HCV 感染患者血清 miR-199 和 miR-483 水平表达及其临床价值

王楷翔[1a]，曹 明[1a]，陈 晖[1b]，赵 娟[2]

（1. 保定市人民医院 a. 分子生物学实验室；b. 肝病科，河北保定 071000；2. 保定市第二中心医院检验科，河北涿州 072750）

摘 要：目的 探讨丙型肝炎病毒（HCV）感染患者血清 miR-199 及 miR-483 的表达，分析其对肝癌的诊断价值。**方法** 选取 121 例 HCV 感染患者和健康体检正常者 50 例作为研究对象，其中 HCV 感染患者分为慢性丙型肝炎（CHC）50 例、肝硬化 43 例和肝癌 28 例。检测各组血清 miR-199 及 miR-483 表达水平和 HCV-RNA 含量。应用 ROC 曲线分析 miR-199 及 miR-483 对肝癌的诊断价值。Pearson 相关分析 miR-199 与 miR-483 在 HCV 感染患者中的相关性。**结果** 肝癌组、肝硬化组和 CHC 组血清 miR-199（3.40±1.25，1.83±0.72，1.70±0.65 vs 0.80±0.14）及 miR-483（3.86±1.62，2.04±0.91，1.93±0.82 vs 0.71±0.08）表达水平均明显高于对照组，差异有统计学意义（t=11.904~16.825，均 P<0.001）。肝癌组血清 miR-199 及 miR-483 表达水平均明显高于 CHC 组和肝硬化组，差异均有统计学意义（t=11.604~14.817，均 P<0.001）。ROC 曲线显示，miR-199 及 miR-483 二者联合诊断肝癌的曲线下面积（0.922，95%CI：0.858 ~ 0.977）最大，其敏感度和特异度为 93.7% 和 86.4%。相关性分析显示，肝癌患者血清 miR-199 表达水平与 miR-483 呈正相关（r=0.803，P<0.001）。**结论** 血清 miR-199 及 miR-483 水平在 HCV 感染患者中明显升高，二者联合对诊断 HCV 感染导致的肝癌具有较好的诊断价值。

关键词：丙型肝炎；肝癌；微小核糖核酸 -199；微小核糖核酸 -483

中图分类号：R512.63；R392.11 **文献标识码：**A **文章编号**:1671-7414（2021）05-058-04

doi:10.3969/**j.issn.**1671-7414.2021.05.013

Expression and Clinical Value of Serum miR-199 and miR-483 in Patients with HCV Infection

WANG Kai-xiang[1a], CAO Ming[1a], CHEN Hui[1b], ZHAO Juan[2]

（1a. *Molecular Biology Laboratory*; 1b. *Department of Hepatology*, *Baoding People's Hospital*, *Hebei Baoding* 071000, *China*; 2. *Department of Clinical Laboratory*, *the Second Central Hospital of Baoding*, *Hebei Zhuozhou* 072750, *China*）

Abstract: Objective To investigate the expression of serum miR-199 and miR-483 in patients with hepatitis C virus (HCV) infection and analyze their diagnostic value for liver cancer. **Methods** The 121 patients with HCV infection and 50 healthy people were selected as the research objects. The patients with HCV infection were divided into 50 cases of chronic hepatitis C (CHC), 43 cases of liver cirrhosis and 28 cases of liver cancer. The expression levels of serum miR-199 and miR-483 and the content of HCV-RNA in each group were detected. ROC curve was used to analyze of miR-199 and miR-483 in the diagnosis of liver cancer. Pearson correlation analysis were used to analyze the correlation between miR-199 and miR-483 in HCV infected patients. **Results** The expression levels of miR-199（3.40 ± 1.25，1.83 ± 0.72，1.70 ± 0.65 vs 0.80 ± 0.14） and miR-483（3.86 ± 1.62，2.04 ± 0.91，1.93 ± 0.82 vs 0.71 ± 0.08） in liver cancer group, cirrhosis group and CHC group were significantly higher than those in the control group, the differences were statistically significant(t=11.904~16.825, all P<0.001). The expression levels of miR-199 and miR-483 in liver cancer group were significantly higher than those in CHC group and cirrhosis group, the differences were statistically significant(t=11.604~14.817, all P<0.001). ROC curve showed that the area under curve (0.922, 95%CI：0.858~0.977) of the combined diagnosis of liver cancer with miR-199 and miR-483 were the largest, and its sensitivity and specificity were 93.7% and 86.4%, respectively. Correlation analysis showed that the expression level of serum miR-199 in liver cancer group was positively correlated with miR-483 (r=0.803，P<0.001). **Conclusion** The expression levels of serum miR-199 and miR-483 in patients with HCV infection increased significantly, and the combination of the two has a good value in the diagnosis of liver cancer caused by HCV infection.

