

• 论 著 •

HBV 相关慢加急性肝衰竭患者血清 miRNA 表达谱及临床预测价值*

罗 杰¹, 杜 展¹, 汤仕龙², 陈明发¹, 席文娜¹, 孙水林^{1△}

(1. 南昌大学第二附属医院感染科, 南昌 330006; 2. 江西师范大学附属医院内科, 南昌 330006)

摘要:目的 分析乙型肝炎病毒(HBV)相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)与慢性乙型肝炎(CHB)患者血清中微小 RNA(miRNA)差异表达谱,寻找 HBV-ACLF 具有预测价值的 miRNA 标志物。方法 采用 miRNA 芯片技术检测 10 例 HBV-ACLF 患者和 5 例 CHB 患者血清中 miRNA 的差异表达,筛选出差异明显的 miRNA,应用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)进一步评价其在 HBV-ACLF 中的预测价值。结果 与 CHB 组相比,HBV-ACLF 组中 17 种 miRNA 表达下调,两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),9 种 miRNA 表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HBV-ACLF 组表达上调超过 2 倍的 miRNA 有 hsa-miR-4281、hsa-miR-6126、hsa-miR-1275,表达下调超过 2 倍的 miRNA 有 hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-92b-3p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-106b-5p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-451a、hsa-miR-486-5p。ROC 曲线分析结果表明,hsa-miR-4281、hsa-miR-6126、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-25-3p 等 4 种 miRNA 在 ROC 曲线下面积超过 0.800,其中 hsa-miR-4281 对 HBV-ACLF 预测的灵敏度及特异度最高。结论 HBV-ACLF 与 CHB 患者血清中 miRNA 谱存在表达差异,hsa-miR-4281 在预测 HBV-ACLF 严重性方面有一定价值。

关键词: miRNA; 肝衰竭; 乙型肝炎**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.02.014 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)02-0190-04

MiRNA expression profiles and predictive value in patients with hepatitis B-related acute on chronic liver failure*

LUO Jie¹, DU Zhan¹, TANG Shilong², CHEN Mingfa¹, XI Wenna¹, SUN Shuilin^{1△}

(1. Department of Infection, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of Internal Medicine, the Hospital of Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: **Objective** To analyze the differential expression profiles of microRNA(miRNA) in serum of patients with hepatitis B virus-related acute on chronic liver failure(HBV-ACLF) and chronic hepatitis B (CHB), and identify the miRNA markers for predictive value of HBV-ACLF. **Methods** Serum miRNA expression profiles of 10 patients with HBV-ACLF and 5 patients with CHB were detected by using miRNA microarray and predictive value of miRNA was analyzed by receiver operating characteristic(ROC) curve. **Results** Compared with the CHB group, the expression of 17 kinds of miRNA in HBV-ACLF group was down regulated, the difference between the two groups was statistically significant($P < 0.05$), the 9 kinds of miRNA expression were up-regulated, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). The levels of hsa-miR-4281, hsa-miR-6126 and hsa-miR-1275 in HBV-ACLF patients were more than two times higher than in CHB patients, and the level of hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-451a and hsa-miR-486-5p in HBV-ACLF patients were more than two times lower than in CHB patients. ROC curve analysis indicated the AUC value of hsa-miR-4281, hsa-miR-6126, hsa-miR-16-5p and hsa-miR-25-3p was more than 0.800, among them, the sensitivity and specificity of hsa-miR-4281 was the highest. **Conclusion** The miRNA expression profile are different between HBV-ACLF and HBV patients, and hsa-miR-4281 could be a potential biomarker for HBV-ACLF patients.

