

乙型病毒性肝炎患者血浆中 miR-122 及 miR-155 动态表达及意义

李雪^{1,2}, 王悦³, 张扬⁴, 蔡海峰⁴, 冯福民⁵, 张美航⁶,
吴冬雪¹, 王雪¹, 张咪¹, 朱晗瑀¹, 陈琦², 杨帆²

摘要 目的 动态观察乙肝患者血浆中 miR-122、miR-155 的表达并分析其与炎症因子、细胞周期因子的相关性。方法 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测两组血浆中 miR-122、miR-155 的表达水平; ELISA 检测炎症因子白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 和细胞周期因子 p53、CyclinD1 的表达水平。结果 乙肝患者血浆中 miR-122、miR-155 均明显升高 ($P < 0.05$); 在继续治疗的过程中, 患者血浆中 miR-122 先升高再下降, miR-155 表达下降。miR-122、miR-155 的表达与丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、IL-6、TNF- α 、细胞周期因子 CyclinD1 等均呈正相关 ($P < 0.01$); 其中 miR-155 与其相关性更明显; 同时 miR-155 与 p53 呈负相关 ($P < 0.01$)。结论 乙型病毒性肝炎患者血浆中 miR-122 和 miR-155 的异常表达与乙型肝炎所致肝损伤有关, 为乙型病毒性肝炎导致的肝损伤的监测及治疗提供了新思路。

关键词 乙型病毒性肝炎; 非编码 RNA; 肝损伤; 炎症因子; 细胞周期因子

中图分类号 R 512.6+2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0447-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.024

乙型病毒性肝炎 (viral hepatitis type B) 是由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 引起以肝脏急性或慢性炎性损伤为主的传染病。HBV 感染是慢性肝炎、肝硬化、肝癌的危险因素^[1]。因此, 动态监控乙肝患者不同阶段肝指标的损伤情况, 可以使患者更早的得到治疗。目前临床上多采用丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 作为肝损伤的检测指标, 在肝损伤诊断、治疗效果评价中具

有重要作用, 但其特异性较差。miRNAs^[1] 作为非编码 RNA 的一种, 越来越受到研究者的关注。李玉红等^[2] 发现 miR-122 可通过调控其下游靶基因从而导致肝损伤的发生。Luna et al^[3] 发现在 HBV 感染患者中血清 miR-122 的表达增加, 且与肝脏损伤程度密切相关。因此, 研究人员推测 miR-122 可能参与了乙肝的发生发展。miR-155 与乙型肝炎或丙型肝炎病毒感染相关的肝细胞癌密切相关, 研究^[4] 表明 miR-155 在调节炎症-肿瘤过程中具有重要作用。

现对乙肝患者血浆 miR-122、miR-155 进行实时监测, 分析其与 ALT、AST 及相关因子的关系, 为临床上早发现和治理 HBV 导致的肝损伤提供新思路^[3]。

1 材料与方法

1.1 病例资料 2015 年 9 月~2016 年 9 月在唐山市第四医院住院的乙肝患者共 86 例作为研究对象, 体检健康者共 101 例作为对照组, 且民族均为汉族。研究对象均签订知情同意书。

纳入标准: 对照组为 ALT、AST 正常的健康体检者, 乙肝组均符合乙型病毒性肝炎诊断标准 (WS299-2008); 年龄 18~72 (5.12 \pm 2.35) 岁^[1]。

排除标准: 除 HBV 外的其他病毒感染者; 孕产妇; 合并其他肝病的患者; 服用引起肝功异常药物者; 有恶性肿瘤、血液病者; 近 1 个月内有输血史者^[1]。

1.2 问卷调查 收集乙肝组及对照组的基础资料、抗病毒治疗方案、个人病史及用药史。

1.3 血液标本的收集与处理 连续收集研究对象 5 次血样本, 即入院后治疗前的第 1 份静脉血, 治疗 1、2、3、4 周的静脉血; 离心取上清液于 EP 管中, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 血浆中相关非编码 RNA 检测

1.4.1 引物序列 在 Pubmed 上搜索出各基因的完整序列; 引物的设计及合成均来自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。见表 1。

