

• 临床研究 •

血清 miR-18a 检测在 HBV 相关肝病中的诊断价值*

李亚威¹, 许顺江¹, 董红², 李志娟², 王滨², 杨利^{1△}

(1. 河北医科大学第一医院, 石家庄 050031; 2. 华北油田公司总医院, 河北任丘 062552)

摘要:目的 本研究通过检测血清 miR-18a 在乙型肝炎病毒相关肝病患者(乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化、乙型肝炎肝癌患者)和健康对照者血清的表达, 探讨血清 miR-18a 在乙型肝炎病毒相关肝病中的诊断价值。方法 收集 2012 年 9 月至 2013 年 9 月期间, 河北医科大学第一医院肝病中心确诊的患者 164 例, 其中乙型肝炎 62 例(肝炎组), 乙型肝炎肝硬化 58 例(肝硬化组), 乙型肝炎肝癌 44 例(肝癌组)。留取血清标本, 提取总 RNA, 逆转录后采用实时荧光定量聚合酶链法检测血清中 miR-18a 相对表达量。结果 血清 miR-18a 的检测结果显示在肝炎组(-2.50 ± 0.70)、肝硬化组(-2.25 ± 0.96)和肝癌组(-2.27 ± 0.88)中表达明显高于对照组(-3.22 ± 0.93), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。应用 ROC 曲线及曲线下面积(AUC)评估 miR-18a 的诊断价值, miR-18a 的 AUC 值为 0.747, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。95%CI 为 0.669~0.824; 敏感度为 83.3%; 特异性为 60.0%; 约登指数为 43.3%。结论 miR-18a 在肝炎组、肝硬化组、肝癌组患者血清中表达量上调, 对乙型肝炎病毒相关肝病的诊断具有潜在的价值。

关键词:微小 RNA; 乙型肝炎; 乙型肝炎肝硬化; 肝癌; 实时荧光定量聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.02.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)02-0237-03

由乙型肝炎病毒(HBV)引起的急慢性肝炎、肝硬化及肝细胞肝癌等相关的肝脏疾病, 称为 HBV 相关肝病, 严重影响着人类的健康^[1-2]。微小 RNA(miRNA)调控细胞生长、发育、分化及凋亡的各个环节, 并与疾病的发生、发展密切相关^[3-4]。血清 miRNA 在不同温度、不同 pH 值、反复冻融后以及加入 DNA 酶等多种情况下都能检测到, 并且水平变化不大。miRNA 在血浆、血清中良好的稳定性, 为血清 miRNA 作为新的肿瘤标志物进行检测提供了依据^[5]。目前, 血清和组织中 miRNA 的表达检测已经在部分疾病的诊断和预后判断中得到应用, 而在 HBV 相关肝病诊断中的研究报道相对较少^[6-7]。为此, 本研究对 HBV 相关肝病患者外周血血清中 miR-18a 表达水平进行检测, 探讨 miR-18a 在评价慢性 HBV 相关肝病中的诊断价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 9 月至 2013 年 9 月河北医科大学第一医院肝病中心已确诊的患者 164 例, 年龄 46~69 岁[(58.2±2.3)岁]。肝炎组 62 例, 其中男 35 例, 女 27 例; 年龄 44~62 岁[(55.8±2.7)岁]; 肝硬化组 58 例, 其中男 30 例, 女 28 例; 年龄 54~69 岁[(62.1±3.1)岁]; 肝癌组 44 例, 其中男 24 例, 女 20 例; 年龄 46~69 岁[(58.2±2.3)岁]。诊断按 2010 年中华医学会肝病学分会与感染病学分会联合制订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[8]。收集本院查体中心健康者 50 例为对照组, 男 21 例, 女 29 例; 年龄 44~65 岁[(53.6±2.0)岁], 排除心、脑、肾、肝病及其他慢性病。肝炎组、肝硬化组、肝癌组与对照组年龄及性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 美国 Applied Biosystems 公司 7500 型实时荧光定量聚合酶链反应仪, 美国 Eppendorf 公司 4℃低温高速离心机, 美国 Thermo Scientific 公司低速离心机, 美国 Eppendorf 公司移液枪。QIAzol LS 试剂, PrimeScript RT reagent Kit, miR-122miR-18aRT/PCR 引物, SYBR Premix Ex Taq II,

cel-miR-39 内参均购于美国 QIAGEN 公司, 三氯甲烷购于天津科密欧化学公司, 异丙醇购于天津泰兴试剂公司, 无水乙醇购于天津海洋石化试剂公司。

1.3 方法

1.3.1 标本留取 患者住院后, 在服用药物和做手术治疗前, 晨起空腹条件下采集外周静脉血 4 mL, 收集于 5 mL 试管中(确保无菌、无 RNA 酶、无抗凝剂的 5 mL 干燥试管), 室温静置 20~30 min, 待其自然凝固分离血清。标本以 3 000 r/min 离心 10 min 后, 吸取上层血清分装于无菌、无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中, 每管 1 mL。室温静置 5 min 后, -80℃冰箱保存备用。避免反复冻融。

