

肝硬化和肝癌患者外周血淋巴细胞中 INK4 位点反义非编码 RNA 和肿瘤抑制因子的表达

林浩 赵楚生 郑永平

(汕头市中心医院, 广东 汕头 515031)

【摘要】 目的 探讨肝硬化、肝癌患者外周血淋巴细胞中 INK4 位点反义非编码 RNA (ANRIL) 和肿瘤抑制因子 (p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a}) 的 mRNA 表达水平对肝硬化、肝癌诊断和鉴别诊断的价值。方法 选择汕头市中心医院 2013 年 10 月至 2014 年 4 月收治的诊断肝硬化和肝癌的住院患者, 采用实时定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测患者外周血淋巴细胞中 ANRIL、p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 的 mRNA 表达水平; 以本院门诊的健康体检者作为健康对照组。结果 最终纳入患者肝癌组 19 例, 肝硬化组 24 例, 健康对照组 31 例。肝癌组 ANRIL mRNA 表达明显高于健康对照组 (ΔCt : 13.07 ± 0.62 比 12.45 ± 0.84, $P < 0.01$), p15^{INK4b} mRNA 表达明显低于健康对照组 (13.24 ± 0.98 比 13.99 ± 0.99, $P < 0.05$), 而肝硬化和肝癌组 ANRIL (13.07 ± 0.65 比 12.71 ± 0.76) 和 p15^{INK4b} (13.24 ± 0.98 比 13.55 ± 1.08) 的 mRNA 表达水平无统计学差异 (均 $P > 0.05$); 3 组 p14^{ARF}、p16^{INK4a} 的 mRNA 表达水平比较差异亦均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。结论 肝硬化患者外周血淋巴细胞中 ANRIL mRNA 表达水平升高, p15^{INK4b} mRNA 表达水平降低, 可能成为肝癌早期诊断、预测其预后的参考指标。

【关键词】 肝硬化; 肝癌; 淋巴细胞; INK4 位点反义非编码 RNA; p14^{ARF}; p15^{INK4b}; p16^{INK4a}

Expressions of antisense non-coding RNA in INK4 locus and tumor suppressors in peripheral blood lymphocytes of patient with cirrhosis and hepatocellular carcinoma Lin Hao, Zhao Chusheng, Zheng Yongping, Shantou Central Hospital, Shantou 515031, Guangdong, China
Corresponding author: Lin Hao, Email: gdstlinhao@139.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical diagnostic and differential diagnostic values of antisense non-coding RNA in the INK4 locus (ANRIL) and tumor suppressors (p14^{ARF}, p15^{INK4b} and p16^{INK4a}) mRNA expression levels in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Methods** The patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis admitted in Shantou Central Hospital from October 2013 to April 2014 were selected. The real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect ANRIL, p14^{ARF}, p15^{INK4b} and p16^{INK4a} mRNA expression levels of peripheral blood lymphocytes. The subjects having taken physical health examinations in outpatient clinics were assigned in the healthy control group. **Results** During the study period, 19 cases of hepatocellular carcinoma, 24 cases of cirrhosis, and 31 healthy controls were finally enrolled. In the hepatocellular carcinoma group, the mRNA expression level of ANRIL was significantly higher than that of the healthy control group (ΔCt : 13.07 ± 0.62 vs. 12.45 ± 0.84, $P < 0.01$), while p15^{INK4b} mRNA expression level was obviously lower than that of the healthy control group (13.24 ± 0.98 vs. 13.99 ± 0.99, $P < 0.05$). But there were no significant differences in the mRNA expression levels of ANRIL (13.07 ± 0.65 vs. 12.71 ± 0.76) and p15^{INK4b} (13.24 ± 0.98 vs. 13.55 ± 1.08) between the groups of hepatocellular carcinoma and cirrhosis (both $P > 0.05$). There were also no statistically significant differences in p14^{ARF} and p16^{INK4a} mRNA expressions among the three groups (all $P > 0.05$). **Conclusion** The elevation of ANRIL and descent of p15^{INK4b} mRNA expression levels in peripheral blood lymphocytes in patients with liver lesion can be used as the reference indicators for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma and to predict their prognoses.

