

• 肿瘤介入 Tumor intervention •

肝细胞癌患者 TACE 术前后血清 miR-21 表达变化及临床意义

王以浪, 王亚非, 张亮, 缪亚军, 陈卓, 周陈, 印滇, 丁文彬

【摘要】 目的 探讨 HCC 患者经皮肝动脉化疗栓塞(TACE)术前、后血清 miR-21 表达变化及临床意义。**方法** 以反转录定量 PCR(RT-PCR)法检测 HCC 患者 TACE 术前、后及正常者血清 miR-21 水平, 以酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 AFP 水平。**结果** HCC 患者血清 miR-21 水平为正常人的 (12.9 ± 3.5) 倍($t = 19.4307, P < 0.01$), TACE 术后 1 个月为正常参考值的 (7.2 ± 1.7) 倍, 较术前显著降低($t = 9.4937, P < 0.01$)。血清 miR-21 水平与肿瘤大小、癌栓及 HBV 感染相关。TACE 术后 1 个月血清 miR-21 水平在部分缓解、稳定和进展组中分别为正常人的 (4.0 ± 0.3) 、 (6.0 ± 1.5) 和 (8.6 ± 1.5) 倍, 各组间差异有统计学意义($F = 38.168, P = 0.000$)。miR-21 诊断 HCC 的 ROC-AUC 值为 0.910 ± 0.041 , 显著高于 AFP 的 0.860 ± 0.037 ($t = 6.3042, P < 0.01$)。miR-21 检测 HCC 的特异度(88.1%)显著高于 AFP(69.0%, $\chi^2 = 4.5253, P = 0.033$)。**结论** TACE 术后 miR-21 水平明显降低, 能较好预测 TACE 术疗效, 是 HCC 的潜在分子标记物。

【关键词】 肝细胞癌; 经导管动脉化疗栓塞术; miRNA-21; 血清

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2014)-05-0406-05

The changes of serum miR-21 expression level in patients with HCC before and after TACE and its clinical significance WANG Yi-lang, WANG Ya-fei, ZHANG Liang, MIAO Ya-jun, CHEN Zhuo, ZHOU Chen, YIN Dian, DING Wen-bin. The First People's Hospital of Nantong, Natong, Jiangsu Province 226001, China

Corresponding author: DING Wen-bin, E-mail: oncowang@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of serum miR-21 expression level in patients with HCC before and after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) and to discuss its clinical significance. **Methods** Before and after TACE the levels of serum miR-21 in 42 patients with HCC and 42 healthy subjects were determined by reverse transcriptase quantitative PCR (RT-PCR), and the levels of serum AFP were also estimated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results were analyzed. **Results** The serum miR-21 level in patients with HCC was (12.9 ± 3.5) times of that in normal subjects($t = 19.4307, P < 0.01$). One month after TACE, the serum miR-21 level became (7.2 ± 1.7) times of that of normal reference value, which was remarkably lower than that obtained before the treatment ($t = 9.4937, P < 0.01$). The serum miR-21 level was closely correlated with the tumor size, the presence of tumor thrombus and HBV infection. One month after TACE the serum miR-21 levels in patient groups showing partial response, stable disease and progressive disease were (4.0 ± 0.3) , (6.0 ± 1.5) and (8.6 ± 1.5) times, respectively, of that of normal reference value, and statistically significant difference existed between each other among the three groups ($F = 38.168, P = 0.000$). ROC-AUC value of MiR-21 in diagnosing HCC was 0.910 ± 0.041 , which was significantly higher than that of AFP ($0.860 \pm 0.037, t = 6.3042, P < 0.01$). The specificity of miR-21 in detecting HCC was 88.1%, which was remarkably higher than that of AFP (69%, $\chi^2 = 4.5253, P = 0.033$).

