

miR-101 在肝纤维化中表达及其与肝功能指标、炎性细胞因子、肝纤维化相关因子的相关性

荆菁华, 史九波, 安淑霞

三门峡市中心医院, 河南 三门峡 472000

摘要: **目的** 探讨微小 RNA-101(miR-101)在肝纤维化中表达及其临床意义。 **方法** 选取肝纤维化患者 70 例为研究组,根据肝纤维化分期将研究组患者分为 S1 期 8 例、S2 期 30 例、S3 期 20 例、S4 期 12 例;选取肝囊肿患者 70 例为对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-101 的表达水平,检测肝功能指标、炎性细胞因子、肝纤维化相关因子。采用 Pearson 法分析肝纤维化患者 miR-101 与丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、血清 C3、C4、胆碱酯酶(cholinesterase, ChE)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)、Ⅲ型前胶原肽(serum precollagen Ⅲ, PCⅢ)、APRI 指数的相关性。 **结果** 与对照组比较,研究组患者肝组织中 miR-101 的表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),肝纤维化 S1 期、S2 期、S3 期、S4 期患者肝组织中 miR-101 的表达水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,研究组 ALT、AST、TGF- β 1、TNF- α 、IL-6、HA、PCⅢ水平与 APRI 指数均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而血清补体 C3、C4 水平与 ChE 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);miR-101 与 ALT、AST、TNF- α 、IL-6、HA、PCⅢ呈负相关($P < 0.05$),而与 ChE 呈正相关($P < 0.05$)。 **结论** miR-101 在肝纤维化中表达下调,其表达水平与患者肝功能损伤、肝纤维化程度及炎性细胞因子密切相关。

关键词: miR-101;肝纤维化;C3;C4;ChE;HA;PCⅢ;APRI 指数

中图分类号: R575 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2021)01-0102-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.01.028

肝纤维化是临床常见的一种疾病类型,其主要病理基础为肝细胞因炎症或坏死而促使肝脏内纤维结缔组织异常增生^[1-2]。目前肝纤维化发生及发展的分子机制尚未完全阐明,因而寻找肝纤维化发生发展相关

基金项目:国家科技重大专项“十三五”课题(课题编号:2017ZX10302201)

作者简介:荆菁华(1973-),女,河南灵宝人,本科,副主任技师,研究方向:微生物、免疫。

的分子标志物对肝纤维化早期诊断及改善患者预后具有重要意义。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性具有调控功能的非编码小 RNA 分子,可通过靶向结合靶基因促使靶基因降解从而抑制其翻译,并可参与细胞增殖、分化等过程,研究表明肝实质细胞或肝非实质细胞活化后可释放炎性细胞因子,从而导致肝脏炎症损伤进而促进肝纤维化的发生,miRNA 可调控机

及加样后的检查,确保样本量达到检测要求。

出现 QS_INVALID 报错的原因则比较复杂,对照 Cobas TaqMan 检测系统操作手册发现,与患者个体状况,如高血脂导致血浆中血脂含量过高,样本采集与分离不规范导致的溶血等有关,使得扩增反应被抑制;经与厂家工程师沟通探讨,也有可能购买的耗材,尤其是 s-tube 样本管的材质中可能含有扩增抑制剂有关;存放在 4℃ 冰箱中的试剂若在室温中平衡不到位,也可能导致个别样本出现 QS_INVALID 报错。而在实际操作中,若平衡好试剂、更换新批次 s-tube 样本管,这类样本重复检测可能成功检出,若是样本本身的原因,也可能再次报错。

参考文献

- [1] Wilson DP, Law MG, Grulich AE, et al. Relation between HIV viral load and infectiousness: a model-based analysis[J]. Lancet, 2008, 372(9635):314-320.
- [2] Wang SQ, Xu F, Demirci U. Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings[J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(6):770-781.
- [3] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组. 艾滋病诊疗指南(2011 版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(6):321-330.
- [4] 丁莉莎,陈曦,熊晓燕,等. 一种新型国产试剂检测 HIV-1 病毒载量[J]. 实用预防医学, 2014, 21(1):19-21.
- [5] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2015 年修订版)[EB/OL]. (2016-08-11) [2020-08-31]. http://ncaids.chinacdc.cn/xgx/jszl/201608/t20160810_133524.htm2015.

