

乙型肝炎伴早期肝硬化 microRNA 表达谱及其诊断价值

张美殷¹, 魏蓉蓉¹, 彭亮², 高志良², 黄国良³, 王辉云^{1△} (1. 中山大学肿瘤防治中心华南肿瘤学国家重点实验室, 广东广州 510060; 2. 中山大学附属第三医院感染科, 广东广州 510630; 3. 广东医学院东莞分院中美肿瘤研究所, 广东东莞 523808)

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎伴早期肝硬化和乙型肝炎 microRNA(miRNA) 差异表达谱, 寻找具有诊断价值的 miRNA 标志物。**方法** 利用 miRNA 芯片技术检测 7 例乙型肝炎伴早期肝硬化患者和 11 例乙型肝炎患者肝组织中 miRNA 的表达水平。应用 ROC 曲线评价各 miRNA 的诊断价值。**结果** 与单纯肝炎组织相比, 伴早期肝硬化的肝炎组织中表达上调超过 1.5 倍的 miRNA 有 miR-625-3p、miR-325、miR-596 等 5 种, 表达下调超过 1.5 倍的 miRNA 有 miR-365、miR-362-5p、miR-139-5p 等 10 种。ROC 曲线分析结果表明, miR-139-5p 诊断乙型肝炎伴早期肝硬化的特异性和敏感性最高。**结论** 乙型肝炎伴早期肝硬化组织和乙型肝炎组织相比有其特异的 miRNA 表达谱, miR-139-5p 可能是诊断乙型肝炎伴早期肝硬化的一个标志物。

【关键词】 miRNA 芯片; miRNA; 乙型肝炎; 肝硬化

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 16. 003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)16-2069-03

MicroRNA expression profiles and its diagnostic value in hepatitis B-related early liver cirrhosis ZHANG Mei-yin¹, WEI Rong-rong¹, PENG Liang², GAO Zhi-liang², HUANG Guo-liang³, WANG Hui-yun^{1△} (1. State Key Laboratory of Oncology in South China, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou, Guangdong 510060, China; 2. Department of Infectious Disease, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510060, China; 3. Sino-American Cancer Research Institute, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China.)

【Abstract】 Objective To compare miRNA expressions between hepatitis B-related early liver cirrhosis and non-cirrhosis tissues to identify miRNA markers for diagnosis of hepatitis B-related early liver cirrhosis. **Methods** miRNA expression profiling of seven patients with hepatitis B-related early liver cirrhosis and eleven patients with only hepatitis B was performed using miRNA microarray, and diagnostic value of miRNAs was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve method. **Results** Fifteen miRNAs were found to be differentially expressed between hepatitis B related early liver cirrhosis and non-cirrhosis tissues, five (miR-625-3p, miR-325, miR-596, miR-141, miR-339-3p) of which were up-regulated and ten (miR-365, miR-362-5p, miR-193b-5p, miR-139-5p and others) of which were down-regulated. ROC curve analysis showed that AUC value of miR-139-5p was 0.994, which could be the best miRNA for distinguishing hepatitis B-related early liver cirrhosis from patients with only hepatitis B. **Conclusion** Our results demonstrate that there might be a specific miRNA expression profile in hepatitis B-related early liver cirrhosis and miR-139-5p could be a novel and potential biomarker for hepatitis B-related early liver cirrhosis.

【Key words】 miRNA microarray; miRNA; hepatitis B; liver cirrhosis

慢性肝炎、肝硬化、肝癌的发展是一个由乙型肝炎病毒引起的多因素和多步骤的演进过程^[1]。在早期肝硬化时期, 尽管肝细胞受到了损害, 由于肝脏具有强大的代偿能力, 这一时期的患者临床表现不明显, 不易作出准确诊断^[2-3]。因此, 在慢性肝炎形成肝硬化的早期作出准确诊断, 并予以干预, 对于阻断慢性肝炎、肝硬化和肝癌的进展和改善肝病患者的预后十分重要。MicroRNA(miRNA) 是一类长约 21~23 个核苷酸的非编码单链 RNA。miRNA 可在转录或翻译水平调控相关基因的表达, 参与细胞发育、增殖、分化和凋亡等多种生物学过程^[4-5], 也可调控炎症反应及其通路因子的表达^[6]。国内外研究报道 miRNA 在肝脏的慢性损伤过程中存在差异性表达, 相关的 miRNA 表达的改变可能促进了该进程的发生、发展^[7-9]。由此可见, miRNA 的变化在慢性肝炎形成肝硬化的进程起着重要的作用。国内对乙型肝炎患者肝硬化的 miRNA 表达差异变

