

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220648

· 短篇论著 ·

血清 7 种微 RNA 单独或联合甲胎蛋白检测对肝细胞癌的诊断价值

张敬磊, 沈强, 王能, 盛月红, 钱国军, 陆正华*

海军军医大学(第二军医大学)第三附属医院超声介入科, 上海 200438

[摘要] **目的** 分析血清 7 种 miRNA (7miRNAs, 包括 miRNA-122、miRNA-192、miRNA-21、miRNA-223、miRNA-26a、miRNA-27a 和 miRNA-801) 单独或联合甲胎蛋白 (AFP) 检测对肝细胞癌 (HCC) 的诊断价值。**方法** 选择 2021 年 1 月至 2021 年 6 月我院收治的 249 例患者为研究对象, 其中 163 例为确诊的 HCC 患者 (HCC 组)、86 例为非 HCC 患者 (非 HCC 组)。检测两组患者血清 7miRNAs 和 AFP 水平, 根据临床既定标准 (7miRNAs ≥ -0.5 和 / 或 AFP ≥ 20 ng/mL 为阳性) 计算 2 个指标单独和联合检测诊断 HCC 的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。运用 ROC 曲线分析 2 个指标单独及联合检测对 HCC 的诊断价值。**结果** 在 249 例患者中, HCC 组患者的 7miRNAs 和 AFP 水平均高于非 HCC 组患者, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。血清 7miRNAs、AFP 和两者联合检测诊断 HCC 的灵敏度分别为 75.46%、57.06% 和 87.12%, 特异度分别为 74.42%、94.19% 和 69.77%, 阳性预测值分别为 84.83%、94.90% 和 84.52%, 阴性预测值分别为 61.54%、53.64% 和 74.07%, AUC 分别为 0.787、0.819 和 0.864。**结论** 血清 7miRNAs 和 AFP 联合检测对 HCC 的诊断效能优于 AFP 单独检测, 有更高的诊断价值。

[关键词] 肝细胞癌; 甲胎蛋白; 7 种微 RNA; 诊断价值**[中图分类号]** R 735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 2097-1338(2023)05-0636-04

Values of serum 7 microRNAs alone or in combination with α -fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma

ZHANG Jing-lei, SHEN Qiang, WANG Neng, SHENG Yue-hong, QIAN Guo-jun, LU Zheng-hua*

Department of Ultrasonic Intervention, The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To analyze the roles of serum 7 microRNAs (7miRNAs, including miRNA-122, miRNA-192, miRNA-21, miRNA-223, miRNA-26a, miRNA-27a, and miRNA-801) alone or in combination with α -fetoprotein (AFP) in diagnosing hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A total of 249 patients who were admitted to our hospital from Jan. 2021 to Jun. 2021 were enrolled, including 163 patients with confirmed HCC (HCC group) and 86 patients without HCC (non-HCC group). The serum levels of 7miRNAs and AFP were measured in the 2 groups, and based on the established clinical criteria (7miRNAs ≥ -0.5 and/or AFP ≥ 20 ng/mL were positive), the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the 2 indicators were calculated for the diagnosis of HCC alone and in combination. The receiver operating characteristic curve was used to analyze the diagnostic value of the 2 indicators used alone or in combination for HCC. **Results** Among 249 patients, the levels of 7miRNAs and AFP in the HCC group were significantly higher than those in the non-HCC group (both $P < 0.01$). The sensitivities of serum 7miRNAs, AFP and their combination were 75.46%, 57.06% and 87.12% for the diagnosis of HCC, respectively; the specificities were 74.42%, 94.19% and 69.77%, respectively; the positive predictive values were 84.83%, 94.90% and 84.52%, respectively; the negative predictive values were 61.54%, 53.64% and 74.07%, respectively; and the area under curve values were 0.787, 0.819 and 0.864, respectively. **Conclusion** The combined detection of serum 7miRNAs and AFP has higher diagnostic value than that of AFP used alone for HCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma; α -fetoprotein; 7 microRNAs; diagnostic value

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(5): 636-639]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌的主要组织学亚型, 占原发性肝癌的

90%, 是全球最常见的癌症之一, 也是癌症相关死亡的第三大原因^[1]。HCC 最常用的生物学标志物

[收稿日期] 2022-08-03 [接受日期] 2022-11-14

[基金项目] 国家科技重大专项 (2012ZX10002016003003)。Supported by National Science and Technology Major Project (2012ZX10002016003003)。

[作者简介] 张敬磊, 硕士, 主治医师。E-mail: zhangjinglei2008@126.com

*通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81875162, E-mail: lu_zhenghua@126.com