基金项目：保定市科学计划与发展指导计划项目（18ZF043）。

作者简介：王楷翔（1980–），男，本科，副主任检验师，主要从事感染性疾病检验诊断研究，E-mail：yunyan-w@163.com。

Keywords：hepatitis C; liver cancer; miR-199; miR-483

丙型肝炎病毒（hpatitis C virus, HCV）可导致慢性丙型肝炎（chronic hepatitis C, CHC）、肝硬化，部分患者发展为肝癌，是全球范围内重大的公共卫生问题[1-2]。微小核糖核酸（microRNA，miRNA）是一类高度保守的非编码 RNA，其在丙型肝炎中存在异常表达，可能在丙型肝炎的发病机制中发挥着重要的作用[3-4]。近期的研究指出，miR-199 及 miR-483 表达水平与 HCV 所致的相关肝炎有关，在肝脏疾病的发病机制和进展中起着重要作用，是诊断和监测肝脏疾病进展的潜在无创生物标志物[5-6]。为此，本研究通过检测血清 miR-199 及 miR-483 水平在 HCV 感染肝病患者中的表达情况，分析 miR-199 及 miR-483 对肝癌的诊断价值，旨在为该病的诊疗提供帮助。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取保定市人民医院 2018 年 1 月 ~ 2020 年 12 月收治的 121 例 HCV 感染患者，其中男性 70 例，女性 51 例，年龄 28 ~ 68（49.25 ± 9.70）岁。121 例 HCV 感染患者中慢性丙型肝炎 50 例，肝硬化 43 例，肝癌 28 例。纳入标准：CHC 的诊断参考《丙型肝炎防治指南》[7]；排除标准：存在其他类型肝病及感染性疾病。另设计对照组 50 例为体检正常者，其中男性 27 例，女性 23 例，年龄 30 ~ 65（48.60 ± 9.35）岁。各组年龄、性别比较差异无统计学意义（P>0.05）。

1.2 仪器与试剂 SLAN96P 型荧光定量 PCR 仪（上海宏石公司），PCR 试剂盒、RNeasy 试剂盒、miRNA Easy 试剂盒和 Trizol 试剂盒均购自上海生工生物工程公司，贝克曼 Au680 全自动生化分析仪。

1.3 方法

1.3.1 丙肝病毒载量（hepatitis C virus-RNA，HCV-RNA）检测：所有研究对象在治疗前采集静脉血 5ml，离心分离血清，HCV-RNA 载量使用荧光定量 PCR 仪检测。

1.3.2 miR-199 及 miR-483 检测：使用荧光定量 PCR 仪检测 miR-199 及 miR-483，反应体系为 20 μl：10 μl TaqMan 通用混合物溶液（2 ×），1 μl 引物及探针 Mix（20 ×），1.33 μl 反向转录脱氧核糖核酸，7.67 μl 双蒸水。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 miR-199 及 miR-483 水平。

1.3.3 相关检测：丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平采用贝克曼 Au680 全自动生化分析仪及配套试剂检测。

1.4 统计学分析 采用 SPSS22.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 t 检验。应用受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线分析 miR-199 及 miR-483 诊断肝癌的价值。相关性分析采用 Pearson 相关。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 ALT，AST 及 HCV-RNA 水平比较 见表 1。肝癌组、肝硬化组和 CHC 组 ALT 及 AST 水平均明显高于对照组，差异有统计学意义（t=12.316, 10.972, 9.625, 13.417, 11.805, 10.611, 均 P<0.001）。各组间 HCV-RNA 比较，差异无统计学意义（t=0.715, 0.924, 0.583, 均 P>0.05）。

表 1 各组 ALT，AST 及 HCV-RNA 水平比较

项目	对照组（n=50）	CHC 组（n=50）	肝硬化组（n=43）	肝癌组（n=28）	F	P
ALT（U/L）	16.72 ± 5.70	97.46 ± 25.90	101.73 ± 30.82	98.75 ± 31.50	7.936	<0.001
AST（U/L）	24.28 ± 7.04	88.73 ± 22.50	92.46 ± 24.37	91.30 ± 22.84	8.205	<0.001
HCV-RNA（Ig IU/ml）	–	6.42 ± 1.61	6.27 ± 1.58	6.53 ± 1.71	1.194	0.217

