

- [4] HAWORT-KAWECKA A M, KAWECKI G P, DULA-WA J. Hyperammonemia type II as an example of urea cycle elisoder[J]. Wiad Lek, 2006, 59(7/8): 512-515.
- [5] 江利冰, 李瑞杰, 张斌, 等. 2016 年脓毒症与脓毒性休克处理国际指南[J]. 中华急诊医学杂志, 2017, 26(3): 263-266.
- [6] IWASA M, SUGIMOTO R, MIFUJI-MOROKA R, et al. Factors contributing to the development of overt encephalopathy in liver cirrhosis patients[J]. Matab Brain Dis, 2016, 31(5): 1151-1156.
- [7] JALAN R, de CHIARA F, BALASUBRAMANIYAN V, et al. Ammonia produces pathological changes in human hepatic stellate cells and is a target for therapy of portal hypertension[J]. J Hepatol, 2016, 64(4): 823-833.
- [8] LATTANZI B, D'AMBROSIO D, MERLI M. Hepatic en-
- cephalopathy and sarcopeny: two faces of the same metabolic alteration[J]. J Clin Exp Hepatol, 2019, 9(1): 125-130.
- [9] THOMSEN K L, MACNAUGHTAN J, TRITTO G, et al. Clinical and pathophysiological characteristics of cirrhotic patients with grade 1 and minimal hepatic encephalopathy[J]. PLoS One, 2016, 11: e0146076.
- [10] BAKER L, LANZ B, ANDREOLA F, et al. New technologies-new insights into the pathogenesis of hepatic encephalopathy[J]. Metab Brain Dis, 2016, 31(6): 1259-1267.
- [11] 周涛, 马润, 王玉明, 等. 25 个常规生化检验项目的参考区间验证[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(9): 1253-1255.

(收稿日期: 2020-02-26 修回日期: 2020-10-15)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2021. 01. 025

青少年肥胖非酒精性脂肪肝患者血清外泌体源性 miRNA 表达谱的初步研究*

章建伟, 吴若雅, 潘海滔

浙江省绍兴市妇幼保健院儿保科, 浙江绍兴 312000

摘要:目的 分析非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 与单纯肥胖对照者血清外泌体微小 RNA (miRNA) 表达谱的差异, 为筛选外泌体源性 miRNA 作为 NAFLD 早期诊断标记物提供依据。方法 选择 5 例 NAFLD 患者 (NAFLD 组) 和 5 例单纯肥胖患者 (对照组), 采集外周血血清, 使用高通量测序方法测定外泌体源性 miRNA 表达谱, 并通过实时荧光定量 PCR 验证部分差异性表达的 miRNA, 预测靶基因及功能分析。结果 NAFLD 组与对照组相比差异表达的外泌体源性 miRNA 共 30 种 ($P < 0.05$), 当比值 > 2 且 $P < 0.05$ 的差异性 miRNA 有 9 种, 其中 5 种表达上调 (miR-122-5p, miR-3591-3p, miR-335-5p, let-7g-3p 和 miR-27a-5p), 4 种表达下调 (miR-6753-3p, miR-129-2-3p, miR-6760-5p, miR-6516); 对 miR-122-5p, miR-335-5p, miR-27a-5p 进行实时荧光定量 PCR, 结果与测序结果一致。差异表达 miRNA 的功能分析结果提示涉及葡萄糖稳态、脂质代谢、肝脏发育等。结论 NAFLD 组血清外泌体源性 miRNA 表达谱与对照组有明显差异, miR-122-5p, miR-335-5p, miR-27a-5p 可能参与了 NAFLD 的发病机制, 可以作为 NAFLD 早期诊断的标记物。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 外泌体; microRNA; 高通量测序

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)01-0087-04

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 为除饮酒和其他病理因素外引起过多脂肪在肝脏堆积导致的慢性疾病, 是常见的慢性肝病^[1], 容易发生在肥胖患者中, 可增加心血管病的发生率^[2]。据报道, 65%~85% 的肥胖患者易发生 NAFLD^[3], 其机制尚未完全了解。近年来, 研究发现外泌体微小 RNA (miRNA) 在 NAFLD 发病机制中发挥重要作用^[4]。外泌体是一种运载 miRNAs 等重要分子的微小囊泡, 发挥细胞间联络作用。肝脏细胞, 尤其是肝细胞和胆管上皮细胞, 既可释放外泌体, 又是肝脏内源性外泌体和其他器官细胞来源的外泌体作用的靶细胞。miRNAs 为非编码单链

