

# 慢性乙型肝炎肝纤维化患者血清微小RNA-30a mRNA与微小RNA-196b mRNA相对表达量及临床意义

葛建祥<sup>1</sup>, 张伯<sup>2</sup>, 黄小平<sup>3</sup> [1.江苏省张家港市第一人民医院(苏州大学附属张家港医院) 传染科, 江苏 张家港 215600; 2.江苏省张家港市第一人民医院 肝胆外科, 江苏 张家港 215600, 3.苏州大学附属第一医院 感染科, 江苏 苏州 215006]

**摘要:** 目的 探讨微小RNA (microRNA, miRNA) -30a mRNA与miR-196b mRNA在慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 肝纤维化患者血清中的相对表达量及临床意义。方法 选取2016年1月至2018年12月在江苏省张家港市第一人民医院行经皮肝组织活检确诊为CHB肝纤维化的139例患者为CHB肝纤维化组, 选取130例同期健康体检者为对照组。对CHB肝纤维化患者进行肝组织病理学检查。采用Au480全自动生化分析仪检测血清天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, ALT) 及白蛋白水平; 采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清中金属蛋白酶-1抑制剂 (metalloproteinase tissue inhibitor-1, TIMP-1) 浓度; 采用荧光定量聚合酶链反应检测miR-30a和miR-196b mRNA相对表达量, 计算FIB-4指数。对CHB肝纤维化患者进行肝组织病理学检查确定肝纤维化分期。采用Pearson法分析miR-30a mRNA和miR-196b mRNA相对表达量及其与各临床指标的相关性; 采用受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线评价miR-30a和miR-196b对肝纤维化的诊断价值。**结果** 与对照组相比, CHB肝纤维化患者组血清中ALT [ (65.34 ± 13.53) U/L vs (18.28 ± 3.14) U/L]、AST [ (52.84 ± 14.02) U/L vs (25.84 ± 1.26) U/L]、TIMP-1 [ (183.98 ± 42.07) ng/ml vs (80.59 ± 13.09) ng/ml]和FIB-4指数 (1.33 ± 0.09 vs 0.78 ± 0.06) 显著升高, miR-30a mRNA相对表达量 (0.60 ± 0.08 vs 1.00 ± 0.09) 和miR-196b mRNA相对表达量 (0.45 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.02) 显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。139例患者中S0~S1期占32.37% (45/139), S2~S3期占45.32% (63/139), S4期占22.31% (31/139)。S0~S1期患者miR-30a mRNA相对表达量、miR-196b mRNA相对表达量、TIMP-1和FIB-4指数分别为0.83 ± 0.06、0.76 ± 0.05、(142.68 ± 13.21) ng/ml、0.84 ± 0.08, S2~S3期患者上述指标分别为0.69 ± 0.06、0.41 ± 0.08、(257.50 ± 53.05) ng/ml、1.23 ± 0.09, S4期患者上述指标分别为0.28 ± 0.02、0.21 ± 0.05、(383.52 ± 62.31) ng/ml、2.48 ± 0.19, 血清中miR-30a mRNA相对表达量和miR-196b mRNA相对表达量随纤维化分期的增加而降低, TIMP-1和FIB-4指数随肝纤维化分期的增加而增加 ( $P < 0.05$ )。CHB肝纤维化患者血清miR-30a和miR-196b与TIMP-1、FIB-4和肝纤维化分期呈负相关 ( $P < 0.05$ ), 与ALT和AST无相关性 ( $P > 0.05$ )。miR-30a mRNA相对表达量、miR-196b mRNA相对表达量、TIMP-1和FIB-4指数诊断CHB肝纤维化患者肝纤维化的ROC曲线下面积 (area under ROC curve, AUC) 分别为0.847 (95%CI: 0.756~0.928)、0.942 (95%CI: 0.860~0.983)、0.792 (95%CI: 0.721~0.855)、0.895 (95%CI: 0.821~0.967), miR-196b mRNA相对表达量的AUC显著高于其他指标 ( $P < 0.001$ )。以0.468作为临界值, miR-196b mRNA相对表达量诊断的灵敏度和特异度分别为89.45%和83.60%。**结论** CHB肝纤维化患者血清中miR-30a mRNA和miR-196ba mRNA相对表达量降低, 检测miR-30a和miR-196ba mRNA相对表达量有助于评估CHB肝纤维化患者的肝纤维化程度。

**关键词:** 微小RNA-30a; 微小RNA-196b; 慢性乙型肝炎; 肝纤维化

### Relative expression and clinical significance of microRNA-30a mRNA and microRNA-196b mRNA in chronic hepatitis B patients complicated with liver fibrosis

