

网络出版时间: 2021-05-14 15:22 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1450.025.html>

急性痛风性关节炎患者外周血 miRNA-23a 表达及其与临床参数的相关性分析

孙广瀚, 刘健, 万磊, 姜辉, 龙琰, 鲍丙溪, 张颖

摘要 目的 探讨 miR-23a 在急性痛风性关节炎(AGA)患者外周血中的表达及其与临床参数的相关性分析。方法 收集 20 例 AGA 患者(AGA 组)和 20 例健康人(正常组)外周血标本,通过定量 PCR 检测外周血 miR-23a 的表达,统计分析 miR-23a 表达水平与临床参数的相关性。结果 ①在 AGA 组中 miR-23a 相对表达量高于正常组,相对表达量差异具有统计学意义($P=0.005$)。②相关性分析显示外周血中 miR-23a 表达水平与低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、三酰甘油(TG)呈正相关($P<0.05$)。③相关性分析显示外周血中 miR-23a 表达水平与情感职能呈负相关($P<0.05$)。结论 miR-23a 表达可能反映 AGA 的疾病进展和患者预后的过程,并且 miR-23a 可能与代谢指标、情感职能相关,其作用机制有待于进一步探讨。关键词 急性痛风性关节炎;微小 RNA;miR-23a;实验室参数;患者感受参数

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0965-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.025

急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, AGA)是一种主要由嘌呤代谢紊乱和(或)尿酸排泄减少所引起的炎症性、晶体性关节炎,属于代谢性风湿病,其主要表现为反复发作的慢性关节炎、形成痛风石、肾功能出现障碍等^[1]。微小 RNA(MicroRNA, miRNA)是小的非编码 RNA,涉及多种生物学过程的调控,与机体免疫功能和自身免疫耐受有关^[2]。miRNA 与控制基因表达相关,具有生物标志物和治疗剂的作用。研究^[3]表明 miR-23a 在炎症、

代谢等方面以转录后的方式调节靶基因的表达,并可作为炎症负性调控因子而在原发性痛风性关节炎的炎症免疫反应过程中起到重要作用。该研究通过定量 PCR 检测 AGA 患者血浆 miR-23a 的表达,并分析其表达与实验室参数和患者感受参数的相关性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 外周血样本共 40 例,来源于 20 例 AGA 患者(AGA 组)和 20 例健康人(正常组)。AGA 组为随机抽样 2019 年 6—9 月间在安徽省中医药大学第一附属医院风湿免疫科收治确诊者,其中男 19 例,女 1 例,年龄 17~78 岁(43.65 ± 14.57)岁,均符合 2015 年美国风湿病学会/欧洲抗风湿联盟(ACR/EULAR)联合制定的诊断标准^[1]。20 例正常组为同期健康体检者,年龄分布与 AGA 组大致匹配,排除心血管、肿瘤以及其他自身免疫性疾病,其中男 10 例,女 10 例,年龄 18~72 岁(36.40 ± 14.82)岁。经两独立样本 t 检验两组年龄 $P=0.482$,差异无统计学意义。

1.2 主要试剂和仪器 TRIzol(货号:15596018)由美国 Life technologies 公司提供;三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇由上海苏懿化学试剂有限公司提供;DEPC-H₂O(货号:D1007)由上海捷瑞生物工程有限公司提供;Novostart SYBR qPCR SuperMix Plus(货号:E096-01A)由上海近岸蛋白质科技有限公司提供;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(货号:K1622)、PIKO Plate Illuminator(型号:10212432C)由美国 Thermo Scientific 公司提供;hsa-miR-23a-5p miRNA qPCR Detection Primer Set(货号:BK1010T0004496)由南通百奥迈科生物技术有限公司提供。普通 PCR 仪(型号:K960)由杭州晶格科学仪器有限公司提供;高速台式冷冻离心机(型号:JW-3021HR)由合肥嘉文仪器装备有限公司提供;荧光定量 PCR 仪(型号:PIKOREAL 96)由美国 Thermo Scientific 提供;微孔板迷你离心机(型号:MINI-

2021-03-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81973655);科学技术部国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(编号:2018YFC1705204);安徽省高等学校省级质量工程教学研究项目(编号:2018jyxm1068);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:201904a07020004)

作者单位:安徽中医药大学第一附属医院风湿免疫科,合肥 230031

作者简介:孙广瀚,男,硕士研究生;

