

5种致癌相关基因在乙型肝炎病毒感染进程中的差异表达

钱舒然, 谭靖文, 龚明, 何越峰, 李晖 (云南省第二人民医院 感染性疾病科, 昆明 650021)

摘要: **目的** 探讨致癌相关基因在慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者、乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 携带者、HBV相关肝衰竭患者及健康人群外周血白细胞中的差异表达。**方法** 收集2019年2月至2019年9月云南省第二人民医院收治的51例CHB患者 (记为CHB组)、51例HBV携带者 (记为ASC组)、15例HBV相关肝衰竭患者 (记为LF组) 以及51例健康体检者 (HC组) 为研究对象。采集所有研究对象的外周血, 提取外周血白细胞内的总RNA。采用定量反转录聚合酶链式反应 (quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法检测*DNAJC6*、*GSE1*、*HIPK3*、*MBOAT2*、*UBXN7*线状RNA (liner RNA)、环状RNA (circular RNA, circRNA) 的相对表达水平, 并评估其环线比在各组间的变化。**结果** 与HC组相比, ASC组*Lin-DNAJC6* (3.59 ± 1.47 vs 2.36 ± 1.10)、*Lin-HIPK3* (1.79 ± 0.71 vs 1.33 ± 0.65)、*Lin-UBXN7* (8.68 ± 1.96 vs 3.36 ± 0.86)、*Circ-GSE1* (2.71 ± 1.47 vs 1.83 ± 1.09)、*Circ-UBXN7* (2.88 ± 1.37 vs 2.03 ± 1.19) 相对表达量显著升高, *Lin-GSE1* (1.65 ± 0.94 vs 2.04 ± 0.79)、*Circ-HIPK3* (1.93 ± 1.09 vs 3.85 ± 1.23) 相对表达量显著降低 (P 均 < 0.05) ; CHB组*Lin-DNAJC6* (6.73 ± 1.48 vs 2.36 ± 1.10)、*Lin-HIPK3* (7.24 ± 0.85 vs 1.33 ± 0.65)、*Lin-MBOAT2* (6.58 ± 0.72 vs 1.35 ± 0.70)、*Circ-DNAJC6* (5.26 ± 1.86 vs 3.41 ± 1.75)、*Circ-GSE1* (2.61 ± 1.68 vs 1.83 ± 1.09)、*Circ-MBOAT2* (5.50 ± 1.82 vs 3.22 ± 1.52)、*Circ-UBXN7* (4.61 ± 1.36 vs 2.03 ± 1.19) 相对表达量显著升高, *Lin-UBXN7* (2.47 ± 0.83 vs 3.36 ± 0.86) 相对表达量显著降低 (P 均 < 0.05) ; LF组*Lin-DNAJC6* (5.10 ± 2.49 vs 2.36 ± 1.10)、*Lin-HIPK3* (2.47 ± 1.22 vs 1.33 ± 0.65)、*Circ-GSE1* (2.98 ± 2.12 vs 1.83 ± 1.09) 相对表达量显著升高, *Circ-HIPK3* (2.29 ± 1.40 vs 3.85 ± 1.23) 相对表达量显著降低。各组*DNAJC6*、*GSE1*、*HIPK3*、*MBOAT2*、*UBXN7*的RNA环线比存在不同程度的差异。ASC组*GSE1*的环线比 (中位数: 1.77 vs 0.93) 显著高于HC组, *DNAJC6* (中位数: 1.10 vs 1.52)、*HIPK3* (中位数: 1.05 vs 2.95)、*UBXN7* (中位数: 0.31 vs 0.56) 的环线比显著低于HC组 (P 均 < 0.05) ; CHB组*GSE1* (中位数: 1.43 vs 0.93)、*UBXN7* (中位数: 1.82 vs 0.56) 的环线比显著高于HC组 (P 均 < 0.05) , *DNAJC6* (中位数: 0.78 vs 1.52)、*HIPK3* (中位数: 0.50 vs 2.95)、*MBOAT2* (中位数: 0.82 vs 2.14) 的环线比显著低于HC组 (P 均 < 0.05) ; LF组*DNAJC6* (中位数: 0.65 vs 1.52) 环线比显著低于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** *DNAJC6*、*GSE1*、*HIPK3*、*MBOAT2*、*UBXN7*线状RNA和circRNA在HBV感染肝病患者外周血白细胞中差异表达, 提示circRNA可能与HBV感染相关肝病的进展密切相关。**关键词:** 肝炎, 乙型, 慢性; 肝炎病毒, 乙型; 环状RNA

Differential expression of five kinds of carcinoma-related genes in hepatitis B virus infection progression

Qian Shuran, Tan Jingwen, Gong Ming, He Yuefeng, Li Hui (Department of Infectious

