

# 外周血中 microRNA 用于肝癌诊断的研究进展

陈 胜 王 亮 曹 爽 闻勤生

**摘要:**原发性肝癌(以下简称肝癌)是中国发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一。近年来微小 RNA (microRNA, miRNA) 已成为分子生物学领域研究的热点, 目前研究发现 miRNA 在肝癌的发生、发展及转移过程中发挥着重要的作用。此文就外周血中 miRNA 用于肝癌早期诊断的研究进展作一综述。

**关键词:**原发性肝癌; microRNA; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2014.06.009

原发性肝癌(以下简称肝癌)是指起源于肝细胞或肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤, 包括肝细胞癌、肝内胆管细胞癌和肝细胞胆管细胞混合癌。其中以肝细胞癌最常见, 占肝癌的 80%~90%。肝癌位列全球最常见的恶性肿瘤第七位<sup>[1]</sup>。近半数新发肝癌患者在中国, 主要是由于中国有超过 1 亿的慢性乙型肝炎患者<sup>[2]</sup>。肝癌严重威胁着中国人的生命健康, 早期诊断和早期外科干预对提高肝癌患者的生存率十分重要。目前肝癌的早期诊断与筛查主要依靠影像学检查和肿瘤标志物检测两种手段。影像学检查以核磁共振(MRI)、CT、超声为主, 通过视野中可见的肝脏占位性病变来进行诊断, 这些手段存在一定的滞后, 不利于肝癌的早发现、早治疗。而肿瘤标志物的检测在肝癌的诊断、预后判断以及肝癌术后复发的检测等方面发挥着越来越重要的作用<sup>[3]</sup>。

目前常用的肝癌标志物是甲胎蛋白(AFP), 其诊断肝癌的敏感性和特异性并不十分理想, 对肝细胞来源的肝癌特异性较高, 但对胆管上皮来源的肝癌特异性较低, 而且在较小的肿瘤组织突破包膜进入血液循环之前, AFP 检测往往呈阴性, 因此单凭 AFP 易造成漏诊; 此外, 妊娠期妇女、急慢性肝炎、胃肠道肿瘤和生殖腺肿瘤等人群的 AFP 也可能升高, 一味盲目相信 AFP 会造成误诊<sup>[4-6]</sup>。

肿瘤标志物在非瘤组织内一般含量非常少或几乎不产生, 它反映了肿瘤发生发展过程中相关基因、基因产物的相互作用及活性程度。肿瘤标志物是否存在及其表达水平可从患者的体液、分泌物及组织细胞中检测出来。此外, 虽然某些物质可能在

多种肿瘤患者中的存在和表达不同, 不具有明显的肿瘤特异性, 但其可能参与肿瘤发生发展的过程, 故也可作为肿瘤标志物。肿瘤标志物可分为两大类: 一类为血清/血浆肿瘤标志物; 另一类为细胞肿瘤标志物, 包括癌基因和细胞表面抗原两大类。

## 1 微小 RNA 与肝癌的临床诊断

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是由 21~25 个核苷酸构成的非编码小分子 RNA, 不编码蛋白质分子, 曾被视为无功能的分子<sup>[7]</sup>。近年来, miRNA 已成为分子生物学领域的研究热点。miRNA 作用于靶基因 mRNA 3' 非翻译区 (UTR), 以干扰 mRNA 转录的方式负向调控基因的表达<sup>[8]</sup>。有研究发现 miRNA 是与肿瘤相关的多种基因的上游调控分子, 通过调控细胞的增殖、凋亡等多种途径影响肝癌的发生发展<sup>[9]</sup>。miRNA 的异常表达与肝癌的发生、发展及转移密切相关, 这些 miRNA 大致可分为两类: 一类是在多种肿瘤中普遍表达的, 为“非肝癌特异性 miRNA”, 如 miR-221 在肝癌、胰腺癌及前列腺癌中均表达上调; 另一类仅在肝癌中异常表达, 为“肝癌特异性 miRNA”, 目前认为 miR-122 为肝癌特异性 miRNA<sup>[10]</sup>。目前研究发现的在外周血中有望成为肝癌标志物的 miRNA 见表 1<sup>[11]</sup>。

