

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2015.03.08

血清 microRNA-152 和 microRNA-602 检测在肝癌 诊断及手术疗效评估中的应用

周轶冰

(佳木斯市中心医院普外科,黑龙江 佳木斯 154002)

摘要:为探讨 microRNA-152 和 microRNA-602 检测在肝癌诊断及手术疗效评估中的应用价值。采用实时荧光定量 PCR 检测佳木斯市中心医院 2012 年 3 月~2015 年 3 月的 19 例肝癌血清标本中 microRNA-152 和 microRNA-602 的表达水平,分析 microRNA-152 和 microRNA-602 在乙型肝炎病毒(HBV)阳性组、HBV 阴性组和健康对照组血清样本中的表达差异。结果发现 HBV 阳性血清样本中 microRNA-152 的表达水平(0.65 ± 0.29)明显低于健康组(1.21 ± 0.32),microRNA-602 在 HBV 阳性血清样本中的表达(0.63 ± 0.31)明显高于健康组(0.44 ± 0.15),且水平表达的差异具有统计学意义($p<0.05$)。可见血清样本中的 microRNA-152 和 microRNA-602 可以用于 HBV 阳性肝癌诊断的血清标记物,microRNA-152 可以用于 HBV 阳性肝癌术后效果评价的血清标记物。

关键词:HBV; 肝癌; MicroRNA-152; MicroRNA-602

中图分类号: 文献标志码:A 文章编号:1672-5565(2015)03-192-06

Study on the expression and diagnostic significance of microRNA-152 and microRNA-602 in hepatocellular carcinoma

ZHOU Yibing

(Jiamusi Center Hospital General Surgery, Heilongjiang Jiamusi 154002, China)

Abstract: To explore the application value of microRNA-152 and microRNA-602 in the diagnosis of liver cancer and evaluation of therapeutic effects. The serum microRNA was extracted, and the levels of circulating microRNA-152 and microRNA-602 were quantified by real-time quantitative RT-PCR. Expression differences of microRNA-152 and microRNA-602 were analyzed in every experimental groups. Results show the expression level of the HBV positive hepatocellular carcinoma microRNA-152 was significantly lower than that in the healthy group ($p<0.05$), while the expression level of microRNA-602 was higher than that in the healthy group ($p<0.05$). It is speculated that microRNA-152 and microRNA-602 may be employed as novel serum markers for the diagnosis of HBV-positive liver cancer and microRNA-152 may be employed as novel serum markers for the evaluation of therapeutic effect.

Keywords: Hepatitis B Virus; Hepatocellular Carcinoma; MicroRNA-152; MicroRNA-602

肝癌是目前世界上最常见的恶性肿瘤之一,死亡率排第三位,多发于东南亚及非洲。在我国,肝癌引发的死亡率占第二位,我国每年肝癌新发病例占全世界的 55%,寻找有效的肝癌诊断标记物,研究肝癌治疗手段及评估手术治疗效果至关重要。MicroRNA 是一类小分子核糖核酸,长度大约 20~25 个核苷酸,一个 microRNA 可调节包括转录因子、细

胞因子以及受体在内的成百上千个靶基因,这就使得 microRNA 可以对细胞从增殖到分化再到凋亡的整个生命周期进行有效的调控,还可以参与个体胚胎发育的生物学过程、机体代谢的生理过程以及肿瘤发生、发展的生命过程等^[1-2]。

近年来有很多学者都致力于 microRNA 的研究,例如 microRNA-18、microRNA-21、microRNA-221、

microRNA-122、microRNA-125a、microRNA-150 等均在肝癌组织和正常组织中的表达显示着明显的差异性。各种研究表明了 microRNA 不仅可以作为肝癌早期诊断标记物,还可以作为肝癌治疗效果评价的标记物。但是目前大多数的关于肝癌相关 microRNA 的研究都建立于肿瘤组织标本上,由于组织学肿瘤标记物存在标本采集受限、无法连续检测和随访跟踪不便等缺点,不便于在临床开展。

