

致癌相关环状RNA在慢性乙型肝炎病毒感染者的表达及临床意义

钱舒然 谭靖文 王萌婕 张思航 杨镇英 何越峰 李晖

【摘要】目的 探讨致癌相关环状RNA (circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1以及circ-MORC3) 在慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染者的表达变化及临床意义。**方法** 选择云南大学附属医院/云南省第二人民医院2019年5月至12月住院和门诊收治的100例HBV感染者, 其中慢性乙型肝炎患者50例 (CHB组), HBV携带者50例 (HBV携带组), 另选择同期50例体检者为健康对照组。采用逆转录-实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 法检测入组研究对象外周血白细胞内circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3相对表达水平。采用Spearman相关分析检验circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1、circ-MORC3与乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 浓度、HBV DNA水平的相关性, 并应用ROC曲线评估上述环状RNA对于区分CHB患者和HBV携带者的诊断价值。**结果** CHB组、HBV携带者组和健康对照组患者中circ-ASXL1 ($H = 11.93$ 、 $P = 0.003$)、circ-BRIP1 ($H = 13.24$ 、 $P = 0.001$)、circ-CFLAR ($H = 20.89$ 、 $P < 0.001$)、circ-LPAR1 ($H = 19.33$ 、 $P < 0.001$) 和circ-MORC3 ($H = 14.81$ 、 $P = 0.001$) 表达差异均具有统计学意义。与健康对照组相比, CHB组患者circ-ASXL1 ($Z = -3.26$ 、 $P = 0.001$)、circ-BRIP1 ($Z = -3.52$ 、 $P < 0.001$)、circ-CFLAR ($Z = -4.23$ 、 $P < 0.001$)、circ-LPAR1 ($Z = -4.03$ 、 $P < 0.001$) 和circ-MORC3 ($Z = -3.76$ 、 $P < 0.001$) 表达水平显著升高, 差异有统计学意义; 而HBV携带者组的表达与健康对照组差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。CHB患者和HBV携带者的HBsAg浓度与circ-ASXL1 ($r = 0.261$ 、 $P = 0.009$)、circ-BRIP1 ($r = 0.287$ 、 $P = 0.004$)、circ-CFLAR ($r = 0.211$ 、 $P = 0.037$)、circ-LPAR1 ($r = 0.213$ 、 $P = 0.035$) 和circ-MORC3 ($r = 0.237$ 、 $P = 0.019$) 的表达水平均呈正相关, 而HBV DNA水平与circ-ASXL1 ($r = 0.080$ 、 $P = 0.430$)、circ-BRIP1 ($r = 0.076$ 、 $P = 0.454$)、circ-CFLAR ($r = 0.084$ 、 $P = 0.406$)、circ-LPAR1 ($r = 0.020$ 、 $P = 0.846$) 和circ-MORC3 ($r = 0.070$ 、 $P = 0.492$) 的表达水平无相关性。circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3区分CHB患者和健康人群的ROC曲线下面积分别为0.69 (95%CI: 0.59~0.79)、0.70 (95%CI: 0.60~0.81)、0.75 (95%CI: 0.65~0.84)、0.73 (95%CI: 0.64~0.83) 和0.72 (95%CI: 0.62~0.82)。circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3区分CHB患者和HBV携带者的ROC曲线下面积分别为0.64 (95%CI: 0.53~0.75)、0.64 (95%CI: 0.53~0.75)、0.70 (95%CI: 0.60~0.80)、0.70 (95%CI: 0.60~0.80) 和0.64 (95%CI: 0.50~0.75)。circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3区分HBV携带者和健康人群的ROC曲线下面积分别为0.57 (95%CI: 0.46~0.68)、0.58 (95%CI: 0.47~0.69)、0.57 (95%CI: 0.46~0.68)、0.56 (95%CI: 0.44~0.70) 和0.59 (95%CI: 0.48~0.70)。**结论** circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3可能与CHB的致病调控相关, 可作为生物学标记物区分CHB患者、HBV携带者和健康人群。

【关键词】 肝炎, 乙型, 慢性; 环状RNA; 免疫调控

Expression and clinical significance of carcinoma-related circular RNA in patients with chronic hepatitis B virus infection Qian Shuran, Tan Jingwen, Wang Mengjie, Zhang Sihang, Yang Zhenying, He Yuefeng, Li Hui. Department of Hepatology, Affiliated Hospital of Yunnan University/The Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021, China; Kunming Medical University, Kunming 650500, China
Corresponding author: Li Hui, Email: lihuidoc@126.com

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2021.02.002

基金项目: 云南省医疗卫生单位内设研究机构科研项目 (No. 2018NS0004)

