

• 论 著 •

miR-122 在乙型肝炎病毒感染小鼠病毒复制与肝功能损伤中的作用*

李 莉, 马 红

新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市中医医院检验科, 新疆乌鲁木齐 830000

摘要:目的 探究微小 RNA(miR)-122 在乙型肝炎病毒(HBV)感染小鼠病毒复制及肝功能损伤中的作用。方法 选取 40 只 C57BL/6 小鼠按照随机数字表法分为对照组、HBV 组、miR-NC 组、miR-122 组, 每组各 10 只。除对照组外, 其余 3 组小鼠均予尾静脉高压注射 rAAV8-1.3HBV 重组腺病毒载体构建 HBV 感染模型, 此外, miR-NC 组小鼠尾静脉注射空载体病毒, miR-122 组小鼠尾静脉注射含 miR-122 的慢病毒载体。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)与乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)水平, 采用全自动生化分析仪检测小鼠血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平, 采用 ELISA 检测小鼠血清肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-2 及 IL-6 水平, 采用实时荧光定量 PCR 检测小鼠肝组织 miR-122 与血清 HBV-DNA 水平, 采用免疫组织化学染色法检测小鼠肝组织乙型肝炎核心抗原(HBcAg)表达情况, 采用苏木精-伊红染色和 Masson 染色分别观察小鼠肝组织病理形态变化与纤维化情况。结果 与 HBV 组比较, miR-122 组小鼠血清 HBsAg、HBeAg、AST、ALT、TNF- α 、IL-2、IL-6、HBV-DNA 水平均明显降低, 小鼠肝组织 miR-122 水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 HBV 组比较, miR-122 组小鼠肝组织 HBcAg 阳性细胞率明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 HBV 组比较, miR-122 组小鼠肝组织损伤与纤维化现象得到明显改善。结论 在 HBV 感染小鼠中, miR-122 能够明显抑制 HBV-DNA 在其体内的复制与表达, 并抑制炎症因子的释放, 减轻肝组织损伤与纤维化, 发挥良好的肝脏保护作用。

关键词: 乙型肝炎病毒; 微小 RNA-122; 病毒复制; 肝功能损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.23.012

中图法分类号: R512.6+2

文章编号: 1673-4130(2022)23-2874-06

文献标志码: A

Role of miR-122 in viral replication and liver function damage in hepatitis B virus infected mice*

LI Li, MA Hong

Department of Clinical Laboratory, Urumqi Traditional Chinese Medicine
Hospital, Xinjiang, Urumqi 830000, China

Abstract: **Objective** To investigate the role of microRNA (miR)-122 in viral replication and liver function damage in hepatitis B virus (HBV) infected mice. **Methods** Forty C57BL/6 mice were selected and divided into control group, HBV group, miR-NC group and miR-122 group according to the random number table method, with 10 mice in each group. Except for the control group, the other three groups of mice were injected with rAAV8-1.3HBV recombinant adenovirus vector through tail vein at high pressure to construct HBV infection model. In addition, mice in miR-NC group were injected with empty vector virus through tail vein, and mice in miR-122 group were injected with lentiviral vector containing miR-122 through tail vein. Serum levels of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B e antigen (HBeAg) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were detected by automatic biochemical analyzer. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-2 and IL-6 were detected by ELISA. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the levels of miR-122 in liver tissue and HBV-DNA in serum of mice. The expression of hepatitis B core antigen (HBcAg) in mouse liver tissue was detected by immunohistochemical staining method. HE staining and Masson staining were used to observe the pathological changes and fibrosis of liver tissue. **Results** Compared with the HBV group, the levels of serum HBsAg, HBeAg, AST, ALT, TNF- α , IL-2, IL-6 and HBV-DNA in the miR-122 group were significantly decreased, and the level of miR-122 in the liver tissue was significantly increased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the HBV group, the rate of

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市卫生健康委员会科技计划项目(202016)。

作者简介: 李莉, 女, 副主任技师, 主要从事临床检验研究。

HBcAg positive cells in the liver tissue of mice in the miR-122 group was significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the HBV group, the liver tissue injury and fibrosis of mice in the miR-122 group were significantly improved. **Conclusion** In HBV infected mice, miR-122 can significantly inhibit the replication and expression of HBV-DNA in vivo, inhibit the release of inflammatory factors, reduce liver tissue damage and fibrosis, and play a good role in liver protection.

