

Paneli cirkulirajočih mikroRNA za detekcijo hepatocelularnega karcinoma

Circulating microRNA Panels for Detection of Hepatocellular Carcinoma

Branislava Ranković, Nina Hauptman*

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Slovenian Journal of Digestive Diseases / Gastroenterolog 2023; 2, 3: 59–64

Ključne besede: hepatocelični karcinom, serum, plazma, cirkulirajoča mikroRNA

Keywords: hepatocellular carcinoma, serum, plasma, circulating microRNA

IZVLEČEK

Hepatocelularni karcinom (HCC) je drugi vodilni vzrok smrti zaradi raka na svetu. Visoka stopnja obolevnosti in umrljivosti poudarja nujnost identifikacije učinkovitih bioloških označevalcev, ki bi omogočili zgodnjo diagnozo HCC. Naraščajoče število raziskav o nekodirajočih RNA, vključno z mikroRNA, v povezavi s HCC, kaže na njihovo potencialno uporabnost pri diagnozi HCC. Namen tega pregleda je predstaviti panele miRNA z visoko specifičnostjo in občutljivostjo za odkrivanje HCC iz vzorcev krvi.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second leading cause of cancer death worldwide. The high rate of morbidity and mortality emphasizes the necessity of identifying effective biomarkers that would enable the early diagnosis of HCC. The growing number of studies on non-coding RNAs, including microRNAs, in association with HCC indicates their potential utility in the diagnosis of HCC. This review aims to present miRNA panels with high specificity and sensitivity for the detection of HCC from blood samples.

*znanst. sod. dr. Nina Hauptman

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana

E-pošta: nina.hauptman@mf.uni-lj.si

UVOD

Hepatocelularni karcinom (HCC) je najpogostejši rak jeter in drugi vodilni vzrok smrti zaradi raka na svetu (1, 2). Ta agresivna oblika raka predstavlja kar 90 % vseh primarnih rakov jeter (3). Običajno se HCC razvije ob prisotnosti ciroze, medtem ko kronični virusni hepatitis, povezan s hepatitisom B (HBV) in C (HCV), poškodbe zaradi alkoholne ali nealkoholne maščobne bolezni jeter, izpostavljenost aflatoksinom ter genetska nagnjenost dodatno spodbujajo proces tumorigeneze (4).

V zadnjem času narašča število raziskav, ki kažejo, da so cirkulirajoče nekodirajoče RNA (ncRNA), vključno z mikroRNA (miRNA), prisotne v telesnih tekočinah, kot so urin, plazma, serum ali slina, lahko koristne kot potencialni diagnostični bioznačevalci (5, 6). Te zunajcelične ncRNA v telesnih tekočinah naj bi se sprostile iz celic po poškodbi ali apoptozi celic, ali pa jih izločajo zunajcelični vezikli, kot so eksosomi (7, 8). Cirkulirajoče ncRNA štejejo za tumorsko specifične zaradi njihove zelo specifične prisotnosti med različnimi tkivi ali boleznimi (9, 10).

Številne raziskave opisujejo vlogo ncRNA pri pojavu in razvoju HCC (11), pri čemer lahko njihovo spremembo v izražanju uporabimo v diagnostične namene (12). V tem prispevku se bomo osredotočili na panele cirkulirajočih miRNA, ki bi bili lahko uporabni za določanje hepatocelularnega karcinoma v krvnih vzorcih.

MikroRNA pri raku

MiRNA so skupina majhnih nekodirajočih RNA, običajno dolgih med 20 in 22 nukleotidov. Te molekule izvirajo iz različnih genomskih virov, vključno z intergenskimi regijami in zaporedji eksonov znotraj nekodirajočih transkripcijskih regij. Pomembno je omeniti, da velik delež, do 60 % znanih miRNA, izvira iz intronskih zaporedij, ki se nahajajo bodisi v genih, ki kodirajo proteine, bodisi v nekodirajočih transkripcijskih regijah. MiRNA se lahko pojavljajo kot posamezni geni ali kot skupki v genomskih regi-

jah. V nekaterih primerih so skupki miRNA sočasno regulirani in prepisani, kar kaže na kompleksne mehanizme regulacije (13). Ocenjujejo, da miRNA v človeškem genomu predstavljajo več kot 3 % vseh genov. Glede na funkcionalnost so miRNA izjemno raznolike in vplivajo na številne vidike regulacije genov. Njihova osrednja funkcija pri sesalcih je predvsem inhibicija translacije preko interakcij s 3'-UTR (neprevedena regija) ciljnih mRNA. V kompleksnem celičnem okolju posamezne miRNA lahko vplivajo na več mRNA tarč, včasih tudi do 200 mRNA tarč za eno miRNA. Prav tako je lahko ena sama mRNA regulirana z več različnimi miRNA (14).

