

· 论 著 ·

强直性脊柱炎患者外周血 miR-132、IL-17 的表达及临床意义*

郭团茂, 杨争光, 陈忠宁, 行艳丽[△], 朱海云
(咸阳市中心医院骨科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 探讨强直性脊柱炎(AS)患者外周血 miR-132 及白细胞介素 17(IL-17)的表达及临床意义。
方法 选取 2013 年 8 月至 2017 年 8 月该院门诊及住院部收治的 AS 患者 189 例及同期健康志愿者 105 例作为 AS 组和对照组。收集 AS 患者和健康志愿者外周血,以实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测 miR-132 的表达水平,以酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血浆 IL-17 表达水平,并采用 Pearson 相关分析 miR-132 与 IL-17 的相关性。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析外周血 miR-132 表达水平对 AS 的诊断价值。
结果 与对照组相比,AS 组患者外周血 miR-132 及 IL-17 水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。相关性分析发现,AS 组患者外周血中 miR-132 与 IL-17 呈正相关($r = 0.713, 95\%CI: 0.635 \sim 0.777, P < 0.01$)。ROC 曲线分析结果显示,外周血中 miR-132 mRNA 表达水平诊断 AS 的灵敏度和特异度分别是 90.5% 和 91.0%。
结论 miR-132 和 IL-17 在 AS 的发病机制中有着重要的作用,而且外周血 miR-132 是诊断 AS 的潜在生物学标志物。

关键词: miR-132; 白细胞介素 17; 强直性脊柱炎; 生物学标志物
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.19.010 **中图法分类号:** R593.23
文章编号: 1673-4130(2020)19-2341-03 **文献标识码:** A

Expression and clinical significance of peripheral blood miR-132, IL-17 in patients with ankylosing spondylitis*

GUO Tuanmao, YANG Zhengguang, CHEN Zhongning, XING Yanli[△], ZHU Haiyun
(Department of Orthopaedic, Xianyang Central Hospital, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of peripheral blood miR-132 and IL-17 in patients with ankylosing spondylitis (AS). **Methods** Totally 189 patients with AS and 105 healthy volunteers in the same period were enrolled from August 2013 to August 2017 in the hospital. Peripheral blood was collected from patients with AS and healthy volunteers. The expression level of miR-132 was detected by RT-qPCR, while the expression level of IL-17 was detected by ELISA. Then the correlation between miR-132 and IL-17 was analyzed by Pearson. Receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to analyze the diagnostic value of miR-132 expression level in peripheral blood for AS. **Results** Compared with the control group, miR-132 and IL-17 levels in peripheral blood of patients in AS group were significantly increased ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that miR-132 in peripheral blood of AS patients was positively correlated with IL-17 ($r = 0.713, 95\%CI: 0.635 - 0.777, P < 0.01$). ROC analysis showed that the sensitivity and specificity of miR-132 mRNA in peripheral blood for the diagnosis of AS were 90.5% and 91.0%, respectively. **Conclusion** IL-17 and miR-132 play important roles in the pathogenesis of AS, and the peripheral blood miR-132 is a potential biomarker for the diagnosis of AS.

Key words: miR-132; interleukin 17; ankylosing spondylitis; biological marker

强直性脊柱炎(AS)是一种常见的慢性自身免疫紊乱性脊柱疾病,多以骶髂关节炎最先发病,最终导致心肺功能受限的脊柱强直改变。AS 是多病因疾病,遗传和环境因素占发病因素的 90%,其中 50% 遗传因素与机体主要组织相容性复合物 HLA-B27 基因相关^[1]。目前,AS 的发病机制仍然不十分清楚。近年来发现,miR-132 参与了多种炎症性疾病的发病机制,包括自身免疫性疾病类风湿关节炎^[2-3]。白细胞

* 基金项目:陕西省中医药管理局 2019 年科研项目(2019-GJ-LC003);陕西省咸阳市中青年科技创新领军人才项目(咸科发[2018]64 号);陕西省咸阳市中心医院重点创新项目(2019Z-02)。

作者简介:郭团茂,男,主任医师,主要从事脊柱外科临床研究。 [△] 通信作者, E-mail: 1538946055@163.com。

本文引用格式:郭团茂,杨争光,陈忠宁,等.强直性脊柱炎患者外周血 miR-132、IL-17 的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2020,41(19):2341-2343.

