

# 原发性肝癌术后早期复发密切相关 microRNA 的筛选及应用

邓治亮<sup>1</sup>, 孙建\*, 区应亮, 侯宝华, 简志祥, 区金锐  
(广东省医学科学院//广东省人民医院普外一区, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】利用 microRNA 芯片技术分析比较两组不同复发倾向肝癌患者的 miRNA 表达谱,并在更大样品的基础上进行实验验证。【方法】收集 10 例原发性肝癌组织标本根据术后复发情况分 2 组:早期复发组与非早期复发组,运用 microRNA 芯片技术筛选出差异常表达的 microRNAs。结合文献报道,选择 mir-144、mir-502-3p 作为其他 82 例肝癌组织标本 qReal-time PCR 验证的检测指标。并利用生物信息学方法预测其靶基因。【结果】本研究共筛选获得 7 个差异表达的 microRNAs。与非早期复发组相比,在早期复发组中有 4 个表达上调,3 个表达下调。qReal-time PCR 验证与 microRNA 芯片筛选的结果一致。生物信息学方法预测 miR-144 靶基因可能为 Rb1, miR-502-3p 靶基因可能为 SET。【结论】microRNA 芯片筛选的 mir-144、mir-451、mir-486-5p、mir-602、mir-551b、mir-96、mir-502-3p 与原发性肝癌术后早期复发密切相关。

**关键词:**原发性肝癌;早期复发;microRNA 芯片

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2012)04-0494-05

## Screening and Validating MicroRNA Associated with Early Recurrence after Radical Surgery in Primary Hepatocellular Carcinoma

DENG Zhi-liang<sup>1</sup>, SUN Jian\*, OU Ying-liang, HOU Bao-hua, JIAN Zhi-xiang, OU Jin-rui

(1.Graduate School, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2.Department of Hepatopancreatobiliary General Surgery, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To select effectiveness of microRNAs and correlated with early recurrence after radical surgery in liver cancer by microRNA profiling, which analyzing verified the results by tissue samples on the basis. 【Methods】 10 HCC cases with radical surgery were divided into 2 group: early recurrence group and non-early recurrence group, according to postoperative recurrence in primary hepatocellular carcinoma. MicroRNA profiling study were performed to obtain some different and significant microRNAs. According to literature, mir-144 and mir-502-3p were used to detect HCC recurrence by real-time PCR with 82 HCC cases, and target genes were predicted using bioinformatics. 【Results】 Expression of 7 miRNAs were different and significant in the HCC with early recurrence group. Comparing with non-early recurrence group, 4 miRNAs were up-regulated in early recurrence group. However, 3 miRNAs were down-regulated. The result of mir-144 and mir-502-3p expression by real-time PCR was uniformity to microarray. Rb1 might be a potential target gene of mir-144; SET might be a potential target gene of mir-502-3p. 【Conclusions】 Mir-144, mir-451, mir-486-5p, mir-602, mir-551b, mir-96, and mir-502-3p were correlated with early recurrence after radical surgery in primary hepatocellular carcinoma with analyzing and screening of microRNA profile by microarray.

**Key word:** primary hepatocellular carcinoma; early recurrence; microarray

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4):494-498]

原发性肝细胞癌 (primarg heptaocellular carcinoma, HCC) 是全球最常见的恶性肿瘤之一。对肝癌行根治性手术是目前肝癌治疗最有效的方

法<sup>[1]</sup>,但是肝癌术后复发尤其是术后早期复发严重影响患者的预后。有关临床研究文献指出:肝癌的复发转移以术后 1 年内最高,达 60%~80%。故

收稿日期:2012-04-20

基金项目:广东省科技计划项目(2009B080701021;2010B080701021),广东省医学科研基金(A2010002),广东省自然科学基金(10151008004000002)