化及其诊断肝硬化的研究较少。本文参照肝脏组织病理学诊断, 对乙型肝炎组织和肝硬化组织进行 miRNA 芯片检测, 以便为乙型肝炎伴早期肝硬化的诊断和治疗提供实验和理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 5~7 月在中山大学附属第三医院行门诊肝组织活检病例。乙型肝炎组 11 例, 年龄 22~48 岁, 男 9 例, 女 2 例; 乙型肝炎伴早期肝硬化组 7 例, 年龄 27~54 岁, 男 5 例, 女 2 例。诊断符合 2000 年西安全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订标准, 均经 B 超、实验室检查、病理学及临床表现确诊, 排除了肝癌、其他病毒性肝炎、遗传性肝病、血吸虫性肝病、血液系统等疾病。组织标本离体后浸泡于 RNA later 试剂过夜, 后转入 -80 ℃ 保存备用。所有患者均签署知情同意书。

△ 通讯作者, E-mail: wanghyun@mail. sysu. edu. cn。

1.2 试剂 RNA later 试剂和 TRIzol 试剂购自 Life technology 公司。碱性磷酸酶和 T4 RNA 连接酶购自 Affymetrix 公司。Dy647 购自 Dharmacon 公司。Micro Bio-Spin 6 column 购自 BioRad 公司。Denhardt's 溶液、柠檬酸钠/氯化钠缓冲液 (SSC)、十二烷基磺酸钠 (SDS) 和二甲基亚砷 (DMSO) 购自广州威佳科技有限公司。

1.3 RNA 的提取 按照 TRIzol 试剂说明书步骤提取组织总 RNA。应用 Nanodrop ND-1000 测定总 RNA 吸光度 (A_{260} 和 A_{280}), 计算其浓度并检测其纯度; 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 质量。

1.4 miRNA 芯片制备 根据 miRNA 数据库 13.0 选取 682 个 miRNA, 设计高灵敏、高特异性互补靶 RNA 结合的探针, 使用芯片点样仪 SmartArrayer™ 136 (CapitalBio 公司) 点制芯片。每张 miRNA 芯片中包含 682 个特异性探针、对照探针以及无探针的空白对照, 每个探针在芯片内重复 2 次。

1.5 miRNA 芯片检测 miRNA 的表达 取 2.5 μ g 总 RNA, 碱性磷酸酶去磷酸化, DMSO 变性, T4 RNA 连接酶标记 Dy647。采用 Micro Bio-Spin 6 column 纯化过滤并浓缩成粉末, 然后溶于杂交液中, 于 46 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交结束后依次在 2 $\times$ SSC 和 0.2%SDS、2 $\times$ SSC、0.2 $\times$ SSC 蒸馏水中洗 10 min。芯片甩干后用共聚焦激光扫描仪 LuxScan™ 10K (CapitalBio 公司) 进行图像扫描并提取数据。

1.6 统计学处理 miRNA 芯片数据处理使用 Quantile 方法进行标准化。通过 Significance Analysis of Microarrays 软件和 *t* 检验挑选差异变化在 1.5 倍以上和 $P<0.05$ 的 miRNA, 使用 MeV 软件进行聚类分析。通过 MedCalc statistical 软件绘制受试者工作特征 (ROC) 曲线, 计算 ROC 曲线下面积 (AUC) 和各诊断评价参数。

2 结 果

2.1 miRNA 表达谱 与乙型肝炎组织相比, 乙型肝炎伴早期肝硬化组织表达上调 1.5 倍以上的 miRNA 有 5 种, 表达下调 1.5 倍以上的 miRNA 有 10 种。两组间 miRNA 相对表达值见表 1, 两组间 miRNA 差异倍数和 P 值分布火山图见图 1。