介素 17(IL-17)作为一种炎性介质,在很多免疫紊乱性疾病中有重要作用。目前,miR-132、IL-17 与 AS 的关系尚不清楚。因此,本研究探索了 AS 患者外周血 miR-132 及 IL-17 的表达情况及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 8 月至 2017 年 8 月在本院门诊及住院的 AS 患者 189 例作为 AS 组。AS 诊断符合美国风湿病学会(ACR)1984 年纽约标准^[4]。(1)双侧或单侧的骶髂关节炎;(2)临床表现符合下列条件之一:①轴性腰背痛时间至少 3 个月,持续性静息痛,活动后疼痛改善;②腰椎活动度受限,尤以前屈后伸及侧屈明显;③胸廓活动度低于同龄、同性别的正常值。纳入标准:(1)经上述诊断标准确诊的 AS 患者;(2)血清 HLA-B27 阳性;(3)红细胞沉降率和 C 反应蛋白异常的活动期患者。排除标准:(1)近 3 个月出现感染病史;(2)严重的高血压、糖尿病患者;(3)有恶性肿瘤病史;(4)合并脊柱退变疾病。AS 组患者中,男 152 例,女 37 例;年龄 19~56 岁,平均(29.8±6.1)岁;病程 6 个月至 20 年,平均(6.6±1.4)年。另选取同期在本院体检的健康志愿者 105 例作为对照组,其中男 84 例,女 21 例;年龄 25~45 岁,平均(30.7±3.6)岁。两组性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院伦理委员会审议批准,所有研究对象均知情研究内容并签署同意书。

1.2 仪器和试剂 9701 型梯度荧光 PCR 仪购自南京赛飞生物科技有限公司,SM800 型多功能酶标仪购自上海永创医疗器械有限公司。Ficoll 分离液购自上海生工生物工程股份有限公司,总 RNA 提取所用 Trizol 试剂、RNase-free 水购自上海杰美基因医药科技有限公司,反转录试剂盒及人 IL-17 试剂盒购自上海联硕生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血 miR-132 表达水平的测定 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-132 的表达情况。收集每位研究对象清晨空腹外周静脉血 3 mL,置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,3 000 r/min 离心 5 min。采用 Ficoll 分离液外周静脉血分离单个核细胞(PBMC),然后加入 Trizol 试剂 1 mL 充分裂解细胞,提取 PBMC 的总 RNA,最后加入 15 μ L 的 RNase-free 水溶解沉淀。根据反转录试剂盒说明书进行反转录 cDNA 操作。参照 Genbank 数据库及 miRBase 数据库中的基因序列,使用软件 Primer5.0 设计引物,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。RT-qPCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,然后按以下条件循环 40 次:变性 95 $^{\circ}$ C 5 s,58 $^{\circ}$ C 30 s/72 $^{\circ}$ C 30 s。miR-132 的相对表达水平以 U6 为内参照,将目标基因的 Ct 值与内参基因的 Ct 值做对比,计算基因 mRNA 的相对表达量^[5]。

1.3.2 血浆 IL-17 表达水平的测定 取制备的研究对象血浆标本于室温下复融,应用酶联免疫吸附试验

(ELISA)检测研究对象血浆中 IL-17 的表达水平。严格按照人 IL-17 ELISA 试剂盒说明书操作步骤实施。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	引物序列
miR-132	上游:5'-TGGATCCCCCCCAGTCCCCGTCCCTCAG-3'
	下游:5'-TGAATTCGGATACCTTGGCCGGGAGGAC-3'
U6	上游:5'-AAAATTTCTCACGCCGGTATTTC-3'
	下游:5'-CCTGCAGACCGTTCGTCAA-3'