Ge Jianxiang<sup>1</sup>, Zhang Bo<sup>2</sup>, Huang Xiaoping<sup>3</sup> [1.Department of Infectious Diseases, Zhangjiagang First People's Hospital (Zhangjiagang Hospital affiliated to Suzhou University), Zhangjiagang 215600, Jiangsu Province, China; 2.Department of Hepatobiliary Surgery, Zhangjiagang First People's Hospital (Zhangjiagang Hospital affiliated to Suzhou University), Zhangjiagang 215600, Jiangsu Province, China; 3.Department of Infection, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China]

**Abstract: Objective** To investigate the serum relative expression and clinical significance of microRNA-30a (miR-30a) mRNA and miR-196ba mRNA in chronic hepatitis B (CHB) patients complicated with liver fibrosis. **Methods** Total of 139 patients with CHB and liver fibrosis diagnosed by percutaneous liver biopsy in Zhangjiagang First People's Hospital from January 2016 to December 2018 were selected as CHB liver fibrosis group, and 130 healthy subjects in the same period were selected as control group. Liver histopathology was performed in CHB patients with liver fibrosis. Serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and albumin levels were detected by Au480 automatic biochemical analyzer, and serum metalloproteinase tissue inhibitor-1 (TIMP-1) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The relative expression of miR-30a and miR-196b mRNA was detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction, and FIB-4 index was calculated. Liver histopathology was performed in patients with CHB and liver fibrosis to determine the stage of liver fibrosis. Pearson method was used to analyze the correlation between the relative expression of miR-30a mRNA and miR-196b mRNA and clinical indicators. Receiver operator characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic value of miR-30a and miR-196b for liver fibrosis. **Results** Compared with control group, serum ALT [(65.34 (65.34 ± 13.53) U/L vs (18.28 ± 3.14) U/L], AST [(52.84 ± 14.02) U/L vs (25.84 ± 1.26) U/L], TIMP-1 [(183.98 ± 42.07) ng/ml vs (80.59 ± 13.09) ng/ml] and FIB-4 index (1.33 ± 0.09 vs 0.78 ± 0.06) of patients in CHB and liver fibrosis group increased, the relative expression of miR-30a mRNA (0.60 ± 0.08 vs 1.00 ± 0.09) and the relative expression of miR-196b mRNA (0.45 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.02) decreased, the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). Of the 139 patients, S0~S1 stage accounted for 32.37% (45/139), S2~S3 stage accounted for 45.32% (63/139) and S4 stage accounted for 22.31% (31/139). Relative expression of miR-30a mRNA, relative expression of miR-196b mRNA, TIMP-1 and FIB-4 index of patients with S0~S1 stage were 0.83 ± 0.06, 0.76 ± 0.05, (142.68 ± 13.21) ng/ml and 0.84 ± 0.08, respectively. The above indexes of patients with S2~S3 stage were 0.69 ± 0.06, 0.41 ± 0.08, (257.50 ± 53.05) ng/ml and 1.23 ± 0.09, respectively and 0.28 ± 0.02, 0.21 ± 0.05, (383.52 ± 62.31) ng/ml and 2.48 ± 0.19 of patients with S4 stage, respectively. Relative expression of serum miR-30a mRNA and miR-196b mRNA decreased with the increase of fibrosis stage, while TIMP-1 and FIB-4 index increased with the increase of fibrosis stage ( $P < 0.05$ ). Serum levels of miR-30a and miR-196b in CHB patients with liver fibrosis were negatively correlated with TIMP-1, FIB-4 index and liver fibrosis stage ( $P < 0.05$ ), which had no correlation with ALT and AST ( $P > 0.05$ ). The area under the ROC curve (AUC) of the relative expression of miR-30a mRNA, the relative expression of miR-196b mRNA, TIMP-1 and FIB-4 index for the diagnosis of liver fibrosis in CHB patients were 0.847 (95%CI: 0.756~0.928), 0.942 (95%CI: 0.860~0.983), 0.792 (95%CI: 0.721~0.855), 0.895 (95%CI: 0.821~0.967) and 0.895 (95%CI: 0.821~0.967), respectively. The AUC of relative expression of miR-196b mRNA was significantly higher than that of other indicators (all  $P < 0.001$ ). With 0.468 as the cut-off value, the sensitivity and specificity of the relative expression of miR-196b mRNA were 89.45% and 83.60%, respectively. **Conclusions** The serum relative expression of miR-30a mRNA and miR-196b in CHB patients with liver fibrosis decreased. The detection of relative miR-30a mRNA and miR-196ba mRNA is helpful to assessing the degree of liver fibrosis in CHB patients with liver fibrosis.