2020-02-01 接收

基金项目: 河北省研究生创新资助项目 (编号: 2016198)

作者单位: 华北理工大学¹ 公共卫生学院、² 经济学院、⁵ 医学实验研究中心、⁶ 人事处, 唐山 063000

³ 华北理工大学附属医院病案科, 唐山 063000

⁴ 唐山市人民医院, 唐山 063000

作者简介: 李雪, 女, 讲师, 博士;

冯福民, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: fm_feng@sina.com

表1 扩增基因及引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
U6	RT:AACGCTTCACGAATTTGCGTC F:GCTCGGTTCCGGCAGCACA R:GAGGTATTCCGACCAGAGGA
miR-122	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGCTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACCAAAACA F:ATTGCGGTGGAGTGTCTCATGG R:AACCACTGCAGCGTCCGAGG
miR-155	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGCTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACACCCCT F:ACTCGGCGGTAATGCTAATCGT R:ATCCAGTGCAGCGTCCGAGG

1.4.2 qRT-PCR 检测 miR-122、miR-155 的 mRNA 表达水平 TRIzol 法提取血浆总 RNA 测其浓度及纯度。反转录合成 cDNA RT-PCR 检测 mRNA 表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算结果。

1.5 ELISA 法检测血浆中白细胞介素 (interleukin, IL)-6、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 、p53、CyclinD1 等因子的含量 试剂盒室温平衡 20 min 后取出板条,设置标准孔和样本孔,标准孔加不同浓度标准品各 50 μ l,样本孔加血清 10 μ l 同时加入 40 μ l 样本稀释液,各孔加入辣根过氧化物酶,封板膜封住 37 $^{\circ}$ C 温育后,洗板 5 次,每孔加入底物 A、B 37 $^{\circ}$ C 温育后,加终止液,酶标仪选择波长 450 nm 处检测吸光度值 (optical density, OD) 值,最后通过标准曲线方程计算蛋白含量。ELISA 温育过程不要贪快,要充分温育。试剂盒购自北京冬歌博业生物科技有限公司 (批号:201611)。

1.6 统计学处理 用 SPSS 23.0 对数据进行分析,一般因素采用 χ^2 检验,计量资料采用进行统计描述,检测方差齐性,方差齐时,组间比较采用单因素方差进行分析,两两比较采用 LSD 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义^[4]。

2 结果

2.1 研究对象一般情况 两组间在性别、年龄、文化程度、吸烟、饮酒等方面差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),两组具有可比性。见表 2。

2.2 miR-RNA 及其相关因子在对照组中的可信区间 SPSS 软件对健康对照者血浆中 miR-122、miR-155、IL-6、TNF- α 、p53 及 CyclinD1 的表达水平进行统计描述,为实验组各指标的表达水平提供参考,见表 3。

2.3 miR-RNA 及其相关因子在乙肝患者血浆中的动态变化情况 结果显示,miR-122、miR-155 在乙型肝炎患者血浆中均存在异常表达。对乙肝组 86

例患者血浆进行 5 个时间点动态监测,检测时点为 0 (入院第 1 份血液标本)、1、2、3、4 周,每组样本量分别为 86、86、86、11、7 例。结果表明 miR-122 表达在治疗第 2 周时表达量出现高峰,而在治疗第 3、4 周时表达水平逐渐降低;miR-155 的表达则随着治疗周期的延长逐渐降低,并且与刚入院时相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

