

肝癌患者血清 miR-106b 的表达变化及其临床意义

孟凡龙^{1,2} 英卫东^{1,2} 许戈良^{1,2} 李建生^{1,2} 王伟³ 孙其恺^{1,2}

摘要 目的 观察肝癌患者血清 miR-106b 的表达变化,并探讨其临床意义。方法 收集 47 例肝癌患者、31 例正常人、22 例慢性肝病作为研究对象,应用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测其血清 miR-106b 表达水平,并比较肝癌患者血清 miR-106b 表达水平与临床病理特征之间的关系。应用接受者工作特征 (ROC) 曲线分析血清 miR-106b 用于肝癌诊断的价值。结果 肝癌患者血清 miR-106b 表达水平较正常对照组及慢性肝病组均显著升高 ($P < 0.01$); 血清 miR-106b 表达水平与肿瘤分化程度、脉管侵犯及 TNM 分期等临床病理特征显著相关 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示血清 miR-106b 区分肝癌与正常人的 ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.868, 诊断敏感性与特异性分别为 87.2%、74.2%。区别肝癌与肝硬化患者时 AUC 为 0.791, 敏感性与特异性分别为 72.3%、77.3%。结论 miR-106b 在肝癌患者血清中表达显著上调,是潜在的肝癌诊断及预后指标。

关键词 肝肿瘤; 血清; miRNA; 诊断; 预后

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0334-05

肝细胞癌(简称肝癌)是世界范围内第五大常见肿瘤,在肿瘤相关死亡原因中居第 3 位^[1],由于传统检查手段对肝癌的诊断效率并不令人满意,多数患者因出现症状而就诊时已失去了手术治疗的机会,导致肝癌的总体预后很差,因此寻找新的更灵敏特异的肝癌标志物具有重要意义。近来研究^[2-3]显示循环 miRNA 在肿瘤等疾病的诊断及预后中具有重要应用价值,正成为疾病标志物研究的热点。有研究^[4-5]报道 miR-106b 在肝癌组织中表达升高,且与肝癌的增殖及侵袭转移相关,但其在血清中的表达情况尚未见报道。因此,该研究拟通过应用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法检测 miR-106b 在肝癌患者血清中的表达情况并分析其与肝癌临床病理特征的相关性,初步探讨其是否具有成为肝癌诊断及预

后的标志物的可能性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2012 年 8 月~2013 年 3 月安徽医科大学附属省立医院收治的 47 例经术后病理确诊的乙肝阳性肝癌患者(肝癌组),其中男 37 例,女 10 例,年龄(55.4 ± 10.7)岁; 22 例慢性乙肝或慢性乙肝后肝硬化患者(慢性肝病组),其中男 17 例,女 5 例,年龄(53.6 ± 11.8)岁; 31 例各项指标均正常且自述无肿瘤相关病史的健康体检者(正常对照组),其中男 24 例,女 7 例,年龄(51.8 ± 12.3)岁。

1.2 主要试剂与仪器 血清/血浆 RNA 提取试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒、miRNA SYBR Green PCR 检测试剂盒及 Spike-In Control 试剂盒均购自德国 QIAGEN 公司; miR-106b 特异性上游引物是根据 miRBase 数据库(网址 <http://www.mirbase.org/>)公布的序列,应用 Oligo 7 软件设计并由 Invitrogen(美国)公司合成的,序列为 5'-TAAAGTGCTGACAGTG-CAGAT-3'; 普通 PCR 仪购自德国 Biometra 公司; ABI 7500 Real Time PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 方法

1.3.1 血清样本的收集 采集患者清晨空腹静脉血 3~4 ml,室温静置 30 min 充分凝结,4℃ 下 300 r/min 离心 15 min,将上清液于 4℃ 下 1300 r/min 离心 10 min 去除残余细胞成分,将所获血清以 300 μl/管分装后置于 -80℃ 保存备用。

1.3.2 血清总 RNA 提取 从 -80℃ 冰箱取出血清样本后迅速置于 37℃ 水浴 1 min 解冻,取 200 μl 血清按照血清 RNA 提取试剂盒操作说明书提取血清总 RNA,立即进行逆转录。

1.3.3 cDNA 第一链合成 按照逆转录试剂盒说明书进行加尾法逆转录,反应结束后将获得的 10 μl cDNA 以 5 μl/管分装于 EP 管后置于 -80℃ 保存备用。

