

◇ 临床医学研究 ◇

4 种 miRNAs 在肝细胞性肝癌血清中的表达及意义

裴丽玲¹, 任维华^{1,2}, 李建生², 许戈良², 蒺卫东², 冯金良²

摘要 目的 分析 miR-27a、miR-30a、miR-664b、miR-451a 在肝细胞性肝癌(HCC)患者血清中的表达差异及其与临床病理参数的关系。方法 选取 HCC 患者血清标本 66 例, 相匹配的健康对照血清 40 例, 采用实时定量 PCR 方法对 miR-27a、miR-30a、miR-664b、miR-451a 作定量分析。结果 相对于健康对照血清, miR-27a、miR-30a、miR-664b 在 HCC 患者血清中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); miR-451a 在 HCC 患者血清中表达下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且有淋巴结转移的患者表达水平明显低于无淋巴结转移患者 ($P < 0.05$); TNM 分期 III + IV 期的患者表达水平明显低于 I + II 期的患者 ($P < 0.05$); 而 miR-451a 与患者性别、年龄、肿瘤直径和组织分化程度无关。结论 miR-27a、miR-30a、miR-664b 不能为 HCC 的诊断提供价值; miR-451a 在 HCC 血清中表达显著降低, 且与淋巴结转移和临床分期有关, miR-451a 可能对 HCC 的诊断和预后具有潜在的临床应用价值。

关键词 miRNA; 肝细胞性肝癌; 血清

中图分类号 R 735.7; R 73-37

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1287-05

肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 在癌症死亡率中位居第三^[1], 寻找与 HCC 发生发展相关的新型生物标志物对于 HCC 的诊断和治疗显得尤为重要。微小 RNA (microRNA, miRNAs) 是真核生物中的一类内源性具有调控功能的非编码小分子 RNA, 长约 21 ~ 25 个核苷酸。研究^[2-4] 显示 miRNAs 参与生命过程中多种调节途径, 包括早期发育、细胞增殖和凋亡等, 且 miRNAs 的异常表达与疾病, 尤其是恶性肿瘤的发生发展关系密切。miR-27a、miR-30a、miR-664b 在乳腺癌、前列腺癌、HCC 等多种肿瘤中异常表达; miR-451a 在肿瘤发生和发

展中发挥了重要作用, 在多种肿瘤中表达下调^[5-7]。目前 miR-27a、miR-30a、miR-664b、miR-451a 在 HCC 患者血清中的表达变化和临床意义研究甚少, 该研究应用 Real-Time PCR 技术检测 miR-27a、miR-30a、miR-664b、miR-451a 在 HCC 患者血清中的表达水平, 并分析其与临床病理参数的关系, 旨在为寻找 HCC 诊断和预后标志提供依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 66 例患者血清来自安徽医科大学附属省立医院 2012 年 6 月 ~ 2013 年 6 月肝脏外科住院者, 首次确诊为 HCC, 不限患者年龄、肿瘤分级和分期, 但排除既往有肿瘤病史患者, 抽血前患者均未接受任何手术、化疗、放疗治疗。HCC 组男 50 例, 女 16 例, 年龄 21 ~ 69 (54.1 ± 11.4) 岁。40 例正常对照为同期健康体检者, 男 32 例, 女 8 例, 年龄 32 ~ 71 (52.2 ± 10.3) 岁。HCC 患者和健康志愿者的年龄和性别匹配, 标本的采集均获得患者的知情同意。

1.2 实验试剂与仪器 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 Real-Time PCR 试剂盒均购自德国 QIAGEN 公司; miR-27a、miR-30a、miR-664b、miR-451a 及内参 miR-16 特异性检测引物均由 QIAGEN 公司设计并合成; ABI 7500 Real-Time PCR 系统由安徽医科大学附属省立医院中心实验室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 血清样本的收集 用无菌采血管采集新鲜血液样本 5 ml, 室温放置 0.5 ~ 1 h, 至血液完全凝固后 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液移入无 RNA 酶的 1.5 ml EP 管中, 4 °C、25 000 r/min 离心 15 min, 小心吸取上清液移入无 RNA 酶的 1.5 ml 另一 EP 管中, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.3.2 血清总 RNA 提取 取血清样本, 每份 200 μ l, 用 QIAGEN 公司血清 RNA 提取试剂盒 (货号: 217184) 提取说明书所述的方法抽提总 RNA, 取 2 μ l RNA 用 DU® 7300 紫外分光光度仪测定总 RNA 纯度, OD_{260}/OD_{280} 的比值在 1.8 ~ 2.1, 抽提获得的