表 1 两组之间 miRNA 表达的比较 ($\bar{x}\pm s$)

miRNA	乙型肝炎表达	乙型肝炎伴早期	表达	差异	P
	相对值 ($n=11$)	肝硬化表达 相对值($n=7$)			
miR-625-3p	8.082 $\pm$ 0.180	9.825 $\pm$ 1.522	上调	4.900	<0.001
miR-325	8.200 $\pm$ 0.314	8.822 $\pm$ 0.622	上调	1.617	0.015
miR-596	8.874 $\pm$ 0.492	9.416 $\pm$ 0.778	上调	1.599	0.021
miR-141	8.567 $\pm$ 0.492	9.109 $\pm$ 0.674	上调	1.534	0.046
miR-339-3p	8.372 $\pm$ 0.456	8.910 $\pm$ 0.745	上调	1.502	0.020
miR-569	8.743 $\pm$ 0.447	8.184 $\pm$ 0.188	下调	0.649	0.008
miR-591	8.761 $\pm$ 0.414	8.206 $\pm$ 0.224	下调	0.649	0.014
miR-492	8.940 $\pm$ 0.570	8.423 $\pm$ 0.263	下调	0.645	0.043
miR-484	10.761 $\pm$ 0.408	10.088 $\pm$ 0.522	下调	0.631	0.021
miR-200c-5p	8.665 $\pm$ 0.466	8.023 $\pm$ 0.280	下调	0.619	0.037
miR-365	12.450 $\pm$ 0.269	11.663 $\pm$ 0.397	下调	0.604	0.005
miR-362-5p	9.289 $\pm$ 0.491	8.592 $\pm$ 0.357	下调	0.575	0.010
miR-33a-3p	8.871 $\pm$ 0.562	8.174 $\pm$ 0.189	下调	0.566	0.013
miR-193b-5p	9.534 $\pm$ 0.470	8.719 $\pm$ 0.539	下调	0.561	0.018
miR-139-5p	9.642 $\pm$ 0.313	8.749 $\pm$ 0.234	下调	0.524	0.001

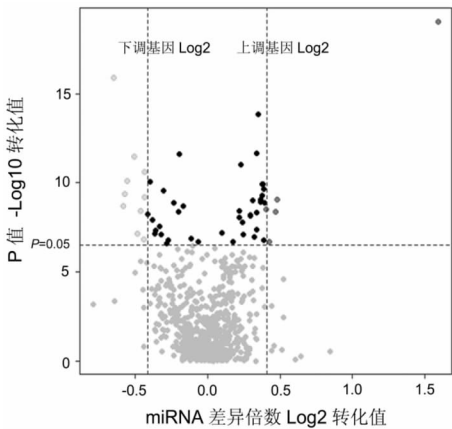


图 1 miRNA 差异倍数和 P 值分布火山图

2.2 聚类分析 对差异表达 miRNA 进行基于 Euclidean Distance 方法的监督聚类分析, 15-miRNA 可准确将乙型肝炎和乙型肝炎伴早期肝硬化组织区分为两组, 见图 2。

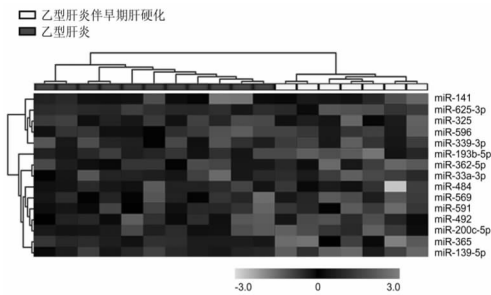


图 2 15-miRNA 表达谱聚类图

2.3 差异表达 miRNA 诊断乙型肝炎伴早期肝硬化的效果评价 以芯片检测的 miRNA 相对表达量作为测试变量、乙型肝炎伴早期肝硬化诊断作为状态变量绘制 ROC 曲线及计算 AUC, 见表 2。基于 ROC 曲线选择诊断价值较高的 miRNA ($AUC>0.9$), 找出其最佳截点及计算其对应的诊断评价参数, 见表 3。miRNA 诊断乙型肝炎伴早期肝硬化的 ROC 曲线见图 3。其中, miR-139-5p 的诊断评价参数优于其他 miRNA 的诊断评价参数。