作者单位: 650021 昆明市, 云南大学附属医院/云南省第二人民医院肝病科; 650500 昆明市, 昆明医科大学

通信作者: 李晖, Email: lihuidoc@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the differential expression of circular RNA, such as circ-ASXL1, circ-BRIP1, circ-CFLAR, circ-LPAR1 and circ-MORC3 in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection and their clinical significance. **Methods** Total of 100 patients with HBV infection in Affiliated Hospital of Yunnan University/The Second People's Hospital of Yunnan Province from May to December 2019 were selected, including 50 patients of chronic hepatitis B (CHB), 50 HBV carriers and 50 healthy controls. Expressions of circ-ASXL1, circ-BRIP1, circ-CFLAR, circ-LPAR1 and circ-MORC3 in peripheral blood leukocytes of all subjects were detected by fluorescence real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The correlation between HBV surface antigen (HBsAg) concentration and HBV DNA level and expressions of circ-ASXL1, circ-BRIP1, circ-CFLAR, circ-LPAR1 and circ-MORC3 were analyzed by Spearman correlation analysis. The diagnostic value of these circular RNA in distinguishing between CHB patients and HBV carriers were evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** The expressions of circ-ASXL1 ($H = 11.93$, $P = 0.003$), circ-BRIP1 ($H = 13.24$, $P = 0.001$), circ-CFLAR ($H = 20.89$, $P < 0.001$), circ-LPAR1 ($H = 19.33$, $P < 0.001$) and circ-MORC3 ($H = 14.81$, $P = 0.001$) between patients of CHB group, HBV carriers group and control group were significantly different. The expressions of circ-ASXL1 ($Z = -3.26$, $P = 0.001$), circ-BRIP1 ($Z = -3.52$, $P < 0.001$), circ-CFLAR ($Z = -4.23$, $P < 0.001$), circ-LPAR1 ($Z = -4.03$, $P < 0.001$) and circ-MORC3 ($Z = -3.76$, $P < 0.001$) in CHB group were significantly higher than those in control group, while there were no significant difference between HBV carriers group and control group (all $P > 0.05$). The HBsAg concentration had significantly positive relationship with expression levels of circ-ASXL1 ($r = 0.261$, $P = 0.009$), circ-BRIP1 ($r = 0.287$, $P = 0.004$), circ-CFLAR ($r = 0.211$, $P = 0.037$), circ-LPAR1 ($r = 0.213$, $P = 0.035$), circ-MORC3 ($r = 0.237$, $P = 0.019$) in CHB group and HBV carriers group, but there were no significant correlation between HBV DNA level and expression levels of circ-ASXL1 ($r = 0.080$, $P = 0.430$), circ-BRIP1 ($r = 0.076$, $P = 0.454$), circ-CFLAR ($r = 0.084$, $P = 0.406$), circ-LPAR1 ($r = 0.020$, $P = 0.846$), circ-MORC3 ($r = 0.070$, $P = 0.492$). The area under the ROC curve of these circRNAs for distinguishing patients of CHB from control were 0.69 (95%CI: 0.59-0.79) for circ-ASXL1; 0.70 (95%CI: 0.60-0.81) for circ-BRIP1; 0.75 (95%CI: 0.65-0.84) for circ-CFLAR, 0.73 (95%CI: 0.64-0.83) for circ-LPAR1; 0.72 (95%CI: 0.62-0.82) for circ-MORC3. The area under the ROC curve of these circRNAs for distinguishing patients of CHB from HBV carriers were 0.64 (95%CI: 0.53-0.75) for circ-ASXL1, 0.64 (95%CI: 0.53-0.75) for circ-BRIP1, 0.70 (95%CI: 0.60-0.80) for circ-CFLAR, 0.70 (95%CI: 0.60-0.80) for circ-LPAR1, 0.64 (95%CI: 0.50-0.75) for circ-MORC3. The area under the ROC curve of these circRNAs for distinguishing patients of HBV carriers from control were 0.57 (95%CI: 0.46-0.68) for circ-ASXL1, 0.58 (95%CI: 0.47-0.69) for circ-BRIP1, 0.57 (95%CI: 0.46-0.680) for circ-CFLAR, 0.56 (95%CI: 0.44-0.70) for circ-LPAR1, 0.59 (95%CI: 0.48-0.70) for circ-MORC3. **Conclusions** circ-ASXL1, circ-BRIP1, circ-CFLAR, circ-LPAR1 and circ-MORC3 may be involved in the pathogenic regulation of CHB and could be used as biological markers to distinguish patients of CHB, HBV carriers and healthy controls.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Circular ribonucleic acid; Immunomodulation

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染引起的一种常见传染病, 目前全球约2.4亿慢性HBV感染者, 每年约78万人死于CHB相关并发症^[1]。环状RNA (circular ribonucleic acid, circRNA) 是一类广泛表达于真核细胞的非编码RNA, 因其具有内源性、保守性、相对稳定性特征, 已成为近年来RNA领域研究的热点^[2]。HBV感染引起的肝脏损伤及炎症坏死主要由病毒的免疫应答导致, 此过程涉及到多种免疫细胞、细胞因子及其他分子间的相互作用^[3]。干扰素 (interferon, IFN) 介导的免疫反应是机体抗HBV感染的重要机制, Zhang等^[4]研究证明敲除

circ-0004812可增强HBV感染细胞中IFN- α 和IFN- β 的表达, 还可通过抑制miR-1287-5p促进卵泡抑素样蛋白1 (follistatin-related protein 1, FSTL1) 的表达, 调节HBV诱导的免疫抑制。

