

## miR-203 在系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中的表达及临床意义

王艳艳<sup>1</sup>, 王 婧<sup>1</sup>, 欧阳春<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院风湿免疫科,<sup>2</sup>肾内科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)患者外周血单个核细胞中 miR-203 的表达水平与疾病活动度、肾脏受累情况等临床表现之间的关系,初步探讨 miR-203 在 SLE 中的临床意义。方法:收集 31 例 SLE 患者、16 例健康志愿者外周血标本,根据肾脏受累分为狼疮肾炎 21 例和 SLE 无肾脏受累 10 例。采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quota polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)中 miR-203 表达,比较各组间 miR-203 表达水平的差异,并分析其与 SLE 临床指标之间的关系。结果:SLE 患者 miR-203 表达明显低于正常对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );狼疮肾炎组患者 miR-203 表达低于 SLE 无肾脏受累组和正常对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );SLE 患者 miR-203 表达水平与 24 h 尿蛋白、肾脏急性指数呈明显负相关( $P < 0.01$ )。结论:SLE 患者 PBMCs 中 miR-203 的表达水平降低,表明 miR-203 在 SLE 发病机制中可能发挥一定作用;狼疮肾炎患者 miR-203 的表达降低,提示 miR-203 可能参与了狼疮肾炎的发病。

**[关键词]** 系统性红斑狼疮;miR-203;外周血单个核细胞

**[中图分类号]** R593.24

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)11-1594-03

**doi:**10.7655/NYDXBNS20151119

## Expression of miR-203 in peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus

Wang Yanyan<sup>1</sup>, Wang Qiang<sup>1</sup>, Ouyang Chun<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Rheumatology,<sup>2</sup>Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the expression level of miR-203 in the peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) of patients with systemic lupus erythematosus(SLE), and to analyze the relationship between the expression level and clinical manifestations. **Methods:** The PBMCs of 31 SLE patients, 16 healthy people were collected, and then SLE patients were divided into two groups, including the lupus nephritis group (21 cases) and the no kidney involvement group (10 cases). The expression level of miR-203 in PBMCs was detected by real-time fluorescence quota polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expression levels of miR-203 in each group were compared to analyze the relationship between the expression level and clinical manifestations. **Results:** The expression level of miR-203 was significantly lower in the SLE group compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The expression level of miR-203 was significantly lower in the lupus nephritis group than that in the no kidney involvement group and the control group (both  $P < 0.01$ ). The expression level of miR-203 was negative correlated to 24 hours urine protein, acute kidney disease index ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The expression of miR-203 was decreased in SLE patients, indicating that miR-203 may play a role in the pathogenesis of SLE. And miR-203 may be associated with the occurrence of lupus nephritis.

**[Key words]** systemic lupus erythematosus; miR-203; peripheral blood mononuclear cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1594-1596, 1623]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81302575);江苏省自然科学基金(BK20131028)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:c\_ouyang@163.com

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种多系统受累的自身免疫性疾病,关于其发病机制的研究,目前已深入到非编码微小RNAs(microRNAs, miRNAs)。miRNAs是一类新发现的长20~25 nt的单链非编码RNA,通过转录后调控机制广

泛参与了各种生命活动过程。研究表明,miRNAs 可能参与了狼疮的关键致病通路,对判断狼疮预后及寻找新的治疗靶点起重要作用。miR-203 是一个首先在皮肤细胞中鉴定出来的小分子,被认为与皮肤炎症相关,是一个皮肤的特异 miRNA<sup>[1]</sup>。目前已报道 miR-203 在银屑病皮损、各种恶性肿瘤细胞增殖和分化过程中起着关键的调控作用<sup>[2-3]</sup>。miR-203 在自身免疫性疾病中的研究甚少,尤其是与 SLE 皮肤损伤及相关免疫指标的关系尚无报道。本研究拟通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 SLE 患者外周血单个核细胞中 miR-203 相对表达情况,并探讨其临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

