



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.012
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4022.shtml

· 基础研究 ·

miR-19 在肝细胞肝癌中的表达及其临床意义

郭跃虎, 刘建武, 王波, 赵巍, 何明艳

(武警山西总队医院 普通外科, 山西 太原 030006)

摘要

目的: 探讨肝细胞肝癌(HCC)组织中 miR-19 的表达情况及其临床意义。

方法: 用 qRT-PCR 的方法检测 51 例 HCC 组织及其癌旁组织以及 10 例正常肝组织中 miR-19 的表达; 分析了 miR-19 表达与 HCC 患者临床病理因素及预后的关系。

结果: miR-19 的表达量在正常肝组织、癌旁组织、HCC 组织中依次增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。miR-19 表达与 HCC 患者的肿瘤大小 ($P = 0.029$)、转移 ($P = 0.011$)、静脉侵犯 ($P = 0.002$) 及 AJCC 分期 ($P = 0.008$) 有关, 而与年龄、性别、肿瘤分化、卫星灶、肿瘤数量及 AFP 无相关(均 $P > 0.05$)。miR-19 高表达的患者 5 年生存率明显低于低表达的患者 ($P < 0.05$)。miR-19 高表达以及转移、静脉侵犯均为影响 HCC 患者生存的独立风险因素(均 $P < 0.05$)。

结论: miR-19 在 HCC 组织中表达上调, 并可能与 HCC 的增殖、转移有关; miR-19 高表达提示预后不良。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(9):1217-1221]

关键词

癌, 肝细胞; 微 RNAs; MicroRNA-19; 预后

中图分类号: R735.7

MiR-19 expression in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

GUO Yuehu, LIU Jianwu, WANG Bo, ZHAO Wei, HE Mingyan

(Department of General Surgery, Armed Police Corps Hospital of Shanxi, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

Corresponding author: GUO Yuehu, Email: 363879688@qq.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the miR-19 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue and its clinical significance.

Methods: The miR-19 expression in 51 pairs of HCC tissues along with their matched adjacent tissues, and 10 samples of normal liver tissues were detected by qRT-PCR methods. The relations of miR-19 expression with the clinicopathologic factors and prognosis of HCC patients were analyzed.

Results: The miR-19 expression level was increased in ascending order in normal liver tissue, tumor-adjacent tissue and HCC tissue, and the differences had statistical significance (all $P < 0.05$). The miR-19 expression was significantly related to tumor size ($P = 0.02$), metastasis ($P = 0.011$), venous invasion ($P = 0.002$) and AJCC stage ($P = 0.008$) of the HCC patients, but irrelevant to their age, sex, tumor differentiation, satellite lesions, tumor number and AFP level (all $P > 0.05$). The 5-year survival rate in patients with high miR-19 expression was significantly lower than that in those with low miR-19 expression ($P < 0.05$). High miR-19 expression together

收稿日期: 2014-04-29; 修订日期: 2014-07-10。

作者简介: 郭跃虎, 武警山西总队医院主治医师, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通信作者: 郭跃虎, Email: 363879688@qq.com

with metastasis and venous invasion are risk factors affecting the survival of HCC patients (all $P < 0.05$).

Conclusion: The miR-19 expression is up-regulated in HCC tissue, which probably may be associated with the proliferation and metastasis of HCC, and high miR-19 expression may predict an unfavorable outcome.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(9):1217-1221]

KEYWORDS Carcinoma, Hepatocellular; MicroRNAs; MicroRNA-19; Prognosis

CLC number: R735.7

肝细胞肝癌 (HCC) 是世界范围内最常见的 5 大恶性肿瘤之一, 我国是乙肝发生大国, 所以 HCC 是第 2 位的癌症杀手^[1-2]。HCC 恶性程度高, 易发生转移, 总体预后往往较差^[3]。目前公认的首选治疗方式是肝叶切除术及肝移植。虽然许多 HCC 患者成功接受了手术治疗并且在术后辅以多种治疗措施, 但患者总体的远期效果仍不佳^[4-5]。所以如能早期发现并对预后进行良好的评估, 将有利于患者的治疗。

microRNA (miRNA) 在许多肿瘤的发生发展过程中起到了十分重要的作用。这也使得其备受关注。目前 miR-19 与肿瘤的关系有一些报道, 但其与 HCC 之间的关系尚不清楚, 本研究初步分析了 miR-19 在 HCC 中的表达情况, 探讨了 miR-19 与 HCC 临床病理特征、预后的联系。

