

文章编号 1006-8147(2017)06-0519-04

论 著

肝癌血清中 miRNA-183 的表达及临床意义

张自立^{1,2,3}, 石文霞³, 李霖², 孟祥朝², 高英堂³, 杜智³

(1.天津医科大学三中心临床学院普通外科, 天津 300170; 2.天津市第三中心医院普通外科, 天津 300170; 3.天津市肝胆疾病研究所, 天津市人工细胞重点实验室, 卫生部人工细胞工程技术研究中心, 天津 300170)

摘要 目的:比较肝癌及良性肝病患者的血清中 miRNA-183 的表达并探讨其临床意义。方法:收集肝癌患者血清标本 54 例,肝硬化患者血清标本 45 例,肝炎患者血清标本 30 例及健康体检者血清标本 45 例,荧光定量 PCR 检测 miRNA-183 在各组中的表达量及分析肝癌组与临床病理特征之间的关系。结果:肝癌患者血清中 miR-183 表达量高于正常对照组,也高于肝炎组及肝硬化组($P < 0.05$);肝硬化组血清 miR-183 表达量高于正常对照组($P < 0.05$)。肝癌患者的血清 miR-183 表达量与 TNM 分期有关,Ⅲ~Ⅳ期的表达水平高于Ⅰ~Ⅱ期($P < 0.05$);低分化肝癌患者血清 miR-183 的表达水平高于高-中分化患者($P < 0.05$);伴有肝硬化的肝癌患者其血清 miR-183 表达水平高于不伴肝硬化者($P < 0.05$)。ROC 曲线下面积为 0.699(95% CI 0.613~0.784),最佳临界值为 1.38,相应的敏感性为 53.7%,特异性为 83.3%,阳性预测值为 60.1%,阴性预测值为 76.9%。结论:血清 miR-183 可能作为诊断肝癌的新型肿瘤标志物,并可能预测肝癌预后。

关键词 微小 RNAs; 肝细胞癌; 血清; miR-183

中图分类号 R735.7

文献标志码 A

Expression and significance of serum miRNA-183 in hepatocellular carcinoma

ZHANG Zi-li^{1,2,3}, SHI Wen-xia³, LI Lin², MENG Xiang-chao², GAO Ying-tang³, DU Zhi³

(1.Department of General Surgery, The Third Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China; 2. Department of General Surgery, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China; 3.Tianjin Institute of Hepatobiliary Disease, Key Laboratory of Artificial Cell, Artificial Cell Engineering Technology Research Center of Public Health Ministry, Tianjin 300170, China)

Abstract Objective: To compare the expression of serum miR-183 in hepatocellular carcinoma (HCC) and benign liver diseases and explore its clinical significance. **Methods:** Serum miR-183 expression was measured in HCC($n=54$), liver cirrhosis(LC)($n=45$), chronic viral hepatitis (CH)($n=30$) and normal controls (NC) ($n=45$) by quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results:** The expression of serum miR-183 in HCC was higher than those in normal controls, hepatitis and cirrhosis patients ($P < 0.05$); the expression of serum miR-183 in cirrhosis patients was also higher than that in normal controls ($P < 0.05$). The expression of serum miR-183 was higher in Ⅲ~Ⅳ stage than that in Ⅰ~Ⅱ stage in HCC ($P < 0.05$); well-differentiated HCC was lower than that in poor-differentiated HCC ($P < 0.05$); and HCC patients with cirrhosis had a higher expression of miR-183 than those without cirrhosis. ROC curve of serum miR-183 in HCC had an ideal diagnostic value, with a optimal value of 1.38; the diagnostic sensitivity and specificity were 53.7% and 83.3%, respectively and the positive predictive value and negative predictive value were 60.1%, 76.9%, respectively. **Conclusion:** Serum miR-183 may act as a new tumor marker and may predict the prognosis and therapeutic effect.

