

外周血miRNA-26a的表达对经TACE治疗的原发性肝癌患者预后的意义

纪民, 林海燕, 赵旭, 蒲春文, 李本科, 张麒麟, 宋瑞金, 姜伯昭 (大连市第六人民医院 介入治疗科, 辽宁 大连 116039)

摘要: 目的 探讨外周血miRNA-26a的表达对TACE治疗的原发性肝癌患者预后的意义。方法 选取2013年5月至2013年10月于本院行TACE治疗的原发性肝癌患者29例(A组)、代偿期肝硬化患者30例(B组)及健康体检者30例(C组)为研究对象,采用实时定量PCR技术检测外周血miRNA-26a的表达水平,分析原发性肝癌(PLC)患者TACE治疗术后miRNA-26a表达水平的变化、不同miRNA-26a表达水平的PLC患者无疾病进展时间(progression free survival, PFS)及1、2、3年生存率的差异。结果 肝癌患者外周血miRNA-26a的表达水平(1.230 ± 0.299)低于代偿期肝硬化组(1.897 ± 0.534)和健康体检组(2.427 ± 0.569),差异有统计学意义($t = -5.542$ 、 -10.058 , $P < 0.001$);原发性肝癌患者TACE治疗前后外周血miRNA-26a表达水平的差异有统计学意义[(1.230 ± 0.299) vs (2.154 ± 0.371), $t = -8.786$, $P < 0.001$)。以TACE术前外周血miRNA-26a表达的中位值1.145将PLC患者分为高表达组(13例)和低表达组(16例),高表达组的无疾病进展生存时间为(27.18 ± 4.28)个月,显著高于低表达组的(17.23 ± 9.18)个月,差异有统计学意义($t = 5.287$, $P = 0.019$),高表达组1、2、3年生存率分别为92.31%、76.92%和61.54%,低表达组的1、2、3年生存率分为93.75%、50.00%、43.75%,差异有统计学意义($\chi^2 = 3.885$, $P = 0.032$)。结论 原发性肝癌患者经TACE治疗后外周血miRNA-26a的表达水平提高,外周血miRNA-26a的表达对原发性肝癌介入治疗的预后评估有判断价值。

关键词: 原发性肝癌; 外周血; miRNA-26a表达水平; 经动脉化疗栓塞

Prognostic significance of miRNA-26a expression in peripheral blood in patients with primary liver cancer treated with TACE

Ji Min, Lin Hai-yan, Zhao Xu, Pu Chun-wen, Lin Ben-ke, Zhang Qi-qi, Song Rui-jin, Jiang Bo-zhao (Department of Interventional Radiology, the Sixth People's Hospital of Dalian, Dalian 116039, Liaoning Province, China)

Abstract: Objective To investigate the prognostic significance of miRNA-26a expression in peripheral blood in patients with primary liver cancer who were treated with transcatheter arterial chemoembolization (TACE). **Methods** Total of 29 cases with primary liver cancer who underwent TACE (group A), 30 cases with decompensated cirrhosis (group B) and 30 healthy controls (group C) in our hospital from May 2013 to October 2013 were selected. The expression levels of peripheral plasma miRNA-26a were detected by real-time quantitative PCR. The changes of miRNA-26a expression in patients with primary liver cancer (PLC) after TACE treatment were analyzed. The time without disease progression (PFS) and 1, 2 and 3 year survival rates of PLC patients with different miRNA-26a expression levels were also analyzed. **Results** The expression level of miRNA-26a in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma (1.230 ± 0.299) was lower than those in compensated cirrhosis group (1.897 ± 0.534) and healthy controls (2.427 ± 0.569), the differences were statistically significant ($t = -5.542$, -10.058 ; $P < 0.001$). The difference of expression level of miRNA-26a in peripheral blood in patients with primary liver cancer before and after TACE was statistically significant [(1.230 ± 0.299) vs (2.154 ± 0.371), $t = -8.786$, $P < 0.001$]. Patients with PLC were divided into miRNA-26a high expression group and low expression group according to the median of

miRNA-26a 1.145. PFS in miRNA-26a high expression group $[(27.18 \pm 4.28) \text{ months}]$ was significantly higher than that in miRNA-26a low expression group $[(17.23 \pm 9.18) \text{ months}]$, the difference was statistically significant ($t = 5.287, P = 0.019$). The survival rates of 1, 2 and 3 year in miRNA-26a high expression group were 92.31%, 76.92% and 61.54%, respectively. The survival rates of 1, 2 and 3 year in miRNA-26a low expression group were 93.75%, 50.00% and 43.75%, respectively. The difference was statistically significant ($t = 3.885, P = 0.032$). **Conclusions** TACE can improve the expression level of miRNA-26a in peripheral blood of patients with primary liver cancer, and the expression of miRNA-26a in peripheral blood can be used to evaluate the prognosis of primary liver cancer.

