

- 11 谢庆芝, 邱祖建. 大学生运动猝死调查与风险预警研究 (J). 武汉体育学院学报 2013; 47(2): 93-7.
- 12 安俊英, 黄海燕. 基于模糊层次分析法的大型体育赛事风险评估研究 (J). 上海体育学院学报 2011; 35(4): 32-5.
- 13 Tomioka K, Kurumatani N, Hosoi H. Positive and negative influences of social participation on physical and mental health among community-dwelling elderly aged 65-70 years: a cross-sectional study in Japan (J). BMC Geriatr 2017; 17(1): 111.
- 14 Chen L, Wang S, Xu JC. Survey on physical fitness and cardiovascular function of the city elderly in different regular physical activities in China (J). J Nutr Health Aging 2018; 22(9): 1107-11.

(2019-02-25 修回)

(编辑 王一涵)

• 其 他 •

老年原发性干燥综合征患者血清 miR-146a 和 miR-155 表达及临床意义

朱丽娟¹ 张振山¹ 夏楠楠¹ 张伟峰¹ 郑晶² 孟飞龙¹ 杨磊¹ 沈龙³

(1 郑州大学附属郑州中心医院风湿免疫科, 河南 郑州 450007; 2 中山大学附属第五医院风湿免疫科; 3 厦门大学)

〔摘要〕 目的 探究 miR-146a 和 miR-155 在老年原发性干燥综合征 (PSS) 患者血清中的表达及临床意义。方法 老年 PSS 患者 80 例 (疾病组) 和同期健康体检者 80 例 (对照组) 为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR 法检测血清 miR-146a、miR-155 表达水平, 采用阻抗法检测血清白细胞 (WBC) 含量, 采用免疫比浊法测定血清免疫球蛋白 (Ig) G 抗体水平, 采用间接免疫荧光法检测血清抗核抗体 (ANA), 采用免疫组化法检测血清抗 SSA、抗 SSB 抗体, 采用 Pearson 法分析 miR-146a、miR-155 及二者分别与 WBC、IgG 的相关性; 采用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析检测 miR-146a、miR-155 表达水平对 PSS 诊断价值。结果 与对照组比较, 疾病组血清中 miR-146a 表达水平明显升高 ($P < 0.001$), miR-155 表达水平明显降低 ($P < 0.001$), 血清中 WBC 数量显著减少 ($P < 0.001$), IgG 水平显著增加 ($P < 0.001$); 与抗 ANA 阴性组、抗 SSA 阴性组、抗 SSB 阴性组比较, 抗 ANA 阳性、抗 SSA 阳性组、抗 SSB 阳性组 miR-146a 表达水平显著升高, miR-155 表达水平显著降低 ($P < 0.001$); PSS 患者血清中 miR-146a 与 miR-155 表达呈显著负相关 ($r = -0.718, P < 0.05$), 与 WBC 呈显著负相关 ($r = -0.694, P < 0.05$), 与 IgG 呈显著正相关 ($r = 0.690, P < 0.05$); PSS 患者血清中 miR-155 与 WBC 呈显著正相关 ($r = 0.566, P < 0.05$), 与 IgG 呈显著负相关 ($r = -0.693, P < 0.05$); 血清 miR-146a、miR-155 表达水平诊断 PSS 疾病的曲线下面积 (AUC) 为 0.831、0.834, 截断值为 0.625、0.651, 特异度为 0.825、0.838, 灵敏度为 0.800、0.813; 二者联合诊断 PSS 疾病的 AUC 为 0.884, 特异度为 0.925, 灵敏度为 0.763。结论 miR-146a 在 PSS 患者血清中高表达, miR-155 低表达, 二者呈负相关, 可能参与 PSS 发生发展过程, 对 PSS 早期诊断有一定参考价值。

〔关键词〕 miRNA-146a; miRNA-155; 原发性干燥综合征**〔中图分类号〕** R593 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2019)20-5020-05; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2019.20.043**Expressions and clinical significances of serum miR-146a and miR-155 in elderly patients with primary Sjogren's syndrome**

ZHU Li-Juan, ZHANG Zhen-Shan, XIA Nan-Nan, et al.

