

miR-122 在糖尿病合并慢性乙型肝炎患者中的表达及临床意义研究*

朱杰华¹, 王江林², 丰智雪³, 陈安林¹, 黄 健¹, 杜文胜^{1△}

1. 遵义医科大学附属医院医学检验科, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省仁怀市中医院检验科, 贵州仁怀 564500; 3. 遵义医科大学医学与科技学院, 贵州遵义 563099

摘要:目的 探讨微小 RNA-122(miR-122)在糖尿病(DM)合并慢性乙型肝炎患者中的表达水平及临床意义。方法 选取于遵义医科大学附属医院就诊的 125 例患者为研究对象,其中 DM 患者(DM 组)50 例,慢性乙型肝炎患者(HBV 组)50 例,DM 合并慢性乙型肝炎患者(DM 合并 HBV 组)25 例,同时选取健康体检者 20 例为对照组。提取所有受试者的单个核细胞总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 检测各组 miR-122 水平,研究 miR-122 与各生化指标的相关性。结果 DM 合并 HBV 组 miR-122 水平高于 HBV 组、DM 组和对对照组($P < 0.05$)。HBV 组乙型肝炎病毒 DNA 定量(HBV-DNA)水平高于 DM 合并 HBV 组($P < 0.05$);HBV 组丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶水平高于对照组、DM 组和 DM 合并 HBV 组($P < 0.05$)。DM 合并 HBV 组 miR-122 水平与 HBV-DNA、血糖(GLU)水平均呈正相关($r = 0.238, 0.231, P < 0.05$)。结论 miR-122 水平在 DM 合并慢性乙型肝炎患者中明显升高,并与 HBV-DNA、GLU 水平存在相关性,考虑其可能参与了疾病的发生、发展过程。

关键词:微小 RNA-122; 糖尿病; 慢性乙型肝炎

中图法分类号:R446.1

文章编号:1672-9455(2020)05-0582-04

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Expression and clinical significance of miR-122 in patients with diabetes mellitus and chronic hepatitis B*

ZHU Jiehua¹, WANG Jianglin², FENG Zhixue³, CHEN Anlin¹, HUANG Jian¹, DU Wensheng^{1△}

1. Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Renhuai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Renhuai, Guizhou 564500, China; 3. College of Medicine and Technology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563099, China

Abstract: Objective To investigate the expression level and clinical significance of microRNA-122 (miR-122) in patients with diabetes mellitus (DM) and chronic hepatitis B. **Methods** A total of 125 patients in the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University were selected as the research objects, including 50 DM patients (DM group), 50 chronic hepatitis B patients (HBV group), 25 DM combined with chronic hepatitis B patients (DM combined with HBV group), and 20 healthy people were selected as the control group. The total RNA of mononuclear cells was extracted from all subjects, and the level of miR-122 in each group was detected by PCR. The correlation between miR-122 and biochemical indexes was studied. **Results** The level of miR-122 in DM combined with HBV group was higher than that in HBV group, DM group and control group ($P < 0.05$). The level of HBV-DNA in HBV group was higher than that in DM combined with HBV group ($P < 0.05$); the level of ALT and AST in HBV group was higher than that in control group, DM group and DM combined with HBV group ($P < 0.05$). The level of miR-122 was positively correlated with the level of HBV-DNA and serum glucose (GLU) ($r = 0.238, 0.231, P < 0.05$). **Conclusion** The level of miR-122 is significantly increased in patients with DM and chronic hepatitis B, and it is correlated with the levels of HBV-DNA and GLU. MiR-122 may be considered participating in the development of the disease.

Key words: microRNA-122; diabetes mellitus; chronic hepatitis B

乙型肝炎是目前最常见的慢性传染病,有着相当高的发病率和病死率。据世界卫生组织报道,我国慢

性乙型肝炎病毒(HBV)感染者约 9 300 万,其中慢性乙型肝炎患者约 2 000 万,每年约有 100 万人死于

* 基金项目:贵州省科技合作计划(黔科合 LH 字[2015]7478 号);遵义医学院附属医院基金项目(院字[2014]47 号)。

作者简介:朱杰华,女,主管技师,主要从事临床免疫检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail:408942381@qq.com。