CircRNA不仅在抗感染免疫调控中发挥作用, 还广泛参与肿瘤的发生与进展^[5]。Xu等^[6]研究证实了circSETD3是一种新型的肝癌抑制因子, 部分通过circSETD3/miR-421/MAPK14途径抑制肝细胞癌的生长, 是预测肝癌患者预后的生物标志物。越来越多的证据显示, circRNA可能是一种潜在的病情标志物和治疗靶点, 然而关于circRNA与慢性HBV感染所致肝病方面的研究仍然较少。免疫在原发性

肝癌的发病中具有重要意义, HBV慢性感染过程中诱导的免疫失衡与肝癌的进展有着密切联系^[7], 提示致癌相关的circRNA在慢性HBV感染者不同时期可能存在差异表达。因此, 本研究根据Memczak等^[8]报道中所检测到的circRNA谱, 筛选了一批致癌相关的circRNA, 得到circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3这5个circRNA在CHB患者和HBV携带者的外周血白细胞的表达存在差异, 旨在探讨circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3在慢性HBV感染者体内的表达变化及临床意义, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

收集2019年5月至12月云南大学附属医院/云南省第二人民医院门诊和住院收治的患者100例, 其中CHB患者50例, HBV携带者50例。本研究经本院伦理委员会审批通过(批号: 20180335), 并与所有研究对象签署知情同意书。纳入标准: 成人患者; 性别不限; 诊断标准依据中华医学会肝病学分会和感染分会制定的《慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)》^[9]。排除标准: 合并其他原因导致的活动性肝炎; 有未被控制的肾脏、心脏、肺脏、血管性、神经性、消化性、代谢性疾病、免疫缺陷疾病; 合并原发性肝癌或其他肿瘤患者; 孕妇、哺乳期妇女; 接受过肝移植的患者等。

二、方法

1. circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1、circ-MORC3的测定: (1) 提取总RNA: 取外周抗凝血于红细胞裂解液(北京酷来博科技有限公司)中, 裂解离心后收集白细胞, 加入Trizol试剂(宝生物工程(大连)有限公司)提取各组白细胞中的总RNA。

(2) 实时荧光定量PCR检测: 依照说明书利用逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)将RNA逆转录为cDNA, 反应条件: 26℃、2 min, 42℃、5 min, 85℃、5 min, 10℃、2 min, 合成的cDNA用于实时荧光定量PCR。采用罗氏LightCycler 96荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪和FastStart Universal SYBR GreenMaster荧光定量试剂盒(罗氏诊断产品有限公司)检测circ-ASXL1、circ-

BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3相对表达水平, 荧光定量PCR所使用的酶为UltraSYBR Mixture(北京康为世纪生物科技有限公司)。荧光定量PCR反应程序为: 95℃预变性520 s; 95℃变性10 s, 60℃退火10 s, 共41个循环。以 β -Actin作为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值来表示相对表达量, PCR引物序列见表1。

2. 主要指标的测定: HBV DNA水平检测采用美国ABI公司7500型荧光PCR检测仪和中山大学达安基因有限公司试剂盒; 采用美国雅培公司ARCHITECT®i2000全自动分析仪及原装配试剂盒检测乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)浓度。

三、统计学处理

本研究运用SPSS 24.0和Graph Pad Prism 6.0软件进行统计学分析。年龄和HBsAg浓度为符合正态分布的计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验; circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1、circ-MORC3的表达水平和HBV DNA水平为非正态分布的计量资料, 以M(P25, P75)描述, 多组间比较采用Kruskal-Wallis *H*检验, 组间两两比较采用Dunn-Bonferroni检验; 性别为计数资料, 组间比较采用卡方检验。采用Spearman相关分析检验HBV DNA水平、HBsAg浓度与circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1、circ-MORC3表达水平间的相关性; 采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-

表1 circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3引物序列

引物	引物序列(5'→3')
circ-ASXL1	上游: GCATGCCTCAATGCTATGCT
	下游: GGGGAAGTCCCCTTCTCAT
circ-BRIP1	上游: TCTGTGTGCCAGACTGTGAG
	下游: ACACCAAGTTCTGACGAAAAGG
circ-CFLAR	上游: TGGACTTCATAGCCCAGGGA
	下游: GAGCAAGCCCCCTAGGAATCTG
circ-LPAR1	上游: AGGTGTCTAGTCTGAGAAGTCA
	下游: GTAGTTCTGGGGCGTGTTC
circ-MORC3	上游: CATCCTACGTGGACAGAAAGTGAA
	下游: CTGTTCCGTGGAAAACAGAGAAAT
β -actin	上游: CCTGTACGCCAACACAGTGC
	下游: ATACTCCTGCTTGCTGATCC

