

丙型肝炎病毒感染患者血清外泌体 miR-122 的表达量及临床意义探讨

宋晓菲 徐元宏

摘要 目的 探讨血清外泌体微小 RNA-122 (miR-122) 在丙型肝炎病毒(HCV)感染者中的表达水平及其临床意义。方法 收集 40 例 HCV 患者,其中 28 例为 HCV-1b,12 例为非 HCV-1b 检测血清循环和外泌体 miR-122 的表达水平以及其他的生化指标。同时选择 20 例健康人作对照。结果 HCV 组血清外泌体中的 miR-122 的表达量均较健康对照组低,但 HCV-1b 组的 miR-122 表达量比非 HCV-1b 组略高,其次 HCV 组血清外泌体 miR-122 的表达量与谷草转氨酶(AST)或谷丙转氨酶(ALT)的表达量呈负相关,但相关性弱;血清外泌体中的 miR-122 的表达趋势与血清循环 miR-122 一致;此外,血清循环 miR-122 在持续病毒应答率(SVR)患者中表达量明显高于非持续病毒应答率(NR)患者($P < 0.05$),但血清外泌体 miR-122 在 SVR 患者和 NR 患者中表达量差异无统计学意义。结论 血清外泌体 miR-122 可能可以预测肝损伤,但暂不认为其能预测 HCV 治疗效果。

关键词 丙型肝炎病毒;血清外泌体;miR-122

中图分类号 R 512.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)01-0131-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.026

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)持续感染可导致慢性肝炎、肝硬化甚至是肝癌,严重危害人类健康。近期研究^[1]揭示了微小 RNA(miRNA)在 HCV 增殖和发病中的作用。微小 RNA-122(miR-122)是肝脏中含量最丰富的 miRNA,一些临床研究^[2-3]显示 miR-122 与肝损伤相关,表现为和谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)及乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) DNA 表达水平相关,因此 miR-122 也被认为是一种新的肝损标志物。外泌体是由细胞膜内陷后通过一系列复杂的机制形成的微囊泡结构,外泌体中包含蛋白质、脂肪及核酸,双层脂质膜结构可以保护这些内容物不被酶所

降解,外泌体是细胞间信息交流传递的重要载体^[4]。存储在外泌体中的循环 miRNA 具有足够的稳定性,该研究的主要目的是检测 HCV 患者中血清外泌体中的 miR-122 的表达水平,探讨 miR-122 是否能作为 HCV 患者肝损的标志物。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2017 年 1 月~2018 年 1 月无锡市第二人民医院筛查出 HCV 感染者 40 例,诊断符合《丙型肝炎防治指南》^[5],其中男 22 例,女 16 例,年龄 18.0~67.0 岁(中位年龄 42.8 岁)。其中 28 例基因分型为 HCV-1b,非 HCV-1b 共计 12 例(HCV-2a, HCV-3a, HCV-3b 和 HCV-6a)。其他原因的肝脏损害疾病排除在外,包括乙肝、丁肝、戊肝、己肝、合并艾滋病、肝硬化、肝癌等。所有患者接受了以聚乙二醇干扰素联合利巴韦林为基础的治疗。选了 20 例健康体检者作为对照组,其中男 12 例,女 8 例,年龄 20.1~70.0 岁(中位年龄 46.0 岁)。所有患者接受了以聚乙二醇干扰素联合利巴韦林为基础的治疗,按照疗效分为持续病毒应答组(sustained virological response, SVR)和非持续性病毒应答组(non-sustained virological response, NR),前者为接受治疗后获得了持续性病毒学应答或完全清除了丙肝病毒,后者为治疗后未获得病毒应答或一直持续高病毒水平。所有研究对象均知情并签署了知情同意书。每位研究对象采集 2~3 ml 静脉血。

1.2 仪器和主要试剂 Real-Time PCR 仪购自美国 Thermofisher 公司;酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司;低温离心机、移液器购自德国 Eppendorf 公司;电泳仪、转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司;马尔文 NanoSight NS300 纳米颗粒跟踪分析仪购自英国 Malvern Instruments 公司,CD63、CD9、TSG-101 抗体、抗-HCV 诊断试剂盒, HCV 核酸定量检测试剂盒购自上海释物生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;miR-122 实时定量 PCR 引物、丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)购自上海吉凯生物有限公司;

2018-09-12 接收

基金项目: 国家科技支撑计划(编号: 2015BAI32H00)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