1 资料与方法

1.1 标本收集

标本收集于武警山西总队医院 2004 年 2 月—2008 年 12 月, 经术后病理证实的 HCC 标本 51 例及其对应的癌旁组织 51 例。患者在手术前均未接受其他非手术治疗。在该组病例中伴有转移的患者 24 例 (肝内局部转移 12 例, 伴有血管侵犯 15 例, 肿瘤侵犯胆囊 7 例, 术中发现门静脉癌栓 3 例, 有肝门部淋巴结转移 2 例)。同时收集了同期的 10 例正常肝脏组织作为对照 (其中肝血管瘤 6 例、肝破裂 4 例), 这 10 例标本的病理显示均为正常肝组织无肝炎及肝硬化。所有标本收集后, 迅速冷冻于液氮, 并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。HCC 分化依据 Edmondson-Steiner 标准。HCC 分期按 2010 发布的美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 第 7 版分期系统的标准确定。所有标本的收集取得均告知患者及其家属并得以同意, 本研究经武警山西总队医

院伦理委员会批准开展, 标本的获得及各项临床数据的收集均符合赫尔辛基宣言 (Declaration of Helsinki)。

1.2 主要试剂及仪器

实验所用 TRIzol 购自美国 Sigma 公司; qRT-PCR 试剂盒 miScript system 为美国 Qiagen 公司; ABI7700 定量 PCR 仪为美国 PE 公司; 氯仿、异丙醇、无水乙醇等未特殊说明的试剂均为 Sigma 公司。

1.3 qRT-PCR 方法

液氮碾磨标本, TRIzol 试剂提取标本的总 RNA。通过紫外分光光度计检测总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 间。依据试剂盒说明书进行 qRT-PCR 实验。逆转录体系为 20 μL , 按下列条件进行逆转录: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、60 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 min。PCR 反应体系也为 20 μL , 按以下条件在 ABI7700 定量 PCR 仪上进行反应: 起始激活 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min; 3 步循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 共 30 个循环。RNA U6 作为内参, 反应条件同上。实验重复 3 次, 所得数据运用 $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行分析。

1.4 统计学处理

SPSS 13.0 统计软件行统计学处理。所得数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。miR-19 与临床病理特征参数之间用 χ^2 检验或 Fisher 检验; 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, Log-rank 检验进行曲线间比较; 单因素及多因素生存分析运用 COX 回归。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 组织、癌旁组织以及正常肝组织中 miR-19 的表达情况

qRT-PCR 结果显示, miR-19 的表达量在正常肝组织、癌旁组织、HCC 组织中依次增高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 1)。

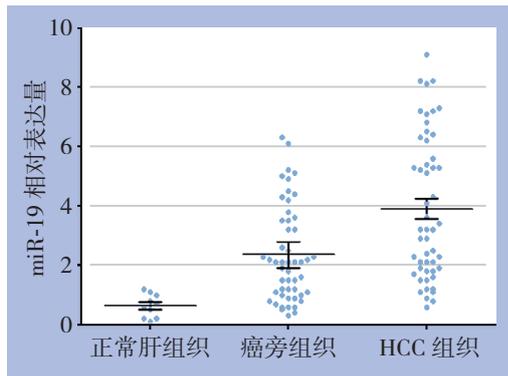


图1 miR-19 在不同组织中的相对表达量

Figure 1 The relative miR-19 expression levels in different tissues

2.2 miR-19 的表达与 HCC 的临床病理特征的关系

为进一步探讨 miR-19 与 HCC 之间的关系, 采用统计学的方法分析了 miR-19 的表达与 HCC 各项临床病理特征。按照 miR-19 表达情况的中位数 (3.21), 将 51 例标本 (无论转移与否) 分成两组: miR-19 低表达组和 miR-19 高表达组。通过采用 χ^2 检验或 Fisher 检验分析, 结果提示 miR-19 的表达与肿瘤大小 ($P=0.029$)、转移 ($P=0.011$)、静脉侵犯 ($P=0.002$) 及 AJCC 分期 ($P=0.008$) 有关, 而与年龄、性别、肿瘤分化、卫星灶、肿瘤数量及 AFP 无明显关系 (均 $P>0.05$) (表 1)。

