论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201501234

循环 miR-338-5p、miR-15b-5p 和 miR-21-5p 作为肝细胞癌的潜在肿瘤标记物

陈 义,黄 平,陈 进,刘一钊,李始亮,王孜尧,宋 丹 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 筛查血浆中能作为肝细胞癌肿瘤标记物的 miRNA。**方法** 分为4个阶段:①miRNA芯片筛查肝细胞癌组织中异常表达的 miRNA,并根据文献和 miRNA 芯片结果确定候选 miRNA。②13 对术前和术后 7~10 d 肝细胞癌患者血浆用定量逆转录-聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测候选 miRNA 的表达水平,术后表达水平下降的 miRNA 定为目的 miRNA。③39 例肝细胞癌患者、32 例肝硬化患者、25 例健康人员血浆进行 qRT-PCR,验证目的 miRNA 在3组人群中的表达差异。④分析目的 miRNA 作为肝细胞癌肿瘤标记物的诊断价值,绘制受试者工作曲线并分析其与临床参数的相关性。**结果** 癌组织中 40 种 miRNA 表达量增加(>2 倍),52 种miRNA 表达量明显下降(<0.5 倍)。结合文献,选取 miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 作为候选 miRNA。术后 3 种 miRNA 表达水平下降,定为目的 miRNA。3 组人群测量结果显示 miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 在肝细胞癌患者血浆中表达水平明显高于肝硬化患者和健康对照人群。其中 miR-338-5p 在肝细胞癌与肝硬化、健康人群鉴别时,曲线下面积(area under the curve, AUC)分别为 0.762 4(灵敏度:64.10%,特异度:87.50%)和 0.906 4(灵敏度:89.74%,特异度:84.00%)。miR-21-5p 和 miR-338-5p 进行联合诊断,特异度可达 92.98%。即使在甲胎蛋白(α-fetoprotein,AFP)判定为阴性的肝细胞癌患者,3 种 miRNA 判定为肝细胞癌的灵敏度都比较高。相关性分析结果显示,血浆 miR-338-5p 水平与 AFP 水平呈负相关($r=-0.344$,$P=0.032$)。**结论** 循环 miR-338-5p、miR-15b-5p、miR-21-5p 具有作为肝细胞癌的肿瘤标记物的潜力。

[关键词] 肝细胞癌;miR-338-5p;miR-15b-5p;miR-21-5p;循环 miRNA
[中图法分类号] R446.1; R730.43; R735.7 [文献标志码] A

Plasma circulating miR-338-5p, miR-21-5p and miR-15b-5p are potential biomarkers for screening hepatocellular carcinoma

Chen Yi, Huang Ping, Chen Jin, Liu Yizhao, Li Shiliang, Wang Ziyao, Song Dan (Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the plasma circulating miRNAs as potential biomarkers for screening hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** This study was divided into 4 phases. Firstly, a miRNA array was used to screen miRNAs with abnormal expression in HCC tissues for selecting candidate miRNAs. Secondly, the preoperative and postoperative (7 – 10 d after surgery) plasma samples of 13 patients with HCC were detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the candidate miRNAs with down-regulated expression after surgery were selected as target miRNAs for further study. Thirdly, the expression profiles of the target miRNAs in the plasma of 39 HCC patients, 32 cirrhosis

[基金项目] 重庆市教委科学技术研究项目(x1400)
[通信作者] 黄 平,E-mail:huangpchina@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150617.0848.008.html(2015-06-17)

