

MiR-132、miR-143、miR-638、AFP 在 104 例乙肝相关肝癌中的表达分析

Expression of miR-132, miR-143, miR-638 and AFP in 104 Cases with Hepatitis B Virus-related Hepatocellular Carcinoma // XU Bin, REN Chun-mei, PENG Si-lu, SUN Hong, XIAO Ting-ting

许斌, 任春梅, 彭思璐, 孙宏, 肖婷婷

(四川绵阳四〇四医院, 四川 绵阳 621000)

摘要: [目的] 探讨 miR-132、miR-143、miR-638、AFP 在乙肝相关肝癌中的表达及相关性。[方法] 选取乙肝相关肝癌患者 104 例, 取患者手术切除的癌组织及癌旁组织标本进行免疫组化染色, 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-132、miR-143、miR-638 表达, 酶联免疫吸附实验法检测 AFP 水平。[结果] 与癌旁组织比较, 乙肝相关肝癌组织中 miR-132、miR-638 表达较低, miR-143、AFP 表达水平较高 ($P < 0.05$)。与无淋巴结转移患者相比, 有淋巴结转移患者 miR-132、miR-638 表达水平较低, miR-143、AFP 表达水平较高 ($P < 0.05$)。与 I、II 期患者相比, III、IV 期患者 miR-132、miR-638 表达水平较低, miR-143、AFP 表达水平较高 ($P < 0.05$)。与高分化患者相比, 中分化患者 miR-132、miR-638 表达水平较低, miR-143、AFP 表达水平较高 ($P < 0.05$); 与中分化患者相比, 低分化患者 miR-132、miR-638 表达较低, miR-143、AFP 表达水平较高 ($P < 0.05$)。乙肝相关肝癌患者 miR-132 与 miR-638 表达呈正相关, miR-132 表达与 miR-143、AFP 表达呈负相关; miR-638 表达与 miR-143、AFP 表达呈负相关; miR-143 与 AFP 表达呈正相关。[结论] MiR-132、miR-143、miR-638、AFP 在乙肝相关肝癌组织中表达水平明显异常, 可能共同参与乙肝相关肝癌的发生发展。

关键词: miR-132; miR-143; miR-638; AFP; 乙肝相关肝癌

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2021)08-0682-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.08.B014

乙肝是诱发相关性肝癌的主要原因^[1]。大量临床研究表明, 我国肝癌发病原因中最常见的是乙肝, 乙肝所导致的肝癌已达 80% 以上^[2]。对乙肝相关肝癌早期病情进行评估能明显提高患者生存率。近年来用于乙肝相关肝癌诊断的肿瘤性标志物有所增加, 但仍没有一种公认度较高且可评价乙肝相关肝癌病情、疗效和预后的标志物^[3]。有学者认为, miR-132、miR-143、miR-638 在乙肝相关肝癌中表达, 且具有一定的相关性, 但支持文献较少^[4]。为研究 miR-132、miR-143、miR-638、AFP 与乙肝相关肝癌的相关性, 本研究分析 miR-132、miR-143、miR-638、AFP 在乙肝相关肝癌中的表达及相关性。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2020 年 2 月在四川绵阳四〇四医院接受治疗的乙肝相关肝癌患者 104 例, 年

龄 52~68 岁, 平均年龄 (60.2±6.6) 岁。TNM 分期包括 I 期患者 26 例, II 期患者 23 例, III 期患者 30 例, IV 期患者 25 例; 癌组织分化程度: 高分化 26 例, 中分化 34 例, 低分化 44 例。本文研究均经患者及家属知情同意, 并获得医院伦理委员会批准。

纳入标准: 所有患者均符合中华医学会中对肝癌患者的诊断标准, 合并乙肝相关^[5]。

排除标准: ①病历资料不全患者; ②患有甲、丙、丁、戊型病毒性肝炎等其他肝病; ③患有获得性免疫缺陷综合征; ④精神疾病患者; ⑤沟通障碍患者。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

取所有患者手术切除癌组织标本及距癌组织 5 cm 以上的癌旁组织, 4% 中性福尔马林固定、石蜡包埋, 厚度 3 μ m, 连续切片作免疫组化标记。

1.2.2 免疫组化染色

对待测标本进行脱蜡、水化等处理之后, 将其在 0.01 mol/L、95 $^{\circ}$ C 的枸橼酸缓冲液中浸泡, 并进行热修复, 3% H_2O_2 环境下培育 10 min, 滴入山羊血清, 26 $^{\circ}$ C 环境中培养 30 min, 抽离封闭液、添加一抗, 将其置于 5 $^{\circ}$ C 的环境中过夜培养, 次日加入二抗, 37 $^{\circ}$ C

