

miR326 调控 Ets-1 表达及 Th17 细胞分化参与 SLE 发病

戴超, 陶金辉, 孙晓歌, 方璇, 金莉, 项楠, 张敏, 厉小梅, 李向培

摘要 目的 检测系统性红斑狼疮(SLE)患者 CD4⁺T 细胞中 miR326、E26 转录因子-1(Ets-1)表达量及 Th17 细胞比例,分析三者之间的相关性以及与狼疮活动度、系统受累情况的关联,探讨 SLE 可能的致病机制。方法 选取符合 2009 年美国风湿病学会诊断标准的 SLE 患者 40 例,记录临床资料,选取无自身免疫性疾病的健康志愿者 14 例。流式细胞术检测 Th17(CD4⁺IL-17A⁺)/CD4⁺T 细胞比例,磁珠分选 CD4⁺T 细胞、RT-PCR 法检测 CD4⁺T 细胞中 Ets-1 mRNA 及 miR326 的相对表达量。结果 SLE 组 CD4⁺T 细胞中 miR326 水平高于对照组($P=0.003$),活动组高于稳定组($P=0.000$);SLE 组 Ets-1 的表达水平低于对照组($P=0.002$),活动组低于稳定组($P=0.001$);SLE 组 Th17 细胞比例较对照组增高($P=0.004$),活动组高于稳定组,差异有统计学意义;SLE 患者 miR326 表达量与 Ets-1 表达量呈负相关性($P<0.001$),与 Th17 细胞比例呈正相关性($P=0.001$);Ets-1 与 Th17 细胞比例呈负相关性($P=0.003$);SLE 患者 miR326 的表达量及 Th17 细胞比例与 SLEDAI 评分呈正相关性($P<0.001$),Ets-1 与 SLEDAI 评分呈负相关性($P<0.001$);SLE 患者 miR326 水平及 Th17 细胞比例在皮疹、发热、血液系统及肾脏受累的患者中增高,Ets-1 的表达量则降低;miR326 水平及 Th17 细胞比例与抗 dsDNA、抗核小体呈正相关性,与 C3、C4 呈负相关性,Ets-1 与抗 dsDNA、抗核小体呈负相关性,与 C3、C4 呈正相关性。结论 SLE 患者 CD4⁺T 细胞中 miR326 表达明显增高并与 Th17 细胞比例、疾病活动指标呈正相关性,与 Ets-1 呈负相关性,提示 miR326 可能通过抑制 Ets-1 基因表达,促进 Th17 细胞分化参与 SLE 疾病活动。

关键词 系统性红斑狼疮;微小 RNA;Ets-1;Th17 细胞

中图分类号 R 593.24.02;R 593.241.02

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)09-1320-05

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种典型的多系统炎症性自身免疫性疾病,以多种自身抗体及免疫复合物引起的组织和器官的

损伤为特征,其发病机制尚不完全清楚。Th17(T helper cell 17)细胞是一种以分泌 IL-17(interleukin 17)为主的 CD4⁺T 细胞亚群。大量实验显示,Th17 细胞及其相关细胞因子与 SLE 的发病以及疾病的活动度密切相关^[1]。E26 转录因子-1(E26 transformation specific-1, Ets-1)能够调控 Th17 细胞在内的多种细胞的增殖及分化,进而参与自身免疫性疾病的发生与发展^[2]。研究^[3]证实 Ets-1 缺陷鼠的 Th 细胞比野生型鼠的 Th 细胞向 Th17 细胞分化增多,提示 Ets-1 是 Th17 细胞分化的负性调节因子,Ets-1 缺陷会导致 Th17 细胞相关应答的异常。miR326 是课题组前期运用生物信息学方法筛选出的以 Ets-1 为靶基因的 miRNA,研究^[4]表明 SLE 患者外周单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中 Ets-1 mRNA 及 miR326 表达异常,该研究通过检测 SLE 患者 CD4⁺T 细胞中 miR326 及 Ets-1 mRNA 的表达水平及 Th17 细胞比例,分析三者之间的相关性以及与狼疮活动程度、系统受累情况及实验室指标的关联,探讨三者 SLE 疾病活动中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 采用病例对照的研究方法,选取 2014 年 4 月~12 月于安徽医科大学附属省立医院风湿免疫科住院部及门诊就诊的 40 例 SLE 患者,女 35 例,男 5 例;年龄 18~64(36.00±12.58)岁,所有患者符合美国风湿病学院(ACR)2009 年修订的 SLE 诊断标准。根据 SLE 疾病活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)将 SLE 患者分为活动组(SLEDAI≥5 分)21 例,稳定组(SLEDAI<5 分)19 例。SLE 患者的 SLEDAI 平均评分为(7.65±7.301)分。同时收集 SLE 患者的详细临床资料,包括肾脏损害、关节痛、皮疹、血液系统受累、发热、雷诺现象等临床表现。14 例健康对照者均为健康志愿者,性别、年龄与 SLE 患者组匹配,无相关免疫性疾病和近期感染史。所有纳入研究的对象根据伦理学要求并签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 流式细胞术荧光抗体抗人 CD4-

