doi:10.11659/jjssx.03E022004

·临床研究·

miR-222-3p 在乙型肝炎病毒相关肝细胞癌血清外泌体中的表达及临床意义

朱富平,刘红强,常 清,冷伟业 (重庆市第九人民医院普外一科,重庆 400700)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-222-3p 在乙型肝炎病毒(HBV)相关肝细胞癌(HCC)血清外泌体中的表达及其与临床特征和预后的相关性。**方法** 收集我院收治的 604 例 HCC 患者的临床病理资料,包括 391 例 HBV-HCC 患者(HBV-HCC 组)和 213 例非 HBV-HCC 患者(非 HBV-HCC 组)。另选取 288 例慢性乙肝患者作为 HBV 组。采用实时荧光定量 PCR 法检测血清外泌体 miR-222-3p 表达水平,分析 miR-222-3p 表达与 HBV-HCC 患者不同临床特征的关系。采用受试者工作特征(*ROC*)曲线评估血清外泌体 miR-222-3p 对 HBV-HCC 的诊断价值;采用 *Kaplan-Meier* 生存曲线和 *Log-rank* 检验分析 miR-222-3p 表达水平与患者预后的相关性;采用 *Cox* 比例回归风险模型分析影响 HBV-HCC 患者预后的危险因素。**结果** HBV-HCC 组患者血清外泌体 miR-222-3p 水平显著高于非 HBV-HCC 组和 HBV 组($P<0.001$)。经 *ROC* 曲线分析,血清外泌体 miR-222-3p 用于 HBV-HCC 诊断(HBV-HCC 组 *vs.* HBV 组、HBV-HCC 组 *vs.* 非 HBV-HCC 组)的曲线下面积(*AUC*)分别为 0.900(95% *CI*:0.878 ~ 0.922)、0.731(95% *CI*:0.692 ~ 0.771)。血清外泌体 miR-222-3p 的表达与患者 HBV-DNA 拷贝、天冬氨酸转氨酶(AST)、异常凝血酶原(DCP)、巴塞罗那临床肝癌(BCLC)分期有关($P<0.05$)。HBV-HCC 患者血清外泌体 miR-222-3p 高表达组和低表达组中位生存时间分别为 2.66 年、4.14 年,总生存率分别为 32.8%、35.7%(*Log-rank* $\chi^2=15.078$, $P<0.001$)。经 *Cox* 比例风险回归模型分析,血清外泌体 miR-222-3p 表达水平升高是影响 HBV-HCC 患者预后的独立危险因素之一($P<0.05$)。**结论** 血清外泌体 miR-222-3p 与 HBV-HCC 的发生发展密切相关,其表达水平升高是影响 HBV-HCC 患者预后的独立危险因素。

[关键词] miR-222-3p;血清外泌体;肝细胞癌;乙型肝炎病毒;预后
[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-03-01

Expression and clinical significance of miR-222-3p in serum exosomes of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma

ZHU Fu-ping, LIU Hong-qiang, CHANG Qing, LENG Wei-ye (First Department of General Surgery, Ninth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400700, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-222-3p in serum exosomes of hepatitis B virus (HBV)-associated hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with clinical features and prognosis. **Methods** The clinicopathological data of 604 patients with HCC in our hospital were collected, including 391 patients with HBV-HCC (the HBV-HCC group) and 213 patients with non-HBV-HCC (the non-HBV-HCC group). And another 288 patients with chronic hepatitis B were selected as the HBV group. The expression level of serum exosome miR-222-3p was detected by real-time fluorescent quantitative PCR method, and the relationship between the expression of miR-222-3p and different clinical features of HBV-HCC patients was analyzed. *Receiver operating characteristic* (*ROC*) curve was used to evaluate the diagnostic value of serum exosome miR-222-3P for HBV-HCC; *Kaplan-Meier* survival curve and *Log-rank* test were used to analyze the correlation between the expression level of miR-222-3P and the prognosis of patients; *Cox* proportional hazards regression model was used to analyze the risk factors affecting the prognosis of patients with HBV-HCC. **Results** The level of serum exosome miR-222-3p in the HBV-HCC group was significantly higher than that in the non-HBV-HCC group and the HBV group ($P<0.001$). According to the *ROC* curve analysis, the *area under the curve* (*AUC*) of serum exosome miR-222-3p for the diagnosis of HBV-HCC (the HBV-HCC group *vs.* the HBV group, the HBV-HCC group *vs.* the non-HBV-HCC group) were 0.900 (95% *CI*: 0.878 to 0.922) and 0.731 (95% *CI*: 0.692 to 0.771), respectively. The expression of serum exosome miR-222-3p was related to the patient's HBV-DNA copy, aspartate aminotransferase (AST), des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) and Barcelona clinic liver cancer (BCLC) stage ($P<0.05$). The median survival time in the high expression group and the low expression group of serum exosome miR-222-3p in patients with HBV-HCC were 2.66 years and 4.14 years, respectively, and the overall survival rates were 32.8% and 35.7%, respectively (*Log-rank* $\chi^2=15.078$, $P<0.001$). *Cox* proportional hazards regression model analysis showed that the elevated expression level of serum exosome miR-222-3p was one of the independent risk factors affecting the prognosis of patients with HBV-HCC ($P<0.05$). **Conclusion** Serum exosome miR-222-3p is closely related to the occurrence and development of HCC-HCC, and its elevated expression level is an independent risk factor affecting the prognosis of patients with HBV-HCC.

