

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.23.019

# 原发性肝癌患者血清 miR-221 检测的临床意义

赵甜甜<sup>1,2</sup>, 赵雯秋<sup>3</sup>

(1. 徐州医科大学, 江苏徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属徐州市立医院检验科, 江苏徐州 221000;  
3. 徐州市中医院检验科, 江苏徐州 221000)

**摘要:**目的 探讨 miR-221 在原发性肝癌患者血清中的表达及临床意义。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测对比 71 例原发性肝癌患者(肝癌组)、40 例肝良性病变(良性肝病组)、52 例体检健康者(健康组)血清 miR-221 水平,分析 miR-221 的表达程度与患者多项临床参数之间的关系。结果 肝癌组患者血清 miR-221 表达水平明显高于良性肝病组及健康组( $P < 0.05$ )。肝癌组患者血清 miR-221 表达水平的高低与性别、年龄及甲胎蛋白(AFP)无相关性( $P > 0.05$ ),与临床 TNM 分期、淋巴转移及远处转移有关( $P < 0.05$ )。结论 血清 miR-221 表达水平与原发性肝癌患者多项临床参数关系密切,可作为原发性肝癌诊疗观察的血清学依据。

**关键词:**原发性肝癌; miR-221; 逆转录-聚合酶链反应

中图分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)23-3546-04

## Clinical significance of detection of serum miR-221 in patients with primary hepatic carcinoma

ZHAO Tiantian<sup>1,2</sup>, ZHAO Wenqiu<sup>3</sup>

(1. Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xuzhou No. 1 People's Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Xuzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and clinical significance of miR-221 in the serum of patients with primary hepatocellular carcinoma. **Methods** A total of 71 cases of patients with primary liver cancer, 40 patients with benign liver lesions and 52 cases of normal control group had detected serum miR-221 level by real-time fluorescent quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. And the relationship between the expression of miR-221 and the degree of patients with multiple clinical features were detected. **Results** The level of miR-221 in serum of patients with primary hepatocellular carcinoma was significantly higher than that in benign lesion group and normal control group ( $P < 0.05$ ). The levels of serum miR-221 in patients with primary hepatocellular carcinoma were not correlated with gender, age and alpha fetoprotein ( $P > 0.05$ ), which was related to the TNM, lymph node metastasis and distant metastasis ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression level of miR-221 in serum is closely related to the clinical pathological characteristics of primary liver cancer, and is expected to be the serological basis for the diagnosis and treatment of primary liver cancer.

**Key words:** primary hepatic carcinoma; miR-221; reverse transcription-polymerase chain reaction

微小 RNA(miRNA)是近年来发现的一类长度为 20~25 nt 的内源性非编码单链小分子 RNA,负向调控靶基因的表达是目前被普遍认可的作用机制。它通过与目标 mRNA 分子的 3'-UTR 完全或不完全配对来降解靶基因 mRNA 或抑制其翻译,调控细胞的发育、增殖、分化、凋亡等一系列病理生理过程<sup>[1-3]</sup>。

有资料显示 miR-221 在原发性肝癌(HCC)患者血清中异常表达,明显升高<sup>[3]</sup>。miR-221 是最近发现的一种 miRNA,定位于 X 染色体 P11.3 区约 1 kb 的区域内,成簇分布,具有类似癌症基因,且以大顺反子形式转录,基本上呈同步表达<sup>[4]</sup>。又有研究证实 miR-

221 在许多恶性肿瘤细胞中表达明显上调,比如肝癌、胶质母细胞瘤、前列腺癌、甲状腺乳头状癌、血液系统肿瘤等,表现为一种“通用”的促癌基因<sup>[5-7]</sup>,但与 HCC 关系尤为密切,且在肝良性变组织及炎性组织中未见此增高现象的相关报道。

国外近期有研究表明,miR-221 在 HCC 患者的组织和血清中明显上调,在肝癌细胞增殖、抑制、凋亡及浸润转移中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。国内也有 miR-221 模拟物转染实现证实它可使更多的 HCC 细胞系 HepG2 细胞处于 DNA 合成的 S 期,并抑制 HepG2 的凋亡,进一步确认了 miR-221 促增殖的特性<sup>[8]</sup>。但

