

文章编号 1006-8147(2018)06-0517-04

论 著

miR-202、AFP 及 DKK1 在原发性肝癌患者血清中的表达及其意义

韩悦,魏殿军

(天津医科大学第二医院检验科,天津 300211)

摘要 目的:研究微小 RNA-202(miR-202)、甲胎蛋白(AFP)、分泌性蛋白 Dkkopf-1(DKK1)在原发性肝癌(PHC)患者血清中的表达水平及临床价值。方法:选择 2013 年 6 月-2014 年 12 月我院肝病科收治的 PHC 患者(PHC 组)43 例、良性肝病组患者(良性肝病组)37 例作为研究对象,选择同期健康体检人员 51 例作为健康对照组。检测 3 组受试对象血清中 miR-202、AFP 及 DKK1 的表达水平,运用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析 miR-202、AFP、DKK1 联合检测诊断 PHC 的诊断效能。结果:(1)PHC 患者血清中 miR-202 水平低于良性肝病组和健康对照组,有显著性差异($P<0.05$);AFP 和 DKK1 水平均高于良性肝病组和健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。(2)联合检测诊断 PHC 的效能高于 miR-202、AFP 及 DKK1 单独检测。(3)miR-202 与 AFP 呈负相关($r=-0.314, P<0.05$);miR-202 与 DKK1 呈负相关($r=-0.319, P<0.05$);AFP 与 DKK1 呈正相关($r=0.556, P<0.05$)。结论:原发性肝癌患者 miR-202 水平表达水平降低,AFP 和 DKK1 表达水平升高,三者联合检测有助于原发性肝癌的临床诊治。

关键词 miRNA-202;甲胎蛋白;分泌性蛋白 Dkkopf-1;原发性肝癌

中图分类号 R735.7

文献标志码 A

Expression and significance of miR-202, AFP and DKK1 in serum of patients with primary hepatic carcinoma

HAN Yue, WEI Dian-jun

(Department of Clinical Laboratory, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract **Objective:** To study the expression level and clinical value of tiny RNA-202 (miR-202), alpha fetoprotein (AFP) and secretory protein Dkkopf-1 (DKK1) in serum of patients with primary hepatic carcinoma (PHC). **Methods:** From June 2013 to December 2014, 43 patients with PHC (PHC group) and 37 patients with benign liver disease (benign liver disease group) were selected as the research subjects. Fifty-one healthy persons during the same period were selected as healthy control group. The levels of serum miR-202, AFP and DKK1 in three groups were detected. Receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to analyze the diagnostic efficiency of miR-202, AFP and DKK1 in the diagnosis of primary hepatic carcinoma. **Results:** The serum level of miR-202 in PHC group was lower than that in benign liver disease group and healthy control group ($P<0.05$). AFP and DKK1 levels were all higher than those in benign liver disease group and healthy control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The efficacy of joint detection in the diagnosis of PHC was higher than that of miR-202, AFP and DKK1. MiR-202 was negatively correlated with AFP ($r=-0.314, P<0.05$); miR-202 was negatively correlated with DKK1 ($r=-0.319, P<0.05$); AFP was positively correlated with DKK1 ($r=0.556, P<0.05$). **Conclusion:** The expression levels of miR-202 and AFP and DKK1 could increase in patients with primary hepatic cancer. The combined test of the three may be useful to the clinical diagnosis and treatment of primary hepatic cancer.

Key words miR-202; alpha fetoprotein; secretory protein Dkkopf-1; primary hepatic carcinoma

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是肝细胞发生的恶性肿瘤,与肝硬化、病毒性肝炎密切相关,目前其病因及发病机制尚不明确。调查发现,PHC 发病率较高,在世界恶性肿瘤中处于第 5 位,死亡率为第 2 位^[1]。在我国,PHC 高发于东南沿海地区,是危害人们身心健康的一大杀手。据统计,

我国 PHC 病人的中位年龄为 40~50 岁,男性多于女性,其死亡率约为 98%,略高于 PHC 全球死亡率,且死亡人数占到肝癌全球死亡人数的一半以上^[2]。由于 PHC 早期症状不显著,患者被确诊时已是中晚期,因而错过了最佳治疗时期,即使获得根治性治疗,5 年内仍有 60%~70% 的患者出现复发^[3]。PHC 病情发展加快会导致患者肝功能衰竭,晚期癌细胞大量增殖,扩散至周围组织及远处器官,如门静脉、肺部、脑部等,恶化程度加剧。及早发现并治疗可提高