Department of Rheumatology and Immunology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, Henan, China

〔Abstract〕 Objective To investigate the expressions and clinical significances of microRNA-146a (miR-146a) and microRNA-155 (miR-155) in the serum of elderly patients with primary Sjogren's syndrome (PSS). **Methods** 80 elderly patients with PSS and 80 healthy people (control group) were collected from January 2016 to January 2019. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of serum miR-146a and miR-155, the content of WBC in serum was measured by impedance method, serum IgG antibody level was determined by immunoturbidimetry, anti-ANA antibody in serum was detected by in-

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81571585)

通信作者: 杨磊 (1969-), 女, 主任医师, 硕士, 主要从事风湿免疫研究。

第一作者: 朱丽娟 (1982-), 女, 主治医师, 硕士, 主要从事风湿免疫研究。

direct immunofluorescence assay , serum anti-SSA and anti-SSB antibodies were detected by immunohistochemistry. Pearson method was used to analyze the correlation between miR-146a and miR-155 and their correlations with WBC , IgG , respectively. ROC curve analysis was used to detect the expression levels of miR-146a and miR-155 in the diagnosis of PSS. **Results** Compared with that of control group , the level of serum miR-146a of PSS group was significantly increased ($P < 0.05$) , while the level of miR-155 was significantly decreased ($P < 0.05$) . The number of WBC in serum of patients with PSS was decreased significantly , while the level of IgG was increased significantly ($P < 0.05$) . Compared with that of anti-ANA negative group , the expression level of miR-146a in the anti-ANA positive group was increased significantly , and the expression level of miR-155 was decreased significantly ($P < 0.05$) . Compared with that of anti-SSA negative group , the expression level of miR-146a in anti-SSA positive group was increased significantly , and the expression level of miR-155 was decreased significantly ($P < 0.05$) . Compared with that of anti-SSB negative group , the expression level of miR-146a in anti-SSB positive group was increased significantly , and the expression level of miR-155 was decreased significantly ($P < 0.05$) . Pearson analysis showed that there was a negative correlation between the expression of miR-146a and the expression of miR-155 in serum of patients with PSS ($r = -0.718$, $P < 0.05$) . The level of serum miR-146a in patients with PSS was negatively correlated with WBC ($r = -0.694$, $P < 0.05$) , and positively correlated with IgG ($r = 0.690$, $P < 0.05$) . The level of serum miR-155 in patients with PSS were positively correlated with WBC ($r = 0.566$, $P < 0.05$) , and negatively correlated with IgG ($r = -0.693$, $P < 0.05$) . The results of ROC curve analysis showed that the AUCs of levels of serum miR-146a and miR-155 in the diagnosis of PSS were 0.831 and 0.834 , the truncation values were 0.625 and 0.651 , the specificities were 0.825 and 0.838 , and the sensitivities were 0.800 and 0.813 . The AUC of combined diagnosis of PSS was 0.884 , the truncation value was 0.688 , the specificity was 0.925 , and the sensitivity was 0.763 . **Conclusions** The expression of miR-146a is high in the serum of patients with PSS , the expression of miR-155 is low , there is a negative correlation between them . They may be involved in the occurrence and development of PSS , and have certain reference value for the early diagnosis of PSS .

【Key words】 MicroRNA-146a; MicroRNA-155; Primary Sjogren's syndrome

原发性干燥综合征(PSS)是一种慢性炎症性自身免疫性疾病,临床症状复杂多样,病理表现主要可见大量淋巴细胞浸润外分泌腺及内脏器官。PSS在我国发病率为0.3%~0.7%,多发于30~40岁或绝经女性,其发病机制至今尚不明确^[1]。PSS在老年人群中致病高达0.77%,严重影响老年人的生活质量^[2]。微小RNA(miRNA)是一类长度为18~25个核苷酸的内源性非编码小RNA,通过与其靶基因3'非翻译区(UTR)区序列结合形成沉默复合物,通过降解其靶基因或抑制其靶基因翻译,参与调节机体生长、发育、细胞衰老、凋亡等多种生物过程^[3]。研究发现,miRNA可调节机体免疫功能、维持免疫系统稳定,在固有免疫和适应性免疫中发挥重要作用^[4]。本研究拟观察miR-146a和miR-155在老年PSS患者血清中表达。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2016年1月至2019年1月郑州大学附属郑州中心医院收集的80例首次确诊的PSS患者为疾病组,其中男5例,女75例,年龄55~84(平均 (68.32 ± 12.41))岁。另选取同期体检正常者80例为对照组,其中男4例,女76例,年龄55~85(平均 (69.15 ± 13.25))岁。两组在年龄和性别构成上差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经本院伦理委员会批准,样品采集均取得患者及家属知情同意,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》。