目前,国内关于 miR-221 与 HCC 患者各项临床参数之间关系的研究还不够深入和全面。本研究旨在通过检测健康者、HCC 患者及良性肝病患者的血清 miR-221 水平,并对检测结果进行比较,探讨其与 HCC 患者多项临床参数之间的关系,现将结果报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2014 年 1 月至 2016 年 5 月在本院进行诊治的 HCC 患者 71 例为肝癌组,其中男 49 例,女 22 例;平均年龄(52.0±26.0)岁。根据 2010 年国际抗癌联盟(UICC)/美国癌症联合会(AJCC)肝癌 TNM 分期:Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 22 例,Ⅲ期 16 例,Ⅳ期 21 例。选择同期在本院诊治的良性肝病变患者 40 例为良性肝病组,其中男 26 例,女 14 例;平均年龄(48.5±13.5)岁;其中肝血管瘤 9 例,肝囊肿 11 例,肝硬化 20 例。同时选择同期在本院体检健康者 52 例为健康组,其中男 33 例,女 19 例;平均年龄(41.5±20.5)岁。本研究获得本院伦理委员会的批准,所有患者均签署知情同意书。3 组研究对象年龄和性别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 标本收集** 肝癌组和良性肝病组患者均于入院次日清晨,健康组于体检当日,空腹采集 5 mL 静脉全血,500 r/min 离心 10 min,取上层血清,收集于一次性的无热原、无内毒素 EP 管内。样品收集后若在 1 周内进行检测的保存于 4 °C,若不能及时检测,按 1 次使用量分装,冻存于 -20 °C(1 个月内),或 -80 °C(6 个月内)冰箱待测,避免反复冻融。

**1.2.2 总 RNA 提取** 依照 TaKaRa 生物工程有限公司 RNAiso Blood 试剂盒的操作说明提取总 RNA 约 0.45 μg。

**1.2.3 RNA 纯度和完整性分析** (1)以变性琼脂糖凝胶电泳检测完整性,依照试剂说明书,本实验完整无损的 TotalRNA 显示为一种 miRNA,条带亮度明了,无拖尾。如果 miRNA 条带增多或弥散,说明其可能已降解,或者可能存在基因组 DNA 及其他 RNA 污染,应使用 DNase I 处理;(2)用 30 μL RNase-free 水重悬 RNA 后吸取 2 μL 在 OneDrop1000 型紫外分光光度仪上测定吸光度(OD),检测纯度,OD260/OD280 比值在 1.7~2.1 内为好。如果比值小于 1.7,说明可能存在蛋白质干扰,如果比值大于 2.1,说明可能存在 DNA 干扰。

**1.2.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)反应及实时荧光定量聚合酶链反应(Real-Time PCR)反应** 依照 TaKaRa 生物工程有限公司 PrimeScript™ RT reagent Kit(perfect Real Time)试剂盒的操作说明在 Genelight 9810 PCR 扩增仪上分别进行 RT-PCR(10 μL 反应体系)和 Real-Time PCR(25 μL 反应体系)检

测。其中 RT-PCR 扩增使用 miR-221 逆转录特异性引物并以 U6 为内参基因,见表 1;Real-Time PCR 扩增使用 PCR 特异性引物。

**1.2.5 miR-221 表达的相对变化** 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法(CT 值定义为每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数)分析 miR-221 表达的相对变化。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析。计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间对比用  $t$  检验( $n<50$ )或  $Z$  检验( $n>50$ );采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)法求得 CUT-OFF 值,并计算 AUC 面积。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 引物序列

项目	引物序列(5'-3')
miR-221	AGC UAC AUU GUC UGC UGG GUU UC
	正向:CAA GGA ATC ATG TAT GCT GTA G
	反向:AGG ATG ACA TTA CAC CTT ATC TC
U6	GAU GAC GCA AAU UCG UGA AGC
	正向:GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T
	反向:CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT

