

miR-143在HCC组织中的表达及其临床意义

丁隆¹, 杨宇², 曲义坤¹, 徐剑¹, 刘伟新¹, 张英海¹ (1.佳木斯大学附属第一医院 普外二科, 黑龙江 佳木斯 154007; 2.佳木斯大学基础医学院 局部解剖教研室, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 目的 通过检测肝细胞肝癌(HCC)组织中microRNA-143(miR-143)的表达,探讨miR-143在HCC侵袭转移过程中的作用。方法 收集45例HCC组织和对应的癌旁肝组织标本,采用实时荧光定量PCR(qPCR)法检测上述组织中miR-143的表达,并分析其与HCC的临床病理学参数及HBV的关系。结果 癌旁肝组织中无miR-143表达的病例,HCC组织中miR-143的阳性表达率为88.89%(40/45)。miR-143的表达与肿瘤数目、肿瘤包膜、门静脉癌栓、癌细胞分化、远处转移和肿瘤分期呈显著相关($P < 0.05$),而与患者年龄、性别、肿瘤直径和HBV感染无关($P > 0.05$);miR-143表达阳性与阴性的HCC患者3年生存率分别为89.12%、32.56%,差异有统计学意义($P < 0.005$)。结论 miR-143表达可能与HCC的侵袭转移有关,miR-143可作为预测HCC预后的标志物。

关键词: 癌,肝细胞;microRNA-143;预后

Expression and clinical significance of microR-143 in hepatocellular carcinoma tissue

DING Long¹, YANG Yu², QU Yi-kun¹, XU Jian¹, LIU Wei-xin¹, ZHANG Ying-hai¹ (1.The Second Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2.Department of Regional Anatomy Teaching and Research, Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

Abstract: Objective To explore the possible function and significance of miR-143 expression by detecting the miR-143 expression in carcinoma and the corresponding para-carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma.

Methods Total of 45 samples of HCC and the corresponding para-carcinoma tissues were collected from our hospital, and the real-time quantitative reverse transcription (qRT-PCR) was used to test the miR-143 expression. The correlation between the miR-143 expression and the clinical pathological parameters of HCC was analyzed. **Results** There was no miR-143 expression in the corresponding para-carcinoma tissues, and the positive expressing rate of miR-143 in HCC tissues was 88.89% (40/45). It's been showed positive correlation between the miR-143 expression and the tumor number, tumor capsule, portal vein tumor thrombus, tumor differentiation grade, distant metastasis and tumor stage (all $P < 0.05$), but no correlation between the miR-143 expression and the age, sexuality, tumor diameter, HBV infection (all $P > 0.05$). MiR-143 expression of positive and negative of HCC patients with 3 year survival rates were 89.12%, 32.56%, the difference was statistically significant ($P < 0.005$). **Conclusions** miR-143 may contribute to the invasion and metastasis of HCC and was an biological marker for predicting the prognosis of HCC.

Key words: Cancer, hepatocyte; microRNA-143; Prognosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一,居于癌症相关死亡原因的第二位^[1]。HCC易于转移是肝癌患者失去最佳治疗时机和死亡的最主要原因。因此,探索肝癌发生、发展和侵袭转移的分子机制,寻找新的预后判断标志物和防治靶点,对提高肝癌治愈率具有重要的临床意义。HCC侵袭转移是一个多因素、多基因参与的复杂过程,但具体机制尚不完全清楚。微

RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为21~23个核苷酸的内源性小分子RNA,通过降解mRNA和(或)抑制mRNA翻译等方式参与调控生物体发育、基因表达、细胞分化、上皮-间叶表型转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、细胞增殖与凋亡及恶性肿瘤的侵袭转移等多种生物学过程。迄今共发现并克隆出约17 000多种miRNA^[2]。研究表明,一些microRNA参与了HCC的发生、发展和侵袭转移过程^[3-7]。本研究应用实时荧光定量PCR(real-time quantification polymerase chain reaction,

qPCR)检测HCC及癌旁肝组织中miR-143的表达,并分析其与临床病理参数和HBV感染的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2007年1月2010年12月本院行手术切除的45例HCC患者的组织标本,对应的癌旁组织作为对照,术前未做任何放疗及化疗。收集患者的临床资料、术中探查情况及术后病理和随访资料,术后测量肿瘤直径。合并HBV感染者给予抗病毒治疗。本课题研究已获得佳木斯大学附属医院伦理委员会批准。所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取 用Invitrogen公司Trizol试剂盒,按说明书提取RNA,并用Nano Drop ND-1000分光光度计测定含量和纯度。所提取的总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,−80℃保存待用。

