

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.06.012

文章编号: 1005-8982(2017)06-0059-06

MicroRNA-223 表达与肝癌根治性 切除术预后的相关性

王云雀¹, 黄湘壹²

(1. 武汉理工大学 校医院, 湖北 武汉 430070; 2. 南华大学附属第二医院, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 识别可以作为肝癌根治性切除术患者预后标志物的 microRNA (miRNA) 分子。**方法** 利用 miRNA 微阵列方法对 2 例原发性肝癌及对应的肺转移性肝癌进行 miRNA 表达分析。将原发性和转移性肝癌中表达量有 2 倍差异的 miRNAs 作为候选 miRNAs 分子。在 miRNA 验证过程中, 运用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分析 37 例肝癌及相应癌旁非肿瘤组织中候选 miRNAs 分子的表达, 并将其与患者的临床病理特征及生存情况进行相关性分析。**结果** 最终选取 8 种 miRNAs (miR-27b, 122, 142-5p, 196a, 223, 590-5p, 630 及 944) 作为候选 miRNA。只有 miR-223 表达水平与肿瘤分期、有丝分裂指数相关。将肝癌患者分为 miR-223 高表达组 (25 例) 和 miR-223 低表达组 (12 例) 后发现, miR-223 高表达与较高 T 分期、淋巴结转移、较高有丝分裂指数及较高 Ki-67 阳性指数相关。此外, miR-223 高表达还与总体生存率和无病存活率下降相关 ($P < 0.05$), 中位随访时间 37.9 个月 [疾病复发危险比为 16.267 (95%CI: 1.732, 153.789) $P = 0.015$]。**结论** 肝癌组织中 miR-223 异常表达与肝癌患者治疗结束后发生复发转移, 以及无病生存时间和总生存率有关, 通过检测肿瘤组织中 miR-223 qRT-PCR 反应有可能预测患者预后。

关键词: 肝癌; microRNA; microRNA-223

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Value of miRNA-223 expression in predicting outcome of hepatocellular carcinoma after radical therapy

Yun-que Wang¹, Xiang-yi Huang²

(1. School Hospital, Wuhan University of Technology, Wuhan, Hubei 430070, China; 2. The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To identify miRNAs that could be potential prognostic biomarkers of hepatocellular carcinoma in patients who underwent radical resection. **Methods** For miRNA target screening, 2 primary HCC and the corresponding liver metastases were screened for miRNA expression by the miRNA Chip analysis. Candidate miRNAs were selected by more than 2-fold difference of expression between metastatic and primary tumors. For miRNA target validation, qRT-PCR was performed for candidate miRNAs on 37 HCC and the matched paracancerous non-tumor tissues, and the correlations of the miRNA levels with the clinicopathological features and survival were analyzed. **Results** Eight miRNAs (miRNA-27b, 122, 142-5p, 196a, 223, 590-5p, 630, and 944) were selected as candidate miRNAs. Only miR-223 level was significantly associated with tumor stage and mitotic count. When the HCC patients were stratified into high (25 cases) and low (12 cases) miRNA-223 expression groups, high miRNA-223 expression was associated with advanced T stage, lymphatic metastasis, higher mitotic counts, and higher Ki-67-labeling index. In addition, high miRNA-223 expression was associated with decreased overall survival and tumor-free survival ($P < 0.05$) during a median followup of 37.9 months [the hazard ratio for recurrence = 16.267 (95% CI: 1.732, 153.789), $P = 0.015$]. **Conclusions** High miRNA-

收稿日期: 2016-08-02

[通信作者] 黄湘壹, E-mail: 417354749@qq.com; Tel: 13786494910

223 expression has a significant relation with poor outcome of patients with HCC.

