

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.010

长链非编码 RNA 在类风湿性关节炎患者和健康人 PBMCs 中差异表达及其发病机制

陈璐佳¹, 唐奕泉², 欧大明¹

(南华大学附属第一医院:1. 风湿免疫科;2. 骨科, 湖南衡阳 421001)

[摘要] **目的** 探究长链非编码 RNA(lncRNA)在类风湿性关节炎(RA)患者外周血单个核细胞(PBMCs)和健康人 PBMCs 中的差异表达,并对其分析以进一步阐明 RA 的发病机制。**方法** 选取 2016 年 1—4 月在该院风湿免疫科就诊的 RA 患者 22 例作为观察组,22 例健康人作为对照组。采用 Agilent Human lncRNA 芯片测定 5 例 RA 患者和 5 例健康人的 PBMCs 中的 lncRNA 和 mRNA 的差异表达;利用 GO 以及 Pathway 分析检测出差异表达的 lncRNA 的功能分布,构建起 lncRNA-mRNA 的共表达网络,采用 Trans-与 Cis-预测其中与 RA 发病相关的 lncRNA。**结果** lncRNA 在 RA 患者的 PBMCs 和健康人的 PBMCs 中共存在 1 623 条差异表达,mRNA 差异表达则有 851 条。GO、Pathway 分析表明,差异表达的 mRNA 的主要功能是参与蛋白激酶、核苷酸、金属离子的结合和转录调节,还参与 B 细胞受体信号通路、TNF 信号通路的调节。经过 Cis-和 Trans-分析预测和 Real-time PCR 验证后找到 3 个 lncRNA 可能与 RA 发病有关,分别为 NONHSAT 120696、uc. 80+、NONHSAT 031501。**结论** lncRNA 在 RA 患者 PBMCs 和健康人 PBMCs 中存在差异表达,NONHSAT 120696、uc. 80+、NONHSAT 031501 3 个 lncRNA 可能与 RA 的发病有关。

[关键词] 长链非编码 RNA;关节炎,类风湿;外周血单个核细胞**[中图分类号]** R593.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2337-03

Differential expression of long chain noncoding RNA in PBMCs in health people and patients with rheumatoid arthritis and its pathogenesis

Chen Lujia¹, Tang Yiquan², Ou Daming¹

(1. Department of Rheumatism; 2. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the differential expression of long chain noncoding RNA (lncRNA) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the patients with rheumatoid arthritis (RA) and normal human and to analyze to further clarify the pathogenesis of RA. **Methods** Twenty-two cases of RA in our hospital from January to April 2016 were selected as the observation group and 22 healthy persons served as the control group. The differential expression of lncRNA and mRNA in PBMCs of 5 RA cases and 5 healthy persons were determined by using Agilent human lncRNA chip; GO and Pathway were used to analyze the functional distribution of differentially expressed lncRNA, the co-expression network was constructed and the Trans- and Cis- were adopted to predict the RA onset related lncRNA. **Results** There were 1623 differential expressions of lncRNA in PBMCs of RA patients and healthy persons and 851 differential expressions of mRNA. GO and Pathway analysis showed that the main function of differentially expressed mRNA was to participate in the binding and transcriptional regulation of protein kinase, nucleotide and metal ions, and also participate in the regulation of B cell receptor signaling pathway and TNF signaling pathway. After Cis- and Trans- analysis prediction and real-time PCR validation, the 3 lncRNA could be related with RA onset, which were NONHSAT 120696, uc. 80+ and NONHSAT 031501. **Conclusion** lncRNA has differential expression in PBMCs of RA patients and healthy persons, three 031501 lncRNA of NONHSAT 120696, uc. 80+, NONHSAT may be related to the pathogenesis of RA.

