

血清 miR-148a 检测作为肝癌标志物的临床价值研究

王 峰,孙慧玲,应后群,何帮顺,潘玉琴,王书奎*

(南京医科大学附属南京医院中心实验室,江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:探讨血清 miR-148a 作为肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)标志物的临床应用价值。方法:实时荧光定量 PCR 法(quantitative real time-polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测 HCC 患者血清 miR-148a 水平,并与良性肝病组以及健康对照组进行比较分析。结果:HCC 患者血清 miR-148a 水平明显低于良性肝病组及健康体检组($P < 0.001$)。ROC 曲线(receiver operating characteristic curve)结果显示 HCC 组 vs. 良性肝病组的曲线下面积(area under the curve,AUC)为 0.666,95% 置信区间(Confidence interval,CI)为 0.581~0.744,诊断灵敏度为 67.7%,特异性为 59.2%($P < 0.001$);HCC 组 vs. 健康对照组的 AUC 为 0.746,95%CI 为 0.663~0.818,诊断灵敏度为 43.6%,特异性为 96.1%($P < 0.001$)。血清 miR-148a 与 HCC 患者肿瘤大小($P=0.011$)及 TNM 分期($P < 0.001$)有关,而与其他临床参数无明显相关性($P > 0.05$)。HCC 患者术后血清 miR-148a 水平与术前相比明显升高($P=0.023$);而术后出现复发或转移的 HCC 患者其血清 miR-148a 水平明显下降,并且低于术前水平($P < 0.05$)。生存曲线分析显示血清 miR-148a 低表达的 HCC 患者其总生存率明显低于血清 miR-148a 高表达的 HCC 患者($P < 0.001$),Cox 回归分析进一步显示血清 miR-148a 可作为 HCC 预后评估的一个独立决定因子。结论:HCC 患者血清 miR-148a 明显降低,并与 HCC 病情、恶性进展及预后相关,可作为 HCC 诊断与鉴别诊断、病情评估、疗效观察及预后判断的指标。

[关键词] 肝细胞肝癌;miR-148a;血清标志物

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)02-135-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160202

Clinical value of serum miR-148a as a potential biomarker for hepatocellular carcinoma

Wang Feng,Sun Huiling,Ying Houqun,He Bangshun,Pan Yuqin,Wang Shukui*

(Central Laboratory,Nanjing First Hospital,NJMU,Nanjing 210006,China)

[Abstract] **Objective:**To explore the clinical value of serum miR-148a as a potential biomarker for hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:**Quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR)was used to investigate the levels of serum miR-148a in HCC patients,the patients with benign liver diseases and healthy volunteers were used as control groups. **Results:**Serum levels of miR-148a were significantly decreased in HCC cases than those in benign and healthy controls, $P < 0.001$. Receiver operating characteristic curve(ROC)showed that the area under the curve(AUC)in HCC group vs. benign group was 0.666,95% Confidence interval (CI),0.581-0.744;the diagnostic sensitivity was 67.7% and specificity was 59.2%, $P < 0.001$. The AUC in HCC group vs. healthy group was 0.746,95%CI,0.663~0.818;the diagnostic sensitivity was 43.6% and specificity was 96.1%, $P < 0.001$. In addition,serum miR-148a was significantly associated with tumor size($P=0.011$) and TNM stage($P < 0.001$),whereas,no significant correlation of serum miR-148a with other clinical parameters, $P > 0.05$. The level of serum miR-148a in postoperative HCC patients was significantly higher than that of preoperation, $P=0.023$. However,the level of serum miR-148a in postoperative patients with recurrence or metastasis was significantly decreased,and even lower than that of preoperative group, $P < 0.05$. Kaplan-Meier analysis demonstrated that the decreased serum miR-148a was closely correlated with shorten overall survival of HCC patients, $P < 0.001$. Besides,Cox regression model further indicated that serum miR-148a was an independent prognosis marker for HCC patients. **Conclusion:**The down-regulated serum miR-148 was related to disease condition,malignant progression and prognosis of HCC patients. Moreover,serum miR-148 might act as a potential marker for diagnosis and differential diagnosis,evaluation of disease, observation of curative effect and judgment of prognosis for HCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma;miR-148a;serum biomarker