Keywords: miR-222-3p; serum exosomes; hepatocellular carcinoma; hepatitis B virus; prognosis

[通信作者] 刘红强,E-mail:27206040@qq.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是严重威胁人类健康的消化系统恶性肿瘤之一[1]。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染是 HCC 发生最主要的流行病学因素,80% 以上的 HCC 患者存在 HBV 感染史[2]。因此,临床亟需寻找评估 HBV-HCC 发生发展和预后的可靠预测因子和潜在治疗靶点。外泌体是一类小的、包含大量蛋白质、脂质和核酸等的细胞外囊泡,是细胞间重要的信号通讯工具[3-4]。有研究证实,肿瘤细胞分泌的 miR-222-3p 可在循环外泌体中富集,促进上皮性卵巢癌[5]、非小细胞肺癌[6]等肿瘤的恶性发展。Li 等[7]研究发现,HBV 感染衍生的外泌体可通过抑制 Akt/mTOR 通路促进病毒复制,这与 miR-222-3p 的高表达有关。Sun 等[8]也证实 HBV 感染进一步促进了 miR-222-3p 的表达,并通过 miR-222-3p 介导的 THBS1 下调促进 HCC 的进展。因此,我们推测血清外泌体 miR-222-3p 有望成为 HBV-HCC 诊断中的非侵入性生物标志物,然而目前尚缺乏相关的临床证据。基于此,本研究通过分析 HBV-HCC 患者血清外泌体 miR-222-3p 表达水平及与患者临床特征和预后的相关性,以期为寻找可靠的生物标志物和改进临床治疗策略提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2012 年 1 月至 2017 年 11 月我院普外科收治的 604 例 HCC 患者的临床病理资料,包括 391 例 HBV-HCC 患者(男 242 例,女 149 例,年龄 38 ~ 89 岁)和 213 例非 HBV-HCC 患者(男 135 例,女 78 例,年龄 40 ~ 88 岁)。纳入标准:经病理检查证实为 HCC,符合《原发性肝癌诊疗规范(2019 年版)》[9]诊断标准;首次确诊,既往未行任何相关抗癌治疗;HBV-HCC 患者 HBV 表面抗原(HBV surface antigen,HBsAg)检测呈阳性,非 HBV-HCC 患者无慢性 HBV 感染史;具有完整临床、实验室、影像学相关资料。另选取 288 例慢性乙肝患者作为 HBV 组,患者有 HBV 感染史,HBsAg 检测呈阳性。排除标准:丙型肝炎病毒或其他病毒性肝炎感染史;合并其他恶性肿瘤;有肝切除术、远处转移、肝动脉化疗栓塞术、肿瘤消融或抗病毒治疗史;心、肺、肾等器官严重功能障碍;自身免疫性疾病;合并其他感染性疾病;代谢、精神疾病;妊娠或哺乳期育龄患者;非原发病灶。本研究经我院伦理委员会批准(2012003),所有患者及家属均对本研究知情,并签署书面知情同意书。

1.2 观察指标

收集所有患者的一般资料,包括年龄、性别、Child-Pugh 分级、巴塞罗那临床肝癌(Barcelona clinic liver cancer,BCLC)分期、治疗方法等,以及生化资料。采集所有患者清晨空腹静脉血 5 mL 置于抗凝管中,于 4 ℃下 4 000 r/min 离心 15 min,分离血清,-80 ℃冰箱保存待测。采用酶联免疫吸附试验检测患者 α-甲胎蛋白(alpha-fetoprotein,AFP)、异常凝血酶原(des-gamma-carboxy prothrombin,DCP)水平,试剂盒均购自上海将来实业股份有限公司。采用日立 7600-20 全自动生化分析仪检测患者血小板计数(platelet count,PLT)、总胆红素(total bilirubin,TBil)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotranseferase,ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、白蛋白(albumin,ALB)水平。采用 SysmexCA-1500 全自动血凝仪检测凝血酶原活动度(prothrombin activity,PTA)。所有检测均由对研究终点不知情的技术人员进行。

1.3 血清外泌体 miR-222-3p 检测

取 0.5 mL 血清样本于 4 ℃下 3 000 r/min 离心 10 min,使血细胞下降,然后 12 000 r/min 离心10 min,去除残留的细胞碎片。用全血清外泌体分离试剂盒(美国 Invitrogen 公司)从血清中分离纯化血清外泌体,并将外泌体颗粒重悬于磷酸盐缓冲液中,-80 ℃保存。取血清外泌体置于 formvar 涂层的铜—钯网格上,固定后用 3% 磷钨酸染色,通过 100XCII 透射电镜(日本 JEOL 公司)观察外泌体的大小和形态特征,并用 NanoSight 纳米粒径追踪分析仪确定外泌体颗粒粒径分布和相对浓度。采用 Western blot 法检测血清外泌体样本中 CD63、TSG101、Alix 表达,抗体均购自美国 Abcam 公司。用 ExoQuick®外泌体提取和 TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)提取外泌体总 RNA,通过 PrimeScript RT 试剂盒(日本 Takara 公司)进行反转录得到 cDNA。逆转录后使用 SYBR Green Real Time PCR 试剂盒(日本 Takara 公司)在 Applied Biosystems 7300 型 PCR 系统上进行实时荧光定量 PCR 反应:95 ℃ 2 min,40 个扩增周期(95 ℃ 30 s,60 ℃ 20 s,70 ℃ 30 s),每个周期后测量荧光曲线,平行进行 3 次。以 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-222-3p 的相对表达量。引物序列:miRNA-222-3p 的正向引物序列为5'-CTC AGTAGCCAGTGTAG-3'、反向引物序列为 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3';U6 的正向引物序列为 5'-ACAGATCTGTCGGTGTGGTGGCAC-3'、反向引物序列为5'-GGCCCCGGATTATCCGACATTC-3'。

