

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01381

慢性乙肝患者外周血 microRNAs 的表达变化

Changes of circulating microRNA profile in patients with chronic hepatitis B

贾音, 张毅, 费明钰, 孙树汉*

第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

[关键词] microRNAs; 血浆; 慢性乙型肝炎

[中图分类号] R 512.62

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)12-1381-03

microRNAs(miRNAs)是大小约 21~23 个碱基的非编码单链小分子 RNA,通过与靶基因 3'端非翻译区(3'-UTR)的不完全碱基配对发挥基因调控作用,使 mRNA 降解或抑制靶 mRNA 翻译。miRNAs 广泛参与了生物体多种生理和病理过程,包括细胞增殖、凋亡、应激反应和肿瘤生成等^[1-3]。最近有报道指出随着一些疾病的发生发展,外周血循环中的 miRNAs 表达量也有显著变化^[4-6]。我国是乙型肝炎高发区,目前关于 miRNAs 在乙型肝炎中的表达变化尚不清楚。由于病毒性肝炎的 miRNAs 表达谱还没有详细的研究,我们根据文献报道一共选择了 9 个与肝脏疾病和病毒复制相关的 miRNAs,观察这些 miRNAs 在慢性乙型肝炎患者血浆中的表达量变化,为进一步了解乙型肝炎的分子生物学表现提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究对象 慢性乙型肝炎患者 26 例,其中男性 15 例,女性 11 例,平均年龄(42.3±7.1)岁,均符合 2005 年中华医学会制定的《慢性乙型肝炎防治指南》中慢性乙肝的诊断标准(血清中 HBsAg 阳性持续 6 个月以上,并且存在肝脏组织病理学改变)。排除合并急性病毒性肝炎、自身免疫性肝病、酒精性肝病、药物性肝病、代谢性肝病、遗传性肝病、隐源性肝病、血吸虫性肝病等的患者。所有患者均无血液、肾脏、肿瘤等可能影响血清水平的疾病,并且近 1 个月内无输血制品史。入院后均经 B 超或 CT 检查排除肝癌。健康对照组 15 人为健康献血员,其中男性 8 例,女性 7 例,平均年龄(43±8.2)岁。两组研究对象的性别及年龄构成比差异均无统计学意义。本研究经第二军医大学长海医院伦理委员会批准,所有患者及其家属均知情同意,并签署了知情同意书。在抽血之前,所有患者均没有接受任何相关治疗。

1.2 样本处理和 RNA 抽提 采集患者的外周血 4 ml 加入含 360 μl EDTA 的抗凝管中,静置 2 h 左右,1 600×g,4℃离心 10 min,将上清移至另一干净的 Ep 管中,再 16 000×g,4℃离心 10 min,收集血浆至一新的 Ep 管中。加入 TRIzol LS reagent (Invitrogen),充分混匀后,放置冰上 15 min,12 000×g,4℃离心 10 min,小心取上清,置入 1.5 ml 的 Ep 管中,加入氯仿(上清:氯仿=1:0.2),冰上放置 5 min 后,12 000×g,4℃离心 15 min,取上层水相。采用 Applied Biosystems 公司 mirVana miRNA Isolation Kit 富集血浆中的小 RNA(具体步骤参照试剂盒说明书)。

1.3 RNA 浓度测定 用 Eppendorf 生物分光光度计测定 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 的光密度(D)值,读取 RNA 样品的浓度,并根据 D_{260}/D_{280} 的比值初步判断 RNA 纯度。每份 RNA 均经过 3 次独立测量,如误差不超过 5% 则取 3 次测量平均值作为最终浓度。

1.4 反转录 PCR 和实时定量 PCR 每个样本取 50 ng 小 RNA 进行反转录。从已经发表的 miRNAs 表达谱数据中选择了 9 个 miRNAs,分别是 miR-199a、miR-126、miR-181a、miR-122、miR-21、miR-223、miR-125b、miR-222 和 miR-150^[7-14]。miRNAs 的序列来自 Sanger 数据库,根据 Chen 等^[15]在 2005 年建立的方法自行设计了基因特异性颈-环反转录引物(表 1)。以 U6 为内参基因。miRNA 的实时定量 PCR 技术使用 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa)试剂,Applied Biosystems 公司的 Step One Plus real-time PCR system 实时定量 PCR 仪,引物见表 1。反应条件:95℃ 30 s,90℃ 10 s,55℃ 15 s,72℃ 20 s,45 个循环。实时定量 PCR 结果直观的以 CT 值形式得到,所有的样本同时对 miRNA 和 U6 进行扩增,每个样本重复 3 次。采用相对定量方法($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)对定量结果进行比较、分析。