1.3.4 Real Time-PCR 按照 miRNA SYBR Green PCR 检测试剂盒说明书操作,反应体系共 20 μl,反应条件为:95℃ 15 min 后,以 94℃ 15 s,55℃ 30 s,70℃ 34 s 进行 40 个循环,70℃ 时采集荧光信

2013-09-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81172364、81201906)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹ 肝脏外科、² 肝胆胰外科安徽重点实验室、³ 肿瘤内科,合肥 230001

作者简介:孟凡龙,男,硕士研究生;

英卫东,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: jwd1968@sina.com

号,循环结束后绘制溶解曲线并对产物行琼脂糖凝胶电泳。每个反应均重复3次取平均值。根据文献^[6]报道,以提取RNA时所加外参 Cel-miR-39 作为定量参照,以 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算血清中目标 miRNA 的相对表达量,其中 $\Delta Ct = Ct_{(miR-106b)} - Ct_{(Cel-miR-39)}$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,所有数据均以中位数(四分位数)表示,各组数据经对数转化后基本符合正态分布,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验,两组数据的比较采用独立样本 *t* 检验。采用 Medcalc 软件绘制血清 miR-106b 用于肝癌区分对照组的 ROC 曲线并计算曲线下面积(AUC)、敏感度及特异度。

2 结果

2.1 qRT-PCR 法检测结果 所有样本均可检出 Cel-miR-39 及 miR-106b,两种产物溶解曲线均为单峰, T_m 值分别为 75.75 °C 与 75.51 °C,产物琼脂糖凝胶电泳条带均位于 80~100 bp,见图 1。

2.2 各组血清 miR-106b 表达情况 肝癌组、慢性肝病组及正常对照组间血清 miR-106b 比较差异有

统计学意义 ($F = 25.454, P < 0.01$),肝癌组血清 miR-106b 相对表达量 [5.469×10^{-3} ($3.362 \times 10^{-3}, 11.840 \times 10^{-3}$)] 分别较正常对照组 [1.572×10^{-3} ($0.698 \times 10^{-3}, 2.634 \times 10^{-3}$)] 及慢性肝病组 [2.430×10^{-3} ($1.389 \times 10^{-3}, 3.974 \times 10^{-3}$)] 显著升高 ($P < 0.01$),慢性肝病组患者血清 miR-106b 相对表达量较正常对照组有升高趋势,但差异无统计学意义,见图 2。

2.3 血清 miR-106b 表达量与肝癌临床病理特征的关系 统计分析结果显示肿瘤细胞低分化者较中分化者血清 miR-106b 相对表达量高 ($P < 0.05$),有脉管侵犯者较无脉管侵犯者相对表达量高 ($P < 0.05$),TNM 分期 III/IV 期患者较 I/II 期患者相对表达量高 ($P < 0.05$)。而与患者年龄、性别、病灶多少、肿瘤大小及血清 AFP 水平均无明显相关性,见表 1。

2.4 血清 miR-106b 的诊断价值 ROC 曲线分析显示,血清 miR-106b 区分肝癌患者与正常人 AUC 为 0.868 (95% CI: 0.773~0.934, $P < 0.01$),截断值取 2.262×10^{-3} 时,敏感度与特异度分别为

