

## 肝细胞肝癌患者血浆 miR-29a 水平的变化及其临床意义\*

任雪维<sup>1</sup>, 张吉才<sup>1,2</sup> (1. 湖北医药学院, 湖北十堰 442000;  
2. 湖北医药学院附属太和医院检验科, 湖北十堰 442000)

**摘要:**目的 探讨肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者血浆 miR-29a 水平的变化及其临床意义。方法 病例对照研究, 收集湖北省十堰市太和医院 2016 年 1 月~6 月期间入院的 30 例肝细胞肝癌 HCC 患者, 30 例肝硬化(cirrhosis of liver, LC)患者和 30 例健康对照(healthy controls, HC)的血浆标本, 采用实时荧光定量 PCR 检测血浆中 microRNA-29a(miR-29a)含量, 通过受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析血浆 miR-29a 表达水平在肝癌诊断中的敏感度和特异度, 并对 HCC 患者血浆中 miR-29a 含量和甲胎蛋白(AFP)含量进行相关性分析。结果 比较 miR-29a 的相对表达量, HCC 组( $3.38 \pm 8.37$ ), LC 组( $8.79 \pm 3.80$ )和 HC 组( $11.98 \pm 6.64$ )差异具有统计学意义( $P=0.000$ ), 其中 HCC 组显著低于 LC 组( $P=0.046$ )和 HC 组( $P=0.001$ ), LC 组显著低于 HC 组( $P=0.026$ )。ROC 曲线下面积 miR-29a 为  $0.816(95\% \text{ CI } 0.695 \sim 0.938)$  小于 AFP  $0.918(95\% \text{ CI } 0.853 \sim 0.982)$ , 诊断效率 miR-29a 不如 AFP。HCC 患者血浆中 miR-29a 含量和 AFP 浓度具有显著相关性( $P=0.002$ ), 血浆 miR-29a 和 AFP 联合应用有助于提高 HCC 的诊断效率。结论 HCC 患者血浆 miR-29a 水平降低, 可能成为 HCC 诊断的参考指标。

**关键词:** miR-29a; 肝细胞肝癌; 肝硬化; 聚合酶链反应

**中图分类号:** R735.7; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)02-033-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.009

## Changes of Plasma miR-29a Levels in Patients with Hepatocellular Carcinoma and Its Clinical Significance

REN Xue-wei<sup>1</sup>, ZHANG Ji-cai<sup>1,2</sup> (1. Hubei University of Medicine,  
Hubei Shiyan 442000, China; 2. Department of Clinical Laboratory,

Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Hubei Shiyan 442000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the changes of plasma miR-29a level in patients with hepatocellular carcinoma(HCC) and its clinical significance. **Methods** Case-control study, 30 patients with HCC, 30 patients with cirrhosis of liver (LC) and 30 healthy controls (HC) were recruited from Shiyan Taihe Hospital, 2016 January to June. The level of microRNA-29a (miR-29a) in plasma was detected by real-time quantitative PCR, and the sensitivity and specificity of plasma miR-29a expression in the diagnosis of HCC were analyzed by receiver operating characteristic curve (ROC), and to analyze the correlation between the miR-29a and the alpha-fetoprotein (AFP) in patients with hepatocellular carcinoma, the combination of miR-29a and AFP could improve the diagnostic efficiency of HCC. **Results** The relative expression of miR-29a was significantly different between HCC group ( $3.38 \pm 8.37$ ), LC group ( $8.79 \pm 3.80$ ) and HC group ( $11.98 \pm 6.64$ ), the expression level of miR-29a in HCC group was significantly lower than that in LC group ( $P=0.046$ ) and HC group ( $P=0.001$ ), and that in LC group was significantly lower than that in HC group ( $P=0.026$ ). The area under the ROC curve of miR-29a was  $0.816(95\% \text{ CI } 0.695 \text{ to } 0.938)$  less than AFP  $0.918(95\% \text{ CI } 0.853 \text{ to } 0.982)$ , and the diagnostic efficiency of miR-29a was not as good as that of AFP. The levels of miR-29a and AFP in plasma of patients with hepatocellular carcinoma were significantly correlated ( $P=0.002$ ). **Conclusion** The level of miR-29a in plasma of patients with HCC decreased, which may become the reference index of HCC diagnosis.