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS23.0 统计软件包进行处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用两独立样本 t 检验。miR-132 与 IL-17 的相关性采用 Pearson 相关分析。采用受试者工作特征曲线(ROC)分析外周血 miR-132 对 AS 患者的诊断价值。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 miR-132 及 IL-17 表达水平比较 AS 组患者外周血 miR-132 及 IL-17 表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组外周血 miR-132 及 IL-17 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-132(pg/mL)	IL-17(pg/mL)
AS 组	189	3.98±1.23	8.04±1.37
对照组	105	2.01±0.31	5.12±0.41
<i>t</i>		16.13	21.30
<i>P</i>		<0.01	<0.01

2.2 AS 组患者外周血 miR-132、IL-17 的相关性 Pearson 相关分析结果显示,miR-132、IL-17 呈正相关($r=0.713,95\%CI:0.635\sim0.777,P<0.01$)。

2.3 外周血 miR-132 诊断 AS 患者的 ROC 曲线 外周血 miR-132 诊断 AS 患者的 ROC 曲线见图 1,miR-132 ROC 曲线下面积为 0.931,临界值取 2.50,其诊断 AS 的灵敏度为 90.5%,特异度为 91.0%。见图 1。

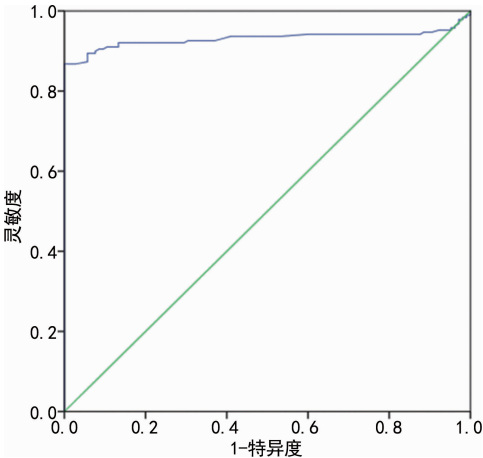


图 1 外周血 miR-132 诊断 AS 的 ROC 曲线

3 讨论

AS 是发生在运动系统的慢性疾病,通常影响脊柱和外周关节,疾病持续性恶化最终严重影响生活质量。资料显示,全世界 AS 的发病率近年呈上升趋势。

势^[6]。由于缺少阻止疾病进展和有效防治方法, AS 发病率不断递增^[7]。本研究探索了外周血 miR-132 及 IL-17 在 AS 的表达和临床意义。

辅助性 T 淋巴细胞 Th17(CD4⁺ T 细胞)分泌炎症因子 IL-17, 参与多种自身免疫紊乱性疾病的发病, 如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎等。AS 作为自身免疫性疾病, 淋巴细胞诱导的炎症反应是疾病的重要因素。栾仲秋等^[8]认为, 类风湿关节炎患者血清中 IL-17 明显升高, 并且疾病的活动性和 IL-17 正相关。有研究发现, IL-17 诱导银屑病和银屑病性关节炎患者血糖或血脂升高, 研究者认为炎症因子导致了自身免疫性疾病中代谢紊乱^[9]。在本研究中, AS 组患者血浆 IL-17 的表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 验证了张立等^[10]的研究结果: 早期启动的 IL-17 炎症因子参与 AS 发病过程。有学者进一步研究发现, IL-17 单抗对活动期 AS 有良好的治疗效果^[11]。提示炎症因子 IL-17 在 AS 疾病的发病中起着重要的作用, 通过抑制 IL-17 可以预防和治疗 AS。

微小 RNA(miR)属于内源性非编码单链小分子 RNA, 转录后调控靶基因的表达水平。miR-132 是发现较早和研究较多的 miR, 在癌症、神经退变性疾病、炎症疾病、免疫系统疾病中发挥着重要的作用。有研究强调, 低表达的 miR-132 是总体生存率($P = 0.001$)和无病生存率($P = 0.006$)的独立预后因素, miR-132 与骨肉瘤的发生、发展有关^[12]。另外一个研究表明, miR-132 在舌鳞状细胞中的表达增加^[13]。有学者已经证实, miR-132 与 miR-223 通过调节炎症性肠病中的叉形头转录因子 O 亚型 3a(FOXO3a)控制正反馈回路^[14]。有报道表明, 青少年特发性关节炎患者血浆中 miR-132 低于健康人和青少年 AS 患者^[15]。AS 是一种慢性炎症性疾病, 因此本研究检测了患者外周血 miR-132, 结果发现 miR-132 呈高表达, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 同时, miR-132 与 IL-17 水平呈明显正相关($r = 0.713$, $P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示, miR-132 诊断 AS 的灵敏度和特异度较高, 结果表明 miR-132 可以视为活动性 AS 血液中潜在的生物标志物。