表 2 miRNA 诊断乙型肝炎伴早期肝硬化的 AUC

miRNAs	标准误	AUC	95%CI	P
miR-139-5p	0.009	0.994	0.803~1.000	<0.0001
miR-365	0.048	0.948	0.732~0.999	<0.0001
miR-200c-5p	0.071	0.909	0.679~0.992	<0.0001
miR-569	0.078	0.903	0.670~0.990	<0.0001
miR-484	0.083	0.896	0.662~0.988	<0.0001
miR-33a-3p	0.083	0.896	0.662~0.988	<0.0001
miR-591	0.081	0.883	0.646~0.984	<0.0001
miR-362-5p	0.082	0.883	0.646~0.984	<0.0001
miR-193b-5p	0.097	0.870	0.630~0.980	<0.0001
miR-325	0.098	0.831	0.583~0.963	0.0007
miR-625-3p	0.135	0.818	0.568~0.957	0.0180
miR-492	0.109	0.805	0.554~0.951	0.0052
miR-339-3p	0.129	0.740	0.484~0.914	0.0632
miR-596	0.142	0.701	0.444~0.890	0.1574
miR-141	0.144	0.675	0.418~0.872	0.2239

表 3 miRNA 诊断乙型肝炎伴早期肝硬化的最佳截点和各参数

miRNA	最佳截点	灵敏度(%)	特异度(%)	Youden 指数(%)	阳性似然比	阴性似然比	准确率[% (n/n)]
miR-139-5p	≤9.136	100.0	90.9	90.9	10.99	−0.10	94.4(17/18)
miR-365	≤12.244	100.0	81.8	81.8	5.49	−0.22	88.9(16/18)
miR-200c-5p	≤8.155	85.7	90.9	76.6	9.42	0.06	88.9(16/18)
miR-569	≤8.418	100.0	81.8	81.8	5.49	−0.22	88.9(16/18)

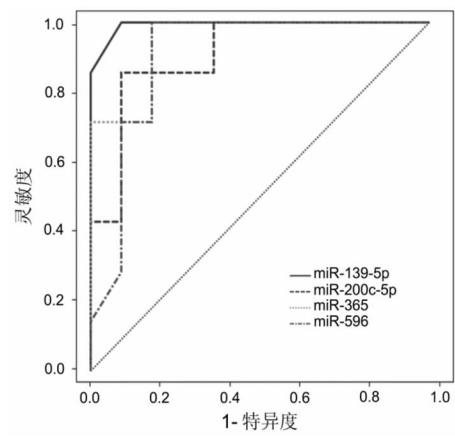


图 3 miRNA 诊断乙型肝炎伴早期肝硬化 ROC 曲线图

3 讨 论

miRNA 在不同的组织中具有特定的表达模式,这种特定的表达模式已在包括肝癌在内的多种肿瘤中得到证实^[10-11]。miRNA 表达谱能很好地区分肿瘤和非肿瘤、良性和恶性肿瘤、炎性腺瘤和灶性节结增生、乙型肝炎病毒感染、酒精肝以及基因有无突变等^[12]。

本研究基于病理学诊断依据,利用 miRNA 芯片技术检测 18 例乙型肝炎伴早期肝硬化及肝炎组织的差异表达 miRNA,结果发现乙型肝炎伴早期肝硬化表达上调 1.5 倍以上的 miRNA 有 5 种,包括 miR-625-3p、miR-325、miR-596、miR-141 和 miR-339-3p,表达下调 1.5 倍以上的 miRNA 有 10 种,包括 miR-569、miR-591、miR-492、miR-484、miR-200c-5p、miR-365、miR-362-5p、miR-33a-3p、miR-193b-5p 和 miR-139-5p,提示这些 miRNA 可能与乙型肝炎向肝硬化转归的发生及发展有关。通过分析 ROC 曲线及其各诊断评价参数,发现在差异表达的 miRNA 中,miR-139-5p 的诊断价值最高,可作为反映肝硬化的一个参考指标。本研究发现的与乙型肝炎伴早期肝硬化相关 miRNA 在其他疾病中的功能研究报道较多^[13-15],但其在肝纤维化和肝硬化中的作用机制尚未见报道。有文献报道,miR-139-5p 在肾透明细胞癌、基底细胞癌、卵巢癌等肿瘤组织中的表达均下调^[16-18]。本研究推测 miR-139-5p 可能也在肝纤维化、肝硬化的进程中,参与了肝星状细胞(HSC)的活化,后者是肝纤维化发生的主要驱动因素。Venugopal 等^[19]也发现 HSC 的纤维化可使 miR-150 和 miR-194 表达水平明显降低,而 miR-150 和 miR-194 的扩增则可分别抑制 c-myb 和 rac1 的表达,从而抑制 HSC 的活化和细胞外基质的产生。在此研究基础之上,应进一步分析 miR-139-5p 的靶基因并检测其靶基因的表达水平,通过构建 miR-139-5p 过表达载体等细胞体外实验及动物体内实验,以进一步研究 miRNA 与肝纤维化向肝硬化进展的关系。