patients and 25 healthy controls were measured by qRT-PCR, and the miRNAs with significant abnormal expressions were determined as potential biomarkers. Finally, the values of the potential biomarkers in diagnosing HCC were analyzed, and their relationship with clinicopathologic parameters were validated. **Results** The expression levels of 40 miRNAs were up-regulated and 52 miRNAs were down-regulated in the tumor tissues. miR-15b-5p and miR-338-5p were significantly over-expressed in the tumor tissues compared with the adjacent non-tumor tissues. According to the reports, miR-15b-5p, miR-338-5p and miR-21-5p were chosen as candidate miRNAs finally. Next, the levels of 3 miRNAs were reduced after surgery. Moreover, higher expression was observed in the plasma of HCC patients than of the cirrhosis patients and healthy controls. Receiver operating characteristic curve (ROC curve) analyses suggested that these plasma miRNAs could be useful biomarkers for discriminating patients with HCC from cirrhosis patients and healthy controls. Especially, miR-338-5p yielded the receiver-operator characteristic area under the curve (AUC) of 0.7624 (sensitivity 64.10% and specificity 87.50%) in discriminating patients with HCC from cirrhosis patients and 0.9046 (sensitivity 89.74% and specificity 84.00%) in discriminating HCC patients from healthy controls. The combination of miR-21-5p and miR-338-5p yielded the specificity of 92.98% in determining HCC from all cases. Moreover, the miRNAs had high sensitivity for HCC diagnosis even to α-fetoprotein (AFP)-negative HCC patients. Further analyses indicated that the expression level of miR-338-5p was negatively correlated with the AFP level ($r = -0.344$, $P = 0.032$). **Conclusion** Circulating miR-338-5p, miR-21-5p and miR-15b-5p may serve as the potential biomarkers for screening HCC.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; miR-338-5p; miR-15b-5p; miR-21-5p; circulating miRNA

Supported by the Project of Science and Technology Research of Chongqing Municipal Education Committee (x1400). Corresponding author: Huang Ping, E-mail: huangpchina@sina.com

肝癌是全球癌症相关死亡排名第二的肿瘤[1],主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和胆管细胞癌。其中主要为HCC,在全球常见恶性肿瘤中位居第五[2]。HCC主要病因为HBV与HCV感染[3],在中国,由上述两种病毒感染所致的HCC占全部HCC的86%[4]。肝切除术是目前治疗HCC最主要的方法,根据HCC分期的不同,其5年生存率为38%~61%[5]。但由于早期诊断的困难,只有30%~40%的患者能获得根治性治疗[6]。传统的肿瘤标记物甲胎蛋白(α-fetoprotein, AFP)的检测,常规用于临床HCC的筛查。现有研究证明,AFP在诊断HCC时,灵敏度为39%~65%,特异度为76%~93%,大约1/3早期HCC患者不能得到诊断[2]。因此寻找特异性的早期HCC诊断标志物特别重要。

miRNA是长19~22个核苷酸内源性表达的单链非编码RNA。其广泛存在于真核生物中,主要与mRNA的3′UTR端结合而调节靶基因的表达,从而调节细胞的增殖、分化、凋亡、浸润和迁移[7]。现在观点认为miRNA能在循环中稳定地表达,能抵制核糖核酸酶A的降解,甚至在pH值为1和13的溶液中保持稳定[8]。基于此类研究的发现,国内外学者开始对HCC患者循环中的miRNA的诊断价值进行论证,并取得了一定的成绩,为HCC诊断开辟了新的研究方向。Qi等[9]指出,miR-122在HCC患者血清中表达水平明显高于健康对照者,能作为HCC肿瘤标记物区分两组人群。Tomimaru等[10]发现循环miR-21能够作为HCC肿瘤标记物,从而把HCC与健康人群、慢性肝炎患者区别。这些研究为寻找HCC新的肿瘤标记物提供了线索。本实验旨在探索具有诊断潜力的HCC相关miRNA肿瘤标记物,并验证其与临床参数的相关性。

1 资料与方法

1.1 实验设计和一般资料

分为4个阶段。第一阶段:组织样本候选miRNA筛查。取肝癌切除术患者癌组织和癌旁非肿瘤组织进行miRNA芯片检测,筛查异常表达的miRNA,选择高表达的miRNA作为候选miRNA进行下一步实验。第二阶段:目的miRNA的确定。取术前及术后7~10 d HCC患者血浆进行定量RT-PCR,术后表达量下降的候选miRNA定为目的miRNA进行下一步研究。第三阶段:目的miRNA的验证。所有HCC患者术前血浆、肝硬化(hepatocirrhosis, CIR)及健康对照者血浆进行定量逆转录-聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR),检验

目的 miRNA 在3组人群血浆中的表达差异。第四阶段:诊断价值验证及相关性分析。绘制受试者工作曲线(receiver operating characteristic curve, ROC),对目的 miRNA 的诊断价值进行评价,并分析目的 miRNA 与临床参数之间的相关性。

