

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.04.007

肝细胞癌组织中 miR-203a 和其靶基因的表达及其临床意义

沈国强, 高云霞, 唐小琦, 周知化(常州市金坛区第二人民医院 检验科, 江苏 常州 213200)

[摘要] **目的:** 探讨肝细胞癌(HCC)患者血清及癌组织中 miR-203a 和其靶基因的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系。**方法:** 利用生物信息学方法从 TargetScan、miRDB 和 PicTar 网站预测 HCC 组织中 miR-203a 的靶基因, 通过双荧光素酶报告基因实验进行验证。选取 2018 年 1 月至 2019 年 6 月在常州市金坛区第二人民医院手术切除的 96 例 HCC 患者的癌和癌旁组织标本、血清和临床资料, 以及 90 例健康体检者的血清作为对照。qPCR 法检测血清 miR-203a 水平, 以及 HCC 组织和癌旁组织中 miR-203a 及其靶基因表达, 比较分析不同临床病理特征 HCC 患者 miR-203a 及其靶基因表达。随访 3 年, 采用 Kaplan-Meier 法进行生存(OS)分析。**结果:** 从数据库筛选出 HCC 中 miR-203a 相关的靶基因共 10 个, 包括 APC、CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PAQR3、PRMT5 和 SOSC3。HCC 组织中 miR-203a 和 APC、PAQR3 mRNA 表达水平均显著低于癌旁组织(均 $P < 0.01$), CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PRMT5 和 SOSC3 mRNA 表达水平均显著高于癌旁组织(均 $P < 0.01$); 血清 miR-203a、HCC 组织 miR-203a 及其靶基因表达均与患者肿瘤临床分期、分化程度、肝功能分级、OS 率有关(均 $P < 0.01$)。**结论:** HCC 组织中 miR-203a 呈低表达, miR-203a 及靶基因表达均与患者肿瘤临床分期、分化程度、肝功能及远期 OS 率有关。

[关键词] 肝细胞癌; miR-203a; 靶基因; 预后

[中图分类号] R735.7; R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)04-0324-07

Expressions of miR-203a and its target genes in hepatocellular carcinoma tissues and their clinical significance

SHEN Guoqiang, GAO Yunxia, TANG Xiaoqi, ZHOU Zhihua (Laboratory Department, the Second People's Hospital of Jintan District, Changzhou 213200, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of miR-203a and its target genes in serum and tumor tissues of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and their relationships with clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods:** The target genes of miR-203a were predicted from TargetScan, miRDB and PicTar websites using bioinformatics methods, which were verified by double luciferase gene report experiment. The samples of cancer tissues and para-cancerous tissues, serum and clinical data of 96 patients with HCC whose tumors were surgically removed at the Second People's Hospital of Jintan District, Changzhou City from January 2018 to June 2019 were collected. The serum of 90 healthy people was collected as controls. The serum miR-203a level and the expressions of miR-203a and its target genes in HCC and para-cancerous tissues were detected by qPCR. The expressions of miR-203a and its target genes in HCC patients with different clinicopathological characteristics were comparatively analyzed. The patients were followed-up for 3 years and overall survival (OS) analysis was performed by Kaplan-Meier method. **Results:** A total of 10 miR-203a-related target genes were screened from databases, including adenomatous polyposis coli (APC), cyclin dependent kinase 6 (CDK6), transcription factor GATA binding protein 6 (GATA6), homeobox D3 (HOXD3), insulin-like growth factor class 1 receptor (IGF1R), insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP5), potassium intermediate small conductance calcium activated channel subfamily N, member2 (KCNE2), progesterin and adipoQ receptor 3 (PAQR3), Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) and suppressor of cytokine signaling 3 (SOSC3). The expressions of miR-203a, APC and PAQR3 mRNA in the HCC tissues were significantly lower than those in the para-cancerous tissues (all $P < 0.01$), and the expressions of CDK6, GATA6, HOXD3, IGF1R, IGFBP5, KCNE2, PRMT5 and SOSC3 mRNA were significantly higher than those in the para-cancerous tissues (all $P < 0.01$). The expressions of serum miR-203a and miR-203a and its target genes in HCC tissues were related to the clinical stage, differentiation degree, liver function grade and OS rate of the patients (all $P < 0.01$). **Conclusion:** miR-203a in HCC tissues is in low expression, and the expressions of miR-203a and target genes are related to clinical stage, differentiation, liver function and long-term OS rate.

