

文章编号 1006-8147(2015)06-0503-04

论 著

血浆 miRNA-372/373 在正常献血者和 HBV 早期感染献血者中的表达差异

安蓬蓬¹, 汤 华², 郭军飞²

(1.天津市血液中心质管科, 天津 300110; 2.天津医科大学天津市生命科学中心实验室, 天津 300070)

摘要 目的:研究 miRNA-372/373 与 HBV 早期感染的相关性,分析其在 HBV 早期感染诊断中的潜在应用价值。方法:收集来源于 2013 年 3 月至 9 月天津市内无偿献血者所献血液的血浆标本留样,共 54 份,分为正常组、酶免单阳组(E 单阳组)和酶免核酸双阳组(EN 双阳组)。提取此 3 组共 54 份血浆标本中的 miRNA-372 和 miRNA-373,用实时荧光定量 PCR 方法进行检测。分别比较 miRNA-372 和 miRNA-373 在 3 组血浆标本之间的表达差异,并对各组间的 miRNA 表达趋势进行统计学分析;同时,对 miRNA-372、miRNA-373 的相对表达水平分别与核酸检测 HBV 核酸阳性血浆标本中的 HBV DNA 拷贝数进行相关性分析。结果:经实时荧光定量 PCR 检测,与正常献血者相比,miRNA-372、miRNA-373 在 E 单阳组和 EN 双阳组中均表达上调,其中,miRNA-372、miRNA-373 在 EN 双阳组中表达上调更为显著。进一步分析发现,在 EN 双阳组中,miRNA-372、miRNA-373 均与相应的 HBV DNA 拷贝数呈正相关性,且与 miRNA-372 相比,miRNA-373 与相应的 HBV DNA 拷贝数的正相关性更为明显。结论:miRNA-372、miRNA-373 与 HBV 早期感染密切相关,提示 miRNA-372、miRNA-373 在 HBV 感染的早期诊断中具有潜在价值。

关键词 微小 RNA;miRNA-372;miRNA-373;HBV 早期感染

中图分类号 R457.1

文献标志码 A

Differential expression of miRNA-372/373 in plasma between the normal donors and the HBV donors at early stage

AN Peng-peng¹, TANG Hua², GUO Jun-fei²

(1.Department of Quality Control, Tianjin Blood Center, Tianjin 300110, China; 2.Tianjin Life Science Research Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the relationship between the miRNA-372/373 levels in plasma and the early-stage infection of HBV, to uncover the potential of miRNA-372/373 in the diagnosis of the early-stage infection of HBV. **Methods:** Blood samples for miRNA detecting were collected from 54 donors who donated blood from 2013.3 to 2013.9 in Tianjin. All the samples were divided into 3 groups: eighteen samples were Normal; 18 samples were ELISA testing (+) and NAT (-) (HBV-S); the last 18 samples were ELISA testing (+) and NAT(+) (HBV-D). Quantization of miRNA-372 and miRNA-373 in all the 54 plasma samples were performed using quantitative RT-PCR. At last, compared the deregulated miRNA (miRNA-372/-373) in the plasma of the three groups respectively, and the expression patterns of miRNA-372 and miRNA-373 were analyzed using statistical methods; the correlation between the expression level of miRNA-372/-373 and the copy number of HBV DNA in NAT (+) plasma was statistically analyzed. **Results:** Compared with the Normal, miRNA-372 and miRNA-373 in both HBV-S and HBV-D were up-regulated. Furthermore, both miRNA-372 and miRNA-373 were up-regulated more significantly in HBV-D than in HBV-S. Moreover, the levels of both miRNA-372 and miRNA-373 were positively correlated with the copy number of HBV DNA in HBV-D. Compared with miRNA-372, miRNA-373's positive correlation with the copy number of HBV DNA was significantly higher. **Conclusion:** The correlation between miRNA-372/373 in plasma and the early-stage infection of HBV is high, indicating their potential values in the early-stage diagnosis of HBV infection.

