·论　著·

miRNA let-7a 和 miRNA let-7f 早期诊断肝癌的临床价值*

刘旭斌[1],余德奎[1△],邹汉良[1],杨　娟[1],陶绪雄[2],李　杰[3]
(1.广东省深圳市坪山新区妇幼保健院普外科　518122;2.广东省深圳市龙岗中心医院　518100;3.武汉大学公共卫生学院,武汉 430070)

摘　要:目的　探讨原发性肝癌患者 miRNA let-7a、miRNA let-7f 的表达。**方法**　收集龙岗中心医院院及合作医院 2014 年 6 月至 2016 年 3 月接受肝癌切除手术的 40 例原发性肝癌患者。采用 RT-PCR 方法检测 miRNA let-7a、miRNA let-7f 在血清、肝癌/癌旁组织中的表达水平。选择同期该院体检的 40 例健康者作为健康对照者。比较肝癌患者和健康对照者血清 miRNA let-7a、let-7f 的表达差异。**结果**　肝癌癌变组织 miRNA let-7a[(0.18±0.04)×10³]、miRNA let-7f[(0.19±0.01)×10³]分别较癌旁组织[(1.52±0.11)×10³、(0.67±0.10)×10³]低,差异有统计学意义($P<0.01$);肝癌患者血清 miRNA let-7a[(0.22±0.06)×10³]、miRNA let-7f[(0.15±0.04)×10³]较健康对照者[(1.13±0.21)×10³、(0.62±0.12)×10³]低,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论**　miRNA let-7a、miRNA let-7f 在肝癌患者病变组织及血清中异常偏低表达,可作为早期诊断肝癌的重要标志物,为临床诊断提供参考。

关键词:肝癌;　miRNA let-7a;　miRNA let-7f
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.14.005　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2017)14-2017-03

The expression of miRNA let-7a and miRNA let-7f in primary liver cancer patients*

LIU Xubin[1],*YU Dekui*[1△],*ZOU Hanliang*[1],*YANG Juan*[1],*TAO Xuxiong*[2],*LI Jie*[3]
(1.*Department of General Surgery*,*Shenzhen Pingshan New District Women and Child Health Hospital*,*Shenzhen*,*Guangdong* 518122,*China*;2.*Longgang Central Hospital of Shenzhen*,*Shenzhen*,*Guandong* 518100,*China*;3.*School of Public Health*,*Wuhan University*,*Wuhan*,*Hubei* 430070,*China*)

Abstract:Objective　To study the expression of miRNA let-7a and let-7f in primary liver cancer patients. **Methods**　In our hospital from June 2014 to March 2016,40 patients with primary liver cancer were sellected. the expression levels of miRNA let-7a and let-7f in serum and liver cancer/tumor adjacent tissues were detected by RT-PCR methods. A total of 40 healthy volunteers were selected at the same time and expression of miRNA let-7a,let-7f in serum were analyzed. **Results**　The miRNA in cancer tissues [let-7a (0.18±0.04)×10³,let-7f(0.19±0.01)×10³]were lower than those in the adjacent tissues [let-7a(1.52±0.11)×10³,let-7f (0.67±0.10)×10³]. The difference was statistically significant($P<0.01$);In primary liver cancer,the level of miRNA let-7a [(0.22±0.06)×10³,let-7f(0.15±0.04)×10³] were lower than those in normal healthy people[(1.13±0.21)×10³,(0.62±0.12)×10³],the difference was statistically significant($P<0.01$). **Conclusion**　miRNAlet-7a,miRNA let-7f are abnormally low expression in the tissue and the serum of primary liver cancer patients.

Key words:primary liver cancer;　miRNA let-7a;　miRNA let-7f

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤类型之一,男性多于女性,具有发病率高、病死率高等特点,早期及时确诊是指导临床治疗、改善患者预后的关键。肝癌患者早期症状不明显或缺乏特异性,仅凭肝区疼痛、全身或消化道等症状难以确诊,传统检查手段如血清标志物甲胎蛋白(AFP)检测、影像学检查等均存在一定的漏诊、误诊,且确诊时大多数患者已是中晚期,临床治疗效果欠佳,预后较差[1]。近年来 miRNA 在肝癌发病机制中的作用逐渐引起关注,国内外研究已明确 miRNA let-7 与肝癌的发生、发展密切相关[2-3]。但现有研究报道多数是关于 let-7 家族与肝癌细胞之间的关系,对 let-7 家族中 miRNA 的单个种类的研究不足,特别是针对 let-7f 的研究欠缺。动物试验表明 miRNA let-7a、miRNA let-7f、miR-98 等在大鼠早期肝癌中异常表达。现通过患者肝癌病变组织与癌旁组织;肝癌患者与健康对照者各指标水平的比较,探讨 miRNA let-7a、miRNA let-7f 在早期肝癌诊断中的临床价值。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取龙岗中心医院及合作医院 2014 年 6 月至 2016 年 3 月行肝癌切除手术的 40 例原发性肝癌患者。纳入标准:(1)均结合临床常规检查结果、手术病理结果等确诊。(2)年龄小于或等于 70 岁。(3)入院前未接受其他放、化疗或生物免疫治疗等。(4)签署知情同意书。排除标准:(1)合并心、肺、肾等器质性病变或其他恶性肿瘤者。(2)精神意识障碍者。男 29 例,女 11 例;年龄 35～69 岁,平均年龄(53.1±6.2)岁;入院时 AFP 为 15.7～627.3 ng/mL,平均(90.4±10.7)ng/mL。选取同期该院体检的 40 例健康者作为健康对照者,男 31 例,女 9 例;年龄 32～70 岁,平均年龄(53.5±6.4)岁。

