

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.011.007
文章编号: 1005-8982 (2018) 011-0033-11

临床研究 · 论著

MicroRNA 基因单核苷酸多态性与 类风湿关节炎的相关性研究

谢传美, 袁国华

(川北医学院附属医院 风湿科, 四川 南充 637000)

摘要: 目的 分析类风湿关节炎 (RA) 患者和健康人群 microRNA-146a (miR-146a)、miR-499a、miR-149 及 miR-196a 多态性位点的相关 rs2910164、rs3746444、rs2292832 及 rs11614913 等位基因和基因型频率分布的差异。探讨其与类风湿关节炎 (RA) 发病风险的相关性, 以及与疾病活动性及严重性的关系。**方法** 收集 600 例 RA 患者和 398 例健康人群的外周静脉血, 提取基因组 DNA, 采用基于连接酶检测反应的单核苷酸多态性 (SNP) 分型技术对研究对象的 4 个 SNP 位点进行检测。**结果** rs3746444 位点的 CT 基因型与中国汉族人群 RA 疾病的活动性和严重性相关, 并且 rs11614913 位点 (miR-196a) 与性别存在交互作用, 可能与 RA 发病有关。**结论** miR-499a 的 rs3746444 位点的 CT 基因型可能与中国汉族人群 RA 疾病的活动性和严重性相关。

关键词: 类风湿关节炎; 单核苷酸多态性; 微小 RNA

中图分类号: R593.22

文献标识码: A

Relationship between single nucleotide polymorphisms of microRNA gene and rheumatoid arthritis

Chuan-mei Xie, Guo-hua Yuan

(Department of Rheumatology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To identify the associations of single nucleotide polymorphism (SNP) loci rs2910164, rs3746444, rs2292832 and rs11614913 of miR-146a, miR-499a, miR-149 and miR-196a with rheumatoid arthritis (RA) in a Chinese Han population. **Methods** A case-control genetic association study was carried out in 600 patients with RA and 398 healthy individuals. The four SNPs were selected for genotyping by multiplex polymerase chain reaction and ligase detection reaction. **Results** The rs3746444 CT genotype was correlated with the activity and severity of RA in Chinese Han population. Moreover, gene-sex (rs11614913-sex) interaction was identified by GMDR analysis. However, we did not find any significant association of rs2910164, rs2292832 or rs11614913 with RA risk, severity, or activity. **Conclusions** The miR-499a polymorphism (rs3746444) is associated with the disease severity and activity of RA, which needs further replication and validation.

Keywords: rheumatoid arthritis; single nucleotide polymorphism; microRNAs

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性系统性自身免疫病, 目前从遗传角度探索 RA 的发病机制成为研究热点。microRNA (miRNA) 是一类

内源性的小分子 RNA, 广泛参与各种生理及病理过程^[1-2]。miRNA 可调节免疫应答, 参与多种自身免疫病的发病^[3-8]。miR-146、miR-155 及 miR-233 等与

收稿日期: 2017-03-17

[通信作者] 袁国华, Tel: 13990799112

RA 关系密切^[9]。miR-146 的单核苷酸多态位点 (single nucleotide polymorphism, SNP) rs2910164 与自身免疫病相关^[10-14]。miR-499a 的 rs3746444 位点与 RA 相关^[15-16]。中国人群 miR-196a 的 rs11614913 和 miR-149 的 rs2292832 位点与肿瘤及呼吸道疾病的易感性相关。本实验探讨以上位点与中国汉族人群 RA 患病风险的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 7 月-2017 年 1 月在川北医学院附属医院风湿科住院的 RA 患者 600 例作为 RA 组, 所有患者符合 2009 年美国风湿病学会和欧洲抗风湿联盟的 ACR-EULAR 分类标准^[17]。收集并统计 RA 患者临床参数: 年龄、性别、发病年龄、病程、红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、DAS28 评分 (disease activity score, DAS)、关节 X 射线分期、类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) 滴度及抗环状瓜氨酸抗体 (anti-cyclic citrullinated peptide antibody, anti-CCP) 滴度。随机选取本院体检中心健康体检者 398 例作为对照组, 对照组符合以下标准: ①本人及其直系亲属无自身免疫疾病病史, 且不符合 RA 诊断标准中的任意一项; ②无严重疾病史; ③近期 1 个月未使用激素和免疫抑制剂等药物。本文中的研究对象均为无血缘关系汉族人。本研究获得本院伦理委员会批准, 实验遵循赫尔辛基宣言, 所有受试者自愿参加并签署知情同意书。

