

• 临床检验研究论著 •

四种循环 miRNA 在类风湿性关节炎患者血浆及外周单个核细胞中的表达分析*

荀春华, 胡志坚, 韩 峰

(九江学院附属医院检验科, 江西九江 332000)

摘要:目的 探讨血液中四种 miRNA 在类风湿性关节炎(RA)患者血浆及外周单个核细胞(PBMC)中的表达及意义。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测随机选取的 43 例 RA 患者和 30 例健康体检者血浆和 PBMC 中四种 miRNA(miRNA-146a、miRNA-223、miRNA-16 和 miRNA-155)的表达,分析这些血浆和 PBMC 特异的 miRNA 在 RA 中的作用。结果 与对照组相比, RA 组患者血浆中 miR-146a 和 miR-155 表达下调($P<0.05$),miR-16 表达增高($P<0.05$),而 miR-223 与健康对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);PBMC 中四种 miRNA 表达均上调($P<0.05$);相关性分析显示这些 miRNA 在血浆和 PBMC 中的表达没有明显相关性。结论 miRNA-146a、miRNA-223、miRNA-16 和 miRNA-155 在 RA 中起着重要作用且在血浆和 PBMC 中出现的机制可能不同。

关键词:关节炎, 类风湿; 微 RNAs; 血浆; 外周血单个核细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)15-1943-02

The analysis on the expression of 4 kinds of circulating miRNAs in plasma and peripheral mononuclear cells for patients with rheumatoid arthritis*

Xun Chunhua, Hu Zhijian, Han Feng

(Department of Clinical Laboratory, Jiujiang University Hospital, Jiujiang, Jiangxi 332000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression levels of 4 kinds of miRNAs in plasma and peripheral mononuclear cells(PBMC) of patients with rheumatoid arthritis(RA) and the clinical significance. **Methods** Real-time quantitative PCR was adopted to detect the levels of 4 kinds of miRNAs(miRNA-146a, miRNA-223, miRNA-16 and miRNA-155) both in plasma and PBMC for the randomly selected 43 cases of RA patients and 30 healthy subjects, and those plasma and PBMC specific miRNAs were analysed for their function in RA. **Results** Compared with control group, in RA group plasma miR-146a and miR-155 were down-regulated($P<0.05$), miR-16 expression increased($P<0.05$), while miR-223 compared with the healthy control group showed no statistically significant($P>0.05$); expression levels of 4 kinds of miRNAs all increased in PBMC($P<0.05$); the correlation analysis for the expression levels of miRNAs in plasma and PBMC showed no significant correlation. **Conclusion** MiRNA-146a, miRNA-223, miRNA-16 and miRNA-155 play important roles in RA, and the mechanisms for their appearance in plasma and in PBMC may be different.

Key words: arthritis, rheumatoid; microRNAs; plasma; peripheral blood mononuclear cell

miRNA 作为一类内源性的短序列非编码 RNA,主要作用于基因转录后水平的调控,通过抑制 mRNA 的翻译来参与调控机体细胞的增殖、分化、代谢、凋亡等一系列生物学活动^[1]。miRNA 在冠状动脉疾病,免疫性疾病及癌症患者的血液中表达失调^[2-3],可能对类风湿性关节炎(RA)诊断有一定的价值^[4]。为了验证其在 RA 中的作用,笔者选择了四种 miRNA(miR-146a、miR-223、miR-16 和 miR-155),采用实时荧光定量 PCR 检测 RA 患者和健康体检者血浆和外周血单个核细胞(PBMC)中 miRNAs 的相对表达量,同时对 miRNAs 在两类样本中的水平进行相关性分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 3 月至 2012 年 9 月于本院就诊或住院治疗的 RA 患者(RA 组),均符合 1987 年美国风湿病协会修订的 RA 诊断标准,男 29 例,女 14 例,年龄 19~47 岁,平均(32.4±12.9)岁。随机选取 30 例本院同期的健康体检者作为对照组,男 20 例,女 10 例,年龄 20~49 岁,平均(35.5±13.2)岁。选取的研究对象均排除其他自身免疫性疾病和严重的心肺、肝、肾等系统疾病。未使用过糖皮质激素及其他免疫

抑制剂治疗,或停用上述药物治疗 1 个月以上。本研究均经过患者的知情同意,经九江学院附属医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 样本的收集 于清晨抽取上述人员空腹静脉血 2 管(每管约 4 mL),管中含 EDTA 抗凝剂,其中一管分离血浆后于-80℃保存备用;另外一管,采用 Ficoll 分离液(sigma 公司)分离 PBMC,于-80℃保存备用。