1.2 纳入排除标准 纳入标准:①参照2012年美

国《风湿病学协会干燥综合征诊断标准》^[5],首次诊断为PSS;②年龄 ≥ 50 岁;③未进行激素、免疫抑制剂治疗;④自愿接受治疗研究,并能完成临床记录;排除标准:①有严重感染性疾病;②精神异常;③有严重脏器功能障碍或其他恶性肿瘤;④有糖尿病、高血压等疾病。

1.3 主要试剂与仪器 Trizol试剂(编号:R0016)购自上海碧云天生物技术有限公司;PrimeScriptTM RT试剂盒(Perfect Real Time,编号RR037A)、PrimeScriptTM II第一链cDNA合成试剂盒(编号:6210A)购自北京TaKaRa;引物由上海生工生物公司合成,miR-146a引物:上游5'-AGAACTGAATTC-CATGGGT-3',下游:5'-GACAGAGATATCCCAGCT-GAAGAA-3';miR-155引物:上游5'-TTAATGCTA-ATCGTGATAGGGGT-3',下游:5'-CCTTAAACTC-CACTAGAAGCA-3';U6引物:上游5'-ATTGGA-AC-GATACAGAGAAGATT-3',下游:5'-GGAACGCT-TCACGAATTTG-3'。MODEL550型酶标仪、实时荧光定量-聚合酶链反应(qRT-PCR)仪美国Bio-Rad公司、迈瑞5380生化仪、美国Beckman IMMAGE800生化仪等。

1.4 样品采集及保存 采集PSS患者和对照组血液5ml,于1h内3000r/min室温离心5min分离血清,冻存于-80℃冰箱备用。

1.5 qRT-PCR检测血清中miR-146a、miR-155表达水平 采用Trizol试剂提取血清总RNA,反转录得到cDNA。采用定量PCR仪(Bio-Rad)对miR-146a

和 miR-155 进行扩增。qRT-PCR 反应采用 20 μ l 体系: TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μ l, ROX Reference Dye or Dye II (50 \times) 0.4 μ l, cDNA (50 ng/ μ l) 2 μ l, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ l, ddH₂O 6.0 μ l。反应采用两步法, 条件设置为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s; 60 $^{\circ}$ C 34 s 40 个循环; 添加溶解曲线。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法对血清 miR-146a 和 miR-155 表达水平进行定量分析。

1.6 血清指标检测 采用阻抗法检测血清白细胞 (WBC) 含量, 采用免疫比浊法测定血清免疫球蛋白 (Ig) G 抗体水平, 采用间接免疫荧光法检测血清抗核抗体 (ANA), 采用免疫组化法检测血清抗 SSA、抗 SSB 抗体。根据检测结果将疾病组分为抗 ANA 阳性 (+) 53 例, 抗 ANA 阴性 (-) 27 例; 抗 SSA 阳性 (+) 56 例, 抗 SSA 阴性 (-) 24 例; 抗 SSB 阳性 (+) 52 例, 抗 SSB 阴性 (-) 28 例。

1.7 统计学分析 采用 SPSS22.0 软件进行 χ^2 检验、*t* 检验、Pearson 相关系数分析、受试者工作特征 (ROC) 曲线分析。

2 结果

2.1 对照组与疾病组血清 miR-146a、miR-155 表达比较 与对照组比较, 疾病组血清 miR-146a 表达水平显著升高 (1.02 \pm 0.35 vs 3.28 \pm 0.71, *t* = 25.536, *P* < 0.001), miR-155 表达水平显著降低 (1.13 \pm 0.27 vs 0.56 \pm 0.12, *t* = 17.255, *P* < 0.001)。

