

# 出入境人员丙型肝炎病毒感染者 miRNA-122 表达变化研究\*

史咏梅, 冯子力, 伍碧梅, 唐明慧, 王 琪, 涂承宁, 谭 华, 叶立青(珠海出入境检验检疫局国际旅行卫生保健中心, 广东珠海 519020)

**【摘要】 目的** 探讨珠海口岸出入境人员丙型肝炎病毒(HCV RNA)感染者外周血 miRNA-122 表达的变化及其对丙型肝炎患者的临床意义。**方法** 收集 96 例丙型肝炎 IgG 抗体初筛阳性患者外周血, 定量检测 HCV RNA 水平。对 HCV RNA 阳性患者检测 miRNA-122、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及检查肝脏超声影像学改变, 并进行相关性分析。**结果** 96 例 HCV IgG 阳性患者检测出 49 例 HCV RNA 阳性, 占 60.9%; 两组患者 miRNA-122 表达水平差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与 ALT 呈正相关, 与 HCV RNA 无相关性。B 超检查发现 11 例合并轻度脂肪肝, 合并脂肪肝患者 miRNA-122 表达水平高于无脂肪肝患者。**结论** HCV 阳性患者循环 miRNA-122 表达可能与病毒复制无关, 而是反映肝脏组织活动性损害和病变严重性的指标。

**【关键词】** miRNA-122; 丙型肝炎; 脂肪肝

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.06.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)06-0738-03

**Study on change of miRNA-122 expression in exit-entry people with hepatitis C virus infection\*** SHI Yong-mei, FENG Zi-li, WU Bi-mei, TANG Ming-hui, WANG Qi, TU Cheng-ning, TAN Hua, YE Li-qing (International Travel Health Care Center, Zhuhai Supervision Testing Institute of Quality and Metrology, Zhuhai, Guangdong 519020, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the change of peripheral blood miRNA-122 expression in exit-entry people with hepatitis C virus (HCV) infection at Zhuhai port and its significance to the patients with hepatitis C. **Methods** The peripheral blood was collected from 96 cases of HCV IgG antibody primary screening positive for quantitatively detecting the HCV RNA level. Then the individuals of HCV RNA positive were detected miRNA-122, ALT and hepatic B-ultrasonic examination was performed. Furthermore the correlation analysis was conducted. **Results** Among 96 cases of HCV IgG positive, 49 cases (60.9%) were HCV RNA positive; the expression level of miRNA-122 had statistical difference between the experimental group and the control group ( $P < 0.01$ ); the correlative analysis showed that there was a positive correlation between the expression of miRNA-122 and ALT and no significant correlation between the expression of miRNA-122 and HCV RNA was found. Eleven cases of complicating mild fat liver were found by B-ultrasound and the expression level of miRNA-122 in the patients with complicating fat liver was higher than that in the patients with non-fat liver. **Conclusion** The circulating miRNA-122 expression may be irrelevant with HCV virus replication and is an indicator reflecting the active liver damage and lesion severity.

**【Key words】** miRNA-122; hepatitis C; fat liver

丙型肝炎(以下简称丙肝)是由丙肝病毒(HCV)感染而引起的病毒性肝炎, 感染率极高, 且发病率有明显上升趋势<sup>[1]</sup>。近年来, 对珠海口岸的出入境人员丙肝感染率的监测显示, 丙肝抗体初筛阳性率由 2012 年的 0.46% 上升到 2014 年的 0.88%, 增长近 1 倍, 丙肝感染率有加速上升趋势。丙肝危害不亚于乙型肝炎, 慢性丙肝也是肝硬化和肝癌的重要诱因<sup>[2]</sup>。患者感染丙肝后慢性化程度严重, 临床治疗效果不理想, 治疗康复花费巨大, 给家庭和社会带来沉重的经济负担。

miRNA-122 是内源性非编码单链小分子 RNA, 在进化上高度保守, 是肝脏组织特异性高表达 miRNA, 占肝脏 miRNAs 表达水平的 70% 以上, 参与肝脏增殖、分化、凋亡等众多生物学过程<sup>[3]</sup>。前期研究显示, 循环 miRNAs 有可能成为肿瘤、组织器官损伤理想的诊断指标。本研究拟通过对丙肝感染者外周循环血 miRNA-122 表达水平的检测, 结合 HCV RNA、