1.3.2 标本处理 从 -80℃冰箱中取出保存的血清标本, 置室温中避光复融 30 min 后, 轻轻混匀, 然后将血清标本置于低温离心机(4℃)中, 以 16 000 r/min 离心 15 min, 取上清液进行检测。

1.3.3 提取血清中总 RNA 在室温下溶解血清, 将溶好的血清标本在 4℃, 以 16 000 r/min 离心 5 min, 转移上清液至无菌、无 RNA 酶的新管中, 不要碰到沉淀。取 100 μL 血清备用。使用前颠倒混匀。采用 Trizol 法提取血清中总 RNA, 将提取的 RNA 样本置于 -80℃冰箱保存备用。

1.3.4 RNA 转录为 cDNA 原理为采用逆转录酶以 RNA 为模板合成与其互补的 DNA 的过程。严格按照说明书要求, 配置逆转录反应液(核酸混合物 4 μL, 逆转录酶 2 μL, 缓冲液 2 μL, RNA 模板 12 μL)。在每个含有 Reverse Trascriptase master Mix 的管中最后加入模板 RNA。温和混匀, 短暂离心后置于冰上。放入 7500 型实时荧光定量聚合酶链反应仪中进行反应, 设置反应条件为 37℃ 60 min, 95℃ 5 min。终止反应后, 置于冰上。-20℃冰箱保存备用。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应 实时荧光定量聚合酶链反应是通过扩增反应中的每一个循环产物的荧光信号进行

* 基金项目: 河北省卫生厅科研立项资助项目(20120290)。

△ 通信作者, E-mail: 23299709@qq.com。

实时监测,分析指数期的扩增情况来实现对起始模板的定量分析。以逆转录所得 cDNA 为模板,用实时荧光定量聚合酶链反应法测定 miR-18a 及内参 cel-miR-39 的表达水平。cel-miR-39 在血清中特异性表达并且表达恒定,因此被选为内参。严格按照说明书配置反应体系,配制预混液时各反应液多加 10%,以避免分管移液时丢失造成倚偏。为了消除标本间加样误差,每个标本做 3 个复孔,并设置阴性对照,阴性对照孔不加 cDNA 模板,以 DEPC-H₂O 代替。作者以 cel-miR-39 作为内参照,每一标本均分别扩增 miR-122、miR-18a 及内参 cel-miR-39。戴好口罩和手套,操作过程均在冰上进行。反应程序设置,预变性,95 ℃ 15 min;40 个反应循环(变性,94 ℃ 15 s;退火,55 ℃ 30 s;延伸,75 ℃ 34 s),重复 2 次。阈值循环数 Ct 代表聚合酶链反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。反应完成后,记录下各检测反应孔 Ct 值。复孔间 Ct 值之差应<1.0,否则需重复试验。各样本的 Δ Ct 值=(目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值), Δ Ct 值越大,表达量越低,各标本基因表达相对定量值为 $2^{-\Delta Ct}$ 。采用 $\text{Log}2^{-\Delta Ct}$ 的值,比较直观地表达各标本基因表达相对定量。

1.4 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计分析软件和 EXCEL 软件对数据进行处理。各标本基因表达量的正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 描述,均数比较采用 *t* 检验,组间差异比较用 *F* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。应用 ROC 曲线及曲线下面积(AUC)评估 miR-18a 的诊断价值。

2 结 果

2.1 miR-18a 在肝炎组、肝硬化组和肝癌组中的表达 血清 miR-18a 的检测结果显示在肝炎组、肝硬化组和肝癌组,与对照组相比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。血清 miR-18a 的检测结果显示在肝炎组(-2.50±0.70)、肝硬化组(-2.25±0.96)和肝癌组(-2.27±0.88)中表达明显高于对照组(-3.22±0.93),差异有统计学意义(*P*<0.05)。

2.2 血清 miR-18a 在 HBV 相关肝病中的诊断价值分析 应用 ROC 曲线及 AUC 值评估 miR-18a 的诊断价值,miR-18a 的 AUC 值为 0.747,差异有统计学意义(*P*<0.05)。95%CI 为 0.669~0.824(*P*<0.05);敏感度为 83.3%;特异性为 60.0%;约登指数为 43.3%。见图 1。