作者简介: 宋晓菲,女,主管检验师;

徐元宏,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-

mail: xyhong1964@163.com

PVDF filter 购自美国 Millipore 公司。

1.3 miR-122 荧光定量 PCR 用 RNA 提取试剂盒提取血清中的 microRNA ,RNA 逆转录采用 Taqman microRNA 反转录试剂盒和 miRNA 特异性茎环引物 具体步骤参考试剂盒说明书。逆转录反应体系如下: 5 μl RNA 2 μl 逆转录缓冲液 0.25 μl dNTP (100 mmol/L) 4 μl 逆转录引物(1 μmol/L) 0.5 μl 逆转录酶(50 U/μl) 0.25 μl Rnase 抑制剂(20 U/μl) ,12 μl RNAase-free 去离子水; 反应条件: 16 °C、30 min; 42 °C、30 min; 85 °C、5 min。采用 Taqman microRNA 定量 PCR 试剂盒对 miR-122 进行实时荧光定量 PCR ,引物、反应体系和反应条件参考文献^[6] ,采用 U6 为内参 标准化 CT: $\Delta Ct = CT_{miR-122} - CT_{U6}$ 。血浆中 miR-122 的含量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, $\Delta\Delta Ct = (CT_{miR-122} - CT_{U6})_{实验组} - (CT_{miR-122} - CT_{U6})_{对照组}$ 。

1.4 外泌体的分离鉴定 血清预先用 0.22 μm PVDF filter 过滤 按照文献^[7] 超速离心的方法收集外泌体 提取的外泌体利用电镜负染的方法观察其形态 利用 NanoSight NS300 进行外泌体大小测定和定量分析。利用 Western blot 检测外泌体表面标志性 marker-CD63、CD9 和肿瘤易感基因 101 蛋白 (TSG-101) 等方法对外泌体进行鉴定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析 正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述 偏态资料分布用中位数(最大值 ~ 最小值) ,正态分布数据用 *t* 检验比较 偏态分布用非参数检验进行比较。

2 结果

2.1 HCV 患者的一般临床特征 两组的一些常规的生化指标 ,包括血清白蛋白 (Alb) 、总胆红素

(TBIL) 、低密度脂蛋白(LDL) 、谷丙转氨酶(ALT) 、谷草转氨酶(AST) 以及其他各项指标如白细胞 (WBC) 、红细胞 (RBC) 、葡萄糖(GLU) 、乳酸脱氢酶 (LDH) 、高密度脂蛋白(HDL) 等。Alb、TBIL、LDL 在 HCV 患者中较健康人水平下降 ,而 ALT、AST 水平在 HCV 患者中较健康人升高 ,WBC、RBC、GLU、LDH、HDL 等其他指标在两组之间差异无统计学意义。见表 1。

2.2 血清外泌体分离鉴定 在 HCV 患者和对照组提取的血清外泌体中检测到 CD63、CD9 和 TSG-101 提示血清外泌体提取成功(图 1) 。

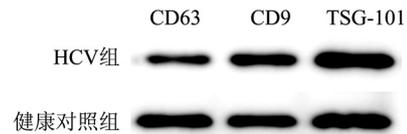


图 1 HCV 患者和健康对照者的血清外泌体标志物 CD63、CD9 和 TSG-101 表达

2.3 HCV 患者和健康对照组中血清外泌体 miR-122 的表达水平 HCV 组血清外泌体中 miR-122 的表达量均较健康对照明显降低 ,但是 HCV-1b 组的 miR-122 表达量比非 HCV-1b 组略高 ,差异有统计学意义(*P* < 0.05) ,见图 2A。HCV 组(包括 HCV-1b 和非 HCV-1b 组) 中外泌体 miR-122 的表达量与 AST 和 ALT 之间的相关性: HCV 组中 miR-122 的表达量与 AST 的相关系数 *r* = - 0.22 ,miR-122 表达量与 ALT 的相关系数 *r* = - 0.29 ,提示 HCV 组中 miR-122 的表达量与 AST 或 ALT 的表达量负相关 ,但相关性弱。

