

网络出版时间: 2019-12-2 13:43 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.022.html>

◇ 临床医学研究 ◇

环状 RNA hsa_circ_104871 在系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中的表达和意义

黄自坤 张 露 曾璐璐 罗 清

摘要 目的 探讨环状 RNA hsa_circ_104871 在系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血单个核细胞(PBMC)中的表达及临床意义,以阐明其在 SLE 诊断及鉴别诊断中的应用价值。方法 应用 RT-PCR 检测 70 例 SLE 患者(SLE 组)、70 例健康对照组(健康对照组)和 76 例 RA 疾病对照组(RA 疾病对照组)PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平,比较各组之间环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平,分析 SLE 患者 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达与临床指标的相关性,并采用受试者工作特征(ROC)曲线评价环状 RNA hsa_circ_104871 诊断指标的灵敏度和特异度。结果 ① SLE 组患者 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平低于健康对照组($t=3.57, P=0.0005$)。② 患者 SLE 环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平低于 RA 疾病对照组($U=1472, P<0.0001$)。③ SLE 组患者 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平低于对照组(健康对照组+RA 疾病对照组)($U=2654, P<0.0001$)。④ SLE 组患者环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平与 PLT 呈正相关($r=0.2900, P=0.0157$)。⑤ SLE 组患者和健康对照组 ROC 曲线曲线下面积(AUC)为 0.759(95% CI: 0.677~0.841; $P<0.0001$),敏感性为 64.29%,特异性为 81.43%。⑥ SLE 组患者和 RA 疾病对照组 ROC 曲线 AUC 为 0.727(95% CI: 0.645~0.809; $P<0.0001$),敏感性为 70.00%,特异性为 66.23%; SLE 组患者和对照组 AUC 为 0.742(95% CI: 0.666~0.818; $P<0.0001$),敏感性为 65.71%,特异性为 74.80%。结论 SLE 患者 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 的表达明显下调,且与 SLE 血液系统 PLT 受累的严重程度呈负相关,可作为 SLE 的潜在的诊断及鉴别诊断标志物。

关键词 系统性红斑狼疮;环状 RNA;诊断标志物

中图分类号 R 593.24+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1947-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.022

2019-07-10 接收

基金项目:江西省教育厅科技项目(编号:170008);江西省自然科学基金(编号:20171BAB205113);国家自然科学基金项目(编号:81360459)

作者单位:南昌大学第一附属医院检验科,南昌 330006

作者简介:黄自坤,男,主管技师,硕士;

罗清,女,主管技师,硕士,责任作者,E-mail: lxc042@163.com

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种病因不明的,以免疫性炎症为突出表现的系统性自身免疫病,好发于育龄期妇女^[1]。目前用于诊断的实验室指标主要为自身抗体,但是自身抗体敏感性较低,患者中阳性率也较低,有一定的误诊和漏诊^[2-3]。环状 RNA 是最近新发现的区别于传统线性 RNA 的一类特殊 RNA,主要由 mRNA 前体通过可变剪切加工产生,具有闭合环状结构^[4]。此外,这使得环状 RNA 在作为新型临床生物标记物的开发应用上具有明显优势。环状 RNA 在多种疾病^[5-7]的诊断、疗效判断、监测复发上的作用已得到证实,在 SLE 中的作用也逐渐得到大家的认识^[8]。该研究首次以外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)环状 RNA hsa_circ_104871 为研究目标,探讨其在 SLE 诊断及鉴别诊断中的价值和意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 70 例 SLE 患者来自南昌大学第一附属医院风湿免疫科 2017 年 1 月~2019 年 3 月期间住院患者,其中男 5 例,女 65 例;年龄 11~75(40.8±14.6)岁,临床诊断符合美国风湿病学会(ACR)1997 年修订的分类标准^[9],并排除严重糖尿病、高血压、高血脂、心脑血管疾病、肝肾疾病、血栓性疾病、血小板疾病等其他疾病。健康对照组 70 例,均为健康志愿者,排除炎症或其他自身免疫性疾病,其中男 10 例,女 60 例;年龄 22~74(38.4±11.3)岁。两组性别、年龄无显著性差异。详细收集 SLE 患者临床资料及相关实验室检查数据,并计算其 SLE 疾病活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)^[10]。此外,选取同期收治的 76 例类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)作为 RA 疾病对照组,其中男 14 例,女 62 例;年龄 16~79(54.9±12.3)岁。临床诊断符合美国风湿病学会(ACR)1987 年修订 RA 诊断标准^[11],并排除其他疾病。本实验经过医院伦理委员会批准,患者和健康

