

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.05.010

· 临床研究 ·

miR-451 抑制肝癌 HepG2 细胞增殖及其在肝癌诊断和预后中的作用

徐品¹, 卢梦璇^{1a}, 康凯夫², 曾柳燕¹, 黎华辉¹, 叶才果¹, 何志巍¹ (1. 广东医科大学 广东省医学分子诊断重点实验室 中美肿瘤研究所, 广东 东莞 523808; 2. 广东省佛山市顺德区人民医院 病理科, 广东 佛山 528000)

[摘要] **目的:** 寻找用于肝癌诊断的 miRNA 分子靶标, 探讨其在肝癌细胞增殖及细胞周期中的作用及其机制。 **方法:** 通过对 TCGA 数据库中 377 例肝癌样本和 37 例癌旁样本的 miRNAs 表达数据资料进行统计分析, 得到一组包含 33 个差异表达的 miRNA。对差异表达的 miRNA 采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)和 Kaplan-Meier 生存分析进行进一步的筛选, 同时结合现有文献最终选择 miR-451 作为研究目标。向人肝癌细胞株 HepG2 转染 pLVX-shRNA2-miR-451, 使之过表达 miR-451, 通过 CCK-8 细胞增殖实验检测其对 HepG2 细胞增殖能力的影响, 用流式细胞术观察对 HepG2 细胞细胞周期的影响。 **结果:** miR-451 在肝癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织[(473.40±390.24) vs (1 990.47±2 118.04), $P<0.05$], 且可以作为肝癌诊断的标志物, ROC 值为 0.91(敏感度 0.89, 特异性 0.87)。体外实验结果表明, 过表达 miR-451 后肝癌 HepG2 细胞增殖能力明显降低[48 h: (0.69±0.04) vs (1.08±0.05); 72 h: (0.76±0.07) vs (1.52±0.02)]; 均 $P<0.01$], 大量细胞被阻滞于 S 期($P<0.05$)。 **结论:** miR-451 不但可以作为诊断肝癌和指示预后的生物标志物, 还具有抑制肝癌细胞增殖的作用。

[关键词] miR-451; 肝癌; 细胞增殖; 细胞周期; 诊断; 预后; TCGA 数据库

[中图分类号] R735.7; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)05-0497-06

Inhibitory effect of miR-451 on proliferation of hepatic carcinoma HepG2 cells and its prospect in hepatic carcinoma diagnosis and prognosis

XU Pin¹, LU Mengxuan^{1a}, KANG Kaifu², ZENG Liuyan¹, LI Huahui¹, YE Caiguo¹, HE Zhiwei¹ (1. Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics of Guangdong Province, China-American Cancer Research Institute, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China; 2. Department of Pathology, the First People's Hospital of Shunde District, Foshan 528300, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mRNA molecular targets for diagnosis of hepatic carcinoma and to investigate their functional roles in proliferation and cell cycle of hepatic cancer cells. **Methods:** Based on the statistical analysis of miRNA expression data from 377 hepatic carcinoma samples and 37 adjacent non-cancerous samples in TCGA database, a group of 33 differentially expressed miRNAs were identified. A further screen of these differentially expressed miRNAs was performed using the receiver operating characteristic curve (ROC curve) and Kaplan-Meier survival analysis; and with referring to the current publications, miR-451 was screened as the study subject. HepG2 cells were transfected with pLVX-shRNA2-miR-451 to over-express miR-451. The effect of miR-451 over-expression on the proliferation of HepG2 cell was determined by CCK-8 assay; while the effect on cell cycles was detected by flow cytometry. **Results:** The expression of miR-451 in the adjacent non-cancerous tissues was significantly lower than that in cancer tissues [(473.40±390.24) vs [1 990.47±2 118.04], $P<0.05$]. MiR-451 could be used as an early diagnostic biomarker of hepatic carcinoma, with a high ROC value of 0.91 (sensitivity 0.89, specificity 0.87). The results of *in vitro* experiments showed that the proliferation of HepG2 cells was significantly decreased after miR-451 over-expression (48 h: [0.69±0.04] vs [1.08±0.05]; 72 h: [0.76±0.07] vs [1.52±0.02]; all $P<0.01$), and a large number of cells were blocked in S phase($P<0.05$). **Conclusion:** miR-451 has the potential to be used as a biomarker for hepatic carcinoma diagnosis and prognosis; moreover, it also exhibits the inhibitory effect on proliferation of hepatic cancer cells.