1.2 全血细胞基因组 DNA 的提取与分型

所有研究对象抽取 2 ml 外周静脉血置于 EDTA 抗凝管中, 采用北京天根科技公司的 Relax Gene Blood DNA 系统提取所有样本的基因组 DNA。采用基于连接酶检测反应 (ligase detection reaction, LDR) 的 SNP 分型技术 (上海翼和应用生物技术有限公司) 对所有样本的 4 个 SNP 位点进行基因分型。简要流程如下: ①通过多重 PCR 技术获得含有待检测突变位点的基因片段; ②通过多重 LDR 技术进行基因分型检测; ③最后通过测序仪电泳读取检测结果。

为确保实验质量, 笔者在分型中使用双重阳性对照 (相同 DNA 样本的重复) 和阴性对照 (空白, 不含 DNA 样本)。SNP 和样本分型正确率 >95% 时方可进入下一步实验流程。

1.3 统计学方法

使用 SNPStats 软件分析基因分布是否符合哈迪-温伯格平衡定律 (hardy-weinberg equilibrium, HWE)。正态分布计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 非正态分布计量资料以中位数和四分位数间距 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示, 用 t 检验、方差分析或非参数检验, 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验或 Fishers 确切概率法。本研究采用广义多因子降维法 (generalized multifactor dimensionality reduction, GMDR) 分析各变量间的组合并判读较好的模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料、等位基因及基因型频率比较

RA 组患者中男性 134 例, 女性 466 例; 平均年龄 (41.4 ± 5.9) 岁; 病程 1.5 ~ 10.0 年, 平均 4.0 年。其中 RF 阳性、anti-CCP 阳性、关节 X 射线分期 > II 期及 DAS28 评分 >3.2 分者分别为 70.5%、85.6%、47.2% 和 82.4%。平均 ESR 水平为 23.8 mm/h ($16.1 \sim 33.1$ mm/h), 平均 CRP 水平为 7.8 mg/L ($3.5 \sim 25.0$ mg/L)。对照组患者中男性 78 例, 女性 320 例; 平均年龄 (38.5 ± 9.8) 岁。两组患者年龄、性别比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在本研究中, 所有 SNP 位点的分型成功率均 >98%, 4 个位点均显示出 2 个等位基因及 3 个基因型。对照组 HWE 检验显示, 符合 HWE 定律。两组 rs2910164、rs3746444、rs2292832 及 rs11614913 等位基因和基因型频率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1、2。

2.2 rs2910164、rs3746444、rs2292832 及 rs11614913 位点在不同遗传模型下与 RA 比较

在不同遗传模型下均未发现 rs2910164、rs3746444、rs2292832 及 rs11614913 与 RA 遗传易感性相关 ($P > 0.05$)。见表 3 ~ 5。

2.3 CRP、ESR 及 DAS28 评分与 RA 患者基因型频率分布的关系

笔者采用 CRP、ESR 水平及 DAS28 评分评价 RA 的疾病活动度。通过比较 4 个位点不同基因型的 CRP、ESR 水平及 DAS28 评分, 发现 rs3746444 位点与 RA 疾病活动性存在关联, TT、TC 及 CC 基因型的 CRP 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步分析基因型间的 CRP 水平发现, TT 基因型

与 TC 基因型比较, 差异有统计学意义 ($Z = -3.365$, $P = 0.001$); TT 基因型与 CC 基因型比较, 差异无统计学意义; TC 基因型与 CC 基因型比较, 差异有统计学意义 ($Z = -2.098$, $P = 0.036$)。TT、TC 及 CC 基因型的 ESR 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 进一步分析基因型间的 ESR 水平发现, TT 基因型与 TC 基因型比较, 差异有统计学意义 ($Z = -2.201$, $P = 0.028$); TT 基因型与 CC 基因型比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); TC 基因型与 CC 基因型比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。TT、TC 及 CC 基因型的 DAS28 评分比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 进一步分析基因型间的 DAS28 评分发现, TT 基因型与 TC 基因型相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); TT 基因型与 CC 基因型比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); TC 基因型与 CC 基因型比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

见表 6、图 1。

2.4 RA 的疾病严重程度和基因型频率分布的关系

笔者使用 RF、CCP 和 X 射线分别表示 RA 的疾病严重性。研究结果发现 rs3746444 位点与 RA 的疾病严重性存在关联, TT、TC 和 CC 基因型的 RF 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 进一步研究发现 TC 基因型与 TT + CC 基因型比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), RF 阳性组的患病风险增加。TT、TC 和 CC 基因型的 anti-CCP 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 进一步研究发现 TC 基因型与 TT + CC 基因型比较, 差异有统计学意义 [$OR = 1.831$ (95%CI: 1.016, 2.303) $P = 0.042$], anti-CCP 阳性组的患病风险增加。同样, TT、TC 和 CC 基因型的 X 射线分期 \leq II 期比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TC 基因型与

表 1 两组患者基因型分布情况比较 例 (%)