[Key words] hepatocellular carcinoma (HCC); miR-203a; target gene; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(4): 324-330. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.04.007]

[基金项目] 国家重点研发计划“国家质量基础的共性技术研究与应用”重点专项(No. 2019YFF0216502)

[作者简介] 沈国强(1974—), 男, 学士, 副主任医师, 主要从事肝胆系统疾病的临床研究, E-mail: shenguoqiang1974@163.com

[通信作者] 沈国强, E-mail: shenguoqiang1974@163.com

肝癌是指发生于肝上皮或间叶组织的恶性肿瘤, 其中肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是肝癌的主要组织学亚型 (占原发性肝癌的 90%), 其发病率和病死率高而总生存 (OS) 率低。中国每年约有 41 万例新发肝癌患者, 位居全球发病率之首 (占全球的 49.4%)^[1]。目前, 临床上仍缺乏有效的根治手段, 因此阐明 HCC 发生发展的分子机制对于指导临床治疗十分重要。miRNA 是一类由内源基因编码的单链 RNA 分子, 长度约 22 个核苷酸, 参与转录后基因表达调控^[2-3]。miR-203a 是近年来发现的一种抑癌基因, 参与胃癌、乳腺癌等肿瘤的发生发展, 且与化疗耐药有关^[4]。有研究^[5-6]指出, miR-203a 可靶向胰岛素样生长因子结合蛋白 5 (insulin-like growth factor binding protein 5, IGFBP 5)、锌指转录因子 Slug 等基因表达参与细胞增殖、凋亡及上皮间充质转化, 从而参与肿瘤的发生; miR-203a 异常表达可参与 HCC 的发生与进展^[7-8]。目前关于 HCC 组织中 miR-203a 的靶基因及 miR-203a 在血清中的表达与意义尚未见报道。基于此, 本研究先利用生物信息学方法预测 miR-203a 的靶基因, 并检测 HCC 患者癌组织及血清 miR-203a 及其靶基因表达并分析其临床意义, 旨在为 HCC 的靶向治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取常州市金坛区第二人民医院 2018 年 1 月至 2019 年 6 月手术切除的 HCC 患者的癌和癌旁组织标本、血清及临床资料, 同时选取健康体检者的血清样本作为对照。纳入标准: (1) 患者均经病理学检查确诊为 HCC; (2) 对照组均为健康体检者。排除标准: (1) HCC 复发或其他部位原发性恶性肿瘤转移至肝者; (2) 伴有其他类型可能由 miR-203a 参与的疾病者 (如银屑病、阿尔茨海默病等); (3) 非初诊有抗肿瘤治疗史的患者; (4) 有精神、沟通或认知障碍者; (5) 有免疫缺陷疾病或近 6 个月内有免疫治疗史者; (6) 不接受跟踪随访者。本研究经医院伦理委员会审批通过 (伦理审批号: 201712-002), 所有受试者均签署知情同意书。

1.2 miR-203a 靶基因预测

利用 TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/)、miRDB (<http://www.mirdb.org/>) 和 PicTar (<https://pictar.mdc-berlin.de/>) 对 miR-203a 的靶基因进行预测, 并参照数据库预测靶点的分值结合相应靶基因功能初步确定候选靶基因。

1.3 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-203a 的靶基因

构建野生型及突变型 3' 非翻译区的报告基因质粒, 并将构建的质粒、miR-203a 模拟物 (mimic) 及其

阴性对照 (表 1) 转入人肝癌 HepG2 细胞 (上海弘顺生物科技有限公司) 中。培养 48 h 后按照双荧光素酶检测试剂盒说明书进行双荧光素酶检测, 将萤火虫荧光强度/海肾荧光强度用以评价不同处理组的相对荧光强度。实验重复 3 次。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
miR-203a	F: 5'-CTGATATGCGTAAGGCTA-3' R: 5'-AGCGCGGATGAGAGCTA-3'	208
U6	F: 5'-CTGAGATCGAGGA-3' R: 5'-AAGGGATACGCTAG-3'	180
APC	F: 5'-ATGCGTAGAGGAGAGAGCTA-3' R: 5'-TGAGATCGGCGATAGCGAGA-3'	210
CDK6	F: 5'-TGGTGGCTAGAGCTAGGAGCTCTA-3' R: 5'-TAGGATCGAGTGAGAGAGCTATAG-3'	242
GATA6	F: 5'-CGGTGAGAGCTAGAGTTCGAGA-3' R: 5'-TGGATATGCGGATAGGCGAGAG-3'	216
HOXD3	F: 5'-TGGCTGGGAGAGGTGGCTGA-3' R: 5'-TTGAAGCTAGACAGAGCTA-3'	212
IGF1R	F: 5'-TGAAGCGGATAGCTAAC-3' R: 5'-CTAGAGTCGAGAGCTAG-3'	186
IGFBP5	F: 5'-CCGGCTCGCGCGGCATA-3' R: 5'-CTAGAGATCGAGATCGAAA-3'	226
KCNE2	F: 5'-AATGCTAGATTTTGCAT-3' R: 5'-TTGAGAGGGGCGGATA-3'	182
PAQR3	F: 5'-AGGGATCGGGATCGAGG-3' R: 5'-GCGCTAGAGGCTAGAGCA-3'	190
PRMT5	F: 5'-AGAGGGAAGCGGGCTAG-3' R: 5'-CGGTTCGGATAGGCTAGC-3'	202
SOSC3	F: 5'-AGAGGCGCGCTAGAG-3' R: 5'-CGGCGCTAGAGGCGGC-3'	176
β -actin	F: 5'-CGCTGCGAGATCGA-3' R: 5'-CGATTAGCTAGAGCTA-3'	170

