

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.06.009  
文章编号: 1005-8982(2020)06-0047-05

## 肝癌患者血清 microRNA-363 水平在诊断和病情评估中的价值

杨健<sup>1</sup>, 杨超<sup>2</sup>, 李剑辉<sup>3</sup>

(1. 台州医院 肝胆胰外科, 浙江 台州 317000; 2. 台州医院 血液净化中心, 浙江 台州 317000; 3. 浙江大学医学院附属第一医院 肝胆胰外科, 浙江 杭州 310003)

**摘要: 目的** 探讨肝癌患者血清 microRNA-363 (miR-363) 水平与肝癌临床病理特征的关系及其在肝癌诊断中的价值。**方法** 选取 2016 年 1 月—2018 年 12 月台州医院肝胆胰外科收治的肝细胞肝癌患者 86 例作为肝癌组, 选取同期该院健康体检者 86 例作为对照组。RT-PCR 测定血清 miR-363 水平。**结果** 肝癌组血清 miR-363 相对表达量低于对照组 ( $P < 0.05$ ), AFP 水平高于对照组 ( $P < 0.05$ )。不同 TNM 分期、有无转移患者血清 miR-363 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。肝癌患者血清 miR-363 与 AFP 呈负相关 ( $r = -0.502, P < 0.05$ )。miR-363、AFP 及 miR-363+AFP 诊断肝癌的 ROC 曲线下面积分别为 0.742 (95% CI: 0.740, 0.747)、0.884 (95% CI: 0.881, 0.887) 和 0.938 (95% CI: 0.935, 0.941), 敏感性分别为 0.907 (95% CI: 0.876, 0.932)、0.872 (95% CI: 0.843, 0.900) 和 0.826 (95% CI: 0.796, 0.855), 特异性分别为 0.663 (95% CI: 0.643, 0.673)、0.802 (95% CI: 0.782, 0.824) 和 0.930 (95% CI: 0.903, 0.962)。**结论** 肝癌患者血清 miR-363 水平降低, 血清 miR-363 与肝癌 TNM 分期、转移关系密切, 在协助肝癌诊断中具有一定指导价值。

**关键词:** 肝肿瘤; microRNA-363/ 微 RNAs; 甲胎蛋白类

**中图分类号:** R735.7

**文献标识码:** A

## Serum miR-363 level in patients with liver cancer and its value in diagnosis and disease assessment

Jian Yang<sup>1</sup>, Chao Yang<sup>2</sup>, Jian-hui Li<sup>3</sup>

(1. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Taizhou Hospital, Taizhou, Zhejiang 317000, China; 2. Blood Purification Centre, Taizhou Hospital, Taizhou, Zhejiang 317000, China; 3. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310003, China)

**Abstract: Objective** To investigate the serum miR-363 level of liver cancer and its relationship with clinicopathological features and its value in the diagnosis of liver cancer. **Methods** From January 2016 to December 2018 in Taizhou Hospital, patients with primary liver cancer were selected as the liver cancer group, and 86 healthy subjects were selected as the control group. The serum miR-363 level was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The serum miR-363 level in the liver cancer group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and the AFP level was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). There was significant difference in the relative expression of miR-363 in different TNM stages and with or without metastasis ( $P < 0.05$ ). There were significant differences in the levels of serum miR-363 with different TNM staging and metastasis ( $P < 0.05$ ). The serum miR-363 level was negatively correlated with AFP levels in patients with liver cancer ( $r = -0.502, P < 0.05$ ). The areas under the ROC curve of miR-363, AFP, miR-363+AFP for diagnosis of liver cancer

were 0.742 (95% CI: 0.740, 0.747), 0.884 (95% CI: 0.881, 0.887) and 0.938 (95% CI: 0.935, 0.941), respectively; the sensitivities were 90.70% (95% CI: 87.56, 93.21), 87.21% (95% CI: 84.32, 90.03), 82.56% (95% CI: 0.796, 0.855); the specificities were 66.28% (95% CI: 0.643, 0.673), 80.23% (95% CI: 0.782, 0.824) and 93.02% (95% CI: 0.903, 0.962). **Conclusion** Serum miR-363 level is decreased in patients with liver cancer, and serum miR-363 has a certain guiding value in the assessment of severity and diagnosis of liver cancer.