2016-05-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81373186)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院风湿免疫科,合肥 230001

作者简介:戴超,女,硕士研究生;

李向培,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-

mail: lixiangpei55@126.com

FITC、抗人 IL-17A-PE、同型对照抗体、白细胞刺激剂(美国 BD 公司)、固定/透膜剂(美国 BD 公司); CD4⁺ T 细胞磁珠分选试剂盒、LD 细胞分选柱(德国 MiltenyiBiotec 公司); 人淋巴细胞分离液(北京索来宝公司); TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司); PrimeScript 逆转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒、PCR 引物(日本 TaKaRa 公司)。Ets-1 引物序列的上游引物: 5'-GGAGCAGCCAGTCATCTTTC-3', 下游引物: 5'-GTCCCGCACATAGTCCTTGA-3', 预计扩增的产物长度为 128 bp; β -actin 上游引物: 5'-TG-GCACCAGCACAATGAA-3', 下游引物: 5'-CTA-AGTCATAGTCCGCTAGAAGCA-3', 预计扩增的产物长度为 186 bp。All-in-One miRNA qPCR 引物、逆转录试剂盒及 PCR 试剂盒(美国 GeneCopoeia 公司); ABI 7500 实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); BD FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 流式细胞术 抽取空腹外周静脉肝素钠抗凝血 20 ml, 分选出 PBMCs 并行细胞计数。取 1×10^6 个细胞, 用 1 ml 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬, 加入 2 μ l 白细胞刺激剂, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱 5 h 后, 取出用 PBS 重悬, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 PBS 50 μ l 重悬, 加入 10 μ l 抗 CD4-FITC 抗体, 避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 3 ml PBS 重悬后 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 250 μ l 固定/透膜剂, 避光室温孵育 20 min, 用 1 ml 现配的 Wash 液重悬离心弃上清液重复 2 遍, 加入 50 μ l Wash 液及抗 IL-17A-PE 抗体, 避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 1 ml Wash 液重悬离心弃上清液重复 2 遍, 100 μ l PBS 重悬, 同时染同型对照, 24 h 内上机检测。

1.3.2 磁珠分选 CD4⁺ T 细胞 每 10^7 个细胞加入 90 μ l 磁珠分选缓冲液, 10 μ l CD4⁺ T 细胞生物素抗体混合液混匀, 孵育 10 min, 每 10^7 个细胞再加入 20 μ l 抗生物素抗体磁珠, 孵育 15 min; 每 10^7 个细胞加入 2 ml 缓冲液, 1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清液; 每 10^8 个细胞加入 500 μ l 缓冲液重悬细胞, 将细胞悬液垂直加入已润洗过的 LD 柱中, 阴选出 CD4⁺ T 细胞。

1.3.3 RNA 提取和 cDNA 的合成 取分离好的 CD4⁺ T 细胞, 加入 500 μ l TRIzol, 充分混匀后先后加入三氯甲烷、异丙醇、75% 乙醇溶液, 最后加入 10 μ l DEPC 水溶解 RNA。取 2 μ l 用于 RNA 浓度和纯度测定, 计算逆转所需的 RNA 体积。利用 Prime-

Script 和 All-in-One miRNA 逆转录试剂盒分别得到相应的 cDNA。Ets-1 mRNA 逆转录条件: 37 $^{\circ}$ C、15 min 85 $^{\circ}$ C 5 s。miRNAs 逆转录条件: 37 $^{\circ}$ C 60 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min 随后将 miRNAs 逆转录产物稀释 5 倍。根据 SYBR Green PCR 和 All-in-One miRNA qPCR 试剂盒的检测条件, 分别扩增 Ets-1、miR326 及内参基因获得 Δ CT 值, 选择对照组一样本 Δ CT 值为基准计算 $\Delta\Delta$ CT, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值作为各样本相对表达量。