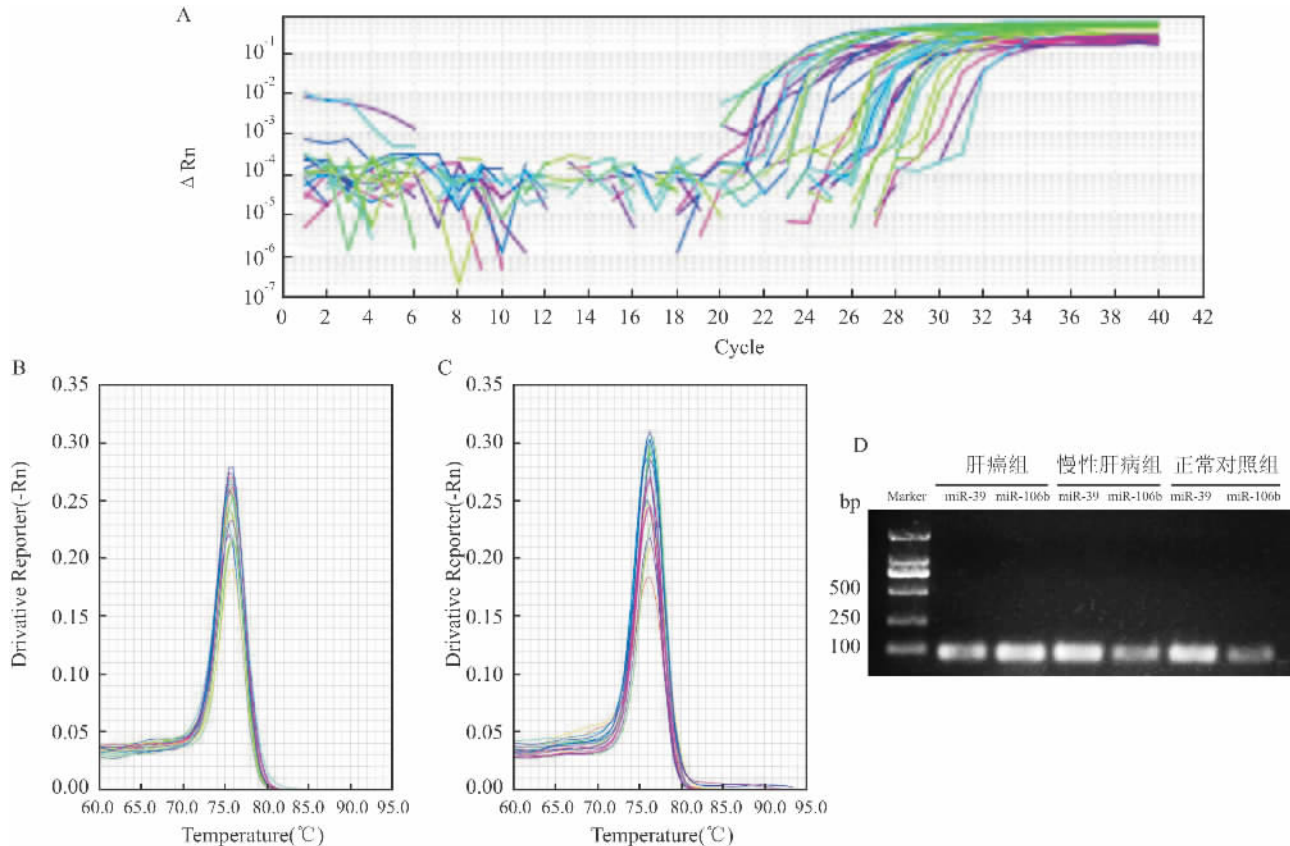


图1 qRT-PCR 法检测结果

A: 部分样本扩增曲线; B: Cel-miR-39 溶解曲线; C: miR-106b 溶解曲线; D: PCR 扩增产物电泳图

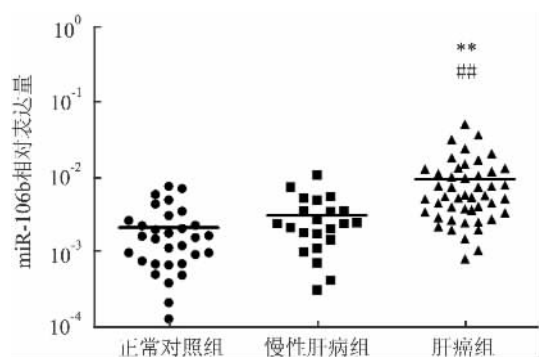


图2 血清 miR-106b 在各组间的相对表达量(横线代表均值)与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与慢性肝病组比较: ## $P < 0.01$

表1 肝癌患者血清 miR-106b 相对表达量与临床病理特征的关系

项目	n	miR-106b 表达量($\times 10^{-3}$)	t 值	P 值
性别				
男	37	5.223(3.127, 12.368)	0.448	0.656
女	10	6.626(3.717, 12.469)		
年龄(岁)				
<60	26	6.425(3.745, 10.597)	0.783	0.438
≥ 60	21	5.330(2.229, 13.118)		
AFP($\mu\text{g/L}$)				
<20	11	7.396(2.774, 13.341)	-0.501	0.619
≥ 20	36	5.209(3.380, 11.643)		
病灶数				
单发	34	5.399(2.863, 11.624)	0.590	0.558
多发	13	7.544(3.676, 12.368)		
肿瘤直径(cm)				
<5	19	5.468(2.175, 10.446)	1.645	0.107
≥ 5	28	5.549(3.741, 16.508)		
脉管侵犯				
无	25	4.523(2.719, 7.470)	-2.277	0.028
有	22	9.889(4.370, 15.441)		
分化程度				
低分化	18	8.649(5.026, 17.357)	2.504	0.016
中、高分化	29	4.470(2.461, 8.917)		
TNM 分期				
I + II	23	4.523(2.664, 7.544)	-2.341	0.024
III + IV	24	7.725(4.168, 16.508)		