Keywords: hepatocellular carcinoma; microRNA; miR-223

肝癌是全球常见的一种高发病率和高致死率的消化道恶性肿瘤^[1]。据 2012 年全球肿瘤流行病学统计数据显示,全世界每年新发癌症患者约 1 410 万例,每年死于癌症的患者约 820 万人,其中肝癌新发患者 >100 万,每年约有 80 万例患者死于肝癌,占癌症死亡率的 9.1%,5 年生存率 <50%,已上升至癌症致死原因的第 2 位,仅次于肺癌 160 万,19.4%)^[2]。寻找和发现有效的预测指标,对高危复发的患者进行有效的个体化治疗,降低复发率,是提高肝癌治疗效果的关键,也是肝癌研究的热点。因此,研发新的肝癌生物标志物有助于肝癌预后预测和进一步促进肝癌精准治疗的发展。

MicroRNA (miRNA) 是一系列高度保守非编码 RNA,通过调节多种基因的表达发挥效应。近年来有研究发现,癌症组织中的 miRNA 表达异于正常组织,很多 miRNA 具有致肿瘤活性或肿瘤抑制活性^[3-4]。例如,FRANCESCA 等^[5]研究表明,肝癌 miR-519d 表达变化可能与不良临床结果相关,能够作为肝癌独立预后生物标志物。LING 等^[6]认为,上调 miR-210 能增强肝癌细胞系 HepG2 的增殖和黏附。本研究表明,miRNA 在肝癌发生、发展中发挥重要作用,可以作为肝癌诊断的生物标志物。本研究旨在寻找和发现可以作为肝癌根治性切除术患者预后标志物的新 miRNAs 分子。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2010 年 1 月 - 2012 年 12 月南华大学附属第二医院普外科接受根治性切除术的肝癌患者 37 例,患者中位年龄 57.2±13.3 岁。其中,男性 25 例,女性 12 例。28 例患者发生淋巴结转移。

1.2 研究步骤

本研究分 2 步进行:① 差异 miRNA 筛选;② 差异 miRNA 验证。为筛选差异 miRNA,本研究选择 2 例肺转移的肝癌患者,2 例患者接受肝癌和肺转移癌的切除手术,收集肝癌和肺转移癌手术切除标本,miRNA 表达微阵列检测两组组织标本中 miRNA 的表达差异。用原发性和转移性肿瘤中表达差异 >2 倍的 miRNA 作为候选预后差异 miRNA。随后采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time

polymerase chain reaction, qRT-PCR) 验证 37 例接受根治性治疗的肝癌患者肝癌组织中候选 miRNA 的表达。所有患者接受定期随访,直至死亡或随访结束 (2015 年 12 月)。平均随访时间 34.3 个月 (11~52 个月)。患者定期接受身体检查,如有必要进行 CT 扫描。总生存期指手术至死亡间隔。

1.3 肝癌组织总 RNA 提取

采用 miRNA 提取试剂盒 mirVana RNA Isolation Kit 分别提取肝癌组织和肺转移癌组织标本总 RNA,具体操作方法按说明书进行。用生化分析仪 2100 Bioanalyzer 定量,琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的完整性。

1.4 miRNA 表达微阵列检测

对从原发性肝癌组织 (Cy5 标记) 和肝癌肺转移组织 (Cy3 标记) 中获得 RNA 样本的 2 个实验重复进行杂交实验。使用激光扫描仪获得杂交图像,并使用 Array-Pro 图像分析软件进行数字化。首先消除背景感染,然后使用 LOWESS 过滤器对信号进行归一化,对数据进行分析。筛选表达差异 >2 倍的 miRNA。

1.5 qRT-PCR 验证差异 miRNA 在肝癌组织中的表达

总 RNA 反转录后的第 1 链 cDNA 为模板,进行聚合酶链反应扩增。95℃ 预变性 20 s,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 20 s,70℃ 延伸 10 s,共 40 个循环,以 U6snRNA 作为内参,绘制扩增融解图,将样本 miRNA 与 U6snRNA 基因含量的差值作为评价 miRNAs 相对表达水平的指标,据公式 $\Delta Ct = [Ct(miRNA)] - [Ct(U6snRNA)]$,取 ΔCt 的均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 为检测结果。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选肝癌预后标志物的候选 miRNAs 分子

miRNA 差异分析显示,原发性肝癌和肝癌肺转移性组织中 18 种 miR 表达。miR-122、485-3p、711 及 944 在肝癌肝转移性组织中的表达量是原发性肝