收稿日期:2020-07-21

体免疫、炎症反应等生理病理过程^[3-5]。微小 RNA-101 (microRNA-101, miR-101) 在肝纤维化组织中表达下调, 并可能参与肝纤维化发生过程^[6]。但 miR-101 在肝纤维化发生过程中的作用机制及其与细胞因子、肝纤维化相关因子的相关性尚未可知。因此, 本研究主要探讨肝纤维化患者中 miR-101 表达量及其与肝功能指标、炎症细胞因子、肝纤维化相关因子的相关性, 为肝纤维化的预防及治疗提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2017 年 12 月—2018 年 12 月在三门峡市中心医院治疗的肝纤维化患者 70 例为研究组, 其中男 48 例, 女 22 例, 年龄 41~72 岁, 平均年龄 (56.35±3.26) 岁, 所有患者均经影像学检查确诊为肝纤维化。根据肝纤维化分期将研究组患者分为 S1 期 8 例 (汇管区纤维化), S2 期 30 例 (汇管区-汇管区纤维化, 小叶结构完整), S3 期 20 例 (汇管区-汇管区或汇管区-中央静脉桥样纤维化, 小叶结构紊乱), S4 期 12 例 (肝硬化)^[7]。选取同期本院治疗的肝囊肿患者 70 例为对照组, 所有患者均经影像学检查确诊为肝囊肿, 其中男 39 例, 女 31 例, 年龄 43~78 岁, 平均年龄 (58.67±6.32) 岁。排除标准: 合并其他系统疾病患者; 临床资料不完整者; 伴有肝癌患者。两组患者性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。本研究经该院伦理委员会批准, 所有患者知情且签署同意书。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 所有患者均进行穿刺活检, 切取 10 mg 病理样本, 液氮中研磨, 制备组织悬液, 4℃ 条件下经 3 500 r/min 离心 10 min (离心半径 12 cm), 置于 -80℃ 超低温冰箱保存。所有患者均于次日清晨空腹抽取静脉血 5 ml, 4℃ 条件下经 3 500 r/min 离心 10 min (离心半径 12 cm), 吸取血清置于离心管内, 置于 -20℃ 冰箱内保存。

1.2.2 miR-101 表达水平检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测。取出冻存肝组织, 采用 Trizol 法 (美国 Invitrogen 公司) 提取组织中的总 RNA, 应用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。采用反转录试剂盒合成 cDNA。反转录体系: RNA 2 μl, 10×RT Buffer 2 μl, dNTP 0.4 μl, Multiscribe RT 1 μl, 10×Random Primer 2 μl, RNase-Free ddH₂O 补足体系至 20 μL; 反应条件: 25℃ 10 min, 37℃ 60 min, 95℃ 5 min, 4℃ 保存。miR-101 正向引物 5'-GCGATCGAGTCAGCTAGCT-3', 反向引

物 5'-CAGCTAGCATCAGTCC GACT-3'; U6 正向引物 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3', 反向引物 5'-GGAACG CTTCACGAATTTG-3', 引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。qRT-PCR 反应体系: cDNA 2 μl, Real-Time Master Mix 10 μl, 正反向引物各 1 μl, RNase-Free ddH₂O 补足体系至 20 μl; 反应条件: 95℃ 2 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 72℃ 30 s (循环 40 次)。miR-101 以 U6 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-101 的表达水平。反转录试剂盒与 qRT-PCR 试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.2.3 肝功能指标检测 应用迈瑞 BS-220 型全自动生化分析仪 (南京贝登医疗股份有限公司) 检测肝功能指标丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平。