1.3.4 实验室指标检测 抗核抗体使用间接免疫荧光法检测, Western blot 法检测抗核抗体谱; 免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA 及补体 C3、C4 用免疫比浊法检测, 常规检测血、尿常规、血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 符合正态分布的计量资料采用 t 检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。三组之间的比较使用单因素方差分析及 q 检验; 不符合正态分布的计量资料采用非参数秩和检验, 以中位数(25 分位数, 75 分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 三组间比较使用 Kruskal-Willis 秩和检验, 如差异有统计学意义则进行两两比较, α' 修正为 0.05/3。双变量符合正态分布的使用 Pearson 分析相关性, 余采用 Spearman 分析相关性。制图采用 Prism 5.0 (Graph-Pad) 软件。

2 结果

2.1 miR326 和 Ets-1 在 CD4⁺ T 细胞中的表达水平 SLE 组 CD4⁺ T 细胞中 miR326 的相对表达量明显高于对照组, 差异有统计学意义。采用 Kruskal-Willis 秩和检验比较三组间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 22.785, P = 0.000$), 进行两两比较, α' 修正为 0.05/3。活动组与对照组比较, 差异有统计学意义。活动组与稳定组差异有统计学意义, 稳定组与对照组比较, CD4⁺ T 细胞中 miR326 的表达有增高趋势, 但差异无统计学意义。

与对照组比较, Ets-1 的相对表达量在 SLE 组明显减低, 差异有统计学意义。Kruskal-Willis 秩和检验三组间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 19.956, P = 0.000$), 进行两两比较, α' 修正为 0.05/3。活动组明显低于对照组和稳定组; 稳定组与对照组比较, 差异无统计学意义。见表 1。

2.2 miR326 与 Ets-1 表达及 Th17 细胞比例的相关分析 SLE 组患者外周血中, Th17 (CD4⁺ IL-17A⁺) / CD4⁺ T 细胞比例 (0.642 ± 0.270) % 明显高于对照组 (0.407 ± 0.225) %。使用单因素方差分

表1 SLE患者CD4⁺T细胞中miR326与Ets-1相对表达量的比较

组别	n	miR326	Z值	P值	Ets-1	Z值	P值
SLE	40	2.821(0.704, 6.983)	-2.981	0.003*	0.309(0.170, 0.641)	-3.040	0.002*
活动	21	4.994(2.515, 14.717)	-4.311	0.000 [#]	0.210(0.113, 0.309)	-3.940	0.000 [#]
稳定	19	0.906(0.376, 2.793)	-3.698	0.000 [△]	0.618(0.350, 0.730)	-3.426	0.001 [△]
对照	14	0.712(0.482, 0.869)	-0.838	0.402	0.723(0.460, 0.987)	-1.348	0.178

* SLE组与对照组比较; [#]活动组与对照组比较; [△]活动组与稳定组比较; 稳定组与对照组比较, 其中[#]、[△]的 α' 修正为0.05/3

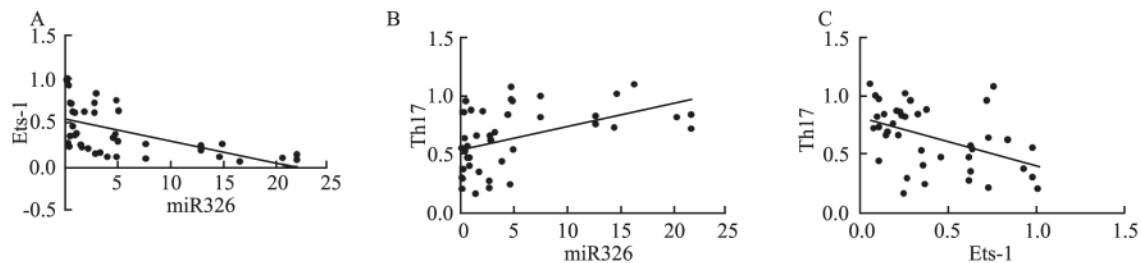


图1 miR326、Ets-1 mRNA相对表达量及Th17细胞比例之间相关性分析

A: miR326与Ets-1 mRNA的表达呈负相关性; B: miR326的表达与Th17细胞比例呈正相关性; C: Ets-1 mRNA的表达与Th17细胞比例呈负相关性