人均签署知情同意书。

1.2 试剂和主要仪器 Ficoll 分离液购自美国 Sigma 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 去除 DNA 的 PrimeScript™ 逆转录试剂盒和 SYBR® Premix Ex Taq™ 购自大连宝生物 TaKaRa 公司; hsa_circ_104871 及内参基因 β-actin 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计购自美国 Nanodrop 公司; Applied Biosystems 7500 型荧光定量 PCR 仪器购自美国 ABI 公司。

1.3 PBMC 提取 采集受试者清晨空腹 EDTA 抗凝外周血 2 ml 6 h 内送检。采用 Ficoll 分离液分离 PBMC, 用 TRIzol 试剂处理, 放 -80 °C 冰箱保存。

1.4 PBMC 总 RNA 提取 按 TRIzol 试剂说明书分别提取 SLE 组患者、RA 疾病对照组和健康对照组 PBMC 中的总 RNA, 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的蒸馏水溶解 RNA, 采用 RNA 纯化试剂盒纯化总 RNA。进一步使用 Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计对总 RNA 进行定量和质量分析。

1.5 RT-PCR 检测 采用 RT-PCR SYBR Green 法, 以 β-actin 作为内参进行 hsa_circ_104871 的检测。提取 PBMC 中的总 RNA, DEPC 水溶解后, 取 1 μl RNA, 利用 PrimeScript 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。采用 20 μl 反应体系进行检测, PCR 引物序列见表 1。反应体系包括: 1 μl 反转录产物、0.5 μmol/L 上游引物、0.5 μmol/L 下游引物、1 × SYBR 荧光染料试剂。PCR 反应条件为: 95 °C、10 min, 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 72 °C、30 s, 40 个扩增循环。所有样品做 3 个复孔。RT-PCR 使用 ABI7500 仪器进行。分析待测标本的扩增熔解曲线, 均为单峰, 无非特异性扩增。根据待测标本的 Ct 值, 采用相对定量法对 RT-PCR 结果进行分析, 计算 2^{-ΔCt}。引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

名称	引物序列(5'-3')
hsa_circ_104871	F:CGGAACCTCCTGTGGTCATCT
	R:TCCATCTCAAGCAGGTTTCATT
β-actin	F:TACTGCCCTGGCTCCTAGCA
	R:TGGACAGTGAGCCAGGATAG

1.6 SLE 相关的其他指标检测方法 IgG、C3、C4、CRP 采用速率散色比浊法(试剂和仪器购自美国 Beckman Coulter 公司); 抗 ds-DNA 采用酶联免疫吸附法(试剂购自上海科新生物技术股份有限公司);

抗 ENA 抗体采用免疫印记法检测(试剂和仪器均购自德国欧蒙公司); ESR 采用动态血沉仪法(仪器购自北京普利生公司); 血常规采用电阻抗法(试剂和仪器购自日本希森美康公司)。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 实验数据首先进行正态性检验, 符合正态分布数据, 两组样本均数的比较采用 t 检验, 否则采用非参数检验。两个变量之间相关性采用 Pearson 相关分析。受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC) 曲线分析评价 circRNA 诊断和鉴别诊断的敏感性和特异性。以双侧 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 组患者和健康对照组 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 中表达的比较 SLE 组患者 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平显著低于健康对照组, 分别为(0.000 72 ± 0.000 73) 和 (0.001 17 ± 0.000 75), 差异有统计学意义(t = 3.57, P = 0.000 5)。见图 1。

