

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.005

## miR-224 在原发性肝癌患者血清中的表达及意义\*

郭晓东 余灵祥 杨 美 郭超楠 李志伟<sup>△</sup>

(解放军第 302 医院 北京 100039)

**摘要 目的:** 原发性肝癌 (primary hepatocellular carcinoma, PHC) 作为常见的恶性程度极高的肿瘤, 严重威胁着人类的生命。miR-224 是近年来发现的一个肿瘤相关 miRNA 分子, 在肿瘤的发生及发展过程中发挥着重要的作用。本研究通过测定原发性肝癌患者血清中 miR-224 的表达水平, 探讨血清 miR-224 与原发性肝癌预后的关系。**方法:** 采用实时荧光定量 RT-PCR (Real-time RT-PCR) 方法, 分别检测 40 例原发性肝癌患者, 20 例慢性肝炎患者, 20 例慢性肝硬化患者及 20 例正常人的血清标本中 miR-224 的表达水平。分析血清 miR-224 的表达水平与 AFP 和 MMP-9 的相关性。**结果:** 原发性肝癌患者血清 miR-224 的表达水平明显高于正常人、慢性肝炎和慢性肝硬化患者 ( $P<0.05$ )。皮尔森相关分析结果显示原发性肝癌患者血清 miR-224 的表达与 AFP 和 MMP-9 呈正相关。血清 miR-224 低表达组术后复发 / 转移率显著低于高表达组, 术后生存率则高于高表达组 ( $P<0.01$ )。**结论:** miR-224 在原发性肝癌患者的血清中呈高表达, 其血清表达水平与原发性肝癌的临床预后密切相关。这提示我们, miR-224 可能成为新的原发性肝癌检测标记物和潜在的原发性肝癌预后分子标志物。

**关键词:** 原发性肝癌; 血清; miR-224; 预后

**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)04-621-03

## Expression and Significance of miR-224 in Serum on Primary Hepatocellular Carcinoma\*

GUO Xiao-dong, YU Ling-xiang, YANG Mei, GUO Chao-nan, LI Zhi-wei<sup>△</sup>

(302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

**ABSTRACT Objective:** As a common malignant tumor, the primary liver cancer (primary hepatocellular carcinoma, PHC) has seriously threatened the human life. Recently, miR-224 has been discovered as the relative micromRNAs molecules of tumor that played an important role on the occurrence and development process of tumor. This research aims to investigate the expression of miR-224 in serum on primary hepatocellular carcinoma, as well as the relationship with the prognosis of primary hepatocellular carcinoma. **Methods:** The blood samples were collected from 40 patients with PHC, 20 patients with chronic hepatitis, 20 patients with chronic hepatic cirrhosis and 20 healthy people. The expression levels of miR-224 in the serum were measured by reverse transcription polymerase chain reaction. The correlations of miRNA-224 expression, traumatic injury and the prognosis of primary hepatocellular carcinoma were analyzed. **Results:** The expression level of miR-224 in patients with PHC was significantly higher than those of patients with benign diseases and healthy people ( $P<0.05$ ). Pearson's correlation analysis showed that the expression of miR-224 in serum had a close correlation with AFP and MMP-9 ( $P<0.05$ ). The recurrent/metastatic of PHC patients with a lower miR-224 expression level was lower than those of people with higher expression, while the survival time of PHC patients with a lower miR-224 expression level was longer than those of people with a higher level expression ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The expression of miR-224 in serum is high and it is closely relative to the prognosis of PHC which could be the potential marker for PHC and the target for treatment.

**Key words:** Primary hepatocellular carcinoma; Serum; MiR-224; Prognosis

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

**Article ID:** 1673-6273(2014)04-621-03

## 前言

原发性肝癌(Primary hepatocellular carcinoma, PHC)是最常见的恶性肿瘤之一, 发病隐匿、进展快、预后差且死亡率高<sup>[1]</sup>。近年来, 肿瘤相关 miRNA 的研究已成为肿瘤研究领域中的一个热点<sup>[2]</sup>。MicroRNA 是广泛存在于真核生物中的一类内源性非

