

• 临床研究 •

出入境人员乙型肝炎病毒感染者循环 miRNA-122 表达水平分析^{*}

史咏梅, 冯子力, 伍碧梅, 唐明慧, 谭华, 王琪, 涂承宁, 叶立青

(珠海出入境检验检疫局保健中心, 广东珠海 519020)

摘要:目的 分析出入境人员乙型肝炎病毒(HBV)感染者外周血 miRNA-122 表达水平及其临床意义。方法 采集 300 例 HBV 感染患者和 40 例健康者外周血标本, 定量检测 miRNA-122 表达水平, 并分析其与丙氨酸氨基转移酶(ALT)、HBV DNA、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝表面抗原(HBsAg)及影像学改变的相关性。结果 与健康者相比, HBV 感染者 miRNA-122 表达水平明显升高($P < 0.05$)。miRNA-122 表达与 HBsAg、ALT 呈正相关, 与 HBeAg、HBV DNA、肝脏损伤影像学改变相关性较弱。结论 HBV 感染者循环 miRNA-122 表达水平可能与病毒复制无关, 但是反映肝脏活动性损伤和组织修复的指标。

关键词:miRNA-122; 乙型肝炎; 实时荧光定量聚合酶链反应; 肝损伤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.21.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)21-3168-03

乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球性健康问题之一, 全世界范围内大约有 3.5 亿 HBV 慢性感染者, 中国约有 1.2 亿感染者, 每年约 100 万人死于 HBV 相关的肝硬化、原发性肝癌等终末期肝病^[1-2]。乙型病毒性肝炎(简称乙肝)也是国内出入境人员检出率高的传染性疾病。微小 RNAs(miRNAs)是一类由 18~25 个核苷酸构成的内源性非编码单链小分子 RNA。miRNAs 在进化上高度保守, 具有转录后基因调控功能, 在多种生理和病理过程中发挥作用^[3-4]。循环 miRNAs 可用于评估脏器损伤或功能障碍, 是一种潜在的诊断标志物。本研究检测了出入境人员 HBV 感染者循环 miRNA-122 水平, 并结合影像学、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、HBV DNA 及其他指标, 探讨了 miRNA-122 在 HBV 感染者病情监测和健康评估中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 8 月至 2014 年 7 月珠海国际旅行卫生保健中心检出的乙肝表面抗原(HBsAg)阳性出入境人员 300 例(试验组), 平均年龄(39.9 ± 14.2)岁, HBV 感染病程超过 1 年, 未接受抗病毒药物、保肝或免疫调节药物治疗, 排除自身免疫性肝病、血吸虫肝病、酒精性肝硬化等疾病患者。同期体检健康者 40 例(对照组), 平均年龄(40.6 ± 13.5)岁, 排除条件: 病毒性肝炎、酒精性肝病和肝癌等。所有研究对象均排除可能影响血清 miRNA-122 水平的其他疾病, 且 1 个月内无输血史。

1.2 仪器与试剂 7180 型生化分析仪及配套 ALT 检测试剂盒(日本日立), ABI7500 型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国 ABI), AIA360 型磁微粒酶免分析仪及配套乙肝血清学标志物检测试剂盒(日本东曹), miRNA-122 荧光探针试剂盒和 U6 RNA 内对照(美国 ABI), miRNeasy Mini Kit miRNAs 提取试剂盒及 HBV DNA 荧光定量检测试剂盒(德国 QIAGEN)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 以普通真空干燥管和乙二胺四乙酸二钾抗凝管分别采集受试者静脉血 5 mL 和 2 mL, 4 h 内 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清及血浆标本。

1.3.2 HBV DNA 提取和定量检测 按照 QIAGEN 试剂盒说明书进行核酸提取和 HBV DNA 定量检测。

1.3.3 miRNA-122 提取和检测 按照 QIAGEN 公司 miR-Neasy Mini Kit 说明书的要求提取血浆 miRNAs。使用 Taq-man miRNAs 逆转录试剂盒和 miRNAs 特异性茎环结构逆转录引物进行 miRNAs 逆转录及扩增, 操作参照 ABI 试剂盒说明书。以 U6 RNA 作为内参, 扩增 miRNA-122 和 U6 RNA, 采用相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)对扩增结果进行比较分析。