2.2 对照组与疾病组 WBC、血清 IgG 水平比较 与对照组比较, 疾病组患者 WBC 数显著减少 [(7.95 \pm 2.61) $\times 10^9$ /L vs (3.52 \pm 1.47) $\times 10^9$ /L, *t* = 13.228, *P* < 0.001], 血清中 IgG 水平显著增加 [(9.72 \pm 3.51) g/L vs (20.61 \pm 5.47) g/L, *t* = 14.987, *P* < 0.001]。

2.3 血清 miR-146a、miR-155 表达水平与 PSS 患者炎症损伤指标的关系 与抗 ANA (-) 组比较, 抗 ANA (+) 组 miR-146a 表达水平显著升高, miR-155 表达水平显著降低 (*P* < 0.001); 与抗 SSA (-) 组比较, 抗 SSA (+) 组 miR-146a 表达水平显著升高, miR-155 表达水平显著降低 (*P* < 0.001); 与抗 SSB (-) 组比较, 抗 SSB (+) 组 miR-146a 表达水平显著升高, miR-155 表达水平显著降低 (*P* < 0.001)。见表 1。

表 1 疾病组血清 miR-146a、miR-155 表达水平与炎症损伤指标间关系 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-146a	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	miR-155	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
抗 ANA (+) 组	53	3.35 \pm 0.64	8.256	<0.001	0.59 \pm 0.14	10.332	<0.001
抗 ANA (-) 组	27	2.31 \pm 0.18			0.94 \pm 0.15		
抗 SSA (+) 组	56	3.21 \pm 0.52	12.053	<0.001	0.51 \pm 0.12	10.797	<0.001
抗 SSA (-) 组	24	1.87 \pm 0.24			0.87 \pm 0.17		
抗 SSB (+) 组	52	3.42 \pm 0.56	12.897	<0.001	0.48 \pm 0.11	13.171	<0.001
抗 SSB (-) 组	28	2.01 \pm 0.19			0.95 \pm 0.21		

2.4 PSS 患者血清 miR-146a、miR-155 表达水平的相关性 PSS 患者血清中 miR-146a 与 miR-155 表达呈显著负相关 (*r* = -0.718, *P* < 0.05)。见图 1。

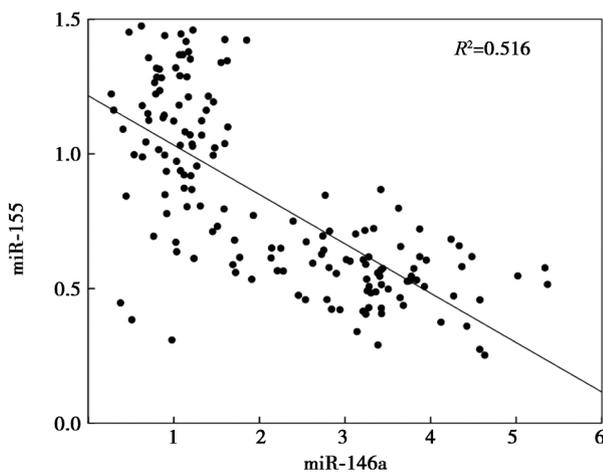


图 1 PSS 患者血清 miR-146a、miR-155 表达水平的相关性

2.5 PSS 患者血清中 miR-146a、miR-155 与 WBC、IgG 水平的相关性 PSS 患者血清中 miR-146a 与 WBC 呈显著负相关 (*r* = -0.694, *P* < 0.05), 与 IgG 呈显著正相关 (*r* = 0.690, *P* < 0.05); miR-155 与 WBC 呈显著正相关 (*r* = 0.566, *P* < 0.05), 与 IgG 呈显著负相关 (*r* = -0.693, *P* < 0.05)。见图 2, 图 3。

2.6 血清 miR-146a、miR-155 表达水平对 PSS 的诊断价值 分别以血清 miR-146a、miR-155 表达水平及二者联合预测值为检验变量绘制 ROC 曲线, 结果显示, 血清 miR-146a、miR-155 表达水平诊断 PSS 的曲线下面积 (AUC) 为 0.831、0.834, 截断值为 0.625、0.651, 特异度为 0.825、0.838, 灵敏度为 0.800、0.813; 二者联合诊断 PSS 的 AUC 为 0.884, 截断值为 0.688, 特异度为 0.925, 灵敏度为 0.763。见图 4。

