

37-43.

[12] 冯淑娟,王勇. 甘肃地区 164 例宫颈癌人乳头瘤病毒基因分型检测的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(9): 79.

[13] 胡滨,崔金全,邓克红,等. 宫颈癌组织高危型 HPV 感染与 HWAPL 蛋白表达的关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2014, 49(6): 862-865.

[14] 谭振华,廖子慧,陈雄毅,等. 肇庆地区育龄妇女人乳头瘤病毒(HPV)基因分型检测在宫颈癌筛查中的应用与分析[J]. 医学检验与临床, 2016, 27(9): 246-278.

[15] 李小欢,张春蕾,华正宇,等. 大连地区女性人乳头瘤病毒基因分型联合液基细胞学检测的临床应用[J]. 中国实验诊断学, 2014, 26(11): 1790-1792.

(收稿日期:2017-04-02 修回日期:2017-06-12)

血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平在类风湿关节炎诊疗中的临床应用研究

邹映东¹, 林云¹, 张兴宗¹, 周唯践¹, 杨雪松¹, 王玉明^{2△}

(1. 云南省中医医院, 昆明 650021; 2. 昆明医科大学第二附属医院, 昆明 650021)

摘要:目的 探讨血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平在类风湿关节炎(RA)诊疗中的应用价值。方法 选用 RA 确诊病例 46 例(RA 组, 又分为高度活动组 24 例、低度活动组 22 例), 健康对照 20 例作为对照组, 采用 qPCR SYBR GREEN I 嵌合荧光染料法, 以 U6 为内参, 检测 RA 组和对照组血清 miR-146a-3p、miR-125a-3p 表达水平, 分析其与 RA 诊断和疾病活动度的相关性。结果 RA 组 miR-146a-3p 表达水平[0.015(0.005, 0.055)]与对照组[0.001(0.001, 0.002)]比较, 差异具有统计学意义($P=0.001$); RA 组血清 miR-155-5 表达[0.039(0.020, 0.079)]与对照组水平[0.008(0.005, 0.016)]比较, 差异具有统计学意义($P=0.001$)。RA 高度活动组血清 miR-146a-3p 表达[0.055(0.028, 0.138)]与低度活动组水平[0.006(0.003, 0.007)]比较, 差异具有统计学意义($P=0.001$); miR-155-5p 表达[0.070(0.055, 0.145)]与低度活动组水平[0.024(0.014, 0.033)]比较, 差异具有统计学意义($P=0.001$)。结论 RA 患者血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平明显高于对照组, RA 高度活动组血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平高于低度活动组患者, 可认为检测两种 miRNA 血清表达水平可作为 RA 诊断和疾病活动度观察指标。

关键词:血清 miRNA; 类风湿关节炎; 表达水平; 临床应用

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)18-2607-03

类风湿关节炎(RA)是以侵蚀性关节炎为主要表现, 关节滑膜慢性炎症以及关节进行性破坏、畸形为特征的自身免疫性疾病。该病起病隐匿、病因不明, 早期临床症状不典型, 晚期则可造成关节的不可逆改变。我国是 RA 高发国家, 该病严重威胁人民群众健康的同时, 给国家和患病家庭带来了沉重的经济负担^[1-2]。因此, 对于 RA 患者的早期诊断和积极的干预具有重要的意义^[3]。近年来, 与 RA 相关的 miRNAs 研究进展表明, miRNAs 在 RA 患者关节滑液、组织滑膜细胞和外周血异常表达, 与 RA 的发生、发展、预后关系密切^[4]。结合 RA 诊疗现状和 miRNAs 研究进展, 本研究采用 qPCR 方法检测 RA 患者血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平, 探讨其在 RA 的诊断和疾病活动性观察中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 6 月至 2016 年 2 月在云南省中医医院风湿科确诊的 RA 病例 46 例(平均年龄为 53 岁, 均排除合并有肿瘤、糖尿病及其他自身免疫性疾病)作为研究对象(RA 组), 医院健康体检者 20 例(平均年龄为 48 岁)作为对照(对照组, 入选标准为无 RA 相关的临床表现, 同时排除肿瘤、糖尿病、自身免疫性疾病及炎症性疾病)。依据类风湿关节炎疾病活动(DAS28)评分, 将 RA 病例进一步细分为高度活动组 24 例(DAS28 \geq 5.1 分)和低度活动组 22 例(DAS28 $<$ 5.1 分)。RA 组和对照组在性别、年龄构成上比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。该研究已获得医院伦理委员会同意。