[Key words] miR-451; hepatic carcinoma; cell proliferation; cell cycle; diagnosis; prognosis; TCGA database

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(5): 497-502. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.010]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81572782)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81572782)

[作者简介] 徐品(1991-), 男, 硕士生, 主要从事肝癌诊治中 miRNA 作用的研究, E-mail: lorever@163.com; 卢梦璇(1992-), 女, 硕士, 主要从事肝癌诊治中 miRNA 作用的研究, E-mail: 282657019@qq.com。Δ为共同第一作者

[通信作者] 何志巍(HE Zhiwei, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤发病机制及临床的研究, E-mail: zhiweihe688@yahoo.com; 叶才果(YE Caiguo, co-corresponding author), 博士, 助理研究员, 主要从事肝癌发病机制及生物治疗的研究, E-mail: yecaiguo@gdmu.edu.cn

2012年全球肝癌新发确诊病例为782 500例,病死745 500例,而其中中国就占到大约50%,中国的肝癌发病率和病死率均居世界首位^[1]。目前肝癌的早期筛查仍然借助于肝超声和AFP。肝超声检测肝癌的灵敏度为65%、特异性为90%^[2],是目前较为经济合适的选择。AFP作为肝癌早期筛查指标已有40多年历史,其灵敏度为60%~80%、特异性70%~90%^[3],作为肝癌早期检测并非绝对可信,其数值升高还普遍见于肝慢性炎症,而非肝癌特异性。在肝癌诊断方面,研究者^[4-5]在人循环血液中检测到miRNA的存在,并大胆推测miRNA将会是肝癌早期诊断和治疗的非常有前景的分子靶标。早期研究^[6]报道,miR-21区分肝癌患者与慢性肝炎患者及正常对照的敏感性达87.3%、特异性达92.0%。miR-375区分肝癌患者和健康者的特异性高达96%,而敏感性几乎达到100%(ROC值为0.96)^[7]。上述研究显示出miRNA作为诊断标志物具有非常好的前景。本研究在检索数据库并在大样本数据分析的基础上,筛选出一组差异表达miRNA,通过在肝癌细胞HepG2中过表达miR-451的方法,进一步探讨miR-451对HepG2细胞增殖和细胞周期的影响。

1 资料与方法

1.1 细胞株、主要试剂与仪器

人肝癌细胞株HepG2由广东医科大学中美肿瘤研究所提供。DMEM培养基和胎牛血清购自GIBCO公司,胰蛋白酶购自吉诺生物医药公司,JetPEI转染试剂购自Polyplus公司,Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自日本同仁株式会社化学研究所,碘化丙啶(PI)、核糖核酸酶(RNase A)购自Solarbio公司,反转录PCR和RT-qPCR的试剂均购自Promega公司,U6内参引物购自广州锐博生物科技有限公司,细胞周期检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。miR-451引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 肝癌基因数据组的采集

癌症基因组图谱(TCGA)数据(TCGA cohort)源自TCGA数据库(<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>),其中包含377例肝癌组织样本(包括37例配对的癌和癌旁组织样本),对多达1 042种miRNAs的表达谱进行数据分析。排除缺少后续随访生存数据的样本后,有334例样本被用于统计分析。

1.3 细胞培养

HepG2从液氮中取出后在37℃的超纯水中摇晃解冻,将细胞悬液吸入到盛有5 ml培养基的15 ml离心管中,800×g离心4 min后弃去上清,再加入3 ml含10%胎牛血清的DMEM培养基轻吹打重悬,吸取细