本研究首次发现 miR-139-5p 在乙型肝炎伴早期肝硬化中

表达下调,其灵敏度和特异度均较高。但需要指出的是,本研究的标本量少,存在一定的局限性。作者将扩大临床标本,进一步验证 miR-139-5p 在乙型肝炎伴早期肝硬化中的表达水平,为预测和评估乙型肝炎伴早期肝硬化的分子标志物和治疗靶点提供实验依据。

参考文献

[1] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(1): 51-68.

[2] 甘楚林,莫让辉,莫穆隆. 156 例乙型病毒性早期肝硬化临床分析[J]. 当代医学, 2010, 16(34): 55-56.

[3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000(6): 324-329.

[4] Bartel DP. MicroRNAs; genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[5] Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(3): 219-230.

[6] Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes[J]. Cytokine, 2009, 45(2): 58-69.

[7] Shi B, Gao W, Wang J. Sequence fingerprints of microRNA conservation[J]. PLOS One, 2012, 7(10): e48256.

[8] Ura S, Honda M, Yamashita T, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(4): 1098-1112.

[9] Wang XW, Heegaard NH, Orum H. MicroRNAs in liver disease[J]. Gastroenterology, 2012, 142(7): 1431-1443.

[10] Minguez B, Lachenmayer A. Diagnostic and prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma[J]. Dis Markers, 2011, 31(3): 181-190.

[11] Zhang Q, Pu R, Du Y, et al. Non-coding RNAs in hepatitis B or C-associated hepatocellular carcinoma: potential diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets[J]. Cancer Lett, 2012, 321(1): 1-12.

[12] Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations[J]. Hepatology, 2008, 47(6): 1955-1963.

[13] Lázár L, Nagy B, Molvarec A, et al. Role of hsa-miR-325 in the etiopathology of preeclampsia[J]. Mol Med Report, 2012, 6(3): 597-600.

[14] Costa FF, Bischof JM, Vanin EF, et al. Identification of microRNAs as potential prognostic markers in ependymoma[J]. PLOS One, 2011, 6(10): e25114. (下转第 2073 页)

2.2 血气分析仪与生化分析仪检测结果的相关性 两种仪器检测的 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 TCO_2 结果间均呈显著相关性 ($r =$

$0.717, r = 0.832, r = 0.721, r = 0.919, P < 0.01$)。见图 1。

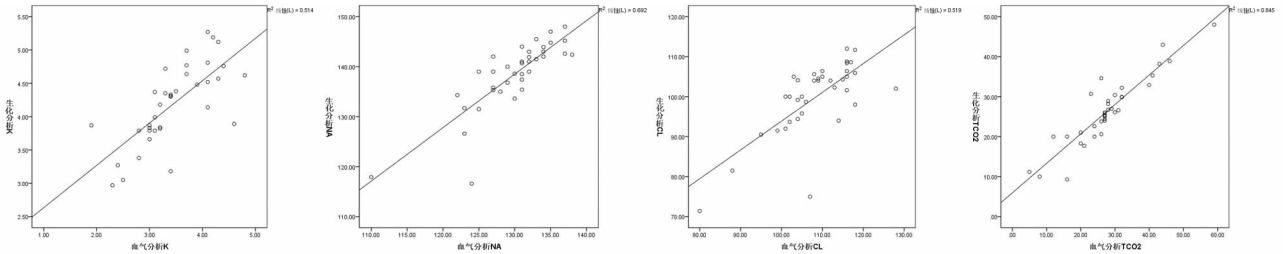


图 1 血气分析仪与生化分析仪检测 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 TCO_2 结果相关性散点图

3 讨 论

本实验对两种仪器测定 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 TCO_2 的结果进行相关性分析,结果表明两种仪器检测结果相关性好。采用配对资料 t 检验分析两种仪器检测结果的差异,结果表明生化分析仪 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 检测结果明显高于血气分析仪 ($t = 9.41, t = 13.42, t = 7.57, P < 0.05$);而两种仪器 TCO_2 检测结果差异无统计学意义 ($t = -1.96, P > 0.05$),表明两种仪器检测结果较为一致,但因采用的是两个不同检测系统,存在许多不确定影响因素,因此,尽管两种仪器检测 TCO_2 结果较为一致,但在临床诊断中前后比较最好都采用同一仪器检测结果。

