

类风湿关节炎患者血浆外泌体 miR-16-5p 和 miR-223-3p 的表达及临床意义

桑成晨 钱 龙

摘要 目的 通过检测 miR-16-5p 及 miR-223-3p 在类风湿关节炎(RA)患者和正常人血浆外泌体中的表达水平,分析其与 RA 临床指标间的关系,进一步了解其在 RA 疾病中的临床价值。方法 采用 exoEasy Maxi Kit 试剂盒提取 RA 患者和正常人血浆中的外泌体,采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应技术(RT-qPCR)对外泌体中 miR-16-5p 和 miR-223-3p 进行定量检测。结果 外泌体 miR-16-5p 在 RA 组 [1.852 (1.084, 2.532)] 中的表达高于健康对照组 [0.995 (0.572, 1.798)], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 但在 RA 活动组 [1.427 (0.950, 2.314)] 中的表达水平与 RA 稳定组 [1.970 (1.248, 2.857)] 相当, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。外泌体 miR-223-3p 在 RA 组 [106.611 (46.813, 223.841)] 的表达水平高于健康对照组 [47.586 (8.115, 101.347)] 在 RA 活动组 [199.615 (104.944, 305.090)] 中的相对表达水平也高于 RA 稳定组 [53.993 (21.524, 107.707)], 并且 miR-223-3p 相对表达水平与患者关节压痛

数(TJC)、关节肿胀数(SJC)、基于 CRP 及 ESR 水平计算的 28 个关节疾病活动性评分(DAS28-CRP、DAS28-ESR)均呈正相关 ($P < 0.05$)。结论 miR-16-5p 和 miR-223-3p 在 RA 患者血浆外泌体中异常表达,提示其在 RA 发病中可能起重要作用。

关键词 外泌体; 微小 RNA; 类风湿关节炎

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)10-1628-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.030

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性、炎症性和系统性自身免疫疾病,临床主要表现为关节疼痛、肿胀、畸形,严重时可导致残疾,同时它可以累及肺、心脏和眼睛等关节外器官,并且与心血管疾病、感染、淋巴瘤和预期寿命降低的风险增加有关。RA 的确切病因尚不清楚,许多研究提示环境和遗传因素综合作用参与其发病,目前认为炎症的小分子介质(如花生四烯酸代谢产物)、自身抗体、细胞因子、生长因子、趋化因子、黏附分子、表观遗传学、异常信号转导和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)均与 RA 的发病机制有关。表观遗传学与 RA 的研究进展表明微小 RNA(microR-

2020-06-04 接收

基金项目:安徽省学术和技术带头人及后备人选科研项目(编号:2017H143)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院风湿免疫科,合肥 230601

作者简介:桑成晨,女,硕士研究生;

钱龙,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: longqian0551@163.com

recovery assessment, they were divided into the postoperative incomplete recovery group ($n = 52$) and the postoperative complete recovery group ($n = 36$). The body mass index (BMI), extracorporeal circulation (CPB) time, ascending aorta occlusion time, deep hypothermia cycle arrest time, intraoperative cerebral oxygen saturation, history of hypertension, and surgical treatment timing within 24 hours of onset were retrospectively analyzed. **Results** Univariate analysis showed that there were statistically significant differences in body mass index ($P = 0.002$) and CPB time ($P < 0.001$), time of ascending aorta occlusion ($P < 0.001$), deep and low temperature shutdown cycle time ($P < 0.001$), history of hypertension ($P = 0.024$), surgery within 24 hours of onset ($P = 0.006$), and intraoperative brain oxygen saturation ($P < 0.001$). For the single factor analysis indicators to be statistically significant in two classifications dependent variable Logistic regression analysis, the results showed that extracorporeal circulation time ($OR = 1.150, P = 0.001$), the cycle time of cryogenic stop ($OR = 1.450, P = 0.001$), brain oxygen saturation ($OR = 0.918, P = 0.002$), hypertension ($OR = 0.682, P = 0.015$), and within 24 hours of surgery ($OR = 0.525, P = 0.020$) were statistically significant independent predictors. **Conclusion** Extracorporeal circulation time, deep hypothermia shutdown time, intraoperative cerebral oxygen saturation, history of hypertension, and surgery within 24 hours of onset were independent predictors of patients' recovery after type A dissection.

