

# microRNA-137 基因与原发性肝细胞癌患病风险和手术治疗预后分析

赵冀<sup>1</sup>, 周超<sup>2</sup>, 邓小凡<sup>1</sup>, 张宇<sup>1</sup>, 刘兴超<sup>1</sup>, 杨洪吉<sup>1</sup>

1. 四川省人民医院器官移植中心, 四川 成都 610072;

2. 四川省人民医院消化内科, 四川 成都 610072

**摘要:** **目的** 探讨 microRNA-137 (miR-137) 基因与原发性肝细胞癌 (HCC) 患病风险和手术治疗预后的关系。**方法** 纳入 200 例 HCC 患者 (病例组) 和 200 例健康对照者, 利用直接测序法测定其 miR-137 基因 rs1625579 多态性位点基因型, 利用  $\chi^2$  检验、*t* 检验、Kaplan-Meier 曲线法和 Log rank 检验比较分析不同基因型的分布、血清甲胎蛋白 (AFP) 水平、5 年总生存率和生存期的差异, 并用 Cox 回归分析预后的影响因素。**结果** 本样本中 rs1625579 多态性位点检测出 AA 和 AC 基因型, 在病例组的分布为 178/22 例, 在对照组的分布为 173/27 例, 两组分布差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.581, P = 0.446$ ); 术前 AC 基因型携带者患者的血清 AFP 水平显著高于 AA 基因型携带者 ( $t = 2.192, P = 0.029$ ); 病例组 AA 基因型的 5 年总生存率为 52.81%, 中位生存时间为 34.2 个月, AC 基因型为 32.82% 和 26.5 个月, 两型间差异无统计学意义 (Log rank  $\chi^2 = 2.847, P = 0.092$ )。采用 Cox 回归分析 HCC 患者预后的影响因素, 显示随访期内有过 AFP < 20 ng/ml 是影响生存率的保护因素 ( $P = 0.022, HR = 0.454, 95\% CI: 0.128 \sim 2.244$ )。**结论** miR-137 基因虽然与 HCC 的发病风险和手术预后无直接相关性, 但与术前 AFP 水平相关, 提示 miR-137 可能在肝癌细胞的糖代谢中起重要作用。

**关键词:** 微小 RNA-137; 原发性肝细胞癌; 甲胎蛋白; 手术治疗; 生存率; 患病风险; 预后

**中图分类号:** R 735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)07-0880-04

## Association of the microRNA-137 gene with morbid risk and surgical treatment prognosis for primary hepatocellular carcinoma

ZHAO Ji\*, ZHOU Chao, DENG Xiao-fan, ZHANG Yu, LIU Xing-chao, YANG Hong-ji

\* Organ Transplant Center, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China

**Abstract:** **Objective** To explore the associations of the microRNA-137 (miR-137) gene polymorphism with the morbid risk and surgical treatment prognosis in primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A total of 200 HCC patients (case group) and 200 healthy subjects (control group) were enrolled in this study. The genotypes of rs1625579 polymorphic locus of miR-137 were detected by direct sequencing method. The chi-square test, *t* test, Kaplan-Meier curve and Log rank test were used to analyze and compare the genotype distribution, alpha-fetoprotein (AFP) level, 5-years overall survival rate and survival term in two groups, and the Cox regression analysis was used to analyze the affecting factors of prognosis. **Results** AA and AC genotype were found in rs1625579 in our samples. The genotype distribution was AA/AC = 178/22 in cases group and AA/AC = 173/27 in control group, and there was no significant difference in the genotype distribution between two groups ( $\chi^2 = 0.581, P = 0.446$ ). In case group, the preoperative AFP level in cases with AC genotype was significantly higher than that in cases with AA genotype ( $t = 2.192, P = 0.029$ ). In case group, the 5-years overall survival rate was 52.81% in cases with AA genotype and 32.82% in cases with AC genotype, and the median survival time was 34.2 months in cases with AA genotype and 26.5 months in cases with AC genotype, and there were all no significant differences in them between two genotypes (Log rank  $\chi^2 = 2.847, P = 0.092$ ). Cox regression analysis showed that AFP < 20 ng/ml happened once in follow-up period was the protective factors affecting survival rate ( $P = 0.022, HR = 0.454, 95\% CI: 0.128 \sim 2.244$ ). **Conclusion** Though miR-137 gene is not associated with the morbid risk and operational prognosis of HCC, the miR-137 gene rs1625579 polymorphism is associated with preoperative AFP level which infers that miR-137 may play an important role in the process of glucose metabolism of HCC cells.