[Acta Univ Med Nanjing,2016,36(02):135-139]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81201351,81472027)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:sk_wang@njmu.edu.cn

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 作为我国常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率呈逐年上升趋势。乙型肝炎和丙型肝炎是我国 HCC 发病的重要风险因素,由于 HCC 术后易复发和转移,是预后最差的实体恶性肿瘤之一。目前仍然缺乏有效的早期诊断和术后预测因子。尽管血清甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 作为 HCC 早期诊断的标记物已被普遍使用多年,但是它的临床诊断价值极其有限^[1-2]。因此,寻找新的有效生物标志物用于 HCC 早期诊断、疗效评估以及预后评价具有重要的临床应用价值。

microRNAs (miRNAs) 是一类由 18~25 个核苷酸构成的高度保守的内源性非编码 RNAs, 主要通过靶向结合下游 mRNA 的 3' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 调控靶基因的表达。研究表明 miRNAs 能够稳定存在于除了肿瘤组织之外的血清、尿液等多种体液中,经过反复冻融仍能保持相对稳定,与肿瘤的发生发展密切相关并具有充当肿瘤标志物的潜能^[3-5]。已报道 miR-148a 在 HCC 肿瘤组织低表达,并且与 HCC 的发生和发展密切相关^[6-9]。然而,miR-148a 在 HCC 患者血清中的表达情况尚不清楚,本研究通过检测 HCC 患者、良性肝病以及健康对照人群中血清 miR-148a 表达水平,分析其与 HCC 的临床病理特征、临床诊断和预后的关系,为 HCC 筛查及其患者肿瘤动态监测提供潜在的临床应用靶点。

1 对象和方法

1.1 对象

收集 2010 年 1 月—2011 年 12 月南京市第一医院收治的 76 例 HCC 患者外周血标本,术前未接受过放疗、化疗以及其他治疗,术后均得到病理确诊。HCC 患者详细的临床病理特征见表 1,并且每个肝癌患者进行了跟踪随访。此外选取本院同期性别和年龄相近的非肿瘤患者作为对照,其中包括良性肝病组 62 例,健康对照组 55 例。所有研究对照均签署知情同意书,该研究已获得南京市第一医院伦理委员会批准。所有研究对象均被采集静脉血 5 mL 置于分离胶真空管中,4℃条件下 1 500 g 离心 10 min,吸取上清液于 4℃ 12 000 g 继续离心 10 min,再将上清液保存于 -80℃。

超低温冰箱 (Thermo Scientific 公司,美国),超速低温离心机 (Eppendorf 公司,德国),微量分光光度计 (Thermo Scientific 公司,美国),ABI 7500 荧光

定量 PCR 仪 (ABI 公司,美国);miRNeasy Serum/Plasma Kit、miScript II RT Kit、miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen 公司,德国),逆转录引物和 PCR 引物 (上海生工)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取与逆转录

总 RNA 的提取采用 miRNA 提取试剂盒,利用分光光度计检测总 RNA 的纯度与浓度,当 $D(260\text{nm})/D(280\text{nm})$ 1.8~2.1 时则总 RNA 可以用于后续实验。将提取的总 RNA 按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录得到 cDNA。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

应用 miScript SYBR Green PCR Kit 对合成的 cDNA 进行实时定量 PCR 反应。反应条件:预变性 95℃ 10 min;95℃ 10 min,60℃ 1 min,扩增 45 个循环。以 cel-miR-39 为内参,miR-148a 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示, $\Delta\Delta\text{CT} = \text{实验组}(\alpha \text{ 目的基因} - \alpha \text{ 管家基因}) - \text{对照组}(\alpha \text{ 目的基因} - \alpha \text{ 管家基因})$ 。miR-148a 上游引物:5'-CCAGCTCAGTGCCTACAGA-3'; cel-miR-39 上游引物:5'-CCAGCTCACCGGG-TGTAAG-3'; 通用下游引物为:5'-AGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'。