Key words type A aortic dissection; surgical treatment; incomplete recovery; cause analysis

NA, miRNA) 与 RA 发病机制之间有紧密关系, 近年来有学者研究证实外泌体可通过传递 miRNAs 参与 RA 发病机制^[1]。该研究通过检测 miR-16-5p 和 miR-223-3p 在 RA 患者和正常人血浆外泌体中的表达水平进一步探讨外泌体 miRNAs 和 RA 之间的确切联系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第二附属医院风湿免疫科 2017 年 10 月~2019 年 10 月的 RA 住院患者 56 例, 按照患者基于 C 反应蛋白(C reaction protein, CRP) 水平计算的 28 个关节疾病活动性评分(disease activity score 28-CRP, DAS28-CRP) 来区分 RA 活动度, 其中病情活动组(DAS28-CRP ≥ 3.2) 和稳定组(DAS28-CRP < 2.6) 各 28 例。同时收集 24 例健康体检者作为对照组。本研究获得研究对象知情同意及安徽医科大学第二附属医院医院伦理委员会批准。

1.2 纳入、排除标准 所有病例组患者诊断均符合美国风湿病学会 1987 年 RA 分类诊断标准, 对照组为同期健康体检者, 研究对象均为无血缘关系汉族人, 各组年龄及性别差异无统计学意义($P > 0.05$)。选取的研究对象均排除感染、代谢、肿瘤和其他自身免疫性疾病。

1.3 一般资料 记录所有患者以下临床资料: 姓名、年龄、性别、类风湿因子(rheumatoid factor, RF) 滴度、抗环瓜氨酸肽抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, Anti-CCP) 滴度、血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、CRP、关节压痛数(tender joint count, TJC)、关节肿胀数(swollen joint count, SJC)、关节超声、关节平片等, 并计算 RA 患者 DAS28 评分。

1.4 实验流程 采集 RA 患者与正常人晨血标本 10 ml, 离心取上层血浆后, 按照试剂盒说明书使用 Qiagen 公司的外泌体提取试剂盒(exoEasy Maxi kit) 提取外泌体。以 miR-451a 作为内对照, 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应技术(RT-qPCR) 对外泌体中 miR-16-5p 和 miR-223-3p 进行定量检测, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算其相对表达水平。

1.5 统计学处理 所有数据均采用 SPSS 18.0 进行统计学分析。计量资料正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态分布以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示; 计量资料两组间比较采用 t 检验或秩和检验, 计数资料两组间比较采用 χ^2 检验; 变量间相关性比较采用 Spearman 相关分

析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料统计分析 在 RA 组及健康对照组, RA 病情活动组及稳定组中, 性别、年龄差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、表 2。

表 1 RA 组与健康对照组的一般资料比较

组别	n	性别(男/女)	年龄[最低~最高($\bar{x} \pm s$)]
RA	56	11/45	19~80(57.66 \pm 13.86)
健康对照	24	5/19	36~76(57.58 \pm 10.91)
χ^2/t 值	-	0.000	-0.024
P 值	-	1.000	0.981

表 2 RA 病情活动组与稳定组的一般资料比较

组别	n	性别(男/女)	年龄[最低~最高($\bar{x} \pm s$)]
病情活动	28	6/22	39~80(59.86 \pm 11.61)
病情稳定	28	5/23	19~80(55.46 \pm 15.70)
χ^2/t 值	-	0.113	1.190
P 值	-	0.737	0.239

2.2 RA 组和健康对照组血浆外泌体中 miR-16-5p 的表达 RA 组及健康对照组血浆外泌体中均检测到 miR-16-5p, 其在 RA 组 [1.852 (1.084, 2.532)] 中的表达高于健康对照组 [0.995 (0.572, 1.798)], 差异有统计学意义($Z = -2.310, P = 0.021$) (图 1)。