1.2.4 血清细胞因子水平检测 采用 ELISA 法检测细胞因子转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的水平, 检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 血清补体与 ChE 水平检测 采用免疫散射比浊法检测血清补体 C3、C4 水平, 检测仪器为 BN II 特种蛋白仪。应用全自动生化分析仪检测血清胆碱酯酶 (cholinesterase, ChE) 的水平, 检测试剂盒购自美国贝克曼公司, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 血清 HA、PCⅢ水平检测与 APRI 指数计算 采用 ELISA 法检测血清透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 水平, 采用放射免疫分析法检测血清Ⅲ型前胶原肽 (precollagen Ⅲ, PCⅢ) 水平, 检测试剂盒购自上海慧颖生物科技有限公司, 严格按照试剂盒说明书进行操作。AST 与血小板指数的比值 (APRI), 应用全自动生化分析仪检测血小板指数, 并计算 APRI。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS 21.0 进行分析, 符合正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- t 检验; 采用 Pearson 法分析肝纤维化患者 miR-101 与肝功能指标、细胞因子、血清 C3、C4、ChE、HA、PCⅢ、APRI 指数的相关性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝纤维化患者肝组织中 miR-101 的表达水平比较 与对照组比较, 研究组患者肝组织中 miR-101 的

表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 S1 期比较, S2 期、S3 期、S4 期患者肝组织中 miR-101 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 S2 期比较, S3 期、S4 期患者肝组织中 miR-101 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 S3 期比较, S4 期患者肝组织中 miR-101 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 肝纤维化患者肝组织中 miR-101 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-101
对照组	70	1.02±0.13
研究组	70	0.33±0.09 ^a
S1 期	8	0.71±0.11 ^a
S2 期	30	0.51±0.03 ^{ab}
S3 期	20	0.32±0.02 ^{abc}
S4 期	12	0.20±0.04 ^{abcd}
<i>F</i> 值		466.201
<i>P</i> 值		0.000

注: 与对照组比较, a $P < 0.05$; 与 S1 期比较, b $P < 0.05$; 与 S2 期比较, c $P < 0.05$; 与 S3 期比较, d $P < 0.05$ 。

2.2 两组患者肝功能指标比较 与对照组比较, 研究组患者肝功能指标 ALT、AST 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 两组患者肝功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 70$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照组	38.52±3.62	41.21±4.26
研究组	63.42±5.03	64.32±4.75
<i>t</i> 值	33.617	30.304
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.3 两组患者血清细胞因子水平比较 与对照组比较, 研究组患者血清 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 两组患者血清细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 70$)

组别	TGF- β 1 (ng/mL)	TNF- α (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)
对照组	45.26±3.26	20.45±2.62	18.59±2.16
研究组	96.52±4.32	56.32±4.25	41.21±3.58
<i>t</i> 值	79.244	60.110	45.263
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.4 两组患者血清补体 C3、C4 与 ChE 水平比较 与对照组比较, 研究组患者血清补体 C3、C4 水平与 ChE 水平显著降低 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 两组患者血清补体 C3、C4 与 ChE 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 70$)

组别	C3 (g/L)	C4 (g/L)	ChE (U/L)
对照组	1.06±0.11	0.23±0.06	8 012.85±556.42
研究组	0.86±0.12	0.13±0.05	2 857.16±852.34
<i>t</i> 值	10.279	10.712	42.378
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.5 两组患者血清 HA、PCⅢ水平与 APRI 指数比较 与对照组比较, 研究组患者血清 HA、PCⅢ水平与 APRI 指数显著升高 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 5 两组患者血清 HA、PCⅢ水平与 APRI 指数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 70$)

组别	HA (ng/L)	PCⅢ (μ g/L)	APRI 指数
对照组	66.32±13.25	68.47±21.03	0.21±0.02
研究组	156.57±36.24	163.24±44.52	0.58±0.13
<i>t</i> 值	19.569	16.104	23.536
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.6 肝纤维化患者 miR-101 与肝功能指标、细胞因子、血清 C3、C4、ChE、HA、PCⅢ、APRI 指数的相关性分析 采用 Pearson 法分析肝纤维化患者 miR-101 与肝功能指标、细胞因子、血清 C3、C4、ChE、HA、PCⅢ、APRI 指数的相关性, 结果显示, miR-101 与 ALT、AST、TNF- α 、IL-6、HA、PCⅢ呈负相关 ($P < 0.05$), 而与 ChE 呈正相关 ($P < 0.05$), 见表 6。