1.3.4 乙肝血清学标志物和 ALT 检测 乙肝血清学标志物采用 AIA360 型磁微粒酶免分析仪检测, ALT 采用 7180 型全自动生化分析仪检测, 均使用配套试剂盒。

1.3.5 结果判定标准 HBV DNA ≥ 500 copies/mL、HBsAg ≥ 0.2 IU/mL 判为阳性, 乙肝 e 抗原(HBeAg) ≥ 1.0 S/CO 判为阳性。肝炎超声诊断标准参照《病毒性肝炎防治方案》制定的中度及以上肝损伤超声诊断标准^[5]。(1)中度: 肝脾稍大, 肝实质回声增强, 分布不均; 肝血管多清晰, 门静脉及脾静脉内径不宽。(2)重度: 肝表面不光滑, 边缘钝, 肝实质回声增粗, 肝静脉不清晰、狭窄或扭曲, 门静脉、脾静脉内径宽, 脾大。(3)肝硬化: 肝脏体积缩小, 表面凹凸不平, 锯齿状, 实质回声增强, 结节状不均, 肝静脉粗细不均或扭曲僵直, 脾大, 门静脉及脾静脉增宽, 可见腹腔积液。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用完全随机设计两样本 t 检验, 相关性分析采用双变量 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为比较差异或分析参数有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆 miRNA-122 检测结果 健康组 miRNA-122 相对表达量为 1.54 ± 2.32 , 试验组表达量为 26.28 ± 14.86 , 试验组 miRNA-122 相对表达量较对照组明显升高($P < 0.05$)。

2.2 HbsAg 与 miRNA-122 相关性分析 以试验组 HbsAg 检测结果为 X 轴, miRNA-122 相对表达量为 Y 轴, Spearman 相关分析结果显示二者呈正相关, 相关系数(r)为 0.646, 见图 1。

2.3 HBeAg 与 miRNA-122 相关性分析 试验组受试者检出 HBeAg 阳性 201 例。以 HBeAg 水平为 X 轴, 以 miRNA-122 相对表达量为 Y 轴, Spearman 相关分析结果显示二者呈正相关, 但相关性较弱($r=0.249$), 见图 2。

2.4 HBV DNA 与 miRNA-122 的相关性分析 试验组受试

* 基金项目: 珠海出入境检验检疫局科技计划项目(ZH2012-2)。

者检出 HBV DNA 阳性 248 例。以 HBV DNA 检测结果 10 为底的对数值为 X 轴, miRNA-122 相对表达量为 Y 轴, Spearman 相关分析结果显示二者呈正相关, 但相关性较弱 ($r=0.127$), 见图 3。