**Key words:** MicroRNA-30a; MicroRNA-196b; Chronic hepatitis B; Hepatic fibrosis.

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染引起的肝脏慢性炎症性疾病。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)统计,全球约有3.5亿CHB患者,已成为世界范围内主要卫生问题之一<sup>[1,2]</sup>。CHB可发展为肝纤维化、肝硬化,最终导致肝细胞癌或肝衰竭<sup>[3]</sup>。不同肝纤维化阶段的患者对治疗策略的反应各不相同,肝纤维化阶段的精确测定对于临床治疗方案的选择至关重要。目前,肝纤维化的诊断依赖于肝组织活检,但由于有创性及可能导致的并发症,限制了其广泛使用<sup>[4]</sup>。研究者一直努力寻找一种安全、经济且可靠的肝纤维化诊断方法。多种参数指标如FIB-4指数、肝纤维化增强指数等为肝纤维化的无创诊断提供了参考,但目前尚无标准的临界值,临床应用受到限制<sup>[5-7]</sup>。因此,研究新的生物标志物对CHB患者肝纤维化的诊断和预后将具有重要意义。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码的小RNA,通过干扰转录或抑制翻译来调节靶基因的表达,其参与细胞增殖、分化和凋亡等多种生物学过程调控,可作为疾病诊断、治疗及预后评估的潜在生物标志物<sup>[8]</sup>。通过Oncomine数据库整合疾病miRNA表达谱发现,miR-30a和miR-196b在CHB肝纤维化患者中表达异常,但其作用机制至今尚未明确<sup>[9,10]</sup>。本研究通过检测CHB肝纤维化患者血清中miR-30a和miR-196b的表达水平,探讨其与肝纤维化的潜在关系,以确定其在CHB肝纤维化诊断中的临床意义。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 选取2016年1月至2018年12月在江苏省张家港市第一人民医院行经皮肝组织活检确诊为CHB肝纤维化的139例患者为CHB肝纤维化组。所有患者临床资料完整,诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)》诊断标准<sup>[11]</sup>。排除丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)等其他肝炎病毒感染者;排除人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者;排除失代偿期肝硬化、各种恶性肿瘤、过度饮酒(折合乙醇量>20 g/d)及药物滥用者,排除入院前6个月内接受过抗病毒及免疫调节剂治疗者;排除采血和肝组织活检日期相差7 d以上的患者。选取我院同期进行健康体检者120例为对照组。本研究获得医院医学伦理学委员会批准,研究对象均知情同意并签署知情同意书。

**1.2 肝组织病理学检查** 在超声引导下经皮肝穿刺取肝组织,进行常规病理石蜡标本制作,由2名从事病理专业工作的病理医师进行诊断。根据国际Scheuer系统规定的标准对肝组织进行病理分期<sup>[12]</sup>。将肝纤维化程度分为S0~S4期:S0为无纤维化,S1为汇管区纤维化扩大,S2为纤维化扩大至汇管区周围或形成纤维间隔,S3为纤维化伴小叶结构紊乱,S4为肝硬化,S0~S1定义为轻度肝纤维化,S2~S3定义为显著肝纤维化,S4定义为肝硬化。

**1.3 血液标本采集和观察指标** 所有研究对象均采集空腹静脉血6 ml,分为两管,一管用枸橼酸钠抗凝,用全自动四分类血细胞分析仪(日本光电)检测血小板水平,然后离心后分离血清,采用Au480全自动生化分析仪(日本Olympus公司)测定血清中天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)及白蛋白水平,计算FIB-4指数,  $FIB-4 \text{ 指数} = \text{年龄(岁)} \times AST(U/L) / \text{血小板}(\times 10^9/L) \times ALT^{1/2}$ ;采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中金属蛋白酶-1抑制剂(metalloproteinase tissue inhibitor-1, TIMP-1)浓度,试剂盒购于美国Quidel公司,操作方法按说明书进行。另一管加入1 ml TRIzol后-80℃保存备用。根据RNA提取试剂盒(美国Life Technologies公司)操作说明书加入氯仿、无水乙醇等试剂提取RNA,在37℃ 60 min, 95℃ 5 min的逆转录条件下合成cDNA(逆转录试剂盒购于美国ABI公司);在95℃预加热15 min, 1个循环;94℃ 15 s, 65℃ 30 s, 72℃ 34 s, 40个循环的条件下进行扩增(荧光定量聚合酶链反应试剂盒购于上海生工生物工程有限公司)。以U6作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-30a和miR-196b mRNA的相对表达量。引物序列见表1。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析。年龄、白蛋白、ALT、AST、miR-30a mRNA相对表达量、miR-196b mRNA相对表达量、TIMP-1及FIB-4指数等计量资料均符合正态分

表1 荧光定量聚合酶链反应引物序列

名称	序列
miR-30a	上游引物: 5'-GAAGGUCAGCUCCUACAAUUGU-3' 下游引物: 5'-GAAGGUCAGCUCCUACAAUUGU-3'
miR-196b	上游引物: 5'-GCAGCAGCTAGGTAGTTTCC-3' 下游引物: 5'-TATCGTTGTCTCCACTCCTTGAC-3'
U6	上游引物: 5'-TCCATCACCATCTTCCAG-3' 下游引物: 5'-GGTATCCATCGCCATGCTC-3'