1.3 统计学方法

利用 SPSS 17.0 对数据进行统计分析。miR-148a 表达水平的差异行 Kruskal-Wallis H 或 Mann-Whitney U 检验,卡方检验分析 miR-148a 表达水平与临床病理特征的相关性分析。受试者工作特征 (receiver operating characteristic curve, ROC) 曲线评估 miR-148a 在 HCC 的诊断价值,Kaplan-Meier 曲线和 Cox 回归分析用于评价各个因子对 HCC 患者预后的影响。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 miR-148a 含量检测

qRT-PCR 检测结果显示,HCC 患者血清 miR-148a 水平明显低于良性肝病组及健康体检组 ($P < 0.001$);同时良性肝病组血清 miR-148a 水平也明显低于健康体检组 ($P = 0.030$,图 1)。

2.2 血清 miR-148a 对 HCC 患者的临床诊断价值

通过构建 ROC 曲线进一步评估血清 miR-148a 水平对 HCC 患者潜在的诊断与鉴别诊断价值,图 2A 显示,HCC 组 vs. 良性肝病组的 ROC 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.666,95% 置信区间 (confidence interval, CI) 为 0.581~0.744,诊断灵敏度为 67.7%,特异性为 59.2%,约登指数 (Youden in-

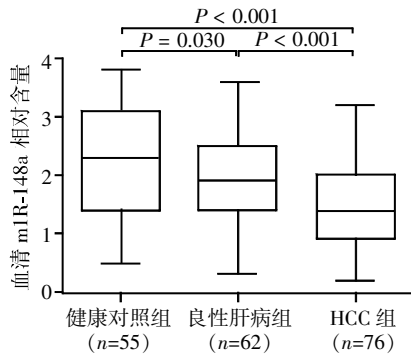


图 1 各组血清 miR-148a 含量比较

Figure 1 Comparison of serum miR-148a levels in 3 different groups

dex) 为 0.269 ($P < 0.001$)。而 HCC 组 vs. 健康对照组的 ROC 曲线下 AUC 为 0.746, 95% CI 为 0.663~0.818, 诊断灵敏度为 43.6%, 特异性为 96.1%, 约登指数为 0.397 ($P < 0.001$, 图 2B)。提示血清 miR-148a 不仅可用于诊断 HCC, 而且对良性肝脏疾病及健康体检者也具有一定的鉴别诊断价值。

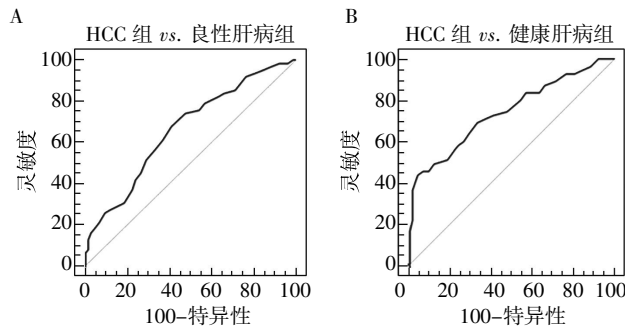


图 2 血清 miR-148a 对 HCC 患者的临床诊断价值

Figure 2 Clinical diagnostic value of serum miR-148a in HCC patients

2.3 血清 miR-148a 水平与 HCC 患者临床病理参数相关性

根据 HCC 患者血清 miR-148a 中位数水平将 HCC 组分为 2 组, 即高表达组 ($n=38$) 和低表达组 ($n=38$)。卡方检验结果显示, 血清 miR-148a 与 HCC 患者肿瘤大小 ($P=0.011$) 及 TNM 分期 ($P < 0.001$) 有关; 而与年龄、性别、是否有 HBV 感染、是否伴有肝硬化、血清 AFP 水平以及肿瘤分化程度等临床参数无明显相关性 (P 均 > 0.05 , 表 1)。

2.4 HCC 患者血清 miR-148a 动态检测的临床意义

对 28 例行外科切除手术的 HCC 患者血清 miR-148a 水平进行了动态观察, 28 例患者术后血清 miR-148a 水平明显升高, 与术前相比差异有统计学意义 ($P=0.023$)。经过进一步随访, 28 例术后患者中有 19

表 1 血清 miR-148a 与 HCC 患者临床病理参数之间相关性分析

Table 1 Correlation analyses between serum miR-148a and clinical pathological parameters in HCC patients