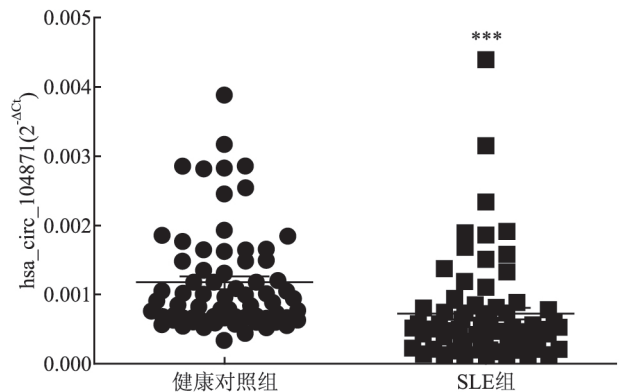


图 1 SLE 组患者和健康对照组 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达与健康对照组比较: *** P < 0.001

2.2 SLE 组患者和 RA 疾病对照组 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达的比较 SLE 组患者 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平显著低于 RA 疾病对照组, 分别为 0.000 52 (0.000 29, 0.000 81) 和 0.000 95 (0.000 58, 0.001 45), 差异有统计学意义(U = 1 472, P < 0.000 1)。见图 2。

2.3 SLE 组患者和对照组(健康对照者 + RA 疾病对照者) PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达的比较 SLE 患者 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平显著低于对照组, 分别为 0.000 52 (0.000 29, 0.000 81) 和 0.000 90 (0.000 63,

0.001 45), 差异有统计学意义 ($U = 2\ 654, P < 0.000\ 1$)。见图 3。

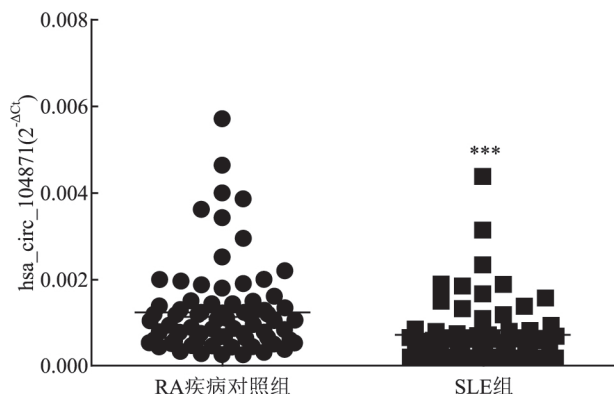


图 2 SLE 组患者和 RA 疾病对照组 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达与 RA 疾病对照组比较: *** $P < 0.001$

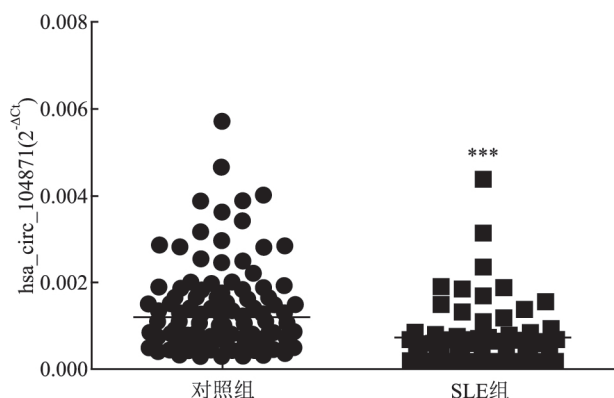


图 3 SLE 组患者和对照组 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达与对照组比较: *** $P < 0.001$

2.4 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平与 SLE 患者临床参数之间相关性分析 SLE 患者 PBMC 环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平与 PLT 呈正相关 ($r = 0.290\ 0, P = 0.015\ 7$) (图 4), 而与其他临床指标 (SLEDAI, ESR, C3, C4, 自身抗体等) 不相关。

2.5 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 对 SLE 诊断的价值 为评估 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 对 SLE 的诊断价值, 对 SLE 患者和健康对照者的 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平进行 ROC 曲线分析, ROC 曲线 AUC 为 0.759 (95% CI: 0.677 ~ 0.841; $P < 0.000\ 1$), Cut-off 值为 0.000 620 2, 敏感性为 64.29%, 特异性为 81.43%, 阳性预测值为 66.18%, 阴性预测值为 72.83%, 约登指数为 0.457。见图 5。