2.3 miR-19 表达与患者生存的关系

就 51 例患者术后生存资料分析, 结果发现 miR-19 低表达组患者平均生存时间为 32.1 个月, 5 年生存率为 19.7%; miR-19 高表达组患者平均生存时间为 11.2 个月, 5 年生存率为 8.1%。miR-19 高表达组患者生存率及生存时间低于低表达组。Log-rank 检验显示两组组之间差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2)。

2.4 单因素及多因素 COX 回归分析

经单因素 COX 回归分析显示肿瘤转移、静脉侵犯、AJCC 分期 (III/IV) 及 miR-19 高表达可作为 HCC 患者总体预后的风险因素之一。取 $P<0.05$ 的风险因素再进行多因素回归分析多变量 COX 回归。结果显示: miR-19 高表达不受其他风险因素的影响, 可以作为 HCC 患者总体预后的独立风险因素 ($P<0.05$) (表 2)。

表 1 miR-19 的表达与 HCC 患者临床病理特征的关系 [n (%)]
Table 1 Relations of miR-19 expression with the clinicopathologic features of HCC patients [n (%)]

临床病理参数	n	miR-19		χ^2	P
		高表达 (n=31)	低表达 (n=20)		
性别					
男	37	22 (71.0)	15 (75.0)	0.099	0.753
女	14	9 (29.0)	5 (25.0)		
年龄 (岁)					
≤ 50	32	19 (61.3)	13 (65.0)	0.072	0.789
> 50	19	12 (38.7)	7 (35.0)		
肿瘤大小 (cm)					
≤ 5	26	12 (38.7)	14 (70.0)	4.763	0.029
> 5	25	19 (61.3)	6 (30.0)		
肿瘤分化					
高	20	14 (45.2)	6 (30.0)	1.172	0.279
中低	31	17 (54.8)	14 (70.0)		
转移					
是	24	19 (61.3)	5 (25.0)	6.426	0.011
否	27	12 (38.7)	15 (75.0)		
静脉侵犯					
是	18	16 (51.6)	2 (10.0)	9.218	0.002
否	33	15 (48.4)	18 (90.0)		
卫星灶					
有	19	11 (35.5)	8 (40.0)	0.106	0.745
无	32	20 (64.5)	12 (60.0)		
肿瘤数量					
单发	40	23 (74.2)	17 (85.0)	0.839	0.360
多发	11	8 (25.8)	3 (15.0)		
AJCC 分期					
I/II	17	6 (19.4)	11 (55.0)	6.951	0.008
III/IV	34	25 (80.6)	9 (45.0)		
AFP (ng/mL)					
≤ 400	19	11 (35.5)	8 (40.0)	0.106	0.745
> 400	32	20 (64.5)	12 (60.0)		

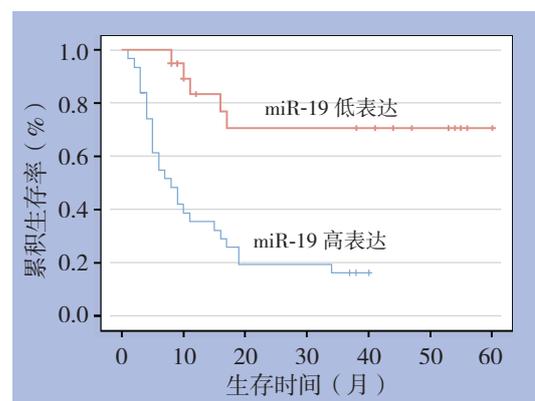


图2 不同 miR-19 表达水平 HCC 患者的生存曲线

Figure 2 Survival curves of patients with different miR-19 expression levels

表 2 HCC 患者总体生存期的单因素和多因素 COX 回归分析

Figure 2 Univariate and multivariate COX regression analyses for the overall survival of HCC patient