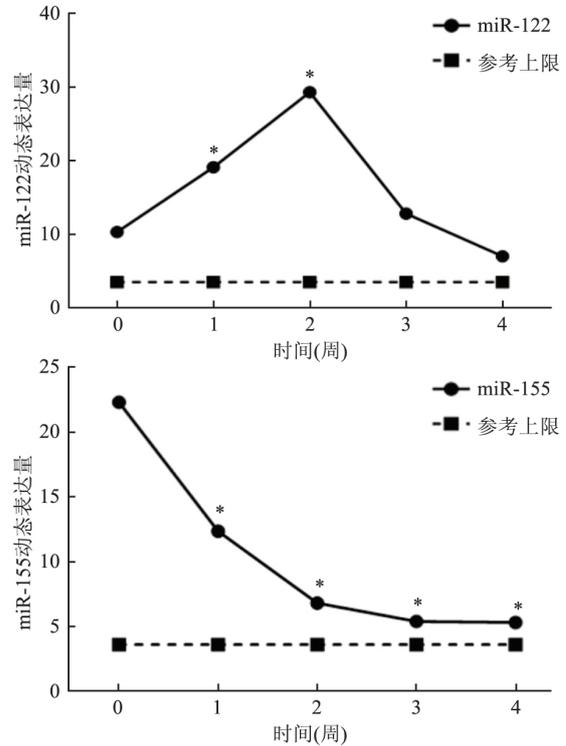


图1 乙肝患者血浆各个时点 miR-122、miR-155 动态变化与入院时(0 周)比较:* $P < 0.05$

表2 乙肝组和健康对照组一般情况分布 [n (%)]

一般因素	乙肝组 (n = 86)	健康对照组 (n = 101)	χ^2 值	P 值
性别			5.78	0.13
男	63 (73.2)	65 (64.4)		
女	23 (26.8)	36 (35.6)		
年龄 (岁)			1.70	0.21
18 ~ 30	12 (13.0)	20 (19.8)		
> 30 ~ 45	33 (35.6)	48 (47.5)		
> 45 ~ 60	37 (40.0)	32 (31.7)		
> 60 ~ 72	4 (4.4)	1 (1.0)		
文化程度			0.17	0.94
小学及以下	16 (18.6)	17 (16.8)		
初中	31 (36.0)	39 (38.6)		
高中及以上	39 (45.4)	45 (44.6)		
吸烟			0.04	0.89
吸烟	49 (57.0)	59 (58.4)		
不吸烟	37 (43.0)	42 (41.6)		
饮酒			1.90	0.18
饮酒	57 (66.2)	57 (56.4)		
不饮酒	29 (33.8)	44 (43.6)		

表3 miR-RNA 及其相关因子在健康对照者血浆中的表达

指标	均数	标准差	95% CI	
			下限	上限
miR-122	2.51	0.15	2.24	2.79
miR-155	2.39	0.09	2.19	2.60
IL-6	274.49	3.76	267.01	281.98
TNF- α	49.79	8.18	48.17	51.39
p53	939.97	14.00	912.15	967.79
CyclinD1	186.33	1.72	182.95	189.69

IL-6、TNF- α 、Cyclin D1 表达随着治疗周期的延长逐渐下降,并且与刚入院相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。p53 的表达水平随着治疗周期的延长则呈现上升趋势,与刚入院时相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图2、3。

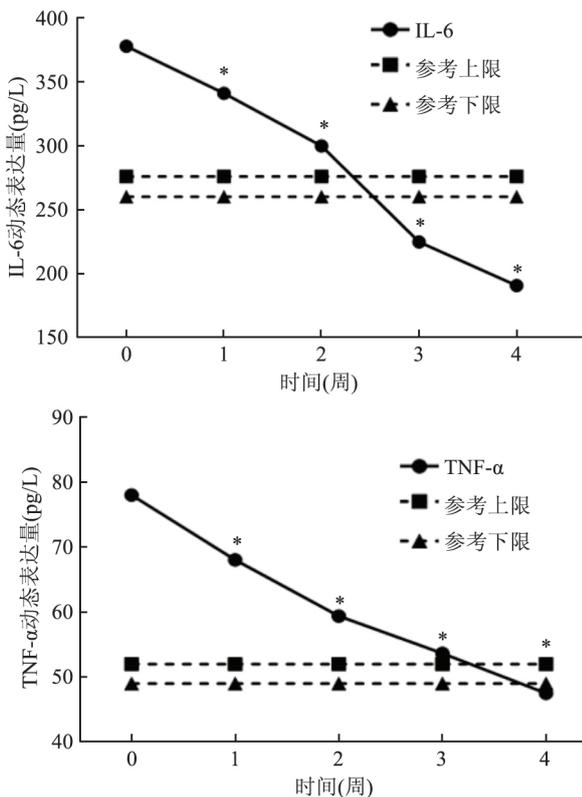


图2 乙肝患者血浆各个时点 IL-6、TNF- α 动态变化与入院时(0周)比较: * $P < 0.05$

2.4 miR-RNA 与肝功指标及相关因子的相关性
结果显示, miR-122、miR-155 与 ALT、AST、IL-6、TNF- α 、CyclinD1 等均呈正相关, miR-122 与 p53 呈正相关, 但 miR-155 与 p53 呈负相关; 且 miR-122、miR-155 均与 ALT 的相关系数较大。见表4。