1.4 随访

随访时间为第 1 年每 3 个月 1 次,第 2 年每 4 个月 1 次,第 3 年每 6 个月 1 次,之后每 1 年 1 次,随访的截止时间是 2022 年 1 月或者患者死亡时,记录患者

死亡情况。定期检测患者肿瘤和 HBV 的血清标志物，并根据需要进行腹部造影、超声、肝动脉造影或侵袭性检查。总生存期定义为手术日期至随访截止时间或患者死亡时间。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 26.0 软件处理数据，二分类变量以率(%)表示，采用 χ^2 检验；连续变量先进行 *K-S* 正态性检验和方差齐性分析，文中所有连续变量均不符合正态分布，以中位数和四分位数表示，采用 *Mann-Whitney U* 或 *Kruskal-Wallis H* 检验。绘制受试者工作特征(*receiver operating characteristic*，*ROC*)曲线，并计算曲线下面积(*area under the curve*，*AUC*)以评估血清外泌体 miR-222-3p 对 HBV-HCC 的诊断价值。采用 *Kaplan-Meier* 生存曲线和 *Log-rank* 检验分析 miR-222-3p表达水平与患者预后的相关性。采用 *Cox* 比例风险回归模型分析影响 HBV-HCC 患者预后的危险因素。所有检验均为双侧检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料比较

3 组患者年龄、性别、ALB 比较差异均无统计学意义($P>0.05$)，而非 HBV-HCC 组和 HBV-HCC 组患者血清 AST、ALT、TBil、AFP、DCP 水平均高于 HBV 组，同时血清 PTA、PLT 显著低于 HBV 组($P<0.05$)；HBV-HCC 组和非 HBV-HCC 组患者 Child-Pugh 分级、BCLC 分期、治疗方法比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 1。

表 1 患者一般资料比较

指标		HBV 组($n=288$)	非 HBV-HCC 组($n=213$)	HBV-HCC 组($n=391$)	H/χ^2	P
年龄/岁		69.0(62.0,76.0)	70.0(63.0,77.0)	69.0(64.0,75.0)	2.941	0.431
性别/例(%)	男	179(62.2)	135(63.4)	242(61.9)	0.136	0.934
	女	109(37.8)	78(36.6)	149(38.1)		
AST/(IU·L^{-1})		39.0(29.0,54.0)	57.0(40.5,77.0)*	61.0(44.0,97.5)*	123.169	<0.001
ALT/(IU·L^{-1})		34.0(25.0,46.5)	49.0(31.0,72.5)*	53.0(34.0,88.5)*	60.318	<0.001
TBil/(mg·dL^{-1})		0.7(0.6,0.9)	0.9(0.6,1.3)*	0.9(0.7,1.5)*	57.707	<0.001
ALB/(g·dL^{-1})		4.0(3.8,4.3)	3.7(3.4,4.2)	3.9(3.3,4.2)	4.572	0.121
PTA/%		87.3(79.8,94.5)	81.7(72.0,91.4)*	77.8(65.2,88.8)*	60.411	<0.001
PLT/(×10^9·L^{-1})		177.0(140.0,229.5)	132.0(105.0,165.0)*	131.0(104.0,167.5)*	108.078	<0.001
AFP/(ng·mL^{-1})		5.0(3.0,8.0)	23.0(10.0,95.0)*	29.0(10.0,163.0)*	339.995	<0.001
DCP/(mAU·mL^{-1})		17.0(14.0,20.0)	53.0(21.5,308.5)*	48.0(22.0,313.0)*	259.593	<0.001
治疗方法/例(%)	肝切除术		52(24.4)	67(17.1)	5.168	0.160
	经导管介入治疗		83(39.0)	161(41.2)		
	肿瘤消融术		74(34.7)	151(38.6)		
	其他		4(1.9)	12(3.1)		
Child-Pugh 分级/例(%)	A 级		159(74.6)	277(70.8)	3.155	0.207
	B 级		50(23.5)	96(24.6)		
	C 级		4(1.9)	18(4.6)		
BCLC 分期/例(%)	0 期		38(17.8)	76(19.4)	5.109	0.276
	A 期		111(52.1)	186(47.6)		
	B 期		39(18.3)	87(22.3)		
	C 期		18(8.5)	21(5.4)		
	D 期		7(3.3)	21(5.4)		