V okviru raziskav raka so miRNA postale ključni regulatorji specifičnih genov. Po svojem delovanju so podobne številnim proteinskim transkripcijskim faktorjem, za katere je znano, da so ključni akterji pri preoblikovanju normalnih celic v maligne. MiRNA vplivajo na različne faze izražanja genov, vključno s transkripcijo, stabilnostjo in translacijo mRNA. Rakave celice kažejo genetske in epigenetske spremembe v primerjavi z nemalignimi celicami, pri čemer imajo miRNA pomembno vlogo pri teh spremembah. Z novimi tehnologijami lahko izvedemo celotno profiliranje genoma, s čimer so odkrili različne značilnosti miRNA, edinstvene za določene vrste raka, kar poudarja diagnostični potencial teh molekul. Kombinacija označevalcev miRNA z drugimi biološkimi označevalci obeta boljše oceno tveganja za razvoj raka, izboljšanje preventivnih strategij in napovedovanje bolezni. Poleg tega so bili specifični genetski polimorfizmi povezani z nagnjenostjo k razvoju različnih vrst raka. Zato se vse bolj poudarja potreba po združevanju genomskih mutacij z označevalci miRNA, kar omogoča oblikovanje celovitih panelov označevalcev za natančnejšo oceno tveganja in zgodnjo diagnozo v okviru raziskav raka ter v klinični praksi (15–17).

Cirkulirajoče tumorske miRNA

Identifikacija miRNA kot potencialnih označevalcev v serumu ali plazmi je predstavljala pomemben preboj, ki ponuja minimalno invazivno metodo za zgod-

nje odkrivanje raka. Razumevanje značilnosti sekretornih miRNA in njihova uporabnost pri zgodnjem odkrivanju raka sta tako izjemnega pomena (18, 19). V zadnjih letih so miRNA pritegnile veliko pozornost raziskovalcev, ki so prepoznali njihov potencial za diagnozo in prognozo raka. Za sistematičen pregled literature smo izvedli obsežno iskanje na portalu PubMed. Za specifičen tip raka (hepatocelularni rak HCC) smo združili izraze 'miRNA panel' s 'plazma' ali 'serum' ter 'diagnoza'. S tem iskanjem smo identificirali 53 študij, ki smo jih skrbno pregledali in izbrali tiste, ki so uporabljale panele miRNA za odkrivanje HCC ter jih primerjale s normalnimi kontrolami. Med izbranimi študijami smo nato izbrali originalne članke, ki so testirali svoje izbrane panele miRNA na vzorcih človeškega seruma ali plazme ter

ovrednotili kombinirane panele izbranih miRNA označevalcev.

Cirkulirajoče miRNA pri hepatocelularnem karcinomu

Panele miRNA smo razvrstili v tri skupine. Prvo skupino sestavlja osem panelov, ki vključujejo izključno miRNA. V drugi skupini so trije paneli, v katerih so miRNA združene z dolgimi nekodirajočimi RNA (lncRNA) in mRNA. Tretjo skupino vključujejo štirje paneli, kjer so bile miRNA kombinirane z α -fetoproteinom (AFP). Omeniti velja, da je bilo več miRNA uporabljenih v več panelih miRNA. Te miRNA so: miR-126, miR-21, miR-122, miR-125b, miR-375, miR-206, miR-192, miR-223, miR-26a in miR-27a (Tabela 1).

