

· 临床论著 ·

微小RNA-122在HBV感染慢性肝脏疾病中的表达及其临床意义

陈素玲¹ 李芳¹ 柴海云¹ 王海丽² 马良³

【摘要】目的 探讨HBV感染慢性肝病者血清miR-122的表达水平与HBV DNA载量、HBsAg浓度、ALT、AST、AFP水平之间关系,并探讨其临床意义。**方法** 选取慢性HBV携带患者30例(ASC),慢性乙型肝炎患者(CHB)95例,其中包括轻度30例、中度35例、重度30例。乙型肝炎肝硬化(LC)患者及肝癌(HCC)患者各30例。另选择30例同期健康体检人群血清miR-122含量为基线评价指标。采用实时荧光定量PCR法测定血清miRNA-122含量,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析其相对表达量。**结果** 血清miR-122相对表达量在健康对照组中最低,与其他各组差异具有统计学意义(P 均 < 0.05),CHB轻、中、重度3组患者组间比较,重度 $>$ 中度 $>$ 轻度,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05);血清miR-122相对表达量与血清ALT、AST、HBsAg水平均呈正相关关系($r = 0.894, 0.875, 0.381$, P 均 < 0.01);肝癌患者血清miR-122相对表达量与AFP呈负相关关系($r = -0.673$, $P = 0.001$);血清miR-122相对表达量与总体Ig (HBV DNA)经Pearson相关性分析,两者之间无相关性($r = 0.094$, $P > 0.05$)。**结论** 血清miR-122水平可能是一种能特异、灵敏地反映肝损伤、评估肝损伤的一种指标,且可以对疾病的炎症活动程度进行评估。血清miR-122与血清AFP呈负相关关系,可能对肝癌的评估、预后及治疗评价具有重要意义。

【关键词】 微小RNA-122; 肝炎, 乙型, 慢性; 肝细胞癌; 丙氨酸氨基转移酶; 天门冬氨酸氨基转移酶

The expression and clinical significance of micro RNA-122 in different chronic liver diseases with HBV infection Chen Suling¹, Li Fang¹, Chai Haiyun¹, Wang Haili², Ma Liang³. ¹Department of Infectious Diseases, ²Department of Hematology, ³Central Laboratory of Heping Hospital Attached to Changzhi Medical College, Changzhi 064000, China

Corresponding author: Chen Suling, Email: 13835556402@163.com

【Abstract】Objectives To explore the relationships between serum miR-122 level and HBV DNA load, levels of HBsAg, ALT, AST and AFP in the serum of patients with chronic liver diseases, and to identify the role of miR-122 as a potential clinical marker. **Methods** There were 30 healthy control, 30 chronic HBV carriers (ASC); 95 chronic hepatitis B (CHB) patients including 30 mild cases, 35 moderate cases, 30 severe cases; and 30 cases with hepatitis B cirrhosis and 30 cases with hepatocellular carcinoma were selected, respectively. The serum miRNA-122 levels were assessed by real-time fluorescence quantitative PCR (by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ analysis). **Results** The relative expression of serum miR-122 level in healthy control group was significantly lower than those of all the other groups (P all < 0.05). Among the three groups of CHB patients, the serum miR-122 level were severe $>$ moderate $>$ mild, with significant differences (P all < 0.05). The serum levels of miR-122 and ALT, AST, HBsAg concentration were significantly correlated ($r = 0.894, 0.875, 0.381$; P all < 0.01); the relative expression of miR-122 was negatively correlated with AFP in the serum of patients with hepatocellular carcinoma ($r = -0.673$, $P = 0.001$). By the pearson correlation analysis, there were no correlation between the serum relative expression of miR-122 and the total serum Ig (HBV DNA) ($r = 0.094$, $P > 0.05$). **Conclusions** There was a significant correlation between serum miR-122 level and ALT, AST, indicating that serum miR-122 may be a more specific and sensitive early factor, which

maybe an indicator of liver damage, and could be an index to assess the liver inflammation. The serum miR-122 was negatively correlated with the AFP, which indicates that miR-122 may has important significance for evaluation, prognosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

【Key words】MicroRNA-122; Chronic hepatitis B virus; Hepatocellular carcinoma; Alanine aminotransferase; Aspartate aminotransferase