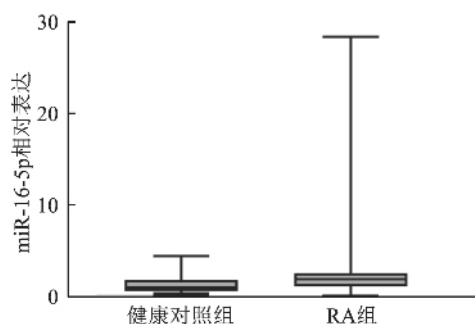


图 1 miR-16-5p 在 RA 组和健康对照组血浆外泌体中的表达

2.3 RA 病情活动组和稳定组血浆外泌体中 miR-16-5p 的表达 血浆外泌体 miR-16-5p 在 RA 活动组 [1.427 (0.950, 2.314)] 中的表达水平与 RA 稳定组 [1.970 (1.248, 2.857)] 相当, 差异无统计学意义($Z = -1.573, P = 0.116$) (图 2)。

2.4 RA 组和健康对照组血浆外泌体中 miR-223-3p 的表达 RA 组与健康对照组外泌体中均检测到 miR-223-3p, RA 组 [106.611 (46.813, 223.841)] 血浆外泌体 miR-223-3p 的表达水平高于健康对照组

[47.586 (8.115 ,101.347)],差异有统计学意义 ($Z = -2.845, P = 0.004$) (图3)。

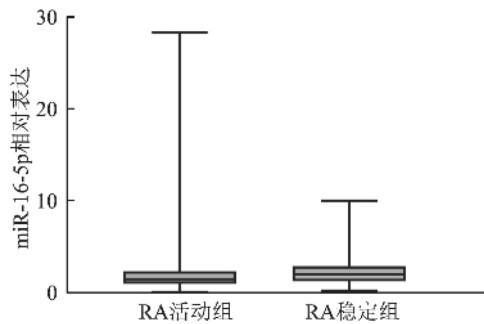


图2 miR-16-5p在RA病情活动组和稳定组血浆外泌体中的表达

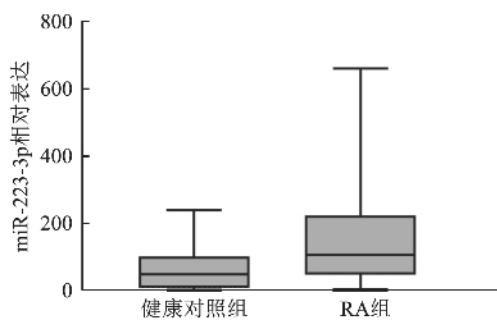


图3 miR-223-3p在RA组和健康对照组血浆外泌体中的表达

2.5 RA病情活动组和稳定组血浆外泌体中 miR-223-3p 的表达 血浆外泌体 miR-223-3p 在 RA 活动组 [199.615 (104.944 ,305.090)] 中的相对表达水平比 RA 稳定组 [53.993 (21.524 ,107.707)] 升高,差异有统计学意义 ($Z = -4.097, P = 0.000$) (图4)。

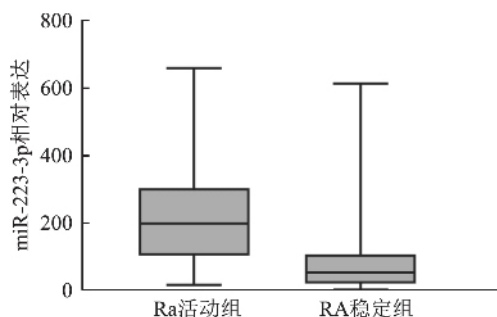


图4 miR-223-3p在RA病情活动组和稳定组血浆外泌体中的表达

2.6 血浆外泌体 miR-16-5p、miR-223-3p 相对表达水平与临床相关指标的相关性 相关性分析显示,RA 患者血浆外泌体 miR-16-5p 与 RF 滴度、Anti-CCP 滴度、ESR、CRP、TJC、SJC、DAS28-CRP 和 DAS28-ESR 等临床指标均无相关性 ($P > 0.05$);

miR-223-3p 相对表达水平与患者 RF 滴度、Anti-CCP 滴度、ESR 和 CRP 均无相关性,但与 TJC、SJC、DAS28-CRP、DAS28-ESR 评分呈正相关 ($P < 0.05$),见表3。