**Keywords:** miR-29a; hepatocellular carcinoma; cirrhosis of liver; PCR

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种高死亡率的原发性肝癌,在世界恶性肿瘤死亡人数中位列第三,我国位列第二。肝癌死亡率高的原因之一是多数患者发现肿瘤时已经是终末期,然而越早发现 HCC,治疗效果和预后越好<sup>[1]</sup>。因此,

早发现、早治疗是提高 HCC 患者生存和预后的关键。microRNA(miRNA)是长度约 22 个核苷酸的非编码 RNA,在转录后水平的调节靶基因表达,不仅参与正常细胞的各种生理生化功能,而且在肿瘤的发生发展过程中也发挥重要作用。近年来的

\* 基金项目:湖北省自然科学基金(2014CFB304)资助。

作者简介:任雪维(1991-),女,硕士在读,主要研究方向为肿瘤分子诊断, Tel:15727195809, E-mail:369385602@qq.com。

研究表明,miRNA 在肿瘤组织和患者血浆中的水平会发生不同程度的增高或降低,是潜在的肿瘤诊断及预后评估指标。miR-29 家族包括 miR-29a, miR-29b 和 miR-29c<sup>[2]</sup>,已有报道称肝组织 miR-29 水平与血浆 AFP 关系密切<sup>[3]</sup>,血浆 miR-29 水平可用于 HBV 相关肝病的诊断和预后<sup>[4]</sup>。本文旨在探究血浆中 miR-29a 水平在 HCC 中的临床应用价值。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取十堰市太和医院 2016 年 1 月~6 月期间收治的 HCC 患者 30 例,其中男性 25 例,女性 5 例,平均年龄  $57 \pm 10$  岁;肝硬化(LC)患者 30 例,其中男性 23 例,女性 7 例,平均年龄  $34 \pm 13$  岁;健康体检者作为 HC,30 例,其中男性 16 例,女性 14 例,平均年龄  $45 \pm 7$  岁。所有患者采集血样前均未经手术、放疗以及化疗。标本采集经本院伦理委员会审查批准,所有研究对象签署知情同意书。

## 1.2 方法

### 1.2.1 主要试剂与仪器

1.2.1.1 试剂:血浆 miRNA 提取试剂盒(北京天根生化科技 DP503),All in One miRNA qRT-PCR Detection Kit(美国 GeneCoeia AOMD-Q050),miRNA 检测外参(北京天根生化科技 DR100-01),miRNA 检测外参引物(北京天根生化科技 CD200-01),miR-29a 引物(上海英骏生物公司)。

1.2.1.2 仪器:PCR 仪(美国 ABI7500),实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 7500),全自动生化仪(德国 SIEMENS ADVIA 2400)。

1.2.2 标本前处理:EDTA 抗凝管采集全血,2 h 内低速离心,取血浆装入 1.5 ml 无酶离心管, $13\,000 \times g$  高速离心取上清转入新的无酶离心管, $-80^\circ\text{C}$  冻存备用。

1.2.3 血浆 RNA 提取,逆转录,荧光定量 PCR 以及相对表达量的计算:按照血浆 miRNA 提取试剂盒说明书提取 miRNA,并在提取过程中加入外参。逆转录以及荧光定量 PCR 按照 All in One miRNA qRT-PCR Detection Kit 操作步骤进行。逆转录反应条件为  $37^\circ\text{C}$  反应 60 min, $85^\circ\text{C}$  加热 5 min 灭活酶。荧光定量 PCR 反应条件为  $95^\circ\text{C}$ ,10 min; $95^\circ\text{C}$  10 s $\rightarrow$  $60^\circ\text{C}$  20 s $\rightarrow$  $72^\circ\text{C}$  15 s(并且收集荧光),40 个循环。miR-29a 特异性引物序列为:GGGTAGCACCATCTGAAATC,另一通用引物由试剂盒提供,外参引物购买自天根公司。设置三个复孔,取 Ct 平均值。 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miR-29a}} - \text{Ct}_{\text{外参}}$ , $2^{-\Delta\text{Ct}}$  表示血浆中 miR-29a 相对表达量。结果乘以  $10^3$  以简化数据呈现<sup>[5]</sup>。

1.2.4 miR-29a 以及外参扩增效率的检测:取一份高浓度 miR-29a 的 cDNA 和外参的 cDNA,计算出拷贝数,然后按 10 倍浓度差做倍比稀释后进行荧光定量 PCR,建立标准曲线。