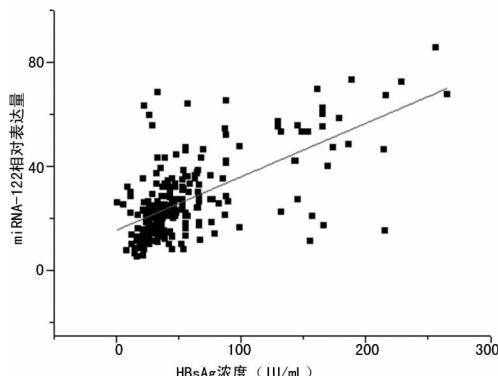


图 1 miRNA-122 相对表达量与 HBsAg 水平散点图

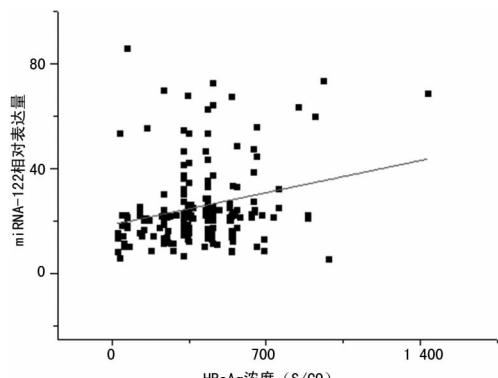


图 2 miRNA-122 相对表达量与 HBeAg 水平散点图

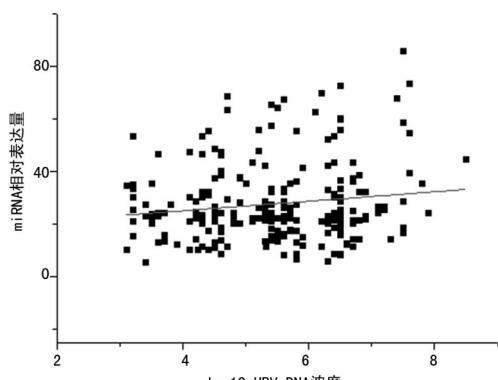


图 3 miRNA-122 相对表达量与 log10HBV DNA 散点图

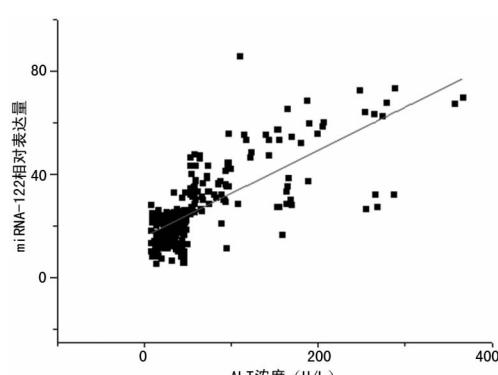


图 4 miRNA-122 相对表达量与 ALT 散点图

2.5 ALT 与 miRNA-122 相关性分析 试验组受试者检出

ALT 阳性者 98 例。以 ALT 检测结果为 X 轴, miRNA-122 相对表达量为 Y 轴, Spearman 相关分析结果显示二者呈正相关 ($r=0.752$), 见图 4。

2.6 肝脏影像学损伤与 miRNA-122 的相关性分析 试验组受试者检出中度以上肝损伤 25 例, 肝损伤者 miRNA-122 相对表达量为 26.3 ± 16.22 , 无肝损伤者表达量为 24.6 ± 14.52 , 肝损伤者与无肝损伤者 miRNA-122 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨 论

肝脏是人体重要的免疫器官和物质能量代谢中枢, HBV 感染可引起肝功能的损伤。珠海口岸出入境人员 HBV 感染率较高, 且呈上升趋势, 乙肝所致肝纤维化、早期肝硬化检出率亦有所上升。因此, 对出珠海口岸出入境人员进行早期诊断和干预, 降低严重并发症发生率, 是当前珠海口岸国际旅行卫生保健机构的重要任务。

相关研究表明, miRNA-122 在肝脏组织中高表达, 占肝脏 miRNA 表达量的 70% 以上, 且肝损伤可导致 miRNA-122 表达量明显升高^[6]。乙肝患者肝细胞内的 miRNA-122 可阻断 cyclin G1 的 P53 作用途径, 从而间接抑制 HBV 的复制^[7]。因此, miRNA-122 可用于肝损伤或功能障碍评价, 是一种潜在的诊断标志物。