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2023.02.002

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目 (202001AY070001-256); 云南省医疗卫生单位内设研究机构科研项目 (2018NS0004)

通讯作者: 李晖 Email: lihuidoc@126.com

Diseases, the Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021, China)

Abstract: Objective To investigate the differential expression of carcinoma-related genes in peripheral blood leukocytes of patients with chronic hepatitis B (CHB), hepatitis B virus (HBV) carriers, patients with HBV-related liver failure and healthy controls. **Methods** Patients with CHB (CHB group, 51 cases), HBV carriers (ASC group, 51 cases), patients with HBV-related liver failure (LF group, 15 cases) and healthy controls (HC group, 51 cases) in the Second People's Hospital of Yunnan Province from February 2019 to September 2019 were enrolled. Peripheral blood was collected from all study subjects and total RNA was extracted from peripheral blood leukocytes. The relative expression levels of *DNAJC6*, *GSE1*, *HIPK3*, *MBOAT2*, *UBXN7* linear and circular RNA were detected by quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the changes of circRNA/linear RNA expression ratio among groups were evaluated. **Results** Compared with healthy controls, the relative expression levels of *Lin-DNAJC6* (3.59 ± 1.47 vs 2.36 ± 1.10), *Lin-HIPK3* (1.79 ± 0.71 vs 1.33 ± 0.65), *Lin-UBXN7* (8.68 ± 1.96 vs 3.36 ± 0.86), *Circ-GSE1* (2.71 ± 1.47 vs 1.83 ± 1.09) and *Circ-UBXN7* (2.88 ± 1.37 vs 2.03 ± 1.19) were significantly higher in ASC group, while the relative expression levels of *Lin-GSE1* (1.65 ± 0.94 vs 2.04 ± 0.79) and *Circ-HIPK3* (1.93 ± 1.09 vs 3.85 ± 1.23) were significantly lower (all $P < 0.05$). Compared with healthy controls, the relative expression levels of *Lin-DNAJC6* (6.73 ± 1.48 vs 2.36 ± 1.10), *Lin-HIPK3* (7.24 ± 0.85 vs 1.33 ± 0.65), *Lin-MBOAT2* (6.58 ± 0.72 vs 1.35 ± 0.70), *Circ-DNAJC6* (5.26 ± 1.86 vs 3.41 ± 1.75), *Circ-GSE1* (2.61 ± 1.68 vs 1.83 ± 1.09), *Circ-MBOAT2* (5.50 ± 1.82 vs 3.22 ± 1.52) and *Circ-UBXN7* (4.61 ± 1.36 vs 2.03 ± 1.19) in CHB group were significantly higher, while the relative expression level of *Lin-UBXN7* (2.47 ± 0.83 vs 3.36 ± 0.86) was significantly lower (all $P < 0.05$). Compared with healthy controls, the relative expression levels of *Lin-DNAJC6* (5.10 ± 2.49 vs 2.36 ± 1.10), *Lin-HIPK3* (2.47 ± 1.22 vs 1.33 ± 0.65) and *Circ-GSE1* (2.98 ± 2.12 vs 1.83 ± 1.09) were significantly higher in LF group, while the relative expression levels of *Circ-HIPK3* (2.29 ± 1.40 vs 3.85 ± 1.23) was significantly lower (all $P < 0.05$). Meanwhile, the circRNA/linear RNA expression ratio of *DNAJC6*, *GSE1*, *HIPK3*, *MBOAT2*, *UBXN7* were different in each group. The circRNA/linear RNA expression ratio of *GSE1* (median: 1.77 vs 0.93) in ASC group were significantly higher than HC group ($P < 0.05$). The circRNA/linear RNA expression ratio of *DNAJC6* (median: 1.10 vs 1.52), *HIPK3* (median: 1.05 vs 2.95) and *UBXN7* (median: 0.31 vs 0.56) in ASC group were significantly lower than HC group (all $P < 0.05$). The circRNA/linear RNA expression ratio of *GSE1* (median: 1.43 vs 0.93) and *UBXN7* (median: 1.82 vs 0.56) in patients with CHB were significantly higher than those of healthy controls (all $P < 0.05$). The circRNA/linear RNA expression ratio of *DNAJC6* (median: 0.78 vs 1.52), *HIPK3* (median: 0.50 vs 2.95) and *MBOAT2* (median: 0.82 vs 2.14) in patients with CHB were significantly lower than those of healthy controls (all $P < 0.05$). The circRNA/linear RNA expression ratio of *DNAJC6* (median: 0.65 vs 1.52) of patients in LF group were significantly lower than those of healthy controls ($P < 0.05$). **Conclusions** *DNAJC6*, *GSE1*, *HIPK3*, *MBOAT2*, *UBXN7* linear RNA and circRNA were differentially expressed in peripheral blood leukocytes of patients with HBV-infected liver disease, suggesting that circRNA may be closely related to the progression of liver disease associated with HBV infection.