1.2.2 cDNA合成 1μg总RNA,加入Oligo(dT) 1μg,补充DEPC水补至11μl。混合物在70℃孵育5分钟后,依次加入5×Reaction Buffer 4μl, 4×10mM dNTP 2μl、RNasin 0.5μl,补充DEPC水至19μl, 37℃孵育5分钟;加入MuLV Reverse Transcriptase 1μl, 42℃保温60分钟, 95℃灭活5分钟, −70℃保存备用。

1.2.3 实时荧光定量PCR 用TaqMan探针法检测miR-143的表达。miR-143和内参U6的引物探针由ABI公司合成。反应体系为TaqMan Universal PCR Master Mix (2×) 25μl, Assay Mix (20×) 2.5μl, H₂O 17.5μl, cDNA 5μl。反应条件: 95℃ 10分钟, (95℃ 15秒, 60℃ 1分钟)×40循环。仪器为ABI公司7500型Real-time PCR仪。

1.2.4 结果计算 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析。肿瘤组织 $\Delta CT = \Delta CT_{miR-143} - \Delta CT_{U6}$; 癌旁组织 $\Delta CT = \Delta CT_{miR-143} - \Delta CT_{U6}$; $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{肿瘤} - \Delta CT_{癌旁}$, 目标基因表达 $= 2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

1.3 统计学处理 采用SPSS 18.0软件进行数据处理, miR-143表达与临床病理指标关系的比较采用 χ^2 检验, 采用Kaplan-Meier法进行生存分析, Pearson相关进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-143在HCC中的表达及其与临床病理参数的关系 Real-time PCR检测发现miR-143在HCC组织中

的表达显著高于癌旁组织($P < 0.05$), 见图1。miR-143表达与肿瘤数目、肿瘤包膜、门静脉癌栓、癌细胞分化、远处转移和肿瘤分期呈显著相关($P < 0.05$), 而与患者年龄、性别、肿瘤直径和是否HBV感染无关($P > 0.05$), 见表1。

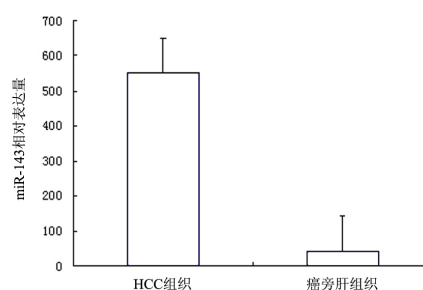


图1 miR-143在HCC及癌旁肝组织标本中的相对表达强度
注: $P < 0.05$

2.2 生存分析 miR-143表达阳性与阴性的HCC患者3年生存率分别为89.12%和32.56%, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

miR-143是广泛存在于人类各种细胞中的一种microRNA。Michael等^[8]首先报道了miR-143在结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、淋巴瘤等恶性肿瘤细胞中低表达, 而Zhang等^[9]研究发现HCC细胞中miR-143表达上调, 与本研究结果一致。Sara等^[9]等研究发现, miR-143在上皮型、中间型和肉瘤型间皮瘤中的表达降低, 且与间皮瘤的恶性程度呈负相关, 而Slaby等^[10]发现, miR-143和miR-145在肿瘤直径> 50mm的结直肠癌组织中的表达水平低于直径< 50mm的结直肠癌组织。Akao等^[11]发现miR-143在结肠癌细胞株DLD-1和SW480的表达水平显著降低, 而Bandres等^[12]报道在包括DLD-1和SW480等15种被检测的结肠癌细胞株中未检测到miR-143的表达。Nakajima等^[13]声称日本患者的临床结肠肿瘤标本中miR-143的表达水平未见明显改变。Budhu等^[14]检测241例乙型病毒性肝炎肝硬化患者的miR-143表达, 并未发现表达下调, 而Murakami等^[15]发现在慢性乙型病毒性肝炎患者中miR-143表达下调而在肝硬化患者中表达上调。结果不一致的原因可能有以下几方面: 肿瘤标本中某些miRNAs的表达可能来源于不同生物体体内; 在微阵列分析中标本来源、杂交条件等方面存在差异; 这

