

miR-449b 表达与原发性肝细胞癌预后的关系

樊斌¹, 张家耀¹, 李伟²

1. 恩施土家族苗族自治州中心医院肝胆外科, 湖北 恩施 445000;
2. 恩施土家族苗族自治州中心医院病理科, 湖北 恩施 445000

摘要: **目的** 探讨原发性肝细胞癌患者外周血中微小 RNA(miR)-449b 的表达水平及其与预后的关系。**方法** 选取 2013 年 1 月至 2015 年 1 月行根治切除术的 98 例原发性肝细胞癌患者作为观察组, 选取同期 30 例健康体检者作为对照组。用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测研究对象外周血中 miR-449b 的表达水平。对观察组患者进行随访, 截止时间为 2019 年 10 月, 观察患者总生存期(OS), 分析 miR-449b 的表达与 OS 的关系。**结果** 观察组外周血中 miR-449b 表达水平为(0.25 ± 0.09), 低于对照组的(0.59 ± 0.12), 差异有统计学意义($t = 16.674$, $P < 0.01$)。共 90 例患者获得随访, 死亡 49 例。Kaplan-Meier 联合 Log-rank 检验显示, miR-449b 低表达组 OS 短于 miR-449b 高表达组($P < 0.05$)。Cox 分析结果显示, miR-449b 低表达、年龄大、TNM 分期高是影响原发性肝细胞癌患者 OS 的独立危险因素($P < 0.05$)。**结论** 原发性肝细胞癌患者外周血中 miR-449b 表达下调, 且 miR-449b 表达降低与较短的 OS 有关, 血 miR-449b 的检测可能成为有效的原发性肝细胞癌预后标志物。

关键词: 原发性肝细胞癌; 微小核糖核酸-449b; 总生存期; 预后

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)02-0178-04

Relationship between miR-449b expression and prognosis of primary hepatocellular carcinoma

FAN Bin*, ZHANG Jia-yao, LI Wei

* Department of Hepatobiliary Surgery, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China

Corresponding author: LI Wei, E-mail: liweiw000@126.com

Abstract: Objective To investigate the expression level of microRNA (miR)-449b in peripheral blood and its relationship with prognosis of patients with primary hepatocellular carcinoma (PHC). **Methods** A total of 98 PHC patients undergoing radical resection from January 2013 to January 2015 were selected as observation group, and 30 healthy examined people during the same period were served as control group. The quantitative real time polymerase chain reaction assay was used to detect the expression level of miR-449b in peripheral blood. The patients in observation group were followed up until October 2019 to observe the overall survival (OS) and analyze the association of miR-449b expression with OS. **Results** The expression level of miR-449b in observation group was significantly lower than that in control group (0.25 ± 0.09 vs 0.59 ± 0.12, $t = 16.674$, $P < 0.01$). In the 90 followed patients, 49 patients died. Kaplan-Meier combined with Log-rank test showed that OS in patients with low expression of miR-449b were significantly shorter than that in patients with high expression of miR-449b ($P < 0.05$). Cox analysis showed that lower miR-449b expression, older age and higher TNM stage were the independent risk factors for OS in PHC patients ($P < 0.05$). **Conclusion** In patients with PHC, the down-regulation expression of miR-449b is associated with poor OS, and peripheral blood detection of miR-449b may be an effective prognostic marker of PHC.

Keywords: Primary hepatocellular carcinoma; MicroRNA-449b; Overall survival; Prognosis

肝细胞癌的诊断和治疗在过去几年中取得巨大进步, 但患者的存活率仍然很低^[1]。目前已知许多微小 RNA (microRNA, miRNA, miR) 在肝癌发生的过

