

循环 microRNA-4281 对肝癌的诊断与预后评估研究

胡 甜^{1,2}, 李金成³, 阳学风¹, 张楚红¹, 李 赛¹, 吕 秀¹, 贺 莎¹,
严汉兴¹, 谭贻兮¹, 陈荣如¹, 文美玲^{1*}, 左建宏^{1,2*}

(1. 南华大学附属南华医院, 湖南 衡阳, 421000; 2. 南华大学医学院; 3. 邵阳学院医学部)

摘要: **目的** 探讨循环 miRNA-4281 在肝癌患者血清中的表达情况及对诊断的临床意义。 **方法** 运用 QRT-PCR 技术分别检测 45 例肝癌患者(肝癌组)及正常人(对照组)血清中 miRNA-4281 的表达量。 **结果** 与对照组相比,肝癌患者血清标本中 miRNA-4281 的表达量明显高于正常人,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。ROC 曲线下面积是 0.805,miRNA-4281 作为肝癌诊断的灵敏度为 84.40%,特异度是 73.30%。miRNA-4281 的表达与 AFP 无明显相关性。Kaplan-Meier 分析提示 miRNA-4281 表达水平高的患者具有较短的生存期限($P < 0.05$)。 **结论** 检测 miRNA-4281 有利于肝癌的诊断,可作为 HCC 潜在的临床诊断标志物,同时其对于评估患者的预后具有重要作用。

关键词: 肝癌; miRNA-4281; 诊断; 预后

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A

Study of circulating microRNA-4281 for diagnosis and prognostic valuation in hepatocellular carcinoma

HU Tian, LI Jiancheng, YANG Xuefeng, et al

(The Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To measure the expression of the circulating miRNA-4281 in the serum of patients with hepatocellular carcinoma (HCC), and to find out the clinical meaning in diagnosis. **Methods** Blood samples from normal healthy ($n = 45$) and HCC patients ($n = 45$) were collected, respectively. Quantitative Real-time PCR was used to detect the expression level of miRNA-4281 in the two groups. **Results** The expression of miRNA-4281 was significantly higher in the patients compared to that in the control ($P < 0.05$). The area under receiver-operating characteristic curve was 0.805, with the sensitivities of 84.40% and the specificities of 73.30%. The expression level of miRNA-4281 and AFP had no correlation. Kaplan-Meier showed that the patients seemed to live a shorter time with the high expression of miRNA-4281 ($P < 0.05$). **Conclusion** Detecting miRNA-4281 may help to diagnose HCC. MiRNA-4281 may be a potential marker in the diagnosis and the prognosis.

Key words: hepatocellular carcinoma; miRNA-4281; diagnosis; prognosis

原发性肝癌是目前世界上最常见的恶性肿瘤之一,其高居癌症相关死亡肿瘤的世界第三位,具有恶性程度高、转移率高、复发率高及生存率低的流行病学特点,严重危害人民生命健康,成为威胁人类公共

卫生的巨大挑战^[1]。由于肝癌的早期临床表现隐匿和缺乏有效的早期诊断,大部分患者诊断时都为晚期肝癌,常伴有远处转移或肝内转移,其预后差,生存期短。因此,早期发现和诊断对于及时采取有效的治疗手段,改善患者预后,延长生存期具有重要的临床意义^[2]。循环 microRNA(miRNA)是一类单链,内源性非编码小分子 RNA^[3]。研究表明 miRNAs 参与了疾病的发生发展、复发及转移,miRNA 的表达紊乱是导致包括肝癌在内的一系列

收稿日期:2016-06-18;修回日期:2016-12-29

基金项目:国家自然科学基金(81272960),湖南省科技厅重点项目(2013WK2010,2014SK2015),人社部重点项目[2016]176 号和天晴肝病研究基金(TQGB20140155)。

* 通讯作者, E-mail:632138414@qq.com.

肿瘤形成的重要因素^[4]。目前已有研究证明循环 microRNA 在肝癌的诊断、转移复发以及预后中都具有重要的作用^[5-6]。例如研究表明 miR-20a 可以抑制 Hep G2 细胞(肝肿瘤细胞)的生长、侵袭以及转移,因此有望作为肝癌诊断和治疗的新分子靶点^[7]。但对于 miRNA-4281 与肝癌的关系报道较少,因此,本文研究 miRNA-4281 在肝癌患者以及正常人血清中的表达情况,分析其与肝癌相关病理生理的关系,明确 miRNA-4281 在肝癌诊断和预后中的作用。

