• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.06.001

肝细胞癌患者血清 microRNA-92b-3p 的表达及其意义*

曹小秋¹, 刘春霞¹, 陶国华², 申贤娟³, 曹晓莉⁴, 韩刚⁵, 鞠少卿^{3△}

(1. 南通瑞慈医院检验科, 江苏南通 226010; 2. 江苏省南通市第一人民医院检验科 226001; 3. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001; 4. 南通市肿瘤医院检验科, 江苏南通 226000; 5. 南通市第三人民医院检验科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 探讨肝细胞癌(HCC)患者血清 microRNA-92b-3p 的表达水平及其辅助诊断的价值。方法 选择 79 例 HCC、40 例肝硬化(LC)患者以及 40 例健康对照者为研究对象,对 3 组血清标本中的 microRNA-92b-3p、甲胎蛋白(AFP)和维生素 K 缺乏诱导蛋白(PIVKA-Ⅱ)水平进行了检测。结果 HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 相对表达量显著高于 LC 组和健康组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而 LC 组与健康组 microRNA-92b-3p 比较差异无统计学意义($P = 0.135$)。HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 相对表达量在血管浸润、TNM 分期、LC 相关分组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 相对表达量与 AFP($R^2 = 0.041, P = 0.073$)、PIVKA-Ⅱ($R^2 = 0.083, P = 0.011$)无相关性。microRNA-92b-3p、AFP、PIVKA-Ⅱ 3 项联合检测诊断 HCC 时的曲线下面积为 0.941,灵敏度为 93.67%,诊断效能最佳。结论 HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 水平升高,检测 microRNA-92b-3p 水平对 HCC 具有一定的辅助诊断价值,可能成为 HCC 诊断中的重要生物学指标之一。

关键词:肝细胞癌; microRNA-92b-3p; 甲胎蛋白; 维生素 K 缺乏诱导蛋白**中图分类号:**R575**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)06-0721-04**Expression and significance of microRNA-92b-3p in the serum of patients with hepatocellular carcinoma***CAO Xiaoqi¹, LIU Chunxia¹, TAO Guohua², SHENG Xianjuan³, CAO Xiaoli⁴, HAN Gang⁵, JU Shaoqing^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Nantong Rich Hospital, Nantong, Jiangsu 226010, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226001, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Nantong Tumor Hospital, Nantong, Jiangsu 226000, China; 5. Department of Clinical Laboratory, Third People's Hospital of Nantong, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective To discuss the expression level of microRNA-92b-3p and its diagnostic value in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Serum samples of 79 cases of HCC, 40 cases of cirrhosis (LC) and 40 healthy controls were collected, and the levels of microRNA-92b-3p, alpha fetoprotein (AFP) and protein induced by vitamin K absence (PIVKA-Ⅱ) in the three serum samples were tested. **Results** Level of microRNA-92b-3p in serum of HCC patients was significantly higher than the level in LC group and healthy control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of microRNA-92b-3p in the serum of LC group and healthy control group ($P = 0.135$). The paper also found that the relative expression of microRNA-92b-3p in serum of HCC patients had significant differences in different groups of vascular invasion, TNM staging and cirrhosis of the liver ($P < 0.05$). Besides, there was no correlation between the level of microRNA-92b-3p and AFP ($R^2 = 0.041, P = 0.073$) and PIVKA-Ⅱ ($R^2 = 0.083, P = 0.011$). Area under the curve and sensitivity of combined detection of microRNA-92b-3p, AFP and PIVKA-Ⅱ were 0.941 and 93.67%, which had the best diagnostic value of HCC. **Conclusion** The relative expression of microRNA-92b-3p in HCC is elevated. Detection of microRNA-92b-3p has certain diagnostic value for HCC, and it could be one of the important biological indicators in HCC diagnosis.

Key words: hepatocellular carcinoma; microRNA-92b-3p; alpha fetoprotein; protein induced by vitamin K absence

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81271920);江苏省重点研发专项(BE2015654)。

