃癌组患者距离幽门2.5 cm处的胃黏膜组织适量,光学显微镜中进行病理诊断,在油镜下分析Hp感染密度, Hp轻度:样本中Hp小于1/3; Hp中度:样本中Hp超过1/3但小于2/3; Hp重度:样本中Hp成堆存在。对照组不进行镜检。

**1.3.3 血清标本采集:** 采集对照组及胃癌组受试者空腹静脉血5~6 ml,室温静置20 min, 4℃下 $3\,000 \times g$ 离心10 min,采集血清至RNA酶离心管中, -80℃冰箱保存备用,用于后续RNA的提取。

**1.3.4 qRT-PCR法测定受试者血清中miR-181b, PDCD4的表达水平:** 利用RNA提取试

试剂盒 (Invitrogen 公司) 提取血清总 RNA, 经过反转录得到 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR) 对 miR-181b, PDCD4 进行扩增。qRT-PCR 反应体系共 20 $\mu$ l: miScript SYBR<sup>®</sup> Green Mix 10  $\mu$ l, cDNA (50ng/ $\mu$ l) 2 $\mu$ l, 上下游

引物 (10 $\mu$ mol/L) 各 1 $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 6.0 $\mu$ l。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 90s; 95  $^{\circ}$ C 30s; 62  $^{\circ}$ C 30s; 72  $^{\circ}$ C 15s; 共 40 个循环。miR-181b, PDCD4 及内参 U6, GAPDH 的引物序列见表 1。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法对血清 miR-181b, PDCD4 相对表达水平进行分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列

类别	正向引物 5' -3'	反向引物 5' -3'
miR-181b	TCATTGCTGTCGGTGGGTGAACCTG	AAGCGGGGCCACAGTTGCATT
U6	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	GGAACGCTTCACGAATTTG
PDCD4	ATGTGGAGGAGGTGGATGTG	TGGTGTTAAAGCTTCTCAAATGC
GAPDH	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.4 统计学分析 采用软件 SPSS 25.0 统计学分析。以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 对计量资料进行表述, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 SNK-*q* 检验; 计数资料用 *n* 进行描述, 行  $\chi^2$  检验; Spearman 法分析 miR-181b, PDCD4 与胃癌 Hp 感染的相关性。

## 2 结果

2.1 Hp 感染检测 对照组中 79 例为 Hp 感染阴性, 12 例为 Hp 感染阳性, Hp 感染阳性率为 13.19%; 胃癌组 19 例为 Hp 感染阴性, 63 例为 Hp 感染阳性, Hp 感染阳性率为 76.83%; 与对照组相比, 胃癌组 Hp 感染阳性率显著升高, 差异

有统计学意义 ( $\chi^2=68.571$ ,  $P < 0.05$ )。

2.2 对照组与胃癌组血清中 miR-181b, PDCD4 表达水平比较 见表 2。与对照组相比, 胃癌组 Hp 阴性、Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表达水平均显著升高 ( $t=13.779$ , 8.158, 均  $P < 0.05$ ), PDCD4 表达水平均显著降低 ( $t=8.432$ , 19.087, 均  $P < 0.05$ ), 且胃癌组及对照组 Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表达水平高于 Hp 阴性患者 ( $t=3.469$ , 4.163, 均  $P < 0.05$ ), PDCD4 表达水平低于 Hp 阴性患者 ( $t=8.878$ , 16.470, 均  $P < 0.05$ ), 差异均有统计学意义。

表 2 两组受试者血清中 miR-181b, PDCD4 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组	胃癌组	<i>t</i>	<i>P</i>
Hp 阴性				
miR-181b	0.98 $\pm$ 0.19	1.67 $\pm$ 0.22	13.779	0.000
PDCD4	1.06 $\pm$ 0.18	0.69 $\pm$ 0.13	8.432	0.000
Hp 阳性				
miR-181b	1.19 $\pm$ 0.23	2.28 $\pm$ 0.45	8.158	0.000
PDCD4	0.76 $\pm$ 0.11	0.34 $\pm$ 0.06	19.087	0.000