作者简介:邓治亮,硕士研究生,研究方向:肝癌的综合治疗。\*通信作者:孙建,副主任医师,E-mail:akeyman@yahoo.com.cn

有学者定义肝癌术后1年内的肿瘤复发转移称肝癌早期复发<sup>[2-4]</sup>。目前有学者认为肝癌术后复发主要机制是肝内播散和非同步多中心癌变<sup>[5]</sup>。因此研究肝癌术后早期复发分子机制,将为肝癌治疗带来新的希望。MicroRNA 是一类内源性非编码的小分子 RNA,其长度为 21-23nt,通过对靶基因转录后水平的负性调控作用,来降低靶基因的表达水平。近来,有关研究发现 miRNA 参与调节肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡等多个生物学进程。有关报道指出肝癌的复发、转移、预后与肝癌组织中异常表达的 miRNA 有关<sup>[6-7]</sup>。本研究采用 microRNA 芯片技术筛选出与肝癌早期复发相关的 microRNAs,进一步研究 microRNA 在原发性肝癌早期复发中的分子机制,以及肝癌分子靶向治疗提供新的分子靶标。

## 1 材料与方 法

### 1.1 患者资料

从我院肝癌标本库中挑选例肝癌冰冻标本<sup>[8]</sup> 92 例,其中 55 例早期复发组(55 例肝癌患者术后 1 年内肝内出现复发病灶),37 例非早期复发组(37 例术后超过 2 年未出现肝内复发病灶)。所有患者均接受肝癌根治性手术,并且术后病理显示为原发性肝细胞癌,患者术后定期随访,随访截止至 2011 年 10 月,患者随访时间最短 8 个月,最长 70 个月。HCC 组织取肿瘤中无坏死组织、淤胆、出血,标本取下后立即放入 -200 °C 液氮中,再转入 -80 °C 低温冰箱中冻存。

### 1.2 主要试剂

MiRNA Complete Labeling and Hyb Kit、Gene Expression Wash Buffer Kit、Human miRNA microarray 购自 Agilent 公司,mirVana RNA Isolation Kit 购自 Ambion 公司,Rnase-Free Dnase Set (50) 购自 Qiagen 公司 实时荧光定量 PCR 试剂:M-MLV、Rnasin inhibitor 购自 Promega 公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,DL2000、SYBR Green PCR Master Mix 购自 TakaRa 公司。

### 1.3 MicroRNA 芯片的制作及其信号获得

取肝癌切除术后的肿瘤组织经 RNAlater (Ambion,美国)处理,转入 -80 °C 超低温冰箱冻存备用。本研究采用 Agilent miRNA 芯片公司的 Human miRNA microarray 表达谱芯片(该芯片覆盖

了 866 个人类相关的 microRNA 探针序列)进行分析研究。肿瘤组织总 RNA 的提取、纯化、荧光标记及芯片杂交、洗染、扫描等制作过程严格按照 Agilent miRNA 芯片公司提供的实验步骤操作。最后芯片信号数据以 Cel 文件格式保存。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 实验

采用 Trizol 一步法提取肝癌肿瘤组织总 RNA;采用茎环法以 miRNA 为模板合成 cDNA,cDNA 终产物置于 -20 °C。以 cDNA 为模板,U6 为内参,参照 TakaRa 公司提供的操作说明书进行 qReal-time PCR 反应。引物序列如下:mir-144-F (5' -ACACTCCAGCTGGGTACAGTATAGATGATGTA-3'),mir-144-R (5' -CTCAACTGGTGTCTGCTGTA-3'),U6-F (5' -CTCGCTTCGGCAGCACAA-3'),U6 -R (5' AACGCTTCACGAATTTGCGT3'),mir-502-3p-F (5' -ACACTCCAGCTGGGAATGCACTGGGCAAGGA-3'),mir-502-3p-R (5' -CTCAACTGGTGTCTGCTGGA-3')。反应条件:95 °C,15 s,1 个循环;65 °C,15 s,72 °C,32 s,40 个循环。

### 1.5 靶基因预测

应用互联网上 miRNAs 靶基因预测软件(TargetScan,PicTar,miRNAbase),预测筛选出的差异表达 miRNAs 的靶基因,取 3 个软件均预测到的基因作为靶基因。

### 1.6 统计分析

利用 SPSS13.0 软件对临床病理数据进行统计分析,实验数据均采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ )表示,计量资料采用两独立样本的 *t* 检验,计数资料采用 Pearson  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。采用 SAM2.1 软件分析基因数据。