87.2% 与 74.2% ; 血清 miR-106b 区分肝癌患者于慢性肝病患者的 AUC 为 0.791 (95% CI: 0.676 ~ 0.880 $P < 0.01$) 截断值取 3.629×10^{-3} 时 敏感性与特异性分别为 72.3% 与 77.3% 。血清 miR-106b 区分慢性肝病与正常对照的 AUC 值为 0.654 (95% CI: 0.511 ~ 0.779 , $P < 0.05$) , 截断值取 2.067×10^{-3} 时 敏感性与特异性分别为 63.6% 与 67.7% , 见图 3。

3 讨论

微小 RNA (miRNA) 是新发现的一类短链非编码 RNA , 可以对基因表达进行转录后调控 , 在细胞各项正常生命活动及包括肿瘤在内的各种疾病的发生发展中发挥重要调节作用。Lawrie et al^[7] 首次在血清中发现 miRNA , 之后越来越多的研究证实外周血及其他体液中含有稳定存在的 miRNA , 提示其可能成为理想的血清学标志物 , 在肿瘤等疾病的诊断及预后中具有重要的应用前景。肝癌在全球发病率高、预后差 , 而目前最主要的诊断标志物 AFP 的敏感度较低 , 且区分肝癌与乙型肝炎或肝硬化的能力较差 , 因此 , 探究循环 miRNA 在肝癌诊断及预测预后方面的应用价值正日益成为研究的热点。

miR-106b 基因位于人第 7 号染色体长臂上 , 是 miR-106b ~ 93 ~ 25 簇的组成部分 , 目前已有文献报道其在神经胶质瘤^[8]、前列腺癌^[9] 等多种肿瘤中表达上调 , 提示其发挥着癌基因的作用。在肝癌方面 , Shen et al^[4] 研究发现 miR-106b 在肝癌细胞系及肝癌组织中相对于正常肝细胞及正常肝组织表达均显著升高 , 并可以抑制 APC 基因表达促进肝癌细胞的增殖。而 Yau et al^[5] 进一步研究发现 miR-106b 的高表达与 E-Cadherin 等上皮细胞标志物的低表达及 N-Cadherin 等间质细胞标志物的高表达相关 , 提示

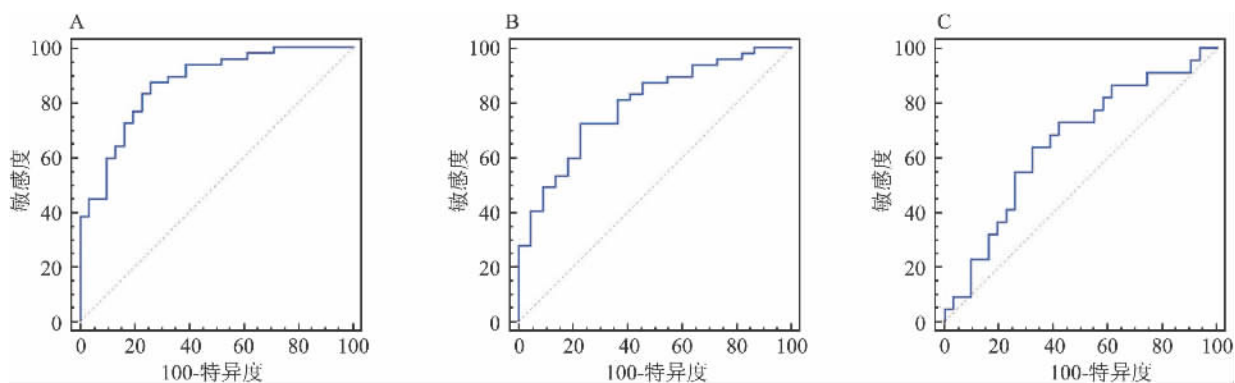


图3 血清 miR-106b ROC 图

A: 血清 miR-106b 区分肝癌患者与正常人 ROC 曲线; B: 血清 miR-106b 区分肝癌患者与慢性肝病患者的 ROC 曲线; C: 血清 miR-106b 区分慢性肝病患者与正常人的 ROC 曲线