2.3 不同 Hp 感染密度与血清中 miR-181b, PDCD4 表达水平比较 见表 3。随着胃癌患者 Hp 感染密度的增加, Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表

达水平呈依次升高趋势 ( $t=5.476$ , 7.479, 2.227, 均  $P < 0.05$ ), PDCD4 表达水平均呈依次降低趋势 ( $t=10.216$ , 14.014, 9.199, 均  $P < 0.05$ )。

表 3 不同 Hp 感染程度的胃癌患者血清中 miR-181b, PDCD4 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	Hp 密度			<i>F</i>	<i>P</i>
	轻度 ( <i>n</i> =32)	中度 ( <i>n</i> =19)	重度 ( <i>n</i> =12)		
miR-181b/U6	1.87 $\pm$ 0.37	2.54 $\pm$ 0.50	2.98 $\pm$ 0.59	8.875	0.000
PDCD4/GAPDH	0.48 $\pm$ 0.09	0.25 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.02	39.644	0.000

注: 中度组与轻度组相比, miR-181b/U6:  $t=5.476$ ,  $P=0.000$ , PDCD4/GAPDH:  $t=10.216$ ,  $P=0.000$ ; 重度组与中度组相比: miR-181b/U6:  $t=2.227$ ,  $P=0.034$ , PDCD4/GAPDH:  $t=9.199$ ,  $P=0.000$ ; 重度组与轻度组相比: miR-181b/U6:  $t=7.479$ ,  $P=0.000$ , PDCD4/GAPDH:  $t=14.014$ ,  $P=0.000$ 。

2.4 胃癌患者 Hp 感染与血清 miR-181b, PDCD4 表达水平相关性分析 Spearman 相关性分析结果显示血清中 miR-181b 水平与胃癌患者 Hp 感染呈正相关性, 与 Hp 阳性相关系数为 0.659, 与 Hp 阴性相

关系数为 0.685 ( $P < 0.001$ ), 血清中 PDCD4 水平与胃癌患者 Hp 感染呈负相关性, 与 Hp 阳性相关系数为 -0.611, 与 Hp 阴性相关系数为 -0.702 ( $P < 0.001$ )。



### 3 讨论

胃癌是临床常见的恶性肿瘤之一,随着现代饮食结构及生活方式的改变以及环境污染加重、农药、化肥等药品的大量使用,造成胃癌发病率逐年升高,胃癌患者常会有上腹疼痛、进行性吞咽困难、呕血、黑便等不良表现,对患者的身体、心理健康及生活质量造成较大的影响<sup>[10]</sup>。引起胃癌发生的原因多样, Hp 感染是引发胃癌的重要危险因素,资料显示 Hp 具有调控细胞生长和分化的作用,进而引发机体的炎症反应,加剧胃黏膜损伤,从而引起癌变<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,胃癌组 Hp 感染阳性率显著高于健康体检者,提示胃癌患者中具有较高的 Hp 感染阳性率,表明 Hp 感染与胃癌发生密切相关, Hp 常存在于胃窦部、胃小凹等胃癌常发部位,这些部位长期受到 Hp 的感染,引发癌变的几率会大大增加<sup>[12]</sup>。

miRNA 为一类具有多种生物学功能的进化保守的短序列小 RNA,主要通过调节相关基因的表达作为抑癌基因或原癌基因参与机体肿瘤的发生与发展,诸多研究表明 miRNA 异常表达与胃癌的发生发展联系密切<sup>[13]</sup>,资料显示 miR-181 家族在胃癌、肝癌、肺癌等肿瘤的形成发展中起到重要作用, miR-181b 是其中一员, miR-181b 在胃癌组织中呈现高表达,高表达的 miR-181b 对于胃癌患者的生存具有不利影响<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,胃癌组 Hp 阴性、Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表达水平均显著高于对照组,且胃癌组及对照组 Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表达水平高于 Hp 阴性患者,提示 miR-181b 可能参与了胃癌疾病的进展。