## 2 结 果

### 2.1 肝癌术后早期复发组与非早期复发组临床病理资料对比分析

结果显示(表 1):在早期复发组中患有肝硬化显著高于非早期复发组( $\chi^2 = 5.924, P = 0.015$ );早期复发组中肿瘤直径、微血管侵犯、门静脉侵犯及病理分级显著高于非早期复发组,肿瘤直径( $\chi^2 = 12.439, P = 0.000$ )、微血管侵犯( $P = 0.024$ )、门静脉侵犯( $P = 0.027$ )、Edmonson 病理分级( $\chi^2 = 10.385, P = 0.001$ )。

### 2.2 肝癌组织中差异表达的 miRNAs 经 Agilent

表 1 肝癌术后早期复发组与非早期复发组临床数据比较

Table 1 Comparison of clinical variables of early recurrence group and none-early recurrence group		(n=82)			
Clinical Variables		EN	nEN	$\chi^2/t$ value	P value
Gender					
	male	45	26		0.325
	female	5	6		
Age(years)		47.880 ± 13.816	51.438 ± 12.474	-1.18	0.241
HBsAg	+	42	26	0.104	0.747
	-	8	6		
Child-pugh calss					
	A	38	23	0.174	0.676
	B	12	9		
Cirrhosis					
	yes	46	23	5.924	0.015
	no	14	9		
Tumor Size					
	≤5 cm	16	23	12.439	0.000
	≥5 cm	34	9		
Tumor No.					
	single	41	23	2.319	0.128
	multiple	9	9		
Edmonson Grade					
	II-III	38	13	10.385	0.001
	III-IV	12	19		
Microvascular Invasion					
	yes	13	2		0.038
	no	37	30		
Portal Vei Invasion					
	yes	7	0		0.039
	no	43	32		

Student *t* test; EN; early recurrence group; nEN; none-early recurrence group.

### miRNA芯片检测结果

结果表明,在原发性肝癌术后的早期复发组与非早期复发组中,经芯片杂交实验筛选出7个表达水平具有显著差异的miRNAs(图1)。相对于非早期复发组,早期复发组有4个microRNAs表达上调(表2);有3个microRNAs表达下调(表3)。

### 2.3 miR-144 和 miR-502-3p 在肝癌组织中相对表达水平

运用 Real-timePCR 检测 miR-144、miR-502-3p 在 82 例肝癌组织中的表达水平。结果显示,相对非早期复发组,早期复发组中 miR-144 在肝癌

中上调 6.944 倍。在早期复发组与非早期复发组中 miR-144 的相对表达量的数值分别是(43.893 ± 107.890) 和(6.321 ± 6.845),且两组比较差异有统计学意义( $P = 0.018$ );早期复发组中 miR-502-3p 在肝癌中表达下调 0.253 倍。在早期复发组与非早期复发组中 miR-502-3p 相对表达量的数值分别是(6.702 ± 9.775)和(26.467 ± 39.613),且两组比较差异有统计学意义( $P = 0.009$ )。

### 2.4 miR-144 和 miR-502-3p 靶基因的预测

我们运用互联网上3种miRNA靶基因预测软件(TargetScan, PicTar, miRnAbase),预测 miR-144 的靶基因,发现 Rb1 在其3种软件中均预测

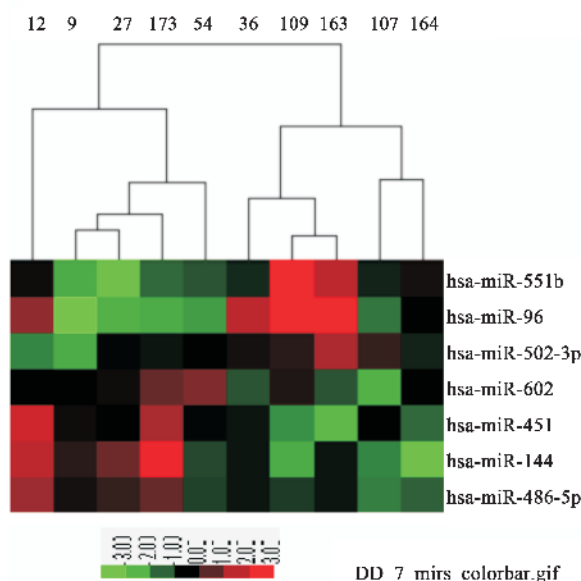


图1 肝癌中 miRNA 差异表达:早期复发组 VS 非早期复发组

Fig.1 Differential expression of early recurrence group and none-early recurrence group in HCC

表2 早期复发组中表达上调的 miRNAs

Table 2 miRNAs up-regulated in early recurrence group

miRNA	Fold-change(EN/nEN)	P value
miRNA-144	5.28	0.0108
miR-451	3.73	0.0134
miR-486-5p	2.50	0.0163
miR-602	2.29	0.0432

EN: early recurrence group; nEN: none-early recurrence group.

