

循环miRNA与肝脏病诊断标记物

赵莹莹, 邢卉春 (首都医科大学附属北京地坛医院 肝病中心 内五科, 北京 100015)

microRNA (miRNA) 是一种保守的、非编码的小RNA, 长度约为22个核苷酸, 存在于低级生物、植物、高等动物等多种生物中, 参与正常与疾病状态下的免疫调节、细胞周期调控、生物代谢和凋亡等多个生物过程^[1-4]。在生命过程中, 某些miRNA表达的缺失或过度表达, 会引起某些系统组织及细胞分化代谢及凋亡等异常^[5]。近几年研究发现, 除了特定的组织细胞存在着miRNA外, 其他组份也含有miRNA, 如血液成分、唾液、尿液、精液^[6,7]等。血液中的miRNA又称为循环miRNA, 循环miRNA很稳定, 不易被RNA酶分解^[8], 可以作为基于血液检测的疾病诊断标记物^[9], 大量研究表明不同疾病的循环miRNA对疾病诊断的敏感性和特异性有其各自的特点^[10,11]。本文就循环miRNA在肝脏病诊断中的应用进行综述。

1 循环miRNA与乙型病毒性肝炎

Li等^[12]利用Solexa测序进行miRNA的筛选发现, 慢性乙型病毒性肝炎患者血清中有13个表达上调的miRNA, 如miR-375、miR-92a、miR-10a、miR-223、miR-423、miR-23b、miR-23a、miR-342-3p、miR-99a、miR-122a、miR-125b、miR-150、let-7c^[13], 联合应用miR-375、miR-10a、miR-223、miR-423这几种miRNA时, 可以从健康人群中鉴别出HBV的患者的曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 (99.9% ± 0.1%)、敏感性99.3%、特异性98.8%。与之类似的另一研究^[12]表明, 血清miR-223、miR-122、miR-21联合可能作为肝损伤的标记物。Chen等^[13]利用TaqMan探针的定量逆转录PCR检测了隐匿性HBV感染 (occult hepatitis virus B infection, OBI) 患者血清, 与健康人群相比, 发现OBI患者血清miRNA与常见的普通HBV感染者相关的miRNA的表达类似。为了对miRNA进行更好的定量, 在RNA提取之前, 血清样本中植入了外源性miR-156a, 发现let-7c、miR-23b、miR-122、miR-150这4种miRNA在血清中的表达水平与健康人群完全不同, 且联合这4种miRNA鉴别健康人群及OBI的AUC分别为0.999、0.989。聚类分析也表明这4种miRNA可以从健康人群中鉴别出OBI患者。

Murakami等^[14]利用基因芯片技术及实时定量PCR技术对其血清miRNA的表达情况进行研究, 发现联合应用血清miR-1914*、miR-193a-5p、miR-22、miR-659、miR-711这5种

miRNA诊断CHB (与健康人群比较) AUC = 89.29%, 且随着肝脏炎症的加重而表达水平增加 ($P < 0.05$); 另一方面, 有9种miRNA (miR-1274b、miR-197、miR-1974、miR-21、miR-34a、miR-451、miR-548d-5p、miR-760、miR-767-3p) 的表达水平随着肝脏炎症的加重而明显下降 ($P < 0.05$)。

除了上述几种CHB患者血清内表达变化的miRNA, Zhang等^[15]利用基因芯片技术及rt-PCR还发现另外34种与健康人群表达不同的miRNA, 其中CHB血清有12种上调、24种下调 (变化倍数 > 2.0 , $P < 0.01$), 其中miR-122、miR-572、miR-575、miR-638表达的平均水平明显增高 ($P < 1.00 \times 10^{-5}$), miR-744明显降低 ($P < 1.00 \times 10^{-6}$)。miR-122、miR-638、miR-572、miR-575、miR-744与肝脏功能变化 [包括如ALT、AST、 γ -谷氨酰转氨酶 (γ -glutamyltransferase, γ -GT)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、TBil、总胆汁酸 (total bile acid, TBA)] 存在相关性 ($r = 0.74$, $P < 1.00 \times 10^{-4}$)。结合Murakami等^[14]的研究结果, 可见CHB患者血清内多种miRNA的表达情况与肝脏炎症程度相关。笔者也注意到, 不同研究中发现的与OBI或CHB相关的miRNA变化的情况是有不同的, 这种差异是由于病毒活动或肝脏炎症活动所引起还有待进一步探讨。

