

血浆 miRNAs 水平检测在原发性肝细胞癌早期筛查中的价值

刘志虎¹, 董淑晓², 张振亮¹, 王继涛¹, 甄忠广¹

(1. 河北医科大学附属邢台市人民医院, 河北 邢台 054001;

2. 邢台市第三医院, 河北 邢台 054001)

摘要: [目的] 探讨血浆 miRNAs 水平检测在原发性肝细胞癌早期筛查中的作用。[方法] 采用 TaqMan 低密度芯片 (TaqMan Low Density Array) 的方法, 筛选出候选可作为原发性肝细胞癌早期筛查的 miRNAs 标志物, 并采用 RT-qPCR 方法在 98 例原发性肝细胞癌样本中进行验证。[结果] 5 个候选 miRNAs 在 HCC 患者血浆中的表达与对照组相比显差异有统计学意义, 其中 miR-21 (病例组 $\Delta Ct = 5.8675 \pm 1.3561$, 对照组 $\Delta Ct = 8.5214 \pm 1.8956$), miR-222 (病例组 $\Delta Ct = 6.2568 \pm 2.5842$, 对照组 $\Delta Ct = 9.2354 \pm 1.5627$), miR-18 (病例组 $\Delta Ct = 9.4237 \pm 2.4785$, 对照组 $\Delta Ct = 12.5862 \pm 0.9852$) 在病例组中的表达量高于对照组, miR-16 (病例组 $\Delta Ct = 13.4211 \pm 1.2258$, 对照组 $\Delta Ct = 8.4251 \pm 0.8625$), miR-451a (病例组 $\Delta Ct = 8.2358 \pm 1.2372$, 对照组 $\Delta Ct = 5.2666 \pm 1.1656$) 在病例组中的表达量低于对照组; miR-21 在对照组、I 期、II 期、III 期及以上组中表达量存在差异性, 呈现递增趋势 ($P < 0.05$), miR-16 在对照组、I 期、II 期、III 期及以上组中表达量存在差异性, 呈现递减趋势 ($P < 0.05$)。[结论] 患者血浆 miRNAs 表达的差异可能可作为原发性肝细胞癌早期筛查的血浆学分子标志物。

关键词: miRNAs; 原发性肝细胞癌; 血浆; 标志物; RT-qPCR

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)08-0663-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.08.B003

The Role of Plasma miRNAs Detection in the Early Screening of Hepatocellular Carcinoma

LIU Zhi-hu¹, DONG Shu-xiao², ZHANG Zhen-liang¹, et al.

(1. Hebei Medical University Affiliated Xingtai People's Hospital, Xingtai 054001, China;

2. Xingtai Third Hospital, Xingtai 054001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the role of plasma miRNAs detection in early screening of hepatocellular carcinoma (HCC). [Methods] There were 98 cases with HCC were selected for searching the miRNAs markers for early screening by RT-qPCR method. [Results] Five candidate miRNAs expressed in HCC patients were significantly different with that expressed in the control group. Compared with the control group, MiR-21 (HCC group $\Delta Ct = 5.8675 \pm 1.3561$, control group $\Delta Ct = 8.5214 \pm 1.8956$), miR-222 (HCC group $\Delta Ct = 6.2568 \pm 2.5842$, control group $\Delta Ct = 9.2354 \pm 1.5627$) and miR-18 (HCC group $\Delta Ct = 9.4237 \pm 2.4785$, control group $\Delta Ct = 12.5862 \pm 0.9852$) were expressed significantly higher than those in the HCC group, at the same time, miR-16 (HCC group $\Delta Ct = 13.4211 \pm 1.2258$, control group $\Delta Ct = 8.4251 \pm 0.8625$) and miR-451a (HCC group $\Delta Ct = 8.2358 \pm 1.2372$, control group $\Delta Ct = 5.2666 \pm 1.1656$) were expressed lower than those in the HCC group; MiR-21 expressed in the control group and HCC group (respectively stage I, II, III) were showing an increasing trend ($P < 0.05$), while miR-16 in these groups were showing a decreasing trend ($P < 0.05$). [Conclusion] Differences of miRNAs expressed in the HCC patients might serve as the plasma molecular markers of HCC for early screening.