LPAR1和circ-MORC3表达水平对慢性HBV感染相关肝病的诊断效能。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组患者的基本资料

收集本院门诊和住院收治的患者100例, 其中CHB患者50例(CHB组), HBV携带者50例(HBV携带者组)。CHB组中男性26例, 女性24例, 平均年龄为 (38.68 ± 9.76) 岁; HBV携带者组中男性25例, 女性25例, 平均年龄为 (38.38 ± 12.62) 岁。另选同期健康体检者50例, 男性27例, 女性23例, 平均年龄为 (36.50 ± 12.85) 岁。以上各组研究对象性别($\chi^2 = 0.160$, $P = 0.923$)和年龄($F = 0.499$, $P = 0.608$)差异均无统计学意义, 具有可比性。CHB组HBV DNA水平为 $[2.00 (2.00, 2.00)]$ lgIU/ml, HBV携带者组HBV DNA水平为 $[2.59 (2.00, 4.58)]$ lgIU/ml, 差异具有统计学意义($Z = -3.473$, $P = 0.001$); CHB组的HBsAg浓度为 (3.51 ± 0.76) lgIU/ml, HBV携带者组HBsAg浓度为 (2.96 ± 1.30) lgIU/ml, 差异具有统计学意义($t = 6.7$, $P = 0.011$)。

二、5种环状RNA在CHB组、HBV携带者组及健康对照组外周血白细胞中的表达

circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3在CHB组、HBV携带者组和健康对照组中表达差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。与健康对照组比较, circ-ASXL1、circ-

BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3在CHB组的表达均升高, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.05); HBV携带者组5种环状RNA的表达水平与CHB组差异有统计学意义(P 均 < 0.05), 但与健康对照组差异无统计学意义(P 均 > 0.05), 见表2。

三、5种环状RNA与慢性HBV感染者临床主要指标的相关性

相关性分析结果如表3所示: CHB患者和HBV携带者的HBsAg浓度与circ-ASXL1 ($r = 0.261$, $P = 0.009$)、circ-BRIP1 ($r = 0.287$, $P = 0.004$)、circ-CFLAR ($r = 0.211$, $P = 0.037$)、circ-LPAR1 ($r = 0.213$, $P = 0.035$)、circ-MORC3 ($r = 0.237$, $P = 0.019$)的表达水平呈正相关, 见图1; 而HBV DNA水平与circ-ASXL1 ($r = 0.080$, $P = 0.430$)、circ-BRIP1 ($r = 0.076$, $P = 0.454$)、circ-CFLAR ($r = 0.084$, $P = 0.406$)、circ-LPAR1 ($r = 0.020$, $P = 0.846$)、circ-MORC3 ($r = 0.070$, $P = 0.492$)的表达水平无相关性, 见图2。

四、5种环状RNA区分CHB患者、HBV携带者和健康人群的诊断价值

circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3相对表达水平分别以2.31、2.71、2.22、3.53和2.71为临界值时, 区分CHB患者和健康人群的ROC曲线下面积为0.69 (95%CI: 0.59~0.79)、0.70 (95%CI: 0.60~0.81)、0.75 (95%CI: 0.65~0.84)、0.73 (95%CI:

表2 5种环状RNA在各组研究对象白细胞中的表达 [M (P25, P75)]

组别	例数	circ-ASXL1	circ-BRIP1	circ-CFLAR	circ-LPAR1	circ-MORC3
CHB组	50	1.77 (0.80, 5.27)	2.12 (0.85, 6.29)	2.81 (1.01, 5.20)	3.17 (0.99, 5.89)	2.21 (0.92, 4.89)
HBV携带者组	50	1.08 (0.64, 2.21)	1.22 (0.66, 2.48)	1.07 (0.72, 2.17)	1.20 (0.65, 2.06)	1.28 (0.67, 2.43)
健康对照组	50	1.00 (0.56, 1.47)	0.97 (0.48, 1.79)	0.99 (0.56, 1.56)	1.03 (0.59, 1.77)	0.96 (0.48, 1.64)
H 值		11.93	13.24	20.89	19.33	14.81
P 值		0.003	0.001	< 0.001	< 0.001	0.001