1.2.2 总 RNA 的提取 分别取制备好的血浆和 PBMC 样本各 400 μL,按 mirVanaTMPARISTM 试剂盒(美国 Applied Biosystem 公司产品)说明书所述的方法提取总 RNA。取 1 μL RNA 在 NanoDropND1000 Spectrophotometer 仪(美国 NanoDrop 公司产品)上测定 RNA 浓度。抽提获得的 RNA 置于-80℃保存备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分别取 43 例 RA 患者和 30 例健康者血浆或 PBMC 总 RNA 60 ng,应用 miScript Reverse Transcription 反转录试剂盒(德国 Qiagen 公司产品)将其反转录为 cDNA,反应条件:37℃ 1 h,95℃ 5 min。以 cDNA 为模板,应用 miScript SYBR Green PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司

* 基金项目:江西省教育厅青年科学基金资助项目(GJJ12625)。 作者简介:荀春华,女,主管技师,主要从事临床免疫学与检验研究。

产品),进行实时荧光定量 PCR,以 U6 小核 RNA(snRNA)为内参照,miRBase database(<http://www.mirbase.org/>)中寻找四种待测的 miRNA 和 snRNA 序列然后应用 Primer Express Software v2.0(美国 Applied Biosystem 公司产品)进行设计,引物序列见表 1,引物由 Applied Biosystem 公司合成,实时荧光定量 PCR 在 7500 定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司产品)进行,PCR 反应条件:第 1 步 95 ℃ 预热 5 min,第 2 步 94 ℃ 15s,58 ℃ 30s,70 ℃ 34s,共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示每种 miRNA 相对表达水平 $\Delta\Delta C_{t\text{目的基因}} = \Delta C_{t\text{目的基因}} - \Delta C_{tU6}$,实验重复 3 次。

表 1 PCR 引物序列	
引物名称	序列(5'→3')
U6 snRNA	TTC GTG AAG CGT TCC ATA TTT T ACA CTC
miRNA-146a	CAG CTG GGT GAG AAC TGA ATT CCA TGG GT
miRNA-223	ACA CTC CAG CTG GGT GTC AGT TTG TCA AAT AC
miRNA-16	ACA CTC CAG CTG GGT AGC AGC ACG TAA ATA TT
miRNA-155	ACA CTC CAG CTG GGT TAA TGC TAA TCG TGA
miRNA reversed	TA CTC AAC TGG TGT CGT GGA

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS17.0 统计软件分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本计量资料比较采用独立样本 *t* 检验,相关性检验采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆中 miRNA 的水平 RA 组与对照组比较,血浆 miRNA-146a 和 miRNA-155 水平明显低于对照组($P < 0.05$);血浆 miRNA-223 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);血浆 miRNA-16 水平明显高于对照组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 RA 组和对照组间血浆中四种 miRNA 水平的比较			
miRNA 名称	RA 组	对照组	<i>P</i> 值
miRNA-146a	2.437±0.669	3.164±0.677	0.000
miRNA-223	3.224±0.900	3.034±0.873	0.576
miRNA-16	3.101±0.922	2.158±0.899	0.000
miRNA-155	2.504±0.765	2.764±1.081	0.003

2.2 miRNA 在 PBMC 中的表达 与对照组相比,RA 组患者 PBMC 中的 miRNA-146a、miRNA-223、miRNA-16 和 miRNA-155 表达水平均明显上调($P < 0.05$),见表 3。

表 3 RA 组和对照组 PBMC 中四种 miRNA 表达水平的比较			
miRNA 名称	RA 组	对照组	<i>P</i> 值
miRNA-146a	3.794±0.668	1.957±0.391	0.000
miRNA-223	4.471±0.774	3.670±0.816	0.000
miRNA-16	4.202±1.049	3.483±1.046	0.005
miRNA-155	3.556±1.234	2.610±1.387	0.003

2.3 血浆和 PBMC 中 miRNA 水平的相关性分析 Pearson 相关分析显示血浆和 PBMC 中四种 miRNA 检测结果的相关系数和 *P* 值分别为 miRNA-146a; $r = 0.001, P = 0.994$; miR-

NA-223; $r = 0.125, P = 0.425$; miRNA-16; $r = 0.152, P = 0.330$; miRNA-155; $r = 0.107, P = 0.493$ 。血浆和 PBMC 中四种 miRNA 检测结果均无明显相关性。