其可能通过促使肝癌细胞发生上皮间质转化 (EMT) 进而促进肝癌的侵袭及转移。但上述研究均是基于肝癌组织及细胞系, miR-106b 在肝癌患者血清中表达是否异常, 以及其能否作为肝癌诊断及预后标志物, 国内外尚未见相关报道。

本研究成功检测了血清中 miR-106b 的表达量, 实验产物各项特征均与试剂盒说明书提供的参考值一致。结果显示, 血清 miR-106b 表达水平在肝癌患者中较正常对照组及慢性肝病组均显著升高, 与之前报道在肝癌组织及细胞系中的表达情况一致。分析表明血清 miR-106b 在 TNM 分期较晚、分化程度较低及有脉管侵犯等预后不良患者中表达更高, 提示其可能是患者预后的敏感指标。ROC 曲线分析显示血清 miR-106b 用于区分肝癌与正常人时敏感度及特异度分别达到 87.3% 及 74.2%, 而文献^[10]统计显示 AFP 诊断敏感度与特异度约为 70% 与 89%, 比较而言血清 miR-106b 敏感度较高, 但特异度较低, 而本研究显示患者 AFP 水平与血清 miR-106b 表达量之间并无相关性, 提示两者在诊断肝癌方面可能存在一定互补性, 进一步研究可以尝试联合检测血清 miR-106b 与 AFP 以提高诊断敏感度与特异度。值得注意的是, miR-106b 在区分肝癌与慢性肝病患者时也具有较高的敏感度及特异度, 提示其可用于慢性肝炎及肝硬化患者等肝癌高危人群的筛查, 以提高肝癌早期诊断率。

参考文献

[1] Parkin D M. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. Lancet

Oncol, 2001, 2(9): 533-43.

- [2] 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): 10513-8.
- [3] Li J, Wang Y, Yu W, et al. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(1): 70-3.
- [4] Shen G, Jia H, Tai Q, et al. miR-106b downregulates adenomatous polyposis coli and promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(1): 211-9.
- [5] Yau W L, Lam C S, Ng L, et al. Over-expression of miR-106b promotes cell migration and metastasis in hepatocellular carcinoma by activating epithelial-mesenchymal transition process [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e57882.
- [6] Scheffer A R, Holdenrieder S, Kristiansen G, et al. Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer [J]. World J Urol, 2012: Epub ahead of print.
- [7] Lawrie C H, Gal S, Dunlop H M, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. Br J Haematol, 2008, 141(5): 672-5.
- [8] Zhang A, Hao J, Wang K, et al. Down-regulation of miR-106b suppresses the growth of human glioma cells [J]. J Neurooncol, 2013, 112(2): 179-89.
- [9] Hudson R S, Yi M, Esposito D, et al. MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer [J]. Oncogene, 2013, 32(35): 4139-47.
- [10] Zhou Y, Yin X, Ying J, et al. Golgi protein 73 versus alpha-fetoprotein as a biomarker for hepatocellular carcinoma: a diagnostic meta-analysis [J]. BMC Cancer, 2012, 12: 17.

Serum miR-106b expression and its clinical significance in hepatocellular carcinoma

Meng Fanlong^{1,2}, Jia Weidong^{1,2}, Xu Geliang^{1,2}, et al

(¹Dept of Hepatic Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, ²Key Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery of Anhui Province, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression level of serum miR-106b in hepatocellular carcinoma (HCC) patients and to discuss its clinical value. **Methods** The expression levels of serum miR-106b of 47 HCC patients, 31 healthy controls and 22 chronic liver disease patients were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The relationship between the serum miR-106b level of the patients and their clinical parameters was analyzed. The diagnostic value of the serum miR-106b level was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Compared with healthy controls and chronic liver disease patients, serum miR-106b level was significantly higher in HCC patients ($P < 0.01$). The serum miR-106b level was strongly correlated with