组别	rs2910164			rs3746444			rs2292832			rs11614913		
	CC	CG	GG	TT	CT	CC	TT	CT	CC	TT	CT	CC
对照组	152 (39.2)	187 (48.3)	48 (12.5)	301 (75.8)	88 (22.1)	8 (2.1)	172 (44.8)	171 (44.6)	41 (10.6)	84 (21.6)	200 (51.7)	103 (26.7)
RA 组	242 (40.8)	271 (45.7)	80 (13.5)	455 (76.4)	120 (20.2)	20 (3.4)	277 (46.6)	243 (40.8)	75 (12.6)	123 (20.5)	333 (55.6)	143 (23.9)
χ^2 值	0.693			1.996			1.642			1.528		
P 值	0.707			0.369			0.440			0.466		

表 2 各位点等位基因型的分布情况 例 (%)

SNP	对照组	RA 组	χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P_1 值	P_2 值
					下限	上限		
rs2910164								
C	491 (63.4)	755 (63.7)	0.010	0.990	0.821	1.195	0.920	0.140
G	283 (36.6)	431 (36.3)						
rs3746444								
T	690 (86.9)	1 030 (86.6)	0.050	1.031	0.791	1.343	0.823	0.460
C	104 (13.1)	160 (13.4)						
rs2292832								
T	515 (67.1)	797 (67.0)	0.001	1.004	0.828	1.217	0.970	0.490
C	253 (32.9)	393 (33.0)						
rs11614913								
T	368 (47.5)	579 (48.3)	0.116	0.969	0.809	1.161	0.733	1.000
C	406 (52.5)	619 (51.7)						

注: P_1 : χ^2 检验; P_2 : HWE 检验

TT + CC 基因型比较, 差异有统计学意义 [$\hat{OR}=1.572$ (95%CI: 1.084, 2.279) $P=0.017$], anti-CCP 阳性组的患病风险增加。见表 7~9。

2.5 基因 - 基因相互作用和 RA 风险的广义多因素降维模型分析

通过 GMDR 0.9 软件进行多因子降维分析 microRNA 基因 - 基因交互作用与 RA 风险的相关性。列出 3 个不同组合的最佳模型, 模型间训练精确度、测试精确度及 10 次拟合的交叉验证一致性 (cross-validation consistency, CV) 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 未发现 4 个位点之间的交互作用与 RA 患

病风险相关。见表 10。

2.6 基因 - 性别相互作用和 RA 风险的广义多因素降维模型分析

通过 GMDR 0.9 软件进行多因子降维分析 microRNA 基因 - 性别交互作用与 RA 风险的相关性。列出 4 个不同组合的最佳模型, 模型间的训练精确度、测试精确度及 10 次拟合的 CV 比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。rs11614913-SEX 构成的组合符号训练精确度、测试精确度及拟合的 CV 都较高, 并且仅包含 2 个因子, 符合简约的原则。因此为最佳交互作用模型。见表 11。

表 3 显性模型下 SNP 与 RA 的关系 例 (%)

SNP	对照组	RA 组	χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P 值
					下限	上限	
rs2910164							
CC	152 (39.2)	242 (40.8)	0.229	0.938	0.722	1.219	0.632
CG + GG	235 (60.8)	351 (59.2)					
rs3746444							
TT	301 (75.8)	455 (76.4)	0.056	0.965	0.716	1.299	0.813
CT + CC	96 (24.2)	140 (23.6)					
rs2292832							
TT	172 (44.8)	277 (46.6)	0.292	0.931	0.720	1.205	0.589
CT + CC	212 (55.2)	318 (53.4)					
rs11614913							
TT	84 (21.6)	123 (20.5)	0.194	1.073	0.785	1.467	0.659
CT + CC	303 (78.4)	476 (79.5)					

表 4 隐性模型下 SNP 与 RA 的关系 例 (%)

SNP	对照组	RA 组	χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P 值
					下限	上限	
rs2910164							
CC + CG	339 (87.5)	513 (86.5)	0.244	1.101	0.751	1.616	0.621
GG	48 (12.5)	80 (13.5)					
rs3746444							
TT + CT	389 (97.9)	575 (96.6)	1.573	1.691	0.738	3.878	0.210
CC	8 (2.1)	20 (3.4)					
rs2292832							
TT + CT	343 (89.4)	520 (87.4)	0.831	1.207	0.805	1.808	0.362
CC	41 (10.6)	75 (12.6)					
rs11614913							
TT + CT	284 (73.3)	456 (76.1)	0.944	0.865	0.645	1.160	0.331
CC	103 (26.7)	143 (23.9)					

表 5 超显性模型下 SNP 与 RA 的关系 例 (%)

