

• 论 著 •

血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测对  
乙型肝炎相关早期肝细胞癌的诊断价值\*

李 洪,冯雪晶,秦 维,庄恢勇

琼海市人民医院检验科,海南琼海 222000

**摘 要:****目的** 探讨血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测对乙型肝炎(简称乙肝)相关早期肝细胞癌的诊断价值。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月该院收治的乙肝相关早期肝细胞癌患者 120 例作为肝癌组,120 例肝炎患者作为肝炎组,120 例健康体检者作为对照组。通过实时荧光定量 PCR 检测患者血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平。用受试者工作特征(ROC)曲线分析血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的价值。**结果** 3 组间外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中肝癌组外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平高于肝炎组和对照组( $P<0.05$ ),肝炎组外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平高于对照组( $P<0.05$ )。血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测用于鉴别乙肝相关早期肝细胞癌和肝炎的灵敏度分别为 93.00%、93.00%、95.00%,特异度分别为 94.00%、93.00%、93.00%;用于诊断乙肝相关早期肝细胞癌的灵敏度分别为 95.00%、96.00%、94.00%,特异度分别为 95.00%、95.00%、93.00%。血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 联合检测用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的灵敏度为 93.33%,特异度为 92.92%,准确度为 93.05%。**结论** 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 是乙肝相关早期肝细胞癌诊断的潜在标志物。

**关键词:**血清外泌体; 微小 RNA; 乙型肝炎; 肝细胞癌; 早期诊断

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.003 **中图法分类号:**R446.11

**文章编号:**1673-4130(2021)17-2058-04 **文献标志码:**A

The diagnostic value of serum exosome miR-15b, miR-224 and miR-501  
in the hepatitis B-related early hepatocellular carcinoma\*

LI Hong, FENG Xuejing, QIN Wei, ZHUANG Huiyong

Department of Clinical Laboratory, Qionghai People's Hospital, Qionghai, Hainan 222000, China

**Abstract:****Objective** To investigate the diagnostic value of serum exosome miR-15b, miR-224 and miR-501 in serum exosomes in the hepatitis B-related early hepatocellular carcinoma. **Methods** From January 2018 to December 2019, 120 patients with hepatitis B-related early hepatocellular carcinoma admitted to the hospital were enrolled in the study as liver cancer group, 120 patients with hepatitis were enrolled as the hepatitis group, and 120 healthy people who had undergone physical examination were enrolled as the control group. The relative expression levels of miR-15b, miR-224 and miR-501 in patients' serum exosomes were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnostic values of miR-15b, miR-224 and miR-501 in hepatitis B-related early hepatocellular carcinoma. **Results** There were significant differences in the relative expression levels of miR-15b, miR-224 and miR-501 in serum exosomes among the three groups ( $P<0.05$ ), and the relative expression levels of miR-15b, miR-224 and miR-501 in the liver cancer group were higher than those in the hepatitis group and the control group ( $P<0.05$ ), and the relative expressions of miR-15b, miR-224 and miR-501 in the hepatitis group were greater than those in the control group ( $P<0.05$ ). The sensitivity of serum exosomes miR-15b, miR-224, and miR-

\* 基金项目:海南省医药卫生科研项目(1904320116A2001)。

作者简介:李洪,男,副主任技师,主要从事临床检验的相关研究。

本文引用格式:李洪,冯雪晶,秦维,等.血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测对乙型肝炎相关早期肝细胞癌的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(17):2058-2061.

501 for the differentiation of hepatitis B-related early hepatocellular carcinoma from hepatitis was 93.00%, 93.00%, and 95.00%, respectively, and the specificity was 94.00%, 93.00%, and 93.00%, respectively. The sensitivity for the diagnosis of hepatitis B-related early hepatocellular carcinoma was 95.00%, 96.00%, 94.00%, and the specificity was 95.00%, 95.00%, 93.00%, respectively. The sensitivity of the combined detection of serum exosomes miR-15b, miR-224, and miR-501 for the diagnosis of hepatitis B-related early hepatocellular carcinoma was 93.33%, the specificity was 92.92%, and the accuracy was 93.05%. **Conclusion** The relative expression levels of miR-15b, miR-224, and miR-501 in serum exosomes can be used as potential diagnostic markers of hepatitis B-related early hepatocellular carcinoma.

