

论著·临床研究

肝纤维化指标与 miRNA-200b、TAP 联合检测与原发性肝癌预后的相关性研究*

李章勇¹, 夏川¹, 李刚勇², 颜彦¹, 林应标^{1△}

(湖南省郴州市第一人民医院, 1. 检验医学中心; 2. 肝病科, 湖南郴州 423000)

摘要:目的 探讨肝纤维化指标与 miRNA-200b、肿瘤异常蛋白(TAP)表达水平与原发性肝癌预后的相关性。方法 选择 2017 年 2 月至 2018 年 1 月在该院接受治疗的 73 例原发性肝癌患者病例资料作为研究对象, 根据预后状况分为预后良好组和预后不良组。对两组患者 miRNA-200b、TAP 表达水平及肝纤维化指标进行分析。结果 预后不良组患者肝组织 miRNA-200b mRNA 表达量均低于预后良好组, 预后良好组患者血清 TAP 水平显著高于预后不良组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。预后不良患者血清Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)、层粘连蛋白(LN)以及透明质酸(HA)水平均低于预后良好患者, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。血清血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测对原发性肝癌预后评估的灵敏度、准确度和特异度分别为 0.985、0.972 和 0.832。结论 血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测可用于对原发性肝癌的预后进行评估的灵敏度、特异度及准确度均较高, 具有较好的临床应用前景。

关键词: 血清 TAP; miRNA-200b; 肝纤维化指标; 联合检测; 原发性肝癌; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.009

中图法分类号:R735.7; R446.6

文章编号:1673-4130(2019)11-1317-04

文献标识码:A

Analysis of the significance of combined detection of TAP, miRNA-200b and hepatic fibrosis in the prognosis evaluation of primary liver cancer*

LI Zhangyong¹, XIA Chuan¹, LI Gangyong², YAN Yan¹, LIN Yingbiao^{1△}

(1. Center for Laboratory Medicine; 2. Department of Liver Diseases, the First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou, Hunan 423000, China)

Abstract: **Objective** To study the correlation between hepatic fibrosis indexes and miRNA-200b, TAP protein expression and prognosis of primary liver cancer. **Methods** 73 patients with primary liver cancer who were treated in the hospital from February 2017 to January 2018 were divided into good prognosis group and poor prognosis group according to the prognosis. The expression level of miRNA-200b, TAP protein and hepatic fibrosis indexes were analyzed in both groups. **Results** The expression of miRNA-200b mRNA in liver tissue in poor prognosis group was lower than that in good prognosis group, and the serum TAP expression in good prognosis group was significantly higher than that in poor prognosis group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of serum PCⅢ, Ⅳ-C, LN and HA in the poor prognosis group were lower than those in the good prognosis group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The sensitivity, accuracy and specificity of the combined detection of serum TAP, miRNA-200b mRNA expression and hepatic fibrosis were 0.985, 0.972 and 0.832, respectively. **Conclusion** The combined detection of serum TAP, miRNA-200b mRNA expression and hepatic fibrosis indexes can be used to evaluate the prognosis of primary liver cancer with high sensitivity, specificity and accuracy, and has a good clinical application prospect.

Key words: serum TAP; miRNA-200b; hepatic fibrosis index; combined detection; primary liver cancer; prognosis

原发性肝癌是目前我国最为常见的一种恶性肿瘤, 具有较高的致死率, 全球范围内发病率均较高^[1]。

* 基金项目: 湖南省郴州市第一人民医院科研项目(N2018-009)。

作者简介: 李章勇, 男, 副主任技师, 主要从事临床生化检验和医学诊断工作。 △ 通信作者, E-mail: 50064945@qq.com。

本文引用格式: 李章勇, 夏川, 李刚勇, 等. 肝纤维化指标与 miRNA-200b、TAP 联合检测与原发性肝癌预后的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(11): 1317-1320.