[收稿日期] 2010-06-23

[接受日期] 2010-10-27

[基金项目] 国家科技支撑计划(2006BA105A05),国家自然科学基金(30901613),上海市科委基础研究重大项目(08JC1405300),上海市自然科学基金(09ZR1439100)。Supported by National Key Technology R&D Program of China (2006BA105A05), National Natural Science Foundation of China (30901613), the Major Basic Research Program of Shanghai (08JC1405300), and Shanghai Natural Science Foundation (09ZR1439100)。

[作者简介] 贾音,硕士生。E-mail: jyin_2007@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871053, E-mail: shsun@vip.sina.com

表1 miRNAs 反转录引物与实时定量 PCR 引物

miRNA		引物序列
hsa-miR-21	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT CAA CA-3'
	实时定量	5'-GCT GCG GTA GCT TAT CAG ACT GA-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
hsa-miR-126	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC GCA TT-3'
	实时定量	5'-CGT CCG GTC GTA CCG TGA GTA AT-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
hsa-miR-125b	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT AC GAC TCA CAA-3'
	实时定量	5'-GGC G TC CCT GAG ACC CTA AC-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
hsa-miR-150	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC ACT GG-3'
	实时定量	5'-GGC GGT CTC CCA ACC CTT GTA-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
hsa-miR-181a	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CTC AC-3'
	实时定量	5'-CGG GGA ACA TTC AAC GCT GTC G-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
hsa-miR-223	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT GGG GT-3'
	实时定量	5'-GGG CCG GTG TCA GTT TGT CAA AT-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
hsa-miR-222	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA CCC AG-3'
	实时定量	5'-GCG TCG GAG CTA CAT CTG GCT A-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
hsa-miR-199a	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG AAC AG-3'
	实时定量	5'-GCC GCC CAG TGT TCA GAC TAC-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'
hsa-miR-122	反转录	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAACGACCAAAC-3'
	实时定量	5'-GGG CGT GGA GTG TGA CAA TGG T-3', 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'

1.5 HBV DNA 浓度测定 采用匹基公司的乙型肝炎病毒核酸扩增荧光定量检测试剂盒测定慢性乙型肝炎患者外周血 HBV DNA 浓度。

1.6 统计学处理 所有统计分析均采用 SPSS 软件完成。血浆中 miRNAs 表达量水平的变化情况采用 Wilcoxon 秩和检验。HBV DNA 与 miR-122 相关性分析用 Spearman 相关系数分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 慢性 HBV 患者血浆样本中 miRNAs 表达量变化 图 1 显示的是 9 个 miRNAs 在乙型肝炎组和正常对照组的表达量变化情况。在这几个候选 miRNAs 中, miR-181a ($P=0.24$)、miR-126($P=0.21$)和 miR-223($P=0.31$)的表达量水平乙型肝炎组与对照组相比略有下降,但差异均无统计学意义。其余 6 个 miRNAs 的表达量乙型肝炎组与对照组相比显示上升水平,miR-150 ($P=0.27$)、miR-21($P=0.17$)和 miR-222($P=0.36$)的表达量变化没有统计学意义,miR-125b ($P<0.05$)、miR-199a($P<0.05$)和 miR-122($P<0.01$)的表达量变化具有统计学意义,分别平均升高了 5.9 倍、6.6 倍和 25.5 倍,其中以 miR-122 的表达量变化最大。

2.2 HBV DNA 和 miR-122 的相关性分析 所有慢性乙型肝炎患者均检测了外周血中的 HBV DNA 浓度,并做了与血浆中 miR-122 的相关性分析。分析发现患者血浆中 miR-122 的表达量变化与 HBV DNA 浓度不相关($R=0.13$, 图 2)。

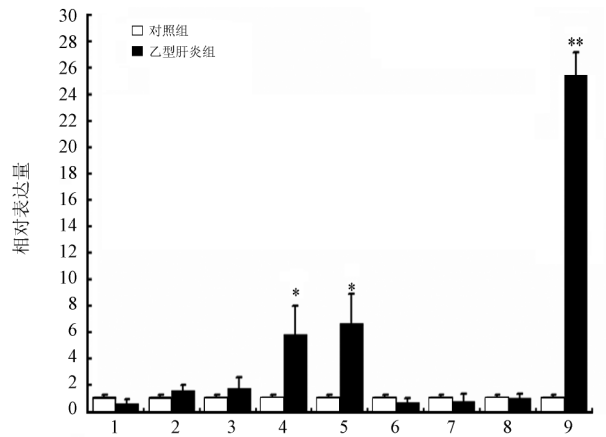


图1 两组血浆中 miRNAs 的相对表达量

1: miR-181a; 2: miR-150; 3: miR-21; 4: miR-199a; 5: miR-125b; 6: miR-126; 7: miR-223; 8: miR-222; 9: miR-122. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与对照组比较