**Key words:** serum exosomes; miRNA; hepatitis B; hepatocellular carcinoma; early diagnosis

肝细胞癌在所有肝癌病例中占较大比例,是全球五大常见恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。乙型肝炎病毒(HBV)感染是肝细胞癌发生的主要危险因素。由于早期肝细胞癌临床诊断困难,只有 30%~40% 的患者能行根治性切除术治疗<sup>[2]</sup>。在目前的诊断方案中,甲胎蛋白(AFP)是筛选肝细胞癌的生物标志物<sup>[3]</sup>,但 AFP 的灵敏度仅为 39%~56%,特异度为 76%~93%,约三分之一的肝细胞癌患者不能通过 AFP 检测确诊<sup>[4]</sup>。微小 RNA(miRNA)是一类具有 19~22 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA<sup>[5]</sup>。在乙型肝炎(简称乙肝)相关早期肝细胞癌患者中,外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 异常表达<sup>[6]</sup>。然而,关于上述几种 miRNA 能否作为诊断乙肝相关早期肝细胞癌的生物标志物国内未见报道,所以本研究对此进行了探讨。

1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月本院收治的乙肝相关早期肝细胞癌患者 120 例作为肝癌组,男 61 例、女 59 例,年龄(53.56±5.62)岁;选取肝炎患者 120 例作为肝炎组,肝炎病毒检测为阳性,病程超过半年,有乏力、食欲缺乏、恶心、腹胀、肝区疼痛等症状,男 64 例、女 56 例,年龄(52.61±8.23)岁。本研究中乙肝的诊断均符合《病毒性肝炎防治方案》中的相关标准<sup>[7]</sup>;乙肝相关早期肝细胞癌的诊断符合《原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)》中的标准<sup>[8]</sup>。排除标准:(1)接受过相应的药物治疗;(2)有严重心、肾功能损害者;(3)长期使用皮质类固醇激素及免疫抑制剂者;(4)精神疾病患者;(5)同时患有其他癌症者。另外,将同期于本院接受体检的健康者 120 例作为对照组,男 60 例、女 60 例,年龄(50.65±10.59)岁。各组一般资料比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究获本院伦理委员会批准,且受试者均签署知情同意书。

**1.2 方法** 抽取上述人群肘前静脉血 20 mL,静置 20 min 后,以 2 500 r/min 离心 15 min 分离血清。取 4 mL 血清后,加入 34 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,移至超速离心管,经配平后于 4 ℃ 以 150 000×g 离

心 70 min 获取血清外泌体。采用外泌体 RNA 分离试剂盒(北京金优科技有限公司)进行 RNA 的提取:裂解外泌体后加入氯仿,静置后离心得到上层的水相 RNA 层,再加入无水乙醇沉淀 RNA,经 RWT 缓冲液和 RPE 缓冲液洗脱后再用 DEPC 水收集得到 RNA 溶液。随即采用反转录试剂盒(昆明迪然科技有限公司)进行反转录制备 cDNA。采用实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒(北京吉田生物科技有限公司)配制扩增体系,进行 qPCR 检测,通过循环阈值(Ct 值)计算 miRNA 的相对表达水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS22.0 软件进行统计学处理。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。3 组间血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平的比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- $q$  检验;应用受试者工作特征(ROC)曲线分析血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测对乙肝相关早期肝细胞癌和肝炎的鉴别诊断价值及乙肝诊断的价值。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 3 组间血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平的比较** 肝癌组和肝炎组患者血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平高于对照组,肝癌组高于肝炎组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

| 表 1 3 组间血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 相对表达水平的比较( $\bar{x} \pm s$ ) |          |             |             |             |
|--------------------------------------------------------------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| 组别                                                                 | <i>n</i> | miR-15b     | miR-224     | miR-501     |
| 肝癌组                                                                | 120      | 2.14±0.71   | 1.45±0.41   | 1.72±0.52   |
| 肝炎组                                                                | 120      | 1.14±0.34*  | 0.42±0.11*  | 0.56±0.18*  |
| 对照组                                                                | 120      | 0.23±0.07*△ | 0.11±0.03*△ | 0.14±0.04*△ |
| <i>F</i>                                                           |          | 526.052     | 978.222     | 792.063     |
| <i>P</i>                                                           |          | <0.001      | <0.001      | <0.001      |

注:与肝癌组相比,\* $P<0.05$ ;与肝炎组相比,△ $P<0.05$ 。

**2.2 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测用于乙肝相关早期肝细胞癌和肝炎鉴别诊断的效**

能 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测用于乙肝相关早期肝细胞癌和肝炎鉴别诊断的效能指标见表 2,截断值分别为 1.384、0.749、0.960。

2.3 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测

用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的效能 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的效能指标见表 3,截断值分别为 0.558、0.227、0.274。