Conclusion After TACE the serum MiR-21 level in HCC patients is significantly decreased, which is very helpful in predicting the therapeutic efficacy of TACE. Therefore, MiR-21 can be regarded as a

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2014.05.009

作者单位: 226001 江苏南通 南通市第一人民医院肿瘤科(王以浪、王亚非、张亮、缪亚军、印滇),介入科(陈卓、周陈、丁文彬)

通信作者: 丁文彬 E-mail: oncowang@163.com

potential molecular marker of HCC. (J Intervent Radiol, 2014, 23: 406-410)

[Key words] hepatocellular carcinoma; transcatheter arterial chemoembolization; miRNA-21; serum

肝细胞癌(HCC)进展快,临床症状隐匿,诊断时病程多在晚期,丧失手术机会^[1]。经导管选择性肝动脉化疗栓塞(TACE)是晚期 HCC 的首选疗法^[2-3]。

AFP 是 HCC 介入治疗术后疗效评估及监测复发、转移的常用标志物,但存在部分假阴性^[4]。寻找特异性标记物是 HCC 诊断的研究热点^[5-6]。微小RNA(miRNA)是一类非编码单链小 RNA 分子,通过多种途径抑制靶基因 mRNA 的表达,与肝癌、前列腺癌及肠癌等多种肿瘤相关。其在外周血中可稳定存在,易被 PCR 法检测^[7-9]。microRNA-21(miR-21)通过调节靶基因表达,参与 HCC 的发生、发展、复发、转移和耐药等过程^[10-11]。本文以反转录定量 PCR 法分析 HCC 患者 TACE 术前、后血清 miR-21 表达变化及与 HCC 病理学特征关系,并探讨其对 HCC 诊断及 TACE 术后疗效评估的价值。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2009 年 1 月—2012 年 12 月我院诊治的 HCC 患者 42 例,其中男 34 例,女 8 例;年龄为 35 ~ 74 岁,平均(53 ± 9)岁。所有患者诊断符合《原发性肝癌规范化诊治专家共识》^[12]。肿瘤直径 ≥ 5 cm 32 例, < 5 cm 10 例(多发肿瘤统计最大者直径);伴有门静脉及分支癌栓 34 例,无癌栓 8 例。AFP ≥ 400 μg/L 16 例, < 400 μg/L 26 例。HBsAg 阳性 36 例,阴性 6 例。纳入标准:初治患者,无手术切除指征,未接受化疗、放疗以及分子靶向治疗;无 TACE 禁忌,肝功能 Child-Pugh A ~ B 级;总病灶占肝脏体积 < 70%,门静脉主干通畅。介入治疗术中碘化油乳剂为:表阿霉素 60 mg、奥沙利铂 50 mg 联合碘化油混成乳剂(用量根据肿瘤大小及血供情况,总量不超过 30 ml)。TACE 时将导管超选择插入肝固有动脉以远的肿瘤供血动脉,栓入碘化油乳剂。收集 42 例我院门诊正常体检者血清标本作为正常对照组。

1.2 方法

1.2.1 血清 miR-21 反转录定量 PCR 法检测 抽取不同时期患者静脉血各 5 ml,加入含有 EDTA 试管中。离心,抽提总 RNA(美国 Molecular Research Cente 公司)。合成第一链 cDNA(以色列 Fermentas

公司)。miR-21 和 miR-16 反转录定量 PCR 引物由上海英骏生物公司合成(表 1)。采用 EzOmics™ 一步实时反转录定量 PCR 法检测血清 miRNA(百奥迈科生物技术有限公司)。反转录定量 PCR 反应体系:50 ng RNA, qPCR 混合物 12.5 μl, miRNA-21 反转录引物(10 μmol/L)0.5 μl, miRNA-21 正、反向引物各 0.5 μl(10 μmol/L), RNA 酶抑制剂,加 ddH₂O 至 25 μl。每个样本进行 3 次检测取平均数。以 miR-16 为内参照基因, miR-21 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算^[8]。该方法是目的基因与内参基因的 Ct 值比较后(ΔCt),再将 HCC 组与正常组比较($\Delta\Delta Ct$)。 $\Delta Ct = (Ct \text{ miR-21} - Ct \text{ miR-16})$, $\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ miR-21} - Ct \text{ miR-16})_{\text{HCC}} - (Ct \text{ miR-21} - Ct \text{ miR-16})_{\text{正常人}}]$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的数值反映血清 miR-21 相对于正常人血清水平的倍数(定量 PCR 扩增仪、凝胶成像分析仪和核酸蛋白分析仪购自美国 Bio-Rad 公司)。