是血清甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP)^[2], 然而 AFP 在某些特定情形中的使用一直存在争议, 特别是在治疗反应监测和诊断方面^[3]。建立一种有效且可靠的肝癌诊断方法将在改善肝癌患者预后方面发挥关键作用。

miRNA 与肿瘤发生和转移相关^[4]。研究表明, HCC 和非肿瘤组织中的 miRNA 表达谱有显著差异。《原发性肝癌诊疗指南 (2022 年版)》指出, 血浆游离 miRNA 可以作为肝癌早期诊断标志物, 特别是对于血清 AFP 阴性人群^[5]。有研究者构建了联合检测 7 种 miRNA (miRNA-122、miRNA-192、miRNA-21、miRNA-223、miRNA-26a、miRNA-27a 和 miRNA-801) 表达的 logistic 回归模型 (7miRNAs), 并通过 ROC 曲线分析得出 7miRNAs 对于肝癌的早期诊断有较好的临床价值^[6]。之后, 有生物公司制作了 7miRNAs 的 HCC 诊断试剂盒, 方便了它在临床中应用。然而, 目前尚缺乏临床应用的数据分析, 也缺乏与 AFP 的对比研究。我院尝试将 7miRNAs 检测试剂盒用于 HCC 诊断, 本研究对血清 7miRNAs 和 AFP 进行联合检测, 探讨 7miRNAs 在 HCC 临床诊断中的应用价值, 从而为 HCC 的诊断提供更多依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选择 2021 年 1 月至 2021 年 6 月在我院就诊的 HCC 和非 HCC 患者为研究对象, 对其病例资料进行回顾性分析。HCC 组纳入标准: (1) 肝穿刺活检或切除术后病理检查诊断为 HCC; (2) 同期 CT 或 MRI 动态增强检查显示肝脏占位性病变在动脉期有快速不均质血管强化, 静脉期或延迟期快速消退; (3) 乙型肝炎或丙型肝炎相关性肝癌。非 HCC 组纳入标准: 临床诊断或病理诊断为 HBV 携带者、肝硬化、胆结石、肝囊肿、肝脓肿、肝血管瘤、肝局灶结节增生或其他肿瘤性病变的非 HCC 患者。排除标准: (1) 婴幼儿患者; (2) 妊娠期及哺乳期患者; (3) 生殖腺胚胎源性肿瘤患者。共纳入符合条件的 249 例患者, 所有患者均有明确的诊断结果。本研究通过我院医学伦理委员会审批。

1.2 研究方法与观察指标 所有入组病例均在评估入院后次日空腹采集静脉血, 室温静置 15~30 min, 以 3 000 r/min (离心半径为 10 cm) 离心 10 min, 分离血清, 保存于 -20℃ 冰箱待测。

采用骏实生物科技 (上海) 有限公司生产的 7 种 miRNA 检测试剂盒 (PCR 荧光探针法) 于体外半定量检测人血浆中 7 种 miRNA (miRNA-21、miRNA-26a、miRNA-27a、miRNA-122、miRNA-192、miRNA-223、miRNA-801)。首先使用纳米磁珠的特异捕获和 qPCR 技术完成 7 种 miRNA 的量化检测, 然后利用 logistic 回归模型, 通过非参数检验对 7 种 miRNA 的检测结果进行综合分析得出联合检测结果 (7miRNAs)。采用瑞士罗氏公司生产的 Cobase601 全自动电化学发光免疫分析仪检测 AFP 水平, 所用校准品、质控品、试剂均由瑞士罗氏公司提供。检测过程中严格按照说明书操作, 质控品的测定值均在要求范围内。遵从临床工作中的检验标准, 分别以 7miRNAs ≥ -0.5 和 AFP ≥ 20 ng/mL 为阳性。联合诊断 HCC 时, 7miRNAs 和 AFP 中任意 1 个指标阳性即判断为阳性, 两者皆为阴性即判断为阴性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 20.1 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 呈偏态分布的计量资料以中位数 (极差) 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验; 计数资料以例数和百分数表示, 两组间比较采用 χ^2 检验。以临床诊断结果或病理结果为金标准, 计算 7miRNAs、AFP 及两者联合检测诊断 HCC 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。绘制 7miRNAs、AFP 及两者联合检测诊断 HCC 的 ROC 曲线, 计算 AUC。在 AUC > 0.5 的情况下, AUC 越接近于 1 说明诊断效果越好。所有检验均为双侧检验, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 两组患者基本资料 249 例患者中 HCC 组 163 例, 男 139 例、女 24 例, 年龄为 33~87 (57.68 \pm 10.91) 岁; 非 HCC 组 86 例, 男 47 例、女 39 例, 年龄为 20~87 (57.33 \pm 12.35) 岁。两组患者年龄差异无统计学意义 ($t=0.23$, $P=0.26$); HCC 组女性患者比例低于非 HCC 组, 差异有统计学意义 ($\chi^2=27.94$, $P<0.01$)。