1.2 仪器与试剂 仪器: TL988 四通道实时荧光定量分析

仪、LT-80 加热型干式金属浴恒温器、TG16-W 微量台式高速离心机、低速冷冻离心机、微量管离心机、XK 96-A 快速混匀器、移液器; 试剂: miRcute miRNA 提取分离试剂、miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂、miRcute miRNA 荧光定量检测试剂、上游引物: hsa-miR-146a-3p、hsa-miR-155-5p U6 RNA、无核酸酶水、氯仿、无水乙醇。

1.3 方法 实验方法采用 qPCR SYBR GREEN I 嵌合荧光染料法。样本采集: 用无抗凝剂真空管采集 RA 组和对照组空腹静脉血液 4 mL, 室温凝固, 4 000 r/min 低温离心 10 min, 用无 RNase 耗材留取血清; miRNA 提取: 用 miRcute miRNA 提取分离试剂、氯仿、无水乙醇进行血清 miRNA 提取、分离和富集; cDNA 合成: 将提取纯化的 miRNA 加入到 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂配制的实验体系中, 在 LT-80 加热型干式金属浴恒温器上进行 miRNA 3'末端加多聚 A 尾 poly(A), Oligo(dT)-universal tag 进行逆转录反应, 合成与 miRNA 对应的 cDNA; qPCR: 将合成的 cDNA 和上游引物加入到用 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂配制的反应体系中, 离心混匀, 在 TL988 四通道实时荧光定量分析仪上完成上机操作。qPCR 反应程序: 第一阶段, 94 °C 2 min, 1 个循环; 第二阶段, 94 °C 20 s、60 °C 34 s(退火、延伸、读取荧光值), 共 45 个循环; 第三阶段, 95 °C 15 s、60 °C 60 s、95 °C 15 s、40 °C 5 s 生成溶解曲线。实验结果以溶解曲线出现单峰作为实验特异性和有效性评价标准, 用 miRNA CT 值减去 U6 CT 值, 得到 Δ CT 值, 以 $2^{-\Delta$ CT 作为血清 miRNA 的表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行统计学分析,以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,使用非参数秩和检验进行实验数据统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 RA 组与对照组血清 miRNAs 表达水平 研究结果显示,RA 组血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平显著高于对照组,差异具有统计学意义 ($P = 0.001$)。见表 1。

表 1 RA 组与对照组血清 miRNA 表达水平 [$M(P_{25}, P_{75})$]

分组	n	miR-146a-3p	miR-155-5p
RA 组	46	0.015(0.005, 0.055) *	0.039(0.020, 0.079) *
对照组	20	0.001(0.001, 0.002)	0.008(0.005, 0.016)

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 RA 高度活动组与低度活动组血清 miRNAs 表达水平 研究结果显示,高度活动组血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平明显高于低度活动组,差异具有统计学意义 ($P = 0.001$)。见表 2。

表 2 RA 高度活动组与低度活动组血清 miRNA 表达水平 [$M(P_{25}, P_{75})$]

分组	n	miR-146a-3p	miR-155-5p
高度活动组	24	0.055(0.028, 0.138) *	0.070(0.055, 0.145) *
低度活动组	22	0.006(0.003, 0.007)	0.024(0.014, 0.033)

注:与低度活动组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

RA 相关诊疗指南的应用为临床进行 RA 的诊治提供了规范和标准^[5-6],但对于非典型 RA 和早期 RA 的诊断存在鉴别诊断困难、漏诊和误诊的问题^[7-8],同时在治疗方面,临床医师对“达标治疗”的认识和判断标准不一,存有一定争议^[9]。研究 miRNAs 在 RA 患者中的表达水平以及在 RA 发病机制中的作用,有望为 RA 的诊治提供新的靶靶,进而弥补现行 RA 诊疗中的不足。

