

# 肝癌患者血清 miRNA-4516 的表达及其临床意义 和靶基因的预测\*

王福花<sup>1</sup> 王春艳<sup>1</sup> 郭向云<sup>1</sup> 李峰<sup>1</sup> 杨云锋<sup>2</sup> 郭素堂<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨血清 miRNA-4516 在肝癌中的表达情况及其临床意义并预测其可能的靶基因。方法:收集 100 例肝癌患者和同期体检的 100 例健康人血清样本,采用 RT-PCR 测定血清 miRNA-4516 表达水平,分析其与肝癌临床病理的相关性,最后通过生物信息学预测 miRNA-4516 可能的靶基因。结果:经分析血清 miRNA-4516 相对表达水平,肝癌患者高于正常对照组( $P=0.001$ );与肝癌的分化程度有关( $P=0.015$ );而与患者年龄、性别、AFP 表达量、是否肝炎肝硬化、是否转移无相关性( $P>0.05$ )。通过生物信息学分析,miRNA-4516 预测的靶基因多数与转录因子有关。结论:miRNA-4516 有可能通过调节转录因子在肝癌发生、发展中起作用。

**[关键词]** 肝癌;miRNA-4516;靶基因

**DOI:**10.3969/j.issn.1671-038X.2021.02.02

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标志码]** A

## Expression of serum miRNA-4516 and its clinical significance and predicted target genes in hepatocellular carcinoma

WANG Fuhua<sup>1</sup> WANG Chunyan<sup>1</sup> GUO Xiangyun<sup>1</sup> LI Feng<sup>1</sup>  
YANG Yunfeng<sup>2</sup> GUO Sutang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Shanxi Cancer Hospital and Institute, Taiyuan, 030013, China; <sup>2</sup>Department of Gastroenterology, Shanxi Provincial People's Hospital)

Corresponding author: GUO Sutang, Email: 58998417@qq.com

**Abstract Objective:** This study sought to detect the expression and clinical significance of serum miRNA-4516 in hepatocellular carcinoma, and to predict its target genes through bioinformation. **Methods:** A total of 100 patients with hepatocellular carcinoma and 100 healthy persons were selected. The level of serum miRNA-4516 was detected by RT-PCR. The correlation of serum miRNA-4516 expression levels with the clinical characteristics of hepatocellular carcinoma was analyzed. Bioinformatics methods were used to analyze target genes of miRNA-4516. **Results:** Serum miRNA-4516 was highly expressed in patients with hepatocellular carcinoma in contrast with controls( $P=0.001$ ). The high expression of miRNA-4516 was shown to be related to differential grade of hepatocellular carcinoma( $P=0.015$ ), Whereas the high expression of miRNA-4516 didn't correlate with age, sex, AFP, hepaitis, cirrhosis and distant metastasis of the patients( $P>0.05$ ). Target genes predicted by information are largely transcription factor. **Conclusion:** miRNA-4516 may play a role in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma through transcription factor.

**Key words** hepatocellular carcinoma; serum miRNA-4516; target genes

肝癌的死亡率在全球恶性肿瘤中位居第 3,每年大约有 100 万新发病例,而且发病率在不断升高。由于发现较晚、药物耐受、肿瘤复发转移等诸多因素,5 年生存率低于 7%<sup>[1-2]</sup>。直到现在,外科手术、肝移植和经皮消融术仍旧是肝癌的主要治疗措施,然而其仅仅适用于一些早期癌症患者。由于症状不明显,多数患者诊断时已属晚期而不适合上述治疗方案。因此,阐明肝癌的分子机制有助于发展新的诊疗手段和治疗措施,从而改善肝癌的生存率。

miRNA 在 1993 年首次被发现,是近些年来的

研究热点,它是一种内源性非编码的小分子 miRNA,其种子区域通过结合靶基因的 3'-UTRs 负性调节转录后 miRNA,诱导靶基因 miRNA 水平下调或抑制其翻译,进而调控目的基因表达<sup>[3]</sup>。目前越来越多的研究表明,miRNA 表达的异常是许多肿瘤共有的特征,它在细胞迁移、凋亡、增殖和分化等肿瘤发生和发展中扮演着至关重要的角色。而且每个 miRNA 都被认为有能力与数百个靶标结合,因此他们有很强的调节靶基因的能力。尤其是容易获取且在血清血浆中相对稳定存在的细胞外 miRNA 引发了研究者们极大的兴趣,这些 miRNA 水平的改变有可能作为多种疾病的非侵入性生物标志物<sup>[4]</sup>。

