

类风湿关节炎中 miR-146a 多态性与临床表现及血清中肿瘤坏死因子 α 水平之间的相关性

李博^a, 胡秋侠^b, 谭锦辉^a, 吴系美^a, 余若男^a, 胡建云^b(深圳市龙华区人民医院, a.风湿免疫科, b.风湿免疫及肾内科, 广东 深圳 518109)

摘要: 目的 探讨类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)中 miR-146a 上 rs2910164 位点单核苷酸多态性(SNP)与患者临床表现及血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达水平之间的相关性。方法 以高分辨率熔解(high-resolution melting, HRM)法对 126 例 RA 患者进行 miR-146a 上 rs2910164 位点的 SNP 分型, 并分析其与 RA 患者病情活动性、临床表现及患者血清中 TNF- α 表达水平之间是否有关。结果 RA 患者中 miR-146a 上 rs2910164 位点 G 等位基因频率为 30.6%, C 等位基因频率为 69.4%, G/G 型纯合子患者的比例为 12.7%, C/C 型纯合子患者的比例为 51.6%, G/C 型杂合子患者的比例为 35.7%。未发现 miR-146a 上 rs2910164 位点的不同基因型组之间的病情活动性有显著差异, 但具有 G/C 基因型的 RA 患者出现关节外表现的比例显著增高($P < 0.05$), 具有 G/C 基因型的 RA 患者血清中细胞因子 TNF- α 表达水平显著高于具有 G/G 基因型[(5.41 \pm 0.69) vs (3.63 \pm 0.37), $P < 0.05$]和 C/C 基因型[(5.41 \pm 0.69) vs (3.27 \pm 0.82), $P < 0.05$]的 RA 患者。结论 miR-146a 上 rs2910164 位点 SNP 与 RA 病情活动性无明显相关性, 但 G/C 基因型与 RA 特定的临床表现及血清中 TNF- α 表达水平有关, 提示 miR-146a 可能在 RA 发病中可能具有一定的作用。

关键词: miR-146a; 类风湿关节炎; 单核苷酸多态性; 肿瘤坏死因子 α

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)04-0471-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.018

引用本文: 李博, 胡秋侠, 谭锦辉 等. 类风湿关节炎中 miR-146a 多态性与临床表现及血清中肿瘤坏死因子 α 水平之间的相关性[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 471-474.

Mir-146a Rs2910164 Polymorphism Correlates with Extraarticular Manifestations and the Serum TNF- α Level in Patients with Rheumatoid Arthritis

LI Bo^a, HU Qiuxia^b, TAN Jinhui^a, WU Ximei^a, SHE Ruonan^a, HU Jianyun^b(People's Hospital of Longhua District Shenzhen, a.Department of Rheumatology, b.Department of Rheumatology & Nephrology, Shenzhen 518109, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the single nucleotide polymorphisms(SNP) of the microRNA-146a (miR-146a) in rheumatoid arthritis(RA), and whether it is associated with clinical manifestations and the serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) level in patients with RA. **METHODS** The SNP of miR-146a rs2910164 polymorphism was detected by high-resolution melting method in 126 patients with RA, and the serum TNF- α level was detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). The correlations of miR-146a rs2910164 polymorphism with clinical manifestations and the serum TNF- α level were also analyzed. **RESULTS** The percent of RA patients with G/C, G/G and C/C genotype was 35.7%, 12.7% and 51.6% respectively. It was not found that any significant association of miR-146a rs2910164 polymorphism with disease activity in RA. However, the percent of RA patients with extraarticular manifestations was higher in miR-146a rs2910164 G/C genotype than in RA patients with other genotypes ($P < 0.05$), and the serum level of TNF- α was higher in miR-146a rs2910164 G/C genotype than in RA patients with other genotypes($P < 0.05$). **CONCLUSION** It suggests that miR-146a rs2910164 polymorphism might correlate with special clinical manifestations and higher levels of serum level of TNF- α in RA, which indicate that miR-146a may play an important role in pathogenesis of RA.