表3 RA 患者血浆外泌体 miRNAs 相对表达和临床指标的相关性分析

临床指标	miR-16-5p		miR-223-3p	
	r 值	P 值	r 值	P 值
RF	-0.074	0.587	-0.084	0.538
Anti-CCP	0.062	0.648	-0.207	0.125
ESR	0.048	0.724	0.036	0.790
CRP	0.143	0.291	0.113	0.407
TJC	-0.157	0.248	0.508	0.000
SJC	-0.141	0.300	0.483	0.000
DAS28-CRP	-0.027	0.842	0.434	0.001
DSA28-ESR	-0.036	0.791	0.355	0.007

3 讨论

RA 病程中关节的破坏给患者、社会均造成了沉重负担,明确 RA 的发病机制、寻找其早期诊断的生物标志物及开发理想的 RA 治疗药物是迫切的医学需求。外泌体是一种由多种细胞分泌可进入细胞外环境的异质性囊泡,其内包含脂质、蛋白质、多种核酸等物质,Takamura et al^[2] 鉴定了 RA 成纤维样滑膜细胞系(即 MH7A)的外泌体 RNA,发现 miR-155 和 miR-146a 在源自 MH7A 的外泌体中表达,并且在 TNF- α 刺激后的外泌体中的表达是升高的,提示外泌体可能通过传递 miRNAs 参与 RA 发病机制。miRNAs 作为进化高度保守的一类小分子 RNA 参与免疫系统的发育和免疫功能的调节,研究显示 miR-16^[3-4]、miR-223^[5-6] 在 RA 患者的血清、外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PB-MC)、关节滑液、滑膜组织等标本中均异常表达,因 miRNAs 与外泌体结合后不受内源性核糖核酸酶活性的影响而稳定存在^[7],表明外泌体 miRNAs 有成为新的疾病生物标志物的潜能。故本研究通过检测 miR-16-5p 和 miR-223-3p 在血浆外泌体中的表达水平,并进行临床相关性分析,进一步探讨外泌体 miRNAs 在 RA 发病及疾病进展中的意义。

miR-16 被位于人类 3 号和 13 号染色体上的两个基因编码,Jing et al^[8] 通过分析从人细胞中分离的 miR-16 的序列发现 miR-16 包含可以与 TNF- α mRNA 中的 ARE 基因配对的 UAAAUAUU 序列,破坏 miR-16 前体 pre-miR16-1 后可显著降低 HeLa 细

胞中 miR-16 的水平,并延长了 TNF- α mRNA 的半衰期,从而推测其参与 ARE 介导的 TNF- α mRNA 降解过程,而 TNF- α 在 RA 的发病机制中起重要作用,这似乎说明 miR-16 可能参与 RA 的发生。Wu et al^[9] 的研究进一步发现 RA 患者 PBMC 中的 Th17 和 Treg 细胞中 miR-16 的表达与转录因子 ROR γ t 和 FoxP3 的表达密切相关,说明 miR-16 可能通过影响 ROR γ t 和 FoxP3 的表达而参与 RA 患者的 Th17/Treg 失衡。随后孙寅等^[4] 发现 miR-16 在 RA 患者血浆、PBMC 和关节滑液中的表达水平均高于健康对照组,其表达水平由低到高分别为 PBMC、关节滑液和血浆,且 RA 患者血浆 miR-16 的表达与 DAS28 呈负相关, PBMC 中 miR-16 的表达与 DAS28 评分、ESR 及 CRP 呈正相关。而 Murata et al^[10] 研究结果显示滑液中 miR-16 的浓度与 RA 临床指标 MMP-3、CRP、ESR、DAS28、SJC、TJC 均无相关性。本研究检测了 RA 患者和健康对照组的血浆外泌体 miR-16-5p 的相对表达量,发现其在 RA 患者中的表达高于健康对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示其可能参与 RA 发病。但外泌体 miR-16-5p 在 RA 病情活动组及稳定组中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),且其表达水平与 RF 滴度、Anti-CCP 滴度、ESR、CRP、TJC、SJC、DAS28-CRP 和 DAS28-ESR 等临床指标均无相关性 ($P > 0.05$),结合既往研究中 miR-16 在 RA 患者血浆、关节滑液和 PBMC 中的表达水平存在明显差异,考虑 miR-16 在不同标本中的来源不同,并可能存在不同的 miRNA 表达谱,需要加大样本量进行更深入的研究明确外泌体 miR-16 参与 RA 发病的作用机制。