3 讨论

中国甲乙类法定报告传染病中, 乙型肝炎的发

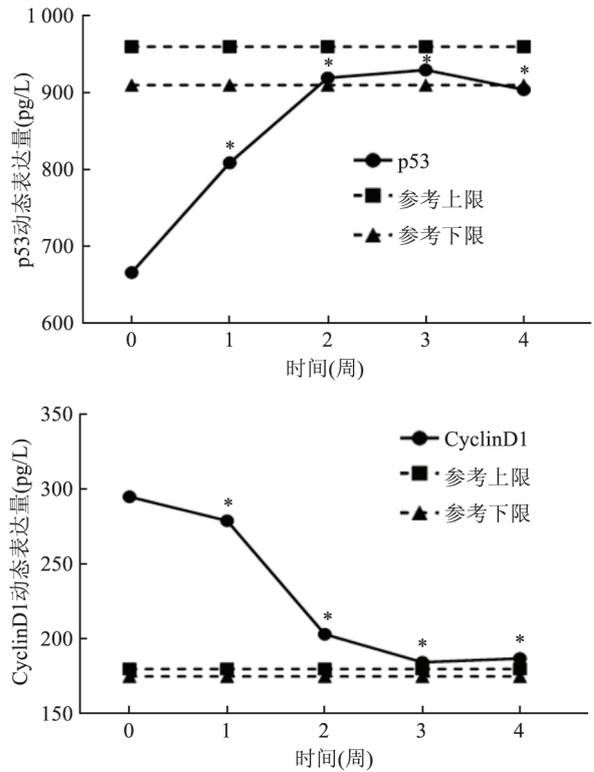


图3 乙肝患者血浆各个时点 p53、CyclinD1 动态变化与入院时(0周)比较: * $P < 0.05$

表4 血浆 miR-122、miR-155 与 ALT、AST 及相关因子的相关性分析

指标	统计值	miR-122	miR-155
ALT	r 值	0.49	0.60
	P 值	<0.01	<0.01
AST	r 值	0.47	0.56
	P 值	<0.01	<0.01
IL-6	r 值	0.21	0.65
	P 值	<0.01	<0.01
TNF- α	r 值	0.19	0.62
	P 值	<0.01	<0.01
p53	r 值	0.16	-0.28
	P 值	<0.01	<0.01
CyclinD1	r 值	0.12	0.65
	P 值	<0.01	<0.01

病率和死亡率均位列前三, 不容小觑。因此, 对乙型肝炎病程及其肝损伤的程度进行有效监测, 找到灵敏的监测指标对乙肝的发生发展具有重要意义。

近年来, 研究^[5-6]表明 miRNA 在肝脏疾病的发生发展中发挥着重要作用。裴丽玲等^[7]发现肝细胞癌患者血清 miR-451a 的表达明显低于对照组, 提示其与肝癌的迁移和恶性程度密切相关, 在肝细胞癌诊断、治疗及预后方面具有较高的临床应用价值。孟凡龙等^[8]研究表明 miR-106b 在肝癌患者血清中表达量显著升高, 可作为潜在生物标志。以上研究

表明 miR-RNA 与肝病密切相关, 该研究在乙型肝炎患者入院治疗前及治疗 1、2、3、4 周 5 个时点对血浆中 miR-122、miR-155 表达量进行检测, 结果表明 miR-122、miR-155 的表达与刚入院时相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 miR-122、miR-155 可能参与了乙型肝炎的发展过程。