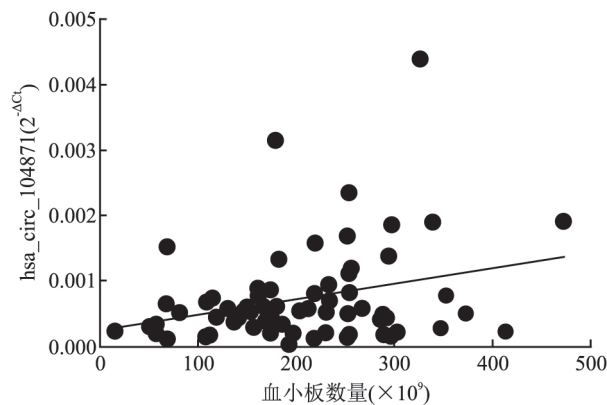


图 4 SLE 组患者 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 表达水平与 PLT 的相关性分析

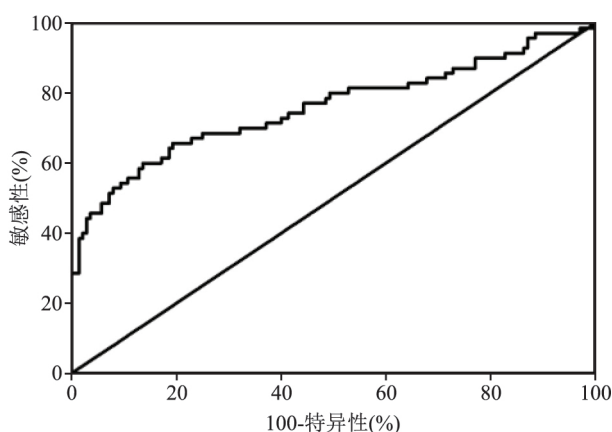


图 5 SLE 组患者与健康对照组 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 的 ROC 曲线分析

2.6 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 对 SLE 与 RA 鉴别诊断的价值 对 SLE 组与 RA 疾病对照组 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 的表达水平进行 ROC 分析, AUC 为 0.727 (95% CI: 0.645 ~ 0.809; $P < 0.000\ 1$), Cut-off 值为 0.000 697 8, 敏感性为 70.00%, 特异性为 66.23%, 阳性预测值为 65.33%, 阴性预测值为 70.83%, 约登指数为 0.362; 对 SLE 与对照组 PBMC 中环状 RNA hsa_circ_104871 的表达水平进行 ROC 分析, AUC 为 0.742 (95% CI: 0.666 ~ 0.818; $P < 0.000\ 1$), Cut-off 值为 0.000 628 9, 敏感性为 65.71%, 特异性为 74.80%, 阳性预测值为 54.76%, 阴性预测值为 82.48%, 约登指数为 0.405。见图 6。

3 讨论

目前, SLE 诊断的必要条件是抗核抗体谱, 包括抗双链 DNA 抗体、抗核抗体、抗可提取性核抗原抗体等, 其中抗双链 DNA 抗体 (anti-dsDNA)、抗史密