RNA 分子, 参与脂肪细胞分化、肝脏脂肪酸和胆固醇代谢、胰岛素抵抗、线粒体损伤等过程的调节。有研究发现小鼠脂肪组织巨噬细胞的外泌体 miRNAs 可以增加胰岛素抵抗^[5]。另一项研究也表明外泌体 miRNAs 可作为病毒性肝炎、酒精性脂肪肝、NAFLD 和肝细胞癌的潜在生物标记物, 外泌体 miRNAs 或蛋白的表达随着 NAFLD 的进展改变^[6]。因此监测外泌体 miRNAs 对探索 NAFLD 的发病机制具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 经绍兴市妇幼保健院伦理委员会批

* 基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2018KY843)。

本文引用格式: 章建伟, 吴若雅, 潘海滔. 青少年肥胖非酒精性脂肪肝患者血清外泌体源性 miRNA 表达谱的初步研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 87-90.

准,收集 2019 年 7—12 月来本院儿童内分泌科就诊并收住入院的 NAFLD 患者 5 例(男 3 例,女 2 例)作为 NAFLD 组,根据性别、年龄配对 5 例单纯肥胖患者作为对照组。本研究获得受试者家属知情同意并签署知情同意书。10 例研究对象年龄 10~13 岁。青少年 NAFLD 的诊断标准:参照中华医学会儿科分会内分泌学组于 2018 年发布的专家共识^[7]中彩色超声诊断标准。肥胖判断体质量指数(BMI)标准基于中国儿童的生长发育标准^[8]。

1.2 方法 所有患者均为住院患者,均于上午 7 点采集外周血 5 mL,提取血清。采用外泌体提取试剂盒提取法提取外泌体,试剂盒由 SBI 公司提供。对提取的外泌体使用总 RNA 提取法提取总 RNA,用微量核酸蛋白浓度测定仪(美国 Thermo 公司)测定标本总 RNA 浓度和纯度。miRNA 表达谱测序在每个标本总 RNA 的 3'端和 5'端添加 RNA 接头,PCR 富集 8% PAGE 胶片段分选,根据 Qubit 定量结果,按数据比例混合文库,进行桥式 PCR 扩增,簇生长,在 Illumina 测序平台(美国 Illumina 公司)进行 2×150 bp 测序。计算两组样品间各 miRNA 的差异倍数,把当倍值设定 1.5 倍作为区别两组间差异表达阈值,筛选当倍比值>2.0 且 $P<0.05$ 的差异性 miRNA。测序过程由上海英拜生物科技有限公司完成。实时荧光定量 PCR 对显著差异表达 miRNA 进行验证。通过 TargetScan、miRDB、miRanda 靶基因预测软件,对差异表达 miRNA 进行靶基因预测。应用 DAVID 数据库对预测的靶基因进行 GO 功能富集分析。利用超几何分布方法进行统计分析,计算出最为显著的功能,并以 $P<0.05$ 作为显著富集基因的阈值。

2 结 果

2.1 miRNA 表达谱结果通过高通量测序 成功构建 NAFLD 组和对照组血清外泌体源性 miRNA 表达谱,共筛选出表达差异较高(>1.5 倍)的已知 miRNA 30 种,见表 1。其中 5 种 miRNA(miR-122-5p, miR-3591-3p, miR-335-5p, let-7g-3p 和 miR-27a-5p)较对照组差异表达且显著升高 2.0 倍以上,4 种 miRNA(miR-6753-3p, miR-129-2-3p, miR-6760-5p, miR-6516)较对照组差异表达且显著降低 2.0 倍以上,差

异均有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

2.2 显著差异表达 miRNA 的实时荧光定量 PCR 验证 为验证高通量测序结果的准确性,选取 3 个 miRNA(miR-122-5p、miR-335-5p、miR-27a-5p)在两组标本中进行验证,两组标本中 miRNA 的实时荧光定量 PCR 结果与高通量测序结果一致,见图 1。

2.3 预测的靶基因及其 GO 功能富集分析 预测的差异表达 miRNA 的靶基因的生物功能比较广泛,包括葡萄糖稳态、脂质代谢、肝脏发育。大多数显著富集的 GO 过程集中于调节葡萄糖稳态、脂质代谢、肝脏发育等病理生理功能,见表 3。以 $P<0.05$ 为显著富集基因的阈值。