布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, CHB 肝纤维化组和对照组间的比较采用独立样本  $t$  检验, 不同肝纤维化程度患者间的比较采用方差分析, 组内两两比较采用 LSD- $t$  检验; 年龄等计数资料以例数和百分数表示, 采用  $\chi^2$  检验。采用 Pearson 法进行相关性分析; 采用受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线评价 miR-30a 和 miR-196b 的诊断价值, 采用  $z$  检验比较 ROC 曲线下面积 (area under ROC curve, AUC) 的差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 一般资料 CHB 肝纤维化组中男性 81 例, 女性 58 例, 年龄 ( $40.26 \pm 11.09$ ) 岁。对照组中男性 70 例, 女性 50 例, 年龄 ( $42.85 \pm 12.20$ ) 岁, 两组研究对象间性别和年龄的差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.159$ ,  $P = 0.690$ ;  $t = 0.793$ ,  $P = 0.430$ )。

2.2 两组 ALT、AST、TIMP-1、FIB-4 指数、miR-30a mRNA 相对表达量和 miR-196b mRNA 相对表达量与对照组相比, CHB 肝纤维化患者组血清中 ALT、AST、TIMP-1 和 FIB-4 指数显著升高 ( $t = 2.752$ ,  $P = 0.013$ ;  $t = 2.475$ ,  $P = 0.024$ ;  $t = 25.857$ ,  $P < 0.001$ ;  $t = 58.942$ ,  $P < 0.001$ ), miR-30a mRNA 和 miR-196b mRNA 相对表达量显著降低 ( $t = 37.864$ ,  $P < 0.001$ ;  $t = 142.753$ ,  $P < 0.001$ ), 白蛋白水平差异无统计学意义 ( $t = 0.918$ ,  $P = 0.361$ ), 见表 2。

2.3 不同肝纤维化分期患者 miR-30a mRNA 相对表达量、miR-196b mRNA 相对表达量、TIMP-1 及 FIB-4 指数 139 例患者中纤维化分期 S0 期 18 例, S1 期 27 例, S2 期 36 例, S3 期 27 例, S4 期 31 例。其

中 S0 ~ S1 期 (轻度肝纤维化) 占 32.37% (45/139), S2 ~ S3 期 (显著肝纤维化) 占 45.32% (63/139), S4 期 (肝硬化) 占 22.31% (31/139)。血清中 miR-30a mRNA 相对表达量和 miR-196b mRNA 相对表达量随纤维化分期的增加而降低, TIMP-1 和 FIB-4 指数随纤维化分期的增加而增加, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

2.4 CHB 肝纤维患者血清 miR-30a 和 miR-196b 水平与临床指标的相关性分析 CHB 患者血清 miR-30a 与 ALT 和 AST 无相关性 ( $r = -0.121$ 、 $-0.215$ ,  $P = 0.087$ 、 $0.054$ ), 与 TIMP-1、FIB-4 和肝纤维化分期呈负相关 ( $r = -0.334$ 、 $-0.227$ 、 $-0.259$ ,  $P = 0.002$ 、 $0.043$ 、 $0.020$ ); miR-196b 与 ALT 和 AST 无相关性 ( $r = -0.204$ 、 $-0.100$ ,  $P = 0.063$ 、 $0.153$ ), 与 TIMP-1、FIB-4 和肝纤维化分期呈负相关 ( $r = -0.655$ 、 $-0.354$ 、 $-0.529$ ,  $P < 0.05$ ), 见表 4、图 1。

2.5 miR-30a mRNA 相对表达量、miR-196b mRNA 相对表达量、TIMP-1 和 FIB-4 对 CHB 肝纤维化患者肝纤维化诊断价值 miR-30a mRNA 相对表达量、miR-196b mRNA 相对表达量、TIMP-1 和 FIB-4 指数诊断 CHB 肝纤维化患者肝纤维化的 ROC 曲线下面积 (area under ROC curve, AUC) 分别为 0.847、0.942、0.792、0.895, 均有一定的诊断价值 ( $z = 15.322$ ,  $P < 0.001$ )。miR-196b 的 AUC 显著高于 miR-30a、TIMP-1 和 FIB-4 ( $P$  均  $< 0.001$ )。以 0.468 作为临界值, miR-196b 诊断的灵敏度和特异度分别为 89.45% 和 83.60%, 均显著高于其他指标, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 见表 5、表 6、图 2。