## 2 结果

**2.1 3 组研究对象 miR-221 水平比较** 结果显示,肝癌组为(10.74±2.45) μg/μL,良性肝病组为(4.19±1.73) μg/μL,健康组为(4.07±1.48) μg/μL。肝癌组明显高于其他两组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但良性肝病组和健康组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.2 血清 miR-221 表达与 HCC 患者临床指标的关系** 结果显示,血清 miR-221 表达高低与性别、年龄及血清甲胎蛋白(AFP)无关( $P>0.05$ ),与 TNM 分期、淋巴结转移及远处转移有关( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 不同临床指标的 HCC 患者血清 miR-221 表达水平(μg/μL,  $\bar{x}\pm s$ )

临床指标	n	miR-221 水平	P
性别			
男	49	9.61±3.15	>0.05
女	22	9.95±2.65	
年龄(岁)			
≥55	51	10.08±2.69	>0.05
<55	20	9.29±3.11	
血清 AFP(μg/L)			
≥20	64	11.87±3.86	>0.05
<20	7	10.42±3.46	
TNM 分期			
Ⅰ	12	7.28±2.09	<0.05
Ⅱ	22	9.53±2.72	
Ⅲ	16	11.50±2.11	

续表 2 不同临床指标的 HCC 患者血清 miR-221 表达水平 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

临床指标	n	miR-221 水平	P
IV	21	12.40 ± 2.86	
淋巴结转移			
无	51	7.28 ± 3.02	<0.05
有	20	11.07 ± 2.48	
远处转移			
无	62	6.81 ± 2.35	<0.05
有	9	12.42 ± 2.92	

**2.3 血清 miR-221 在原发性肝癌中的诊断价值**  
miR-221 检测原发性肝癌患者血清的  $AUC_{miR-221}$  值为 0.792, 根据最大约登指数 (约登指数 = 灵敏度 + 特异度 - 1) 确定 CUT-OFF 值为 8.59  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 灵敏度为 85.75%, 特异度为 78.82%。

### 3 讨论

恶性肿瘤是目前造成人类死亡的主要原因之一, 随着分子生物学和人类基因组学的发展, 人们对肿瘤的认识已经达到了一个新的高度, 大量研究表明肿瘤的发生发展中都伴有 miRNA 的异常表达<sup>[9]</sup>。

miRNA 是一类内源性, 长度为 20~25 个核苷酸的非编码单链小 RNA, 广泛分布于真核细胞生物中。人类的 miRNA 约占人类基因组的 1%, 其中约 50% 定位于染色体的脆弱区, 而该区域恰与人类癌症的发生发展密切相关<sup>[10-11]</sup>。且在外周血中有丰富的 miRNA 稳定的表达, 但由于其内源性的结构特性决定了血清中 miRNA 具有对抗核糖核酸酶的能力, 即使经历反复的冻融、pH 值改变等情况仍能维持稳定<sup>[11]</sup>。

miRNA 在细胞核内经 RNA 聚合酶 II、III 催化转录成具有 5' 帽结构和 3' 多聚 A 尾的初级 miRNA, 其长度约数千核苷酸, 之后被 RNA 酶 Droscha 识别并切割成长约 70 nt 的具有发夹结构的前体 miRNA, 前体 miRNA 在核转运蛋白 5 作用下, 依赖 Ran-GTP 方式转运至细胞质, 随即被另一种 RNA 酶 Dicer 剪切成约 20 nt 的 miRNA-miRNA 聚体, 此二聚体结合 Argonaute 蛋白、反式激活反应 RNA 结合蛋白后被切割成两条单链, 其中一条单链 miRNA 游离出复合体很快被降解, 另一条单链 miRNA 作为成熟 miRNA 参与形成 RNA 介导的沉默复合体 (RISC), 当 miRNA 完全绑定目标信使 RNA (mRNA) 的 3' 端非编码区时, 造成 mRNA 降解; 当不完全绑定时, 阻遏其转录, 产生基因沉默作用, 发挥独特的负调节基因表达能力<sup>[12]</sup>。不同的 miRNA 对细胞生长具有不同的调控作用, 相同的 miRNA 对不同的细胞株的调控作用亦不同<sup>[13]</sup>。