癌中的 2 倍甚至更多;而 miR- 27b、14- 5p、196a、206、223、320c、38- 5p、449c、590- 5p、630、1 293、1 978、2 116 及 2 277 在肝肝癌肝转移性组织中的表达量比原发性肝癌减少 ≥ 2 倍。18 种 miRNA 中,笔者选取 miR- 27b、122、142- 5p、196a、223、590- 5p、630 及 944 进一步分析。见图 1。

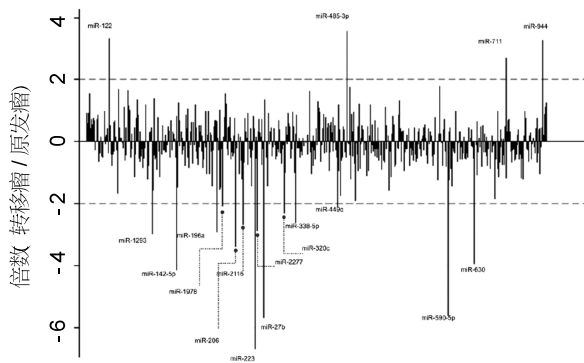


图 1 肝癌肺转移瘤和原发瘤中 miRNA 表达差异

2.2 验证候选 miRNAs 分子作为肝癌的预后标志物

随访期期间 6 例患者 (16.2%) 发生肝癌复发。采用 qRT-PCR 分析 8 种 miRNAs 在 37 例肝癌及相应癌旁非肿瘤肝样本中的表达水平,并分析其表达与临床病理特点的相关性。miR- 223 的表达水平在临床分期 III 期、淋巴结转移、TNM 分期更高、有丝分裂

指数高 (每 10 个高倍镜视野 >2)、Ki- 67 阳性指数高 (3%) 及复发患者中增高 ($P < 0.05$)。miR- 142- 5p 的表达水平在有丝分裂指数高患者中也升高 ($P < 0.05$)。miR- 27b 表达水平在不同有丝分裂指数和是否复发患者中比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见附表和图 2、3。

2.3 miRNA-223 作为肝癌预后标志物价值的分析

本研究利用受试者工作特征分析 miR- 223、27b 及 142- 5p 作为预测肝癌根治治疗后复发指标的潜能,结果发现,肝癌组织中 miR- 223 表达水平能识别肝癌复发患者 [曲线下面积 area under curve, AUC) = 0.833 (95%CI : 0.658, 1.000) , $P = 0.011$]。其中 miR- 196a 相对表达量的临界值是 1.279,敏感性和特异性分别是 83.3%和 83.9%。本研究还发现,肝癌组织中 miR- 27b 的表达水平也能区分肝癌复发患者 [AUC=0.747 (95%CI : 0.516, 0.978) , $P = 0.058$] , 临界值是 0.378。而 miR- 142- 5p 不能有效识别肝癌复发患者 [AUC=0.543 (95%CI : 0.227, 0.859) , $P = 0.742$]。将 miR- 223 表达水平临界值设为 1.279,依此把患者分为 miR- 223 高表达组 (25 例) 和低表达组 (12 例)。miR- 223 高表达组患者组织学分级、有丝分裂指数、Ki67 阳性指数、发生血管淋巴管浸润的频率、TNM 分期和临床分期均高于低表达组 ($P < 0.05$)。除此之

附表 不同影响因素间 miR-27b、122、142-5p、196a、223、590-5p、630 及 944 在肝癌组织表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