有研究显示,miRNAs 在固有免疫和获得性免疫系统中对炎症细胞的生长、分化及信号通路中 T 细胞的分化发挥着重要的调节作用,并在 RA 疾病进程的不同阶段组织、细胞呈现出高水平表达^[10]。在 RA 患者滑膜组织,滑膜细胞在 TNF- α 、IL-18 等炎症因子的刺激下通过核因子 κ B(NF- κ B)途径诱导部分 miRNA 表达上调,进而靶向抑制基质金属蛋白酶(MMP-3、MMP-1)的产生或直接下调靶基因的肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)和 IL-1 受体相关激酶 1(IRAK1),最终实现抑制或终止炎症反应,从而发挥其负反馈调控作用,延缓关节破坏进程^[11-13]。在 RA 患者外周血,miR-146a、miR-155 可在疾病的早期于 PBMC 和血浆异常表达,参与疾病进程^[14-16]。在 RA 活动度观察的方面,Nakasa 等^[17]用实时荧光定量 PCR 技术和原位杂交方法证实 miR-146a 在高活动度 RA 患者滑膜组织中异常表达,而在低活动度 RA 患者滑膜组织中弱表达;Pauley 等^[18]依据 C 反应蛋白和红细胞沉降率水平进行 RA 活动期和非活动期分组的研究中显示,RA 活动期患者 miR-146a 表达水平显著高于非活动期患者。

本研究通过 qPCR SYBR GREEN I 嵌合荧光染料法检测 46 例 RA 患者血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平,发现其在 RA 患者血清表达水平显著高于对照组,研究结果与其他学者在外周血和有核细胞进行的研究相似^[19-20],提示血清

miR-146a-3p、miR-155-5p 表达可能与 RA 发病机制相关。进一步进行的 RA 分组研究显示,RA 高度活动组血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平高于低度活动组,表明两种血清 miRNAs 表达水平上调与 RA 的病情活动度相关。本研究选用血清作为研究载体,相比较其他样本类型,血清样本具有易于收集、受试者接受度高的优点,可便于临床进行持续性观察,同时循环血中 miRNAs 表达水平的变化能更贴切反映疾病的变化和进程。但是,从实验角度分析,也存有一定的不足之处,循环血量中 miRNAs 表达水平较低,增加了实验提取的难度,同时繁琐的实验步骤,可能为实验结果带来一些不确定因素。因此,在后续的临床应用研究还应进一步考虑优化实验方案,对实验流程进行标准化。

综上所述,本研究发现 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平在 RA 血清表达水平的上调可能与 RA 发病机制相关,初步认为检测两种 miRNA 血清表达水平可用于 RA 的诊断及疾病活动度观察。但因研究的样本数量有限,后续实验有必要加大样本量进行验证,进而阐明其在 RA 机制中的作用。

参考文献

- [1] Langley PC, Mu R, Wu M, et al. The impact of rheumatoid arthritis on the burden of disease in urban China[J]. J Med Econ, 2011, 14(6):709-719.
- [2] 曾小峰,朱松林,谭爱春,等. 我国类风湿关节炎疾病负担和生存质量研究的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2013, 13(3):300-307.
- [3] van Eijk IC, Nielen MM, van der Horst-Bruinsma I, et al. Aggressive therapy in patients with early arthritis results in similar outcome compared with conventional care: the STREAM randomized trial[J]. Rheumatology (Oxford), 2012, 51(4):686-694.
- [4] Alevizos I, Illei GG. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(7):391-398.
- [5] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4):265-270.
- [6] 中华中医药医学会. 类风湿性关节炎诊疗指南[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(11):150-151.
- [7] Van Der Inden MP, Knevel R, Huizinga TW, et al. Classification of rheumatoid arthritis: comparison of the 1987 American College of Rheumatology criteria and the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(1):37-42.
- [8] Cohen S, Emery P. The American college of rheumatology/European league against rheumatism criteria for the classification of rheumatoid arthritis: a game changer[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9):2592-2594.
- [9] 秦晨曼,刘升云,张磊,等. C 反应蛋白和红细胞沉降率计算类风湿关节炎患者 28 个关节疾病活动指数的差异[J]. 中华风湿病学杂志, 2014, 18(4):255-258.
- [10] Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases[J]. J Autoimmun, 2009, 32(3/4):189-194.
- [11] Abou-Zeib A, Saad M, Soliman E. MicroRNA 146a ex-

pression in rheumatoid arthritis: association with tumor necrosis factor-alpha and disease activity[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2011, 15(11): 807-812.

[12] Xu WD, Lu MM, Pan HF, et al. Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases [J]. Inflammation, 2012, 35(4): 1525-1529.

[13] 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(1): 209-219.

[14] Stanczyk J, Pedrioli DM, 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.

[15] Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(5): 1281-1288.

[16] 尹志华, 叶志中, 孙华麟, 等. 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞和血浆中 miR-155 和 miR-146a 的表达 [J]. 中

华风湿病学杂志, 2012, 16(9): 620-624.

[17] 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.

[18] Pauley KM, Satoh M, Chan AL, et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R101.