Key words: miRNA; liver failure; hepatitis B

乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭(HBV-ACLF)是临床上一种危重疾病,病死率极高,如能早期预测及诊断,将有助于临床治疗及预防,从而降低发病率及病死率。循环微小 RNA(miRNA)能在血清中稳定存在,不仅可作为多种疾病诊断的标志物,而且可作为疾病严重性预测、治疗的新型靶标^[1]。因此,本研究检测 HBV-ACLF 与慢性乙型肝炎(CHB)患者血清中 miRNA 谱的差异表达情况,以便寻找评估 HBV-ACLF 严重性的预测标志物及可能治疗的新靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集南昌大学第二附属医院 2015 年 6 月至

2016 年 1 月肝病科住院的 CHB 患者 5 例及 HBV-ACLF 患者 10 例,诊断符合 CHB 防治指南(2015 版)^[2]及肝衰竭诊治指南(2012 年版)^[3]。

1.2 标本采集 采集外周静脉血 8 mL,离心分离血清,放置 -80℃ 保存备用。

1.3 仪器与试剂 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司),SSPE 缓冲液(0.9 mol NaCl, 60 mmol Na₂HPO₄, 6 mmol 乙二胺四乙酸, pH6.8),冷冻高速离心机(日本 Kubota 公司),台式离心机(中国 Thmorgan 公司),移液器(德国 Eppendorf 公司),低速自动平衡离心机(中国北京医用离心机厂),超净工作

* 基金项目:江西省卫生和计划生育委员会资助项目(20155266);江西省科技厅资助项目(2015IBBG70163)。

作者简介:罗杰,男,副主任医师,主要从事肝病基础与临床研究。△ 通信作者, E-mail: sunshuilin2280@126.com。

台(中国苏净集团安泰空气技术有限公司)。

1.4 血清 RNA 提取 按照 Trizol 试剂说明书操作提取血清中总 RNA。

1.5 芯片实验 芯片实验由杭州联川生物有限公司(LC Sciences)进行。微阵列实验使用 4~8 μg 总 RNA 样品。使用 Poly(A)聚合酶在总 RNA 3'端加上 poly(A)尾巴,再将一个寡聚核苷酸标记与这个 poly(A)尾巴连接(ligation)用于后续的荧光标记。杂交反应利用微循环泵的循环作用在 Paraflo 微流体芯片上过夜进行。检测探针均使用 PGR 化学法进行原位合成。杂交解链温度是通过化学修饰检测探针进行平衡。杂交使用含有 25%甲酰胺的 100 μL 6×SSPE 缓冲液,杂交温度为 34 ℃。RNA 与探针杂交后,与标记特异结合的 Cy3 染料在微流体芯片上循环流动进行染色。利用激光扫描仪(GenePix 4000B,Molecular Device)采集杂交图像并使用 Array-Pro 图像分析软件(Media Cybernetics)进行图像数字化转换。数据分析首先是减除背景值,然后使用 LOWESS 过滤进行信号归一化。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线),计算 ROC 曲线下面积(AUC)和各诊断评价参数。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况 15 例患者中,CHB 患者 5 例,HBV-ACLF 患者 10 例;男 11 例,女 4 例;其肝功能、凝血酶原时间(PT)、HBV DNA 等一般情况见表 1。CHB 与 HBV-ACLF 两组之间总胆红素(TBIL)、凝血酶原时间(PT)差异有统计学意义($P<0.01$),丙氨酸氨基转移酶(ALT)、HBV DNA 差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 患者的一般情况比较($\bar{x}\pm s$)			
项目	CHB(<i>n</i> =5)	HBV-ACLF(<i>n</i> =10)	<i>P</i>
年龄(岁)	36.00±4.60	45.90±11.70	0.096
ALT(IU/L)	121.80±90.70	512.00±386.40	0.047
TBIL(μmol/L)	10.90±2.90	339.80±119.10	<0.01
PT(s)	10.50±0.60	31.10±10.80	<0.01
HBV DNA(log ₁₀ IU/mL)	6.24±1.18	7.29±1.25	0.142