1 资料与方法

1.1 实验对象 45 例肝癌患者组来自于南华大学附属南华医院及附属第一医院在 2015 年 9 月至 2016 年 1 月的肝癌患者。患者年龄为 31~80 岁,平均年龄为 57.64 岁。每例肝癌患者至少经过超声、CT 和组织病理学中的两种方法,并结合相关病史及血清 AFP 水平而确诊。所有样本均在患者进行治疗前收集。对照组的 45 例正常人血清样本来自南华大学附属南华医院体检中心,年龄 28~72 岁,平均年龄 45.22 岁。所有参与研究者在实验前均签署了知情同意书,同时经过了南华大学伦理委员会的批准。肝癌患者组和健康对照组均取外周血 2 mL,离心后取上层血清,放至 -80 ℃ 环境中保存。

1.2 实验材料 所有实验耗材均购自湖南科泰公司, QIAzol Lysis Reagent、miScript II RT Kit、miR-Neasy Serum/Plasma Kit、Has_miR-4281、Has_miR-6087、Has_miR-39 特异性反转录引物及 qPCR 特异性扩增引物、miScript SYBR Green PCR Kit 均购自德国 Qiagen 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取 取上层血清标本 200 μL,加入 5 倍量的 QIAzol 试剂并严格按照 QIAzol Lysis Reagent 试剂盒说明书上进行操作。

1.3.2 cDNA 合成 取 3 μL 上述步骤中提取的 RNA 做模板,参照 miScript II RT Kit 试剂盒上要求,分别加入以下试剂: 4 μL of 5x miScript HiSpec Buffer, 2 μL of 10x miScript Nucleics Mix, 9 μL of RNase-free water and 2 μL of miScript Reverse Transcriptase Mix。反应体系共 20 μL,放至 PCR 逆转录仪中,设置反应条件为 37 ℃ 60 分钟, 95 ℃ 5 分钟, 4 ℃ 30 分钟。最后所得 cDNA 中加入 200 μL 无酶水后可放至 -20

℃ 中长期保存。

1.3.3 QRT-PCR 反应在 48 孔板中分别加入 5 μL of 2x QuantiTect SYBR Green PCR master Mix, 1 μL of 10x miScript Universal Primer, 1 μL of 10x Has_miR-39 miScript Primer Assay or 1 μL of Has_miR-miRNA-4281 miScript Primer Assay, 2 μL of RNase-free water 和 1 μL 上述 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 仪(illuminaEco 48),反应分为两步,第一步是 95 ℃ 15 分钟预变性 1 个循环;然后进行第二步扩增 40 个循环(95 ℃ 15 秒, 55 ℃ 30 秒, 70 ℃ 30 秒)。

本次实验使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法来进行比较,同时利用 miR-39 作为内参进行数据的标准化,测出 miRNAs 的相对表达量。同时为了进一步保证实验的准确性,每次实验均设置了三个重复孔,利用重复孔的平均值进行计算。

1.3.4 统计分析 数据用均数±标准差表示。采用了 SPSS 18.0 统计软件进行分析。miRNA-4281 的相对表达量 miRNA-4281 在肝癌患者及正常人中表达量水平的比较使用了 *t* 检验。miRNA-4281 的表达量与肝癌患者临床特征各参数间的比较运用了单因素变量分析,以 $P < 0.05$ 表示为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-4281 在肝癌患者及正常人血清中的表达水平 miRNA-4281 在肝癌患者血清中的相对表达量是 11.87 ± 2.44 。正常人血清中 miRNA-4281 的相对表达量分别是 8.38 ± 2.11 。结果提示 miRNA-4281 在肝癌患者血清中的表达量明显高于正常人,两者有统计学差异($P < 0.05$) (见图 1)。通过绘制受试者工作曲线(ROC) (见图 2),当 miRNA 的相对表达量为 10.86 时,其 Youden 指数最大,此时 miRNA-4281 诊断肝癌的 ROC 曲线下面积是 0.805,并且其灵敏度是 84.40%,特异度是 73.30%。上述结果提示检测 miRNA-4281 对于肝癌诊断具有重要的意义。

2.2 miRNA-4281 与 AFP 的相关性分析 通过计算 Pearson 相关系数,来分析 miRNA-4281 与 AFP 的之间相关性。分析结果得出 miRNA-4281 与 AFP 之间相关性 $r = 0.15$, $P = 0.9$,说明 miRNA-4281 与 AFP 没有相关性,可作为肝癌的独立诊断标准。

