

血清 miRNA-574-3p, AFP, IGF-2 水平联合检测在肝癌早期诊断中的价值研究

卢美红, 杨曙梅, 王峰, 王旭东, 鞠少卿 (南通大学附属医院医学检验科, 江苏南通 226001)

摘要: 目的 探讨血清 miRNA-574-3p, 甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP、胰岛素样生长因子-2 (insulin-like growth factor 2, IGF-2) 联合诊断早期肝癌的价值。方法 选取2019年4月~2020年11月南通大学附属医院确诊的85例早期肝癌患者和90例健康体检者为研究对象, 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 测定血清中 miRNA-574-3p 水平, 化学发光法检测血清 AFP 浓度, ELISA 法检测 IGF-2 浓度, 分析三者对早期肝癌的诊断价值。结果 早期肝癌组 miRNA-574-3p, AFP 和 IGF-2 分别为 1.40 ± 0.28 RQ, 94.13 ± 25.05 ng/ml 和 432.50 ± 104.01 ng/ml, 显著高于健康对照组 (0.55 ± 0.10 RQ, 10.05 ± 3.34 ng/ml 和 189.40 ± 52.36 ng/ml), 差异有统计学意义 ($t=5.368, 12.401, 18.514$, 均 $P<0.05$)。miRNA-574-3p, AFP 和 IGF-2 诊断早期肝癌的曲线下面积分别为 0.801, 0.787 和 0.762, 其中 miRNA-574-3p 曲线下面积最大。AFP, IGF-2 分别联合 miRNA-574-3p 诊断早期肝癌的曲线下面积为 0.870, 0.853, 三者联合诊断价值最高, 曲线下面积为 0.917。结论 相比于 AFP 和 IGF-2, miRNA-574-3p 对早期肝癌诊断价值更高, 临床上可通过 miRNA-574-3p 联合 AFP, IGF-2 共同诊断以提高诊断效能。

关键词: 早期肝癌; miRNA-574-3p; 甲胎蛋白; 胰岛素样生长因子-2; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R735.7; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 02-033-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.02.007

Study on the Value of Combined Detection of Serum miRNA-574-3p, AFP and IGF-2 Levels in the Early Diagnosis of Liver Cancer

LU Mei-hong, YANG Shu-mei, WANG Feng, WANG Xu-dong, JU Shao-qing

(Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: Objective To explore the diagnostic value of combined detection of serum miRNA-574-3p, alpha fetoprotein AFP (AFP) and insulin-like growth factor 2 IGF-2 (IGF-2) in the diagnosis of early liver cancer. **Methods** Selected 85 patients with early liver cancer diagnosed in Affiliated Hospital of Nantong University from April 2019 to November 2020, and 90 healthy physical examination subjects were selected as the research object. Real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detects the level of miRNA-574-3p in the serum, chemiluminescence method detects serum concentration, ELISA method detects concentration, and analyze the diagnostic value of the three for early liver cancer. **Results** MiRNA-574-3p, AFP and IGF-2 in early hepatocellular carcinoma group were 1.40 ± 0.28 RQ, 94.13 ± 25.05 ng/ml, 432.50 ± 104.01 ng/ml, respectively, significantly higher than those in healthy control group (0.55 ± 0.10 RQ, 10.05 ± 3.34 ng/ml, 189.40 ± 52.36 ng/ml), the differences were statistically significant ($t=5.368, 12.401, 18.514$, all $P<0.05$). The area under the curve of miRNA-574-3p, AFP and IGF-2 in the diagnosis of early liver cancer were 0.801, 0.787 and 0.762, respectively, and the area under the curve of miRNA-574-3p was the largest. The area under the curve of AFP and IGF-2 combined with miRNA-574-3p in the diagnosis of early liver cancer was 0.870 and 0.853 respectively. The combined diagnosis value of the three is the highest, and the area under the curve was 0.917. **Conclusion** Compared with the common tumor markers AFP and IGF-2, miRNA-574-3p is more valuable in the diagnosis of early liver cancer. Clinically, miRNA-574-3p combined with AFP and IGF-2 can be used for joint diagnosis to improve the diagnostic efficiency.