Subject words: miRNAs; hepatocellular carcinoma; plasma; markers; RT-qPCR

原发性肝细胞肝癌(HCC)是常见的恶性肿瘤之一,在世界范围之内排名第五。中国自 20 世纪 90 年代起, HCC 已上升为第 2 位癌症杀手。全球每年新

发肝癌病例数约 65 万, 其中一半以上发生在中国。因此, 寻找与 HCC 发生发展相关的新型生物标志物, 对于早期发现疑似病例, 早治疗, 降低 HCC 的死亡率具有重大的经济效益和社会效益。近年研究^[1-3]表明 miRNAs 不仅可作为抑癌因子, 抑制原癌基因的激活, 亦可作为致癌基因促进肿瘤的生长, 有些致癌病

通讯作者: 甄忠广, 副主任医师, 硕士; 河北医科大学附属邢台市人民医院肝胆外科, 河北省邢台市桥东区红星街 16 号 (054000); E-mail: 732076446@qq.com

收稿日期: 2017-01-12; 修回日期: 2017-02-27

毒编码的 miRNAs 也可能参与相关肿瘤的发生。上述作用参与到肿瘤的发生、生长、侵袭和转移等各个过程,因而为肿瘤的诊断、预后及治疗提供新的思路。本实验试图寻找某些可作为 HCC 早期筛查的血浆 miRNAs,为 HCC 的二期预防提供新的策略和方法。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例组为在某市三甲医院就诊的 HCC 患者 98 例,其中男性 72 例(73.5%),女性 26 例(26.5%),年龄 41 ± 9 岁(32~50)岁。所有患者术前均未接受放疗或化疗。TNM 分期按 2002 国际抗癌联合会(UICC) HCC 的 TNM 分期标准分为: I 期 10 例、II 期 22 例、III 期及以上 66 例。正常对照组选取同社区健康体检人员,体检合格,无肝肾等器质性病变以及其它疾病者 86 人,其中男性 59 人(68.6%),女性 27 人(31.4%),年龄 43 ± 8 岁(35~51)岁。所有样本采集前告知采集目的并获得患者同意。病例组与对照组的年龄、吸烟、饮酒等因素的分布差异均无统计学意义($P > 0.05$),见 Table 1。

Table 1 Characteristics of the HCC group and control group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Smokers(%)	Drinkers(%)	Age(years)
HCC	98	18(18.4)	14(14.3)	41 ± 9
Control	86	12(14.0)	11(12.8)	43 ± 8

Note: Age was divided into three stages (<40, 40~50 and ≥ 50 years)

1.2 仪器与试剂

总 RNA 的提取与逆转录以及 cDNA 的扩增用的主要试剂是 TRIzol LS Reagent (Invitrogen, 美国)、QiaGen miReasy Mini Kit (QIAGEN, 德国)、TapMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI, 美国)、TapMan® Universal Master Mix II, no UNG (ABI, 美国); TaqMan 低密度芯片 (TaqMan Low Density Array, TLDA) 购自美国 ABI 公司, Real-time PCR 仪购自美国 ABI 公司的 7900HT。

1.3 血样采集与血浆分离

无菌采集实验个体外周血,每管 5ml,采集的血样常温下保存不超过 1h,之后 $3500 \times g$ 离心 10min,将血浆与血细胞分离,装入 1.5ml EP 管中, -80°C 保存。

1.4 RNA 提取

从样本血浆中提取富含 miRNAs 的总 RNA,提取采用 QiaGen miReasy Mini Kit 试剂盒,具体操作按说明书进行。在此过程中加入同一终浓度(10^{-5} pmol/ μl)的人工合成线虫 39miRNA (cel-miR-39) 作为内参,用于标准化提取、逆转录及控制后续的定量检测全过程操作的样本间差异。提取后的总 RNA -80°C 保存。

1.5 TaqMan® 低密度芯片筛选

随机选取病例和对照各 5 例,对每份血浆分别进行芯片筛选。低密度芯片选用 TaqMan® Human MicroRNA Array Set v2.0,分为 A&B 两板,包含 667 个人类已知的 miRNAs 及多个内参共计 768 个 miRNA。以 cel-miR-39 做为外参,操作步骤按说明书进行。SDS2.4 和 RQ Manager 1.2 软件分析实验结果。