有研究^[9-11]显示 miRNAs 参与生命过程中的各种调节途径, 包括细胞增殖和凋亡等。TNF- α 作为重要的炎症介质, IL-6 作为多功能细胞因子, 其联合起来可作为反映机体炎症严重程度的重要指标。而 ALT、AST 等又是临床上反映肝脏损伤程度的重要指标, 因此该研究通过分析 miR-122、miR-155 与 ALT、AST 及其相关因子的相关性, 探讨 miR-122、miR-155 对乙肝患者的作用意义及可能的作用方式。结果显示, 乙肝患者血浆中 miR-122、miR-155 的异常表达与乙型肝炎引起的肝损伤有关, 并可能参与了乙肝的炎症反应和细胞周期调控。

参考文献

- [1] 刘红, 吴疆. 国内外慢性乙型肝炎防治指南比较: 抗病毒治疗诊断标准和治疗方案 [J]. 中国肝脏病杂志 (电子版), 2018, 10(1): 10-7.
- [2] 李玉红, 朱凌妍, 田慎谦, 等. miRNA-122 在异烟肼肝损伤大鼠中的调控机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(2): 97-102.
- [3] Luna J M, Michailidis E, Rice C M. Mopping up miRNA: an integrated HBV transcript disrupts liver homeostasis by sequestering miR-122 [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(2): 257.
- [4] Thomsen K G, Terp M G, Lund R R, et al. miR-155 identified as anti-metastatic by global miRNA profiling of a metastasis model, inhibits cancer cell extravasation and colonization in vivo and causes significant signaling alterations [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 29224-39.
- [5] Xu J, Li J, Zheng T H, et al. MicroRNAs in the occurrence and development of primary hepatocellular carcinoma [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2016, 25(5): 971-5.
- [6] Smekalova E M, Kotelevtsev Y X, Leboeuf D, et al. lncRNA in the liver: prospects for fundamental research and therapy by RNA interference [J]. *Biochimie*, 2016, 131(12): 159-72.
- [7] 裴丽玲, 任维华, 李建生, 等. 4 种 miRNAs 在肝细胞性肝癌血清中的表达及意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(9): 1287-90.
- [8] 孟凡龙, 龚卫东, 许戈良, 等. 肝癌患者血清 miR-106b 的表达变化及其临床意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(3): 334-7.
- [9] Mastron J K, Siveen K S, Sethi G, et al. Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review [J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26(5): 475-86.
- [10] Li C P, Li H J, Nie J, et al. Mutation of miR-21 targets endogenous lipoprotein receptor-related protein 6 and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(2): 715-21.
- [11] Zhu Z, Fang Z, Hu X, et al. MicroRNAs and mesenchymal stem cells: hope for pulmonary hypertension [J]. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2015, 30(3): 380-5.

Dynamic expression and significance of miR-122 and miR-155 in plasma of patients with viral hepatitis type B

Li Xue^{1,2}, Wang Yue³, Zhang Yang⁴, et al

(¹School of Public Health, ²School of Economics, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000; ³Dept of Medical Record, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan 063000; ⁴Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000)

Abstract Objective To observe the expression of miR-122 and miR-155 in plasma of patients with viral hepatitis type B and analyze their correlation with inflammatory factors and cell cycle factors. **Methods** The expressions of miR-122 and miR-155 were determined by qRT-PCR. The expressions of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , P53, CyclinD1 were determined by ELISA. **Results** The results of qRT-PCR showed that expressions of miR-122 and miR-155 in the plasma of patients with viral hepatitis type B were high ($P < 0.05$). During the course of continuous treatment, miR-122 in the patient's plasma increased first and then decreased, and miR-155 expression decreased. The expressions of miR-122 and miR-155 were positively correlated with alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), IL-6, TNF- α and CyclinD1 ($P < 0.01$), and miR-155 had more obvious correlation. There was a negative correlation with p53 ($P < 0.01$). **Conclusion** The abnormal expression of miR-122 and miR-155 in plasma of patients with hepatitis B virus (HBV) is related to liver damage caused by HBV, which provides a new idea for the monitoring and treatment of liver damage caused by HBV.

Key words viral hepatitis type B; non-coding RNA; liver injury; inflammatory factor; cell cycle factor