所有组织和血液样本来自本院。组织样本于2010年6月收集并送公司检测,血液样本于2014年1-6月收集,包括肝细胞癌患者39例,CIR 患者32例,健康对照者25例。所有肝细胞肝癌经病理证实,组织和血液样本的使用取得患者同意。

1.2 组织和血浆

肝细胞癌肿瘤组织和癌旁组织来源于肝癌切除术患者,为分离血浆,2 mL 外周血经 EDTA 抗凝后立即行4 ℃,2 000 r/min 离心10 min,上清液转入新 EP 管,4 ℃,13 000 r/min 离心8 min,收集上清液,-80 ℃贮存。

1.3 组织 miRNA 芯片

癌组织及癌旁正常组织送重庆威斯腾生物技术服务中心进行 miRNA 芯片检测。

1.4 血浆 RNA 提取

使用 TRIzol LS (Invitrogen)试剂提取血浆中总 RNA,具体提取步骤根据试剂说明进行。RNA 纯度和浓度用 NanodropND2000 分光光度计(Thermo Scientific, Worcester, MA, USA)检测。$D(260)/D(280)$ 为1.9~2.1,总 RNA 浓度为25~120 ng/μL。

1.5 qRT-PCR

血浆 miRNA 的逆转录和定量检测采用 ALL-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit(GeneCopoeia 公司,广州)。miRNA 引物购自 GeneCopoeia 公司(广州)。25 μL 逆转录体系包括总 RNA:10 μL,Poly A 聚合酶(2.5 U/μL):1 μL,RTase Mix:1 μL,5×PAP/RT Buffer:5 μL,dd H_2O:8 μL。逆转录执行条件:37 ℃孵育60 min,85 ℃孵育5 min 使酶灭活。定量 PCR 采用20 μL 体系[逆转录产物即 cDNA:2 μL,2×ALL-in-One qPCR Mix:10 μL,ALL-in-One™ miRNA 引物:2 μL,Universal Adaptor PCR 引物(稀释至2 μmol/μL):2 μL,ddH_2O:4 μL],定量 PCR 条件:95 ℃ 10 s,40个循环:95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 10 s。每个孔重复3次,取平均 Ct 值。在循环 miRNA 的研究中,目前没有公认的内参,根据文献[9-10]选择 U6 RNA 和 miR-16 进行内参筛选。由于 U6 RNA 在多数样本中无法检测,miR-16 在所有样本中稳定表达,最终选择 miR-16 作为内参。miRNA 的表达水平用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 值表示[11],$\triangle Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{miR\text{-}16}$,$\triangle\triangle Ct = \triangle Ct_{miRNA(样本A)} - \triangle Ct_{miRNA(样本B)}$。

1.6 统计学分析

组织样本 miRNA 表达差异采用分层汇聚和相关分析,统计数据由重庆威斯腾生物技术服务中心提供。血浆 miRNA 表达水平差异、与临床参数的相关性及诊断价值评估采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。术前和术后3种血浆 miRNA 表达差异采用秩和检验(Mann-Whitney test)。miRNA 与临床病例参数之间的相关性,先按临床参数进行分组,秩和检验分析组间表达水平的差异,Spearman 秩相关性分析检验其相关性。GraphPad Prism 5 绘制 ROC 曲线和计算曲线下面积(area under the curve, AUC)评估目的 miRNA 的诊断价值,计算 Youden 指数(Youden's index)选择最佳的界值(cutoff value)。

2 结果

2.1 候选 miRNA 的筛选

组织 miRNA 芯片结果显示:癌组织中40种 miRNA 表达量增加(>2倍);52种 miRNA 表达量明显下降(<0.5倍)。表1列举了部分肿瘤组织中异常表达的 miRNAs,选取癌组织中表达量最高的2种 miRNAs 即 miR-15b-5p、miR-338-5p 进行研究。miR-21-5p 在 HCC 中作用机制研究较多,且在肝癌切除术后表达水平下降,增加 miR-21-5p 作为候选 miRNA 进行下一步研究有利于实验的质量控制。