Key words: Primary liver cancer; Peripheral blood; miRNA-26a expression level; Transcatheter arterial chemoembolization (TACE)

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 发病率有逐年上升之势, 预后极差, 病死率在恶性肿瘤中排名第二, 仅次于肺癌, 严重危害人们的健康^[1-3]。由于肝癌的早期症状不明显, 绝大多数患者发现时已是中晚期, 失去了手术根治的机会, 只能接受介入治疗。经动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是目前治疗原发性肝癌的最主要介入治疗方式^[4]。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类由约20~22个核苷酸组成的内源性非编码小RNA^[5], 通过与特定目标mRNA的3'-UTRs结合而发挥负调控作用^[6]。miRNA-26a位于人类3号染色体上, 全长21个核苷酸, 在多种组织中广泛表达, 其表达无特异性。miRNA-26a可抑制鼻咽癌、乳腺癌和肝癌细胞的增殖^[7,8]。肝癌的发病机制目前尚未阐明, 但研究表明miRNA在肿瘤的发生、发展及转移中发挥重要作用, miRNA的表达可作为肿瘤治疗和预后的判断^[9]。本研究通过实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测经TACE治疗的原发性肝癌患者血浆标本miRNA-26a的表达, 以探讨其对肝癌介入治疗疗效监测及预后评估的意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2013年5月至2013年10月于大连市第六人民医院住院行TACE治疗的原发性肝癌患者29例为原发性肝癌组, 其诊断符合《原发性肝癌诊疗规范(2011年版)》^[10]中的相关标准, 均为初治患者; 选取代偿期肝硬化患者30例为肝硬化组, 其诊断符合2000年《病毒性肝炎防治方案》^[11]中的相关标准, 上述两组患者病因均为乙型肝炎病毒感染; 另随机选取同期30例健康体检者为健康对照组, 所有入组对象均签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 miRNA提取分离试剂盒(DP501)、miRNA cDNA第一链合成试剂盒(KR201)和miRNA荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)

(FP401)均购自天根生化科技(北京)有限公司。主要仪器为Stratagene公司的Mx3000P荧光定量RCR仪。目的基因miRNA-26a上游引物(CD201-0319)设计与合成由天根生化科技(北京)有限公司提供, 管家基因U6上游引物(5'-CAAATTCGTGAAGCGTTCCAT-3')的设计与合成由美国Invitrogen公司完成, 以上基因下游引物来源于试剂盒(FP401)通用引物。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA的提取 行TACE术的患者于术前及术后1个月分别留取静脉血2 ml, 置于含枸橼酸钠的试管中, 经离心分离出血清, -80℃保存, 肝硬化组和健康对照组入组后以同样方法留取标本保存。血清采用苯酚/氯仿去蛋白处理, 乙醇沉淀RNA, 加入焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解, 紫外分光光度法测定RNA纯度^[12]。

1.3.2 miRNA 3'-末端加Poly(A)尾和反转录 加入2 μg RNA于20 μl反应体系中, 短暂离心后37℃反应60分钟进行加尾。取上述Poly(A)反应液再次加入20 μl反应体系中, 短暂离心后37℃反应60分钟, 合成获得第一链cDNA。

1.3.3 Real-time PCR 采用Stratagene公司-Mx3000P实时反应PCR仪进行扩增反应, 以管家基因U6为内参检测miRNA的表达。反应总体积为50 μl, 其中含有2 × miRcute miRNA Premix(含SYBR, 含ROX) 25 μl, 下游引物(10 μmol/L) 1 μl, miRNA第一链cDNA 2 μl, 上游引物 1 μl, 加ddH₂O补齐反应体系。反应条件: 94℃预变性2分钟, 然后以94℃ 20秒、64℃ 20秒及72℃ 30秒进行5个循环, 富集模板; 最后以94℃ 20秒和60℃ 34秒进行40个循环。