MicroRNA-152 和 microRNA-602 被证明在 HBV 相关性肝癌组织中存在异常表达,而在肝癌患者血清中的表达尚未明确。本文主要探讨 microRNA-152 和 microRNA-602 检测在肝癌诊断及手术疗效评估中的应用价值,采用实时荧光定量 PCR 检测佳木斯市中心医院 2012 年 3 月~2015 年 3 月的 19 例肝癌血清标本中 microRNA-152 和 microRNA-602 的表达水平,分析 microRNA-152 和 microRNA-602 在 HBV 阳性组、HBV 阴性组和健康对照组血清样本中的表达差异^[3]。

1 材料与方法

1.1 统计资料来源

收集佳木斯市中心医院普外科 2012 年 12 月~2015 年 3 月经病理切片证实为原发性肝癌且行手术切除的 19 例肝癌患者的血清标本作为实验组,其中 HBV 阳性 11 例,HBV 阴性 8 例,男性 12 例,女性 7 例,年龄分布在 56 ± 4.6 。HBV 阳性实验组中 $ALT \leq 40 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 4 例, $ALT > 40 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 7 例;AFP $< 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 8 例,AFP $\geq 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 3 例;肿瘤大小 $\geq 3 \text{ cm}$ 者 8 例,肿瘤大小 $< 3 \text{ cm}$ 者 3 例;I 期 2 例,II 期 5 例,III 期 4 例。HBV 阴性实验组中 $ALT \leq 40 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 7 例, $ALT > 40 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 1 例;AFP $< 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 4 例,AFP $\geq 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 4 例;肿瘤大小 $\geq 3 \text{ cm}$ 者 5 例,肿瘤大小 $< 3 \text{ cm}$ 者 3 例;I 期 1 例,II 期 3 例,III 期 4 例。收集 15 例正常血清样本作为健康对照组,男性 8 例,女性 7 例,年龄分布在 55 ± 9.2 , $ALT \leq 40 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 14 例, $ALT > 40 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 1 例;AFP $< 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 者 15 例。各组别之间性别、年龄均无统计学差异($P > 0.05$)。经过对实验样本资料的统计发现,HBV-DNA 定量、肿瘤大小以及肿瘤分期在 HBV 阳性肝癌患者和 HBV 阴性肝癌患者的样本中表达水平有显著差异,具有统计学意义($P < 0.05$)。

提取血清中的 microRNA,采用荧光定量 PCR 各实验组血清样本中 microRNA-152 和 microRNA-602 的表达水平进行定量检测,分析 microRNA-152 和 microRNA-602 在各实验组中的表达差异。

1.2 方法

首先用上海拜力生物科技有限公司生产的 AM1560 试剂盒提取并纯化总的 microRNA。然后用特殊设计的颈环结构的反转录引物,通过 RT-PCR 技术将 microRNA 单链逆转录成为互补 DNA,即 cDNA,再以此为模板通过 PCR 扩增系统进行 DNA 扩增。最后通过荧光探针法定量 PCR 技术检测样品中 microRNA-152 和 microRNA-602 的表达水平^[4-6]。提取血清中 microRNA 的方法如下:

①抽取大约 2 mL 外周血,放入 EDTA 管内,轻轻混匀,是血与管内抗凝物质充分接触,防止血细胞破裂。

②将盛有 4 mL 全血的 EDTA 管放入 4 °C 冰箱,在 2 h 内分离血浆。

③离心 10 min,将上层液相小心吸出,避免吸取中间白色细胞层。

④将上层液相转入事先预冷的 1.5 mL 离心管子,离心 10 min,以便进一步分离血浆和血细胞。

⑤将第三步离心以后得到的血浆,以 500 μL 的体积分装,并转入 -80 °C 冰箱长期保存。

⑥使用 AM1560 试剂盒提取 microRNA,具体操作方法见说明书。

⑦使用紫外分光光度仪 ZF 型测定 microRNA 的浓度和纯度,具体操作方法见说明书^[7-9]。

1.3 统计学处理

应用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析^[10],实验组与对照组之间的年龄、AFP、HBV-DNA 等定量临床参数采用非配对 t 检验来确定组间差异,使用均数 $\bar{x} \pm s$ 表示,各实验组间 microRNA-152 和 microRNA-602 表达水平的差异显著性使用 U 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义,所有 P 均为双侧^[11]。

