

miR-522在肝细胞肝癌中的表达及临床意义

苗志龙¹, 施育华^{1*}, 刘小兵¹, 浦立勇²

¹盐城市第三人民医院普外科, 江苏 盐城 224001; ²南京医科大学第一附属医院普外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 探讨在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中 micro RNA-522(miR-522)表达对临床及预后的意义。方法: 收集85例肝癌组织及癌旁组织标本, 采用实时荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 miR-522在这些组织中的表达变化, 并结合临床病理资料分析该分子在肝癌中的临床意义以及对预后的影响。结果: 与癌旁组织相比, miR-522在肝癌组织中表达增高, 且 miR-522的表达与肝癌的TNM分期($P=0.005$)及肿瘤分级($P=0.009$)有关, 此外, miR-522的表达与患者的总生存率有明显的相关性。相关性分析表明 miR-522可以作为一个独立提示预后的因素。结论: 在肝细胞肝癌患者中过表达的 miR-522可能是一个与生存预后相关的生物标记物。

[关键词] 肝细胞肝癌; 微RNAs; 预后

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2018)12-1735-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20181216

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 具有高发病率及病死率, 每年约有25万患者死于肝癌^[1]。虽然越来越多的方法诊断治疗肝癌, 但肝癌的5年生存率仍然不令人满意。为了提高肝癌患者的生存率, 研究者们不断发现一些新颖的分子靶向治疗方法。微小RNA是一类非编码RNA, 参与许多基因代谢活动, 如增殖、凋亡、侵袭、转移, 也包括最原始的肿瘤发生发展进程^[2]。越来越多的证据把它在癌和抑癌复杂的基因改变联系在一起。并且, 很多研究开始注意到异常突变的小干扰RNA涉及到人类很多肿瘤进程, 也包括肝脏肿瘤^[3]。研究发现过表达的 miR-21 及 miR-183 能促进肝癌细胞的生长及侵袭^[4]。而低表达 miR-148b 在肝癌中可以表示一个不良的预后^[5]。这些研究提示 miRNA 可能在肝癌发生发展中扮演重要角色。

有学者发现 miR-522 作为一个肿瘤促进因子可以通过调控 DKK1 和 SFRP2 来实现^[6], 但到目前为止, 在肝癌中 miR-522 的预后价值仍没有相关报道, 本文主要关注它在肝细胞肝癌发生发展中的作用及其对肿瘤预后的意义。

1 对象和方法

1.1 对象

选自2008年5月—2014年7月本院接受肝细胞

[基金项目] 盐城市医学科技发展项目(YK2016061)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 1968892360@qq.com

肝癌局部解剖性切除手术治疗的肝细胞肝癌患者的肿瘤组织及远端对照正常组织(距癌组织 ≥ 5 cm)。年龄在29~78岁, 所有患者在手术前均未接受过放疗或化疗或肿瘤方面的任何治疗。共收集85例标本, 其中, 男45例, 女40例, 所有的离体标本在手术后0.5 h内立即冰封及储存在液氮装置中。根据肝细胞癌组织分类标准分别记录患者的临床病理指标, 包括性别、年龄、肿瘤分化程度、TNM分期和甲胎蛋白(AFP)水平。所有患者均签订知情同意书, 所有研究均通过伦理委员会审核。

TRIzol 试剂、PCR 扩增试剂盒(Invitrogen 公司, 美国), 2XEasyTaq PCR SuperMix(北京中山金桥生物技术有限公司), DNA marker、TBE 5X 缓冲液(上海生工生物工程有限公司), 内参 U6 及 miR-522 特异 RT-PCR 引物(华大基因科技有限公司合成)。

1.2 方法

按照试剂说明书对肝癌组织及相应癌旁正常组织进行总 RNA 提取。逆转合成 cDNA。用实时 PCR 方法定量分析小 RNA。反应条件为: 95 °C 10 s, 57 °C 20 s, 72 °C 15 s, 扩增 40 个循环。以 U6 小核 RNA 作为内参, 所有反应均设立 3 个复孔, 取平均值。记录每个反应管中的荧光信号到达所设立的阈值时所经历的循环数即 Ct 值, 以 U6 作内参, $\Delta Ct = [Ct(miR-522) - Ct(U6)]$, 分别计算肝癌组织及相应癌旁组织中的 miR-522 的相对表达量。

