

类风湿性关节炎患者血浆 microRNA-221 检测及临床意义

张瑞萍, 李翠茹

洛阳市第一人民医院检验科, 河南 洛阳 471002

摘要: **目的** 探讨血浆微小核糖核酸(microRNA, miRNA)-221 在类风湿性关节炎(RA)患者中的表达及其与血清 C-反应蛋白(CRP)和类风湿因子(RF)的相关性。**方法** 选取 2015 年 1 月至 6 月于郑州大学第一附属医院确诊的 101 例 RA 患者为实验组, 52 例健康志愿者为对照组。采用定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)方法检测血浆中 miRNA-221 表达水平, 采用免疫比浊法测定血清 CRP, ELISA 法测定 RF。**结果** 实验组血浆 miRNA-221 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)明显高于对照组(0.164 ± 0.142 vs 0.072 ± 0.026 , $t = 4.611$, $P = 0.000$); 实验组血浆 miRNA-221 表达量与血清 CRP 和 RF 含量呈正相关($r = 0.287$, $P = 0.004$; $r = 0.373$, $P = 0.000$)。**结论** 血浆 miRNA-221 在类风湿性关节炎患者中表达升高, 或可作为 RA 诊断的标志物。

关键词: 类风湿性关节炎; 微小核糖核酸-221; C-反应蛋白; 类风湿因子

中图分类号: R 593.22 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)06-0800-03

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种累及多关节的以关节滑膜慢性炎症为特征的自身免疫性疾病, 关节滑膜明显增厚并伴有大量炎症细胞浸润、血管形成以及软骨组织的侵蚀与破坏是其主要病理改变^[1]。

microRNAs(miRNAs)是一种长度为 18~25 碱基的单链非编码小 RNA, 通过与目的信息 RNA 的 3'-非翻译区结合, 并进一步抑制其翻译或使其降解, 从而达到基因调控的目的^[2]。研究表明, miRNAs 可以参与多种病理生理过程, 包括细胞生长、增殖、凋亡、侵袭和迁移^[3], 在各种疾病的发生发展中发挥作用。有报道证实, miRNAs 可以出现在包括血液、唾液、尿液和乳汁等各种体液当中^[4], 并且由于其稳定性和体液标本的易获得性, 体液 miRNAs 作为疾病预测和诊断的潜在生物学标志物越来越受到人们的重视。2012 年 Pandis 等^[5]发现, 与骨关节炎(osteoarthritis)患者相比, RA 患者关节液成纤维细胞(synovial fibroblast)中 miRNA-221 表达量明显升高, 推测 RA 患者成纤维细胞中 miRNA-221 的高表达可能与 RA 的发病有关。目前, 关于 RA 患者血浆 miRNA-221 的研究尚未见报道。本研究旨在通过检测 RA 患者血浆中 miRNA-221 的表达, 并分析其与其他常见 RA 血清学检测指标间的相关性, 探讨血浆 miRNA-221 在 RA 诊断中的价值及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 6 月于郑州大学第一附属医院确诊的 RA 患者 101 例为实验组, 所有患者诊断均符合 1987 年美国风湿病协会修订的 RA 诊断标准, 其中男性 27 例, 女性 74 例; 年龄 18~85(54.3 ± 14.6)岁。并选取同期本院体检科健康体检者 52 例作为对照组, 其中男 21 例, 女 31 例; 年龄 20~45(30.1 ± 10.3)岁。两组对象性别、年龄比较无统计学差异(P 均 > 0.05)。本研究经本院伦理委员会批准, 并获得患者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器 RNA 提取试剂 TRI Reagent BD(美国 MRC Gene 公司); RT 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TAKARA 公司); NanoDrop2000c 紫外分光光度计(美国赛默飞世尔公司); 7500 Fast Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2.2 样本的收集 于清晨采集患者空腹 12 h 以上肘静脉血, 取 3 ml 置于 EDTA-K2 抗凝管中, 3 000 g 离心 10 min, 将血浆转移至 1.5 ml EP 管中, 再以 12 000 g 离心 10 min, 取 200 μ l 血浆, 保存于 -80°C 备用, 用于 miRNA-221 测定。另取 3 ml 静脉血, 不抗凝, 离心后取上层血清, 用于 CRF 及 RF 的测定。

1.2.3 血浆总 RNA 提取、反转录反应及定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)测定 miRNA-221 用 TRI Reagent BD 试剂提取总 RNA; NanoDrop2000c 紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, 选取吸光度

