

• 临床检验研究论著 •

## 原发性胆汁性肝硬化患者单个核细胞中 lncRNA AK053349 表达增高及意义\*

张 蕾<sup>1</sup>, 黄元兰<sup>2#</sup>, 王 慧<sup>1</sup>, 孔 伟<sup>2</sup>, 叶 辛<sup>3</sup>, 陈 燕<sup>1</sup>, 刘挺挺<sup>1</sup>, 秦 琴<sup>1▲</sup>, 邓安梅<sup>1△</sup>

(1. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433; 2. 第二军医大学长征医院, 上海 200003; 3. 第二军医大学长海医院输血科, 上海 200433)

**摘要:**目的 研究 lncRNA AK053349 是否参与了原发性胆汁性肝硬化(PBC)的发病机制。方法 采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测了 42 例 PBC 患者及 40 例健康者外周血单个核细胞(PBMC)中 lncRNA AK053349 的相对表达量, 分析了其与疾病特征的关系。结果 PBC 患者外周血 PBMC 中 lncRNA AK053349 表达较健康对照组明显增高( $P < 0.01$ ), 且随疾病分期的不同其表达量有明显变化( $P < 0.05$ ); lncRNA AK053349 表达与 Mayo 危险评分呈正相关( $r^2 = 0.33$ ,  $P < 0.01$ )。结论 lncRNA AK053349 可能参与了 PBC 的发病机制, 同时还是 PBC 的潜在标志物。

**关键词:**肝硬化; 胆汁性; 长链非编码 RNA; 逆转录聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)20-2656-02

### Increased expression of lncRNA AK053349 in peripheral blood mononuclear cells from patients with primary biliary cirrhosis and its clinical significance\*

Zhang Lei<sup>1</sup>, Huang Yuanlan<sup>2#</sup>, Wang Hui<sup>1</sup>, Kong Wei<sup>2</sup>, Ye Xin<sup>3</sup>, Chen Yan<sup>1</sup>, Liu Tingting<sup>1</sup>, Qin Qin<sup>1▲</sup>, Deng Anmei<sup>1△</sup>

(1. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 3. Department of Blood Transfusion, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract: Objective** To explore whether lncRNA AK053349 may play a role in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis (PBC). **Methods** The expression of lncRNA AK053349 in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in 42 PBC patients and 40 healthy individuals was detected by RT-PCR. The association between lncRNA AK053349 and clinical characteristics of PBC was analyzed. **Results** The expression of lncRNA AK053349 in PBMC from patients with SLE was increased significantly in contrast to the healthy controls ( $P < 0.01$ ). And with the different stages of disease, the expression was significantly different ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** lncRNA AK053349 may play a role in the pathogenesis of PBC and is a potential marker for it.

**Key words:** liver cirrhosis, biliary; long noncoding RNAs; reverse transcriptase polymerase chain reaction

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种以肝小叶汇管区淋巴细胞浸润、小胆管炎性破坏、血清特征性抗线粒体抗体(AMA)阳性为特征的自身免疫性肝病<sup>[1]</sup>。流行病学调查显示,在我国 40 岁以上的人群中, PBC 在男性中的发病率约为 4.92/万, 女性中的发病率约为 15.58/万<sup>[2]</sup>。研究表明, 在环境或遗传因素的作用下, 免疫细胞分化、发育与活化过程中固有的精细调节机制被打破, 导致免疫系统对自身组织产生免疫应答, 是该病发生与发展的根本原因<sup>[3-4]</sup>, 但其分子机制还有待进一步阐明。

长链非编码 RNA(lncRNAs)是一类转录本长度超过 200 nt、无或少有蛋白编码能力的复杂长链非编码 RNA<sup>[5]</sup>。近来研究发现 lncRNAs 通过修饰染色体<sup>[6]</sup>、调节转录活性<sup>[7]</sup>、调节 mRNA 剪接<sup>[8]</sup>等方式调节多种基因的表达, 并由此参与了多种病理以及生理过程。新近研究表明, lncRNA 在免疫细胞活化以及自身免疫性疾病的发生和发展中发挥十分重要的作用<sup>[9-10]</sup>。在前期工作中, 作者采用芯片发现 PBC 患者 PBMC 中 lncRNA AK053349 表达明显增高, 提示其可能参与了 PBC