表1 癌组织(C)和癌旁正常组织(N)miRNA 表达水平

miRNA	C/N	C	N
癌组织中表达量增加			
miR-15b-5p	2.541 2	1.865 7	0.734 2
miR-338-5p	13.792 4	2.202 5	0.159 7
miR-452	2.002 7	0.347 1	0.173 0
miR-25	2.024 3	0.642 7	0.317 4
miR-21*	2.121 9	0.359 5	0.169 4
癌组织中表达量减少			
miR-519e	0.216 0	1.859 5	8.609 5
miR-130a	0.340 4	0.460 7	1.353 5
miR-138-2*	0.418 8	0.093 0	0.222 0
miR-19b	0.477 4	0.892 6	1.869 5
miR-1201	0.393 3	0.157 0	0.399 2

*:暂未统一命名

2.2 候选 miRNA 验证

HCC 患者术前、术后血浆 qRT-PCR 结果显示:miR-15-5p($P=0.006$)、miR-21-5p($P=0.011$)、miR-338-5p($P=0.002$)术后明显降低。上述3种 miRNA

在肿瘤组织和血浆中均高表达,且术后表达水平明显下降,提示 3 种候选 miRNA 均为肿瘤来源,定为目的 miRNA 进行下一步实验(表 2)。

表 2　术前、术后 miRNA 表达差异[M(Q1,Q3),$n=13$]

时间	miR-15b-5p	miR-21-5p	miR-338-5p
术前	2.05(1.26,3.60)	2.79(1.83,13.97)	3.21(2.10,8.73)
术后	1.00(0.62,1.00)	1.00(1.00,1.43)	1.00(1.00,1.19)
P 值	0.006	0.011	0.002

2.3　目的 miRNA 检测

使用 qRT-PCR 检测剩余 26 例 HCC 患者、32 例 CIR 患者和 25 例健康对照者血浆中目的 miRNA 的表达水平,并把术前 13 例 HCC 患者样本纳入统计,共 39 例 HCC 样本(样本总量为 96 个)。结果见表 3,图 1。

表 3　目的 miRNA 在 HCC、肝硬化(CIR)、健康对照组(HC)表达水平对比[M(Q1,Q3)]

组别	例数	miR-15b-5p	miR-21-5p	miR-338-5p
HCC	39	1.45(1.00,2.87)	2.56(1.27,7.65)	2.92(1.36,8.27)
CIR	32	1.00(0.88,1.09)[a]	1.00(0.89,1.47)[a]	1.00(0.82,1.63)[a]
HC	25	0.41(0.24,0.88)[ac]	0.53(0.19,1.13)[ab]	0.34(0.09,0.88)[ac]

a: $P<0.01$,与 HCC 比较;b: $P<0.05$,c: $P<0.01$,与 CIR 比较

由表 3 和图 1 可见,HCC 组 miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 表达水平明显高于 CIR 组($P<0.01$)和 HC 组($P<0.01$)。同时可以看出 CIR 组 miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 表达水平也明显高于 HC 组($P<0.01$),由图 1 我们还可以看出 HCC 组 miR-15b-5p、CIR 组 miR-338-5p 存在离群值,且表达量很高,暂不做进一步研究。