Key words microRNA; miRNA-372; miRNA-373; the early-stage infection of HBV

在我国,乙肝病毒是威胁血液安全的主要因素。目前,采供血机构多同时采用 ELISA 检测和核酸检测(NAT)两种方法对血液进行 HBV 检测。虽然 NAT 检测大大缩短了 HBV 的检测“窗口期”,很大程

作者简介 安蓬蓬(1979-),女,主治医师,硕士在读,研究方向:输血;
通信作者:汤华,E-mail:htang2002@yahoo.com。

度上降低了经血传播疾病发生的风险,但 NAT 检测的准确性还是会受到病毒含量、病毒变异等因素的影响。1993 年, Lee 等^[1]发现了第一个 miRNA(lin-4),它是一类长度在 21~25 nt 的内源性非编码单链小分子 RNA。2008 年, Lawrie 首次在人类血清中发现 miRNA,由于 miRNA 可以广泛而稳定地存在于人类

细胞外液,一直以来,科学家都致力于其在非侵袭性临床疾病诊断中的应用。miRNA-373与miRNA-371a、miRNA-371b及miRNA-372同属于miRNA-371-373簇^[2],它们源自相同的初级miRNA的转录^[3],对HBV感染来说,有研究表明miRNA-372/373可以增加HBV蛋白及核心DNA的表达^[4]。目前相关研究都是集中在细胞、组织中的miRNA-372/373上,关于循环中、血浆中miRNA-372/373的研究甚少,本研究通过检测HBV感染早期的无偿献血者血浆中和正常献血者血浆中的miRNA(miRNA-372/373)表达差异,进而分析这两种miRNA与HBV早期感染的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象 血浆标本来源于2013年3月-9月天津市内无偿献血者所献血液的标本留样,共54份,每份血浆标本量为5 mL,54位无偿献血者均符合《献血者健康检查要求》,年龄18~55岁,为随机抽取。

1.2 试剂与仪器 miRcute miRNA提取试剂盒(北京TIANGEN),CyDyeTM荧光染料(Amersham Biosciences CyDye),rTaq PCR试剂盒、dNTP(10 mmol/L)、碱性磷酸酶、SYBR Premix EX Taq定量PCR试剂盒(日本TaKaRa),焦碳酸二乙酯DEPC(北京鼎国),RNA酶抑制剂、T4 RNA连接酶、T4多核苷酸激酶、Taq DNA聚合酶(深圳Fermentas),M-MLV反转录酶(美国Promega),40% PAGE(丙烯酰胺单体:N'N'亚甲双丙烯酰胺=19:1)(Genview美国),RNase-free水,氯仿,异丙醇,75%乙醇(RNase-free水配制),20×SSC,10×PBS,3 mmol/L氯化钠,0.3 mmol/L柠檬酸钠,10% SDS,5 mmol/L醋酸铵,0.5 mmol/L EDTA,1 mmol/L Tris-HCl(pH7.5)。所有试剂均在有效期内。Version3.0.0.0016(美国PerkinElmer),超净工作台(BCM-8)(苏州净化设备公司),iQ5定量PCR检测仪(美国Bio-Rad),紫外分光光度计(美国Bio-tek),台式离心机(德国Eppendorf),miniCycler™ PCR仪(美国MJ Research)。

1.3 方法

1.3.1 分组方法 所抽取的无偿献血者血浆标本均经过ELISA检测及核酸检测,分别为第1组(正常组):ELISA检测HBsAg及核酸检测HBV核酸均为阴性的正常的血浆标本18份;第2组(E单阳组):仅ELISA检测HBsAg阳性而核酸检测HBV核酸阴性的血浆标本18份;第3组(EN双阳组):ELISA检测HBsAg及核酸检测HBV核酸均阳性的血浆标本18份。其中,以上3种血浆标本的其他血

液中心常规检测项目均为阴性,ALT水平正常。追查后两组36份血浆标本的相应献血者,均为无明显症状的轻度早期感染者。ELISA检测由Star全自动加样仪、FAMI24/30全自动酶免分析仪、anthos 340r酶标仪共同完成;ALT检测由TBA-120 FR全自动生化仪完成;核酸检测由Procleix® TRGRIS®核酸检测分析系统和罗氏cobas s201核酸检测系统检测并提供数据。