**Keywords:** liver neoplasms; mir-363 / micrnas; alpha-fetoproteins

肝癌为常见的恶性肿瘤,全球范围内病死率较高。肝癌的早发现、早诊断对提高疗效和改善预后具有重要作用。目前临床上应用最广泛的诊断肝癌的血清学标志物为甲胎蛋白(α-fetoprotein, AFP),但单一指标的诊断敏感性和特异性有限<sup>[1]</sup>。microRNA(miRNA)为非编码小RNA,参与机体发育、新陈代谢、细胞增殖及凋亡、肿瘤发生和发展等过程。多种miRNA在肝脏中表达,miRNA表达量异常与肝癌的发生、发展关系密切。miRNA在血液中具有较高的稳定性,因此测定血清miRNA水平对肝癌的诊治具有重要价值<sup>[2]</sup>。microRNA-363(miR-363)在多种恶性肿瘤细胞中表达异常,参与多种恶性肿瘤的发生、发展过程<sup>[3-4]</sup>。但肝癌患者血清miR-363水平尚不清楚,本文拟探讨肝癌患者血清miR-363水平及其临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2016年1月—2018年12月台州医院肝胆胰外科收治的肝细胞肝癌患者86例作为肝癌组。其中,男性72例,女性14例;平均年龄(52.37±8.16)岁;平均肿瘤直径(4.65±1.24)cm;单发肿瘤37例,多发肿瘤49例;TNM分期:I期22例,II期19例,III期38例,IV期7例;有转移42例,无转移44例;腹水31例,肝硬化47例,食管胃底静脉曲张15例,门静脉高压21例。选取同期本院健康体检者86例作为对照组。其中,男性68例,女性18例;平均年龄(51.79±9.42)岁。纳入标准:①肝癌组经病理确诊为肝细胞肝癌、首次诊治;②对照组均身体健康;③患者资料完整,签署知情同意书。排除标准:①其他恶性肿瘤者;②自身免疫性疾病者;③急、慢性感染性疾病者;④严重心、肝、肾功能异常者;⑤糖尿病、高血压等慢性疾病者。两组性别、年龄比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究经台州医院伦理委员会审批通过。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 抽取患者空腹静脉血4ml,4℃、1000 r/min离心10 min,分离血清,吸出上清液置于离心管中,4℃、5000 r/min离心10 min,留取上清液

置新的离心管中,于-80℃冰箱中保存。

**1.2.2 血清 miR-363 水平测定** 从-80℃冰箱中取出血清,室温解冻,待血清完全溶解后,取200 μl至灭酶、灭菌EP管中,采用Trizol试剂提取总RNA,根据RT-PCR试剂盒(美国Sigma公司)说明书将RNA逆转录为cDNA,并置于-80℃冰箱中保存。利用NCBI数据库确定miR-363引物序列(正向引物:5'-ACAC TCCAGGTGGAATTGCACGGTGTCCA-3',反向引物:5'-TGGTGTGGTGGAGTTCG-3',长度22 bp),以U6为内参照(正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3',反向引物:5'-AAGGCTTCACGAATTTGCGT-3',长度23 bp),采用RT-PCR测定血清miR-363水平,反应条件如下:95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火60 s,共38个循环。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算血清miR-363相对表达量。

**1.2.3 血清 AFP 水平测定** 采用电化学发光法测定血清AFP水平,试剂盒购自上海羽朵生物科技有限公司。

### 1.3 诊断标准

**1.3.1 肝硬化** 肝组织病理学检查同时表现为弥漫性肝纤维化和结节形成则可诊断为肝硬化<sup>[5]</sup>。

**1.3.2 门静脉高压** ①巨脾;②血小板 $<100 \times 10^9/L$ 和/或白细胞 $<4 \times 10^9/L$ ;③门静脉宽度 $>14$  mm或脾静脉宽度 $>10$  mm;④胃镜下胃底静脉曲张或存在腹水;⑤胃镜下食管静脉曲张。符合 $\geq 2$ 项则可诊断为门静脉高压<sup>[6]</sup>。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 20.0统计软件。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用 $t$ 检验;计数资料以率(%)表示,比较用 $\chi^2$ 检验,相关性分析用Pearson法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组血清 miR-363 和 AFP 水平