表 1 miR-143表达与HCC临床病理参数的关系（例）

病理参数		miR-143		χ^2	P
		表达	无表达		
性别	男	29	7	2.746	0.572
	女	7	2		
年龄	≤ 60岁	31	10	1.056	0.865
	> 60岁	3	1		
HBV感染	HBsAg阳性	30	7	1.324	0.724
	HBsAg阴性	6	2		
肿瘤直径	≤ 5 cm	8	2	2.452	0.531
	> 5 cm	28	7		
肿瘤数目	1个	25	9	0.084	0.002
	> 1个	8	3		
肿瘤包膜	完整	19	7	16.751	0.000
	不完整	14	5		
分期	I 或 II	11	4	22.192	0.000
	IIIa或IIIb	22	8		
分化	低	14	5	6.487	0.039
	中	10	3		
	高	12	1		
癌栓	有	10	4	15.934	0.000
	无	23	8		

种差异可能是因microRNAs具有多功能的属性^[7]。据报道^[16]，miR-143除了参与癌症的生物学行为之外，还通过靶向Erk5基因在脂肪细胞的分化中发挥重要作用。因此，miR-143通过靶向不同靶基因的表达在调控细胞生物学方面具有相当的潜能。

本研究结果表明，miR-143在HCC组织中的表达高于癌旁肝组织，而且miR-143表达与HCC的低分化、晚分期、3年生存期比率低和多个肿瘤数目（微卫星灶）、血管侵犯（癌栓）等代表恶性程度高的临床病理特征呈显著相关，且miR-143表达水平越高，HCC患者的预后越差。提示miR-143可能参与了HCC的侵袭和转移过程，但具体的分子机制尚待进一步的研究。Zhang等^[7]研究发现有一条由miR-143介导、NF-κB参与的特异而复杂的信号转导网络参与了促进HBV相关HCC的转移。

上皮-间叶表型转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT），是上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间充质细胞转分化的现象，这一概念是Green-berg和Hay在1982年首先提出的^[17]。EMT起初是在胚胎发育过程中观察到的现象，即细胞失去上皮特性并获得间质细胞的属性，细胞迁移和侵袭活性增加。EMT使上皮来源的肿瘤细胞能改变表型成为更原始、更容易迁移和侵袭的间叶表型细胞^[18]。EMT是恶性肿瘤侵袭转移的重要机制之一，而

NF-κB是EMT下游信号转导通路中的一个关键转录因子^[19]。因此笔者假设miR-143启动了受NF-κB介导的EMT过程，从而促进HCC侵袭和转移，这是本课题组下一步需要的验证的实验研究。

参考文献

- [1] Tan A, Yeh SH, Liu CJ, et al. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer[J]. Liver Int,2008,28:175-788.
- [2] Zare-Shahabadi A, Renaudineau Y, Rezaei N. MicroRNAs and multiple sclerosis: from physiopathology toward therapy[J]. Expert Opin Ther Targets,2013,17:1497-507.
- [3] Lin J, Huang S, Wu S, et al. MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis,2011,32:1641-1647.
- [4] 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,2012,31:3357-3369.
- [5] Kong G, Zhang J, Zhang S, et al. Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model[J]. PLoS One,2011,6:e19518.
- [6] Zheng F, Liao YJ, Cai MY, et al. The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2[J]. Gut,2012,61:278-289.
- [7] Zhang X, Liu S, Hu T, et al. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression[J]. Hepatology,2009,50:490-499.
- [8] Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia[J]. Mol Cancer Res,2003,1:882-891.
- [9] Busacca S, Germano S, De Cecco L, et al. MicroRNA signature of malignant mesothelioma with potential diagnostic and prognostic implications[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2010,42:312-319.
- [10] Slaby O, Svoboda M, Fabian P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer[J]. Oncology,2007,72:397-402.
- [11] Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers[J]. Oncol Rep,2006,16:845-850.
- [12] Bandre's E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues[J]. Mol Cancer,2006,5:29.
- [13] Nakajima G, Hayashi K, Xi Y, et al. Non-coding microRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are associated with chemoresponse to S-1 in colon cancer[J]. Cancer Genomics Proteomics,2006,3:317-324.
- [14] Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,2008,47:897-907.
- [15] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. Oncogene,2006,25:2537-2545.
- [16] Esau C, Kang X, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem,2004,279:52361-52365.
- [17] Greenberg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells[J]. J Cell Biol,1982,95:333-339.
- [18] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. Nat Rev Cancer,2002,2:442-454.
- [19] Lindsay JT, Syamal D Bhattacharya, et al. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies[J]. Int J Biochem Mol Biol,2012,3:117-136.

收稿日期：2014-04-26