且原发性肝癌患者在发病早期缺乏典型的临床症状,往往确诊时已进入中晚期,临床治疗难度较大,预后多不良^[2]。因此,对于原发性肝癌患者及早确诊、及早治疗在改善患者预后、提高生存率方面具有重要意义。MiR-200 家族作为 miRNA 的重要组成部分之一,在多种肿瘤组织中均有异常表达,尤其是 miR-200 家族是抑制肿瘤转移的关键步骤,在肿瘤转移过程中发挥重要作用^[3-4]。miR-200b 为 miR-200 家族的重要成员,亦参与肿瘤细胞浸润、转移等多种生物学行为^[5]。最近发现,正常细胞恶变时,细胞膜表面的聚糖结构发生变化,最常见的是 N-链聚糖分支的增加,产生多种异常糖链糖蛋白即肿瘤异常蛋白(TAP),可释放到体液中。当肿瘤细胞产生的 TAP 量达到一定程度时,即可以在末梢血液中检出^[6]。亦有研究认为肝脏纤维化病情进展,最终可导致原发性肝癌。在此背景下,本研究旨在探讨 miRNA-200b、TAP 蛋白表达水平与肝纤维化指标联合检测在原发性肝癌疾病诊断中的意义,为临床做好原发性肝癌早期诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 2 月至 2018 年 1 月在本院接受治疗的 73 例原发性肝癌患者病例资料作为研究对象,其中有男 58 例,女 15 例,年龄 23~79 岁,平均(57.11±8.32)岁。根据预后情况将患者分为预后良好组和预后不良组,以随访 2 年内复发或死亡为预后不良组,随访期间未发生病情恶化为预后良好组。结果预后良好患者 45 例,其中男 37 例,女 8 例,年龄 23~76 岁,平均(58.06±7.41)岁。预后不良患者 38 例,男 31 例,女 7 例,年龄 24~79 岁,平均(57.34±6.27)岁。两组患者性别比例、年龄等基础资料差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究方案经医院伦理委员会批准,入组患者及家属均对本研究方案之前同意并签署知情同意书。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:(1)根据中国抗癌协会肝癌专业委员会修订的肝癌诊断标准^[7];(2)样本采集前未经过放疗、化疗或介入治疗等措施。排除标准:(1)伴有自身免疫性疾病的患者;(2)伴有其他系统恶性肿瘤者。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 标本采集 入组研究者均使用真空采血管采集空腹静脉血 4 mL,室温自然凝集 30 min,室温,4 000 r/min 离心 15 min,离心半径 16 cm,移取上层血清,-20℃保存备用。

1.3.2 miRNA-200b mRNA 检测 术中采集肝组织标本,放入液氮中冷冻,之后转存于-80℃冰箱保存。取肝癌及癌旁组织标本,研磨,采用 TRIzol 试剂盒提

取组织中总 RNA。所有操作严格按照说明书进行,并对获得的总 RNA 进行检测,取 A260/A280>1.8 的标本完成后续实验。经反转录后得到 cDNA,之后采用 RT-qPCR 测定肝癌组织中 miRNA-200b mRNA 的表达水平。

1.3.3 TAP 的检测 取各组研究对象指端末梢血,推制成厚薄均匀的血片 3 张,自然干燥。将 TAP 检测试剂充分摇匀,用滴管垂直滴加在血片上,每张 3 滴;等血片上凝聚助剂自然干燥形成圆形“斑点”,将标本置于 TAP 集成阅片仪下,寻找特异形态的凝聚物。TAP 正常/无明显凝聚物:面积 0~121 μm²;TAP 异常/凝聚物较小:面积 121~225 μm²;TAP 异常/凝聚物较大:面积≥225 μm²。试剂和仪器均购自浙江瑞生医疗科技有限公司。