Key words: hepatitis B virus; microRNA-122; virus replication; liver function damage

乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球肝病流行的主要原因,HBV 作为一种 DNA 病毒,属于嗜肝 DNA 病毒科,通过前基因组 RNA 反转录复制 DNA^[1]。HBV 感染增加了慢性乙型肝炎、肝硬化和肝细胞癌等疾病的发生风险^[2],其中,慢性乙型肝炎对人类健康影响较大,根据世界卫生组织公布的数据,全球约有 2.4 亿人患有慢性乙型肝炎,其中 20%~30% 的患者会发展为肝硬化或肝细胞癌,导致患者肝衰竭^[3]。目前,抗病毒疗法是治疗 HBV 感染相关疾病的有效方法。然而,由于停药后复发和一些其他不良反应等影响,使该疗法的应用受到限制^[4]。因此,迫切需要阐明 HBV 感染后的发病机制并探索抑制或消除人体内 HBV 的新型有效方法。微小 RNA(miRNA)是在转录后水平调节基因表达的非编码功能性小 RNA 分子,长度为 21~24 个核苷酸,在许多生理和病理过程中发挥重要作用。研究表明,miRNA 在 HBV 感染中发挥作用,在 HBV 感染期间,病毒复制和表达的产物导致内源性 miRNA 出现异常表达,并使感染持续存在,从而促进组织或机体损伤^[5];然而,宿主细胞内也有一些 miRNA,如 miR-1231、miR-204 和 miR-1236^[6-7],可通过直接或间接机制抑制 HBV 的复制和表达。miR-122 是在肝内特异性高表达的一种 miRNA,约占肝内所有 miRNA 的 70%,在调节肝细胞分化与功能维持中起着关键作用^[8]。已有体外研究表明,miR-122 能够明显抑制 HBV 的复制^[9],但关于 miR-122 在体内 HBV 感染中作用的相关研究较少,为了进一步揭示 miR-122 对 HBV 感染后病毒复制的影响,本研究通过构建 HBV 感染小鼠模型,检测给予 miR-122 处理后的病毒复制水平变化,并观察其对肝功能损伤的影响,以期为 HBV 感染性疾病的诊疗研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择 40 只无特异病原体(SPF)级 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体质量 20~25 g,雌雄各 20 只,购自新疆医科大学实验动物中心。小鼠分笼饲养,期间自由进食、饮水,饲养室温维持在 20~25℃,相对湿度为 40%~60%,每日光照/黑暗各 12 h 交替。所有小鼠饲喂 1 周后进行实验。

1.2 仪器与试剂 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购于北京万泰生物药业股份有限公司,肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-2 及 IL-6

ELISA 检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司,Trizol 试剂盒购于美国 GIBCO 公司,TaqMan MicroRNA assay 试剂盒购于北京百奥莱博生物科技有限公司,HBV 核酸提取试剂盒和 HBV-DNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购于北京索奥生物医药科技有限公司,二氨基联苯胺(DAB)试剂盒和苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购于北京百奥莱博生物科技有限公司,Masson 染色试剂盒购于上海贝博生物科技有限公司,小鼠抗人乙型肝炎核心抗原(HBcAg)单克隆抗体购于北京博尔西科技有限公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购于英国 Abcam 公司。rAAV8-1.3HBV 重组腺病毒载体购于北京五加和分子医学研究所有限公司,pAV. Ex1d-CMV miR-122 慢病毒载体构建与包装均交由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。SMT100V 便携式全自动生化分析仪购于南京普朗医疗设备有限公司,LabServ™K3 型酶标仪购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司,CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测系统购于美国 BIO-RAD 公司,XSP-1200 光学显微镜购于上海光学仪器五厂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型建立与分组 采用随机数字表法将 40 只小鼠随机分为对照组、HBV 组、miR-NC 组、miR-122 组,每组各 10 只。除对照组外,其余小鼠均根据文献^[10]报道的方法建立 HBV 感染模型,给予小鼠尾静脉高压注射 50 μ L rAAV8-1.3HBV 重组腺病毒载体(拷贝数 5.0×10^{10} copies/mL),5 s 内注射完毕。对照组采用同样方法注入等体积磷酸盐缓冲液(PBS)。注射后,miR-NC 组小鼠经尾静脉注射 50 μ L 空载体病毒,miR-122 组小鼠经尾静脉注射 50 μ L 含 miR-122 的慢病毒载体,对照组和 HBV 组分别注射等体积 PBS,所有处理结束后将小鼠继续分笼饲养。