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种传染性强、且具有很高的种属和细胞特异性的嗜肝病毒,其自然病程复杂而且多变,临床上所表现出的疾病谱也较为广泛,尽管经多年研究,其发病机制目前尚未十分明确。从HBV感染到慢性肝炎、肝硬化,以至于肝癌发病过程中,目前尚无简单易行、且敏感性及特异性均较高的检测指标能够独立地评估肝脏炎症、慢性纤维化程度以及癌变。对于肝脏疾病诊断,不仅需要依据患者的临床症状,同时还需结合抗原、抗体等血清标志物,以及丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)等实验室相关指标的检测。

微小RNA(microRNA, miRNA)是由约19~25个核苷酸的非蛋白质编码的小RNA,普遍存在于真核生物体内,与生长发育,细胞的增殖与凋亡,肿瘤浸润和转移等相关,具有一定的调控作用^[1-2]。其中,miRNA-122是特异表达于肝组织中,随着肝脏发育含量逐渐升高,约占成熟肝组织中所有miRNA的70%^[3-4],与肝脏生理及病理过程密切相关,尽管目前已有miR-122与HBV感染肝病相关方面研究,但大部分研究结果尚不一致,其相关性尚不明确。因此,本研究旨在进一步探讨miR-

122在HBV感染慢性肝病患者中的表达及其与临床实验室相关指标的关系。

资料与方法

一、病例选择

1. 对象选取标准:选取2010年6月至2014年6月就诊于长治医学院附属和平医院门诊和住院患者共185例。入选患者半年内均未使用抗病毒药物及免疫调节剂,排除乙型肝炎以外的合并或重叠感染其他病毒性肝炎的患者,排除自身免疫性肝病患者,排除酒精、化学、药物、中毒等因素引起的肝炎患者,排除合并包括心、肺、胃肠道、胰腺及风湿免疫系统、内分泌等方面的疾病。所有入组病例诊断、慢性乙型肝炎轻、中、重度的分级根据2010年中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[5]中的慢性乙型肝炎诊断标准以及2000年9月中华医学会传染病与寄生虫病学分会以及肝病学分会于西安联合修订的《病毒性肝炎防治方案》^[6]的标准;HCC诊断依据第4届全国肝癌学术大会讨论通过的原发性肝癌诊断标准^[7]。

2. 研究对象分组:乙型肝炎病毒携带者(hepatitis B virus carriers, ASC)30例为ASC组;

表1 研究对象的一般资料

组别	例数	男:女	平均年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)
健康对照组(HC组)	30	18:12	42.20 ± 9.21
乙型肝炎病毒携带组(ASC组)	30	13:17	38.56 ± 7.35
慢性乙型肝炎组(CHB组)			
轻度	30	14:16	39.62 ± 10.28
中度	35	18:17	38.29 ± 8.27
重度	30	18:12	43.36 ± 8.21
肝硬化组(LC组)	30	17:13	40.38 ± 11.30
肝癌组(HCC组)	30	20:10	44.23 ± 6.72

表2 实时定量PCR使用引物列表^[8]

基因名称	双向引物序列(5'→3')
U6	
上游引物	ATTGGAACGATAC AGAGAAGATT
下游引物	GGAACGCTTCACGAATTG
miR-122	
上游引物	CAAGCGTTGGAGTGTGACA
下游引物	CGTCCTACCATTCTCCAGC

慢性乙型肝炎患者 (chronic hepatitis B, CHB) 95 例, 分为3组, 分别为轻度30例, 中度35例和重度30例; 肝硬化患者 (liver cirrhosis, LC) 30例, 为LC组; 肝癌患者 (hepatocellular carcinoma, HCC) 30例, 为HCC组。另选本院同期健康体检人员30例, 作为健康对照组 (healthy control, HC), 为HC组。以上各组在性别、年龄等方面的差异无统计学意义, 具有可比性, 详见表1。

二、方法

1. 血清miR-122的测定

(1) 提取总RNA及其质量鉴定: 选用Trizol试剂 (美国Invitrogen公司) 提取血清中的RNA并保存于 -70°C 。RNA完整性选用1%变性琼脂糖凝胶电泳检测, RNA浓度和纯度选用NanoDrop ND-1000检测。