APC: 结肠腺瘤性息肉病基因 (adenomatous polyposis coli); CDK6: 周期蛋白依赖性激酶 6 (cyclin dependent kinase 6); GATA6: 转录因子 GATA 结合蛋白 6 (GATA binding factor 6); HOXD3: 同源异形盒-D3 (homeobox D3); IGF1R: 胰岛素样生长因子 1 类受体 (insulin-like growth factor class 1 receptor); KCNE2: 钾离子通道 2 (potassium intermediate small conductance calcium activated channel subfamily N, member 2); PAQR3: 脂联素分子受体 3 (progestin and adipoQ receptor 3); PRMT5: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 (protein arginine methyltransferase 5); SOS3: 细胞因子信号转导抑制分子 3 (suppressor of cytokine signaling 3)

1.4 qPCR 法检测 HCC 组织及血清中 miR-203a 及其靶基因 mRNA 表达水平

采用 TRIzol 试剂提取癌及癌旁组织中总 RNA, 并逆转录为互补的 cDNA。采用 SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II 试剂盒 (大连宝生物技术公司) 进行 PCR 扩增反应, 扩增体系总体积 20 μ L。引物序列见表 1 (内参

为 β -actin)。PCR反应条件:95℃ 1 min, 72℃ 45 s, 55℃ 1 min, 共35个循环, 最后55℃ 5 min。绘制溶解曲线, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。实验重复3次。

血清miR-203a检测时, HCC患者均于治疗前空腹抽取3 mL肘静脉血, 对照组抽取健康体检者3 mL肘静脉血, 经抗凝处理。800×g离心10 min, 取上清液采用qPCR法检测血清miR-203a表达, 引物序列见表1(内参为U6), 其PCR反应方法同前。

1.5 随访

所有患者均随访, 随访内容为HCC患者生存情况, 开始时间为纳入研究后, 随访时间为3年, 随访方式包括电话、门诊复查等。

1.6 统计学处理

采用SPSS22.0软件进行统计学分析。计量资料经检验符合正态分布且方差齐时以 $\bar{x}\pm s$ 表述, 以配对 t 检验本组内差异, 以独立样本 t 检验两组间差异; 计数资料采用百分率表述, 以 χ^2 检验; 采用Kaplan-Meier法进行OS率分析, 采用Log-Rank检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料

HCC组患者96例, 男性80例、女性16例, 年龄

31~75岁, 平均(55.15±8.19)岁。对照组90例, 男性76例、女性14例, 年龄30~72岁, 平均(56.25±9.30)岁。两组间性别、年龄比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$), 具有可比性。

2.2 miR-203a的靶基因预测结果

经TargetScan网站预测miR-203a的靶基因共5470个, 经miRDB网站预测miR-203a的靶基因共1686个, 经PicTar网站预测miR-203a的靶基因共1052个。结合基因库筛选HCC相关的miR-203a的靶基因主要有10个, 包括APC、CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PAQR3、PRMT5和SOSC3, 其功能主要涉及肿瘤、细胞免疫、细胞增殖与凋亡等。

双荧光素酶报告基因实验结果(表2)显示, mimic转染组人肝癌HepG2细胞中野生型miR-203a相对表达水平高于空白对照(NC)组(均 $P<0.01$), 而不同基因转染组突变型miR-203a相对表达水平与NC组比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$), NC组野生型miR-203a表达均低于突变型miR-203a表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 不同基因转染组野生型与突变型miR-203a表达差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。验证结果表明, miR-203a可靶向APC、CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PAQR3、PRMT5和SOSC3基因。

表2 人肝癌HepG2细胞中野生型和突变型miR-203a相对表达水平比较($n=3$)