Key words: Hepatitis B, chronic; Hepatitis B virus; Circular RNA

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）感染可引起慢性乙型肝炎（chronic hepatitis B, CHB）、肝硬化和肝癌等，严重危害人类健康^[1,2]。CHB也是我国的常见疾病及多发疾病，每年约30万人死于CHB相关疾病^[3]。早期准确诊断与及时抗病毒治疗可延缓病情进展。因此，进一步探究其生物学标记物对于控制疾病的发生、发展具有重要意义。

线性RNA（liner RNA）和环状RNA（circular RNA, circRNA）的产生来自于体内不同的转录剪切途径^[4]，此处的线性RNA即传统意义上的mRNA分子。circRNA是一类新发现的不具有3'和5'末端头尾结构的特殊RNA，广泛存在于真核细胞内，与mRNA相比，circRNA更具有保守性及稳定性^[5,6]。研究表明，circRNA在肝癌、肝纤维化、CHB等疾病进展中发挥重要作用^[7,8]。circMTO1已被证实能够抑制肝细胞癌进展，最近的研究显示，circMTO1还可调节微小RNA（micro RNA, miRNA）的表达，抑制肝纤维化^[9]。circUBXN7可影响肝癌细胞的增殖、迁移和凋亡，在促进肝癌的发生发展中发挥重要作用，有望成为治疗肝癌的潜在靶标^[10]。circHIPK3在肝癌组织中表达上调，可通过充当miR-124海绵来调节其靶基因AQP3的表达^[11]。由此可见，circRNA可能在未来成为多种疾病诊断的新型标志物或治疗靶点。

Memczak等^[12]研究表明，DNAJC6、GSE1、HIPK3、MBOAT2、UBXN7等circRNA在外周血中表达丰富，具有作为疾病诊断生物标记物的潜能。上述RNA在功能上被发现与致癌有关，可能参与了HBV感染肝病的疾病进程，因此本研究采用定量反转录聚合酶链式反应（quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction, qRT-PCR）法检测DNAJC6、GSE1、HIPK3、MBOAT2、UBXN7线性RNA、circRNA在HBV感染肝病患者外周血白细胞中的表达量，探究这些致癌

相关基因在HBV感染者中的表达差异及环线比变化，为进一步寻找HBV相关肝病的分子标记物提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集2019年2月至2019年9月云南省第二人民医院感染性疾病科收治的51例CHB患者（记为CHB组）、51例HBV携带者（记为ASC组）、15例HBV相关肝衰竭患者（记为LF组）、51例同期健康体检者（HC组）进行前瞻性研究，诊断标准依据中华医学会肝病学分会和感染分会制定的《慢性乙型肝炎防治指南（2015年版）》^[13]和中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组和中华医学会肝病学分会重型肝炎与人工肝学组制定的《肝衰竭诊治指南（2012年版）》^[14]。排除标准：合并其他肝病及恶性肿瘤的患者、抗人类免疫缺陷病毒抗体阳性者、孕妇、哺乳期妇女等。研究经本院伦理委员会批准通过（批件文号：20180335），所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 研究方法 提取各组外周血白细胞内总RNA后采用qRT-PCR法检测RNA的相对表达水平。方法如下：取外周抗凝血于红细胞裂解液中裂解得到白细胞；再利用Trizol试剂（诺禾致源公司）提取各组白细胞中的总RNA，用琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的完整性，紫外分光光度计检测 A_{260} 和 A_{280} 的吸光度，计算RNA浓度；使用逆转录试剂盒（Roche公司）将RNA逆转录为cDNA，步骤按照说明书进行，使用罗氏LightCycler 96荧光定量聚合酶链式反应仪（LightCycler 96 instrument）和FastStart Universal SYBR GreenMaster荧光定量试剂盒（罗氏诊断产品有限公司）检测DNAJC6、GSE1、HIPK3、MBOAT2、UBXN7线性RNA、circRNA相对表达水平（PCR引物序列见表1、表2）。荧光定量PCR所使用的酶为UltraSYBR Mixture（北京康为世纪生物科技有限公司）。荧光定量PCR反应程序为：95℃预