影响因素	miR- 27b	t 值	P 值	miR- 122	t 值	P 值	miR- 142- 5p	t 值	P 值	miR- 223	t 值	P 值
临床分期												
I、II (n=14)	0.232± 0.036			0.365± 0.046			0.643± 0.152			0.285± 0.058		
III、IV	1.000± 0.188	0.834	0.163	0.569± 0.171	0.698	0.461	0.672± 0.208	0.609	0.614	2.707± 0.932	5.278	0.004
淋巴结转移												
否 (n=9)	0.238± 0.056			0.378± 0.152			0.598± 0.178			0.405± 0.123		
是 (n=28)	0.327± 0.134	0.671	0.497	0.267± 0.115	0.659	0.537	0.801± 0.276	0.708	0.434	2.605± 0.743	0.881	0.080
TNM 分期												
I、II (n=21)	0.238± 0.063			0.372± 0.112			0.598± 0.228			0.279± 0.192		
III、IV (n=16)	0.690± 0.224	0.798	0.260	0.442± 0.124	0.269	0.912	0.801± 0.265	0.745	0.356	2.605± 0.449	6.355	0.002
有丝分裂指数												
< 2 (n=30)	0.235± 0.065			0.375± 0.249			0.533± 0.162			0.347± 0.133		
≥ 2 (n=7)	0.707± 0.139	0.871	0.092	0.315± 0.139	0.580	0.642	1.866± 0.872	0.898	0.040	2.707± 0.599	1.796	0.012
Ki67 指数												
< 3 (n=30)	0.247± 0.061			0.455± 0.162			0.598± 0.174			0.405± 0.192		
≥ 3 (n=7)	0.253± 0.117	0.079	0.987	0.199± 0.164	0.094	0.105	0.799± 0.204	0.688	0.475	1.217± 0.302	0.872	0.108
复发												
是 (n=6)	0.744± 0.254			0.442± 0.162			0.801± 0.254			3.037± 0.821		
否 (n=31)	0.233± 0.063	0.895	0.058	0.372± 0.102	0.642	0.564	0.598± 0.173	0.506	0.742	0.405± 0.127	2.175	0.011

续附表

影响因素	miR- 196a	t 值	P 值	miR- 590- 5p	t 值	P 值	miR- 630	t 值	P 值	miR- 944	t 值	P 值
临床分期												
I、II(n=14)	1.061± .486	0.834	0.163	0.114± 0.078	0.096	0.985	0.365± 0.138	0.701	0.449	3.286± 1.303	0.660	0.535
III、IV(n=23)	0.743± 0.178			0.122± 0.040			0.600± 0.108			3.912± 1.016		
淋巴结转移												
否 n=9)	0.988± 0.431	0.771	0.303	0.101± 0.061	0.506	0.742	0.536± 0.159	0.801	0.257	4.001± 1.832	0.755	0.343
是 n=28)	0.525± 0.156			0.210± 0.082			0.304± 0.170			0.944± 0.188		
TNM 分期												
I、II(n=21)	1.048± 0.542	0.782	0.285	0.101± 0.069	0.608	0.618	0.312± 0.125	0.711	0.428	3.333± 1.143	0.430	0.883
III、IV(n=16)	0.787± 0.292			0.124± 0.061			0.592± 0.284			2.931± 0.175		
有丝分裂指数												
< 2 n=30)	0.923± 0.648	0.645	0.561	0.111± 0.064	0.586	0.628	0.477± 0.149	0.569	0.656	3.285± 1.281	0.433	0.877
≥ 2 n=7)	0.835± 0.567			0.126± 0.055			0.345± 0.116			3.912± 1.687		
Ki6 指数												
< 3 n=30)	1.048± 0.372	0.881	0.080	0.097± 0.021	0.698	0.465	0.536± 0.184	0.699	0.455	2.018± 0.739	0.611	0.604
≥ 3 n=7)	0.253± 0.196			0.141± 0.065			0.328± 0.103			4.085± 0.925		
复发												
是 n=6)	0.525± 0.122	0.733	0.387	0.210± 0.039	0.701	0.446	0.896± 0.206	0.718	0.422	2.539± 0.826	0.349	0.902
否 n=31)	0.988± 0.442			0.101± 0.011			0.418± 0.184			3.333± 1.386		