2.2 各组血清 miR-199 及 miR-483 表达水平比较 见表 2。与对照组比较，肝癌组、肝硬化组和 CHC 组血清 miR-199 及 miR-483 表达水平均明显升高，差异有统计学意义（t=14.704，12.151，11.904，16.825，13.512，13.106，均 P<0.001）；且血清 miR-199 及 miR-483 表达水平在肝癌组均明显高于 CHC 组和肝硬化组，差异有统计学意义（t=12.553，11.604，14.817，13.216，均 P<0.001）。

表 2 各组血清 miR-199 及 miR-483 表达水平比较（$\bar{x} \pm s$）

项目	对照组（n=50）	CHC 组（n=50）	肝硬化组（n=43）	肝癌组（n=28）	F	P
miR-199	0.80 ± 0.14	1.70 ± 0.65	1.83 ± 0.72	3.40 ± 1.25	15.736	<0.001
miR-483	0.71 ± 0.08	1.93 ± 0.82	2.04 ± 0.91	3.86 ± 1.62	18.227	<0.001

2.3 miR-199 及 miR-483 诊断肝癌的价值 见表 3 和图 1。miR-199 及 miR-483 诊断肝癌的最佳截断值为 2.28 和 2.53，二者联合诊断肝癌的曲线下面积（0.922，95%CI：0.858~0.977）最大，明显高于单项 miR-199（0.811，95%CI：0.753~0.870）及 miR-483（0.850，95%CI：0.788~0.912），差异有统计学意义（t=6.270，5.812，均 P<0.05），其敏感度和特异度为 93.7% 和 86.4%。

表 3　miR-199 及 miR-483 诊断肝癌的价值

项目	最佳截断值	曲线下面积（95%CI）	敏感度（%）	特异度（%）	阳性预测值（%）	阴性预测值（%）
miR-199	2.28	0.811（0.753 ~ 0.870）	83.5	75.2	79.0	80.4
miR-483	2.53	0.850（0.788 ~ 0.912）	86.2	80.3	83.5	84.2
二者联合	–	0.922（0.858 ~ 0.977）	93.7	86.4	89.0	91.6

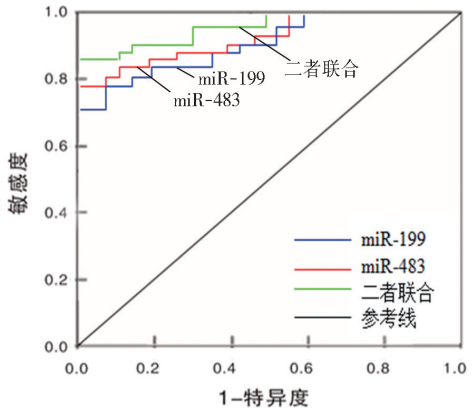

图 1　miR-199 及 miR-483 诊断肝癌的 ROC 曲线

2.4　miR-19 与 miR-483 的相关性分析　见图 2。Pearson 相关分析显示，CHC 组血清 miR-199 表达水平与 miR-483 呈正相关（r=0.725，P<0.001），肝癌组血清 miR-199 表达水平与 miR-483 呈正相关（r=0.803，P<0.001）。