表 6 肝纤维化患者 miR-101 与肝功能指标、细胞因子、血清 C3、C4、ChE、HA、PCⅢ、APRI 指数的相关性

指标	miR-101	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
ALT	-0.336	0.013
AST	-0.352	0.010
TGF- β 1	-0.196	0.428
TNF- α	-0.485	0.000
IL-6	-0.302	0.036
C3	0.213	0.223
C4	0.224	0.135
ChE	0.512	0.000
HA	-0.412	0.008
PCⅢ	-0.553	0.000
APRI 指数	-0.203	0.326

3 讨论

既往研究显示 miRNA 在肝纤维化中异常表达并可参与多种肝脏疾病发生及发展过程, 部分 miRNA 还可参与纤维化发展进程^[8-10]。但 miR-101 在肝纤维化发生过程中的调控作用尚未阐明。

肝纤维化发生过程中 miR-101 的表达量降低, 其可能是通过调节 TGF- β 1 的表达从而参与肝纤维化过程^[11-12]。研究表明 miR-101 表达量上调可抑制心脏纤维化的发生^[13]。相关报道指出 miR-101 在肝纤维化发生过程中发挥重要调控作用^[14]。本研究结果显示肝纤维化患者肝组织中 miR-101 的表达量明显降低, 且随着肝纤维化分期的增加而显著降低, 提示 miR-101 表达量降低可能促进肝纤维化的发生及发展。有研究表明 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 细胞因子在肝纤维化患者中的表达水平显著升高, 其中 TGF- β 1 是肝纤维化发生的危险因子, TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 可通过影响细胞外基质合成、降解从而参与肝纤维化发生过程^[15]。本研究结果显示研究组患者肝功能指标 ALT、AST 水平显著升高, 血清 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6

水平显著高于对照组,与上述研究报道结果相似,进一步研究显示 miR-101 与 ALT、AST、TNF- α 、IL-6 呈负相关,提示 miR-101 表达量降低可促进 TNF- α 、IL-6 等细胞因子表达而影响细胞外基质合成、降解从而参与肝纤维化发生及发展过程。

肝脏是补体合成的主要器官,研究表明补体 C3、C4 在肝炎患者血清中表达水平降低,随着疾病严重程度的增加而显著降低,而血清中 ChE 是一种乙酰胆碱酯酶,其主要来源于肝细胞的拟胆碱酯酶与新生红细胞,通过检测血清 ChE 水平可判断患者肝脏损伤程度,ChE 水平降低预示患者肝细胞合成功能障碍^[16-17]。本研究结果显示研究组患者血清 C3、C4、ChE 水平显著降低,与上述研究结果相似,提示肝纤维化患者肝功能严重受损。进一步分析显示 miR-101 与 ChE 呈正相关,提示 miR-101 表达量降低与肝功能损伤密切相关。HA 是一种糖胺多糖,其主要是由肝间质成纤维细胞合成及分泌并可被肝内细胞降解,当肝细胞受损时,肝纤维化早期患者血清 HA 含量显著升高,PCⅢ水平升高可反映肝纤维合成状况及炎症反应程度,其表达水平与肝纤维化程度有关^[18]。本研究结果显示研究组患者血清 HA、PCⅢ水平显著高于对照组,与上述研究报道结果相似,进一步研究显示 miR-101 与 HA、PCⅢ呈负相关,提示 miR-101 表达量降低与肝纤维化程度密切相关,并可能作为肝纤维化早期诊断及监测疾病进展的重要指标。研究表明 APRI 指数与肝脏纤维化程度有关,并可作为诊断肝脏纤维化的重要指标^[19]。结果显示研究组患者 APRI 指数显著升高,进一步分析显示 miR-101 与 APRI 指数无明显相关性,分析原因可能是本研究样本量较小,需要进一步扩大样本量分析 miR-101 与 APRI 指数的相关性。