超敏 C 反应蛋白与维吾尔族老年单纯收缩期高血压患者血管内皮功能的相关性

刘忠玉¹ 李 辰² 黄 榕³ 周亚丽³ 张艳君⁴ 赵宗峰⁴

摘要 目的 探讨超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)与维吾尔族老年单纯收缩期高血压(ISH)患者血管内皮功能之间的关系。方法 选取维吾尔族老年 ISH 患者 100 例作为 ISH 组,维吾尔族老年原发性高血压(EH)患者 100 例作为 EH 组,并选择年龄与之相匹配的维吾尔族血压正常人群(NT) 80 例作为 NT 组。采用免疫透射比浊法测定血清 hs-CRP 水平、ELISA 法测定血清内皮素 1(ET-1)浓度, Griess 法测定血清一氧化氮(NO)含量;运用超声技术测定血流介导的内皮依赖性血管舒张功能(FMD),动脉硬化检测仪测定颈-股动脉脉搏波传导速度(cfPWV)。采用直线相关分析及多元线性逐步回归分析法分析 hs-CRP 与 ET-1、cfPWV、NO、FMD 的相关性。结果 与 NT 组比较,ISH 组、EH 组 hs-CRP、cfPWV、ET-1 明显升高($P < 0.01$),而 NO、FMD 明显降低($P < 0.01$); ISH 组 hs-CRP、cfPWV、ET-1 高于 EH 组($P < 0.01$); ISH、EH 两组间的 NO、FMD 差异无统计学意义。相关性分析表明,hs-CRP 与 ET-1、cfPWV 呈正相关($P < 0.01$),与 NO、FMD 呈负相关($P < 0.01$)。多元线性逐步回归分析显示 hs-CRP、NO、ET-1、cfPWV 是影响 FMD 的主要因素($P < 0.05$)。结论 维吾尔族老年 ISH 患者血清 hs-CRP 水平明显升高,且与 FMD 呈负相关。

关键词 维吾尔族;单纯收缩期高血压;超敏 C 反应蛋白;血流介导的内皮依赖性血管舒张功能;脉搏波传导速度

中图分类号 R 544.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0338-05

超敏 C 反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)是白细胞介素 6(IL-6)诱导肝脏合成的急性时相蛋白,hs-CRP 通过引起内皮功能损伤、促进动脉硬化等形式,在心脑血管疾病的发生与发展过程中发挥重要作用,是心脑血管疾病的独立危险因素^[1-4]。近年来研究^[5-6]表明,老年原发性高血压(essential hypertension, EH)患者的血清 hs-CRP 水平明显升高,提示 hs-CRP 与老年 EH 的发病密切相关。内皮细胞功能障碍和动脉硬化被认为是老年单纯收缩期高血压(isolated systolic hypertension, ISH)的重要发病机制,但 hs-CRP 与维吾尔族老年 ISH 内皮细胞功能及动脉硬化之间的关系鲜有报道。既往研究^[7]证实,血流介导的内皮依赖性血管舒张功能(flow-mediated endothelium-dependent vasodilation function, FMD)、内皮素 1(endothelin-1, ET-1)及一氧化氮(nitric oxide, NO)是反映血管内皮功能的重要指标,而颈-股动脉脉搏波传导速度(carotid-femoral pulse wave conduction velocity, cfPWV)则是反映动脉硬化的敏感指标。该研究拟以维吾尔族老年 ISH 为研究对象,探讨 hs-CRP 与 FMD、cfPWV、ET-1 及 NO 之间的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象与分组

连续收集 2011 年 7 月 ~

2013-09-29 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2011211A053);
新疆维吾尔自治区人民医院院内资助项目(编号:
20090108)

作者单位:¹ 安徽医科大学新疆临床学院,乌鲁木齐 830001

² 石河子大学医学院,石河子 832000

新疆维吾尔自治区人民医院³ 干部保健二科、⁴ 临床中心
实验室,乌鲁木齐 830001

作者简介:刘忠玉,男,硕士研究生;

周亚丽,女,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhouyali11@163.com

tumor differentiation, TNM stages and vascular invasion ($P < 0.05$). ROC curve analyses revealed that the area under the curve (AUC) of serum miR-106b was 0.868 in discriminating HCC from healthy controls with a sensitivity of 87.2% and a specificity of 74.2%, while the AUC was 0.791 in discriminating HCC from chronic hepatitis or cirrhosis with a sensitivity of 72.3% and a specificity of 77.3%. **Conclusion** The expression level of serum miR-106b in HCC patients was significantly up-regulated, and it might be a useful diagnostic and prognostic biomarker for HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; serum; miRNA; diagnosis; prognosis