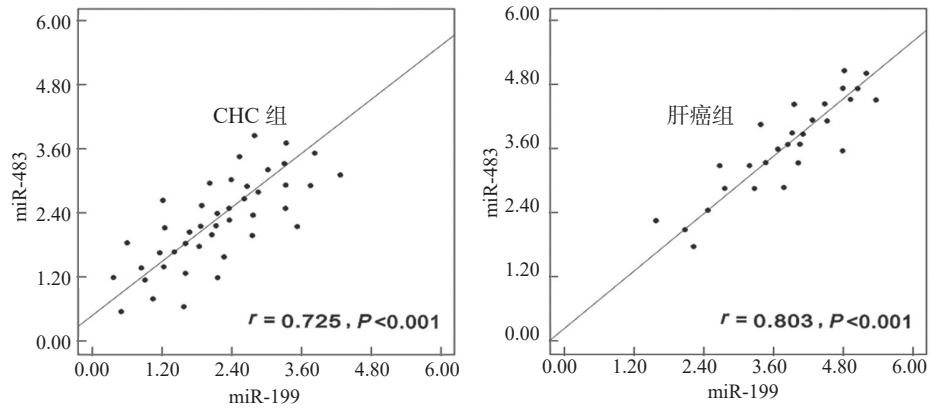

图 2　血清 miR-199 表达水平与 miR-483 的相关性

3　讨论

miRNA 作为基因表达的转录后调节因子，在丙型肝炎的发生发展中发挥了重要的作用[8]。国内外研究表明，miRNA 具有调节肝脏的生理和病理功能，其表达改变与肝脏代谢失调、肝损伤、肝纤维化和肿瘤的发生发展有关，使得 miRNA 成为诊断和治疗肝脏疾病的重要策略，未来可能是肝癌诊断、治疗和预后判断的无创性生物标志物[9-10]。EL-HEFNY 等[11]研究发现，miR-199 异常表达与肝癌细胞增殖、细胞周期和凋亡有关，可能在肝脏疾病的进展中发挥潜在作用，是诊断和监测肝脏疾病进展一个有用的生物标志物。TANG 等[12]研究认为，miR-483 与肝癌的发生有关，在肝癌细胞增殖、迁移、侵袭中发挥促进作用，其高表达是肝癌患者生存期缩短的独立预测因子，可作为肝癌的诊断和预后评估的潜在标志物。

本研究显示，与对照组比较，肝癌组、肝硬化组和 CHC 组血清 miR-199 及 miR-483 表达水平均明显升高，且肝癌组血清 miR-199 及 miR-483 表达水平升高最明显。提示 miR-199 及 miR-483 高表达促进了病情进展，其在丙型肝炎的发展过程中具有一定的促进作用。有研究指出，miRNA 在 HCV 感染过程中参与了病毒复制，这些 miRNA 可以直接靶向 HCV 基因组参与调控丙型肝炎的发病，与肝细胞癌的发生和发展有关[13]。LU 等[14]研究显示，miR-483 在肝癌组织中显著上调，并能显著促进肝癌细胞在体外的迁移和侵袭，是肝癌侵袭转移的重要调控因子和复发的独立危险因素，可作为评估肝癌复发风险的生物标志物。肝癌是最常见的恶性肿瘤之一，发病率和死亡率都很高，寻找新的、可靠的、无创的生物标志物对提高肝癌的早期诊断具有重要意义。本研究 ROC 曲线显示，miR-199 及 miR-483 二者联合诊断肝癌的曲线下面积最大，其敏感度为 93.7%，特异度为 86.4%，相关分析结果也显示，肝癌组 miR-199 与 miR-483 呈显著正相关。这说明 miR-199 及 miR-483 二者联合检测有助于提高肝癌诊断的价值，有望作为肝癌诊断的生物学指标。JIAO 等[15]研究发现，miR-199 是反映肝损伤的一种新的生物标志物，与肝功能密切相关，对评估肝癌患者预后和反映治疗效果具有很好的价值。另有研究表明，miR-483 表达水平在肝癌的不同生物学过程中起着重要作用，其在肝癌患者中的表达水平

高于肝硬化患者，可作为诊断 HCV 感染后肝癌患者的潜在生物标志物 [16]。

综上所述，血清 miR-199 及 miR-483 水平在 HCV 感染患者中明显升高，而且在肝癌患者中升高最明显，miR-199 及 miR-483 二者联合检测有助于提高肝癌诊断的价值，可能是肝癌治疗的潜在靶向。

参考文献：

[1] 陈仲丹. 全球丙型肝炎消除的进展、挑战及应对 [J]. 中华肝脏病杂志 ,2020,28(10):812-816.
CHEN Zhongdan. Progress, challenges and countermeasures of global hepatitis C elimination [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2020, 28 (10): 812-816.

[2] KAPLAN D. Hepatitis C virus[J]. Annals of Internal Medicine, 2020, 173(5): ITC33-ITC48.

[3] CABRAL B C A, HOFFMANN L, BOTTARO T, et al. Circulating microRNAs associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C patients[J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2020, 24(9): 100814.

[4] WEIS A, MARQUART L，CALVOPINA D A. Serum microRNAs as biomarkers in hepatitis C: preliminary evidence of a microRNA panel for the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(4): 864.