SNP	对照组	RA 组	χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P 值
					下限	上限	
rs2910164							
CC + GG	200 (51.7)	322 (54.3)	0.646	0.900	0.696	1.163	0.422
CG	187 (48.3)	271 (45.7)					
rs3746444							
TT + CC	309 (77.9)	475 (79.8)	0.574	0.887	0.651	1.210	0.449
CT	88 (22.1)	120 (20.2)					
rs2292832							
TT + CC	213 (55.4)	352 (59.2)	1.303	0.860	0.664	1.114	0.254
CT	171 (44.6)	243 (40.8)					
rs11614913							
TT + CC	187 (48.3)	266 (44.4)	1.450	1.171	0.906	1.513	0.229
CT	200 (51.7)	333 (55.6)					

表 6 RA 患者基因型频率分布与 CRP、ESR 及 DAS28 评分的关系

SNP	RA 组 例 (%)	CRP/ (mg/L)	H 值	P 值	ESR/ (mm/h)	H 值	P 值	DAS28 评分 / 分	F 值	P 值
rs2910164										
CC	242 (40.8)	6.2 (3.2~19.9)	0.479	0.787	24.2 (15.4~32.4)	5.953	0.501	3.8 ± 1.5	8.416	0.836
CG	271 (45.7)	5.5 (3.5~20.2)			24.6 (13.4~32.1)			3.80 ± 1.6		
GG	80 (13.5)	5.8 (3.3~20.5)			25.2 (14.8~34.3)			3.81 ± 1.4		
rs3746444										
TT	455 (76.4)	6.2 (2.3~23.2)	12.293	0.002	24.2 (16.4~35.4)	5.251	0.072	3.6 ± 1.3	56.056	0.000
TC	120 (20.2)	16.9 (3.5~57.6)			30.4 (18.9~39.2)			4.2 ± 1.5		
CC	20 (3.4)	6.1 (3.0~19.3)			26.2 (21.2~32.2)			3.7 ± 1.3		
rs2292832										
TT	277 (46.6)	6.5 (2.8~25.0)	2.089	0.352	22.6 (15.5~33.4)	3.973	0.137	3.4 ± 0.8	6.235	0.334
TC	243 (40.8)	7.1 (3.5~23.2)			25 (15.4~38)			3.6 ± 1.0		
CC	75 (12.6)	8.2 (3.4~22.6)			23.1 (16.0~35.1)			3.7 ± 1.3		
rs11614913										
TT	123 (20.5)	6.4 (2.8~25.0)	1.573	0.442	21.5 (17.3~34.6)	1.175	0.556	3.2 ± 1.1	7.986	0.567
TC	333 (55.6)	7.2 (3.5~24.2)			23.8 (15.6~31.3)			3.3 ± 1.2		
CC	143 (23.9)	6.6 (3.0~26.1)			24.4 (16.0~35.2)			3.4 ± 0.9		

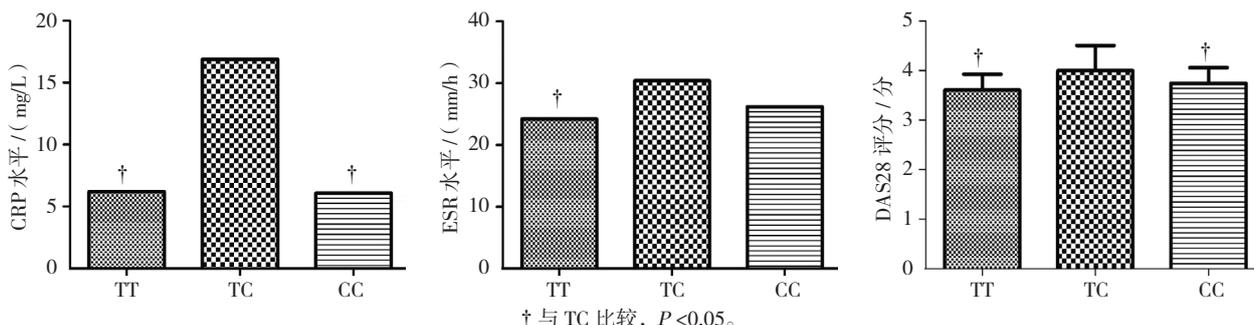


图 1 RA 患者 CRP、ESR 和 DAS28 评分与 rs3746444 基因型频率分布的关系

表 7 基因型频率分布与 RA 组患者 RF 的关系 例 (%)