2.2 miRNA 表达谱 CHB 与 HBV-ACLF 两组之间 miRNA 相对表达量见表 2,其中表达上调超过 2 倍的 miRNA 有 hsa-miR-4281、hsa-miR-6126、hsa-miR-1275,表达下调超过 2 倍的 miRNA 有 hsa-miR-486-5p、hsa-miR-451a、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-106b-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-92b-3p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-15a-5p,两组间的差异倍数及 *P* 值分布火山图见图 1。

2.3 差异表达的 miRNA 在 HBV-ACLF 中的预测价值 以芯片检测的 miRNA 相对表达量作为测试变量、HBV-ACLF 预测作为状态变量绘制 ROC 曲线及计算 AUC,见表 3。基于 ROC 曲线选择预测价值较高的 4 种 miRNA,分别为表达上调的 hsa-miR-4281、hsa-miR-6126 及表达下调的 hsa-miR-25-3p、hsa-miR-16-5p,找出其最佳截点并计算其对应的诊断评价参数,见表 4。miRNA 预测 HBV-ACLF 严重性的 ROC 曲线见图 2。其中,miR-4281 的诊断评价参数优于其他 miRNA 的诊断评价参数。

表 2 CHB 组与 HBV-ACLF 组间 miRNA 相对差异表达比较($\bar{x}\pm s$)

miRNA	CHB 组 (<i>n</i> =5)	HBV-ACLF 组 (<i>n</i> =10)	差异倍数	<i>P</i>
hsa-miR-4281	166±52	900±445	2.44	0.038
hsa-miR-6126	246±71	1 284±568	2.39	0.033
hsa-miR-1275	118±16	483±120	2.04	0.013
hsa-miR-7150	117±20	449±156	1.94	0.030
hsa-miR-1246	222±59	755±125	1.76	0.007
hsa-miR-4687-3p	241±60	603±195	1.32	0.041
hsa-miR-6090	762±169	1 808±272	1.25	0.011
hsa-miR-30c-1-3p	456±110	1 038±323	1.18	0.045
hsa-miR-486-5p	3 450±398	258±83	−3.74	0.006
hsa-miR-451a	43 193±3 873	4 063±1 141	−3.41	0.005
hsa-miR-16-5p	7 719±1 208	865±315	−3.16	0.010
hsa-miR-140-3p	567±167	69±28	−3.04	0.012
hsa-miR-106b-5p	678±159	100±38	−2.77	0.011
hsa-miR-92a-3p	2 378±961	414±151	−2.52	0.013
hsa-miR-25-3p	1 414±367	250±62	−2.50	0.006
hsa-miR-92b-3p	1 146±285	248±94	−2.21	0.016
hsa-miR-15a-5p	686±183	165±7	−2.06	0.000
hsa-miR-20a-5p	867±209	296±82	−1.55	0.023
hsa-miR-107	1 147±362	409±165	−1.49	0.049
hsa-miR-103a-3p	1 209±286	441±168	−1.46	0.049
hsa-let-7b-5p	734±193	267±45	−1.46	0.009
hsa-miR-22-3p	1 804±478	700±186	−1.37	0.027
hsa-miR-106a-5p	577±163	256±80	−1.17	0.046
hsa-miR-17-5p	608±205	275±79	−1.15	0.042
hsa-miR-4454	3 010±597	1 675±251	−0.85	0.021
hsa-miR-638	968±218	727±66	−0.41	0.031