2.4 HCV 患者和健康对照组中血清循环 miR-122 的表达水平 血清循环 miR-122 的水平见图 2B。HCV-1b 和非 HCV-1b 组的血清循环 miR-122 表达

表 1 HCV 患者(HCV-1b 和非 HCV-1b) 和健康对照组一般情况比较

项目	HCV-1b 组	非 HCV-1b 组	健康对照组	<i>P</i> ₁ 值	<i>P</i> ₂ 值
人数(男/女)	28(16/12)	12(6/6)	20(12/8)	-	-
年龄(岁)	41.0(22.0 ~ 67.0)	42.8(18.0 ~ 63.6)	46.0(20.1 ~ 70.0)	-	-
Alb(g/L)	40.1(33.2 ~ 45.0)	39.3(32.1 ~ 42.3)	47.3(42.1 ~ 51.5)	0.023	0.018
TBIL(μmol/L)	12.3(8.9 ~ 17.1)	12.0(8.1 ~ 16.2)	5.7(3.1 ~ 11.0)	0.000	0.000
LDL(mmol/L)	3.1(2.1 ~ 3.5)	2.3(1.8 ~ 3.0)	2.0(1.1 ~ 2.3)	0.030	0.096
ALT(U/L)	52.1(20.6 ~ 93.7)	51.5(21.6 ~ 90.5)	24.1(13.7 ~ 31.5)	0.000	0.000
AST(U/L)	41.0(23.3 ~ 67.1)	35.9(23.1 ~ 63.1)	21.5(14.0 ~ 26.7)	0.000	0.000
WBC(× 10 ⁹ /L)	6.2(3.6 ~ 8.5)	6.1(4.0 ~ 7.9)	6.0(4.1 ~ 7.7)	0.133	0.231
RBC(× 10 ¹² /L)	4.9(3.4 ~ 4.9)	4.7(3.1 ~ 5.0)	4.8(4.1 ~ 4.9)	0.201	0.211
GLU(mmol/L)	5.3(4.3 ~ 6.3)	5.1(4.1 ~ 6.3)	5.5(5.0 ~ 6.9)	0.130	0.145
LDH(U/L)	190.0(164.8 ~ 239.0)	192.3(160.0 ~ 220.1)	193.9(148.3 ~ 224.3)	0.125	0.142
HDL(mmol/L)	1.2(1.0 ~ 1.7)	1.3(1.0 ~ 1.8)	1.3(1.0 ~ 1.8)	0.130	0.147

*P*₁: HCV-1b 组与健康对照组比较; *P*₂: 非 HCV-1b 组与健康对照组比较

量较健康人降低,同样的,HCV-1b组的血清循环 miR-122 表达比非 HCV-1b 组的表达高($P < 0.05$),见图 2。HCV 患者中(包括 HCV-1b 和非 HCV-1b 组)血清循环 miR-122 和 ALT、AST 相关性显示:血清循环 miR-122 和 ALT、AST 呈负相关,前者相关系数 $r = -0.522$,后者相关系数 $r = -0.39$ 。

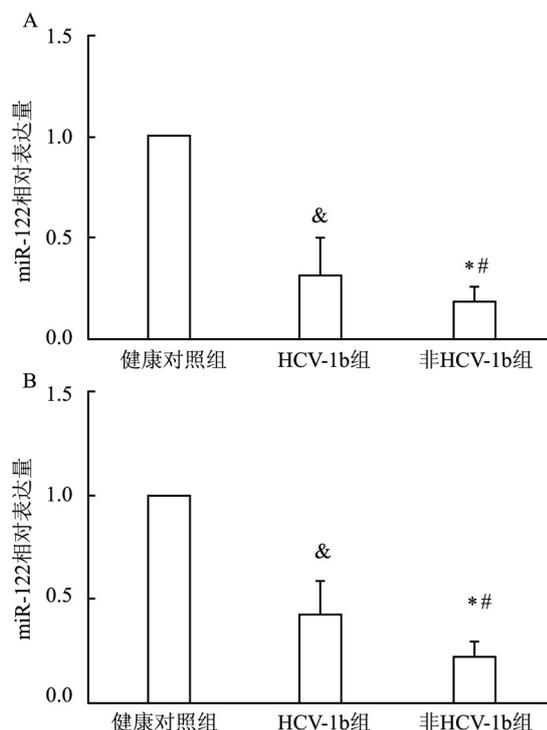


图2 HCV-1b组、非HCV-1b组和健康对照组的血清外泌体 miR-122 和血清循环 miR-122 表达量

A: 三组中血清外泌体 miR-122 的表达量; B: 三组中血清循环 miR-122 的表达量; 非 HCV-1b 组与健康对照组比较: * $P < 0.05$; HCV-1b 组与健康对照组比较: & $P < 0.05$; 非 HCV-1b 组与 HCV-1b 组比较: # $P < 0.05$