Key words microRNAs; hepatocellular carcinoma; serum; miR-183

肝细胞癌(HCC)是世界范围内第六大常见恶性肿瘤,其发病率逐年上升,约占每年新增癌症患者总数的 5.7%^[1]。大多数肝癌发生在发展中国家,中国的肝癌致死率在所有癌症中排第 2 位,约占世界肝癌总死亡人数的 50%左右^[2]。由于缺乏有效的诊断治疗手段导致肝癌生存率仅为 5%~9%。报道称肝癌的早期诊断可使患者 5 年生存率上升至 69%^[3-4],因此有必要探索敏感有效的诊断方法来提高患者生存率。miRNA 是一组内源性、高度保守的小分子非编码 RNA,长约 21~25 个核苷酸,通过作用于相

关 mRNA 的 3'-UTR 特定区域来调节翻译过程,进而参与细胞的增殖、分化、凋亡等过程,与多种肿瘤的形成有关^[5-6]。另外,从组织、器官或体液中提取的 miRNA 对极端 pH、温度和 RNA 酶活性具有一定耐受性,这种稳定性使其有潜力成为一种新型肿瘤标志物^[7-8]。miR-183 是 miRNA-183 家族中的成员,研究证明其在多种肿瘤中存在表达异常。目前关于肝癌血清中 miR-183 表达的研究较少,本研究通过检测肝癌及肝良性疾病血清中 miRNA-183 的表达量,并分析其与肝癌病理特征间有无联系,进一步探讨 miR-183 在肝癌早期诊断及治疗疗效中的意义。

作者简介 张自立(1980-),男,硕士在读,研究方向:普通外科;通信作者:杜智,E-mail:zhi-du@163.com。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2013年11月–2015年5月在天津市第三中心医院肝胆科治疗的肝癌患者54例、肝硬化患者45例、肝炎患者30例,于治疗前收集各组患者的血清标本;另外选择同时期来我院体检的健康人45例作为对照组,对照组既往无肝病史。4组患者在年龄、性别方面差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究取得所有受试者的知情同意并得到医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器 血清/血浆RNA提取试剂盒购自德国Qiagen公司;TaqMan® microRNA转录试剂盒、U6及miR-183特异性逆转录引物购自美国Applied Biosystems公司;实时荧光定量PCR试剂、U6及miR-183的特异性探针均购自美国Applied Biosystems公司。荧光定量PCR仪ViiATM7购自美国Applied Biosystems公司,PCR扩增仪购自中国杭州大和热磁有限公司,分光光度计购自德国Eppendorf公司。

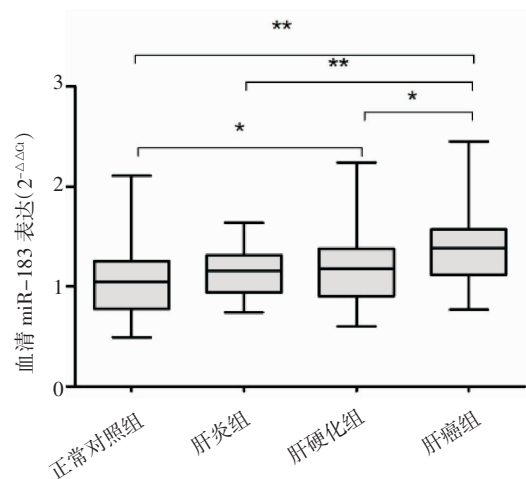
1.3 血清miR-183表达量的检测 (1)总RNA的提取:严格按照提取说明书进行总RNA的提取,用分光光度计检测提取RNA的浓度及纯度,A260/A280比值在1.8~2.2,将提取的总RNA保存于-80℃低温冰箱。(2)miR-183及内参U6的逆转录反应:按照逆转录试剂盒反转录合成cDNA,反应体系15 μL包括:2.0 μL总RNA、3.0 μL茎环逆转录引物(5×)、0.15 μL dNTP混合物、1.5 μL逆转录缓冲液(10×)、1.0 μL逆转录酶、0.19 μL RNA酶抑制剂、7.16 μL DEPC水;反应条件为16℃30 min、42℃30 min、85℃5 min。U6作为内参。(3)荧光定量PCR:按照试剂盒进行操作,反应体系共20 μL包括:10 μL混合物、1 μL引物(20×)、1.5 μL cDNA模板、7.5 μL DEPC水。反应过程为95℃10 min;95℃15 s,60℃1 min,共40个循环。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$ 。每个样本独立重复实验2次。