SNP	RF		χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P 值
	(-)	(+)			下限	上限	
rs2910164							
CC	74 (42.5)	168 (40.1)					
CG	81 (46.0)	188 (45.1)	1.213				0.545
GG	20 (11.5)	62 (14.8)		1.127	0.868	1.463	
C	229	524	0.804				0.370
G	121	312					
rs3746444							
TT	136 (77.5)	293 (69.9)					
TC	32 (18.2)	120 (28.6)	11.339	1.806	1.166	2.798	0.003
CC	8 (4.3)	6 (1.5)					
TT + CC	144 (81.8)	299 (71.4)	7.127				0.008
T	304	706	0.864	1.184	0.829	1.692	0.353
C	48	132					
rs2292832							
TT	75 (42.7)	211 (50.3)					
TC	77 (43.8)	160 (38.2)	2.997				0.224
CC	24 (13.5)	48 (11.5)		0.965	0.739	1.258	
T	227	482	0.071				0.790
C	125	256					
rs11614913							
TT	42 (23.8)	84 (19.8)					
TC	89 (50.0)	241 (57.2)	2.393				0.302
CC	46 (26.2)	97 (23.0)		1.017	0.793	1.303	
T	173	409	0.017				0.897
C	181	435					

表 8 基因型频率分布与 RA 组患者 anti-CCP 抗体的关系 例 (%)

SNP	anti-CCP 抗体		χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P 值
	(-)	(+)			下限	上限	
rs2910164							
CC	33 (38.5)	216 (42.6)					
CG	38 (44.8)	238 (46.8)	2.475				0.290
GG	14 (16.7)	54 (10.6)		0.814	0.582	1.137	
C	104	670	1.461				0.227
G	66	346					

续表 8

SNP	anti-CCP 抗体		χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P 值
	(-)	(+)			下限	上限	
rs3746444							
TT	67 (77.8)	358 (70.4)					
TC	15 (17.7)	142 (27.8)	6.210	1.831	1.016	2.303	0.045
CC	4 (4.5)	9 (1.8)					
TT + CC	71 (82.3)	367 (72.2)	4.141				0.042
T	149	858	0.622	1.208	0.755	1.934	0.430
C	23	160					
rs2292832							
TT	39 (44.7)	251 (49.3)					
TC	37 (43.3)	200 (39.2)	0.498				0.780
CC	10 (12.0)	58 (11.5)		0.908	0.644	1.281	
T	115	702	0.301				0.583
C	57	316					
rs11614913							
TT	22 (25.6)	92 (18.0)					
TC	45 (52.5)	291 (56.7)	2.830				0.243
CC	19 (21.9)	130 (25.3)		1.244	0.900	1.719	
T	89	475	1.755				0.185
C	83	551					

表 9 基因型频率分布与 RA 组患者 X 线分期的关系 例 (%)

SNP	X 射线分期		χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P 值
	≤ II 期	> II 期			下限	上限	
rs2910164							
CC	119 (37.9)	115 (41.2)					
CG	140 (44.7)	130 (46.5)	2.667				0.264
GG	54 (17.4)	35 (12.3)		0.847	669	1.072	
C	378	360	1.915				0.166
G	248	200					
rs3746444							
TT	232 (74.0)	191 (68.0)					
TC	67 (21.3)	84 (29.9)	7.939	1.572	1.084	2.279	0.019
CC	15 (4.7)	6 (2.1)					
TT + CC	247 (78.7)	197 (70.1)	5.732				0.017
T	531	466	0.584	1.128	0.828	1.535	0.445
C	97	96					

续表 9

SNP	X 射线分期		χ^2 值	\hat{OR} 值	95%CI		P 值
	≤ II 期	> II 期			下限	上限	
rs2292832							
TT	133 (42.5)	132 (47.1)					
TC	139 (44.2)	110 (39.0)	1.667				0.434
CC	42 (13.3)	39 (13.9)		0.913	0.718	1.160	
T	405	374	0.555				0.456
C	223	188					
rs11614913							
TT	76 (24.0)	54 (19.2)					
TC	162 (51.2)	163 (57.6)	2.917				0.233
CC	78 (24.8)	66 (23.2)		1.075	0.857	1.349	
T	314	271	0.389				0.533
C	318	295					

表 10 基因-基因相互作用和 RA 风险的广义多因素降维模型分析

因子数目	最佳模型	训练精确度	测试精确度	交叉验证一致性	P 值
2	rs3746444-rs11614913	0.5481	0.5268	10/10	0.3770
3	rs2910164-rs3746444-rs11614913	0.5543	0.5299	9/10	0.3770
4	rs2910164-rs3746444-rs2292832-rs11614913	0.5548	0.5307	10/10	0.3770

注: P 值经性别和年龄校正。

表 11 基因-性别相互作用和 RA 风险的广义多因素降维模型

因子数目	最佳模型	训练精确度	测试精确度	交叉验证一致性	P 值
2	rs11614913-SEX	0.5884	0.5892	10/10	0.0010
3	rs3746444-rs11614913-SEX	0.6018	0.5806	6/10	0.0010
4	rs2910164-rs3746444-rs11614913-SEX	0.6124	0.5879	7/10	0.0107
5	rs2910164-rs3746444-rs2292832-rs11614913-SEX	0.6137	0.5863	10/10	0.0107