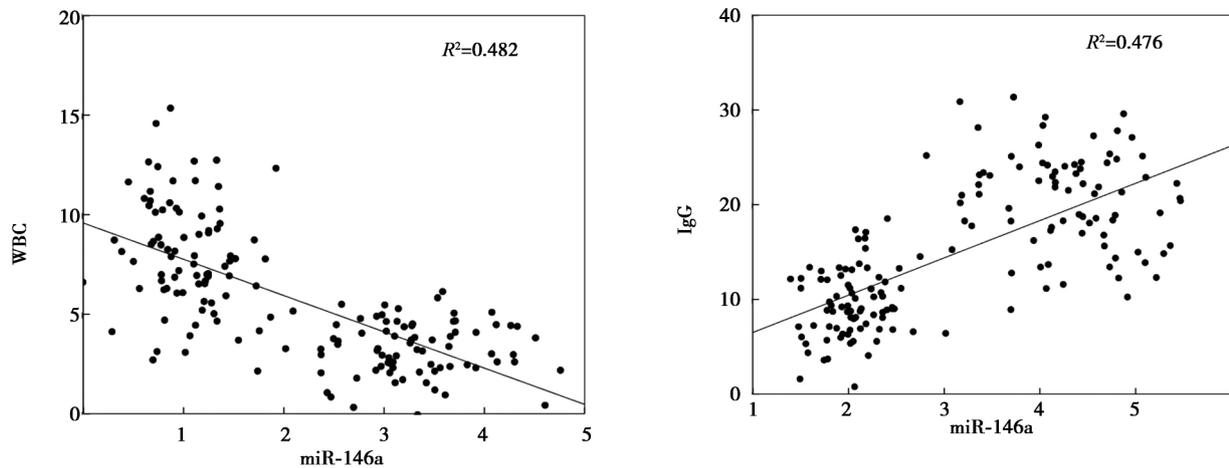


图 2 PSS 患者血清中 miR-146a 与 WBC 水平及 IgG 水平的相关性

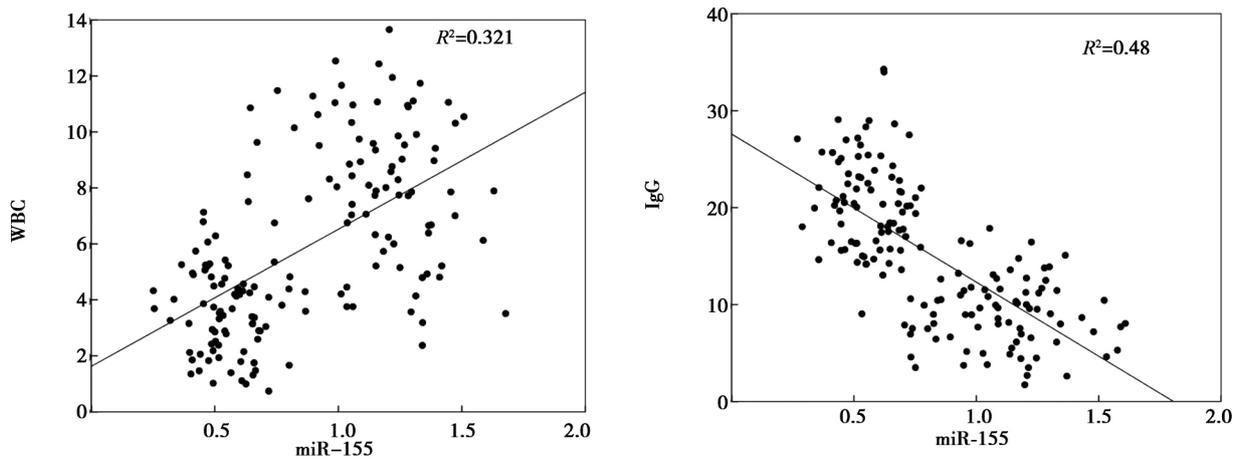


图 3 PSS 患者血清中 miR-155 与 WBC 水平及 IgG 水平的相关性

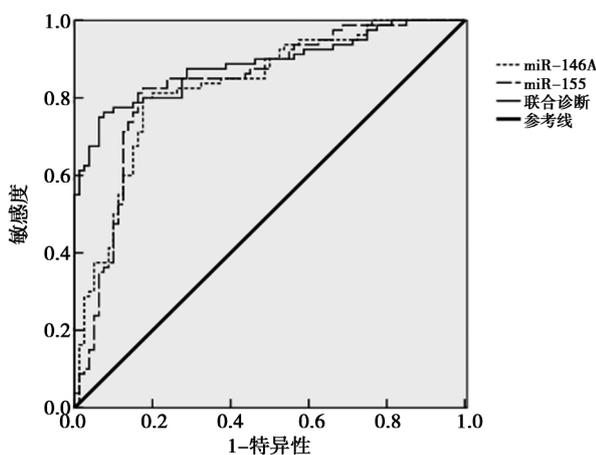


图 4 血清 miR-146a、miR-155 对 PSS 疾病的 ROC 曲线

3 讨论

PSS 属自身免疫性疾病范畴,临床典型表现为

口、眼干燥,并可累及全身多种器官。该病好发于女性,尤其绝经后女性,严重威胁老年女性群体健康。目前临床唇腺活检及腮腺造影诊断 PSS 的特异性较高,但有创检测医疗费用高,在推广应用受限⁽⁶⁾。因此寻找 PSS 敏感且特异的早期诊断指标对早发现、早治疗、有效控制病情发展意义重大。

近来研究表明,miRNA 进化过程中高度保守,广泛存在于线虫、细菌、病毒、植物及哺乳动物中,参与生物体的生长、发育、细胞增殖、凋亡等多种生命活动⁽⁷⁾。研究发现,miRNAs 表达和功能失调与多种疾病,如癌症⁽⁸⁾、肿瘤⁽⁹⁾及许多自身免疫性疾病类风湿性关节炎⁽¹⁰⁾、干燥综合征⁽¹¹⁾等发生有关。miR-146a 是一种与慢性炎症疾病有关的 miRNA,在天然免疫和获得性免疫中有重要调控作用⁽¹²⁾。miR-155 位于人类 21 号染色体上,是一个多功能 miRNA,在淋巴细胞应答中发挥重要作用,还可介导炎症反应、呈递抗原、调控免疫过程中细胞因子生成

等^[13]。