采用SDS 2.4软件计算Ct值, 采用定量PCR中的相对定量法, 标准化的Ct值为相对定量值, $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因U6}}})_{\text{病例组}} - (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因U6}}})_{\text{正常组}}$, 得到病例组相对正常组的表达量, 结果中

miRNA-26a表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

1.4 TACE介入治疗 患者于介入导管手术室,以Seldinger技术穿刺股动脉,置动脉鞘,5F导管进入腹腔动脉造影,超选择插管置肿瘤供血动脉碘化油化疗乳剂(碘油10~20 ml+吡柔比星30 ml+5-Fu 0.5 g+奥铂100 mg)和(或)辅以栓塞微球、明胶海绵等进行化疗栓塞,至碘油沉积密实肿瘤供血消失。术后辅以护肝水化补液对症治疗。

1.5 统计学处理 应用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。总生存率的比较应用Kaplan-Meier生存曲线和Log-Rank检验。

2 结果

2.1 各组研究对象的一般资料 原发性肝癌组29例患者中男性22例,女性7例;年龄30~75岁,平均(54.5 ± 15.9)岁;巴塞罗那分期(Baselona clinic liver cancer, BCLC分期)B期19例、C期10例;肝功能Child-Pugh分级A级12例、B级17例,美国东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)评分系统评分0~2分。代偿期肝硬化组30例患者中男性19例,女性11例;年龄29~76岁,平均(52.3 ± 14.8)岁,肝功能Child-Pugh分级均为A级;健康对照组30例中男性20例,女性10例;年龄35~75岁,平均(52.5 ± 11.5)岁。3组间性别和年龄无统计学差异($P < 0.05$),具有可比性,见表1。

2.2 TACE治疗前各组肝功能指标及外周血miRNA-26a的表达水平 TACE治疗前肝癌患者与肝硬化患者的肝功能无显著差异,健康对照组肝功能均正

常,与肝癌及肝硬化组比较有显著差异;肝癌患者外周血miRNA-26a的表达水平(1.230 ± 0.299)低于代偿期肝硬化组(1.897 ± 0.534),差异有统计学意义($t = -5.542, P < 0.001$),和健康体检组(2.427 ± 0.569)比较,差异有统计学意义($t = -10.058, P < 0.001$),见表2。

2.3 原发性肝癌患者TACE治疗前后肝功能及外周血miRNA-26a表达的变化 TACE治疗前后原发性肝癌患者的肝功能无显著变化,TACE治疗后外周血miRNA-26a的表达水平(2.154 ± 0.371)显著高于治疗前(1.230 ± 0.299),差异有统计学意义($t = -8.786, P < 0.001$),见表3。

2.4 外周血miRNA-26a与原发性肝癌患者预后的关系 以TACE术前肝癌患者外周血miRNA-26a表达的中位值1.145为分界点,将肝癌患者术前分为miRNA-26a高表达组(13例)和低表达组(16例),miRNA-26a高表达组的无疾病进展时间(progression free survival, PFS)为(27.18 ± 4.28)个月,显著高于低表达组的(17.23 ± 9.18)个月,差异有统计学意义($t = 5.287, P = 0.019$),高表达组1、2、3年累积生存率分别为92.31%、76.92%和61.54%,低表达组分别为93.75%、50.00%和43.75%,Kaplan-Meier生存分析显示差异有统计学意义($t = 3.885, P = 0.032$),见图1。

3 讨论

miRNA广泛存在于组织、血浆、血清及其他体液中,非常稳定且不会被内源性核糖核酸酶所降解^[13,14]。miRNA-26a在多种实体瘤组织中低表达^[15]。Ji等^[16]应用microRNA芯片检测了455例手术切除

表1 3组研究对象的一般资料

组别	例数	性别 (男/女, 例)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	BCLC分期(例)		Child-Pugh分级(例)		ECOG评分(最小值~最大值, 分)
				B期	C期	A级	B级	
原发性肝癌组	29	22/7	54.5 ± 15.9	19	10	12	17	0~2
肝硬化组	30	19/11	52.3 ± 14.8	-	-	30	0	-
健康对照组	30	20/10	52.5 ± 11.5	-	-	-	-	-