基金项目 天津市卫计委科技基金资助项目(2015KZ101)

作者简介 韩悦(1984-),男,技师,硕士在读,研究方向:临床检验诊断;通信作者:魏殿军, E-mail: weidianjun01@163.com。

PHC 患者的生存率,改善生存质量。本研究通过检测肝癌患者血清中微小 RNA-202(micro RNA-202, miR-202)、甲胎蛋白(Alpha fetoprotein, AFP)、分泌性蛋白 Dkkopf-1(secreted protein,DKK1)的水平,运用 ROC 曲线分析 3 个指标联合检测诊断 PHC 的价值,探究提高临床诊断 PHC 准确性的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 6 月—2014 年 12 月天津医科大学第二医院肝病科收治的 43 例 PHC 患者(PHC 组)、37 例良性肝病患者(良性肝病组)及 51 例同期健康体检人员(健康对照组)。根据原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015 年版)^[4]对 PHC 进行诊断,并经病理检查确诊为 PHC。PHC 组男性 25 例,女性 18 例,年龄 29~76 岁,平均年龄(54.2±4.9)岁;良性肝病患者男性 22 例,女性 15 例,年龄 32~77 岁,平均年龄(53.9±6.1)岁,其中肝囊肿 18 例,肝血管瘤 19 例;健康对照组男性 29 例,女性 22 例,年龄 30~81 岁,平均年龄(56.2±8.3)岁。纳入标准:(1)患者初次确诊;(2)之前未接受任何治疗。排除标准:(1)合并神经性疾病或语言交流障碍者;(2)妊娠或哺乳期妇女;(3)有其他恶性肿瘤疾病患者;(4)有自身免疫性疾病患者;(5)药物性肝病或病毒性肝病患者;(6)临床依从性较差患者。3 组受试对象在性别($\chi^2=0.060, P=0.971$)、年龄($F=1.590, P=0.207$)上比较,差异无统计学意义,具有可比性($P>0.05$)。本研究经天津医科大学第二医院医学伦理委员会批准,所有受试者均知晓本次研究并签署知情同意书。

1.2 方法 分别采集 3 组受试对象清晨空腹静脉血 10 mL,3 500 r/min 离心 10 min,分离血清,于-80℃保存。采用实时荧光定量 PCR 法(qPCR 法)检测 3 组受试者血清 miR-202 含量,先提取血清总 RNA,加入引物后,根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆

转录为 cDNA。分别在 95℃、95℃、60℃预变性 30 s、3 s、30 s,共 40 个循环,miR-202 的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。用实时荧光定量 PCR 仪扩增定量,用 PCR 检测试剂盒进行定量检测;采用电化学发光法检测血清中 AFP 水平;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中 DKK1 水平。所有操作均严格按照产品说明书要求进行。

1.3 实验仪器与试剂盒 总 miRNA 提取试剂盒、miRNAs 逆转录试剂盒、miR-202 引物(5'-GCTGGAG AGGTATAGGGCA-3', 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3')、内参(5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3', 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTG-3')及探针和 miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒(赛默飞世尔);灭酶 EP 管(上海俊晟生物科技有限公司);干浴锅(上海汗诺仪器有限公司);实时荧光定量 PCR 仪(达安基因);紫外可见分光光度计(菲勒仪器有限公司);AFP 试剂盒、DKK1 试剂盒(武汉明德生物)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件处理本实验研究数据,计量数据不服从正态分布,则用中位数和四分位数间距 $M(Q1, Q3)$ 表示,3 组间数据比较采用 Kruskal-Wallis H 检验;运用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析 miR-202、AFP、DKK1 及联合检测诊断 PHC 的诊断效能;采用 Pearson 相关分析研究 miR-202、AFP 及 DKK1 的相关性。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-202、AFP 及 DKK1 在 PHC 组、良性肝病组及健康对照组血清中的表达 PHC 组患者血清中 miR-202 水平低于良性肝病组和健康对照组,有显著性差异($P<0.05$);AFP 和 DKK1 水平均高于良性肝病组和健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 3 组受试对象血清中 miR-202、AFP 和 DKK1 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of the levels of miR-202, AFP and DKK1 expression in the serum of the three groups($\bar{x}\pm s$)