1.3.2 小鼠血清 HBsAg、HBeAg、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平检测 各组小鼠处理完毕饲养 4 周后,全身消毒,经尾静脉取血,静置 30 min,以 12 000 r/min 离心 10 min 后,收集上清液。各组小鼠血清 HBsAg、HBeAg 水平检测采用 ELISA 试剂盒,AST、ALT 水平检测采用 SMT100V 便携式全自动生化分析仪,具体步骤严格参照说明书进行。

1.3.3 ELISA 检测小鼠血清炎症因子水平 取分离

的各组小鼠血清,采用 ELISA 试剂盒检测血清 TNF- α 、IL-2 及 IL-6 水平,具体步骤严格参照说明书进行。

1.3.4 qRT-PCR 检测小鼠肝组织 miR-122 与血清 HBV-DNA 水平 取血后,处死各组小鼠并剪开腹腔获取肝组织,在无菌环境下剪碎,加入液氮研磨,采用 Trizol 试剂盒提取肝组织 RNA,反转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板,采用 qRT-PCR 检测肝组织内 miR-122 表达水平,以 U6 作为内参,具体根据 Taq-Man MicroRNA assay 试剂盒说明书操作,反应条件:95 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 60 s,循环 30 次;72 °C 1 min。取各组小鼠血清标本,根据 HBV 核酸提取试剂盒说明书提取血清 DNA,采用 qRT-PCR 检测 HBV-DNA 水平,以 GAPDH 作为内参,根据 HBV-DNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法)说明书进行检测,反应条件:94 °C 2 min;94 °C 10 s,60 °C 30 s,循环 40 次。各引物序列如下:miR-122 上游引物 5'-TGGAGTGTGACAATGGTG-3',下游引物 5'-GTCAGGGTCCGAGG-3';U6 上游引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';HBV-DNA 上游引物 5'-ACCGACCTTGAGGCATACTT-3',下游引物 5'-GCCTACAGCCTCCTAGTACA-3';GAPDH 上游引物 5'-ACCA-CAGCTCAAGCCATCAC-3',下游引物 5'-TCCAC-CACCCTGTTGCTAT-3'。

1.3.5 免疫组织化学染色法检测小鼠肝组织 HBcAg 表达情况 取各组小鼠肝组织固定后,常规石蜡包埋,切片,烤箱内烤片,脱蜡水化,利用柠檬酸钠加热修复抗原和 0.3%过氧化氢液孵育以封闭过氧化物酶活性,PBS 冲洗,10%山羊血清封闭,滴加小鼠抗人 HBcAg 单克隆抗体(1:100),4 °C 过夜,滴加对应二抗(1:1000)室温孵育 1 h。处理结束后用 PBS 冲洗,DAB 显色,予以苏木素染色,脱水透明,中性树胶封片。在光学显微镜下观察染色情况并采集图像,阳性表达为细胞质、细胞核呈棕色至棕褐色。随机选择

5 个视野,镜下计数总细胞数与 HBcAg 阳性细胞数,计算 HBcAg 阳性细胞率。

1.3.6 HE 染色观察小鼠肝组织病理形态变化 将制备的各组小鼠肝组织切片经脱蜡后浸入梯度乙醇中处理。切片上加入 Harris 苏木精染色 5 min,流水冲洗,滴加 1%盐酸乙醇分化数秒,流水冲洗,加入伊红染色 3 min,脱水透明,中性树胶封片,在光学显微镜下观察各组小鼠肝组织病理形态并采集图像。