临床参数	例数	血清 miR-148a		P 值
		高表达[n(%)]	低表达[n(%)]	
年龄				0.359
<51 岁	38	21	17	
≥51 岁	38	17	21	
性别				0.497
男	66	32	34	
女	10	6	4	
是否 HBV 感染				0.073
阳性	55	24	31	
阴性	21	14	7	
是否伴有肝硬化				0.106
有	58	26	32	
无	18	12	6	
血清 AFP				0.081
≤200 ng/mL	23	15	8	
>200 ng/mL	53	23	30	
肿瘤大小				0.011
≤5 cm	33	22	11	
>5 cm	43	16	27	
分化程度				0.166
高+中	42	24	18	
低	34	14	20	
TNM 分期				<0.001
I + II	29	23	6	
III + IV	47	15	32	

例出现了复发或转移, 这 19 例患者血清 miR-148a 水平出现了显著降低 ($P < 0.001$), 并且低于术前水平 ($P=0.027$, 图 3)。

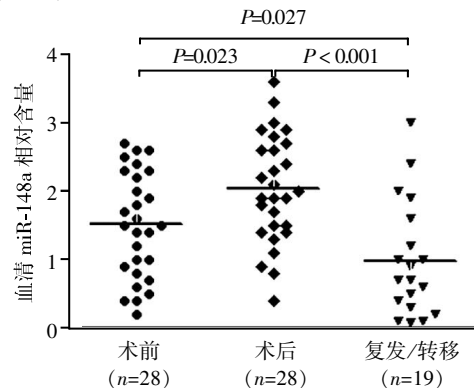


图 3 动态检测 HCC 患者血清 miR-148a 含量变化

Figure 3 Dynamic detection of serum miR-148a levels in HCC patients

2.5 血清 miR-148a 水平在 HCC 患者预后判断中的价值

根据 HCC 患者血清 miR-148a 中位数水平将 HCC 组分为 2 组,即高表达组($n=38$)和低表达组($n=38$)。Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示,血清 miR-148a 低表达的 HCC 患者其总生存率明显低于血清 miR-148a 高表达的 HCC 患者($P < 0.001$,图4)。进一步运用 Cox 回归模型评估血清 miR-148a 对 HCC 患者预后判断的潜在价值。单因素回归分析显示血清 AFP 水平($P=0.001$)、肿瘤大小($P=0.009$)、TNM 分期($P<0.001$)以及血清 miR-148a 水平($P<0.001$)与 HCC 患者的预后具有显著相关性;而年龄、性别、是否有 HBV 感染、是否伴有肝硬化、以及肿瘤分化程度等临床参数与 HCC 患者预后无明显相关性(P 均 >0.05 ,表 2)。多因素回归分析显示,仅血清 AFP 水平($P=0.017$)、TNM 分期($P=0.003$)以及血清 miR-148a 水平($P=0.030$)3 个参数可用于判断 HCC 患者的不良预后(表 2)。

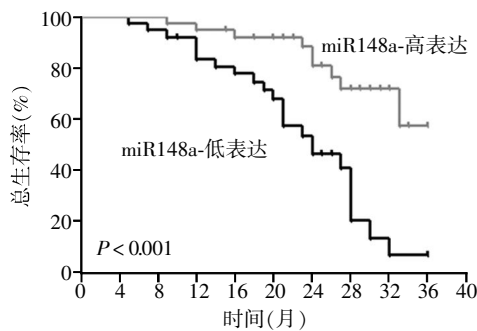


图 4 生存曲线分析血清 miR-148a 水平与 HCC 患者预后相关性

Figure 4 Survival curve analysis the relationship of serum miR-148a and prognosis in HCC patients