KEYWORDS: miR-146a; rheumatoid arthritis; single nucleotide polymorphisms; tumor necrosis factor- α (TNF- α)

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是发病率较高的风湿性疾病之一。RA 常侵犯受累关节的滑膜并引起滑膜炎及大量血管翳的形成, 最终

造成软骨及骨的破坏, 引起关节畸形及功能逐渐丧失。RA 的病因与发病机制尚没有被完全阐明, 但在近年来有关 RA 的研究中, miR-146a 备受瞩目

基金项目: 广东省医学自然科学基金立项课题资助(A2013611); 深圳市卫生计生系统科研项目(201501051, 201601060); 深圳市龙华区科技创新资金项目(20170919A1030357)

作者简介: 李博, 男, 博士, 主任医师 Tel: 13688806758 E-mail: friendlybo@163.com

目。目前有关 miR-146a 序列中 *rs2910164* 位点多态性与中国大陆 RA 患者相关性及其临床意义的研究尚不多见。本研究用高分辨率熔解 (high-resolution melting, HRM) 分析方法, 在 126 例 RA 患者和 102 例正常对照者中对 miR-146a 上 *rs2910164* 位点的 SNP 分型进行了检测, 并分析 miR-146a 上 *rs2910164* 位点多态性与 RA 的病情活动、临床表现及血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达水平之间的相关性, 旨在进一步研究 miR-146a 在 RA 发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例选择

2015 年 7 月—2017 年 8 月, 深圳市龙华区人民医院风湿免疫科的门诊或住院 RA 患者, 均需符合美国风湿病学会在 1987 年制定的 RA 分类标准。RA 患者关节外表现是指关节炎外的其他临床表现, 包括类风湿结节、肺部病变、皮肤溃疡、心脏病变、眼部病变及血液系统等病变。所有同时合并有系统性红斑狼疮、炎性肌病、系统性硬化症及其他结缔组织病的患者均不得入选。所有同时合并有获得性免疫缺陷综合征、结节病、移植抗宿主病及淋巴瘤的患者也不得入选。

1.2 方法

1.2.1 RA 患者临床资料的收集 记录研究中入选的 RA 患者临床特点及检验检查资料。RA 患者的辅助检查包括血常规、C-反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)、类风湿因子(RF)及抗环瓜氨酸多肽抗体(抗 CCP 抗体)等。其中 RF 的检测使用免疫比浊法, 抗 CCP 抗体的检测使用酶联免疫吸附法, RA 患者的病情活动性采用 DAS28 评分进行判断。

1.2.2 miR-146a 序列中 *rs2910164* 位点多态性分析 采集 EDTA 抗凝的静脉血 5 mL, 采用全血基因组 DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司)抽提全血基因组 DNA, 抽提后置于 -20°C 冰箱保存备用。采用 HRM 等位基因分型试剂盒进行检测, 相关试剂盒均购自美国 Roche 公司。检测过程完全按照说明书进行。PCR 反应的总体积为 10 μL , 含 dNTP 0.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 MgCl_2 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、引物 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Rox 0.45 μL 、Taq 酶 0.5 U 及 DNA 1 μL (约 15 ng)。PCR 扩增的条件: 95°C 先预变性 10 min, 然后先后 95°C 变性 15 s、 60°C 退火 60 s,

共进行 40 个循环。以上反应在 LightCycler 定量 PCR 仪上进行。为控制好质量, 每次试验均设置了 2 个阳性对照及 2 个阴性对照。

1.2.3 血清中 TNF- α 水平的检测 利用酶联免疫吸附法(ELISA)对 RA 患者血清中 TNF α 水平进行检测, 试剂购自 Cayman 公司(产品货号: 589201-96), 检测完全按照说明书进行。

1.3 统计分析

采用 SPSS 22.0 对数据进行分析。其中计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间率的比较采用列联表 χ^2 检验, 不同组间计量资料的比较采用独立 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 入选研究的 RA 患者的一般情况

共有 126 例 RA 患者入选本研究, 其中男 23 例, 女 103 例, 年龄最小 20 岁, 最大 70 岁, 平均年龄(39 ± 12)岁, 平均病程为(37 ± 14)月, RF 阳性者 101 例, 抗 CCP 抗体阳性者 67 例, 有关节外表现者 43 例, 平均 DAS28 评分为 6.2 ± 2.6 。

2.2 miR-146a 序列中 *rs2910164* 位点等位基因的分布

检测结果显示 RA 患者中 miR-146a 上 *rs2910164* 位点 G 等位基因频率为 30.6%, C 等位基因频率为 69.4%。RA 患者中具有 G/G、C/C 及 G/C 基因型的患者例数分别为 16, 65 及 45; G/G 基因型患者的比例为 12.7%, C/C 基因型患者的比例为 51.6%, G/C 基因型患者的比例为 35.7%。对研究群体的各等位基因分布进行平衡检验, 检验结果符合 Hardy Weinberg 平衡($P=0.98$)。