Tabela 1. Pregled panelov cirkulirajočih miRNA za odkrivanje HCC

miRNA panel	Tip vzorca	Število vzorcev	Izražanje	Statistika	Referenca
miRNA paneli					
miR-122 miR-192 miR-21 miR-223 miR-26a miR-27a miR-801	plazma	457 HCC, 167 normalnih vzorcev	↑ ↑ ↑ ↓ ↓ ↓ ↓	PPK = 0,941	[20]
miR-206 miR-141-3p miR-433-3p miR-1228-5p miR-199a-5p miR-122-5p miR-192-5p miR-26a-5p	serum	261 HCC, 173 normalnih vzorcev	↑ ↑ ↑ ↑ ↓ ↓ ↓ ↓	PPK = 0,887 (95 % IZ = 0,850–0,918) občutljivost = 85,55 % specifičnost = 73,3 %	[21]
miR-214-5p miR-125b miR-1269 miR-375	serum	224 HCC, 84 normalnih vzorcev	↓ ↓ ↑ ↓	PPK = 0,95 s 95 % IZ občutljivost = 83,2 % specifičnost = 96,9 % točnost = 86,8 %	[22]
miR-27b-3p miR-192-5p	serum	212 HCC, 110 normalnih vzorcev	↑ ↑	PPK = 0,823 (p < 0.0001)	[23]
miR-375 miR-10a miR-122 miR-423	serum	149 HCC, 149 normalnih vzorcev	↑ ↑ ↑ ↑	PPK = 0,995 (95 % IZ = 0,985–1)	[24]

HCC, hepatocelularni karcinom; AFP, α -fetoprotein; PPK, površina pod krivuljo; IZ, interval zaupanja; PNV, pozitivna napovedna vrednost; NNV, negativna napovedna vrednost; ↑ povišano izražanje; ↓ znižano izražanje; SN, standardna napaka

Tabela 1. nadaljevanje

miRNA panel	Tip vzorca	Število vzorcev	Izražanje	Statistika	Referenca
miR-4661-5p miR-4746-5p	eksosomi v serumu	84 HCC, 26 normalnih vzorcev	↑ ↑	PPK = 0,942 (95% IZ = 0.895–0.972) občutljivost = 84,5 % specifičnost = 89,3 % PNV = 88,8 % NNV = 85,2 %	[25]
miR-126 miR-21 miR-30c miR-193b miR-122 miR-222 miR-125b	serum	34 HCC, 25 normalnih vzorcev	↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	PPK = 1,00 SN = 0 p < 0,001	[26]
miR-10b miR-181a miR-106b	serum	27 HCC, 50 normalnih vzorcev	↑ ↓ ↑	PPK = 0,94 (95 % IZ = 0,89–0,99)	[27]
miRNA + lncRNA + mRNA paneli					
miR-16-2 miR-21-5p lncRNA-CTBP mRNA LAMP2	serum	78 HCC, 42 normalnih vzorcev	↑ ↑ ↑ ↑	občutljivost = 79,5 % specifičnost = 100 %	[28]
miR-1262 lncRNA-RP11-513I15.6 mRNA RAB11A	eksosomi v serumu	60 HCC, 18 normalnih vzorcev	↓ ↓ ↓	občutljivost = 100 % specifičnost = 76,7 % PNV = 81,1 % NNV = 100 % točnost = 88,3 %	[29]
miR-4764-5p lncRNA-RP11-156p1.3 mRNA RFTN1	serum	49 HCC, 36 normalnih vzorcev	↓ ↓ ↓	občutljivost = 100 % specifičnost = 76,7 % PPV = 81,1 % NNV = 100 % točnost = 88,3 %	[30]
miRNA + AFP paneli					
miR-122 miR-885-5p miR-29b AFP	serum	192 HCC, 95 normalnih vzorcev	↑ ↑ ↓	PPK = 1	[31]
miR-92-3p miR-107 miR-3126-5p AFP	serum	115 HCC, 40 normalnih vzorcev	↑ ↑ ↓	PPK = 0,988	[32]
miR-125b miR-223 miR-27a miR-26a AFP	serum	90 HCC, 30 normalnih vzorcev	↓ ↓ ↓ ↓	PPK = 0,936 (IZ = 0,878–0,995) občutljivost = 0,907 specifičnost = 0,933	[33]
miR-206 miR-126 AFP	plazma	38 HCC, 20 normalnih kontrol	↑ ↓	PPK = 0,989 (IZ = 0,919–1,000)	[34]

HCC, hepatocelularni karcinom; AFP, α -fetoprotein; PPK, površina pod krivuljo; IZ, interval zaupanja; PNV, pozitivna napovedna vrednost; NNV, negativna napovedna vrednost; ↑ povečano izražanje; ↓ znižano izražanje; SN, standardna napaka