3 讨论

研究表明 miRNAs 参与多种细胞的生物学过程,包括细胞的凋亡、增殖和分化等。另外,miRNAs

还可以通过调控原癌基因或抑癌基因的表达参与肿瘤的发生发展过程^[10-11];这些 miRNAs 分子具有一定的组织特异性,在肿瘤的早期诊断、治疗监测以及预后评估中具有重要临床价值。miRNAs 分子不仅在肿瘤组织中异常表达,而且在体液中也呈现异常分布,包括血清、血浆、尿液、脑脊液等。外周血中 miRNAs 可稳定存在于微泡和 RNA 结合蛋白中,能够抵抗内源性的核糖核酸酶的活性。更重要的是,血标本极易获得且创伤极小,能够在体外持续稳定的监测^[12-13]。如外周血循环 miR-21、miR-375、miR-199a-3p、miR-182、miR-331-3p 等已被证实可以作为 HCC 的诊断和预后的标志物^[14-16]。因此,外周血循环 miRNAs 可以作为肿瘤的早期诊断和预后评估的一类有前途的、非侵袭性的、高度准确的候选标志物。

miR-148a 在 HCC 癌组织及多个 HCC 细胞系中普遍下调,是 HCC 发生发展中肿瘤细胞的生物学行为的重要调控子。研究发现 miR-148a 在乙型肝炎相关的 HCC 中下调,通过靶向结合造血前体 B 细胞白血病转录因子相关蛋白(HPIP)介导的 mTOR 通路抑制 HCC 细胞的生长、上皮间质转化以及转移。进一步研究显示 miR-148a 可靶向结合特异性泛素蛋白酶 4(USP4)、Met、Wnt1 和 SMAD2,分别通过 Met/Snail、Wnt 和 TGFβ-SMAD2 信号通路抑制肝癌细胞的增殖、转移、上皮间质转化以及血管生成,表明 miR-148a 可作为 HCC 一个潜在的治疗靶点^[6-9]。然而 miR-148a 在 HCC 患者循环中的表达情况仍不清楚。因此,本研究重点探讨血清 miR-148a 作为 HCC 标志物的临床应用价值。

本研究表明,HCC 患者血清 miR-148a 水平明显低于良性肝病组及健康体检组;同时良性肝病组血清 miR-148a 水平也明显低于健康体检组,该结果与在非小细胞肺癌血清中的研究结果一致^[17],提示

表 2 Cox 回归分析 HCC 患者各临床参数与预后之间的相关性

Table 2 Cox regression analyses the correlation between clinical parameters and prognosis of HCC patients

临床参数	分组	单因素分析		多因素分析	
		HR(95% CI)	P 值	HR(95% CI)	P 值
年龄	<51 岁/≥51 岁	1.264(0.617~2.589)	0.522	-	-
性别	男/女	1.322(0.642~2.725)	0.449	-	-
是否 HBV 感染	阳性/阴性	1.624(0.792~3.332)	0.186	-	-
伴有肝硬化	有/无	1.511(0.733~3.115)	0.263	-	-
血清 AFP	≤200 ng/mL/>200 ng/mL	3.305(1.611~6.779)	0.001	2.454(1.172~5.193)	0.017
肿瘤大小	≤5 cm/>5 cm	2.635(1.280~5.425)	0.009	1.617(0.784~3.338)	0.193
分化程度	高+中/低	1.962(0.946~4.070)	0.070	-	-
TNM 分期	I + II / III + IV	4.723(2.274~9.811)	0.000	3.054(1.451~6.425)	0.003
血清 miR-148a	高表达/低表达	4.110(1.979~8.537)	0.000	2.261(1.084~4.718)	0.030

血清 miR-148a 水平降低与肝脏良、恶性疾病相关,可作为肝脏疾病早期筛查的指标。ROC 曲线显示血清 miR-148a 能够很好地区分 HCC 和良性肝病、健康对照组,可以成为 HCC 新的潜在诊断标志物。

研究表明,血清 miR-148 a 水平与非小细胞肺癌的肿瘤大小、淋巴结转移以及 TNM 分期显著相关^[17]。本研究结果显示,血清 miR-148a 与 HCC 患者肿瘤大小及 TNM 分期有关;而与年龄、性别、是否有 HBV 感染、是否伴有肝硬化、血清 AFP 水平以及肿瘤分化程度等参数无关,提示血清 miR-148a 水平与 HCC 患者病情的严重程度以及恶性进展相关。此外,众多研究显示,循环 miRNAs 的动态监测有助于评估肿瘤患者的术后复发转移^[18-19]。本研究表明,HCC 患者术后血清 miR-148a 水平明显上升,而当 HCC 术后复发或转移时,血清 miR-148a 水平又明显降低。因此,动态监测血清 miR-148a 水平有助于评估 HCC 术后疗效以及预测术后的复发与转移。同时,本研究进一步评估了血清 miR-148a 在 HCC 患者中的预后价值。Kaplan-Meier 曲线分析显示,血清 miR-148a 低表达的 HCC 患者的总生存率明显低于 miR-148a 高表达的 HCC 患者。Cox 多因素分析揭示血清 miR-148a 的表达水平是 HCC 患者的一个独立的预后因子。然而,本研究对血清 miR-148a 在 HCC 的临床价值仅仅处于初步研究阶段,因此需要大样本、多中心、长期随访以及 miRNA 检测的方法学评估以进一步探讨 miR-148a 在 HCC 中的临床应用价值。

