

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.20.005

慢性乙型病毒性肝炎湿热类证潜在 miRNA 表达谱研究*

苏悦¹, 罗雪梅², 彭杨芷¹, 党思捷¹, 刘西洋¹, 姜岑^{1△}

(1. 成都中医药大学 610075; 2. 四川省雅安市中医院 625000)

[摘要] **目的** 筛选慢性乙型病毒性肝炎(CHB)湿热类证潜在 miRNA 标志物。**方法** 运用基因芯片技术,检测 CHB 脾胃湿热证组、肝胆湿热证组、脾虚湿热证组、隐证组及健康对照组的 miRNA,分析获得湿热类证潜在 miRNA 标志物,并对其进行靶基因预测和功能分析。**结果** 获得脾胃湿热证潜在 miRNA 表达谱 9 条、肝胆湿热证潜在 miRNA 表达谱 14 条、脾虚湿热证潜在 miRNA 表达谱 17 条;hsa-miR-1260a 为脾胃湿热证、肝胆湿热证、脾虚湿热证共有的 miRNA,且均表达上调,差异倍数分别是 6.130 02、11.003 02、6.827 84。对其进行靶基因预测及功能富集分析,共获得 3 302 条靶基因,功能涉及肝素钠反应、Wnt 信号通路等方面。**结论** CHB 湿热类证潜在 miRNA 表达谱为 hsa-miR-1260a。

[关键词] 慢性乙型病毒性肝炎;湿热类证;miRNA;生物学标志物

[中图分类号] R229 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)20-2663-03

Study on expression profile of potential miRNA of chronic hepatitis B with dampness-heat syndrome*

SU Yue¹, LUO Xuemei², PENG Yangzhi¹, DANG Sijie¹, LIU Xiyang¹, JIANG Cen^{1△}

(1 Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610075, China;

2. T. C. M. Hospital of Ya'an, Ya'an, Sichuan 625000, China)

[Abstract] **Objective** To screen out the potential miRNA biomarker of chronic hepatitis B with dampness-heat syndrome patients. **Methods** Microarray technology was used to detect chronic hepatitis B miRNA in the spleen-stomach dampness-heat syndrome group, the liver and gallbladder dampness-heat syndrome group, the spleen deficiency and dampness-heat syndrome group, the hidden syndrome group and the control group, analyzed the potential miRNA markers of dampness-heat syndrome, and the target genes were predicted and the functions were analyzed. **Results** Nine potential mRNA biomarkers were found in the spleen-stomach dampness-heat syndrome, 14 potential mRNA biomarkers were found in the liver and gallbladder dampness-heat syndrome, 17 potential mRNA biomarkers were found in the spleen deficiency and dampness-heat syndrome; hsa-miR-1260a was a mutual regulation miRNA among the three kinds of dampness-heat syndrome, and all expressions were up-regulated, the differences were 6.130 00, 11.003 02, and 6.827 84 respectively. The target gene prediction and enrichment analysis showed that a total of 3 302 target genes were obtained, the functions involved heparin sodium response and Wnt signaling pathways. **Conclusion** The potential miRNA biomarker of chronic hepatitis B with dampness-heat syndrome is hsa-miR-1260a.

[Key words] chronic hepatitis B; dampness-heat syndrome; miRNA; biological marker

慢性乙型病毒性肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是 HBV 持续感染引起的慢性肝脏炎性疾病,病毒性 HBV 表面抗原(HBsAg)和(或)HBV-DNA 持续阳性 6 个月以上。病毒性肝炎是一项世界性的公共卫生问题,据 WHO 2017 年报道,全球约有 2.57 亿 HBV 感染者(HBV 表面抗原阳性),仅 2015 年,全球 HBV 及其并发的肝硬化和肝细胞癌等约致 88.7 万人死亡。在我国,CHB 的发病率也长期居于法定传染病的前列,国家卫生健康委员会疾病预防控制局(CDC)2017 年 6 月的数据显示,新增 HBV 约占新增甲乙类传染

