

Wilson 病患者 LncRNA Meg3 表达水平与肝纤维化指标的相关性分析

花代平¹, 宣巧玉¹, 孙兰婷¹, 于庆生², 王琴³, 王涛⁴, 马麒颜⁴, 杨文明^{1,5}, 汪瀚^{1,5}

安徽中医药大学第一附属医院¹神经内科,²普外科,³超声科,安徽合肥 230031;⁴安徽中医药大学第一临床医学院,安徽合肥 230031;⁵新安医学教育部重点实验室//安徽中医药大学,安徽合肥 230038

摘要:目的 探讨 Wilson 病(WD)患者长链非编码 RNA 母系表达基因 3(LncRNA Meg3)基因表达水平与肝纤维化程度、Beclin-1、微管结合蛋白 1 轻链 3B(LC3B)的相关性。**方法** 选取安徽中医药大学第一附属医院就诊的 WD 患者(WD 组)100 例和健康对照组(对照组)50 例,检测血小板计数(PLT)、透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、III 型前胶原 N 端肽(PIIINP)、IV 型胶原(C-IV)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST),计算肝纤维化血清无创诊断模型 AST 和 PLT 比率指数(APRI)评分以及肝纤维化-4 指数(FIB-4);RT-qPCR 检测外周血 LncRNA Meg3、Beclin-1、LC3B 表达;二维剪切波弹性成像(2D-SWE)检测肝脏硬度值(LSM)、剪切波速度(SWV),并依据 LSM 值进行 2D-SWE 肝纤维化分期。同时选取我院经肝活检诊断为 WD(WD 组)和术后病理诊断为肝血管瘤患者(HC 组)各 10 例,术中取新鲜肝脏组织,采用苏木精-伊红(HE)、马松(Masson)和铜染色(罗丹宁法)观察肝组织病理学改变并进行肝纤维化分期;透射电镜观察肝组织超微结果;RT-qPCR 检测肝组织 LncRNA Meg3、Beclin-1、LC3B 表达。**结果** 与对照组相比,WD 组外周血 LncRNA Meg3 表达水平显著下降($P<0.01$),AST、ALT、HA、LN、PIIINP、C-IV、APRI、FIB-4、LSM、SWV 水平升高($P<0.01$);LncRNA Meg3 与 LSM、SWV、APRI、FIB-4、Beclin-1、LC3B 呈负相关($P<0.05$);ROC 曲线结果显示 LncRNA Meg3 对 2D-SWE 肝纤维化>F4 期的诊断敏感度为 92.9%,特异度为 83.7%,AUC 为 0.902(95% CI: 0.835~0.969),诊断效能显著优于 APRI(AUC=0.746)和 FIB-4(AUC=0.661)。2D-SWE 肝纤维化分期与 LncRNA Meg3、Beclin-1、LC3B、APRI、FIB-4、HA、LN、C-IV 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$);WD 组肝细胞核固缩、溶解,细胞轮廓消失坏死,胶原纤维显著增生,肝细胞胞质内大量砖红色铜颗粒沉积,以变性肝细胞为基;电镜下自噬小体和自噬溶酶体数量增多。与 HC 组相比,WD 组肝组织 LncRNA Meg3 表达水平低($P<0.05$),Beclin-1、LC3B 表达水平高($P<0.05$),LncRNA Meg3 表达水平与 Beclin-1、LC3B 表达水平呈负相关($P<0.05$)。肝纤维化分期(S4 期 7 例,S3 期 3 例)与 LSM、SWV 水平差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** WD 患者 LncRNA Meg3 表达水平显著下降,且与肝纤维化程度呈负相关,与自噬水平密切相关。

关键词: Wilson 病;长链非编码 RNA 母系表达基因 3;肝纤维化;自噬

LncRNA Meg3 expression level is negatively correlated with liver fibrosis severity in patients with Wilson disease

HUA Daiping¹, XUAN Qiaoyu¹, SUN Lanting¹, YU Qingsheng², WANG Qin³, WANG Tao⁴, MA Qiyang⁴, YANG Wenming^{1,5}, WANG Han^{1,5}
¹Department of Neurology, ²Department of General Surgery, ³Department of Ultrasound, First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; ⁴First Clinical Medical College of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; ⁵Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: Objective To investigate the expression of the long non-coding RNA maternally expressed gene 3 (LncRNA Meg3) in patients with the Wilson disease (WD) and its correlation with the severity of liver fibrosis and autophagy-related markers. **Methods** A total of 100 WD patients and 50 healthy individuals were enrolled from the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine. Serum biomarkers, including platelet count, hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen N-terminal peptide (PIIINP), type IV collagen (C-IV), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST), were measured, and the non-invasive indices APRI and FIB-4 were calculated. Peripheral blood levels of LncRNA Meg3, Beclin-1 and LC3B were detected using RT-qPCR, and liver stiffness (LSM) and shear wave velocity (SWV) were evaluated using two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE). The liver tissues from 10 WD patients and 10

patients with hepatic hemangioma were examined using histochemical staining, transmission electron microscopy, and RT-qPCR. **Results** The expression level of LncRNA Meg3 was significantly lower, while the levels of AST, ALT, HA, LN, PIIINP, C-IV, APRI, FIB-4, LSM and SWV were significantly higher in WD patients than in the healthy individuals (all $P<0.01$). LncRNA Meg3 was negatively correlated with LSM, SWV, APRI, FIB-4, Beclin-1 and LC3B ($P<0.05$). ROC analysis demonstrated that LncRNA Meg3 effectively discriminated >F4 stage fibrosis (AUC=0.902) with a sensitivity of 92.9% and a specificity of 83.7% at the optimal cut-off value, outperforming APRI (AUC=0.746) and FIB-4 (AUC=0.661). The liver tissues from WD patients exhibited characteristic

收稿日期:2025-05-01

基金项目:国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(U22A20366);安徽省中医药科技攻关专项项目(202303a07020004);全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号);安徽省自然科学基金项目(2208085MH266);安徽省卫生健康科研项目(AHWJ2022b036)

Supported by Regional Innovation and Development Joint Fund of National Natural Science Foundation of China (U22A20366).

作者简介:花代平,在读博士研究生,E-mail: 15655171331@163.com

通信作者:汪瀚,博士,主任医师,博士生导师,E-mail: neuwhah@126.com

histopathological changes and lowered expression of LncRNA Meg3, which was negatively correlated with Beclin-1 and LC3B expressions ($P < 0.05$). Liver fibrosis staging (7 S4 cases and 3 S3 cases) was significantly associated with LSM and SWV levels ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression level of LncRNA Meg3 is significantly decreased in WD patients, which is negatively correlated with the severity of liver fibrosis and closely related to the level of autophagy.