(2) 实时荧光定量PCR检测: cDNA合成: 总反应体系包括dNTP 2 μl , $5 \times \text{RT Buffer}$ 5 μl , RT特异引物0.3 μl , Total RNA 200 μg , 2.5 U/ μl , Poly A Polymerase 1 μl , RT mix 1 μl , 无RNA酶水补足20 μl , 共20 μl 。反应条件: 37°C , 60 min; 85°C , 5 min。合成的cDNA用于实时定量PCR: 总反应体系包括: $2 \times \text{SYBR Green qPCR Mix}$ 12.5 μl , cDNA 5 μl , 100 nmol/L的PCR特异引物F 1 μl , 100 nmol/L的PCR特异引物R 1 μl , 无RNA酶水补足25 μl 。后混匀, 置于PCR仪。反应条件: 95°C , 15 s, 95°C , 5 min; 40个PCR循环 (60°C , 5 min)。实时定量引物由上海生工生物工程有限公司合成, 见表2。

(3) 结果与计算: 样品miR-122和内参 (U6 snRNA) 分别进行实时荧光定量PCR检测。 $\Delta\text{Ct} = \text{miR122Ct} - \text{U6Ct}$ (值越大, 表达量越低), 血清miR-122采用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 表示。

2. 其他血清指标的测定: 血清 HBV DNA、ALT、AST、AFP、HBsAg、HBeAg的检测: HBV DNA检测亦采用荧光定量PCR法 (仪器型号:

ABI7300, 美国ABI公司)。ALT、AST检测采用生化自动分析仪。AFP采用化学发光法测定。HBsAg及HBeAg检测选用雅培ARCHITECT i2000化学发光免疫分析仪及配套试剂。

三、统计学处理

数据统计分析应用SPSS 17.0统计软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。miR-122的相对表达量 ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) 经对数转换, 经K-S检验数据符合正态分布, 以Levene方差齐性检验, 数据具有方差齐性 ($P > 0.1$)。计量资料组间比较采用方差分析, 相关性分析应用Pearson相关检验方法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、不同组血清miR-122表达量

通过PCR法测定各组人群血清miR-122相对表达量 ($2^{-\Delta\text{Ct}}$), miR-122相对表达量在HC组、ASC组、CHB组、LC组和HCC组均可测得, 处于不同疾病状态下的血清miR-122相对表达量不同 (见图1)。

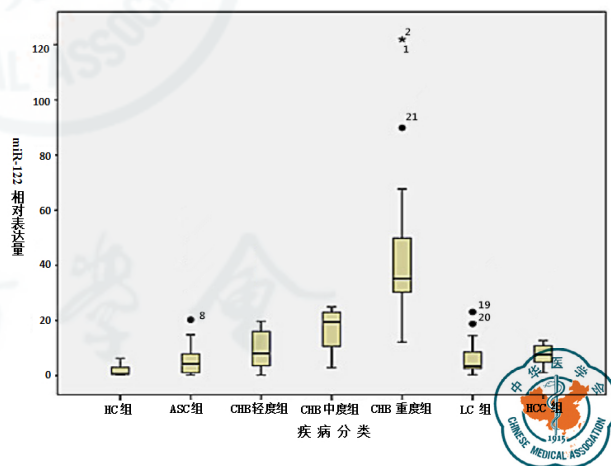


图1 不同组血清 miR-122 的相对表达量 ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) 箱图

表3 血清 miR-122 相对表达量在不同组之间比较及 HBV DNA 等指标的检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	$\text{Ct}_{\text{miR-122}}$	$2^{-\Delta\text{Ct}}$	$\lg 2^{-\Delta\text{Ct}}$	ALT (U/L)	AST (U/L)	\lg (HBV DNA)
HC 组	30	24.57 ± 1.48	1.94 ± 2.00	0.04 ± 0.49	28.29 ± 5.06	28.14 ± 5.36	—
ASC 组	30	23.13 ± 1.97	5.91 ± 5.44	0.48 ± 0.61^a	30.03 ± 3.96	29.23 ± 3.46	7.71 ± 115
CHB 组	95						
轻度	30	21.98 ± 1.51	8.93 ± 6.54	0.78 ± 0.46^{abd}	133.75 ± 27.36	95.89 ± 28.41	4.79 ± 1.42
中度	35	20.87 ± 0.99	16.88 ± 9.87	1.14 ± 0.31^{ab}	321.55 ± 54.67	279.39 ± 56.23	7.71 ± 1.45
重度	30	19.30 ± 0.78	44.99 ± 28.95	1.58 ± 0.25^{ab}	497.21 ± 222.58	453.45 ± 198.61	3.77 ± 1.62
LC 组	30	22.41 ± 1.50	6.19 ± 5.53	0.62 ± 0.44^{ac}	115.42 ± 66.74	122.69 ± 61.94	4.22 ± 1.57
HCC 组	30	21.86 ± 0.98	7.68 ± 3.60	0.81 ± 0.29^{ac}	127.01 ± 36.07	117.20 ± 34.85	3.52 ± 2.03