作者简介:曹小秋,女,副主任技师,主要从事临床免疫和微生物方面的研究。△ 通信作者,E-mail:jsq814@hotmail.com。

肝细胞癌(HCC)是全球高发的恶性肿瘤之一,在我国病死率仅次于胃癌和食道癌^[1],亚洲和非洲地区肝癌呈高发状态^[2]。一般认为 HCC 的发生与病毒感染(乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒)、长期酗酒及黄曲霉毒素、亚硝酸盐物质、饮用水污染、原发性胆汁性肝硬化和非酒精性脂肪肝等密切相关,且我国乙型肝炎病毒携带者约有 1 亿人口,有研究指出乙型肝炎病毒是我国肝细胞癌发病的主要原因^[3-5]。临床上,HCC 诊疗所采用的指标主要有甲胎蛋白(AFP)、维生素 K 缺乏诱导蛋白(PIVKA-II)等,已有研究表明它们在 HCC 的早期辅助诊断中具有一定的应用价值^[6]。但临床应用也发现这些传统诊断指标也存在一定比例的假阳性和假阴性,尤其当这些指标进行单独检测时的灵敏度和特异度都较低。

微小核糖核酸(microRNA)是一类长度为 17~25 个核苷酸的非编码单链小分子核糖核酸(RNA),通过与靶基因 3'UTR 区互补结合,消极调节蛋白质编码基因和其他非编码转录表达,参与细胞生长、分化、凋亡、脂肪代谢、胚胎发育等调控过程^[7]。microRNA-92b-3p 在人类胚胎干细胞中的表达非常丰富,在很多的胚胎干细胞中调控细胞周期,但在 HCC 中是否进行调控的有关报道较少。本研究旨在探讨 HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 的表达及其意义,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 8 月 1 日至 2017 年 4 月 30 日在南通瑞慈医院和南通市肿瘤医院经过影像和病理学确诊的 HCC 患者共 79 例(HCC 组),收集时均为未经任何治疗的首发病例,年龄 21~75 岁,中位年龄 54 岁;选择同期南通市第三人民医院确诊收治的肝硬化(LC)患者共 40 例为 LC 组,年龄 26~72 岁,中位年龄 51 岁;选择同期在南通瑞慈医院体检中心进行体检的健康体检者共 40 例为健康组,年龄 28~68 岁,中位年龄 40 岁。3 组研究对象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。本研究通过医院伦理委员会批准,所有受试者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 血液标本的采集和血清总 RNA 的提取 采用分离胶的真空采集管收集受试者的血液标本,以 1 000 r/min 离心 10 min 后,将上层血清分装于无酶的离心管中,置于-80℃保存备用。用北京百泰克生物有限公司提供的血清 RNA 提取试剂盒提取血清总 RNA,经紫外分光光度计测量浓度和纯度合格后,立即保存于-80℃或在 1 d 内反转录成 cDNA。

1.2.2 RNA 反转录合成互补 DNA 采用美国 Thermo 公司提供的反转录试剂和广州锐博生物公司提供的 microRNA-92b-3p 及 microRNA-92b-3p 茎环反转录引物,将提取的总 RNA 反转录成互补 DNA。反转录体系:RNA 共 300 ng,5×反应缓冲液 4 μL,反转录引物 2 μL,脱氧核糖核苷酸 2 μL,核糖核酸酶抑制剂 1 μL,反转录酶 1 μL,无核酸酶纯水补足至 20

μL。将上述体系混匀,瞬时离心。反应条件:42℃ 60 min,70℃ 5 min。合成的互补 DNA 置于-20℃保存备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 microRNA-92b-3p 水平 采用德国 Roche 公司提供的荧光染料 SYBR Green I Master 和美国 ABI 公司的 7500 实时荧光定量 PCR 扩增仪进行荧光定量 PCR 检测。microRNA-92b-3p 正向、反向引物序列,U6 正向、反向引物序列由广州锐博生物公司合成。反应体系:SYBR Green I 混合液 10.0 μL,互补 DNA 共 4.0 μL,正向引物 0.5 μL,反向引物 0.5 μL,无 RNA 酶水 5.0 μL。混匀以上体系,瞬时离心。反应条件:95℃,10 min;95℃,15 s;59℃ 31 s,共 40 个循环。每个样本做 3 个复孔,结果取其均值。microRNA-92b-3p 的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{检测}}(Ct_{\text{miR}} - Ct_{U6}) - \Delta Ct_{\text{对照}}(Ct_{\text{miR}} - Ct_{U6})$ 的均值。

1.2.4 AFP 和 PIVKA-II 水平的检测 利用德国 Roche 公司 E170 仪以电化学发光法检测 AFP,采用日本富士会社 LUMIPULSE G1200 仪以免疫分析法检测 PIVKA-II。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析,并使用 SigmaPlot Suite V12 软件进行相关图谱的绘制。非正态分布的计量资料采用中位数和四分位数间距 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验;计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验;指标之间的相关性采用 Spearman 相关分析。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析 microRNA-92b-3p、AFP、PIVKA-II 对 HCC 的诊断价值。以 $P<0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 3 组血清 microRNA-92b-3p 相对表达量的比较