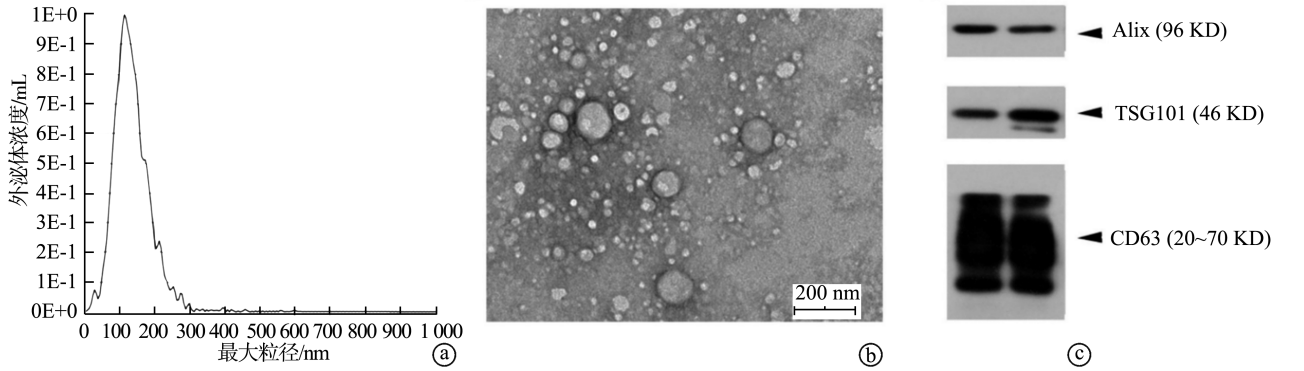
*：与 HBV 组比较，$P<0.05$

2.2 血清外泌体获取及鉴定

用超速离心法从患者的血清中提取并纯化得到双层膜结构的球形或椭球型的外泌体，用透射电镜观察，颗粒分布均匀，粒径大小为 40～100 nm。纳米粒径追踪技术显示，外泌体粒径主要为 0～300 nm。经 Western blot 法检测，这些颗粒高表达 CD63、TSG101、Alix，见图 1。

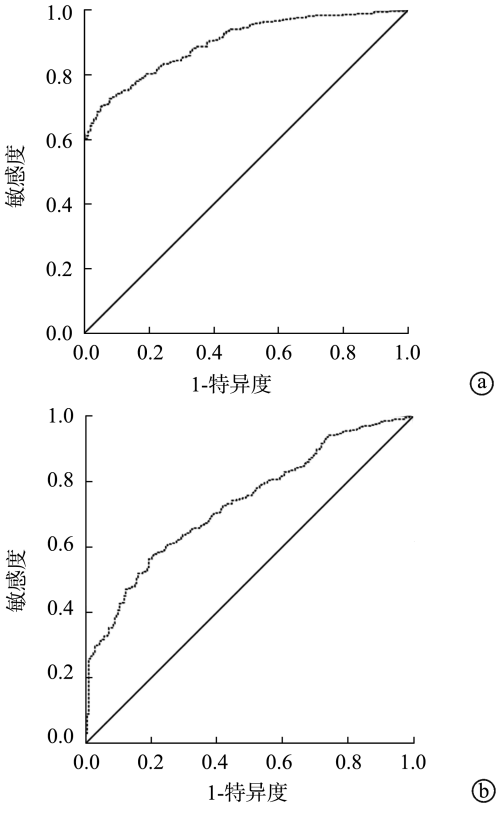
2.3 血清外泌体 miR-222-3p 水平比较

HBV 组、非 HBV-HCC 组和 HBV-HCC 组患者血清外泌体 miR-222-3p 水平分别为 1.0(0.8,1.2)、1.4(1.0,1.7)、1.6(1.3,2.1)，差异有统计学意义($H=217.064$，$P<0.001$)。HBV-HCC 组患者血清外泌体 miR-222-3p 水平显著高于非 HBV-HCC 组和 HBV 组($P<0.001$)。经 *ROC* 曲线分析，血清外泌体 miR-222-3p 用于 HBV-HCC 诊断(HBV-HCC 组 *vs.* HBV 组、HBV-HCC 组 *vs.* 非 HBV-HCC 组)的 *AUC* 分别为 0.817(95% *CI*：0.786～0.847)、0.672(95% *CI*：0.632～0.712)，见图 2。根据 *ROC* 曲线得到最佳截断值，当血清外泌体 miR-222-3p≥1.4 时，用于区分 HBV-HCC 和 HBV 的准确性为 88.7%，阳性似然比



a:纳米粒径追踪分析法分析血清外泌体的大小分布;b:血清外泌体的透射电镜图;c:Western blot 法检测血清外泌体特征蛋白 CD63、TSG101 和 Alix 表达

图 1 血清外泌体特征鉴定



a:HBV-HCC 组 *vs.* HBV 组;b:HBV-HCC 组 *vs.* 非 HBV-HCC 组

图 2 血清外泌体 miR-222-3p 诊断 HBV-HCC 的 *ROC* 曲线

为 8;当血清外泌体 miR-222-3p ≥ 1.7 时,用于区分 HBV-HCC 和非 HBV-HCC 的准确性为 79.0%,阳性似然比为 3.5。

2.4 miR-222-3p 表达与 HBV-HCC 患者不同临床特征的关系

根据血清外泌体 miR-222-3p 中位值 1.6 将 HBV-HCC患者分为高表达组和低表达组,血清外泌体 miR-222-3p 的表达与患者 HBV-DNA 拷贝、AST、DCP、BCLC 分期有关($P < 0.05$),而与患者年龄、性别、HBsAg、ALT、TBil、ALB、PTA、PLT、AFP、治疗方法、Child-Pugh 分级无关($P > 0.05$),见表 2。