表 2 CHB 肝纤维化组和对照组 ALT、AST、TIMP-1、FIB-4 指数、miR-30a mRNA 相对表达量和 miR-196b mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	白蛋白 (g/L)	TIMP-1 (ng/ml)
CHB肝纤维化组 ( $n = 139$ )	$65.34 \pm 13.53$	$52.84 \pm 14.02$	$24.10 \pm 4.57$	$183.98 \pm 42.07$
对照组 ( $n = 120$ )	$18.28 \pm 3.14$	$25.84 \pm 1.26$	$25.21 \pm 6.72$	$80.59 \pm 13.09$
$t$ 值	2.752	2.475	0.918	25.857
$P$ 值	0.013	0.024	0.361	$< 0.001$
组别	FIB-4指数	miR-30a mRNA相对表达量	miR-196b mRNA相对表达量	
CHB肝纤维化组 ( $n = 139$ )	$1.33 \pm 0.09$	$0.60 \pm 0.08$	$0.45 \pm 0.04$	
对照组 ( $n = 120$ )	$0.78 \pm 0.06$	$1.00 \pm 0.09$	$1.00 \pm 0.02$	
$t$ 值	58.942	37.864	142.753	
$P$ 值	$< 0.001$	$< 0.001$	$< 0.001$	

表 3 不同肝纤维化分期 CHB 患者 miR-30a mRNA 相对表达量、miR-196b mRNA 相对表达量、TIMP-1 及 FIB-4 指数 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-30a mRNA相对表达量	miR-196b mRNA相对表达量	TIMP-1 (ng/ml)	FIB-4指数
S0 ~ S1期 (n = 45)	0.83 ± 0.06	0.76 ± 0.05	142.68 ± 13.21	0.84 ± 0.08
S2 ~ S3期 (n = 63)	0.69 ± 0.06	0.41 ± 0.08	257.50 ± 53.05	1.23 ± 0.09
S4期 (n = 31)	0.28 ± 0.02	0.21 ± 0.05	383.52 ± 62.31	2.48 ± 0.19
F值	1001.600	712.540	244.580	1895.920
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t <sub>1</sub> 值	11.955	27.920	14.191	23.237
P <sub>1</sub> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t <sub>2</sub> 值	49.105	47.127	25.191	45.368
P <sub>2</sub> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t <sub>3</sub> 值	36.961	12.730	10.214	43.406
P <sub>3</sub> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: t<sub>1</sub>、P<sub>1</sub>为 S0 ~ S1 期与 S2 ~ S3 期相比, t<sub>2</sub>、P<sub>2</sub>为 S0 ~ S1 期与 S4 期相比, t<sub>3</sub>、P<sub>3</sub>为 S2 ~ S3 期与 S4 期相比

