

MiR-193b 在肝癌组织中的表达及临床意义

尹文君,王秋平,刘双全,姜孝新*

(南华大学第一附属医院检验科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: 观察 microRNA-193b(miR-193b)在肝癌组织中的表达,并探讨其临床意义。采用荧光实时定量 PCR (qRT-PCR)检测 40 例肝癌组织及相应的癌旁非肿瘤组织标本中 miR-193b 表达,分析 miR-193b 表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、TNM 分期及淋巴结转移等临床病理参数的关系,并比较 miR-193b 高、低表达患者 5 年生存率。结果显示,相对于癌旁非肿瘤组织,肝癌组织中 miR-193b 表达水平明显降低($P<0.01$),miR-193b 表达与肿瘤分化程度、TNM 分期和淋巴结转移相关($P<0.05$),与年龄、性别、肿瘤大小无相关性($P>0.05$);与 miR-193b 低表达组患者相比,高表达组患者 5 年生存率明显增加($P<0.05$)。MiR-193b 在肝癌组织呈低表达,可作为评估肿瘤恶性程度及判断预后的分子标记物。

关键词: miR-193b;肝癌;qRT-PCR;病理特征;生存率

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

Expression of miR-193b in hepatic cancer tissue and its clinical significance

YIN Wenjun, WANG Qiuping, LIU Shuangquan, JIANG Xiaoxin

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: To observe the expression of microRNA-193b (miR-193b) in hepatic cancer tissue and explore its clinical significance. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-193b in 40 hepatic cancer and corresponding paracancerous tissue samples. Relationship between miR-193b expression and patients' age, sex, tumor size, differentiation degree, TNM period, and lymph node metastasis was analyzed. In addition, five-year survival rate was compared between cases with high miR-193b expression and ones with low miR-193b expression. In comparison with paracancerous tissue, miR-193b expression levels were significantly decreased in hepatic cancer tissue ($P<0.01$). The expression of miR-193b was associated with differentiation degree, TNM period and lymph node metastasis ($P<0.05$), but not age, sex and tumor size ($P>0.05$). Five-year survival rate was higher in high miR-193b expression group than low miR-193b expression group ($P<0.05$). These findings suggest that miR-193b is lowly expressed in hepatic cancer tissue and may serve as a molecular marker for evaluating the degree of tumor malignance and judging the prognosis.

Key words: miR-193b; hepatic cancer; qRT-PCR; pathological features; survival rate

肝癌即肝细胞癌,是肝脏中最常见的肿瘤,发病率高,死亡率在各种恶性肿瘤中占第二位,对人类健康危害极大。microRNAs(miRNAs)是一类长度为 19~25 个核苷酸的内源性非编码 RNA,通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区结合,导致其翻译过程受到抑制或引起 mRNA 的降解,在转录后水平特异性影响靶基因表达^[1]。近年研究发现,miRNAs 失调与

肝癌的发生、发展密切相关^[2-3]。MiR-193b 的编码基因位于人第 16 号染色体 p13.12 上,在非小细胞肺癌、食管鳞癌组织中呈低表达^[4-5]。本课题组前期研究表明,miR-193b 通过 caspase-3 途径降低 HepG2 细胞对顺铂的耐药性^[6],提示这种 miRNA 具有抗肝癌作用。然而,miR-193b 在肝癌组织中的表达及与患者预后的关系仍不清楚。本研究采用荧光实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 miR-193b 在肝癌组织及相应的癌旁非肿瘤组织中的表达,从而探讨其在肝癌发生、发展中的作用及临床意义。

收稿日期:2018-03-09;修回日期:2018-08-14

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(No:2018JC1199)

* 通信作者,E-mail:jiangxiaoxin168@.126.com

1 资料与方法

1.1 一般资料 40 例原发性肝癌组织及相应的癌旁非肿瘤组织标本均为本院 2008 年 1 月~2011 年 12 月手术切除后的经石蜡块保存的组织标本,并经病理检测确定,所有病例术前未行化疗和放疗,亦未合并其它系统恶性肿瘤。根据档案室患者病历资料,按年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、TNM 分期情况及淋巴结转移进行分类,并记录 5 年内的生存情况。本实验经南华大学第一附属医院伦理委员会批准,同时征得患者或者其家属的知情同意。