程中起作用, 可导致肿瘤促进或肿瘤抑制。miRNA 代表一类小 RNA, 经常在人类恶性肿瘤中失控, 近年来 miRNA 在早期诊断、预后分类、监测癌症治疗、选

择靶向药物方面的作用已经得到证实^[2]。研究显示,miR-449b在多种恶性肿瘤中表达降低,且与抑制肿瘤进展有关^[3]。miR-449b表达可抑制原发性肝癌进展和转移^[4],但miR-449b表达对原发性肝癌预后的影响报道较少,外周血中miRNA由于性质稳定、检测方便,已成为多种疾病的生物学标志物^[5],故本研究观察原发性肝癌患者外周血中miR-449b的表达水平及其与预后的关系,为临床寻找原发性肝癌预后标志物提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2013年1月至2015年1月在恩施土家族苗族自治州中心医院行根治切除手术的98例原发性肝癌患者作为观察组,年龄35~76(52.5±5.4)岁,男52例,女46例,BMI(24.6±2.5)kg/m²。选取标准:经术后常规病理诊断为原发性肝癌;年龄18~80岁;临床病理资料完整;本人或直系亲属签署研究同意书;首诊患者且既往未在他院接受其他抗癌治疗;依从性可。排除合并其他恶性肿瘤、接受抗癌治疗、严重心脑血管疾病、精神疾病、复发转移肝癌、肿瘤家族史、哺乳者、正在参与其他研究、预期生存时间较短、自身免疫性疾病、急性期疾病(感染)者。选取同期30例体检结果健康者作为对照组。对照组年龄34~78(53.5±5.7)岁,男17例,女13例,BMI(24.4±2.6)kg/m²。2组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),本研究符合医院伦理委员会要求。

1.2 方法

1.2.1 miR-449b检测 采集患者肘静脉血4ml,置入分离胶真空管,采用3000r/min(离心半径15cm)离心机离心15min后取上清液置于-80℃冰箱备用。miRNA分离试剂盒购自北京百奥莱博生物科技有限公司,RNA浓度及纯度用NanoDrop1000分光光度计测量。分离血总miRNA后使用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR,miScript SYBR Green PCR Kit)法检测miR-449b的表达水平,PCR反应条件:95℃10min,95℃15s,60℃1min,共45个循环。miR-449b的表达水平使用2^{-ΔΔCt}法计算。

1.2.2 随访 采用上门、病历、电话和门诊随访相结合的方式对患者进行每3个月1次的随访,随访内容包括复发、转移、死亡等,截止时间为2019年10月,观察患者总生存期(overall survival,OS)。OS定义为死亡时间或观察终止时间减去手术时间。

1.3 统计学方法 使用SPSS 21.0软件分析数据。

符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用独立样本 t 检验,非正态分布的资料使用中位数(第25百分位数,第75百分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,计数资料采用 χ^2 检验。Kaplan-Meier法及Log-rank检验进行OS的单因素分析,将单因素分析中有统计学差异的自变量纳入Cox多因素模型分析OS的独立影响因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组miR-449b表达水平 观察组外周血中miR-449b表达水平低于对照组[(0.25±0.09)vs(0.59±0.12), $t=16.674, P<0.01$]。

2.2 原发性肝癌预后 共90例患者获得随访,失访8例,成功随访率为91.8%,随访时间(48.9±6.9)个月,共死亡49例,按miR-449b表达水平中位值将患者分为miR-449b高表达组(miR-449b>0.35,45例)和miR-449b低表达组(miR-449b≤0.35,45例)。

2.3 miR-449b表达与OS的关系 Kaplan-Meier联合Log-rank检验显示,miR-449b低表达组OS短于miR-449b高表达组($P<0.05$)。见图1。不同年龄、Child-Pugh分级、肿瘤数目、TNM分期、门静脉癌栓者的OS比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。Cox分析结果显示,miR-449b低表达、年龄大、TNM分期高是影响原发性肝癌患者预后的独立危险因素($P<0.05$)。见表2。