## 2 肝癌标志物候选 miRNA

### 2.1 miR-16

单独检测 miR-16 用于鉴别肝癌及其他慢性肝脏疾病的特异性和灵敏性分别为 88.8% 和 72.1%, 与传统指标 AFP、脱- $\gamma$ -羧基凝血酶原(DCP)相比有较高的敏感性, 对于 <3 cm 的肿瘤, 其诊断敏感性更是高达 79.1%。目前认为 miR-16 对小肝癌的鉴别具有较高的诊断价值, 有利于肝癌的早期诊断。Qu 等<sup>[12]</sup>的研究显示, 将 miR-16 与传统诊断指标联合检测, 诊断敏感性将明显提高; 联合检测 miR-16、AFP、甲胎蛋白异质体比例(AFP-L)、DCP 诊断肝

作者单位: 710038 陕西西安, 第四军医大学学员一旅(陈胜, 王亮, 曹爽); 710038 陕西西安, 第四军医大学唐都医院消化内科(闻勤生)

通信作者: 闻勤生, Email: wenqss@163.com

癌的敏感性明显高于联合检测 AFP、AFP-L、DCP；并认为 miR-16 可用于传统指标检测阴性者的进一步筛查，以减少漏诊。为了提高检测的准确性，倾

向于选择高表达的 miRNA，而 miR-16 在肝癌血清中低表达，在一定程度上限制了 miR-16 作为肝癌诊断指标<sup>[13]</sup>。

表 1 外周血中可能成为肝癌标志物的 miRNA

microRNA	血浆中表达水平	样本来源	结论
miR-16	下调	71HL, 105HCC, 107CLD	与肝癌显著相关, 与传统标志物相结合提高诊断能力
miR-21	上调	89HL, 101HCC, 48CH	肝脏损伤非特异性标志物
miR-21	上调	20HL, 46HCC	在肝癌中升高
miR-92a	下调	10HL, 10HCC	手术切除后降低
miR-122	上调	89HL, 101HCC, 48CH	肝脏损伤非特异性标志物
miR-195	下调	71HL, 105HCC, 107CLD	与肝癌显著相关
miR-199a	下调	71HL, 105HCC, 107CLD	与肝癌显著相关
miR-221	上调	20HL, 46HCC	在 46 例肝癌中 35 例升高, 与肝癌的分期及预后相关
miR-222	上调	20HL, 46HCC	在肝癌中升高
miR-223	上调	89HL, 101HCC, 48CH	肝脏损伤非特异性标志物
miR-224	上调	20HL, 46HCC	在肝癌中升高
miR-500	上调	10HCC	10 例中 3 例升高, 手术后 6 个月降低
miR-885	上调	10HL, 15HCC, 10LC	肝纤维化标志物

注: HL, 健康肝脏; HCC, 肝细胞癌; CH, 慢性肝炎; LC, 肝硬化; CLD, 慢性肝脏疾病

### 2.2 miR-21

目前认为 miR-21 具有类似癌基因的作用，通过调控多种抑癌基因如程序性细胞凋亡因子 4 (PDCD4)、原肌球蛋白 1 (TPM1)、同源性磷酸酶-张力蛋白 (PTEN)，参与肿瘤的生长、侵袭和转移<sup>[14]</sup>。有研究发现，肝癌和慢性肝炎患者血浆中 miR-21 较健康人显著升高，认为 miR-21 可作为肝脏损伤非特异性标志物<sup>[15]</sup>。miR-21 用于鉴别肝癌和慢性肝炎患者的敏感性和特异性分别为 61.1% 和 83.3%，受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积 (AUC) 为 0.773，具有一定的诊断准确性；miR-21 用于鉴别肝癌患者和健康志愿者的敏感性和特异性分别为 87.3% 和 92.0%，AUC 为 0.953，具有较高诊断准确性<sup>[16]</sup>。但 miR-21 在肺癌、乳腺癌、淋巴瘤等多种恶性肿瘤中均有异常表达，其对于肝癌的早期诊断价值有待进一步研究。