2 结果分析

利用荧光定量 PCR 对健康对照组和 HBV 阳性肝癌患者术前、术后的血清样本进行 microRNA-152 和 microRNA-602 的定量检测和分析,RT-PCR 电泳图见图 1 和图 2。

实验表明:(1) microRNA-152 在 HBV 阳性肝癌患者术前实验组中的表达明显低于其在健康对照组中的表达($t = 3.75, P = 0.001$),也明显低于术后实验组中的表达($t = 3.92, P = 0.003$),且差异都具有统计学意义;(2) microRNA-602 在 HBV 阳性肝癌患者术前实验组中的表达明显高于其在健康对照组中的表达($t = 3.13, P = 0.002$),其术后实验组中的表达也要高于健康对照组中的表达($t = 3.47, P = 0.001$),且差异具有统计学意义,具体数据见图 3 和图 4。

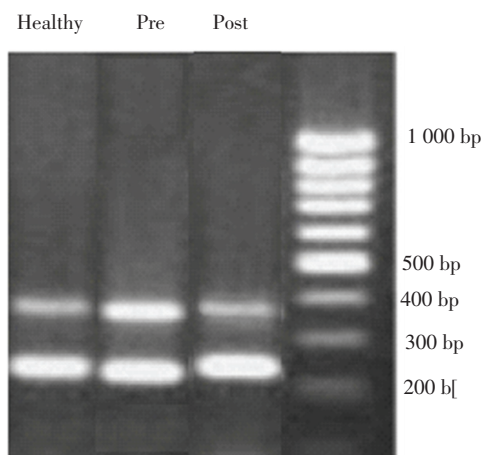


图1 MicroRNA-152 在 HBV 阳性肝癌实验组中的 RT-PCR 电泳图

Fig.1. MicroRNA-152 in HBV positive liver cancer rt-pcr electrophoresis figure in experimental group

注: Healthy; 健康对照组; Pre; 术前组; Post; 术后组。

Notes: Healthy: Healthy controls; Pre: preoperative group; Post: postoperative group.

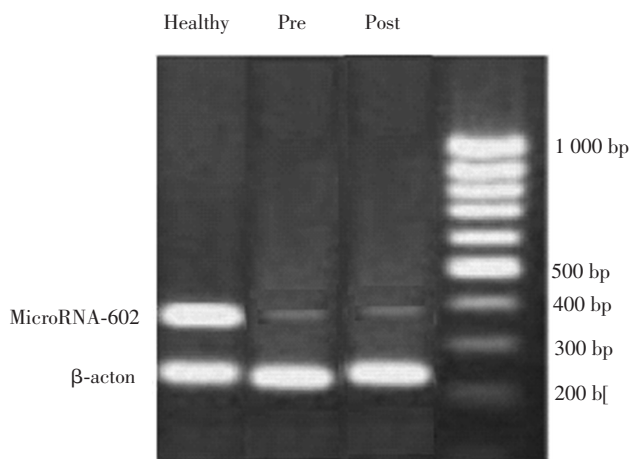


图2 MicroRNA-602 在 HBV 阳性肝癌实验组中的 RT-PCR 电泳图

Fig2. MicroRNA-602 in HBV positive liver cancer rt-pcr electrophoresis figure in experimental group

注: Healthy; 健康对照组; Pre; 术前组; Post; 术后组。

Notes: Healthy: Healthy controls; Pre: Preoperative group; Post: Postoperative group.