析检验三组, 差异有统计学意义($F = 16.086$, $P = 0.000$), 使用 q 检验进行两两比较。其中活动组(0.793 ± 0.191)%显著高于对照组和稳定组(0.475 ± 0.248)%, 差异有统计学意义。稳定组与对照组比较, 差异无统计学意义($P = 0.367$)。分析miR326与Ets-1、miR326与Th17细胞比例的相关性, 结果显示, miR326与Ets-1呈负相关性($r = -0.667$, $P < 0.001$) (图1A); miR326与Th17细胞比例呈正相关性($r = 0.525$, $P = 0.001$) (图1B); Ets-1的相对表达量与Th17细胞的比例呈负相关性($r = -0.465$, $P = 0.003$) (图1C)。

2.3 SLE患者miR326、Ets-1 mRNA的表达水平及Th17比例与临床特征的分析 将有无关节痛、肾脏受累、皮疹、发热、血液系统受累、雷诺现象等临床表现的SLE患者分为阳性组与阴性组, 分别比较两组miR326、Ets-1 mRNA的表达量以及Th17细胞比例有无差异。结果显示, 在SLE患者肾脏受累、皮疹、发热及血液系统受累患者中, miR326表达水平增高, Ets-1 mRNA表达水平降低, Th17细胞比例也增高。有无关节痛及雷诺现象组间比较差异无统计学意义。分析SLE患者miR326表达水平与SLE-DAI的相关性, 结果显示两者呈正相关性($r = 0.531$, $P < 0.001$), Ets-1表达水平与SLEDAI评分呈负相关性($r = -0.536$, $P < 0.001$), Th17/CD4⁺T细胞比例与SLEDAI评分呈正相关性($r = 0.514$, $P < 0.001$)。见表2。

2.4 SLE患者miR326、Ets-1 mRNA的表达水平

表2 SLE患者miR326、Ets-1 mRNA的表达水平及Th17细胞比例与临床特征的比较

临床表现	阳性组 (n)	阴性组 (n)	miR326		Ets-1		Th17	
			Z值	P值	Z值	P值	Z值	P值
关节痛	13	27	-1.574	0.120	-0.448	0.654	-1.885	0.067
肾脏受累	15	25	-2.431	0.015	-2.389	0.017	-2.954	0.005
皮疹	15	25	-3.437	0.001	-4.26	<0.001	-3.162	0.003
发热	10	30	-2.484	0.013	-3.280	0.001	-2.410	0.023
血液系统受累	13	27	-1.964	0.049	-2.180	0.029	-3.630	0.001
雷诺现象	9	31	-1.555	0.120	-0.599	0.566	-2.601	0.061

及Th17细胞比例与实验室指标的相关分析 结果显示miR326表达水平与抗dsDNA抗体、抗Sm抗体、抗RNP抗体、抗核小体抗体、IgG、ESR等指标呈正相关性, 与C3、C4呈负相关性; Ets-1 mRNA的表达与抗dsDNA抗体、抗Sm抗体、抗RNP抗体、抗核小体抗体呈负相关性, 与白细胞、C3、C4呈正相关性; Th17细胞与抗dsDNA、抗RNP、抗核小体抗体呈正相关性, 与白细胞、C3、C4呈负相关性。结果显示, SLE活动性指标如抗dsDNA、抗核小体抗体、C3、C4等与miR326、Ets-1的表达以及Th17比例明显相关(表3)。与淋巴细胞、血小板、抗核糖体P抗体、IgG、CRP等指标无相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

microRNA通过与mRNAs结合, 在后转录水平调控基因表达。目前发现microRNA参与多种自身免疫疾病的发生。本课题组前期利用生物信息学方法筛选出以Ets-1为靶基因的miRNAs中包括