1.4 统计学方法 采用SPSS20.0统计软件进行数据分析,因检验指标呈非正态分布,用中位数和百分位数表示^[M(P25, P75)],组间比较采用秩和检验;分类资料采用 χ^2 检验;受试者工作特征(ROC)曲线用于确定筛查肿瘤患者的最佳界定值。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 4组血清标本miR-183表达水平 4组血清标本miR-183的表达差异具有统计学意义($P<0.01$);其中肝癌患者表达量为1.46(1.18,1.59),高于正常对

照组的1.05(0.78,1.25),也高于肝炎组的1.16(0.94,1.31)及肝硬化组的1.21(0.95,1.37),差异具有统计学意义(分别为 $Z=4.22, P<0.01$; $Z=3.05, P<0.01$; $Z=2.53, P=0.01$);肝硬化组血清miR-183的表达量高于正常对照组,差异具有统计学意义($Z=2.09, P=0.04$)。正常对照组与肝炎组血清miR-183的表达差异无统计学意义($Z=1.48, P=0.14$)。见图1。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$

图1 4组血清标本miR-183的相对表达量

Fig 1 The relative expressions of serum miR-183 of the four groups

2.2 血清中miR-183诊断肝癌的ROC曲线分析 ROC曲线分析结果显示血清中miR-183可能对区分肝癌及良性肝病患者有应用价值,曲线下面积为0.699(95%CI 0.613~0.784),最佳临界值为1.38(cut-off值),相应的敏感性为53.7%,特异性为83.3%,阳性预测值为60.1%,阴性预测值为76.9%。见图2。

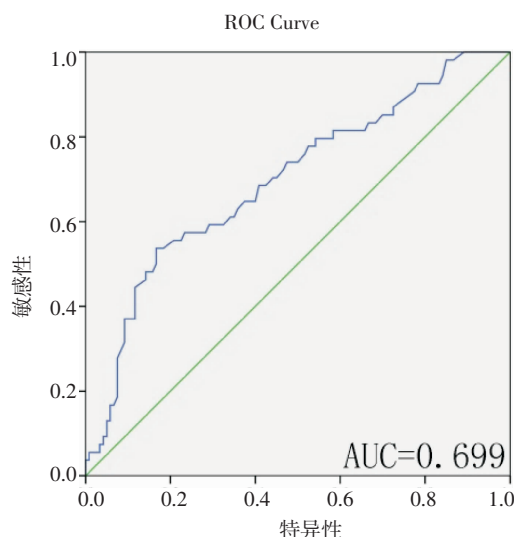


图2 血清miR-183用于诊断肝癌的ROC曲线

Fig 2 Receiver operating characteristics (ROC) curve of serum miR-183 to diagnose HCC

2.3 肝癌患者血清中 miR-183 与临床病理特征之间的关系 统计结果显示低分化肝癌患者血清 miR-183 的表达水平高于高-中分化患者($P<0.05$);伴有肝硬化的肝癌患者其血清 miR-183 表达水平高于不伴肝硬化者($P<0.05$);TNM 分期中Ⅲ~Ⅳ期的表达水平高于Ⅰ~Ⅱ期($P<0.05$);在性别、年龄、肿瘤大小、HBV 是否阳性及 Child 分级方面差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 肝癌血清中 miR-183 与临床病理特征间的关系

Tab 1 Relation of serum miR-183 with clinical characteristics in HCC patients

病理特征	例数	血清 miR-183		
		P50(P25, P75)	Z	P
性别				
男	36	1.44(1.17,1.57)	0.468	0.64
女	18	1.29(0.90,1.64)		
年龄/岁				
≥50	30	1.35(0.94,1.61)	0.235	0.81
<50	24	1.46(1.17,1.55)		
HBV				
+	45	1.39(1.15,1.61)	1.172	0.24
-	9	1.38(0.96,1.46)		
肿瘤大小/cm				
≥3	42	1.38(1.12,1.61)	0.749	0.45
<3	12	1.46(1.07,1.53)		
肝硬化				
+	49	1.45(1.15,1.59)	2.149	0.03
-	5	1.18(0.83,1.26)		
TNM 分期				
Ⅰ~Ⅱ	28	1.26(1.04,1.56)	2.009	0.045
Ⅲ~Ⅳ	26	1.51(1.24,1.67)		
Child 分级				
A	44	1.39(1.11,1.58)	0.434	0.66
B	10	1.35(1.10,1.56)		
分化程度				
高-中分化	41	1.31(1.09,1.56)	2.034	0.04
低分化	13	1.54(1.42,1.70)		