1.3.4 肝脏纤维化指标 测定仪器为新产业 MA-GLUMIN 2000 全自动化学发光仪,试剂盒由深圳市新产业生物医学工程有限公司提供,检测入组研究人群血清透明质酸(HA),Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、层粘连蛋白(LN)水平。

1.4 统计学处理 采用 EXCEL 软件进行原始数据的录入和预处理,采用 SPSS 22.2 软件进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验,采用 Spearman 相关性分析肝纤维化指标及血清 TAP,癌组织 miRNA-200b 与预后的相关性,预后良好赋值为 1,预后不良赋值为 0,并采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测在原发性肝癌预后的评估价值,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 比较 预后不良组患者肝组织 miRNA-200b mRNA 表达量均低于预后良好组,预后良好组患者血清 TAP 显著高于预后不良组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者血清 TAP、癌组织 miRNA-200b 水平比较

组别	miRNA-200b(ng/mL)	TAP(μm ²)
预后不良组(<i>n</i> =38)	0.57±0.11	143.68±19.08
预后良好组(<i>n</i> =45)	0.67±0.14	81.73±11.32
<i>t</i>	28.018	12.932
<i>P</i>	0.000	0.000

2.2 两组患者肝脏纤维指标比较 观察组患者血清 PCⅢ、Ⅳ-C、LN 以及 HA 水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平及肝纤维化指标与预后的相关性分析 如表 3 所

示,血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平对原发性肝癌诊断的临界值分别为 0.58 和 94.02 μm^2 ($r=-0.213$ 、 0.715 , $P<0.05$)。肝纤维化指标 PCⅢ、Ⅳ-C、LN 和 HA 对原发性肝癌诊断的临界值

分别为 102.3 $\mu\text{g/L}$ 、98.1 $\mu\text{g/L}$ 、122.4 $\mu\text{g/L}$ 和 106.5 $\mu\text{g/L}$ ($r=-0.512$ 、 -0.608 、 -0.743 、 -0.673 , $P<0.05$)。

表 2 两组患者肝脏纤维指标比较

组别	PCⅢ(μg/L)	Ⅳ-C(μg/L)	LN(μg/L)	HA(μg/L)
预后良好组(n=45)	94.11±9.22	83.13±8.34	103.05±14.22	97.34±5.83
预后不良组(n=38)	162.91±11.51	143.17±14.02	151.08±18.28	124.17±32.09
t	21.027	19.018	20.385	12.591
P	0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测在原发性肝癌预后的 ROC 曲线分析 血清血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测评估原发性肝癌预后的灵敏度、准确度和特异度分别为 0.985、0.972 和 0.832。见表 3、图 1。

表 3 血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测在原发性肝癌疾病诊断

指标	灵敏度	准确性	特异度
血清 TAP	0.940	0.901	0.431
miRNA-200b	0.926	0.904	0.600
TAP、miRNA-200b 联合肝纤维化指标	0.985	0.972	0.832

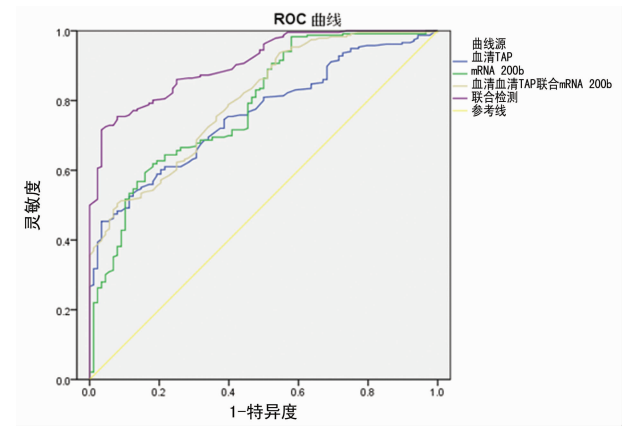


图 1 血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测在原发性肝癌预后的 ROC 曲线分析

3 讨论

近年来,有研究表明肿瘤的生物行为受到肿瘤自身及肿瘤微环境的影响,对其演变和转归均会产生重要影响^[8-10]。趋化因子能够将机体免疫细胞募集至肿瘤病灶处,分泌多种细胞因子,影响肿瘤的生长及附近血管的生成^[11]。有大量报道表明,TAP 与多种肿瘤的发生、侵袭转移密切相关,且能够对肿瘤患者