注: circ-ASXL1: CHB组 vs. HBV携带者组: $Z = -2.42$, $P = 0.016$, CHB组 vs. 健康对照组: $Z = -3.26$, $P = 0.001$; HBV携带者组 vs. 健康对照组: $Z = -1.17$, $P = 0.244$ 。circ-BRIP1: CHB组 vs. HBV携带者组: $Z = -2.35$, $P = 0.019$, CHB组 vs. 健康对照组: $Z = -3.52$, $P < 0.001$; HBV携带者组 vs. 健康对照组: $Z = -1.37$, $P = 0.170$ 。circ-CFLAR: CHB组 vs. HBV携带者组: $Z = -3.46$, $P = 0.001$, CHB组 vs. 健康对照组: $Z = -4.23$, $P < 0.001$, HBV携带者组 vs. 健康对照组: $Z = -1.20$, $P = 0.230$ 。circ-LPAR1: CHB组 vs. HBV携带者组: $Z = -3.43$, $P = 0.001$, CHB组 vs. 健康对照组: $Z = -4.03$, $P < 0.001$, HBV携带者组 vs. 健康对照组: $Z = -0.96$, $P = 0.340$ 。circ-MORC3: CHB组 vs. HBV携带者组: $Z = -2.39$, $P = 0.017$, CHB组 vs. 健康对照组: $Z = -3.76$, $P < 0.001$, HBV携带者组 vs. 健康对照组: $Z = -1.51$, $P = 0.130$ 。

表3 5种环状RNA与HBV DNA、HBsAg相关性分析

指标	circ-ASXL1		circ-BRIP1		circ-CFLAR		circ-LPAR1		circ-MORC3	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
HBV DNA	0.080	0.430	0.076	0.454	0.084	0.406	0.020	0.846	0.070	0.492
HBsAg	0.261	0.009	0.287	0.004	0.211	0.037	0.213	0.035	0.237	0.019

0.64~0.83)和0.72 (95%CI: 0.62~0.82), 以上5个ROC曲线下面积两两比较(方法参照金丕焕主编《医用统计方法》^[10]第2版)差异均无统计学意义, 提示上述circ-RNA区分CHB患者和健康人群的诊断价值差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见图3和表4。

circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3相对表达水平分别以2.76、2.45、2.27、3.19和3.30为临界值时, 区分CHB患者和HBV携带者的ROC曲线下面积为0.64 (95%CI: 0.53~0.75)、0.64 (95%CI: 0.53~0.75)、0.70 (95%CI: 0.60~0.80)、0.70 (95%CI: 0.60~0.80)和0.64 (95%CI: 0.50~0.75), 以上5个ROC曲线下面积两两比较

(方法同前^[10])差异均无统计学意义, 提示上述circ-RNA区分CHB患者和HBV携带者的诊断价值差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见图4和表4。

circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3相对表达水平分别以1.68、1.83、0.71、0.91和2.13为临界值时, 区分HBV携带者和健康人群的ROC曲线下面积为0.57 (95%CI: 0.46~0.68)、0.58 (95%CI: 0.47~0.69)、0.57 (95%CI: 0.46~0.68)、0.56 (95%CI: 0.44~0.70)和0.59 (95%CI: 0.48~0.70), 以上5个ROC曲线下面积两两比较(方法同前^[10])差异均无统计学意义, 提示上述circ-RNA区分HBV携带者和健康人群的诊断价值差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见图5和表4。