表 1 反转录定量 PCR 引物序列

名称	引物序列
miR-21	反转录引物: 5'-CTCAACTGCTGCTGGAGTCGGCAAT-T-CAGTTGAGTCAACATC-3'
	正向引物: 5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGAC-T-GA-3'
	反向引物: 5'-TGCTGCTCGTGGAGTCG-3'
miR-16	正向引物: 5'-CTTTGAGATTGTAGCCTGTACTGA-3
	反向引物: 5'-GCCAGCTGACTGCAACACCACTA-3'

1.2.2 ELISA 法血清 AFP 定量检测 ELISA 操作按说明书进行,用自动酶联仪在 450 nm 波长测量各孔的 A 值。绘制标准曲线,计算各样品中 AFP 的浓度。

1.2.3 疗效评价方法 所有患者均在术前 1 周内和治疗后 4 周于本院接受 CT(Siemens sensation 64 排螺旋 CT)或 MR(Siemens symphony 3.0 T)多期扫描。用 RECIST 标准评价 HCC 治疗后反应。包括完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、进展(PD)和稳定(SD)。CR 指所有靶病灶消失,PR 指靶病灶最大径总和缩小 30% 以上,PD 指靶病灶最大径总和增加 20% 以上和(或)有新病灶出现,SD 指病灶变化介于 PD 和 PR 之间。

1.3 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数行 *t* 检验,多样本均数先行方差齐性检验,方差相等时行单因素方差分

析。两样本率的比较采用 χ^2 检验。以受试者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)比较 miR-21 和 AFP 对 HCC 的诊断价值。检验水准取 $P = 0.05$ 。

2 结果

2.1 RNA 质量检测及反转录定量 PCR 扩增

提取外周血总 RNA,用紫外分光光度计进行浓度和纯度检测,所测 A 值均在 1.8 ~ 2.0 之间。经 1% 琼脂糖凝胶电泳证实 RNA 各条带显示清晰,合成第一链 cDNA,以特异性引物对 miR-21 和 miR-16 进行实时荧光定量 PCR 反应,其扩增曲线见图 1。

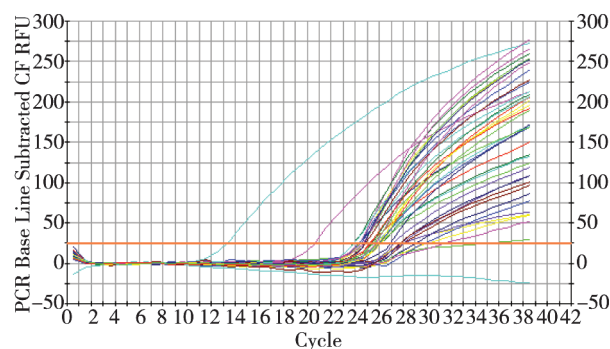


图 1 反转录定量 PCR 扩增曲线

2.2 正常人群和 HCC 患者血清 miR-21 水平比较

各组血清 miR-21 水平见表 2。HCC 患者血清 miR-21 水平为正常人群的 (12.9 ± 3.5) 倍, TACE 术后 1 周血清 miR-21 水平较术前升高, 术后 1 个月较术前降低。

表 2 正常人群和 HCC 患者血清 miR-21 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

标志	正常对照组 ($n = 42$)	HCC 组 ($n = 42$)		
		术前 1 d	术后 1 周	术后 1 个月
miR-21 Ct	27.3 ± 3.1	23.3 ± 2.4	23.1 ± 2.4	24.7 ± 2.9
miR-16 Ct	24.6 ± 2.4	24.3 ± 2.2	24.4 ± 2.6	23.6 ± 2.2
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1.1 ± 1.8^a	12.9 ± 3.5	17.1 ± 6.7^b	7.2 ± 1.7^c