表 1 30 种差异表达的 miRNA

miRNA	表达类型	差异表达倍数	miRNA	表达类型	差异表达倍数
miR-122-5p	表达上调	2.58	miR-6516	表达下调	2.19
miR-335-5p	表达上调	2.03	miR-6753-3p	表达下调	2.54
miR-744-3p	表达上调	2.06	miR-4685-5p	表达下调	2.62
miR-27a-5p	表达上调	2.16	miR-6760-5p	表达下调	2.65
miR-3591-3p	表达上调	2.58	miR-4756-3p	表达下调	2.71
miR-196a-3p	表达上调	3.63	miR-3937	表达下调	2.72
miR-128-2-5p	表达上调	3.89	miR-4793-5p	表达下调	2.77
miR-6853-5p	表达上调	3.92	miR-2681-3p	表达下调	2.81
miR-4509	表达上调	4.09	miR-6779-3p	表达下调	2.96
let-7g-3p	表达上调	4.86	miR-448	表达下调	3.05
miR-1247-3p	表达下调	1.54	miR-129-2-3p	表达下调	3.56
miR-4701-5p	表达下调	1.57	miR-6778-5p	表达下调	3.67
miR-3936	表达下调	1.59	miR-6764-3p	表达下调	3.77
miR-137	表达下调	2.11	miR-3670	表达下调	4.06
miR-6806-3p	表达下调	2.12	miR-887-5p	表达下调	4.51

表 2 NAFLD 组较对照组显著差异表达的 miRNA

miRNA	表达类型	差异表达倍数	P
miR-122-5p	表达上调	2.58	0.000 1
miR-3591-3p	表达上调	2.58	0.000 1
miR-335-5p	表达上调	2.03	0.000 2
let-7g-3p	表达上调	4.86	0.000 2
miR-27a-5p	表达上调	2.16	0.001 0
miR-6753-3p	表达下调	2.54	0.000 1
miR-129-2-3p	表达下调	3.56	0.000 2
miR-6760-5p	表达下调	2.65	0.000 6
miR-6516	表达下调	2.19	0.006 0

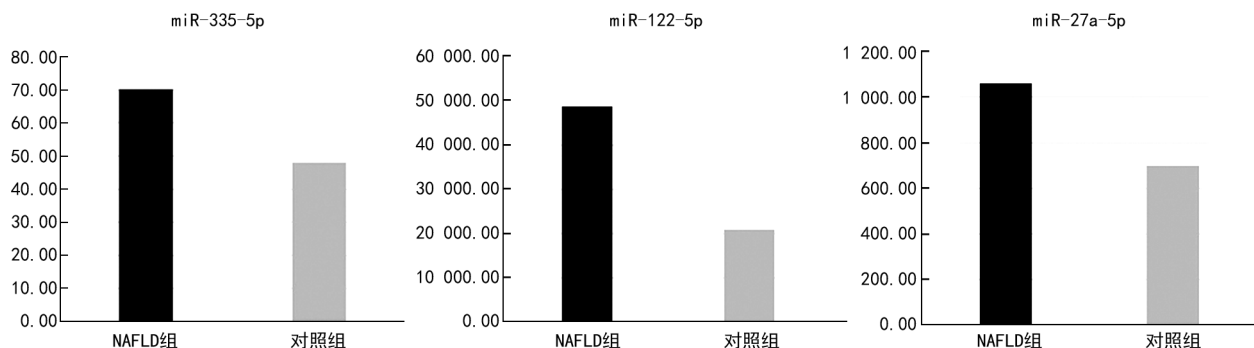


图 1 miR-122-5p、miR-335-5p、miR-27a-5p 在不同组别的表达验证

表 3 差异表达的 miRNA 预测的靶基因 GO 功能富集分析

GO 序号	条目	P
GO:0008286	insulin receptor signaling pathway(胰岛素受体信号通路)	0.000 01
GO:0016055	Wnt signaling pathway(Wnt 信号通路)	0.000 01
GO:0001889	liver development(肝脏发育)	0.000 01
GO:0006184	GTP catabolic process (GTP 分解代谢过程)	0.000 01
GO:0042593	glucose homeostasis(葡萄糖稳态)	0.000 01
GO:0046856	phosphatidylinositol dephosphorylation(磷脂酰肌醇去磷酸化)	0.005
GO:0045719	negative regulation of glycogen biosynthetic process(糖原生物合成过程的负调控)	0.008
GO:0006112	energy reserve metabolic process(能量储备代谢过程)	0.080
GO:0006629	lipid metabolic process(脂质代谢过程)	0.010
GO:0006665	sphingolipid metabolic process(鞘脂代谢过程)	0.010
GO:2000505	regulation of energy homeostasis(能量稳态调节)	0.018
GO:0045444	fat cell differentiation(脂肪细胞分化)	0.019