### 2.3 miR-122

miR-122 约占成年人肝脏内 miRNA 总量的 72%，是最早发现的具有组织特异性、高丰度表达的 miRNA 之一，与肝脏的生长、发育及干细胞正常形态的调控密切相关<sup>[17]</sup>。有研究认为 miR-122 能将肝癌和慢性肝炎患者与健康人区别开来，但不能区别肝癌患者与肝炎患者，miR-122 是反映肝损害的指标而非肝癌的特异性指标<sup>[15]</sup>。此外，miR-122 与肝脏高丰度转录因子 (LETf) 的功能一致，两者

构成“正反馈环”，共同促进肝细胞的分化<sup>[18,19]</sup>。一般认为 LETf 是高分化肝细胞的标志基因，可作为区分肝细胞分化程度的指标<sup>[20]</sup>。因此，miR-122 与肝脏肿瘤的分化程度有关，目前认为 miR-122 的表达水平的高低可作为判断肝脏肿瘤分化程度的指标。

### 2.4 miR-221

miR-221 是近年发现的一种肿瘤相关 miRNA，其在许多实体肿瘤组织中的表达上调<sup>[21]</sup>。肝癌患者癌组织和血清中的 miR-221 明显上调，提示 miR-221 与肝癌具有相关性<sup>[22]</sup>。过表达 miR-221 的细胞的生长、增殖、侵袭及转移能力都有增强<sup>[23]</sup>。郭晓东等<sup>[24]</sup>的研究认为，miR-221 的表达水平与肝癌患者肝移植术后复发及转移密切相关。miR-221 的反义核苷酸抑制剂可抑制肝癌细胞生长，在动物实验中，过表达 miR-221 促进了肿瘤的进程，也减少了动物的生存时间。目前认为，miR-221 通过调节多个基因的表达从而影响多条肿瘤信号通路，如 CDKN1B/P27、CDKN1C/P57、PTEN 等<sup>[25,26]</sup>。这些通路的存在表明，即使是一种 miRNA 的表达异常，也会对肿瘤产生重要的影响。

### 2.5 miRNA 组合

Li 等<sup>[27]</sup>比较乙型肝炎患者及正常对照组血清中 miRNA 的含量，筛选出 miR-375、miR-92a、miR-10a、miR-223、miR-423、miR23b/a、miR-342-3P、

miR-99a、miR-122a、miR-125b、miR-150 和 let-7c, 它们在乙型肝炎患者血清中的含量较正常对照组高3倍以上。其中若干种 miRNA 的组合不仅能区分乙型肝炎、丙型肝炎和健康对照组,而且能鉴别乙型肝炎及其相关性肝癌。联合检测7个血浆中与肝癌有关的 miRNA (miR-122、miR-192、miR-21、miR-223、miR-26a、miR-27a 和 miR-801)时,敏感性和特异性分别为81.8%和83.5%,AUC为0.888,具有一定的诊断准确性。针对AFP阴性的肝癌患者,上述7种 miRNA 组合的诊断敏感性和特异性为77.7%和84.5%,AUC为0.879,表明其对于AFP阴性的肝癌患者具有很好的诊断效果<sup>[28]</sup>。

### 3 展望

肝脏是人体重要的代谢、解毒器官。肝脏发生癌变必然会引起体内相关基因及其产物发生一系列变化,这些变化会在基因、分子、细胞等角度体现出来。肿瘤标志物就是要发现这些处于各个水平上的变化,为肝癌的诊断和治疗提供参考。理想的肝癌诊断标志物需要具备以下特点:(1)对肝癌具有高度特异性,在肝脏不典型增生结节及其他器官的肿瘤中检测不到;(2)敏感性高,能在肝癌早期被检出;(3)检测方法简便、结果稳定,重复性好;(4)取样少、检测创伤小,便于操作,患者依从性好<sup>[29]</sup>。目前肝癌标志物的检测仍然存在特异性较差、敏感性不高的缺陷,这可能是今后肿瘤标志物研究的方向。