1.2 主要试剂 Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒、SYBR Green Real Time PCR Master Mix 分别由美国 Promega 公司、上海生工生物工程公司、日本 Toyobo 公司提供。

1.3 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 采用 Trizol 试剂提取组织标本中的总 RNA,并按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.22 设计本实验所使用的引物,并由华大基因生物科技有限公司合成,序列如下:miR-193b 正义:5'-GTGCAGGGTC CGAGGT-3',反义:5'-CTGTGCGT-GTGACAG CGGCTGA-3';以 U6 为内参, U6 引物为:正义:5'-CTCG CTTCGGCAGCACA-3',反义:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。在 Roach480 qRT-PCR 仪上进行 PCR 反应,反应条件:95℃ 预变性 15 min,94℃ 变性 15 s,55℃ 复性 30 s,70℃ 延伸 30 s,总共 40 个循环。利用 $\Delta\Delta C_t$ 值法定量目的基因 miR-193b 表达水平。实验过程中同时设置阴性、阳性对照。

1.4 统计学分析 通过 SPSS14.0 软件包进行统计学分析,两组均数比较行 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验,生存率分析利用 Kaplan-Meier 法,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-193b 在肝癌组织中的表达 利用 qRT-PCR 检测 miR-193b 在肝癌组织及相应的癌旁组织中的表达,其 qRT-PCR 的溶解曲线见图 1,从曲线上分析,各个标本的熔点基本上都集中在 89℃ 左右,可以认为 qRT-PCR 的特异性较好,结果分析发现肝癌组织 miR-193b 表达水平明显低于癌旁组织,差异有显著性($t=5.32, P<0.01$) (图 2)。

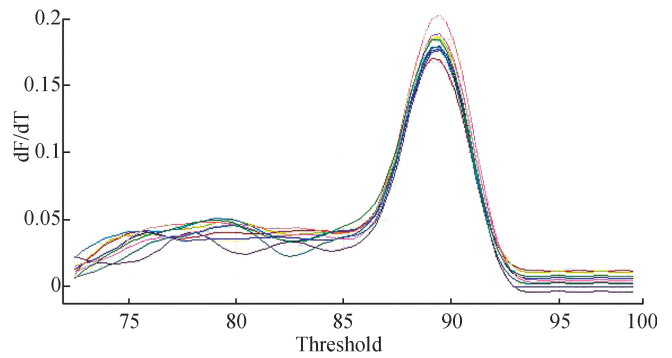


图 1 miR-193b 的 qRT-PCR 的溶解曲线

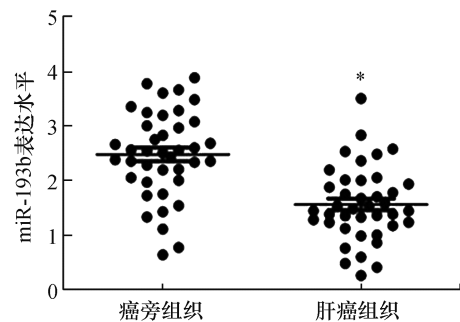


图 2 两组 miR-193b 表达水平比较
与癌旁组织相比,* $P<0.05$

2.2 miR-193b 表达与肝癌临床病理特征分析 为了进一步探讨 miR-193b 与肝癌临床病理特征之间的关系,以中位数为界值(1.68)将其分为 miR-193b 低表达组($\leq$ 中位数)和 miR-193b 高表达组($>$ 中位数),分别包括 16、24 个样本。如表 1 所示,miR-193b 表达与分化程度、TNM 分期和淋巴结转移相关($P<0.05$),而与年龄、性别、肿瘤大小无相关性($P>0.05$)。