2.3 miR-146a 序列中 *rs2910164* 位点基因型与 RA 患者临床表现及血清中 TNF α 表达水平之间的关系

为了评估 miR-146a 上 *rs2910164* 位点基因型与 RA 患者病情活动性、临床表现及血清中 TNF α 表达水平之间的关系, 将具有不同基因型的 RA 患者的不同临床表现与 TNF- α 表达水平做了统计分析, 并进行比较, 结果未发现 *rs2910164* 位点的不同基因型组之间的病情活动性有显著差异($P > 0.05$), 但发现具有 G/C 基因型的 RA 患者出现关节外表现的比例显著增高($P < 0.05$), 具有 G/C 基因型的 RA 患者血清中细胞因子 TNF- α 表达水平显著高于具有 G/G 基因型和 C/C 基因型的 RA 患者($P < 0.05$), 结果见表 1。

表 1 miR-146a 上 *rs2910164* 位点基因型与 RA 患者临床表现及血清中 TNF- α 表达水平之间的关系

Tab. 1 The correlation of miR-146a *rs2910164* genotype with clinical manifestations and the serum TNF- α level

参数	G/G 型 (n=16)	G/C 型 (n=45)	C/C 型 (n=65)	F/t	P
年龄	39±13	40±12	39±12	0.034	0.966
病程/月	37±14	37±14	38±15	0.040	0.961
RF 阳性	13	37	51	0.250	0.882
抗 CCP 抗体阳性	9	23	35	0.150	0.928
有关节外表现	3	26	14	17.462	0.000
DAS28 评分	6.3±2.5	6.2±2.6	6.0±2.5	0.718	0.397
TNF- α 水平	3.63±0.37	5.41±0.69	3.27±0.82	3.526	0.003

3 讨论

microRNA 也被称为微小 RNA, 是一种进化上非常保守、约 18~25 个核苷酸长度的小分子单链 RNA。microRNA 通过与靶 mRNA 的结合从而在转录后水平对靶基因的表达进行调控。已有研究结果提示 microRNA 不仅参与了机体的多个生物学过程, 还与心脏病、风湿性疾病、癌症、感染及糖尿病等多种疾病相关。研究还发现某些 microRNA 可能有助于某些疾病的诊断、疗效及病情活动性的判断, 甚至可能成为疾病的潜在治疗靶点^[1]。miR-146a 的靶目标相对明确^[2-3], 在 RA 发病中的研究备受瞩目。

多个研究已经表明, 和正常人相比, RA 中的 miR-146a 的表达存在异常, 其中异常表达的部位不仅包括滑膜成纤维细胞及滑膜^[4-9], 还包括外周血单个核细胞(PBMCs)^[10-14]。还有研究者发现 miR-146a 在 RA 中的表达有助于 RA 的病情活动性的判断^[6]。RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 的表达水平增高, 与 RA 病情活动性呈正相关, 有研究者推测可能的原因与这些 RA 患者 IL-6、IL-1 β 以及 TNF α 等炎症细胞因子体内过度表达并诱导了 miR-146a 的转录增加有关^[15]。

为了进一步探讨 miR-146a 在中国 RA 中的意义, 本研究对 miR-146a 上 *rs2910164* 位点的 SNP 进行了分型, 并分析了这些 SNP 与 RA 的临床特点、病情活动性及血清中 TNF α 表达水平之间的关系。结果未发现 *rs2910164* 位点的不同基因型组之间的病情活动性评分有显著差异, 但发现具有 G/C 基因型的 RA 患者出现关节外表现的比例显著增高, 血清中 TNF α 表达水平增高。国内外已有较多文献发现活动性 RA 血清中 TNF- α 表达水平高于

稳定期 RA 患者^[16], 并且活动性 RA 患者更易出现关节外表现。本研究发现的结果与国内外已有的研究结论相符合。国内 Zhou 等^[17]研究未发现 miR-146a 的 *rs2910164* 位点的多态性与中国汉族人群 RA 易感相关, 但发现 GG 型与女性 RA 发病风险有关, CC 型与 RA 病情活动性相关。亦有研究者报道未发现 miR-146a 的 *rs2910164* 位点的多态性与中国汉族 RA 患者发病风险及患者的 RF、CCP 等相关^[18]。国外多个研究者发现 miR-146a 的 *rs2910164* 位点的多态性非 RA 发病的独立危险因素^[19-21], 但 Hassine 等^[22]发现 miR-146a 的 *rs2910164* 位点的多态性在突尼斯 RA 患者中存在异常, C 等位基因似乎具有保护作用。最新的埃及 RA 患者中的研究发现 miR-146a 的 *rs2910164* 位点的多态性是 RA 发病的危险因素, 并与关节侵蚀有关^[23]。本研究结果与已有的研究结果相比部分相符, 可能与不同研究间的人种差异有关, 以上结果差异尚需进行进一步的验证。