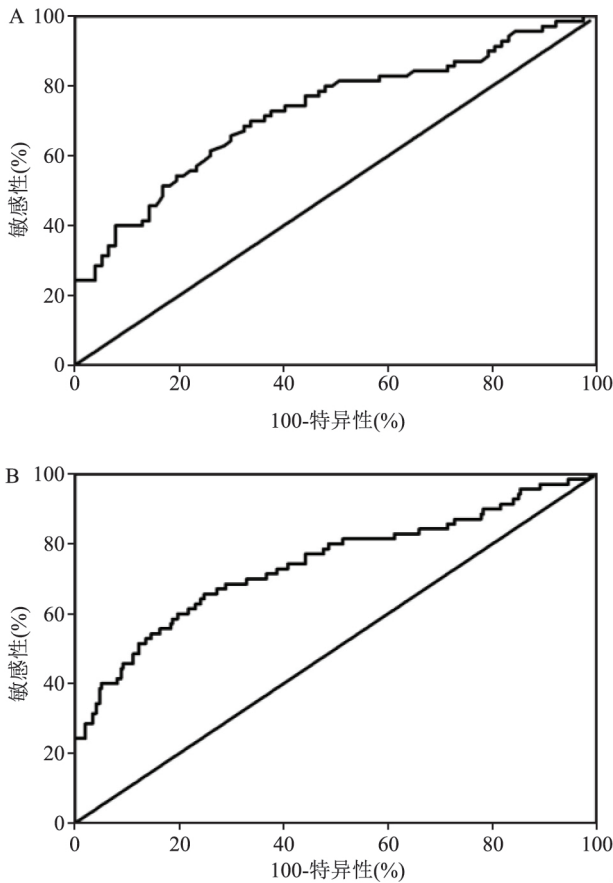


图6 SLE组患者分别与RA疾病对照组和对照组PBMC中环状RNA hsa_circ_104871的ROC曲线分析
A:RA疾病对照组;B:对照组(健康对照者+RA疾病对照者)

斯抗体(anti-Sm)和抗核小体抗体是SLE的标志性抗体^[2-3,12]对于SLE的诊断具有很好的特异性。但这些指标诊断SLE的敏感性都不理想,其中抗核小体抗体的敏感性最强,但也只有约60%,anti-dsDNA的敏感性低于50%,而anti-Sm抗体的敏感性只有10%~30%^[2,12]。因此,临床上目前仍缺乏理想的SLE诊断标志物。

研究^[13]表明,环状RNA在血液中可长期稳定存在,RNA酶降解作用、煮沸、反复冻融、酸碱环境、长期保存等各种处理方法均不会造成血液环状RNA的损失,比较适宜作为基本的临床诊断标志物。近期,国内外均有学者尝试探讨环状RNA作为自身免疫性疾病诊断标志物的可行性,并取得了可喜的成果^[6-7,14]。此外,Li et al^[8]采用高通量基因芯片检测发现SLE患者血浆环状RNA表达谱发生显著变化,表明环状RNA可作为SLE的潜在诊断标志物。

关于环状RNA hsa_circ_104871是否可作为SLE潜在的诊断标志物,本研究结果显示SLE组患

者PBMC中 hsa_circ_104871 表达水平降低,进一步分析SLE组PBMC中 hsa_circ_104871 表达的临床意义,结果显示其表达水平与SLE患者的PLT数量呈正相关,说明 hsa_circ_104871 表达水平与疾病严重程度呈反比,患者疾病越严重, hsa_circ_104871 分子的表达水平越低。另外,ROC曲线分析表明, hsa_circ_104871 可有效地从健康对照者中诊断出SLE患者,其敏感性为64.29%,而特异性可达到81.43%。

SLE可累及关节,患者经常会有有关节疼痛等症状,临床上容易与RA混淆,为此该文比较了SLE患者与RA患者PBMC中 hsa_circ_104871 的表达水平,SLE患者PBMC中 hsa_circ_104871 表达水平显著低于RA疾病对照组,差异有统计学意义。进一步的ROC曲线分析证实其可有效将SLE患者与RA患者区别开来,可用于SLE与RA的鉴别诊断。此外,本研究还显示RA患者的PBMC中 hsa_circ_104871 表达水平与健康对照者无差异,这与Ouyang et al^[6]研究结果不一致,Ouyang et al^[6]研究分析了30例健康对照者和35例初诊的RA患者PBMC中 hsa_circ_104871 表达水平,结果表明RA患者PBMC中的 hsa_circ_104871 表达水平明显高于健康对照者,但也未显示RA患者PBMC中的 hsa_circ_104871 表达水平与疾病活动度等临床指标相关,ROC曲线分析表明RA患者PBMC的 hsa_circ_104871 表达水平对RA的诊断效能较好,敏感性为83.30%,特异性为68.00%。这其中的差异可能源自:①不同RA患者异质性较大;②本文收集的RA病例并非均是初诊未治疗的,药物可能对其表达有影响;③自身免疫性疾病发病机制较复杂。

本研究尚存在一些不足:①SLE患者的研究样本不够多;②没有检测治疗前后以及初诊和复诊患者之间 hsa_circ_104871 的表达差异,无法明确其在预后监测中的疗效。在后续的研究中将进一步扩大样本量检测SLE患者PBMC hsa_circ_104871 的表达,使研究结果更具有可靠性。