表3 早期复发组中表达下调的 miRNAs

Table 3 miRNAs down-regulated in early recurrence group

miRNA	Fold-change(EN/nEN)	P value
miR-551b	0.21	0.0463
miR-93	0.12	0.0406
miR-502-3p	0.042	0.0422

EN: early recurrence group; nEN: none-early recurrence group.

到,miR-502-3p 的靶基因为 SET。

### 3 讨论

microRNA 芯片技术是一种快速、高通量、高

效率分析 miRNA 表达谱的方法。本研究从我科肝癌标本库中选取 2 组病例用于 microRNA 芯片的制作:5 例早期复发组(术后 1 年内肝内出现复发灶);5 例非早期复发组(术后超过 2 年未出现肝内复发灶)。两组病例具有高度的可比性。

本研究初步筛选出 7 个与肝癌早期复发有关且具有明显异常表达的 miRNA。相对于非早期复发组,在早期复发组中有 4 个 microRNAs 表达上调,3 个 microRNAs 表达下调。其中 miR-144 在早期复发组中的表达是非早期复发组的 5.28 倍,miR-502-3p 在早期复发组中的表达是非早期复发组的 0.042 倍。同时应用 qReal-time PCR 方法在 82 例超低温肝癌冰冻标本中检测 miR-144、miR-502-3p 在肝癌早期复发组与非早期复发组中的表达水平,检测结果显示:相对非早期复发组,早期复发组中 mir-144 上调 6.944 倍,miR-502-3p 下调 0.253 倍。实验验证所得结果与 miRNA 芯片预测出的结果一致,说明 miRNA 芯片结果可靠。

原发性肝癌术后早期复发是影响肝癌患者长期生存的主要危险因素。本研究回顾性分析 82 例肝癌患者相关临床病理指标显示:肝硬化、肿瘤直径、微血管侵犯、门静脉侵犯及病理分级等因素是影响肝癌患者早期复发的危险因素。而有关 mir-144 和 miR-502-3p 在肝癌中的表达是否与以上影响肝癌早期复发的危险因素有关联还需进一步分析研究。

多处文献报道 mir-144 在各种恶性肿瘤中(乳腺癌、慢性粒细胞白血病等)表达下调,Mir-144 位于 11 号染色体,呈高度保守序列。已有研究发现在 mir-144 与 3' 非编码区的靶基因 Klf1d (一种红细胞系统的 Kruppel 样转录因子)结合,选择性调控胚胎期的  $\alpha$ -珠蛋白合成。与此同时靶基因 klf1d 又可反馈激活 miR-144 的转录水平。可见 mir-144 在红细胞发育过程中在调控维持  $\alpha$ -珠蛋白的表达水平中起关键作用<sup>[9]</sup>。另外研究<sup>[10]</sup>显示:在对比分析甲状腺滤泡癌与癌旁正常甲状腺组织的 microRNA 芯片表达谱中显示,miR-144 在甲状腺癌中表达下调,然而通过上调 mir-144 的表达就能够抑制其靶基因的表达靶蛋白。可见 Mir-144 在恶性肿瘤的发生、发展中扮演类似抑癌基因的作用。然而,本研究结果显示 mir-144 在肝癌术后早期复发中表达上调与文献报道结果相反,还需进一步实验验证 mir-144 与肝癌中术后早期复发

的相关性。

有关 mir-502-3p 的研究文献较少,在近来有关研究指出<sup>[11]</sup>:mir-502-3p 在纤层蛋白 A/C 基因突变所致的肌营养不良症中表达上调,mir-502-3p 过表达可能抑制丝裂原活化蛋白酶 (mitogen-activated protein kinase MAPK)、Wnt 信号传导通路以及转化生长因子 (transforming growth factor- $\beta$ ) 的表达,从而抑制肌细胞的修复。Mir-502 调控原癌基因 SET8 的表达,诱导产生一种关键的调节因子 TP53,激活 TP53 通路促进早期乳腺癌的发生<sup>[12]</sup>。本研究显示 mir-502-3p 在肝癌术后早期复发中表达下调,与文献报道一致<sup>[13]</sup>。