的发病机制。本研究旨在分析 PBC 患者外周血单个核细胞(PBMC)内 lncRNA AK053349 的相对表达量, 以初步明确 lncRNA AK053349 是否参与了 PBC 的发病机制, 为进一步探讨其在 PBC 发生、发展中的作用提供参考。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究纳入第二军医大学长海医院和长征医院 PBC 患者共 42 例, 其诊断标准参照美国肝病协会(AASLD)2000 年制定的 PBC 诊疗指南<sup>[11]</sup>。其中, 男性 8 例, 女性 34 例; 平均年龄(53±11)岁; 根据组织学病变共分为 4 期, I 期(非化脓性破坏性胆管炎期)6 例; II 期(小胆管增生期)10 例; III 期(瘢痕形成期)7 例; IV 期(肝硬化期)5 例。另有 14 例无法获得肝穿资料。另从同期来院体检者中选择 40 名健康者作为健康对照, 健康对照组男女性别之比为 15:25。平均年龄为(51±9)岁。实验组和对照组在年龄和性别构成比上差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本研究经过第二军医大学长海医院和长征医院伦理委员会批准, 所有受试对象均签署知情同意书。

\* 基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(“973”项目, 2013CB531606); 国家自然科学基金资助项目(81273282, 81202353, 30972730); 上海科委基金资助项目(11JC1410902); 吴阶平基金资助项目(320.6750.13147); 上海杨浦区人才发展资金资助项目(鼎元资金); 长海医院基金资助项目(CH125530300)。 作者简介:张蕾,女,在读研究生,主要从事感染免疫及微生物研究。 # 共同第一作者。 ▲ 通讯作者, E-mail: qinq78@163.com。 △ 通讯作者, E-mail: amdeng70@163.com。

1.2 方法

1.2.1 血样标本的采集与 PBMC 的分离 对所有纳入的受试对象,采集空腹静脉血 5 mL,置于枸橼酸钠抗凝剂的无菌试管中。采用密度梯度离心法分离 PBMC(Ficoll 分离液购自北京鼎国生物技术有限公司)。

1.2.2 RNA 抽提与反转录 采用 Trizol 法抽提细胞总 RNA,将其反转录为 cDNA,然后置于-80 °C 冰箱备用。细胞总 RNA 抽提试剂盒及反转录试剂盒购自北京 invitrogen 公司。

1.2.3 PCR 扩增 定量 PCR 采用荧光染料 SYBGreen,以 GAPDH 为内参将逆转录得到的 cDNA 模板进行 PCR 扩增。lncRNA AK053349 引物序列为:5'-TCA AGG GAA AGA TGG CAA AC-3'(f),5'-AGC CTG AAA CCA ACT GTG CT-3'(r);内参 GAPDH 引物序列为:5'-AAA TGG TGA AGG TCG GTG TGA-3'(f),5'-CCG TTG AAT TTG CCG TGA GTG-3'(r)。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应条件为:95 °C 5 min 随后 95 °C 15 s,59 °C 30 s 循环 40 次。读取每个定量 PCR 反应的阈循环(ct)值后,将定量 PCR 结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。

1.2.4 实验室指标的检测 纳入患者的实验室检查包括凝血酶原时间(PT)、胆红素、清蛋白。并根据 PT、清蛋白、患者年龄等特征计算出其 Mayo 危险评分。PBC 患者 Mayo 危险评分的计算公式为:Mayo 危险评分 =  $0.871 \times \log_e[\text{总胆红素 (mg/mL)}] - 2.53 \times \log_e[\text{白蛋白 (g/dL)}] + 2.38 \times \log_e[\text{凝血酶原时间 (s)}] + 0.039 \times \text{年龄 (岁)} + 0.859 \times \text{水肿状况}^{[12]}$ 。水肿状况的计分规则是:无水肿记为 0 分;有水肿但是治疗后好转记为 0.5 分;有水肿治疗后未好转则记为 1 分。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析。两组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组资料的比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,相关性分析采用 Spearman 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBC 患者 PBMC 中 lncRNA AK053349 表达结果 与正常对照组相比,PBC 患者 PBMC 中 lncRNA AK053349 的相对表达量较健康对照组增高了约 4.3 倍,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

2.2 PBC 患者 PBMC 中 lncRNA AK053349 分期表达结果 不同分期的 PBC 患者其 lncRNA AK053349 的表达有差异,随着病程的加剧 lncRNA AK053349 表达明显增高 ( $P < 0.01$ )。见图 1。

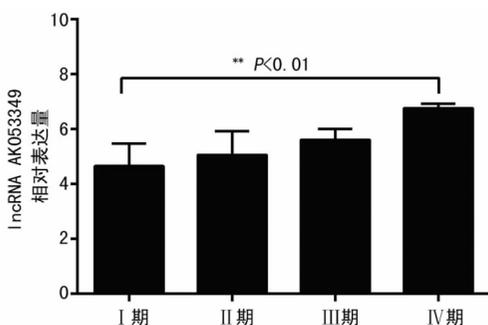


图 1 PBC 患者不同病理分期下 AK053349 相对表达量的比较

2.3 PBC 患者外周血 PBMC 中 lncRNA AK053349 表达与患者 Mayo 危险评分的相关性分析 PBC 患者 Mayo 危险评分

为  $(5.51 \pm 0.94)$  分。PBC 患者 PBMC 中 lncRNA AK053349 与 Mayo 危险评分呈正相关 ( $r^2 = 0.33, P < 0.01$ )。见图 2。