2.2 两组患者血清 7miRNAs 和 AFP 水平 HCC 组患者的 7miRNAs 高于非 HCC 组 [-0.18 (3.12) vs -0.31 (3.01)], 差异有统计学意义 ($U=11\ 035.50$, $P<0.01$)。HCC 组 AFP 水平高于非 HCC 组 [(398.36 \pm 40.17) ng/mL vs (10.62 \pm 4.18)]

ng/mL], 差异有统计学意义 ($t=6.99, P<0.01$)。

2.3 血清 7miRNAs 和 AFP 在 HCC 与非 HCC 患者中的分布 HCC 患者中 123 例 7miRNAs 阳性、40 例 7miRNAs 阴性, 93 例 AFP 阳性、70 例 AFP 阴性; 非 HCC 患者中 22 例 7miRNAs 阳性、64 例 7miRNAs 阴性, 5 例 AFP 阳性、81 例 AFP 阴性。按照联合诊断标准, HCC 患者中, 有 142 例联合诊断为阳性, 21 例联合诊断为阴性; 非 HCC 患者中, 有 26 例联合诊断为阳性, 60 例联合诊断为阴性。AFP 检测阴性的 70 例 HCC 患者中 49 例 (70.00%) 7miRNAs 阳性。

2.4 血清 7miRNAs、AFP 单独及联合检测对 HCC 的诊断价值 7miRNAs、AFP 和两者联合检测的灵敏度分别为 75.46% (123/163)、57.06% (93/163) 和 87.12% (142/163), 特异度分别为 74.42% (64/86)、94.19% (81/86) 和 69.77% (60/86), 阳性预测值分别为 84.83% (123/145)、94.90% (93/98) 和 84.52% (142/168), 阴性预测值分别为 61.54% (64/104)、53.64% (81/151) 和 74.07% (60/81)。

ROC 曲线分析 (图 1) 显示, 7miRNAs、AFP 单独检测和两者联合检测诊断 HCC 的 AUC 分别为 0.787、0.819 和 0.864。结果说明 7miRNAs 和 AFP 联合检测的诊断效能最高, 7miRNAs 对 HCC 的诊断效能略逊于 AFP, 但 $AUC>0.7$, 对 HCC 诊断仍有一定的临床价值。

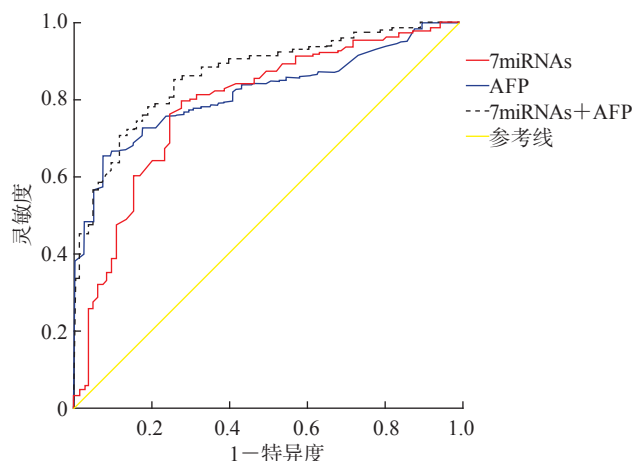


图 1 7miRNAs、AFP 和两者联合检测诊断肝细胞癌在接受者操作特征曲线

7miRNAs 为 7 种 miRNA (miRNA-122、miRNA-192、miRNA-21、miRNA-223、miRNA-26a、miRNA-27a、miRNA-801) 联合检测模型。miRNA: 微 RNA; AFP: 甲胎蛋白。

3 讨论

CT 或 MRI 检查对肝癌的诊断较为准确, 但费用相对较高, 而肝穿刺活检有创且有一定的手术风险, 均不适合 HCC 的普遍性筛查。血液肿瘤标志物的检测简单、便捷, 成为肿瘤筛查的首选方法之一, AFP 就是 HCC 筛查、诊断最重要的肿瘤标志物之一。但是, 对于有 HCC 高危因素的患者, AFP 检测的判断效果不够理想, 有 30%~40% 的 HCC 患者 AFP 水平正常; 同时 AFP 也可能因非肿瘤相关因素如慢性病毒性肝炎、肝硬化、转移性肝癌等而升高, 导致 AFP (临界值为 20 ng/mL) 诊断 HCC 的灵敏度仅为 58%~68%^[7-8]。此外, AFP 对于小肝癌 (直径 < 5 cm) 的诊断特别不灵敏, 其小肝癌中的阳性率仅为 25%^[9]。AFP 单项检测无法满足 HCC 的诊断需求^[10], 因此需要寻找新的血液肿瘤标志物, 以提高 HCC 的诊断效率。