1.3.7 Masson 染色观察小鼠肝组织纤维化情况 取制备的各组小鼠肝组织切片,脱蜡,再浸入梯度乙醇中处理。切片上加入 weigert 氏铁苏木精溶液染色 10 min,流水冲洗,滴入 1%盐酸乙醇分化,流水冲洗,再用 Masson 染液染色 3 min,丽春红酸性品红液染色 5 min,1%磷钼酸水溶液处理 3 min,苯胺蓝染液染色 5 min,采用 1%冰醋酸水溶液浸泡后洗涤切片,脱水透明,中性树胶封片,在光学显微镜下观察肝组织内蓝染胶原表达情况并采集图像。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件进行数据分析,采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制统计图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析,多组间两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 HBsAg、HBeAg、AST 及 ALT 水平比较 对照组小鼠血清中未检测到 HBsAg 和 HBeAg,HBV 组小鼠血清中均检测到 HBsAg 和 HBeAg,且二者水平较高,由此判断建模成功。HBV 组小鼠 AST、ALT 水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 HBV 组比较,miR-122 组小鼠血清 HBsAg、HBeAg、AST、ALT 水平均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 HBV 组和 miR-NC 组小鼠 AST、ALT 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠血清 HBsAg、HBeAg、AST 及 ALT 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	HBsAg(IU/mL)	HBeAg(IU/mL)	AST(U/L)	ALT(U/L)
对照组	10	—	—	38.07 $\pm$ 3.18	43.11 $\pm$ 4.26
HBV 组	10	1 536.29 $\pm$ 100.31	2 361.52 $\pm$ 152.27	115.65 $\pm$ 9.69*	103.58 $\pm$ 9.24*
miR-NC 组	10	1 531.84 $\pm$ 106.65	2 368.71 $\pm$ 160.18	117.06 $\pm$ 9.44*	102.97 $\pm$ 9.15*
miR-122 组	10	662.07 $\pm$ 43.76 ^{#Δ}	1 161.56 $\pm$ 80.94 ^{#Δ}	68.37 $\pm$ 6.02 ^{#Δ}	65.46 $\pm$ 5.93 ^{#Δ}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 HBV 组比较,[#] $P < 0.05$;与 miR-NC 组比较, ^{Δ} $P < 0.05$;—表示无数据。

2.2 各组小鼠血清炎症因子水平比较 HBV 组小鼠血清 TNF- α 、IL-2 及 IL-6 水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 HBV 组比较,miR-122 组小鼠血清 TNF- α 、IL-2、IL-6 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);HBV 组和 miR-NC 组小鼠血清 TNF- α 、IL-2 及 IL-6 水平比较,差异无统计学

意义($P > 0.05$),见表 2。

2.3 各组小鼠肝组织 miR-122 与血清 HBV-DNA 水平比较 与对照组比较,HBV 组小鼠肝组织 miR-122 水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 HBV 组比较,miR-122 组小鼠肝组织 miR-122 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 HBV 组

和 miR-NC 组小鼠肝组织 miR-122 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1A。对照组小鼠血清中未检测到 HBV-DNA,检测结果呈阴性;miR-122 组小鼠血清 HBV-DNA 水平较 HBV 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);HBV 组和 miR-NC 组小鼠血清 HBV-DNA 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1B。

表 2 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-2 及 IL-6 水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	n	TNF- α	IL-2	IL-6
对照组	10	41.61 $\pm$ 3.47	36.26 $\pm$ 3.06	26.45 $\pm$ 2.31
HBV 组	10	147.02 $\pm$ 9.14*	116.10 $\pm$ 9.22*	98.12 $\pm$ 8.75*
miR-NC 组	10	145.58 $\pm$ 12.01*	117.55 $\pm$ 9.45*	97.25 $\pm$ 8.92*
miR-122 组	10	69.81 $\pm$ 6.17 [#] Δ	60.89 $\pm$ 5.53 [#] Δ	61.78 $\pm$ 5.82 [#] Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 HBV 组比较,[#] $P<0.05$;与 miR-NC 组比较, Δ $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠肝组织 HBcAg 表达情况比较 在对