4 结 论

综上所述, miR-132 和 IL-17 在 AS 的发病机制中有着重要的作用, 而且外周血 miR-132 是诊断 AS 的潜在生物学标志物。然而, 本文纳入样本量较少, 未来将会纳入较大样本量进一步验证结论。此外, miR-132 及 IL-17 的详细网状机制有待进一步阐明。

参考文献

[1] CHEN R, WEI Y, CAI Q, et al. PADI4 gene polymorphism is not associated with ankylosing spondylitis in Chinese Han population[J]. Scand J Immunol, 2010, 72(5):449-453.

[2] SINGH A, PATRO P S, AGGARWAL A. MicroRNA-132, miR-146a, and miR-155 as potential biomarkers of methotrexate response in patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol, 2019, 38(3):877-884.

[3] 郑锡铭, 姜峻. RA 患者外周血及关节液中 miR-132, miR-140-5p, miR-150 及 miR-181a 表达水平的临床意义[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(3):362-366.

[4] ROSU O M, ANCUTA C. McKenzie training in patients with early stages of ankylosing spondylitis: results of a 24-week controlled study[J]. Eur J Phys Rehabil Med, 2015, 51(3):261-268.

[5] LU K P, ALEJANDRO N F, TAYLOR K M, et al. Differential expression of ribosomal L31, Zis, gas-5 and mitochondrial mRNAs following oxidant induction of proliferative vascular smooth muscle cell phenotypes[J]. Atherosclerosis, 2002, 160(2):273-280.

[6] SONG Y, WANG C, CHEN H. Functional limitation and associated factors in outpatients with ankylosing spondylitis in Southwest China[J]. Clin Rheumatol, 2017, 36(4):871-877.

[7] GORMAN J D, SACK K E, DAVIS J C. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha[J]. N Engl J Med, 2002, 346(18):1349-1356.

[8] 栾仲秋, 李秋红, 王继坤, 等. 类风湿性关节炎患者 IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-23 和 IL-33 炎症相关因子变化的临床意义[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(3):64-65.

[9] PIROWSKA M, PODOLEC K, LIPKO-GODLEWSKA S, et al. Level of inflammatory cytokines tumour necrosis factor alpha, interleukins 12, 23 and 17 in patients with psoriasis in the context of metabolic syndrome [J]. Postepy Dermatol Alergol, 2019, 36(1):70-75.

[10] 张立, 王丽, 李建平, 等. IL-12 和 IL-17 强直性脊柱炎患者的外周血表达水平及两者之间相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(12):1776-1780.

[11] WENDLING D, VERHOEVEN F, PRATI C. Anti-IL-17 monoclonal antibodies for the treatment of ankylosing spondylitis[J]. Expert Opin Biol Ther, 2019, 19(1):55-64.

[12] YANG J, GAO T T, TANG J, et al. Loss of microRNA-132 predicts poor prognosis in patients with primary osteosarcoma[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 381(1/2):9-15.

[13] ANAND S, MAJETI B K, ACEVEDO L M, et al. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis [J]. Nat Med, 2010, 16(8):909-914.

[14] KIM H Y, KWON H Y, THI H T, et al. MicroRNA-132 and microRNA-223 control positive feedback circuit by regulating FOXO3a in inflammatory bowel disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 31(10):1727-1735.

[15] MA X, WU F, XIN L, et al. Differential plasma microRNAs expression in juvenile idiopathic arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2016, 26(2):224-232.