注:“-”为无相关数据

表2 TACE治疗前各组肝功能指标及miRNA-26a的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT (U/L)	TBil (μ mol/L)	ALB (g/L)	miRNA-26a
原发性肝癌组($n = 29$)	92.14 ± 12.54	42.18 ± 8.25	35.12 ± 7.89	1.230 ± 0.299
肝硬化组($n = 30$)	105.71 ± 20.25	50.18 ± 10.84	36.58 ± 6.59	1.897 ± 0.534
健康组($n = 30$)	36.51 ± 5.42	10.68 ± 2.14	40.15 ± 6.97	1.897 ± 0.534
t 值	0.098	0.649	2.221	-5.542
P 值	0.756	0.425	0.030	< 0.001

表 3 29 例原发性肝癌患者 TACE 治疗前后肝功能及外周血 miRNA-26a 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

时间	ALT (U/L)	TBil (μmol/L)	ALB (g/L)	miRNA-26a
治疗前	92.14 ± 12.54	42.18 ± 8.25	35.12 ± 7.89	1.230 ± 0.299
治疗后	110.57 ± 21.26	45.67 ± 9.64	35.98 ± 8.51	2.154 ± 0.371
t值	0.273	0.167	0.105	-8.876
P值	0.152	0.387	0.588	< 0.001

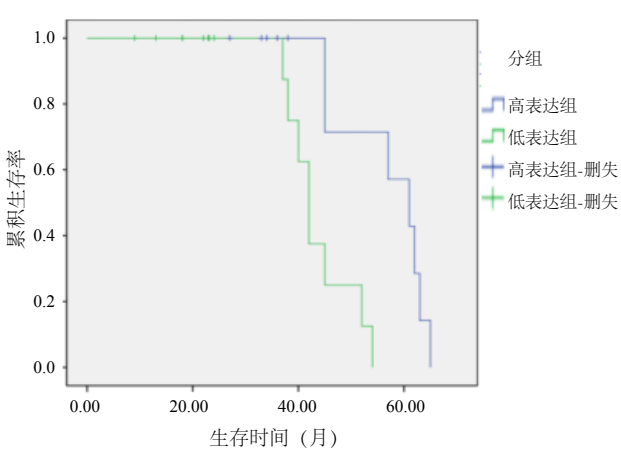


图 1 miRNA-26a 高表达组与低表达组无疾病进展生存时间曲线

的肝癌肿瘤标本,发现miRNA-26a在女性非肝癌组织中的表达显著高于男性,且在肝癌组织中的表达显著低于非肝癌组织。肝癌组织miRNA-26a a/b的低表达与肝癌患者的总生存期及对α干扰素(interferon-α, IFN-α)辅助治疗的反应性显著相关,可作为判断肝癌患者应用IFN-α辅助治疗的指标。Yang等^[17]证实,肝癌组织中miRNA-26a高表达患者具有较好的预后,患者总生存期和复发时间较对照组显著延长。

研究表明miRNA能够在血浆中稳定存在,肿瘤衍生的miRNA存在于血浆中并可作为肿瘤诊断的生物化学指标^[18]。miRNA-26a是一个重要的抑癌基因, Kota等^[19]发现, miRNA-26a能抑制小鼠肝癌模型的形成,在体外实验中, miR-26a可阻滞肝癌细胞的分裂周期,抑制肝癌细胞的增殖,导致肿瘤细胞凋亡,抑制肝癌进展; miRNA-26a在肝细胞癌中过表达,其能显著下调cyclinE2蛋白的表达,抑制肝癌细胞株HepG的增殖,运用腺病毒载体介导miRNA-26a高表达对肝癌小鼠模型有较好的治疗效果。有研究^[16]表明, miRNA-26在肝癌组织中表达下调; miRNA-26a表达较低的患者接受干扰素治疗后, 5年生存率由30%左右可提高到65%左右。miRNA-26a在的肝癌发生发展中起重要作用。

本研究显示,原发性肝癌患者外周血miRNA-26a的表达显著低于代偿性肝硬化患者和健康者,

由此可见miRNA-26a在肝癌发生发展的机制中发挥调控作用,对于原发性肝癌的诊断具有一定意义。从健康者到代偿期肝硬化患者再到原发性肝癌患者,其外周血miRNA-26a的表达逐渐降低,提示miRNA-26a还可能与肝病的进展有关,但需要进行更多的研究。本研究观察到肝癌患者TACE术后外周血miRNA-26a较术前表达升高,可能原因包括:①TACE术后大量肿瘤细胞缺血坏死,肿瘤组织中的miRNA-26a释放入血;②TACE治疗的栓塞作用或药物可能有上调miRNA-26a的作用。有学者发现二甲双胍可通过上调胰腺癌细胞中包括miRNA-26a在内的数种miRNA的表达,引起胰腺癌细胞生长抑制,侵袭、转移能力下降,凋亡增加^[20]。以miRNA-26a表达的中位值进行分组后进行随访, miRNA-26a高表达组患者的无疾病进展生存时间长于低表达组,高表达组患者的生存率及与生存时间均优于低表达组。