胞悬液置于6 cm皿中,置于37℃、5%CO₂的恒温细胞培养箱中培养。于倒置显微镜下观察细胞生长情况,1~2 d后用胰酶消化、传代培养,取生长状态良好的细胞用于后续实验。

1.4 HepG2细胞转染miR-451过表达载体

实验用慢病毒pLVX-shRNA2表达载体构建miRNA过表达载体。将miR-451的序列与空载体组合构建pLVX-shRNA2-miR-451重组质粒。采用Jet-PEI试剂对细胞进行瞬转处理,实验组转染pLVX-shRNA2-miR-451重组质粒,对照组转染pLVX-shRNA2质粒空载体,转染试剂用量参照JetPEI转染试剂说明书。分别于转染后24、48和96 h时于荧光显微镜下检测转染效率。

1.5 qPCR法检测转染pLVX-shRNA2-miR-451过表达载体对HepG2细胞miR-451表达的影响

将HepG2细胞按 4×10^5 /孔铺板种于6孔板,细胞贴壁后进行转染。于转染后48 h,根据TRIzol说明书提取RNA,反转录为cDNA,放入定量PCR仪扩增检测,反应程序为:94℃ 10 min;94℃ 40 s,60℃ 50 s,40个循环。选择U6作为内参基因检测miR-451相对表达量,计算方法为 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct值为循环数, $\Delta Ct = Ct_{待测} - Ct_{U6}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{样本} - Ct_{空载}$)。实验重复3次。miR-451引物序列:反转录引物为5'-GTCGTATC-CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCTCA-3';上游为5'-AAACCGTTACCAT-TACTGAGTT-3';下游为5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。

1.6 CCK-8细胞增殖实验检测miR-451过表达对HepG2细胞增殖的影响

将HepG2细胞按 1×10^5 /孔铺板种于24孔板,细胞贴壁后进行转染。转染后24 h用胰酶消化后的HepG2细胞按 5×10^3 /孔铺96孔板,置于CO₂培养箱中分别培养24、48 h(分别为转染后的48和72 h),终止培养前1 h,吸出原培养基,加入含10% CCK-8的培养基100 μl,继续在细胞培养箱中培养2 h,于酶标仪上检测在450 nm波长处各孔光密度(D)值。实验重复3次。

1.7 流式细胞术检测miR-451过表达对HepG2细胞周期的影响

将HepG2细胞按 4×10^5 /孔铺板种于6孔板,细胞贴壁后进行转染。转染后24和48 h分别用不含EDTA的胰酶消化,并收集细胞,离心,弃上清液,以75%乙醇固定过夜,第2天离心,弃上清液,用PBS洗2遍后,加入PI 100 μg/ml和RNase A 100 μg/ml的染色液400 μl,室温避光染色30 min,以流式细胞仪检测细胞周期的变化。实验重复3次。

1.8 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计学软件对实验数据进行分析,并用 Graph pad 5.0 软件作图。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;miRNA 表达差异性分析用 Student *t* 检验;用受试者工作曲线(ROC)方法分析 miRNA 对于肝癌诊断的准确性和特异性;用 Kaplan-Meier(K-M)生存分析评价 miRNA 对肝癌患者生存和预后的作用。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 33 种 miRNA 的差异表达标签可有效区分出肝癌和非癌组织

通过对 TCGA 数据进行分析,发现其中 207 种

miRNA 在肝癌和非肝癌组织中表达存在着显著差异 ($P<0.05$)。在运用 Multi Experiment Viewer v4.2 软件对这些配对的样本数据进行类预测和聚类后,一组包含 33 种 miRNA 的组合标签被证实可以从肝相关非癌组织中有效区分出肝癌。对于肝癌和非癌组织来说,最大的正确分类率达到了 98.7%。在这 33 种 miRNA 中,有 22 种 miRNA 在肝癌组织中表达下调,11 种表达上调(表 1)。

