

miR-200a 及 AFP 在肝癌、肝硬化患者血清中表达比较分析 *

夏 宁¹ 高 媛² 朱春红³ 王 兴¹ 刘卫辉¹ 王 涛¹ 李海民^{1△}

(1 第四军医大学附属西京医院肝胆胰脾外科 陕西 西安 710032 2 北京军区总医院 263 临床部口腔科 北京 101149 ;

3 总后通州干休所 北京 101147)

摘要 目的 分析 miR-200a 及 AFP 在肝癌、肝硬化患者血清中的表达水平并进行比较,探索其成为肝癌早期诊断血清标志物的可能性。**方法** 临床收集肝正常、肝硬化、肝癌患者血液标本。运用实时定量 PCR 技术检测血清 miR-200a 的相对表达情况,血清 AFP 水平从临床资料中提取。**结果** 临床标本分析结果显示,miR-200a 在肝硬化及肝癌患者中均显著下调 ($P<0.05$),AFP 仅在肝癌患者中出现异常表达。**结论** 血清 miR-200a 极大程度地参与了肝癌发生,对肝硬化及肝癌具有一定的诊断价值。

关键词 肝癌 血清 早期诊断 miR-200a AFP

中图分类号 R735.7,R575.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 09-1668-03

A Comparison Analysis between the Expressions of Serum MiR-200a and AFP in Liver Cirrhosis and Liver Cancer Patients*

XIA Ning¹, GAO Yuan², ZHU Chun-hong³, WANG Xing¹, LIU Wei-hui¹, WANG Tao¹, LI Hai-min^{1△}

(1 Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;

2 Department of Stomatology, PLA263 Hospital, Beijing, 101149, China;

3 Cadre's Relaxing Place of Chief Logistic Ministry, Tongzhou, Beijing, 101147, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to analyze the expression levels of serum microRNA-200a (miR-200a) and AFP in liver cirrhosis and liver cancer patients, and to explore whether miR-200a could be a novel biomarker of liver cancer. **Methods:** Patients with normal liver, liver cirrhosis and liver cancer in clinic were included in this study. Blood samples of the patients were collected for analysis. Real time quantitative PCR technique was used to measure the expression level of serum miR-200a. The AFP expression was got from clinical data. **Results:** Comparing with normal liver patients, miR-200a presented lower expressions in liver cirrhosis patients and liver cancer patients ($P<0.05$), while AFP presented higher expressions only in liver cancer patients ($P<0.05$). **Conclusion:** Data indicated that MiR-200a played an important role in liver cancer development and had diagnostic value for indicating liver cirrhosis and liver cancer.

Key words: Carcinoma, hepatocellular; Serum; Early diagnosis; MiR-200a; AFP

Chinese Library Classification(CLC): R735.7, R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1668-03

肝癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病隐匿,病程进展迅速,一旦出现明显症状,1/3 的患者已属晚期,错过了最佳治疗时机。因此,找出能对肝癌做出早期诊断的方法成为了目前学者们研究的热点。近年来有研究发现肝癌中 miR-200a 表达下调^[1] 通过沉默 miR-200a 的表达,可以促进肝癌的发生^[2]。我课题组在前期进行了 miR-200a 在肝癌组织和癌旁组织中的表达差异研究^[3]以及其在胎肝细胞和肝癌细胞间差异表达谱的研究^[4],由结果推测 miR-200a 很可能极大地参与了肝癌的发生。为了进一步明确 miR-200a 是否参与了肝癌的发生,以及能否成为肝癌早期诊断的又一标志物,我们收集了 36 例临床病例的血样,并对其进行了 miR-200a 相对表达的检测,同时,收集病例 AFP 的表达水平作为对照,以期明确 miR-200a 在肝癌发生及诊断中的作用提供临床数据参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者血清标本来源于第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科 2011 年 8 月-2011 年 12 月肝硬化及肝癌患者,各 12 例,其中原发性肝癌 8 例,继发性肝癌 4 例,所有肝癌患者经彩超、CT、病理检查证实为肝癌。12 例对照正常血清系胆道结石、胆囊炎等非肿瘤疾病手术时留取。36 例患者中,男 24 例,女 12 例 年龄 22~71 岁。