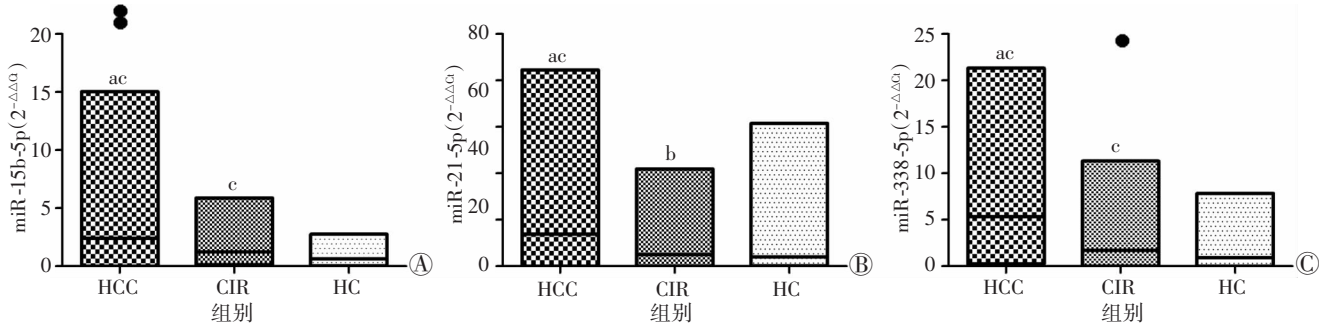
2.4　ROC 曲线分析

为了评估 miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 作为诊断 HCC 的肿瘤标记物的价值,我们分 3 种模式(HCC 和 CIR 区别、HCC 和 HC 区别、HCC 区别 CIR 和 HC 的联合)绘制 ROC 曲线,分别计算其 AUC,并根据最大 Youden 指数选择作为 HCC 肿瘤标记物的界值。我们发现 3 种 miRNA 在区别 HCC 患者、CIR 患者和健康人群时,都有较好的诊断价值。为了验证 3 种 miRNA 在所有样本中鉴别 HCC 患者的能力,我们把所有样本同时纳入绘制 ROC 曲线(第 3 种模式),结果显示,miR-338-5p≥1.743 时,把 HCC 患者从总的 96 个样本中区分出的灵敏度、特异度、AUC 较高,表现出较高的诊断价值。同样的方法进一步对 miR-21-5p 进行分析,也表现出较好的价值,而 miR-15b-5p 的 AUC 相对较小。总的来说,3 种 miRNA 在区别 HCC 患者和健康对照人群所表现出的 AUC 大于区别 HCC 和 CIR 所表现出的 AUC。结果见表 4,图 2。

表 4　miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 作为 HCC 肿瘤标记物的诊断价值[界值,AUC(灵敏度,特异度)]

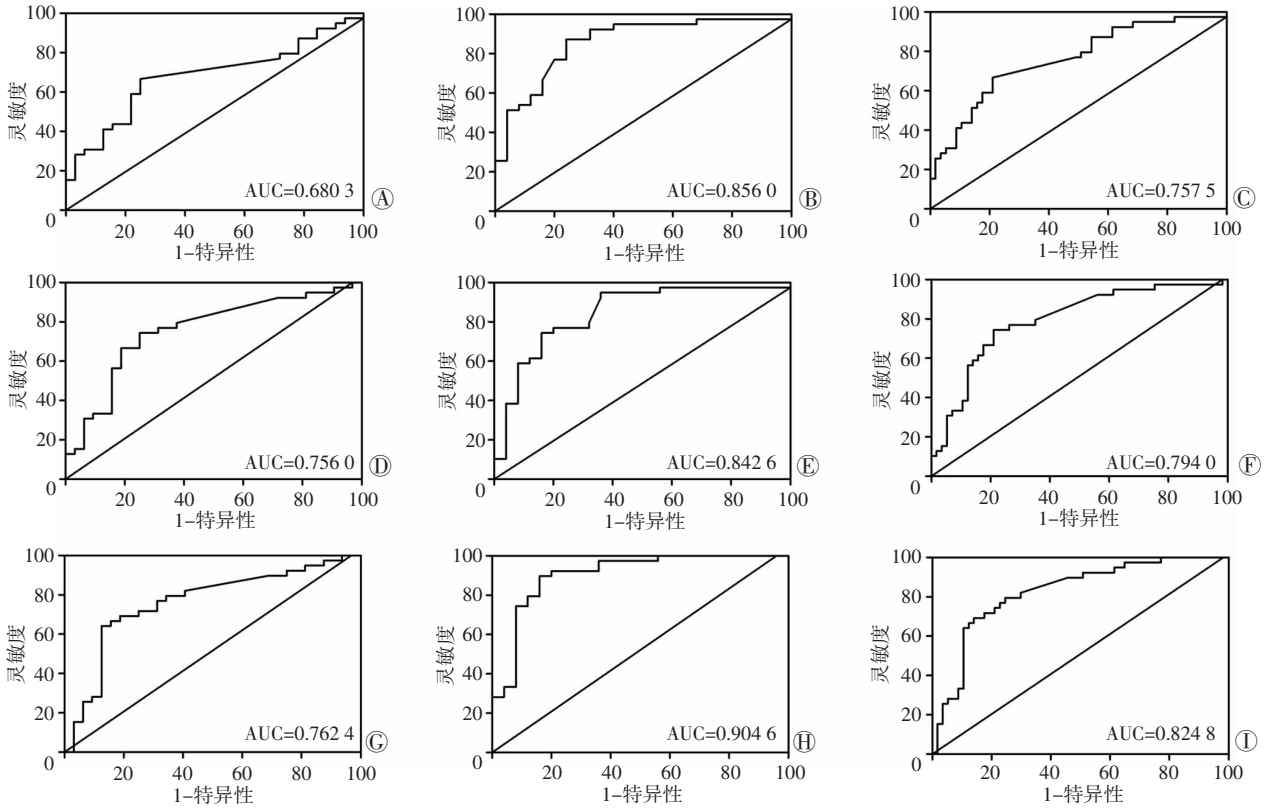
miRNA	HCC 和 CIR 区别	HCC 和 HC 区别	HCC 区别 CIR 和 HC 的联合
miR-15b-5p	1.025,0.680 (66.67%,75.00%)	0.807,0.856 (87.18%,76.00%)	1.025,0.758 (66.67%,78.95%)
miR-21-5p	1.353,0.756 (74.36%,75.00%)	0.772,0.843 (94.87%,64.00%)	1.393,0.794 (74.36%,78.95%)
miR-338-5p	2.270,0.762 (64.10%,87.50%)	0.981,0.905 (89.74%,84.00%)	1.743,0.825 (69.23%,85.96%)