miR-223 位于人类 X 染色体 q12 上, Fulci et al^[6] 首次表征了 RA 患者外周 T 淋巴细胞的 miRNA 表达谱,与正常人相比, RA 患者 CD4+ 原始 T 淋巴细胞中 miR-223 的表达显著升高,而正常人的原始 CD4 T 细胞用 T 细胞抗原受体刺激后也未检测到 miR-223 的表达,说明 RA 患者中 miR-223 的过表达与 RA 发病相关。Sugatani et al^[11] 的研究显示 miR-223 通过转录因子 PU.1/miR-223/核因子 1A (nuclear factor 1A, NFI-A)/巨噬细胞集落刺激因子受体 (macrophage colony-stimulating factor receptor, M-CSFR) 反馈通路调控破骨细胞的生成。在这个反馈环中, M-CSFR 可以上调 PU.1 水平刺激 miR-223 的表达,过表达的 miR-223 下调 NFI-A 水平促进破骨细胞的生成,同时 NFI-A 表达水平的降低使 M-CSFR 的表达水平升高,而 M-CSFR 对破骨细胞的分化

和功能至关重要。随后 Li et al^[5] 在 RA 患者关节滑膜和 CIA 小鼠模型中的实验进一步证实了 Sugatani et al^[11] 的结论,提示 miR-223 可能成为 RA 的潜在治疗靶点。近期孙广等^[12] 研究了 RA 患者血清外泌体 miR-223 的表达水平,发现 RA 患者血清外泌体 miR-223 的相对表达量显著高于健康对照组,且其表达量与 RA 患者 DAS28 评分、血清 Anti-CCP 滴度、RF 滴度、CRP 及 ESR 水平正相关。在本研究中相对于健康对照组, RA 患者血浆外泌体 miR-223-3p 的表达增高 ($P < 0.05$),这与孙广等^[12] 的研究结果一致,同时本研究发现外泌体 miR-223-3p 在 RA 活动组的表达水平高于 RA 稳定组 ($P < 0.05$),进一步说明外泌体 miR-223-3p 可能参与 RA 疾病的发展。相关性分析结果显示 RA 患者血浆外泌体 miR-223-3p 相对表达水平与 RF 滴度、Anti-CCP 滴度、ESR 和 CRP 均无相关性 ($P > 0.05$),这个结果与孙广等^[12] 的研究结果存在不同,考虑可能有以下原因: ① 目前的大量研究在 RF 滴度、Anti-CCP 滴度、ESR 及 CRP 水平与 RA 疾病活动度是否相关的问题上存在分歧,这可能与不同实验方法测定出的指标值存在差异以及活动期 RA 患者的炎症指标与滑膜炎严重程度并不一致^[13] 有关; ② 来自于同一发夹结构 pre-miRNA 的相反两臂命名时后缀加“-3p”(表示从 3' 端的臂加工而来)或“-5p”(表示从 5' 端的臂加工而来),如 miR-223-3p 和 miR-223-5p,它们在不同组织的表达量不同,本研究选取表达量较高且特异性较高的 miR-223-3p 进行研究,而孙广等^[12] 的研究中并未提及测定的 miR-223 序列; ③ 本研究中选择的内参相对表达量计算方法与孙广等^[12] 的不同,这可能导致了不同的结果。同时本研究中 RA 患者血浆外泌体 miR-223-3p 相对表达水平与 TJC、SJC、DAS28-CRP、DAS28-ESR 均呈正相关 ($P < 0.05$),这说明外泌体 miR-223-3p 不仅参与 RA 的发病,还可能用来评估 RA 患者的疾病活动情况,但其可否成为 RA 的潜在治疗靶点还需要更多的实验证实。