分组	<i>n</i>	miR-202	AFP/(ng/mL)	DKK1/(ng/mL)
PHC 组	43	0.34(0.17, 0.44)	295.66(100.48, 368.16)	7.69(6.62, 8.69)
良性肝病组	37	0.55(0.47, 0.67)	58.65(9.72, 181.23)	3.71(3.30, 4.36)
健康对照组	51	1.39(1.16, 1.66)	10.29(6.53, 23.61)	1.31(1.26, 1.38)
Kruskal-Wallis H		91.372	63.968	84.433
P		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清 miR-202、AFP 及 DKK1 诊断 PHC 的效能 联合检测诊断 PHC 的效能高于 miR-202、AFP 及 DKK1 单独检测,且联合检测的 ROC 曲线下面积最大,为 0.917。ROC 曲线下面积比较, $AUC_{\text{联合检测}} > AUC_{\text{miR-202}}$ ($Z=2.075, P<0.05$),差异具有统计学意义;

$AUC_{\text{联合检测}} > AUC_{\text{AFP}}, AUC_{\text{联合检测}} > AUC_{\text{DKK1}}$, 差异无统计学意义 (Z 值分别为 1.812, 1.202, P 均 >0.05); $AUC_{\text{miR-202}} < AUC_{\text{AFP}}, AUC_{\text{miR-202}} < AUC_{\text{DKK1}}$, 差异无统计学意义 (Z 值分别为 -0.743, -1.261, P 均 >0.05); $AUC_{\text{AFP}} < AUC_{\text{DKK1}}, P>0.05$ 。详见图 1、表 2 和表 3。

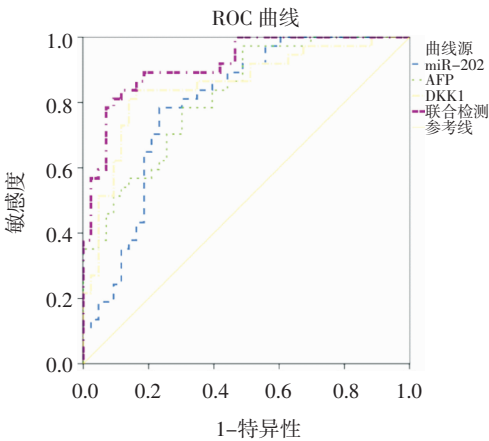


图 1 miR-202、AFP、DKK1 及联合检测诊断 PHC 的 ROC 曲线
Fig 1 The receiver operating characteristic curves(ROC) for miR-202, AFP,DKK1 and combined detection for the diagnosis of PHC