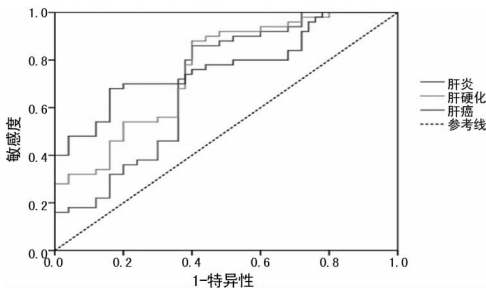


图 1 miR-18a 在 HBV 相关肝病中的表达

3 讨 论

miRNAs 不仅在人血清或血浆中呈高度稳定形式,而且特定 miRNAs 的表达水平在不同疾病患者的血浆中与健康人相比具有显著不同^[9]。这些研究为 miRNAs 成为新型、非创伤性生物标志提供了理论依据。在血液中 miRNA 的稳定性异常高,推测 miRNA 很可能是 1 个基于血液的理想生物标志物。由于病理的损伤和细胞的破坏,组织和器官的细胞内

miRNA 会随着细胞死亡或凋亡过程释放到血液中,被认为是新的无创标志物选择,血液和组织中 miRNA 表达的检测已经在部分疾病诊断和预后中得到应用^[10]。

实时荧光定量聚合酶链反应法是较传统的基因检测方法,其检测效率高,准确性强,试验结果重复性好。作者通过实时荧光定量聚合酶链反应法检测发现,肝炎组、肝硬化组、肝癌组患者血清中 miR-18a 表达水平明显升高。目前研究已表明,miRNA 在细胞的发育、病毒的感染、疾病的发生等过程中发挥着重要调控作用^[11]。HBV 感染可导致 miRNAs 的表达尤其是肝特异性 miRNAs 分子的表达模式发生改变,这些变化可能与慢性持续性感染以及疾病的进展有关。有研究发现,miR-18a 在肝癌患者中的表达水平明显高于对照组血清中的表达量^[12]。另有研究发现,miR-18a 在肝病的发生、发展中起致癌作用,在肝癌中的表达水平明显高于对照组^[13]。Murakami 等^[14]报道了肝癌组织和癌旁组织的 miRNA 表达谱,应用基因芯片的技术,结果表明 miR-18a 在肝癌组织中表达量高于正常组织。有研究发现,在肝癌患者人群中,miR-18a 是通过抑制雌激素受体 α 的表达来促进肝癌细胞的增殖。另有研究报道,在检测鼠肝组织中的 miRNA 表达谱发现,miR-18a 的表达是上调的^[15]。因此,miR-18a 可能与 HBV 相关肝病的发生、发展相关。

ROC 曲线也称为受试者工作特征曲线,即反映敏感度与特异性连续变量的综合指标。AUC 表示正确区分患者和健康者的可能性,可反映某个诊断试验的价值大小,及比较 2 个诊断试验的价值高低。AUC 值=0.5 则可以认为完全无价值,通常 1 个理想的诊断试验 AUC 值=1.0。当 *P*<0.05 时,AUC 值具有区分患者和健康者的诊断价值。AUC 值>0.5 时,AUC 值越接近 1.0,说明诊断效果越好。AUC 值 $\geq 0.5\sim<0.7$ 时有较低的准确性,AUC 值 $\geq 0.7\sim<0.9$ 时有一定的准确性,AUC 值 ≥ 0.9 时有较高的准确性。本研究中,血清 miR-122 和 miR-18a 的诊断分析结果显示,AUC 值>0.7 且 *P*<0.001,提示血清 miR-18a 在肝炎组、肝硬化组、肝癌组中有一定的诊断价值。

综上所述,miR-18a 在肝炎组、肝硬化组、肝癌组的血清中表达上调,且通过 ROC 曲线分析结果推测,miR-18a 在肝炎组、肝硬化组、肝癌组中有潜在的诊断价值,外周血 miR-18a 水平检测可为 HBV 相关肝病的早期诊断提供可能。随着大样本资料的收集、试验技术的提升,越来越多的试验数据将证明血清 miRNA 可作为新的无创生物学标志物应用于 HBV 相关肝病的监控,从而在早期阶段预测肝细胞癌的发生。

参考文献

[1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2012, 142 (6): 1264-1273.

[2] 中国抗癌协会肝癌专业委员会,中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会,中华医学会肝病学会肝病学组. 原发性肝癌规范化诊治的专家共识[J]. 中华医学信息导报,2009,24(16):22-23.

[3] 叶韦伟,陈永新,金凌晨,等. 微小 RNA-21 在乙型肝炎肝硬化致肝癌病程中的表达及机制研究[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(2):257-259.

[4] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(3):143-149.

[5] 雷永红, 吕文平, 王海. 肝细胞癌患者血清 miR-221 和 miR-122 的检测及其临床意义[J]. 河北医科大学学报, 2013, 34(5):522-525.