表 2 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测用于乙肝相关早期肝细胞癌和肝炎鉴别诊断的效能

| miRNA 类型 | 灵敏度(%) | 特异度(%) | 约登指数 | 曲线下面积 | 95%CI       | P      |
|----------|--------|--------|------|-------|-------------|--------|
| miR-15b  | 93.00  | 94.00  | 0.87 | 0.941 | 0.907~0.976 | <0.001 |
| miR-224  | 93.00  | 93.00  | 0.86 | 0.932 | 0.891~0.969 | <0.001 |
| miR-501  | 95.00  | 93.00  | 0.88 | 0.943 | 0.908~0.972 | <0.001 |

表 3 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的效能

| miRNA 类型 | 灵敏度(%) | 特异度(%) | 约登指数 | 曲线下面积 | 95%CI       | P      |
|----------|--------|--------|------|-------|-------------|--------|
| miR-15b  | 95.00  | 95.00  | 0.90 | 0.951 | 0.922~0.983 | <0.001 |
| miR-224  | 96.00  | 95.00  | 0.91 | 0.954 | 0.918~0.984 | <0.001 |
| miR-501  | 94.00  | 93.00  | 0.87 | 0.933 | 0.884~0.969 | <0.001 |

2.4 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 联合检测用于乙肝相关早期肝细胞癌的诊断 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 联合检测用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的灵敏度为 93.33%(112/120),特异度为 92.92%(223/240),准确度为 93.05%(335/360)。见表 4。

表 4 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 联合检测用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的分析(n)

| 3 种 miRNA 联合检测 | 组别  |      | 合计  |
|----------------|-----|------|-----|
|                | 肝癌组 | 非肝癌组 |     |
| 阳性             | 112 | 17   | 129 |
| 阴性             | 8   | 223  | 231 |
| 合计             | 120 | 240  | 360 |

注:非肝癌组为肝炎组和对照组人群。

3 讨 论

慢性肝病有发展为肝细胞癌的可能,对慢性肝病患者而言这是严重的健康隐患。因此,肝细胞癌的早诊断、早治疗至关重要。本研究检测了 3 组人群的血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 水平,然后进行了 ROC 曲线分析,发现血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 联合检测用于乙肝相关早期肝细胞癌诊断的灵敏度为 93.33%,特异度为 92.92%,准确度为 93.05%。本研究中,尽管各项指标单独检测的特异度和灵敏度并不低于联合检测,但是血清外泌体 miRNA 属于间接标志物,会受到患者各种因素的影响,联合检测能减少这些影响。

miRNA 可在转录后调节基因表达,与许多生物学过程有关,如发育、细胞分化、增殖、凋亡和炎症<sup>[9]</sup>。

在包括肝细胞癌在内的许多癌症中都发现了 miRNA 的异常表达,它们具有致癌或抑癌特性<sup>[10]</sup>。本研究发现,肝癌组患者血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 的相对表达水平明显高于肝炎组,而且肝癌组、肝炎组均明显高于对照组。抑制 miR-224 的表达可显著降低基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的基因和蛋白表达,MMP-2 是促进肿瘤迁移的重要蛋白<sup>[11]</sup>,这说明肝细胞癌患者血清外泌体高表达 miR-224 可能与肝细胞癌的侵袭、迁移能力相关。另外,陈帅等<sup>[12]</sup>发现 miR-501 在肺腺癌标本中呈高表达,与本研究发现的 miR-501 在肝细胞癌患者血清外泌体高表达的现象一致;此外,上调 miR-501 表达可抑制其靶基因 CYLD 的表达,并进一步引起下游基因 C-myc 和 Cyclin D1 的表达升高,由此造成肝癌细胞的高增殖活性。由此可见,miR-224、miR-501 可能与乙肝相关早期肝细胞癌的进展和转移有关。

外泌体是小的膜泡,大小为 30~120 nm,来自内部多泡体(MVB)<sup>[13]</sup>。外泌体已经在包括血液、腹水、尿液和唾液在内的体液中被发现<sup>[14]</sup>。研究表明,外泌体非编码 RNA 以一种稳定的形式存在,不受内源性 RNA 酶的干扰,它们可能是细胞间通信的重要介质<sup>[15]</sup>。因此,相较于血清 AFP 的筛查,血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 更加稳定。外泌体包含不同的 miRNA 组分,这主要取决于不同的器官和疾病状态,这可能反映了器官组织起源细胞的分子特征<sup>[16]</sup>。肿瘤来源的外泌体含有肿瘤特异性的 miRNA,它们在肿瘤进展和转移中发挥作用<sup>[17]</sup>。目前,AFP 作为筛选肝细胞癌的生物标志物,灵敏度、特异

度不够理想,本研究发现血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测在灵敏度和特异度方面均有明显优势。

综上所述,血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 可作为诊断乙肝相关早期肝细胞癌的潜在标志物。

参考文献

[1] LOFTFIELD E, ROTHWELL J A, SINHA R, et al. Prospective Investigation of serum metabolites, coffee drinking, liver cancer incidence, and liver disease mortality[J]. J Natl Cancer Inst, 2020, 112(3):286-294.