【Key words】 Cirrhosis; Hepatocellular carcinoma; Lymphocyte; Antisense non-coding RNA in the INK4 locus; p14^{ARF}; p15^{INK4b}; p16^{INK4a}

p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 都是肿瘤抑制因子。p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 功能相似, 通过特异性地与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子结合起作用, 抑制成视网膜细胞瘤家族蛋白表达, 使细胞生长周期阻滞在 G1 期^[1]; p14^{ARF} 可活化 p53, 导致细胞周期阻滞

或凋亡^[2]。INK4 位点反义非编码 RNA (ANRIL)、p16^{INK4a}、p15^{INK4b} 和 p14^{ARF} (人类为 p14^{ARF}, 小鼠为 p19^{Arf}) 均位于 9p21 区的 INK4b-ARF-INK4a 基因群。INK4b-ARF-INK4a 基因群编码 2 个周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a}, 同时还编码 p14^{ARF}^[3], ANRIL 也称 CDKN2BAS (CDKN2B antisense RNA)^[4]。目前有关包括 ANRIL 在内的长非编码 RNAs 与肿瘤的关系研究较多^[5], ANRIL

通过表观修饰,调控邻近基因 p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 的表达影响肿瘤的发生发展,但关于其调控方向,以及是否这 3 个抑癌基因均受其调控或只是其中一部分,报道并不一致^[4, 6-9]。另外,关于 p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 在多种肿瘤及细胞研究中的表达水平改变已有较多研究报道^[10-12],但在肝癌患者外周血中的表达,以及肝硬化、肝癌患者表达水平的区别鲜有报道。本研究采用实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肝硬化、肝癌患者及健康对照者外周血淋巴细胞 ANRIL、p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 的 mRNA 表达水平,分析这些基因在肝硬化、肝癌中表达的差异及其临床意义,同时探讨 ANRIL 与 p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} mRNA 表达水平的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料:收集汕头市中心医院 2013 年 10 月至 2014 年 4 月诊断为肝癌、肝硬化的住院患者为观察对象。全部病例均经 CT 或磁共振(MRI)证实、血甲胎蛋白和(或)病理学确诊,且均无化疗及免疫治疗。排除继发性肝癌、免疫相关性疾病及其他重大疾病。最后纳入肝癌患者 19 例为肝癌组,肝硬化患者 24 例为肝硬化组,以本院同期 31 例健康体检者为健康对照组。

本研究符合医学伦理学标准,并经医院伦理委员会批准,取得患者或家属知情同意。

1.2 主要试剂和仪器:人淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司);RNA 提取试剂 TRIzol(日本 TaKaRa 公司);逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司);荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Life Applied Biosystems 公司);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成:① p14^{ARF} 上游引物:5'-GGC CCT CGT GCT GAT GCT AC-3',下游引物:5'-TGG AGC AGC AGC AGC TCC GC-3';② p15^{INK4b} 上游引物:5'-GAT CCC AAC GGA GTC AAC C-3',下游引物:5'-GCA CCA CCA GCG TGT CCA-3';③ p16^{INK4a} 上游引物:5'-CTG CCC AAC GCA CCG AAT AG-3',下游引物:5'-CAG CAC CAC CAG CGT GTC C-3';④ β -肌动蛋白(β -actin)上游引物:5'-ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA-3',下游引物:5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3';⑤ ANRIL 上游引物:5'-CCC TTT TGA TGA GAA GAA TAA GCC T-3',下游引物:5'-GCA CAC CTA ACA GTG ATG CTT GAA-3'。

1.3 观察指标及方法:采集受试者清晨空腹静脉血 2 mL,置于肝素抗凝管中,加入淋巴细胞分离液 3 mL,4 °C 离心 5 min,弃血浆,收集第 2 层细胞(淋巴细胞)放入含磷酸盐缓冲液(PBS)的试管中,充分混匀后 4 °C 离心 10 min,加入 TRIzol 1 mL,移入无 RNA 酶小离心管(EP 管)中,置于 -80 °C 冰箱保存。采用 TRIzol 试剂法提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA。以人外周血淋巴细胞 cDNA 为模板,进行 RT-PCR 反应,扩增 ANRIL、p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 及 β -actin 的基因编码序列。反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 复性、延伸 30 s,共进行 40 个循环。 β -actin 为内参照。 β -actin 扩增产物长度 149 bp;ANRIL 扩增产物长度 172 bp;p14^{ARF} 扩增产物长度 111 bp;p15^{INK4b} 扩增产物长度 180 bp;p16^{INK4a} 扩增产物长度 183 bp。各组目的基因表达水平用 Δ Ct 值表示。