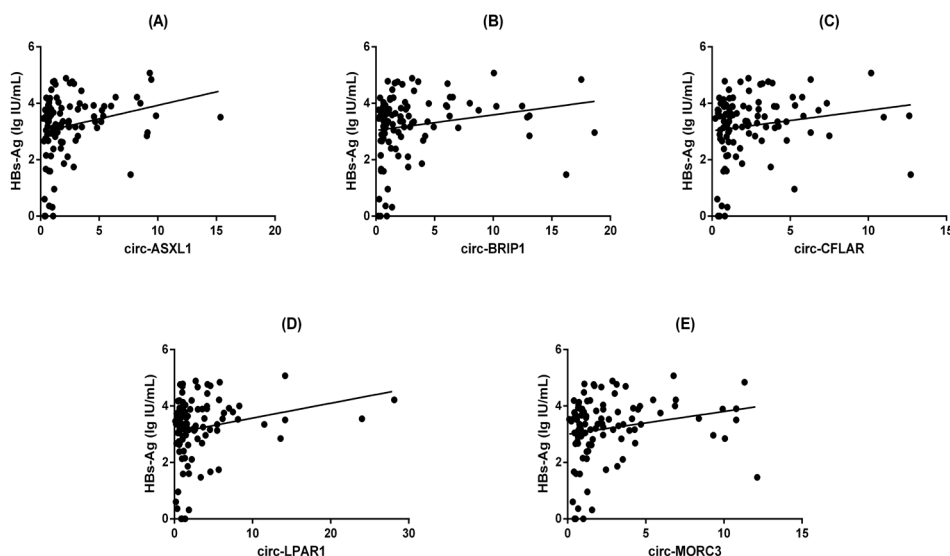


图1 5种circRNA与HBsAg浓度相关性分析

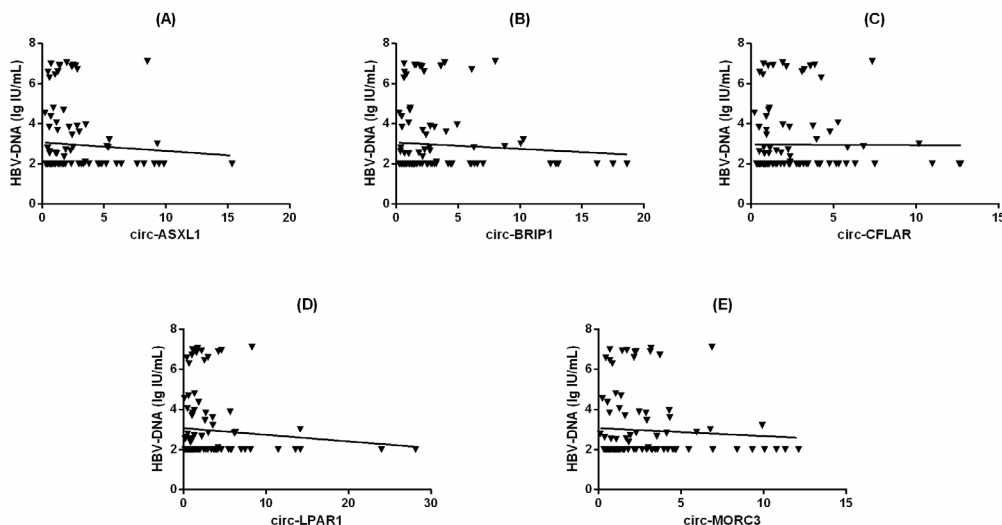


图2 5种circRNA与HBV DNA水平相关性分析

表4 5种环状RNA的诊断效能

组别	circ-ASXL1	circ-BRIP1	circ-CFLAR	circ-LPAR1	circ-MORC3
CHB组 vs. 健康对照组					
AUC (95%CI)	0.69 (0.59~0.79)	0.70 (0.60~0.81)	0.75 (0.65~0.84)	0.73 (0.64~0.83)	0.72 (0.62~0.82)
灵敏度 (%)	48.0	44.0	58.0	48.0	52.0
特异度 (%)	90.0	94.0	88.0	88.0	94.0
阳性预测值 (%)	82.8	88.0	82.9	88.9	80.8
阴性预测值 (%)	63.4	62.7	67.7	64.4	60.8
CHB组 vs. HBV携带者组					
AUC (95%CI)	0.64 (0.53~0.75)	0.64 (0.53~0.75)	0.70 (0.60~0.80)	0.70 (0.60~0.80)	0.64 (0.50~0.75)
灵敏度 (%)	44.0	48.0	58.0	50.0	40.0
特异度 (%)	86.0	76.0	78.0	90.0	86.0
阳性预测值 (%)	74.2	66.7	72.5	83.3	70.1
阴性预测值 (%)	60.9	59.4	65.8	64.2	60.0
HBV携带者组 vs. 健康对照组					
AUC (95%CI)	0.57 (0.46~0.68)	0.58 (0.47~0.69)	0.57 (0.46~0.68)	0.56 (0.46~0.70)	0.59 (0.48~0.70)
灵敏度 (%)	38.0	40.0	78.0	68.0	32.0
特异度 (%)	82.0	78.0	40.0	48.0	88.0
阳性预测值 (%)	70.4	64.5	56.5	57.6	76.2
阴性预测值 (%)	57.5	56.5	64.5	61.0	57.0