HBV 导致的肝衰竭、肝硬化及肝癌。糖尿病(DM)是最常见的慢性代谢性疾病,目前全世界的 DM 患者已达 2.46 亿^[1],而由 DM 引起的心脑血管、视网膜、肾脏、神经损伤等可加重患者的病情,严重影响患者的治疗和预后^[2-4]。微小 RNA-122(miR-122)是微小 RNA(microRNA)家族的一员,参与机体的新陈代谢,免疫功能,细胞增殖、凋亡,组织生长及分化等过程^[5]。研究认为 DM 可以通过影响肝脏对脂肪的代谢,间接影响肝细胞内 miR-122 的表达,进而影响肝细胞的生物学功能^[6]。在肝细胞中,miR-122 不仅对肝细胞的生长周期、脂肪代谢等肝脏生理功能具有重要调节作用,而且与病毒性肝炎关系密切^[7]。此外,临床发现 DM 会增加 HBV 感染的风险,但 miR-122 在 DM 合并 HBV 感染中的具体作用和可能机制目前尚不明确。本文通过对 DM 患者、慢性乙型肝炎患者、DM 合并慢性乙型肝炎患者外周血标本 miR-122 水平的分析,探讨了 miR-122 在不同患者中的差异性表达情况及其与临床生化指标间的关系,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 7 月到 2017 年 8 月于遵义医科大学附属医院内分泌科和感染科住院治疗的患者 125 例为研究对象,其中临床明确诊断的 DM 患者(DM 组)50 例,男 27 例、女 23 例,年龄 11~78 岁、平均(34.5±10.40)岁;慢性乙型肝炎患者(HBV 组)50 例,其中男 30 例、女 20 例,年龄 14~58 岁、平均(31.58±10.03)岁;DM 合并慢性乙型肝炎患者(DM 合并 HBV 组)25 例,其中男 11 例、女 14 例,年龄 17~73 岁、平均(34.58±11.31)岁。随机挑选同期于该院健康体检者 20 例为对照组,其中男 14 例、女 6 例,年龄 21~38 岁、平均(28±8.5)岁。纳入标准:DM 组患者均符合 DM 诊断标准;HBV 组患者均符合慢性乙型肝炎诊断标准;DM 合并 HBV 组患者均同时符合 DM 及慢性乙型肝炎诊断标准。排除标准:合并其他慢性代谢性疾病、脂肪肝、药物性肝炎、自身免疫性疾病、感染性疾病和遗传性疾病的患者;合并严重心脑血管等重要脏器功能障碍的患者;合并精神障碍的患者。4 组研究对象性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有受试者均签署知情同意书,本研究经医院伦理委员会审核批准。

1.2 仪器与试剂 奥林巴斯 AU5400 全自动生化仪、雅培 i2000 化学发光检测仪、全自动糖化血红蛋白检测仪、实时荧光定量 PCR 仪、生物安全柜、低温高速离心机等。试剂包括 RNA 提取试剂盒、DNA 提取试剂盒及反转录试剂盒等。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取 采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,并用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次收集沉淀;RNA 的提取严格按试剂盒说明书进行,取 3 μ L RNA 用 1.2%琼脂凝胶电泳检测,余 RNA 于-20 $^{\circ}$ C

保存待用。

1.3.2 反转录 按试剂盒说明书进行反转录体系配制,2 \times 反转录缓冲液 10 μ L,反转录引物 1.2 μ L, RNA 2 μ L,MLLV 反转录酶 0.2 μ L,加入 DEPC 至总体积为 20 μ L,反应条件为 42 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.3 实时荧光定量检测 以 U6 作为内参基因,采用实时荧光定量 PCR 技术检测 miR-122 的表达水平,其反应体系为 2 \times 定量 PCR Master Mix 10 μ L,上游引物 0.08 μ L,下游引物 0.08 μ L,cDNA 模板 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.4 μ L,ddH₂O 加至 20 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 12 s,62 $^{\circ}$ C 40 min,40 个循环。miR-122 的表达水平计算:用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 代表 miR-122 的表达水平,其中 Ct 值是指从基线到指数增长的拐点所对应的循环次数。

1.3.4 生化指标检测 所有研究对象抽取空腹静脉全血 3 mL,静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,待测。采用草酰乙酸脱氢酶法检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平;采用己糖激酶法检测血糖(GLU)水平;采用实时荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA 水平。