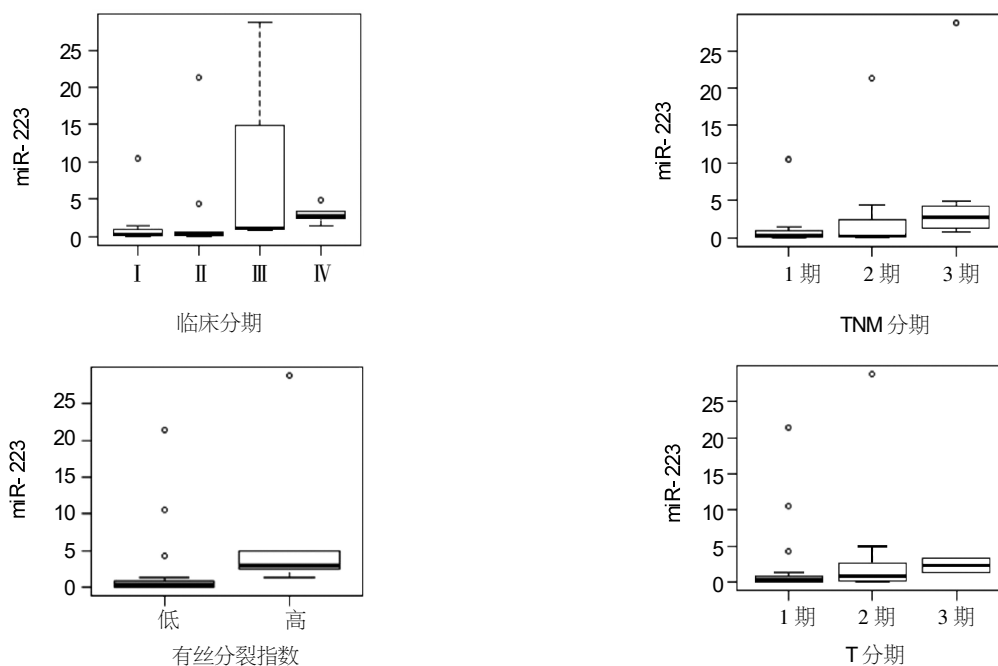


图 2 miR-223 表达与肝癌患者临床病理特征的关系

外,miR- 223 高表达组患者无病生存率 (disease-free survival,DFS) 和总生存率 (overall survival,OS) 低于低表达组 (DFS 分别为 38.9%和 95.5%;OS 分别为 90.0%和 100%, $P=0.000$ 和 0.046)。尽管 miR- 27b 高表达组 OS 小于低表达组 ($P=0.016$),但是 miR- 27b

高表达组的 DFS 与低表达组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。miR- 142- 5p 表达水平高患者和表达水平低患者的 OS、DFS 比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。Cox 回归分析显示,miR- 223 高表达组患者复发率 单变量分析 $HR=20299$,多变量分析 $HR=16267$)。

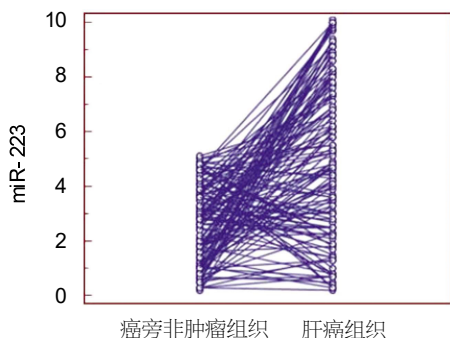


图 3 miR-223 在癌旁非肿瘤组织和肝癌组织中的表达

单变量分析和多变量分析 (HR=7.637 和 6.697) 显示, miR- 27b 高表达组复发率与低表达组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。正如预期所示, 临床分期、TNM 分期是 DFS 和 OS 的重要的预测因素, 高临床分期 ($P=0.000$) 和高 TNM 分期 ($P=0.000$) 患者 DFS 较低, 同样高临床分期 ($P=0.000$) 和高 TNM 分期 ($P=0.020$) 患者 OS 较低。见附表和图 4。