两组血清miR-363相对表达量和AFP水平比较,经 $t$ 检验,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),肝癌组血清miR-363低于对照组,AFP高于对照组。见表1。

表1 两组血清 miR-363 相对表达量和 AFP 水平比较

(n=86,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-363	AFP/ (ng/ml)
对照组	1.00 ± 0.07	3.26 ± 0.24
肝癌组	0.38 ± 0.05	624.34 ± 46.31
t 值	66.838	124.307
P 值	0.000	0.000

## 2.2 不同因素患者的血清 miR-363 相对表达量比较

不同 TNM 分期、有无转移患者的血清 miR-363 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。不同年龄、性别、肿瘤直径、肿瘤个数、有无腹水、肝硬化、食管胃底静脉曲张、门静脉高压患者的 miR-363 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表2 不同因素患者的血清 miR-363 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

因素	n	miR-363	t 值	P 值	因素	n	miR-363	t 值	P 值
年龄					转移				
<60 岁	47	0.41 ± 0.10	1.932	0.057	有	42	0.33 ± 0.06	10.454	0.000
≥ 60 岁	39	0.37 ± 0.09			无	44	0.49 ± 0.08		
性别					腹水				
男	72	0.39 ± 0.12	0.877	0.383	有	31	0.36 ± 0.14	1.831	0.071
女	14	0.36 ± 0.10			无	55	0.41 ± 0.11		
肿瘤直径					肝硬化				
<5 cm	44	0.40 ± 0.11	1.929	0.057	有	47	0.37 ± 0.09	1.680	0.097
≥ 5 cm	42	0.35 ± 0.13			无	39	0.41 ± 0.13		
肿瘤个数					食管胃底静脉曲张				
单发	37	0.39 ± 0.10	1.030	0.306	有	15	0.37 ± 0.11	1.730	0.087
多发	49	0.37 ± 0.08			无	71	0.42 ± 0.10		
TNM 分期					门静脉高压				
I、II 期	41	0.51 ± 0.09	12.136	0.000	有	21	0.36 ± 0.10	1.403	0.164
III、IV 期	45	0.30 ± 0.07			无	65	0.39 ± 0.08		

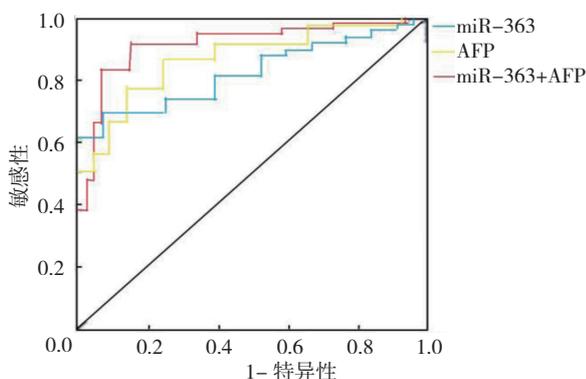


图1 miR-363、AFP 及 miR-363+AFP 诊断肝癌的 ROC 曲线

## 2.3 肝癌患者血清 miR-363 与 AFP 的相关性

Pearson 相关性分析显示, 肝癌患者血清 miR-363 与 AFP 呈负相关 ( $r = -0.502, P = 0.000$ )。

## 2.4 血清 miR-363 与 AFP 诊断肝癌的价值

血清 miR-363、AFP 分别以 0.47 和 400 ng/ml 作为临界值, 绘制 ROC 曲线。miR-363、AFP 及 miR-363+AFP 诊断肝癌的 ROC 曲线下面积分别为 0.742 (95% CI: 0.740, 0.747)、0.884 (95% CI: 0.881, 0.887) 和 0.938 (95% CI: 0.935, 0.941), 敏感性分别为 90.7% (95% CI: 0.876, 0.932)、87.2% (95% CI: 0.843, 0.900) 和 82.6% (95% CI: 0.796, 0.855), 特异性分别为 66.3% (95% CI: 0.643, 0.673)、80.2% (95% CI: 0.782, 0.824) 和 93.0% (95% CI: 0.903, 0.962)。见图 1。