1.4 统计学分析:使用 SPSS 16.0 统计软件处理数据。正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;非正态分布的计量数据采用秩和检验;计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组性别、年龄比较(表 1):3 组性别、年龄差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),有可比性。

2.2 3 组 ANRIL mRNA 表达水平比较(表 1):3 组 ANRIL mRNA 表达水平比较差异有统计学意义($F = 3.849$, $P = 0.026$),肝癌组 ANRIL mRNA 表达水平较健康对照组明显升高($P = 0.007$),肝硬化组与健康对照组($P = 0.221$)、肝癌组与肝硬化组($P = 0.128$) ANRIL mRNA 表达水平比较差异均无统计学意义。

2.3 3 组 p14^{ARF} mRNA 表达水平比较(表 1):3 组 p14^{ARF} mRNA 表达水平比较差异无统计学意义($F = 0.035$, $P = 0.966$)。

2.4 3 组 p15^{INK4b} mRNA 表达水平比较(表 1):3 组 p15^{INK4b} mRNA 表达水平比较差异有统计学意义($F = 3.423$, $P = 0.038$),肝癌组较健康对照组明显降低($P = 0.013$),肝硬化组与健康对照组($P = 0.114$)、肝癌组与肝硬化组($P = 0.324$) p15^{INK4b} mRNA 表达水平比较差异均无统计学意义。

2.5 3 组 p16^{INK4a} mRNA 表达水平比较(表 1):3 组 p16^{INK4a} mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义($F = 2.064$, $P = 0.135$)。

表 1 3 组基线资料及 ANRIL、p14^{ARF}、p15^{INK4b}、p16^{INK4a} mRNA 表达水平的比较

组别	例数 (例)	性别(例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	mRNA 表达 ($\Delta Ct, \bar{x} \pm s$)			
		男性	女性		ANRIL	p14 ^{ARF}	p15 ^{INK4b}	p16 ^{INK4a}
健康对照组	31	24	7	52.35 ± 16.42	12.45 ± 0.84	15.16 ± 1.70	13.99 ± 0.99	17.97 ± 2.18
肝硬化组	24	18	6	56.50 ± 11.65	12.71 ± 0.76	15.16 ± 1.49	13.55 ± 1.08	18.46 ± 2.17
肝癌组	19	16	3	57.21 ± 15.22	13.07 ± 0.65 ^a	15.05 ± 1.52	13.24 ± 0.98 ^a	17.18 ± 1.63
统计量		$\chi^2=0.560$		$F=0.839$	$F=3.849$	$F=0.035$	$F=3.423$	$F=2.064$
P 值		0.756		0.436	0.026	0.966	0.038	0.135

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$

3 讨论

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤,发病率呈逐年上升趋势,其发病机制目前尚不明确。原发性肝癌起病隐匿,进展迅速,大多数患者确诊时已达到局部晚期或发生远处转移,预后很差^[13-15]。我国 80% 以上的原发性肝癌发生是由肝炎、肝硬化发展而来的^[16-17]。在肝硬化患者中,寻找非创伤性肝癌的监测显示非常迫切。p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 都是肿瘤抑制因子,在多种肝癌及肝癌细胞株研究中的表达水平改变也有报道^[10-12]。而 ANRIL 由于其 DNA 位点上的特殊物理位置,很可能与 p14^{ARF}、p15^{INK4b} 和 p16^{INK4a} 表达存在调控关系。

3.1 肝癌患者与健康对照组 ANRIL、p15^{INK4b} 的 mRNA 表达水平差异有统计学意义。本研究显示,健康对照组、肝硬化组和肝癌组 ANRIL mRNA 表达水平呈逐级递增, p15^{INK4b} mRNA 表达水平呈逐级递减。肝癌与肝硬化患者及健康对照组外周血淋巴细胞 p14^{ARF} 和 p16^{INK4a} 表达水平差异无统计学意义。肝癌组与健康对照组 ANRIL、p15^{INK4b} mRNA 表达水平差异有统计学意义,这与 Kotake 等^[18]的研究结果是一致的。在 Kotake 等^[18]的研究中, ANRIL 表达的缺失,干扰了 SUZ12 与 p15^{INK4b} 位点的结合,使得 p15^{INK4b} 表达水平升高,但对 p14^{ARF} 和 p16^{INK4a} 的 mRNA 表达水平影响不明显。因此 ANRIL 和 p15^{INK4b} 的 mRNA 表达水平只能作为肝癌与健康人群的区分指标,而与肝硬化患者区别则较为困难,需进一步研究论证。