2.3 miRNA-4281 与肝癌患者临床病理特征的相关性分析 不同性别、肿瘤大小、疾病分期、AFP 水

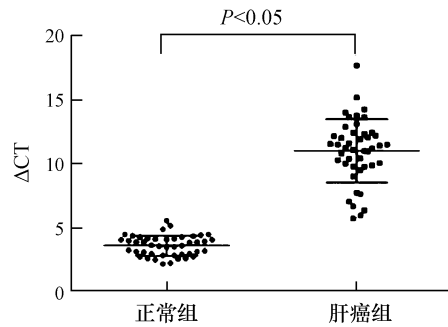


图 1 miRNA-4281 在正常人及肝癌患者血清中的表达情况

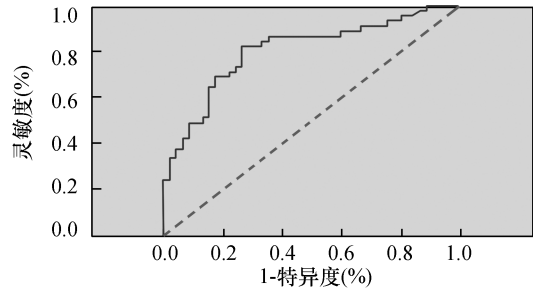


图 2 miRNA-4281 在肝癌患者血清诊断的 ROC 曲线

平、肝功能(转氨酶、总胆红素)、乙型肝炎表面抗原等临床特点中,miRNA-4281 的表达量无明显差异($P>0.05$)(见表 1)。将实验中 miRNA-4281 的表达量按其平均数分为高、低两组。实验结果表明 miRNA-4281 表达量高的组别中,其病人的生存期相对较短,且高、低两组数据的差异同样具有统计学意义($P<0.05$)(见图 3)。

3 讨 论

众所周知,肝癌起病隐匿,早期临床症状不明显,同时由于现有诊断手段的局限,病人确诊时多为晚期。如果能够早期诊断,在肝癌只有单一肿块或肿块大小在 2cm 以内,早期进行根治性手术,患者的 5 年生存期将大大延长^[8]。因此,需要一种行之有效的诊断方法来提高早期诊断率。目前临床上主要是通过血清 AFP 检测以及影像学检查等来进行肝癌的诊断,但是这些诊断手段仍存在一定的局限性,无法十分有效的进行肝癌的早期诊断^[9]。与 AFP 不同的是,miRNAs 更早、更稳定的在体液或组织中表达,即使经过高温、极酸或极碱性条件下,血浆中 miRNAs 的含量变化不大,甚至是经过多次冻

表 1 miRNA-4281 的表达量与肝癌患者临床特征的相关性分析

	例数	miRNA-4281 表达量	P 值
性别 男	33	10.81±2.35	0.27
女	12	11.84±2.79	
肿瘤直径 >5 cm	30	11.20±2.50	0.67
<5 cm	15	10.85±2.53	
分期 I, II	9	11.56±1.90	0.43
III, IV	36	10.96±2.62	
AFP <400 μg/L	22	10.88±2.79	0.47
>400 μg/L	23	11.40±2.07	
谷草转氨酶 >65 IU/L	19	11.23±2.55	0.9
<65 IU/L	26	11.13±2.25	
谷丙转氨酶 >65 IU/L	14	11.18±2.57	0.87
<65 IU/L	31	11.04±2.48	
总胆红素 >25 μmol/L	16	10.89±2.96	0.73
<25 μmol/L	29	11.88±2.23	
乙肝表面抗原 阳性	19	10.74±2.45	0.43
阴性	26	11.34±2.53	

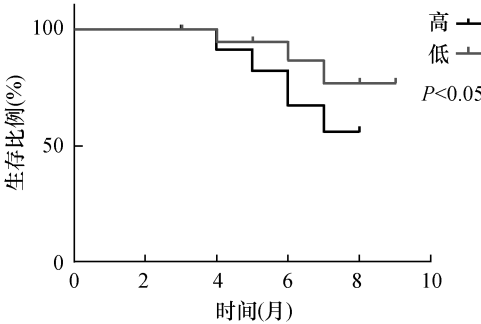


图 3 miRNA-4281 表达水平

高(黑线)的患者有较低的生存期,浅色线提示 miRNA-4281 表达低组具有较高的生存期,两组数据的差异有统计学意义

融循环,其同样能保持相对稳定^[10]。越来越多的研究表明,miRNAs 对于包括肝癌在内的许多疾病的发生、发展、增殖及转移等多个生物学过程都起到了一定的作用^[3,11]。已有研究证明了 miR-96 可以作为肝癌诊断的新型标志物,同时其表达水平与肿瘤大小及分期有关^[12]。Ruan T 等发现了 miR186 在肝癌患者中是低表达的,同时其可抑制肝癌细胞的增值、转移及侵袭^[13]。另外研究发现 miR-101 可通过作用于血管内皮因子来抑制肝癌细胞的迁移和侵