1.2.5 AFP 的检测用全自动生化仪,使用配套试剂盒。

1.3 统计学分析 应用 SPSS Statistics 21.0 进行统计学分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,Unpaired T-test 检验比较两样本均数,用 Pearson 检验作相关性分析。通过 ROC 判断 miR-29a 表达水平在肝癌诊断中的灵敏度和特异度。以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

2.1 miR-29a 荧光定量检测方法的建立 miR-29a 的标准曲线方程为  $Y = -3.535X + 18.961$ ,R 为 0.972,扩增效率 E 为 0.93,外参的标准曲线为  $Y = -3.468X + 13.961$ ,R 为 0.982,扩增效率 E 为 0.96,表明 miR-29a 和外参的检测方法均线性良好。且两组标准曲线的斜率差值  $< 0.1$ ,可以进行相对定量。

### 2.2 不同临床类型样本血浆 miR-29a 的表达水平

使用 Unpaired T-test 检验分析发现,各组总体均数不同,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。HCC 组 miR-29a 的表达水平( $3.38 \pm 8.37$ )显著低于 LC 组( $8.79 \pm 3.80$ , $P = 0.000$ )和 HC 组( $11.98 \pm 6.64$ , $P = 0.000$ ),LC 组 miR-29a 的表达水平显著低于 HC 组( $P = 0.005$ )。相对表达量分布见图 1。

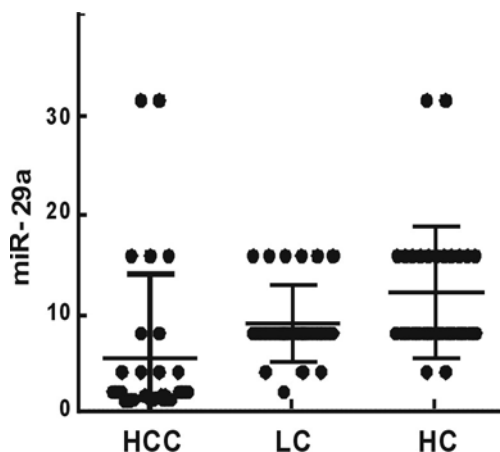


图1 HCC组,LC组和HC组 miR-29a 相对表达量分布情况

2.3 miR-29a 对 HCC 的诊断价值 miR-29a ROC 曲线下面积为 0.816(95%可信区间 0.695~0.938);AFP ROC 曲线下面积为 0.918(95%可信区间 0.853~0.982)。根据曲线下面积可知,AFP 的诊断效率高于 miR-29a。ROC 曲线见图 2。

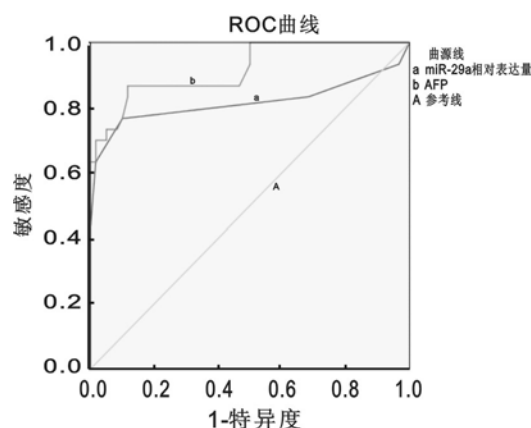


图2 miR-29a和AFP的ROC曲线

2.4 血浆 miR-29a 和 AFP 联合应用有助于提高 HCC 的诊断效率 HCC 患者血浆 miR-29a 水平与 AFP 浓度有一定的相关性 ( $R^2 = 0.259$ ,  $P = 0.014$ )。单变量 logistic 回归分析表明,血浆 miR-29a 对 HCC 的优势比 (OR) 为 6.57 ( $P < 0.01$ ), 95% 可信区间为 2.82~12.54, 见表 1。这表明,在不考虑 AFP 的情况下,血浆 miR-29a 阳性(相对表达量  $< 1.56$ )的患者,发生 HCC 的风险是阴性患者的 6.57 倍。在校正了 AFP 后,血浆 miR-29a 对 HCC 的 OR 为 2.59 ( $P = 0.03$ ), 95% 可信区间为 1.89~7.85。血浆 miR-29a 相对表达量  $< 1.56$  仍然可以提供 AFP 以外的诊断信息,即联合血浆 miR-29a 与 AFP 更有助于提高 HCC 的诊断效率。