分组	野生型miR-203a	突变型miR-203a	t	P
APC mimic组	0.98±0.12**	1.15±0.18	1.361	0.245
NC-APC组	0.50±0.10	1.09±0.20	4.570	0.010
CDK6 mimic组	0.97±0.11**	1.12±0.17	1.283	0.269
NC-CDK6组	0.46±0.07	1.10±0.19	5.475	0.005
GATA6 mimic组	1.01±0.17**	1.14±0.17	0.937	0.402
NC-GATA6组	0.44±0.08	1.11±0.22	4.957	0.008
HOXD3 mimic组	0.99±0.15*	1.17±0.19	1.288	0.267
NC-HOXD3组	0.48±0.09	1.12±0.21	4.852	0.008
IGF1R mimic组	0.94±0.14**	1.20±0.19	1.908	0.129
NC-IGF1R组	0.51±0.09	1.14±0.18	5.422	0.006
IGFBP5 mimic组	0.92±0.15**	1.09±0.14	1.435	0.225
NC-IGFBP5组	0.50±0.08	1.11±0.17	5.623	0.005
KCNE2 mimic组	0.99±0.15**	1.14±0.21	1.007	0.371
NC-KCNE2组	0.51±0.07	1.08±0.19	4.876	0.008
PAQR3 mimic组	0.95±0.14**	1.16±0.17	1.652	0.174
NC-PAQR3组	0.49±0.08	1.11±0.19	5.209	0.006
PRMT5 mimic组	0.98±0.16**	1.08±0.20	0.676	0.536
NC-PRMT5组	0.51±0.07	1.12±0.21	4.773	0.009
SOSC3 mimic组	1.00±0.17**	1.04±0.21	0.256	0.810
NC-SOSC3组	0.54±0.10	1.07±0.19	4.275	0.013

与NC组比较, ** $P<0.01$

2.3 HCC 组织与癌旁组织中 miR-203a 及其靶基因表达比较

HCC 组有 3 例失访, 剔除本研究。qPCR 法检测结果(表 3)显示, HCC 组织中 miR-203a 和 APC、PAQR3 mRNA 表达水平均显著低于癌旁组织(均 $P < 0.01$), CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、

KCNE2、PRMT5 和 SOSC3 mRNA 表达水平均显著高于癌旁组织(均 $P < 0.01$)。实验结果表明, HCC 组织中 miR-203a 和 APC、PAQR3 mRNA 均呈低表达, 而 CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PRMT5 和 SOSC3 mRNA 均呈高表达。

表 3 HCC 组织和癌旁组织中 miR-203a 及其靶基因表达比较

组织	N	miR-203a	APC	CDK6	GATA6	HOXD3	IGF1R	IGFBP5	KCNE2	PAQR3	PRMT5	SOSC3
HCC 组织	9	0.48±0.09	0.45±0.07	1.85±0.36	1.73±0.25	1.70±0.26	1.80±0.24	1.59±0.31	1.84±0.30	0.58±0.15	1.46±0.23	1.53±0.22
癌旁组织	9	1.01±0.20	1.05±0.22	1.02±0.20	1.01±0.22	1.08±0.24	1.02±0.21	1.00±0.20	1.02±0.23	0.98±0.21	0.96±0.20	0.99±0.20
t		20.197	25.063	19.436	8.398	16.898	23.587	15.423	20.919	14.947	15.820	17.515
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 HCC 患者血清 miR-203a 呈低表达

qPCR 法检测结果显示, HCC 患者血清 miR-203 表达水平显著低于健康体检者(0.53±0.11 vs 0.92±0.17, $t=20.257$, $P < 0.01$)。结果表明, HCC 患者血清 miR-203a 呈低表达。

2.5 不同临床病理特征 HCC 患者血清 miR-203a 和癌组织 miR-203a 及其靶基因表达比较

qPCR 法检测结果(表 4)显示, 不同性别、年龄 HCC 患者血清 miR-203 和 HCC 组织中 miR-203a 及其靶基因表达比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);

III~IV 期、未/低分化、Child-Pugh C 级患者血清 miR-203 表达与肝 HCC 组织 miR-203a、APC、PAQR3 mRNA 表达均低于 I~II 期、中/高分化、Child Pugh A+B 级患者(均 $P < 0.01$), HCC 组织中 CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PRMT5 和 SOSC3 mRNA 表达均高于 I~II 期、中/高分化、Child Pugh A+B 级患者(均 $P < 0.01$)。结果表明, HCC 组织 miR-203a 及其靶基因表达与患者临床分期、分化程度、肝功能分级均有关联。