刘健,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:

liujianahzy@126.com

P25) 由杭州奥盛仪器有限公司提供。

1.3 实时荧光定量 PCR 实验 使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA。首先在 0.2 ml EP 管中, 去除基因组 DNA 反应, PCR 仪上 42 °C 加热 2 min, 立即冰浴 1 min。在上述 EP 管中加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μ l、RT Primer Mix 1.0 μ l、RNase Free dH₂O 4.0 μ l、RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase 4.0 μ l。在 PCR 仪进行加热 37 °C、15 min、85 °C、5 s。取出上述反应液, 即为 cDNA, -80 °C 保存备用。最后取出 cDNA 作为荧光定量的模板, 进行荧光定量 PCR 反应。以 β -actin 作为参照进行计算, 计算使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法执行。

1.4 实验室参数 炎症参数: 超敏 C-反应蛋白 (hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)、红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、 α 1-酸性糖蛋白 (α 1-acidglycoprotein, AAG); 免疫指标: 免疫球蛋白 A (IgA)、免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 M (IgM)、补体 C3 (complement 3, C3)、补体 C4 (complement 4, C4)、尿酸 (uric acid, UA); 代谢指标: 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy)。

1.5 量表评分方法 全部患者均进行焦虑自评量表 (self-rating anxiety scale, SAS) [4]、抑郁自评量表 (self-rating depression scale, SDS) [5]、生活质量量表 (the MOS item short form health survey, SF-36) [6] 的调查。由本课题小组成员在病房当面询问, 填入纸质问卷, 最后由本课题小组成员电脑录入统计。

1.6 统计学处理 运用 R 语言将数据信息矩阵转换后, 采用 heatmap() 调用 heatmap 函数进行热图绘制 [7] 分析实验室参数。采用 SPSS 20.0 统计软件分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用独立样本 t 检验。对于定量的临床资料, 用 Pearson 相关分析法分析两组间的相关性。双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验室参数聚类分析 不同实验室参数的不同患者的聚类分析结果见图 1。将实验室参数共聚为 2 类: UA、AAG 为聚 1 类, HDL-C、LDL-C、Hcy、ESR、TG、C3、C4、IgM、IgG、IgA、hs-CRP、TC 为聚 2

类。热图其颜色表示实验室参数数值大小, 数值越大颜色越深 (红色 10.00 为上调, 蓝色 0.00 为下调), 其中 UA 表达最为显著, 其次是 AAG。每行表示实验室参数在不同患者中的数值情况, 每列表示每位患者标本号情况。

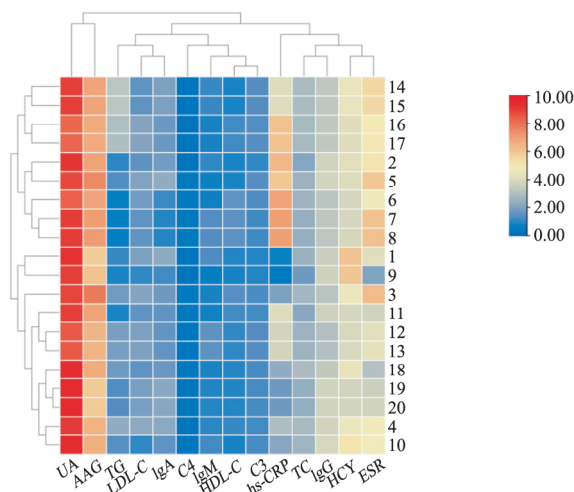


图 1 实验室参数聚类分析

2.2 外周血 miR-23a 表达检测特异性分析 外周血标本提取的 miRNA 经反转录成 cDNA 后, 采用定量 PCR 检测。miR-23a 及 U6 基因是内参基因定量 PCR 的熔解曲线为单峰。横坐标为熔解温度, 纵坐标为相对荧光单位。见图 2。

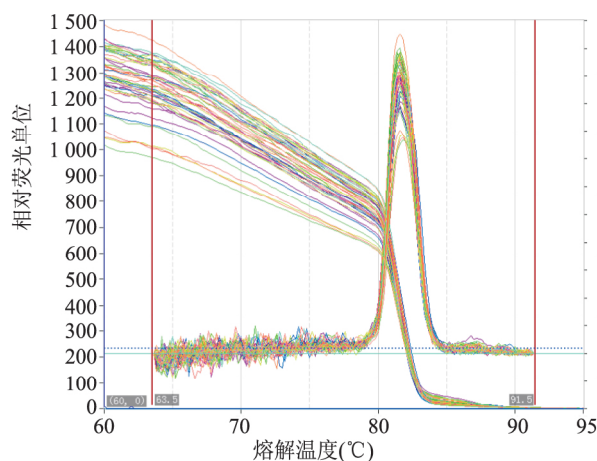


图 2 外周血 miR-23a 实时荧光定量 PCR 的熔解曲线

2.3 miR-23a 在 AGA 组、正常组外周血中的相对表达量 AGA 组 (1.24 ± 0.36) miR-23a 在外周血中的相对表达量与正常组 (0.41 ± 0.11) 相比较, 差异有统计学意义 ($t = -9.82$, $P < 0.05$)。