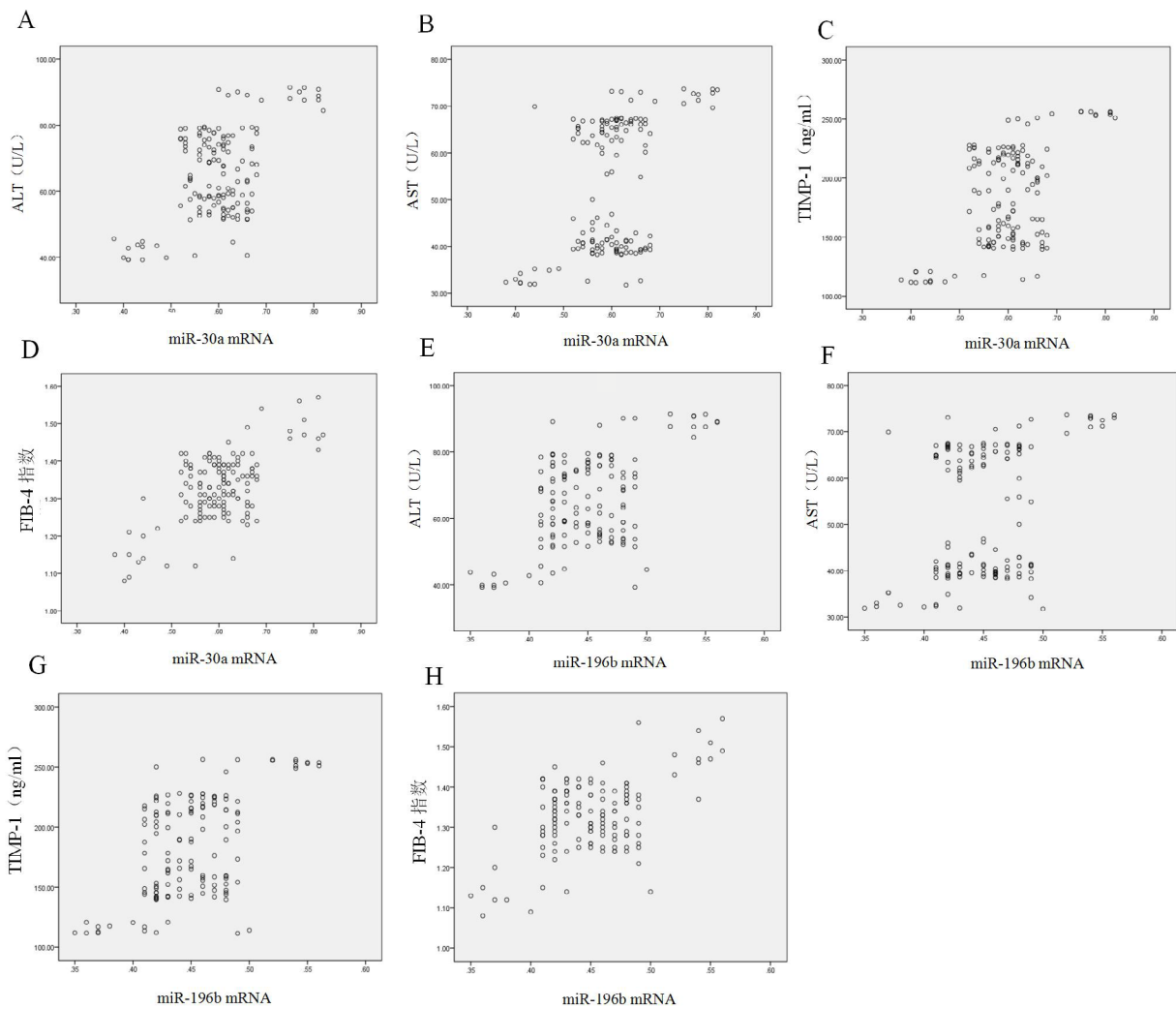


图 1 CHB 肝纤维化患者血清 miR-30a mRNA 和 miR-196b mRNA 水平与临床指标的散点图

表4 CHB 肝纤维化患者血清 miR-30a mRNA 和 miR-196b mRNA 水平与临床指标的相关性分析

影响因素	miR-30a		miR-196b	
	r值	P值	r值	P值
ALT	-0.121	0.087	-0.204	0.063
AST	-0.215	0.054	-0.100	0.153
TIMP-1	-0.334	0.002	-0.655	< 0.001
FIB-4	-0.227	0.043	-0.354	0.001
肝纤维化分期	-0.259	0.020	-0.529	< 0.001

表5 miR-30a、miR-196b、FIB-4 和 APRI 对 CHB 肝纤维化患者肝纤维化的诊断价值

指标	AUC	95%CI	P值	临界值	敏感性 (%)	特异度 (%)
miR-30a	0.847	0.756~0.928	0.002	0.559	63.19	78.26
miR-196b	0.942	0.860~0.983	0.000	0.468	89.45	83.60
TIMP-1	0.792	0.721~0.855	0.004	174.563	54.36	63.28
FIB-4	0.895	0.821~0.967	< 0.001	1.343	87.60	81.91
z值	15.322	-	-	-	13.653	10.427
P值	< 0.001	-	-	-	< 0.001	< 0.001

注：“-”为无相关数据

表6 miR-30a、miR-196b、FIB-4 和 APRI 对 CHB 肝纤维化患者肝纤维化的诊断价值比较的统计学分析

项目	AUC		敏感性		特异度	
	z值	P值	z值	P值	z值	P值
miR-30a vs miR-196b	4.274	< 0.001	7.331	< 0.001	1.425	0.136
miR-30a vs TIMP-1	5.140	< 0.001	2.864	0.002	4.035	< 0.001
miR-30a vs FIB-4	3.923	< 0.001	6.025	< 0.001	1.213	0.215
miR-196b vs TIMP-1	4.252	< 0.001	8.263	< 0.001	4.983	< 0.001
miR-196b vs FIB-4	4.182	< 0.001	1.053	0.247	1.012	0.301
TIMP-1 vs FIB-4	4.628	< 0.001	7.534	< 0.001	4.204	< 0.001

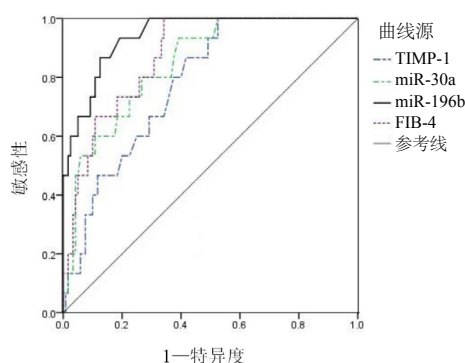


图2 miR-30a、miR-196b mRNA、TIMP-1 和 FIB-4 对 CHB 肝纤维化患者肝纤维化诊断的 ROC 曲线

### 3 讨论

进行本研究前，经文献检索发现了20个与CHB肝纤维化相关的miRNA。同时，这些miRNA能够预测多结节或孤立性肿瘤（包括早期疾病患者）肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）患者的生存