本研究利用茎环引物及 Taqman 探针实时荧光定量 PCR, 以 U6 RNA 为内参, 检测了 HBV 感染者循环 miRNA-122 的相对表达量, 结果显示, 与健康者相比其表达水平明显升高 ($P<0.05$), 与类似研究结果一致^[8-9]。本研究采用的 U6 RNA 表达相对稳定, 可适用于循环 miRNAs 的相对定量检测。ALT 作为肝损伤指标广泛应用于疾病诊治。本研究结果亦显示 ALT 与 miRNA-122 的表达存在较强正相关关系, 推测肝损伤引起的 ALT 升高可能影响 miRNA-122 的表达, 或者二者间具有相互作用。HBsAg 和 HBeAg 是 HBV 感染重要标志物。有研究表明, HBsAg 阳性者 miRNA-122 相对表达量高于阴性者, 并且 miRNA-122 对 HBV 抗原的表达具有调节作用^[10]。本研究结果也显示 HBsAg 与 miRNA-122 的表达相关性较强。HBeAg 和 HBV DNA 均为病毒复制的标志, 是判断 HBV 在体内复制水平及是否具有传染性的指标。但本研究结果显示 HBeAg、HBV DNA 与 miRNA-122 的表达相关性不强, 推测 miRNA-122 表达水平可能与病毒复制无关。HBV 感染者肝脏影像学表现可反映肝脏炎症、坏死、再生、纤维化的累积损伤程度, 且超声检查获得的损伤影像学资料反映的是已存在的肝损伤, 与 miRNA-122 实时表达量相关性不强。

综上所述, miRNA-122 作为肝脏特异性 miRNAs, 在出入境人员 HBV 感染者血循环中表达水平升高。miRNA-122 水平可能与机体免疫状态及肝炎活动有关, 当存在肝损伤时表达水平升高, 而与病毒在体内的复制无关。这对出入境人员 HBV 感染者肝炎活动期的诊断、评估及健康管理和干预有一定指导意义。

参考文献

- 成军, 孙长贵, 陈瑜, 等. 乙型病毒性肝炎的实验室诊断新进展 [C]. 杭州: 2010 年浙江省检验医学学术年会论文汇编, 2010.
- Dienstag JL. Hepatitis B virus infection [J]. N Eng J Med, 2008, 359(14): 1486-1500.
- 吴珊珊, 温旺荣. 外周血 miRNA 的诊断意义 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(2): 131-136.

- [4] Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(31): 5848-5856.
- [5] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 中华医学会肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 肝脏, 2000, 5(4): 257-265.
- [6] Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating MicroRNAs, mir-21, mir-122, and mir-123 in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis[J]. Mol Carcinog, 2011, 50(2): 136-142.
- [7] Wang S, Qiu L, Yan X, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G1-modulated P53 activity[J]. Hepatology, 2012,

• 临床研究 •

粪便隐血试验不同检测方法的比较和应用

文 永¹, 徐 艳²

(1. 遵义市第二人民医院检验科, 贵州遵义 563000; 2. 遵义医学院附属医院输血科, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 探讨邻联甲苯胺法和匹拉米洞半定量法在粪便隐血试验(FOBT)中的应用效果。方法 选择 200 例上消化道出血确诊患者和 200 例健康者, 同时采用邻联甲苯胺法和匹拉米洞半定量法进行 FOBT 检测, 分析并比较检测结果。结果 邻联甲苯胺法灵敏度高(97.5%), 但假阳性率也高(16.0%)。与邻联甲苯胺法相比, 匹拉米洞半定量法灵敏度略低(80.5%), 但假阳性率也有所降低(1.5%)。结论 邻联甲苯胺法易受到多种因素干扰, 易出现假阳性结果, 但灵敏度较高。匹拉米洞半定量法灵敏度较低, 但假阳性率也相对较低。二者联合应用可提高上消化道出血的阳性检出率及检测结果准确性。

关键词:邻联甲苯胺法; 匹拉米洞半定量法; 粪便隐血试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.21.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)21-3170-02