miRNA 负向调控靶基因的表达是目前被普遍认可的作用机制。miR-221 亦是通过对碱基互补配对原

则与靶 mRNA 结合, 从而在转录后水平引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译成蛋白质<sup>[14]</sup>。其作用其机制可能是通过对 P27、CDKN1C/P57、PUMA、Bmf、c-kit、DDIT4 等基因来调控细胞分化周期, 抑制细胞凋亡, 参与肿瘤的生发<sup>[15]</sup>。有研究者通过对比 104 例 HCC 患者的 90 例肝硬化组织、21 例正常肝组织及 35 个 HCC 衍生的细胞系 miRNA、mRNA 及相关蛋白表达水平, 发现 miR-221/222 在 HCC 衍生的细胞系中表达上调最为显著, 并且通过靶向抑制 P27(Kip1-CDKN1B) 基因和酪氨酸酶受体 c-kit 基因, 增强细胞生长, 参与肝癌的发生和转移<sup>[16]</sup>。在小鼠模型中过表达 miR-221/222 是通过抑制 P27 的翻译而不是转录, 因为 P27 的 mRNA 水平没有变化。还有相关研究表明, miR-221 在 HCC 组织中可通过调控下游靶基因 P57 的表达, 同样使更多的 HCC 细胞聚集于 S 期, 从而促进 HCC 细胞生长<sup>[17-18]</sup>。本研究通过检测血清 miR-221 表达水平分析其与 HCC 患者多项临床参数之间的关系。由于对 miR-221 的临床研究还处于发展阶段, 目前尚无健康人血清检测结果的参考范围, 本次试验以 ROC 曲线得出血清 miR-221 检测的 CUT-OFF 值为 8.59  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,  $AUC_{miR-221}$  为 0.792。结果发现, miR-221 与 TNM 分期、淋巴结转移及远处转移均有关 ( $P < 0.05$ ), 与性别、年龄及血清 AFP 水平均无关 ( $P > 0.05$ )。miR-221 检测的灵敏度为 85.75%, 特异度为 78.82%。

综上所述, miR-221 有望作为 HCC 的一种新型血清标记物为临床诊疗监测提供临床实验室支持。

### 参考文献

- [1] KLOOSTERMAN W P, PLASTERK R H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. Dev Cell, 2006, 11(4): 441-450.
- [2] RUVKUN G. The perfect storm of tiny RNAs[J]. Nat Med, 2008, 14(10): 1041-1045.
- [3] FABIAN M R, SONENBERG N, FILIPOWICZ W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs [J]. Annu Rev Biochem, 2010, 79(1): 351-379.
- [4] CIAFRÉ S A, GALARDI S, MANGIOLA A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1351-1358.
- [5] DI LEVA G, GASPARINI P, PIOVAN C, et al. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(10): 706-721.
- [6] PINEAR A, VOLINIA S, MCJUNKIN K, et al. MiR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(1): 264-269.
- [7] SCHAEFER A, JUNG M, MOLLENKOPF H J, et al. Diagnostic and prognostic implications (下转第 3552 页)

病的发生,必要时再结合液基薄层细胞学和阴道镜检查,对宫颈癌或癌前病变能尽量做到早发现、早治疗,提高生活质量。

## 参考文献

- [1] 吕行, 犹忆, 关思宇, 等. 宫颈癌危险因素 Meta 分析[J]. 现代预防医学, 2011, 38(22): 4596-4598.
- [2] HOSAKA M, FUJITA H, HANLEY S J, et al. Incidence risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 or more severe lesions is a function of human papillomavirus genotypes and severity of cytological and histological abnormalities in adult Japanese women[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(2): 327-334.
- [3] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. *Cancer Statistics*, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29.
- [4] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. *Global cancer statistics*, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [5] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. *Cancer statistics in China*, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [6] 刘永林, 张丽, 陈益民, 等. 浙江地区 1 088 例妇科就诊患者 HPV 感染状况调查[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(2): 106-108.
- [7] 崔燕红, 宛传丹, 赵一琳, 等. 常熟地区女性 HPV 感染及亚型分布调查研究[J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 81-82.
- [8] CASTLE P E, SCHIFFMAN M, HERRERO R, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste [J].