注: P 值经年龄校正。

3 讨论

类风湿关节炎是一种常见的、多种因素诱导的全身性自身免疫病,其中遗传因素提供了个体发病的易感性。miRNA 属于表观遗传学的范畴,许多研究发现 miRNA 参与了自身免疫病和炎症性疾病的发生发展过程。因此,基于 miRNA 基因改变能够影响其表达及功能的设想,笔者选择了中国人群中常见的 SNP 位点 rs2910164、rs3746444、rs11614913 及 rs2292832 探讨和 RA 遗传易感性的关联。

在本研究中,笔者并未发现 rs2910164、rs11614913

及 rs2292832 和 RA 患病风险及疾病的活动性及严重性相关。人类 miR-146a 基因位于第 5 号染色体,许多研究显示 miR-146a 在免疫系统中发挥了重要功能,特别是可以靶向抑制白细胞介素-1 受体相关激酶、TNF 受体相关因子 6 参与 Toll 样受体 / 髓样分化因子 88 (以下简称 TLR/MyD88) 信号通路的调控,进而影响核转录因子 NF- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 下游的白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症细胞因子的产生。许多研究提示,以

上炎症细胞因子可以诱导 miR-146a 在免疫细胞、滑膜成纤维细胞、滑膜组织中表达增加, 或许和 RA 疾病的活动性相关^[18-20]。rs2910164 位点位于 pre-miR-146a 的负链序列, 其突变可以导致 pre-miR-146a 发夹结构茎部由 G : U 配对变成 C : U 错配, 影响成熟 miR-146a 表达和功能, 该位点多态性可能和 miR-146a 参与的疾病遗传易感性有关^[21]。然而, 目前关于此位点与 RA 患病风险的结论报道不一。国内外均有文献报道, 该位点的多态性与 RA 患病风险无关^[15, 22]。类似的, 在本研究中, 无论是从 RA 的患病风险, 还是与 RA 的疾病活动性及严重性方面, 均未发现相关性。这些结果提示, rs2910164 位点并不能影响 miR-146a 在 TNF- α 信号通路中的作用, miR-146a 在 RA 中发挥作用的机制可能与该位点多态性无关。rs2292832 位点位于 miR-149 的前体, 它能负反馈调节 TLR 介导的免疫反应过程。有研究提示 miR-149 可能是 TLR/MyD88 信号通路的重要免疫调节因子, 因为使用脂多糖刺激巨噬细胞系 RAW264.7 后, miR-149 水平降低, 而 MyD88 升高, TNF- α 、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 等炎症介质产生亦减少^[23]。miR-149 在调节免疫反应中可能发挥了重要的作用, 它能与 MyD88 的 3' UTR 直接结合, 在转录后水平负反馈调节炎症因子的产生^[24]。故有中国学者报道, 基因型为 CC 的患者 RA 发病风险增大, 即 miR-149 的 rs2292832 多态性位点与 RA 的遗传易感性相关^[25]。但在本研究中并未发现该位点和 RA 易感性相关, 出现此差异的可能性为前者研究样本量较小, 且和分型技术的灵敏度及准确度有关。因此, 此位点是否在 RA 中发挥作用, 还有待进一步考量。miR-196a 的 rs11614913 位点涉及多种肿瘤的致癌过程。有研究显示, 该位点通过调控基因表达和调节促炎因子的产生, 可以增加白塞病的发病风险^[26]。然而, 在本研究中, 并未发现该位点和 RA 发病相关。

位于 MIR499A 基因的 rs3746444 位点目前发现与 RA、溃疡性结肠炎及白塞病等多种自身免疫病相关^[15-16, 27]。值得注意的是, 以上研究均发现 CT 基因型与疾病的相关性, 提示超显性遗传模型在 RA 疾病发生发展中的重要作用。类似的, 在本研究中, 同样发现 CT 基因型与 RA 患者的临床参数之间存在相关性。笔者发现 CT 基因型的患者的 CRP、ESR 水平及 DAS28 评分均较 TT、CC 基因型的升高, 这与前人的研究结果相一致, 可能提示 miR-499a 与 RA 疾病活