的预后进行评估^[12-15]。

本研究结果表明,预后不良组患者血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平高于对照组。相关研究表明 miRNA-200b mRNA 高表达者中位生存期长于低表达者,表明 miRNA-200b mRNA 高表达可提高患者生存率,延长生存期,与杨西胜等^[16]报道基本一致。推测 miRNA-200b mRNA 在肝癌发生中可能发挥抑癌基因作用,高表达 miRNA-200b mRNA 可能通过下调 E-cadherin 或直接抑制 EMT 而减少肿瘤细胞迁移、侵袭的发生。

TAP 是肿瘤细胞在新陈代谢过程中排放的糖蛋白和钙一组蛋白复合物的总称,TAP 的出现间接表示细胞癌变的数量和程度。当 TAP 达到一定程度后,这类物质向血液排放,并较多地存在于外周血液。TAP 在肝脏肿瘤具有较高表达,阳性率为 70%~95%^[17]。将其作为肝癌血清学检测的指标,对发现癌前病变有较高的灵敏度和特异度。

正常肝脏细胞外基质的主要成分有蛋白多糖、LN 和胶原。HA,一种蛋白多糖,在肝组织发生纤维化时,其在血清中的含量会明显升高,同时分布于内皮细胞的 HA 受体相应降低,其降解途径受到抑制,因此在肝脏发生纤维化时,血清 HA 水平发生较大波动,是目前能够反映肝脏纤维化较为敏感的生化指标之一^[18]。慢性肝炎患者的血清 PCⅢ持续升高提示病情向肝硬化发生了进一步的进展,而其血清含量的降低则预示了病情有所缓解。此外,LN 及Ⅳ-C 也是反映肝纤维化的重要指标。随着肝炎患者病情进展,逐渐演变成肝硬化乃至肝癌,肝纤维化指标均会发生相应的变化,因此肝纤维化指标是反映机体肝脏健康状况的重要指标。本研究结果表明,预后不良组患者血清 PCⅢ、Ⅳ-C、LN 以及 HA 水平均低于预后良好组,说明肝癌患者的预后与肝纤维指标存在较好的相关性。

根据 ROC 曲线分析结果,结果表明血清血清

TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测对原发性肝癌疾病预后评估的灵敏度、准确度和特异度分别为 0.985、0.972 和 0.832。说明血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平联合肝纤维化指标能够对原发性肝癌进行有效诊断,其原因是血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平作为在肝癌发生过程中即会明显变化的指标,用其预测肝脏疾病预后具有一定的临床意义,而肝纤维化是肝脏病变逐渐进展接近肝癌的一个病理期,因此两种指标联合能够兼顾特异度和准确性。

4 结 论

血清 TAP、癌组织 miRNA-200b mRNA 表达水平与肝纤维化指标联合检测可用于对原发性肝癌的预后进行评估诊断,其灵敏度、特异度及准确度均较高,具有较好的临床应用前景。

参考文献

[1] 李科,林国桢,李燕,等. 广州市 2004—2013 年原发性肝癌流行现况和趋势分析[J]. 中华肿瘤防治杂志,2016,23(23):1527-1530.

[2] 余子牛,鲁东,周春泽,等. 原发性肝癌患者 TACE 治疗后预后和生存分析[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(10):1515-1518.

[3] MASTRON J K, SIVEEN K S, SETHI G, et al. Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review[J]. Anticancer Drugs, 2015, 26(5):475-486.