[6] Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma[J]. Cancer Res, 2010, 70(23):9798-9807.

[7] 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(12):1830-1838.

[8] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 肝脏, 2011, 16(3):2-16.

[9] 刘梅, 刘吉兵, 王黎明, 等. 肝癌介入治疗中血清 miR-122 表达及其临床意义探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(7):515-517.

[10] 张颖, 江勇, 齐凤祥. miRNA 在慢性肝病中的变化及其临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(28):4257-4262.

[11] 鱼康康, 施光峰, 李宁. miRNA 在乙型肝炎病毒感染相关肝病中的研究进展[J]. 中国病毒病杂志, 2014(2):150-154.

[12] Li L, Guo Z, Wang J, et al. Serum miR-18a: a potential marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma screening[J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(11):1910-1916.

[13] 陈珊珊, 井宣, 涂建成. 血清 microRNA 作为乙型肝炎病毒相关肝细胞癌发生过程标志物的研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(4):653-658.

[14] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of MicroRNAs expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. Oncogene, 2006, 25(17):2537-2545.

[15] 王传玺, 宋伟, 李增军, 等. 肝细胞癌组织 microRNA 表达谱研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(5):976-980.

(收稿日期:2016-07-28 修回日期:2016-10-18)

• 临床研究 •

细菌性阴道病检测的影响因素分析*

陈远翔¹, 张达容², 罗光丽²

(1. 重庆市万州区妇幼保健院 404000; 2. 重庆市肿瘤医院 400000)

摘要:目的 分析细菌性阴道病检测的影响因素, 保证细菌性阴道病检测结果的准确性。方法 采用唾液酸酶法对 400 例阴道分泌物标本进行检测, 以培养方法和线索细胞为标准对检测结果进行评价, 并对影响因素进行分析和验证。结果 400 例标本中共检出细菌性阴道病阳性 45 例(11.3%)。在细菌性阴道病阳性标本中只有 20 例(44.4%)是由于阴道加德纳菌感染所引起, 与总体检出率之间差异有统计学意义($P<0.05$)。真菌、滴虫、经期血液污染是细菌性阴道病检测的干扰因素, 导致细菌性阴道病检测呈假阳性。结论 唾液酸酶法检测细菌性阴道病干扰因素包括:真菌、滴虫、血液。实际工作发现, 细菌性阴道病阳性标本同时有真菌或滴虫感染, 或分泌物有血液污染时, 应对分泌物进行线索细胞查找或采用培养方法确定病原菌的感染类型, 便于临床医生有针对性合理地合理用药, 减轻患者感染症状。

关键词:细菌性阴道病; 唾液酸酶法; 阴道加德纳菌; 影响因素
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.02.036 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)02-0239-03

细菌性阴道病也称非特异性阴道炎, 是目前临床上妇产科常见的感染性疾病之一, 如不及时治疗, 易发生泌尿系统感染^[1]。细菌性阴道病发病率高, 可引发多种妇科并发症, 并且使人类免疫缺陷病毒和宫颈癌的感染风险增高^[2]。临床上大多采用唾液酸酶法对细菌性阴道病进行快速检测, 唾液酸酶法以其良好的特异性、敏感度广泛应用于临床白带常规检测^[3-4]。笔者在实际工作中发现, 多种因素可导致唾液酸酶法细菌性阴道病检测假阳性, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 细菌鉴定和培养基采用法国梅里埃 API-Coryne 棒状杆菌(法国梅里埃生物技术公司), 人血哥伦比亚琼脂(自制), 肝浸液(青岛海博生物技术有限公司); 细菌性阴道病检测采用江苏硕士阴道炎联合检测装置和配套试剂(江苏硕士生物

科技有限公司); 其他试剂设备为革兰染液(重庆庞通医疗器械有限公司), 白色念珠菌标准菌株(上海宝录生物科技有限公司), 阴道加德纳菌标准菌株(上海宝录生物科技有限公司), 恒温箱(上海博讯医疗设备厂), 生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 生理盐水润湿后窥阴器扩张, 清除阴道内现有的阴道和宫颈分泌物, 弃之。再轻压宫颈使分泌物流出, 3 支无菌棉拭子采集, 或取阴道后穹窿分泌物送检。

1.2.2 涂片染色和性状观察 生理盐水 1 滴于洁净玻片, 1 支已采样棉拭子滚动涂抹后立即镜下观察滴虫、真菌。自然干燥固定后进行革兰染色, 观察线索细胞。对分泌物性状进行记录, 如脓性、豆腐渣样、经期血液污染等。

* 基金项目:重庆市万州区科技资助项目(201403045)。