Keywords: Wilson disease; LncRNA Meg3; liver fibrosis; autophagy

肝豆状核变性又称威尔逊病(WD),是一种由 *ATP7B* 基因突变引起的遗传性铜代谢障碍性疾病^[1],该基因突变造成胆道排铜障碍,过量铜蓄积于组织脏器中,出现肝脏、神经、精神、肾脏损害,以及骨关节病、角膜色素环(K-F环)等表现^[2,3]。铜具有重金属毒性作用,过度铜沉积可激活静态的肝星状细胞(HSC)活化合成大量细胞外基质(ECM),最终对机体造成一系列损伤引起肝纤维化^[4]。肝纤维化是WD发展过程中的早期病理变化,是向肝硬化发展的关键步骤和影响预后的重要环节^[5,6]。肝纤维化是WD患者主要肝脏病理改变,是发展为肝硬化的中间阶段,35%~45%的患者在诊断WD时已存在肝硬化^[3],而肝硬化导致的并发症是WD患者死亡的主要原因。肝纤维化具有可逆性,因此寻找具有高敏感度、高特异度的非侵入性生物标志物,在肝纤维化早期进行预测和诊断以阻止或延缓WD肝脏损伤的进程显得尤为重要。

长链非编码RNA(LncRNA)在肝纤维化发病机制中具有重要作用^[7],其中,母系表达基因3(Meg3)备受关注。研究显示,LncRNA Meg3在慢性乙型肝炎肝纤维化患者中的表达水平显著降低,且与纤维化严重程度呈负相关^[8,9]。然而,现有的研究多聚焦于病毒性肝病,且多基于动物模型,缺乏铜代谢异常相关的WD肝纤维化机制的临床研究。本团队前期通过RNA测序发现LncRNA Meg3可能参与WD肝损伤的发病机制和

发展^[10],但其在WD患者中的水平及与肝纤维化程度的相关性尚未可知。因此,本研究通过对比WD患者与健康组外周血及肝组织LncRNA Meg3表达水平,并分析其与肝纤维化指标之间的相关性,明确WD患者LncRNA Meg3表达水平与肝纤维化程度的关联,探究LncRNA Meg3作为无创诊断标志物的潜在价值。

1 资料和方法

1.1 患者一般资料

收集安徽中医药大学第一附属医院2023年9月~2024年12月脑病中心收治的WD患者(WD组)100例,体检中心健康对照者(对照组)50例的外周血,用于肝纤维化相关指标及RT-qPCR检测。同时对WD组和对照组进行二维剪切波弹性成像(2D-SWE)评估,两组性别、年龄、体质量指数(BMI)差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。另收集我院2023年1月~2024年12月经肝活检诊断为WD患者10例(WD组),经手术后病理诊断为肝脏血管瘤患者(HC组)10例的正常新鲜肝脏组织。一部分用福尔马林固定,石蜡包埋,用于切片染色、透射电镜观察。另一部分分装于无菌组织冻存管,液氮保存,用于RT-qPCR检测。肝组织WD组和HC组性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究已获安徽中医药大学第一附属医院医学伦理委员会审批(伦理批号:2023AH-42),所有患者均签署知情同意书。研究流程图见图1。

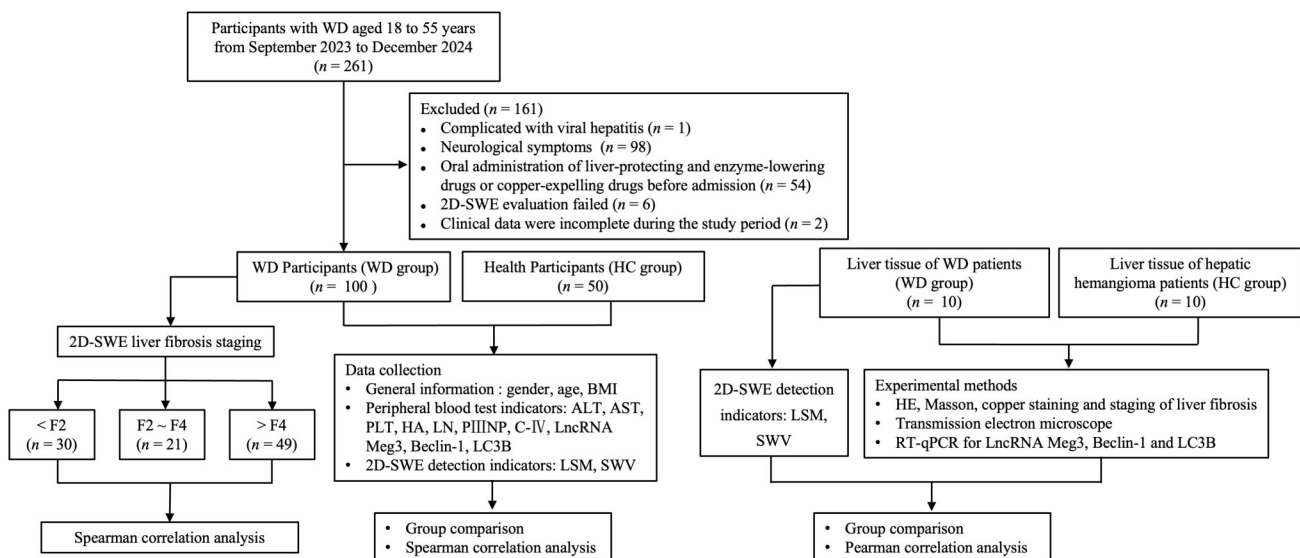


图1 研究流程图

Fig.1 Flow chart of the study.

1.2 诊断标准

依据《肝豆状核变性诊疗指南(2022年版)》^[3]中推荐的莱比锡评分系统^[11],莱比锡评分总分 ≥ 4 分即可诊断为WD。

1.3 纳入及排除标准

纳入标准:符合WD诊断标准;年龄18~55岁;自愿配合完成研究并签署知情同意书。排除标准:存在其他肝病(病毒性肝炎、酒精性肝病、胆汁淤积性肝病、免疫性肝病等);具有神经系统症状;入院前口服保肝降酶药或排铜药物者;妊娠期或哺乳期妇女;肝脏二维剪切波弹性成像(2D-SWE)评估失败;注册期间临床数据不完整。

1.4 肝纤维化相关指标检测

研究对象入组后于次日早晨空腹,使用EDTA抗凝剂试管抽取静脉血2 mL,采用全自动模块式血液体液分析仪(上海希森美康医用电子有限公司,XN-20[A1])检测血小板计数(PLT);使用促凝剂/分离胶试管抽取静脉血5 mL,4000 r/min,离心5 min分离血清,采用全自动化学发光分析仪(郑州安图生物工程股份有限公司,Autotumo Plus)检测透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原N端肽(PⅢNP)、Ⅳ型胶原(C-Ⅳ);采用Beckman Coulter全自动生化分析仪(苏州贝克曼库尔特实验系统有限公司,AU5800)检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)。计算肝纤维化血清无创伤诊断模型:AST和PLT比率指数(APRI)评分,APRI=(AST/正常值上限) $\times 100$ /PLT(10^9 /L)^[12];肝纤维化-4指数(FIB-4),FIB-4=(年龄 \times AST) \div (PLT \times 丙氨酸氨基转移酶的平方根)^[13]。

1.5 2D-SWE检测肝脏硬度值(LSM)、剪切波速度(SWV)