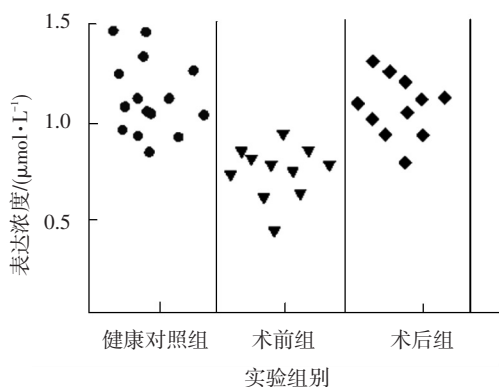


图3 MicroRNA-152 在 HBV 阳性肝癌各实验组中的表达情况

Fig.3 MicroRNA-152 in HBV positive expression in the experimental group of liver cancer

注: 健康对照组: $n = 15$; 术前组: $n = 11$; 术后组: $n = 11$; 健康对照组-术前组: $p < 0.05$; 术前组-术后组: $p < 0.05$; 健康对照组-术后组: $p > 0.05$ 。

Notes: Healthy controls: $n = 15$; Preoperative group: $n = 11$; Postoperative group: $n = 11$; Healthy controls-Preoperative: $p < 0.05$; Preoperative-Postoperative: $p < 0.05$; Healthy controls-Postoperative: $p > 0.05$ 。

利用实时荧光定量 PCR 对健康对照组和 HBV 阴性肝癌患者术前、术后的血清样本进行 microRNA-152 和 microRNA-602 的定量检测和分析, RT-PCR 电泳图见图 5 和图 6。

实验表明: (1) MicroRNA-152 在 HBV 阴性肝癌患者在术前实验组与健康对照组中的表达没有显著差异 ($t = 2.03, P = 0.07$), 术后实验组与健康对照组

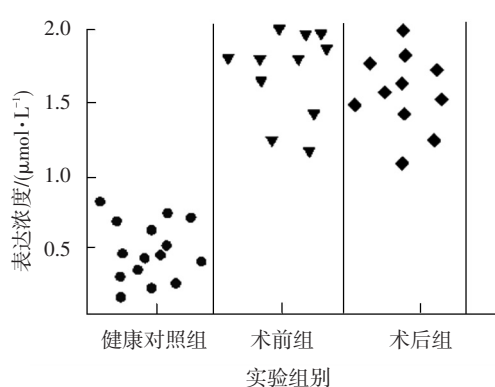


图4 MicroRNA-602 在 HBV 阳性肝癌各实验组中的表达情况

Fig.4 MicroRNA-602 in HBV positive expression in the experimental group of liver cancer

注: 健康对照组: $n = 15$; 术前组: $n = 11$; 术后组: $n = 11$; 健康对照组-术前组: $p < 0.05$; 术前组-术后组: $p > 0.05$; 健康对照组-术后组: $p < 0.05$ 。

Notes: Healthy controls: $n = 15$; Preoperative group: $n = 11$; Postoperative group: $n = 11$; Healthy controls-Preoperative: $p < 0.05$; Preoperative-Postoperative: $p > 0.05$; Healthy controls-Postoperative: $p < 0.05$ 。

中的表达也没有显著差异 ($t = 2.32, P = 0.09$), 都不具有统计学意义; (2) MicroRNA-602 在 HBV 阴性肝癌患者在术前实验组与健康对照组中的表达没有显著差异 ($t = 2.18, P = 0.12$), 术后实验组与健康对照组中的表达也没有显著差异 ($t = 2.09, P = 0.11$), 都不具有统计学意义, 具体数据见图 7 和图 8。

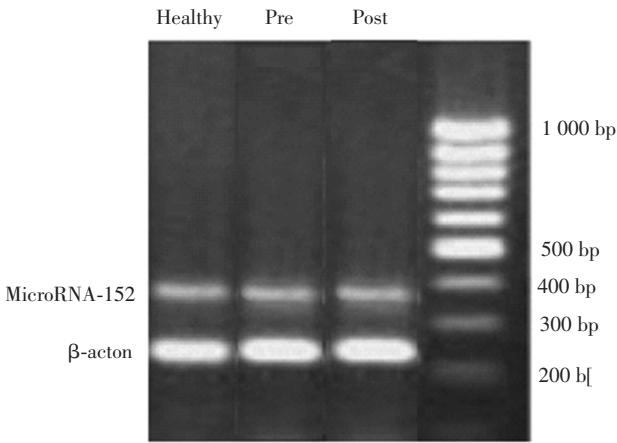


图 5 MicroRNA-152 在 HBV 阴性肝癌实验组中的 RT-PCR 电泳图

Fig.5 MicroRNA-152 in HBV negative liver cancer rt-pcr electrophoresis figure in experimental group

注: Healthy: 健康对照组; Pre: 术前组; Post: 术后组。

Notes: Healthy: Healthy controls; pre: Preoperative group; Post: Postoperative group.