ALT、影像学肝脏病变等指标的变化, 探讨 miRNA-122 作为疾病监测和健康评估指标的意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 8 月至 2015 年 3 月在珠海出入境检验检疫局国际旅行卫生保健中心进行健康体检的出入境人员 96 例(出境劳务 69 例, 商务 9 例, 探亲 8 例, 出境旅游 8 例, 留学人员 2 例)作为研究组, 其中男 78 例, 女 18 例; 年龄 18~62 岁, 平均(39.9±9.6)岁。研究对象抗 HCV 抗体初筛检测阳性, 病程超过 1 年, 且未服用过任何抗病毒药物、保肝或免疫调节等药物治疗, 排除自身免疫性肝病、血吸虫肝病、酒精性肝硬化等患者。另选同期体检健康者 40 例作为对照组, 其中男 31 例, 女 9 例; 年龄 17~64 岁, 平均(40.6±11.5)岁。排除条件: 病毒性肝炎、酒精性肝病和肝癌等。所有研究对象均无血液、肾脏、肿瘤等可能影响血清水平的疾病, 且在 1 个月内无输

\* 基金项目: 珠海出入境检验检疫局科技计划项目(ZH2012-2)。

作者简介: 史咏梅, 女, 硕士, 主管技师, 主要从事卫生检验方面的研究。

血史。

**1.2 仪器与试剂** 7180 生化分析仪(日本日立);ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI);BIO-RAD 680 酶标仪(美国伯乐);SSD-3500 彩色超声诊断系统(日本阿洛卡);miRNA-122 荧光探针试剂盒和 U6 内对照试剂盒(美国 ABI);HCV RNA 荧光定量试剂盒(QIAGEN);HCV 抗体诊断试剂盒(中国丽珠)。

**1.3 方法**

**1.3.1 样本收集与处理** 分别收集受试者静脉血 5 mL 至普通真空干燥管及 2 mL 至乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管。室温下 4 h 内 3 000 r/min 离心 10 min 以尽快分离血清及血浆,并于 -70 °C 保存,用于丙肝抗体、ALT 测定,HCV RNA 与 miRNA 的提取及定量。

**1.3.2 HCV RNA 提取和定量检测** 按照 QIAGEN 试剂盒说明书进行 HCV RNA 核酸提取和定量检测。

**1.3.3 miRNA-122 提取和检测** 按照 QIAGEN 公司 miR-Neasy Mini Kit 说明书严格操作,提取血浆 miRNA。使用 Taqman miRNA 逆转录和 Taqman 探针试剂盒及 miRNA 特异性茎环结构(stem-loop)逆转录引物进行 miRNA 逆转录及扩增反应,操作参照 ABI 的试剂盒说明。采用 U6RNA 作为内参,所有样本同时对 miRNA-122 和 U6 RNA 进行扩增。采用相对定量方法( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )对扩增结果进行比较分析。

**1.3.4 丙肝抗体和 ALT 水平检测** 按照 HCV 抗体诊断试剂盒说明书严格操作。ALT 使用日立 7180 全自动生化分析仪测定,使用设备配套试剂并严格按照说明书操作。

**1.3.5 结果判定** HCV RNA:  $\geq 500$  U/mL 为阳性,丙肝抗体:  $\geq 1.0$  S/CO 为阳性。肝炎超声诊断依据:(1)肝实质点状高回声(回声水平肝高于脾、肾);(2)回声衰减(+)(++);(3)肝内脉管显示不清。凡具第(1)项加第(2)、(3)项之一项者可确诊。肝硬化超声诊断标准:肝被膜增厚,肝脏表面不光滑,肝实质回声增强,粗糙不匀称,门脉直径增宽,脾大,腹腔积液<sup>[4]</sup>。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,肝脏影像学改变的 miRNA-122 表达差异性分析采用完全随机设计两样本 *t* 检验进行比较分析。ALT、HCV-RNA 与 miRNA-122 相关性分析用双变量 Spearman 相关分析。以  $\alpha = 0.05$  为检验水准,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 HCV RNA 检出率** 96 例 HCV 抗体初筛阳性患者均进行 HCV RNA 定量检测,确诊 HCV RNA 阳性 49 例,阳性率为 60.9%,不同 S/CO 段的阳性率分别为 5.0%、33.3%、76.9%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。随着 S/CO 值升高,HCV RNA 阳性率增加。见表 1。

**表 1 不同 HCV 抗体阳性 S/CO 值 HCV RNA 检测结果[n(%)]**

HCV 抗体阳性 S/CO 值	n	HCV RNA 阳性	HCV RNA 阴性
1.0~4.0	20	1(5.0)	19(95.0)
>4.0~8.0	24	8(33.3)	16(66.7)
>8.0	52	40(76.9)	12(23.1)

