

非酒精性脂肪性肝病患者血清中循环microRNAs表达水平及意义

高金保, 刘霞 (榆林市第一医院 消化内科, 陕西 榆林 718000)

摘要: 目的 研究microRNAs (miRNAs) 在非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 患者血清中的表达水平和意义。方法 选择NAFLD患者78例 (NAFLD组) 和非NAFLD人群58例 (对照组)。采集入组人群血清, 提取总RNA, 应用qRT-PCR方法对血清中miR-21、miR34a、miR-122及miR-451表达水平进行检测; 分析miRNAs血清表达水平与脂肪变性程度之间的关系。结果 两组人群血清中miR-145 ($P = 3.290$) 和miR21 ($P = 1.570$) 表达水平无显著变化; miR-451 ($P = 0.0309$)、miRNA-122 ($P = 0.0083$) 和miR-34a ($P = 0.0032$) 表达水平显著升高。NAFLD组患者根据肝脏脂肪变性程度分为轻度 (46例) 和重度 (32例), miRNA-122 ($P = 0.0062$) 和miRNA-34a ($P = 0.0044$) 的表达水平随脂肪变性程度的增加而显著升高。结论 NAFLD患者较健康人群血清miR-21、miR-34a、miR-122及miR-451表达水平升高, 特别是miR-34a和miR-122可以作为NAFLD诊断的一个生物学标志分子。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 微小RNA; 脂肪肝

Expression and significance of circulating microRNAs in non-alcoholic fatty liver disease

GAO Jin-bao, LIU Xia (Department of Gastroenterology, Yulin First Hospital of Shaanxi Province, Yulin 718000, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions and significance of microRNAs (miRNAs) in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** There are 78 cases of patients with NAFLD (NAFLD group) and non NAFLD people 58 cases (control group) in the study. From serum total RNA, qRT-PCR method for serum miR-21, miR34a, miR-122 and miR-451 were tested, and analysis the relationship between miRNAs serum expression levels and the degree of steatosis was analyzed. **Results** The serum miR-145 ($P = 3.290$) and miR21 ($P = 1.570$) expression level had no significant change in two groups; the miR-451 ($P = 0.0309$), miRNA-122 ($P = 0.0083$) and miR-34 ($P = 0.0032$) significantly increased the expression level. NAFLD patients according to the degree of liver steatosis were divided into mild (46 cases) and severe (32 cases), the miRNA-122 ($P = 0.0062$) and the miRNA-34 a ($P = 0.0044$) expression level significantly increased with the increase of the degrees of steatosis. **Conclusions** Serum miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-122 expression levels of NAFLD patients were higher than non-NAFLD people, especially in miR-34a and miR-122 can be used as a biological marker of NAFLD in the diagnosis.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease; MicroRNA; Liver steatosis

MicroRNAs (miRNAs) 是一类由19~25个核苷酸组成的, 高度保守、非编码RNA分子, 可以在转录后水平对基因表达进行调控, 超过30%的人类mRNA分子受其调控^[1]。miRNAs不仅具有组织特异性, 并且与某些疾病形成特定的表达谱, 如癌症、

肝病、心脏病、肾病及自身性免疫疾病等^[2-7]。

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 以脂肪在肝脏中大量积累为特点, 已经成为危害人类健康的常见病, 可增加患心血管疾病、2型糖尿病及代谢综合症等的风险, 重度NAFLD可发展为非酒精性脂肪肝炎 (non-