外周血单个核细胞取自 2013 年 12 月—2014 年 12 月在本院风湿免疫科及肾科住院的 31 例初诊 SLE 患者。所有患者的诊断均符合美国风湿病学会 2009 年修订的 SLE 诊断标准。男 5 例,女 26 例,中位年龄 34(21~49)岁。本研究征得所有受试者本人同意,并取得医学伦理委员会批准。入组的 SLE 患者 SLE 疾病活动指数评分(SLEDAI)均 $\geq 10$ 。所有患者入组前均未使用糖皮质激素治疗。根据尿化验检查异常分为狼疮性肾炎组(21 例)和非狼疮性肾炎组(10 例)。狼疮性肾炎定义:24 h 尿蛋白定量 $> 500$  mg,伴或不伴血尿。狼疮性肾炎组患者均行肾脏穿刺活检术,经光镜、免疫荧光检查,并按 2003 年 ISN/RPS 分型方案进行病理分型。按照病理结果记录肾脏活动性指数和慢性指数。同时收集 16 例年龄及性别匹配的健康人外周血。

淋巴细胞分离液(Ficoll,南京建成生物有限公司),TRIzol(Invitrogen 公司,美国);Taq DNA 聚合酶及其缓冲液、dNTP Mix(TaKaRa 公司,日本);miR-203 引物(上海英俊生物技术有限公司)。TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit、U6 snRNA、TaqMan MicroRNA Assays 及 TaqMan 2 $\times$ Universal PCR Master Mix (ABI 公司,美国),ABI PRISM7900 Real-Time PCR 扩增仪(ABI 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的提取

抽取外周血 4 mL 于肝素钠抗凝管中,3 000 r/min 离心 5 min,去除上层血浆,加入等体积 PBS 稀释血液,在离心管中加入 Ficoll(按外周血:PBS:Ficoll=1:1:1 的比例)沿倾斜的管壁缓缓加入稀释的外周血,800 g

离心 30 min, PBMCs 所在细胞层为白色,用吸管将该层细胞吸取在另一干净的 1.5 mL EP 管中,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加 1 mL TRIzol,细胞计数后,-40 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.2.2 总 RNA 提取和定量

将加入 TRIzol 冻存于-40 $^{\circ}$ C 冰箱的单个核细胞取出,按照常规 RNA 提取方法提取 RNA,后用 NanoDrop1000 微量核酸蛋白检测仪测定 260 nm 和 280 nm 吸光度值,确定含量和纯度,-80 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.2.3 逆转录反应

应用 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription 试剂盒逆转录已定量的 RNA,选用 U6 作为内参,反应体系为 15  $\mu$ L,反应参数为:16 $^{\circ}$ C 30 min;42 $^{\circ}$ C 30 min,85 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.2.4 实时荧光定量 PCR

应用 TaqMan MicroRNA Assay 和 TaqMan 2 $\times$ Universal PCR Master Mix 进行 qRT-PCR。20  $\mu$ L 反应体系:TaqMan MicroRNA Assay 1.00  $\mu$ L,cDNA 1.33  $\mu$ L,TaqMan 2 $\times$ Universal PCR Master Mix 10.00  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 7.67  $\mu$ L,混合后离心放入定量 PCR 仪。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min,40 个循环(95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min)。每组设 3 个复孔。所有扩增均在 ABI 7900 实时 PCR 仪上进行,反应结束后作熔解曲线。miR-203 相对表达量以公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行参数检验统计处理,结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组独立样本的比较采用 *t* 检验,多重独立样本比较采用方差分析法(one-way ANOVA),采用 Spearman's 相关分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SLE 患者临床特征

31 例初诊 SLE 患者中,无肾脏受累者 10 例,肾脏受累者 21 例。在非狼疮肾炎组中,SLEDAI 平均评分为 14 分,狼疮肾炎组中,SLEDAI 平均评分为 18 分(表 1)。

### 2.2 miR-203 在 SLE 患者及正常人 PBMCs 中的表达

qRT-PCR 检测结果显示,SLE 患者外周血 PBMCs 中 miR-203 相对表达水平明显低于正常对照组( $0.56 \pm 0.11$  vs  $1.07 \pm 0.23$ , $P=0.02$ )。miR-203 在狼疮肾炎组中表达( $0.39 \pm 0.12$ )明显低于非狼疮肾炎组( $0.65 \pm 0.18$ , $P < 0.01$ )和正常对照组( $1.07 \pm 0.23$ , $P < 0.01$ ,图 1)。

表 1 SLE 患者临床特征

Table 1 The characteristics of SLE patients

临床特征	非狼疮肾炎组 (n=10)	狼疮肾炎组 (n=21)
年龄(岁)	21~46	22~49
男/女	2/8	3/18
病程(月)	0~37	0~49
疾病表现(例)		
肾脏疾病	0	21
血管炎	4	8
关节炎	6	8
皮疹	2	5
脱发	2	2
黏膜溃疡	5	4
浆膜炎	2	0
白细胞减少	8	12
血小板减少	2	1
发热	0	1
SLEDAI(分)	14	18
dsDNA 阳性(例)	3	15
C3 或 C4 下降(例)	8	19