**Key words:** Micro RNA-137; Primary hepatocellular carcinoma; Alpha-fetoprotein; Surgery treatment; Survival rate; Morbid risk; Prognosis

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)的发病率和病死率均高,在我国 HCC 的年新发病例数约占全球总新发病数的 55%<sup>[1]</sup>。虽然 HCC 的发生与乙型肝炎病毒(HBV)感染的关系十分密切,约 50% 的 HCC 由 HBV 感染导致,但 HCC 的治疗现状仍不乐观,患者预后相对较差,给患者及其家庭带来巨大的痛苦和压力<sup>[2]</sup>。而对 HCC 仍缺乏早期诊断和评价预后的生物学指标,这对改善 HCC 患者的预后也是不利因素之一<sup>[3]</sup>。

甲胎蛋白(AFP)早已被用作 HCC 的血清标记物,但它缺乏特异性,而近年来越来越多的研究表明,微小 RNA(microRNA)在肿瘤的诊断和预后判断中扮演了重要的角色,其中 microRNA-137(miR-137)就被认为与多种恶性肿瘤关系密切,其过度表达不仅被证实可能与抑制癌细胞的增殖有关,而且其启动子区域的甲基化与头颈部癌症患者预后不良有关<sup>[4-7]</sup>。miR-137 宿主基因定于与 1p21.3,其多态性位点 rs1625579 与该 microRNA 的表达调控密切相关,可能直接影响着 miR-137 在机体中的生物学功能发挥<sup>[8]</sup>。因此,阐明 rs1625579 与疾病的关系对疾病的诊断和预后判断尤为重要。本研究目的在于通过分析 rs1625579 多态性与疾病的关系,从而探讨 miR-137 与 HCC 患病风险和手术治疗预后的关联性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2009 年 9 月至 2012 年 6 月四川省人民医院器官移植中心收治的 200 例 HCC 患者,男 153 例,女 47 例;年龄(53.74 ± 10.29)岁;有乙型肝炎病史 89 例;临床分期:Ⅰ期 63 例,Ⅱ期 137 例;巨块型 75 例,结节型 125 例;血清 AFP 水平(295.61 ± 80.46)ng/ml。纳入标准:(1)病理学诊断为 HCC;(2)在四川省人民医院首诊首治;(3)临床分期Ⅰ或Ⅱ期且具有手术适应证者;(4)KPS 评分<sup>[9]</sup> ≥ 60 分;(5)肝功能 Child-Pugh 分级<sup>[10]</sup>为 A 级;(6)患者或其家属同意加入本研究。排除标准:(1)临床分期Ⅲ期或无手术适应证者;(2)合并其他部位恶性肿瘤或其他器官严重功能障碍;(3)KPS 评分 < 60 分,或 Child-Pugh 分级 B/C 级;(4)患者及家属不同意参与本研究。同期纳入性别、年龄相匹配的健康对照者 200 例,男 149 例,女 51 例;年龄(52.67 ± 10.33)岁;血清 AFP 水平(14.28 ± 3.50)ng/ml。纳入标准:(1)

身体健康,无躯体疾病;(2)与纳入的患者无血缘关系;(3)自愿参与本试验。排除标准:(1)合并躯体疾病;(2)是纳入患者的亲属或有直接血缘关系;(3)不愿参与本研究。所有纳入研究者均签署知情同意书,研究已经医院的伦理学委员会批准同意。

**1.2 临床指标采集** 患者的治疗方式均为外科常规开腹肝肿瘤切除术,术后辅助或不进行辅助化疗。若随访期内患者疾病进展则按 NCCN 指南<sup>[11]</sup>进行治疗。随访截至 2014 年 8 月 12 日,临床指标主要采集患者手术前和手术后(1 周、1 年)和末次随访的血清 AFP 水平、手术患者的术后 5 年总生存率及生存期等。