采用彩色多普勒超声诊断仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),SC6-1U探头,使用2D-SWE模式。检查前至少空腹8 h,研究对象取仰卧位,右上肢抬高至头部以增宽肋间隙,于肝右叶包膜下1~2 cm处选取肝实质区域,避开肝内粗大血管、胆道等结构。2D-SWE采样框尺寸设定为4.0 cm \times 3.0 cm,嘱研究对象屏住呼吸3~5 s进行成像,待弹性图像均匀稳定后冻结图像,并选取直径约2 cm的感兴趣区域,测量结果包括LSM、SWV,单位分别为kPa和m/s。连续测量5次,四分位数范围/中位数 $\leq 30\%$ 说明数据可靠,此时取中间数作为最终LSM。2D-SWE肝脏纤维化分期临界值参考标准^[14]:F2:8.35 kPa,F4:10.34 kPa。

1.6 RT-qPCR检测外周血及肝组织LncRNA Meg3、自噬相关蛋白1(Beclin-1)、微管结合蛋白1轻链3B(LC3B)基因表达水平

1.6.1 外周血单个核细胞提取 取新鲜血液,1000 r/min离心5 min,保存上层血浆。向下层红细胞加等体积

PBS缓冲液混匀,将其缓慢注入含3 mL外周血人淋巴细胞分离液(信天翁生物科技有限公司)的离心管,静置5 min后2600 r/min离心20 min。吸取淋巴细胞层,加PBS定容至8 mL,2000 r/min离心15 min。弃上清,加红细胞裂解液,3000 r/min离心10 min,再用PBS缓冲液重复离心。

1.6.2 总RNA提取及浓度测定 使用(细胞/组织)RNA快速提取试剂(信天翁生物科技有限公司,400-100),分别提取外周血和肝组织中总RNA,使用紫外分光光度计(BioSpectrometer basic)测量RNA浓度。

1.6.3 RNA逆转录 使用HyperScript III RT SuperMix试剂盒(新贝生物科技有限公司),在0.2 mL平盖薄壁管中分别加入2 μ L remover、10 μ L RNA、4 μ L ddH₂O,放入梯度PCR仪(ABI, Veriti96)上反应42 $^{\circ}$ C 2 min。结束后加入4 μ L SuperMix继续在PCR仪上、中37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s进行逆转录。

1.6.4 RT-qPCR检测 按2 \times S6 Universal SYBR qPCR Mix试剂盒(新贝生物科技有限公司,Q204-01)说明书,进行RT-qPCR扩增。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性30 s,94 $^{\circ}$ C 10 s;60 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。使用仪器默认程序进行溶解曲线测定。以 β -actin作为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算LncRNA Meg3、Beclin-1、LC3B基因的相对表达水平。使用引物均由新贝生物科技有限公司设计、合成,引物序列如下:LncRNA Meg3正向引物为:ATCATCCGTCCACCTCCTTGTCTTC,反向引物为:GTATGAGCATAGCAAAGGTCAGGGC;Beclin-1正向引物为:AAGGGTCTAAGACGTCCAACAA,反向引物为:GCCTGGGCTGTGGTAAGTAATG;LC3B正向引物为:CCATCACAGTTGGCACAAACG,反向引物为:GACTTTGGGTGTGGTTCTCTTAGG; β -actin正向引物为:CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC,反向引物为:AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT。

1.7 苏木精-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色、铜染色(罗丹宁法)观察肝组织肝纤维化及铜沉积情况

取1 cm \times 1 cm \times 0.5 cm肝组织经固定、包埋后切取厚度为5 μ m的薄片,严格按照试剂盒说明书(珠海贝索生物技术有限公司)进行HE、Masson和铜染色(罗丹宁法)。肝纤维化程度由本院病理科统一判读,病理诊断分级按Scheuer分期^[15]方法进行,分为S0~S4期。

1.8 透射电镜观察肝组织超微结构

迅速切取体积约为1 mm³的肝组织依次经固定、脱水、包埋、超薄切片、染色,透射电镜下观察自噬小体数量及结构。

1.9 统计学分析

样本量计算通过G*Power 3.1软件完成。外周血样本:基于文献^[8]及预实验结果(效应量 $d=0.6$),设定双

侧 α (检验水准)为0.05,1- β (检验效能)为0.80,计算得出WD组需71例,对照组35例。考虑到20%的脱落性和临床可行性,最终纳入WD组100例,对照组50例。肝组织样本:WD组与HC组各10例,LncRNA Meg3表达分别为0.44±0.32和0.89±0.31,效应量 $d=1.43$,检验效能为85.54%($\alpha=0.05$),高于常规阈值(80%),满足研究要求。

所有数据均采用Graphpad Prism 10.3软件进行统计学分析及绘图,计量资料均采用中位数(四分位数间距)描述,符合正态分布两组间比较采用 t 检验,多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用Bonferroni法;非正态分布两组间比较采用Mann-Whitney U 检验,多组间采用Kruskal-Wallis检验。计数资料采用频数(百分比)表示,组间比较采用卡方检验。采用Spearman秩相关系数或Pearson相关系数分析

LncRNA Meg3与各指标之间的相关性。为控制性别、年龄、BMI等潜在混杂因素,建立多重线性回归模型评估LncRNA Meg3与各指标之间的独立关联性。通过受试者工作特征(ROC)曲线分析外周血LncRNA Meg3对2D-SWE肝纤维化分期>F4的诊断效能,并计算曲线下面积(AUC)、敏感度、特异度及最佳截断值。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 WD组与对照组观察指标分析

与对照组相比,WD组ALT、AST、APRI、FIB-4、HA、LN、PⅢNP、C-IV、LSM、SWV水平明显升高($P<0.05$),外周血LncRNA Meg3表达水平显著下降($P<0.01$),而Beclin-1、LC3B水平差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表1 WD组与对照组基线资料和观察指标分析

Tab.1 Baseline data and observation indexes in WD and control groups

Variable	WD group (n=100)	Control group (n=50)	$\chi^2/z/t$	P
Male [n (%)]	61 (61.00)	29 (58.00)	0.125	0.724
Age (year)	26.00 (22.00, 35.00)	25.00 (23.00, 31.00)	-0.647	0.518
BMI (kg/m ²)	21.62 (20.21, 22.69)	21.05 (20.28, 22.64)	-0.451	0.652
ALT (U/L)	30.00 (20.45, 54.20)	16.70 (14.40, 22.40)	-5.132	<0.001
AST (U/L)	30.40 (22.15, 42.15)	19.00 (16.40, 22.60)	-6.127	<0.001
APRI	0.53 (0.33, 0.78)	0.32 (0.28, 0.39)	-5.482	<0.001
FIB-4	0.98 (0.56, 1.44)	0.52 (0.39, 0.58)	-5.753	<0.001
HA (ng/mL)	108.07 (66.65, 175.39)	67.47 (54.74, 83.28)	-5.116	<0.001
LN (ng/mL)	112.12 (84.56, 160.35)	80.77 (76.59, 90.46)	-4.956	<0.001
PⅢNP (ng/mL)	16.20 (10.01, 26.36)	9.62 (7.90, 10.33)	-5.759	<0.001
C-IV (ng/mL)	72.31 (53.44, 100.65)	48.70 (38.52, 59.83)	-5.512	<0.001
LSM (kPa)	10.17 (7.93, 13.82)	5.20 (3.81, 5.77)	-9.217	<0.001
SWV (m/s)	1.85 (1.62, 2.11)	1.26 (1.09, 1.32)	-9.603	<0.001
LncRNA Meg3	0.59 (0.11, 1.42)	1.20 (0.56, 1.84)	3.700	<0.001
Beclin-1	1.18 (0.72, 1.61)	1.11 (0.95, 1.30)	-0.339	0.735
LC3B	1.35 (0.54, 2.02)	1.17 (0.85, 1.45)	-0.797	0.425

Data are presented as Median (IQR). BMI: Body mass index; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; APRI: Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index; FIB-4: Fibrosis-4; HA: Hyaluronic acid; LN: Laminin; PⅢNP: Aminoterminal propeptide of type III procollagen; C-IV: Type IV collagen; LSM: Liver stiffness measurement; SWV: Shear wave velocity; LncRNA Meg3: Long non-coding maternally expressed gene 3; LC3B: Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta; LC3B.