本研究从临床医师的角度出发, 除了已有研究中相似的观察内容(例如 RF 及 CCP 的有无、病情活动性等), 还额外分析了 RA 中 *rs2910164* 位点的 SNP 与患者临床症状(有关节外表现)的相关性, 这是其他类似研究中较少见到的。但是本研究也存在不足, 即本研究是小样本、单中心研究, 结果尚需在大样本、多中心的不同种群患者中得到验证, 这也是以后有关 RA 患者中 *rs2910164* 位点 SNP 临床意义的研究应该努力的方向。

总之, 本研究探讨了 miR-146a 基因多态性在 RA 中的临床意义, 结果显示 miR-146a 的 *rs2910164* 位点的 SNP 与 RA 特定的临床表现及血清中 TNF α 表达水平有关。以上研究结果提示 miR-146a 可能在 RA 发病中可能具有一定的作用。

REFERENCES

- [1] WANG D X, MA Y, FANG J, et al. Identification of bioactivity microRNAs derived from *Zea mays* and their regulating target function [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(1): 12-15.
- [2] CHATZIKYRIAKIDOU A, VOULGARIS P V, GEORGIU I, et al. A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility [J]. Joint Bone Spine, 2010(77): 411-413.
- [3] AHMAD R, SYLVESTER J, ZAFARULLAH M. MyD88, IRAK1 and TRAF6 knockdown in human chondrocytes

- inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-13 gene expression and promoter activity by impairing MAP kinase activation [J]. *Cell Signal*, 2007(19): 2549-2457.
- [4] LI J, WAN Y, GUO Q, et al. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(3): R81. Doi: 10.1186/ar3006.
- [5] 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. Doi: 10.1186/ar3013.
- [6] NAKAMACHI Y, KAWANO S, TAKENOKUCHI M, et al. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5): 1294-1304.
- [7] STANCZYK J, PEDRIOLI D M, 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.
- [8] 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.
- [9] ABOU-ZEID A, SAAD M, SOLIMAN E. MicroRNA 146a expression in rheumatoid arthritis: association with tumor necrosis factoralpha and disease activity [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011, 15(11): 807-812.
- [10] NIIMOTO T, NAKASA T, ISHIKAWA M, et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010(11): 209. Doi: 10.1186/1471-2474-11-209.
- [11] ZHOU Q, HAUPT S, KREUZER J T, et al. Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(6): 1265-1274.
- [12] SMIGIELSKA-CZEPIEL K, VAN DEN BERG A, JELLEMA P, et al. Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs [J]. *Genes Immun*, 2014, 15(2): 115-125.
- [13] 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. Doi: 10.1186/ar2493.
- [14] NAKASA T, SHIBUYA H, NAGATA Y, et al. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 23(6): 1582-1590.
- [15] CHUROV A V, OLEINIK E K, KNIP M. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(11): 1029-1037.
- [16] 李鸿斌, 白莉, 吴庆军, 等. 类风湿关节炎患者合并心脑血管病的危险性分析 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(25): 1769-1773.
- [17] ZHOU X D, ZHU J L, ZHANG H, et al. Is the microRNA-146a (*rs2910164*) polymorphism associated with rheumatoid arthritis? Association of microRNA-146a (*rs2910164*) polymorphism and rheumatoid arthritis could depend on gender [J]. *Joint Bone Spine*, 2015, 82(3): 166-171.
- [18] BIN Y J, LONG Z Y, YING S, et al. Association study of single nucleotide polymorphisms in pre-miRNA and rheumatoid arthritis in a Han Chinese population [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(8): 4913-4919.
- [19] BOGUNIA-KUBIK K, WYSOCZAŃSKA B, PIĄTEK D, et al. Significance of polymorphism and expression of mir-146a and NFkB1 genetic variants in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2016, 64(Suppl 1): 131-136.
- [20] EL-SHAL A S, ALY N M, GALIL S M, et al. Association of microRNAs genes polymorphisms with rheumatoid arthritis in egyptian female patients [J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(6): 626-631.
- [21] HASHEMI M, ESKANDARI-NASAB E, ZAKERI Z, et al. Association of pre-miRNA-146a *rs2910164* and pre-miRNA-499 *rs3746444* polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(1): 287-291.
- [22] HASSINE H B, BOUMIZA A, SGHIRI R, et al. Micro RNA-146a but not IRAK1 is associated with rheumatoid arthritis in the tunisian population [J]. *Mol Biomarkers*, 2017, 21(2): 92-96.
- [23] SHAKER O G, EL BOGHDADY N A, EL SAYED A E. Association of MiRNA-146a, MiRNA-499, IRAK1 and PADI4 polymorphisms with rheumatoid arthritis in egyptian population [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6): 2239-2249.

收稿日期: 2018-06-05

(本文责编: 曹粤锋)