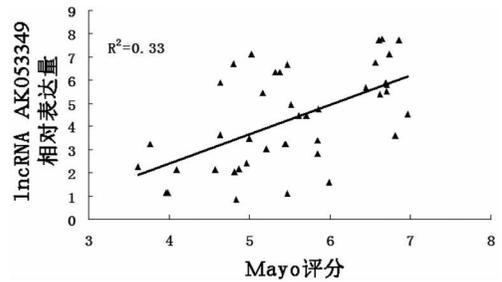


图 2 PBC 患者 lncRNA AK053349 的表达量与 Mayo 评分的关系

3 讨论

目前对 PBC 的治疗仍然十分棘手,熊去氧胆酸(UDCA)是唯一通过美国 FDA 认证的用于临床治疗 PBC 的药物,其可以在一定程度上改善患者症状,但最近来自循证医学证据表明,UDCA 可能并不会有效改善患者预后<sup>[12]</sup>。深入研究 PBC 发生与发展的分子机制,对于发展新的 PBC 治疗方案具有十分重要的价值。

本研究首先比较了 PBC 患者和健康个体 PBMC 中 lncRNA AK053349 的相对表达量,发现 PBC 患者 lncRNA AK053349 较健康个体明显增高,说明 lncRNA AK053349 参与了 PBC 的发病机制。然而,尚不明确 PBMC 中 lncRNA AK053349 表达增高与 PBC 发生发展之间的因果关系,对这一问题的阐释还需要进一步的分子生物学实验和动物实验予以证实。

在 PBC 的诊断成立以后,对患者的病情进行全面、客观地评估,是制定个体化治疗方案,改善患者预后的基础<sup>[13]</sup>。目前,PBC 的病情评估方法主要包括肝脏活检和实验室检查<sup>[14]</sup>。Mayo 危险评分融合了 3 个与患者肝功能密切相关的指标,较为全面地反映了患者的肝功能状态,且属于无创检查,因为更受临床医师青睐。作者发现 lncRNA AK053349 的表达 PBC 患者的组织学分期 Mayo 评分密切相关。这一方面进一步印证了 lncRNA AK053349 参与 PBC 发病机制的结论,另一方面也说明了 lncRNA AK053349 是 PBC 潜在的疾病标志物,检测 PBMC 中 AK053349 的表达,有助于判断 PBC 患者的病情。

综上所述,本研究发现 lncRNA AK053349 参与了 PBC 的发病机制,其确切的分子机制值得进一步研究。此外,检测 PBC 患者 PBMC 中 lncRNA AK053349 的表达可能有助于判断患者的病情。

参考文献

[1] Bhandari BM, Bayat H, Rothstein KD. Primary biliary cirrhosis [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2011, 40(2): 373-386.  
 [2] Liu H, Liu Y, Wang L, et al. Prevalence of primary biliary cirrhosis in adults referring hospital for annual health check-up in Southern China [J]. BMC Gastroenterol, 2010, 10: 100.  
 [3] Selmi C, Gershwin ME. The etiology mystery in primary biliary cirrhosis [J]. Dig Dis, 2010, 28(1): 105-115.  
 [4] Selmi C, Meda F, Kasangian A, et al. Experimental evidence on the immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis [J]. Cell Mol Immunol, 2010, 7(1): 1-10.  
 [5] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and (下转第 2659 页)

( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 不同组别 H-FABP 与 cTnI 敏感性比较 (n)

组别	n	H-FABP		cTnI	
		阳性	阴性	阳性	阴性
AMI 组	30	29	1	24	6
UAP 组	26	2	24	3	23
NCCP 组	25	0	25	0	25
对照组	27	0	27	0	27

### 3 讨 论

对于急性胸痛患者,如何正确和迅速判断出 AMI 在临床上具有十分重要的意义,以往常采用典型临床表现,特征性心电图改变和实验室生化指标检查等加以确诊。但在临床实践中,常可遇到缺乏典型临床表现,或者特征性心电图改变的患者。而既往实验室诊断指标、主要以 CK、CK-Mb、cTn-I 及肌红蛋白为主,但是 CK 表达水平一般在患者发病 6 h 后才出现升高现象,而 CK-Mb 表达水平则一般在发病 4 h 后才出现升高现象,检测心肌酶则至少需要 2 h,而肌红蛋白缺乏诊断特异性,不能区分骨骼肌和心肌损伤,故患者难以在 6 h 内得到及时正确的治疗措施<sup>[3]</sup>。