表1 DNAJC6、GSE1、HIPK3、MBOAT2、UBXN7RNA 线性引物序列

引物	引物序列（5'-3'）	片段长度（bp）	起止核苷酸位置
Lin-DNAJC6	上游：TCTCTACTCTACTCCTGGCCAG 下游：GTAGTCACACATATAGCCCAGGT	107	161~267
Lin-GSE1	上游：AGCTCAGTTGTGACAGGATTC 下游：CTTCTCAGGTAGTCCTCGGT	101	459~559
Lin-HIPK3	上游：AGACTCAAGGTTTGCCAGGA 下游：CTGCCTCATGCTCTTCCAAT	126	1321~1446
Lin-MBOAT2	上游：TACTCCACAGGTAATGTTGTAC 下游：ACTTTCATTGAAGGCAGATCATACCA	176	642~817
Lin-UBXN7	上游：AGAAATCCCGTCACTTGGTCCAA 下游：TGACAGTGAGGAAGGTGAGAGA	150	504~653
β -actin	上游：CCTGTACGCCAACACAGTGC 下游：ATACTCCTGCTTGCTGATCC	211	1031~1241

变性520 s; 95 °C 变性10 s, 60 °C 退火10 s, 72 °C 延伸10 s, 共41个循环。以 β -actin作为内参基因, 以 $\Delta\Delta$ CT值表示相对表达量(值越大, 表达量越高), circRNA和线状RNA相对表达水平的比值为环线比。

1.3 统计学处理 采用SPSS 24.0软件进行统计数据分 析, 年龄及各基因RNA相对表达量为正态分布的 计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组组间均数比较采用 单因素方差分析, 两两比较采用LSD-*t*检验; RNA 环线比为非正态分布的计量资料, 以 $M(p_{25}, p_{75})$ 表示, 多组间样本比较采用Kruskal-Wallis *H*检验, 两两比较采用Dunn-Bonferroni检验。性别为计数资 料, 以例数表示, 采用Pearson χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 各组患者性别与年龄差异无统计学意 义($P > 0.05$), 具有可比性, 见表3。

2.2 各组线状RNA相对表达量 *DNAJC6*、*HIPK3*、 *MBOAT2*线状RNA在CHB组的相对表达量显著高 于其他组($P < 0.05$), *DNAJC6*、*HIPK3*线状 RNA在HC组相对表达量显著低于其他组($P < 0.05$)。 *GSE1*线状RNA在LF组的相对表达量显著 高于ASC组和CHB组($P < 0.05$), 在HC组的相 对表达量显著高于ASC组($P < 0.05$)。 *UBXN7*线 状RNA在ASC组的相对表达量显著高于其他组(P

均 < 0.05), 在CHB组的相对表达量显著低于HC 组($P < 0.05$), 见表4。

2.3 各组circRNA相对表达量 *MBOAT2*、*UBXN7* *circRNA*在CHB组相对表达量最高, *MBOAT2* *circRNA*在ASC组相对表达量低于LF组, 差异有 统计学意义($P < 0.05$), *UBXN7* *circRNA*在 ASC组相对表达量高于HC组($P < 0.05$)。 *GSE1* *circRNA*在HC组相对表达量显著低于其他组(P 均 < 0.05)。 *HIPK3* *circRNA*在HC组的相对表达 量显著高于LF组和ASC组, 在CHB组的相对表达 量也显著高于LF组和ASC组, 差异均有统计学意 义($P < 0.05$)。 *DNAJC6* *circRNA*在CHB组 的相对表达量均显著高于HC组和ASC组($P < 0.05$)。见表5。

2.4 各组5种RNA环线比 *DNAJC6*在HC组的环线均显 著高于其他各组($P < 0.05$), *DNAJC6*在ASC组 的环线比显著高于LF组及CHB组($P < 0.05$)。 *GSE1*在HC组的环线比显著低于ASC组及CHB组 ($P < 0.05$)。 *HIPK3*在HC组的环线比显著高于 其他各组($P < 0.05$), 且CHB组的环线比显著 低于ASC组、LF组($P < 0.05$)。 *MBOAT2*在CHB 组的环线比显著低于HC组、LF组及ASC组($P < 0.05$)。 *UBXN7*在ASC组的环线比显著低于其他各组 ($P < 0.05$), 而*UBXN7*在CHB组的环线比显著高 于HC组及LF组($P < 0.05$)。见表6。

表2 *DNAJC6*、*GSE1*、*HIPK3*、*MBOAT2*、*UBXN7* RNA 环状引物序列

引物	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
Circ- <i>DNAJC6</i>	上游: CCAGACATCTTGACCACTACACA	302
	下游: ATGTGTCTTTGAGGGTGTCTTT	
Circ- <i>GSE1</i>	上游: CATCCTCCAGCTTTGCCGCCG	219
	下游: CTGGTCGCGGTGGAAGCATC	
Circ- <i>HIPK3</i>	上游: TCGGCCAGTCATGTATCAAA	156
	下游: TGCTTGGCTCTACTTTGAGTTTC	
Circ- <i>MBOAT2</i>	上游: AGTGCAAGATAAAGGCCCAAA	226
	下游: TGATCATCATAGGAGTGGAGAACA	
Circ- <i>UBXN7</i>	上游: ACCAGTATTCCTGCTTTTGAGG	183
	下游: CTACCCTTGCGATCTATTCCGG	