1.4 观察指标 比较各组 miR-122 的表达水平;比较各组生化指标(ALT、AST、GLU)及 HBV-DNA 水平;进一步行相关性分析明确各组 miR-122 表达水平与 ALT、AST、GLU、HBV-DNA 水平的相关性。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism7.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用线性回归分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 miR-122 表达水平比较 以 U6 作为内参,分析各组的 miR-122 表达水平,结果显示:对照组 miR-122 表达水平低于 HBV 组、DM 组和 DM 合并 HBV 组,差异均有统计学意义($P<0.05$);DM 合并 HBV 组 miR-122 表达水平高于 HBV 组、DM 组和对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组 miR-122 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | Ct _{U6} | Ct _{miR-122} | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|-------------|----------|------------------|-----------------------|-------------------------|
| 对照组 | 20 | 14.37±0.61 | 28.79±4.07 | 1.00±0.01 |
| HBV 组 | 50 | 16.00±2.71 | 27.87±2.29 | 4.89±1.16* [#] |
| DM 组 | 50 | 15.39±2.16 | 23.76±2.99 | 5.58±1.81* [#] |
| DM 合并 HBV 组 | 25 | 13.97±1.20 | 23.83±1.39 | 18.38±1.91 [#] |

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 DM 合并 HBV 组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2 各组生化指标水平比较 HBV 组 HBV-DNA 水平高于 DM 合并 HBV 组,差异有统计学意义($P<0.05$);DM 组和 DM 合并 HBV 组 GLU 水平高于对照组和 HBV 组,差异有统计学意义($P<0.05$);HBV 组 ALT 和 AST 水平高于对照组、DM 组和 DM 合并

HBV 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组生化指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | HBV-DNA(IU/mL) | GLU(mmol/L) | ALT(U/L) | AST(U/L) |
|-------------|----|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 对照组 | 20 | $< 1.0 \times 10^2$ | 5.07 ± 0.54 | 24.65 ± 6.71 | 20.35 ± 6.64 |
| HBV 组 | 50 | 340.93 ± 29.60 | 5.01 ± 0.74 | $72.00 \pm 27.47^{* \#}$ | $60.75 \pm 21.15^{* \#}$ |
| DM 组 | 50 | $< 1.0 \times 10^2$ | $8.87 \pm 3.32^{* \Delta}$ | 22.22 ± 8.12 | 24.56 ± 5.83 |
| DM 合并 HBV 组 | 25 | $6.24 \pm 2.33^{\Delta}$ | $9.06 \pm 4.44^{* \Delta}$ | $32.00 \pm 12.16^{* \Delta \#}$ | $29.25 \pm 13.93^{\Delta * \#}$ |

注: 与对照组比较, $^* P < 0.05$; 与 HBV 组比较, $^{\Delta} P < 0.05$; 与 DM 组比较, $^{\#} P < 0.05$ 。

2.3 各组 miR-122 水平与 ALT、AST、GLU、HBV-DNA 水平的相关性分析 对照组 miR-122 水平与 GLU、AST、ALT、HBV-DNA 水平均无显著相关性 ($P > 0.05$); HBV 组 miR-122 水平与 AST、ALT 水平呈正相关 ($r = 0.287, 0.292, P < 0.05$); DM 组 miR-122 水平与 GLU 水平呈正相关 ($r = 0.350, P < 0.05$); DM 合并 HBV 组 miR-122 水平与 HBV-DNA、GLU 水平呈正相关 ($r = 0.238, 0.231, P < 0.05$)。

3 讨论

DM 是最常见的代谢性疾病之一, 其发病受多种因素的影响, 有研究认为 microRNA 可能参与了 DM 的发病, 同时还与 DM 相关并发症有关。邓仁生等^[8]发现 DM 患者 miR-126、miR-28-3p 水平显著升高, 并可能通过参与调控胰岛素及其受体信号通路和血管生成等导致 DM 的发生。周燕等^[9]则发现 2 型 DM 患者中 miR-217 水平升高, 并与沉默调节因子和缺氧诱导因子存在相关性, 可促进 DM 肾损害的发展。另外, 也有研究发现 miR-29 可通过调节靶基因 PKR 结合蛋白 X 的表达, 参与 DM 视网膜病变的发生^[10]。miR-135b 可通过调控 Smad5 基因促进系膜细胞增殖及肾脏纤维化^[11]。由此可见, microRNA 在 DM 的发生、发展过程中发挥着重要作用。既往关于 miR-122 与 DM 的相关性研究发现, miR-122 与血脂水平具有相关性, 其可通过下调胆固醇 7-羟化酶 α 的基因表达, 抑制胆固醇向胆汁酸转化, 最终使血浆胆固醇水平升高^[12], 此外, 阻断 miR-122 表达可下调几种与三酰甘油合成相关基因的表达, 从而减少肝脏三酰甘油的合成, 降低血浆中三酰甘油水平^[13]。