综上所述,肝纤维化患者肝脏组织中 miR-101 的表达量降低,其低表达量与肝功能指标、炎性细胞因子及肝纤维化相关指标密切相关,可作为肝纤维化早期诊断及监测病情进展的重要分子标志物,还可为肝纤维化的防治提供理论依据。但本研究仍需进行体内动物实验,观察 miR-101 与其靶基因及相关信号通路的相关性,为揭示肝纤维化发病机制提供新的研究思路 and 实验依据。

参考文献

[1] 奚经巧,林枝,赵春,等. 肝功能正常慢性乙肝患者肝组织

- GP73 表达与纤维化及炎症分级关系[J]. 实用预防医学, 2018, 25(9):107-110.
- [2] 孙丹,邓靖宇,何生. 17 β -雌二醇抑制 NF-kappa Bp65 表达对 CCL4 诱导大鼠肝纤维化中肝细胞损伤的意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(2):40-46.
- [3] Su Q, Kumar V, Sud N, et al. MicroRNAs in the pathogenesis and treatment of progressive liver injury in NAFLD and liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 129(1):54-63.
- [4] 谷建宝,葛保民,裴玉祥,等. 慢性乙型肝炎患者血清 microRNA-34a 表达水平与肝纤维化分期的关系[J]. 实用预防医学, 2020, 27(6):758-761.
- [5] Chen SL, Zheng MH, Shi KQ, et al. A new strategy for treatment of liver fibrosis[J]. Bio Drugs, 2013, 27(1):25-34.
- [6] 白洁,纪文静,丁永年,等. miRNA-101 调控转化生长因子- β 1 信号通路参与肝纤维化的研究[J]. 中国医药导报, 2019, 16(1):16-23.
- [7] 朱书利. 血清补体 C3、C4 水平检测对慢性乙型肝炎患者肝组织病理学的意义评价[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(5):459-462.
- [8] 陈建亮,李书,刘雨亭,等. 微小 RNA-30a 在肝纤维化中的表达及其影响[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(10):2302-2305.
- [9] 陈靖,郑琦,曾达武,等. 细胞 Toll 样受体 4/微小核糖核酸-181a 在慢性乙型肝炎肝纤维化进程中的动态表达及临床意义[J]. 中华传染病杂志, 2018, 36(8):466-472.
- [10] Chau BN, Brenner DA. What goes up must come down; the emerging role of microRNA in fibrosis[J]. Hepatology, 2011, 53(1):4-6.
- [11] 张明,黄君. miRNA-101 调控转化生长因子- β 1 信号通路促进肝纤维化研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2018, 25(12):1439-1442.
- [12] Liu Z, Yi J, Ye R, et al. miR-144 regulates transforming growth factor- β 1 induced hepatic stellate cell activation in human fibrotic liver[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(4):3994-4000.
- [13] 蒋智渊,钟国强,肖飞,等. 微小 RNA-101 在心房颤动心房纤维化中的作用[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(6):890-893.
- [14] 张海燕. miR-101 调控肝纤维化发生的作用机制研究[D]. 南京:南京大学, 2013:1-50.
- [15] 黎武,宋劲松. 肝纤维化患者 Ac-SDKP、Smad7 和 PPAR- γ 的表达水平及其临床意义[J]. 肝脏, 2019, 24(5):565-567.
- [16] 文关良. 肝炎肝硬化患者血清 CHE、ALB、CHO 水平检测在肝功能评估中的临床应用价值[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(18):2741-2742.
- [17] 林孟新,苏智军,郭如意. 乙型肝炎患者血清免疫球蛋白和补体 C3/C4 检测的意义[J]. 实用肝脏病杂志, 2015, 18(2):182-183.
- [18] 黎晓晖. B 超与血清学指标在肝纤维化诊断中的联合应用[J]. 实用医技杂志, 2016, 23(5):463-465.
- [19] 秦浩,尹华发. 瞬时弹性成像联合 APRI 在慢性乙型肝炎肝纤维化诊断中的应用价值[J]. 安徽医学, 2015, 36(5):552-555.

收稿日期:2020-03-21