HCC 组、LC 组及健康组血清 microRNA-92b-3p 的相对表达量分别为 3.029(1.165, 8.350)、1.346(0.939, 2.737)和 1.022(0.619, 1.344)。HCC 组患者血清 microRNA-92b-3p 水平高于 LC 组和健康组,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 LC 组与健康组血清中 microRNA-92b-3p 水平比较,差异无统计学意义($P=0.135$)。

表 1 HCC 组 microRNA-92b-3p 的表达量与临床病理特征的相关性(n)

临床病理特征	microRNA-92b-3p		χ^2	P
	高表达	低表达		
性别				
男	30	32	0.279	0.598
女	7	10		
年龄				
≤55 岁	19	21	0.122	0.727
>55 岁	17	22		
HBsAg				
阴性	11	10	0.245	0.621
阳性	34	24		

续表 1 HCC 组 microRNA-92b-3p 的表达量与临床病理特征的相关性(n)

临床病理特征	microRNA-92b-3p		χ^2	P
	高表达	低表达		
肿瘤直径				
≤5 cm	33	14	0.611	0.435
>5 cm	25	7		
肿瘤数目				
1 个	26	44	0.181	0.671
≥2 个	4	5		
LC				
无	26	38	7.547	0.006
有	12	3		
血管浸润				
无	12	57	18.108	0.000
有	8	2		
TNM 分期				
I ~ II	15	52	2.001	0.009
III ~ IV	7	5		
HBV-DNA				
≤1.0×10 ³	24	37	0.001	0.972
>1.0×10 ³	7	11		

2.2 HCC 组血清 microRNA-92b-3p 水平与临床病理特征相关性分析 根据患者性别、年龄、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、肿瘤直径、LC、肿瘤数目、血管浸润、TNM 分期和 HBV-DNA 拷贝数等临床资料对 79 例 HCC 患者进行分组,在此基础上,进一步根据 microRNA-92b-3p 的 cut off 值(1.913),将人群分为 microRNA-92b-3p 高表达组和 microRNA-92b-3p 低表达组。结果发现,HCC 组血清 microRNA-92b-3p 的表达量在不同性别、年龄、HBsAg、肿瘤直径、肿瘤数目及 HBV-DNA 拷贝值差异无统计学意义($P > 0.05$),但在血管浸润、TNM 分期、LC 相关分组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 血清 microRNA-92b-3p 水平与 AFP、PIVKA-II 相关性分析 HCC 组、LC 组与健康组的血清 AFP、PIVKA-II 水平差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 水平与 AFP($R^2 = 0.041, P = 0.073$)、PIVKA-II($R^2 = 0.083, P = 0.011$)无相关性。

表 2 3 组血清 AFP 和 PIVKA-II 水平比较
[ng/mL, $M(P_{25}, P_{75})$]

组别	n	AFP	PIVKA-II
HCC 组	79	27.27(3.32, 736.20)	32.00(15.50, 1 098.00)
LC 组	40	36.50(27.00, 54.00)	16.02(12.00, 25.75)
健康组	40	3.11(2.09, 3.98)	16.00(14.00, 18.00)

2.4 ROC 曲线分析 将 HCC 组、LC 组、健康组的血清 microRNA-92b-3p 相对表达量、AFP 和 PIVKA-II 分别作 ROC 曲线。结果显示,microRNA-92b-3p 诊断 HCC 的最佳临界值为 2.797,其灵敏度、特异度和准确度分别为 54.40%、80.00% 和 63.00%,

AFP 的灵敏度、特异度和准确度分别为 41.80%、92.50% 和 58.82%,PIVKA-II 的灵敏度、特异度和准确度分别为 46.80%、95.00% 和 63.00%。microRNA-92b-3p 的曲线下面积(AUC)为 0.689,在鉴别诊断 HCC 和 LC 时,PIVKA-II 的 AUC(0.724) 优于 microRNA-92b-3p 和 AFP(0.472);microRNA-92b-3p 的灵敏度高于 PIVKA-II 和 AFP,microRNA-92b-3p 和 PIVKA-II 的诊断准确度相同(63.00%),高于 AFP(58.82%)。在鉴别诊断 HCC 和健康组时,microRNA-92b-3p 的 AUC、灵敏度、准确度(0.842、69.90%、63.00%)都优于 PIVKA-II(0.746、68.40%、61.30%)和 AFP(0.804、68.40%、58.82%)。3 项联合 AUC 为 0.941,灵敏度为 93.67%,诊断效能最佳。