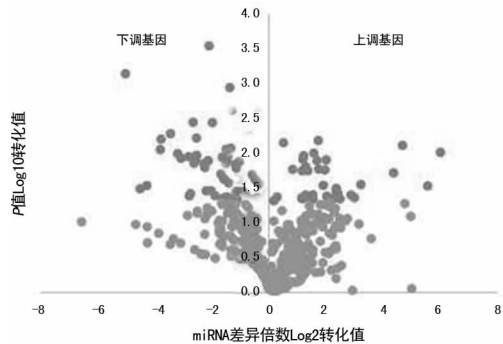


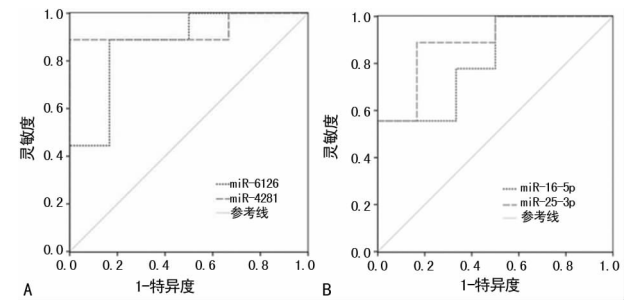
图 1 miRNA 差异倍数和 *P* 值分布火山图

表 3 miRNA 预测 HBV-ACLF 严重性的 AUC

miRNA	AUC	95%CI	<i>P</i>
hsa-miR-4281	0.926	0.777~0.995	0.007
hsa-miR-25-3p	0.889	0.716~1.000	0.013
hsa-miR-6126	0.870	0.674~0.896	0.018

续表 3 miRNA 预测 HBV-ACLF 严重性的 AUC			
miRNA	AUC	95%CI	P
hsa-miR-16-5p	0.815	0.592~1.000	0.045
hsa-miR-451a	0.778	0.530~1.000	0.077
hsa-miR-92a-3p	0.759	0.496~1.000	0.099
hsa-miR-486-5p	0.741	0.449~1.000	0.126
hsa-miR-92b-3p	0.722	0.438~1.000	0.157
hsa-miR-140-3p	0.704	0.425~0.982	0.195
hsa-miR-106b-5p	0.685	0.392~0.979	0.239
hsa-miR-1275	0.537	0.190~0.884	0.814
hsa-miR-15a-5p	0.667	0.345~0.988	0.289

表 4 miRNA 预测 HBV-ACLF 的最佳截点及各参数						
miRNA	最佳截点	灵敏度	特异度	Youden 指数	阳性预测值	阴性预测值
hsa-miR-4281	≥676.5	0.809	0.833	0.722	0.89	0.67
hsa-miR-6126	≥801.5	0.789	0.833	0.622	0.90	0.80
hsa-miR-16-5p	≤966.0	0.778	0.667	0.445	0.89	0.67
hsa-miR-25-3p	≤523.0	0.889	0.833	0.722	0.90	0.80



注：A 为 HBV-ACLF 组表达上调的 2 种 miRNA；B 为 HBV-ACLF 组表达下调的 2 种 miRNA。

图 2 HBV-ACLF 组表达差异明显的 miRNA ROC 曲线分析

3 讨 论

miRNA 是一种在转录后水平调控基因表达的内源性非编码单链 RNA,参与机体的发育、增殖、分化、凋亡、炎症等一系列生物学过程。miRNA 不仅在不同疾病状态下表达谱不同,而且可以稳定地存在于血液、血清等体液中。因此,循环 miRNA 作为生物学标志物被广泛应用于疾病诊断、治疗、预后判断等多方面。例如肝脏疾病中,血清 miR-21、miR-122 在肝癌患者中明显升高^[4],miR-122 和 miR-192 在药物性肝损伤的患者血清中表达明显上调^[5]。Zhang 等^[6]分析了 CHB 患者与非酒精性脂肪肝、健康患者血清中 miRNA 的变化情况,发现 miR-122、miR-572、miR-575、miR-638 明显高于对照组,miR-744 低于对照组。另外,Xi 等^[7]通过构建腺病毒为载体的 Ad-mfgl2-miRNA、Ad-mFas-mTNFR1-miRNA 经尾静脉注射治疗肝衰竭模型小鼠,对暴发性肝衰竭小鼠产生保护作用。这些研究证实 miRNA 不仅能作为疾病诊断、预后评价的潜在标志物,同时可能成为一种疾病治疗的有效手段。