注:与 TACE 术前 1 d 组比, $^a: t = 19.430$ 7, $P < 0.001$; $^b: t = 3.600$ 8, $P < 0.001$; $^c: t = 9.493$ 7, $P < 0.001$

2.3 HCC 患者血清 miR-21 水平与临床特征关系分析

对 miR-21 表达与临床特征分析显示(见表 3), miR-21 表达与肿瘤大小、有无癌栓及 HBV 感染相关,与肿瘤数目、AFP 水平无相关性。

2.4 HCC 患者 TACE 术后 miR-21 水平 ($\bar{x} \pm s$) 与近期疗效关系

HCC 患者介入术后 1 个月行 CT 或 MRI 检查,以 RECIST 标准评价 HCC 患者介入术后近期疗效,见表 4。各组间 miR-21 水平差异有统计学意义, miR-21 水平随疗效改善而降低。

表 3 HCC 患者血清 miR-21 水平与临床特征分析 ($\bar{x} \pm s$)

参数	例数	miR-21 Ct	miR-16 Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
肿瘤数目				
单发	10	23.4 ± 2.4	24.3 ± 2.5	12.9 ± 3.1^a
多发	32	23.2 ± 2.2	24.3 ± 2.0	14.9 ± 4.2
肿瘤直径/cm				
≥ 5	32	23.1 ± 2.1	24.3 ± 2.2	16.0 ± 3.7^b
< 5	10	23.7 ± 2.3	24.2 ± 2.6	9.8 ± 2.9
癌栓				
有	34	23.1 ± 1.9	24.5 ± 2.3	18.4 ± 4.9^c
无	8	23.9 ± 2.6	24.1 ± 2.5	8.0 ± 2.6
AFP/($\mu\text{g/L}$)				
≥ 400	16	23.4 ± 2.0	24.4 ± 2.1	13.9 ± 3.3^d
< 400	26	23.1 ± 2.3	24.2 ± 1.9	14.9 ± 4.5
HBsAg				
阳性	36	23.0 ± 2.2	24.4 ± 2.4	18.3 ± 4.4^e
阴性	6	23.9 ± 2.5	24.0 ± 2.1	7.5 ± 2.1

注: $^a: t = 1.387$ 4, $P = 0.173$ 0; $^b: t = 4.840$ 1, $P = 0.000$ 0; $^c: t = 5.776$ 6, $P = 0.000$ 0; $^d: t = 0.783$ 4, $P = 0.438$ 0; $^e: t = 5.856$ 2, $P = 0.000$ 0

表 4 TACE 术后 miR-21 水平与近期疗效关系 ($\bar{x} \pm s$)

疗效(n)	miR-21 水平
PR(9)	4.1 ± 0.3
SD(8)	6.0 ± 1.5
PD(25)	8.6 ± 1.5

注: $F = 38.168$, $P = 0.000$

2.5 HCC 患者血 miR-21 与 AFP 检测 ROC 曲线下面积(AUC)比较

以正常人群血清的 miR-21 与 AFP 表达水平为对照组,绘制 ROC 曲线(图 2)。miR-21 ROC AUC 为 0.910 ± 0.041 , 显著高于 AFP 的 0.860 ± 0.037 ($t = 6.304$ 2, $P < 0.01$)。

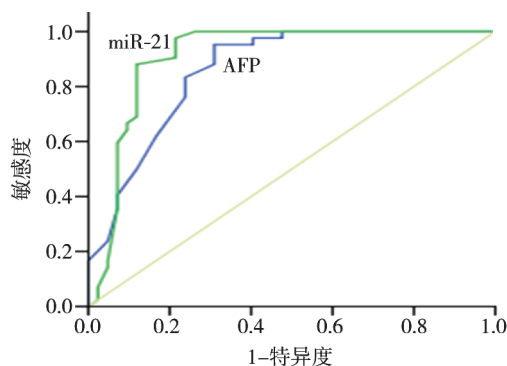


图 2 miR-21 与 AFP 的 ROC

2.6 miR-21 与 AFP 诊断 HCC 的灵敏度和特异度比较

取以正常人群为对照的 ROC 曲线约登指数最大点,确定 miR-21 和 AFP 诊断 HCC 的最佳临界值分别为 4.95 倍和 $13.5 \mu\text{g/L}$ 。两者诊断 HCC 灵敏度及特异度见表 5。