前期实验我们已经用针对血清/血浆的 Serum

\*基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:81972840);山西省重点研发计划项目(No:201903D321129)

<sup>1</sup>山西省肿瘤医院分子生物室(太原,030013)

<sup>2</sup>山西省人民医院消化科

通信作者:郭素堂,Email:58998417@qq.com

®. Plasma miScript miRNA PCR Array 对肝癌患者、肝硬化患者与健康人的血清进行了 miRNA 差异表达筛选<sup>[5]</sup>。在后续试验中,我们进一步通过 RT-PCR 技术对已筛选出的 miRNA-4516 进行了大样本验证,并评估了血清 miRNA-4516 相对表达水平与患者年龄、性别、AFP 表达量、是否肝炎肝硬化、肝癌的分化程度、是否转移等肝癌临床病理的相关性。并通过生物信息学分析,寻找其潜在的靶基因,以明确其可能的分子机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2015 年 6 月—2016 年 6 月在我院普外科和介入科收集的 100 例新发肝癌患者,作为肝癌组。以同期来我院进行体检的 100 例健康人员为健康对照组。肝癌组男 80 例,女 20 例;年龄 38~74 岁,中位年龄 54 岁;有肝炎者 72 例,无肝炎者 28 例;有肝硬化者 68 例,无肝硬化者 32 例;低分化者 54 例,中高分化者 46 例。健康对照组男 69 例,女 31 例;年龄 34~66 岁,中位年龄 46 岁;均无肝病史。2 组年龄、性别比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本项目取得医院伦理委员会批准。病例入选标准:①按照第 8 版内科学肝癌诊断标准确诊病例;②未经任何治疗(包括手术、介入或放化疗)前抽血;③获得参加者的知情同意。排除标准:资料不全者,患有其他恶性肿瘤或重要脏器功能衰竭者。

### 1.2 仪器与试剂

miRNeasy Serum/Plasma kit; miRNeasy II RT kit; miScript Primer Assay; SYBR Green PCR Master Mix; Viia 7 荧光定量 PCR 仪。

### 1.3 方法

**1.3.1 标本采集** 空腹状态下,用普通血清管收集 3 mL 全血,标本采集后静置 2 h,于 4℃,3 000  $r/min$  离心 10 min,分离血清于 1.5 mL EP 管中,继续 4℃,12 000  $r/min$  离心 10 min,以去除血清中细胞碎片,并立即置于 -80℃ 冰箱中保存待用。

**1.3.2 血清总 RNA 提取** 提取 200  $\mu L$  血清样品,为使血清样品标准化,提取前加入一个合成的 miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control(线虫 miRNA-39),然后依照 miRNeasy Serum/Plasma kit 试剂盒说明书进行总 RNA 提取,提取完成后,以 14  $\mu L$  DEPC 水(无 RNA 酶纯水)洗脱得到血清总 RNA,包括 miRNA。在 Nanodrop 上进行 RNA 纯度及浓度测定。

**1.3.3 miRNA 反转录** 提取得到的 miRNA 立即进行反转录反应。为避免 RNA 降解,所有的反应都在冰上进行。反应体系 20  $\mu L$ ,包括:miScript Reverse Transcriptase Mix 2  $\mu L$ ,5x miScript HiSpec Buffer 4  $\mu L$ ,10x miScript Nucleics Mix 2  $\mu L$ ,

Template RNA 12  $\mu L$ 。反应条件为:37℃ 60 min,95℃ 5 min。反应完成后,用 200  $\mu L$  无 RNase 的纯净水稀释 cDNA。若不立即进行 PCR 反应,应将稀释后的反转录反应溶液放入 -20℃ 冰箱中保存待用。

**1.3.4 miRNA PCR 检测** miRNA-4516 特异的 miScript Primer Assays(正向引物 Cat. No. Ms00037555)、线虫 cell-miRNA-39 miScript Primer Assay(Lot. No. 176135137)和 miScript Universal Primer(通用的反向引物)(引物均由 Qiagen 合成)配合 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 进行 RT-PCR,miRNA-39 作为对照,来检测 miRNA-4516 的表达。PCR 反应为:95℃ 15 min,94℃ 15 s,55℃ 30 s,70℃ 30 s,40 个循环。