基金项目: 四川省医学科研青年创新课题计划 (Q18008)

通信作者: 许斌, 副主任医师, 本科; 四川绵阳四〇四医院感染科, 四川省绵阳市涪城区跃进路 56 号 (621000); E-mail: 623641947@qq.com

收稿日期: 2020-11-30; **修回日期:** 2021-01-28

恒温箱中培养 30 min,清洗后进行 DAB 显色、封片。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-132、miR-143、miR-638 表达量

提取细胞总 RNA,检测 RNA 纯度、含量,逆转录处理后获得 cDNA,使用 Primer5.0 软件设计引物,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算,内参 U6。设置反转录反应条件:25 °C 10 min,40 °C 60 min,85 °C 5 min;设置扩增条件:94 °C 20 s,72 °C 30 s,60 °C 30 s,35 个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算出需要检测的 miR-132、miR-143、miR-638 表达量。MiR-132 引物序列:上游引物:5'-UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG-3',下游引物:5'-CGACCAUGGCUGUAGACUGUUA-3'。MiR-143 引物序列:上游引物:5'-GCGGCGGTGAGAGAAGCACTG-3',下游引物:5'-ATCCAGTGCAGGGTC-AGAGG-3'。MiR-638 引物序列:上游引物:5'-ATCCAGTGCCTGTCGTG-3',下游引物:5'-TGCTAGGGATCGCGGGCGG-GTG-3'。U6 引物序列:上游引物:5'-CTCGCTTCG-GCAGCACA-3',下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTT-GCGT-3'。

1.2.4 酶联免疫吸附实验法检测 FBP 水平

将血清置于室温后,标记酶标板,制作标准品,然后取出试剂盒,以 1:2 的稀释液稀释样品;在反应

孔上依次加入稀释好的待测血清和标准品 100 μ l/孔,放置 37 °C 恒温孵育箱中湿育 2 h;然后用专用的洗涤液将反应板清洗 3 次以后,再加入抗体工作液(1:100 倍稀释后)100 μ l/孔,放于 37 °C 恒温孵育箱中湿育 45 min;继续清洗反应板 4 次后,在反应孔内加入 TMB 溶液 100 μ l/孔,置于 37 °C 恒温孵育箱中湿育 45 min 后在反应孔内加入终止液 100 μ l/孔终止反应,在 450 nm 波长测定吸光度,颜色反应深浅与 FBP 水平呈正比,经绘制标准曲线计算 FBP 水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间对比行 LSD-*t* 检验,多组间比较行 *F* 检验。相关性采用 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MiR-132、miR-143、miR-638、AFP 表达水平

与癌旁组织相比,乙肝相关肝癌组织中 miR-132、miR-638 表达较低,miR-143、AFP 蛋白表达水平较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)(Table 1, Figure 1)。