[2] DIETRICH P, WORMSER L, FRITZ V, et al. Molecular crosstalk between Y5 receptor and neuropeptide Y drives liver cancer[J]. J Clin Invest, 2020, 130(5):2509-2526.

[3] XU R, WANG J, HUANG X, et al. Clinical value of spectral CT imaging combined with AFP in identifying liver cancer and hepatic focal nodular hyperplasia[J]. J BUON, 2019, 24(4):1429-1434.

[4] CHEN W, PENG J, YE J, et al. Aberrant AFP expression characterizes a subset of hepatocellular carcinoma with distinct gene expression patterns and inferior prognosis[J]. J Cancer, 2020, 11(2):403-413.

[5] YAN X, LIU X, WANG Z, et al. MicroRNA-486-5p functions as a tumor suppressor of proliferation and cancer stem-like cell properties by targeting Sirt1 in liver cancer[J]. Oncol Rep, 2019, 41(3):1938-1948.

[6] LEE Y R, KIM G, TAK W Y, et al. Circulating exosomal noncoding RNAs as prognostic biomarkers in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2019, 144(6):1444-1452.

[7] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华内科杂志, 2001, 40(1):62-68.

[8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(12):886-895.

[9] XIU D, WANG D, WANG J, et al. MicroRNA-543 suppresses liver cancer growth and induces apoptosis via the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2019, 7(2):2451-2456.

[10] TAO C, SUN H, SANG W, et al. MiRNA-99a inhibits cell invasion and migration in liver cancer by directly targeting HOXA1[J]. Oncol Lett, 2019, 17(6):5108-5114.

[11] 邱卫明, 黄雁, 陈志伟. miR-224 对细胞侵袭和迁移的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(14):2111-2114.

[12] 陈帅, 周永春, 陈颖, 等. miR-501-5p 在宣威地区肺腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(3):354-359.

[13] CAO S Q, ZHENG H, SUN B C, et al. Long non-coding RNA highly up-regulated in liver cancer promotes exosome secretion[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(35):5283-5299.

[14] WANG H, LU Z, ZHAO X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1):133.

[15] LIU J, FAN L, YU H, et al. Endoplasmic reticulum stress causes liver cancer cells to release exosomal miR-23a-3p and up-regulate programmed death ligand 1 expression in macrophages[J]. Hepatology, 2019, 70(1):241-258.

[16] LIN Q, ZHOU C R, BAI M J, et al. Exosome-mediated miRNA delivery promotes liver cancer EMT and metastasis[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(3):1080-1095.

[17] ZHU L, LI J, GONG Y, et al. Exosomal tRNA-derived small RNA as a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):74.

(收稿日期:2020-12-18 修回日期:2021-04-11)

(上接第 2057 页)

[18] FLESHNER M, CRANE C R. Exosomes, DAMPs and miRNA: features of stress physiology and immune homeostasis[J]. Trends Immunol, 2017, 38(10):768-776.

[19] ZHU T T, ZHANG W F, YIN Y L, et al. MicroRNA-140-5p targeting tumor necrosis factor- $\alpha$  prevents pulmonary arterial hypertension[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6):9535-9550.

[20] 邓伟明, 黄郁凯, 江佳伟, 等. 强直性脊柱炎患者精浆来源外泌体中肿瘤坏死因子- $\alpha$  的表达情况[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(9):955-958.

[21] BAYOUMI A S, PARK K M, WANG Y, et al. A carvedilol-responsive microRNA, miR-125b-5p protects the heart from acute myocardial infarction by repressing pro-

apoptotic bak1 and klf13 in cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 114(1):72-82.

[22] NAGA P S, DUAN Z H, GUPTA M K, et al. Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks[J]. J Biol Chem, 2009, 284(40):27487-27499.

[23] YANG V K, LOUGHRAN K A, MEOLA D M, et al. Circulating exosome microRNA associated with heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease in a naturally occurring canine model[J]. J Extracell Vesicles, 2017, 6(1):1358-1363.

(收稿日期:2020-11-26 修回日期:2021-03-28)