在肝脏中, miR-122 与肝细胞的生长周期、脂肪代谢等生理过程有关, 同时还参与病毒性肝炎的发病^[7]。一方面, HBV 可以利用宿主细胞内的 microRNA 来改变宿主细胞环境, 使其有利于自身存活; 另一方面, HBV 可以编码 microRNA 来协助自身的生存和增殖。有研究发现, miR-122 在 HBV 感染者中表达水平升高, 并参与肝纤维化的发生^[14]。而体外细胞实验发现 miR-122 的过量表达可抑制 HBV 的复制^[15]。然而, 有研究也发现, 虽然慢性 HBV 感染引起肝脏损伤时会检测到 miR-122 水平的升高, 但血浆中 miR-122 水平与 HBeAg、HBV-DNA 水平均无明显相关性^[16]。临床工作发现 DM 患者 HBV 的感染

风险升高^[17-18], 同时, DM 还会引起脂肪代谢异常, 导致肝细胞脂质沉积、脂肪病变, 进一步加重肝损伤^[19]。SCHILLIE 等^[17]的研究结果表明, DM 患者的 HBV 感染率是非 DM 人群的 1.6 倍; REILLY 等^[18]调查发现, 11.0% 的急性 HBV 感染患者同时患有 DM。miR-122 既与 HBV 感染有关又参与 DM 发病, 但其在 DM 合并慢性 HBV 感染中的作用及其在临床诊断、治疗中的意义目前尚不明确。

为了进一步探讨 miR-122 在 DM 合并慢性 HBV 感染中的作用及临床价值, 本研究对 DM 患者、慢性乙型肝炎患者、DM 合并慢性乙型肝炎患者外周血标本中 miR-122 的表达水平进行分析发现, miR-122 在 HBV 组、DM 组、DM 合并 HBV 组的表达水平均高于对照组。且 DM 合并 HBV 组的 miR-122 水平显著高于 HBV 组和 DM 组。提示 DM 患者存在 miR-122 的水平升高, 当合并 HBV 感染时, 其 miR-122 水平升高更为显著。进一步对 DM 合并 HBV 组中 miR-122 水平与生化指标进行相关性分析发现, DM 合并 HBV 组患者的 miR-122 水平与 GLU、HBV-DNA 水平呈正相关, 推测 miR-122 可能参与了 DM 合并慢性乙型肝炎患者疾病的发生与发展过程。此外, 4 组间生化指标比较发现, HBV 组 HBV-DNA 水平显著高于 DM 合并 HBV 组, 考虑与 miR-122 在 DM 合并慢性乙型肝炎患者中过量表达对 HBV 具有负向调控作用相关^[15]。但相关性分析发现, HBV 组的 HBV-DNA 水平与 miR-122 水平无明显相关性, 考虑可能与纳入的病例数较少, 数据存在偏倚有关。

综上所述, miR-122 的表达水平在 DM 合并慢性乙型肝炎患者中明显升高, 其可能参与了疾病的发生、发展过程, 但具体的分子机制目前尚不明确, 有待进一步研究。

参考文献

- BRUNETTI A, CHIEFARI E, FOTI D. Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus[J]. World J Diabetes, 2014, 5(2): 128-140.
- TAN M C, NG O C, WONG T W, et al. The association of cardiovascular disease with impaired health-related quality of life among patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Singapore Med J, 2014, 55(4): 209-216.
- DUNKLER D, DEGHAN M, TEO K K, et al. Diet and

kidney disease in high-risk individuals with type 2 diabetes mellitus[J]. JAMA Intern Med, 2013, 173(18):1682-1692.

[4] AMIRI A A, MABOUDI A, BAHAR A, et al. Relationship between type 2 diabetic retinopathy and periodontal disease in Iranian adults[J]. N Am J Med Sci, 2014, 6(3): 139-144.

[5] NIE Y, CAO J, ZHOU Y, et al. The effect of miRNA-122 in regulating fat deposition in a cell line model[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(5):839-846.

[6] BOESCH-SAADATMANDI C, WAGNER A E, WOLFFRAM S, et al. Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver in vivo-role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b[J]. Pharmacol Res, 2012, 65(5):523-530.

[7] LUNA J M, SCHEEL T K, DANINO T, et al. Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122[J]. Cell, 2015, 60(6):1099-1110.