临床病理参数	相对风险系数 (95% CI)	P
单因素		
性别	1.230 (0.565~2.679)	0.602
年龄	0.989 (0.484~2.019)	0.975
肿瘤大小	1.211 (0.596~2.461)	0.596
肿瘤分化	1.689 (0.828~3.444)	0.150
转移	0.057 (0.021~0.155)	<0.001
静脉侵犯	0.046 (0.016~0.129)	<0.001
卫星灶	0.909 (0.444~1.858)	0.793
肿瘤数量	0.527 (0.235~1.183)	0.121
AJCC 分期	0.292 (0.119~0.715)	0.007
AFP (ng/mL)	1.318 (0.645~2.693)	0.448
miR-19	0.180 (0.069~0.471)	<0.001
多因素		
转移	0.029 (0.004~0.191)	<0.001
静脉侵犯	0.155 (0.041~0.592)	0.006
AJCC 分期	1.839 (0.529~6.393)	0.338
miR-19	0.091 (0.026~0.322)	<0.001

3 讨论

miRNA 是一组小分子非编码 RNA, 可以调节肿瘤发生发展相关基因的表达, 提示了一种参与 HCC 发生的新机制^[6]。miR-19 染色体定位于 13q31-32, 转录子 B 编码生成包括 pre-miR-19 在内的 5 种前体 miRNA^[7]。NF- κ B、RE1、CREB1 是 miR-19 的潜在转录因子^[8]。既往 miR-19 在血液系统肿瘤中研究较多, 随着研究的深入, 在其他实体性肿瘤中也发现 miR-19 与肿瘤的发生发展密切相关。

在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、T 细胞白血病等肿瘤中, miR-19 都表现有基因簇的扩增。在急性 T 淋巴细胞白血病中, miR-19 的表达明显增加, 而在无痛性滤泡状淋巴瘤中 miR-19 的表达明显低于急性 T 淋巴细胞白血病, 这结果暗示 miR-19 在急性 T 淋巴细胞白血病恶性转化中发挥了重要作用^[9-10]。在实体性肿瘤中也有类似的结果。研究发现在肺癌^[11]、前列腺癌^[12]、胶质瘤^[13]、鳞状食管癌^[14]、膀胱癌^[15]、小泡状横纹肌肉瘤^[16]、结肠癌^[17]中 miR-19 也呈现高表达。但是 miR-19 在 HCC 中的表达情况目前尚不清楚。本研究对比了 HCC 组织、癌旁组织及正常肝组织中 miR-19 的表达, 结果显示 miR-19 在 HCC 组织中表达明显增高, 这也提示 miR-19 在 HCC 的发生、

发展中起到了促进作用。

为进一步了解 miR-19 与 HCC 的关系, 分析了 miR-19 的表达与 HCC 各项病理特征。结果显示 miR-19 的表达与肿瘤大小、转移、静脉侵犯及 AJCC 分期明显有关, 这也暗示 miR-19 可能与 HCC 的增殖、转移有密切联系。这结果与既往既往结果相似。miR-19 在雄激素非依赖性的前列腺癌细胞株中高表达, 并与前列腺癌的恶性程度相关^[11]。miR-19 在膀胱癌、小泡状横纹肌肉瘤、结肠癌中呈高表达, 与肿瘤血管发生、疾病预后、复发及其生存率密切相关^[15-17]。

既往的研究还发现, 在 B 细胞淋巴瘤中, miR-19 通过介导靶基因 PTEN 的抑制从而促进肿瘤细胞的增殖^[9]。miR-19 可在转录和转录后水平调控促凋亡因子 Bim、AMP 激活激酶 (Prkaa1)、PTEN 和肿瘤抑制因子磷酸酶类 PP2A 的表达^[18]。在慢性髓细胞性白血病中 miR-19a 在 MAPK、ErbB 及 TGF-B 信号转导通路的作用, 同时也证实了 CyclinD1 是 miR-19 的作用靶点, 揭示其在 P53 信号通路中的作用^[19]。miR-19 在血管内皮细胞中高表达, 并同时能通过对靶点 CyclinD1 的抑制作用, 抑制细胞周期 G₁ 到 S 期的转变^[20]。miR-19 在各类型的甲状腺癌细胞株中表达升高, miR-19 对甲状腺癌的促增殖作用机制是通过介导肿瘤抑癌基因 PTEN 来发挥作用^[21]。鉴于我们的结果, miR-19 的表达与肿瘤大小、转移密切相关, 结合既往研究提示, miR-19 在 HCC 中参与增殖、转移的机制也可能是通过调控 PTEN、Bim、AMP 激活激酶、CyclinD1 等。但具体的机制尚待进一步的实验证明。