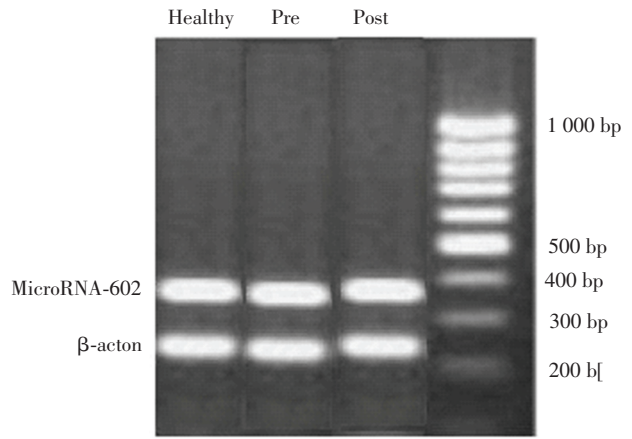


图 6 MicroRNA-602 在 HBV 阴性肝癌实验组中的 RT-PCR 电泳图

Fig.6 MicroRNA-602 in HBV negative liver cancer rt-pcr electrophoresis figure in experimental group

注: Healthy: 健康对照组; Pre: 术前组; Post: 术后组。

Notes: Healthy: Healthy controls; Pre: Preoperative group; Post: Postoperative group.

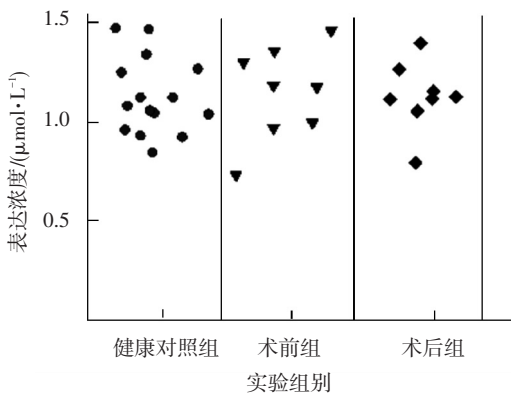


图 7 MicroRNA-152 在 HBV 阴性肝癌各实验组中的表达情况

Fig.7 MicroRNA-152 in HBV negative expression in the experimental group of liver cancer

注: 健康对照组: $n = 15$; 术前组: $n = 11$; 术后组: $n = 11$; 健康对照组-术前组: $p > 0.05$; 术前组-术后组: $p > 0.05$; 健康对照组-术后组: $p > 0.05$ 。

Notes: Healthy controls: $n = 15$; Preoperative group: $n = 11$; Postoperative group: $n = 11$; Healthy controls-Preoperative: $p < 0.05$; Preoperative-Postoperative: $p < 0.05$; Healthy controls-Postoperative: $p > 0.05$ 。

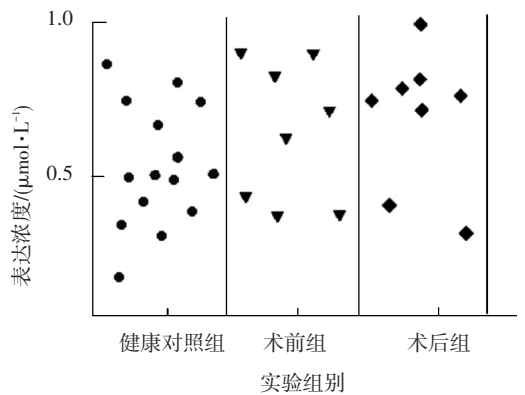


图 8 MicroRNA-602 在 HBV 阴性肝癌各实验组中的表达情况

Fig.8 MicroRNA-602 in HBV negative expression in the experimental group of liver cancer