表1 原发性肝癌患者OS的单因素分析

项目	OS		Log-rank χ^2	P值
	[月, $M(P_{25}, P_{75})$]			
年龄	≥60岁	49(20,58)	4.592	0.036
	<60岁	60(21,68)		
性别	男	52(19,65)	1.025	0.841
	女	53(21,68)		
Child-Pugh分级	B级	47(21,57)	3.997	0.041
	A级	59(20,68)		
肿瘤最大径	≥5cm	53(20,67)	1.023	0.258
	<5cm	53(21,69)		
肿瘤数目	多发	46(18,59)	4.369	0.039
	单发	59(20,69)		
门静脉癌栓	是	44(17,58)	8.214	0.015
	否	58(24,67)		
TNM分期	Ⅲ期	35(11,66)	10.254	0.001
	I~II期	60(29,69)		
感染肝炎病毒	是	52(16,60)	1.026	0.531
	否	54(18,61)		
miR-449b表达	降低	42(15,59)	5.141	0.023
	升高	58(23,68)		
肿瘤部位	左叶	51(18,65)	0.367	0.941
	右叶	53(19,68)		

表 2 原发性肝细胞癌患者 OS 的多因素分析

项目	β	SE	Wald	P 值	OR 值	95% CI
miR-449b 表达	1.789	0.718	6.216	0.013	5.985	1.466 ~ 24.429
年龄	1.607	0.805	3.988	0.046	4.989	1.030 ~ 24.162
TNM 分期	4.063	1.476	7.757	0.006	18.139	3.221 ~ 1049.470

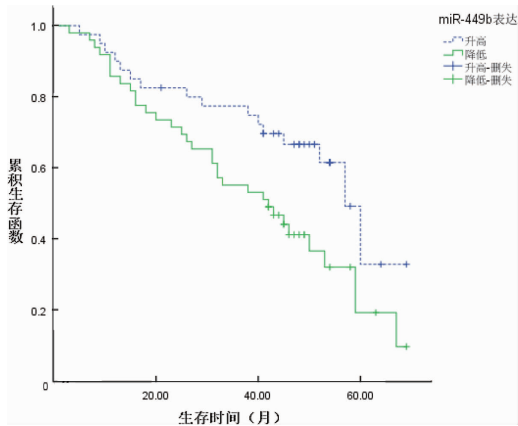


图 1 miR-449b 高表达和低表达患者的 OS 曲线

3 讨论

原发性肝细胞癌居癌症相关死亡的第二位,预计到 2030 年,将成为癌症相关死亡的第三大主要原因,超过乳腺癌、前列腺癌和结肠直肠癌^[5]。肿瘤切除或肝移植是其标准治疗方法,但是接受这些治疗的患者复发的风险仍然很高。肿瘤切除后 5 年的复发率为 70%,而移植后 5 年的复发率为 15% ~ 20%^[6]。寻找影响预后的标志物对预测预后和探索肿瘤进展机制具有重要意义。

miRNA 在原发性肝细胞癌的研究中受到重视,为原发性肝细胞癌早期诊断、早期干预和预后预测拓宽了思路^[7-8]。本研究发现观察组外周血中 miR-449b 表达水平显著低于对照组,提示 miR-449b 在原发性肝细胞癌患者中表达下调,与既往研究结果相符^[9]。本研究还显示 miR-449b 低表达组 OS 低于 miR-449b 高表达组,且 miR-449b 低表达是影响原发性肝细胞癌患者 OS 的独立危险因素。目前 miR-449b 表达对原发性肝细胞癌预后的报道非常有限。外周血 miRNA 性质稳定^[10],血浆 miR-449b 表达在其他疾病中作为预后标志物的作用已被证实^[11]。既往研究显示,miR-449b 的低水平表达与非小细胞肺癌、鼻咽癌等复发和死亡密切相关^[3,12],提示 miR-449b 可能具有抑制肿瘤的特异性。miR-449b 表达抑制原发性肝细胞癌进展的机制尚未明确。侯彭姣等^[9]研究显示,miR-449b 在肝癌细胞中表达下调,通过过表达 miR-449b 可抑制肝癌细胞的迁移。体外研究证实 miR-449b 在肝癌中具有功能作用和靶基因的特征,

miR-449b 通过下调引起癌基因 SOX4 抑制,从而抑制细胞死亡和细胞迁移^[13]。研究证实,miR-449b 靶向 β -catenin 和 Wnt 信号传导抑制体内肝母细胞瘤的生长^[14]。但部分研究结果不同,黄智平等^[15]研究认为 miR-449b-5p 在肝癌细胞中表达下调,miR-449b-5p 通过靶向 KLF4 促进肝细胞癌的增殖以及转移。因此 miR-449b 在原发性肝细胞癌中作用仍需进一步证实。