表 4 不同临床病理特征 HCC 患者血清 miR-203a 和癌组织 miR-203a 及其靶基因表达比较

临床特征	N	miR-203a [△]	miR-203a	APC	CDK6	GATA6	HOXD3	IGF1R	IGFBP5	KCNE2	PAQR3	PRMT5	SOSC3
性别													
男性	78	0.53±0.12	0.48±0.10	0.44±0.08	1.84±0.38	1.74±0.26	1.71±0.27	1.79±0.25	1.60±0.33	1.83±0.34	0.58±0.17	1.47±0.26	1.54±0.23
女性	15	0.53±0.10	0.47±0.08	0.50±0.10	1.90±0.36	1.68±0.24	1.65±0.25	1.85±0.24	1.54±0.30	1.89±0.30	0.58±0.14	1.41±0.21	1.48±0.22
年龄/岁													
>60	35	0.55±0.13	0.46±0.08	0.43±0.08	1.87±0.42	1.75±0.28	1.73±0.30	1.82±0.26	1.61±0.32	1.86±0.35	0.58±0.16	1.48±0.22	1.56±0.27
≤60	58	0.52±0.09	0.49±0.10	0.46±0.06	1.84±0.40	1.72±0.23	1.68±0.25	1.79±0.23	1.58±0.31	1.83±0.29	0.58±0.15	1.45±0.20	1.51±0.21
临床分期													
I~II	32	0.74±0.17	0.92±0.16	0.69±0.09	1.54±0.35	1.52±0.23	1.54±0.24	1.31±0.22	1.23±0.27	1.52±0.36	0.74±0.16	1.23±0.25	1.30±0.25
III~IV	61	0.42±0.08**	0.25±0.05**	0.32±0.05**	2.01±0.46**	1.84±0.39**	1.78±0.30**	2.06±0.34**	1.78±0.35**	2.01±0.42**	0.50±0.12**	1.58±0.29**	1.65±0.31**
分化程度													
未/低分化	19	0.26±0.07**	0.20±0.04**	0.26±0.08**	3.17±0.48**	2.43±0.41**	2.48±0.33**	3.79±0.48**	2.91±0.38**	3.16±0.41**	0.42±0.13**	2.47±0.28**	2.74±0.33**
中/高分化	74	0.60±0.12	0.55±0.18	0.50±0.12	1.51±0.33	1.55±0.26	1.50±0.24	1.29±0.25	1.25±0.30	1.50±0.33	0.62±0.15	1.20±0.24	1.22±0.24
Child-Pugh 分级													
A+B	63	0.63±0.13	0.58±0.17	0.53±0.14	1.63±0.38	1.58±0.24	1.57±0.25	1.43±0.27	1.33±0.34	1.55±0.36	0.70±0.14	1.25±0.28	1.27±0.26
C	30	0.32±0.08**	0.28±0.05**	0.28±0.05**	2.31±0.42**	2.05±0.29**	1.97±0.28**	2.58±0.36**	2.14±0.28**	2.45±0.42**	0.33±0.16**	1.90±0.30**	2.08±0.29**

[△]血清 miR-203a; 与 I~II 期、中/高分化、Child Pugh A+B 级比较, ** $P < 0.01$

2.6 随访结果

3 年的随访结果发现, 93 例 HCC 患者中, 有 38 例

患者死亡, 其病死率为 40.86%, 表明 HCC 患者病死率较高。

2.7 血清 miR-203a 和 HCC 组织 miR-203a 及其靶基因表达的生存分析

qPCR 法检测结果 (图 1) 显示, HCC 组织中 CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PRMT5、SOSC3 mRNA 高表达患者的 OS 率均显著低于低表达患者 ($\chi^2=7.323、9.003、5.380、5.873、9.668、$

4.431、15.962、12.084, 均 $P<0.01$), 血清和 HCC 组织 miR-203a 及 APC、PAQR3 mRNA 低表达患者 OS 率均显著低于高表达患者 ($\chi^2=11.434、10.726、10.794、11.677$, 均 $P<0.01$)。结果表明, HCC 患者血清 miR-203a 和癌组织 miR-203a 及其靶基因表达与患者 OS 率有关。