2.2 WD患者外周血LncRNA Meg3表达水平与肝纤维化指标、Beclin-1、LC3B的相关性分析

Spearman相关性分析结果显示,外周血LncRNA Meg3与LSM、SWV、APRI、FIB-4、HA、C-IV、Beclin-1、LC3B均呈负相关($P<0.05$),与LN、PⅢNP无相关性($P>0.05$,图2)。在调整了性别、年龄、BMI等混杂因素后,外周血LncRNA Meg3水平的降低仍然与LSM、SWV、APRI、FIB-4、Beclin-1、LC3B水平的升高显著相

关($P<0.05$,表2)。

2.3 WD患者外周血LncRNA Meg3的诊断价值分析

ROC曲线分析结果显示,外周血LncRNA Meg3对2D-SWE肝纤维化分期>F4的敏感度为92.9%,特异度为83.7%,AUC为0.902,95%CI为0.835~0.969,其临界值为0.415。在诊断2D-SWE肝纤维化分期>F4时,LncRNA Meg3(AUC=0.902)的效能显著优于APRI(AUC=0.746)和FIB-4(AUC=0.661)(图3)。

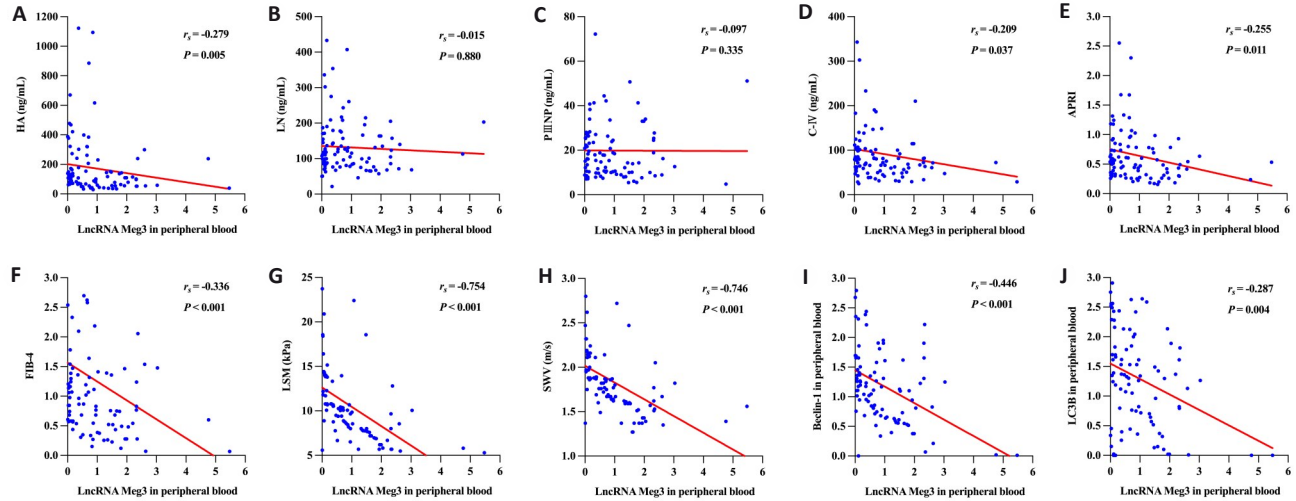


图2 WD患者外周血 LncRNA Meg3 与肝纤维化指标、Beclin-1、LC3B 的相关性分析散点图

Fig.2 Scatter plot diagram showing the correlation of LncRNA Meg3 in peripheral blood of WD patients with liver fibrosis indexes and Beclin-1 and LC3B. LncRNA Meg3 in peripheral blood was negatively correlated with HA (A), LN (B), P III NP (C), C-IV (D), APRI (E), FIB-4 (F), LSM (G), SWV (H), Beclin-1 (I) and LC3B (J).

表2 WD患者外周血 LncRNA Meg3 与连续变量的多重线性回归分析

Tab.2 Multiple linear regression analysis of peripheral blood LncRNA Meg3 and the continuous variables in WD patients

Variable	β	<i>t</i>	<i>P</i>
HA	-0.140	-1.376	0.172
LN	-0.072	-0.710	0.480
PIIINP	-0.032	-0.308	0.758
C-IV	-0.125	-1.240	0.218
APRI	-0.231	-2.340	0.021
FIB-4	-0.276	-2.566	0.012
LSM	-0.569	-6.441	<0.001
SWV	0.572	-6.500	<0.001
Beclin-1	-0.402	-4.321	<0.001
LC3B	-0.278	-2.821	0.006

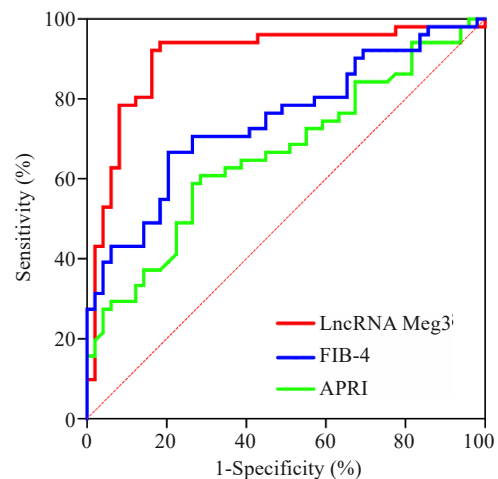


图3 WD患者外周血 LncRNA Meg3、FIB-4、APRI 的ROC曲线

Fig.3 ROC curves for peripheral blood LncRNA Meg3, FIB-4, and APRI in WD patients. The AUC for LncRNA Meg3 was 0.902 (95% CI: 0.835-0.969), significantly higher than that of FIB-4 (AUC=0.661) and APRI (AUC=0.746).