注: ^a 与 HC 组比较, $P < 0.05$; ^b 组间两两比较, $P < 0.05$; ^c 组间两两比较, $P > 0.05$; ^d 与 LC 组比较, $P > 0.05$

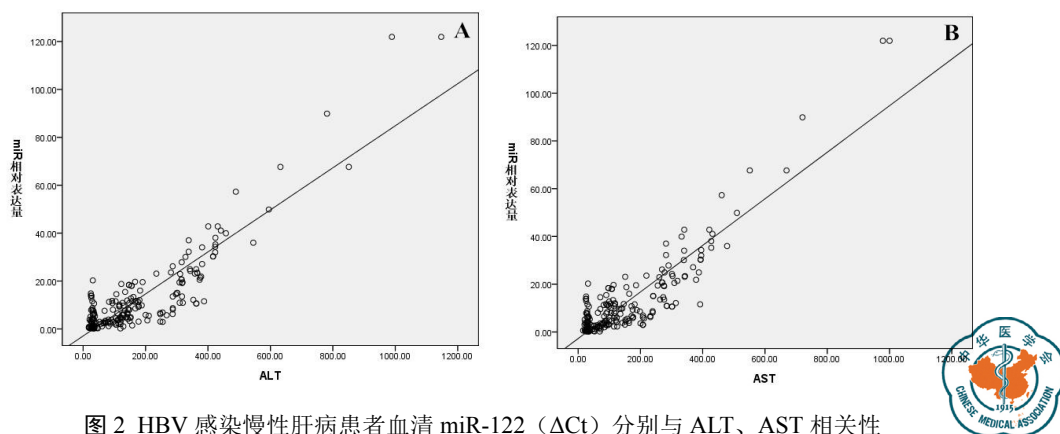


图2 HBV感染慢性肝病患者的血清miR-122 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 分别与ALT、AST相关性

二、血清miR-122相对表达量在不同组之间比较

血清miR-122相对表达量取其对数值, $\lg 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值在健康对照组中最低, 与其他各组差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05)。慢性乙型肝炎组随着炎症活动程度进展 $\lg 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值逐渐升高, 组间比较具有统计学差异, 重度 $>$ 中度 $>$ 轻度 (P 均 < 0.05) ; 硬化组与慢性肝炎 (轻度) 相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; 肝癌组 $\lg 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值与肝硬化组相比无统计学差异 ($P > 0.05$) , 见表3。

三、血清miR-122表达量与ALT、AST的相关性分析:

通过Pearson相关性分析, HBV感染慢性肝病患者的血清miR-122相对表达量与ALT、AST呈显著正相关关系 ($r = 0.894, 0.875, P$ 均 < 0.01) (图2)。

四、血清miR-122相对表达量与HBV DNA的相关性分析

入组患者均检测其外周血HBV DNA水平,

分析血清miR-122相对表达量与总体lg (HBV DNA) 的相关性, 发现两者之间无显著相关性 ($r = 0.094, P > 0.05$) (图3)。本研究根据HBV DNA载量将上述患者分组, 发现乙型肝炎病毒复制水平在 $10^4 \sim 10^6$ 拷贝/ml组、 $10^7 \sim 10^8$ 拷贝/ml组、 $10^2 \sim 10^3$ 拷贝/ml组, 组间差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。但进一步检测上述患者HBeAg, 依据结果将上述患者分为HBeAg (+) 组及HBeAg (-) 组, 两组组间比较, miR-122相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

五、血清miR-122相对表达量与HBsAg的相关性分析

通过测定患者HBsAg浓度, 并与血清miR-122相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 进行相关性分析, 两者之间呈中度相关性 ($r = 0.381, P = 0.000$) (图4)。

六、血清miR-122相对表达量与AFP的相关性分析

肝癌患者血清miR-122相对表达量与AFP呈中度负相关, 即AFP越高, miR-122水平越低 (r

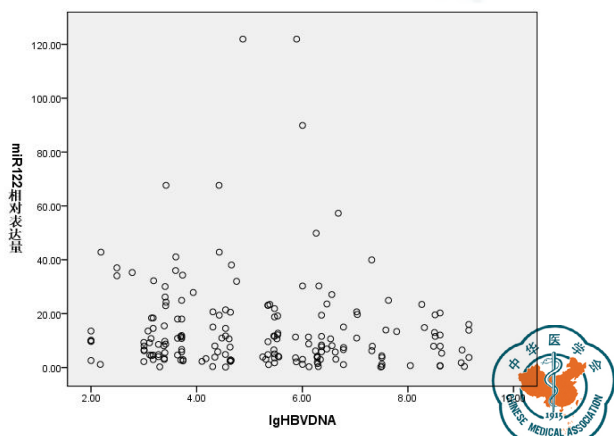


图3 HBV感染慢性肝病患者的血清miR-122相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 与lg (HBV DNA) 相关性