表 2 血清外泌体 miR-222-3p 表达与 HBV-HCC 患者不同临床特征的关系[例(%)]

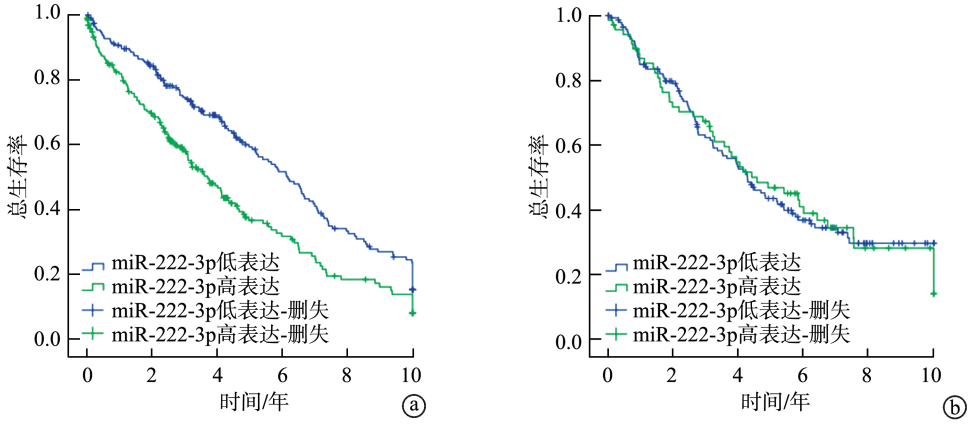
临床特征		*n*	高表达组 (*n* = 195)	低表达组 (*n* = 196)	χ^2	*P*
年龄	<65 岁	108	46(23.6)	62(31.6)	3.163	0.075
	≥65 岁	283	149(76.4)	134(68.4)		
性别	男	149	66(33.8)	83(42.3)	2.995	0.084
	女	242	129(66.2)	113(57.7)		
HBsAg	阳性	155	77(39.5)	78(39.8)	0.004	0.950
	阴性	236	118(60.5)	118(60.2)		
HBV-DNA 拷贝	<4 logIU·mL^{-1}	201	71(36.4)	130(66.3)	35.02	<0.001
	≥4 logIU·mL^{-1}	190	124(63.6)	66(33.7)		
AST	<40 IU·L^{-1}	75	35(17.9)	40(20.4)	7.749	0.005
	≥40 IU·L^{-1}	316	160(82.1)	156(79.6)		
ALT	<50 IU·L^{-1}	175	91(46.7)	84(42.9)	0.574	0.449
	≥50 IU·L^{-1}	216	104(53.3)	112(57.1)		
TBil	<0.8 mg·dL^{-1}	136	75(38.5)	61(31.1)	2.321	0.128
	≥0.8 mg·dL^{-1}	255	120(61.5)	135(68.9)		
ALB	<4 g·dL^{-1}	252	133(68.2)	119(60.7)	2.394	0.122
	≥4 g·dL^{-1}	139	62(31.8)	77(39.3)		
PTA	<80%	193	104(53.3)	89(45.4)	2.456	0.117
	≥80%	198	91(46.7)	107(54.6)		
PLT	<100×10^9·L^{-1}	172	94(48.2)	78(39.8)	2.805	0.094
	≥100×10^9·L^{-1}	219	101(51.8)	118(60.2)		
AFP	<40 ng·mL^{-1}	229	107(54.9)	122(62.4)	2.190	0.139
	≥40 ng·mL^{-1}	162	88(45.1)	74(37.6)		
DCP	<50 mAU·mL^{-1}	194	86(44.1)	108(55.1)	4.731	0.030
	≥50 mAU·mL^{-1}	197	109(55.9)	88(44.9)		
治疗方法	未治疗	24	16(8.2)	8(4.1)	9.122	0.058
	肝切除术	67	26(13.3)	41(20.9)		
	经导管介入治疗	159	78(40.0)	63(32.1)		
	肿瘤消融术	147	71(36.4)	76(38.8)		
	其他	12	4(2.1)	8(4.1)		
Child-Pugh 分级	A 级	277	134(68.7)	143(72.9)	0.887	0.642
	B 级	96	51(26.2)	45(23.0)		
	C 级	18	10(5.1)	8(4.1)		
BCLC 分期	0 期	76	32(16.4)	44(22.4)	13.56	0.009
	A 期	186	83(42.6)	103(52.6)		
	B 期	87	52(26.6)	35(17.8)		
	C 期	21	16(8.2)	5(2.6)		
	D 期	21	12(6.2)	9(4.6)		

2.5 miR-222-3p 水平与 HCC 患者预后的关系

对于 HBV-HCC 患者,血清外泌体 miR-222-3p 高表达组和低表达组中位生存时间分别为 2.66 年、4.14 年,总生存率分别为 32.8%(64/195)、35.7%(70/196),经 *Log-rank* χ^2 检验,差异有统计学意义(χ^2 = 15.078,P < 0.001),见图 3a。对于非 HBV-HCC 患者,血清外泌体 miR-222-3p 高表达组和低表达组中位生存时间分别为 4.05 年、3.37 年,总生存率分别为 34.8%(24/69)、41.0%(59/144),经 *Log-rank* χ^2 检验,差异无统计学意义(P > 0.05),图 3b。