2.4 WD患者2D-SWE肝纤维化分期与外周血观察指标分析

依据2D-SWE结果对100例WD患者进行肝纤维化分期, <F2(30例、30.00%), F2-F4(21例、21.00%), >F4(49例、49.00%)。2D-SWE肝纤维化分期与APRI、FIB-4、HA、LN、C-IV、LncRNA Meg3、Beclin-1、LC3B水平差异有统计学意义($P<0.05$), 与P III NP水平差异无统计学意义($P>0.05$,图4)。

2.5 WD组与HC组HE染色、Masson染色、铜染色对比

与HC组相比,WD组HE染色结果显示,肝细胞胞质内可见大小不等的脂滴空泡,肝细胞核固缩、溶解,细胞轮廓消失坏死。同时可见门管区和肝小叶内形成较为明显的假小叶(图5A);WD组Masson染色结果显示,肝小叶结构异常,门管区大量胶原沉积,胶原纤维显著

增生并向外延展,纤维分割形成假小叶(图5B);WD组铜染色结果显示,肝细胞胞质内出现大量砖红色铜颗粒沉积,以变性肝细胞为甚,小叶周围其他区域亦可见铜颗粒沉积(图5C)。

2.6 WD组与HC组透射电镜结果对比

与HC组相比,WD组自噬小体和自噬溶酶体数量明显增加(图6)。

2.7 WD组与HC组肝组织 LncRNA Meg3、Beclin-1、LC3B 表达水平对比

与HC组相比,WD组肝组织 LncRNA Meg3 表达水平低($P<0.05$),Beclin-1、LC3B 表达水平高($P<0.05$,图7)。

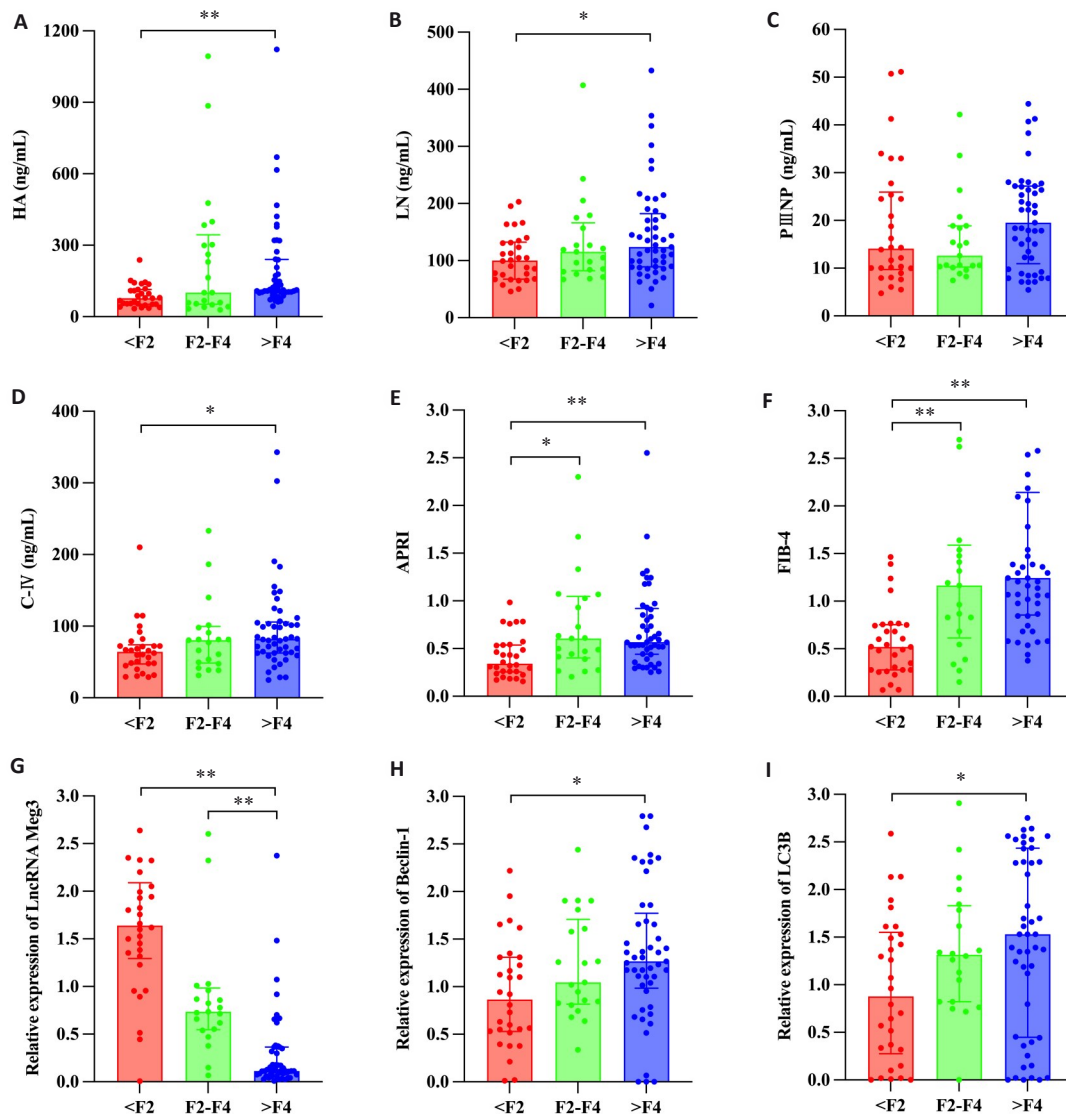


图4 WD 患者 2D-SWE 肝纤维化分期与观察指标分析箱式图

Fig.4 2D-SWE liver fibrosis stage and observation index analysis box plot of WD patients. Histograms are shown for HA (A), LN (B), PIIIINP (C), C-IV (D), APRI (E), FIB-4 (F), LncRNA Meg3 (G), Beclin-1 (H) and LC3B (I) for different 2D-SWE liver fibrosis stages. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.8 WD 组肝组织 LncRNA Meg3 与 Beclin-1、LC3B 的相关性分析

Pearson 相关性分析显示,WD 组肝组织 LncRNA Meg3 表达水平与 Beclin-1、LC3B 表达水平呈负相关 ($P<0.05$,图8)。

2.9 WD 组肝组织肝纤维化分期与 LSM、SWV 水平分析

10 例 WD 患者肝纤维化分期 S4 期 7 例, S3 期 3 例, 肝纤维化分期与 LSM、SWV 水平差异均有统计学意义 ($P<0.05$,图9)。

3 讨论

肝纤维化是 WD 发展过程中的早期病理变化,是向肝硬化发展的关键步骤和影响预后的重要环节^[5,6]。LncRNA 参与 HSC 活化^[16-18],在肝纤维化发病机制中具

有重要作用^[7],其中 LncRNA Meg3 可能参与 WD 肝纤维化^[10]。

LncRNA Meg3 是一种主要受表观遗传学调节的肿瘤抑制基因,它位于人类染色体 14q32.2 上,并在正常组织中广泛表达^[19]。Chen 等^[8]报道,在慢性乙型肝炎患者中 LncRNA Meg3 水平较低,且与肝纤维化程度呈负相关,与赵红英等^[9]报道一致,提示 LncRNA Meg3 可作为肝纤维化诊断和分期的潜在生物标志物^[9]。朱权等^[20]发现在人肝癌细胞(HepG2)中 LncRNA Meg3 表达显著低于正常组织,且其低表达与肿瘤增殖、迁移能力增强相关,过表达 LncRNA Meg3 可通过促进铁死亡增强 HepG2 对顺铂化疗的敏感性,提示 LncRNA Meg3 不仅是诊断标志物,还可能用于预测化疗效果。LncRNA Meg3 在感染、肿瘤、代谢性疾病中均表现出表达异常,提示其可能作为泛疾病标志物^[21,22]。本研究