**1.3 血液样本收集** 所有受试者于入组时的次日清晨 6:30 ~ 7:30,采集空腹肘静脉血 5 ml 置于 EDTA 抗凝试管中,轻微上下翻转 5 次混匀,编号后放于试管架中并置 -70 °C 冰箱保存,以备实验所用。

**1.4 基因型测定** 使用基因组 DNA 提取试剂盒对病例组和对照组血液样本进行全基因组 DNA 提取,方法参照试剂盒说明书。基因扩增引物上游为 5'-ATAGAGCGGCCATTTGGATT-3',下游为 5'-TCAAG-GCCTTTCAGTTCGTTTC-3'。配置 25 μl PCR 反应体系,在 PCR 仪中扩增 35 个循环,条件为 95 °C 变性 45 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s、72 °C 终延伸 5 min。miR-137 基因 rs1625579 多态性由基因直接测序完成基因分型。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 进行数据统计学分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 Student's *t* 检验;分类资料的组间比较采用  $\chi^2$  检验;生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线法,生存率的比较采用 Log rank 检验;患者生存状况的影响因素分析采用 Cox 回归分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-137 与 HCC 发病风险的关系** 经测序,miR-137 基因多态性位点 rs1625579 在该人群中仅有两种基因型 AA 和 AC(见图 1),其中不同基因型在 HCC 病例组为 AA/AC = 178/22,在对照组的分布为 AA/AC = 173/27,其分布差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.581, P = 0.446$ )。

**2.2 miR-137 与 AFP 的关系** 比较病例组 AA 和 AC 基因型的血清 AFP 水平差异,术前 AC 基因型携带者患者的血清 AFP 水平显著低于 AA 基因型携带

表 1 miR-137 与血清 AFP 水平的关系 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

基因型	术前	术后 1 周	术后 1 年	末次随访
AA	291.29 ± 79.48 (n = 178)	31.76 ± 20.47 (n = 177)	65.22 ± 52.38 (n = 155)	133.66 ± 94.34 (n = 109)
AC	330.60 ± 78.25 (n = 22)	34.28 ± 17.34 (n = 22)	71.37 ± 50.01 (n = 17)	169.21 ± 85.93 (n = 10)
t 值	2.192	0.553	0.461	1.148
P 值	0.029	0.581	0.645	0.253

者( $t=2.192, P=0.029$ ),但在术后 1 周、术后 1 年以及末次随访时,两基因型患者的血清 AFP 水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

### 2.3 miR-137 与 HCC 5 年总生存率和生存期的关系

随访期内,AA 基因型和 AC 基因型携带者患者分别失访 8 和 1 例。比较病例组 AA 和 AC 基因型的 5 年总生存率和中位生存时间,AA 基因型的 5 年总生存率为 52.81%,中位生存时间为 34.2 个月,AC 基因型的 5 年总生存率为 32.82%,中位生存时间为 26.5 个月,两基因型比较差异无统计学意义(Log rank  $\chi^2=2.847, P=0.092$ )。其生存曲线见图 2。

### 2.4 HCC 患者预后的影响因素分析

进一步采用 Cox 回归分析探讨影响患者 5 年生存率的因素,在年龄、性别、复发情况等因素中,仅发现术后随访期内有过血清 AFP < 20 ng/ml 是影响生存率的保护因素( $P=0.022, HR=0.454, 95\% CI:0.128 \sim 2.244$ ),其余因子对 HCC 患者生存预后无显著影响( $P$  均 > 0.05)。见表 2。