3 讨论

近来多项研究表明外周血 miRNA 可以作为恶

表 5 miR-21 与 AFP 诊断 HCC 的灵敏度和特异性比较

组别	灵敏度/%	特异度/%	约登指数/%
miR-21	83.3(34/42) ^a	88.1(37/42) ^b	71.4
AFP	95.2(40/42)	69.0(30/42)	64.2

与 AFP 组比, ^a: $\chi^2 = 0.3111$ 1, $P = 0.078$; ^b: $\chi^2 = 4.525$ 3, $P = 0.033$

性肿瘤的标记物,为研究肿瘤发病机制、早期诊断、临床疗效评估及监测复发、转移提供了重要工具。

miRNA 是一类非编码的微小 RNA, 其与靶基因 mRNA 3'非编码区的碱基互补配对结合,通过多种途径影响靶基因的表达而发挥生理、病理作用。其主要作用方式有:抑制 mRNA 翻译;促使多聚核糖体脱落,抑制蛋白翻译延伸;募集蛋白酶降解翻译中的蛋白;促进 mRNA 降解^[13]。miR-21 靶基因包括数种抑癌基因,如 p53、PTEN/AKT 信号通路、RAS 信号通路、FasL 和 TPM1 等,miR-21 可抑制靶基因表达,参与肿瘤细胞增殖、细胞周期调控、凋亡和侵袭转移,起着癌基因的作用^[14-15]。

miRNA 在外周血中可以稳定存在,耐 RNA 酶降解,易被定量 PCR 等方法检测到。本研究显示 HCC 患者外周血中 miR-21 水平明显高于正常人群,具有较高的诊断价值。有研究表明 miR-21 在 HCC 组织中的水平是癌旁组织的近 3 倍^[16]。本文检测 miR-21 表达水平相对较高可能与两项研究标本分别是外周血及病理组织有关,此外,欧美国家 HCC 病因常见为 HCV 感染及酒精性脂肪肝等,而我国多为 HBV 感染。

AFP 作为临床最常用的 HCC 标记物,具有较高的灵敏度,但也存在 30%左右的假阴性,此外慢性 HBV 患者及生殖系肿瘤患者 AFP 常增高,导致了部分假阳性。本文研究显示 HCC 患者 miR-21 表达与 AFP 无明显相关性,miR-21 ROC AUC 为 0.910,显著高于 AFP 的 0.860。miR-21 和 AFP 诊断 HCC 的最佳临界值分别为 4.95 和 13.5 $\mu\text{g/L}$,此时两者检测 HCC 均具有较高灵敏度(83.3%和 95.2%),而特异度分别为 88.1%和 69.0%,miR-21 明显高于 AFP。可见 miR-21 可与 AFP 在 HCC 诊断中起到互补作用,提高诊断准确率。

本研究显示 HBsAg 阳性者外周血 miR-21 水平较 HBsAg 阴性者显著增高。我国 HCC 患者 90%以上为 HBV 相关性 HCC,HBx 蛋白在 HBV 诱发 HCC 形成过程中扮演了重要的作用^[17-18]。HBx 通过上调 miR-21 抑制凋亡基因表达,促进 HCC 形成^[19]。此外,我们研究还发现肿瘤越大及伴有门静脉癌栓者,其血清 miRNA-21 水平越高。可能与肿瘤负荷高,HCC 细胞内成熟的 miR-21 被脂蛋白或脂质包