[参考文献]

[1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2013 [J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30

[2] Njei B,Rotman Y,Ditah I,et al. Emerging trends in hepatocellular carcinoma incidence and mortality[J]. Hepatology,2015,61(1):191-199

[3] Romero-Cordoba SL,Salido-Guadarrama I,Rodriguez-Dorantes M,et al. miRNA biogenesis:biological impact in the development of cancer[J]. Cancer Biol Ther,2014,15(11):1444-1455

[4] Lan H,Lu H,Wang X,et al. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer:opportunities and challenges[J]. Biomed Res Int,2015,2015:125094

[5] Khoury S,Tran N. Circulating microRNAs:potential biomarkers for common malignancies[J]. Biomark Med,2015,9(2):131-151

[6] Zhang JP,Zeng C,Xu L,et al. MicroRNA-148a suppresses the epithelial- mesenchymal transition and metastasis of hepatoma cells by targeting Met/Snail signaling [J].

Oncogene, 2014,33(31):4069-4076

[7] Heo MJ,Kim YM,Koo JH,et al. microRNA-148a dysregulation discriminates poor prognosis of hepatocellular carcinoma in association with USP4 overexpression [J]. Oncotarget,2014,5(9):2792-806

[8] Yan H,Dong X,Zhong X,et al. Inhibitions of epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cells-like properties are involved in miR-148a-mediated anti-metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Mol Carcinog,2014,53(12):960-969

[9] Jiang F,Mu J,Wang X,et al. The repressive effect of miR-148a on TGF beta-SMADs signal pathway is involved in the glabridin- induced inhibition of the cancer stem cells-like properties in hepatocellular carcinoma cells[J]. PLoS One,2014,9(5):e96698

[10] Sidhu K,Kapoor NR,Pandey V,et al. The “Macro” world of microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Front Oncol,2015,5(1):68

[11] Khare S,Zhang Q,Ibdah JA. Epigenetics of hepatocellular carcinoma;role of microRNA [J]. World J Gastroenterol,2013,19(33):5439-5445

[12] Wang WT,Chen YQ. Circulating miRNAs in cancer:from detection to therapy [J]. J Hematol Oncol,2014,7(1):86

[13] Qi J,Wang J,Katayama H,et al. Circulating microRNAs (cmRNAs)as novel potential biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. Neoplasia,2013,60(2):135-142

[14] Liao Q,Han P,Huang Y,et al. Potential role of circulating microRNA-21 for hepatocellular carcinoma diagnosis: A Meta-Analysis[J]. PLoS One,2015,10(6):e0130677

[15] Yin J,Hou P,Wu Z,et al. Circulating miR-375 and miR-199a-3p as potential biomarkers for the diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Tumour Biol,2015,36(6):4501-4507

[16] Chen L,Chu F,Cao Y,et al. Serum miR-182 and miR-331-3p as diagnostic and prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol,2015,36(10):7439-7447

[17] Yang JS,Li BJ,Lu HW,et al. Serum miR-152,miR-148a,miR-148b,and miR-21 as novel biomarkers in non-small cell lung cancer screening [J]. Tumour Biol,2015,36(4):3035-3042

[18] Le HB,Zhu WY,Chen DD,et al. Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre- and post-operative lung carcinoma patients[J]. Med Oncol,2012,29(5):3190-3197

[19] Fleming NH,Zhong J,da Silva IP,et al. Serum-based miRNAs in the prediction and detection of recurrence in melanoma patients[J]. Cancer,2015,121(1):51-59