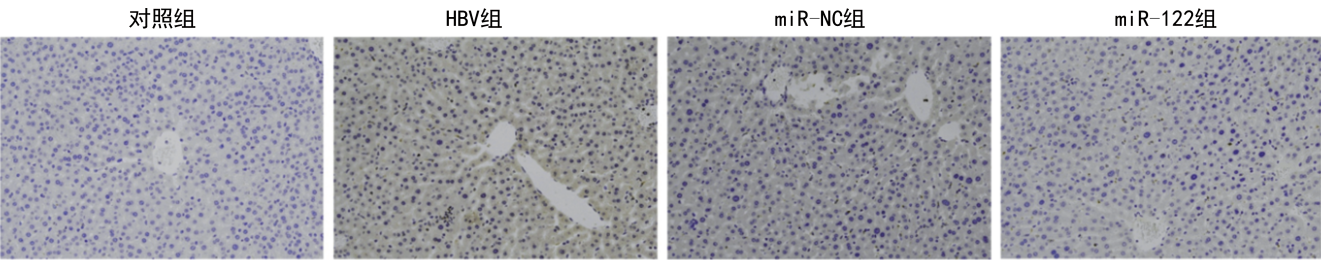
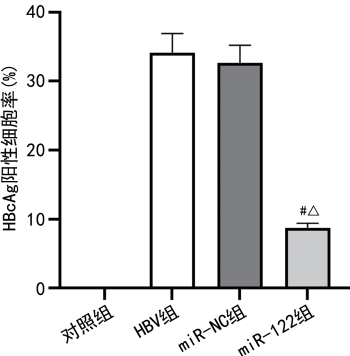


图 2 各组小鼠肝组织 HBcAg 表达情况(免疫组织化学染色, $\times 100$)



注:与 HBV 组比较,[#] $P<0.05$;与 miR-NC 组比较, Δ $P<0.05$ 。

图 3 各组小鼠肝组织 HBcAg 阳性细胞率比较

2.5 各组小鼠肝组织病理形态变化比较 对照组小

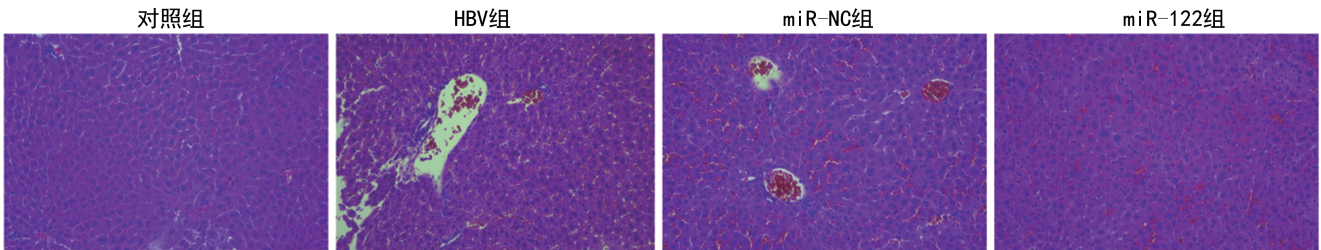
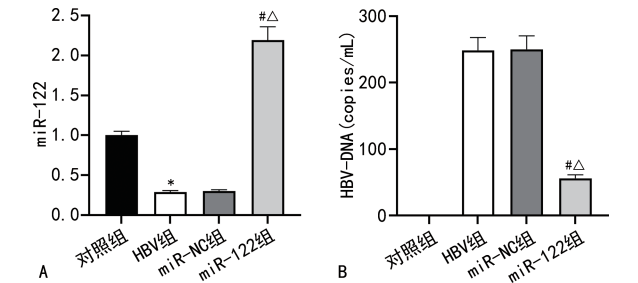


图 4 各组小鼠肝组织病理形态变化(HE 染色, $\times 100$)

照组小鼠肝组织内未出现着色细胞核或细胞质,而 HBV 组小鼠肝组织内染色明显加深,HBcAg 阳性细胞率较高;与 HBV 组比较,miR-122 组小鼠肝组织染色较浅,HBcAg 阳性细胞率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);而 miR-NC 组与 HBV 组 HBcAg 阳性细胞率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2、3。



注:A 为各组小鼠肝组织 miR-122 水平比较;B 为各组小鼠血清 HBV-DNA 水平比较;与对照组比较,* $P<0.05$;与 HBV 组比较,[#] $P<0.05$;与 miR-NC 组比较, Δ $P<0.05$ 。

图 1 各组小鼠肝组织 miR-122 与血清 HBV-DNA 水平比较

鼠肝组织内细胞形态发生明显改变,排列紊乱,有大量炎性细胞浸润;miR-122 组小鼠肝组织损伤程度较 HBV 组明显减轻,组织内细胞排列较为整齐,炎性细胞浸润减少,而 miR-NC 组小鼠肝组织损伤现象与 HBV 组比较未发生改善,见图 4。