3 讨 论

青少年 NAFLD 发病率较高,达 3%~10%,成年后并发症较多,如肝硬化、2 型糖尿病、代谢综合征和心血管疾病等。青少年 NAFLD 发生机制尚不明确,“多次打击”学说被大多数学者推荐^[9],包括高胰岛素血症和胰岛素抵抗引起单纯肝脏细胞脂肪变性,游离脂肪酸脂毒性作用、氧化应激、线粒体功能障碍等激活相关炎性细胞因子致肝细胞坏死,引起非酒精性脂肪性肝炎,激活肝星状细胞合成大量细胞外基质进一步发生肝纤维化。miRNAs 作为一种基因表达的调控因子,在肥胖、NAFLD、动脉粥样硬化和糖尿病等代谢疾病的发生、发展中起重要作用,在肝脏疾病中作用更为明显。已有众多研究提示 miRNAs 参与 NAFLD 病理生理的调控^[10-11],主要表现在脂肪细胞分化、肝脏脂肪酸和胆固醇代谢、胰岛素抵抗、线粒体损伤等过程的调控。外泌体是一种细胞特殊小分子如 miRNA 的运输载体,肝脏细胞既可释放外泌体,又是肝脏内源性外泌体和其他器官细胞来源的外泌体作用的靶细胞。

miR-122 是肝脏中表达量最丰富的 miRNA,参与三酰甘油、胆固醇、游离脂肪酸的代谢。普遍认为,miR-122 与脂肪肝发病密切相关。本项目中笔者发现 NAFLD 患者血清外泌体源性 miR-122-5p 表达显著增加。SALVOZA 等^[12]也发现 NAFLD 患者的血清 miR-122 水平明显高于健康对照组,而 CSAK 等^[13]在饮食诱导的脂肪性肝炎大鼠中发现肝脏组织 miR-122 降低。因此,本研究推测肝脏组织 miR-122 表达降低参与了非酒精性脂肪性肝炎相关肝纤维化的发生,其他组织分泌 miR-122,并由外泌体携带至肝脏代偿以保护肝脏。

miR-27 是一种与脂质代谢相关性最高的 miRNA。有研究表明在人类和啮齿类动物脂肪细胞脂质代谢中 miR-27a 过度表达可以加速脂肪释放、三酰甘油水解,释放出更多的游离脂肪酸,肝脏游离脂肪酸的超负荷是导致脂肪肝变性的重要原因^[14]。研究证

实 miR-27 基因家族在成脂分化过程中表达下调,过表达 miR-27 会特异性抑制脂肪细胞的形成,而不影响肌源性分化^[15]。此外,还发现 miR-27 可与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 结合并影响其表达,调节脂质分解以及合成代谢效率,miR-27a 可能在肥胖 NAFLD 的病理发展中发挥作用。此外,有研究发现,miR-335 在肥胖小鼠的白色脂肪组织和肝脏中表达上调,这可能与肥胖的病理生理机制相关^[16]。在饮食诱导小鼠 NAFLD 的肝脏中发现 miR-335-5p 上调,而 miR-21 有所降低,这些 miR-335 的靶标分子在调控脂类和碳水化合物代谢、信号传导以及凋亡中都有重要作用,这对饮食引起肥胖、脂肪肝、肝纤维化甚至肝硬化的发生、发展具有重要作用^[17]。

综上所述,青少年 NAFLD 患者血清差异性表达的 miRNA 可能与疾病的发病机制有关,但仍需深入研究,miR-122-5p、miR-335-5p、miR-27a-5p 可能可以作为肥胖 NAFLD 早期诊断的标记物。

参考文献

- [1] VOS M B, ABRAMS S H, BARLOW S E, et al. NASPGHAN clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children; recommendations from the expert committee on NAFLD (ECON) and the north american society of pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition (NASPGHAN) [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2017, 64(2):319-334.
- [2] ISMAIEL A, DUMITRASCU D L. Cardiovascular risk in fatty liver disease: the liver-heart axis-literature review [J]. Front Med (Lausanne), 2019, 6:202-206.
- [3] PAPPACHAN J M, BABU S, KRISHNAN B, et al. Non-alcoholic fatty liver disease; a clinical update [J]. J Clin Transl Hepatol, 2017, 5(4):384-393.
- [4] THOMOU T, MORI M A, DREYFUSS J M, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues [J]. Nature, 2017, 542(7642):450-455.
- [5] YING W, RIOPEL M, BANDYOPADHYAY G, et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miRNAs