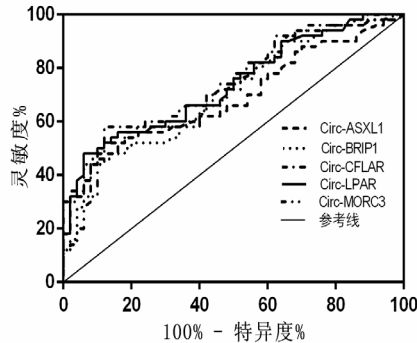


图3 5种circRNA区分CHB患者和健康人群的ROC曲线

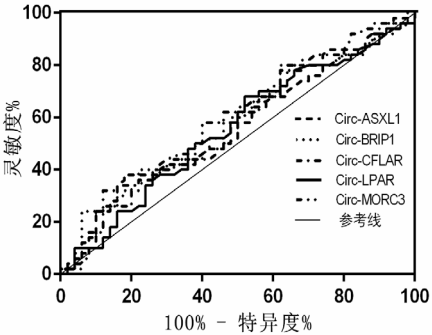


图5 5种circRNA区分HBV携带者和健康人群的ROC曲线

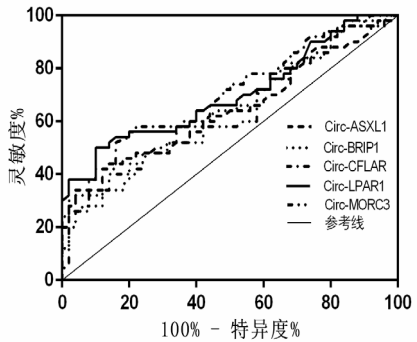


图4 5种circRNA区分CHB患者和HBV携带者的ROC曲线

讨论

circRNA通过内含子或外显子经非经典剪接方式形成，是一类不具有5'-末端帽子和3'-末端poly (A) 尾巴的RNA分子，曾被认为是RNA错误剪

接或者剪接过程中产生的副产物^[11-12]。有研究证实，部分circRNA拥有大量的miRNA结合位点，如hsa-circ-002048拥有36个EB病毒编码的miRNA结合位点，可作为miRNA海绵 (miRNA sponge) 竞争性结合miRNA，影响下游靶基因表达^[13]，提示circRNA在HBV感染过程中也可通过类似机制来发挥免疫调控功能。慢性HBV感染的自然史包括免疫耐受期 (慢性HBV携带状态)、免疫清除期 (HBeAg阳性CHB)、免疫控制期 (非活动HBsAg携带状态) 和再活动期 (HBeAg阴性CHB)^[14]，关于circRNA在HBV感染不同时期的具体机制及作用尚不明确。本研究结果显示，CHB组患者外周血白细胞中circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3表达水平与HBV携带组和健康对照组相比上调，提示

circRNA在CHB患者、HBV携带者和健康人群中表达存在差异,而上述circRNA在CHB发病机制及免疫调控中的功能尚待深入探讨。

近年来大量研究发现, circRNA通过与疾病关联的miRNA相互作用,在肿瘤起始和进展中发挥重要功能^[15-16]。circ-ASXL1被证实在膀胱肿瘤组织中的表达明显上调,可用来预测膀胱癌的总生存率^[17];研究发现circ-MORC3与下咽鳞状细胞癌的肿瘤分期和大小相关^[18], circ-LPAR1可通过与miR-762结合而在肿瘤侵袭和转移中起关键作用^[19], BRIP1突变会增加卵巢癌、乳腺癌及结肠癌的患病风险^[20-21], CFLAR基因编码凋亡抑制蛋白c-FLIP,而c-FLIP过表达有利于癌细胞逃脱凋亡机制^[22-23],关于BRIP1、CFLAR环状RNA的功能有待深入研究。与线状RNA相比, circRNA更具有稳定性,广泛表达于人的外泌体和血清当中,提示其在作为疾病分子标记物方面更具价值^[24]。故本研究运用qRT-PCR法检测致癌相关circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3在CHB患者、HBV携带者及健康对照组外周血白细胞中的表达水平,结果显示上述circRNA在CHB组表达水平较健康对照组和HBV携带组上调,可作为区分HBV感染不同时期的潜在标记物。本研究中HBV携带组与健康对照组的circRNA表达水平差异无统计学意义,考虑可能与样本量相对较少有关,尚需增加样本量进一步研究证实。

HBsAg定量检测不仅能作为HBV感染的标志,还可用于评估HBV在肝内复制水平和活跃程度,并判断疾病进展^[25]。HBV DNA定量也可用于HBV感染后病毒复制水平的评估,是选择抗病毒适应证及评判疗效的重要参考。本研究采用相关性分析评估circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3的表达水平与血清HBsAg浓度及HBV DNA水平间相关性,结果表明上述circRNA与HBsAg浓度呈正相关,与HBV DNA水平无相关性,提示circRNA可能与HBV复制有关,但二者相关系数较低,尚需进一步研究证实其临床价值。Wang等^[26]发现, circRNA-10156可能作为miR-149-3p的分子海绵抑制肝癌细胞增殖,可为HBV相关性肝癌提供前瞻性分子标记物和治疗靶标。有研究证实^[27]部分circRNA在CHB患者体内通过与miRNA相互作用参与致病机制,有望成为HBV感染相关肝病的生物标记物。本研究

运用ROC曲线分析circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1和circ-MORC3对于区分CHB患者和HBV携带者的诊断价值,结果表明上述circRNA可作为区分CHB组与健康对照组、CHB组与HBV携带者组的指标,但本研究样本量相对较少,故存在局限性,尚需扩大样本量后加以验证。

综上, circ-ASXL1、circ-BRIP1、circ-CFLAR、circ-LPAR1以及circ-MORC3在CHB患者和HBV携带者的外周血白细胞中表达存在差异,可能与CHB的致病调控相关,有望作为区分慢性HBV感染者不同时期的生物学标记物。