2.4 外周血中 miR-23a 表达水平与实验室参数的

相关性分析 外周血中 miR-23a 表达水平与 HDL-C、LDL-C、TG 呈正相关 ($P < 0.05$), 与其余项相关性无统计学意义。见表 1。

表 1 外周血中 miR-23a 表达水平与实验室参数的相关性分析

指标	r 值	P 值
UA	0.40	0.05
TC	0.14	0.29
HDL-C	0.46	0.02
LDL-C	0.43	0.03
Hcy	0.25	0.15
ESR	0.04	0.43
TG	0.44	0.03
C3	0.32	0.09
C4	0.38	0.05
AAG	0.24	0.16
IgM	0.29	0.11
IgG	0.02	0.47
IgA	0.19	0.22
hs-CRP	0.03	0.45

2.5 患者生活质量各维度积分与外周血中 miR-23a 表达水平相关性分析 通过相关性分析得出, 生理机能、生理职能、躯体疼痛、一般健康、精力、社会功能、情感职能、焦虑、抑郁与外周血中 miR-23a 表达水平相关系数值分别为: $r = -0.392$, $P = 0.087$; $r = -0.257$, $P = 0.275$; $r = -0.217$, $P = 0.357$; $r = -0.349$, $P = 0.131$; $r = -0.182$, $P = 0.442$; $r = -0.291$, $P = 0.213$; $r = -0.47$, $P = 0.038$; $r = -0.386$, $P = 0.093$; $r = -0.251$, $P = 0.286$ 。其中外周血中 miR-23a 表达水平与情感职能呈负相关 ($P < 0.05$), 与其余项相关性无统计学意义。

3 讨论

AGA 是一种单钠尿酸盐沉积关节所致的晶体相关性关节病, 属于代谢性风湿病范畴^[8], 近年来我国 AGA 发病率明显上升。有研究^[9-10]表明, AGA 患者血浆中表达上调的为 miR-3146、miR-4449 和 miR-4654, 表达下调的为 miR-451a、miR-223-3p 和 miR-22-3p 等, 且部分 miRNA 已被证实为脂质代谢的调节因子。miR-23a 在癌症方面研究的较多, 其表达与靶基因 X 连锁的凋亡抑制蛋白的表达呈负相关, 可以作为非小细胞肺癌早期诊断的潜在生物标志物, 是胃癌的癌基因(在临床胃癌组织中表达上调)^[11-12]。在调节炎症方面, miR-23a 可以通过直接炎症体轴导致神经性疼痛, 在体内和体外研究中改善了败血症诱导的肺损伤, 还可以通过抑制

自噬/苯氯素 1 调节因子 1 基因调节成纤维细胞自噬活性参与皮肤光老化进程^[13]。

本研究表明 AGA 患者外周血中 miR-23a 表达水平均高于正常组, 说明外周血中 miR-23a 表达上调可能是参与 AGA 的发生发展。并且通过相关性分析, 外周血中 miR-23a 表达水平与 HDL-C、LDL-C、TG 呈正相关 ($P < 0.05$)。HDL-C、LDL-C、TG 同属于代谢指标, 而痛风主要诱因就是进食肥甘厚味导致患者不能正常代谢。并且足够的证据可表明尿酸和脂质代谢之间的关系, 有研究^[14]推测脂肪组织使大量的游离脂肪酸进入肝脏, 加速了嘌呤合成途径中 5'-磷酸戊糖的活化导致尿酸相对增加, 从而导致痛风急性发作。同时在成脂分化中, miR-23a 与 3T3-L1 脂肪细胞中的脂质蓄积和甘油三酸酯含量有密切联系, 这提示 miR-23a 参与脂肪的转录。

随着医学模式的转变, 人们开始重视生存质量的研究, 医师也不仅仅着眼于疾病的发展, 而且重视疾病对患者感受的影响。AGA 长期反复发作常困扰患者, 影响患者的生活, 对患者的心理也产生严重的影响^[15]。可以借助 SF-36 量表应用于评价 AGA 患者生命质量和临床效果, 根据该研究通过相关性分析也反映了患者外周血中 miR-23a 表达水平与情感职能呈负相关, 反映出 miR-23a 表达越高, 情感职能表达越低, miR-23a 表达上升可能导致患者情感职能的受到限制。