表 1 多参数 logistic 回归模型  
分析血浆 miR-29a 与 HCC 的关系

变量	OR	95%可信区间	P 值
单变量 miR-29a $< 1.56$	6.57	2.82~12.54	$< 0.01$
多变量 miR-29a $< 1.56$	2.59	1.89~7.85	0.03
AFP $> 300 \mu\text{g/L}$	87.65	20.64~360.24	$< 0.01$

3 讨论 肝细胞肝癌(HCC)恶性程度极高,早期诊断、早期治疗已成为提高肝癌患者生存期的关键。理想的肝癌患者诊断生物标志物应具备易获取、创伤小,敏感度和特异度高等特点。AFP 通常仅在发育期胎儿肝脏中高度表达,在 HCC 肿瘤中,AFP 被重新激活,但只有 60% 的患者 AFP 表达升高。AFP 对原发性肿瘤的诊断敏感度和特异度不高,特别是在癌症早期阶段<sup>[6]</sup>。miRNA 是近年来的研究热点,其表达具有时间和组织特异性,是调控基因表达的重要一员,影响着细胞的分化、增殖、凋亡和转移,与肿瘤关系密切。近年来,miRNA 在肿瘤中作用机制的研究越来越多,肝癌组织中的 miRNA 在诊断和判断预后方面的应用价值已得到肯定,但组织标本获取困难,而且存在较大风险,临床难以推广。外周血中的循环 miRNA 具有一定的组织特异性和稳定性,而且获取容

易,是理想的肝癌早期诊断指标<sup>[7~9]</sup>。

miR-29 家族具有抑癌和促癌双重作用,能与 DNA 甲基转移酶 3A(DNMT-3A)和 DNA 甲基转移酶 3B(DNMT-3B)的 3'-UTRs 互补,从而降低基因组的甲基化作用,增强抑癌基因的表达<sup>[10]</sup>,促进细胞凋亡,发挥抑癌作用。诱导细胞周期阻滞,抑制肿瘤细胞增殖<sup>[11]</sup>。还可以改变肿瘤的侵袭性,但在不同的肿瘤中效果相反<sup>[12,13]</sup>。迄今为止,miR-29 家族在外周循环的起源和存在形式还未明了。肝脏组织中 miR-29 含量丰富。造血干细胞和肝细胞 miR-29 水平相同,但肝细胞的数量远高于造血干细胞<sup>[14]</sup>。免疫细胞也表达高水平的 miR-29,并通过 miR-29 抑制白细胞介素(interleukin, IL)-23 和 IL-17 信号传导维持免疫内环境稳定<sup>[15]</sup>。促纤维化和炎症趋化因子诱导 miR-29 的下调,高水平的 AFP 也可引起 miR-29 肝组织水平下降。然而,肝癌发生时,肝细胞发生坏死,不可避免地导致细胞破裂,细胞内组分包括 miRNA 向循环血液中释放。这与我们在研究中观察到的现象相反,血清 miR-29 水平不仅不上调,反而下调。可能的解释是,miR-29 的分泌减少远远超过从肝细胞被动释放的 miR-29。miR-29a 作为 miR-29 家族中的一员,来自于 7 号染色体的 32 区段(7q32),序列为 UAGCACCAUCUGAAAUCG-GUUA,与 miR-29b 和 miR-29c 只有个别碱基不同,已有文献表明 miR-29a 在肝癌组织中下调明显,在 HBV 相关的肝病中血浆中的浓度也存在显著降低<sup>[16]</sup>。本研究通过实时荧光定量 PCR 发现,肝癌患者血浆中 miR-29a 的浓度显著下调,这与其他研究一致<sup>[17]</sup>。通过 ROC 曲线分析得知,血浆 miR-29a 水平对于鉴别 HCC 和 LC 者, HCC 和 HC 有一定的临床应用价值,尽管其效果可能不如 AFP,但其表达水平与 AFP 浓度具有显著的相关性,将循环 miR-29a 与 AFP 联合应用可提高肝癌早期诊断效率。总之,血浆 miR-29a 有望成为新的辅助诊断 HCC 的非侵入性指标,如何确定循环 miR-29a 在健康个体中 99% 的分布区间应是今后工作的重点之一。

#### 参考文献:

- [1] 刘冲,唐浩,邓霖,等.血清 miRNA-186, miRNA-30c 在肝细胞性癌中诊断价值的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(6): 44-47.  
Liu C, Tang H, Deng L, et al. Research of diagnostic application of serum miRNA-186 and miRNA-30c in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(6): 44-47.
- [2] 任雪维,张吉才. miR-29 在肿瘤中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(17): 775-779. (下转 40 页)