查阅文献[8]发现,一组包含 30 种 miRNA 的组合标签也可以有效区分出肝癌和非癌组织,经过仔细地比对分析,发现文献[8]报道中就有 2 种 miRNA 与本研究的结果一致,即 miR-451 和 miR-18a,因此选择 miR-451 作为研究目标。

表 1 33 种 miRNAs 在肝癌和非癌肝组织中的表达差异

Tab. 1 Thirty-three miRNAs are differentially expressed in hepatic cancerous tissues and non-cancerous tissues

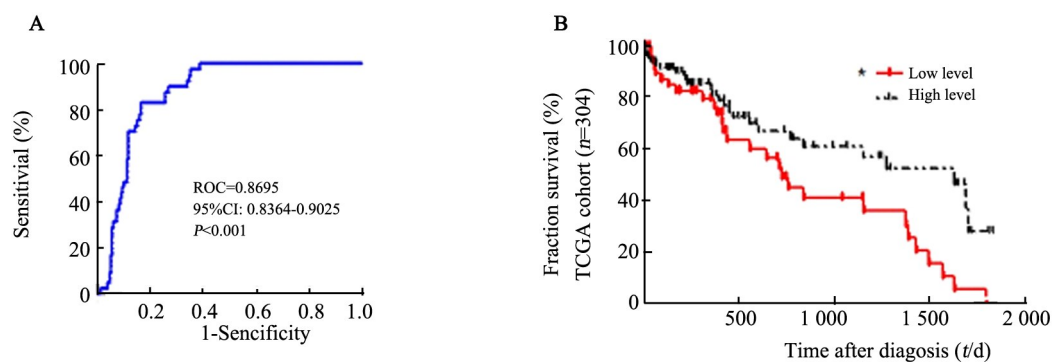
| miRNA | Mean of tumor | Mean of non-tumor | Expression level in HCC |
|----------------|--------------------|-------------------|-------------------------|
| | (Log, $n=41$) | (Log, $n=41$) | |
| hsa-mir-103-2 | 8.52±3.14 | 7.51±2.73 | up |
| hsa-mir-10b | 30 945.6±30 951.18 | 2 247.21±2 516.14 | up |
| hsa-mir-1266 | 9.26±10.14 | 2.42±3.05 | up |
| hsa-mir-1301 | 11.03±7.29 | 6.07±3.17 | up |
| hsa-mir-18a | 13.72±13.42 | 9.35±3.58 | up |
| hsa-mir-217 | 2 354.21±3 882.6 | 204.21±248.46 | up |
| hsa-mir-301a | 6.12±4.4 | 4.78±1.77 | up |
| hsa-mir-3127 | 3.49±2.5 | 1.76±0.79 | up |
| hsa-mir-3677 | 8.56±7.25 | 2.22±1.22 | up |
| hsa-mir-421 | 7.4±5.85 | 3.05±1.57 | up |
| hsa-mir-766 | 17.88±12.57 | 12.74±3.91 | up |
| hsa-mir-125b-1 | 542.46±386.96 | 1 165.72±299.29 | down |
| hsa-mir-125b-2 | 31.45±26.75 | 61.67±15.06 | down |
| hsa-mir-130a | 37.88±27.27 | 136.42±41.49 | down |
| hsa-mir-142 | 1 241.52±972.52 | 3 315.94±1 351.66 | down |
| hsa-mir-145 | 1 016.6±747.97 | 2 395.6±1 042.63 | down |
| hsa-mir-199a-1 | 483.59±541.32 | 1 487.95±659.98 | down |
| hsa-mir-199a-2 | 790.27±890.34 | 2 398.54±1 010.72 | down |
| hsa-mir-199b | 926.07±1 055.37 | 2 716.44±1 117.15 | down |
| hsa-mir-214 | 12.85±14.95 | 36.99±16.08 | down |
| hsa-mir-326 | 9.29±12.11 | 12.43±4.56 | down |
| hsa-mir-33b | 14.8±17.04 | 30.36±17.23 | down |
| hsa-mir-3607 | 152.78±212.35 | 304.1±183.47 | down |
| hsa-mir-3647 | 8.72±11.11 | 15.73±8.22 | down |
| hsa-mir-3653 | 10.01±11.44 | 20.63±11.58 | down |
| hsa-mir-378c | 17.86±16.48 | 39.88±13.47 | down |
| hsa-mir-424 | 190.8±213.57 | 737.84±328.52 | down |
| hsa-mir-450b | 9.29±7.9 | 28.01±9.21 | down |
| hsa-mir-497 | 20.78±18.47 | 37.45±14.1 | down |
| hsa-mir-511-1 | 6.15±3.89 | 17.56±6.21 | down |
| hsa-mir-511-2 | 6.43±3.59 | 17.51±6.93 | down |
| hsa-mir-542 | 246.98±217.95 | 554.01±199.6 | down |
| hsa-mir-451 | 473.40±390.24 | 1 990.47±2 118.04 | down |