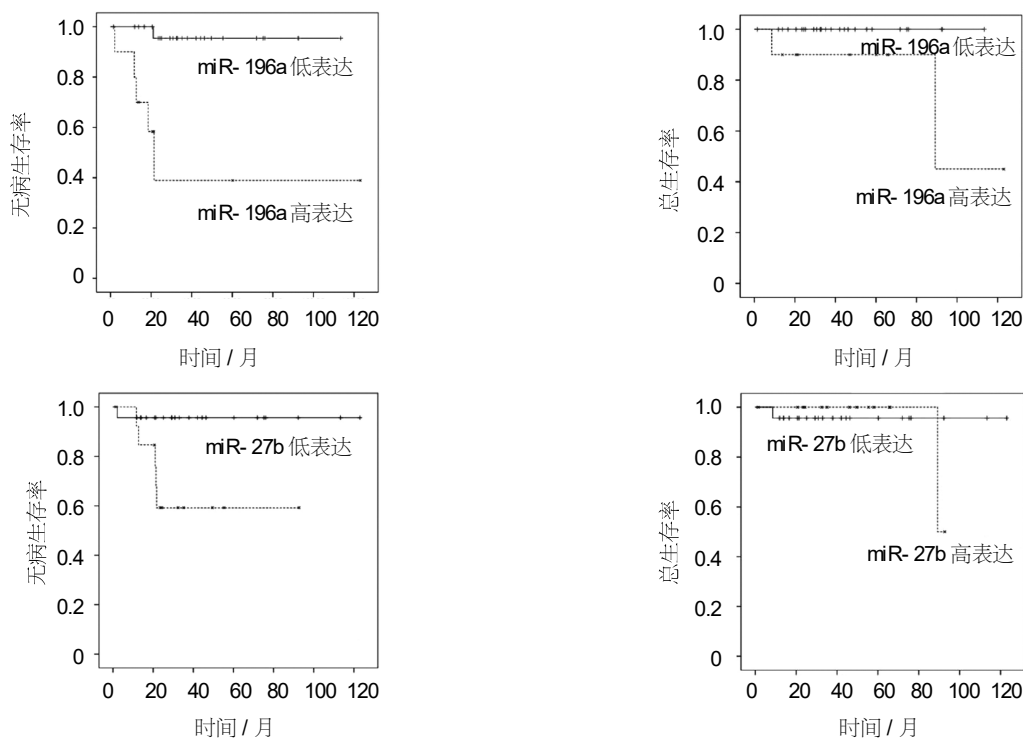


图 4 卡普兰 Meier 曲线分析 miR-223 和 27b 表达对 37 例肝癌患者 OS、DFS 表达的影响

3 讨论

手术切除一直以来是肝癌的首选治疗手段,也是肝癌患者获得长期生存的最主要治疗手段。但是,除肿瘤分级和 TNM 分期以外,肝癌的有效预后指标很少;且寻找新的预后标志物有利于对该临床上和生物学上具有异质性的肿瘤进行分层。本研究发现,组织中 miR- 223 的表达水平可以作为预测肝癌患者复发和生存的标志物。过去一段时间内,表观遗传学研究越来越得到关注;其中 miRNAs 由于表达十分稳定,且比较容易在血清/血浆,以及新鲜的和石蜡包埋的组织中检测出,得到学者们的青睐,大量研究探讨 miRNA 作为多种肿瘤标志物和治疗靶点的潜力。研究报道,肝癌中会发生多种 miRNAs 表达水

平的上升或下降,包括 miRNA- 21、34、146a、155、196a- 2、200a/b 及 1290^[5-9]。但是,关于 miRNAs 对肝癌诊断和预后价值的研究不多见。

迄今为止,关于肝癌的研究已经发现 miR- 21、642 及 193b 的高表达与肝癌细胞增殖活性和转移性增强有关^[7]。本研究发现,miR- 223 表达水平增高与肿瘤分级升高(也就是 Ki- 67 增殖活性增高和有丝分裂指数增高)、肿瘤分期升高和其它侵袭性表现有关(例如淋巴管血管浸润和淋巴结转移)。此外,miR- 223 高表达组患者 5 年 DFS 和 OS 降低。上述结果表明,miR- 223 可以作为根治性治疗术后肝癌的预后标志物。据笔者所能查阅到的文献,本研究是首次通过长期跟踪随访肝癌患者,分析 miR- 223a 对肝

癌患者的预后判断价值。

近期有研究报道,miRNA-223 的功能,miR-223 高水平能促进细胞生长和抗凋亡能力^[9];且 miR-223 能促进胃癌细胞的迁移和远处转移,根蛋白是其直接的作用靶点^[9]。miR-223 与同源异型 (Homeobox, HOX) 簇有互补性,并能抑制目标 HOX 基因,包括 HOXB8、HOXD8 及 HOXA7^[10]。此外,miR-223 还在胰腺癌细胞的增殖和上皮间质转化过程中发挥重要作用,其可能的作用靶点是核因子 κ B 抑制剂^[11]。研究发现,miR-223 具有作为多种疾病预后和诊断标志物的潜能,包括家族性和散发型肿瘤和胰腺导管内乳头状瘤^[12-13]。比如,血清 miR-223 水平能够预测胰腺导管腺癌的存活率下降,胰液中 miR-223 的水平升高对肠型胰腺导管内乳头状瘤有预测作用^[14]。