Sun 等^[14]研究发现,miR-146a 表达与 PSS 发生有关,可作为诊断 PSS 发生的生物标志。王笑颜等^[6]研究发现,miR-146a-5p 在 PSS 患者中表达上调。陈慕芝等^[15]研究表明,miR-155 在 PSS 患者外周血单个核细胞中显著低表达,与本研究结果一致。本研究结果发现,miR-146a 在 PSS 患者血清中显著高表达,miR-155 显著低表达,提示血清 miR-146a、miR-155 表达可能与 PSS 有关。研究发现,抗 SSA 抗体可能与 PSS 患者血液系统障碍尤其 WBC 减少密切相关^[6]。van Woerkom 等^[16]研究发现 PSS 患者血清中 IgG 升高,且可作为判断 PSS 活动指标。本研究提示 PSS 发生伴随 WBC 减少,IgG 抗体数增加。进一步分析提示 miR-146a、miR-155 可能与 PSS 发展及炎性损伤过程有关。研究表明,抗 ANA、抗 SSA、抗 SSB 是非特异性抗体,当自身免疫反应发生时,这些抗体水平会随免疫反应严重程度升高,其中抗 SSA 抗体常见于 PSS 和系统性红斑狼疮女性患者,抗 SSB 抗体几乎仅见于 PSS 患者,抗 ANA、抗 SSA、抗 SSB 抗体水平常作为临床诊断 PSS 实验室检测指标^[6],结合本研究结果提示 miR-146a、miR-155 水平变化可能与 PSS 患者炎症损伤程度有关。本研究提示而 miR-146a、miR-155 可能共同参与 PSS 疾病发生发展。进一步采用 ROC 曲线分析血清 miR-146a、miR-155 水平对 PSS 诊断价值提示联合检测血清 miR-146a、miR-155 水平对 PSS 疾病诊断的 AUC 显著增加,对 PSS 疾病诊断有一定参考价值,但本研究纳入样本量较少,其具体可行性有待深入探究。