1.3.2 制备方法 (1)血浆miRNA提取:采用miRcute miRNA提取试剂盒(离心柱型)(北京TIANGEN公司)提取miRNA。(2)miRNA鉴定:采用紫外分光光度法测定miRNA在260 nm和280 nm的吸光度,计算miRNA含量(260 nm的OD=1相当于miRNA含量33 μg/mL),判断提取的miRNA质量(miRNA OD260/OD280应在1.8至2.1之间,OD260/OD230应大于2.0)。

1.3.3 实时荧光定量PCR方法 miRNA的定量分析采用基于茎-环引物的实时定量PCR方法^[5]。

1.3.3.1 RT制备cDNA:RT引物序列见表1。应用hsa-miRNA-16作为内参照。配制反应体系,总体积为13 μL,其中含小片段RNA 2 μL;miRNA-372, miRNA-373, miRNA-16 1 μL;DEPC水 10 μL。65℃变性10 min,25℃5 min,水浴2~5 min。补加以下试剂,总体积为20 μL,其中含5×first stand buffer 4 μL; dNTPs(10 mmol/L)1 μL;RNA酶抑制剂(40 U/μL)1 μL;M-MLV(200 U/μL)1 μL。42℃延伸30 min。70℃灭活10 min。产物保存于-20℃。

1.3.3.2 实时定量PCR确定miRNA-372、miRNA-373的相对表达水平:引物序列见表1。反应体系总体积为20 μL。其中含2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL; PCR Forward Primer(5 pmol/μL)1 μL;PCR Reverse Primer(5 pmol/μL)1 μL;模板(RT产物cDNA)2 μL; DDW 6 μL。循环体系为:95℃预变性3 min;95℃30 s, 56℃30 s,72℃30 s,40个循环。收集结果,按照以下方法进行数据分析。目的miRNA的定量采用相对法,将2^{-ΔCt}作为目的miRNA在样品中的相对含量,其中ΔCt=CtmiRNA-CtmiRNA-16。

1.4 统计学分析 所有计量资料按照均数±标准差的方法进行统计。两组间的比较应用两独立样本t检验。3组及以上间的比较应用单因素方差分析(one-way analysis of variance,ANOVA),组间的进一步两两比较应用SNK-q检验。两组变量的相关性分析应用Pearson相关系数法。检验统计量P<0.05时具有统计学差异。

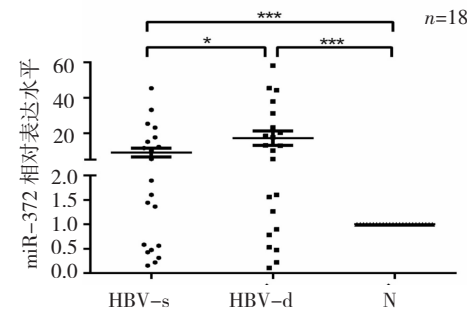
表 1 RT 引物信息表

Tab 1 The information table of RT primers

Primer 名称	序列(5'to 3')	碱基数
372-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGCACTGGATACGACACGCTC	46
373-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGCACTGGATACGACACACCC	46
372-Fwd	GCCCGCAAAGTGCTGCGACAT	21
373-Fwd	TGCGTGAAGTGCTTCGATTTTG	22
Reverse	CCAGTGCAGGGTCCGAGGT	19

2 结果

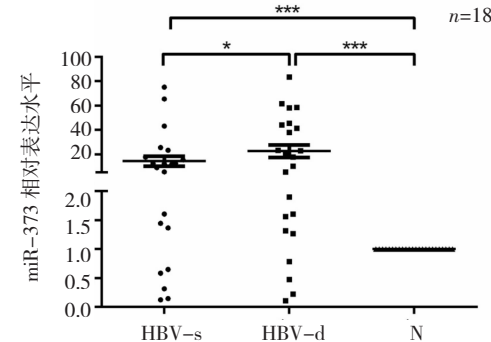
2.1 miRNA-372 在 3 组无偿献血者血浆中的相对表达水平差异 相比较于正常组,miRNA-372 在 E 单阳组、EN 双阳组无偿献血者血浆中的相对表达水平均明显上调;其中,miRNA-372 在 EN 双阳组中的相对表达水平比在 E 单阳组上调更为明显(图1)。