2 循环miRNA与丙型病毒性肝炎

Li等^[12]做了一项513例受试者 (210例健康对照、135例HBV相关性疾病、48例乙型肝炎相关性疾病、120例HCC患者) 的研究, 经基因芯片筛选及RT-PCR验证后, 发现联合检测健康人群与CHC患者血清miR-92a、miR-423, 诊断CHC的AUC = 99.6% ± 0.4%、敏感性97.9%、特异性99.4%。与此类似, Yoshiki等^[14]联合应用检测血清miR-1225-5p、miR-1275、miR-638、miR-762、miR-320c、miR-451、miR-1974、miR-1207-5p、miR-1246的表达情况可以鉴别诊断CHC患者, 其准确性AUC = 96.59%。此外, 有学者还希望通过联合检测多种miRNA的表达情况, 对肝脏炎症及纤维化的程度进行分级。

在一项回顾性研究中, Cermelli等^[16]发现CHC患者血清miR-122 ($P < 0.0001$)、miR-34a ($P = 0.002$) 水平与肝酶水平、纤维化程度、炎症活性等与疾病的严重性呈正相关; 回顾性分析结果表明, CHC早期患者的血清miR-122水

平明显高于健康人群(6.4倍, $P < 0.0001$), miR-34a的水平在CHC疾病早期可以检测到, 且两者的水平随着CHC疾病的进展, 分别增长到发病早期的2.2倍($P = 0.009$)和2.6倍($P = 0.002$)。若评价鉴别诊断CHC早期与进展期, 血清miR-34a的诊断价值($AUC = 0.84$)优于miR-122($AUC = 0.75$)。不难发现, CHC患者循环miRNA的表达情况与健康人群明显不同, 与肝脏炎症密切相关, 尤其是miR-122和miR-34。在慢性HBV感染的研究中也发现miR-122、miR-34与肝脏的炎症相关, 推测miR-122、miR-34可能是炎症程度相关, 而非与病毒相关。

3 循环miRNA与肝纤维化/肝硬化

miR-571起源于肝脏细胞, miR-652起源于单核/巨噬细胞, 促纤维化因子TGF- β 刺激后, 肝脏细胞及HSC的miR-571水平上调; miR-652受到细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后明显下降; 肝硬化患者血清及肝脏内肝细胞、肝星状细胞及单核/巨噬细胞及这些细胞的细胞器内miR-571的表达水平基本相同, 而miR-652仅表达于单核/巨噬细胞内, 可能在肝硬化过程中参与天然免疫过程^[17]。

酒精性肝硬化或HCV相关肝硬化的血清miR-513-3p、miR-571的表达水平明显高于健康人群($P = 0.048$ 、 0.039), miR-652水平显著低于健康人群($P = 0.027$); 血清miR-513-3p、miR-571、miR-652水平诊断肝硬化的AUC分别为0.87、0.91、0.75, 而当联合应用其中miR-571、miR-652或联合应用miR-571、miR-513-3p、miR-652时, AUC分别为0.962和0.9676。miR-571水平与疾病分期密切相关($P < 0.001$), 肝硬化Child-Pugh C级的患者血清miR-571明显增加, 但是与年龄、性别、肌酐、体重指数无关($P > 0.001$)。因此, miR-571可能是肝硬化的潜在诊断标记物。ROC曲线证明血清miR-513-3p、miR-571、miR-652联合血小板、国际化比值(international normalized ratio, INR)或ALB水平时, 其诊断精确性明显提高($P < 0.001$)^[18]。有研究^[19]证实, HBV和HCV感染的肝脏组织表达miRNA的水平不同; Chen等^[20]利用全基因组miRNA芯片回顾性研究了128例CHB导致的肝硬化患者、79例CHB患者、47例非CHB性质的肝硬化患者及137例健康对照者循环miRNA的表达情况, 结果发现循环miR-106b、miR-181b可作为肝硬化的生物标记物, 与肝病病因无关, 尤其是诊断早期肝硬化方面准确性均较高。

Ninomiya等^[21]通过深度测序方法筛选了10例PBC、5例CHC、5例CHB患者及5例健康者的miRNA表达情况。PBC患者有81种miRNA的表达情况与其他几组不同, 与其他组别相比, PBC患者循环hsa-miR-505-3p($P < 0.005$)、miR-197-3p($P < 0.005$)及miR-500a-3p($P < 0.005$)的表达水平明显下降; 循环hsa-miR-505-3p($P < 0.005$)、miR-139-5p($P < 0.05$, $P > 0.005$)及miR-197-3p($P < 0.05$, $P > 0.005$)的表达水平明显低于病毒性肝炎组。综合分析发现在PBC时, hsa-miR-505-3p及miR-197-3p的表达下降。