alcoholic steatohepatitis, NASH)。由于NAFLD患者无明显症状,大多数NAFLD患者是在医院检查中偶然发现的。目前用于NAFLD的主要检测手段为超声和CT扫描,检测手段具有耗时长、花费大不经济等缺点。因此寻找一种简单、便捷、经济的检测手段非常有必要。已有报道证实miR-122、miR-34a、miR-145、miR-451及miR-21具有调节胆固醇与脂肪酸平衡的作用,并且与NAFLD的发病有着密切的关系^[8,9]。本研究主要探讨miR-145、miR-451、miR-122、miR-34a及miR-21在NAFLD患者血清中的表达水平,以期为NAFLD的临床诊断提供新的标志分子。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2011年5月至2012年5月本院收治的NAFLD患者78例为NAFLD组,包括男性41例,女性37例,年龄23~64岁,平均年龄(46.4 ± 1.7)岁;选择本院同期体检的非NAFLD人群(排除高血压、高血脂、糖尿病及肝功能异常者)53例为对照组,包括男性28例,女性25例,年龄20~61岁,平均年龄(44.6 ± 2.3)岁。两组人群的年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义。疾病诊断标准参考《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》^[10]。脂肪变性程度采用声像图分析,分为正常、轻度和重度^[11]。轻度变性指肝脏回声轻度增加,肝脏和肾脏的回声差异显著。严重变性指肝脏的回声极度增强,肝脏的血管和隔膜不易观察到。至少3个不同的超声波检测医师进行评估,NAFLD组患者经诊断分为:轻度(46例)和重度(32例)。入组人群抽血取样均获得医院和患者的同意,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清采集 入组人群均抽取空腹肘静脉血5 ml,标本在4℃ 1200 × g离心10分钟,将上层液体移至1.5 ml Eppendorf管中,4℃ 12 000 × g离心10分钟,取上清液移至新的Eppendorf管中,−70℃保存备用。

1.2.2 qRT-PCR方法 按照TRIzol试剂盒(Invitrogen)标准操作步骤,提取样本血清中总RNA。提取的总

RNA溶解于15 μl无RNA酶的灭菌水中,qRT-PCR按照miScript System(Qiagen,其中包含各miRNA引物)检测miRNA的方法进行。反应体系为:10 μl SYBR 缓冲液,2 μl特异引物,2 μl模板和4 μl无RNA酶的灭菌水。扩增条件:预变性95℃ 15分钟;94℃ 15秒,55℃ 30秒,70℃ 30秒,45个循环。加入的标准的cyn-39为内参对照,依据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[12]计算各组细胞miRNA的相对表达量。

1.3 统计学处理 应用SPSS 16.0软件进行数据分析,数值均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料,采用 t 检验;大于两组的数据采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAFLD患者血清miRNA的表达水平 为了探讨miRNA是否在NAFLD患者血清中的表达发生变化,本研究测定5种miRNA(miR-145、miR-451、miR-122、miR-34a和miR-21)的血清水平。与对照组比较,NAFLD患者miR-145($P = 3.290$)和miR-21($P = 1.570$)血清中的表达水平无显著变化;miR-451表达水平升高了2.8倍($P = 0.0309$);miR-122表达升高了6.5倍($P = 0.0083$);而miR-34a表达水平则从不可检测的水平达到了很高的水平($P = 0.0032$),见图1。

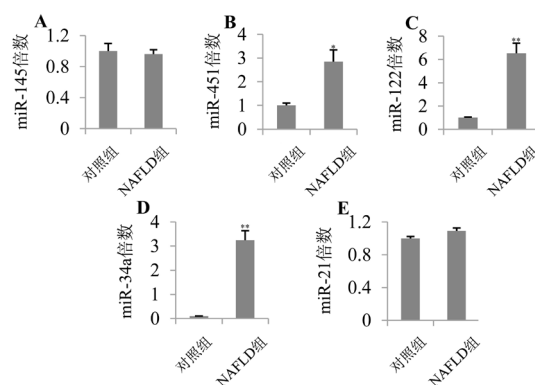


图1 miRNAs在NAFLD患者血清中的表达水平

注: NAFLD组为78例,对照组为53例; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns $P > 0.05$

2.2 miR-451、miR-122和miR-34a表达水平与脂肪变性的关系 为进一步探讨血清miR-451、miR-122和miR-34a高表达的意义,本研究分析这3种miRNAs表达水平与脂肪变性程度的关系。结果显