- can modulate in vivo and in vitro insulin sensitivity[J]. Cell, 2017, 171(2):372. e12-384. e12.
- [6] ZHOU X, HUANG K, JIA J, et al. Exosomal miRNAs profile in children's nonalcoholic fatty liver disease and the correlation with transaminase and uric acid[J]. Ann Nutr Metab, 2020, 76(1):44-53.
- [7] 周雪莲, 傅君芬. 儿童非酒精性脂肪肝病诊断与治疗专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(7):487-492.
- [8] 李辉, 季成叶, 宗心南, 等. 中国 0~18 岁儿童、青少年体块指数的生长曲线[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(7):493-498.
- [9] ANON. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases[J]. Clin Liver Dis (Hoboken), 2018, 11(4):81-87.
- [10] LIU X L, CAO H X, FAN J G. MicroRNAs as biomarkers and regulators of nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Dig Dis, 2016, 17(11):708-715.
- [11] OTSUKA M, KISHIKAWA T, YOSHIKAWA T, et al. MicroRNAs and liver disease[J]. J Hum Genet, 2017, 62(1):75-80.
- [12] SALVOZA N C, KLINZING D C, GOPEZ-CERVANTES J, et al. Association of circulating serum miR-34a and miR-122 with dyslipidemia among patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153497.
- [13] CSAK T, BALA S, LIPPAI D, et al. microRNA-122 regulates hypoxia-inducible factor-1 and vimentin in hepatocytes and correlates with fibrosis in diet-induced steatohepatitis[J]. Liver Int, 2015, 35(2):532-541.
- [14] ESLER W P, BENICE K K. Metabolic targets in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019, 8(2):247-267.
- [15] 孙琛, 梁廷明. miR-27 在肿瘤、心血管疾病和能量代谢中的作用研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(1):93-99.
- [16] 王来娣, 郑云, 蒋拾贝, 等. miRNA 在脂代谢中的研究进展[J]. 动物营养学报, 2013, 25(7):1446-1452.
- [17] 倪子慧, 许芳, 秦俊杰. microRNA 在肝纤维化中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(3):235-238.

(收稿日期:2020-04-03 修回日期:2020-10-25)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.01.026

MCV 对不同方法血小板计数结果的影响

张 泽, 赵强元

解放军总医院第六医学中心检验科, 北京 100048

摘要:目的 探讨红细胞平均体积(MCV)对 XN-2000 血液分析仪电阻抗法(PLT-I)和荧光染色法(PLT-F)计数患者血小板结果的影响。方法 采用 Sysmex XN-2000 血液分析仪对 286 例患者抗凝血分别用 PLT-I 和 PLT-F 进行血小板计数,计数结果根据 MCV 大小分为 3 组, A 组: $MCV < 72$ fL, B 组: $72 \text{ fL} \leq MCV \leq 82$ fL, C 组: $MCV > 82$ fL; 将两种方法检测的血小板结果进行统计学分析。结果 A 组 PLT-I 和 PLT-F 两种方法计数结果差异有统计学意义 ($P < 0.05$), B 组和 C 组这两种方法计数结果差异均无统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 临床进行血常规血小板计数检测时, MCV 越大, PLT-I 和 PLT-F 二者计数结果差异越不明显, MCV < 72 fL 时, PLT-I 和 PLT-F 血小板计数结果有明显差异, 提示 MCV < 72 fL 时采用 PLT-F 对血小板计数结果进行复检, 可有效避免小红细胞导致的小血小板计数假性增高。

关键词: XN-2000 全自动血细胞分析仪; 血小板计数; 电阻抗法; 荧光染色法

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)01-0090-03

血细胞分析仪是临床检验应用最为普遍的仪器, 具有快速、重复性好等特点, 为临床提供准确、有效的血细胞参数^[1]。血小板计数检测是临床血细胞计数检验中的一项重要分析指标, 对多种临床疾病的诊断及治疗具有重要意义, 并且与疾病的发展和预后密切相关^[2-6]。而临床血小板检测中易受溶血、脂血、红细胞碎片等因素影响导致血小板计数假性减低和假性增高^[7]。Sysmex 公司 XN-2000 血细胞分析仪可采用电阻抗法(PLT-I)和荧光染色法(PLT-F)对血小板进行计数分析, 其中 PLT-I 具有快速、重复性好等特点, 但易受小红细胞和红细胞碎片的影响; PLT-F 应

用血小板特异性染料结合流式细胞术进行血小板计数, 对非血小板颗粒具有较强的抗干扰能力。本次研究分析不同范围 MCV 这两种方法计数血小板结果的差异, 并结合直方图及散点图, 对其准确性及干扰因素进行分析, 为实验室准确检测血小板计数提供依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源 随机收集本院门诊、住院患者及体检者 286 份标本, 根据 MCV 结果分为 3 组: A 组 124 例, $MCV < 72$ fL; B 组 62 例, $72 \text{ fL} \leq MCV \leq 82$ fL; C 组 106 例, $MCV > 82$ fL。