2.5 不同基因型患者 miR-122 表达水平与疗效初步分析 本研究的 28 例 HCV-1b 型患者,其中 20 例为 SVR,其余为 NR; 12 例非 HCV-1b 型患者中,有 4 例为 SVR,其余为 NR。计算 SVR 的患者和 NR 患者血清循环和血清外泌体 miR-122 表达量,血清循环 miR-122 在 SVR 患者中表达量明显高于 NR 患者($P < 0.05$),但血清外泌体 miR-122 在 SVR 患者和 NR 患者中表达量差异无统计学意义。见图 3。

3 讨论

血清循环 miR-122 被认为是一种新的预测肝功能损伤的生物标志物^[8-12]。本研究中,HCV 患者血清循环 miR-122 的表达量较正常人降低,并与 AST 和 ALT 表达水平呈负相关。目前关于 HCV 患者血

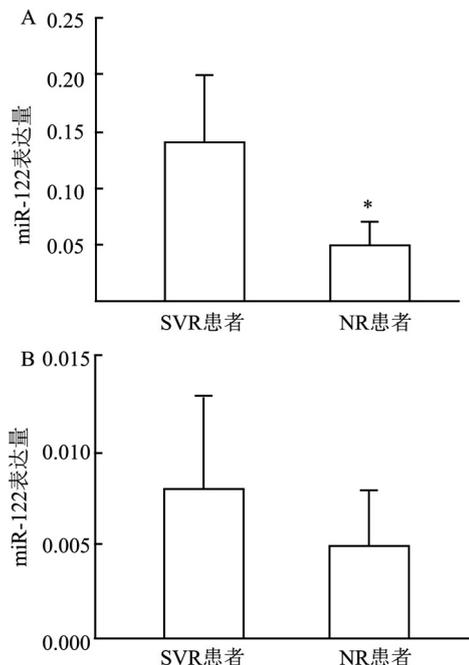


图3 SVR组和NR组的血清外泌体 miR-122 和血清循环 miR-122 表达

A: 血清外泌体 miR-122 的表达; B: 血清外循环 miR-122 的表达; 与 SVR 患者比较: * $P < 0.05$

清循环 miR-122 的表达趋势尚有争议,张庆等^[13]和 Bihrer et al^[14]研究显示慢性 HCV 感染者血清循环 miR-122 表达高于健康对照组,而 Jiao et al^[15]研究表明血清和外泌体中 miR-122 在各个丙肝基因型组中均低于对照组,造成这样的原因因为这几个研究纳入患者和样本量大小不一样,张庆等^[13]的研究主要纳入的为慢性丙肝、肝硬化、肝癌患者,Bihrer et al^[14]主要纳入的也为慢性丙肝患者,本研究 and Jiao et al^[15]研究纳入的患者群并非限定在慢性丙肝感染,可能在丙肝进程的不同阶段 miR-122 表达量会不同,后续研究中也会关注这点。

外泌体是一种稳定有效的细胞间信号传递和交换方式,包含蛋白质、信使 RNA 和微小 RNAs 等,这些内容物在外泌体的保护下不易被降解^[16]。在本研究中,外泌体源性 miR-122 与血清循环 miR-122 表达趋势类似(消长一致),在 HCV 患者中表达水平低于健康人群,此外,外泌体源性 miR-122 与 AST 和 ALT 之间也存在着负相关,只是负相关性比血清循环 miR-122 和 AST/ALT 弱。这些结果提示外泌体源性 miR-122 虽然稳定性比血清循环 miR-122 稳定,但是准确性上可能不如血清循环 miR-122。

临床 HCV 治疗方案主要为干扰素和利巴韦林,但疗效差异较大,HCV 最常见有 5 种基因型(1a、1b、2a、3a、6a),我国主要为以 1b 型最多见(约占

70%) ,有研究^[15]认为不同基因型 HCV 与疾病严重程度有一定相关性。本研究观察到 HCV 不同基因型之间的血清循环和血清外泌体中的 miR-122 表达量存在差异 ,HCV-1b 组 miR-122 表达量略高于非 HCV-1b 组 ,这与 Jiao et al^[15]的研究结果基本一致。也有研究^[14]报道 miR-122 可作为 HCV 治疗成功的预后标记 ,本研究也对此进行了初步的探讨 ,SVR 为治疗有效 ,而 NR 则为效果不佳 ,本研究结果提示 获得 SVR 的患者血清循环 miR-122 高于 NR 的患者 ,但是血清外泌体 miR-122 在 SVR 组和 NR 组之间的差异无统计学意义 ,提示血清外泌体 miR-122 可能不具备预测治疗效果的可能性。但是治疗效果的影响因素众多 ,即便是血清循环 miR-122 在 SVR 组和 NR 组之间存在差异 ,血清循环 miR-122 预测治疗效果的能力仍有待深入探讨。