病总数的 30.8%,CHB 的发病人数及病死率仍处于较高的水平,给社会经济及人民的健康带来较为沉重的负担,深入开展 CHB 的防治工作仍十分必要。

中医药是中华文明的重要载体,数千年来为华夏民族的健康保驾护航,中医重视“治未病”,在 CHB 的防治中具有自身的特色和优势,在准确辨证的前提下遣方用药,能起到改善患者生存质量,降低肝纤维化的发生,促进肝功能恢复的作用。中医辨证讲究四诊合参,但由于 CHB 证候复杂多变,给辨证带来了较大难度,寻找客观的生物学标志物有利于提高辨证的准

* 基金项目:“十二五”传染病国家科技重大专项(2012ZX10005001),四川省中医药管理局项目(319787)。 作者简介:苏悦(1990—),博士研究生,从事温病与感染病研究。 △ 通信作者, E-mail:jiangcen517@163.com。

确性,充分发挥中医药防治 CHB 的优势。大量研究发现,湿热类证(脾胃湿热证、肝胆湿热证、中焦湿热证、湿热内蕴证、脾虚湿热证等)是 CHB 的常见证型^[1-3],因此本研究选择湿热类证中的脾胃湿热证、肝胆湿热证、脾虚湿热证作为研究对象,筛选其共有的 miRNA,探索湿热类证潜在的表达谱。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究 50 例患者来源于成都市公共卫生中心及上海中医药大学附属曙光医院。设脾胃湿热证组、肝胆湿热证组、脾虚湿热证组、无证可辨组、健康对照组,每组各 10 例。各组年龄、性别等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 纳入标准

1.2.1 CHB 的纳入标准 血清 HBsAg 阳性至少在 6 个月以上;病毒载量阳性;1 年之内血清学检查丙氨酸氨基转移酶(ALT)持续或反复升高;年龄在 18~60 岁的患者;签署知情同意书,自愿加入实验研究,依从性较为满意者;在试验进行过程中无计划迁离当前的试验地点。符合《慢性乙型肝炎防治指南》(2010 年版)^[4]的规定,推荐接受抗病毒治疗的患者。

1.2.2 中医证型的纳入标准

1.2.2.1 脾胃湿热证组 主证:(1)脘腹胀闷;(2)苔黄腻。次证:(1)恶心,厌油,纳呆;(2)身目发黄,色泽鲜明或尿黄;(3)大便黏滞臭秽。辨证要求:具备以上所有主证的临床证素,即属本证;具备主证(1)及次证(1)、(2)者;具备主证(2)及次证 3 项中的任何 2 项者。

1.2.2.2 肝胆湿热证组 主证:(1)胁肋胀痛;(2)舌苔黄腻。次证:(1)纳呆呕恶,厌油腻;(2)身目发黄;(3)尿黄。辨证要求:具备以上所有主证的临床证素,即属本证;具备主证(1)及次证 3 项中的任何 2 项者,即属本证;具备主证(2)及次证(1)、(2)者,即属本证。

1.2.2.3 脾虚湿热证组 主证:乏力;纳食减少;舌苔黄。次证:腹胀脘闷;少气懒言;口苦黏;恶心厌油;四肢倦怠;尿黄;大便干结或溏垢或先干后溏;脉弦数或沉弦。辨证要求:主症符合 3 项,次症符合 1 项以上。

1.2.2.4 无证可辨组 符合 CHB 的诊断,但症状、体征隐匿,中医四诊难以明辨证型。

1.2.2.5 健康对照组 年龄 18~60 岁,身体质量指数 $19 \sim 24 \text{ kg/m}^2$;不嗜烟酒;体格检查无异常,无心、肺、肝、肾、消化道、代谢异常等病史;女性志愿者排除怀孕、月经期。

1.3 排除标准 合并其他类型肝炎病毒和/或 HIV 感染者;合并肝硬化、恶性肿瘤者;确诊为重型肝炎者(含急性、亚急性及慢性重症肝炎);合并药物性或中毒性肝损害、自身免疫性肝炎、遗传-代谢性肝脏疾病;合并有心、肺、肾、内分泌、血液等严重疾病者;怀孕妇

女,哺乳期妇女;有精神疾患,符合中国精神障碍分类与诊断(CCMD-3)标准;过敏体质或已知对中药某些成分过敏的患者;有其他中医类兼夹证者。符合以上任何 1 条,均不能纳入本研究。