和复发。这一发现促使我们研究miRNA在CHB肝纤维化中的作用。研究表明，血清miR-30a和miR-196b水平在CHB患者和HCC患者中均升高，可作为肝损伤的特异性标志物，但对HCC并无特异性<sup>[13]</sup>。

miR-30a存在于多种人类恶性肿瘤中，其在肿瘤进展预测和抑制中具有潜在作用。研究表明，miR-30a可通过靶向TIMP-1、k-Ras和MTDH/PTEN/AKT信号转导通路，在HCC中发挥抑癌作用，抑制肿瘤的体外生长<sup>[14,15]</sup>。还有研究表明，miR-30a下调可通过靶向多种可能的基因和途径在HCC发生和发展中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。CHB患者血清中miRNA表达研究表明，miR-30a可作为肝组织损伤的标志物，具有良好的敏感性和特异性<sup>[17]</sup>。利用成熟的肝转移裸鼠模型和慢病毒介导的稳定miR-30a表达获得体内分析的研究证实，miR-30a可减少肝转移灶的形成<sup>[18]</sup>。

临床标本验证结合体内外实验表明，CHB患者miR-30a表达的降低影响了肝纤维化的进展，miR-

30a过表达可下调TIMP-1,抑制肝纤维化进展<sup>[19,20]</sup>。肝纤维化的特征是肝细胞外基质蛋白(extracellular matrix, ECM)合成和降解不平衡,导致包括胶原蛋白在内的ECM蛋白过度积累<sup>[21]</sup>。TIMP-1是ECM合成和降解的关键调控因子,在小鼠模型和人类肝纤维化患者中均发现其表达显著升高<sup>[22]</sup>。此外,TIMP-1的过表达促进了小鼠肝纤维化的发展,而TIMP-1表达降低可抑制ECM在肝脏的沉积,有效地减弱了肝纤维化的进程<sup>[23]</sup>。更重要的是,肝组织中TIMP-1水平的上调似乎与慢性丙型肝炎患者肝纤维化程度密切相关<sup>[24]</sup>。

miRNA-196b在肿瘤方面的作用已有相关报道,在HCC、胃癌及肠癌等患者中低表达,且表达量与肿瘤预后密切相关<sup>[25]</sup>。miR-196b可抑制肝星状细胞的增殖,减少ECM和胶原的产生而发挥抗肝纤维化的作用<sup>[26]</sup>。肝星状细胞的活化是肝纤维化的中心环节,有研究表明小鼠肝纤维化模型的肝星状细胞中miR-30a和miR-196b表达显著降低,可促进肝星状细胞细胞的增殖和I型胶原的增加<sup>[27]</sup>。研究表明,CHB患者miR-30a表达水平与血清ALT、HBV DNA和HBsAg水平呈正相关,且可区分疾病进展的高危和低危患者;miR-196b表达水平与ALT无相关性,而与HBV DNA呈正相关,miR-196b是否与HBV复制有关目前尚未见报道,值得进一步探讨<sup>[28]</sup>。本研究结果与上述研究部分一致。因此,可推测miR-30a和miR-196b可能在CHB肝纤维化的发病过程中发挥作用,但尚需更多的研究来证实。进一步探讨miR-30a和miR-196b在CHB肝纤维化中的分子机制,对CHB肝纤维化的诊断和治疗具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Locarnini S, Hatzakis A, Chen DS, et al. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs[J]. J Hepatol, 2015, 62(1 Suppl): S76-S86.
- [2] 陈红英, 丁洁, 游晶. 慢性乙型肝炎病毒感染者血清流行病学研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(8): 939-942.
- [3] 田长印, 张欣, 刘拉羊, 等. 慢性乙型肝炎患者生命质量影响因素分析[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(2): 156-159.
- [4] Sun Y, Zhou J, Wang L, et al. New classification of liver biopsy assessment for fibrosis in chronic hepatitis B patients before and after treatment[J]. Hepatology, 2017, 65(5): 1438-1450.
- [5] Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest[J]. Hepatology, 2007, 46(1): 32-36.
- [6] 刘京, 刘映霞, 董常峰, 等. ARFI、Forns指数、FIB-4和APRI无创诊断慢性乙型肝炎病毒性肝纤维化的研究[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2014, 6(1): 18-21.
- [7] Vesterhus M, Hov JR, Holm A, et al. Enhanced liver fibrosis score predicts transplant-free survival in primary sclerosing cholangitis[J]. Hepatology, 2015, 62(1): 188-197.
- [8] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-222.
- [9] 邢同京, 徐洪涛, 王变, 等. 慢性乙型肝炎免疫清除相关微RNA分子的筛选及其生物信息学分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2014, 7(5): 441-446.
- [10] Kałuzna EM. MicroRNA-155 and microRNA-196b: promising biomarkers in hepatitis C virus infection? [J]. Rev Med Virol, 2014, 24(3): 169-185.
- [11] 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 19(5): 1-18.
- [12] Fan Y, Wang L, Dou X. Serum monocyte chemoattractant protein-1 predicts liver inflammation of patients with chronic hepatitis B[J]. Clin Lab, 2018, 64(5): 841-846.
- [13] Li WF, Dai H, Ou Q, et al. Overexpression of microRNA-30a-5p inhibits liver cancer cell proliferation and induces apoptosis by targeting MTDH/PTEN/AKT pathway[J]. Tumor Biology, 2016, 37(5): 5885-5895.
- [14] Zhou K, Luo X, Wang Y, et al. MicroRNA-30a suppresses tumor progression by blocking Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 1025-1032.
- [15] Li WF, Dai H, Ou Q, et al. Overexpression of microRNA-30a-5p inhibits liver cancer cell proliferation and induces apoptosis by targeting MTDH/PTEN/AKT pathway[J]. Tumor Biol, 2016, 37(5): 5885-5895.
- [16] Huang WT, Chen ZX, He RQ, et al. Clinicopathological role of miR-30a-5p in hepatocellular carcinoma tissues and prediction of its function with bioinformatics analysis[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 5061-5071.
- [17] Wang Y, Huang Y, Zhang M, et al. Bioinformatic analysis of the possible regulative network of miR-30a/e in cardiomyocytes 2 days post myocardial infarction[J]. Acta Cardiologica Sinica, 2018, 34(2): 175-188.
- [18] Zhang S, Liu Q, Zhang Q, et al. MicroRNA-30a-5p suppresses proliferation, invasion and tumor growth of hepatocellular cancer cells via targeting FOXA1[J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 5018-5026.
- [19] 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.
- [20] El-Ekiaby NM, Mekky RY, Riad SE, et al. miR-148a and miR-30a limit HCV-dependent suppression of the lipid droplet protein, ADRP, in HCV infected cell models[J]. J Med Virol, 2016, 89(4): 653-659.
- [21] Bi H, Ming L, Cheng R, et al. Liver extracellular matrix promotes BM-MSCs hepatic differentiation and reversal of liver fibrosis through activation of integrin pathway[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(10): 2685-2698.
- [22] Song T, Dou C, Jia Y, et al. TIMP-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating SDF1/CXCR4 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(14): 12061-12079.
- [23] Zhu Y, Miao Z, Gong L, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells expressing TIMP-1-shRNA improves hepatic fibrosis in CCl4-