[8] 邓仁生, 朱小琴, 刘长召, 等. 血浆循环 miRNA-126、miRNA-28-3p 的表达与糖尿病的关系研究[J]. 局解手术学杂志, 2017, 26(6):400-405.

[9] 周燕, 张慧, 金旭波. 2 型糖尿病不同尿白蛋白排泄率患者血清 MicroRNA-217 水平与 Sirt1 及 HIF-1 α 的相关性分析[J]. 全科医学临床与教育, 2017, 15(3):279-281.

[10] 孙琳. miRNA-29 在糖尿病视网膜病变患者血清中的表达分析研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(2):162-163.

[11] 何凤, 周姗姗, 关昌杰, 等. 微小 RNA-135b 调控 Smad5 在糖尿病肾病发病中的作用研究[J]. 新医学, 2017, 48(5):317-322.

[12] XU H, HE J, XIAO Z, et al. Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development[J]. Hepatology, 2010, 52(4):1431-1442.

[13] GIRARD M, JACQUEMIN E, MUNNICH A, et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver[J]. J Hepatol, 2008, 48(4):648-656.

[14] BIANQIAO C, QI Z, WEIGUO L, et al. MicroRNA-122 inhibits epithelial-mesenchymal transition of hepatic stellate cells induced by the TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1):284-290.

[15] FATEMEH M, SHASHI B, KAREN K, et al. Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS[J]. Sci Rep, 2015, 5:9991.

[16] 李祥云, 陈兆军, 潘峰, 等. microRNA-122 在不同时期慢性乙肝患者外周血浆中表达变化的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4):874-876.

[17] SCHILLIE S, XING J, MURPHY T, et al. Prevalence of hepatitis B virus infection among persons with diagnosed diabetes mellitus in the United States, 1999-2010[J]. J Viral Hepat, 2012, 19(9):674-676.

[18] REILLY M L, SCHILLIE S F, SMITH E, et al. Increased risk of acute hepatitis B among adults with diagnosed diabetes mellitus[J]. J Diabetes Sci Technol, 2012, 6(4): 858-866.

[19] 董建平, 田国保. 糖尿病合并慢性乙型肝炎的治疗进展[J]. 中国临床医生, 2012, 40(4):21-23.

(收稿日期:2019-07-15 修回日期:2019-11-02)

(上接第 581 页)

汉藏语系的汉族和其他民族之间群体间的 AMOVA 分析, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。需要指出的是, 在对各地人群 Y-STR 基因座的等位基因频率资料收集的过程中发现, 在法医学发展比较好及其邻近地区的 Y-STR 基因座资料比较全面, 部分地区、部分民族的 Y-STR 基因座资料比较欠缺, 并不能明显反映出遗传差异。因此, 在法医发展相对落后及部分民族群体中的遗传学资料比较匮乏的地区, 应该在调查研究中投入更大的精力, 建立本地区、本民族的基因分布频率资料, 为法医学应用和民族的起源、进化、迁徙研究提供相对科学的基础数据^[3-6]。

综上所述, 河南回族、贵州仡佬族和贵州苗族人群的 27 个 Y-STR 基因座的基因多态性普遍较高, 适用于法医学个体识别和亲权关系中, 为本地区构建该民族 Y-STR 数据库奠定了基础, 对进一步的研究具有参考意义; 本研究应用多种统计分析方法, 对河南回族、贵州仡佬族、贵州苗族人群与其他 13 个群体的遗传关系进行了分析, 所得结果与各民族起源和迁徙史基本一致, 进一步证实了这些民族的遗传关系, 为

今后研究这些民族的起源、进化和迁徙史等人类遗传学研究提供了基础性数据。

参考文献

[1] BUTLER J. Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology[M]. Waltham: Academic Press, 2011: 203-210.

[2] COBLE M D, HILL C R, BUTLER J M. Haplotype data for 23 Y-chromosome markers in four U. S. population groups[J]. Forensic Sci Int Genet, 2013, 7(3):e66-e68.

[3] 李生斌. 中华民族遗传结构与亲缘关系[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2016:161-200.

[4] 李辉, 金力. Y 染色体与东亚族群演化[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2015:110-120.

[5] 侯一平. 法医物证学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016:89-94.

[6] JOHN M, BUTLER. 法医 DNA 分型专论: 证据解释[M]. 侯一平, 李成涛, 译. 北京: 科学出版社, 2018:267-270.

(收稿日期:2019-06-10 修回日期:2019-09-29)