Keywords: early liver cancer, miRNA-574-3p, alpha-fetoprotein, insulin-like growth factor-2, real-time fluorescent quantitative PCR

肝癌 (liver cancer, LC) 是常见的恶性肿瘤之一, 发病率, 早期肝癌的五年存活率约 70% 左右, 而中晚期肝癌的五年存活率不到 10%^[1]。LC 患者早期症状隐匿, 大多数患者发现征兆时已处于晚期, 预后极差。因此, 若能在癌症发生早期及时作出可靠的诊断, 可以大大提高患者的生存概率。目前缺

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81271920)。

作者简介: 卢美红 (1975-), 女, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向: 临床免疫学检验, E-mail: alu522@126.com。

通讯作者: 鞠少卿, 男, 主任技师, 博士生导师, E-mail: jsq814@hotmail.com。

乏有效的早期诊断方法和技术,使得肝癌的诊断与治疗总是处于滞后状态,随着医学的进步与发达,现有的诊断仪器设备和方法,如影像学、病理学的完善与成熟,提高了早期肝癌的诊断准确率,但受仪器分辨率及专业人员主观因素的影响,容易漏检。肿瘤标志物是肝癌早期诊断的主要方式,如甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)^[2]、胰岛素生长因子-2(insulin-like growth factor 2, IGF-2)^[3]等标志物已经应用于肝癌的临床诊断、预后判断等方面,但灵敏度和特异性尚不高,影响了肝癌的准确诊断。因此需要寻求更新颖和更敏感的生物标志物来补充现有的检测方法。微小核糖核酸(microRNAs, miRNAs)是一类小分子非编码单链RNA,通过碱基配对的方式作用于相应靶mRNA,导致mRNA降解或抑制转录后翻译,miRNA的表达失调与肿瘤的发生发展密切相关^[4-5]。

本研究通过测定血清miRNA-574-3p及肿瘤标志物AFP, IGF-2水平在早期肝癌及正常健康对照者间的表达情况,评价miRNA-574-3p单独及联合AFP, IGF-2检测在肝癌早期诊断方面的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2019年4月~2020年11月于南通大学附属医院进行诊治的85例早期肝癌患者为研究对象,纳入标准^[6]:经手术病理、影像学证实,满足早期肝癌诊疗规范相关标准。所有研究对象排除标准^[7]:并发肾病综合征、心力衰竭、结核等可引起血清肿瘤标志物升高者、妊娠、生殖系统胚胎源性肿瘤、其他恶性肿瘤患者。患者未进行放化疗治疗。对照组:选取我院体检中心健康体检者90例。两组性别、年龄等临床资料差异无统计学意义($P > 0.05$)。标本采集经医院伦理委员会审查批准,患者知情同意。

1.2 仪器与试剂 7500定量PCR扩增仪(ABI公司,美国), Trizol试剂盒(Invitrogen公司,美国), miRNA提取试剂盒(Life Technologies公司,美国), miRNA逆转录试剂盒(Life Technologies公司,美国),实时荧光定量PCR试剂盒(Qiagen公司,德国), miRNA-574-3p, U6引物(上海英骏生物工程公司), i4000检测发光仪其配套试剂(雅培公司,美国)。ELISA试剂盒(R&D Systems公司,美国),低温高速离心机(Sigma公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集:采用有分离胶的真空管收集实验组和健康对照组人员清晨空腹静脉血液标本2管,一管4 000r/min离心10 min后,将上层血清分装于无酶EP管中,按照400~500μl每管分装好,-80℃保存备用;一管3 000r/min离心10 min后分离血清

用于AFP, IGF-2的测定。

1.3.2 血清miRNA-574-3p水平检测:按miRNA提取试剂盒说明书将RNA提取后进行逆转录反应,取U6做内参,采用qRT-PCR方法检测miRNA-574-3p的相对表达水平。miRNA的相对表达量用 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示, $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{U6}}) - \text{对照组}(Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{U6}})$ 均值。

1.3.3 肝癌肿瘤标志物的测定:雅培公司i4000SR化学发光仪检测AFP, ELISA法测定血清IGF-2浓度(R&D Systems公司),试剂、校准品、质控品均为原装产品,所有操作严格按照说明书进行。

1.4 统计学分析 数据采用SPSS 19.0统计进行分析及ROC曲线生成。计量资料正态分布检验后满足正态分布的以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用独立样本t检验,诊断价值采用受试者工作曲线(ROC)分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 早期肝癌、健康对照者miRNA-574-3p, AFP, IGF-2的含量 见表1。早期肝癌患者血清miRNA-574-3p, AFP, IGF-2显著高于健康对照者,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