3 讨 论

RA 是常见的以关节滑膜慢性炎症为主要特征的自身免疫性疾病,其主要病理改变为关节滑膜明显增厚并伴有大量炎症细胞浸润,血管翳形成以及软骨组织的侵蚀与破坏^[5]。miRNA 是一类短的(大约 20~22 个核苷酸)非编码 RNA,介导 RNA 干扰和在翻译水平抑制蛋白表达;可被分泌释放到细胞外,参与多种炎症和自身免疫性疾病的发病过程^[6]。有研究表明 miRNA 与自身免疫性疾病进程有关且可能参与 RA 新的调控机制^[6-8]。miRNA 在 RA 发病中的作用逐渐成为研究热点,有望成为 RA 新的诊断标志物和治疗靶点^[4]。有文献报道 RA 患者单核巨噬细胞和滑膜组织中 miRNA-146a 和 miRNA-16 的表达量均明显增加,且这种异常与疾病的活动性呈正相关,其水平可以像 ESR 和 CRP 一样反映疾病的活动状态,而上调的 miRNA146a 对靶点 IRAK-1 和 TRAF6 的异常负向调控可能是导致 RA 发病的主要原因^[9-11]。此外,有文献报道在 RA 患者的滑膜组织中过度表达的 miRNA-155 可以抑制间质金属蛋白酶(MMP)-1 及 MMP-3 的生成,以此对抗风湿关节的组织破坏,且 RA 患者滑液 miRNA-155 和 miRNA-146a 的表达比骨关节患者高,其中 miR155 通过减少 Toll 样受体配体 MMP-3 和细胞因子表达来调节组织损伤控制慢性炎症对滑膜组织的损害^[12-13]。miRNA-223 在滑膜组织中控制破骨细胞的分化而在 RA 患者滑膜组织中高表达^[14]。由此可见,miRNA-146a、miRNA-223、miRNA-16 和 miRNA-155 与 RA 是密切相关的,有希望作为该病的诊断标志物。

本研究表明,RA 组血浆 miRNA-146a 和 miRNA-155 水平低于对照组,miR-16 水平高于对照组;RA 组血浆 miRNA-223 水平与对照组的差异无统计学意义。这些结果与 Murata 等^[15]的报道不符,可能与受试人群的选择及地区不同有关,有待进一步证实。RA 组 PBMC 中四种 miRNA 的表达水平均明显上调,与已有的报道相符^[9,11]。Hunter 等^[16]研究发现健康人 PBMC 与血浆微泡中 miRNA 表达方式明显不同。本研究发现 miRNA 在血浆中的水平和在 PBMC 中的表达水平没有明显相关性,可能是因为 miRNA-146a、miRNA-223、miRNA-16 和 miRNA-155 在 RA 患者血浆和 PBMC 中出现的机制可能不同。

总之,miRNA-146a、miRNA-223、miRNA-16 和 miRNA-155 有可能作为 RA 诊断标志物,miRNA 在 RA 患者血浆中的水平和在 PBMC 中的表达水平无相关性说明 miRNA 在血浆中出现的机制较为复杂,有待进一步的研究。

参考文献

[1] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23(1): 175-205.

[2] Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. Circ Res, 2010, 107(5): 677-684.

[3] Zhao H, Shen J, Medico L, et al. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast Cancer[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13735.

[4] Filková M, Jüngel A, Gay RE, et al. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy[J]. Bio Drugs, 2012, 26(3): 131-141.

(下转第 1947 页)

3 讨 论

血液中出现 NRBC 是由于幼稚红系细胞释放至外周血所致,在新生儿血液中可见^[1-2]。但是涉及新生儿 NRBC 参考值的文献甚少,主要原因之一新生儿血样来源困难,其二是以往计数常基于手工涂片镜检,计数细胞数少,重复性较差,人为主观因素较强。随着 Sysmex 公司研发出 XE-2100 血细胞分析仪,使用聚次甲基荧光染料对 NRBC 和 WBC 进行核酸染色,经半导体激光流式细胞检测,使得 NRBC 计数作为常规检测项目成为可能。并且该方法灵敏度、准确性、精密度均得到国内外专家学者的验证^[3-4]。