表3 各组基线资料

组别	例数	男/女(例)	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)
ASC组	51	25/26	39 \pm 13
CHB组	51	24/27	38 \pm 10
LF组	15	8/7	44 \pm 9
HC组	51	29/22	37 \pm 13
统计量值		$\chi^2 = 1.129$	$F = 0.890$
<i>P</i> 值		0.77	0.26

注: ASC 组为 HBV 携带者, CHB 组为慢性乙型肝炎患者; LF 组为 HBV 相关肝衰竭患者, HC 组为健康对照组。

表 4 各组白细胞中 5 种线状 RNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>Lin-DNAJC6</i>	<i>Lin-GSE1</i>	<i>Lin-HIPK3</i>	<i>Lin-MBOAT2</i>	<i>Lin-UBXN7</i>
ASC组	3.59 ± 1.47 ^{abc}	1.65 ± 0.94 ^{ab}	1.79 ± 0.71 ^{abc}	1.08 ± 0.72 ^c	8.68 ± 1.96 ^{abc}
CHB组	6.73 ± 1.48 ^{ab}	1.84 ± 0.87 ^b	7.24 ± 0.85 ^{ab}	6.58 ± 0.72 ^{ab}	2.47 ± 0.83 ^a
LF组	5.10 ± 2.49 ^a	2.51 ± 1.31	2.47 ± 1.22 ^a	1.48 ± 0.65	2.91 ± 1.21
HC组	2.36 ± 1.10	2.04 ± 0.79	1.33 ± 0.65	1.35 ± 0.70	3.36 ± 0.86
<i>F</i> 值	79.468	3.891	592.225	711.197	235.490
<i>P</i> 值	< 0.001	0.010	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>t</i> ₁ 值	6.160	1.724	4.805	0.683	-1.583
<i>P</i> ₁ 值	< 0.001	0.089	< 0.001	0.497	0.118
<i>t</i> ₂ 值	16.926	-1.195	39.544	38.409	-5.327
<i>P</i> ₂ 值	< 0.001	0.235	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>t</i> ₃ 值	4.784	-2.243	3.430	-1.947	17.775
<i>P</i> ₃ 值	< 0.001	0.027	0.001	0.054	< 0.001
<i>t</i> ₄ 值	3.169	-2.311	17.239	24.584	-1.637
<i>P</i> ₄ 值	0.002	0.024	< 0.001	< 0.001	0.106
<i>t</i> ₅ 值	-2.964	-2.808	-2.747	-1.927	10.772
<i>P</i> ₅ 值	0.004	0.007	0.008	0.058	< 0.001
<i>t</i> ₆ 值	10.781	1.069	35.300	39.175	-21.184
<i>P</i> ₆ 值	< 0.001	0.288	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: *t*₁、*P*₁为LF组和HC组比较, *t*₂、*P*₂为CHB组和HC组比较, *t*₃、*P*₃为ASC组和HC组比较, *t*₄、*P*₄为LF组和CHB组比较, *t*₅、*P*₅为LF组和ASC组比较, *t*₆、*P*₆为CHB组和ASC组比较; 与HC组比较, ^a*P* < 0.05, 与LF组比较, ^b*P* < 0.05; 与CHB组比较, ^c*P* < 0.05。