表1 miRNA-574-3p, AFP, IGF-2检测结果

项目	早期肝癌患者 (n=85)	正常组 (n=90)	t	P
miRNA-574-3p(RQ)	1.40 ± 0.28	0.55 ± 0.10	5.368	0.000
AFP (ng/ml)	94.13 ± 25.05	10.05 ± 3.34	12.401	0.000
IGF-2 (ng/ml)	432.50 ± 104.01	189.40 ± 2.36	18.514	0.000

2.2 血清miRNA-574-3p, AFP, IGF-2单独用于诊断早期肝癌的价值评估 见表2,图1。根据miRNA-574-3p, AFP, IGF-2结果绘制ROC曲线显示,miRNA-574-3p, AFP, IGF-2单独诊断早期肝癌的曲线下面积分别为0.801, 0.787, 0.762,其中miRNA-574-3p诊断曲线下面积最大。

表2 miRNA-574-3p, AFP, IGF-2单独诊断早期肝癌的诊断效能

项目	AUC	灵敏度(%)	特异度(%)	95%CI
miRNA-574-3p	0.801	80.1	67.6	0.649~0.892
AFP	0.787	76.6	70.4	0.680~0.893
IGF-2	0.762	75.8	75.2	0.640~0.884

2.3 血清miRNA-574-3p, AFP, IGF-2联合诊断的价值评估 见表3,图2。logistic回归模型将miRNA-574-3p和AFP, IGF-2组合获得预测概率,联合诊断早期肝癌的价值分析显示AFP, IGF-2分别联合miRNA-574-3p诊断早期肝癌的曲线下面积为0.870, 0.853,三种联合诊断曲线下面积最大0.917,诊断效能最高。

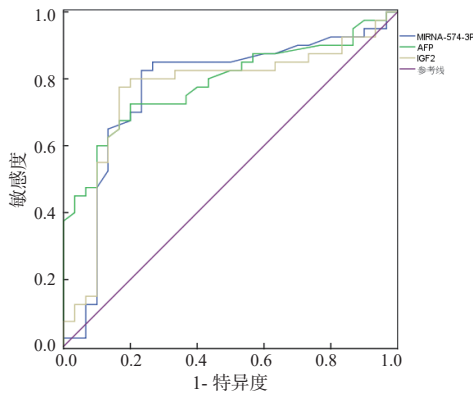


图1 各指标单独诊断早期肝癌的ROC曲线

表3 不同指标组合对早期肝癌的诊断效能

类别	AUC	灵敏度 (%)	特异度 (%)	95%CI
miRNA-574-3p+ AFP	0.870	84.7	70.1	0.784~0.955
miRNA-574-3p+IGF-2	0.853	77.9	74.5	0.762~0.945
miRNA-574-3p+AFP+ IGF-2	0.917	90.2	73.9	0.901~0.998

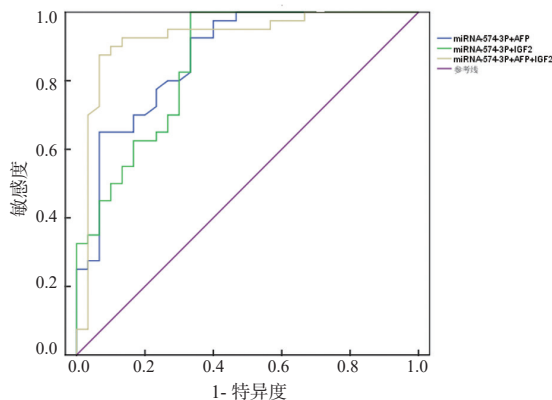


图2 血清学指标联合诊断早期肝癌的ROC曲线

3 讨论

肝癌的高死亡率部分是由于缺乏良好的早期诊断指标所致。AFP可通过诱导淋巴细胞凋亡等途径,导致机体产生免疫抑制反应,同时刺激癌细胞膜受体,促进癌细胞异常增殖,是肝癌目前最常用的特异性肿瘤标志物,对于肝癌的早期筛查也具有重要的意义,但其在慢性肝炎、肝硬化患者以及胃癌、畸胎瘤、胰腺癌、怀孕妇女中也会有所增高。IGF-2主要由肝脏合成,参与肿瘤生长过程,正常生理条件下血清IGF-2含量极低,肝细胞癌变过程中表达呈递增趋势,可能是肝癌早期诊断的标志物^[8],但灵敏度和特异度不高。近几年来,循环miRNA成为了研究的热点,它们可能会成为恶性肿瘤诊断和预后判断的一种很好的无创性标志物^[9]。就肝癌而言miR-34a^[10],miR-498^[11]等被证明可能为肝癌诊断、治疗和预后判断的潜在生物标记。miRNA-574-3p在肝癌中的机制并不十分清