2014-03-03 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (编号: 01013025)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 检验科、² 普通外科, 合肥 230001

作者简介: 裴丽玲, 女, 硕士研究生;

任维华, 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: weihuaren@sina.com

RNA 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.3.3 逆转录 由于 miRNA 的分子太短, QIAGEN 公司运用成熟的 miRNA 3' 末端进行 Poly(A) 加尾, 并加入含有 Oligod(T) 特异的 RT 通用引物(有一个通用的 5' 末端序列, 这种通用型引物, 一个样品反转录一次即可进行多个 miRNA 检测, 一次反转录可进行多个 miRNA 检测), 形成反转录引物/成熟 miRNA 复合物, 并在 miRNA 的 5' 末端延伸, 得到一个较长的反转录扩增因子, 为进一步做实时定量 PCR 提供了符合要求的模板 Oligod(T) 特异的 RT 引物。逆转录过程按照下述步骤操作: 将总 RNA 做适当的浓度调整, 在无 RNase 的 PCR 管中进行反应体系的配置, 包括 miScript Reverse Transcriptase Mix、miScript Nucleics Mix、miScript HiSpec Buffer、RNase-Free Water 配置过程按照 QIAGEN 公司逆转录试剂盒(货号:218160)说明书进行。将反应体系混匀后 37 °C 孵育 60 min, 95 °C 孵育 5 min 灭活逆转录酶。

1.3.4 定量 PCR 检测 将上述实验得到的 cDNA 稀释 10 倍后取适量放入无 RNase 的 PCR 8 联管中, 参照 QIAGEN 公司 Real-Time PCR 检测试剂盒(货号:218073)说明书进行实时定量 PCR, 以 miR-16 为内参^[7], 加入 QIAGEN 公司设计并合成的 miR-27a、miR-30a、miR-664b、miR-451a 和 miR-16 的特异性上游引物和通用下游引物、SYBR Green PCR Master Mix 配成 25 μl 反应体系, 不足部分用 H₂O 补齐。将准备好的反应物放入 ABI 7500 实时 Real-Time PCR 系统中。设置反应参数: 95 °C 15 min; 94 °C 15 s, 55 °C 30 s, 70 °C 34 s, 共 40 个循环, 并在 70 °C 收集荧光信号。结果判定: Ct 为 Real-Time PCR 的临界循环数, 表示模板 cDNA 拷贝数(与模板 cDNA 拷贝数呈负相关); ΔCt 表示 miRNAs 相对内参表达量, ΔCt = Ct_{miRNAs} - Ct_{内参}; ΔΔCt 表示 HCC 血清中 miRNAs 相对于健康对照血清 miRNAs 的表达量, ΔΔCt = ΔCt_{HCC} - ΔCt_{对照}; 2^{-ΔΔCt} 指数表示 HCC 患者血清中 miRNAs 相当于健康对照者血清的表达情况。实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件对 ABI 7500 Real-Time PCR 系统输出的所有相对表达量数值进行 Mann-Whitney U 检验分析。通过受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)判断 miRNA 表达水平在 HCC 中的诊断价值。

2 结果

2.1 HCC 患者血清中 miR-27a、miR-30a、miR-664b 的表达 HCC 患者与健康者比较, 血清中 miR-27a、miR-30a、miR-664b 表达差异无统计学意义(P > 0.05), 见图 1、表 1。

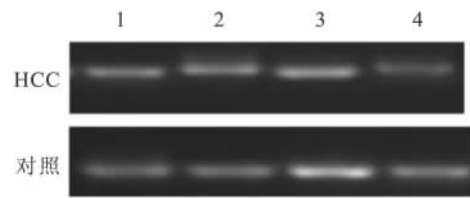


图 1 4 种 miRNA 在 HCC 患者和对照者血清中的表达
1: miR-27a; 2: miR-30a; 3: miR-451a; 4: miR-664b