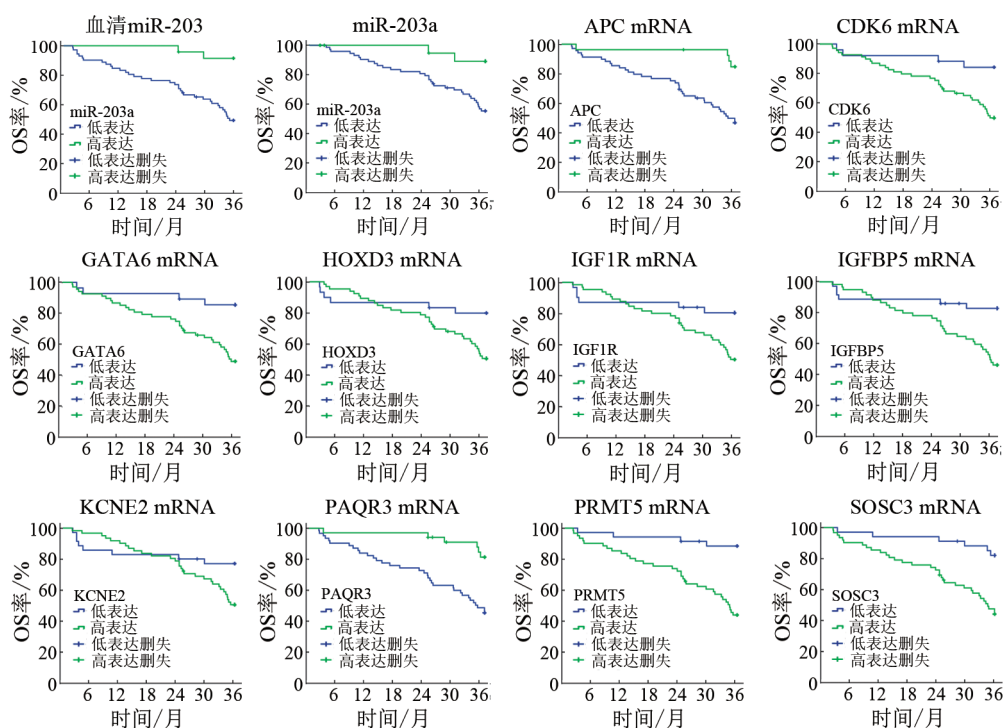


图1 HCC组织中miR-203a及其靶基因mRNA表达与患者OS率分析

3 讨论

随着医疗技术的发展,发现越来越多的miRNA在肿瘤发生与发展过程中扮演着抑癌或原癌基因的角色,其通过调控与肿瘤、细胞免疫、细胞增殖与凋亡等相关的基因转录影响蛋白质的表达,从而诱导恶性肿瘤的发生与发展^[9-11]。miR-203a是近年来发现的一种参与肝癌发生与发展的重要分子^[12],了解其靶基因表达及其临床意义对指导临床HCC靶向治疗具有至关重要的意义。

miR-203a可参与多种恶性肿瘤的发生与发展,包括肿瘤细胞增殖、转移和浸润等病理过程,在肝癌、膀胱癌、胃癌等患者中均呈低表达。本研究结果中HCC患者血清中miR-203a表达水平显著低于健康体检者,与既往SALAZAR-ROA等^[13]的研究结果相符。但在韩利蓉等^[14]的研究中发现,乳腺癌患者中miR-203a呈高表达,本研究结果与该研究结果不符,可能是因为在不同类型肿瘤中miR-203a参与疾病发生的机制不同所致。本研究预测miR-203a靶基因并

将预测结果结合基因库HCC相关的靶基因进行筛选,共发现10个关键基因,分别为APC、CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PAQR3、PRMT5和SOSC3,主要涉及细胞增殖、凋亡、免疫逃逸等病理机制,且经双荧光素酶报告基因实验验证。有研究^[15]显示,APC基因甲基化是肝癌发生的重要因素;下调CDK6表达可抑制人肝癌细胞的增殖^[16];沉默GATA6基因能够促进人肝癌细胞的凋亡^[17];HOXD3可通过调整合素亚基 $\alpha 2$ 参与HCC的发生^[18];抑制IGF1R、IGFBP5基因表达可降低肝癌细胞的增殖、侵袭与迁移等^[19];癌组织中KCNE2呈高表达,可通过抑制其表达降低癌细胞的转移潜能^[20];PAQR3为常见的抑癌基因,上调其表达可抑制肝癌细胞的增殖并促进其凋亡^[21];沉默PRMT5可抑制肝癌细胞的上皮间质转化及免疫逃逸^[22];抑制SOSC3表达可促进人肝癌HepG2细胞凋亡^[23]。本研究发现HCC组织中CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PRMT5、SOSC3表达均高于癌旁组织,而miR-203a表达及APC、PAQR3表达均低于癌旁组织,与上述报