PDCD4 是近年来发现的一种肿瘤抑制基因,与胃癌、结肠癌等多种肿瘤的侵袭、转移密切相关,其在胃癌中的具体机制尚不清晰<sup>[15]</sup>。研究发现 PDCD4 在胃癌患者血清中呈现低表达,且与患者的不良饮食习惯呈现相关性<sup>[16]</sup>。LI 等<sup>[17]</sup>人研究发现在高表达的 miR-183 通过抑制 PDCD4 的表达来促进胃癌细胞的增殖、转移等。本研究结果显示,胃癌组 Hp 阴性、Hp 阳性患者血清中 PDCD4 表达水平均显著低于对照组,且胃癌组及对照组 Hp 阳性患者血清中 PDCD4 表达水平低于 Hp 阴性患者,与 miR-181b 表达水平呈现相反趋势,提示 PDCD4 低表达可能对于胃癌疾病具有不利影响,提示 miR-181b 与 PDCD4 具有一定的负向调控关系,表明 miR-181b 可能通过靶向 PDCD4 来发挥促癌作用;随着胃癌患者 Hp 感染密度的增加, Hp 阳性患者血清中 miR-181b 表达水平呈依次升高趋势, PDCD4 表达水平均呈依次降低趋势, Spearman 相关性分析结果显示血清中 miR-181b 与胃癌患者 Hp 感染呈正相关性,血清中 PDCD4 与胃癌患者 Hp 感染

呈负相关性,表明 Hp 感染可能具有一定影响 miR-181b, PDCD4 表达水平的作用,可能共同参与了胃癌的发生。

胃癌的发生与多种因素相关,其发生机制复杂。本研究通过测定胃癌患者的 Hp 感染情况及血清中 miR-181b, PDCD4 的表达水平,发现 Hp 感染程度的加深与 miR-181b 表达水平的升高及 PDCD4 表达水平的降低密切相关,三者的异常表达均参与了胃癌的发生及发展,但其中的潜在机制尚不清晰,仍需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] KOMAZ K, BOSTANC M T, APARLAR M A, et al. Predicting survival in gastric cancer: A prospective cohort study with 102 patients[J]. J Surg Med, 2019, 3(5): 361-365.
- [2] YIN Jie, WU Xiaoxu, LI Suping, et al. Impact of environmental factors on gastric cancer: A review of the scientific evidence, human prevention and adaptation[J]. Journal of Environmental Sciences, 2020, 89(3):65-79.
- [3] ZHU Hongming, LI Bangyi, TANG Zhe, et al. Epidemiological investigation of *Helicobacter pylori* infection in elderly people in Beijing[J]. World Journal of Clinical Cases, 2020, 8(11):2173-2180.
- [4] YAO Xinjie, LIU Dongyan, ZHOU Linyan, et al. FAM60A, increased by *Helicobacter pylori*, promotes proliferation and suppresses apoptosis of gastric cancer cells by targeting the PI3K/AKT pathway[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2020, 521(4):1003-1009.
- [5] GAO Ying, XU Zhicai, YUAN Fei, et al. Correlation of expression levels of micro ribonucleic Ccid-10b (miR-10b) and micro ribonucleic Acid-181b (miR-181b) with gastric cancer and its diagnostic significance(Article)[J]. Medical Science Monitor, 2018, 24:7988-7995.
- [6] HU Xiuting, WANG Yanbo, LIANG Hongwei, et al. miR-23a/b promote tumor growth and suppress apoptosis by targeting PDCD4 in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10):e3059.
- [7] 姜可伟. 规范全球第二大致死率疾病的诊断 - 《胃癌诊断标准》解读[J]. 中国卫生标准管理, 2010, 1(4):26-28.  
JIANG Kewei. Standardizing the diagnosis of diseases with the second highest mortality rate in the world - Interpretation of *diagnostic criteria for gastric cancer*[J]. China Health Standard Management, 2010, 1(4):26-28.
- [8] KAWAI S, ARAI K, LIN Yingsong, et al. Comparison of the detection of *Helicobacter pylori* infection by commercially available serological testing kits and the <sup>13</sup>C-urea breath test[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2019, 25(10): 769-773.
- [9] 张逸彪, 郭丽丽, 杨辰. 胃癌前病变患者胃蛋白酶原、促胃液素-17 水平变化及幽门螺杆菌感染情况[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(3):306-308.

(下转第 92 页)