HBV-s 为 E 单阳组,HBV-d 为 EN 双阳组,N 为正常组

图 1 miRNA-372 在 3 组无偿献血者血浆中的相对表达水平差异
Fig 1 The differential expressions of miRNA-372 in the plasma of the three groups

2.2 miRNA-373 在 3 组无偿献血者血浆中的相对表达水平差异 相比较于正常组,miRNA-373 在 E 单阳组、EN 双阳组无偿献血者血浆中的相对表达水平均明显上调;其中,miRNA-373 在 EN 双阳组中的相对表达水平比在 E 单阳组上调更为明显(图2)。



HBV-s 为 E 单阳组,HBV-d 为 EN 双阳组,N 为正常组

图 2 miRNA-373 在 3 组无偿献血者血浆中的相对表达水平差异
Fig 2 The differential expressions of miRNA-373 in the plasma of the three groups

2.3 miRNA-372 在 EN 双阳组与相应的 HBV DNA 拷贝数的相关性 miRNA-372 的相对表达水平随

HBV DNA 的拷贝数增加而增加,与相应的 HBV DNA 拷贝数呈正相关性(图 3)。

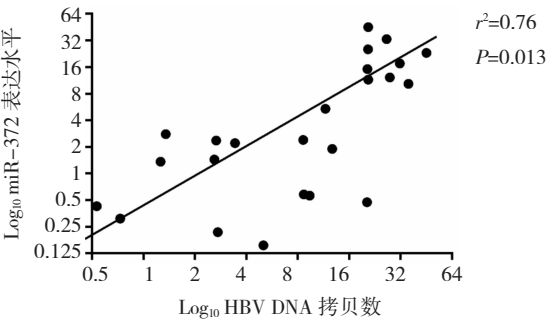


图 3 miRNA-372 与 HBV DNA 拷贝数的相关性
Fig 3 The correlation between the miRNA -372 and the copy number of HBV DNA

2.4 miRNA-373 在“EN 双阳组”与相应的 HBV DNA 拷贝数的相关性 miRNA-373 的相对表达水平随 HBV DNA 的拷贝数增加而增加,与相应的 HBV DNA 拷贝数呈正相关性。而且,与 miRNA-372 相比,miRNA-373 的相对表达水平与 HBV DNA 拷贝数的正相关性更为明显(图 4)。

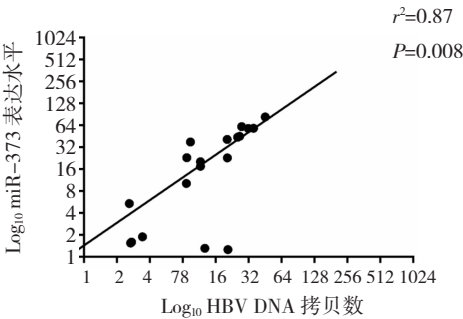


图 4 miRNA-373 与 HBV DNA 拷贝数的相关性
Fig 4 The correlation between the miRNA -373 and the copy number of HBV DNA

3 讨论

3.1 近年来,miRNA-371-373 簇的调节功能引起了人们的关注,但其作用机制还有待深入研究,相关工作还有待继续开展。曾洋等^[6]报道,miR-373 参与调控 Flk1+MSC 向骨细胞分化;武卫华等^[7]也证实,人工构建的 has-miRNA-373 载体经转染后可增加肿瘤细胞中 E-钙黏蛋白的表达量;同时,刘琳等^[8]