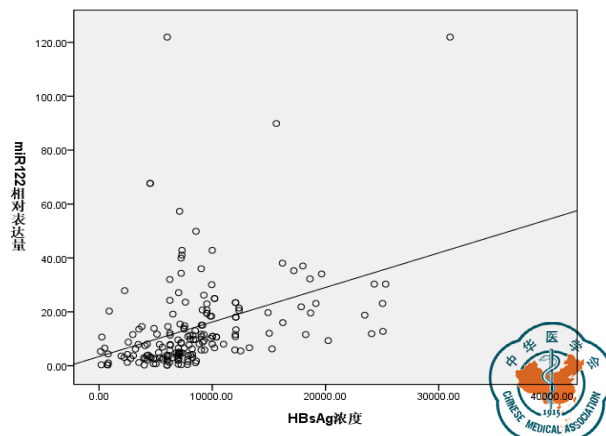


图4 HBV感染慢性肝病患者的血清miR-122相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 与HBsAg浓度相关性

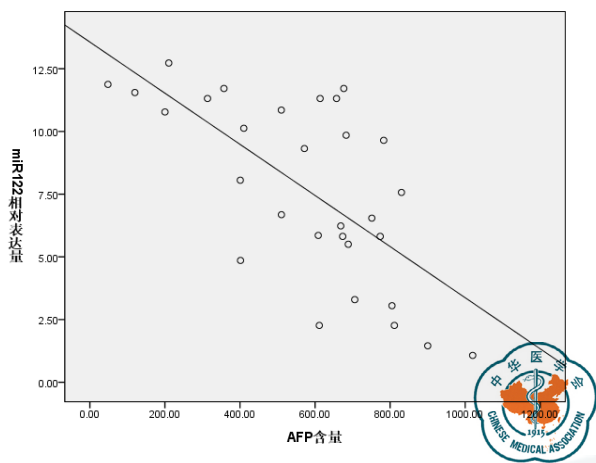


图5 乙型肝炎肝癌患者 miR-122 与 AFP 的相关性

$r = -0.673$, $P = 0.001$) (图5)。

讨 论

miRNAs是近年来发现的调控基因表达的功能分子,在近年来受到广泛关注,其中miRNA-122为肝脏特异性表达,其与肝脏疾病发生、发展之间存在一定的相关性,而且对肝脏疾病的风险评估及其预后具有重要意义^[9-10]。

本研究结果表明,在所有受检人员中均检测到了血清miR-122;血清miR-122相对表达量在健康对照组中最低;慢性活动性乙型肝炎轻、中、重3组随着炎症活动程度进展miR-122水平也逐渐升高。本研究进一步研究其与肝脏炎症活动指标关系,通过分析血清miR-122相对表达量与血清ALT、AST相关性,结果发现miR-122与血清ALT、AST有高度正相关关系,这与目前大部分研究结果一致^[10-11],提示miRNA可作为肝组织损伤的标志物。肝硬化患者血清miR-122相对表达量较对照组升高,与CHB轻度组无差异,但低于CHB中度及重度组,可能是由于肝硬化患者炎症活动较轻的缘故。

随着对miRNA深入研究,发现约50% miRNA存在于肿瘤相关脆性位点或者基因组区域,提示这些miRNA或许与肿瘤发生密切相关^[12]。Kutay等^[13]与Gramantieri等^[14]研究均也发现HCC细胞或组织中miRNA-122表达显著下调,提示miRNA-122是HCC发生发展相关靶基因。本研究结果miR-122相对表达量在肝癌组显著低于慢性肝炎的中、重度组,而较肝硬化组无显著升高,从另一方面也说明miRNA-122在肝癌组表达量相对较低,

这与以上研究结果基本一致。

有研究发现,miR-122是通过对Cyclin G1(细胞周期调节蛋白)调控进而影响p53蛋白的稳定性、转录活性、减少癌细胞转移^[15-17]。推测miR-122可能通过作用于p53途径影响AFP的表达。本研究结果显示肝癌患者血清miR-122与血清AFP含量呈负相关,提示AFP水平可能是肝癌组织miR-122低表达的反映,对评估肝癌治疗效果及评价预后具有重要意义。