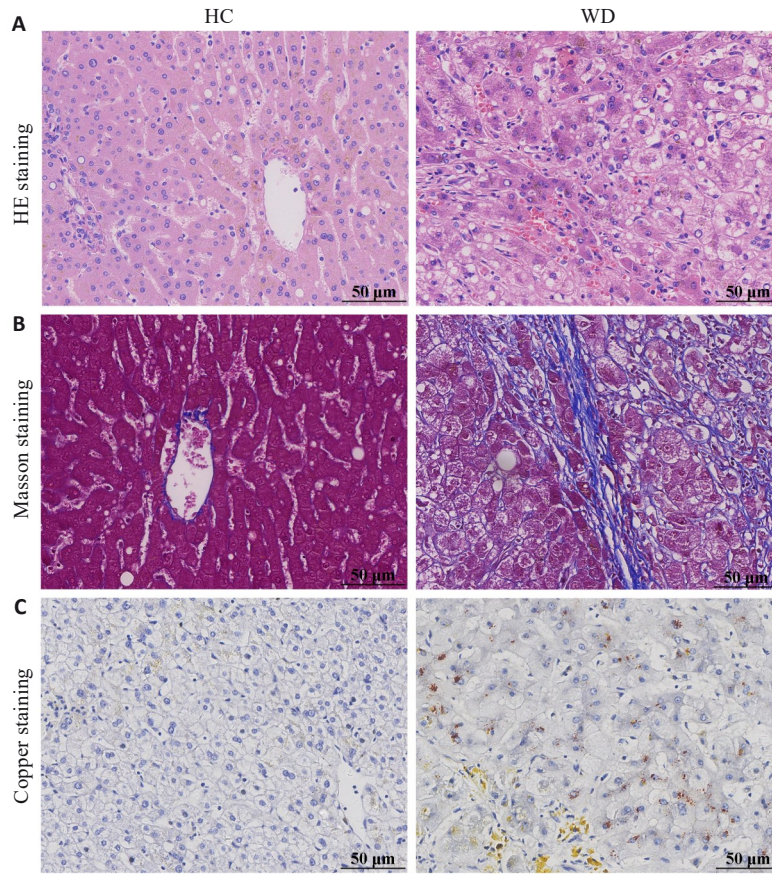


图5 WD组与HC组HE染色、Masson染色、铜染色对比
 Fig.5 HE (A), Masson (B) and copper staining (C) of the liver tissues from WD and healthy control (HC) groups (scale bar=50 μm).

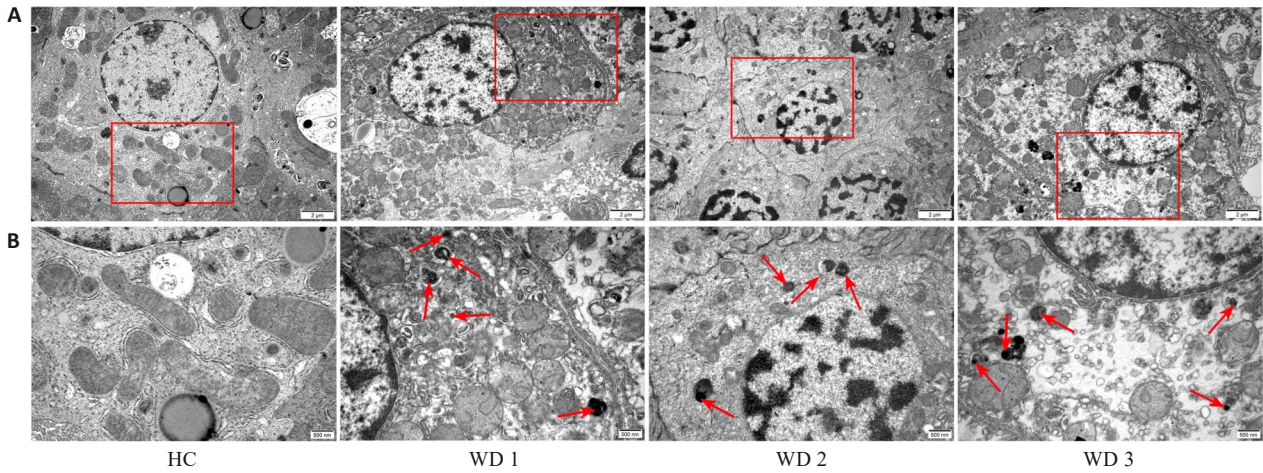


图6 WD组与HC组透射电镜对比
 Fig.6 Transmission electron microscopy of the liver tissues in WD and HC groups (A: original magnification: ×10 000; B: ×25 000). Red arrows indicate the autophagosomes.

通过对比WD患者与健康对照者外周血LncRNA Meg3表达水平,发现WD患者LncRNA Meg3表达水平明显下降,并在肝组织样本中得到验证。通过相关性分析发现,WD患者LncRNA Meg3表达水平与2D-SWE肝纤维分期、肝纤维化血清无创伤诊断模型(APRI,FIB-4)及Beclin-1、LC3B呈负相关,提示其可能通过调控自噬过程参与WD肝纤维化的发生发展。既往研究表明,

LncRNA Meg3可通过抑制mTOR信号通路或调控miRNA表达影响自噬活性^[18, 23, 24]。本课题组前期研究发现:上调LncRNA Meg3的表达,可激活PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制自噬改善铜负荷WD大鼠肝纤维化^[25, 26]。基于此,我们推测在WD中,LncRNA Meg3低表达可能促进自噬,加重肝纤维化,具体分子机制需进一步通过功能实验验证。本研究还发现外周血

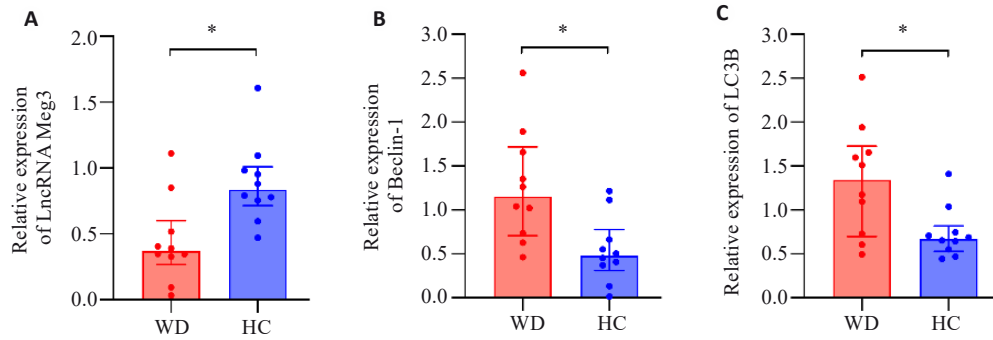


图7 WD组与HC组肝组织 LncRNA Meg3、Beclin-1、LC3B 表达水平分析箱式图
Fig.7 Box plots of the expression levels of LncRNA Meg3 (A), Beclin-1 (B) and LC3B (C) in the liver tissues in WD and HC groups. *P<0.05.