本研究发现,miR-223 高表达与肝癌侵袭性行为 and 预后较差有关;但是本研究中筛选部分实验发现,肝转移性肝癌中 miR-196a 表达水平比原发性肝癌低,似乎与预期不相符,未来还需要进一步深入研究。本实验没有研究转移性肝癌中 miR-223 的表达水平。有趣的是,肝转移性肝癌中 miR-27b 与 miR-142-5p-2 miRNAs 表达水平比较,差异无统计学意义;但这 2 种 miRNAs 表达水平也与侵袭性行为有关 (高分期、有丝分裂指数、Ki-67 阳性指数和高复发频率)。此外,本实验通过对原发性肝癌及相应的肝转移肝癌进行核糖核酸-荧光原位杂交分析发现,肝转移肝癌的 miR-196a 表达水平低于原发性肝癌。尽管还需要功能性研究的进一步验证,但是笔者可以推断,虽然 miR-223 的表达与肝癌的侵袭性行为 (包括浸润和转移) 相关,但是一旦肿瘤发生转移,其表达会受到抑制,这有可能是因为新的肿瘤微环境作用。

总之,本研究发现,组织中 miR-223 表达水平有可能作为判断根治性治疗后肝癌复发的预测指标,但是未来还需要大样本量研究进一步证实。

参 考 文 献:

- [1] YANG H I, LU S N, LIAW Y F, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma[J]. *New England Journal of Medicine*, 2002, 347(3): 168-174.
- [2] FARAZI P A, DEPINHO R A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(9): 674-687.
- [3] FRANCESCA F, MADDALENA M, PASQUALE C, et al. In hepatocellular carcinoma miR-519d, is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3, and TIMP2[J]. *Journal of Pathology*, 2012, 227(3): 275-285.
- [4] LING X U, WANG F, WEI W, et al. Effects of hypoxia on the expressions of hypoxia-inducible factor-1 alpha and miR-210 in hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. *Tumor*, 2011, 31(6): 502-507.
- [5] DAMANIA P, SEN B, DAR S B, et al. Hepatitis B virus induces cell proliferation via HBx-induced microRNA-21 in hepatocellular carcinoma by targeting programmed cell death protein 4 (PDCD4) and phosphatase and tensin homologue (PTEN)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): DOI: 10.1371/journal.pone.0091745.
- [6] SUN O Y, CHUN S M, HAN E H, et al. Deregulated expression of microRNA-221 with the potential for prognostic biomarkers in surgically resected hepatocellular carcinoma[J]. *Human Pathology*, 2011, 42(10): 1391-1400.
- [7] MAO K, ZHANG J, HE C, et al. Restoration of miR-193b sensitizes hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma to sorafenib[J]. *Cancer Letters*, 2014, 352(2): 245-252.
- [8] YU J, ANG L, HONG S M, et al. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasms (PanINs)[J]. *Nature*, 2012, 18(4): 109-112.
- [9] LI X, ZHANG Y, ZHANG H, et al. miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3[J]. *Molecular Cancer Research* MCR, 2011, 9(7): 824-833.
- [10] LI X, ZHANG Y, ZHANG H, et al. miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3[J]. *Molecular Cancer Research*, 2011, 9(7): 824-833.
- [11] MA J, CHENG L, LIU H, et al. Genistein down-regulates miR-223 expression in pancreatic cancer cells [J]. *Current Drug Targets*, 2013, 14(10): 1150-1156.
- [12] WU L, LI H, JIA C Y, et al. MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(7): 1038-1043.
- [13] LI S, LI Z, GUO F, et al. miR-223 regulates migration and invasion by targeting artemin in human esophageal carcinoma[J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 24.
- [14] KANG W, TONG J H M, CHAN A W H, et al. Stathmin1 plays oncogenic role and is a target of microRNA-223 in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): DOI: 10.1371/journal.pone.0033919.

(童颖丹 编辑)