由于 miR-21-5p 和 miR-338-5p 总的 AUC 较大,我们分两种模式对其灵敏度和特异度进行探讨。当 miR-21-5p≥1.393 0,miR-338-5p≥1.743 0 两者满足其一即诊断为 HCC 时,灵敏度为 79.49%,特异度为 75.44%,当两者都满足才能诊断为 HCC 时,灵敏度为 64.10%,特异度为 92.98%。



a:$P<0.01$,与 CIR 组比较;b: $P<0.05$,c: $P<0.01$,与 HC 组比较(●:示离群值)

图 1　miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 在 HCC、CIR、HC 血浆中的表达差异



A～C:miR-15b-5p 作为标记物在把 HCC 从 CIR、HC、CIR + HC 区分出来的表现;D～F:miR-21-5p 作为标记物在把 HCC 从 CIR、HC、CIR + HC 区分出来的表现;G～I:miR-338-5p 作为标记物在把 HCC 从 CIR、HC、CIR + HC 区分出来的表现

图 2 miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 作为 HCC 肿瘤标记物在 3 种模式中的 ROC 曲线表现

2.5 miRNA 血浆表达水平与临床参数相关性分析

进一步与临床参数结合分析结果显示,AFP < 200 ng/mL 的 HCC 患者中,以 miR-15b-5p ≥ 1.025、miR-21-5p ≥ 1.393、miR-338-5p ≥ 1.743 作为诊断标准,其灵敏度分别为 72.73%、86.36%、81.82%。而纳入实验的 HCC 患者,若以 AFP≥200 ng/mL 作为诊断标准,灵敏度仅为 43.59%,与 AFP 灵敏度为 39% ～65%相符合。我们还可以看出 miR-21-5p、miR-338-5p 灵敏度较高,十分有利于 AFP 不能发现的早期 HCC 患者的诊断。

进一步按临床参数分组对 3 种 miRNA 表达水平进行验证。表 5 显示:在 AFP < 200 ng/mL 的患者血浆中,miR-338-5p 的表达水平较高($P = 0.036$)。但 3 种 miRNA 的表达水平与肿瘤直径、胆红素、转氨酶水平及 HBsAg 是否阳性无关。进一步 Spearman 秩相关性分析结果显示,miR-338-5p 表达量与 AFP 水平呈负相关($r = -0.344$, $P = 0.032$)。鉴于本实验 HCC 样本中性别、年龄及 Child-Pugh 分级所表现出的人数差异过大,不做相关性分析。

表 5 临床参数与目的 miRNA 血浆表达水平相关性分析

参数	人数(个)			P 值		
	HCC	CIR	HC	miR-15b-5p	miR-21-5p	miR-338-5p
性别						
男	36	20	12			
女	3	12	13			
年龄(岁)						
≥60	6	5	0			
<60	33	27	25			
AFP(ng/mL)				0.436	0.061	0.036
≥200	17					
<200	22					
ALT(U/L)				0.855	0.144	0.605
≥40	27					
<40	12					
AST(U/L)				0.803	0.379	0.907
≥40	25					
<40	14					
TBiL(μmol/L)				0.725	0.800	0.673
≥17.1	19					
<17.1	20					
HBsAg						
阳性	22					
阴性	7					
Child-Pugh 分级						
A	36					
B	3					
C	0					
肿瘤直径(cm)				0.398	0.248	0.324
≥5	21					
<5	18					