表 5 各组白细胞中 5 种 circRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>Circ-DNAJC6</i>	<i>Circ-GSE1</i>	<i>Circ-HIPK3</i>	<i>Circ-MBOAT2</i>	<i>Circ-UBXN7</i>
ASC组	3.90 ± 1.84 ^c	2.71 ± 1.47 ^a	1.93 ± 1.09 ^{ac}	2.72 ± 1.75 ^{bc}	2.88 ± 1.37 ^{ac}
CHB组	5.26 ± 1.86 ^a	2.61 ± 1.68 ^a	3.60 ± 1.28 ^b	5.50 ± 1.82 ^{ab}	4.61 ± 1.36 ^{ab}
LF组	4.11 ± 2.93	2.98 ± 2.12 ^a	2.29 ± 1.40 ^a	4.26 ± 1.79	2.22 ± 1.64
HC组	3.41 ± 1.75	1.83 ± 1.09	3.85 ± 1.23	3.22 ± 1.52	2.03 ± 1.19
<i>F</i> 值	8.563	4.986	27.337	23.311	35.429
<i>P</i> 值	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>t</i> ₁ 值	1.167	2.843	-4.207	1.887	0.507
<i>P</i> ₁ 值	0.248	0.006	< 0.001	0.064	0.614
<i>t</i> ₂ 值	5.235	3.292	-1.035	6.898	10.276
<i>P</i> ₂ 值	< 0.001	0.001	0.303	< 0.001	< 0.001
<i>t</i> ₃ 值	1.388	3.445	-8.415	-1.554	3.388
<i>P</i> ₃ 值	0.168	0.001	< 0.001	0.123	0.001
<i>t</i> ₄ 值	1.831	-0.840	3.422	2.054	5.717
<i>P</i> ₄ 值	0.072	0.404	0.001	0.044	< 0.001
<i>t</i> ₅ 值	-1.315	-1.425	-1.210	0.348	-1.726
<i>P</i> ₅ 值	0.191	0.156	0.228	0.728	0.086
<i>t</i> ₆ 值	3.732	-0.373	7.170	7.954	6.409
<i>P</i> ₆ 值	< 0.001	0.710	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: *t*₁、*P*₁为LF组和HC组比较, *t*₂、*P*₂为CHB组和HC组比较, *t*₃、*P*₃为ASC组和HC组比较, *t*₄、*P*₄为LF组和CHB组比较, *t*₅、*P*₅为LF组和ASC组比较, *t*₆、*P*₆为CHB组和ASC组比较; 与HC组比较, ^a*P* < 0.05, 与LF组比较, ^b*P* < 0.05; 与CHB组比较, ^c*P* < 0.05。

表6 各组白细胞中5种RNA的环线比 [$M(p_{25}, p_{75})$]

组别	<i>DNAJC6</i>	<i>GSE1</i>	<i>HIPK3</i>	<i>MBOAT2</i>	<i>UBXN7</i>
ASC组	1.10 (0.89, 1.24) ^{abc}	1.77 (1.31, 2.30) ^a	1.05 (0.78, 1.34) ^{ac}	2.34 (1.56, 4.10) ^c	0.31 (0.24, 0.40) ^{abc}
CHB组	0.78 (0.67, 0.86) ^a	1.43 (1.04, 1.74) ^a	0.50 (0.37, 0.61) ^{ab}	0.82 (0.64, 1.02) ^{ab}	1.82 (1.55, 2.03) ^{ab}
LF组	0.65 (0.42, 1.00) ^a	0.96 (0.66, 1.83)	0.94 (0.69, 1.17) ^a	2.73 (1.02, 4.44)	0.71 (0.47, 0.94)
HC组	1.52 (1.28, 1.70)	0.93 (0.68, 1.10)	2.95 (2.46, 4.05)	2.14 (1.36, 3.53)	0.56 (0.38, 0.78)
<i>H</i> 值	83.543	42.621	124.808	72.168	117.313
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>Z</i> ₁ 值	-83.827	23.766	-63.230	-2.340	9.006
<i>P</i> ₁ 值	< 0.001	0.587	< 0.001	1.000	1.000
<i>Z</i> ₂ 值	-80.873	41.123	-106.098	-67.536	67.725
<i>P</i> ₂ 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>Z</i> ₃ 值	-36.343	60.019	-54.593	2.420	-33.877
<i>P</i> ₃ 值	0.001	< 0.001	< 0.001	1.000	0.002
<i>Z</i> ₄ 值	-2.954	-17.357	42.868	65.196	-58.720
<i>P</i> ₄ 值	1.000	1.000	0.019	< 0.001	< 0.001
<i>Z</i> ₅ 值	-47.484	-36.254	-8.637	-4.760	42.883
<i>P</i> ₅ 值	0.007	0.068	1.000	1.000	0.019
<i>Z</i> ₆ 值	-44.530	-18.896	-51.505	-69.956	101.603
<i>P</i> ₆ 值	< 0.001	0.280	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: *Z*₁、*P*₁为LF组和HC组比较, *Z*₂、*P*₂为CHB组和HC组比较, *Z*₃、*P*₃为ASC组和HC组比较, *Z*₄、*P*₄为LF组和CHB组比较, *Z*₅、*P*₅为LF组和ASC组比较, *Z*₆、*P*₆为CHB组和ASC组比较; 与HC组比较, ^a*P* < 0.05, 与LF组比较, ^b*P* < 0.05; 与CHB组比较, ^c*P* < 0.05。