[5] MOURAD L, EL-AHWANY E, ZOHEIRY M, et al. Expression analysis of liver-specific circulating microRNAs in HCV-induced hepatocellular Carcinoma in Egyptian patients[J]. Cancer Biology & Therapy, 2018, 19(5): 400-406.

[6] GAILHOUSTE L, LIEW L C, YASUKAWA K, et al. MEG3-derived miR-493-5p overcomes the oncogenic feature of IGF2-miR-483 loss of imprinting in hepatic cancer cells[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(8): 553.

[7] 中华医学会肝病学分会 , 中华医学会感染病学分会 . 丙型肝炎防治指南 (2019 年版)[J]. 中华传染病杂志 ,2020,38(1):9-28.
Chinese Society of Hepatology, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of hepatitis C (2019 version) [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2020, 38 (1): 9-28.

[8] LI Jian, JIN Boxun, WANG Tiezheng ,et al. Serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for HCV-related hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomarkers : Section A of Disease Markers, 2019, 26(4): 501-512.

[9] 邱颖谦，陈永林. 微小 RNA (microRNA) 在肝细胞肝癌发生发展中的作用研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学 , 2020, 39 (1): 485-490.
QIU Yingqian，CHEN Yonglin. Advances in the role of microRNA during the development of hepatocellular carcinoma [J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39 (1): 485-490.

[10] CHEN Qinlian, XIE Chunfeng, FENG Kunliang, et al. microRNAs carried by exosomes promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis of liver cancer cells[J]. American Journal of Translational Research, 2020, 12(10): 6811-6826.

[11] EL-HEFNY M, FOUAD S, HUSSEIN T, et al. Circulating microRNAs as predictive biomarkers for liver disease progression of chronic hepatitis C (genotype-4) Egyptian patients[J]. Journal of Medical Virology, 2019, 91(1): 93-101.

[12] TANG Shaohui, CHEN Yanfang, FENG Shufen, et al. MiR-483-5p promotes IGF-II transcription and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(59): 99871-99888.

[13] PEZZUTO F, BUONAGURO L, BUONAGURO F M, et al. The role of circulating free DNA and microRNA in non-invasive diagnosis of HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 1007.

[14] LU Xinyuan, CHEN Di, GU Xiaoyuan, et al. Predicting value of ALCAM as a target gene of microRNA-483-5p in patients with early recurrence in hepatocellular carcinoma[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 973.

[15] JIAO Xiaoyang, FAN Zhicheng, CHEN Huanzhu, et al. Serum and exosomal miR-122 and miR-199a as a biomarker to predict therapeutic efficacy of hepatitis C patients[J]. Journal of Medical Virology, 2017, 89(9): 1597-1605.

[16] HASSAN A S, ELGENDY N A, TAWFIK N, et al. Serum miR-483-5p and miR-133a as biomarkers for diagnosis of hepatocellular carcinoma Post-Hepatitis C infection in Egyptian patients[J]. The Egyptian Journal of Immunology / Egyptian Association of Immunologists, 2019, 26(2): 31-40.

收稿日期：2021-01-17 **修回日期：**2021-05-29

（上接第 54 页）

[12] KOOZI H, LENGQUIST M, FRIGYESI A. C-reactive protein as a prognostic factor in intensive care admissions for sepsis: A swedish multicenter study[J]. Journal of Critical Care, 2020, 56(4): 73-79.

[13] ZHAO Danna, LI Shilei, CUI Jie, et al. Plasma miR-125a and miR-125b in sepsis: Correlation with disease risk, inflammation, severity, and prognosis[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2020, 34(2): e23036.

[14] ZHANG Wenping, JIA Jianchao, LIU Zi, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3.0[J]. BMC Pulmonary Medicine, 2019, 19(1): 93.

[15] 桑珍珍，高杰，贾春梅，等. 血清 miRNA-122a 和降钙素原对脓毒症相关肝损伤早期诊断及预后评估的临床价值 [J]. 实用医学杂志，2019，35（16）：2611-2614.
SANG Zhenzhen, GAO Jie, JIA Chunmei, et al. Clinical value of serum miRNA-122a and PCT in the early diagnosis and prognosis of sepsis-related liver injury [J]. The Journal of Practical Medicine, 2019,35 (16): 2611-2614.

收稿日期：2021-01-13 **修回日期：**2021-05-04