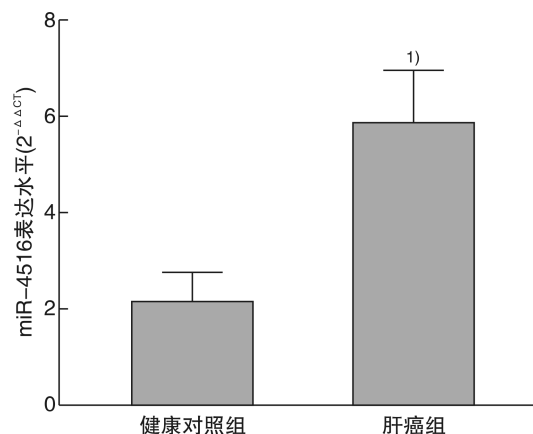
### 1.4 统计学处理

miRNA-39 为内参,对 miRNA-4516 进行归一化处理,采用相对定量法,表达量倍数的变化用  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。RQ 表示肿瘤患者相对于对照组的血清中 miRNA-4516 表达量的变化倍数。其中  $\Delta Ct = Ct_{(miRNA-4516)} - Ct_{(miRNA-39)}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(肝癌组)} - \Delta Ct_{(健康对照组)}$ 。采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析和 GraphPad Prism v5.0 软件作图。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝癌组与健康对照组患者 miRNA-4516 的表达差异

通过 RT-PCR 检测肝癌组和健康对照组血清中 miRNA-4516 和线虫 miRNA-39 的表达情况,分析发现肝癌组患者血清中 miRNA-4516 的表达较健康对照组血清明显升高,差异有统计学意义( $P = 0.001$ )。见图 1。



与健康对照组比较,<sup>1)</sup> $P = 0.001$ 。

图 1 RT-qPCR 检测肝癌组与健康对照组血清 miRNA-4516 的表达差异

### 2.2 血清 miRNA-4516 的表达与肝癌患者病理参数之间的关系

依据 miRNA-4516 表达水平的中位数将肝癌

患者分为 2 组,低表达组( $n=50$ )和高表达组( $n=50$ )。用  $\chi^2$  检验比较高低表达组与肝癌患者病理参数之间的关系,分析结果为血清 miRNA-4516 相对表达水平与肝癌的分化程度有关,差异有统计学意义( $P=0.015$ );而与患者年龄、性别、AFP 表达量、是否肝炎肝硬化、是否转移无相关性,见表 1。

表 1 血清 miRNA-4516 的表达与肝癌患者病理参数之间的关系 例(%)

病理特征	例数	miRNA-4516 表达量		P
		低	高	
性别				0.227
男	80	38(47.5)	42(52.5)	
女	20	12(60.0)	8(40.0)	
年龄/岁				0.163
$\leq 55$	43	24(55.8)	19(44.2)	
$> 55$	57	25(43.9)	32(56.1)	
肝炎				0.494
否	28	16(57.1)	12(42.9)	
是	72	43(59.7)	29(40.3)	
肝硬化				0.265
否	32	17(53.1)	15(46.9)	
是	68	30(44.1)	38(55.9)	
AFP/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$				0.151
$\leq 400$	38	22(57.9)	16(42.1)	
$> 400$	62	28(45.2)	34(54.8)	
肿块大小/cm				0.164
$\leq 5$	41	23(56.1)	18(43.9)	
$> 5$	59	26(44.1)	33(55.9)	
分化程度				0.015
中高分化	46	28(60.9)	18(39.1)	
低分化	54	20(37.0)	34(63.0)	
是否转移				0.080
是	48	20(41.7)	28(58.3)	
否	52	30(57.7)	22(42.3)	