3 讨论

microRNA 可在多种体液中存在,如血清、血浆、唾液、尿液、羊水等。血清 microRNA 水平检测有助于恶性血液病、实体肿瘤的早期诊断,可作为患者预后判断的一种良好的无创性肿瘤标志物。microRNA-542-5p 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织的表达下调,与 TNM 分期、血管转移、淋巴转移具有相关性,是 NSCLC 潜在的诊断指标和治疗靶点^[8-9]。microRNA-202 通过调控靶基因叉头转录因子 R2(FOXR2),使其在子宫内膜腺癌组织中表达显著下调($P < 0.01$),与不良预后显著相关($P < 0.01$)^[10]。血清 microRNA-10b 上调与黑色素瘤的预后不良相关^[11]。microRNA-148b 通过下调靶基因人 DNA 甲基转移酶 3B(DNMT3B),抑制细胞内 DNA 甲基化从而发挥抑癌基因作用,其在胰腺癌肿瘤组织表达下调,与肿瘤的发展和预后呈负相关^[12]。

本文采用了实时荧光定量法检测 HCC 共 79 例、LC 组 40 例和健康组 40 例血清样本中的 microRNA-92b-3p 水平,结果发现,HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 的相对表达量高于 LC 组和健康组,差异有统计学意义($P < 0.05$);同时,LC 组与健康组血清中 microRNA-92b-3p 的水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。HCC 组血清 microRNA-92b-3p 的表达量在不同性别、年龄、HBsAg、肿瘤直径、肿瘤数目及 HBV-DNA 拷贝值分组间差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 水平与上述几种临床病理特征之间并没有相关性,今后需加大样本量进行分析。microRNA-92b-3p 的表达水平在有无血管浸润、不同 TNM 分期、有无 LC 的患者血清中差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 microRNA-92b-3p 与 HCC 恶性程度、有无转移显著相关,提示监测血清 microRNA-92b-3p 水平对 HCC 患者的疾病进展、转移及预后有一定的临床价值。

本研究检测了所有受试者的血清 microRNA-92b-3p、AFP 和 PIVKA-II 的水平,计算其相关性,结果提示 HCC 患者组血清 microRNA-92b-3p 的水平与 AFP($R^2 = 0.041, P = 0.073$)、PIVKA-II($R^2 = 0.083, P = 0.011$)不相关。

ROC 曲线分析发现,在鉴别诊断 HCC 和 LC 时,PIVKA-II 的诊断效能优于 microRNA-92b-3p 和 AFP。microRNA-92b-3p 的灵敏度高于 PIVKA-II 和 AFP。在鉴别诊断 HCC 组和健康组时,microRNA-92b-3p 的 AUC、灵敏度、准确度都优于 PIVKA-II 和 AFP;3 项指标联合检测时能明显提高对 HCC 的诊断效能。

microRNA-92b-3p 在人类胚胎干细胞中表达丰富,在胚胎干细胞中证实通过作用于 p57kip2 来调控细胞周期,并可能对 cip/kip 家族有调控作用^[13]。microRNA-92b-3p 在很多癌症中起致癌基因的作用,如在神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病等恶性肿瘤中已经被证明是一种致癌基因。LI 等^[14]报道 microRNA-92b-3p 的相对表达量在高级别神经胶质瘤细胞比低级别细胞显著升高,microRNA-92b-3p 升高与神经胶质瘤不良生存率相关。其通过靶基因预测分析和双荧光素酶分析证明,microRNA-92b-3p 通过调节靶基因 DKK3 和下游 Wnt/beta-catenin 信号通路发挥生物活性。也有将 microRNA-92b 作为抑癌基因的报道,MA 等^[15]报道 microRNA-92b 通过抑制整合蛋白 ITGAV 的表达来实现对食管鳞状上皮细胞癌(ESCC)的侵袭、转移的抑制,ESCC 组织中高表达 microRNA-92b-3p 与发生淋巴结转移呈负相关,预示预后良好。microRNA-92b-3p 可成为 ESCC 潜在的预后诊断和治疗靶点。这可能说明同一种 microRNA 在不同的组织部位可以发挥不同的作用。