3 讨论

circRNA是近年来在组织和细胞中被广泛研究的具有特异性表达模式的共价闭合RNA, 普遍存在于真核生物中^[15,16]。与线状RNA即传统mRNA相比, circRNA更具稳定性, 提示其在基因研究方面更具价值^[17,18]。研究表明, 部分circRNA具有能与病毒miRNA结合的大量位点, circRNA通过发挥miRNA海绵作用, 抑制miRNA的功能^[19,20]。HBV作为一种病毒, 这种宿主与病毒间RNA的调控机制可能也在其相关病理状态中发挥作用。目前关于HBV感染的发病机制尚未完全阐明, 而*DNAJC6*、*GSE1*、*HIPK3*、*MBOAT2*、*UBXN7*线状、circRNA在外周血中表达丰富, 具有成为HBV相关肝病生物标记物的潜能, 因此, 探究上述基因在HBV感染者中的表达差异及环线比变化, 对于阐明CHB发病机制以及疾病的早期诊断、治疗疗效判断具有重要意义。

HBV感染是目前我国肝癌的主要原因^[21,22], *DNAJC6*、*GSE1*、*HIPK3*、*MBOAT2*、*UBXN7*线状、circRNA在功能上几乎都与癌症相关, 因此也可能在HBV感染相关肝病的发生发展中发挥调控作用。研究证实, *DNAJC6*在人体内过度表达会促进肝癌细胞的增殖、侵袭和生长^[23]; *GSE1*可能在乳腺癌中发挥新型致癌基因的作用, 并由*miR-489-5p*

来发挥调节功能^[24]; *HIPK3*在非小细胞肺癌组织中的低表达与根治性切除术后不良的存活率显著相关, 可能被用作非小细胞肺癌患者生存预后的有价值的生物标志物^[25]; *circMBOAT2*在大肠癌细胞中具有海绵机制, 可吸收下游miRNA并进一步调节相应靶基因, 可能是大肠癌的新型潜在生物标志物^[26]。本研究表明, 与健康对照组相比, *Lin-DNAJC6*、*Lin-HIPK3*、*Lin-UBXN7*、*Circ-GSE1*、*Circ-UBXN7*在HBV携带者中表达水平升高, *Lin-DNAJC6*、*Lin-HIPK3*、*Lin-MBOAT2*、*Circ-DNAJC6*、*Circ-GSE1*、*Circ-MBOAT2*、*Circ-UBXN7*在CHB患者中表达水平升高, *Lin-DNAJC6*、*Lin-HIPK3*、*Circ-GSE1*在HBV相关肝衰竭组表达水平升高, 提示不同阶段HBV感染者间存在大量差异表达的线状、circRNA, 而这些差异表达的RNA在HBV感染相关肝病中的作用机制有待进一步探究。

circRNA的相对表达水平和环线比对于评估circRNA的表达都具有一定价值, 且对人类疾病有着不同的临床意义^[27]。研究表明, 无论是circRNA还是其同源线状RNA在正常组织中比肿瘤组织的表达升高或降低, 环线比都与细胞增殖呈负相关^[28]。有研究表明circRNA的产生不依赖于其同源线状RNA转录变化, 可能与其执行的某种细胞功

能有关^[29]。许多circRNA以组织和阶段特异性的方式表达,因此circRNA失调可能反映了疾病的动态进展^[30]。本研究表明,同健康对照组相比,CHB患者、HBV携带者、HBV相关肝衰竭患者外周血白细胞中的*DNAJC6*、*GSE1*、*HIPK3*、*MBOAT2*环线比存在不同程度的改变,提示这些环状和线状RNA可能在HBV感染相关肝病中具有不同的作用。然而本研究样本量偏小,存在一定局限性,有待于扩大样本量更为深入地研究circRNA与其同源线状RNA间的联系。

综上,*DNAJC6*、*GSE1*、*HIPK3*、*MBOAT2*、*UBXN7*线状、环状RNA在HBV感染相关肝病患者外周血中差异表达,提示circRNA可能与HBV感染相关肝病的进展有关,为进一步探究HBV相关肝病的发生发展提供了实验依据,为未来circRNA应用于HBV感染相关肝病的临床诊断和靶向治疗提供了理论参考。