袭,这对于利用 microRNA 对肝癌进行靶向治疗提供了有利证据^[14]。目前已有大量关于肝癌中循环 microRNA 的研究,也证明了其对于肝癌的诊断、转移以及预后的关系。但是目前关于 miRNA-4281 在肝癌中的表达情况并没有相关的研究报道。本研究通过高通量筛查选出在肝癌患者及正常人血清标本中表达水平具有明显差异的 miRNA-4281。结果显示肝癌患者血清 miRNA-4281 的表达量较正常人明显升高($P<0.05$),同时 ROC 曲线分析得出 miRNA-4281 检测对于肝癌诊断的灵敏度和特异度均较高,并且其与 AFP 的表达水平无明显相关性,可做为肝癌的独立诊断标准^[15]。本研究结果显示 miRNA-4281 的表达水平与患者的性别、肿瘤大小、疾病分期、肝功能情况以及存在过乙型肝炎病毒感染等无明显差异($P>0.05$),提示 miRNA-4281 可以用于肝癌的诊断,有可能作为一种新的肿瘤标志物。Kaplan-Meier 生存曲线分析表明 miRNA-4281 表达水平高的患者倾向于有更短的生存期($P<0.05$)。

综上所述,本研究发现 miR-4281 在肝癌患者中明显升高,说明其可能在肝癌的发生、发展中发挥了重要作用,为肝癌的诊断和预后评判提供了新思路,是否能作为评估患者预后的潜在标志物还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Gokuladhas K, Jayakumar S, Rajan B, et al. Exploring the potential role of chemopreventive agent, hesperetin conjugated pegylated gold nanoparticles in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in male wistar albino rats [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2016, 31 (2): 171-184.
- [2] He S, Hu XW, Wang D, et al. Accuracy of microRNAs for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2016, 3(16): 30026-30032.
- [3] Garzon R, Calin GA, Croce CM, et al. MicroRNAs in cancer [J]. *Annu Rev Med*, 2009, 3(60): 167-179.
- [4] Zuo J, Wen M, Lei M, et al. MiR-210 links hypoxia with cell proliferation regulation in human Laryngocarcinoma cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(6): 1039-1049.
- [5] Mirzaei HR, Sahebkar A, Mohammadi M, et al. Circulating microRNAs in hepatocellular carcinoma potential diagnostic and prognostic biomarkers [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(34): 5257-5269.
- [6] Fiorino S, Bacchi-Reggiani ML, Visani M, et al. MicroRNAs as possible biomarkers for diagnosis and prognosis of hepatitis B- and C-related- hepatocellular-carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(15): 3907-3936.
- [7] Chen GS, Zhou N, Li JQ, et al. restoration of miR-20a expression suppresses cell proliferation, migration, and invasion in HepG2 cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(12): 3067-3076.
- [8] Chen Y, Chen J, Liu Y, et al. Plasma miR-15b-5p, miR-338-5p, and miR-764 as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 10(21): 1864-1871.
- [9] Seleem MI, Abdelraouf A, Gerges SS, et al. Laparoscopic assisted per-frequency ablation (Laprf) as a new modality for treatment of HCC in cirrhotic liver [J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2015, 45(1): 451-456.
- [10] Morishita A, Masaki T. MicroRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatol Res*, 2015, 3(45): 128-141.
- [11] Hua HW, Jiang F, Huang Q, et al. MicroRNA-153 promotes Wnt/beta-catenin activation in hepatocellular carcinoma through suppression of WWOX [J]. *Oncotarget*, 2015, 3(6): 3840-3847.
- [12] Chen Y, Dong X, Yu D, et al. Serum miR-96 is a promising biomarker for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18462-18468.
- [13] Ruan T, He X, Yu J, et al. MicroRNA-186 targets Yes-associated protein 1 to inhibit Hippo signaling and tumorigenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4): 2941-2945.
- [14] Liu Z, Wang J, Mao Y, et al. MicroRNA-101 suppresses migration and invasion via targeting vascular endothelial growth factor-C in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 433-438.
- [15] He S, Zhang J, Lin J, et al. Expression and function of microRNA-27b in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2801-2808.

(本文编辑:秦旭平)