通过基因芯片分析, 纤维化程度越高, miR-483-5p及

miR-671-5p的表达水平升高越明显($P < 0.05$), let-7a、miR-106b、miR-1274a、miR-130b、miR-140-3p、miR-151-3p、miR-181a、miR-19b、miR-21、miR-24、miR-375、miR-548l、miR-93、miR-941这14种miRNA的表达水平随肝纤维化程度的严重而下降($P < 0.05$)^[16]。

最近有研究^[22]证实血清miRNA-122与肝硬化患者病死率及生存时间相关, 失代偿期肝硬化患者血清miR-122水平显著低于代偿期肝硬化($P = 0.012$); 出现腹水、自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)或肝肾综合征的患者血清miR-122的水平明显低于无并发症的代偿期肝硬化患者($P = 0.007$ 、 0.003 、 0.037); 生存曲线表明, miR-122水平高的患者整体生存时间常高于miR-122低水平的患者($n = 72$, $P = 0.016$)。

虽然这些研究发现在不同肝硬化状态下, miRNA的表达谱也是不同的, 但这种变化与肝硬化的发生发展有何关系及是否能作为诊断肝硬化的参考指标还有待进一步研究。

4 循环miRNA与非病毒性肝病

循环miR-122与血糖、胰岛素抵抗之间有正相关性, 与疾病严重程度(从脂肪变到脂肪性肝炎)正相关, 与纤维化分期和炎症活动呈高度正相关性^[17]。Cermelli等^[17]研究发现NAFLD患者血清miR-122、miR-34a的水平明显高于健康人群, 这两种miRNA的水平与疾病的严重程度呈正相关(单纯脂肪变到脂肪性肝炎)($P < 0.05$)。血清miR-122、miR-34a的水平与肝酶水平、纤维化程度、炎症活动性相关; 此外, miR-122水平与NAFLD患者血脂水平正相关($P < 0.05$)。对34例NAFLD患者血清miR-122、miR-34a、miR-16、miR-21的表达情况进行了筛选和验证后发现, NAFLD患者miR-122的水平是健康人群的7.2倍($P < 0.0001$), miR-34a增加至 2.26×10^4 拷贝/ml。回顾性分析发现, 单纯脂肪肝患者(simple steatosis, NAFLD-SS)血清miR-122的水平为健康人群的5.7倍($P < 0.0001$), 所有单纯性脂肪肝的患者都可以检测到miR-34a, 均值为 1.26×10^4 拷贝/ml。NAFLD-SS患者血清miR-122、miR-34a的水平高于NASH组(2倍, $P = 0.05$; 2.8倍, $P = 0.009$); 队列研究表明, miR-122、ALT鉴别诊断单纯性脂肪肝患者及健康人群的准确性分别为 $AUC = 0.93$, $AUC = 0.91$; miR-34a的鉴别诊断NAFLD-SS及NASH特性优于miR-122(AUC 值分别为0.75、0.70)。对于NASH而言, 与健康人群比, 联合检测miR-1225-5p、miR-1275、miR-638、miR-762、miR-320c、miR-451、miR-1974、miR-1207-5p、miR-1246表达的变化, 鉴别诊断NASH的准确性为88.89%^[16]。

很多关于药物性肝损伤的报道均选用小鼠为动物模型, 据报道对乙酰氨基酚诱导性急性肝损伤(acetaminophen-induced acute liver injury, APAP-ALI), 会使肝脏内miR-122及miR-192表达发生变化, 作为APAP-ALI的生物标记物。有学者^[23]首次在人类APAP中毒的患者中研究了血清miRNA的分子机制, 发现与健康人群相比, 血清miR-122、miR-192在APAP-ALI患者体内持续升高, 明显高于健康人群(P 均 < 0.0001)。APAP-ALI患者血清miR-122与ALT

的峰值相关(Pearson相关系数 $R = 0.46$, $P = 0.0005$)。

5 循环miRNA与HCC

HCC患者的肝脏都伴有不同程度的损伤,可能会导致血清miR-122的水平相应地发生变化。循环miR-222、miR-223、miR-21水平与肿瘤的数量、大小、生长分期、包膜完整性及患者的性别、血清TBil、ALB、AFP、ALT、Child-Pugh分级或总体生存率均无明显相关性($P > 0.05$),但与肝内转移灶、肝硬化、瘤栓、TNM分期等呈明显正相关^[24];HCC患者血清miR-21、miR-122、miR-223的平均水平高于健康人群,但是CHB患者血清miR-21、miR-122高于HCC患者,且CHC及HCC患者血清miR-21会出现相同的变化,并无显著差异。因此血清miR-21不能很好的区分CHC、CHB与HCC,miR-21、miR-122、miR-223亦不具备HCC诊断标记物的特性,仅能作为肝脏损伤的标记物^[25-28]。