(A260/280 nm) 比值在 1.8 ~ 2.1 间的样品用于后续实验;按 RT 反转录试剂盒说明书操作将 RNA 逆转录为 cDNA。以 U6 为内参基因,引物设计与合成由广州锐博公司完成。qRT-PCR 总反应体系为 20 μ l, 包括 SYBR[®] Premix Ex Taq II (2 \times), 10 μ l, 10 μ mol/L 上、下游引物各 0.8 μ l, ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ l, cDNA 模板 2 μ l, ddH₂O 6 μ l。循环参数:95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 3 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。7500 Fast System SDS 软件计算 Ct 值, miRNA-221 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。所有反应均设立 3 个复孔。

1.2.4 血清 CRP 及 RF 定量测定 采用免疫比浊法进行血清 CRP 测定, ELISA 法进行 RF 定量测定。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本比较采用独立样本 *t* 检验;相关性采用 Pearson 相关分析。计数资料采用 χ^2 检验。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 血浆 miRNA-221 的表达水平 qRT-PCR 结果显示, RA 组 miRNA-221 相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 为 0.164 ± 0.142 , 明显高于正常对照组 (0.072 ± 0.026), 差异有统计学意义 ($t = 4.611, P = 0.000$)。见图 1。

2.2 血清 CRP 及 RF 定量检测结果 RA 患者血清 CRP 及 RF 含量明显高于对照组 (P 均 < 0.01)。见表 1。

2.3 血浆 miRNA-221 表达水平与血清 CRP 及 RF 含量相关性分析 Pearson 相关分析结果显示, 血浆

中 miRNA-221 表达量与血清 CRP 含量呈正相关 ($r = 0.287, P = 0.004$); 与血清 RF 含量亦呈正相关 ($r = 0.373, P = 0.000$)。

3 讨论

RA 是一种常见的自身免疫性疾病, 现行诊断标准是由美国风湿病协会提出, 主要依靠临床表现、X 线检查及 RF 检测。然而, 符合此标准的患者常常已出现骨关节破坏, 并且 RF 阳性也可出现在系统性红斑狼疮、原发性干燥综合征、恶性肿瘤等疾病, 缺乏特异性, 故寻找新的诊断标志物显得十分必要。

近年来研究发现, miRNA 在包括 RA 在内的多种炎性疾病中发挥重要作用^[6]。在 RA 中, miRNA 可以在成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes)、滑膜液、滑膜成纤维细胞和关节软骨中表达, 其在 RA 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^[7-9]。miRNA-155 和 miRNA-146a 在炎症刺激下可以产生, 并且与骨关节炎患者滑膜成纤维细胞相比表达量明显升高^[10-11]; miRNA-223 在 RA 患者滑膜组织中表达升高, 沉默 miRNA-223 的表达可以减轻疾病活动度^[12]; miRNA-16 已经被证实在 RA 患者的血浆、外周血单个核细胞和滑膜液中表达升高, 甚至和疾病活动度相关^[9, 13]。

目前, miRNA-221 在 RA 中的研究尚不多见, 本研究对 RA 患者血浆 miRNA-221 表达情况、血清 CRP 和 RF 含量进行检测, 结果显示, 与正常对照组相比, RA 患者血浆 miRNA-221 表达量、血清 CRP 和 RF 含量明显升高。进一步相关性分析发现, 血浆 miRNA-221 表达量与血清 CRP 和 RF 含量呈正相关, 而 CRP 和 RF 均是 RA 常规血清学诊断指标, 且与 RA 的疾病活动性相关, 从而提示血浆 miRNA-221 有可能参与 RA 的发生发展, 并且有望成为 RA 的早期诊断指标。然而, miRNA-221 在 RA 的发生发展中的具体作用机制尚不清楚, 进一步研究其作用靶标将可为 RA 的治疗提供帮助。

参考文献

- [1] Lequerré T, Richez C. Pathophysiology of rheumatoid arthritis [J]. Rev Prat, 2012, 62(8): 1085 - 1093.
- [2] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. Nature, 2010, 466(7308): 835 - 840.
- [3] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. Cell, 2009, 136(4): 642 - 655.
- [4] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential [J]. Expert Rev Proteomics, 2009, 6(3):