1.6 Real-Time PCR

根据芯片筛选结果,对较大样本进行 Real-Time PCR 验证。反应体系: TapMan® miRNA PCR Primer & probe ($20 \times$) $0.75 \mu\text{l}$, TapMan® Universal Master Mix II, no UNG $7.5 \mu\text{l}$, Nuclease-free water $5.25 \mu\text{l}$, cDNA 模板 $1.5 \mu\text{l}$ 。反应条件: 95°C , 10min; 95°C , 15s, 60°C , 1min 共 50 个循环。所有反应设立 3 个复孔,记录荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数(ct 值),以 cel-miR-39 做为外参,采用相对定量法,以 ΔCt 表示样本目的基因的表达量, $\Delta\text{Ct} = \text{样本 Ct}_{\text{miRs}} - \text{样本 Ct}_{\text{cel-miR-39}}$, ΔCt 越低说明表达量越高, SDS2.4 和 RQ Manager 1.2 软件分析实验结果。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行数据分析。miRNA 表达以 ΔCt 为计数资料,进行两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低密度芯片(TLDA)扩增结果

将 A、B 两版合并分析,以 Ct 值 ≤ 35 为有效扩增,病例组有 411 个 miRNA 扩增,对照组有 398 个 miRNA 扩增,见 Figure 1。

2.2 筛选 miRNA 标志物标准及结果

将各组有效扩增 miRNAs 的 Ct 值分别减去相应各组外参 cel-miR-39 的 Ct 值,得到 ΔCt ,将组间 ΔCt 差异的绝对值 ≥ 2 的 miRNAs 列出,进入后期的

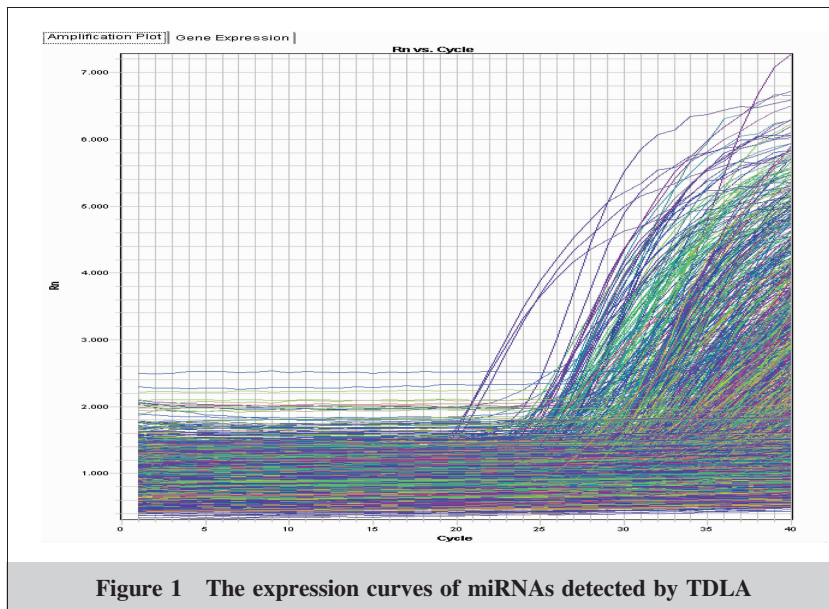


Figure 1 The expression curves of miRNAs detected by TDLA

较大样本 Real-Time PCR 验证阶段。验证结果显示有 5 个 miRNAs 在病例组中与对照组中的表达存在差异性 ($P < 0.05$), 其中, miR-21、miR-222、miR-18 在病例组中的表达量高于对照组, miR-16、miR-451a 在病例组中的表达量低于对照组。见 Table 2。

Table 2 Different miRNAs expressed in the HCC group and control group ($\Delta Ct, \bar{x} \pm s$)

miRNAs	HCC (n=82)	Control (n=82)	t	P
miR-21	5.8675 $\pm$ 1.3561	8.5214 $\pm$ 1.8956	4.12	<0.001
miR-222	6.2568 $\pm$ 2.5842	9.2354 $\pm$ 1.5627	3.77	<0.001
miR-18	9.4237 $\pm$ 2.4785	12.5862 $\pm$ 0.9852	3.95	<0.001
miR-16	13.4211 $\pm$ 1.2258	8.4251 $\pm$ 0.8625	5.23	<0.001
miR-451a	8.2358 $\pm$ 1.2372	5.2666 $\pm$ 1.1656	4.04	<0.001