Peng等^[28]在中国HBV所致HCC人群中做了关于血清miRNA作为标记物可能性的研究,结果发现HCC血清miR-122、miR-500明显高于健康者,HCC肿瘤切除术后患者血清miR-122、miR-500的水平低于术前。单独使用miR-37预测HCC的AUC = 0.96(敏感性96%,特异性100%);联合使用miR-23b、miR-423、miR-375、miR-23a、miR-342-3p时,与健康对照组鉴别诊断HBV感染所致HCC的AUC = 99.9% ± 0.1%,敏感性96.9%,特异性99.4%;联合使用miR-10a、miR-125b鉴别诊断HBV及其导致的HCC的AUC = 99.2% ± 0.6%,敏感性98.5%,特异性98.5%^[12]。

一项针对HCC、慢性肝脏病患者(chronic liver disease, CLD)及健康人群血清miRNA(miR-16、miR-199a、miR-195)的回顾性研究^[29]中,选择105例HCC患者、107例CLD患者、71例健康者作为研究对象;HCC患者血清miR-16、miR-199a水平明显偏低;miR-16作为单独诊断HCC的诊断标记物,与传统HCC诊断标记物[如AFP、AFP异质体(lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein, AFP-L3)、异常凝血酶原(des- γ -carboxyprothrombin, DCP)]等相比敏感性高,miR199a、AFP、DCP、AFP-L3%、miR-195则敏感性稍低;联合应用miR-16、AFP、AFP-L3%、DCP则会使HCC诊断的敏感性、特异性分别提高到92.4%、78.5%。但是以上分析数据仅适用于肿瘤直径< 3 cm的HCC,HCC阳性预测率为18/26(69.2%),而且存在一定的假阳性率12/96(12.5%)。

Liu等^[30]研究了HCC患者血清miR-15b、miR-21、miR-130b、miR-183的表达情况,结果发现肿瘤切除术后,肿瘤源性的miRNA水平的均值降低($P < 0.05$)。在一个交叉性的验证实验中,证明联合应用血清miR-15b、miR-130b是检测HCC有力的生物标记物,ROC曲线分析,AUC = 0.98(灵敏度98.2%,特异度91.5%),即使是在AFP < 20 ng/ml的人群中,其诊断HCC的AUC也为96.7%。

血清miR-18可作为HCC的无创性筛选标记物。首先通过qRT-PCR分别检测15例HBV、HCC患者血清标记物(miR-95、miR-18a、miR-10b、miR125a、miR-378)的水平,并在另外一组受试者(86例HCC患者、30例肝炎或

肝硬化患者、45例健康者)血清样本进行验证,结果发现HBV相关性HCC血清miR-18a明显增高($P < 0.01$),血清miR-378明显降低($P < 0.05$)。ROC曲线分析表明,在肝炎或肝硬化患者中,血清miR-18a的表达水平作为无创性诊断HBV导致的HCC的标记物时,其敏感性86.1%、特异性75.0%,可以从慢性肝炎或肝硬化患者中鉴别出HCC^[25]。

综合分析上述研究发现,尽管大量研究希望能找到对HCC诊断、预测及预后分析有帮助的信息,但目前看来不同研究的结果还较分散,尚不好确定这些miRNA的变化在HCC中的作用及意义。