血清中存在大量稳定表达的 miRNA^[11], 研究报告血清 miRNA-16、miRNA-122、miRNA-21、miRNA-223、miRNA-25、miRNA-375 和 let-7f 等 miRNA 在肝癌患者、乙型肝炎患者和健康人中存在差异表达^[12-14]。但这些报道都有其局限性, 如筛选的 miRNA 数量有限、样本量小、无法区分 HCC 和乙型肝炎、缺乏独立验证等。Zhou 等^[6]的研究报道弥补了以往研究的不足, 科学地鉴定了 7miRNAs 对 HCC 的诊断准确度。7miRNAs 联合诊断 HCC 的灵敏度和特异度分别为 86.1% 和 76.8%, 对 AFP 阴性 HCC 的灵敏度和特异度分别为 77.7% 和 84.5%。此外, 无论 HCC 疾病状态如何, 7miRNAs 的诊断性能均能令人满意 (巴塞罗那临床肝癌分期 0、A、B 和 C 期的 AUC 分别为 0.888、0.888、0.901 和 0.881), 还可以很好地区分 HCC 患者与健康人、慢性乙型肝炎患者和肝硬化患者 (AUC 分别为 0.941、0.842、0.884)。

研究表明, AFP 和其他肿瘤标志物联合检测对原发性肝癌的检出率常高于 AFP 单独检测, 并且单指标检测对疾病的诊断和鉴别诊断仍存在很大的缺陷, 因此联合检测可作为提高诊断效能的重要手段^[15]。本研究结果显示, HCC 组患者的血清 7miRNAs 和 AFP 水平均高于非 HCC 组患者。在 249 例患者中, 7miRNAs 诊断 HCC 的灵敏度为 75.46%, 高于 AFP (57.06%); 7miRNAs 的特异

度为74.42%，低于AFP（94.19%）。ROC曲线分析显示，7miRNAs和AFP诊断HCC的AUC分别为0.787和0.819，两者联合检测的AUC为0.864，提示2项指标单独和联合分析对HCC的诊断均有一定的临床价值，且两者联合检测的诊断效能更高。

综上所述，血清7miRNAs和AFP联合检测对HCC的诊断效能优于AFP单独检测，对HCC具有更高的诊断价值。

[参考文献]

- [1] NAULT J C, GALLE P R, MARQUARDT J U. The role of molecular enrichment on future therapies in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2018, 69: 237-247.
- [2] FORCE M, PARK G, CHALIKONDA D, ROTH C, COHEN M, HALEGOUA-DEMARZIO D, et al. Alpha-fetoprotein (AFP) and AFP-L3 is most useful in detection of recurrence of hepatocellular carcinoma in patients after tumor ablation and with low AFP level[J/OL]. *Viruses*, 2022, 14: 775. DOI: 10.3390/v14040775.
- [3] GALLE P R, FOERSTER F, KUDO M, CHAN S L, LLOVET J M, QIN S K, et al. Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2019, 39: 2214-2229.
- [4] GARZON R, FABBRI M, CIMMINO A, CALIN G A, CROCE C M. microRNA expression and function in cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12: 580-587.
- [5] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38: 288-303.
- [6] ZHOU J, YU L, GAO X, HU J, WANG J P, DAI Z, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 4781-4788.
- [7] MARRERO J A, FENG Z D, WANG Y H, NGUYEN M H, BEFELER A S, ROBERTS L R, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2009, 137: 110-118.
- [8] LOK A S, STERLING R K, EVERHART J E, WRIGHT E C, HOEFS J C, DI BISCEGLIE A M, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138: 493-502.
- [9] 孙明辉, 刘龙, 杨瑞萍, 雷旭, 刘艳清, 陈泽芳, 等. 异常凝血酶原联合甲胎蛋白检测在HBV相关肝细胞癌中的诊断价值[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2018, 10: 1-6.
- [10] TSUCHIYA N, SAWADA Y, ENDO I, SAITO K, UEMURA Y, NAKATSURA T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 10573-10583.
- [11] MITCHELL P S, PARKIN R K, KROH E M, FRITZ B R, WYMAN S K, POGOSOVA-AGADJANYAN E L, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 10513-10518.
- [12] LI L M, HU Z B, ZHOU Z X, CHEN X, LIU F Y, ZHANG J F, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 9798-9807.
- [13] QU K Z, ZHANG K, LI H R, AFDHAL N H, ALBITAR M. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45: 355-360.
- [14] XU J, WU C, CHE X, WANG L, YU D K, ZHANG T W, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis[J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50: 136-142.
- [15] 邹珍珍, 王坤, 何璐, 严敬宇, 高致远. 异常凝血酶原和甲胎蛋白联合检测在原发性肝癌中的临床价值[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16: 1771-1773.

[本文编辑] 杨亚红