本研究提示原发性肝癌患者外周血中 miR-449b 表达降低与患者远期预后相关,miR-449b 表达下调与肝癌的发生和进展有关,miR-449b 可能成为有效的预后标志物及治疗靶点。但本研究仅检测外周血中 miR-449b 水平,未检测肿瘤组织 miR-449b 水平,具有一定局限性,且样本量有限,研究结果仍需进一步验证。综上所述,原发性肝细胞癌患者外周血中 miR-449b 表达下调,且 miR-449b 低表达者 OS 较短,血 miR-449b 的检测可能成为有效的原发性肝细胞癌预后标志物。

参考文献

- [1] Li L, Wang HY. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy[J]. Cancer Lett, 2016, 379(2): 191 - 197.
- [2] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203 - 222.
- [3] Yang D, Li JS, Xu QY, et al. Inhibitory effect of MiR-449b on cancer cell growth and invasion through LGR4 in non-small-cell lung carcinoma[J]. Curr Med Sci, 2018, 38(4): 582 - 589.
- [4] Bronte F, Bronte G, Fanale D, et al. HepatomiRNoma: the proposal of a new network of targets for diagnosis, prognosis and therapy in hepatocellular carcinoma[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 97: 312 - 321.
- [5] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87 - 108.
- [6] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12): 1118 - 1127.
- [7] Xu J, Li J, Liu ZJ. MicroRNAs in the occurrence and development of primary hepatocellular carcinoma[J]. Adv Clin Exp Med, 2016, 25(5): 971 - 975.
- [8] Mao BJ, Wang G. MicroRNAs involved with hepatocellular carcinoma (Review)[J]. Oncol Rep, 2015, 34(6): 2811 - 2820.
- [9] 侯彭姣, 邓艳春, 梁娜, 等. miR-449b 介导 5-氟尿嘧啶/顺铂抑制肝癌细胞的迁移[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(6): 792 - 796.
- [10] Ban E, Chae DK, Yoo YS, et al. An improvement of miRNA extraction efficiency in human plasma[J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(27): 6397 - 6404.

可能有助于提高疗效、缩短病程。本次纳入病例中,复发病例仅9例(3.9%),研究结果显示乳腺导管内脂质样分泌物与疾病的复发并无相关性,未来可能还需要更大的样本量来再次验证这一结果。

本研究基于单因素分析及 Spearman 等级相关性分析的统计方法,提出以乳腺导管内脂质样分泌物为切入点,探究乳腺导管内脂质样分泌物与非哺乳期乳腺炎临床特征的相关性,结果表明,乳腺导管内脂质样分泌物与非哺乳期乳腺炎发病相关,其积聚程度可能会加重患者局部症状、延长治疗时间,在临床上应引起重视。然而,由于样本量不足,未能探究出乳腺导管内脂质样分泌物与疾病复发的关系,在后期的研究将纳入更多病例,为临床提供更有力的实验依据;并且尝试以促进乳腺导管内脂质样分泌物吸收为靶点,为治疗提供新的临床思路。

参考文献

[1] 刘宏伟,邢开. 乳腺导管扩张症一例误诊为乳腺癌[J]. 临床误诊误治,2012,25(4):106.

[2] Yukawa M, Watatani M, Isono S, et al. Management of granulomatous mastitis; a series of 13 patients who were evaluated for treatment without corticosteroids[J]. *Int Surg*, 2015, 100(5):774-782.

[3] Imoto S, Kitaya T, Kodama T, et al. Idiopathic granulomatous mastitis; case report and review of the literature[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 1997, 27(4):27-277.

[4] Bani-Hani KE, Yaghan RJ, Matala II, et al. Idiopathic granulomatous mastitis; time to avoid unnecessary mastectomies[J]. *Breast Journal*, 2004, 10(4):318-322.