- [14] Yoo HJ, Choi HY, Yang SJ, et al. Circulating chemerin level is independently correlated with arterial stiffness[J]. *Journal of Atherosclerosis & Thrombosis*, 2012, 19(1):59-78.
- [15] Dong B, Ji W, Zhang Y. Elevated serum chemerin levels are associated with the presence of coronary artery disease in patients with metabolic syndrome[J]. *Internal Medicine*, 2011, 50(10):1093-1107.
- [16] Pannaciuoli N, De Pergola G, Ciccone M, et al. Effect of family history of type 2 diabetes on the intima-media thickness of the common carotid artery in normal-weight, overweight, and obese glucose-tolerant young adults[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(4):1230-1244.
- [17] Abd El-hafez H, Elrakhawy MM, El-baiomy AA, et al. Carotid intima media thickness is independently associated with male gender, middle age, and IGF-1 in metabolically healthy obese individuals[J]. *ISRN Obesity*, 2014(2014):545804.
- [18] 母春华, 李薇薇, 杨国锐, 等. 乐亭县敬老院老年男性踝臂指数与心血管疾病危险因素的关系[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2014, 6(5):594-596.
- Mu CH, Li WW, Yang GR, et al. Relationship between ankle-brachial index and risk factors cardiovascular diseases in elderly male patients in gerocomium of laoting County[J]. *Chinese Journal of Evidence Based Medicine*, 2014, 6(5):594-596.
- [19] Thejaswini KO, Roopakala MS, Dayananda G, et al. A study of association of ankle brachial index(ABI) and the highly sensitive C-reactive protein(hsCRP) in type 2 diabetic patients and in normal subjects[J]. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 2013, 7(1):46-50.
- [21] Elias-smale SE, Kardys I, Oudkerk M, et al. C-reactive protein is related to extent and progression of coronary and extra-coronary atherosclerosis; results from the Rotterdam study[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 195(2):195-202.

收稿日期:2016-10-26

修回日期:2016-12-06

(上接 35 页)

- Ren XW, Zhang JC. Research progress of microRNA-29 in tumors[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2016, 43(17):775-779.
- [3] Parpart S, Roessler S, Dong F, et al. Modulation of miR-29 expression by alpha-fetoprotein is linked to the hepatocellular carcinoma epigenome[J]. *Hepatology*, 2014, 60(3):872-883.
- [4] Xing TJ, Jiang DF, Huang JX, et al. Expression and clinical significance of miR-122 and miR-29 in hepatitis B virus-related liver disease[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3):7912-7918.
- [5] Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, et al. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(4):e43.
- [6] 李步任, 张惠冰, 张诗颜. ROC 曲线及 Logistic 回归评价血清 AFU, AFP 和 TK1 在原发性肝癌的诊断价值[J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(6):56-59.
- Li BR, Zhang HB, Zhang SY. Diagnostic value of serum AFU, AFP and TK1 for primary liver cancer with logistic regression and ROC curve[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(6):56-59.
- [7] Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36):4781-4788.
- [8] Zhu HT, Hasan AM, Liu RB, et al. Serum microRNA profiles as prognostic biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29):45637-45648.
- [9] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23):9798-9807.
- [10] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(40):15805-15810.
- [11] Lee TY, Ezelle HJ, Venkataraman T, et al. Regulation of human RNase-L by the miR-29 family reveals a novel oncogenic role in chronic myelogenous leukemia[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2013, 33(1):34-42.
- [12] Rothschild SI, Tschan MP, Federzoni EA, et al. MicroRNA-29b is involved in the Src-ID1 signaling pathway and is dysregulated in human lung adenocarcinoma[J]. *Oncogene*, 2012, 31(38):4221-4232.
- [13] Cochrane DR, Jacobsen BM, Connaghan KD, et al. Progesterone regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 355(1):15-24.
- [14] Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2011, 53(1):209-218.
- [15] Brain O, Owens BM, Pichulik T, et al. The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release[J]. *Immunity*, 2013, 39(3):521-536.
- [16] Huang C, Zheng JM, Cheng Q, et al. Serum microRNA-29 levels correlate with disease progression in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Dig Dis*, 2014, 15(11):614-621.
- [17] Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 51(3):836-845.

收稿日期:2017-01-06

修回日期:2017-02-10