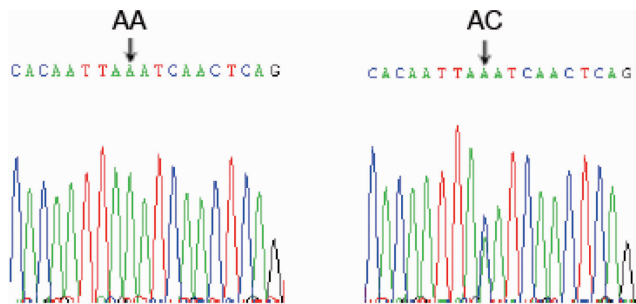


图 1 rs1625579 位点基因型测序结果

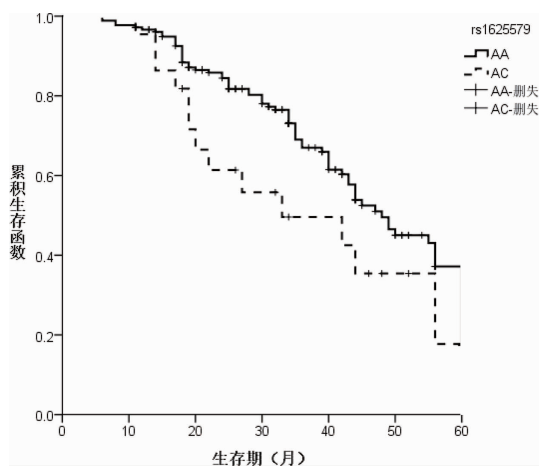


图 2 病例组生存分析的 Kaplan-Meier 曲线图

表 2 HCC 患者预后的影响因素分析

因子	N	P 值	HR	95% CI
年龄	-	0.121	1.125	0.969 ~ 1.306
性别(男)	153	0.358	1.244	0.781 ~ 1.982
乙肝病史	89	0.057	1.167	0.995 ~ 1.368
临床分期(II 期)	63	0.108	1.310	0.943 ~ 1.821
大体分型(巨块型)	75	0.344	1.202	0.765 ~ 1.547
术后有 AFP < 20 ng/ml	153	0.022	0.454	0.128 ~ 2.244
辅助化疗	127	0.645	0.877	0.675 ~ 1.370
局部复发	67	0.244	1.324	0.826 ~ 2.123
远处转移	39	0.083	1.245	0.972 ~ 1.595
复发后介入治疗	41	0.157	0.747	0.546 ~ 1.344

注:HR 为风险比,95% CI 为 95% 置信区间。

## 3 讨论

miR-137 被认为是一种肿瘤抑制基因,它可以靶向 Cdk6 等多种癌基因,抑制其表达,从而发挥抑制肿瘤细胞增殖等作用<sup>[12]</sup>。Rs1625579 作为 miR-137 宿主基因第三外显子上游的单核苷酸多态性位点,对该基因的表达和生物学功能都可能起到一定的调控作用<sup>[13]</sup>。本研究发现 rs1625579 多态性位点的基因型分布在 HCC 患者和对照组中相近,不同基因型携带者患者的 5 年总生存率和中位生存期也无显著差异,miR-137 基因与 HCC 的发病风险和手术预后可能并无关联,但术前 AC 基因型携带者的血清 AFP 水平显著高于 AA 者,表明 miR-137 基因表达可能在 HCC 细胞糖代谢中发挥了重要作用。

早期,对 microRNA 与 HCC 的关系研究多集中在基因的表达层面进行关联分析,其研究策略主要是通过运用 microRNA 芯片、磁珠流式细胞 microRNA 表达谱检测等技术,对肝癌组织及其癌旁正常组织或正常肝组织的 microRNA 进行定性和定量分析,旨在找出两种组织中具有显著表达差异的 microRNA,以及进一步分析这些 microRNA 与肿瘤临床特征的关系<sup>[14]</sup>。Wang 等<sup>[15]</sup>在 19 例 HCC 患者肝癌组织与正常肝组织中对分析了 157 种 microRNA 的表达,发现肝癌组织中有 19 种上调的和 3 种下调的 microRNA,推测这些 microRNA 与肝癌的发生发展可能有密切相关性。Meng 等<sup>[16]</sup>的研究也发现了多种在肝癌组织中上调或下调的 microRNA,其中 miR-21 的上调可能会直接导致 PTEN 蛋白的表达降低,而后者已被

证实是一种肿瘤抑制基因,因此 miR-21 的上调可能会减弱 PTEN 的肿瘤抑制作用。Murakmi 等<sup>[17]</sup>的研究不仅分析了在肝癌组织中异常表达的 microRNA,并且还发现 miR-20、miR-222 和 miR-18 等与肝癌组织的分化程度也密切相关。但目前尚无证据支持 miR-137 在肝癌组织中的表达异常,即使已有研究表明 miR-137 在多种恶性肿瘤的发生发展中发挥了重要作用。