### 2.3 miRNA-4516 靶基因预测

为了更深入地研究 miRNA-4516 在肝癌发生发展中的作用,我们选择常用的在线工具 TargetScan 7.2、miRNADB 和 miRTarBase 对 miRNA-4516 的靶基因进行预测。结果显示,TargetScan 7.2 共预测到 5933 个靶基因(其中 miRNA-4434, 3155 个; miRNA-4516, 24 个; miRNA-5703, 2754 个); miRDB 共预测到 1586 个靶基因; miRTarBase 共预测到 414 个靶基因。其中有 3 个靶基因(ETV4、SLC25A1、ZNF853)在 3 个数据库都被预测到,有 1 个靶基因 GRB7 是 TargetScan 7.2 和 miRTarBase 共同预测到的,见图 2。为了进一步确认靶基因的可能性,应用 RNA22 对 hsa-miRNA-4516 及其靶基因 3'-UTRs 结合位点进行了评估,见表 2。

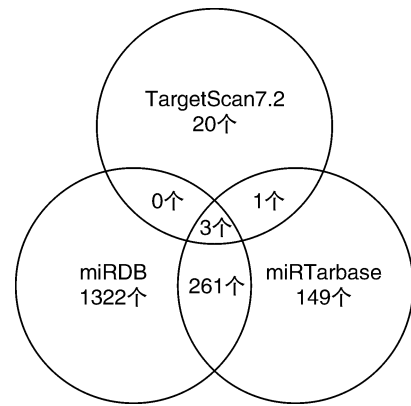


图 2 通过 3 个数据库对 miRNA-4516 进行靶基因预测结果的韦恩图

表 2 hsa-miRNA-4516 及其靶基因 3'-UTRs 结合位点预测

靶基因	靶基因 3'-UTR-hsa-miRNA-4516 (MIMAT0019053) 结合状态	结合位点	P
ETV4	GCCCCCACACCTTTTCCC             :	274~ 292	0.017
ZNF853	CGGGG-CTG-GGAAGAGGG TTCCTG-CCCCTCTCCC :     :	1204~ 1219	0.009
SLC25A1	GCCCC-CTGCTTCTCCC           :	426~ 441	0.077
	CGGGGCTGGGAAGAGGG		

### 3 讨论

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,像其他癌症一样,肝癌的发生、发展也是在环境和基因双方因素影响下的一个多因素多阶段的复杂过程。其发病隐匿,预后差。尤其在中国,发病率和死亡率占世界肝癌发病率和死亡率的 50% 以上<sup>[6-7]</sup>,这对个人和社会都造成了严重的负担。因此,阐明肝癌发生发展的分子机制和发现有效的分子诊断、治疗靶基因是非常有必要的。miRNA 在许多癌症中表达失调。大量的证据显示,循环 miRNA 与疾病高度相关,而且随着疾病的发展动态而变化,且具有高稳定性、非侵袭性的特性。目前像循环 miRNA 这样的液体活检已经成为临床筛查、诊断和监测的最新手段<sup>[8-9]</sup>。

因此,前期实验我们采用了 Qiagen 专门针对血清/血浆的 Serum & Plasma miScript miRNA PCR Array,筛选出肝癌、肝硬化患者与正常人血清的差异表达 miRNA 谱,其中包括上调的 miR-4516。目前 miR-4516 在多种肿瘤中有报道<sup>[10-15]</sup>,包括胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、小细胞肺癌以及恶性胶质瘤,在肝癌中也有报道。报道称长链非编码 RNA LSINCT5 和 miRNA-4516 共同作用于肝癌的发生、发展。说明 miRNA-4516 在不同肿瘤中通

过不同的靶点,在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用。以往研究在肝癌组织和细胞中对 miRNA-4516 进行了研究,并未在肝癌血清中进行研究。在本研究中,我们进一步通过实时定量 RT-PCR 技术对肝癌 miRNA-4516 的表达进行了大样本验证,并评估了 miRNA-4516 与肝癌患者临床病理特征的相关性,如年龄、性别、AFP、是否肝炎肝硬化、肿瘤分化程度以及是否转移等,结果与分化程度有一定相关性( $P=0.015$ )。随后通过在线软件 miRTarBase、miRDB 和 TargetScan7 来预测其可能的靶基因,并通过韦恩图来进行交集,最终聚焦在少数的几个靶基因。为进一步提高预测结果的可靠性,我们使用 RNA22 软件对 hsa-miRNA-4516 和靶基因 3'-UTRs 可能结合位点进行了预测,除 SLC25A1 外,其余差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。最后,我们对 ETV4 和 ZNF853 这 2 个基因进行功能注释及文献检索。ETV4 (ETS variant transcription factor 4, 转录因子 4 ETS 变体),是 ETS 转录因子家族 PEA3 (polyoma enhancer activator 3, 多瘤病毒增强子激活剂 3) 亚家族中的一员,在肿瘤的发生、发展和转移过程中发挥重要作用,在肝癌中也有报道<sup>[16-17]</sup>,通过不同的途径 ETV4-MMP1 及 ETV4-uPAR 对肝癌的发生、发展起作用。ZNF853 (zinc finger protein 853, 锌指蛋白)是一类具有手指状结构域的转录因子,能与某些 RNA/DNA 特异性结合,在转录和翻译水平上调控基因的表达,文献报道较少。