2.2 miR-451 对肝癌的诊断和预后分析的作用

用 ROC 曲线方法对肝癌组织和非癌组织进行区

分后发现, miR-451 的敏感性和特异性都高于 85% (95%CI 为 0.836~0.902, $P < 0.01$; 图 1A)。对患者预后分析发现, 低水平 miR-451 表达是生存的危险因素(5

年生存率为 0), 高水平 miR-451 患者 5 年生存率为 40% ($\chi^2 = 6.575, P < 0.05$; 图 1B)。



* $P < 0.05$ vs Low miR-451 level group

图 1 miR-451 对肝癌诊断(A)和预后(B)的作用

Fig.1 Diagnostic (A) and prognostic (B) roles of miR-451 in hepatic carcinoma

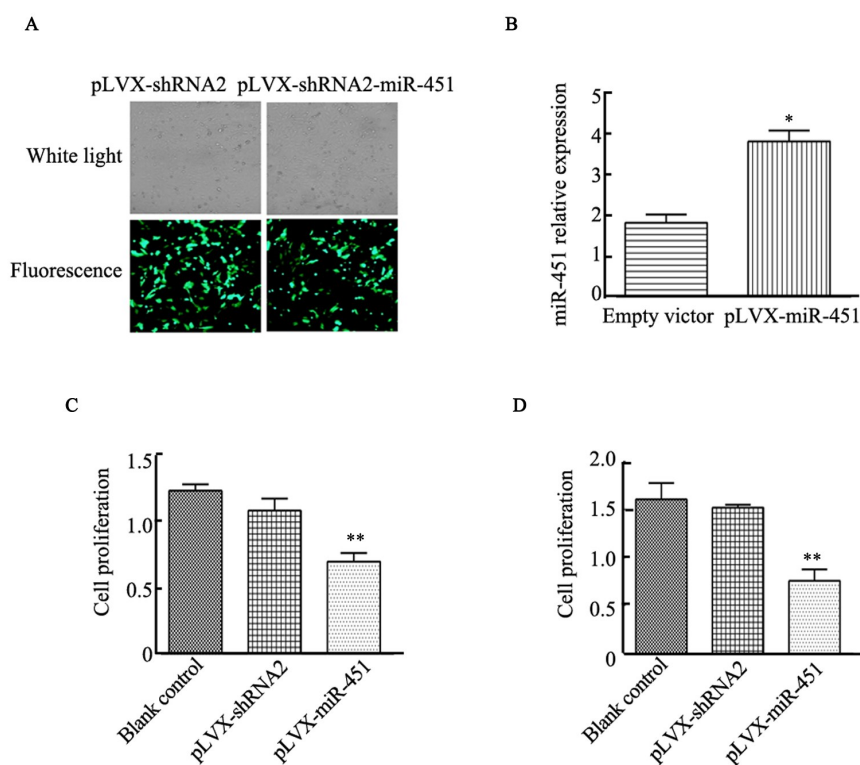
2.3 过表达 miR-451 抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖

CCK-8 细胞增殖实验结果显示, 实验组 HepG2 细胞在转染 24 h 后已有绿色荧光表达, 48 h 表达量增大且转染效率非常高(70%~90%; 图 2A), 96 h 表达量仍然处于高峰仍未衰减。

qPCR 检测结果(图 2B)显示, 在转染 miR-451 过表达载体 pLVX-miR-451 后 HepG2 细胞中 miR-451

的表达显著高于转染空载体的对照组($P < 0.05$)。因此, 后续实验主要选取细胞转染后 48、72 h 作为本实验的主要时间监测点。

CCK-8 细胞增殖实验结果发现, 48、72 h 两个时间点实验组 HepG2 细胞增殖能力显著低于对照组($t = 5.979, 10.97$; 均 $P < 0.01$; 图 2C 和 2D), 结果说明 HepG2 细胞的增殖明显受到抑制。



* $P < 0.05$ vs Empty vector group; ** $P < 0.01$ vs pLVX-shRNA2 group

A: After transfection with miR-451, the expression of GFP was observed by fluorescence microscope; B: miR-451 expression was measured by qPCR; C,D: The changes in cell proliferation was determined by CCK-8 at 48 and 72 h

图 2 转染 miR-451 过表达质粒后对 HepG2 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of transfection with miR-451 over-expression plasmid on proliferation ability of HepG2 cells

2.4 过表达 miR-451 肝癌细胞被阻滞于 S 期

流式细胞术检测结果(图3)发现,实验组HepG2细胞的细胞周期进程较对照组明显受到抑制,大量癌细胞被阻滞停留在S期(18.47% vs 13.86%, $t=7.72$, $P<0.05$)。

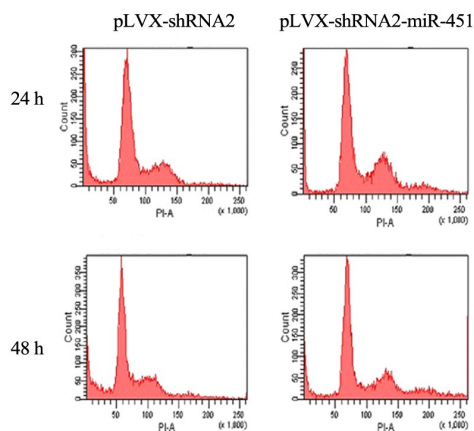


图3 转染 miR-451 过表达质粒后 24 和 48 h 时 HepG2 细胞周期的变化

Fig. 3 Changes in cell cycle of HepG2 cells after transfection with miR-451 over-expression plasmid for 24 and 48 h

3 讨论

随着 miRNA 在肝癌细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡、化疗耐药、病毒感染等过程中的作用机制被越来越多的研究证实^[9], miRNA 在肝癌筛查、诊治、预后判断等方面的运用也逐渐发展起来,主要表现在两方面:一是循环 miRNA(血液、尿液、胃液、胆汁等生理液体中的 miRNA)可以为肝癌亚临床阶段的早期筛查^[10]、肿瘤分化及良恶性程度的判断^[11]以及为肝癌切除手术的预后^[12]提供更为精准的诊疗依据;二是利用 miRNA 构建的溶瘤病毒可以作为肝癌精准靶向治疗的一个补充,但其仍面临诸多的技术难题尚待解决。据报道^[13], miR-10b、miR-106 和 miR-181a 的表达水平能有效地将肝癌患者与健康人区分出来(曲线下面积分别是 0.85、0.82 和 0.89);另外 miR-143 和 miR-215 也能很好地区分肝癌患者与正常人,其敏感性达 80%,特异性达到 91%^[14]。本研究发现,miR-451 具有较高的诊断肝癌准确率(敏感性和特异性都高于 85%),且 miR-451 确有抑制肝癌细胞增殖且有阻滞癌细胞生长周期进程的作用。有研究^[9]显示,一组包含 30 种 miRNA 的组合标签也可以有效区分出肝癌和非癌组织,经比对发现 miR-451 就包含其中,这也一定程度上佐证了 miR-451 的可靠性。