2.6 *Cox* 回归分析影响 HBV-HCC 患者预后的危险因素

经单因素和多因素 *Cox* 比例风险回归模型分析,年龄较大、BCLC 分期较晚及 AST、TBil、ALB、AFP、血清外泌体 miR-222-3p 水平较高是影响 HBV-HCC 患者预后的独立危险因素(P < 0.05),见表 3。



a:HBV-HCC 患者;b:非 HBV-HCC 患者

图 3 *Kaplan-Meier* 曲线

表 3 *Cox* 回归分析影响 HBV-HCC 患者预后的危险因素

指标	单因素分析			多因素分析		
	HR	95% *CI*	*P*	*HR*	95% *CI*	*P*
年龄(0 = <65 岁 *vs.* 1 = ≥65 岁)	1.028	1.012 ~ 1.044	0.001	1.042	1.025 ~ 1.058	<0.001
性别(0 = 男 *vs.* 1 = 女)	0.912	0.708 ~ 1.174	0.474			
Child-Pugh 分级(0 = A 级 *vs.* 1 = B ~ C 级)	2.755	2.107 ~ 3.603	<0.001	1.390	0.914 ~ 2.112	0.123
BCLC 分期(0 = 0 ~ A 期 *vs.* 1 = B ~ D 期)	2.322	1.801 ~ 2.993	<0.001	1.845	1.396 ~ 2.439	<0.001
AST(0 = <40 IU·L^{-1} *vs.* 1 = ≥40 IU·L^{-1})	1.004	1.002 ~ 1.005	<0.001	1.003	1.002 ~ 1.005	<0.001
ALT(0 = <50 IU·L^{-1} *vs.* 1 = ≥50 IU·L^{-1})	1.000	0.997 ~ 1.003	0.974			
TBil(0 = <0.8 mg·dL^{-1} *vs.* 1 = ≥0.8 mg·dL^{-1})	1.849	1.614 ~ 2.119	<0.001	1.627	1.378 ~ 1.922	<0.001
ALB(0 = <4 g·dL^{-1} *vs.* 1 = ≥4 g·dL^{-1})	0.448	0.365 ~ 0.549	<0.001	0.686	0.508 ~ 0.928	0.015
PTA(0 = <80% *vs.* 1 = ≥80%)	0.980	0.973 ~ 0.987	<0.001	0.996	0.986 ~ 1.006	0.478
PLT(0 = <100 × 10^9·L^{-1} *vs.* 1 = ≥100 × 10^9·L^{-1}	0.992	0.972 ~ 1.013	0.445			
AFP(0 = <40 ng·mL^{-1} *vs.* 1 = ≥40 ng·mL^{-1})	1.778	1.388 ~ 2.277	<0.001	1.650	1.065 ~ 2.242	0.021
DCP(0 = <50 mAU·mL^{-1} *vs.* 1 = ≥50 mAU·mL^{-1})	1.987	1.551 ~ 2.546	<0.001	1.424	0.997 ~ 2.318	0.083
HBsAg(0 = 阴性 *vs.* 1 = 阳性)	0.864	0.672 ~ 1.112	0.257			
HBV-DNA 拷贝(0 = <4 logIU·mL^{-1} *vs.* 1 = ≥4 logIU·mL^{-1})	1.078	1.007 ~ 1.154	0.031	1.012	0.939 ~ 1.091	0.752
血清外泌体 miR-222-3p(0 = <1.6 *vs.* 1 = ≥1.6)	1.683	1.438 ~ 1.970	<0.001	1.631	1.346 ~ 1.976	<0.001

3 讨论

HBV 感染是 HCC 发生的原因之一,也是最严重和最普遍的慢性病毒感染,患者的预后通常较差[2]。因此,迫切需要寻找新的诊断或预后生物标志物和潜在的治疗靶点。本研究结果显示,HBV-HCC 组的血清外泌体 miR-222-3p 水平较非 HBV-HCC 组和 HBV 组显著升高,其高表达与患者不良预后密切相关,提示 miR-222-3p 可作为 HBV-HCC 早期诊断或潜在治疗靶点的分子生物学指标。

外泌体是由包括癌细胞在内的大多数细胞分泌的小膜泡,其通过传递活性生物分子在调节细胞间通讯中发挥关键作用,从而影响肿瘤细胞生长、血管生成、转移和其他生物过程[3]。miRNA 是一类长度约 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA,主要通过与 mRNA 3'非翻译区结合并触发 mRNA 降解或翻译抑制来调节基因的表达[5]。外泌体中的 miRNA 相对稳定,可防止细胞外核糖核酸酶降解。因此,外泌体 miRNA 可作为各

种恶性肿瘤诊断和预后的非侵入性生物标志物。血清外泌体高度富集 miRNA,外泌体可以在细胞间转移 miRNA,从而影响 HCC 细胞的增殖和转移。越来越多的证据表明,外泌体中 miRNA 的失调会导致 HBV-HCC 的发生和进展,如 HBV-HCC 患者血清miR-125b、miR122 水平下调[10-11],而 miR-210-3p 水平上调[12],这些都可能成为 HBV-HCC 的候选生物标志物。本研究中,血清外泌体 miR-222-3p 在区分 HBV-HCC 和非 HBV-HCC 或 HBV-HCC 和 HBV 时具有较高的准确性,而且其高表达与 HBV-HCC 患者 HBV-DNA 拷贝、BCLC 分期有关,说明 HBV 感染可能增强了 miR-222-3p 的表达,进而促进疾病进展。