[19] Mookherjee N, El-Gabalawy HS. High degree of correlation between whole blood and PBMC expression levels of miR-155 and miR-146a in healthy controls and rheumatoid arthritis patients [J]. J Immunol Methods, 2013, 400/401(1): 106-110.

[20] 冯知涛, 李娟, 任洁, 等. 类风湿关节炎患者外周血 miR-146a 及 miR-16 的表达及与病情活动的相关性研究 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(2): 320-323.

(收稿日期: 2017-03-26 修回日期: 2017-06-15)

• 临床研究 •

血清 GGT、TBil 与急性脑梗死病变程度的相关性

潘在兴, 叶芳丽, 麦世妹

(海口市人民医院检验科, 海口 570208)

摘要:目的 分析血清 γ -谷氨酰转移酶(GGT)、胆红素(TBil)与急性脑梗死病变程度相关性。方法 选取该院收治急性脑梗死患者 126 例为观察组, 分为初发组(66)和复发组(60 例), 根据神经功能缺损程度分为轻度组(46 例)、中度组(42 例)和重度组(38 例), 另外选取同期来该院健康体检人员 80 例作为对照组, 检测患者血清 GGT、TBil 水平。结果 观察组 GGT 水平显著高于对照组, TBil 水平显著低于对照组, 初发组患者 GGT 水平显著低于复发组, 初发组 TBil 水平显著高于复发组, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$); 观察组 GGT 水平显著高于对照组, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$), 病情越严重, GGT 水平越高, 观察组 TBil 水平显著低于对照组, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$), 病情越严重, TBil 水平越低; 脑梗死患者 GGT 水平与 TBil 水平呈负相关($r = -0.694, P < 0.05$)。结论 急性脑梗死病变程度与 GGT、TBil 水平密切相关。

关键词: γ -谷氨酰转移酶; 胆红素; 急性脑梗死; 相关性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)18-2609-03

急性脑梗死是老年人常见疾病和多发疾病, 发病机制与多种因素有关^[1]。目前研究已经证实炎症、氧化应激在脑梗死发病中起到重要作用^[2], 胆红素(TBil)是体内产生的天然抗氧化剂, 动脉粥样硬化是导致脑梗死重要危险因素之一^[3], γ -谷氨酰转移酶(GGT)是肝胆疾病重要监测指标, 既往研究发现在冠状动脉中有重要作用^[4]。因此, 推测 GGT、TBil 与急性脑梗死病变程度相关, 为分析血清 GGT、TBil 与急性脑梗死病变程度相关性, 以本院收治急性脑梗死患者为研究对象, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2015 年 3 月至 2016 年 3 月收治的急性脑梗死患者 126 例为观察组, 患者发病时间均在 24 h 内, 符合 1995 年脑血管学会会议制定诊断标准, 经 CT 或头磁共振确诊为急性脑梗死, 其中 66 例纳入初发组, 60 例纳入复发组。初发患者首次出现神经系统缺损体征, 复发患者脑梗死再次出现新的神经功能缺损, 距离上次时间超过 1 个月, 排除肝胆系统疾病、心力衰竭、心肌病、严重肾脏疾病、风湿性疾病、自身免疫系统疾病等患者。根据神经功能缺损程度分为轻度组

(46 例)、中度组(42 例)和重度组(38 例)。其中男 72 例, 女 54 例, 年龄在 48~85 岁, 平均(65.0±5.3)岁, 另选取同期来本院健康体检人员 80 例作为对照组, 各组间临床资料差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 判定标准 追溯患者的病史并咨询是否有吸烟史及饮酒史; 以收缩压 ≥ 140 mm Hg, 舒张压 ≥ 90 mm Hg, 并结合患者病史及其他的实验室检查确诊为高血压; 根据空腹血糖正常值在 6.1 mmol/L 以下, 餐后 2 h 血糖的正常值在 7.8 mmol/L 以下, 如果高于这一范围, 则为高血糖; 参考《实用内科学》关于高脂血症的判定标准诊断高血脂。

1.3 方法 患者入院后在第 2 天抽取 3 mL 空腹静脉血, 检测血清 GGT、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)、血清总胆固醇(TC)等水平, GGT 采用酶速率法测定, TBil 采用氧化法测定, 采用仪器为全自动生化分析仪(Roche MODULAR DPP)。

1.4 仪器与试剂 采用中山标佳生物科技有限公司提供血清 TC 检测试剂盒(氧化酶法)和 GGT 检测试剂盒(速率法)分别检测血清 TC、GGT; 采用浙江伊利康生物技术有限公司的 TG