参考文献

[1] Rahman A, Isenberg D A. Systemic lupus erythematosus [J]. N Engl J Med, 2008, 358(9): 929-39.
[2] Hu C, Li M, Liu J, et al. Anti-SmD1 antibodies are associated with renal disorder, seizures, and pulmonary arterial hypertension in Chinese patients with active SLE [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 7617.
[3] Su Y, Jia R L, Han L, et al. Role of anti-nucleosome antibody in

- the diagnosis of systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Immunol*, 2007, 122(1):115-20.
- [4] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2):141-8.
- [5] Yao J T, Zhao S H, Liu Q P, et al. Over-expression of CircRNA_100876 in non-small cell lung cancer and its prognostic value[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(5):453-6.
- [6] Ouyang Q, Wu J, Jiang Z, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2):651-9.
- [7] Zheng J, Li Z, Wang T, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in plasma from primary biliary cholangitis patients[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(4):1271-81.
- [8] Li H, Li K, Lai W, et al. Comprehensive circular RNA profiles in plasma reveals that circular RNAs can be used as novel biomarkers for systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 480:17-25.
- [9] Hochberg M C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(9):1725.
- [10] Bombardier C, Gladman D D, Urowitz M B, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE[J]. *Arthritis Rheum*, 1992, 35(6):630-40.
- [11] Arnett F C, Edworthy S M, Bloch D A, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(3):315-24.
- [12] Yung S, Chan T M. Mechanisms of kidney injury in lupus nephritis—the role of anti-dsDNA antibodies[J]. *Front Immunol*, 2015, 6:475.
- [13] Memczak S, Papavasileiou P, Peters O, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0141214.
- [14] Zhao Z, Li X, Jian D, et al. Hsa_circ_0054633 in peripheral blood can be used as a diagnostic biomarker of pre-diabetes and type 2 diabetes mellitus[J]. *Acta Diabetol*, 2017, 54(3):237-45.

Expression and significance of circular RNA hsa_circ_104871 on peripheral blood mononuclear cell from patients with systemic lupus erythematosus

Huang Zikun, Zhang Lu, Zeng Lulu, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

Abstract Objective To investigate the expression of circular RNA hsa_circ_104871 on peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from systemic lupus erythematosus (SLE) patients and its significance in order to clarify its role in the diagnosis and differential diagnosis of SLE. **Methods** PBMC samples were collected from 70 SLE patients, 70 healthy controls (HC) and 76 RA patients controls. Expression of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC was detected by RT-PCR. Differences in circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC between SLE, HC and RA groups were comparatively analyzed. Correlations of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC with several clinical indexes were analyzed. **Results** ① The expression of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC in SLE patients was significantly lower than that in HC ($t=3.57$, $P=0.0005$). ② The expression of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC in SLE patients was significantly lower than that in RA patients controls ($U=1472$, $P<0.0001$). ③ The expression of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC in SLE patients was significantly lower than that in controls (HC and RA patients controls) ($U=2654$, $P<0.0001$). ④ The expression of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC in SLE patients was positively correlated with PLT ($r=0.2900$, $P=0.0157$). ⑤ The area under ROC curve (AUC), sensibility and specificity of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC between SLE patients and HC was 0.759 (95% CI: 0.677~0.841; $P<0.0001$), 64.29%, 81.43%. ⑥ The AUC, sensibility and specificity of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC between SLE patients and RA patients controls was 0.727 (95% CI: 0.645~0.809; $P<0.0001$), 70.00%, 66.23%. The AUC, sensibility and specificity of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC between SLE patients and controls (HC and RA patients controls) was 0.742 (95% CI: 0.666~0.818; $P<0.0001$), 65.71%, 74.80%. **Conclusion** The expression of circular RNA hsa_circ_104871 on PBMC is decreased in SLE patients and correlated with damage of hematological system. This study suggests that the hsa_circ_104871 on PBMC may be a potential diagnosis and differential diagnosis biomarker of SLE patients.

Key words systemic lupus erythematosus; circular RNA; diagnosis biomarker