1.4 方法 病例纳入后,采集清晨空腹肘静脉全血,进行标本预处理后得到血浆 1 mL,由成都博奥独立医学实验室有限公司的专业技术人员进行检测。本研究采用基因芯片技术,运用 Agilent19.0 芯片进行检测,通过对比 5 组 miRNA 的表达情况,筛选出差异显著的 miRNA 作为 CHB 3 种湿热类证的差异 miRNA,将这些 miRNA 在 MiRNA Targets Prediction (v2.0 beta)数据库中(Targetscan、miRDB、TarBase、miRTarBase)预测靶基因,然后将筛选出来的靶基因导入富集分析系统里(数据包为 clusterProfiler 来自 R/bioconductor),采用 Fisher 精确检验,挑选落在相同 GO 与 pathway 上的基因数目大于或等于 4, $P < 0.05$,富集程度从大到小的前 30 个结果,以探索差异 miRNA 的功能。

2 结果

2.1 CHB 湿热类证潜在 miRNA 表达谱 脾胃湿热证组与健康对照组、隐证组比较,共筛选出具有显著差异的 miRNA 9 条($P < 0.05$;差异倍数大于 2.0),其中 6 条表达上调,3 条表达下调;肝胆湿热证组与健康对照组、隐证组比较,共筛选出具有显著差异的 miRNA 14 条,均表达上调;脾虚湿热证与健康对照组、隐证组比较,共筛选出具有显著差异的 miRNA 17 条($P < 0.05$;差异倍数大于 2.0),均为表达上调。hsa-miR-1260a 为脾胃湿热证、肝胆湿热证、脾虚湿热证 3 组共有的 miRNA($P < 0.05$;差异倍数大于 2.0),在各组中均表达上调,见表 1。

表 1 3 组湿热证 hsa-miR-1260a 的表达情况

组别	P	差异倍数(abs)	调控方向
脾胃湿热证组	0.02210	6.13002	up
肝胆湿热证组	0.00077	11.00302	up
脾虚湿热证组	0.03363	6.82784	up

2.2 CHB 湿热类证潜在 miRNA 表达谱的靶基因预测及富集分析结果 本研究共获得 hsa-miR-1260a 靶基因 3 302 条,GO 富集分析显示,其主要与肝素钠反应、顺铂反应、肾素分泌、上调 Wnt 信号通路,上调纤维细胞生长因子受体信号通路,正向调节多巴胺的分泌,上调碱性磷酸酶的活性、核包涵体、非膜生成蛋白质酪氨酸磷酸酶活性,负向调节 IL-17 的生成、血管内皮生长因子激活受体活性、小脑浦肯野细胞分化,活化蛋白激酶活性等具有相关性。

KEGG 富集分析结果显示,hsa-miR-1260a 靶基因主要与 Wnt 信号通路、维生素 B₆ 代谢、泛素介导的蛋白水解、甲状腺癌、内质网的蛋白进程、磷脂酰环己

六醇信号系统、其他类 O-聚糖的合成、烟酸盐与烟酰胺的代谢、黏蛋白 O-聚糖的合成、黑素生成、赖氨酸退化、亚油酸代谢、肌醇磷酸代谢、肥厚性心肌病、Hedgehog 信号通路、粘多糖合成、乙醚代谢、基底细胞瘤、 α 亚麻酸代谢、脂肪细胞因子通路等具有相关性。

3 讨 论

中医学并无 CHB 病名,然据其临床表现,可归属于“黄疸”“胁痛”等病的范畴,中医将 CHB 的病因概括为湿热、气滞、血瘀、正虚等方面,其中“湿热”最为常见也最为重要。早在《素问》中就提出“湿热相搏,民病黄疸”,湿性重着,郁久化热,湿热胶阻,胆汁不循常道,出于白睛、肌肤、小溲,则发为黄疸;湿热阻滞气机,故而胁痛、脘腹胀;湿热阻滞,脾失健运,而见纳差、恶心、厌油;湿热下注,则出现大便黏腻、小便黄赤;湿热搏结脉道、上犯于舌,可见脉滑数、舌红苔黄腻。CHB 以湿热留恋部位的差异,又有脾胃湿热证、肝胆湿热证、湿热内蕴证等,或有素体脾虚,兼受湿热疫毒外袭所发之脾虚湿热证,其病因却均不离“湿热”二字。因此,笔者以“湿热类证”概括上述证型,试图运用现代生物学技术探寻其潜在的生物学本质。