表 1 miR-193b 表达与肝癌临床病理特征的关系

临床参数	n	miR-193b 表达		χ^2	P
		高 (n = 16)	低 (n = 24)		
年龄(岁)					
≤50	21	9	12	1.62	>0.05
>50	19	7	12		
性别					
男	26	11	15	2.36	>0.05
女	14	5	9		
肿瘤大小(cm)					
≤3	23	9	15	1.92	>0.05
>3	17	7	6		
分化程度					
低分化	16	4	12	18.45	<0.05
中+高分化	24	12	12		

续表

临床参数	n	miR-193b 表达		χ^2	P
		高 (n=16)	低 (n=24)		
TNM 分期					
I+II	18	10	15	26.53	<0.05
III+IV	22	6	6		
淋巴结转移					
无	13	7	16	21.46	<0.05
有	27	9	5		

2.3 miR-193b 表达与肝癌患者生存的关系 对 40 例肝癌患者术后生存状况进行分析, 相对于 miR-193b 低表达组, miR-193b 高表达组患者 5 年生存率明显增加, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25.38, P < 0.05$), 见图 3。

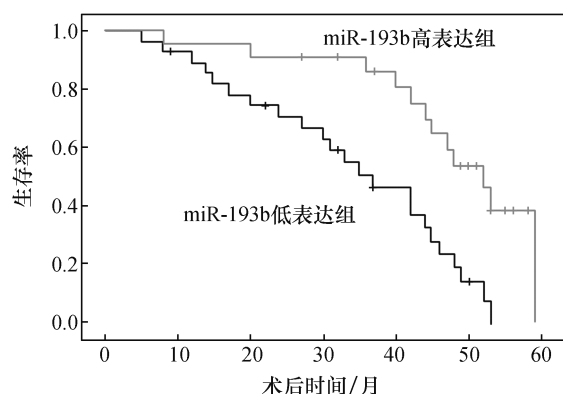


图 3 肝癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨 论

肝癌是最常见的消化系统肿瘤之一, 恶性程度高, 预后差, 其发生是一个多因素、多步骤的复杂过程, 与乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒感染及黄曲霉素、酒精、亚硝胺类物质的长期摄入相关, 但其发病机制仍未完全阐明。肝癌发病隐匿, 许多患者确诊时已到中、晚期, 由于已发生局部肿瘤广泛浸润和/或远处转移而丧失了最佳的治疗时机。近年来, 尽管已采取包括手术、放化疗在内的积极治疗措施, 5 年生存率仍达不到预期水平, 同时具有较高的复发倾向^[7]。因此, 深入研究肝癌的发病机制并从中找出有效的分子标记物对于早期诊断、改善患者预后具有十分重要的意义。

随着人类基因组计划的完成, 后基因组时代的来临, 包括 miRNAs 在内的非编码 RNA 已成为生命

科学最热门的研究领域之一。作为一种多效性因子, miR-193b 在细胞的增殖、分化、凋亡、自噬及血管生成等生物学过程中发挥重要作用。研究表明, miR-193b 在肿瘤形成和发展中具有多重功能, 扮演着抑癌基因的角色。例如, Hulin, 等^[8]用 miR-193b mimic 处理乳腺癌细胞, 发现外源性给予 miR-193b 拮抗细胞迁移及新生血管形成。下调 miR-193b 表达则增加尿激酶型纤溶酶原激活物水平, 进而促进乳腺癌细胞侵袭与转移^[9]。Zhang, 等^[10]报道, miR-193b 在卵巢癌组织中表达下调, 当其过表达时可显著抑制卵巢癌细胞 A2780 增殖, 并增加紫杉醇化疗敏感性。在敲除头颈鳞状细胞癌 FaDu 细胞系的 miR-193b 基因后, 细胞的增殖、迁移、侵袭能力明显提高^[11]。我们的前期研究也发现, miR-193b 通过靶向沉默髓细胞白血病基因-1 抑制肝癌细胞增殖, 并诱导其凋亡^[12]。本研究结果显示, 肝癌组织中 miR-193b 表达水平较癌旁非肿瘤组织降低; miR-193b 表达与肿瘤分化程度、TNM 分期和淋巴结转移相关, 但与年龄、性别、肿瘤大小无相关性; miR-193b 高表达组患者 5 年生存率明显高于 miR-193b 低表达组, 这些结果表明 miR-193b 可能在肝癌的发生、发展中扮演重要作用, 可作为评估肿瘤恶性程度及判断预后的分子标记物, 但具体作用机制仍有待进一步研究。随着研究的深入, miR-193b 可望成为肝癌防治的一个潜在的、有价值的靶点。

