

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.017

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.017

微小RNA-182在系统性红斑狼疮中的诊断价值

余伟¹, 徐蔷薇², 季蓉², 黄红宇¹, 任天丽²

(无锡市第二人民医院 1. 检验科; 2. 风湿免疫科, 江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的: 观察microRNA-182在系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者外周血的表达水平, 明确microRNA-182应用于SLE诊断的临床价值。方法: 选取2014年1月至2015年1月在南京医科大学附属无锡市第二人民医院就诊的SLE患者80例(SLE组), 同期招募健康体检者70例(对照组)。2组患者入院即刻抽取约5 mL静脉血, 采用TaqMan real-time PCR方法测定所有受试者外周血microRNA-182表达水平。根据SLE患者是否首次发病, 分为初发SLE亚组及非初发SLE亚组, 并比较两亚组患者microRNA-182表达水平的差异。分析microRNA-182水平与抗ds-DNA抗体及SLE疾病活动度指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)的相关性。结果: SLE患者外周血中microRNA-182水平较健康对照组显著升高(1.58 ± 0.69 vs. 0.40 ± 0.35 , $P < 0.01$), 其中初发SLE患者microRNA-182水平较非初发SLE患者显著升高(2.05 ± 0.56 vs. 1.10 ± 0.45 , $P < 0.01$), 同时发现microRNA-182水平与SLEDAI($r = 0.466$, $P < 0.01$)及抗ds-DNA抗体($r = 0.442$, $P < 0.01$)具有显著相关性。同时, ROC曲线发现microRNA-182在诊断SLE方面具有较高价值[AUC: 0.94(95% CI 0.91~0.98)]。结论: microRNA-182可以作为诊断及SLE的生物标志物。

[关键词] 微小RNA-182; 系统性红斑狼疮; 抗ds-DNA抗体; SLE疾病活动度指数

Value of microRNA-182 in diagnosis and prediction for systemic lupus erythematosus

YU Wei¹, XU Qiangwei², JI Rong², HUANG Hongyu¹, REN Tianli²

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Rheumatology, Wuxi Second People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi Jiangsu 214002, China)

Abstract **Objective:** To study the expression of microRNA-182 in systemic lupus erythematosus (SLE) for exploring the value of diagnosis for SLE. **Methods:** Eighty SLE patients served as a SLE group and 70 healthy volunteers as a healthy control (HC) group from Wuxi Second People's Hospital of Nanjing Medical University between January 2014 and January 2015. About 5 mL venous blood was collected from all subjects on admission, and the levels of microRNA-182 were detected by TaqMan real-time (RT) PCR. Meanwhile, SLE patients were divided into a newly diagnosed subgroup ($n=40$) and a non-newly diagnosed subgroup ($n=40$), the difference of expression microRNA-182 were compared in

收稿日期 (Date of reception): 2016-12-01

通信作者 (Corresponding author): 任天丽, Email: rentianli@medmail.com.cn

基金项目 (Foundation item): 无锡市医院管理中心医学科技项目 (YGZXQ1301)。This work was supported by Science and Technology Projects of Wuxi City, P. R. China (YGZXQ1301).

the two subgroups. The relationship between microRNA-182 levels and anti-ds-DNA antibody and SLEDAI were explored subsequently. **Results:** The levels of microRNA-182 in the SLE group were significantly higher than the HC group (1.58 ± 0.69 vs. 0.40 ± 0.35 , $P < 0.01$), meanwhile its levels in newly diagnosed subgroup were significantly higher than non-newly diagnosed subgroup (2.05 ± 0.56 vs. 1.10 ± 0.45 , $P < 0.01$). The expression of microRNA-182 had a positive correlation with anti-ds-DNA antibody and SLEDAI ($r = 0.466$, $P < 0.01$ and $r = 0.442$, $P < 0.01$, respectively), and ROC suggested that the value of microRNA-182 in diagnosis for SLE was high [AUC: 0.94 (95% CI 0.91–0.98)]. **Conclusion:** microRNA-182 is a potential biomarker in diagnosis for SLE.