2.6 各组小鼠肝组织纤维化情况比较 对照组小鼠肝组织内蓝染区域少,未发生明显纤维化;相较于对照组,HBV 组小鼠肝组织内有大量蓝染区域出现,组织发生明显纤维化;miR-122 组小鼠肝组织内蓝染区域较 HBV 组减少,组织纤维化现象减轻,而 miR-NC 组肝组织仍有大量纤维化,较 HBV 组未发生明显改变,见图 5。

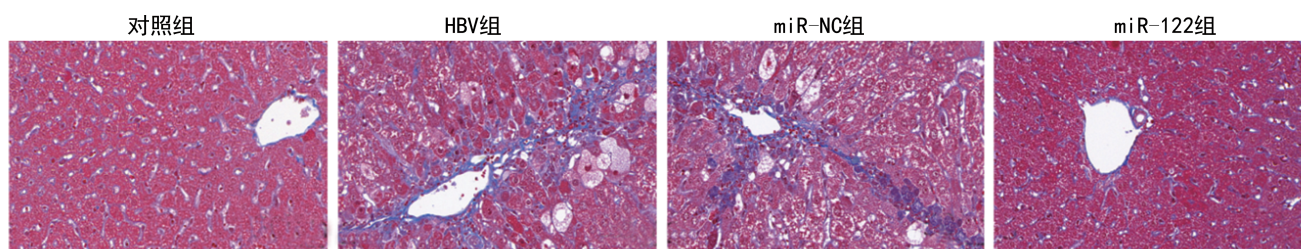


图 5 各组小鼠肝组织纤维化情况 (Masson 染色, $\times 100$)

3 讨 论

HBV 感染是引起肝脏疾病的主要原因之一,探讨针对 HBV 的抗病毒途径对开发严重肝脏疾病的有效预防及治疗方法至关重要。HBV 基因组长 3.2 kb, 包含 4 个基因: 核心蛋白 (HBc)、X 蛋白 (HBx)、表面蛋白 (HBs) 和 P 蛋白^[1]。HBV 作为一种非致细胞病变病毒, 优先在肝细胞中复制, 其进入肝细胞后, 病毒 DNA 被转移到细胞核, 形成共价闭环环状 DNA (cccDNA); cccDNA 生成病毒 RNA, 包括复制中间体, 称为前基因组 (pg) RNA 和 HBs、HBx 的病毒 mRNA。HBc、P 蛋白和 pgRNA 组装成核衣壳, P 蛋白利用其反转录酶活性将 pgRNA 转化为松弛环状 DNA, 而成熟的核衣壳在作为感染性病毒体分泌之前最终与 HBs 结合^[11]。然而, 迄今为止, 抗病毒免疫的机制和 HBV 感染的机制尚未完全阐明。近年来研究表明, miRNA 可作为 HBV 感染机制中的一类新型调节因子, 细胞 miRNA 能够通过直接或间接作用对 HBV 转录、复制及表达产生影响, 并在 HBV 感染相关疾病的发病机制中发挥重要作用^[12]。

目前, 关于 miRNA 调节 HBV 复制和表达的研究越来越多, 有研究表明, 一些 miRNA 能够抑制 HBV 复制, 从而阻碍疾病进展, 例如, miR-130a 可以通过靶向两种宿主因子——过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 和 PPAR γ 共激活因子-1 α 的表达来抑制 HBV 复制和表达^[13]; miR-98-5p 通过靶向核因子- κ B 诱导激酶抑制 HBV 的复制与分泌, 从而抑制 HBV 感染相关肝细胞癌的细胞增殖、迁移和侵袭^[14]; 在 HBV 感染相关肝细胞癌的细胞和组织中 miR-1271-5p 表达均下调, 过表达 miR-1271-5p 可通过靶向抑制水通道蛋白 5 来阻断 HBV 复制以及其诱导的肝细胞癌进展^[15]。miR-122 作为一种在肝脏中高表达的 miRNA, 其不仅在控制肝细胞生长和肿瘤转化方面发挥关键作用, 还参与调节代谢、肝硬化的发生与发展等^[16-17]。关于 miR-122 在 HBV 感染后的表达与作用已有报道, miR-122 在 HBV 感染相关肝细胞癌患者及 HBV 转染的人肝癌细胞系 Huh7 中表达明显降低, miR-122 能够与 HBV 的 pgRNA 双顺反子 mRNA 的高度保守区域结合, 阻止编码 HBV 聚合酶和 HBc, 进而抑制 HBV 表达和复制^[18]; 还有研究证实, miR-122 通过间接调控靶基因或有关机制来影响 HBV 复制, 例如增加人肝癌细胞系 Huh7 中 miR-