通过检测慢性HBV感染者HBV DNA水平,发现血清miR-122相对表达量与总体Ig(HBV DNA)之间无相关性。且miRNA-122与其升高水平比较亦无统计学差异,与Waidmann结果不同^[10],分析原因,可能随着炎症活动加剧,病毒载量水平会有不同程度下降,因miR-122相对表达量与炎症活动正相关,导致本研究其与总体HBV DNA水平无相关性。但具体HBV DNA水平是否会影响miR-122含量有待进一步研究。

目前研究表明,血清HBsAg水平已被证实与肝脏疾病的进展相关^[18-19],且HBV抗原性与血清miR-122的表达有关。朱蕾等^[20]研究也发现HBV抗原蛋白受miR-122调节,Novellino等^[21]发现,HBsAg阳性患者血清中miR-122表达也上升。本研究发现血清HBsAg的水平与miR-122相对表达量呈正相关,但相关系数较低,有待进一步研究证实。

总之,miR-122作为一种肝脏特异性miRNA,本研究发现miRNA-122与ALT、AST有显著相关性,提示miR-122是一种具有潜力的肝脏损伤标志物,且可以对疾病的炎症程度进行评估。血清miR-122与血清AFP呈负相关,可能对肝癌的评估、预后及治疗评价具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 吴瑞珊,温旺荣. 外周血miRNA的诊断意义[J]. 分子诊断与治疗杂志,2012,4(2):131-136.
- 2 Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation[J]. RNA,2003,9(3):277-279.
- 3 Garissimi C, Fulci V, Macino G. MicroRNAs: novel regulators of immunity[J]. Autoimmun Rev,2009,8(6):520-524.
- 4 Chang J, Nicolas E, Marks D, et al. miR-122, a mammalian liver-specific micro RNA is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1[J]. RNA Biol,2004,1(2):106-113.
- 5 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 中华肝脏病杂志2011,19(1):13-24.
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学会,中华医学会肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.
- 7 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌诊断标准[J]. 中华

- 肝脏病杂志,2000,8(3):135-135.
- 8 吴瑞珊, 苏运钦, 余广超, 等. Taqman探针实时荧光定量PCR检测肝脏疾病患者血清中miR-122的表达水平及其临床意义[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(2):348-353.
- 9 Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis[J]. *Mol Carcinog*,2011,50(2):136-142.
- 10 Waidmann O, Bihrer V, Pleli T, et al. Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *J Viral Hepat*,2012,19(2):58-65.
- 11 Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases[J]. *Clin Chem*,2010,56(12):1830-1838.
- 12 朱丽敏, 张思泉, 朱聪, 等. microRNAs在肝细胞癌中的调控机制及临床应用[J]. 医学分子生物学杂志,2013,12(6):360-364.
- 13 Kutay H, Bai S, Datta Motiwala T, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas[J]. *J cell biochem*,2006,99(3):671-678.
- 14 Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*,2007,67(13):6092-6099.
- 15 Baek WK, Kin D, Jung N, et al. Increased expression of cyclin G1 in leiomyoma compared with normal myometrium[J]. *Am J Obstet Gynecol*,2003,188(3):634-639.
- 16 Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, et al. miR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells[J]. *Cancer Res*,2009,69(14):5761-5767.
- 17 杨颖卓, 康鹏, 高杰, 等. 肝特异性miR-122调控肝脏疾病的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,2014,30(5):473-477.
- 18 Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, et al. Hepatitis B surface antigen ser-um levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers[J]. *J Gastroenterology*,2010,139(2):483-490.
- 19 Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective[J]. *Hepatology*,2010,52(4):514-522.
- 20 朱蕾, 陈智, 陈建忠, 等. miR-122对乙型肝炎病毒抗原表达的影响[J]. 浙江大学学报(医学版),2011,40(6):593-597.
- 21 Novellino L, Rossi RL, Bonino F, et al. Circulating hepatitis B surface antigen particles carry hepatocellular microRNAs[J]. *PLoS One*,2012,7(3):e31952.

(收稿日期: 2015-10-30)

(本文编辑: 孙荣华)

陈素玲, 李芳, 柴海云, 等. 微小RNA-122在HBV感染慢性肝脏疾病中的表达及其临床意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2015,9(6):797-802.