综上所述, miR-23a 表达上调可能反映 AGA 的疾病进展和患者预后的过程, 并且 miR-23a 可能与代谢指标、情感职能相关。代谢指标尤其是血脂异常是 AGA 发病的重要机制。这些结果进一步提示 miR-23a 表达上调可能通过代谢途径参与 AGA 的发病过程, 其作用机制有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 杨雪, 刘磊, 朱小霞, 等. 2015 年美国风湿病学会/欧洲抗风湿病联盟痛风分类标准评述[J]. 中华风湿病学杂志, 2016, (2): 141-3.
- [2] Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world[J]. Science, 2001, 294(5543): 797-9.
- [3] 李宁宁, 戴冰冰, 雷蕾, 等. 原发性痛风性关节炎患者 miR-23a、miR-24-2 和 miR-27a 的表达水平及调节机制[J]. 河北医学, 2019, 25(8): 1233-7.
- [4] Zung W W. A self-rating depression scale[J]. Arch Gen Psychiatry, 1965(12): 63-70.
- [5] Zung W W. A rating instrument for anxiety disorders[J]. Psychosomatics, 1971, 12(6): 371-9.

- [6] 李宁秀,刘朝杰,李俊,等. 四川省城乡居民 SF-36 评价参考值[J]. 华西医科大学学报 2001, 31(1): 43-7.
- [7] 杨微. 带空间约束条件的热图计算方法的研究与应用[D]. 泰安: 山东农业大学 2013.
- [8] Perez-Ruiz F, Dalbeth N. Gout[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2019, 45(4): 583-91.
- [9] 刘鹏. miRNAs 在急性痛风性关节炎血浆中的表达意义及穿虎痛风合剂对差异性 miRNAs 表达的干预作用研究[D]. 青岛: 青岛大学 2015.
- [10] 文若剑,乐凯,易卉玲,等. miRNA 在肝脏脂代谢和脂代谢紊乱性疾病中的作用[J]. 江汉大学学报(自然科学版) 2018, 46(3): 257-64.
- [11] Huang F Y, Wong D K, Seto W K, et al. Estradiol induces apoptosis via activation of miRNA-23a and p53: implication for gender difference in liver cancer development[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34941-52.
- [12] 马伟,吴文涌,吴正升,等. 人肝细胞癌中 miR-23a 和 XIAP 的表达及意义[J]. 安徽医科大学学报 2017, 52(7): 1008-11.
- [13] Pan Z, Shan Q, Gu P, et al. miRNA-23a/CXCR4 regulates neuropathic pain via directly targeting TXNIP/NLRP3 inflammasome axis[J]. *J Neuroinflammation* 2018, 15(1): 29.
- [14] 吴若男,丁晓平,韩磊,等. 痛风病人血尿酸和尿酸排泄分数与人体成分及血脂的相关性[J]. 青岛大学学报(医学版), 2019, 55(3): 271-4.
- [15] 孙广瀚,刘健,龙琰,等. 急性痛风性关节炎患者感受的变化与免疫、炎症、代谢指标相关性研究[J]. 风湿病与关节炎, 2020, 9(3): 12-5 21.

The expression of miRNA-23a in peripheral blood of patients with acute gouty arthritis and its correlation with clinical parameters

Sun Guanghan, Liu Jian, Wan Lei, et al

(Dept of Rheumatology and Immunology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031)

Abstract Objective To investigate the expression of miR-23a in the peripheral blood of patients with acute gouty arthritis (AGA) and its correlation with clinical parameters. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 20 cases of AGA group and 20 cases of healthy controls, the expression of miR-23a in peripheral blood was detected by quantitative PCR, and the correlation between miR-23a expression level and clinical parameters was analyzed. **Results** ① The relative expression of miR-23a in the AGA group was higher than that in the normal group, and the difference in relative expression was statistically significant ($P = 0.005$). ② Correlation analysis showed that the peripheral blood miR-23a expression level was positively correlated with low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), Triglyceride (TG) ($P < 0.05$). ③ Correlation analysis showed that the expression level of miR-23a in peripheral blood was negatively correlated with emotional function ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of miR-23a may reflect the disease progression of AGA and the prognostic process of patients, and miR-23a may be related to metabolic indicators and emotional functions, and its mechanism of action needs to be further explored.

Key words acute gouty arthritis; microRNA; miR-23a; laboratory parameters; patient perception parameters