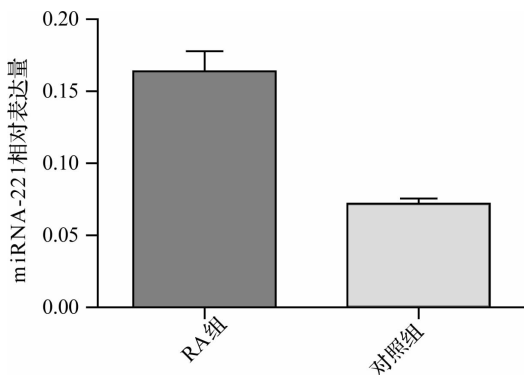


图 1 两组对象血浆中 miRNA-221 表达水平比较

表 1 两组对象血清 CRP 和 RF 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CRP (mg/L)	RF (U/L)
试验组	101	29.68 ± 16.47	220.42 ± 102.90
对照组	52	4.75 ± 2.36	9.56 ± 4.99
<i>t</i> 值		10.842	14.744
<i>P</i> 值		0.000	0.000

267-283.

- [5] Pandis I, Ospelt C, Karagianni N, et al. Identification of microRNA-221/222 and microRNA-323-3p association with rheumatoid arthritis via predictions using the human tumour necrosis factor transgenic mouse model[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(10):1716-1723.
- [6] Mi S, Zhang J, Zhang W, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for inflammatory diseases[J]. *Microna*, 2013, 2(1):63-71.
- [7] Salehi E, Eftekhari R, Oraei M, et al. MicroRNAs in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2015, 34(4):615-628.
- [8] Filková M, Jünger A, Gay RE, et al. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy[J]. *Bio Drugs*, 2012, 26(3):131-141.
- [9] Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteo-

arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3):R86.

- [10] 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 USA*, 2011, 108(27):11193.
- [11] 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.
- [12] Li YT, Chen SY, Wang CR, et al. Brief report: amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(10):3240-3245.
- [13] 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.

收稿日期:2016-02-29 修回日期:2016-03-11 编辑:周永彬

· 临床研究 ·

低钙透析液联合活性维生素 D 治疗血液透析继发性甲状旁腺功能亢进临床观察

付源, 蔡汝超, 章喜俊

东南大学附属南京江北人民医院肾内科, 江苏 南京 210048

摘要: **目的** 探讨低钙透析液联合活性维生素 D 治疗血透患者继发性甲状旁腺功能亢进的疗效。**方法** 选取 2014 年 1 月至 2015 年 10 月肾内科收治的 25 例肾功能衰竭合并甲状旁腺亢进需行血液透析的患者,应用低钙透析液进行透析,同时依据甲状旁腺亢进的程度予以不同剂量的活性维生素 D 治疗,观察并记录血清钙、磷水平、钙磷乘积、全段甲状旁腺素(iPTH)以及相关不良反应。**结果** 治疗 2 个月时与治疗前比较,所有患者血清 iPTH 值显著降低($P < 0.05$),血钙、钙磷乘积和血磷有所降低,但差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。治疗 4 个月时与治疗前比较,血钙增高($P < 0.05$),血磷、钙磷乘积、iPTH 值均明显降低(P 均 < 0.01);与治疗 2 个月时比较,钙磷乘积、iPTH 值均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。治疗期间有 1 例患者发生胃肠道不良反应,经处理后缓解。**结论** 低钙透析液联合活性维生素 D 的治疗方案对血液透析患者继发性甲状旁腺功能亢进临床疗效良好,各项指标改善明显,可避免高钙血症进而有可能减少心血管钙化的发生率。

关键词: 血液透析; 低钙透析液; 活性维生素 D; 甲状旁腺功能亢进, 继发性

中图分类号: R 692.5 R 582.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)06-0802-03

随着临床血液透析技术日臻完善,肾脏替代治疗在国内的普及程度也愈来愈高,尽管延长了血液透析患者的生存时间,但相关的并发症也相对增多。作为终末期肾脏病的常见并发症之一,继发性甲状旁腺功能亢进(SHPT)会使血磷增高、钙磷乘积增高,导致透析患者的死亡危险性随之明显增高^[1-2]。合理的临床干预治疗不仅可以延缓 SHPT 的病程发展,而且能改善各种临床症状。有文献报道,SHPT 引发转移性

钙化可导致心血管疾病、皮肤瘙痒,肾性贫血加重和神经功能损害等并发症^[3-4],是血液透析患者病死率增高的主要原因,但这种转移性钙化并非不可逆转,临床可以采取降低血磷和血钙水平的措施来进行治疗。本研究应用低钙透析液联合活性维生素 D 的方案治疗 SHPT,疗效良好,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2015 年 10 月我院肾内科收治的 25 例肾功能衰竭合并 SHPT 需行血液透析的患者,采用化学发光法检测其血清全段甲