1.2 试剂及仪器

TRI Reagent BD 试剂 (MRC 公司,美国),miR-200a、U6 引物、反转录反应试剂盒、SYBR Green 荧光定量试剂盒 (QIA-GEN 公司,德国),IQ5TM 荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 仪 (Bio-Rad 公司,美国),高速冷冻离心机 Sigma3-18K (Sartorius,德国),紫外分光光度计 Ultrospec (GE Healthcare 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实时定量 PCR 检测临床标本血清 miR-200a 水平 血清

* 基金项目 国家自然科学基金 (81172061), 陕西省自然科学基金 (2011K3-03-04)

作者简介 夏宁 (1982),男,医学硕士,主要研究方向 肝癌的基础与临床研究 E-mail: xn8212@live.cn

△通讯作者 李海民,男,医学博士,教授,主任医师,主要研究方向 肝癌的基础与临床研究 E-mail: lhhaim@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2012-01-03 接受日期 2012-01-15)

RNA 提取：每例临床患者的血液样本收集后在室温下静置 30 min,静置后于 4℃ 1200g 离心 15min,将上层血清吸出移至新的 1.5mlEP 管。所有血清样本冰上放置,每个样本取 250μl 转移到含有 750μl TRI Reagent BD 的新 EP 管中。依照 TRI Reagent BD 提供的方案提取 RNA,所有的 RNA 质量通过分光光度计检测并定量。每个获得的 RNA 沉淀重悬于 20μl DEPC 水,并存放在 -80℃ 冰箱。

反转录反应：1μg 样本总 RNA,1μl miScript Reverse Transcriptase Mix,4μl 5*miScript RT Buffer,DEPC 水,体系为 20 μl。反应条件 37℃ 孵育 60min,95℃ 孵育 5min。反转录产物置于冰上备用。

荧光实时定量检测：10μl SYBR Green PCR Master Mix,2 μl miScript universal primer,2μl specific primer,1μl cDNA 以及 5μl DEPC 水。反应条件 95℃ 15 min 后连续 45 个循环,每个循环内 94℃ 15 s,55℃ 30s,70℃ 30s,总反应体系 20μl。反应结束后分析 PCR 反应曲线,得到 Ct 值。Real-time 分析采用 2^{-ΔΔCt}

法进行。血清 AFP 水平直接从患者检验结果中提取。
1.3.2 统计学分析 各项数据以均数± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,实验数据应用 SPSS13.0 统计软件进行处理,PCR 各组数据间采用单因素方差分析进行比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 血清 miRNA200a 表达变化
三个组的 miR-200a 实时定量 PCR 扩增起峰均在 30 个循环前,符合实时定量 PCR 的实验要求,溶解曲线显示单峰,提示扩增产物特异性良好(图 1)。

三个组之间比较结果显示:与对照组相比,肝硬化患者及肝癌患者血清中 miR-200a 表达均出现显著下调($P<0.05$)。(表 1)。

2.2 血清 AFP 表达变化
AFP 表达在肝癌患者中均有不同程度上调,而在对照组及肝硬化患者中均未见异常(表 1)。

表 1 临床病例血清 miR-200a 相对表达水平、AFP 表达水平 (n=12)
Table 1 The expression levels of serum miR-200a and AFP in patients

	miR-200a (2 ^{-ΔΔCt} 值)	AFP (ng/ml)
Control group	2.445± 0.188	1.867± 0.816
Liver cirrhosis group	1.007± 0.152a	2.344± 0.866
Liver cancer group	0.306± 0.046ab	398.8± 166.2ab

注 a:与对照组比较,P<0.05 b:与肝硬化组比较,P<0.05
Note: a: compared with the control group, P<0.05; b: compared with the liver cirrhosis group, P<0.05