编码单链小分子 RNA, 通过与目标 mRNA 分子的 3'-UTR 完全或不完全的互补结合, 能够抑制靶基因的表达水平<sup>[3]</sup>。miRNAs 可参与调控生物体发育、细胞增殖、分化和凋亡等一系列重要的生理病理过程<sup>[4]</sup>。大量研究表明, miRNAs 在肝癌组织和细胞中呈异常表达, 提示其可能参与肝细胞癌变的病理过程<sup>[5,6,8]</sup>。miR-224 被证实是肿瘤相关的一个 miRNA 分子, 在多种恶性

\* 基金项目: 解放军第 302 医院院内课题(YNKT2012039)

作者简介: 郭晓东(1981-), 主治医师, 主要研究方向: 肝病的诊断及治疗, E-mail: gxd302@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者: 李志伟, 主任医师, E-mail: laohushanshang@163.com

(收稿日期: 2013-08-15 接受日期: 2013-08-31)

肿瘤组织(如胃癌、胰腺癌、肝癌、结直肠癌)中呈高表达<sup>[7]</sup>。研究表明,原发性肝癌患者血清中的 miRNAs 会出现明显的变化,而这种变化与原发肝癌的发生发展及预后密切相关<sup>[8]</sup>。本文通过检测 PHC 患者血清 miR-224 的表达水平,探讨 miR-224 在 PHC 的诊断和治疗中的价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集我院 2010 年 10 月~2011 年 12 月接受手术治疗的 40 例 PHC 患者血清样本。所有 PHC 患者均经组织病理学检测证实为肝细胞肝癌,诊断均符合 2001 年肝癌临床诊断标准和临床分期。另选取 20 例正常人,20 例慢性肝炎患者,20 例慢性肝硬化患者血清标本作为对照。所有实验对象均空腹采集静脉血 3 mL,置于室温下 1 h。1500 rpm/min 离心 15 min,取上清(血清)置于新 1.5 mL 微量离心管。放入 -80℃ 冰箱待实验。

### 1.2 主要试剂及仪器

RNAisoTMPlus 和 RT-PCR 试剂盒均购于 Takara 公司; mirVana TMmiRNA Isolation Kit 购于 Ambion 公司。miR-224 及 U6 引物序列由上海阅微基因技术有限公司设计;ABI PRISM 7900 实时荧光定量 PCR 仪由 ABI 公司提供。

### 1.3 RT-PCR 检测血清 miR-224 的表达

**1.3.1 血清总 RNA 的提取** Trizol 一步法提取细胞中总 RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,用分光光度计定量,1.5%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。将提取出的 RNA 样品保存于 -80℃ 冰箱以备下一步实验使用。

**1.3.2 miRNA 的 cDNA 合成** 按照 miScript Reverse Transcription Kit 的说明进行操作。Total RNA 1  $\mu$ L/Conc, 5 $\times$  miScript RT Buffer 41  $\mu$ L, miScript Reverse Transcriptase Mix 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 至总体积 20  $\mu$ L。在 Gene Amp PCR System 9700 进行 RT 反应。37℃, 60 min; 95℃, 5 min 使反转录酶活性丧失。

**1.3.3 miRNA RealTime PCR 反应** 以 U6 为内参基因,建立 20  $\mu$ L 反应体系:通用引物 1  $\mu$ L, 目的引物 1  $\mu$ L, RNase free H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ L, 模板 CDNA 1  $\mu$ L。反应条件如下: 95℃, 15 min; 40 个 PCR 循环(95℃, 30 s; 56℃, 20 s; 72℃, 20 s); 95℃, 30 s; 60℃, 30 s; 90℃, 30 s。数据采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法(CT 值定义为每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数)对 miR-224 的表达进行分析。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组数据的组间差异分析采用 2 检验, Kaplan-Meier 法计算复发转移率与术后生存率, 皮尔森相关分析评估血清 miR-224 的表达水平与 AFP 和 MMP-9 的相关性,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PHC 患者与肝良性病、正常人血清 miR-224 表达情况对比

通过 RT-PCR 检测各组血清 miR-224 表达的 CT 值。以 U6 为内参基因,经  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算, PHC 患者血清 miR-224 表达量为  $(0.97\pm 0.18)$ , 较正常人、慢性肝炎患者和慢性肝硬化患者

血清 miR-224 表达量  $(0.27\pm 0.05)$ 、 $(0.29\pm 0.07)$  和  $(0.31\pm 0.09)$  明显上调( $P<0.01$ )。而正常人、慢性肝炎患者和慢性肝硬化患者血清 miR-224 的表达比较则无明显差异( $P>0.05$ )(图 1)。