*Costa Rica J Infect Dis*, 2005, 191(11): 1808-1816.

- [9] 任晓慧, 耿建祥, 李海, 等. 某市 2 109 例女性宫颈细胞中 HPV 基因型别的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(13): 1542-1544.
- [10] 马茜, 侯萌, 杨筱凤. 西安交通大学第一附属医院 8 581 名妇女生殖道人乳头瘤病毒感染筛查[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(3): 277-282.
- [11] 杨燕芬, 邱毅, 佟雁, 等. HPV 多重感染与宫颈病变的关系研究[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(2): 254-256.
- [12] 楼微华, 洪祖蓓, 狄文. 不同人乳头瘤病毒高危亚型与宫颈病变发生的关系[J]. 上海医学, 2013, 36(9): 805-809.
- [13] 乌恩奇, 赵焕虎, 刘微, 等. 中国不同地区宫颈癌中 HPV 型别分布数据横向比较分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(23): 1845-1851.
- [14] 林联韵, 高丽丹, 吴莉, 等. 永安市女性人乳头瘤病毒感染和基因亚型分布特点[J]. 福建医药杂志, 2017, 39(4): 100-102.
- [15] 秦红霞, 胡世莉. 东莞地区 1 962 例宫颈高危型人乳头瘤病毒检测及其流行病学调查分析[J]. 上海医药, 2017, 38(23): 58-60.
- [16] 黄紫艳, 陈颖. 4 498 名体检妇女高危型人乳头瘤病毒感染状况调查[J]. 浙江预防医学, 2014, 26(6): 613-614.
- [17] GILMER L S. Human papillomavirus vaccine update[J]. *Prim Care*, 2015, 42(1): 17-32.
- [18] 何志晖, 寇增强, 徐爱强. HPV 感染及其免疫预防[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(1): 106-112.

(收稿日期: 2018-03-02 修回日期: 2018-06-20)

(上接第 3548 页)

- of microRNA profiling in prostate carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5): 1166-1176.
- [8] 党裔武, 陈罡, 廖夔, 等. miR-191 与 miR-221 在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(6): 397-398.
- [9] LOVAT F, VALERI N, CROCE C M. MicroRNAs in the pathogenesis of cancer [J]. *Semin Oncol*, 2011, 38(6): 724-733.
- [10] ESQUELA-KERSCHER A, SLACK F J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259-269.
- [11] 孙凯, 王伟, 雷尚通, 等. MicroRNA-221 通过抑制 CDKN-IC/p57 表达促进结肠癌细胞增殖 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(11): 1886-1889.
- [12] MITCHELL P S, PARKIN R K, KROH E M, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [13] OKAYAMA H, SCHETTER A J, HARRIS C C. Mi-

croRNAs and inflammation in the pathogenesis and progression of colon cancer [J]. *Dig Dis*, 2012, 30(Suppl 2): 9-15.

- [14] 杜秋丽. microRNA 及其功能研究 [J]. 生物学通报, 2004, 39(8): 13-15.
- [15] HEMMATZADEH M, MOHAMMADI H, KARIMI M, et al. Differential role of microRNAs in the pathogenesis and treatment of Esophageal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82: 509-519.
- [16] 邢慧慧, 刘晓峰, 刘长江, 等. miR-221 在肿瘤中的研究进展 [J]. 医学前沿, 2014, 43(8): 14-16.
- [17] 陈罡, 党裔武, 罗殿中. MIR-221 对 HepG2 肝癌细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(8): 582-587.
- [18] PASCALSTEFANO V M. MiR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis [J]. *PNAS*, 2010, 107(1): 264-269.

(收稿日期: 2018-05-11 修回日期: 2018-07-28)