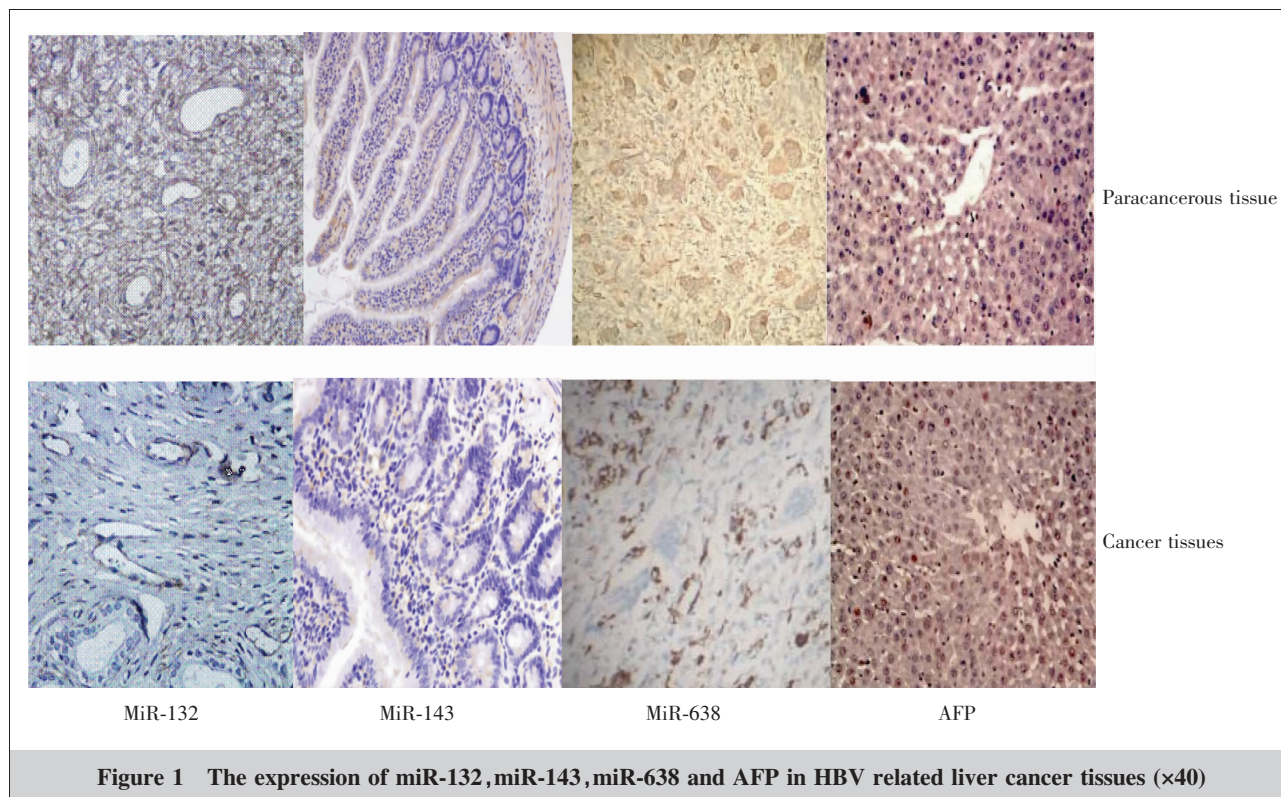


Figure 1 The expression of miR-132,miR-143,miR-638 and AFP in HBV related liver cancer tissues ($\times 40$)

2.2 MiR-132、miR-143、miR-638、AFP 蛋白表达水平与乙肝相关肝癌患者临床病理特征的关系

与无淋巴结转移患者相比,有淋巴结转移患者 miR-132、miR-638 表达较低,miR-143、AFP 蛋白表达水平较高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 I、II 期患者相比,III、IV 期患者 miR-132、miR-638 表达较低,miR-143、AFP 表达水平较高,差异有统计学意义($P<0.05$);与高分化患者相比,中分化患者 miR-132、miR-638 表达较低,miR-143、AFP 表达水平较高,差异有统计学意义($P<0.05$);与中分化患者相比,低分化患者 miR-132、miR-638 表达较低,miR-143、AFP 表达水平较高,差异有统计学意义($P<0.05$) (Table 2)。

2.3 乙肝相关肝癌中 miR-132、miR-143、miR-638、AFP 表达相关性

对乙肝相关肝癌中 miR-132、miR-143、miR-638、AFP 表达相关性进行分析,miR-132 与 miR-143 表达水平呈负相关 ($r=-0.616, P=0.001$);miR-132 与 miR-638 表达水平呈正相关 ($r=0.881, P=0.001$);miR-132 与 AFP 表达水平呈负相关 ($r=-0.516, P=0.001$);miR-143 与 miR-638 表达水平呈负相关 ($r=-0.332, P=0.001$);miR-143 与 AFP 表达水平呈正相关 ($r=0.304, P=0.001$);miR-638 与 AFP 表达水平呈负相关 ($r=-0.463, P=0.001$) (Figure 2)。

3 讨论

慢性乙肝病毒感染被认为是乙肝相关肝癌发生的重要因素,同时也是影响乙肝相关肝癌复发及不良预后的重要危险因素^[6]。导致肝癌发生的诱因包括肥胖、肝硬化、吸烟、酗酒及糖尿病。临床早期诊断对患者治疗起关键作用,

Table 1 Comparison of expression levels of miR-132, miR-143, miR-638 and AFP proteins in cancer tissues and paracancerous tissues ($\bar{x}\pm s$)

Group	N	MiR-132	MiR-143	MiR-638	AFP
Paracancerous tissue	104	1.89±0.40	1.55±0.39	0.92±0.40	6.16±1.37
Cancer tissue	104	0.68±0.12	4.47±1.17	0.53±0.11	34.86±4.53
<i>t</i>	—	29.550	24.150	9.587	61.840
<i>P</i>	—	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Table 2 Relationship of miR-132, miR-143 and miR-638 expression levels with clinicopathological characteristics of HBV related liver cancer patients ($\bar{x}\pm s$)