*　**基金项目:**广东省深圳市科技计划资助项目(JCYJ20140415114640316)。
作者简介:刘旭斌,男,副主任医师,主要从事普通外科研究。　△　**通信作者,**E-mail:2073700930@qq.com。

本研究经该院伦理委员会审核批准，且肝癌患者和健康对照者的性别、年龄等一般资料比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），具有可比性。

1.2　方法

1.2.1　血液标本及处理　肝癌患者手术前和健康对照者均抽取空腹静脉血 5 mL，15～25 ℃静置 60～120 min，血液凝固后常规离心 1 500 r/min，10 min 并提取上清液，标本装入去核糖核酸酶（RNase）的 EP 管中，－60 ℃冷存以备检测。按照 1∶1 的比例在血清标本中加入 Trizol 试剂，充分混匀后用苯酚/氯仿做去蛋白处理，将乙醇沉淀的 RNA 成分加入 DEPC 水中溶解，采用紫外分光光度法检测所提取的 RNA 纯度，检测后将提取的 RNA 低温保存。

1.2.2　组织标本及处理　肝癌患者手术采集肝癌病变组织和癌旁组织，其中癌旁组织切取范围为距离癌灶边缘约 3 cm 以内，标本即刻低温－60 ℃保存。分别取 0.1 g 组织标本放入预冷的研钵中，加入适量液氮磨成粉末，待标本中液氮挥发后加入约 3 mL 的 Trizol 试剂，4 ℃下 8 000 r/min 离心，5 min 后，获取上清液至 EP 试管中并加入 200 μL 氯仿，充分振荡混匀 30 s 以确保有机相、水相充分接触。15～25 ℃静置 15～20 min 后4 ℃下 8 000 r/min 离心，5 min，其中水相部分置于 0.5 mL 异丙醇的去 RNase 的 EP 管中，常规离心弃上清液后加入 DEPC 水溶解。采用紫外分光光度法提取总 RNA，OD260/OD280 比值大于或等于 1.8，检测提取的 RNA 低温保存。

1.2.3　合成 cDNA　严格按照 TAKARA 反转录试剂盒说明书进行操作，RT 反应体系的配置在去 RNase 的 PCR 管中进行，将提取的总 RNA 浓度进行适当调整，RT 反应体系充分混匀后 40 ℃孵育反转录 60 min，90 ℃孵育 10 min 灭活反转录酶。

1.2.4　荧光定量 PCR 检测　取适量 cDNA 置于去 RNase 的 PCR 试管中，内侧基因为 β-actin，根据试剂盒说明书加入上下游引物，2 μL 通用引物、2 μL 的 let-7a 和 let-7f 目的引物、4 μL 的无酶水和 2×SYBR Green PCR Master MiX，建立 20 μL 的反应体系。反应相关参数设置：预变性 95 ℃，15 min，共 40 个循环；变性 95 ℃，30 s，退火 56 ℃，20 s，延伸 72 ℃，40 s，观察并收集荧光信号。

1.2.5　数据分析　根据 cDNA 浓度梯度的 log 值作△CT 值图，采用实时荧光定量 Real-time PCR 相对定量法检测组织和血清标本的 miRNA let-7a、let-7f 水平。以 U6 表达量为内参，miRNA let-7a、let-7f 用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 表示，其中 CT 值表示每个 PCR 管内的荧光信号到达设定阈值期间所经历的循环数，△CT＝检测值平均 CT－U6 平均 CT，△△CT＝待检测标本△CT －校准标本△CT。

1.3　统计学处理　采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析，使用 EpiData3. 软件行双份录入，利用人工和计算机对数据进行再次核查确保数据的客观、准确性，纠正逻辑错误和锁定数据集。肝癌患者组织、血清标本 miRNA let-7a、let-7f 为计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较行 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　2 种组织标本检测结果比较　肝癌患者病变组织标本 miRNA let-7a、let-7f 分别低于癌旁组织，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1 和图 1、2。