血气分析 K^+ 结果低于生化分析仪,其可能原因:(1)血气标本采用肝素抗凝所致,因为肝素是一种酸性黏多糖阴离子,多聚电解质,能够与血液中的阳离子特别是 K^+ 结合,肝素与 K^+ 结合形成肝素钾^[1-2],同时肝素抗凝对血液也有一定的稀释作用。(2)生化分析仪采用血清,血液在体外凝固过程中,细胞和血小板破裂可释放一定量的钾使血清钾浓度增高^[3-5]。生化分析仪检测 Na^+ 、 Cl^- 高于血气分析仪可能原因:(1)生化分析采用血清只是全血的一部分,因此血清样品有一定的“浓缩效应”;(2)血气分析仪与生化分析仪电极不一样,也可导致系统误差。本实验结果还表明血气分析仪 TCO_2 与生化分析仪检测结果比较一致,而刘光明等^[6]实验结果表明血气分析仪 TCO_2 高于生化分析仪结果,可能原因是血气分析仪标本从抽血到完成检测过程中都不与空气接触,避免了空气中 CO_2 的影响,生化分析仪采用的是血清样本,在采血、运送、分离、检测过程都会与空气接触,使空气中 CO_2 可与血清进行交换^[5]。由此导致血气分析仪检测 TCO_2 比生化分析仪的结果要高。在本实验中,血清管采用的是血清真空管,可以避免血样与空气接触,同时动脉血与血清同步检测减少了因与空气接触和放置时间过长导致的影响,因此两种仪器检测 TCO_2 结果较为一致。

综上所述,两种仪器 TCO_2 检测结果差异不明显, K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 差异明显。但这些项目在两种仪器检测结果有很好的相关性^[8-9],可为临床诊疗提供参考价值。但在临床诊疗中前后对比最好采用同一仪器的检测结果,同时两种仪器应定期进行比对,以免影响临床判断和治疗。

参考文献

- [1] 李志平,谢灿茂,程东升,等.血清与全血及血浆电解质、葡萄糖测定结果存在重大差异[J].陕西医学检验,1998(4):15-16.
- [2] 丁珂.全自动生化分析仪与血气分析仪电解质测定结果比较[J].海军医学杂志,2011,32(4):255-256.
- [3] 齐永志,马聪,张雅芳,等.全自动生化分析仪与血气分析仪电解质测定结果比较[J].国际检验医学杂志,2011,32(16):1828-1829.
- [4] 王凤平,吴兴福,封莉.便携式血气分析仪电解质结果分析[J].临床合理用药杂志,2009,2(24):60-61.
- [5] 王建琼,牛华,郑瑞,等.肝素抗凝血浆钾与血清钾测定对比分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(5):500-501.
- [6] 刘光明,黄小兵,李健茹.血气分析仪与生化分析仪相同检测项目的比较分析[J].海南医学,2010,21(8):102-104.
- [7] 何愿民.滴定法、速率法、电极法测定血浆碳酸氢根的比较[J].上海医学检验杂志,2000,15(4):210.
- [8] 冯磊,年士艳.两种二氧化碳结合力测定方法的比较[J].实用医学杂志,2007,23(12):1784.
- [9] 罗梅.电极法与酶法测定血清总二氧化碳的实验对比[J].国际检验医学杂志,2007,28(1):6-7.

(收稿日期:2012-12-21 修回日期:2013-04-17)

(上接第 2071 页)

- [15] Von Frowein J, Pagel P, Kappler R, et al. MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma[J]. Hepatology, 2011, 53(3): 833-842.
- [16] Wu X, Weng L, Li X, et al. Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35661.
- [17] Sand M, Skrygan M, Sand D, et al. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma[J]. Br J Dermatol, 2012, 167(4): 847-855.

- [18] Miles GD, Seiler M, Rodriguez L, et al. Identifying microRNA/mRNA dysregulations in ovarian Cancer [J]. BMC Res Notes, 2012, 5:164.
- [19] Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(1): 101-106.

(收稿日期:2013-01-26 修回日期:2013-04-28)