Note: The lower ΔCt showed the higher expression of miRNAs

2.3 表达差异的 miRNAs 在不同期别肝癌中的表达

miR-21 在对照组、I 期、II 期、III 期及以上组中表达量存在差异性, 呈现递增趋势 ($P < 0.05$), miR-16 在对照组、I 期、II 期、III 期及以上组中表达量存在差异性并呈现递减趋势 ($P < 0.05$)。见 Table 3, Figure 2。

3 讨论

miRNAs 是一类广泛存在于生物体内、长度在

18~24 个核苷酸的内源性非编码小 RNA, 通过与目标 mRNA 特定区域不同程度的互补结合而引起后者的降解或者翻译抑制, 是包括细胞增殖、分化、凋亡以及多种系统疾病的重要调节因^[4,5]。由于肿瘤组织 miRNA 表达谱与肿瘤发病及预后相关, 因此 2008 年以前对 miRNA 的研究主要集中在组织和细胞内。但是组织和细胞内的 miRNAs 研究检测技术复杂、创伤大, 难以真正应用于临床诊断。2008 年有多个实验的研究成果^[6,7]为血浆 miRNA 作为分子标记应用于肿瘤的早期诊断和预后提供了基础。实验证明血浆中 miRNA

可以在高温、低温、高 pH 值、反复冻融、高酸等恶劣的环境中仍然保持着稳定, 是一种完美的生物学指标物的选择项。

miRNAs 在 HCC 的发生发展中扮演着重要角色。miRNAs 在 HCC 中充当原癌基因或者抑癌基因的角色, 同时也影响其它原癌基因或者抑癌基因的表达。研究表明^[8]增强 miR-122 表达可抑制肿瘤细胞的迁移、浸润和生长, 抑制裸鼠肿瘤生长、肿瘤血管形成及裸鼠肝癌移植模型的肝内转移。研究发现^[9], miR-122 单独或联合索拉非尼均可以抑制肝癌进程。Karakatsanis 等^[10]发现 miR-222 能通过诱导肿瘤坏死因子相关凋亡途径, 促进肝癌细胞的生长和转移。Teng 等^[11]发现, miR-21 能促进细胞增殖转移, 还能导致细胞周期的失调从而促进 HCC 恶化。在另外一项研究中^[12], 检测了 105 例 HCC、107 例慢性肝癌

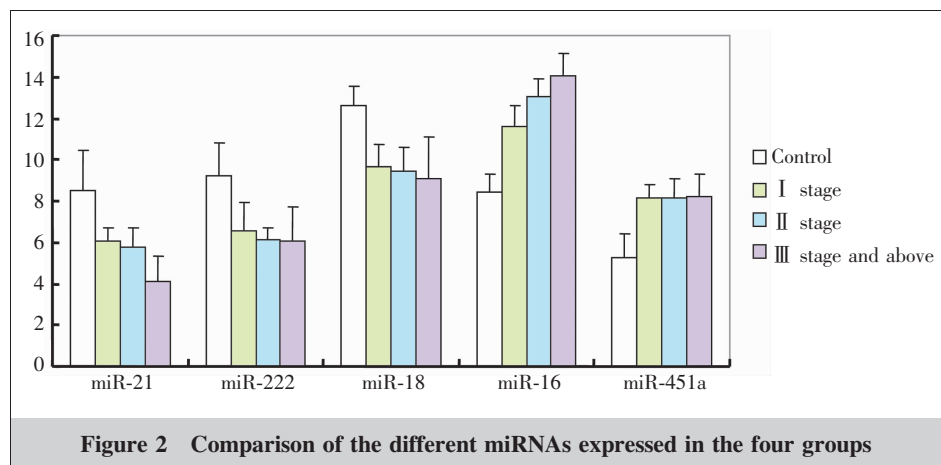


Figure 2 Comparison of the different miRNAs expressed in the four groups

Table 3 Comparison of the different miRNAs expressed in the four groups ($\Delta Ct, \bar{x} \pm s$)