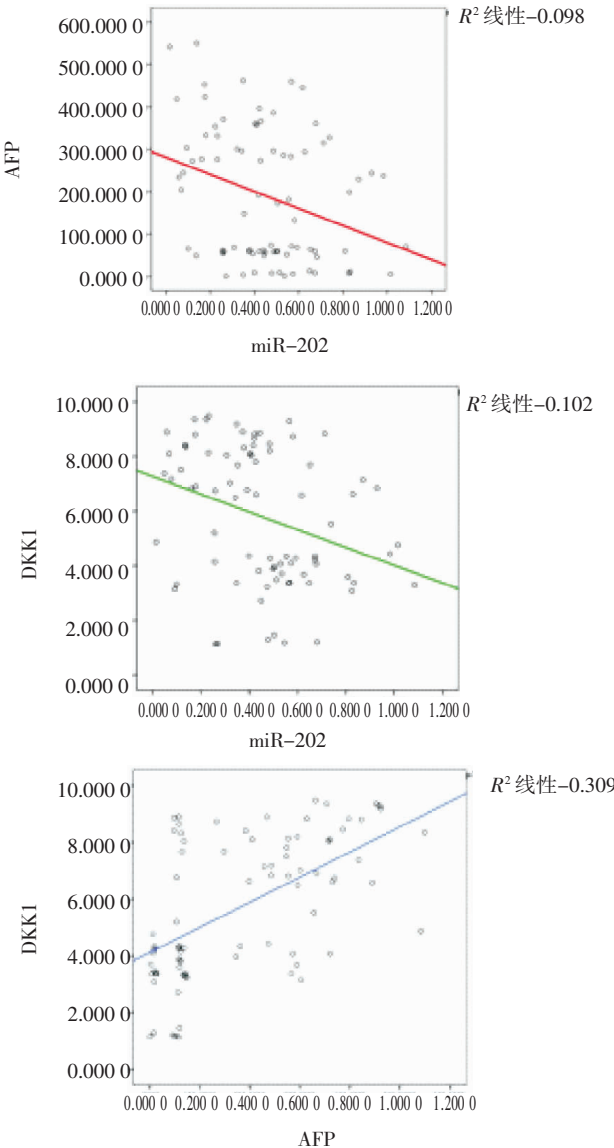


图 2 miR-202、AFP 及 DKK1 的相关性
Fig 2 Correlation between miR-202,AFP and DKK1

2.3 miR-202、AFP 及 DKK1 的相关性分析 miR-202 与 AFP 呈负相关($r=-0.314,P=0.005$);miR-202

与 DKK1 呈负相关 ($r=-0.319,P=0.004$);AFP 与 DKK1 呈正相关($r=0.556,P<0.001$)。

表 2 联合检测 miR-202、AFP 及 DKK1 对 PHC 的诊断价值(%)
Tab 2 The diagnostic value of combined detection of mir-202, AFP and DKK1 for PHC(%)

指标	敏感度	特异性	阳性预测值	阴性预测值	准确率
miR-202	76.74	70.27	75.00	72.22	73.75
AFP	69.77	70.27	73.17	66.67	70.00
DKK1	83.72	83.78	85.71	81.58	83.75
联合检测	83.72	86.49	87.80	82.05	85.00

表 3 miR-202、AFP、DKK1 及联合检测诊断 PHC 的 ROC 曲线下面积
Tab 3 Area under the receiver operating characteristic curves(ROC) for miR-202,AFP, DKK1 and combined detection for the diagnosis of PHC

检测项目	AUC	SE	P	95%CI	约登指数
miR-202	0.796	0.050	<0.001	0.698~0.895	0.551
AFP	0.819	0.045	<0.001	0.730~0.908	0.485
DKK1	0.853	0.044	<0.001	0.766~0.940	0.675
联合检测	0.917	0.030	<0.001	0.857~0.977	0.722

3 讨论

PHC 的发生发展是多种因素参与、分阶段进行的过程,早期不易发现,仅有少部分患者经确诊后可以治疗,因而造成 PHC 患者预后不良。目前,临床诊断 PHC 仍以影像学检查和肝组织活检病理检查为主,然而两者均有不足之处。CT、MRI 联合检测及 B 超筛查对患者无创伤,但其判断误差较大,需具备良好生理解剖知识及丰富影像学鉴定经验的医师来完成^[5];肝组织活检的准确性相对较高,但易给患者带来创伤、出血风险,临床上应用受到限制^[6]。可见,PHC 传统的诊断方法存在局限,寻找肿瘤细胞筛查的新途径显得尤为重要。研究发现,血清学标志物水平检测近年应用较为广泛^[7]。

有研究报道,多种 miRNAs 在肝癌组织中存在异常表达,在众多 miRNAs 中,miR-202 位于 10q26 的脆性位点,与大脑肿瘤、子宫内膜存在密切关联^[8-9]。报道指出,miR-202 在多种疾病中表达存在异常(如食管癌、胃癌),但关于其在肝癌中表达的报道较少^[10]。本研究中,PHC 患者血清中 miR-202 水平显著低于良性肝病组和健康对照组,这与 Zhang 等^[10]的研究结果基本一致,说明 miR-202 在肝癌发展过程中起到抑制癌基因的作用。Fu 等^[11]研究发现,血清中的 miRNA 稳定性较好,难以被降解,且其具备一定的组织特异性,因此 miRNA-202 可以作为潜在的生物标记物对 PHC 进行诊断。本研究结果显示,miRNA-202 单项诊断 PHC 的准确性为 73.75%,说

明仅凭 miRNA-202 诊断 PHC 易造成误诊和漏诊。

AFP 为临床上常用的肝癌标志物,AFP 在正常成人血清中含量极微,但有报道指出,约有 50%~60% 的 PHC 患者 AFP 表达升高,且 AFP 在肝炎及肝硬化患者中也有不同程度的升高^[12]。本研究中 PHC 患者 AFP 水平高于良性肝病患者健康受试者,此结果与上述研究一致。血清 AFP 诊断 PHC 的敏感度为 69.77%,特异性为 70.27%,结果与 Sakr 等^[13]研究结果类似。另外,AFP 诊断 PHC 的 ROC 曲线下面积相比较而言不是很高,可能原因是癌变时的肝细胞受到低甲基化干扰,从而使其合成的 AFP 表达处于开放化状态,提示单独应用 AFP 诊断 PHC 存在一定的误诊及漏诊率。