1.3 统计学方法

全部数据均采用SPSS19.0统计分析软件进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,肝癌组织与相应癌旁组织中表达采用配对 *t* 检验。Pearson法进行相关性分析;Kaplan-Meier法绘制患者的生存曲线,并进行log-rank检验;COX回归模型对影响患者生存的各因素进行多因素分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-522在肝细胞肝癌及癌旁组织中的表达

用RT-PCR法检测miR-522在85例肝癌及癌旁组织中的表达情况。结果显示,肝癌中miR-522的表达显著高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.01$,图1),表明在肝癌中miR-522是一个促癌基因。

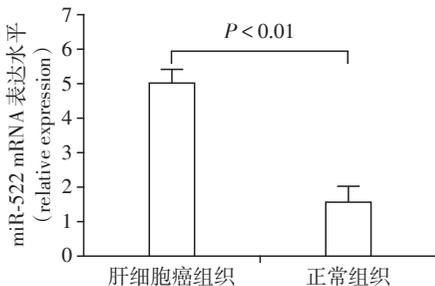


图1 miR-522在肝癌组织及癌旁组织中mRNA表达的差异性

2.2 miR-522表达与肝癌各病理参数间的关系

miR-522的表达与肝细胞肝癌各临床病理参数的关系结果见表1,统计学分析显示miR-522的表达与肝癌的TNM分期($P=0.005$)及肿瘤分级($P=0.009$)有关,肿瘤恶性程度越高miR-522的表达越多,但miR-522的表达与其他临床病理参数如患者的年龄、性别及肿瘤大小等无关。多因素分析结果显示miR-522可以表示一个独立的生存预后因子($P < 0.001$,表2)。

2.3 肝细胞肝癌中miR-522的表达与生存状况的关系

为了评估肝癌中miR-522的表达与生存状况的关系,用Kaplan-Meier方法进行计算。结果表明,miR-522的高表达组与低表达组的6年总生存率存在明显差异(图2)。

3 讨论

肝脏作为一种常见的恶性肿瘤,具有高致死率,目前我国肝癌发病率居高不下,尽管目前新的

表1 miR-522的表达与肝癌临床病理特征的关系

临床参数	例数	miR-522表达		P值
		低 ≤ 0.34	高 > 0.34	
年龄(岁)				0.963
≤ 50	39	21	18	
> 50	46	25	21	
分化程度				0.009
高	29	22	7	
中	33	16	17	
低	23	8	15	
肿瘤大小(cm)				0.473
≤ 5.0	45	26	19	
> 5.0	40	20	20	
TNM分期				0.005
I/II	38	27	11	
III/IV	47	19	28	
性别				0.305
女	40	24	16	
男	45	22	23	
AFP(ng/L)				0.554
< 400	53	30	23	
> 400	32	16	16	
6年预后				< 0.001
生存	56	39	17	
死亡	29	7	22	

表2 多因素分析不同临床病理指标对肝癌预后的意义

	危险系数	95%可信区间	P值
年龄(岁)	1.156	0.555~2.407	0.699
分化程度	3.092	1.771~5.398	0.001
TNM分期	2.606	1.112~6.106	0.027
肿瘤大小	1.822	0.872~3.806	0.110
性别	0.925	0.440~1.907	0.838
miR-522	4.331	2.082~8.701	0.001

诊断及治疗技术不断发展,但肝癌预后仍令人堪忧。miRNA是一类小分子内源性非编码RNA,广泛存在于真核细胞中,通过调控各种信号分子来调节细胞的增殖、分化、侵袭等。目前,miRNA在肿瘤的侵袭及转移中研究的比较多。有研究发现低表达的miRNA-20a在肝癌中提示一个不良的预后^[6]。Tang等^[7]研究表明miR-125a通过PI3K/AKT/mTOR信号通路来抑制肝癌细胞的迁徙及侵袭。这些研究提示miRNA很可能在肝癌的浸润转移中起重要作用,可作为潜在的治疗靶点。