表 1 4 种 miRNA 在 HCC 患者和对照者中的相对表达量 2^{-ΔΔCt} M(P₂₅, P₇₅)

miRNA	HCC 患者	对照者	Z 值	P 值
miR-27a	1.690(1.101, 2.820)	1.261(0.985, 1.458)	0.258	0.823
miR-30a	0.871(0.547, 1.430)	1.071(0.877, 1.547)	-1.186	0.248
miR-451a	0.439(0.135, 1.229)	1.460(1.057, 2.550)	-3.267	0.001
miR-664b	0.861(0.496, 1.389)	0.534(0.190, 1.387)	0.486	0.660

2.2 miR-451a PCR 反应 PCR 反应扩增曲线见图 2A, PCR 产物溶解曲线见图 2B, PCR 反应后凝胶电泳结果见图 3, 血清提取的 miR-451a 无非特异性扩增, 具有良好的扩增效率。

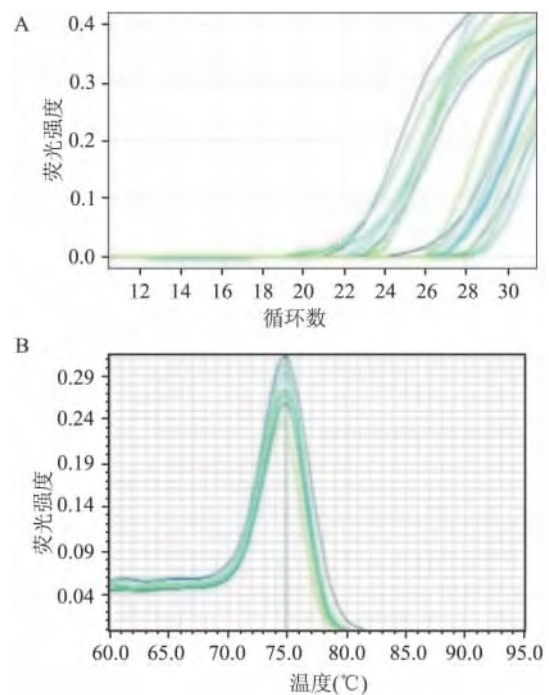


图 2 miR-451a PCR 反应
A: 扩增曲线; B: 溶解曲线

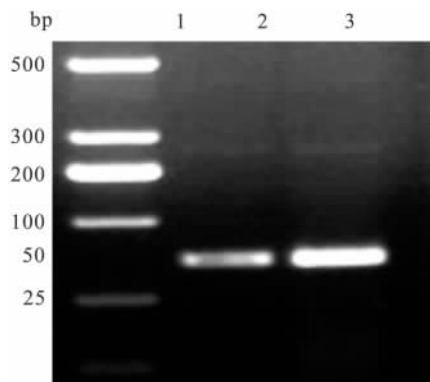


图3 HCC血清中miR-451a表达的电泳图
1:Marker;2:miR-46;3:miR-451a

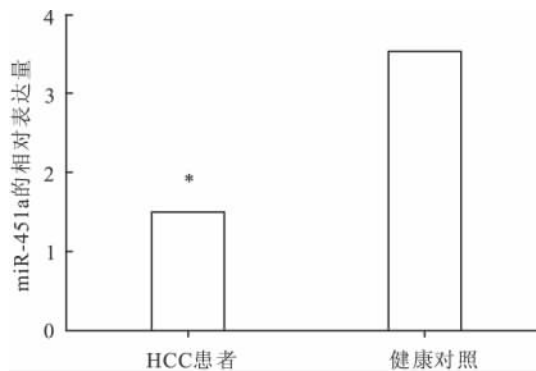


图4 miR-451a在HCC患者和健康对照者中的相对表达量与健康对照比较: * $P < 0.05$

2.3 HCC患者血清中miR-451a的表达 血清中miR-451a Real-Time PCR扩增显示,与健康对照相比,HCC患者血清中miR-451a表达明显减低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图4。ROC曲线显示,曲线下面积(area under curve, AUC)为0.77, $AUC > 0.7$ 与 $AUC = 0.5$ 比较,差异有统计学意义;用血清miR-451a进行HCC诊断时最佳临界点的灵敏度为95.0%,特异度为81.8%,见图5。