MiRNA paneli

Pri pregledu panelov miRNA za odkrivanje HCC so vsi paneli pokazali visoko diagnostično natančnost z vrednostmi površine pod krivuljo (PPK) od 0,887 do 1,00 (Tabela 1). Vsak panel je bil sestavljen iz dveh do osmih miRNA (20–27). Paneli so bili razviti z različnimi metodologijami. Nekateri so za začetni presejalni postopek uporabili mikromreže (20) ali mreže za izražanje genov (24), drugi pa so uporabili nabore podatkov iz prosto dostopnih zbirk podatkov Gene Expression Omnibus (GEO) ali The Cancer Genome Atlas (TCGA) (25), ali uporabili tehnike sekvenciranja (21). Nekatere študije so v procesu razvoja panela uporabile bolj neposreden pristop (22, 26, 27), medtem ko so druge izbrale večfazno strategijo. Ena študija je uporabila dvofazni pristop (24), druge pa so ga razširile na trifazni pristop (20, 21, 25).

Čeprav so nekateri paneli pokazali visoko vrednost PPK, na primer študiji Ali in sod. (26) ter Jiang in sod. (27), je bila njihova kohorta precej majhna, 34 oziroma 27 primerov HCC. Za pridobitev objektivnejših rezultatov bi bilo potrebno panela dodatno testirati. Zanesljivejši so rezultati študij, ki so uporabile večfazno testiranje na večjih kohortah, kot so študije, ki so jih izvedli Zhou in sod. (20), Tan in sod. (21) ter Zhu in sod. (23).

Panel, ki je bil testiran na največ vzorcih so objavili Zhou in sod., kjer so z uporabo mikromrež preverili 723 miRNA v 137 vzorcih plazme. Panel je bil preizkušen na preskusni skupini, nato pa potrjen z neodvisno skupino, kar zagotavlja visoko diagnostično natančnost tega miRNA panela (20).

MiRNA paneli v kombinaciji z lncRNA in mRNA

V primerjavi s paneli, kjer so vključene izključno miRNA so paneli in so miRNA kombinirali z lncRNA in mRNA, imeli občutljivost od 79,5 % do 100 % in specifičnost od 76,7 % do 100 % (Tabela 1) (28–30). Čeprav so rezultati teh študij obetavni, je vredno omeniti, da temeljijo na relativno majhnem številu vzor-

cev (49 do 78) v primerjavi s paneli, kjer so vključene izključno miRNA. V študijah, kjer so panele kombinirali z lncRNA in mRNA, so uporabili neposreden pristop brez validacijskih kohort, zato bi za potrditev njihove statistične vrednosti morali biti paneli preverjeni še na neodvisnih kohortah.

MiRNA paneli v kombinaciji z AFP

AFP je eden najpogosteje uporabljenih bioznačevalcev, ki so ga prvič predstavili v šestdesetih letih prejšnjega stoletja, kljub temu pa je njegova občutljivost za diagnosticiranje HCC okoli 60 %, specifičnost pa je še vedno neustrezna (35). V do tretjini primerov HCC ostanejo AFP vrednosti v serumu normalne, poleg tega se lahko zvišanje AFP pojavi tudi pri nekaterih benignih boleznih jeter in drugih tumorjih (npr. tumor zarodnih celic) (36).

AFP je bil vključen v miRNA panele za izboljšanje statistične vrednosti panelov, kar potrjuje visoka vrednost PPK, ki se giblje od 0,936 do 1 (Tabela 1) (31–34). Čeprav nobena panela v kombinaciji z AFP ni imela večfaznega testiranja, je študija, ki jo je izvedel Zekri in sod. imela veliko kohorto 192 primerov HCC, poleg tega je imela njihova panela tudi najboljše statistični potencial (31).

ZAKLJUČEK

HCC je kompleksna bolezen, ki vključuje različne dejavnike tveganja in jo običajno diagnosticiramo, ko je rak v napredovalem stadiju s slabim preživetjem. Pomanjkanje specifičnih diagnostičnih markerjev za HCC predstavlja izziv za zgodnje odkrivanje bolezni in zdravljenje raka. MiRNA so regulatorji izražanja genov in imajo ključno vlogo pri patogenezi HCC. Njihovo izražanje je spremenjeno celo v zelo zgodnjih fazah raka, zato je njihov potencial za detekcijo HCC v zgodnji fazi pomemben.