## 3 讨论

肝细胞肝癌起病隐匿、恶性程度高, 早期诊断及手术切除是延长患者生存期的关键。影像学检查是发现肝癌的重要方法, 但多数影像学检查发现的肝癌已为晚期, 错过手术机会。除了影像学方法外, 血清 AFP 水平在肝癌的辅助诊断中也具有重要价值, 但单一 AFP 对肝癌的诊断效率有限, 有部分早期肝癌患者被漏诊, 因此探讨肝癌的其他血清学诊断标志物具有重要价值<sup>[7]</sup>。

miRNA 在人类基因调控中发挥重要作用, 某个

miRNA 的变化可引起数百个靶基因表达水平异常,并可引起转录组基因表达谱的改变<sup>[8]</sup>。转录基因表达谱的改变在多种疾病的发生、发展中发挥重要作用,多种恶性肿瘤的发生可能与 miRNA 表达谱的改变有关<sup>[9]</sup>。肝脏组织含有丰富的 miRNA,肝脏中的 miRNA 可通过病毒颗粒分泌、外泌体分泌、凋亡及坏死等过程释放进入外周血中,引起血液循环中 miRNA 水平异常。因外周血中 miRNA 表达相对稳定,因此血清 miRNA 在早期肝癌的诊断中具有指导价值<sup>[10]</sup>。

miR-363 为 miRNA 的一种,具有广泛生物学效应,在多种恶性肿瘤细胞中表达异常,参与多种恶性肿瘤的发生、发展过程<sup>[11]</sup>。如 miR-363 可影响喉癌细胞增殖、侵袭和凋亡<sup>[12]</sup>; miR-363-3p 通过靶向丙酮酸脱氢酶 B 调节胶质瘤细胞生长和侵袭<sup>[13]</sup>; miR-363 通过调节上皮-间质转化抑制上皮性卵巢癌的顺铂化学抗性<sup>[14]</sup>; miR-363 可调节肝细胞肝癌奥沙利铂耐药性<sup>[15]</sup>; miR-363 可作为结直肠癌的诊断标志物<sup>[16]</sup>。miR-363 在肝癌中的作用也受到大家关注,如姜哲等<sup>[17]</sup>研究发现 miR-363 可通过靶向调控 E2F3 影响肝癌细胞 HepG2 的增殖和凋亡。胡建军等<sup>[18]</sup>研究发现肝癌 HepG2 细胞中 miR-363 水平下调,过表达 miR-363 可抑制 HepG2 细胞活力并诱导其凋亡,由此推测 miR-363 在肝癌发生、发展中可能发挥重要作用。介于 miRNA 在外周血中相对稳定,外周血中 miR-363 水平及其意义也受到大家关注。QI 等<sup>[19]</sup>研究发现,水痘患者血清 miR-363 水平异常,血清 miR-363 水平可用作诊断水痘-带状疱疹病毒感染的生物标志物。AFAF 等<sup>[20]</sup>研究发现,慢性淋巴细胞白血病患者血清 miR-363 水平升高。目前 miR-363 在肝癌中的作用主要限于细胞水平研究,肝癌患者血清 miR-363 水平尚不清楚。本文研究发现肝癌患者血清 miR-363 水平降低,血清 miR-363 与肝癌 TNM 分期、有无转移有关。血清 miR-363 与 AFP 相比,诊断肝癌的敏感性较高,但特异性较低。miR-363 在多种恶性肿瘤中表达异常,本研究发现 miR-363 在肝癌诊断中的特异性低,故 miR-363 单独诊断肝癌价值有限,但血清 miR-363 与 AFP 联合可显著提高 AFP 对肝癌的诊断价值,可见血清 miR-363 水平在评估肝癌严重程度中具有一定价值。考虑过表达 miR-363 可以抑制肝癌细胞增殖,诱导肝癌细胞凋亡,当 miR-363 水平下降时,其对肝癌细胞增殖的抑制作用及对肝癌细胞凋亡的诱导作用下降,从而促进肝癌细胞增殖,抑制肝癌细胞凋