楚,MIZUUCHI等^[12]学者对肝癌患者肝组织做了基因芯片分析,miRNA-574-3p有可能是在肝组织高表达的一个分子,但并没有做进一步研究。GUI^[13]等学者在对肝癌血清标本采用基于qPCR的TaqMan低密度阵列分析(TLDA)时发现肝癌患者血清miRNA-574-3p水平高于正常人,同样对它的诊断价值也没有做进一步评估。ZHA^[14]等通过RT-qPCR检测肝癌组织中miR-574-3p的表达,并使用Cell Counting Kit-8分析法评估了miR-574-3p对细胞生长、迁移影响。发现miR-574-3p在肝癌组织和细胞系中的表达下调。ADAM金属肽酶结构域28(ADAM28)为miR-574-3p靶标。为miR-574-3p/ADAM28信号通路在肝癌中的功能提供了新颖的见解,但对其在血清中的表达水平及对早期肝癌诊断价值未进行研究。本研究探讨了肿瘤标志物AFP,IGF2及血清miRNA-574-3p在早期肝癌患者中的改变,并评价了三者在诊断中的价值。发现早期肝癌组血清miRNA-574-3p的含量明显高于正常对照组,差异均具有统计学意义(均 $P<0.01$)。ROC曲线显示miRNA-574-3p,AFP,IGF2三者单独检测对早期肝癌有较高的预测价值,miRNA-574-3p的曲线下面积AUC=0.801,优于AFP(AUC=0.787)和IGF2(AUC=0.762),说明miRNA-574-3p更具有诊断价值,有可能是早期肝癌的一个重要的诊断指标,另外本研究探讨了AFP,IGF2分别与miRNA-574-3p联合及三者联合诊断的价值,结果显示诊断效能均提高,其中三者联合检测曲线下面积最大为0.917,提示多者联合检测可提高早期肝癌的诊断效能。但由于本研究收集病例数有限,miRNA-574-3p作为早期肝癌的诊断标志物仍需更多实验去验证。另外肝癌病理分型较多,本研究未进行细分,因此后期将针对肝癌病理亚型探究miRNA-574-3p在早期诊断中的作用,并且考虑不同患病时长对诊断的影响,同时对早期肝癌病人进行进一步跟踪,探究临床放化疗、靶向治疗对miRNA-574-3p的影响,以及miRNA-574-3p水平对早期肝癌患者生存期的影响。

综上所述,血清miRNA-574-3p水平在肝癌早期诊断中有一定的价值,相比于标志物AFP,IGF2和miRNA-574-3p诊断价值更高,可通过miRNA-574-3p联合AFP,IGF2共同检测以提高早期肝癌的诊断准确度,为临床诊断提供参考。

参考文献:

- [1] KIM J, KO M E, NELSON R A, et al. Increasing age and survival after orthotopic liver transplantation for patients with hepatocellular cancer[J]. Journal of the American College of Surgeons, 2014, 218(3): 431-438.