本研究通过芯片检测到 12 种 miRNA 在 HBV-ACLF 与 CHB 患者中表达差异明显。其中表达上调超过 2 倍的 miR-

NA 有 hsa-miR-4281、hsa-miR-6126、hsa-miR-1275,表达下调超过 2 倍的 miRNA 有 hsa-miR-486-5p、hsa-miR-451a、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-106b-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-92b-3p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-15a-5p,提示这些 miRNA 与 HBV-ACLF 的发生机制有关。目前 HBV-ACLF 发病机制未明,可能受到病毒与宿主相互作用所致。本研究结果提示 HBV-ACLF 与 CHB 患者血清中 miRNA 表达差异,而且差异表达的 miRNA 可作为 HBV-ACLF 诊断及判断疾病严重程度的标志物。有类似的研究也进一步提供了依据。Ding 等^[8]检测外周血单核细胞 miRNA,发现 HBV-ACLF 相比 CHB 患者,hsa-miR-21-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-143-3p、hsa-miR-143-5p、hsa-miR-374a-3p 和 hsa-miR-542-3p 差异表达明显,可作为诊断 HBV-ACLF 的有效标志物。Chen 等^[9]比较了 HBV-ACLF 与 CHB 病毒携带者外周血单核细胞中 miRNA 表达差异,hsa-miR-16 和 hsa-let-7a 在 HBV-ACLF 组中表达较 CHB 病毒携带者高 8 倍以上,提示 hsa-miR-16 和 hsa-let-7a 的表达可能促进了 HBV-ACLF 的发生。Ji 等^[10]的研究证实了肝脏特异性 miR-122-5p 不仅在 HBV-ACLF 患者中高表达,而且能抑制 Huh7 和 HepG2 细胞中 HBV 复制。另外一项研究结果提示 miR-130a 在 HBV-ACLF 中可作为一种有用的判断预后标志物^[11]。

本研究进一步通过 ROC 曲线分析发现,miR-4281 在早期诊断 HBV-ACLF 的价值最高,灵敏度及特异度均高达 80%以上,提示其不仅可以预测 HBV-ACLF 发病,而且可能在发病过程中发挥着重要作用。目前关于 miR-4281 的研究主要集中在乳腺癌、黑色素瘤等疾病中。Hammam 等^[12]发现 hsa-miR-4281 在乳腺癌患者中表达明显上调,Sand 等^[13]发现 hsa-miR-428 在黑色素瘤患者中表达上调,参与黑色素瘤的发生发展。另外的研究提示 miR-4281 参与手足口病的发生^[14]。而且在风湿性关节炎发生机制中调节 T 细胞表型^[15]。至于 miR-4281 如何影响 HBV-ACLF 疾病的进程有待于进一步研究。

综上所述,本研究发现 HBV-ACLF 与 CHB 患者血清中差异表达 miRNA,并提示 miR-4281 在 HBV-ACLF 疾病的诊断及判断预后方面有一定价值,可能参与了 HBV-ACLF 的发病。同时,本研究也存在样本量少的局限性,有必要扩大样本量验证 miR-4281 作用,并分析其作用靶点及信号通路,阐述 miR-4281 影响 HBV-ACLF 发生的机制,可能对 HBV-ACLF 的治疗提供新的思路。

参考文献

[1] Allegra A,Alonci A,Campo S,er al. Circulating microRNAs;new biomarkers in diagnosis,prognosis and treatment of cancer[J]. Int J Oncol,2012,41(6):1897-1912.

[2] 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 版)[J]. 中华肝脏病杂志,2015,23(12):888-905.

[3] 中华医学会感染病学会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组.肝衰竭诊治指南(2012 版)[J]. 中华临床感染病杂志,2012,5(6):321-327.

[4] Xu J,Wu C,Che X,et al. Circulating microRNAs,miR-21,miR-122 and miR-223,in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis[J]. Mol Carcinog,2011,50(2):136-142.

(下转第 197 页)