3 讨论

循环 miRNA 能够作为诊断 HCC 的标记物,即使在 AFP <200 ng/mL 的样本中,也能取得比较满意的诊断价值。本研究参考了国际经典的 miRNA 筛查途径,并把实验分为 4 个阶段。随着研究的深入,我们发现如下现象:①miR-338-5p 在 AFP < 200 ng/mL 的 HCC 患者血浆中表达水平较高,十分有利于 AFP 阴性的 HCC 患者的早期诊断,因为肝癌细胞来源的 AFP 早期水平较低,miR-338-5p 在此阶段的高水平恰好弥补 AFP 在此阶段诊断的不足。②miR-15b-5p、miR-21-5p、miR-338-5p 在鉴别 HCC 患者和健康对照者表现出的 AUC 明显大于鉴别 HCC 和肝硬化时的 AUC,可能提示这 3 种 miRNA 在正常肝脏向肝硬化转变,以及肝硬化向 HCC 转变的过程中发挥作用。

越来越多的研究表明,循环 miRNA 有作为 HCC 肿瘤标记物的潜力;Li 等[12]指出,循环 miR-18a 作为 HBV 相关 HCC 肿瘤标记物有潜在价值;为寻求更加简便的诊断标记物,Abdalla 等[13]对尿液中的 miRNA 进行筛查,发现了 miR-618 和 miR-650,但总的诊断价值不高。除了上述与 HCC 诊断相关的循环 miRNA 外,近期的研究还证实 miR-221、miR-885-5p、miR-122a 均有作为 HCC 肿瘤标记物的潜质[14-16]。

关于 miR-338-5p 和 HCC 关系的研究尚少见报道,对 miR-15b-5p 的文献报道也有限。Dai 等[17]报道,miR-15b 通过肝细胞核因子 1α 调节乙肝病毒的复制。Wu 等[18]指出,乙肝病毒 X 蛋白抑制 miR-15b 的表达,从而增强肝细胞癌的增殖能力。也有研究指出 miR-15b 在肝癌组织中高表达,并在细胞有丝分裂周期中发挥调节作用[19]。关于 miR-21 的报道很多,Xu 等[20]发现 miR-21 的靶点为丝裂原活化蛋白激酶-激酶 3(mitogen-activated protein kinase-kinase 3, MAP2K3),miR-21 通过抑制其表达,促进肝癌细胞增殖。Tomimaru 等[10]和 Xu 等[21]认为循环 miR-21 可以作为肝癌或者慢性肝炎的标记物。miR-15b-5p 和 miR-21-5p 在 HCC 癌组织中高表达已经被证实,提示其为肿瘤组织来源。前者可以调节细胞周期的进程,后者影响肿瘤的迁移和浸润能力,均在肿瘤的发生、发展过程中发挥作用。虽然 miR-338-5p 在 HCC 形成过程中的作用不清,但是我们发现 miR-338-5p 为肿瘤组织来源的证据。这 3 种 miRNA 在 HCC 发展过程中,由癌组织进入血液循环,并稳定地表达,为我们检测循环 miRNA 筛查 HCC 提供了可能。

现有研究也证实循环 miRNA 有作为甲状腺癌[22]、乳腺癌[23]、胰腺癌[24]、肺癌[25]、胃癌[26]等肿瘤标记物的可能。

本研究结果证实 miR-15b-5p、miR-21-5p 具有作为肿瘤标记物潜力的同时,发现 miR-338-5p 也具有作为 HCC 肿瘤标记物的潜力,并且 miR-21-5p 和 miR-338-5p 联合作为 HCC 肿瘤标记物,具有很高的特异性。即使在 AFP 判定为阴性的情况下,3 种 miRNA 都具有较高的灵敏度。我们纳入研究的 HCC 患者血浆样本为 39 例,诊断价值评价结果及相关数据虽然显示出了一定的诊断价值趋势,但有待更大样本的实验证实。本研究丰富了寻找无创的能弥补 AFP 不足的 HCC 肿瘤标记物的实例,为进一步更大范围和规模的研究提供了参考。

志谢 感谢重庆市妇产科重点实验室及于廷和教授对本实验的支持

参考文献:

[1] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, *et al*. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2095-2128.