上消化道出血量小于 5 mL 时, 无法采用肉眼观察法在粪便中发现血液, 而红细胞一旦被破坏, 显微镜检查也无法检出红细胞, 因此需采用化学法、免疫法等证实上消化道出血, 此时称之为隐血。粪便隐血试验(FOBT)通过检测粪便中的血红蛋白以确定消化道有无出血, 是判断消化道出血性疾病的重要方法, 也是筛查消化道肿瘤的方法之一^[1]。不同疾病可造成粪便中的血红蛋白水平存在差异, 影响 FOBT 检测结果。多种方法可用于 FOBT 检测, 如单克隆抗体法、免疫胶体金法、化学法等, 各有自身的优缺点^[2]。此外, 国内目前尚未建立统一的 FOBT 检测标准及规范化的评估程序。本研究比较了 2 种化学法(邻联甲苯胺法和匹拉米洞半定量法)在 FOBT 中的应用效果。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 1~10 月于遵义市第二人民医院经胃镜检查确诊的 200 例上消化道出血性疾病患者粪便标本(患者组), 同期 200 例体检健康者粪便标本(对照组)。

1.2 试剂 邻联甲苯胺试剂参照《全国临床检验操作规程(第 3 版)》配制, 包括 10 g/L 邻联甲苯胺溶液, 3% 过氧化氢(H₂O₂)溶液; 标本检测前先进行 3% H₂O₂ 有效试验, 若试剂失效, 重新配制。匹拉米洞半定量检测试剂盒购自珠海贝索生物技术有限公司(批号:213071), 在有效期内使用。

1.3 方法 分别采用 2 种方法同时患者组和对照组标本进行检测。邻联甲苯胺法检测步骤及结果判断标准参照《全国临床检验操作规程(第 3 版)》。匹拉米洞半定量法操作步骤及结果判断标准参照试剂盒说明书。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料以例数表示, 组间比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

患者组、对照组标本邻联甲苯胺法和匹拉米洞半定量法

55(3): 730-741.

- [8] 贾音, 张毅, 费明钰, 等. 慢性乙肝患者外周血 microRNAs 的表达变化[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(12): 1381-1383.
- [9] Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases [J]. Clin Chem, 2010, 56(3): 1830-1838.
- [10] 朱蕾, 陈智, 陈建忠, 等. miR-122 对乙型肝炎病毒抗原表达的影响[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(6): 593-597.

(收稿日期:2015-06-08)

FOBT 检测结果见表 1。患者组、对照组邻联甲苯胺法 FOBT 检测结果比较差异有统计学意义($\chi^2 = 4.317, P < 0.05$), 匹拉米洞半定量法 FOBT 检测结果比较差异也有统计学意义($\chi^2 = 7.413, P < 0.05$)。邻联甲苯胺法检测灵敏度为 97.5%, 假阳性率为 16.0%, 假阴性率为 2.5%; 匹拉米洞半定量法检测灵敏度为 80.5%, 假阳性率为 1.5%, 假阴性率为 19.5%。

表 1 2 种方法 FOBT 检测结果(n)

检测方法	患者组(n=200)	对照组(n=200)
邻联甲苯胺法		
阳性	195	32
阴性	5	168
匹拉米洞半定量法		
阳性	161	3
阴性	39	197

3 讨 论

FOBT 是临床常规检验项目之一, 主要是检测粪便中的血红蛋白, 对消化道肿瘤、消化道出血性疾病的早期诊治具有非常重要的价值。愈创木脂法是最早用于 FOBT 检测的方法, 随后出现的方法包括邻联甲苯胺法、匹拉米洞法、孔雀绿法等^[3]。化学法的检测原理大致相同, 均是基于血红蛋白中的亚铁血红素有类似过氧化酶的活性, 能催化 H₂O₂ 作为电子受体使色原氧化呈色, 且显色深浅与血红蛋白水平呈正相关^[4]。邻联甲苯胺法较为灵敏, 即使粪便中仅含有少量的血红蛋白或存在具有过氧化物酶活性的物质, 都会使检测结果呈阳性, 例如, 受试者食用动物血液、内脏类食品或食用含有过氧化物酶的叶绿素的瓜果蔬菜, 均可能出现假阳性结果。因此, 在采用邻联甲苯胺法进行 FOBT 检测前, 应嘱咐患者素食 3 d, 以及禁用