表 1　2 种组织标本检测结果比较（$\times10^3$，$\bar{x}\pm s$）

组织类型	例数（n）	miRNA let-7a	miRNA let-7f
病变组织	40	0.18±0.04	0.19±0.01
癌旁组织	40	1.52±0.11	0.67±0.10
t		72.406	30.207
P		＜0.01	＜0.01

表 2　肝癌患者与健康对照者血清标本检测结果比较（$\times10^3$，$\bar{x}\pm s$）

类别	例数（n）	miRNA let-7a	miRNA let-7f
肝癌患者	40	0.22±0.06	0.15±0.04
健康对照者	40	1.13±0.21	0.62±0.12
t		26.352	23.5
P		＜0.01	＜0.01

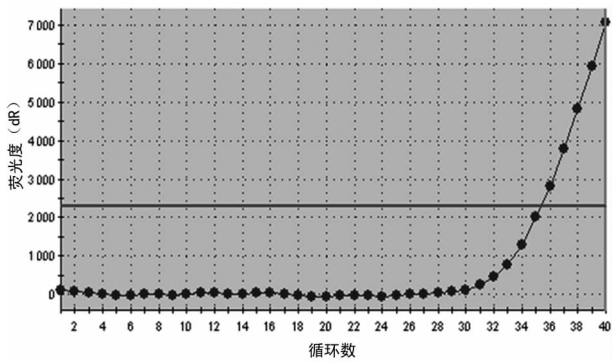

图 1　癌变组织 miRNA let-7a PCR

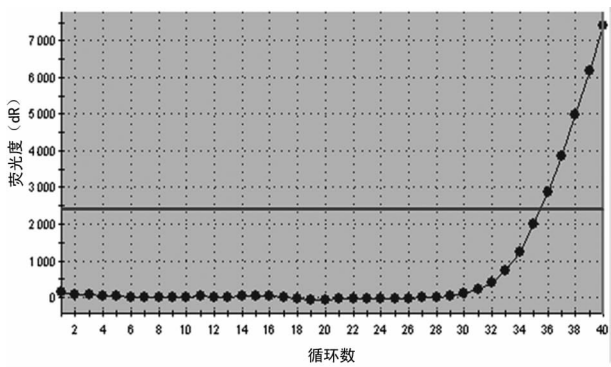

图 2　癌变组织 miRNA let-7f PCR

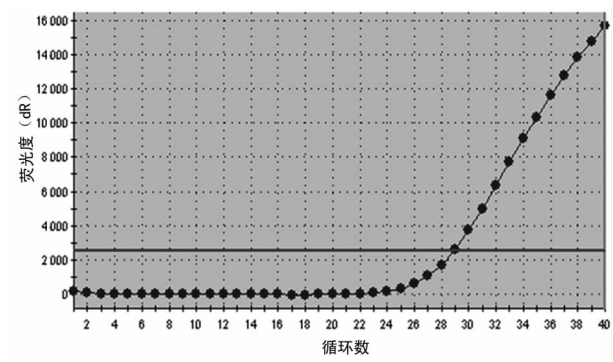

图 3　肝癌患者血清 miRNA let-7a PCR

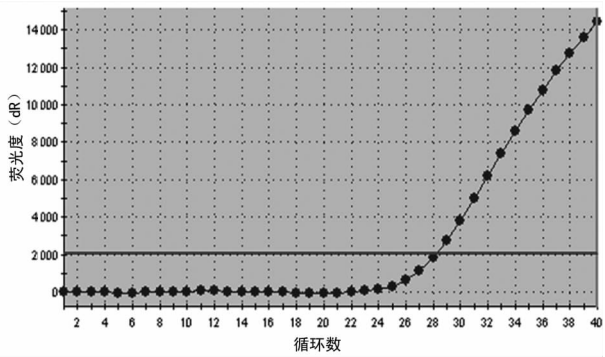

图 4　肝癌患者血清 miRNA let-7f PCR

2.2　肝癌患者与健康对照者血清标本检测结果比较　患者血清 miRNA let-7a、let-7f 分别低于健康对照者，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见表 2 和图 3、4。

3　讨　论

我国乙型肝炎病毒相关性肝癌的发病率和病死率均较高，且呈上升趋势。目前治疗肝癌的手段较多，如外科切除术，经皮肿瘤清除和肝移植治疗，热疗等，但对化疗不敏感，因确诊的延误和肿瘤转移扩散，导致部分患者临床治疗效果不满意，复发率和病死率仍较高[4]。miRNA 是近年来发现的一种具有调节作用的内源性单链小分子 RNA，长度约为 20～22 个核苷酸，在真核生物中广泛分布。目前经鉴定的人类 miRNA 高达 700 余种，其广泛的分布性和稳定特异性的表达对参与调节人体细胞代谢、增殖、凋亡、分化、发育具有重要的影响[5]。多数学者认为 miRNA 相关表达调控机制可能是通过改变处理酶和启动子超甲基化等实现[6]。