3 讨论

由于缺乏敏感有效的诊断方法,肝癌成为世界范围内致死率最高的癌症之一。甲胎蛋白(AFP)作为筛查肝癌的主要肿瘤标志物仍然存在着许多缺陷,有将近 33%的早期肝癌不能用 AFP 检出,AFP 筛查肝癌的敏感性也仅仅为 41%~65%^[9]。miRNA 是一组小分子非编码 RNA,主要通过靶基因 3'端非翻译区结合使靶基因降解或抑制靶基因表达,从而参与机体几乎所有的基本信号传导途径,因此

miRNA 的异常表达往往与多种疾病相关^[10]。目前已证实有 200 余种 miRNA 在肿瘤中存在表达异常,其不仅直接参与细胞增殖、分化、凋亡等活动,更与肿瘤的恶性程度、预后及疗效等相关。我们既往研究通过检测肝癌患者血液中的 88 种 miRNA 表达情况发现有多种 miRNA 存在表达异常^[11];相关 meta-analysis 结果也证实血液中的部分 miRNA 可以有效区分肝癌与肝良性疾病,这意味着 miRNA 有潜力成为一种新型的肿瘤标志物^[12]。miRNA-183 家族是由 7 号染色体上 q32.2 位点转录而来的在结构高度相似的一组 miRNA,包含 miR-183、miR-182 及 miR-96 3 种微小 RNA。miR-183 已证实在多种癌症中存在表达异常,如结肠癌、乳腺癌、上皮细胞癌中表现为升高,而在骨肉瘤中表达下降,但其在肝癌中的研究尚少^[13-15]。

笔者既往研究证实,miR-183 在肝癌组织中存在表达异常,并且其表达水平与多种临床病理因素有关^[16]。考虑到组织中 miRNA 的检验存在取材困难及提取过程复杂等情况,难以作为早期肝癌筛查方法;本研究选取患者血清作为研究对象,取材方便,结果显示肝癌血清中 miR-183 表达高于正常对照及良性肝病组,且与肿瘤 TNM 分期、分化程度等临床病理因素有关;ROC 曲线分析表明血清 miR-183 在区分肝癌与肝良性疾病方面具有较好的敏感性 & 特异性。Zhang 等^[17]也证实部分血清 miRNA 对肝癌具有较理想的诊断能力。肿瘤的形成包含癌基因的过量表达或抑癌基因的表达缺失,miRNA 可通过作用于这些基因的相关遗传区域或脆性位点来起到类似致癌或抑癌基因的作用^[18]。结合本次研究结果,miR-183 可能在肝癌形成过程中起致癌基因的作用,其具体作用机制尚待进一步证实。

综上所述,本研究证实血清 miR-183 在肝癌患者中存在表达升高且与多种临床病理特征有关,使其可作为一种新型肿瘤标志物为肝癌的诊断及预后评估提供新策略。

参考文献:

- [1] Zhu R X, Seto W K, Lai C L, et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region[J]. Gut Liver, 2016,10(3):332
- [2] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等.中国肝癌发病状况与趋势分析[J].中华肿瘤杂志,2015(9):691
- [3] Fukuda S, Itamoto T, Nakahara H, et al. Clinicopathologic features and prognostic factors of resected solitary small-sized hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2005,52 (64):1163
- [4] Yuen M F, Cheng C C, Laufer I J, et al. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience[J]. Hepatology,2000,31(2):330