[4] LIU Y N, YIN J J, ABOU-KHEIR W, et al. MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms [J]. Oncogene, 2013,32(3):296-306.

[5] ZHU Z, FANG Z, HU X, et al. MicroRNAs and mesenchymal stem cells: hope for pulmonary hypertension[J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2015,30(3):380-385.

[6] 成琳,杨良根,许凌云,等. 乳腺癌患者肿瘤异常蛋白表达

的影响因素研究[J]. 中国现代医学杂志,2018,(26):60-62.

[7] 张志伟,陈孝平.《原发性肝癌诊疗规范》(2017 版)解读[J]. 临床外科杂志,2018,26(1):5-8.

[8] 汪晋,马金良. 肝癌预后相关影响因素[J]. 中国普通外科杂志,2015,24(2):270-274.

[9] 汪晋,马金良,许戈良,等. 原发性肝癌手术预后的相关影响因素[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(35):5526-5532.

[10] 褚志强,吴向未,杨宏强,等. 原发性肝癌手术治疗的生存率分析及影响因素研究[J]. 实用医学杂志,2013,29(5):787-789.

[11] SARVAIYA P J, GUO D, ULASOV I, et al. Chemokines in tumor progression and metastasis [J]. Oncotarget, 2013,4(12):2171-2185.

[12] 卜敏,恽惠方,陆燕丰. 盐酸羟考酮或吗啡 PCIA 联合超声引导下 TAP 阻滞在胃肠肿瘤根治术后镇痛效果评价[J]. 重庆医学,2018,(10):1401-1403.

[13] 姜峰,杜然. TAP 联合 Ki-67 对判断非小细胞肺癌患者预后的临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2017,(1):104-106.

[14] 李云华,刘春磊,朱江,等. 骨肉瘤组织中抑癌基因 TAp73 和自噬基因 Beclin1 的表达及其与肿瘤恶性程度的相关性[J]. 海南医学院学报,2017,(7):1001-1004,1008.

[15] 黄婷婷,江倩,杜婷,等. 肺癌患者肿瘤异常糖链蛋白的表达及其意义[J]. 实用医学杂志,2017,(24):4149-4152.

[16] 杨西胜,汪建林,李小磊,等. microRNA-200a 在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 中华肝胆外科杂志,2014,20(6):406-409.

[17] 曹奎杰,刘燕婕. 卵巢上皮癌患者 ABO 血型抗原表达异常与血清糖链蛋白水平的关系[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(3):267-268.

[18] 杜伟,单幼兰,廖权利,等. HA、PⅢNP、LN、CN 在慢性肝病及肝纤维化诊断中的临床意义[J]. 重庆医科大学学报,2013,38(5):530-533.

(收稿日期:2018-11-16 修回日期:2019-01-24)

(上接第 1316 页)

inhibitory factor and interleukin 10 are associated with a rapidly fatal outcome in patients with severe sepsis[J]. Int J Infect Dis, 2014,20(1):13-17.

[13] MONNERET G, FINCK M E, VENET F, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock; association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration [J]. Immunol Lett, 2004, 95(2):193-198.

[14] RHODES A, EVANS L E, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock:2016[J]. Crit Care Med, 2017,45(3):486-552.

[15] 程园园,张洁,郭禹标,等. 血清降钙素原和巨噬细胞移动抑制因子在脓毒症患者中的表达及意义[J]. 广东医学,2016,37(19):2920-2923.

[16] 吴述光,侯小丽,马胜喜. 重症肺炎并发脓毒症患者血清高迁移率族蛋白 B1 检测的临床意义[J]. 新乡医学院学报,2018,34(2):143-145.

[17] GANDO S, SAWAMURA A, HAYAKAWA M, et al. High macrophage migration inhibitory factor levels in disseminated intravascular coagulation patients with systemic inflammation [J]. Inflammation, 2007, 30(3/4):118-124.

(收稿日期:2018-11-28 修回日期:2019-02-25)