DKK1 是由 266 个氨基酸组成的一种分泌型糖蛋白,其能与相应的受体结合并调控细胞的分化、增殖、凋亡及迁移,在肿瘤发生方面具有重要作用。研究指出,DKK1 在乳腺癌、胃癌等中表达水平降低,而在肝癌、肺癌中的表达升高。本研究发现,与良性肝病组和健康对照组相比,PHC 组患者血清中 DKK1 水平升高,提示 DKK1 可用于 PHC 的诊断。DKK1 对 PHC 诊断的敏感度为 83.72%,特异性 83.78%,结果与既往研究存在差异^[14]。由于单项肿瘤标志物诊断 PHC 的敏感度及特异性均难满足临床早期诊断及预后评估的要求,所以在实际工作中推荐应用联合检测。AFP、miRNA-202、DKK1 3 项指标联合检测诊断 PHC 的 AUC 提升至 0.917,高于 AFP、miRNA-202、DKK1 单独检测。因此认为三者联合检测在 PHC 诊断方面更具优势^[15]。此外,3 个指标相关性分析发现,miR-202 与 AFP、DKK1 均呈正相关,AFP 与 DKK1 呈正相关,提示三者血清水平存在联系。

综上所述,miR-202、AFP 及 DKK1 联合检测可以提高 PHC 诊断的准确性,为临床诊治 PHC 提供参考依据。然而本研究样本量小,后续将扩大样本量并进一步探究 3 个指标在 PHC 中的作用机制。

参考文献:

- [1] Liu J, Zhou Q, Xu J, et al. Detection of EGFR expression in patients with colorectal cancer and the therapeutic effect of cetuximab[J]. J BUON, 2016, 21(1):95
- [2] Wei K R, Yu X, Zheng R S, et al. Incidence and mortality of liver cancer in China, 2010[J]. Clin J Cancer, 2014, 33(8):388
- [3] 汪福昌,郭武华. 肝细胞癌生物标志物研究进展[J]. 山东医药, 2012, 52(42):87
- [4] 中国抗癌协会肝癌专业委员会,中华医学会肝病学会肝癌学组,中国抗癌协会病理专业委员会,等. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015 年版)[J]. 中华肝胆外科杂志, 2015, 21(3):865
- [5] Izzo F, Palaia R, Albino V, et al. Hepatocellular carcinoma and liver metastases: clinical data on a new dual-lumen catheter kit for surgical sealant infusion to prevent perihepatic bleeding and dissemination of cancer cells following biopsy and loco-regional treatments[J]. Infect Agent Cancer, 2015, 10(1):11
- [6] Sandrasegaran K, Thayalan N, Thavanesan R, et al. Risk factors for bleeding after liver biopsy[J]. Abdom Radiol, 2016, 41(4):643
- [7] Vasavada B B, Chan C L. Rapid fibrosis and significant histologic recurrence of hepatitis C after liver transplant is associated with higher tumor recurrence rates in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus-related liver disease: a single center retrospective[J]. Exp Clin Transplant, 2015, 13(1):46
- [8] Wu S G, Huang Y J, Bao B, et al. miR-508-5p acts as an anti-oncogene by targeting MESDC1 in hepatocellular carcinoma[J]. Neoplasma, 2017, 64(1):40
- [9] Zhang X, Jiang P, Shuai L, et al. miR-589-5p inhibits MAP3K8 and suppresses CD90+, cancer stem cells in hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1):176
- [10] Zhang Y, Zheng D, Xiong Y, et al. miR-202 suppresses cell proliferation in human hepatocellular carcinoma by downregulating LRP6 post-transcriptionally[J]. FEBS Lett, 2014, 588(10):1913
- [11] Fu Y, Wei X, Tang C, et al. Circulating microRNA-101 as a potential biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2013, 6(6):1811
- [12] Shastri A, Msaouel P, Montagna C, et al. Primary Hepatic Small Cell Carcinoma: Two Case Reports, Molecular Characterization and Pooled Analysis of Known Clinical Data[J]. Anticancer Res, 2016, 36(1):271
- [13] Sakr M, Abdelhakam S M, Dabbous H, et al. Characteristics of Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients with Primary Budd-Chiari Syndrome[J]. Liver Int, 2017, 37(3):415
- [14] Mao L, Wang Y, Wang D, et al. TEMs but not DKK1 could serve as complementary biomarkers for AFP in diagnosing AFP-negative hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2017, 12(9):e0183880
- [15] Erdal H, Gül Utku Ö, Karatay E, et al. Combination of DKK1 and AFP improves diagnostic accuracy of hepatocellular carcinoma compared with either marker alone[J]. Turk J Gastroenterol, 2016, 27(4):375

(2018-02-24 收稿)