道结果相符,也验证了miR-203a靶基因预测结果的准确性。

本研究中HCC患者的3年病死率为40.86%,且血清miR-203a表达、HCC组织中miR-203a表达及APC、CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PAQR3、PRMT5和SOSC3表达与HCC患者肿瘤临床分期、组织学分级、肝功能和远期OS率均有关。有研究^[24]发现,III~IV期、有淋巴结转移、未/低分化的乳腺癌患者血清miR-203a表达水平平均高于I~II期、无淋巴结转移、中/高分化的患者。本研究结果与上述报道不一致,可能与肿瘤类型不同有关,也可能是miR-203a参与恶性肿瘤发生的途径不同所致。但是APC、PRMT5作为抑癌基因,CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PRMT5和SOSC3作为原癌基因的结论均已在既往国内外相关报道^[25-27]中得到证实,推测miR-203a可能是通过多种途径影响HCC的发生与发展的,且很可能其抑癌的效应更强。

综上所述,HCC患者血清和癌组织中miR-203a呈低表达,且miR-203a与HCC相关的靶基因有APC、CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PAQR3、PRMT5和SOSC3等,其表达与患者肿瘤临床分期、分化程度、肝功能损害程度及远期OS率均有关。据此研究结果与上述分析结果可知,miR-203a有作为HCC治疗靶点的研究潜能,可尝试通过上调HCC组织中miR-203a表达,从而抑制CDK6、GATA6、HOXD3、IGF1R、IGFBP5、KCNE2、PRMT5和SOSC3基因的表达,上调APC、PRMT5基因的表达治疗HCC。但该设想是否能实现、如何上调HCC患者肿瘤组织中miR-203a表达水平尚未可知,后续仍需要深入研究。

[参考文献]

- [1] 杨帆,曹毛毛,李贺,等.1990—2019年中国人群肝癌流行病学趋势分析及预测[J].中华消化外科杂志,2022,21(1):106-113. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20211203-00616.
- [2] XIAO Y Y, WANG H Z, WANG C, *et al.* MiR-203 promotes HaCaT cell over proliferation through targeting LXR- α and PPAR- Γ [J/OL]. Cell Cycle, 2020, 19(15): 1928-1940[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7469443/>. DOI: 10.1080/15384101.2020.1783934.
- [3] YUAN W, SUN H, YU L. Long non-coding RNA LINC01116 accelerates the progression of keloid formation by regulating miR-203/SMAD5 axis[J]. Burns, 2021, 47(3): 665-675. DOI: 10.1016/j.burns.2020.07.027.
- [4] NIU S Z, XIANG F, JIA H H. Downregulation of lncRNA XIST promotes proliferation and differentiation, limits apoptosis of osteoblasts through regulating miR-203-3p/ZFPM2 axis[J]. Connect Tissue Res, 2021, 62(4): 381-392. DOI: 10.1080/03008207.2020.1752200.
- [5] NASSAR F J, MSHEIK Z S, ITANI M M, *et al.* Circulating miRNA as biomarkers for colorectal cancer diagnosis and liver metastasis [J/OL]. Diagnostics (Basel), 2021, 11(2): 341[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7921943/>. DOI: 10.3390/diagnostics11020341.
- [6] GUPTA N, KUMAR R, SETH T, *et al.* Targeting of stromal versican by miR-144/199 inhibits multiple myeloma by downregulating FAK/STAT3 signalling[J]. RNA Biol, 2020, 17(1): 98-111. DOI: 10.1080/15476286.2019.1669405.
- [7] WANG L M, TONG D D, GUO Q Q, *et al.* HOXD3 targeted by miR-203a suppresses cell metastasis and angiogenesis through VEGFR in human hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2431[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5799159/>. DOI: 10.1038/s41598-018-20859-3.
- [8] WEI Z T, WENG S Y, WANG L, *et al.* Mechanism of *Astragalus* polysaccharides in attenuating insulin resistance in Rats with type 2 diabetes mellitus via the regulation of liver microRNA-203a-3p[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 1617-1624. DOI: 10.3892/mmr.2017.8084.
- [9] CAO W, CHEN H D, YU Y W, *et al.* Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J/OL]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8104205/>. DOI: 10.1097/CM9.0000000000001474.
- [10] KUDO Y, SUGIMOTO M, ARIAS E, *et al.* PKC λ /i loss induces autophagy, oxidative phosphorylation, and NRF2 to promote liver cancer progression[J/OL]. Cancer Cell, 2020, 38(2): 247-262.e11[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7423690/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.05.018.
- [11] 钱程,于益芝.创新与联合:肿瘤免疫细胞因子综合治疗的最佳组合的迭代与探索[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2022,29(3):167-174. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.001.
- [12] GIANNELLI G, SANTORO A, KELLEY R K, *et al.* Biomarkers and overall survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with TGF- β R1 inhibitor galunisertib[J/OL]. PLoS One, 2020, 15(3): e0222259[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7094874/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0222259.
- [13] SALAZAR-ROA M, TRAKALA M, ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ M, *et al.* Transient exposure to miR-203 enhances the differentiation capacity of established pluripotent stem cells[J/OL]. EMBO J, 2020, 39(16): e104324[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7429746/>. DOI: 10.15252/embj.2019104324.
- [14] 韩利蓉,宋江勤,郭飞波,等.MiR-203a靶向及其靶基因对乳腺癌淋巴结转移的影响[J].中国应用生理学杂志,2020,36(6):600-604. DOI: 10.12047/j.cjap.6041.2020.126.
- [15] NISHINO K, KAWANAKA M, SUEHIRO M, *et al.* Gastric hyperplastic polyps after argon plasma coagulation for gastric antral vascular ectasia in patients with liver cirrhosis: a case suggesting the "gastrin link theory"[J/OL]. Intern Med, 2021, 60(7): 1019-1025[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8079916/>. DOI: 10.2169/internalmedicine.5837-20.
- [16] 祖珊珊.微小核糖核酸let-7c对肝癌细胞增殖的影响及其靶基因分析[J].中国基层医药,2020,27(12):1418-1421. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-6706.2020.12.003.
- [17] 李群英,甄时建.GATA6 siRNA对肝癌HCC-9204细胞自噬和周