参考文献

- [1] 汪增秀, 吴卫锋. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中miR-155和细胞因子信号转导抑制分子1相对表达量与肝功能损伤程度的相关性[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2019,11(3):14-20.
- [2] OTT J J, STEVENS G A, GROEGER J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. Vaccine,2012,30(12):2212-2219.
- [3] 徐伍洪, 郑捷, 王勇. 中药联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎39例[J]. 中国中医药科技,2020,27(3):454-455.
- [4] AKTAŞ T, AVŞAR İLİK İ, MATICZKA D, et al. DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome[J]. Nature,2017,544(7648):115-119.
- [5] ZENG N, WANG T, CHEN M, et al. Cigarette smoke extract alters genome-wide profiles of circular RNAs and mRNAs in primary human small airway epithelial cells[J]. J Cell Mol Med,2019,23(8):5532-5541.
- [6] ZHENG Q, BAO C, GUO W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. Nat Commun,2016,7:11215.
- [7] 杜红飞, 庞雪利, 阳燕, 等. 乙型肝炎肝硬化早期患者外周血环状RNA差异表达谱的研究[J]. 成都医学院学报,2020,15(3):314-319.
- [8] QIN M, LIU G, HUO X, et al. Hsa_circ_0001649: a circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark,2016,16(1):161-169.
- [9] WANG W, DONG R, GUO Y, et al. CircMTO1 inhibits liver fibrosis via regulation of miR-17-5p and Smad7[J]. J Cell Mol Med,2019,23(8):5486-5496.
- [10] 姚建宁, 张学秀, 张延斌, 等. 环状RNA-UBXN7促进肝癌细胞增殖和迁移并抑制其凋亡[J]. 中华肝脏病杂志,2020,28(5):421-427.
- [11] CHEN G, SHI Y, LIU M, et al. circHIPK3 regulates cell proliferation and migration by sponging miR-124 and regulating AQP3 expression in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Dis,2018,9(2):175.
- [12] MEMCZAK S, PAPAVALASILEIOU P, PETERS O, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood[J]. PLoS One,2015,10(10):e141214.
- [13] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2015,7(3):1-18.
- [14] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012年版)[J]. 中华临床感染病杂志,2012,5(6):321-327.
- [15] 颜兴艳, 向天新, 张守华. 环状RNA研究进展及其在HBV相关肝病中的作用[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2016,8(4):6-10.
- [16] 刘晶晶, 周冬冬, 张瑾. 环状RNA在乳腺癌中的研究进展[J]. 天津医药,2020,48(4):333-337.
- [17] 曾奇虎, 翁静飞, 李小林, 等. 环状RNA的研究进展[J]. 海南医学,2019,30(18):2427-2430.
- [18] SONNENSCHNEIN K, WILCZEK A L, DE GONZALO-CALVO D, et al. Serum circular RNAs act as blood-based biomarkers for hypertrophic obstructive cardiomyopathy[J]. Sci Rep,2019,9(1):20350.
- [19] GHOSAL S, DAS S, SEN R, et al. HumanViCe: host ceRNA network in virus infected cells in human[J]. Front Genet,2014,5:249.
- [20] CHEN L, NAN A, ZHANG N, et al. Circular RNA 100146 functions as an oncogene through direct binding to miR-361-3p and miR-615-5p in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cancer,2019,18(1):13.
- [21] 笪丽娜, 孙峰, 张永娟, 等. miR-375、miR-146a及miR-21在慢性乙型肝炎、肝硬化及肝癌患者中表达及其对肝癌的诊断意义[J]. 中国老年学杂志,2020,40(14):2972-2975.
- [22] 陈文军, 王俊娟, 祁建妮, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染患者发生肝细胞肝癌风险预测的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志,2019,46(9):558-561.
- [23] YANG T, LI X N, LI X G, et al. DNAJC6 promotes hepatocellular carcinoma progression through induction of epithelial-mesenchymal transition[J]. Biochem Biophys Res Commun,2014,455(3-4):298-304.
- [24] CHAI P, TIAN J, ZHAO D, et al. GSE1 negative regulation by miR-489-5p promotes breast cancer cell proliferation and invasion[J]. Biochem Biophys Res Commun,2016,471(1):123-128.
- [25] LIU Y, QIAN L, YANG J, et al. The expression level and prognostic value of HIPK3 among non-small-cell lung cancer patients in China[J]. Onco Targets Ther,2018,11:7459-7469.
- [26] TANG X, SUN G, HE Q, et al. Circular noncoding RNA circMBOAT2 is a novel tumor marker and regulates proliferation/migration by sponging miR-519d-3p in colorectal cancer[J]. Cell Death Dis,2020,11(8):625.
- [27] NAKASHIMA S, JINNIN M, IDE M, et al. A potential significance of circ_0024169 down regulation in angiosarcoma tissue[J]. Intractable Rare Dis Res,2019,8(2):129-133.
- [28] BACHMAYR-HEYDA A, REINER A T, AUER K, et al. Correlation of circular RNA abundance with proliferation--exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues[J]. Sci Rep,2015,5:8057.
- [29] CONN S J, PILLMAN K A, TOUBIA J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. Cell,2015,160(6):1125-1134.
- [30] BEI Y, YANG T, WANG L, et al. Circular RNAs as potential theranostics in the cardiovascular system[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2018,13:407-418.

收稿日期: 2020-10-09

钱舒然, 谭婧文, 龚明, 等. 5种致癌相关基因在乙型肝炎病毒感染进程中的差异表达[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023,15(2): 7-13.