示,轻度($P = 0.0391$)和重度($P = 0.0084$)脂肪变性患者的miR-145水平都较正常组中高,而随着脂肪肝从轻度到重度转变时,其表达水平并无显著变化($P = 5.350$);而miR-122($P = 0.0062$)和miR-34a($P = 0.0044$)的血清表达水平则随着脂肪肝严重程度的增加而极显著的增加,见图2。

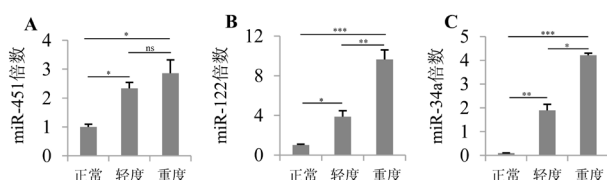


图2 miR-451, miR-122和miR-34a在不同程度脂肪肝中的表达

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns $P > 0.05$

3 讨论

本研究发现NAFLD患者血清中四种miRNAs包括miR-122、miR-34a、miR-21和miR-451的血清表达水平显著高于对照组,特别是miR-34a和miR-122的表达水平与脂肪变性的程度密切相关,可以作为NAFLD检测的生物学标志分子。

尽管对于循环miRNA的代谢途径尚未彻底阐明,检测手段仍然存在着一些缺陷,但目前国内外已有足够的证据表明循环miRNA的表达变化与肝脏病变产生及发展有着密切联系,部分miRNA可作为某些肝脏疾病诊断的分子标志物。此外,miRNA检测具有简便、经济、无创伤等特性,在多种肝病诊断及预后评估中有着非常广阔的应用前景。Qu等^[13]通过对105例肝癌患者、107例慢性肝病患者及71例正常对照进行研究发现,肝癌患者血清中miR-16和miR-199a水平显著低于NAFLD组和对照组($P < 0.01$)。Tomimaru等^[14]通过对10例肝癌患者术前术后microRNA-21表达水平进行检测发现肝癌患者术后microRNA-21水平显著低于术前($P = 0.0125$),与此同时对126例肝癌患者研究发现肝癌患者血液中microRNA-21水平显著高于慢性肝病患者($P < 0.0001$)及对照组($P < 0.0001$)。

本研究初步证实miR-122、miR-34a、miR-21和miR-451在NAFLD患者血清中高表达,特别是miR-34a、miR-122可以作为NAFLD诊断的生物学标志分子,但仍然存在着一一定的局限性,如样本小、未对患者进行长期动态跟踪研究,仍然需要大样本的综合性研究进一步确认。

参考文献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell,2004,116:281-297.
- [2] Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, et al. microRNAs in cancer management[J]. Lancet Oncol,2012,13:e249-e258.
- [3] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease[J]. Nat Rev Genet, 2011,12:861-874.
- [4] Wang XW, Heegaard NH, Ørum H. MicroRNAs in liver disease[J]. Gastroenterology,2012,142:1431-1443.
- [5] Divakaran V, Mann DL. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure[J]. Circul Res,2008,103:1072-1083.
- [6] Karthikeyan Chandrasekaran DSK, Sepramaniam S, Armugam A, et al. Role of microRNAs in kidney homeostasis and disease[J]. Kidney Int,2012,81:617-627.
- [7] Carissimi C, Fulci V, Macino G. MicroRNAs: novel regulators of immunity[J]. Autoimmun Rev,2009,8:520-524.
- [8] Cheung O, Puri P, Eicken C, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression[J]. Hepatology, 2008,48:1810-1820.
- [9] Alisi A, Da Sacco L, Bruscalupi G, et al. Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. Lab Invest,2010,91:283-293.
- [10] 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 临床肝胆病杂志,2010, 26:120-124.
- [11] Strauss S, Gavish E, Gottlieb P, et al. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver[J]. AJR Am J Roentgenol,2007,189:W320-W323.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods,2001,25:402-408.
- [13] Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Gastroenterol,2011,45:355-360.
- [14] Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol,2012, 56:167-175.

收稿日期: 2013-10-16