miR-522是新近发现的与肿瘤相关密切的miRNA之一,其编码54种串联的miRNAs,可在正常人

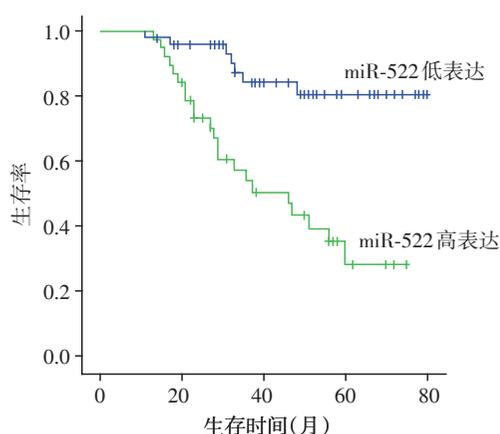


图2 miR-522表达与6年总生存率曲线

体组织中表达并促使多种肿瘤的发生。有学者发现miR-522可以通过调控DKK1和SFRP2来促进细胞增殖及肿瘤进展^[8]。并且研究已经发现在胶质细胞瘤中miR-522通过促进肿瘤细胞增殖从而影响肿瘤进展^[9]。此外,研究发现低表达的miR-522通过DENN/MADD抑制小细胞肺癌的增殖及转移^[10]。所有这些研究均提示miR-522很可能作为一个肿瘤促进因子对肿瘤发生发展起到重要作用。但到目前为止,在肝癌中miR-522的预后价值仍没有相关报道。

通过本研究,发现肝癌中miR-522的表达显著高于癌旁组织,高表达的miR-522与肝癌的TNM分期($P=0.005$)及肿瘤分级($P=0.009$)有关,Kaplan-Meier方法发现在肝癌中高表达miR-522可以表示一个不良的预后。单因素及多因素分析表明miR-522可以代表一个独立的生存预后因子。这些发现均暗示miR-522很可能在肝癌的发生发展中起重要作用,可作为潜在的提示预后的生物标记物。该研究结果仍有待扩大样本进一步研究加以验证,但为肝癌分子研究机制提供了一个潜在的靶点,下一步将进行深入分析和实验验证miR-522与其靶基因在肝癌细胞系中的效应,进一步研究miR-522在肝细胞肝癌发生、发展过程中的作用机制,为肝癌的早期诊断、治疗及预后评估提供一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] Beste LA, Ioannou GN, Yang Y, et al. Improved surveillance for hepatocellular carcinoma with a primary care-oriented clinical reminder [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2015, 13: 172-179
- [2] Zhang X, Zhang H. Diminished miR-613 expression as a novel prognostic biomarker for human ovarian cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20: 837-841
- [3] Wang WY, Zhang HF, Wang L, et al. miR-21 expression predicts prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2014, 38: 715-719
- [4] Li ZB, Li ZZ, Li L, et al. MiR-21 and miR-183 can simultaneously target SOCS6 and modulate growth and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19: 3208-3217
- [5] Zhang Z, Zheng W, Hai J. MicroRNA-148b expression is decreased in hepatocellular carcinoma and associated with prognosis [J]. *Med Oncol*, 2014, 31: 980-984
- [6] Fan MQ, Huang CB, Gu Y, et al. Decrease expression of microRNA-20a promotes cancer cell proliferation and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32: 15-21
- [7] Tang H, Li RP, Liang P, et al. miR-125a inhibits the migration and invasion of liver cancer cells via suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10: 681-686
- [8] Zhang H, Yu C, Chen M, et al. miR-522 contributes to cell proliferation of hepatocellular carcinoma by targeting DKK1 and SFRP2 [J]. *Tumour Biol*, 2016 Mar 9. [Epub ahead of print]
- [9] Zhang S, Zhang H, Zhu J, et al. MiR-522 contributes to cell proliferation of human glioblastoma cells by suppressing PHLPP1 expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 70: 164-169
- [10] Zhang T, Hu Y, Ju J, et al. Downregulation of miR-522 suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells by directly targeting DENN/MADD domain containing 2D [J]. *Sci Rep*, 2016, 19: 193416-19346

[收稿日期] 2018-05-13