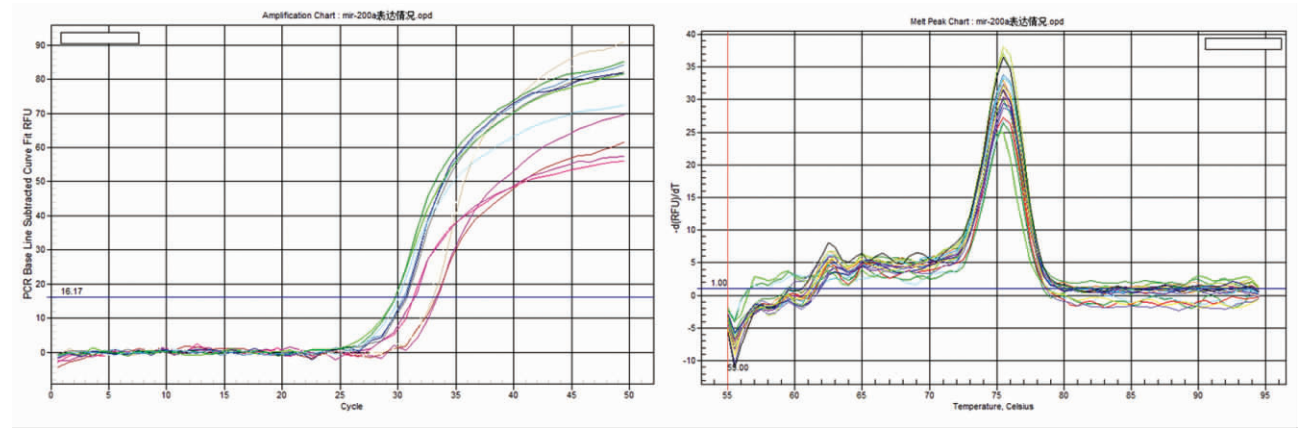


图 1A 图 1B

图 1 miR200a 实时定量 PCR 结果。1A: 扩增曲线;1B: 溶解曲线

Figure 1 Real time quantitative PCR result of miRNA 200a. 1A: Amplification chart; 1B: Melt peak chart

3 讨论

MicroRNAs 是一类非编码 RNA,研究发现,其广泛参与了肿瘤的发生,被认为是潜在的肿瘤生物标志物^[5]。MiR-200a 作为 microRNAs 中的一种,属于 miR-200 家族,已有研究表明其在脑膜瘤^[6]、鼻咽癌^[7]、甲状腺未分化癌^[8]、EB 病毒相关胃癌^[9]、肾透明细胞癌^[10]、卵巢癌^[11]、浸润性宫颈鳞癌^[12]等多种肿瘤的表达均明显低于相应的正常组织。近期许多研究^[1,2,13]还显示其很

可能极大的参与了肝癌的发生。
临床上用于诊断肝癌的血清标志物较多,如 AFP,CEA 等,然而它们均存在着对早期肝癌的诊断敏感度较低、特异性不足等问题。Taketa K^[14]的研究显示,血清 AFP 诊断肝癌的敏感性在 33%~65%之间。国内有报道^[15]称肝癌患者 AFP 阳性率约在 75%~78%左右,这就说明了仍然有相当部分的临床肝癌患者表现为 AFP 阴性^[16,17]。因此,探索出新的肝癌早期诊断标志物刻不容缓。

我实验组在前期实验中,通过比较 7 种 microRNAs 在肝癌组织和癌旁组织中的差异表达、分析其与血清肿瘤标志物的相关性,发现 miR-200a 在肝癌组织和癌旁组织中的表达差异与血清 AFP 呈正相关^[3]。在对胎肝细胞和肝癌细胞间 microRNAs 差异表达谱的研究中也证实,相对于胎肝细胞,miR-200a 表达在肝癌细胞中也是明显下调的^[4]。据此推测,miR-200a 的表达与肝癌的发生具有相关性。

本实验通过收集正常肝脏、肝硬化及肝癌患者的血清,检测其中 miR-200a 的相对表达水平,并将其与血清 AFP 水平进行横向比较,结果显示与正常对照组相比,miR-200a 在肝硬化患者及肝癌患者血清中均出现不同程度下调,而 AFP 在肝硬化患者血清中均未见异常上调,仅在肝癌患者血清中出现上调。这一方面证实了我们的推测,即血清中 miR-200a 的表达水平与肝癌的发生具有相关性;另一方面也显示出 miR-200a 的变化早于 AFP 发生,可能对于肝癌发生发展进程中的肝硬化及肝癌阶段均具有指示作用。众所周知,在临床上,近 80% 的肝细胞癌发生在硬化的基础上,因此可以说诊断出肝硬化,对于肝癌的早期诊断及干预具有非常重要的意义。