- 期的影响及机制研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2021, 24(10): 762-767. DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2021.10.002.
- [18] WANG L M, GAO Y, ZHAO X G, *et al.* HOXD3 was negatively regulated by YY1 recruiting HDAC1 to suppress progression of hepatocellular carcinoma cells *via* ITGA2 pathway[J/OL]. *Cell Prolif*, 2020, 53(8): e12835[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7445403/>. DOI: 10.1111/cpr.12835.
- [19] 杨桢桢, 高国伟, 楚蕾蕾, 等. 棟酰胺介导 IGF1R 对 HepG2 肝癌细胞的抗肿瘤活性[J]. 解剖学研究, 2021, 43(2): 143-147.
- [20] 张海生, 黄河, 徐震. 微小 RNA-203a-3p 下调 Mink 相关肽 1 基因表达抑制非小细胞肺癌细胞转移潜能的实验研究[J]. 安徽医药, 2021, 25(10): 2080-2085. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.040.
- [21] HINZE C, KARAIKOS N, BOLTENGAGEN A, *et al.* Kidney single-cell transcriptomes predict spatial corticomedullary gene expression and tissue osmolality gradients[J/OL]. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32(2): 291-306[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8054904/>. DOI: 10.1681/ASN.2020070930.
- [22] 周健, 陈雪健, 王伟, 等. 沉默 PRMT5 基因对人肝癌细胞生物学行为的影响[J]. 实用肿瘤学杂志, 2020, 34(3): 208-213. DOI: 10.11904/j.issn.1002-3070.2020.03.004.
- [23] 潘志生, 许志臻, 陈苓曦, 等. 菊苣酸在 HepG2 细胞中对 SOSC3 表达的调节作用[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2012, 29(6): 75-79. DOI: 10.11721/cqnuj20120617.
- [24] BOZKURT S B, OZTURK B, KOCAK N, *et al.* Differences of time-dependent microRNA expressions in breast cancer cells[J/OL]. *Noncoding RNA Res*, 2021, 6(1): 15-22[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7770513/>. DOI: 10.1016/j.nrna.2020.12.001.
- [25] MUHAMMAD J S, BAJBOUJ K, SHAFARIN J, *et al.* Estrogen-induced epigenetic silencing of *FTH1* and *TFRC* genes reduces liver cancer cell growth and survival[J/OL]. *Epigenetics*, 2020, 15(12): 1302-1318[2022-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7678938/>. DOI: 10.1080/15592294.2020.1770917.
- [26] HEINRICH S, CRAIG A J, MA L C, *et al.* Understanding tumour cell heterogeneity and its implication for immunotherapy in liver cancer using single-cell analysis[J]. *J Hepatol*, 2021, 74(3): 700-715. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.11.036.
- [27] 陈挺芳, 冯淑芬, 施颖, 等. IGF-1R-Stat3 信号通路通过激活中期因子表达促进肝癌细胞活力、迁移和侵袭[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(7): 1207-1214. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2020.07.008.

[收稿日期] 2022-12-26

[修回日期] 2023-03-10

[本文编辑] 党瑞山