的研究发现,miRNA-373 在宫颈癌组织和 Hela 细胞中低表达,又起到了抑癌基因的作用。在 HBV 感染的肝脏组织和 HepG2.2.15 细胞中,miRNA-373 和 miRNA-371-373 簇的表达均显著上调^[4]。人们通过研究发现,在 1.3×HBV 转染的 HepG2 细胞中,miRNA-373 和 miRNA-371-373 簇的高表达可以通过靶向核因子 I/B,刺激 HBV 蛋白和 HBV 核心 DNA 的产生,从而促进 HBV 的复制。由于 miRNA 是在细胞中产生的,而循环 miRNA 来自于凋亡或坏死的细胞、细胞的主动释放以及循环细胞的裂解,本研究应用实时荧光定量 PCR 方法检测 miRNA-372/373 在各组无偿献血者血浆中的相对表达水平,发现相比较于正常组,miRNA-372/373 在 E 单阳组、EN 双阳组无偿献血者血浆中的相对表达水平均明显上调(图 1~2),由此看出,HBV 感染者血浆中的 miRNA-372/373 与 HBV 感染的肝脏组织和 HepG2.2.15 细胞中的 miRNA-372/373 表现是一致的。这一结果提示血浆中的 miRNA-372/373 与 HBV 感染密切相关。

另外,miRNA-372/373 在 EN 双阳组的相对表达水平比在 E 单阳组上调更为明显。这是由于相对于 E 单阳组,EN 双阳组献血者体内有较活跃的病毒复制且拷贝数较高,这一结果初步表明了血浆 miRNA-372/373 的相对表达水平不仅与 HBV 的感染相关而且与 HBV 的复制及活动性相关。

3.2 将 EN 双阳组中的 miRNA-372/373 相对表达水平与 HBV DNA 拷贝数做相关性分析(图 3~4),miRNA-372/373 的相对表达水平与 HBV DNA 拷贝数呈正相关关系。在组织和细胞中,miRNA-373 和 miRNA-371-373 簇的表达水平与 HBV DNA 拷贝数呈正相关,miRNA-373 和 miRNA-371-373 簇的高表达可以刺激 HBV 蛋白和 HBV 核心 DNA 的产生,从而促进 HBV 的复制^[4]。因此我们推测,在血浆

中,miRNA-373 和 miRNA-371-373 簇也产生同样的作用,miRNA-372/373 相对表达水平的高低可以反应此时的 HBV 复制情况。同时,miRNA-373 的相对表达水平与 HBV DNA 拷贝数的正相关性更为明显。

综上所述,miRNA-372、miRNA-373 的相对表达水平与 HBV 早期感染密切相关,有望为 HBV 早期感染的诊断和治疗提供新的依据和方法。当然,对于临床研究来说,本试验中的血浆样品数量偏少,只有 54 份,因此本研究得出的结论有一定的局限性,仅供参考,相关研究还有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843
- [2] Nikaki A, Piperi C, Papavassiliou A G. Role of microRNAs in gliomagenesis: targeting miRNAs in glioblastoma multiforme therapy[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(10): 1475
- [3] Kwak M S, Lee D H, Cho Y, et al. Association of polymorphism in *Pri -microRNAs -371 -372 -373* with the occurrence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infected patients[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41983
- [4] Guo H Y, Liu H Y, Mitchelson K, et al. MicroRNAs -372/373 promote the expression of hepatitis B virus through the targeting of nuclear factor I/B[J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 808
- [5] Chen C F, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179
- [6] 曾洋,刘星霞,林瑞竹,等. microRNA-373 参与调控人脂肪来源间充质干细胞成骨分化[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(2): 119
- [7] 武卫华,孔璟,叶彬. *hsa-mir-373* 对肿瘤细胞中 E-钙黏蛋白表达的影响[J]. *生物技术通报*, 2011(8): 167
- [8] 刘琳,王月玲,王江芬.miR-21、miR-126、miR-143 和 miR-373 在正常宫颈组织、宫颈癌组织及 Hela 细胞中的表达差异[J]. *四川大学学报:医学版*, 2012, 43(4): 536

(2015-04-23 收稿)