目前针对 miR-200a 的研究尚处于初级阶段,但已有结果足以证实 miR-200a 广泛的参与到了肿瘤的发生^[6,7,18]及侵袭转移^[19,20]等重要环节,这也激励着学者们开展更为广泛深入的研究工作,力争早日将科研成果为临床所用。本实验由于实验时间及条件的限制,仅对 36 例病例进行了初步的检测,且对于 miR-200a 的检测分析为相对表达分析,未深入到定量检测,后期尚需要大量的、深入的研究对本实验结果加以验证和补充。

参考文献 (References)

- [1] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6: 259-269
- [2] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, et al. MicroRNAs in plants [J]. Genes Dev, 2002, 16: 1616-1626
- [3] 张明, 刘卫辉, 尤楠, 等. 7 种 microRNAs 在原发性肝癌组织和癌旁组织间的差异表达及与血清肿瘤标志物水平的相关性研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2010,17: 562-566
Zhang Ming, Liu Wei-hui, You Nan, et al. Differential Expressions of Seven MicroRNAs Between Primary Hepatocellular Carcinoma and Adjacent Nontumorous Tissues and Their Correlations with Levels of Tumor Markers in Serum [J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2010,17: 562-566
- [4] 刘卫辉, 吴印涛, 李韧, 等. 大鼠肝癌细胞与胎肝细胞间抑癌微小 RNAs 的表达差异 [J]. 中华肝脏病杂志, 2009,17: 137-138
Liu Wei-hui, Wu Yin-tao, Li Ren, et al. Expression profiling of microRNAs in rat hepatocarcinoma cells and fetal hepatocytes [J]. Chinese Journal of Bepatology, 2009,17: 137-138
- [5] Jay C, Nemunaitis J, Chen P, et al. MiRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer [J]. DNA Cell Biol, 2007, 26: 293-300
- [6] Saydam O, Shen YP, Wü rding T, et al. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Mol Cell

Biol, 2009, 29: 5923-5940

- [7] Xia HP, Ng SS, Jiang SS, et al. MiR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391: 535-541
- [8] Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H, et al. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas [J]. Oncogene, 2010, 29: 4237-4244
- [9] Shinozaki A, Sakatani T, Ushiku T, et al. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma [J]. Cancer Res, 2010, 70: 4719-4727
- [10] Liu HQ, Brannon AR, Reddy AR, et al. Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma [J]. BMC Syst Biol, 2010, 4: 51
- [11] Hu X, Macdonald DM, Huettner PC, et al. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2009, 114: 457-464
- [12] Lee JW, Choi CH, Choi JJ, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 : 2535-2542
- [13] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10: 593-601
- [14] Taketa K. Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology [J]. Hepatology, 1990, 12: 1420-1432
- [15] 邵浙新, 徐骁, 郑树森, 等. 肝细胞癌患者肝移植术后甲胎蛋白的变化与肿瘤复发 [J]. 中华普通外科杂志, 2006, 21: 351-353
Shao Zhixin, Xu Xiao, Zheng Shusen, et al. Serum α -fetoprotein alterations and tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma patients [J]. Chinese Journal of General Surgery, 2006,21: 351-353
- [16] 劳明, 朱波, 黄玲莎, 等. 三种肿瘤标志物联合检测对原发性肝癌的诊断价值 [J]. 中华消化杂志, 2005, 25: 109-110
Lao Ming, Zhu Bo, Huang Lingsha, et al. Diagnostic value of three kinds of tumor markers in primary hepatic carcinoma. Chinese Journal of Digestion [J]. 2005,25: 109-110
- [17] 马京香, 宫奇林, 林梅青, 等. 多项肿瘤标志物联合检测早期诊断原发性肝癌的研究 [J]. 中华外科杂志, 2000,38: 14-16.
Ma Jingxiang, Gong Qilin, Lin Meiqing, et al. Combined five tumor markers in detecting primary hepatic carcinoma. Chinese Journal of Surgery [J]. 2000,38: 14-16
- [18] Uhlmann S, Zhang JD, Schwäger A, et al. miR-200bc/429 cluster targets PLC gamma and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer [J]. Oncogene, 2010, 29: 4297-4306
- [19] Park SM, Gaur AB, Lengyel E, et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 [J]. Genes Dev, 2008, 22: 894-907
- [20] Gibbons DL, Lin W, Creighton CJ, et al. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression [J]. Genes Dev, 2009, 23: 2140-2151