表 2 miR-203 表达与 SLE 临床指标的相关性分析

Table 2 The relationship between the miR-203 expression level and clinical manifestations

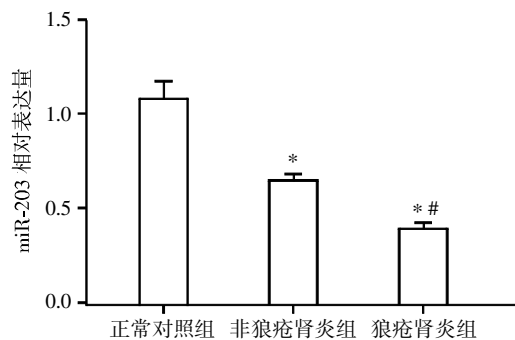
临床指标	r 值	P 值
血沉	0.257	0.149
C 反应蛋白	0.114	0.962
补体 C3	0.151	0.476
补体 C4	0.225	0.089
SLEDAI 评分	0.302	0.187
24 h 尿蛋白	-0.739	0.001
肾脏活动性指数	-0.625	<0.001
慢性指数	0.045	0.736

析 miR-203 的表达与 SLE 患者临床指标间的相关性,结果发现和非狼疮肾炎组相比,miR-203 在狼疮性肾炎患者中表达更低,而且与 24 h 尿蛋白及急性肾脏损伤指数呈负相关。提示 miR-203 可能参与了 SLE 尤其是狼疮肾炎的发生发展过程。

许多 miRNA 被认为与固有免疫应答调控密切相关,miR-203 即是其中之一。miR-203 可以靶向抑制 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)的表达,从而负向调节白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的产生<sup>[5]</sup>。本研究发现 miR-203 在 SLE 患者中表达明显降低,其可能通过对 TLR4 调控下降,TLR4 激活,最终导致核转录因子的转录以及相应免疫基因的活化,释放前炎症因子参与 SLE 的发病。肾脏病变是 SLE 发病及死亡的主要原因。miR-203 的靶基因中 Bcl2/BAX 是细胞凋亡通路的经典蛋白,在狼疮肾炎患者中 Bcl2/BAX 亢进,因此 miR-203 可能通过下调其靶基因 Bcl2/BAX 的表达来抑制异常细胞凋亡,从而在狼疮性肾炎的发生中发挥作用<sup>[6]</sup>。本实验结果发现合并狼疮性肾炎的 SLE 患者 miR-203 表达水平显著低于非狼疮肾炎组和正常对照组,可能是通过上述靶基因参与狼疮肾炎的发病。狼疮性肾炎中的活动性指数 AI 和慢性指数 CI 对评价患者预后具有重要作用。本研究发现 miR-203 与肾脏急性指数 AI 明显负相关,说明其与肾病预后有关,检测其表达水平可能对预后是一种参考。

综上所述,miR-203 在 SLE 患者中显著低表达,且与肾脏受累相关,通过靶基因的预测,考虑其可能通过多个通路参与 SLE 发病过程。为进一步研究 miRNA 在 SLE 发病机制中的作用提供了线索。但由于目前临床研究样本量较少,且未进行疾病活动度分层分析,将来需进一步扩大样本量,验证其在 SLE

(下转第 1623 页)



与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与非狼疮肾炎组比较,\* $P < 0.01$ 。

图 1 各组 PBMCs 中 miR-203 表达的比较

Figure 1 The expression level of miR-203 in PBMCs in each group

### 2.3 miR-203 表达与 SLE 临床指标的相关性分析

SLE 患者 miR-203 表达水平与 24 h 尿蛋白呈明显负相关 ( $P < 0.01$ ),在肾活检的患者中观察 miR-203 表达水平与肾脏活动性指数也呈明显负相关 ( $P < 0.01$ ,表 2)。

### 3 讨论

已有文献证明某些特定的 miRNA 通过对免疫相关基因的调节与 SLE 发病密切相关。如 miR-146 通过抑制 I 型干扰素通路的异常活化参与 SLE 发病机制<sup>[4]</sup>。本研究中通过 qRT-PCR 检测了 miR-203 在初诊 SLE 患者外周血单核细胞中的表达,发现 miR-203 在 SLE 患者中表达量明显降低,进一步分