有研究发现,miR-222-3p 在各种肿瘤细胞中发挥调节作用,如 miR-222-3p 可促进肿瘤细胞迁移和侵袭,抑制细胞凋亡,并与肾细胞癌患者的不良预后相关[13]。吴俊艺等[14]发现,血清外泌体 miR-222-3p 在 HCC 中异常高表达,并与 HCC 患者的不良预后密切相关,但并未分析 miR-222-3p 与肝炎病毒感染的关系。一些基础研究显示,miR-222-3p过表达对肝癌细胞的生长有促进作用[15-19]。本研究结果显示,血清外泌体 miR-222-3p 的表达与非 HBV-HCC 组患者的预后无关,但是血清外泌体 miR-223-3p 表达与 HBV-HCC 患者 BCLC 分期有关,特别是在 BCLC C 分期(晚期)和 D 分期(终末期)患者中,miR-223-3p 水平升高更为常见;*Kaplan-meier* 生存分析也显示,HBV-HCC 患者 miR-222-3p 高表达患者总生存率明显低于 miR-222-3p 低表达患者,且血清外泌体 miR-222-3p 水平升高是影响 HBV-HCC 患者预后的独立危险因素。以上结论说明 miR-222-3p 可能在 HBV-HCC 中起到促癌作用。以前的体外研究已经报道了 miR-223-3p 在 HBV-HCC 细胞中的作用,如 Sun 等[8]发现 HBV 可诱导 miR-222-3p 表达上调,而 miR-222-3p 又进一步通过直接结合 THBS1 mRNA 的 3' 非翻译区并充当其竞争性内源性 RNA,上调 THBS1 促进 HCC 增殖并抑制细胞凋亡。Bandopadhyay 等[16]鉴定了 HBV 感染中 miRNAs 差异性表达谱,证实外泌体 miR-222 表达增加。HBV X 蛋白与 HCC 的发生有关,HBV X 蛋白通过与 p53 的直接相互作用,调节细胞过程,如减少 DNA 修复和抑制 p53 介导的凋亡[17]。此外,据报道,HBV X 蛋白可上调 miR-222,而 miR-222 过表达直接导致肿瘤抑制基因和细胞周期调节因子 p27 的下调[18],这也解释了本研究中血清外泌体 miR-222-3p 水平与 HBV DNA 拷贝呈正相关。因此,miR-222-3p 可能是 HBV-HCC 良好的预后生物标志物。

综上,血清外泌体 miR-222-3p 与 HBV-HCC 的发生发展密切相关,是影响 HBV-HCC 患者预后的一个独立危险因素,血清外泌体 miR-222-3p 表达水平升高预示着 HBV-HCC 患者预后不良,因此,血清外泌体 miR-222-3p 可作为 HBV-HCC 早期诊断或治疗靶点的候选生物标志物。但本研究仍处于初步探索阶段,样本量较小且血清外泌体 miR-222-3p 在 HBV-HCC 中的潜在机制尚未阐明,具有一定局限性,仍需要更多的临床研究来进一步证实。

[参考文献]

[1] 李星辰,赵建军,毕新宇,等. 巨块型肝细胞肝癌手术切除术后综合治疗长期生存病例[J]. 肝癌电子杂志,2019,6(3):28 - 30. doi:10.3969/j.issn.2095 - 7815.2019.03.013.

[2] 蔡 馨,陈娟娟,汤冬玲,等. AFP 联合 GGT/AST 对 HBV 相关肝细胞癌的诊断价值[J]. 临床肝胆病杂志,2021,37(9):2109 - 2112. doi:10.3969/j.issn.1001 - 5256.2021.09.021.

[3] 闫冰冰,晁 旭,冯雪松,等. 外泌体在肝细胞癌发病中的研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志,2021,31(9):854 - 857. doi:10.3969/j.issn.1005 - 0264.2021.09.023.

[4] Xu R,Rai A,Chen M,et al. Extracellular vesicles in cancer-implications for future improvements in cancer care[J]. Nat Rev Clin Oncol,2018,15(10):617 - 638. doi:10.1038/s41571 - 018 - 0036 - 9.

[5] Ying X,Wu Q,Wu X,et al. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages[J]. Oncotarget,2016,7(28):43076 - 43087. doi: 10.18632/oncotarget.9246.

[6] Wei F,Ma C,Zhou T,et al. Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p[J]. Mol Cancer,2017,16(1):132 - 145. doi: 10.1186/s12943 - 017 - 0694 - 8.

[7] Li FH,Deng YY,Zhang SY,et al. Human hepatocyte-enriched miRNA-192-3p promotes HBV replication through inhibiting Akt/mTOR signalling by targeting ZNF143 in hepatic cell lines[J]. Emerg Microbes Infect,2022,11(1):616 - 628. doi: 10.1080/22221751.2022.2037393.

[8] Sun Y,Shi P,Wu Q,et al. MiR-222-3p induced by hepatitis B virus promotes the proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma by upregulating THBS1[J]. Hum Cell,2021,34(6):1788 - 1799. doi: 10.1007/s13577 - 021 - 00577 - 1.

[9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019 年版)[J]. 临床肝胆病杂志,2020,36(2):277 - 292. doi:10.3969/j.issn.1001 - 5256.2020.02.007.