综上所述,通过观察miRNA-26a在原发性肝癌患者血清中的表达及TACE治疗后的改变,说明其对该疾病的早期诊断、治疗和预后观察可能有重要意义,需进一步研究阐明其生物学功能以及TACE术后miRNA-26a表达改变的具体机制。

参考文献

[1] 付艳, 邢卉春. 原发性肝癌的流行状况及危险因素分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2014,6(2):87-90.

[2] Qin L. Osteopontin is a promoter for hepatocellular carcinoma metastasis: a summary of 10 years of studies[J]. Front Med,2014,8(1):24-32.

[3] Lu J, He ML, Wang L, et al. MIR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2[J]. Cancer Res,2011,71(1):225-233.

[4] 贺爱军, 任羽, 姬乐, 等. 肝动脉化疗栓塞术(TACE)对原发性肝癌患者的肝功能影响及相关因素分析[J]. 中国实验诊断学,2016,20(9):1507-1509.

[5] Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells[J]. Front Genet,2014,4:295.

[6] Becker N, Lockwood CM. Pre-analytical variables in miRNA analysis[J]. Clin Biochem,2013,46(10-11):861-868.

[7] Jacobs LA, Bewicke-CoPley F, Poolman MG, et al. Meta analysis using a novel database, miRStress, reveals miRNAs that are frequently associated with the radiation and hypoxia stress-responses[J]. PLOS

- One,2013,8(11):e80844.
- [8] Zhang XQ, Zhang P, Yang Y, et al. Regulation of pulmonary surfactant synthesis in fetal rat type 11 alveolar epithelial cells by microRNA-26a[J]. *Pediatr Pulmonol*,2014,49(9):863-872.
- [9] 李子英, 卢再鸣, 赵相, 等. 微小RNA与原发性肝癌的研究进展[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2015,7(4):8-10.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J]. *临床肿瘤学杂志*,2011,16(10):929-946.
- [11] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华内科杂志*,2001,40(1):62-68.
- [12] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2011,108(12):5003-5008.
- [13] 赵莹莹, 邢卉春. 循环miRNA与肝病诊断标记物[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2014,6(3):91-94.
- [14] Zhang B, Liu XX, He JR, et al. Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer[J]. *Carcinogenesis*,2011,32(1):2-9.
- [15] Liu B, Wu X, Liu B, et al. MIR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN[J]. *Biochim Biophys Acta*,2012,1822(11):1692-1704.
- [16] Ji J, Shi J, Budhu A, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer[J]. *N Engl J Med*,2009,361(15):1437-1447.
- [17] Yang X, Liang L, Zhang XF, et al. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway[J]. *Hepatology*,2013,58(1):158-170.
- [18] Li X, Yang W, Lou L, et al. microRNA: a promising diagnostic biomarker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*,2014,59(6):1099-1107.
- [19] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model[J]. *Cell*,2009,137(6):1005-1017.
- [20] Bao B, Wang Z, Ali S, et al. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Prev Res(Phila)*,2012,5(3):355-364.

收稿日期: 2017-02-28

纪民, 林海燕, 赵旭, 等. 外周血miRNA-26a的表达对经TACE治疗的原发性肝癌患者预后的意义[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2017,9(3):85-89.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

声 明

为适应我国信息化建设, 扩大本刊及作者知识信息交流渠道, 本刊已被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》、《美国化学文摘数据库(Cheical Abstracts Service)》、《中国学术期刊网络出版总库》、《中国核心期刊遴选数据库》(万方数据——数字化期刊群)及CNKI中国知网数据库收录, 其作者论文著作权使用费及相关稿酬一次性给付(已在收取发表费时折减和换算为杂志赠阅)。凡作者向本刊提交文章发表之行为即视为同意本刊上述声明。

本刊编辑部