Keywords microRNA-182; systemic lupus erythematosus; anti-ds-DNA antibody; SLEDAI

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是临床上最为常见的自身免疫性疾病之一^[1]。SLE具有起病隐匿、致残率高、降低生活质量以及治疗效果不佳等特点,早期诊断,早期治疗能很大程度提高患者的临床预后^[2-3]。SLE的诊断、病情评估以及临床效果等对实验室标志物呈现高度的依赖型。目前现有的实验室诊断标志物存在缺点,因此,灵敏度及特异性更高的新型SLE诊断标志物亟待研究发现。microRNA是近年来发现的一类约由22~25个核苷酸组成的高度保守的小分子非编码单链,其通过介导基因转录后沉默来调控基因表达和蛋白质翻译过程,从而对影响生物个体^[4-6]。许多研究^[7-8]指出SLE患者普遍存在microRNAs异常表达,其可能通过调节免疫细胞信号转导、免疫细胞分化过程进而参加自身免疫反应的发生发展。本文拟通过临床试验,系统评价外周血microRNA-182在SLE诊断及疾病活动度评估中的价值。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2014年1月至2015年1月于南京医科大学附属无锡市第二人民医院就诊的SLE患者80例(SLE组),同期招募健康体检者70例(对照组)。其中,根据SLE是否初次确诊,分为初发SLE亚组及非初发SLE亚组(各40例)。研究对象中男16例,女134例,年龄14~75(39.45 ± 13.97)岁。

SLE入选标准基于美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)1997年修订的SLE诊断标准,该标准一共11项,符合其中4项或4项以上者,除外感染、肿瘤、结缔组织病,同时参考其免疫学及相关抗体指标诊断为SLE^[9]。根据系统性红斑狼疮病活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)评估SLE患者疾病活动程度,0~4分为疾病缓解期,≥4分为疾病活动期。

排除其他自身免疫性疾病、严重肝肾疾病、妊娠或哺乳期患者。

所有患者诊治过程获得无锡市第二人民医院伦理委员会认可,并获得充分知情同意。

1.2 资料采集

收集患者在院期间的临床特征,包括患者的年龄、性别等基本资料;实验室检测指标主要为抗ds-DNA抗体,每个SLE患者入院均评估其SLEDAI。

1.3 microRNA-182 表达检测

收集SLE患者以及健康体检个体外周血约5 mL,在4℃条件下,经3 000 r/min离心30 min后,将血浆转移至新的EP管中,继续在4℃条件下,12 000 r/min离心10 min,然后用Ambion公司的血浆microRNA提取试剂盒miRVan™ PARIS™ kit抽提血浆microRNA,并采用Applied Biosystems公司的TaqMan® miRNA reverse transcription kit进行反转录,之后将cDNA置于-80℃保存备用。待收集完成后,采用Applied Biosystems公司的TaqMan® microRNA检测试剂盒,以U6为内参,检测受试对象血浆microRNA-182水平。每个样本均进行3次检测,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算microRNA-182的相对表达水平并对其进行 $\log_2^{-\Delta\Delta Ct}$ 转换^[10-11], $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(\text{Ct microRNA-182} - \text{Ct U6}) - \text{对照组}(\text{Ct microRNA-182} - \text{Ct U6})$,我们采用 $-\Delta\Delta Ct$ 表达microRNA-182的相对水平。

1.4 统计学处理

所有数据采用SPSS 17.0统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用t检验或秩和检验,多组比较采用单因素方差分析进行Kruskal-Wallis H检验。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者循环 microRNA-182 水平

SLE组患者外周血microRNA-182相对表达水平明显高于对照组患者(1.58 ± 0.69 vs. 0.40 ± 0.35 , $P < 0.01$, 图1)。

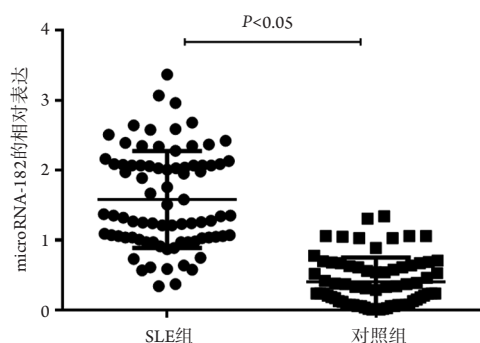


图1 SLE患者组与对照组外周血microRNA-182相对表达水平比较

Figure 1 Relative expression levels of microRNA-182 in peripheral blood of the SLE group compared with the control group

2.2 两亚组患者循环 microRNA-182 水平

根据SLE是否新确诊, 将患者分为两亚组即初发SLE亚组与非初发SLE亚组, 比较发现, 经规范治疗后的非初发SLE患者外周血microRNA-182水平显著低于初发SLE患者(2.05 ± 0.56 vs. 1.10 ± 0.45 , $P < 0.01$; 图2)。