参考文献

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature* , 2004 , 431(7006) : 350 - 5.
- [2] Cheng H R , Kao J H , Wu H L , et al. Clinical significance of circulating miR-122 in patients with dual chronic hepatitis B and C virus infection [J]. *Hepatol Int* , 2015 , 9(1) : 35 - 42.
- [3] Longatti A. The dual role of exosomes in hepatitis A and C virus transmission and viral immune activation [J]. *Viruses* , 2015 , 7(12) : 6707 - 15.
- [4] Zhang L , Zhang S , Yao J , et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth [J]. *Nature* , 2015 , 527(7576) : 100 - 4.
- [5] 中华医学会肝病学会. 丙型肝炎防治指南(2015 年版) [J]. *中华肝脏病杂志* , 2015 , 7(3) : 19 - 23.
- [6] 吴瑞珊 苏运钦 余广超 等. Taqman 探针实时定量 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 - 53.
- [7] Thery C , Amigorena S , Raposo G , et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol* , 2006 , 3(22) : 21 - 3.
- [8] Mitchell P S , Parkin R K , Kroh E M , et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2008 , 105(30) : 10513 - 8.
- [9] Chen X , Ba Y , Ma L , et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Res* , 2008 , 18(10) : 997 - 1006.
- [10] Kosaka N , Iguchi H , Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis [J]. *Cancer Sci* , 2010 , 101(10) : 2087 - 92.
- [11] Chang J , Nicolas E , Marks D , et al. miR-122 , a mammalian liver-specific microRNA , is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1 [J]. *RNA Biol* , 2004 , 1(2) : 106 - 13.
- [12] Esau C , Davis S , Murray S F , et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting [J]. *Cell Metab* , 2006 , 3(2) : 87 - 98.
- [13] 张庆 刘杰 高晓红. HCV 感染者中血清外泌体 miRNA-122 的检测及其临床意义 [J]. *中华临床感染病杂志* , 2016 , 5(9) : 439 - 43.
- [14] Bihrer V , Friedrich-Rust M , Kronenberger B. Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection [J]. *Am J Gastroenterol* , 2011 , 106(9) : 1663 - 9.
- [15] Jiao X , Fan Z , Chen H , et al. Serum and exosomal miR-122 and miR-199a as a biomarker to predict therapeutic efficacy of hepatitis C patients [J]. *J Med Virol* . 2017 , 89(9) : 1597 - 605.
- [16] 李毅 唐佩福. 外泌体中 Micro-RNA 可作为疾病的生物标志物 [J]. *中国组织工程研究* , 2016 , 20(51) : 7738 - 45.

Expression of exosomal miR-122 in patients with hepatitis C and its clinical function

Song Xiaofei , Xu Yuanhong

(Dept of Laboratory , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression and the clinical function of exosomal miR-122 in patients with hepatitis C (HCV) . **Methods** Forty HCV patients (28 HCV-1b and 12 non-HCV-1b) were enrolled in this study , serum and exosomal miR-122 and other conventional biomarkers reflecting liver function were measured. 20 healthy subjects were enrolled as control. **Results** The expressions of exosomal miR-122 in HCV-1b and non-HCV-1b groups were higher than that in healthy group , but the former was slightly higher than the latter. Exosomal miR-122 in HCV group was weakly negatively related to AST and ALT levels. The expression of exosomal miR-122 was consistent with that of serum miR-122. Besides , the serum miR-122 in sustained virological response (SVR) group was higher than that in non-sustained virological response (NR) group ($P < 0.05$) , but statistical difference of exosomal miR-122 between SVR and NR groups was not found. **Conclusion** In HCV patients , exosomal miR-122 may be useful in evaluating hepatic impairment , but it cannot be used to evaluate the therapeutic effect.

Key words hepatitis C virus; serum exosome; miR-122