外周血 miRNA 作为肝癌诊断标志物具有很多优点:血清中表达很稳定;即便被反复冻融,极端pH值或RNA酶处理,也不影响其完整性<sup>[11,30,31]</sup>。目前关于miRNA肝癌标志物的研究尚处于起始阶段,需要扩大样本量,进行多中心临床研究。随着医学科学的进步,强调预防性(preventive)、预测性(predictive)、社会参与性(participator)和个体化(personalized)的“4P”医学模式逐渐形成。基于这种改变,肝癌的防控重点也逐渐前移,强调“治未病”。miRNA在肝癌发生、发展和转移中的作用,以及对于肝癌诊断的价值将随着研究的深入逐步被揭示。

### 参 考 文 献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61: 69-90.
- 2 Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Parkin DM, et al. Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. *Lancet*, 2012, 380: 1840-1850.

- 3 Witjes CD, van Aalten SM, Steyerberg EW, et al. Recently introduced biomarkers for screening of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Hepatol Int*, 2013, 7: 59-64.
- 4 Marrero JA, Feng Z, Wang Y, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2009, 137: 110-118.
- 5 Siripongsakun S, Wei SH, Lin S, et al. Evaluation of alpha-fetoprotein in detecting hepatocellular carcinoma recurrence after radiofrequency ablation. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29: 157-164.
- 6 赵睿, 王启之. 肝癌诊断的肿瘤标志物研究进展. *国际消化病杂志*, 2013: 29-31.
- 7 Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*, 2012, 4: 143-159.
- 8 Sun J, Lu H, Wang X, et al. MicroRNAs in hepatocellular carcinoma: regulation, function, and clinical implications. *Scientific World Journal*, 2013, 2013: 924206.
- 9 Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*, 2012, 33: 1126-1133.
- 10 刘明洋, 关键. microRNA对肝癌诊断和治疗的潜在意义. *癌症进展*, 2011, 9: 692-695.
- 11 Borel F, Konstantinova P, Jansen PL. Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2012, 56: 1371-1383.
- 12 Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45: 355-360.
- 13 曹芳芳, 鲍依稀. 外周血 miRNA 诊断肝细胞癌的研究进展. *国际检验医学杂志*, 2013, 34: 987-989.
- 14 Liu C, Yu J, Yu S, et al. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2010, 53: 98-107.
- 15 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. *Mol Carcinog*, 2011, 50: 136-142.
- 16 Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2012, 56: 167-175.
- 17 Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*, 2008, 48: 648-656.
- 18 Rong M, Chen G, Dang Y. Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro. *BMC Cancer*, 2013, 13: 21.
- 19 Laudadio I, Manfredi I, Achouri Y, et al. A feedback loop between the liver-enriched transcription factor network and miR-122 controls hepatocyte differentiation. *Gastroenterology*, 2012, 142: 119-129.
- 20 Gardner-Stephen DA, Mackenzie PI. Liver-enriched transcription factors and their role in regulating UDP

- glucuronosyltransferase gene expression. *Curr Drug Metab*, 2008, 9: 439-452.
- 21 Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Letters*, 2013, 329: 125-136.
- 22 Li J, Wang Y, Yu W, et al. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406: 70-73.
- 23 Callegari E, Elamin BK, Sabbioni S, et al. Role of microRNAs in hepatocellular carcinoma: a clinical perspective. *Onco Targets Ther*, 2013, 6: 1167-1178.
- 24 郭晓东, 熊璐, 张红萍, 等. 肝细胞癌肝移植患者血清 miR-221 检测及其临床意义. *现代生物医学进展*, 2013, 6: 1079-1082.
- 25 Sun K, Zeng JJ, Wang W, et al. MicroRNA-221 controls CDKN1C/P57 expression in human colorectal carcinoma. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2011, 14: 279-283.
- 26 Zhang X, Sun K, Lei S, et al. Anti-microRNA-221 enhances radiosensitivity of colorectal carcinoma cells by up-regulating PTEN. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2013, 33: 728-732.
- 27 Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res*, 2010, 70: 9798-9807.
- 28 Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 4781-4788.
- 29 王红阳. 肝癌诊断与预后判断的分子标志物. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19: 241-243.
- 30 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. *Cell Res*, 2008, 18: 997-1006.
- 31 Köberle V, Pleli T, Schmithals C, et al. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers. *PLoS One*, 2013, 8: e75184.