122 的水平可通过介导 p53 信号通路来降低 HBV RNA 和 DNA 的表达^[19]。但目前关于 miR-122 在体内 HBV 感染后的作用机制相关研究相对较少, 体内调节机制更加复杂, 而动物实验的有效结果是进行临床研究的支撑条件之一, 鉴于此, 本研究通过构建 HBV 感染小鼠模型, 经体内注射 miR-122 并观察模型小鼠 HBV 复制变化, 结果显示, miR-122 能够降低 HBV 感染小鼠血清 HBsAg 与 HBeAg 水平, 下调血清 HBV-DNA 的表达, 并抑制小鼠肝组织内 HBcAg 的表达。HBsAg、HBeAg 及 HBcAg 是评价 HBV 感染情况的常用标志物, 降低这些指标水平是延缓 HBV 感染相关疾病进展的重要措施。HBsAg 和 HBeAg 是 HBV 基因组编码的两种主要抗原, 这两种抗原存在不仅会导致免疫耐受, 还会导致肝细胞癌发病率升高^[20]。

HBV 在体内不断复制可通过异常免疫攻击介导肝脏炎症反应, 使 ALT 和 AST 水平升高, 影响肝功能, 甚至导致肝衰竭^[21]。本研究结果显示, miR-122 能够降低 HBV 感染小鼠血清 AST 和 ALT 水平, 减轻肝组织病理损伤与纤维化, 提示 miR-122 对 HBV 感染小鼠的肝组织具有保护作用。此外, 经检测发现, miR-122 降低了 HBV 感染小鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-2 及 IL-6 的水平。现已知 HBV 感染可诱导机体免疫失衡, 使免疫细胞及其释放的细胞因子发生改变, 从而参与 HBV 感染期间的肝脏炎症反应, 最终促进肝细胞癌的发生、发展。炎症因子 TNF- α 、干扰素- γ 、IL-2、IL-6 和 IL-12 等的释放可促进细胞间的相互作用, 加重炎症反应^[22], 因此, 如何抑制炎症因子的释放以维持免疫平衡也是 HBV 感染相关疾病治疗的关键步骤。由此推测, miR-122 能够调控 HBV 感染小鼠后炎症因子的释放, 减轻炎症反应。

综上所述, 在 HBV 感染小鼠中, miR-122 能够明显抑制 HBV-DNA 在体内的复制与表达, 并抑制炎症因子的释放, 减轻肝组织损伤与纤维化, 发挥良好的肝脏保护作用, 该发现为 HBV 感染治疗提供了新思路。但本研究未对 miR-122 作用的分子靶点及详细机制进行深入研究, 后续将进一步探究。

参考文献

- [1] XU R, HU P, LI Y, et al. Advances in HBV infection and replication systems in vitro[J]. Virol J, 2021, 18(1): 105.