目前 miRNA 具有致癌基因和肿瘤抑制基因的作用已被普遍认可，有研究探讨子宫内膜样腺癌组织和正常内膜组织的 miRNA 表达谱及差异，发现共有 18 个 miRNA 在子宫内膜样腺癌中呈异常上调表达，31 个 miRNA 呈明显下调表达等，可作为临床区分不同分化子宫内膜样腺癌的重要生物标志物[7]。国外研究报道，结缔组织生长因子（CTGF）和核因子 NF-κB 受体活化因子配体（RANKL）是 miR-18 的靶基因，提示肝癌的发生、进展与 miRNA 紧密相关[8]。

本研究认为：(1)目前对 let-7 家族中 miRNA 的单个种类研究较少。(2)let-7 家族作为最早发现的一类 minRNA，主要包括 let-7a、let-7f、7i、miRNA-98 等 13 个成员，随着 miRNA 对肝癌生物和分子功能研究的逐渐加深，let-7 家族成为关注的热点。本研究结果显示，肝癌患者病变组织 miRNA let-7a、let-7f 水平分别为 $(0.18\pm0.04)\times10^3$、$(0.19\pm0.01)\times10^3$，均明显低于癌旁组织表达（$P<0.01$）；且肝癌患者血清 miRNA let-7a、let-7f 水平也低于健康对照者（$P<0.01$），提示肝癌发病和 miRNA let-7a、let-7f 的表达高度相关，血清检测水平偏低预示肝癌的可能。有研究报道，microRNA let-7a 可通过下调 $CD133^+$ Huh7 肝癌干细胞内的 wnt/β-catenin 信号通路的转录活性，从而达到抑制肝癌干细胞增殖和转移的靶向功能[9]。还有研究表明，let-7 对肝癌高迁移率族蛋白 A2 癌基因也具有抑制作用[10]。本研究认为 miRNA let-7a、miRNA let-7f 在肝癌患者中呈异常下调表达，肿瘤细胞基因的靶向调控功能失调是引起肝癌的重要机制，高敏感性指标 miRNA let-7a、miRNA let-7f 可作为早期诊断的重要标志物。

综上所述，miRNA 表达和肝癌发病密切相关，miRNA let-7a、miRNA let-7f 水平在病理组织和血清标本中均明显下调，早期加强血清相关指标检测，对早期诊断、指导临床治疗、改善预后具有重要的临床意义。

参考文献

[1] 朱明月，李孟森. 甲胎蛋白：治疗肝癌的新靶点[J]. 海南医学，2014，25(1)：1-4.

[2] Nagano T，Higashisaka K，Kunieda A，et al. Liver-specific microRNAs as biomarkers of nanomaterial-induced liver damage[J]. Nanotechnology，2013，24(40)：405-409.

[3] 占美晓，李勇，胡宝山，等. 肝癌患者血清中微小 RNA 的表达及其临床意义[J]. 中华医学杂志，2013，93(23)：1830-1832.

[4] 梁安林，李灼日，周开伦，等. 肝癌的热疗方法与新进展[J]. 海南医学，2013，24(12)：1789-1792.

[5] 王攀，谢赦文，范钦桥，等. miR-139-5p 靶向转化生长因子-β1 抑制肝癌细胞侵袭转移的机制[J]. 中华肝胆外科杂志，2016，22(1)：17-23.

[6] 周超，曹虹，饶雪峰，等. 正常上皮细胞特异性-1 基因超甲基化在肝癌发病机制中的作用[J]. 中华肝胆外科杂志，2016，22(6)：402-406.

[7] 梁静，张贵宇，马本红，等. 子宫内膜样腺癌组织中 microRNA 差异表达谱分析[J]. 山东大学学报（医学版），2011，49(8)：90-95.

[8] Koturbash IJ. Role of epigenetic and miR-22 and miR-29b alterations in the downregulation of Mat1a and Mthfr genes in early preneoplastic livers in rats induced by 2-acetylaminofluorene[J]. Mol Carcinog，2013，52(4)：318-327.

[9] 陈斌，沈顺利，彭宝岗. 微小 RNA let-7a 对 CD133＋肝癌干细胞增殖和转移的影响[J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志（电子版），2015，5(3)：44-47.

[10] 傅孝媛，张献全. 高迁移率族蛋白 A2 基因与肿瘤关系的研究进展[J]. 重庆医学，2016，45(14)：1992-1995.

（收稿日期：2017-01-17　修回日期：2017-02-25）

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序，可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键，包括医学专业设计和统计学设计，医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察（检测）指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查，要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析，包括进行统计描述和统计推断。