**2.2 HCV 感染者血浆样本 MiRNA-122 水平的变化** 检测两组 miRNA-122 相对水平,对照组 miRNA-122 相对表达量为(1.62 ± 2.43),HCV RNA 阳性患者组表达量为(35.43 ± 22.89),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.3 HCV RNA 与 miRNA-122 的相关性分析** 对 HCV RNA 阳性患者病毒载量取以 10 为底计算的对数值为 X 轴,以 HCV RNA 阳性患者 miRNA-122 相对水平为 Y 轴,采用双变量线性相关分析,结果表明感染者外周血浆 miRNA-122 表达量与 HCV RNA 载量无相关性( $r = 0.126$ )。

**2.4 ALT 与 miRNA-122 的相关性分析** 49 例 HCV RNA 阳性患者均检测了 ALT 水平,其中升高者 35 例。采用双变量线性相关分析,结果表明感染者外周血浆 miRNA-122 表达量与 ALT 相关性较强( $r = 0.743$ )。

**2.5 肝脏影像学损害与 miRNA-122 变化的相关性分析** 对 49 例 HCV RNA 阳性患者进行肝脏彩色超声影像学检查显示轻度脂肪肝 11 例,其 miRNA-122 相对水平为(42.45 ± 9.22),其余患者 miRNA-122 相对水平为(20.45 ± 13.55)。经两样本 *t* 检验,两者差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**3 讨 论**

miRNAs 是一类长度在 18~25 个核苷酸的内源性非编码单链小分子 RNA。miRNAs 进化高度保守,具有转录后基因调控功能,在多种生理和病理过程中发挥作用<sup>[5-6]</sup>。循环 miRNAs 通常与血浆蛋白形成蛋白复合物,具有良好的稳定性及高度的组织特异性,目前多项研究发现,循环 miRNA 可能成为肿瘤、组织器官损伤等疾病的良好诊断指标。2008 年,Lawrie 等<sup>[7]</sup>首次在弥散性大 B 淋巴细胞瘤患者血清中检测出 miRNA-21,此后 Mitchell 等<sup>[8]</sup>的研究报道推测循环 miRNA 作为癌症诊断的生物标志物具有良好的前景。根据 miRNA 与靶 mRNA 配对程度的不同,可以将作用方式分为两种:一种是 miRNAs 通常与靶 mRNA 几乎或完全配对,通过 RNA 诱导的沉默复合体作用来直接讲解靶 mRNA;另一种是 miRNA 与靶 mRNA 的 3'-非编码区部分互补,从而通过 RNA 诱导的 RISC 抑制翻译水平的表达,不影响 mRNA。但是近年来的研究发现,miRNA 还能作用于靶基因的 5'-UTR 区域,促进靶基因复制。

研究者在 miRNA 介导的 HCV 与宿主的相互作用研究中发现,体外培养的 Huh-7.5 和含有 HCV 复制子的 Huh-7.5 细胞中 miRNA-122 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),提示 HCV 的复制对 miRNA-122 的合成可能并无明显影响。miRNA-122 是一种肝组织特异高表达的 miRNA,占全部肝脏 miRNA 的 70.0%。研究发现 HCV 能够将肝脏特异的 miRNA-122 募集到基因组 RNA5'-UTR 端,促进病毒蛋白的翻译,同时保护 HCV RNA 免于降解,从而促进病毒复制<sup>[9]</sup>。当体外培养细胞中 miRNA-122 的表达受到抑制,HCV 的复制水平下降 80.0%,而异位表达时可恢复病毒 RNA 的复制,提示 miRNA-122 有可能对病毒 RNA 进行干扰,还有可能被病毒收为己用。在 HCV 感染治疗的体外研究证明,miRNA-122 在 INF- $\beta$  作用下特异性下调,HCV 的复制受到抑制,但体内的研究却不一致,HCV 感染者肝组织中的 miRNA-122 的表达和 HCV 病毒载量无相关性<sup>[10]</sup>。一些研究表明,患者血清中的 miRNA-122 与 ALT 活性及炎性活动密切相关,其有可能成为非侵入性的生物标志来诊断慢性肝炎患者疾病严重程度,但也

有报道称 miRNA-122 仅为肝纤维化的指标,对肝损伤没有明确意义。但目前诸多研究表明,miRNA-122 在肝细胞的炎性和(或)纤维化程度的判断上有一定的指导意义,尚缺少大规模的循证医学依据和量化标准。