miRNA具有高度的保守性、时序性、组织特异、稳定性等特点,参与正常与疾病状态下的多种生物过程。随着分子生物学技术的发展,新的miRNA的检测技术不断更新,如miRNA基因芯片、实时定量逆转录PCR、深度测序等技术,为检测各种组织、液体的miRNA提供了可能。对miRNA的研究也不仅限于某个miRNA的家族,而是全体miRNA库。通过大规模的筛选出不同组织、标本表达差异的miRNA,经RT-PCR验证,发现了很多有作为疾病诊断标记物潜能的miRNA,可用于诊断病毒性肝病、非病毒性肝病、肝癌。某些miRNA在不同疾病状态下均有表达变化,可能与疾病的发生、发展的调控机制有关,例如,某些肝脏特异性miRNA的表达变化,可能反应的是肝脏损伤,或者仅反应了某种免疫机制,这都值得进一步探讨。总的来说,循环miRNA的稳定性、可检测、可预测性、可靠性、无创性、敏感性高等特点,且在疾病早期,miRNA的变化要比ALT出现得早、更敏感,循环miRNA在诊断肝脏性疾病有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Jopling C. Liver-specific microRNA-122 biogenesis and function[J]. RNA Biol,2012,9:137-142.
- [2] Berkhout B, Jeang KT. RISCy business: MicroRNAs, pathogenesis, and viruses[J]. J Biol Chem,2007,282:26641-26645.
- [3] Chen PY, Meister G. microRNA-guided posttranscriptional gene regulation[J]. Biol Chem,2005,386:1205-1218.
- [4] Masyuk T, Masyuk A, LaRusso N. microRNA in cholangiociliopathies[J]. Cell Cycle,2009,8:1324-1328.
- [5] Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in immunity and disease[J]. Mol Biol Int,2011:437301.
- [6] Michael A, Bajracharya SD, Yuen PST, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers[J]. Oral Dis,2010,16:34-38.
- [7] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection[J]. Clin Cancer Res,2009,15:5473-5477.
- [8] Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation[J]. Int J Legal Med,2010,124: 217-226.
- [9] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci

- USA,2008,105:10513-10518.
- [10] Cho WC. Circulating microRNAs as minimally invasive biomarkers for cancer theragnosis and prognosis[J]. *Front Genet*,2011,2:7.
- [11] Wang G, Tam LS, Li EK, et al. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*,2011,20:493-500.
- [12] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma[J]. *Cancer Res*,2010,70:9798-807.
- [13] Chen Y, Li L, Zhou Z, et al. A pilot study of serum microRNA signatures as a novel biomarker for occult hepatitis B virus infection[J]. *Med Microbiol Immunol*,2012,201:389-395.
- [14] Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, et al. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease[J]. *PLoS One*,2012,7:e48366.
- [15] Zhang H, Li QY, Guo ZZ, et al. Serum levels of microRNAs can specifically predict liver injury of chronic hepatitis B[J]. *World J Gastroenterol*,2012,18:5188-5196.
- [16] Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, et al. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *PLoS One*,2011,6:e23937.
- [17] Roderburg C, Mollnow T, Bongaerts B, et al. Micro-RNA profiling in human serum reveals compartment-specific roles of miR-571 and miR-652 in liver cirrhosis[J]. *PLoS One*,2012,7:e32999.
- [18] Roderburg C, Mollnow T, Bongaerts B. Micro-RNA profiling in human serum reveals compartment-specific roles of miR-571 and miR-652 in liver cirrhosis[J]. *PLoS One*,2012,7:e32999.
- [19] Ura S, Honda M, Yamashita T, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*,2009,49:1098-1112.
- [20] Chen YJ, Zhu JM, Wu H, et al. Circulating microRNAs as a fingerprint for liver cirrhosis[J]. *PLoS One*,2013,8:e66577.
- [21] Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, et al. Distinct microRNAs expression profile in primary biliary cirrhosis and evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as novel biomarkers[J]. *PLoS One*,2013, 8:e66086.
- [22] Waidman O, BihrerV, Pleli T, et al. Serum microRNA-122 predicts survival in patients with liver cirrhosis[J]. *PLoS One*,2012,7:e45652.
- [23] Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury[J]. *Hepatology*, 2011,54:1767-1776.
- [24] Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis[J]. *Cancer Sci*,2010,101:2087-2092.
- [25] Li L, Guo Z, Wang J, et al. Serum miR-18a: a potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening[J]. *Dig Dis Sci*,2012,57:2910-2916.
- [26] 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*,2011,50:136-142.
- [27] Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*,2011,6:e26971.
- [28] Qi P, Cheng SQ, Wang H, et al. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *PLoS One*,2011,6:e28486.
- [29] Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *J Clinical Gastroenterol*,2011,45:355-360.
- [30] Liu AM, Yao TJ, Wang W, et al. Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study[J]. *BMJ Open*,2012,2:e000825.
- [31] Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis[J]. *Cancer Sci*,2010,101:2087-2092.
- [32] Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases[J]. *Clin Chem*,2010,56:1830-1838.
- [33] Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, et al. Plasma microRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury[J]. *Clini Chem*, 2009,55:1977-1983.

收稿日期: 2014-03-13