Literatura

1. Gonzalez-Vallinas M, Breuhahn K. MicroRNAs are key regulators of hepatocellular carcinoma (HCC) cell dissemination-what we learned from microRNA-494. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2016; 5:372-376.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
3. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular Carcinoma Incidence, Mortality, and Survival Trends in the United States From 1975 to 2005. *J Clin Oncol* 2009; 27:1485-1491.
4. Friemel J, Rechsteiner M, Frick L, et al. Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21:1951-1961.
5. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, et al. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(9):541-563.
6. Grimaldi A, Zarone M, Irace C, et al. Non-coding RNAs as a new dawn in tumor diagnosis. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 78:37-50.
7. Southwood D, Singh S, Chatterton Z. Brain-derived cell-free DNA. *Neural Regener Res* 2022; 17(10):2213-2214.
8. Cinque A, Vago R, Trevisani F. Circulating RNA in kidney cancer: what we know and what we still suppose. *Genes* 2021; 12(6):835.
9. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011; 12(12):861-874.
10. Wang W, Han C, Sun Y, et al. Noncoding RNAs in cancer therapy resistance and targeted drug development. *J Hematol Oncol* 2019; 12(1):55.
11. Zhou H, Xu Q, Ni C, et al. Prospects of noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* 2018; 2018:6579436.
12. Song T, Li L, Wu S, et al. Peripheral blood genetic biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Front Oncol* 2021; 11:583714.
13. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005; 11:1753-61.
14. Pino, MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138:2059-72.
15. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011; 12:861-74.
16. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res* 2011; 90:430-40.
17. Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol* 2011; 21:354-61.
18. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010; 101:2087-2092.
19. Zen K, Zhang C-Y. Circulating MicroRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev* 2012; 32:326-348.
20. Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011; 29:4781-8.
21. Tan Y, Ge G, Pan T, et al. A serum microRNA panel as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma related with hepatitis B virus. *PLoS ONE* 2014; 9:e107986.
22. Elemeery MN, Badr AN, Mohamed MA, et al. Validation of a serum microRNA panel as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma post-hepatitis C infection in Egyptian patients. *World J Gastroenterol* 2017; 23:3864-3875.
23. Zhu HT, Liu RB, Liang YY, et al. Serum microRNA profiles as diagnostic biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2017; 37:888-896.
24. An Y, Gao S, Zhao WC, et al. Novel serum microRNAs panel on the diagnostic and prognostic implications of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2018; 24:2596-2604.
25. Cho HJ, Baek GO, Seo CW, et al. Exosomal microRNA-4661-5p-based serum panel as a potential diagnostic biomarker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Med* 2020; 9:5459-5472.
26. Ali HEA, Abdel Hameed R, Effat H, et al. Circulating microRNAs panel as a diagnostic tool for discrimination of HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2017; 41:e51-e62.
27. Jiang L, Cheng Q, Zhang BH, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in hepatocellular carcinoma screening: a validation set from China. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94:e603.
28. El-Tawdi AH, Matboli M, Shehata HH, et al. Evaluation of Circulatory RNA-Based Biomarker Panel in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Diagn Ther* 2016; 20:265-77.
29. Abd El Gwad A, Matboli M, El-Tawdi A, et al. Role of exosomal competing endogenous RNA in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* 2018; 119:8600-8610.
30. Ali HS, Boshra MS, El Meteini MS, et al. lncRNA- RP11-156p1.3, novel diagnostic and therapeutic targeting via CRISPR/Cas9 editing in hepatocellular carcinoma. *Genomics* 2020; 112:3306-3314.
31. Zekri AN, Youssef AS, El-Desouky ED, et al. Serum microRNA panels as potential biomarkers for early detection of hepatocellular carcinoma on top of HCV infection. *Tumour Biol* 2016; 37:12273-12286.
32. Zhang Y, Li T, Qiu Y, et al. Serum microRNA panel for early diagnosis of the onset of hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96:e5642.
33. Zuo D, Chen L, Liu X, et al. Combination of miR-125b and miR-27a enhances sensitivity and specificity of AFP-based diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2016; 37:6539-49.
34. Wu X, Wan R, Ren L, et al. Circulating MicroRNA Panel as a Diagnostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Turk J Gastroenterol* 2022; 33:844-851.
35. Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* 2001; 34:570-5.
36. Han LL, Lv Y, Guo H, et al. Implications of biomarkers in human hepatocellular carcinoma pathogenesis and therapy. *World J Gastroenterol* 2014; 20:10249-61.