Groups	miR-21	miR-222	miR-18	miR-16	miR-451a
Control	8.5214±1.8956	9.2354±1.5627	12.5862±0.9852	8.4251±0.8625	5.2666±1.1656
I stage	6.0890±0.6450a	6.5689±1.3409	9.6868±1.0478	11.5721±1.0015a	8.1554±0.6655
II stage	5.7562±0.9623ab	6.1002±0.5883	9.4072±1.1787	13.0253±0.8962ab	8.1276±0.9655
III stage and above	4.1258±1.2235abc	6.0777±1.6597	9.0483±2.0571	14.0487±1.0724abc	8.2410±1.0535
t_1	3.47	1.94	2.01	2.66	1.68
P_1	0.00	0.62	0.53	0.01	0.73
t_2	2.31	1.65	1.98	2.18	1.31
P_2	0.02	1.21	0.59	0.03	1.20
t_3	2.19	1.71	2.13	3.12	1.42
P_3	0.03	1.04	0.74	0.00	0.98

Note: t_1, P_1 : Control group Compared with I stage group; t_2, P_2 : I stage Compared with II stage; t_3, P_3 : II stage Compared with III stage.

患者和 71 例正常对照的血清 miR-1、miR-16、miR-122a、miR-199a、miR-195、miR-224、miR-139, 发现与慢性肝病、正常对照组相比, 血清 miR-16、miR-199a 在 HCC 患者中显著下降。研究还指出作为 HCC 单独的诊断标志物, miR-16 具有最高的灵敏度。

本实验用 miRNA TDLA 筛选出候选标志物, 然后用特异性高、敏感性强的 RT-qPCR 在大规模样品中进行验证。实验发现 HCC 患者血浆中有 5 个 miRNAs 水平较对照组有了显著差异, 其中 miR-21、miR-222、miR-18 在病例组中的表达量高于对照组, miR-16、miR-451a 在病例组中的表达量低于对照组。进一步分析发现 miR-21 在对照组、I 期、II 期、III 期及以上组中表达量存在差异性, 呈现递增趋势 ($P < 0.05$), miR-16 在对照组、I 期、II 期、III 期及以上组中表达量存在差异性, 呈现递减趋势 ($P < 0.05$)。miRNAs 发挥作用主要依靠基因复合体, 通过降解或抑制特定的靶 mRNA, 沉默特定的靶基因, 发挥生物学效应。我们发现的 5 个有意义的 miRNAs 可能通过调节与 HCC 生成有关的 mRNAs 而发挥生物学意义。miR-21 和 miR-16 可能左右影响 HCC 进程的 mRNA, 影响 HCC 的发展。本实验结果提示 HCC 患者的血浆 miRNAs 表达谱相较于对照组存在差异, miRNAs 可能参与了 HCC 的发生发展, miRNAs 在 HCC 中所起的功能我们将在后续的体外细胞培养等研究中加以阐述。综上所述, 血浆 miRNAs 表达的差异或许可以作为 HCC 早期筛查的血浆学分子标志物。

参考文献:

- [1] Khairy A, Hamza I, Shaker O, et al. Serum miRNA panel in egyptian patients with chronic hepatitis c related hepatocellular carcinoma [J]. Asian Pac Cancer Prev, 2016, 17(5): 2699-2703.
- [2] Mao B, Wang G. MicroRNAs involved with hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Rep, 2015, 34(6): 2811-2820.
- [3] Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 298.
- [4] Anwar SL, Lehmann U. MicroRNAs: emerging novel clinical biomarkers for hepatocellular carcinomas [J]. Clin Med, 2015, 4(8): 1631-1650.
- [5] Krauskopf J, Espín-Pérez A, Kleinjans JC, et al. Global microRNA analysis in primary hepatocyte cultures [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1250: 241-250.
- [6] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, 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.
- [7] Gailhouse L, Gomez-Santos L, Ochiya T. Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2013, 1(18): 199-223.
- [8] Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2009, 49(5): 1571-1582.
- [9] Bai S, Nasser MW, Wang B, et al. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib [J]. Biol Chem, 2009, 284(46): 32015-32027.
- [10] Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, et al. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance [J]. Mol Carcinog, 2013, 52(4): 297-303.
- [11] Teng Y, Radde BN, Litchfield LM, et al. Dehydroepiandrosterone activation of g-protein-coupled estrogen receptor rapidly stimulates microRNA-21 transcription in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Biol Chem, 2015, 290(25): 15799-15811.
- [12] Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. Clin Gastroenterol, 2011, 45(4): 355-360.