2.4 HCC患者血清miR-451a的表达变化与临床病理特征的关系 在有淋巴结转移的HCC患者中,miR-451a表达显著减低($P < 0.05$);TNM分期越晚,miR-451a表达减低越显著;miR-451a表达变化与患者年龄、性别、肿瘤直径及分化程度的关系差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

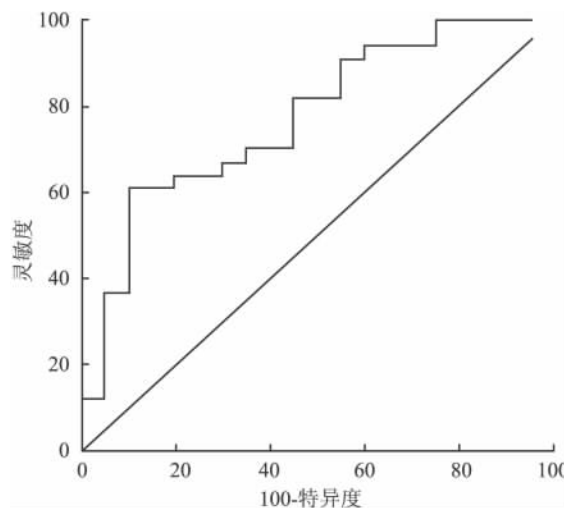


图5 HCC患者血清miR-451a的ROC曲线

表2 HCC患者血清中miR-451a表达变化与临床病理学特征的关系

临床病理参数	n	百分比(%)	$2^{-\Delta\Delta Ct} M(P_{25}, P_{75})$	Z值	P值
性别				-0.588	0.571
男	50	76	0.787(0.144, 1.238)		
女	16	24	0.280(0.096, 1.149)		
年龄(岁)				-0.406	0.697
≤55	28	42	0.797(0.143, 1.366)		
>55	38	58	0.439(0.128, 1.188)		
肿瘤直径(cm)				-1.193	0.240
≤5	30	45	0.157(0.130, 1.188)		
>5	36	55	0.925(0.202, 1.663)		
癌组织分化				-0.445	0.671
高中分化	48	73	0.787(0.142, 1.188)		
低分化	18	27	0.327(0.081, 1.725)		
淋巴结转移				-2.466	0.015
有	14	21	0.157(0.030, 0.327)		
无	52	79	0.925(0.14, 1.366)		
TNM分期				-2.246	0.026
I+II	52	79	0.925(0.145, 1.366)		
III+IV	14	21	0.157(0.072, 0.327)		

3 讨论

miRNA是一类内源性的具有调控功能的小分子非编码RNA,在miRNA水平调节靶基因的表达,进而参与调控有机体的生命活动。miRNAs表达的组织特异性、正常组织和恶性组织间表达的差异性及其调控网络是近年来研究的热点,已成为对各类癌症具有潜在临床诊疗价值的候选新型生物标志物^[7]。其中miRNAs作为HCC肿瘤标志物的大部分前期研究^[8-9]是基于组织学标本展开的,临床意义有限。研究^[7]显示,小分子miRNAs在体液(血浆、血清等)中的稳定性高,部分miRNAs具有组织类型和疾病发展状态的高特异性,使其成为非侵入性肿瘤标志物的新选择。本研究利用循环miRNAs稳定性的特点,分析了HCC患者和健康对照者血清中的4个miRNAs,研究miR-451a与HCC临床病理参数之间的关系,以评估miR-451a对HCC诊断价

值期望为 HCC 的诊疗和预后 提供无创、便捷的生物学诊疗指标。

有研究^[2-3]显示 miR-27a、miR-30a 与乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤密切相关。乳腺浸润性癌中 miR-27a 明显上调,高表达 miR-27a 的患者无病生存率和总体生存率显著降低。过表达 miR-30a 可抑制前列腺癌上皮间质转化,抑制癌细胞的迁移和侵袭,发挥肿瘤抑制作用。在本研究中,HCC 患者与对照者血清中 miR-27a、miR-30a 的表达差异无统计学意义,提示其可能在 HCC 的发生发展中作用有限,有待大量临床标本进一步验证。