本研究通过检测 miR-16-5p 和 miR-223-3p 在 RA 患者和正常人血浆外泌体中的表达,发现其有可能成为 RA 筛查、诊断、评估病情的生物标志物。考虑到目前各种研究中定量方法、不同患者的疾病活动和药物治疗情况以及样本类型(全血、分离细胞亚群、滑膜组织、滑液等)的不一致性,应当注意这些研究结果间的偏差,这可能会推迟 miRNAs 作为 RA 疾病生物标志物的应用。

参考文献

- [1] Withrow J, Murphy C, Liu Y, et al. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther* 2016, 18(1): 286.
- [2] Takamura Y, Aoki W, Satomura A, et al. Small RNAs detected in exosomes derived from the MH7A synovial fibroblast cell line with TNF- α stimulation [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201851.
- [3] Pauley K M, Satoh M, Chan A L, et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R101.
- [4] 孙 寅. miRNA-16 在类风湿性关节炎患者血浆和关节滑液中的表达及临床意义 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [5] Li Y T, Chen S Y, Wang C R, et al. Brief report: amelioration of collagen-induced arthritis in mice by lentivirus-mediated silencing of microRNA-223 [J]. *Arthritis Rheum* 2012, 64(10): 3240-5.
- [6] Fulci V, Scappucci G, Sebastiani G D, et al. miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis [J]. *Hum Immunol* 2010, 71(2): 206-11.
- [7] Recep B, Katrien V R, George A C, et al. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(12): 1673-86.
- [8] Jing Q, Huang S, Guth S, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability [J]. *Cell*, 2005, 120(5): 623-34.
- [9] Wu Y, Liu W, Xue B, et al. Upregulated expression of microRNA-16 correlates with Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis [J]. *DNA Cell Biol*, 2016, 35(12): 853-60.
- [10] 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.
- [11] Sugatani T, Hruska K A. Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(7): 4667-78.
- [12] 孙 广, 候贻莉, 吴 辉, 等. 类风湿性关节炎患者血清外泌体 miR-223、miR-155 表达水平及临床意义 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(21): 2644-7 2650.
- [13] Jonathan G, Rebecca S, Carl G, et al. Levels of C-reactive protein associated with high and very high cardiovascular risk are prevalent in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Plos One*, 2009, 4(7): e6242.

Expression and clinical significance of miR-16-5p and miR-223-3p in plasma exosomes of patients with rheumatoid arthritis

Sang Chengchen, Qian Long

(Dept of Rheumatology and Immunology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective By detecting the expression levels of miR-16-5p and miR-223-3p in the plasma exosomes of rheumatoid arthritis (RA) patients and normal people, the relationship between them and clinical indicators of RA was analyzed to further understand their clinical value in RA diseases. **Methods** ExoEasy Maxi kit was used to extract exosomes from RA patients and normal human plasma, and miR-16-5p and miR-223-3p were quantitatively detected in exosomes using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction technology. **Results** The expression of exosomes miR-16-5p in the RA group [1.852 (1.084, 2.532)] was higher than that in the healthy control group [0.995 (0.572, 1.798)], and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). However, its expression level in the RA active group [1.427 (0.950, 2.314)] was comparable to the RA stable group [1.970 (1.248, 2.857)], and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The expression level of exosomes miR-223-3p in the RA group [106.611 (46.813, 223.841)] was higher than that in the healthy control group [47.586 (8.115, 101.347)], and its expression level in the RA active group [199.615 (104.944, 305.090)] was also higher than that in the RA stable group [53.993 (21.524, 107.707)] ($P < 0.05$). At the same time, the relative expression level of miR-223-3p was positively correlated with the patients' TJC, SJC, DAS28-CRP and DAS28-ESR scores ($P < 0.05$). **Conclusion** The abnormal expression of miR-16-5p and miR-223-3p in plasma exosomes of RA patients suggests that they may play an important role in the pathogenesis of RA.

Key words exosomes; microRNA; rheumatoid arthritis