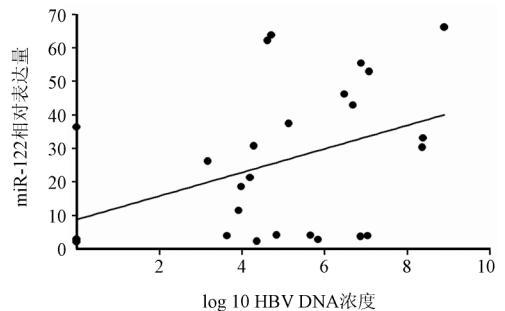


图2 HBV DNA 和 miR-122 的相关系数图

3 讨论

miRNAs 广泛参与生物体多种生理和病理过程^[1-3], 外周血中存在特异性 miRNAs 分子, 随着生理状况、疾病种类和病程的不同, miRNAs 在血清和血浆中存在的种类和数量将发生变化。本研究检测了慢性乙型肝炎患者外周血中 miRNAs 的表达量变化。由于目前病毒性肝炎包括慢性乙型肝炎的 miRNAs 表达谱都还没有详细的研究报道, 为广泛筛选外周血中变化的 miRNAs 分子, 我们根据文献报道选择了肝脏组织中表达水平较高的 miRNAs(miR-122、miR-126、miR-125b)、原发性肝癌组织中上调或下调具有显著统计学意义的 miRNAs(miR-21、miR-125b、miR-223、miR-199a、miR-222)以及与病毒复制有关的 miRNAs(miR-150、miR-181a), 通过自行设计的特异性 miRNAs 引物, 以实时定量 PCR 技术测定了它们在慢性乙型肝炎肝损伤患者的血浆样本中的表达变化, 结果发现在这 9 个 miRNAs 中, 表达量变化有统计学意义的有 3 个: miR-199a、miR-125b 和 miR-122, 其中 miR-122 的变化最为显著。miR-122 是一种人的肝脏特异性 miRNA 分子^[12,14,16], 被认为是成人肝脏中表达量最高的一种 miRNA, 占到肝脏总 miRNAs 的 70% 左右。目前对于外周血循环 miRNAs 来源的主要观点有: (1) 循环 miRNA 来自于凋亡或坏死细胞的主动释放, 以及循环细胞的裂解; (2) miRNAs 被包裹在一种由细胞分泌的外核体中, 释放入外周血^[4]。但是外周血循环 miRNAs 表达量改变的具体机制还没有定论。因为 miR-122 在乙型肝炎肝损伤的患者外周血中表达量升高最为显著, 所以我们以 miR-122 为后续研究对象, 分析了血浆中 miR-122 的表达量与检测病毒复制的常规标记物 HBV DNA 的相关性, 发现两者不具有相关性, 这提示 miR-122 与乙肝病毒的复制可能没有关系。由于本研究选择的是已经发生了病理性肝损伤的患者, miR-122 的显著升高以及其他 miRNAs 在外周血中表达量的改变是否与肝细胞的损伤有关, 还有待于进一步研究。

志谢 衷心感谢第二军医大学长海医院感染科郑瑞英医生在样本收集方面给予的大力帮助!

[参考文献]

- [1] Williams A E. Functional aspects of animal MicroRNAs[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 545-562.
- [2] Zhang B, Wang Q, Pan X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210: 279-289.
- [3] Iorio M V, Croce C M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 5848-5856.
- [4] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, Fritz B R, Wyman S K,

- Pogosova-Agadjanyan E L, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 10513-10518.
- [5] Ng E K, Chong W W, Jin H, Lam E K, Shin V Y, Yu J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening[J]. *Gut*, 2009, 58: 1375-1381.
- [6] Chim S S, Shing T K, Hung E C, Leung T Y, Lau T K, Chiu R W, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2008, 54: 482-490.
- [7] Tjaden B, Goodwin S S, Opdyke J A, Guillier M, Fu D X, Gottesman S, et al. Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 2791-2802.
- [8] Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel D P, Lodish H F. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 7080-7085.
- [9] Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation[J]. *Semin Cancer Biol*, 2008, 18: 131-140.
- [10] Wong Q W, Lung R W, Law P T, Lai P B, Chan K Y, To K F, et al. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of stathmin1[J]. *Gastroenterology*, 2008, 135: 257-269.
- [11] Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations[J]. *Hepatology*, 2008, 47: 1955-1963.
- [12] Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, et al. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues[J]. *Genome Res*, 2004, 14: 2486-2494.
- [13] Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 166.
- [14] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver[J]. *J Hepatol*, 2008, 48: 648-656.
- [15] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, Zhou Z, Lee D H, Nguyen J T, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: e179.
- [16] Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia M A, 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: 106-113.

[本文编辑] 孙岩