本研究检测了新生儿科患儿外周血 NRBC,共 115 例(71.88%)患儿检出 NRBC,另 45 例(28.12%)患儿未检出 NRBC,NRBC 检出率与性别无关。如此多的住院新生儿外周血检出 NRBC,而健康成人血液中无 NRBC^[2],说明将检测新生儿外周血 NRBC 作为一项常规检测具有实际可行性。研究发现外周血检出 NRBC 组患儿胎龄低于未检出 NRBC 组,外周血检出 NRBC 组患儿体质量轻于未检出 NRBC 组,表明外周血 NRBC 的出现可能与新生儿成熟度有关。虽然早产儿和足月儿外周血均有可能出现 NRBC,但是 NRBC 计数比例与绝对值在早产儿中均高于足月儿。尽管在不同出生体质量的患儿外周血均有可能出现 NRBC,然而 NRBC 计数比例与绝对值在体质量低于正常的患儿中均高于体质量正常的患儿。以上均表明胎龄越小、体质量越轻、发育越不成熟的胎儿外周血 NRBC 计数比例与绝对值会升高。有文献报道 NRBC 数量与早产儿所患疾病严重程度呈正相关^[5]。说明外周血 NRBC 有可能成为评价新出生婴儿的健康指标之一,监测新生儿 NRBC 具有实际操作性和一定的临床实用价值。

本次研究发现外周血 NRBC 检出率最高为新生儿出生后的第 1 天,随着新生儿出生天数增加,外周血 NRBC 检出率下降。但是有 52.94%的患儿在出生 4 周后,外周血仍能检测出 NRBC,笔者推测外周血 NRBC 有可能成为新生儿观察疗效及预后的指标。但是上述猜测需要大量临床研究资料来证实。

其中 18 例新生儿窒息患儿外周血均检测出 NRBC,其 NRBC 计数比例与绝对值,均高于未诊断新生儿窒息但在外周血检出 NRBC 患儿。可能胎儿在缺氧状态下,骨髓红系代偿

增生旺盛,导致外周血大量出现 NRBC。这与国内外报道脐血 NRBC 数量与胎儿发生宫内窘迫相关一致^[6-8]。因此通过本实验,作者猜测检测外周血 NRBC 可能成为新生儿窒息诊断依据之一。

参考文献

- [1] Goyama S, Kanda Y, Nannya Y, et al. Clinical significance of peripheral blood erythroblastosis after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Leuk Lymphoma*, 2004, 45(12): 2439-2443.
- [2] Otsubo H, Kaito K, Asai O, et al. Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation[J]. *Clin Lab Haematol*, 2005, 27(4): 242-246.
- [3] 李建英. 血细胞分析仪自动计数外周血有核红细胞的应用研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(6): 606-609.
- [4] Wang FS, Itose Y, Tsuji T, et al. Development and clinical application of nucleated red blood cell counting and staging on the automated haematology analyser XE-2100 [J]. *Clin Lab Haematol*, 2003, 25(1): 17-23.
- [5] Roescher AM, Hitzert MM, Timmer A, et al. Placental pathology is associated with illness severity in preterm infants in the first twenty-four hours after birth[J]. *Early Hum Dev*, 2011, 87(4): 315-319.
- [6] Kil TH, Han JY, Kim JB, et al. A study on the measurement of the nucleated red blood cell (nRBC) count based on birth weight and its correlation with perinatal prognosis in infants with very low birth weights[J]. *Korean J Pediatr*, 2011, 54(2): 69-78.
- [7] Boskabadi H, Maamouri G, Sadeghian MH, et al. Early diagnosis of perinatal asphyxia by nucleated red blood cell count: a case-control study[J]. *Arch Iran Med*, 2010, 13(4): 275-281.
- [8] Bayram F, Ozerkan K, Cengiz C, et al. Perinatal asphyxia is associated with the umbilical cord nucleated red blood cell count in pre-eclamptic pregnancies[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2010, 30(4): 383-386.

(收稿日期:2013-01-08)

(上接第 1944 页)

- [5] Cooles FA, Isaacs JD. Pathophysiology of rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2011, 23(3): 233-240.
- [6] Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles[J]. *Cell*, 2009, 136(1): 26-36.
- [7] Seo KH, Zhou L, Meng D, et al. Loss of microRNAs in thymus perturbs invariant NKT cell development and function[J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(6): 447-453.
- [8] Baxter D, McInnes IB, Kurowska-Stolarska M. Novel regulatory mechanisms in inflammatory arthritis: a role for microRNA[J]. *Immunol Cell Biol*, 2012, 90(3): 288-292.
- [9] Pauley KM, Satoh M, Chan AL, et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R101.
- [10] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1284-1292.
- [11] Feng ZT, Li J, Ren J, et al. Expression of miR-146a and miR-16 in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis and their correlation to the disease activity[J]. *Nan Fang*

Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2011, 31(2): 320-323.

- [12] Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(4): 1001-1009.
- [13] Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(27): 11193-11198.
- [14] Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, et al. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation[J]. *Mod Rheumatol*, 2013, 23(4): 674-685.
- [15] Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3): R86.
- [16] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3694.

(收稿日期:2013-04-15)