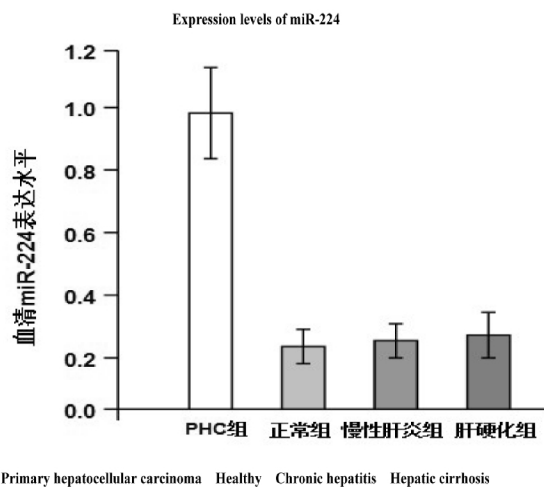


图 1 各组血清 miR-224 水平表达情况

Fig.1 The expressions of miR-224 in different serums

### 2.2 血清 miR-224 的表达与 AFP 和 MMP-9 的相关性分析

皮尔森相关分析结果显示血清中 miR-9 的表达与 AFP 的相关系数  $r=0.73$ , 和 MMP-9 的相关系数  $r=0.78$ , 呈正相关( $P<0.05$ )。

### 2.3 血清 miR-224 的表达水平与 PHC 预后的关系

取 40 例 PHC 患者血清 miR-224 表达量的平均值作为划分标准,将这组患者分为 miR-224 高表达组和低表达组,其中高表达组 18 例,低表达组 22 例。通过一年的随访,结果显示:血清 miR-224 高表达组的复发/转移率明显高于低表达组;血清 miR-224 低表达组的生存率明显高于高表达组 ( $P<0.05$ )(图 2)。

## 3 讨论

近年来,随着肿瘤分子生物学检测技术的发展,血清学肿瘤标记以方便和非侵入性的优势成为检测肿瘤的重要方法之一<sup>[11]</sup>。研究发现,肿瘤患者血清中 miRNAs 呈异常变化,而这种改变与肿瘤的发生、发展、复发、转移及预后密切相关<sup>[12]</sup>。因此,科学家们推测肿瘤患者血清 miRNAs 具有肿瘤特异性,有可能作为一种新型的肿瘤标志物<sup>[13]</sup>。

原发性肝癌因起病隐匿、发展迅速、死亡率高而被称为“癌症之王”<sup>[14]</sup>。由于 PHC 早期的临床症状不典型,常常被患者和医生忽视而延误诊断。因此,临床上急待开发一种特异性和灵敏性较高的肿瘤标志物来进一步提高对 PHC 的早期诊断<sup>[15]</sup>。据相关研究报道,肿瘤相关细胞的血清中存在多个可能成为 PHC 肿瘤标志物的 miRNAs, 如 miR-17-5p, miR-122, miR-18a 和 miR-221 等<sup>[16]</sup>。这些 miRNAs 在 PHC 患者血清中表达较正常人差异显著,手术切除肿瘤后其血清表达水平会发生显著改变。而且其在血清中的表达水平与 PHC 的临床病理特征及患者术后复发、转移和生存时间有关<sup>[17]</sup>。