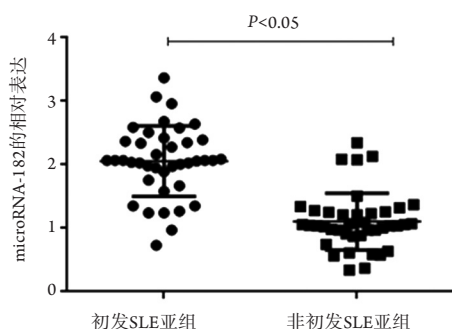


图2 初发SLE患者与非初发SLE患者外周血microRNA-182的相对表达水平比较

Figure 2 Relative expression levels of microRNA-182 in peripheral blood of incident SLE patients compared with those who are not incident

2.3 microRNA-182 与 SLEDAI 及抗 ds-DNA 抗体相关性

分析SLE患者外周血中microRNA-182水平与SLE患者临床资料之间的关系发现: microRNA-182与年龄及性别无明显相关性($r=0.088$, $P=0.282$; $r=-0.044$, $P=0.594$), microRNA-182水平与SLEDAI评分及抗ds-DNA抗体水平呈正相关关系($r=0.466$, $P=0.000$; $r=0.442$, $P < 0.01$; 图3)。

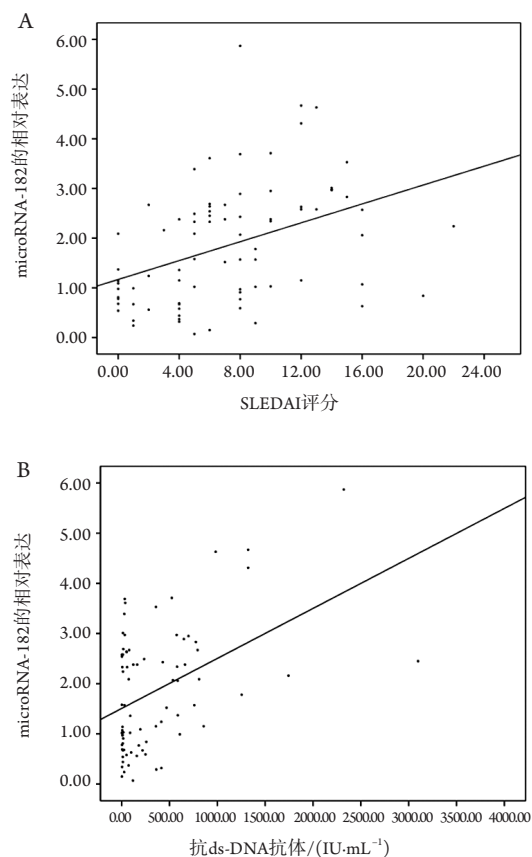


图3 microRNA-182水平与SLEDAI和ds-DNA抗体的相关性
Figure 3 Correlation between microRNA-182 levels and SLEDAI or ds-DNA antibodies

2.4 microRNA-182 诊断效能

通过受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析发现: microRNA-182对SLE的诊断价值优于抗ds-DNA抗体(图4)。

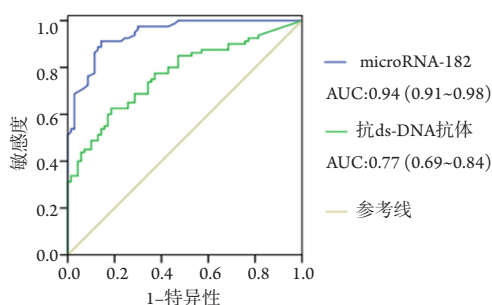


图4 MicroRNA-182及抗ds-DNA抗体诊断SLE的ROC曲线

Figure 4 ROC curve of diagnosis value of the miRNA-182 levels and ds-DNA antibodies in SLE

3 讨论

目前, 在SLE的诊断方面, 由于患者的临床表现多样, 且SLE的诊断标准有多项为主观判断, 而现有的实验室诊断标志物如抗ds-DNA抗体对诊断SLE的敏感性和特异性均为80%~90%, 不同的检测方法得出的诊断效率略有不同, 此外, 其对疾病活动度的评估也并非完美无瑕^[12-13]。虽然近年来, 也有许多新型标志物被发现, 但或多或少存在一点的缺陷, 所以新型诊断标志物仍需探索。