在肝癌预后方面,有研究^[15]认为 miR-25 高表达患者比低表达患者 OS 短,并且多变量回归分析表明

miR-25 的表达水平(风险比为 2.179, $P<0.01$)是一个独立的肝癌患者 OS 的预后指标。另外有学者^[16]发现,高水平的 miR-155 表达也是一个独立的肝癌预后差的指标。本研究中 miR-451 作为预后指标,区分 5 年生存率的敏感性具有统计学意义,患者高水平表达的 miR-451 具有保护作用,其 5 年生存率到达 40%,相比较低水平组(无生存)其作用非常显著。

显然,单一的指标用于肝癌的诊断和预后预测已不能获得良好的效果,无论是以 miR-21、miR-122^[17]、miR-224 等为代表的 miRNA,还是一系列 miRNA 组合标签,或许与传统经典肝癌标志物 AFP 的结合可能为肝癌提供更为精确、可靠的诊断依据。下一步的研究更倾向于对能运用于肝癌的早期筛查和诊断的组合 miRNA 标签的有效性进行可重复的多中心的验证。

综上所述,本研究表明 miR-451 可作为肝癌患者的诊断标志物,低表达水平可以提示预后不良。过表达 miR-451 后,肝癌细胞的增殖能力降低、细胞周期被阻滞于 S 期,提示 miR-451 可能成为肝癌治疗的新靶点,也可能成为观察肝癌细胞快速增殖的一个新指标。

[参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] SINGAL A, VOLK M L, WALJEE A, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2009, 30(1): 37-47. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04014.x.
- [3] ATTWA M H, EL-ETREBY S A. Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. World J Hepatol, 2015, 7(12): 1632-1651. DOI: 10.4254/wjh.v7.i12.1632.
- [4] CARTHEW R W, SONTHEIMER E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.035.
- [5] FRIEDMAN R C, FARH K K, BURGE C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Res, 2009, 19(1):92-105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.
- [6] TOMIMARU Y, EGUCHI H, NAGANO H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2012, 56(1):167-175. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.04.026.
- [7] LI L M, HU Z B, ZHOU Z X, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma[J]. Cancer Res, 2010, 70(23): 9798-9807. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1001.
- [8] WEI R, HUANG G L, ZHANG M Y, et al. Clinical significance and prognostic value of microRNA expression signatures in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(17): 4780-4791. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2728.
- [9] QU K Z, ZHANG K, LI H, et al. Circulating microRNAs as bio-

- markers for hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45(4): 355-360. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3181f18ac2.
- [10] ZHOU J, YU L, GAO X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36): 4781-4788. DOI: 10.1200/JCO.2011.38.2697.
- [11] LI J, WANG Y, YU W, et al. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(1): 70-73. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.111.
- [12] ZHU H T, DONG Q Z, SHENG Y Y, et al. MicroRNA-29a-5p is a novel predictor for early recurrence of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after surgical resection[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52393[2017-10-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3527523/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0052393.
- [13] JIANG L, CHENG Q, ZHANG B H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in hepatocellular carcinoma screening: a validation set from China[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(10): e603[2017-10-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4602462/>. DOI: 10.1097/MD.0000000000000603.
- [14] ZHANG Z Q, MENG H, WANG N, et al. Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 135[2017-10-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4226970/>. DOI: 10.1186/1746-1596-9-135.
- [15] SU Z X, ZHAO J, RONG Z H, et al. Upregulation of microRNA-25 associates with prognosis in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 47[2017-10-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4016611/>. DOI: 10.1186/1746-1596-9-47.
- [16] HAN Z B, CHEN H Y, FAN J W, et al. Up-regulation of microRNA-155 promotes cancer cell invasion and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma following liver transplantation[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(1):153-161. DOI: 10.1007/s00432-011-1076-z.
- [17] KOBERLE V, KRONENBERGER B, PLELI T, et al. Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(16): 3442-3449. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.06.002.

[收稿日期] 2017-12-01

[修回日期] 2018-03-05

[本文编辑] 党瑞山