[2] Morise Z, Kawabe N, Tomishige H, *et al*. Recent advances in the surgical treatment of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(39): 14381-14392.

[3] Eskens F A, van-Erpecum K J, de-Jong K P, *et al*. Hepatocellular carcinoma: Dutch guideline for surveillance, diagnosis and therapy[J]. Neth J Med, 2014, 72(6): 299-304.

[4] de-Martel C, Ferlay J, Franceschi S, *et al*. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(6): 607-615.

[5] Torzilli G, Belghiti J, Kokudo N, *et al*. A snapshot of the effective indications and results of surgery for hepatocellular carcinoma in tertiary referral centers: is it adherent to the EASL/AASLD recommendations?: an observational study of the HCC East-West study group[J]. Ann Surg, 2013, 257(5): 929-937.

[6] Zhou J, Yu L, Gao X, *et al*. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(36): 4781-4788.

[7] Zhu Z, Zhang X, Wang G, *et al*. Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma[J]. Hepat Mon, 2014, 14(8): e18672.

[8] Chen X, Ba Y, Ma L, *et al*. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.

[9] Qi P, Cheng S Q, Wang H, *et al*. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28486.

[10] Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, *et al*. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2012, 56(1): 167-175.

[11] Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, *et al*. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance[J]. Mol Carcinog, 2013, 52(4): 297-303.

[12] Li L, Guo Z, Wang J, *et al*. Serum miR-18a: a potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening[J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(11): 2910-2916.

[13] Abdalla M A, Haj-Ahmad Y. Promising Candidate Urinary MicroRNA Biomarkers for the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma among High-Risk Hepatitis C Virus Egyptian Patients[J]. J Cancer, 2012, 3: 19-31.

[14] Li J, Wang Y, Yu W, *et al*. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(1): 70-73.

[15] Gui J, Tian Y, Wen X. *et al*. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 120(5): 183-193.

[16] Luo J, Chen M, Huang H, *et al*. Circulating microRNA-122a as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6: 577-583.

[17] Dai X, Zhang W, Zhang H, *et al*. Modulation of HBV replication by microRNA-15b through targeting hepatocyte nuclear factor 1α[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(10): 6578-6590.

[18] Wu C S, Yen C J, Chou R H, *et al*. Downregulation of microRNA-15b by hepatitis B virus X enhances hepatocellular carcinoma proliferation via fucosyltransferase 2-induced Globo H expression[J]. Int J Cancer, 2014, 134(7): 1638-1647.

[19] Lin L, Lin Y, Jin Y, *et al*. Microarray analysis of microRNA expression in liver cancer tissues and normal control[J]. Gene, 2013, 523(2): 158-160.

[20] Xu G, Zhang Y, Wei J, *et al*. MicroRNA-21 promotes hepatocellular carcinoma HepG2 cell proliferation through repression of mitogen-activated protein kinase-kinase 3[J]. BMC Cancer, 2013, 13: 469.

[21] Xu J, Wu C, Che X, *et al*. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis[J]. Mol Carcinog, 2011, 50(2): 136-142.

[22] Cantara S, Pilli T, Sebastiani G, *et al*. Circulating miRNA95 and miRNA190 are sensitive markers for the differential diagnosis of thyroid nodules in a Caucasian population[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(11): 4190-4198.

[23] Shen J, Hu Q, Schrauder M, *et al*. Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection[J]. Oncotarget, 2014, 5(14): 5284-5294.

[24] Wang J, Raimondo M, Guha S, *et al*. Circulating micro RNAs in Pancreatic Juice as Candidate Biomarkers of Pancreatic Cancer[J]. J Cancer, 2014, 5(8): 696-705.

[25] Ulivi P, Zoli W. miRNAs as non-invasive biomarkers for lung cancer diagnosis[J]. Molecules, 2014, 19(6): 8220-8237.

[26] Liu L, Wang S, Cao X, *et al*. Diagnostic value of circulating microRNAs for gastric cancer in Asian populations: a meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12): 11995-12004.

(收稿:2015-01-30;修回:2015-03-13)

(编辑 郭建秀)