有报道^[4]显示,HCC 中甲硫氨酸腺苷基转移酶 1A (MAT1A) 低表达,受其潜在调控的 miR-664、miR-485-3p 和 miR-495 则高表达,且低表达 MAT1A 的 HCC 患者预后更差。本研究显示 HCC 患者血清中 miR-664b 与对照者相比差异无统计学意义,和对实体瘤标本研究结果不同。有研究者认为循环 miRNAs 可能间接受肿瘤组织的影响,可能由非瘤细胞分泌^[10-11];另外肿瘤细胞可能从循环血液中主动摄取 miRNAs,这些可能解释了 miRNAs 在组织与血清中表达相反的情况。

miR-451a 在众多癌症中有表达变化,在肿瘤发生发展中发挥了重要作用^[5-7]。在结肠癌、非小细胞肺癌、HCC 等组织中,miR-451a 表达下调,提示 miR-451a 是一抑癌基因;与正常肝上皮细胞、癌周非瘤组织相比,HCC 组织中 miR-451a 显著下调。本研究显示 HCC 患者血清和对照者血清存在着明显差异,HCC 患者血清 miR-451a 表达明显低于健康对照者;进一步研究显示有淋巴结转移和临床分期高的 HCC 患者中 miR-451a 表达显著减低,表明 miR-451a 可能与 HCC 的增殖和转移密切相关;淋巴结转移及肿瘤 TNM 分期较高意味着肿瘤恶性程度高,侵袭性强,容易转移,这类患者术后远期生存率明显降低,提示血清 miR-451a 作为 HCC 患者诊断和预后的候选生物学指标,有明确的临床应用价值。ROC 曲线分析也显示,用血清 miR-451a 对 HCC 进行诊断时有较大价值,最佳临界点的灵敏度和特异性都高,提示利用血清 miR-451a 作为 HCC 的生物标志物有一定的准确性和可行性。

综上所述,利用 Real-Time PCR 方法检测 HCC

患者四种血清学因子 miR-27a、miR-30a、miR-664b、miR-451a 时,前三种血清 miRNAs 的表达没有差异,且与癌组织表达不同,而 miR-451a 在 HCC 患者血清中表达明显降低,且与 HCC 的迁移及恶性程度高度相关。miR-451a 极有可能成为一种新的临床生物学指标应用于 HCC 诊断、治疗及预后,同时 PCR 法检测 miR-451a 具有价格低廉、无创、便捷、扩增效率高的特点,临床应用价值高。

参考文献

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics 2002 [J]. *CA Cancer J Clin* 2005, 55(2):74-108.
- [2] Tang W, Zhu J, Su S, et al. MiR-27a as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51702.
- [3] Kao C J, Martinez A, Shi X B, et al. miR-30a as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT [J]. *Oncogene*, 2014, 33(19):2495-503.
- [4] Yang H, Cho M E, Li T W, et al. MicroRNAs regulate methionine adenosyltransferase 1A expression in hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Invest* 2013, 123(1):285-98.
- [5] Li H P, Zeng X C, Zhang B, et al. miR-451a inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK- β [J]. *Carcinogenesis* 2013, 34(11):2443-51.
- [6] Li H Y, Zhang Y, Cai J H, et al. MicroRNA-451 Inhibits growth of human colorectal carcinoma cells via downregulation of PI3k/Akt Pathway [J]. *Asia Pac J Cancer Prev* 2013, 14(6):3631-4.
- [7] Markou A, Sourvinou I, Vorkas P A, et al. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer* 2013, 81(3):88-96.
- [8] Taylor D D, Taylor C G. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes: diagnostic biomarkers of ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol* 2008, 110(1):13-21.
- [9] Liu R, Zhang C, Hu Z, et al. A five-microRNA signature identified from genomewide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis [J]. *Eur J Cancer* 2011, 47(5):784-91.
- [10] Hu Z, Chen X, Zhao Y, et al. Serum microRNA signatures identified from genomewide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol* 2010, 28(10):1721-6.
- [11] Reid G, Kirschner M B, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers [J]. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011, 80(2):193-208.