Clinicopathological characteristics	N	MiR-132	MiR-143	MiR-638
Lymph node metastasis				
No	45	1.52±0.36	2.84±0.92	0.81±0.35
Yes	59	0.47±0.09	9.93±1.45	0.32±0.04
<i>t</i>	—	28.860	42.100	14.180
<i>P</i>	—	<0.001	<0.001	<0.001
TNM stage				
I + II	49	1.48±0.33	2.80±0.94	0.78±0.34
III + IV	55	0.45±0.07	9.91±1.42	0.30±0.04
<i>t</i>	—	31.140	42.580	14.300
<i>P</i>	—	<0.001	<0.001	<0.001
Degree of differentiation				
Well differentiated	26	1.55±0.32	2.75±0.91	0.80±0.34
Medium differentiation	34	1.03±0.29 ^a	4.81±1.34 ^a	0.67±0.41 ^a
poorly differentiated	44	0.56±0.16 ^{ab}	8.87±2.06 ^{ab}	0.43±0.16 ^{ab}

Note: compared with high differentiation, ^a $P<0.05$; compared with medium differentiation, ^b $P<0.05$

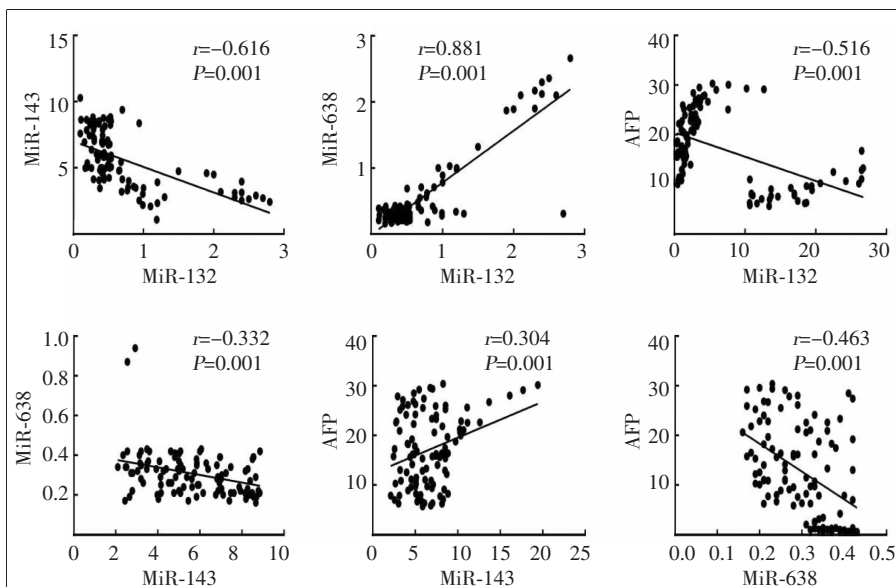


Figure 2 Correlation of miR-132, miR-143, miR-638 and AFP expression levels in HBV related liver cancer

目前临床常规治疗方法对慢性乙肝病毒复制进行激活,但 65% 左右的患者在经过根治性切除治疗后仍会出现复发及转移,相关研究显示,肿瘤复发与肝切除术后残余肝组织中的肝炎活动存在联系^[7]。

MicroRNA 属于一类非编码 RNA, 通过与靶分子 mRNA 结合对靶基因的报答发挥负性调控作用, 促进或抑制肿瘤的发生发展。在乙肝相关肝癌中 miR-132 表达下降与肝癌预后差密切相关, 同时 miR-132 对肝癌细胞增殖转移具有抑制作用^[8]。本研究结果显示, miR-132 在肝癌组织中异常低表达, 有淋巴结转移、Ⅲ~Ⅳ期、低分化患者癌组织中 miR-132 表达相对较低, 提示癌组织淋巴结转移、病理分期、分化程度等与 miR-132 表达存在一定相关性。

MiR-143 在多种人类恶性肿瘤中发挥重要作用, 不同类型肿瘤中 miR-143 表达各不相同。研究显示, miR-143 在乙肝相关肝癌中呈异常高表达, 与外周血表达一致, 且Ⅲ~Ⅳ期 miR-143 表达高于Ⅰ~Ⅱ期, 提示肝细胞乙肝病毒在乙肝相关肝癌患者体内复制强烈^[9]。本研究结果显示, miR-143 在乙肝相关肝癌中呈异常高表达, 且 miR-132 高表达在有淋巴结转移、Ⅲ~Ⅳ期、低分化组显著, 表示癌组织淋巴结转移情况、病理分期、分化程度与 miR-143 表达存在一定相关性, 推测 miR-143 表达变化可能参与乙肝相关肝癌发生发展。