- [2] NGUYEN M H, WONG G, GANE E, et al. Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(2): e00046-19.
- [3] QU B, BROWN R J P. Strategies to inhibit hepatitis B virus at the transcript level[J]. Viruses, 2021, 13(7): 1327.
- [4] 刘志华. 对不确定期慢性 HBV 感染者应否抗病毒治疗的思考[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(12): 2780-2781.
- [5] YANG X, LI H, SUN H, et al. Hepatitis B virus-encoded microRNA controls viral replication[J]. J Virol, 2017, 91(10): e01919-16.
- [6] KOHNO T, TSUGE M, MURAKAMI E, et al. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA[J]. J Viral Hepat, 2014, 21(9): e89-97.
- [7] HUANG J Y, CHEN H L, SHIH C. MicroRNA miR-204 and miR-1236 inhibit hepatitis B virus replication via two different mechanisms[J]. Sci Rep, 2016, 6: 34740.
- [8] THAKRAL S, GHOSH K. MiR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir[J]. Curr Gene Ther, 2015, 15(2): 142-150.
- [9] SONG K, HAN C, DASH S, et al. MiR-122 in hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection[J]. World J Hepatol, 2015, 7(3): 498-506.
- [10] YAO X, LI Z, GONG X, et al. Total saponins extracted from *Abrus cantoniensis* Hance suppress hepatitis B virus replication in vitro and in rAAV8-1.3HBV transfected mice[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112366.
- [11] TAN M, BHADORIA A S, CUI F, et al. Estimating the proportion of people with chronic hepatitis B virus infection eligible for hepatitis B antiviral treatment worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2021, 6(2): 106-119.
- [12] SARTORIUS K, MAKAROVA J, SARTORIUS B, et al. The Regulatory role of microRNA in hepatitis-B virus-associated hepatocellular carcinoma (HBV-HCC) pathogenesis[J]. Cells, 2019, 8(12): 1504.
- [13] HUANG J Y, CHOU S F, LEE J W, et al. MicroRNA-130a can inhibit hepatitis B virus replication via targeting PGC1 α and PPAR γ [J]. RNA, 2015, 21(3): 385-400.
- [14] FEI X, ZHANG P, PAN Y, et al. MicroRNA-98-5p inhibits tumorigenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting NF- κ B-inducing kinase[J]. Yonsei Med J, 2020, 61(6): 460-470.
- [15] LI Z, MA L, DI L, et al. MicroRNA 1271 5p alleviates the malignant development of hepatitis B virus mediated liver cancer via binding to AQP5[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 386.
- [16] 张露, 秦利静, 侯鹏, 等. miR-122 与肝脏疾病的相关性研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2021, 42(4): 287-290.
- [17] SENGUPTA D, CASSEL T, TENG K Y, et al. Regulation of hepatic glutamine metabolism by miR-122[J]. Mol Metab, 2020, 34: 174-186.
- [18] QIAO D D, YANG J, LEI X F, et al. Expression of microRNA-122 and microRNA-22 in HBV-related liver cancer and the correlation with clinical features[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(4): 742-747.
- [19] LIU G, MA X, WANG Z, et al. Adenosine deaminase acting on RNA-1 (ADAR1) inhibits hepatitis B virus (HBV) replication by enhancing microRNA-122 processing[J]. J Biol Chem, 2019, 294(38): 14043-14054.
- [20] SALPINI R, BATTISTI A, PIERMATTEO L, et al. Key mutations in the C-terminus of the HBV surface glycoprotein correlate with lower HBsAg levels in vivo, hinder HBsAg secretion in vitro and reduce HBsAg structural stability in the setting of HBeAg-negative chronic HBV genotype-D infection[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 928-939.
- [21] HUANG C, LI Q, XU W, et al. Serum HBV RNA levels predict significant liver fibrosis in patients with chronic HBV infection[J]. Discov Med, 2020, 29(157): 119-128.
- [22] SARMATI L, MALAGNINO V. HBV infection in HIV-driven immune suppression[J]. Viruses, 2019, 11(11): 1077.

(收稿日期: 2022-02-10 修回日期: 2022-07-14)

(上接第 2873 页)

- [19] HUANG X L, ZHANG L, DUAN Y, et al. Association of Pentraxin 3 with autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis[J]. Arch Med Res, 2016, 47(3): 223-231.
- [20] VENOSA A, MALAVIYA R, GOW A J, et al. Protective role of spleen-derived macrophages in lung inflammation, injury, and fibrosis induced by nitrogen mustard[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 309(12): 1487-1498.
- [21] D'ALESSANDRO M, BERGANTINI L, CAMELI P, et al. Krebs von den Lungen-6 as a biomarker for disease severity assessment in interstitial lung disease: a comprehensive review[J]. Biomark Med, 2020, 14(8): 665-674.
- [22] 贺新伟, 骆琼珍, 尚颖, 等. CCL18 在结缔组织病相关间质性肺疾病 BALF 中的表达及临床意义[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(38): 2976-2981.

(收稿日期: 2022-03-11 修回日期: 2022-07-02)