右美托咪定对食管癌根治术患者单肺通气时 肺内分流及动脉氧分压的影响

张丽丽 张野 李云 翁立军 陈齐 蒋玲玲

摘要 目的 观察右美托咪定(Dex)对食管癌手术中单肺通气(OLV)肺内分流和动脉氧分压(PaO₂)的影响。方法 40例择期行左经胸食管癌根治术患者,美国麻醉医师协会(ASA)分级I~II级,年龄25~65(57.2±8.5)岁,术前检查心肺功能良好,随机分为2组(每组20例):Dex组和生理盐水(NS)组,Dex组麻醉诱导给予Dex负荷量0.6 μg/kg,给药时间10 min,0.4 μg/(kg·h)维持至手术结束前30 min;NS组:给予等量生理盐水泵注。采集麻醉诱导后侧卧位双肺通气30 min(T₁)、OLV 30 min(T₂)、OLV 60 min(T₃)、OLV 90 min(T₄)、恢复双肺通气(TLV)30 min(T₅)时桡动脉和颈

内静脉血进行血气分析,根据血气值计算肺内分流率(Q_s/Q_t),记录PaO₂值。结果 两组血流动力学指标平均动脉压(MAP)和脑电双频指数(BIS)比较差异无统计学意义(P>0.05)。与T₁时比,两组T₂₋₄时PaO₂显著降低,Q_s/Q_t显著升高(P<0.05);与T₁时比,NS组T₅时PaO₂显著降低,Q_s/Q_t显著升高(P<0.05),Dex组T₅时PaO₂和Q_s/Q_t差异无统计学意义(P>0.05);与NS组比,Dex组T₅时PaO₂升高,Q_s/Q_t降低(P<0.05)。结论 Dex在食管癌手术患者中能明显改善恢复TLV后PaO₂及Q_s/Q_t。

关键词 右美托咪定;单肺通气;肺内分流

中图分类号 R 614.2+4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1291-04

2013-12-16 接收

基金项目:安徽省科技厅年度重点项目(编号:1301043030)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院麻醉科,合肥 230601

作者简介:张丽丽,女,硕士研究生;

张野,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:zhangye-hassan@sina.com

在心胸外科手术中经常会用到单肺通气(one-lung ventilation,OLV)技术,OLV使一侧肺停止呼吸萎陷,使术中视野更加清晰,便于手术,但同时可导

The expression and significance of four miRNAs in hepatocellular carcinoma serum

Pei Liling¹, Ren Weihua^{1,2}, Li Jiansheng², et al

(¹Dept of Clinical Laboratory, ²Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To analyze the miR-27a, miR-30a, miR-664b, miR-451a expression differences in hepatocellular carcinoma serum and its relationship with clinicopathological parameters. **Methods** The real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to miR-27a, miR-30a, miR-664b, miR-451a for quantitative analysis in 66 cases of hepatocellular carcinoma and 40 cases of healthy controls, and the relationship of their expressions and clinicopathological parameters were analyzed. **Results** The miR-27a, miR-30a, miR-664b in hepatocellular carcinoma serum were not seen significant difference compared to healthy control (P>0.05); the miR-451a in hepatocellular carcinoma serum was down-regulated compared to healthy controls, the difference was statistically significant (P<0.01). Furthermore, the expression level of lymph node metastasis was significantly lower than the expression level without lymph node metastasis (P<0.05); the expression level of TNM stage III+IV expression levels was significantly lower than the I+II stage expression level (P<0.05); and the miR-451a was not associated with gender, age, tumor size and histological differentiation degree. **Conclusion** The miR-27a, miR-30a, miR-664b are considered of no value for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. The expression of miR-451a in serum of hepatocellular carcinoma is lower, and is associated with the metastasis and clinical stages and lymph node. MiR-451a may have potential clinical application value in diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma.

Key words miRNA; hepatocellular carcinoma; serum