程续文等^[10]研究显示, miR-638 在慢性乙肝病毒感染患者血清中显著表达差异, 提示慢性乙肝病毒的复制与 miR-638 表达有关, 并表示 miR-638 低表达水平可能对肝癌细胞增殖能力和慢性乙肝病毒复制具有抑制作用。本研究结果显示, 在乙肝相关肝癌中 miR-638 呈低表达, 且有淋巴结转移、Ⅲ~Ⅳ期、低分化患者 miR-638 达相对较低, 推测 miR-638 表达变化可能参与乙肝相关肝癌的发生发展。

AFP 表达与肝脏疾病密切相关, 正常肝组织中 AFP 不表达或低表达, 而在肝炎及肝硬化组织表达明显增高, 在肝癌中表达最高。HBV 感染是导致 AFP 在肝癌组织中高表达的重要原因^[11]。本研究结果显示, 乙肝相关肝癌中 AFP 呈异常高表达, 且有淋巴结转移、Ⅲ~Ⅳ期、低分化组织中 AFP 表达相对较高, 提示其在乙肝相关肝癌发生发展过程中可能发挥重要作用。

本研究病例数较少, 且未针对乙肝相关肝癌的危险因素分布情况进行针对性研究, 下一步研究需增加样本量, 针对乙肝相关肝癌发病危险因素分布以及对 miR-132、miR-143、miR-638、AFP 表达进行进一步对比探究。

参考文献:

- [1] Mak LY, Wong DK, Cheung KS, et al. Review article: hepatitis B core-related antigen HBcrAg: an emerging marker for chronic hepatitis B virus infection [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(1): 43-54.
- [2] Van Tong H, Van Ba N, Hoan NX, et al. Soluble fibrinogen-like protein 2 levels in patients with hepatitis B virus-related liver diseases[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 553.
- [3] Ren M, Li J, Xue R, et al. Liver function and energy metabolism in hepatocellular carcinoma developed in patients with hepatitis B-related cirrhosis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(19): e15528.
- [4] 杨启, 吕新远, 王哲. MiR-132、GPC3 在乙肝相关肝癌患者中的表达及意义[J]. *肝脏*, 2019, 24(2): 165-169.
Yang Q, Lyu XY, Wang Z. Expression and significance of miR-132 and GPC3 in patients with hepatitis B-related liver cancer[J]. *Liver*, 2019, 24(2): 165-169.
- [5] 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. 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): 145-151.
Chinese Societies of Liver Cancer, Chinese Anti-Cancer, Liver Cancer Study Group, Chinese Society of Hepatology, Chinese Societies of Pathology, Chinese Anti-Cancer. Evidence-based practice guidelines for the standardized pathological diagnosis of primary liver cancer (2015 edition)[J]. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2015, 21(3): 145-151.
- [6] Ma L, Hernandez MO, Zhao Y, et al. Tumor cell biodiversity drives microenvironmental reprogramming in liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(4): 418-430, e6.
- [7] 朱海涛. 伴肝门淋巴结转移乙肝相关性肝细胞癌患者不同疗法生存差异分析[J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43(6): 667-669.
Zhu HT. A comparison of overall survival difference of different treatment on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma with perihilar lymph node metastases[J]. *Journal of Guizhou Medical University*, 2018, 43(6): 667-669.
- [8] 任丹丹, 刘娜, 周路路, 等. 早期肝细胞癌治疗方案的选择[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(9): 2087-2091.
Ren DD, Liu N, Zhou LL, et al. Selection of treatment regimens for early-stage hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2020, 36(9): 2087-2091.
- [9] 蒋力平, 刘兵元, 张立鹏, 等. 乙肝相关肝癌患者行 TACE 术后 HBV 再激活的临床研究 [J]. *介入放射学杂志*, 2018, 27(2): 171-174.
Jiang LP, Liu BY, Zhang LP, et al. Clinical study of hepatitis B virus reactivation in patients with hepatitis B-related liver cancer after receiving transcatheter arterial chemoembolization therapy [J]. *Journal of Interventional Radiology*, 2018, 27(2): 171-174.
- [10] 程继文, 赵璞, 李娜, 等. MiR-638 用于治疗乙肝相关肝癌可能性的实验研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(14): 2173-2178.
Cheng JW, Zhao P, Li N, et al. Experimental study on the possibility of using miR-638 to treat hepatitis B-related liver cancer [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2018, 26(14): 2173-2178.
- [11] 闫晓彤, 姚明解, 关贵文, 等. 抗病毒治疗对血清 AFP 在 HBV 感染相关肝癌诊断应用中的影响 [J]. *郑州大学学报 (医学版)*, 2018, 53(5): 557-560.
Yan XT, Yao MJ, Guan GW, et al. Influence of antiviral therapy on the diagnosis of AFP for HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*, 2018, 53(5): 557-560.