有报道指出,microRNA-92a 在肝癌中起致癌基因的作用^[16],而 microRNA-92b-3p 在肝癌中的具体功能尚不明确,本次研究发现,HCC 组 microRNA-92b-3p 表达量高于 LC 组和健康组,推测 microRNA-92b-3p 可能在 HCC 的发生发展中发挥致癌基因的作用。QIAN 等^[17]报道,过表达的 microRNA-92b-3p 通过靶基因 C/EBP β 增加 EpCAM⁺ 肝癌细胞的增殖,抑制其分化,从而参与 HCC 的发病过程。本研究分析 microRNA-92b-3p 相对表达量与临床各病理特征间的关系,结果显示,microRNA-92b-3p 在 TNM 分期 III~IV 患者的表达水平高于 TNM 分期 I~II 的患者,伴有血管浸润、LC 的 HCC 患者 microRNA-92b-3p 表达水平高于不伴有血管浸润、LC 的 HCC 患者,提示 microRNA-92b-3p 可能与 HCC 的侵袭、转移有关,microRNA-92b-3p 可以作为 HCC 诊断和预后判断的潜在标志物。

综上所述,HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 水平升高,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 HCC 患者血清 microRNA-92b-3p 水平对 HCC 的辅助诊断有一定价值,microRNA-92b-3p 可能是一个重要的诊断 HCC 的生物学指标,其在肝癌组织中的水平及其在 HCC 中的具体作用机制仍有待进一步地深入研究。

参考文献

[1] WU L J, PAN Y D, PEI X Y, et al. Capturing circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett,

2012,326(1):17-22.

- [2] CHEN C J, LEE M H. Early diagnosis of hepatocellular carcinoma by multiple microRNAs: validity, efficacy, and cost-effectiveness[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(36): 4745-4747.
- [3] RINGEHAN M, MCKEATING J A, PROTZER U. Viral hepatitis and liver cancer[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2017, 372(1732): 20160274.
- [4] HUANG M N, YU W, TEOH W W, et al. Genome-scale mutational signatures of aflatoxin in cells, mice, and human tumors[J]. Genome Res, 2017, 27(9): 1475-1486.
- [5] TESSITORE A, CICCARELLI G, DEL VECCHIO F, et al. MicroRNA expression analysis in high fat diet-induced NAFLD-NASH-HCC progression: study on C57BL/6J mice[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 3.
- [6] JIRUN P, ZHANG G, KIM H K, et al. Clinical utility of alpha fetoprotein and HCCR-1, alone or in combination, in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Dis Markers, 2011, 30(6): 307-315.
- [7] 李艳. 肝癌 microRNA 稳定性、个体差异性与性别相关性评价[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2011.
- [8] YU G, CHEN X, CHEN S, et al. MiR-19a, miR-122 and miR-223 are differentially regulated by hepatitis B virus X protein and involve in cell proliferation in hepatoma cells[J]. J Transl Med, 2016, 14: 122.
- [9] HE R Q, LI X J, LIANG L, et al. The suppressive role of miR-542-5p in NSCLC: the evidence from clinical data and in vivo validation using a chick chorioallantoic membrane model[J]. BMC Cancer, 2017, 17: 655.
- [10] DENG X, HOU C, LIANG Z, et al. MiR-202 Suppresses cell proliferation by targeting FOXR2 in endometrial adenocarcinoma[J]. Dis Markers, 2017, 2017: 2827435.
- [11] BAI M, ZHANG H, SI L, et al. Upregulation of serum miR-10b is associated with poor prognosis in patients with melanoma[J]. Cancer, 2017, 8(13): 2487-2491.
- [12] ZHAO G, ZHANG J G, LIU Y, et al. MiR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPK α 1[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(1): 83-93.
- [13] SENGUPTA S, NIE J, WANGER R J, et al. MicroRNA-92b controls the G1/S checkpoint gene P57 in human embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2009, 27(7): 1524-1528.
- [14] LI Q, SHEN K, ZHAO Y, et al. MiR-92b inhibitor promoted glioma cell apoptosis via targeting DKK3 and blocking the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. J Transl Med, 2013, 11: 302.
- [15] MA G, JING C, LI L, et al. MicroRNA-92b represses invasion-metastasis cascade of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20209-20222.
- [16] WANG L, WU J, XIE C. miR-92a promotes hepatocellular carcinoma cells proliferation and invasion by FOXA2 targeting[J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(7): 783-790.
- [17] QIAN N S, LIU W H, LV W P, et al. Upregulated MicroRNA-92b regulates the differentiation and Proliferation of EpCAM-positive fetal liver Cells by Targeting C/EBP β [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e68004.