被成外切酶体,主动分泌至胞外进入外周血液循环有关。

TACE 术后 1 周外周血 miR-21 水平较术前增高,有研究表明 TACE 术后 7 ~ 10 d 出现 HCC 病灶明显坏死,坏死 HCC 细胞内成熟的 miR-21 大量释放到外周血中,致血 miR-21 水平明显升高。TACE 术后 1 个月 miR-21 较术前显著降低,可能为 HCC 病灶 TACE 术后 HCC 细胞负荷减少,致外周血 miR-21 水平下降有关。提示 TACE 术后检测患者血清 miR-21 来评估治疗效果时间窗应该在 1 个月。分析外周血 miR-21 水平与近期疗效关系显示,miR-21 水平随 HCC 病灶缩小、减少而降低,提示其可以作为 TACE 术疗效监测指标。

综上所述,本研究显示 HCC 患者外周血 miR-21 水平明显增高,与 HBV 感染、肿瘤大小及门脉癌栓相关,与 AFP 在诊断 HCC 中有互补作用,TACE 术后 miR-21 水平明显降低,能较好预测 TACE 术疗效,可作为临床诊断、治疗 HCC 的潜在分子标记物。

[参考文献]

- [1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2012, 142: 1264 - 1273.e1.
- [2] 程永德,程英升,颜志平. 常见恶性肿瘤介入治疗指南[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [3] 高 嵩,朱 旭,杨仁杰,等. TACE 联合奥沙利铂、氟尿嘧啶、亚叶酸钙肝动脉化疗治疗中晚期原发性肝癌 [J]. 介入放射学杂志, 2012, 21: 377 - 383.
- [4] 梁茂全,苏洪英. 肝癌化疗栓塞前后甲胎蛋白变化模式的临床意义[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21: 333 - 338.
- [5] Wang X, Zhang A, Sun H. Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2013, 57: 2072 - 2077.
- [6] Marquardt JU, Galle PR, Teufel A. Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): an emerging field for advanced technologies[J]. J Hepatol, 2012, 56: 267 - 275.
- [7] Braconi C, Henry JC, Kogure T, et al. The role of MicroRNAs in human liver cancers[J]. Semin Oncol, 2011, 38: 752 - 763.
- [8] Wong CM, Kai AK, Tsang FH, et al. Regulation of hepatocarcinogenesis by microRNAs [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2013, 5: 49 - 60.
- [9] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma[J]. JAMA, 2008, 299: 425 - 436.
- [10] Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, et al. Expression of microRNAs, miR - 21, miR - 31, miR - 122, miR - 145, miR - 146a, miR - 200c, miR - 221, miR - 222, and miR - 223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic

- cholangiocarcinoma and its prognostic significance [J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52: 297 - 303.
- [11] Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 5369 - 5380.
- [12] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会和中华医学会肝病学会. 原发性肝癌规范化诊治的专家共识[J]. *实用肝脏病杂志*, 2009, 12: 321 - 328.
- [13] Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and Cancer [J]. *Mol Oncol*, 2012, 6: 590 - 610.
- [14] Zhu Q, Wang Z, Hu Y, et al. miR - 21 promotes migration and invasion by the miR - 21 - PDCD4 - AP - 1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27: 1660 - 1668.
- [15] Vinciguerra M, Sgroi A, Veyrat - Durebex C, et al. Unsaturated fatty acids inhibit the expression of tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN) via microRNA - 21 up - regulation in hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2009, 49: 1176 - 1184.
- [16] Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 419 - 427.
- [17] Knoll S, Fürst K, Thomas S, et al. Dissection of cell context - dependent interactions between HBx and p53 family members in regulation of apoptosis: a role for HBV - induced HCC [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10: 3554 - 3565.
- [18] Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus - induced hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(suppl 1): 144 - 152.
- [19] Qiu X, Dong S, Qiao F, et al. HBx - mediated miR - 21 upregulation represses tumor - suppressor function of PDCD4 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 3296 - 3305.

(收稿日期:2013-11-13)

(本文编辑:俞瑞纲)