在乳腺癌中 miR-19 与乳腺癌细胞株侵袭迁移能力呈负相关, 可作为评估乳腺癌恶性程度的重要标志^[22]。通过分析患者生存, 本研究结果显示 HCC 组织 miR-19 高表达的患者 5 年生存率明显低于低表达患者, miR-19 高表达是影响 HCC 患者总体生存的独立风险因素。说明 miR-19 的表达高低可以评估 HCC 患者的预后。但本研究结果与既往其他肿瘤研究结果相反, 提示 miR-19 在不同肿瘤中的作用可能与肿瘤细胞类型有关, 具有细胞特异性, 也进一步提示 miR-19 的作用觉有双向性和复杂性, 其具体作用尚待进一步研究。

综上所述, miR-19 与肿瘤关系密切, 并通过

多通路参与了肿瘤的增殖、转移过程。通过本研究的结果提示 miR-19 也参与了 HCC 的发生、发展过程,并能够作为 HCC 患者预后的预测分子。但 miR-19 参与 HCC 增殖、转移的机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Zhang HK, Pan K, Wang H, et al. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Letters*, 2008, 261(2):183-192.
- [2] Tung-Ping Poon R, Fan ST, Wong J. Risk factors, prevention, and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Surg*, 2000, 232(1):10-24.
- [3] 阎少冬,杨广顺,杨宁.原发性肝癌淋巴转移治疗方法的选择[J].*中国普通外科杂志*, 2013, 22(4):524-526.
- [4] Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2002, 35(3):519-524.
- [5] Fan ST, Lo CM, Liu CL, et al. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: toward zero hospital deaths[J]. *Annals of surgery*, 1999, 229(3):322-330.
- [6] 解寒冰,孙建军,夏云展. microRNA-497 在肝细胞癌中的表达及意义[J].*中国普通外科杂志*, 2013, 22(7):895-899.
- [7] Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9):3087-3095.
- [8] Ye H, Liu X, Lv M, et al. MicroRNA and transcription factor co-regulatory network analysis reveals miR-19 inhibits CYLD in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12):5201-5214.
- [9] Mu P, Han YC, Betel D, et al. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(24):2806-2811.
- [10] Olive V, Bennett MJ, Walker JC, et al. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(24):2839-2849.
- [11] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpression in human lung cancers and enhances cell proliferation[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(21):9628-9632.
- [12] Albertini MC, Olivieri F, Lazzarini R, et al. Predicting microRNA modulation in human prostate cancer using a simple String Identifier (SID1.0)[J]. *J Biomed Inform*, 2011, 44(4):615-620.
- [13] Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, et al. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas[J]. *Brain Pathol*, 2010, 20(3):539-550.
- [14] Liu M, Wang Z, Yang S, et al. TNF- α is a novel target of miR-19a[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4):1013-1022.
- [15] Ayala de la Peña F1, Kanasaki K, Kanasaki M, et al. Loss of p53 and acquisition of angiogenic microRNA profile are insufficient to facilitate progression of bladder urothelial carcinoma in situ to invasive carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(23):20778-20787.
- [16] Reichel JL, Duan F, Smith LM, et al. Genomic and clinical analysis of amplification of the 13q31 chromosomal region in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6):1463-1473.
- [17] Wang YX, Zhang XY, Zhang BF, et al. Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis[J]. *J Dig Dis*, 2010, 11(1):50-54.
- [18] Mavrakis KJ, Wolfe AL, Oricchio E, et al. Genoma-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(4):372-379.
- [19] Machová Poláková K, Lopotová T, Klamová H, et al. Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets[J]. *Molecular Cancer*, 2011, 10:41. doi: 10.1186/1476-4598-10-41.
- [20] Qin X, Wang X, Wang Y, et al. MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(7):3240-3244.
- [21] Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(6):1147-1154.
- [22] Zhang X, Yu H, Lou JR, et al. MicroRNA-19 (miR-19) regulates tissue factor expression in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(2):1429-1435.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 郭跃虎, 刘建武, 王波, 等. miR-19 在肝细胞肝癌中的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(9):1217-1221. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.012

Cite this article as: GUO YH, LIU JW, WANG B, et al. MiR-19 expression in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(9):1217-1221. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.012