动相关。众所周知, RA 是一种以侵蚀性关节炎为主要表现的全身性自身免疫病, 可导致关节的畸形和毁损, 因此在当今 RA 不能根治的情况下, 治疗中评价 RA 疾病活动度, 并进行及时有效的治疗对防止关节破坏, 保护关节功能非常重要。国际上比较公认的评价 RA 疾病活动度的评分是 DAS28, 比较直观简便的方法是参考炎症相关指标, 如 CRP、ESR 及血小板等。最新研究表明, CRP 检测具有简单、确定、重复性好及不受年龄干扰的特点, 单独测定 CRP 可能更适合评价疾病的活动性^[28]。miR-499a 的靶基因包括白细胞介素-17 (Interleukin-17, IL-17) 受体 B、IL-6 以及其他细胞因子。IL-17 是促炎症细胞因子, 可以诱导 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、白细胞介素-23 及粒细胞集落刺激因子等细胞因子的合成, 而 IL-6 可以通过肝脏刺激 CRP 和血纤维蛋白原的合成^[29]。因此, 笔者推测 miR-499a 可以促进 CRP 的合成, 从而导致炎症的发展。

此外, 在本研究中, 笔者还发现 rs3746444 位点的 CT 基因型或许与 RA 疾病的严重性相关。其中 RF 阳性组和 anti-CCP 抗体阳性组的 CT 基因型频率均较阴性组升高, 并且在 X 射线分期严重骨破坏组 (> II 期) 中也升高。目前研究表明 RF 具有预后意义, 因为具有高滴度类风湿因子者关节病变更严重、进展更快且更容易出现关节外病变。anti-CCP 抗体的敏感性与免疫球蛋白 M 型类风湿因子相似, 但 anti-CCP 抗体的特异性更高。检测 anti-CCP 抗体有助于早期 RA 的鉴别诊断, 而且对于确定那些有发生侵蚀性关节损害危险的早期 RA 患者也很有价值。这些都提示 CT 基因型的 RA 或许更容易进展为侵蚀性关节炎。有研究表明, miR-499a 可以通过调节其靶基因 PADI4 的表达, 从而对 anti-CCP 抗体的合成产生影响^[22]。还有研究报道, IL-17 诱导的一系列炎症因子, 例如 TNF- α 、IL-1 β , 可以促进破骨细胞的激活和分化, 也可以通过激活 NF- κ B 配体受体催化剂, 从而在破骨细胞的生成中发挥作用, 进一步导致骨质的破坏和关节的炎症^[30]。因此, 笔者推测 miR-499a 和侵蚀性 RA 存在一定的关联。

前已述及, RA 是由多因素诱导的复杂疾病, 遗传因素提供了个体发病的易感性, 但却不是疾病发生发展的唯一性因素。环境因素对 RA 的影响也较为显著。因此, 研究多个遗传因素、环境因素, 以及遗传因素和环境因素间的交互作用对 RA 的影响显得十分重要。

多因子降维分析法 (Multifactor dimensionality, MDR) 是一种非参数、无需遗传模式的分析方法, 它的主要特点是把高维的位点组合分成高危和低危 2 类, 降低了数据的维数, 并通过交叉验证来检验模型。最后得到的结果是一组模型, 每一个模型是从一个特定交互级别 (1 阶、2 阶及交互作用) 中选取最优的。该方法不仅适用于病例对照的研究设计, 而且可应用于复杂疾病的交互作用分析。以 MDR 方法为基础, LOU 等^[8]学者发展了 GMDR, 与 MDR 相比较, GMDR 采用基于广义线性回归的积分的统计方法, 代替了 MDR 中的高危和低危分类, 可处理计量和计数资料, 同时允许调整协变量。这种方法和 MDR 丢失大量信息的降维方法不同, 从而把握度也得到提高。本研究对上述 4 个基因的 4 个 SNP 位点用 GMDR 的方法进行了交互分析, 结果显示并未发现 4 个位点之间的交互作用与 RA 患病风险相关。然而, 在基因 - 性别之间交互作用与 RA 风险的分析当中, 结果显示 rs11614913-SEX 构成的组合符号检验有差异, 且训练精准度、测试精准度以及交叉一致性都较高, 并且仅包含两位点符合简约的原则。因此为最佳交互作用模型, 与 RA 发病有关, 它们之间的调控机制可能参与了 RA 疾病的发展进程, 然而这些推测都需要得到进一步的证实。

综上所述, 本研究发现 rs3746444 (miRNA-499a) 位点与中国汉族人群 RA 疾病的活动性和严重性相关, 并且 rs11614913 位点 (miR-196a) 与性别之间存在交互作用, 可能与 RA 发病有关。这些发现有待在更广泛的样本中得到证实。

参 考 文 献:

- [1] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] ZAMORE P D, HALEY B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309(5740): 1519-1524.
- [3] BALTIMORE D, BOLDIN M P, O'CONNELL R M, et al. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function[J]. Nature Immunology, 2008, 9(8): 839-845.
- [4] GRAFF J W, DICKSON A M, CLAY G, et al. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(26): 21816-21825.
- [5] LODISH H F, ZHOU B, LIU G, et al. Micromanagement of the immune system by microRNAs[J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(2): 120.
- [6] INOUE Y, WATANABE M, INOUE N, et al. Associations of single nucleotide polymorphisms in precursor-microRNA (miR) -125a and the expression of mature miR-125a with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases[J]. Clinical & Experimental Immunology, 2014, 178(2): 229-235.
- [7] WANG H, PENG W, XIN O, et al. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Translational Research, 2012, 160(3): 198-206.
- [8] XIA P, FANG X, ZHANG Z H, et al. Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions[J]. Immunology Letters, 2012, 148(2): 151.
- [9] MELO A K, MELO M R, SARAMAGO A B, et al. Persistent glucocorticoid resistance in systemic lupus erythematosus patients during clinical remission[J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2013, 12(2): 2010.
- [10] LÖFGREN S E, FROSTEGÅRD J, TRUEDSSON L, et al. Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene[J]. Genes & Immunity, 2012, 13(3): 268-274.
- [11] CHATZIKYRIAKIDOU A, VOULGARI P V, GEORGIU I, et al. The role of microRNA-146a (miR-146a) and its target IL-1R-associated kinase (IRAK1) in psoriatic arthritis susceptibility[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2010, 71(5): 382-385.
- [12] SAKOGUCHI A, JINNIN M, MAKINO T, et al. The miR-146a rs2910164 C/G polymorphism is associated with telangiectasia in systemic sclerosis[J]. Clinical & Experimental Dermatology, 2013, 38(1): 99-100.
- [13] FENOGLIO C, CANTONI C, DE R M, et al. Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4 + cell activation in patients with multiple sclerosis[J]. Neuroscience Letters, 2011, 504(1): 9-12.
- [14] OKUBO M, TAHARA T, SHIBATA T, et al. Association study of common genetic variants in pre-microRNAs in patients with ulcerative colitis[J]. Journal of Clinical Immunology, 2011, 31(1): 69-73.
- [15] ELSHAL A S, ALY N M, GALIL S M, et al. Association of microRNAs genes polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients[J]. Joint Bone Spine Revue Du Rhumatisme, 2013, 80(6): 626-631.
- [16] YANG B, CHEN J, LI Y, et al. Association of polymorphisms in pre-miRNA with inflammatory biomarkers in rheumatoid arthritis in the Chinese Han population[J]. Human Immunology, 2012, 73(1): 101-106.
- [17] 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 & Rheumatology, 2010, 62(9): 2592-2594.
- [18] LI J, WAN Y, GUO Q, et al. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4 + T cells from patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(3): R81.
- [19] STANCZYK J, PEDRIOLI D M, 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.
- [20] 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.
- [21] IWAI N, NARABA H. Polymorphisms in human pre-miRNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4): 1439-1444.
- [22] YANG B, ZHANG J L, SHI Y Y, et al. Association study of single nucleotide polymorphisms in pre-miRNA and rheumatoid arthritis in a Han Chinese population[J]. *Mol Biol Rep*, 2011 Nov, 38(8): 4913-4919.
- [23] MCCOY C E, SHEEDY F J, QUALLS J E, et al. IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(27): 20492-20498.
- [24] TAGANOV K D, BOLDIN MP, CHANG K J. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12481-12486.
- [25] 肖茗渊, 马怡, 陈兴国, 等. MiR-149 基因多态性与类风湿性关节炎的相关性 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2015, (05): 495-498.
- [26] QI J, HOU S, ZHANG Q, et al. A functional variant of pre-miRNA-196a2 confers risk for Behcet's disease but not for Vogt-Koyanagi-Harada syndrome or AAO in ankylosing spondylitis[J]. *Human Genetics*, 2013, 132(12): 1395-1404.
- [27] ONER T, YENMIS G, TOMBULTURK K, et al. Association of Pre-miRNA-499 rs3746444 and Pre-miRNA-146a rs2910164 polymorphisms and susceptibility to behcet's disease[J]. *Genetic Testing & Molecular Biomarkers*, 2015, 19(8): 424.
- [28] CROWSON C S, RAHMAN M U, MATTESON E L. Which measure of inflammation to use? A comparison of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements from randomized clinical trials of golimumab in rheumatoid arthritis[J]. *Journal of Rheumatology*, 2009, 36(8): 1606.
- [29] PEPYS M B, HIRSCHFIELD G M. C-reactive protein: a critical update[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 111(12): 1805-1812.
- [30] 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.
- [31] LOU X Y, CHEN G, YAN L, et al. A generalized combinatorial approach for detecting gene-by-gene and gene-by-environment interactions with application to nicotine dependence[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 80: 1125-1137.

(李科 编辑)