H-FABP 主要存在于心肌胞质中,在健康人血浆和尿液中 H-FABP 的表达水平极低,而当心肌细胞受到严重损害时 H-FABP 可快速释放到血液并较早检测出来,并且心肌特异性较高<sup>[4-5]</sup>。经相关研究发现,H-FABP 表达水平在 AMI 发病 1.3~3 h 就开始明显升高,8 h 可达到表达水平的最高峰,24 h 内其表达水平可恢复至正常范围,故认为 H-FABP 可作为检测早期 AMI 的一种敏感性实验室指标<sup>[6-10]</sup>。

本研究结果显示,H-FABP 对早期 AMI 患者的诊断敏感性显著高于 cTnI,其诊断发病 6 h 内的心肌梗死的准确性明显优于 cTnI,而其特异性与 cTnI 比较无明显差别,与相关研究相符合<sup>[11]</sup>。因此可知,H-FABP 水平可作为心肌坏死或损伤的早期判断指标,可为急性胸痛患者的诊断提供依据。

### 参 考 文 献

[1] Tomoaki N, Akiyoshi H, Mamoru H, et al. Human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic and prognostic mark-

er in acute coronary syndrome[J]. *Cardiology*, 2003, 99 (2): 96-104.

[2] 中华医学会心血管病学分会. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 29(12): 710-725.

[3] Wu AHB, Feng YJ, Contois JH, Pervaiz J. Comparison of myoglobin, creatine kinase-MB, and cardiac troponin I for diagnosis of acute myocardial infarction[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 1996, 26: 291-300.

[4] 李云鹏, 吴新华. 心肌脂肪酸结合蛋白的临床应用进展[J]. *中国医学创新*, 2010, 7(2): 180-182.

[5] 陈莉莉, 杨 霏, 郭小梅, 等. 快速检测心肌脂肪酸结合蛋白诊断早期急性心肌梗死[J]. *中华急诊医学杂志*, 2005, 14(11): 934-937.

[6] Nakata Y, Hashimoto A, Hase M, et al. Human heart type fatty acid binding protein as an early diagnostic and prognostic marker in acute coronary syndrome[J]. *Cardiology*, 2003, 99(2): 96-104.

[7] Garcia-Valdecasas S, Ruiz-Alvarez MJ, Garcia De Tena J, et al. Diagnostic and prognostic value of heart-type fatty acid-binding protein in the early hours of acute myocardial infarction[J]. *Acta Cardiol*, 2011, 66(3): 315-321.

[8] Alhadi HA, Fox KA. Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein in the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction: The potential for influencing patient management[J]. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2010, 10(1): 41-49.

[9] Cubranic Z, Madzar Z, Matijevic S, et al. Diagnostic accuracy of heart fatty acid binding protein(H-FABP) and glycogen phosphorylase isoenzyme BB(GPBB) in diagnosis of acute myocardial infarction in patients with acute coronary syndrome[J]. *Biochem Med(Zagreb)*, 2012, 22(2): 225-236.

[10] Xu Q, Chan CP, Cao XY, et al. Cardiac multi-marker strategy for effective diagnosis of acute myocardial infarction[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(21/22): 1781-1787.

[11] Seino Y, Tomita Y, Takano T, et al. Office cardiologists cooperative study on whole blood rapid panel tests in patients with suspicious acute myocardial infarction; comparison between heart-type fatty acid-binding protein and troponin T tests[J]. *Circ J*, 2004, 68 (2): 144-148.

(收稿日期: 2013-04-16)

(上接第 2657 页)

functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.

[6] Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, et al. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(2): 232-246.

[7] Wang X, Arai S, Song X, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription[J]. *Nature*, 2008, 454(7200): 126-130.

[8] Beltran M, Puig I, Pena C, et al. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 756-769.

[9] Sharma S, Findlay GM, Bandukwala HS, et al. Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(28): 11381-11386.

[10] Vigneau S, Rohrllich PS, Brahic M, et al. Tmevpg1, a candidate gene for the control of Theiler's virus persistence, could be impli-

cated in the regulation of gamma interferon[J]. *J Virol*, 2003, 77 (10): 5632-5638.

[11] Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the study of liver diseases practice guidelines[J]. *Hepatology*, 2000, 31(4): 1005-1013.

[12] Gong Y, Huang Z, Christensen E, et al. Ursodeoxycholic acid for patients with primary biliary cirrhosis: an updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials using Bayesian approach as sensitivity analyses[J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102(8): 1799-1807.

[13] Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, et al. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(21): 3328-3337.

[14] Dickson ER, Gramhsch PM, Fleming TR, et al. Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making[J]. *Hepatology*, 1989, 10(1): 1-7.

(收稿日期: 2013-08-08)