miR-224 是近年来发现的一个肿瘤相关 miRNA 分子,在肿瘤的发生发展过程中发挥“促癌基因”的功能。经研究证实,

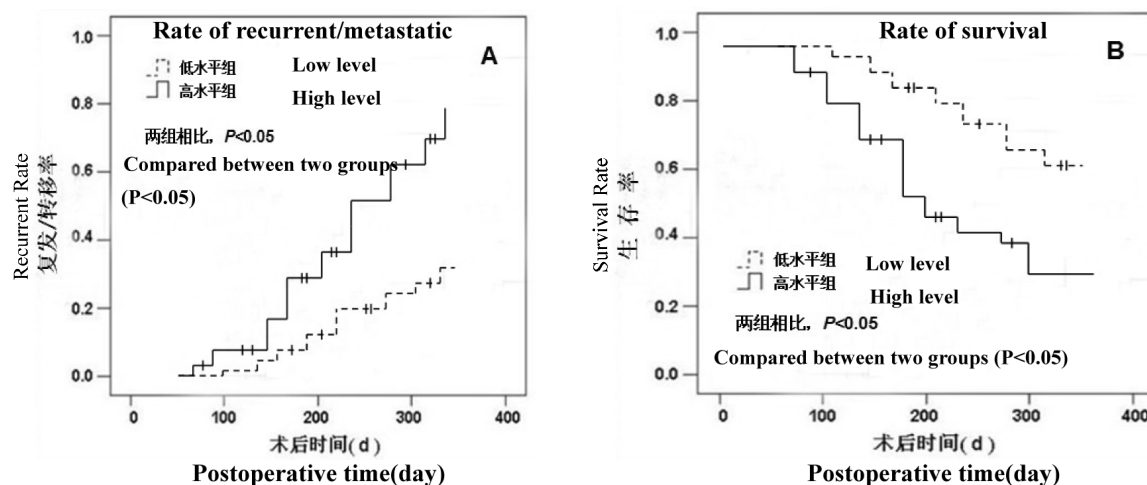


图2 血清 miR-224 水平与术后复发 / 转移和生存率的关系

A 血清 miR-224 水平与术后复发 / 转移的关系; B 血清 miR-224 水平与术后生存率的关系

Fig.2 Relationship of miR-224 expression levels and the rate of recurrent/metastatic and survival

A Rate of recurrent/metastatic; B Rate of survival

miR-224 在胃癌、胰腺癌、肝癌、结直肠癌和宫颈癌等恶性肿瘤的细胞组织中明显高表达。在宫颈癌组织中, 呈高表达的 miR-224 与肿瘤进展和患者预后密切相关, 提示我们 miR-224 可能是判断宫颈癌预后的独立指标<sup>[18]</sup>。另有研究发现, miR-224 对 PHC 肿瘤细胞的迁移和侵袭能力有明显的促进作用, 是调控 PHC 细胞迁移和侵袭能力的一个新型分子, 但其致癌机制目前尚未完全明确<sup>[19,20]</sup>。

本次研究, 我们采用 Realtime PCR 技术分析 PHC 患者与肝良性病、正常人血清 miR-224 表达情况。结果显示, PHC 患者血清中 miR-224 表达水平明显高于慢性肝炎患者、慢性肝硬化患者和健康人群的水平。此外, 我们采用皮尔森相关分析血清 miR-224 与目前公认的 PHC 血清标志物 AFP 和 MMP-9 之间的关系。说明血清 miR-224 的表达与 AFP 和 MMP-9 存在明显的正相关。提示我们, miR-224 具有作为诊断 PHC 的血清学肿瘤标记物的潜能。通过对病例进行随访, 发现血清 miR-224 高表达组的复发 / 转移率明显高于低表达组; 血清 miR-224 低表达组的生存率明显高于高表达组 ( $P < 0.05$ )。这说明 miR-224 不仅能够有效诊断 PHC, 而且可以作为评估 PHC 预后的有价值的标志物。

随着对血清源性 miR-224 的生成机制和生物学功能与疾病之间的关系的逐步阐明, 基础实验和临床研究的深入研究, 我们可以相信, 血清 miR-224 将在 PHC 诊断和治疗领域展示出广阔的临床应用前景。

#### 参考文献(References)

- [1] 郭晓东, 杨美, 皋月娟, 等. 肝癌患者血清乙肝病毒特异性 miRNAs 水平指标检测与术后肿瘤复发的相关性研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(9): 1742-1743, 1724
- Guo Xiao-dong, Yang Mei, Gao Yue-juan, et al. The Relationship between Expression of Serum Hepatitis B Virus (HBV)-specific miRNAs and the Recurrence after Surgical Resection for Patients with Hepatocellular Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(9): 1742-1743, 1724
- [2] 郭晓东, 熊璐, 张红萍, 等. miRNA-181 在肝癌中表达变化的研究 [J].