本研究发现 mir-96、mir-551b 在肝癌术后早期复发中表达下调。而 Myatt<sup>[14]</sup>等研究报道:在子宫内膜癌中 mir-96 表达上调,同时抑制靶基因 FOXO1 的表达。同时抑癌基因 FOXO1 也抑制 miR-96 的表达。提示:mir-96 与靶基因 FOXO1 之间是互相调控关系,如调节失控将导致肿瘤的发生。有关报道<sup>[15]</sup>:mir-96 在经典霍杰金淋巴瘤细胞系中表达上调,表达下调后抑制靶基因 FOXO1 表达下调。可见 mir-96 在经典霍杰金淋巴瘤中具有促进肿瘤转移的作用。

本研究运用 microRNA 芯片技术筛选出与肝癌早期复发相关并有明显差异表达的 miRNA 表达谱。通过在线软件预测 Rb1 可能是 miR-144 的靶基因,SET 可能是 miR-502-3p 的靶基因。在此研究基础之上,我们将运用 Western blot 验证靶基因在肝癌中的表达水平,以及后期细胞体外实验及体内动物实验更进一步研究 miRNA 在肝癌产生、复发、转移中的分子机制。为肝癌的早期诊断找出新的分子标记物和为将来的靶向治疗提供新的靶点。

#### 参考文献:

- [1] Tang ZY. Hepatocellular Carcinoma—cause, treatment and metastasis[J]. World J Gastroenter, 2001, 7(4): 445-454.
- [2] Shah SA, Greig PD, Gallinger S, et al. Factor associated with recurrence after resection for hepatocellular carcinoma and outcomes [J]. J Am Coll Surg, 2006, 202(2): 275-283.
- [3] Ibrahim S, Roychowdhury A, Hean TK. Risk factors for intrahepatic recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma [J]. Am J Surg, 2007, 194(1): 17-22.
- [4] Poon RT, Fan ST, Ng IO, et al. Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection[J]. Cancer, 2000, 89(3): 500-507.
- [5] 李德辉,孙备. 肝细胞肝癌肝内转移与多中心发生的研究进展[J]. 国际外科杂志, 2006, 33(1): 28-31.
- [6] 陈文生. microRNA 与原发肝癌发生机制相关性的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(12): 1218-1223.
- [7] Murakami Y, Yasuda T, Saiqi K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues [J]. Oncogene, 2006, 25(8): 2537-2545.
- [8] 陈伟,林叶,侯宝华,等. 规范化网络信息系统支持的肝癌标本库建立探讨[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(6): 826-827.
- [9] YF Fu, TT Du, M Dong, et al. Mir-144 selectively regulates embryonic  $\alpha$ -hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis [J]. Blood, 2009, 113(6): 1340-1349.
- [10] ossing M, Borup R, Hena R, et al. Down-regulation of microRNAs controlling tumorigenic factors in follicular thyroid carcinoma [J]. Mol Endocrinol 2012, 25, 48(1): 11-23.
- [11] Sylvius N, Bonne G, Straatman K, et al. MicroRNA expression profiling in patients with lamin A/C - associated muscular dystrophy [J]. FASEB, 2011, 25(11): 3966-3978.
- [12] Song F, Zheng H, Liu B, et al. An miR-502-binding site single -nucleotide polymorphism in the 3' - untranslated region of the SET8 gene is associated with early age of breast cancer onset [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(19): 6292-6300.
- [13] Yang L, Ma Z, Wang D, et al. MicroRNA-602 regulating tumor suppressive gene RASSF1A is overexpressed in hepatitis B virus -infected liver and hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(10): 803-808.
- [14] Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer [J]. Cancer Res, 2010, 70(1): 367-377.
- [15] Xie L, Ushmorov A, Leithäuser F, et al. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma [J]. Blood, 2012, 119(15): 3503-3511.

(编辑 徐杰)