(收稿日期:2014-02-20)

(本文编辑:林磊)

(上接第 371 页)

- 3 Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10: 639-645.
- 4 Kudo S, Tamura S, Nakajima T, et al. Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc*, 1996, 44: 8-14.
- 5 Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, et al. Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2003, 124: 880-888.
- 6 Rutter MD, Saunders BP, Schofield G, et al. Pancolonic indigo carmine dye spraying for the detection of dysplasia in ulcerative colitis. *Gut*, 2004, 53: 256-260.
- 7 Wu L, Li P, Wu J, et al. The diagnostic accuracy of chromoendoscopy for dysplasia in ulcerative colitis: meta-analysis of six randomized controlled trials. *Colorectal Dis*, 2012, 14: 416-420.
- 8 Olliver JR, Wild CP, Sahay P, et al. Chromoendoscopy with methylene blue and associated DNA damage in Barrett's oesophagus. *Lancet*, 2003, 362: 373-374.
- 9 Davies J, Burke D, Olliver JR, et al. Methylene blue but not indigo carmine causes DNA damage to colonocytes in vitro and in vivo at concentrations used in clinical chromoendoscopy. *Gut*, 2007, 56: 155-156.
- 10 Kiesslich R, Burg J, Kaina B, et al. Safety and efficacy of methylene blue-aided chromoendoscopy in ulcerative colitis: a prospective pilot study upon previous chromoendoscopies. *Gastrointest Endosc*, 2004, 59: 97.
- 11 张平, 董卫国, 汤绍迁, 等. 电子内镜窄带成像技术与智能分光比色技术的对比研究. *中国医疗设备*, 2009, 24: 55-57, 61.
- 12 Gono K, Obi T, Yamaguchi M, et al. Appearance of enhanced tissue features in narrow-band endoscopic imaging. *J Biomed Opt*, 2004, 9: 568-577.
- 13 Dekker E, van den Broek FJ, Reitsma JB, et al. Narrow-band imaging compared with conventional colonoscopy for the detection of dysplasia in patients with longstanding ulcerative colitis. *Endoscopy*, 2007, 39: 216-221.
- 14 van den Broek FJ, Fockens P, van Eeden S, et al. Narrow-band imaging versus high-definition endoscopy for the diagnosis of neoplasia in ulcerative colitis. *Endoscopy*, 2011, 43: 108-115.
- 15 Pellisé M, López-Cerón M, Rodríguez de Miguel C, et al. Narrow-band imaging as an alternative to chromoendoscopy for the detection of dysplasia in long-standing inflammatory bowel disease: a prospective, randomized, crossover study. *Gastrointest Endosc*, 2011, 74: 840-848.
- 16 Kudo T, Matsumoto T, Esaki M, et al. Mucosal vascular pattern in ulcerative colitis: observations using narrow band imaging colonoscopy with special reference to histologic inflammation. *Int J Colorectal Dis*, 2009, 24: 495-501.
- 17 Neumann H, Vieth M, Günther C, et al. Virtual chromoendoscopy for prediction of severity and disease extent in patients with inflammatory bowel disease: a randomized controlled study. *In amm Bowel Dis*, 2013, 19: 1935-1942.
- 18 Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2007, 132: 874-882.
- 19 Dlugosz A, Barakat AM, Ost A, et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy in colonoscopic surveillance of patients with primary sclerosing cholangitis related inflammatory bowel disease (PSC-IBD). *Gastroenterology*, 2013, 144 (5 Suppl 1): S87.
- 20 Li CQ, Xie XJ, Yu T, et al. Classification of inflammation activity in ulcerative colitis by confocal laser endomicroscopy. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105: 1391-1396.

(收稿日期:2014-04-10)

(本文编辑:林磊)