表3 SLE患者 miR326、Ets-1 mRNA 表达水平及
Th17 细胞比例与实验室指标的相关性分析

实验室指标	miR326		Ets-1		Th17	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
白细胞	-0.275	0.086	0.337	0.033	-0.427	0.006
抗 dsDNA	0.402	0.010	-0.434	0.005	0.383	0.015
抗 Sm	0.318	0.046	-0.371	0.018	0.276	0.084
抗 RNP	0.517	0.001	-0.405	0.010	0.372	0.018
抗核小体	0.463	0.003	-0.550	0.001	0.475	0.002
C3	-0.457	0.003	0.424	0.006	-0.559	0.001
C4	-0.465	0.003	0.456	0.003	-0.389	0.013
ESR	0.410	0.009	-0.291	0.068	0.400	0.011

miR326^[4]。研究^[5]显示多种 microRNA 参与调节 IL-17 细胞因子及其受体的表达。一项系统性硬化症的研究^[6]显示 miR326 能够抑制 Ets-1 的转录,并且其表达增加与 Th17 细胞分化增多及疾病活动密切相关,提示 miR326 可能通过调控 Ets-1 的表达,影响 Th17 细胞分化,参与自身免疫炎症反应。本研究仅进行了简单的相关性分析,结果提示 miR326 与疾病活动相关,但 miR326 的表达是否受药物如糖皮质激素、免疫抑制剂的影响目前尚不清楚,需要进一步研究。

Ets-1 是转录因子 Ets 家族成员之一,近年的 GWAS 研究^[7]显示 Ets-1 是亚洲人 SLE 的易感基因,并且 Ets-1 的基因多态性与 SLE 临床表型有关。既往已有研究^[8]表明,SLE 患者的 PBMCs 中 Ets-1 mRNA 表达水平降低,但尚不清楚 SLE 患者不同细胞亚群中 Ets-1 的表达是否存在差异。本研究针对性地检查 SLE 患者 CD4⁺T 细胞亚群中 Ets-1 mRNA 的表达量,结果进一步证实了 SLE 患者在特定的 T 细胞亚群中存在 Ets-1 的表达缺陷,从而降低了对 Th17 细胞等免疫炎症细胞的负向调控,导致炎症细胞大量增殖。除了 miR326,还有其他 microRNA 如 miR155、miR221、miR222 参与 Ets-1 的调控,这些 microRNA 是否与 miR326 有协同作用,是否也通过调控 Ets-1 的表达参与 SLE 的发病都值得进一步探索。

大量的研究^[9-10]显示血清中 IL-17A 的水平及 Th17 细胞数量与 SLE 疾病活动有关。并且新发狼疮患者外周血中 Th17 细胞比例与 SLEDAI 评分、血清中 C3 水平和抗 dsDNA 抗体的水平相关。根据 miR326 靶向抑制 Ets-1 的转录,Ets-1 缺陷导致 Th17 细胞分化增多,推测 miR326 可能通过抑制 Ets-1 的表达调节 Th17 细胞分化参与 SLE 疾病活动。本项研究结果支持上述推测,提示 miR326 可能通过抑

制 Ets-1 mRNA 的表达水平导致 Th17 细胞的过度增殖,促进了免疫炎症过程,使 SLE 疾病活动加剧。本研究仅检测了 Ets-1 mRNA 的水平,需要进一步进行 Western blot 实验,从蛋白水平进一步验证。下一步可以通过离体实验、动物实验等选择性的抑制或者促进 miR326 的表达,再检测 Ets-1 的表达水平,进一步验证本实验。

综上所述,miR326、Ets-1 及 Th17 细胞在 SLE 患者 CD4⁺T 细胞中表达异常,并且与肾脏受累、皮疹、发热、血液系统受累等以及抗 dsDNA 抗体滴度增高、补体降低有关,提示在 SLE 的疾病活动中发挥重要作用。miR326 可能通过抑制 Ets-1 的表达,促进 Th17 细胞的分化,参与 SLE 的发病,并可能与临床表型相关。进一步研究 miR326 与 Ets-1 是否通过其他可能的作用机制,调节 Th17 及 Treg 这两组极性细胞的分化与功能,有助于揭示 SLE 患者免疫紊乱的具体环节,为临床免疫干预提供新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Vincent F B, Northcott M, Hoi A, et al. Clinical associations of serum interleukin-17 in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(4): R97.
- [2] Zhou Y, Liu M, Li J, et al. Impact of V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 gene polymorphisms upon susceptibility to autoimmune diseases: a Meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(22): e923.
- [3] Christie D, Zhu J. Transcriptional regulatory networks for CD4 T cell differentiation [J]. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014, 381: 125-72.
- [4] 马倩,李向培,陶金辉,等. 系统性红斑狼疮患者 Ets-1 表达及其调控微小 RNAs 的研究 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2013, 17(12): 800-4.
- [5] Mai J, Virtue A, Maley E, et al. MicroRNAs and other mechanisms regulate interleukin-17 cytokines and receptors [J]. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012 4: 1478-95.
- [6] Du C, Liu C, Kang J, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(12): 1252-9.
- [7] Zhong H, Li X L, Li M, et al. Replicated associations of TNFAIP3, TNIP1 and ETS1 with systemic lupus erythematosus in a southwestern Chinese population [J]. *Arthritis Res Ther* 2011, 13(6): R186.
- [8] Li Y, Sun L D, Lu W S, et al. Expression analysis of ETS1 gene in peripheral blood mononuclear cells with systemic lupus erythematosus by real-time reverse transcription PCR [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(16): 2287-8.
- [9] 王道洋,王德光,刘桂凌,等. 系统性红斑狼疮患者外周血单个