- treated rats[J]. Int J Clin Experim Pathol, 2015, 8(8): 8912-8920.
- [24] Komolmit P, Kimtrakool S, Suksawatamnuay S, et al. Vitamin D supplementation improves serum markers associated with hepatic fibrogenesis in chronic hepatitis C patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8905-8912.
- [25] Tsai MM, Wang CS, Tsai CY, et al. MicroRNA-196a/-196b promote cell metastasis via negative regulation of radixin in human gastric cancer[J]. Cancer Letters, 2014, 351(2): 222-231.
- [26] Fantini S, Salsi V, Reggiani L, et al. The miR-196b miRNA inhibits the GATA6 intestinal transcription factor and is upregulated in colon cancer patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(3): 4747-4759.
- [27] Evaristi MF, Barutaut M, Peacock F, et al. A single systemic injection of AAV9-hIGFBP2 prevents left ventricular hypertrophy and dysfunction in metabolic syndrome[J]. Arch Cardiovasc Dis, 2018, 10(2): 215-225.
- [28] Meng J, Li L, Zhao Y, et al. MicroRNA-196a/b mitigate renal fibrosis by targeting TGF- $\beta$  receptor 2[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(10): 3006-3021.
- 收稿日期: 2019-05-26

葛建祥, 张伯, 黄小平. 慢性乙型肝炎肝纤维化患者血清微小RNA-30a mRNA与微小RNA-196b mRNA相对表达量及临床意义[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2020, 12(1): 76-83.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊对来稿参考文献格式的要求

本刊执行 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》。采用顺序编码制著录, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出, 并将序号置于方括号中, 排列于文后。内部刊物、未发表资料(不包括已被接受的待发表资料)、个人通信等请勿作为文献引用, 确需引用时, 可将其在正文相应处注明。日文汉字请按日文规定书写, 勿与我国汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过 3 人全部著录; 超过 3 人可以只著录前 3 人, 后依文种加表示“等”的文字。作者姓名一律姓氏在前、名字在后, 外国人的名字采用首字母缩写形式, 缩写后不加缩写点; 不同作者姓名之间用“,”隔开, 不用“和”、“and”等连词。请于文献题名项后增加标注文献类型标志项目, 示例如下:

[1] 陈登原. 国史旧闻 [M]. 北京: 中华书局, 2000: 29.

[2] 袁训来, 陈哲, 肖书海, 等. 蓝田生物群: 一个认识多细胞生物起源和早期演化的新窗口 [J]. 科学通报, 2012, 55(34): 3219.

[3] 余建斌. 我们的科技一直在追赶: 访中国工程院院长周济 [N/OL]. 人民日报, 2013-01-12(2). [2013-03-20]. [http://paper.people.com.cn/rmrb/html/2013-01/12/nw.D110000renmrb\\_20130112\\_5-02.htm](http://paper.people.com.cn/rmrb/html/2013-01/12/nw.D110000renmrb_20130112_5-02.htm).

本刊编辑部