随着系统生物学、生物信息学的发展,近年来运用现代生物学技术探索中医证候生物学本质的研究很多,均从不同的角度寻找了证候的生物学标志物,有利于中医证候理论的深化。如刘畅^[5]用代谢组学方法研究湿热证“异病同证”的物质基础,发现 CHB 差异物质 27 种、非酒精性脂肪性肝病 28 种、慢性肾小球肾炎 24 种,3 种疾病的湿热证共同变化的物质为肌苷、鸟苷、天门冬氨酸、油酸甘油酯、乳酸盐。魏崑等^[6]运用血浆蛋白质组学对 CHB 湿热中阻证的研究发现,差异表达蛋白质血清载脂蛋白 A1(APO-A1)、载脂蛋白 A4(APO-A4)可潜在作为 CHB 湿热中阻证诊断、预后标记物及治疗靶点。党思捷等^[7]从转录组学角度,探索了 CHB 脾胃湿热证与肝胆湿热证生物学基础的差异。本研究针对湿热类证中较为常见的脾胃湿热证、肝胆湿热证,虚实夹杂性质的脾虚湿热证进行研究,从 miRNA 的角度探索湿热类证的潜在生物学表达谱,是对中医证候生物学标志物的又一尝试。

miRNA 是一类 20~24 nt 的非编码 RNA,通过影响 mRNA 的结构和转录功能,参与多细胞器官基因表达的转录后调控。miRNA 在人体生理、病理过程中发挥重要作用^[8],可作为潜在的诊断标志物^[9]。

hsa-miR-1260a 在既往的研究报道中,有学者发现其在强制性脊柱炎^[10]患者中表达下调,在狼疮肾^[11]中表达上调,但这些研究均未涉及中医证型。本研究发现,hsa-miR-1260a 同时存在于 CHB 典型的 3 种湿热类证中,且于各组中 FC 值存在着差异,说明其在湿热类证中具有相对的特异性,有助于辅助 CHB 湿热类证的诊断及鉴别诊断,对其进行进一步研究也有利于揭示 CHB 湿热类证的本质。本研究对 hsa-miR-1260a 进行靶基因预测,得到 3 302 条靶基因,功能分析发现其参与调控 Wnt 信号通路、维生素 B₆ 的代谢、肝素钠反应等,其调控湿热类证形成的机制仍待进一步的研究。

参考文献

- [1] 杨振. HBeAg 阴性慢性乙型肝炎中医证素分布特点及客观指标相关性研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2015.
- [2] 贺淑萍. 肝病流行病学特征分析及慢性乙型肝炎症状分布示范研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2015.
- [3] 王恩成. 基于因子和聚类分析的慢性乙型肝炎中医证候特征研究[D]. 成都:成都中医药大学,2013.
- [4] 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华内科杂志,2011,3(2):1-12.
- [5] 刘畅. 基于代谢组学方法的湿热证“异病同证”物质基础研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2015.
- [6] 魏崑,刘友平,郭芳宏,等. 慢性乙型肝炎湿热中阻证血浆蛋白质组学分析[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(10):1341-1345.
- [7] 党思捷,罗雪梅,苏悦,等. 转录组学在慢性乙型肝炎湿热类证鉴别中的应用[J]. 中华中医药杂志,2017,32(4):1516-1519.
- [8] CHEN X, MA L, CAI X, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18(10):997-1006.
- [9] TAYLOR D D, GERCEL-TAYLOR C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(1):13-21.
- [10] 吕颖. 强直性脊柱炎患者外周血 microRNA 表达谱的研究[D]. 上海:中国人民解放军第二军医大学,2014.
- [11] HADAVAND M, BINMADI N, ZHOU H, et al. Identification of microRNA predictive of outcome in lupus nephritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(9):2660-2661.

(收稿日期:2017-12-29 修回日期:2018-03-11)