核细胞中 Th17 细胞数量变化及临床意义[J]. 安徽医科大学学报 2013 48(8): 941-5.

[10] Wen Z, Xu L, Xu W, et al. Detection of dynamic frequencies of

Th17 cells and their associations with clinical parameters in patients with systemic lupus erythematosus receiving standard therapy [J]. *Clin Rheumatol*, 2014, 33(10): 1451-8.

miR326 participates in SLE morbidity by regulating Ets-1 expression and Th17 cells differentiation

Dai Chao, Tao Jinhui, Sun Xiaoge, et al

(Dept of Rheumatism, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To detect the expression of miR326 and Ets-1 in CD4⁺ T cells and the ratio of Th17 cells of patients with systemic lupus erythematosus (SLE), to analyze their relationship with each other and with the clinical data, to explore the potential pathogenesis of SLE. **Methods** 40 patients according to 2009 American College of Rheumatology (ACR) SLE diagnosis standards were selected, and recorded their clinical data. 14 healthy adults without autoimmune disease were chosen as controls. Flow cytometry was used to inspect the ratio of Th17 cells (CD4⁺IL-17A⁺)/CD4⁺T cells. Magnetic activated cell sorting was used to enrich the CD4⁺T cells, and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to inspect the relative expression of miR326 and Ets-1 mRNA in CD4⁺ T cells. **Results** Compared to the healthy controls, the miR326 expression level in the CD4⁺T cells of SLE patients was increased obviously ($P=0.003$), and the expression level was higher in the active group than that in remitting group ($P=0.000$). The Ets-1 mRNA expression level in CD4⁺T cells of SLE group was reduced obviously than that in the controls ($P=0.002$), and the expression in the active group was lower than that in remitting group ($P=0.001$). Compared to the controls, the ratio of Th17 cells/CD4⁺T cells in SLE group was increased obviously ($P=0.004$), and significant difference was found between the active group and the remitting group. The miR326 expression had a negative correlation with the Ets-1 expression ($P<0.001$) and a positive correlation with the ratio of Th17 cells ($P=0.001$). There was also a negative correlation between Ets-1 expression and the ratio of Th17 cells ($P=0.003$). The miR326 expression and the ratio of Th17 cells both had a positive correlation with the SLEDAI score, while the Ets-1 expression had a negative correlation with the SLEDAI score. In SLE patients who suffered from erythra, hematologic system or kidney impairment, the miR326 expression and the ratio of Th17 cells increased significantly, while the Ets-1 expression induced compared to the rest SLE patients. The miR326 expression and the ratio of Th17 cells positively regulated with anti-dsDNA antibodies level and anti-nucleosome antibodies level, and negatively regulated with C3 and C4. On the contrary the Ets-1 expression had a negative regulation with anti-dsDNA antibodies and anti-nucleosome antibodies and a positive regulation with C3 and C4. **Conclusion** The miR326 expression of CD4⁺ T cells increases obviously in SLE patients and positively correlates to the ratio of Th17 cells and the disease activity index, but has a negative correlation with Ets-1 expression. The results prompt that miR326 could participate in the disease activity of SLE through inhibiting the Ets-1 gene expression and promoting the differentiation of Th17 cells.

Key words systemic lupus erythematosus; miRNAs; Ets-1; Th17 cells