参 考 文 献

- [1] Hadziyannis E, Laras A. Viral biomarkers in chronic HBeAg negative HBV infection[J]. *Genes*,2018,9(10):469.
- [2] 曾奇虎,翁静飞,李小林,等. 环状RNA的研究进展[J]. *海南医学*,2019,30(18):2427-2430.
- [3] 张梦洁,缪红军. 环状RNA在免疫应答及肺部感染性疾病中的作用[J]. *医学综述*,2019,25(7):1287-1291.
- [4] Zhang L, Wang Z. Circular RNA hsa_circ_0004812 impairs IFN-induced immune response by sponging miR-1287-5p to regulate FSTL1 in chronic hepatitis B[J]. *Virol J*,2020,17(1):33-42.
- [5] 张蕾,张克明,方文捷,等. 环状RNA在人类疾病中的作用及研究进展[J]. *菌物学报*,2019,38(8):1213-1222.
- [6] Xu L, Feng X, Hao X, et al. CircSETD3 (Hsa_circ_0000567) acts as a sponge for microRNA-421 inhibiting hepatocellular carcinoma growth[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2019,38(1):98.
- [7] 毛莉莎,宋庆峰,马天骏,等. HBV感染所致免疫失衡与肝细胞癌的研究进展[J]. *中国癌症防治杂志*,2020,12(2):232-236.
- [8] Memczak S, Papavasileiou P, Peters O, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood[J]. *PLoS One*,2015,10(10):e141214.
- [9] 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(2015年版)[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2015,7(3):1-18.
- [10] 金丕焕主编. 医用统计方法[M]. 2版. 复旦大学出版社,2003:428-431.
- [11] Zheng Q, Bao C, Guo W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. *Nat Commun*,2016,7(1):453-461.
- [12] Song H, Liu Q, Liao Q. Circular RNA and tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell Int*,2020,20:211.
- [13] Ghosal S, Das S, Sen R, et al. HumanViCe: host ceRNA network in virus infected cells in human[J]. *Front Genet*,2014,5:249-261.
- [14] 王贵强,王福生,庄辉,等. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2019,13(6):441-466.
- [15] Huang XY, Zhang PF, Wei CY, et al. Circular RNA circMET drives immunosuppression and anti-PD1 therapy resistance in hepatocellular carcinoma via the miR-30-5p/snail/DPP4 axis[J]. *Mol Cancer*,2020,19(8):394-424.

- [16] Zhou J, Li X, Wu X, et al. Exosomes released from tumor-associated macrophages transfer miRNAs that induce a Treg/Th17 cell imbalance in epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(12):1578-1592.
- [17] Tang G, Xie W, Qin C, et al. Expression of circular RNA circASXL1 correlates with TNM classification and predicts overall survival in bladder cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(8):8495-8502.
- [18] Guo Y, Huang Q, Zheng J, et al. Diagnostic significance of downregulated circMORC3 as a molecular biomarker of hypopharyngeal squamous cell carcinoma: a pilot study[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:43-49.
- [19] Lin G, Sheng H, Xie H, et al. circLPAR1 is a novel biomarker of prognosis for muscle-invasive bladder cancer with invasion and metastasis by miR-762[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3):3537-3547.
- [20] Suszynska M, Ratajska M, Kozłowski P. BRIP1, RAD51C, and RAD51D mutations are associated with high susceptibility to ovarian cancer: mutation prevalence and precise risk estimates based on a pooled analysis of ~30, 000 cases[J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1):50.
- [21] Ali M, Delozier CD, Chaudhary U. BRIP-1 germline mutation and its role in colon cancer: presentation of two case reports and review of literature[J]. *BMC Med Genet*, 2019, 20(1):75.
- [22] Faiz A, Heijink IH, Vermeulen CJ, et al. Cigarette smoke exposure decreases CFLAR expression in the bronchial epithelium, augmenting susceptibility for lung epithelial cell death and DAMP release[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):12426.
- [23] Zheng H, Zhang Y, Zhan Y, et al. Expression of DR5 and cFLIP proteins as novel prognostic biomarkers for nonsmall cell lung cancer patients treated with surgical resection and chemotherapy[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(6):2363-2370.
- [24] Wang Y, Li Z, Xu S, et al. Novel potential tumor biomarkers: Circular RNAs and exosomal circular RNAs in gastrointestinal malignancies[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(7):e23359.
- [25] 于德敏, 张欣欣. 血清HBsAg定量检测在慢性乙型肝炎临床诊疗中的应用及其意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(10):2150-2155.
- [26] Wang M, Gu B, Yao G, et al. Circular RNA expression profiles and the pro-tumorigenic function of circRNA_10156 in hepatitis B virus-related liver cancer[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(10):1351-1365.
- [27] Zhou TC, Li X, Chen LJ, et al. Differential expression profile of hepatic circular RNAs in chronic hepatitis B[J]. *J Viral Hepat*, 2018, 25(11):1341-1351.

(收稿日期: 2020-06-09)
(本文编辑: 孙荣华)

钱舒然, 谭婧文, 王萌婕, 等. 致癌相关环状RNA在慢性乙型肝炎病毒感染者的表达及临床意义[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志 (电子版)*, 2021, 15(2):78-85.