参考文献:

- [1] FANG Y, ZHANG L, LI Z, et al. MicroRNAs in DNA damage response, carcinogenesis, and chemoresistance [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017, 333(1):1-49.
- [2] TANG H, ZHANG J, YU Z, et al. MiR-452-3p: a potential tumor promoter that targets the CPEB3/EGFR axis in human hepatocellular carcinoma [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2017, 16(6):1136-49.
- [3] WANG G, FANG X, HAN M, et al. MicroRNA-493-5p promotes apoptosis and suppresses proliferation and invasion in liver cancer cells by targeting VAMP2 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3):1740-8.
- [4] HU H, Li S, LIU J, et al. MicroRNA-193b modulates proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells [J]. *Aeta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(5):424-30.
- [5] 齐海亮, 安晓颖, 李晓霞, 等. 食管鳞癌组织 miR-193b 表达及其与患者临床病理特征的关系 [J]. *山东医药*, 2016, 56(32):74-5.
- [6] YIN W, NIE Y, ZHANG Z, et al. miR-193b acts as a cisplatin sensitizer via the caspase-3-dependent pathway in HCC chemotherapy [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(1):368-74.
- [7] TANG ZY, YE SL, LIU YK, et al. A decade's studies on metastasis

- sis of hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(4):187-96.
- [8] HULIN JA, ToMMASI S, ELLIOT D, et al. MiR-193b regulates breast cancer cell migration and vasculogenic mimicry by targeting dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):13996.
- [9] LI XF, YAN PJ, SHAO ZM. Downregulation of miR-193b contributes to enhance urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression and tumor progression and invasion in human breast cancer [J]. Oncogene, 2009, 28(44):3937-48.
- [10] ZHANG J, QIN J, SU Y. miR-193b-3p possesses anti-tumor activity in ovarian carcinoma cells by targeting p21-activated kinase 3 [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96:1275-82.
- [11] LENARDUZZI M, HUI AB, AIAJEZ NM, et al. MicroRNA-193b enhances tumor progression via down regulation of neurofibromin 1 [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53765.
- [12] YIN W, NIE Y, CHEN L, et al. Deregulation of microRNA-193b affects the proliferation of liver cancer via myeloid cell leukemia-1 [J]. Oncol Lett, 2018, 15(3):2781-8.
- (本文编辑:秦旭平)

(上接第 599 页)

- [10] 孟宪丽,孟华,刘洪智,等.替格瑞洛治疗行 PCI 的 ST 段抬高型心肌梗死合并糖尿病患者效果观察[J].中国医院药学杂志,2015,35(15):1406-9.
- [11] 杜柯君.高敏 C 反应蛋白对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者近期预后的预测价值分析[J].川北医学院学报,2016,31(3):328-30.
- [12] 吴雪锋,范文茂,庞军刚,等.急性冠脉综合征患者的平均血小板体积与 GRACE 评分的相关性[J].广东医学,2014,35(24):3811-3.
- [13] 周晨,王星,金明超,等.急性冠脉综合征患者平均血小板体积和血浆纤维蛋白原的变化及临床意义[J].实验与检验医学,2015,33(4):458-61.
- [14] 李顺宝,苑国富,于兵,等.NLR 和 hs-CRP 在 NSTEMI 患者行冠状动脉介入术后造影剂肾病的预测价值[J].河北医药,2015,37(7):985-8.
- [15] KHAN JN, MCCANN GP. Cardiovascular magnetic resonance imaging assessment of outcomes in acute myocardial infarction [J].World J Cardiol, 2017,9(2):109-33.
- (本文编辑:秦旭平)