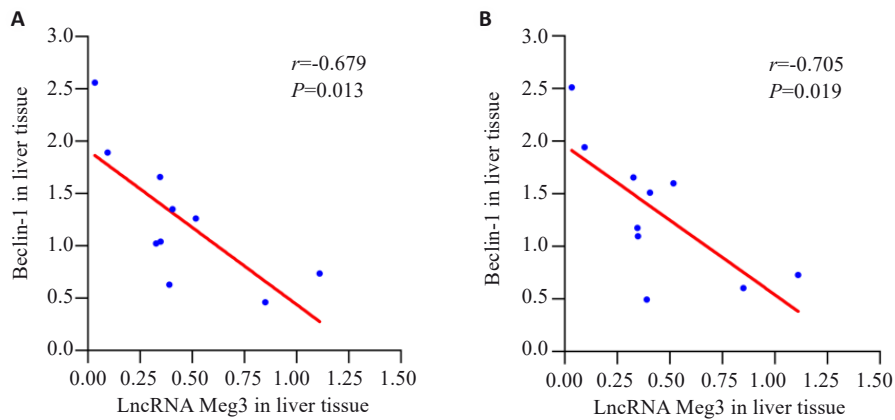


图8 WD组肝组织 LncRNA Meg3 与 Beclin-1、LC3B 的相关性分析散点图
Fig.8 Scatter plots for correlation analysis of LncRNA Meg3 with Beclin-1 (A) and LC3B (B) in the liver tissue of WD group.

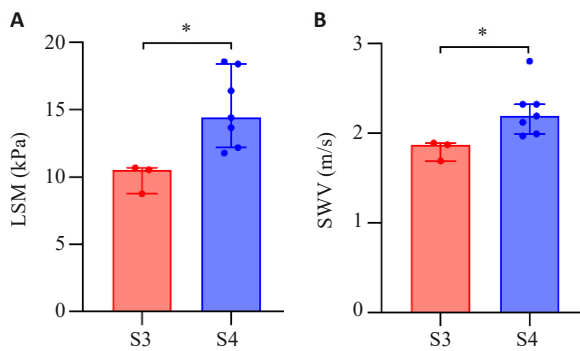


图9 WD组肝组织肝纤维化分期与LSM、SWV水平分析箱式图
Fig.9 Box plot of LSM (A) and SWV (B) levels in WD patients with different liver fibrosis stages. *P<0.05

LncRNA Meg3 对 WD 患者 2D-SWE 肝纤维化分期>F4 期的诊断价值高 (AUC=0.902, 敏感度 92.9%, 特异度 83.7%)。为进一步评估其临床价值,我们将其与目前临床常用的无创诊断指标 APRI 和 FIB-4 进行了直接对比。ROC 分析结果显示,LncRNA Meg3 的诊断效能显著优于 APRI (AUC=0.746) 和 FIB-4 (AUC=0.661)。以上提示 LncRNA Meg3 对于 WD 重度肝纤维化患者诊

断价值高,其诊断效能优于传统血清学模型,有望成为 WD 肝纤维化诊断的一种新型、高效的无创标志物。LncRNA Meg3 除了作为生物标志物,其表达水平与自噬标志物 (Beclin-1、LC3B) 的显著负相关表明,Meg3 可能直接参与了 WD 肝纤维化的病理过程。

肝纤维化程度评估对 WD 患者管理意义重大,虽肝活检是诊断“金标准”,但其创伤性、有并发症、患者接受度低及费用高,限制了普遍应用^[6]。本研究通过对 10 例经肝活检确诊为 WD 的患者进行肝纤维化分期 (S4 期 7 例,S3 期 3 例) 探讨了肝纤维化分期与无创弹性成像参数 (LSM 和 SWV) 的关系,发现 LSM 和 SWV 在晚期肝纤维化 (S3/S4 期) 中差异具有统计学意义。然而,受限于样本量不足及分期覆盖不全的限制,在早期分期的应用仍需进一步验证。肝脏弹性成像测量肝脏硬度是量化慢性肝病肝纤维化的有效无创手段,其中 2D-SWE 作为较新的弹性成像技术,优势明显,临床应用前景佳,在评估肝纤维化上诊断性能良好^[27-29]。在 WD 患者中的应用也备受关注,多项研究表明^[30-33],2D-SWE 可用于评估肝硬化、能预测脾功能亢进、区分肝脏受累程度、与相关指标存在相关性。本研究通过 2D-SWE 检查发现,WD

患者 LSM 和 SWV 水平高于健康对照组,约一半患者 2D-SWE 肝纤维化分期>F4,显示 WD 患者肝纤维化程度较重,凸显了在 WD 患者中开展肝纤维化诊断评估的重要性。

自噬是维持机体内环境稳态的重要机制,在细胞处于缺氧、感染、营养缺乏等不良应激时被激活,可降解受损蛋白质与细胞器,来维持细胞内稳态的过程^[34]。自噬在 WD 这一遗传性铜代谢障碍疾病中同样发挥着双重作用机制。Polishchuk 等^[35]研究显示,WD 患者及 *ATP7B* 缺乏的动物和肝组织中自噬被激活,能保护肝细胞;Zhang 等^[36]在高浓度 CuSO_4 诱导的 *ATP7B* 基因敲除神经干细胞 WD 模型中发现自噬水平增加致神经元损伤加重;Pantoom^[37]则发现铜诱导的 *ATP7B*^{-/-} 基因敲除 HepG2 中自噬受损。Beclin-1 作为自噬启动标志物,能启动自噬体形成,维持细胞内环境稳态^[38]。LC3B 是自噬体膜重要组成部分,其表达水平可衡量自噬活性。本研究对比 WD 患者与对照组外周血和肝组织中 Beclin-1、LC3B 基因水平,发现差异显著,且 WD 患者肝组织内自噬小体及自噬溶酶体数量增多,进一步证实了 WD 患者自噬水平的升高。同时,观察不同 2D-SWE 肝纤维化分期下二者水平变化,提示 WD 患者自噬水平与肝纤维化密切相关。这为理解 WD 肝纤维化发病机制提供关键临床依据。

本研究还存在一些局限性:首先,肝组织样本量较小,且肝纤维化分期集中于 S3~S4 期,缺乏 S0~S2 期的样本,可能导致亚组分析存在偏差。未来需扩大样本量,尤其是纳入更多早期肝纤维化患者,以进一步验证 LncRNA Meg3 在 WD 肝纤维化不同阶段的表达变化及诊断价值。其次,本研究仅在同一时间点检测了外周血与肝组织中 LncRNA Meg3 的表达水平,两者之间的一致性可能受到多种因素的潜在影响,例如:外周血的取样时间以及 RNA 提取过程中的稳定性差异等,这可能会对结果的精确解读带来一定影响。未来研究需通过多时间点动态采样、规范化的组织取样流程以及更稳定的检测技术来进一步验证这种一致性。此外,本研究为横断面设计,缺乏随访数据,因此无法动态观察 LncRNA Meg3 表达水平随时间的变化趋势,也无法阐明其变化与肝纤维化进展之间的因果关系。后续需开展前瞻性纵向研究,以明确 LncRNA Meg3 在 WD 肝纤维化动态进程中的预测价值与临床意义。