亡。本研究结果发现,低水平 miR-363 可能促进肝癌细胞增殖,抑制肝癌细胞凋亡,从而诱导肝癌的发生、发展。

综上所述,肝癌患者血清 miR-363 水平降低,检测血清 miR-363 水平在评估肝癌严重程度和辅助肝癌诊断中具有一定价值。

#### 参 考 文 献:

- [1] SCHERBER P R, GÄBELEIN G, EISELE R M, et al. Early stage liver cancer: hepatocellular carcinoma[J]. *Chirurg*, 2018, 89(4): 281-288.
- [2] WANG F, WANG J, JU L, et al. Diagnostic and prognostic potential of serum miR-132/212 cluster in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Clin Biochem*, 2018, 55(5): 576-582.
- [3] WANG K, YAN L, LU F. miR-363-3p inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion via targeting SOX4[J]. *Oncol Res*, 2019, 27(2): 157-163.
- [4] MOHAMED Z, HASSAN MK, OKASHA S, et al. miR-363 confers taxane resistance in ovarian cancer by targeting the Hippo pathway member, LATS2[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(53): 30053-30065.
- [5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. *中华传染病杂志*, 2001, 19(1): 56-62.
- [6] BAYRAKTAR Y, BALKANCI F, UZUNALIMOGLU B, et al. Is portal hypertension due to liver cirrhosis a major factor in the development of portal hypertensive gastropathy[J]. *Am J Gastroenterol*, 1996, 91(3): 554-558.
- [7] CONG W M, BU H, CHEN J, et al. Practice guidelines for the pathological diagnosis of primary liver cancer: 2015 update[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(42): 9279-9287.
- [8] BHARALI D, JEBUR H B, BAISHYA D, et al. Expression analysis of serum microRNA-34a and microRNA-183 in hepatocellular carcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(9): 2561-2568.
- [9] MOSHIRI F, SALVI A, GRAMANTIERI L, et al. Circulating miR-106b-3p, miR-101-3p and miR-1246 as diagnostic biomarkers of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(20): 15350-15364.
- [10] HU X Y, LI L, WU H T, et al. Serum miR-130b level, an ideal marker for monitoring the recurrence and prognosis of primary hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation treatment[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(10): 1655-1660.
- [11] LI W, FAN X, ZHANG M, et al. Systematic analysis of hsa-miR-363 gene overexpression pattern in endometrial stromal cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5): 2793-2800.
- [12] FENG W T, YAO R, XU L J, et al. Effect of miR-363 on the proliferation, invasion and apoptosis of laryngeal cancer by targeting Mcl-1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(14): 4564-4572.
- [13] XU D X, GUO J J, ZHU G Y, et al. miR-363-3p modulates cell growth and invasion in glioma by directly targeting pyruvate dehydrogenase B[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16):

- 5230-5239.
- [14] CAO L, WAN Q, LI F, et al. miR-363 inhibits cisplatin chemoresistance of epithelial ovarian cancer by regulating snail-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *BMB Rep*, 2018, 51(9): 456-461.
- [15] HUANG H, CHEN J, DING C M, et al. LncRNA NR2F1-AS1 regulates hepatocellular carcinoma oxaliplatin resistance by targeting ABCC1 via miR-363[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(6): 3238-3245.
- [16] 徐学虎, 吴小兵, 伍尚标, 等. miR-490-5p 和 miR-363 作为结肠直肠癌诊断标记的研究 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2014, 17(1): 45-50.
- [17] 姜哲, 舒敏, 王媛媛, 等. miR-363 靶向调控 E2F3 表达影响 HepG2 细胞增殖和凋亡研究 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2018, 21(6): 825-828.
- [18] 胡建军, 郑华荣, 郑耀红, 等. miR-363 下调 HepG2 细胞 Mcl-1 蛋白的表达并诱导其凋亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(7): 1329-1333.
- [19] QI Y, ZHU Z, SHI Z, et al. Dysregulated microRNA expression in serum of non-vaccinated children with varicella[J]. *Viruses*, 2014, 6(4): 1823-1836.
- [20] AFAF A, DANIEL B, DENA R H, et al. An increased fraction of circulating miR-363 and miR-16 is particle bound in patients with chronic lymphocytic leukaemia as compared to normal subjects[J]. *BMC Research Notes*, 2018, 11(1): 280-286.

(李科 编辑)

本文引用格式: 杨健, 杨超, 李剑辉. 肝癌患者血清 microRNA-363 水平在诊断和病情评估中的价值 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(6): 47-51.