综上,PSS 患者血清中 miR-146a 高表达,miR-155 低表达,二者呈负相关,可能作为诊断 PSS 疾病的潜在生物标志。

4 参考文献

- 1 Simka M. Cellular and molecular mechanisms of venous leg ulcers development—the "puzzle" theory (J). *Int Angiol* 2010; 29(1): 1-19.
- 2 李玉玲,冀林华. 老年原发性干燥综合征患者干扰素- γ 、Fas、FasL 检测的意义 (J). *中国老年学杂志* 2016; 36(14): 3536-7.
- 3 Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress and timing (J). *Cell* 2003; 113(6): 673-6.

- 4 Gauna AE, Park YJ, Nayar G *et al.* Dysregulated co-stimulatory molecule expression in a Sjogren's syndrome mouse model with potential implications by microRNA-146a (J). *Mol Immunol* 2015; 68(2): 606-16.
- 5 Shao F, Yang D. Impact of microbial immune enteral nutrition on post-operative insulin resistance and infectious complication of patients with abdominal infection (J). *Clin J Gastrointest Surg* 2014; 17(7): 676-9.
- 6 王笑颜,沈翠芬,金文君,等. 原发性干燥综合征患者血液中 miR-146a-5p、miR-4484 和 miR-4687-5p 的表达 (J). *中国卫生检验杂志* 2015; 25(24): 4248-50.
- 7 Ye ZL, Lu HL, Su Q *et al.* Association between the level of CD4(+) T lymphocyte microRNA-155 and coronary artery disease in patients with unstable angina pectoris (J). *J Geriatr Cardiol* 2018; 15(10): 611-7.
- 8 Chen W, Chu S, Li H *et al.* MicroRNA-146a-5p enhances ginsenoside Rh2-induced anti-proliferation and the apoptosis of the human liver cancer cell line HepG2 (J). *Oncol Lett* 2018; 16(4): 5367-74.
- 9 Liu J, Chen Z, Xiang J *et al.* MicroRNA-155 acts as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting CTHRC1 in vitro (J). *Oncol Lett* 2018; 15(4): 5561-8.
- 10 周亚丽,郭向华,邵莉,等. 类风湿性关节炎患者外周血单核细胞中 miR-146a 及 miR-155 的表达变化 (J). *山东医药* 2016; 56(45): 77-9.
- 11 Wang-Renault SF, Boudaoud S, Nocturne G *et al.* Deregulation of microRNA expression in purified T and B lymphocytes from patients with primary Sjogren's syndrome (J). *Ann Rheum Dis* 2018; 77(1): 133-40.
- 12 Wang X, Cao J, Yu Y *et al.* Role of MicroRNA 146a in regulating regulatory T cell function to Ameliorate acute cardiac rejection in mice (J). *Transplant Proc* 2019; 51(3): 901-12.
- 13 Yang Y, Zhang N, Wang S *et al.* MicroRNA-155 regulates inflammatory response in ischemic cerebral tissues through autophagy (J). *Curr Neurovasc Res* 2018; 15(2): 103-10.
- 14 Sun HY, Lv AK, Yao H. Relationship of miRNA-146a to primary Sjogren's syndrome and to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis (J). *Rheumatol Int* 2017; 37(8): 1311-6.
- 15 陈慕芝,孙学斌,巴哈尔古丽·力提甫,等. 原发性干燥综合征气阴两虚证外周血单个核细胞中 miR-155 表达水平的研究 (J). *新疆医科大学学报* 2018; 41(1): 113-6.
- 16 van Woerkom JM, Kruize AA, Geenen R *et al.* Safety and efficacy of leflunomide in primary Sjogren's syndrome: a phase II pilot study (J). *Ann Rheum Dis* 2007; 66(8): 1026-32.

(2019-03-25 修回)

(编辑 刘振宇)