综上,LncRNA Meg3 在 WD 患者中低表达,其表达水平与 WD 肝纤维化程度、自噬密切相关,提示 LncRNA Meg3 有望成为 WD 肝纤维化诊断和病情分期评估的新型潜在生物标志物,为临床诊疗提供新思路 and 潜在靶点。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Czlonkowska A, Litwin T, Dusek P, et al. Wilson disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 21.
- [2] Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. Wilson's disease and other neurological copper disorders[J]. Lancet Neurol, 2015, 14(1): 103-13.
- [3] 中华医学会肝病学会遗传代谢性肝病协作组. 肝豆状核变性诊疗指南(2022年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(1): 9-20.
- [4] Kang ZL, Qiao N, Liu GY, et al. Copper-induced apoptosis and autophagy through oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction in male germ cells[J]. Toxicol Vitro, 2019, 61: 104639.
- [5] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-66.
- [6] 中华医学会肝病学会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 肝纤维化诊断及治疗共识(2019年)[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(9): 657-67.
- [7] Gao R, Mao J. Noncoding RNA-mediated epigenetic regulation in hepatic stellate cells of liver fibrosis[J]. Noncoding RNA, 2024, 10(4): 44.
- [8] Chen MJ, Wang XG, Sun ZX, et al. Diagnostic value of LncRNA-MEG3 as a serum biomarker in patients with hepatitis B complicated with liver fibrosis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(10): 4360-7.
- [9] 赵红英, 王文浩, 孙宁宁. 长链非编码 RNA MEG3 对老年乙型肝炎并发肝硬化和肝纤维化的诊断价值[J]. 国际消化病杂志, 2021, 41(3): 221-4.
- [10] Zhang J, Ma Y, Xie D, et al. Differentially expressed lncRNAs in liver tissues of TX mice with hepatolenticular degeneration[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1377.
- [11] Ferenci P, Caca K, Loudianos G, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease[J]. Liver Int, 2003, 23(3): 139-42.
- [12] Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C[J]. Hepatology, 2003, 38(2): 518-26.
- [13] Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection[J]. Hepatology, 2006, 43(6): 1317-25.
- [14] Wang JF, Wu ML, Linghu RZ, et al. Usefulness of new shear wave elastography technique for noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B: a prospective multicenter study[J]. Ultrascall Med, 2022, 43(2): e1-e10.
- [15] Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging[J]. Hepatology, 1994, 19(6): 1513-20.
- [16] Wu YY, Wu S, Li XF, et al. LncRNA MEG3 reverses CCl_4 -induced liver fibrosis by targeting NLR5[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 911: 174462.
- [17] Chen T, Lin HJ, Chen X, et al. LncRNA Meg8 suppresses activation of hepatic stellate cells and epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes via the Notch pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(4): 921-7.

- [18] Qin R, Huang W, Huang Y, et al. lncRNA MEG3 modulates hepatic stellate cell activation by sponging miR-145 to regulate PPAR γ [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(1): 3.
- [19] Hussain MS, Majami AA, Ali H, et al. The complex role of MEG3: an emerging long non-coding RNA in breast cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 251: 154850.
- [20] 朱 权, 黄柏胜, 位磊艳, 等. 过表达LncRNAMEG3通过促进铁死亡增强肝癌细胞对顺铂的化疗敏感性[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(1): 17-24.
- [21] 李元香, 郭艳艳, 莫代芬, 等. 血清LncRNA MEG3、miR-23b-3p与艾滋病患者特异性皮炎严重程度相关性研究[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2023, 20(2): 104-8.
- [22] 骆欣敏, 何 玉, 吴凤娇, 等. 外泌体LncRNA MEG3在子宫内膜癌中表达及其临床意义[J]. *蚌埠医学院学报*, 2022, 47(5): 627-30.
- [23] Jiang XY. Long noncoding RNA MEG3: an active player in fibrosis [J]. *Pharmacol Rep*, 2025, 77(1): 21-30.
- [24] Moradi M, Mard SA, Farbood Y, et al. The protective effect of p-Coumaric acid on hepatic injury caused by particulate matter in the rat and determining the role of long noncoding RNAs MEG3 and HOTAIR [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, 37(7): e23364.
- [25] 汪 瀚, 花代平, 殷 馨, 等. 从LncRNA Meg3调控细胞自噬途径探讨肝豆灵治疗Wilson病肝纤维化的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2025, 40(5): 2574-9.
- [26] 殷 馨, 汪 瀚, 孙兰婷, 等. 肝豆灵通过LncRNA Meg3调控自噬减轻铜负荷Wilson病大鼠肝纤维化[J]. *医学研究杂志*, 2025, 54(01): 37-42.
- [27] 中华医学会超声医学分会, 中国研究型医院学会肿瘤介入专业委员会, 国家卫生健康委员会能力建设和继续教育中心超声医学专家委员会, 等. 肝病超声诊断指南[J]. *中华肝脏病杂志*, 2021, 29(5): 385-402.
- [28] Osman AM, El Shimy A, Abd El Aziz MM. 2D shear wave elastography (SWE) performance versus vibration-controlled transient elastography (VCTE/fibroscan) in the assessment of liver stiffness in chronic hepatitis[J]. *Insights Imaging*, 2020, 11(1): 38.
- [29] Kavak S, Kaya S, Senol A, et al. Evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients with 2D shear wave elastography with propagation map guidance: a single-centre study[J]. *BMC Med Imaging*, 2022, 22(1): 50.
- [30] 刘安生, 李 燕, 伍宏兵. 实时二维剪切波弹性成像与血清肝纤维化四项指标评估肝豆状核变性肝硬化[J]. *影像研究与医学应用*, 2024, 8(10): 84-6.
- [31] Wang J, Hu M, Zhu Q, et al. Liver stiffness assessed by real-time two-dimensional shear wave elastography predicts hypersplenism in patients with Wilson's disease: a prospective study[J]. *BMC Med Imaging*, 2022, 22(1): 25.
- [32] Hwang J, Yoon HM, Jung AY, et al. Diagnostic performance of ultrasound elastography and serologic fibrosis indices for evaluation of hepatic involvement in Wilson disease[J]. *J Ultrasound Med*, 2020, 39(11): 2231-42.
- [33] 滕 阅. 应用2D-SWE技术评估儿童肝豆状核变性及糖原贮积症肝脏硬度的价值 [D]. 广州: 广州医科大学, 2022.
- [34] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6): 349-64.
- [35] Polishchuk EV, Merolla A, Lichtmanegger J, et al. Activation of autophagy, observed in liver tissues from patients with Wilson disease and from ATP7B-deficient animals, protects hepatocytes from copper-induced apoptosis[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(4): 1173-89. e5.
- [36] Zhang Y, Wang M, Tang L, et al. FoxO1 silencing in Atp7b^{-/-} neural stem cells attenuates high copper-induced apoptosis *via* regulation of autophagy[J]. *J Neurochem*, 2024, 168(9): 2762-74.
- [37] Pantoom S, Pomorski A, Huth K, et al. Direct interaction of ATP7B and LC3B proteins suggests a cooperative role of copper transportation and autophagy[J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3118.
- [38] Li X, Yang KB, Chen W, et al. CUL3 (cullin 3)-mediated ubiquitination and degradation of BECN1 (beclin 1) inhibit autophagy and promote tumor progression[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 4323-40.

(编辑:余诗诗)