- [2] 胡仁智, 赵世巧, 申波, 等. 血清甲胎蛋白及其异质体和异常凝血酶原对原发性肝癌的诊断价值 [J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(8): 634-637.
HU Renzhi, ZHAO Shiqiao, SHEN Bo, et al. Diagnostic value of serum alpha-fetoprotein, alpha-fetoprotein variant and abnormal prothrombin in primary hepatocellular carcinoma [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2019, 27(8): 634-637.
- [3] MARTINEZ-QUETGLAS I, PINYOL R, DAUCH D, et al. IGF2 is up-regulated by epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinomas and is an actionable oncogene product in experimental models [J]. Gastroenterology, 2016, 151(6): 1192-1205.
- [4] ZHANG Haifeng, WANG Yicheng, HAN Yidi. MicroRNA-34a inhibits liver cancer cell growth by reprogramming glucose metabolism [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 4483-4489.
- [5] WANG Jing, LIANG Huimin, GE Haize, et al. MicroRNA-363-3p inhibits hepatocarcinogenesis by targeting HMGA2 and is associated with liver cancer stage [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2): 935-942.
- [6] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范 (2017 年版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(12): 886-895.
Bureau of Medical Administration, National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Guideline and Consensus Diagnosis, management, and treatment of hepatocellular carcinoma (V2017) [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2017, 25(12): 886-895.
- [7] SHEHAB-ELDEEN S, NADA A, ABOU-ELELA D, et al. Diagnostic performance of microRNA-122 and microRNA-224 in hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2019, 20(8): 2515-2522.
- [8] TAI Bojun, YAO Min, ZHENG Wenjie, et al. Alteration of oncogenic IGF-II gene methylation status associates with hepatocyte malignant transformation [J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 2019, 18(2): 158-163.
- [9] 张筱东, 谢星星, 李佳, 等. 血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平检测在胃癌诊断中的应用研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 52-55.
ZHANG Xiaodong, XIE Xingxing, LI Jia, et al. Application study of serum exosome miR-221 and miR-378 detection in the diagnosis of gastric cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(6): 52-55.
- [10] ZHANG Xu, XU Xueying, GE Guohong, et al. miR-498 inhibits the growth and metastasis of liver cancer by targeting ZEB2 [J]. Oncology Reports, 2019, 41(3): 1638-1648.
- [11] ZHANG Haifeng, WANG Yicheng, HAN Yidi. MicroRNA-34a inhibits liver cancer cell growth by reprogramming glucose metabolism [J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(3): 4483-4489.
- [12] MIZUGUCHI Y, MISHIMA T, YOKOMURO S, et al. Sequencing and bioinformatics-based analyses of the microRNA transcriptome in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15304.
- [13] GUI Junhao, TIAN Yaping, WEN Xinyu, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies [J]. Clinical Science (London, England : 1979), 2011, 120(5): 183-193.
- [14] ZHA Zhongming, JIA Fuxin, HU Pingan, et al. MicroRNA-574-3p inhibits the malignant behavior of liver cancer cells by targeting ADAM28 [J]. Oncology Letters, 2020, 20(3): 3015-3023.

收稿日期: 2021-05-25

修回日期: 2021-07-31

(上接第22页)

- [19] TENG F, XU Z Y, LYU H, et al. Triptolide reverses apatinib resistance in gastric cancer cell line MKN45 via inhibition of heat shock protein 70 [J]. Chinese Journal of Oncology, 2018, 40(2): 92-98.
- [20] 缪孟郡, 方志红, 程菁祎. 胃癌患者血清趋化因子 L20, 热休克蛋白 70 的表达及意义 [J]. 医学临床研究, 2019, 36(12): 2346-2348.
MIAO Mengjun, FANG Zhihong, CHENG Qingyi. Serum levels and clinical significance of CCL20 and HSP70 in patients with gastric cancer [J]. Journal of Clinical Research, 2019, 36(12): 2346-2348.
- [21] 赵格, 高琼, 余宗涛, 等. 肺癌患者血浆 miR-3151 表达水平与临床病理特征的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(5): 28-32.
ZHAO Ge, GAO Qiong, YU Zongtao, et al. Study on the correlation between the expression of miR-3151 in plasma and clinicopathological features in patients with lung cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(5): 28-32.
- [22] 黄光墉, 王金生. miR-101 和 miR-25 表达水平对胃癌诊断效果及手术前后变化研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(10): 1720-1722, 1740.
HUANG Guangyong, WANG Jinsheng. The diagnostic significance of miR-101 and miR-25 expression levels on gastric cancer and their changes before and after operation [J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2019, 26(10): 1720-1722, 1740.
- [23] 冯玉梅, 李思颖. 血清 miR-101 与 miR-25 在胃癌手术患者中的检测价值 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15(1): 119-121.
FENG Yumei, LI Siying. Detection value of serum miR-101 and miR-25 in patients undergoing gastric cancer surgery [J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2018, 15(1): 119-121.

收稿日期: 2021-04-26

修回日期: 2021-07-12