3.2 ANRIL 与 p15^{INK4b} 的 mRNA 表达水平改变方向呈相反的关系。肝癌患者 ANRIL 表达水平上升, p15^{INK4b} mRNA 表达水平下降, ANRIL 与 p15^{INK4b} 的 mRNA 表达水平改变方向呈相反的关系,这与很多研究的结果^[3, 18-20]是一致的。Visel 等^[3]对小鼠的研究发现, ANRIL 基因部分敲除后, Cdkn2a、Cdkn2b 表达水平明显下降; Kotake 等^[18]的研究显示, ANRIL 表达的缺失,干扰了 SUZ12 与 p15^{INK4b} 位

点的结合,使得 p15^{INK4b} 的 mRNA 表达水平升高。

目前许多肝癌发现时已处于中晚期,因此,对肝癌的早期诊断十分重要,从基因层面对肝癌进行研究,将进一步揭示肝癌的发生发展过程。ANRIL mRNA 水平在肝癌中的表达明显高于对照组,而 p15^{INK4b} mRNA 水平则明显低于对照组,提示 ANRIL 与 p15^{INK4b} mRNA 监测有可能成为肝癌早期诊断、预测其预后的指标,对临床治疗具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(9): 667-677.
- [2] 王芳,关云谦. p16^{INK4a}/p14^{ARF} 基因在细胞衰老和肿瘤抑制中的作用研究进展 [J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(1): 100-105.
- [3] Visel A, Zhu Y, May D, et al. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice [J]. Nature, 2010, 464(7287): 409-412.
- [4] Pasmant E, Laurendeau I, Héron D, et al. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF [J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3963-3969.
- [5] 刘名倬,朱峰. 长链非编码 RNA 的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(4): 285-288.
- [6] Sato K, Nakagawa H, Tajima A, et al. ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1 [J]. Oncol Rep, 2010, 24(3): 701-707.
- [7] He S, Gu W, Li Y, et al. ANRIL/CDKN2B-AS shows two-stage clade-specific evolution and becomes conserved after transposon insertions in simians [J]. BMC Evol Biol, 2013, 13: 247.
- [8] Congrains A, Kamide K, Ohishi M, et al. ANRIL: Molecular Mechanisms and Implications in Human Health [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(1): 1278-1292.
- [9] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, et al. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk [J]. PLoS Genet, 2010, 6(12): e1001233.
- [10] Schneller D, Machat G, Sousek A, et al. p19(ARF)/p14(ARF) controls oncogenic functions of signal transducer and activator of transcription 3 in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2011, 54(1): 164-172.
- [11] Min EY, Kim IH, Lee J, et al. The effects of fucodian on senescence are controlled by the p16INK4a-pRb and p14Arf-p53 pathways in hepatocellular carcinoma and hepatic cell lines [J]. Int J Oncol, 2014, 45(1): 47-56.
- [12] Ding ZY, Jin GN, Wang W, et al. Reduced expression of

- transcriptional intermediary factor 1 gamma promotes metastasis and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2014, 60(5): 1620-1636.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2011, 16(10): 929-946.
- [14] 吕修臣, 刘俊莉, 张琼霞, 等. 中西医结合强化综合治疗原发性肝癌临床研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2001, 8(5): 306-308.
- [15] 田雪飞, 肖竺, 郭永良, 等. 归肝经中药对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制及凋亡诱导作用的研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16(4): 199-202.
- [16] 陈萍. 乙型肝炎肝硬化并发原发性肝癌相关危险因素分析[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [17] 黄劲松, 骆欣, 余吉仙, 等. 国产与进口低分子肝素治疗乙型肝炎肝硬化的前瞻性随机对照研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(7): 408-411.
- [18] Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15 (INK4B) tumor suppressor gene [J]. *Oncogene*, 2011, 30(16): 1956-1962.
- [19] Holdt LM, Teupser D. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(2): 196-206.
- [20] Wan G, Mathur R, Hu X, et al. Long non-coding RNA ANRIL (CDKN2B-AS) is induced by the ATM-E2F1 signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1086-1095.