注: 健康对照组: $n = 15$; 术前组: $n = 11$; 术后组: $n = 11$; 健康对照组-术前组: $p > 0.05$; 术前组-术后组: $p > 0.05$; 健康对照组-术后组: $p > 0.05$ 。

Notes: Healthy controls: $n = 15$; Preoperative group: $n = 11$; Postoperative group: $n = 11$; Healthy controls-Preoperative: $p < 0.05$; Preoperative-Postoperative: $p < 0.05$; Healthy controls-Postoperative: $p > 0.05$ 。

3 讨论

研究发现, HBV 阳性肝癌患者手术前血清样本中 microRNA-152 的表达水平显著低于健康对照组和手术后血清样本中的表达水平, 但 microRNA-152 在 HBV 阴性肝癌患者术前、术后以及健康对照组的血清样本中没有显著性差异, 已有研究表明

microRNA 主要来源于细胞分泌, 而 HBV 感染会导致肝细胞中 microRNA-152 的表达水平明显下调, 所以 HBV 阳性肝癌患者血清中 microRNA-152 表达水平显著降低的主要原因在于 HBV 感染后抑制了肝细胞中 microRNA-152 的表达水平, 从而抑制了细胞的主动分泌功能, 导致肝癌血清中 microRNA-152 的表达水平下调。另外, 本研究还发现, microRNA-152 在肝癌患者术后血清样本中的表达水平显著高于术

前血清样本中的表达水平,这主要因为,实验所选的术后血清样本都在手术后2日内完成,手术对肝细胞造成的损伤还没有恢复,可能导致肝细胞中 microRNA-152 漏入血液中,从而导致了术后血清样本中 microRNA-152 的表达水平显著升高。由于实验条件有限,无法进行大样本量的实验,为了能够更加深入的研究 microRNA-152 的机制,还需要长期跟踪随访,进行大样本量的长期研究。

该研究还表明, microRNA-602 在 HBV 阳性肝癌患者术前和术后血清样本中的表达水平都显著高于健康对照组血清样本中的表达水平,具有统计学意义 ($p < 0.05$),但 microRNA-602 在术前与术后血清样本中的表达无显著性差异。我们还发现 microRNA-602 在血清样本中的表达水平在早期已经出现升高,有可能是由于 microRNA-602 在损伤早期,尚未有形态学上的变化之前,已经通过某种机制由肝细胞转移到血液循环。已有报道发现^[12-15], microRNA-602 在肝癌组织中的表达水平显著高于癌旁正常组织中的表达水平,虽然研究的样本类型不同,但是研究结果都指示了 microRNA-602 可能成为一种新的用于 HBV 阳性肝癌早期诊断的血清标记物,而 microRNA-602 在两种不同样本中表达之间的联系还有待我们进一步的研究。

综上所述,该研究发现在 HBV 阳性肝癌患者术前血清样本中 microRNA-152 和 microRNA-602 存在表达异常的现象,在 HBV 阳性肝癌患者术前和术后血清样本中 microRNA-152 的表达也有显著性的差异,这些研究表明了 microRNA-152 和 microRNA-602 可以用于 HBV 阳性肝癌早期诊断的血清标记物,而且 microRNA-152 也有成为一种重要的 HBV 阳性肝癌手术治疗效果的评价指标,但是 microRNA-152 和 microRNA-602 在肝脏细胞中并不具有特异性,它们能否如该研究预期的一样,成为 HBV 阳性肝癌早期诊断的血清标记物还有待更进一步的证实,尤其 microRNA-152 在术前和术后血清样本中差异表达的确切机制更加需要大量样本的研究。