既往研究^[14]表明: 在自身免疫性疾病的发病机制中, microRNA发挥着十分重要的作用。我们前期通过芯片筛选的方式发现SLE患者血浆microRNA-182较健康对照组显著增高, 于是我们进行进一步临床试验后发现: 1)SLE患者外周血中microRNA-182相对表达水平较健康对照组显著升高; 2)初发的SLE患者血浆microRNA-182相对表达水平较规范治疗后非初发的SLE患者显著高; 3)microRNA-182水平与抗ds-DNA抗体及SLEDAI呈显著正相关关系, 这表明microRNA-182作为诊断以及评估SLE疾病活动度的标志物具备临床意义; 4)通过ROC曲线发现microRNA-182对SLE的诊断价值高于抗ds-DNA抗体, 其作为SLE的诊断标志物有临床意义。

有学者^[15]指出SLE的治疗不能仅仅以诱导疾病缓解为目的, 减少器官损伤、提高患者生活质量的远期治疗更应重视。目前, 仅仅依靠实验室指标如补体C3等并不能完全反应疾病缓解情况, 现有的评价SLE患者病情活动度的体系如SLEDAI、系统性狼疮活动测量标准(Systemic Lupus Activity Measure, SLAM)等, 虽然融合了多个实验室参数以及临床特征参数, 提高了预测疾病活动性的准确性, 但同样存在对标准解释不同的缺陷, 在

一定程度上也限制了其临床应用^[16]。结合本研究发现: 初发的SLE患者外周血microRNA-182水平显著高于经规范治疗后的非初发患者, 表明microRNA-182在评估SLE患者临床治疗效果方面也具备重大意义, 有助于完善SLE病情评估体系, 联合现有的指标, 能为临床医师提供更完善、更全面以及科学的评估体系。

综上所述, microRNA-182 在外周血中的表达水平对于 SLE的诊断具有重要临床意义。

参考文献

- Shaharir SS, Hussein H, Rajalingham S, et al. Damage in the multiethnic malaysian systemic lupus erythematosus (SLE) cohort: comparison with other cohorts worldwide[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166270.
- Anandarajah AP, Luc M, Ritchlin CT. Hospitalization of patients with systemic lupus erythematosus is a major cause of direct and indirect healthcare costs[J]. Lupus, 2016, Epub ahead of print.
- 于敏, 刘丁, 杜天慧, 等. 系统性红斑狼疮患儿外周血单个核细胞IL-10、Foxp3和Fas mRNA的表达变化[J]. 山东医药, 2013, 53(39): 81-82.
YU Min, LIU Ding, DU Tianhui, et al. Peripheral blood mononuclear cells in children with systemic lupus erythematosus (SLE) IL-10, Foxp3 and Fas mRNA expression change[J]. Shandong Medical Journal, 2013, 53(39): 81-82.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Database issue): D152-D157.
- Norcini M, Sideris A, Martin Hernandez LA, et al. An approach to identify microRNAs involved in neuropathic pain following a peripheral nerve injury[J]. Front Neurosci, 2014, 8: 266.
- 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.
- Navarro-Quiroz E, Pacheco-Lugo L, Lorenzi H, et al. High-throughput sequencing reveals circulating miRNAs as potential biomarkers of kidney damage in patients with systemic lupus erythematosus[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166202.
- Ren J, Jin P, Wang E, et al. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells[J]. J Transl Med, 2009, 7: 20.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9): 1725.

10. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(6): 659-666.
11. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(3): 559-567.
12. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, et al. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test[J]. *Lupus*, 2010, 19(8): 906-912.
13. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, et al. Fifty years of anti-dsDNA antibodies: are we approaching journey's end?[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, 46(7): 1052-1056.
14. 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.
15. 杨程德. 系统性红斑狼疮的治疗应以减少器官损伤、提高生活质量及改善远期预后为目标[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(7): 961-962.
YANG Chengde. The treatment of systemic lupus erythematosus (sle) should be to reduce the organ damage, improve the quality of life and improve the long-term prognosis for target[J]. *National Medical Journal of China*, 2014, 94(7): 961-994.
16. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(6): 1709-1720.

本文引用: 余伟, 徐蔷薇, 季蓉, 黄红宇, 任天丽. 微小RNA-182在系统性红斑狼疮中的诊断价值[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(3): 547-551. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.017

Cite this article as: YU Wei, XU Qiangwei, JI Rong, HUANG Hongyu, REN Tianli. Value of microRNA-182 in diagnosis and prediction for systemic lupus erythematosus[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(3): 547-551. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.017