(收稿日期: 2014-07-24) (本文编辑: 李银平)

• 论文写作 •

医学论文统计分析方法的合理选用策略

刘菁 孙茜 邱美仙 李银平

(《中国中西医结合急救杂志》编辑部, 天津 300050)

科研工作者在撰写专业论文过程中, 合理选用统计分析方法处理自己在科研工作中遇到的统计学问题, 就如同一个打算到医院工作的临床医生一样, 需要具备诊断和救治各种常见病的技能, 具有鉴别一些症状接近但又有一些细微差别的疾病的能力。临床医生要想做到合理选用统计分析方法, 必须熟练地掌握各种常用的统计学方法, 并能清楚地说出各种统计分析方法的异同点和各自的使用场合, 否则难免会发生盲目套用的错误。

1 科研工作流程图

统计学的应用贯穿于整个研究中的, 不应等到研究结束后再应用统计学撰写论文或总结。应在确定研究目标后, 就应开始应用统计学。科研工作流程图如下: 确定目标科研→专业设计和统计研究设计→观察或实验, 资料收集、整理、描述结果→用正确的研究结果指导未来的研究。

2 统计研究设计

统计研究设计包括调查设计、实验设计、临床试验设计, 其中调查设计的关键是不要漏掉重要的调查项目或指标, 在制定调查设计方案时, 一定要全面、详细地考虑; 实验设计的关键是严格遵守原则去实施, 合理选用实验设计类型, 重点把握好“均衡原则”; 临床试验设计的关键是不要违反伦理道德和如何提高受试者的依从性, 要设法控制人为因素的干扰和影响。

3 资料收集、整理、表达和描述

事先编制出收集各种设计资料的表格, 类似“重复测量设计”资料的设计, 务必要确保来自同一个体的多个数据写在同一行上; 对于多因素多指标资料, 最好按建立数据库的方式录入数据, 即横向代表个体、纵向代表变量, 便于统计软件调用。

均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 仅适合表达呈正态分布的定量资料、中位数 (四分位数间距) [$M(Q_R)$] 适于表达呈偏态分

布的定量资料; 用统计表表达资料时, 务必要将数据的含义表达清楚; 用统计图表达资料时, 务必要确保坐标轴上所标的刻度不违背数学原则, 还应注意资料类型与统计图型相匹配; 运用相对数时, 要注意区分“百分比”与“百分率”, 分母过小时, 不要计算相对数。

4 假设检验合理选用策略

4.1 定量资料检验方法的合理选用: 资料满足正态性和方差齐性时, 应选用参数检验法; 不满足时, 可寻找合适的变量变换方法, 但对变换后的数据仍应检查其前提条件, 满足时, 可对变换后的数据采用参数检验法; 反之, 需要用相应的非参数检验法。一元分析的参数检验法包括 u 检验 (以正态分布为理论依据)、 t 检验 (以 t 分布为理论依据)、方差分析 (以 F 分布为理论依据); 多元分析的参数检验法有包括 T_2 检验、Wilks λ 检验。一元分析的非参数检验法包括符号检验、符号秩检验、Wilcoxon 秩和检验、Manny-Whitney 检验、Kruskal-Wallis 检验、Friedman 检验。

4.2 回归分析方法的合理选用: 一元回归分析的关键在于专业知识、绘制和分析散布图。也就是说, 若专业上有理由认为某些变量之间有关系, 希望通过实验数据和统计学处理来反映变量之间的联系是否具有统计学意义时, 才可以考虑进行相关或回归分析; 而在具体计算之前, 还应将变量之间变化的数量关系用散布图呈现出来, 以便直观判断两变量之间是呈直线变化趋势, 还是呈现曲线变化趋势, 或者两变量之间根本就没有什么关系。合理进行多元回归分析的关键在于专业知识和因变量的类型。

统计学方法的选择与应用必须贯穿于整个课题设计以及资料分析和处理全过程。与统计学专家合作可以使提高科研设计和统计方法选择的正确率、减少修改次数, 达到事半功倍的效果。

(收稿日期: 2014-11-04)

(本文编辑: 李银平)