[5] Lee JH, Oh KK, Kim EK, et al. Radiologic and clinical features of idiopathic granulomatous lobular mastitis mimicking advanced breast cancer[J]. *Yonsei Med J*, 2006, 47(1):78-84.

[6] Hur SM, Cho DH, Lee SK, et al. Experience of treatment of patients with granulomatous lobular mastitis[J]. *J Korean Surg Soc*, 2013, 85(1):1-6.

[7] 上海市卫生局,中华医学会上海分会. 外科诊疗常规[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:14.

[8] 中华中医药学会. 中医外科常见病诊疗指南 ZYYXH/T177 ~ 202-2012[S]. 北京:中国中医药出版社,2012.

[9] 国家中医药管理局. 中医病症诊断疗效标准 ZY/T001.1 ~ 001.9-94[S]. 北京:中国标准出版社,1994.

[10] 陆德铭,陆金根. 实用中医外科学[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2010:158-160.

[11] 陈明岭,耿福能,沈咏梅,等. 康复新液治疗慢性皮肤溃疡多中心随机对照临床研究[J]. *中医杂志*, 2019, 60(15):1308-1311.

[12] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则:试行[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:371.

[13] Barreto DS, Sedgwick EL, Nagi CS, et al. Granulomatous mastitis; etiology, imaging, pathology, treatment, and clinical findings[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 171(3):527-534.

[14] Freeman CM, Xia BT, Wilson GC, et al. Idiopathic granulomatous mastitis; a diagnostic and therapeutic challenge[J]. *Am J Surg*, 2017, 214(4):701-706.

[15] Sheybani F, Naderi H, Gharib M, et al. Idiopathic granulomatous mastitis; long-discussed but yet-to-be-known[J]. *Autoimmunity*, 2016, 49(4):236-239.

[16] Tuli R, O'Hara BJ, Hines J, et al. Idiopathic granulomatous mastitis masquerading as carcinoma of the breast; a case report and review of the literature[J]. *Int Semin Surg Oncol*, 2007, 4(1):1-4.

[17] Pereira FA, Mudgil AV, Macias ES, et al. Idiopathic granulomatous lobular mastitis[J]. *Int J Dermatol*, 2012, 51(2):142-151.

[18] Gautier N, Lalonde L, Tran-Thanh D, et al. Chronic granulomatous mastitis; Imaging, pathology and management[J]. *Eur J Radiol*, 2013, 82(4):e165-e175.

[19] Korkut E, Akcay MN, Karadeniz E, et al. Granulomatous mastitis; a ten-year experience at a University Hospital[J]. *Eurasian J Med*, 2015, 47(3):165-173.

[20] 陆德铭. 实用中医乳房病学[M]. 上海:上海中医学院出版社,1993.

收稿日期:2020-06-18 修回日期:2020-07-23 编辑:王宇

(上接第180页)

[11] Edwardson MA, Zhong XG, Fiandaca MS, et al. Author Correction: plasma microRNA markers of upper limb recovery following human stroke[J]. *Sci Rep*, 2020, 10:2484.

[12] Yin W, Shi L, Mao YJ. MicroRNA-449b-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion by targeting TPD52 in nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Biochem*, 2019, 166(5):433-440.

[13] Sandbothe M, Buurman R, Reich N, et al. The microRNA-449 family inhibits TGF- β -mediated liver cancer cell migration by targeting

SOX4[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(5):1012-1021.

[14] Indersie E, Lesjean S, Hooks KB, et al. MicroRNA therapy inhibits hepatoblastoma growth in vivo by targeting β -catenin and Wnt signaling[J]. *Hepatol Commun*, 2017, 1(2):168-183.

[15] 黄智平,郑浩,姚乃心,等. MicroRNA-449b-5p 通过靶向 KLF4 促进肝细胞癌的增殖和转移[J]. *中国医药生物技术*, 2019, 14(1):21-26.

收稿日期:2020-05-21 修回日期:2020-06-20 编辑:叶小舟