参考文献

- [1] HU X, LI L, SHANG M, et al. Association between microRNA genetic variants and susceptibility to colorectal cancer in Chinese population[J]. *Tumor Biology*, 2014, 8(3):378-183.
- [2] DIKEAKOS P, THEODOROPOULOS G, RIZOS S, et al. Association of the miR-146a, miR-149, and miR-196a polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Greek population[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 16(2):145-148.
- [3] MING R, WANG X, TONG J, et al. A single nucleotide polymorphism in microRNA-146a is associated with the risk for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol. Carcinog*, 2013, 46(S1):122-125.
- [4] 黄琼华, 黄天壬, 利基林, 等. 广西壮族人群 microRNA-146a 基因多态性与肝癌遗传易感性的相关性研究[J]. *中国癌症防治杂志*, 2013, 7(02):98-102. HUANG Qionghua, HUANG Tianren, LI Jilin, et al. Guangxi zhuang people mirna-146-a gene polymorphism and genetic susceptibility to cancer of the liver of the correlation research[J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Control*, 2013, 7(02):98-102.
- [5] 徐国斌, 易广新, 熊斌, 等. 原发性肝癌术后早期肝内复发转移 36 例的介入治疗[J]. *介入放射学杂志*, 2013, 6(04):76-79. XU Guobin, YI Guangxin, XIONG Bin, et al. Transfer of 36 cases of primary liver cancer early postoperative intrahepatic recurrence of interventional therapy[J]. *Interventional Radiology Journal*, 2013, 6(04):76-79.
- [6] ZHANG F, FAN N, MU J, et al. Exportin 4 gene expression and DNA promoter methylation status in chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Viral Hepat*, 2014, 7(4):333-338.
- [7] SONIA A, MELO M. Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2014, 14(1):342-346.
- [8] 范丽丽, 于湘友. 乌司他丁对体外循环患者细胞黏附分子浓度影响及对肺损伤保护作用[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2012, 44(26):57-60. FAN Lili, YU Xiangyou. Ulinastatin on the cell adhesion molecule concentration of patients with extracorporeal circulation and the protection of lung injury[J]. *The Diagnosis and Treatment of Practical Magazine*, 2012, 44(26):57-60.
- [9] 徐杰, 宋樱花, 马明远, 等. 乌司他丁对重度脓毒症患者心功能的影响[J]. *中华全科医学*, 2012, 11(10):33-36. XU Jie, SONG Yinghua, MA Mingyuan, et al. Ulinastatin the influence of cardiac function in patients with severe sepsis[J]. *The Chinese General Medicine*, 2012, 11(10):33-36.
- [10] QU Ke. Circulating microRNA as biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Gastroenterol*, 2011, 45(4):355-360.
- [11] LI Ji. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(1):70-73.
- [12] 邓志华, 黄赞松. microRNA 与消化系统肿瘤[J]. *生物医学工程与临床*, 2011, 11(05):135-138.

- DENG Zhihua, HUANG Zangsong. Micornas and digestive system tumors[J]. Biomedical Engineering and Clinical, 2011, 11(05):135-138.
- [13] 孙铁为, 陈晓宁, 刘军, 等. 胃癌中微小 RNA 表达谱及 miR-429 表达水平的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(3):385-387.
- SUN Yiwei, CHEN Xiaoning, LIU Jun, et al. Small RNA expression in gastric cancer spectrum and miR-429 expression level of the research[J]. The Experimental Surgical Magazine, 2012, 29(3):385-387.
- [14] 居峰, 左君波, 朱阿考, 等. 胃癌组织中 miR-148a 基因甲基化状态与 DNA 甲基化转移酶的关系[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2013, 27(4):361-363.
- JU Feng, ZUO Junbo, ZHU Akao, et al. Gastric cancer tissue of miR-148-a gene methylation status and the relationship between DNA methylation transferase[J]. The Diagnosis and Treatment of Practical Magazine, 2013, 27(4):361-363.
- [15] 聂宇, 张洋, 韩变梅, 等. 常规 TRIzol 法提取血清 microRNA 的改良[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(5):427-428.
- NIE Yu, ZHANG Yang, HAN Bianmei, et al. Conventional TRIzol method to extract serum microRNA improvement[J]. The Diagnosis and Treatment of Practical Magazine, 2011, 25(5):427-428.