本文结果显示,miRNA-4516 在肝癌患者血清中的表达水平升高,且与肿瘤分化有关,通过生物信息学分析,我们预测了 miRNA-4516 可能的靶基因有 ETV4、SLC25A1、ZNF853,其中 ETV4、ZNF853 均属于转录因子且与 miRNA-4516 结合位点预测  $P<0.05$ 。因此,我们下一步重点研究 miRNA-4516 通过调控转录因子在肝癌中发挥生物学效应,进一步了解肝癌发生、发展的机制,为肝癌的临床诊疗提供一定的科学依据,能更好地提升肝癌的生存率。

#### 参考文献

- [1] Kim NG, Nguyen PP, Dang H, et al. Temporal trends in disease presentation and survival of patients with hepatocellular carcinoma: A real-world experience from 1998 to 2015[J]. *Cancer*, 2018, 124(12): 2588-2598.
- [2] Lee D, Xu IM, Chiu DK, et al. Folate cycle enzyme MTHFD1 L confers metabolic advantages in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(5): 1856-1872.
- [3] Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(3-4): 369-378.
- [4] Shah R, Tanriverdi K, Levy D, et al. Discordant Expression of Circulating microRNA from Cellular and Extracellular Sources [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153691.
- [5] 王福花,李峰,王春艳,等. 血清 miRNA 表达谱在肝细胞癌中的差异性研究[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2020, 28(6): 423-426.
- [6] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [7] Abreu P, Ferreira R, Mineli V, et al. Alternative Biomarkers to Predict Tumor Biology in Hepatocellular Carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(12): 6573-6784.
- [8] Nikpay M, Beehler K, Valsesia A, et al. Genome-wide identification of circulating-miRNA expression quantitative trait loci reveals the role of several miRNAs in the regulation of cardiometabolic phenotypes [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(11): 1629-1645.
- [9] Keller A, Fehlmann T, Backes C, et al. Competitive learning suggests circulating miRNA profiles for cancers decades prior to diagnosis [J]. *RNA Biol*, 2020, 17(10): 1416-1426.
- [10] Chen S, Xu M, Zhao J, et al. MicroRNA-4516 suppresses pancreatic cancer development via negatively regulating orthodenticle homeobox 1 [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(12): 2159-2169.
- [11] Jin XH, Lu S, Wang AF. Expression and clinical significance of miR-4516 and miR-21-5p in serum of patients with colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 241.
- [12] Wang Z, Xu R. lncRNA PART1 Promotes Breast Cancer Cell Progression by Directly Targeting miR-4516 [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 7753-7760.
- [13] Shimojo M, Kasahara Y, Inoue M, et al. A gapmer antisense oligonucleotide targeting SRRM4 is a novel therapeutic medicine for lung cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7618.
- [14] Cui T, Bell EH, McElroy J, et al. miR-4516 predicts poor prognosis and functions as a novel oncogene via targeting PTPN14 in human glioblastoma [J]. *Oncogene*, 2019, 38(16): 2923-2936.
- [15] Li O, Li Z, Tang Q, et al. Long Stress Induced Non-Coding Transcripts 5 (LSINCT5) Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression Through Interaction with High-Mobility Group AT-hook 2 and MiR-4516 [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 8510-8523.
- [16] Kim E, Kim D, Lee JS, et al. Capicua suppresses hepatocellular carcinoma progression by controlling the ETV4-MMP1 axis [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2287-2301.
- [17] Yang QX, Zhong S, He L, et al. PBK overexpression promotes metastasis of hepatocellular carcinoma via activating ETV4-uPAR signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2019, 452: 90-102.