[10] Chen S,Chen H,Gao S,et al. Differential expression of plasma microRNA-125b in hepatitis B virus-related liver diseases and diagnostic potential for hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res,2017,47(4):312 - 320. doi: 10.1111/hepr.12739.

[11] Quoc NB,Phuong NDN,Ngan TK,et al. Expression of plasma hsa-miR122 in HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC) in vietnamese patients[J]. Microrna,2018,7(2):92 - 99. doi: 10.2174/2211536607666180427165114.

doi:10.11659/jjssx.11E021021

·临床研究·

PAPV 模式在腹腔镜低位直肠癌保肛手术中对吻合口漏的影响

寇 耀,贾映东,杨宁波 (遂宁市中心医院胃肠外科,四川 遂宁 629000)

[摘 要] **目的** 探讨 PAPV 模式在腹腔镜低位直肠癌保肛手术中对吻合口漏的影响。**方法** 回顾性分析 106 例行腹腔镜低位直肠癌保肛手术患者的临床资料,根据患者是否采用 PAPV 模式分为传统组($n=60$)和 PAPV 组($n=46$)。传统组行腹腔镜低位直肠癌保肛手术,PAPV 组通过 PAPV 模式行腹腔镜低位直肠癌保肛手术。观察比较 2 组围术期相关指标、肛门功能、术后并发症及二次手术情况。**结果** PAPV 组手术时间较传统组显著延长($P<0.05$),肛门排气时间、术后进食时间及术后住院时间较传统组显著缩短($P<0.05$)。PAPV 组术后总并发症发生率显著低于传统组($P<0.05$),其中 PAPV 组吻合口漏发生率显著低于传统组($P<0.05$),PAPV 组二次手术率显著低于传统组($P<0.05$)。术后 3 个月 2 组患者便意、感觉功能、控制能力、排便时间及排便次数评分较术前均显著提高($P<0.05$),且 PAPV 组显著高于传统组($P<0.05$)。**结论** 在腹腔镜低位直肠癌保肛手术中 PAPV 模式虽延长了手术时间,但可有效促进患者术后恢复,改善肛门功能,降低术后并发症及二次手术的风险,尤其对减少吻合口漏的发生具有积极作用。

[关键词] PAPV 模式;腹腔镜;低位直肠癌保肛手术;吻合口漏

[中图分类号] R735.3+7 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-11-02

Effect of PAPV mode on anastomotic leakage in laparoscopic sphincter-preserving surgery for low rectal cancer

KOU Yao, JIA Ying-dong, YANG Ning-bo (Department of Gastrointestinal Surgery, Suining Central Hospital, Suining Sichuan 629000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of PAPV mode on anastomotic leakage in laparoscopic sphincter-preserving surgery for low rectal cancer. **Methods** The clinical data of 106 patients with low rectal cancer treated by laparoscopic sphincter-preserving surgery were retrospectively analyzed. According to whether the patients had adopted PAPV mode or not, they were divided into traditional group ($n=60$) and PAPV group ($n=46$). Traditional group received laparoscopic sphincter-preserving surgery for low rectal cancer, and PAPV group received laparoscopic sphincter-preserving surgery for low rectal cancer under the guidance of PAPV mode. The perioperative related indexes, anal function, postoperative complications and reoperation were observed and compared between the two groups. **Results** The operation time in PAPV group was significantly longer than that in traditional group ($P<0.05$), and the anal exhaust time, postoperative eating time and postoperative hospital stay were significantly shorter than those in traditional group ($P<0.05$). The incidence of postoperative

[基金项目] 四川省中医药管理局科学技术研究专项课题(2021MS258)

[12] Morishita A, Fujita K, Iwama H, et al. Role of microRNA-210-3p in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020, 318(3): G401 - G409. doi: 10.1152/ajpgi.00269.2019.

[13] Zhao L, Quan J, Li Z, et al. MicroRNA-222-3p promotes tumor cell migration and invasion and inhibits apoptosis, and is correlated with an unfavorable prognosis of patients with renal cell carcinoma[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(1): 525 - 534. doi: 10.3892/ijmm.2018.3931.

[14] 吴俊艺,赖智德,田毅峰,等. 血清外泌体来源的 microRNA-221-3p 在肝细胞癌中的表达及意义[J]. 临床肝胆病杂志,2020,36(8):1768 - 1772. doi:10.3969/j.issn.1001 - 5256.2020.08.018.

[15] 孙景武,刘志春,党存曙,等. miR-222 靶向 BBC-3 基因对肝癌细胞增殖凋亡的调控研究[J]. 实用癌症杂志,2019,34(9):1398 - 1401. doi:10.3969/j.issn.1001 - 5930.2019.09.002.

[16] Bandopadhyay M, Bharadwaj M. Exosomal miRNAs in hepatitis B virus related liver disease: a new hope for biomarker[J]. Gut Pathog, 2020, 12: 23. doi: 10.1186/s13099 - 020 - 00353 - w.

[17] Wang XW, Forrester K, Yeh H, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(Suppl 6): 2230 - 2234. doi: 10.1073/pnas.91.6.2230.

[18] Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27 Kip1[J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23716 - 23724. doi: 10.1074/jbc.M701805200.

[19] Xu J, An P, Winkler CA, et al. Dysregulated microRNAs in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: potential as biomarkers and therapeutic targets[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1271. doi: 10.3389/fonc.2020.01271.

(编辑:贺绍梅)