现代生物医学进展, 2013, 13(5): 869-871

- Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zhang Hong-ping, et al. Expression of miRNA-181 in Hepatocellular Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(5): 869-871
- [3] 郭晓东, 杨美, 皋月娟, 等. 实时定量 PCR 检测 miRNA-29a 在肝癌中的变化 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(8): 1484-1485, 1589
- Guo Xiao-dong, Yang Mei, Gao Yue-juan, et al. Expression of miRNA-29a in Hepatocellular Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(8): 1484-1485, 1589
- [4] Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zou L, et al. L1 cell adhesion molecule overexpression in hepatocellular carcinoma associates with advanced tumor progression and poor patient survival [J]. Diagn Pathol, 2012, 13, 7: 96
- [5] Guo Xiao-dong, Xiong Lu, Zou L, et al. Upregulation of Bone morphogenetic Protein 4 is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma [J]. Pathology & Oncology Research, 2012, 18(3): 635-640
- [6] Boguslawska J, Wojcicka A, Piekietko-Witkowska A, et al. MiR-224 targets the 3'UTR of type 1 5'-iodothyronine deiodinase possibly contributing to tissue hypothyroidism in renal cancer [J]. PLoS One, 2011, 6(9): 24541
- [7] Slotta-Huspenina J, Berg D, Bauer K, et al. Evidence of prognostic relevant expression profiles of heat-shock proteins and glucose-regulated proteins in oesophageal adenocarcinomas [J]. PLoS One, 2012, 7(7): 41420
- [8] Zhu H T, Dong Q Z, Sheng Y Y, et al. MicroRNA-29a-5p is a novel predictor for early recurrence of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after surgical resection [J]. PLoS One, 2012, 7(12): 52393
- [9] Hayes C N, Akamatsu S, Tsuge M, et al. Hepatitis B virus-specific miRNAs and Argonaute2 play a role in the viral life cycle [J]. PLoS One, 2012, 7(10): 47490
- [10] Castagnino P, Kothapalli D, Hawthorne E A, et al. miR-221/222 compensates for Skp2-mediated p27 degradation and is a primary target of cell cycle regulation by prostacyclin and cAMP [J]. PLoS One, 2013, 8(2): 56140

(下转第 655 页)

- cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy[J]. *J Pathol*, 2002, 196: 374-379
- [4] Yasuma T, Koh S, Okamura T, et al. Histological changes in aging lumbar intervertebral discs. Their role in protrusions and prolapses [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1990, 72(2): 220-229
- [5] Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc [J]. *Spine*, 2007, 32(23): 2537-2544
- [6] Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects[J]. *Spine*, 2010, 35(26): 2259-2265
- [7] Feng G, Yang X, Shang H, et al. Multipotential differentiation of human annulus fibrosus cells: an in vitro study[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, 92(3): 675-685
- [8] Henriksson HB, Thornemo M, Karlsson C, et al. Identification of Cell Proliferation Zones, Progenitor Cells and a Potential Stem Cell Niche in the Intervertebral Disc Region: A Study in Four Species[J]. *Spine*, 2009, 34: 2278-2287
- [9] Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels[J]. *Cell*, 1982, 30: 215-224
- [10] Thornemo M, Tallheden T, Sjogren JE, et al. Clonal populations of chondrocytes with progenitor properties identified within human articular cartilage[J]. *Cells Tissues Organs*, 2005, 180: 141-150
- [11] Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality [J]. *Stem Cells*, 2002, 20: 530-541
- [12] Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects[J]. *Spine*, 2010, 35: 2259-2265
- [13] Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9: 204-214
- [14] Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8: 315-317

(上接第 623 页)

- [11] Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation [J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 330-334
- [12] Shen S N, Wang L F, Jia Y F, et al. Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer[J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8: 69
- [13] Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, et al. Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 565-575
- [14] Wang Y, Lee C G. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: a tool for possible therapeutic intervention?[J]. *Epigenomics*, 2011, 3(2): 235-243
- [15] Santhekadur PK, Das SK, Gredler R, et al. Multifunction protein Staphylococcal Nuclease Domain Containing-1 (SND1) promotes tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma through a novel pathway that involves Nuclear Factor  $\kappa$ B and miR-221[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(17): 13952-13958
- [16] Ray S S, Pal J K, Pal S K. Computational approaches for identifying cancer miRNA expressions[J]. *Gene Expr*, 2012, 15(5-6): 243-253
- [17] Shih TC, Tien YJ, Wen CJ, et al. MicroRNA-214 down regulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 584-591
- [18] Wang R, Zhao N, Li S, et al. MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2 and CDC42[J]. *Hepatology*, 2013, 58(2): 642-653
- [19] Li D, Liu X, Lin L, et al. MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(42): 36677-36685
- [20] He XX, Chang Y, Meng FY, et al. microRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo[J]. *Oncogene*, 2012, 31(28): 3357-3369