本研究首次从遗传角度分析了 miR-137 基因与 HCC 的发病和预后的关系。在健康成人中,AFP 一般均低于 20 ng/ml<sup>[18]</sup>。而伴随着 HCC 的发生,血清 AFP 水平也急剧上升,研究认为其原因是肝癌细胞本身实际为尚未分化的肝细胞,与胎儿肝细胞类似,因此其丰富地表达 AFP<sup>[19]</sup>。本研究发现,AC 基因型患者的术前 AFP 水平显著高于 AA 基因型携带者,推测 AC 基因型可能发挥对 miR-137 的调节作用,抑制 miR-137 的抑癌功能,从而使得肝癌细胞的代谢旺盛,丰富表达 AFP,但 miR-137 对 HCC 的影响也未必仅限于类似的糖代谢过程中。虽然研究表明 miR-137 基因多态性与发病风险和手术预后无关,但不能推断 miR-137 未参与 HCC 的发生发展中,因为其生物学作用复杂,可能同时受到其他基因和环境的共同影响。

综上所述,本研究分析了 miR-137 基因与 HCC 患病风险和手术治疗预后的相关性,虽然仅发现 miR-137 基因 rs1625579 多态性与术前 AFP 水平相关,但研究也提示 miR-137 可能在肝癌细胞的糖代谢过程中起重要作用,促使我们需进一步深入地探讨和认识 HCC 糖代谢异常在该疾病发生发展中的地位。同时本研究也存在一定不足,主要是由于纳入排除标准的严苛,使得纳入的病例数有限,并且无法排除类似环境因素、其他基因等对研究结果的影响。因此,进一步的研究还应扩大样本量,按不同的因素进行亚组分析,以尽可能排除干扰,得到更加准确的结果,为 miR-137 与 HCC 关系探讨提供更加明确的证据。

#### 参考文献

[1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*,2012,142(6):1264-1273.

[2] Qi P, Cheng SQ, 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.

[3] Tanaka M, Katayama F, Kato H, et al. Hepatitis B and C virus infection and hepatocellular carcinoma in China: a review of epidemiology and control measures[J]. *J Epidemiol*,2011,21(6):401-416.

[4] Personeni N, Bozzarelli S, Pressiani T, et al. Usefulness of alpha-feto-

protein response in patients treated with sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatology*,2012,57(1):101-107.

[5] Xiang Y, Fan S, Cao J, et al. Association of the microRNA-499 variants with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population[J]. *Mol Biol Rep*,2012,39(6):7019-7023.

[6] Li P, Ma L, Zhang Y, et al. MicroRNA-137 down-regulates KIT and inhibits small cell lung cancer cell proliferation[J]. *Biomed Pharmacother*,2014,68(1):7-12.

[7] Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, et al. MicroRNA - 137 promoter methylation is associated with poorer overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Cancer*,2011,117(7):1454-1462.

[8] Strazisar M, Cammaerts S, Van Der Ven K, et al. MIR137 variants identified in psychiatric patients affect synaptogenesis and neuronal transmission gene sets[J]. *Mol psychiatry*,2015,20(4):472-481.

[9] Johnson MJ, Bland JM, Davidson PM, et al. The relationship between two performance scales: New York Heart Association classification and Karnofsky performance status scale[J]. *J Pain Symptom Manage*,2014,47(3):652-658.

[10] Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD [J]. *J Hepatol*, 2005, 42 Suppl (1): S100-S107.

[11] Benson 3rd AB, Abrams TA, Ben-Josef E, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: hepatobiliary cancers[J]. *J Natl Compr Canc Netw*,2009,7(4):350-391.

[12] Zhu X, Li Y, Shen H, et al. miR-137 inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6[J]. *FEBS Lett*,2013,587(1):73-81.

[13] Wang S, Li W, Zhang H, et al. Association of microRNA137 gene polymorphisms with age at onset and positive symptoms of schizophrenia in a Han Chinese population[J]. *Int J Psychiatry Med*, 2014,47(2):153-168.

[14] 戚鹏,高春芳. miRNA 在肝细胞癌中的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*,2008,28(12):94-101.

[15] Wang Y, Lee ATC, Ma JZI, et al. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target[J]. *J Biol Chem*,2008,283(19):13205-13215.

[16] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. *Gastroenterology*,2007,133(2):647-658.

[17] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. *Oncogene*,2006,25(17):2537-2545.

[18] McIntire KR, Waldmann TA, Moertel CG, et al. Serum alpha-fetoprotein in patients with neoplasms of the gastrointestinal tract[J]. *Cancer Res*,1975,35(4):991-996.

[19] Zhou Y, Yin X, Ying J, et al. Golgi protein 73 versus alpha-fetoprotein as a biomarker for hepatocellular carcinoma: a diagnostic meta-analysis[J]. *BMC cancer*,2012,12(1):17.