- [5] Pillai R S, Bhattacharyya S N, Artus C G, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells [J]. *Sci*, 2005, 309(5740):1573
- [6] Barshack I, Meiri E, Rosenwald S, et al. Differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from metastatic tumors in the liver using microRNA expression[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(8):1355
- [7] Si H, Sun X, Chen Y, et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(2):223
- [8] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum MicroRNAs are promising novel biomarkers[J]. *PLoS One*, 2008, 3(9):e3148
- [9] Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(1):167
- [10] Xu J, Li J, Zheng T H, et al. MicroRNAs in the occurrence and development of primary hepatocellular carcinoma[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2016, 25(5):971
- [11] Li J, Shi W, Gao Y, et al. Analysis of microRNA expression profiles in human hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Lab*, 2013, 59(9/10):1009
- [12] Jiang L, Cheng Q, Zhang B H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in hepatocellular carcinoma screening: a validation set from China[J]. *Med*, 2015, 94(10):e603
- [13] Myatt S S, Wang J, Monteiro L J, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1):367
- [14] Chen L, Li Y, Fu Y, et al. Role of deregulated microRNAs in breast cancer progression using FFPE tissue[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54213
- [15] Zhu J, Feng Y, Ke Z, et al. Down-regulation of miR-183 promotes migration and invasion of osteosarcoma by targeting Ezrin[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(6):2440
- [16] Liang Z, Gao Y, Shi W, et al. Expression and significance of microRNA-183 in hepatocellular carcinoma[J]. *Sci World J*, 2013, 2013: 381874
- [17] Zhang Y, Li T, Qiu Y, et al. Serum microRNA panel for early diagnosis of the onset of hepatocellular carcinoma[J]. *Med*, 2017, 96(2): e5642
- [18] 贺小婷, 曹秀峰. miRNA 与食管癌[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(19):2133

(2017-02-16 收稿)

文章编号 1006-8147(2017)06-0522-03

论 著

彩色多普勒在下肢静脉血栓合并动静脉瘘的诊断价值

郭长旭, 袁宇, 魏瑶, 高金妹, 万鑫

(天津市天津医院超声科, 天津 300211)

摘要 目的:探讨彩色多普勒在下肢静脉血栓合并动静脉瘘中诊断价值。方法:回顾性分析超声诊断下肢静脉血栓合并动静脉瘘患者 25 例,男性 12 例,女性 13 例,共涉及下肢静脉血栓合并动静脉瘘病变血管节段 31 段。记录患者下肢静脉血栓病程时间,血栓合并动静脉瘘的发病部位、血管再通部分彩色多普勒血流图像特征和血流频谱,动静脉瘘病变血管节段血栓内新生血管血流频谱阻力指数(RI)以及瘘口大小。结果:25 例下肢静脉血栓合并动静脉瘘患者发现动静脉瘘的时间为确诊静脉血栓后 9 d~21 月。近端肢体血栓时动静脉瘘发生概率较高,动静脉瘘病变节段血管再通部分呈湍流血流信号,且血流频谱呈随心动周期规律搏动性低阻血流频谱,不受呼吸影响,血流动力学改变均只局限在动静脉瘘病变节段血管范围内。21(21/31)段动静脉瘘病变血管节段静脉血栓内存在新生血管,新生血管平均 $RI=0.49\pm0.07$ 。10(21/31)段动静脉瘘病变血管节段未发现新生血管。25 例患者瘘口过于微小,无法明确瘘口大小。结论:彩色多普勒可以明确下肢静脉血栓合并动静脉瘘的存在,并直观评价血管血流动力学受动静脉瘘影响程度,为临床提供更多影像学支持。

关键词 下肢静脉血栓;动静脉瘘;新生血管;彩色多普勒超声

中图分类号 R543.6

文献标志码 A

近年来随着彩色多普勒的发展,超声在血管方面的应用越来越广泛,但一些微小且可能对患者存在潜在风险的病变依然容易被超声医生忽视,下肢深静脉血栓合并动静脉瘘(arteriovenous fistula, AVF)相关报道少见,一方面由于此类病变临床相对少见,另一方面因为超声医生在诊查过程中对于这

类细微的病变容易忽视。本文旨在通过分析下肢静脉血栓合并动静脉瘘超声表现,探讨彩色多普勒在下肢静脉血栓合并动静脉瘘中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2015 年 6 月-2016 年 12 月在我院超声科诊断下肢静脉血栓合并 AVF 患者 25 例,其中 5 例 CT 血管造影同样证实存在动静脉瘘。男性 12 例,女性 13 例,平均年龄 $(68.4\pm$

作者简介 郭长旭(1986-),男,住院医师,学士,研究方向:超声诊断学;通信作者:袁宇, E-mail: tjyycsk@163.com。