本项目比较了珠海口岸出入境人员健康对照与慢性丙肝患者 miRNA-122 相对表达量差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),研究组的表达量远高于对照组,并且 miRNA-122 的相对表达量与病毒载量无关,与 ALT 水平呈正相关,与多数前期研究结果一致,表明 miRNA-122 的表达与病毒复制无关而与感染者肝脏病变的活动性相关<sup>[11]</sup>。肝脏发生脂肪变性是慢性丙肝患者肝脏的重要病理学改变,排除脂肪肝形成的高危因素(性别、胰岛素抵抗、饮酒)等,慢性丙肝患者脂肪肝发病率仍有 50.0%,是无 HCV 感染的 2.5 倍<sup>[12-13]</sup>。本研究中出入境人员慢性丙肝患者脂肪肝患病率为 22.4%,可能是感染病毒后病程或抽样等因素所致患病率较低,研究结果表明合并脂肪肝患者 miRNA-122 的表达水平高于无脂肪肝者,表明 miRNA-122 表达与肝脏病变程度存在正相关。

综上所述,在慢性丙肝患者中,外周 miRNA-122 的血清水平具有评估肝脏组织活动性损害和病变严重性的潜在价值。

#### 参考文献

- [1] 武海波,周紫霄,黄奕祥. 2004~2011 年中国丙型肝炎病毒性肝炎流行病学特征分析[J]. 现代预防医学,2015,42(7): 1173.
- [2] 宋希兰. 丙肝、乙肝病毒感染与肝癌的相关性研究[J]. 中国实用医药,2009,4(26): 85-86.
- [3] Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact[J]. J Clin Oncol,2009,27(34): 5848-5856.
- [4] 范建高,曾民德. 脂肪性肝病[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:343.
- [5] 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.
- [6] Dussault S, Haddad P, Turgeon J, et al. Cigarette smoke-induced impairment of angiogenesis: role of micro RNAs [J]. Can J Cardiol,2013,29(10):S176.
- [7] Lawrie CH, Shira G, Heather MD, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. Br J Haematol,2008,141(5):672-675.
- [8] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Nat Acad Sci,2008,105(30):10513-10518.
- [9] Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122 [J]. J Virol, 2010, 84 (13): 6615-6625.
- [10] 徐洪涛,邢同京. miRNA 介导的丙型肝炎病毒与宿主相互作用研究进展[J]. 中华临床医师杂志,2011,5(12): 3585-3587.
- [11] Silvia C, Anna R, Marrero JA, et al. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease[J]. PLoS One,2011,6(8):e23937.
- [12] 姜丹凤,邢同京,黄俊星,等. 微小 RNA-122 和 29 在乙型肝炎病毒感染相关肝病中的表达及临床意义[J]. 中华临床医师杂志,2013,7(3):1085-1088.
- [13] Basaranoglu M, Basaranoglu G. Pathophysiology of insulin resistance and steatosis in patients with chronic viral hepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(36): 4055-4062.
- [14] Longhi C, Conte MP, Marazzato M, et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in Escherichia coli from community uncomplicated urinary tract infection in an area of high prevalence of quinolone resistance[J]. Eur J Clin Microb Infect Dis,2012,31(8):1917-1921.
- [15] Liu BT, Liao XP, Liao SD, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qepA1 and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene blaCTX-M-14 co-located on the same plasmid in two Escherichia coli strains from China [J]. J Med Microbiol,2012,61(Pt 4):603-605.
- [16] Delgado-Valverde M, Sojo-Dorado J, Pascual A, et al. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae [J]. Ther Adv Infect Dis, 2013,1(2):49-69.
- [17] Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli[J]. J Clin Microb,1996,34(4):908-911.

(收稿日期:2015-09-25 修回日期:2015-11-15)

(收稿日期:2015-10-25 修回日期:2015-12-15)

(上接第 737 页)

et al. High frequency of co-resistance in CTX-M-producing Escherichia coli to non-beta-lactam antibiotics, with the exceptions of amikacin, nitrofurantoin, colistin, tigecycline, and fosfomycin, in a county of Sweden [J]. Scand J Infect Dis,2013,45(4):271-278.

- [13] Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyna-Flores F, et al. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in Mexico [J]. Microb Drug Resist,2011,17(4):497-505.
- [14] Longhi C, Conte MP, Marazzato M, et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in Escherichia coli from community uncomplicated urinary tract infection in an area of high prevalence of quinolone resistance[J]. Eur J Clin Microb Infect Dis,2012,31(8):1917-1921.