[Key words] long chain of noncoding RNA; arthritis, rheumatoid; peripheral blood mononuclear cells

类风湿性关节炎(RA)是一种常见的由多种因素引起的自身免疫性疾病,其病理改变主要为滑膜关节的破坏和慢性炎症^[1]。长链非编码 RNA(lncRNA)是一类长度大于 200 bp 的 RNA 分子,但不编码蛋白质。近年来有研究表明 lncRNA 不但在细胞中起着传递信息的中间媒介的作用,而且还通过影响基因的转录调控蛋白质的表达^[2],可能与 RA 的发病有关。本研究通过探究 lncRNA 在 RA 患者 PBMCs 和健康人 PBMCs 中的差异表达,筛选与 RA 发病有关的 lncRNA,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1—4 月在本院风湿免疫科就诊

且确诊为 RA 的患者 22 例作为观察组,22 例健康人作为对照组。其中 RA 的诊断标准根据 2010 年美国风湿病学会(ACR)和欧洲抗风湿病联盟(EULAR)的 RA 分类标准^[3],所有患者评分均大于 6 分,年龄 35~51 岁,平均(42.12±3.21)岁,所有患者均为女性;对照组 22 例来源于同期于本院进行体检的健康人群,年龄 36~48 岁,平均(42.34±3.53)岁,均为女性。两组患者的年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器

cDNA 反转录试剂盒、Trizol 试剂、SYBR

表 1 Real-time PCR 引物

IncRNA	正向引物(F)	反向引物(R)	产物长度(bp)
uc. 80+	5'-ATT CCS STG TSS GCS STC SGT G-3'	3'-CAG TAA TAT GTT CTG GCA TCG T-5'	169
NONHSAT 031501	5'-CCT TGT TCC TAG TGG TTT GC-3'	3'-AGAGTTTGCTTCGGCTGCTA-5'	254
NONHSAT 120696	5'-AGG CAA CAA GTC AAG GAT AAC-3'	3'-TTG GCT GTC ATC TGA AAC C-5'	144
GAPDH	5'-GCA CCT CAA GGC TGA GAA C-3'	3'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-5'	138

Green Real-time PCR masker mix 试剂均购自 Takara 公司;人淋巴细胞分离液购自灏洋生物有限公司;DEPC 水购自索莱宝公司;Real-time PCR 引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司;Agilent Human IncRNA Microarray 芯片为 Agilent 公司提供的 IncRNA 芯片,探头为 mer 的长寡核苷酸,可覆盖包括 Broad Institute、TUCP Catalog、UCSC LincRNAs Transcripts 等多个数据库最新的 IncRNA 信息,还可同时检测 IncRNA 和 mRNA,分析两者的关系;图像采集数据分析等均由欧易公司完成。

1.2.2 收集细胞 采集 RA 患者和健康人的外周静脉血 5 mL 保存于 EDTA 抗凝管中,高速离心后,将血浆转移至 1.5 mL EP 管中,冻存于 -80°C 冰箱中备用;离心后的血细胞层适应淋巴细胞分离液分离 PBMC,离心后用 0.1 mol/L PBS 洗涤 PBMCs 细胞,同样冻存于 -80°C 冰箱中备用。

1.2.3 提取总 RNA 采用 Trizol 法提取总 RNA。先使用 mir Vana RNA 提取试剂分别提取 RA 患者和健康人 PBMCs 中的总 RNA,纯化后使用 Agilent 2100 分析仪对总 RNA 进行质量、定量的分析。

1.2.4 分析 IncRNA 表达谱 按照 cDNA 反转录试剂盒说明书分别对 RA 患者和健康人的 Total RNA 进行 cDNA 的合成,体外转录合成 cRNA。反转录 cRNA 后荧光标记,对产物进行 Agilent Human IncRNA Microarray 芯片杂交,完成后使用 Agilent Gene Spring 软件对检测数据进行分析,其中,观察组患者的 IncRNA 比对照组的表达变化超过 2 倍且 $P < 0.05$ 者定义为差异表达。使用 GO、Pathway 分析差异表达的 mRNA 的功能属性并进行生物学途径分析,构建 IncRNA-mRNA 的共表达网络。使用 Cis-和 Trans-分析最有可能与 RA 发病相关的 IncRNA。

1.2.5 Real-time PCR 验证实验 在筛选出差异表达的 IncRNA 中,选取差异倍数较大的 IncRNA 作为验证对象,GAPDH 作为内参,进行 Real-time PCR 反应(引物见表 1)。PCR 反应条件为预变性 95°C 30 s,变性 95°C 5 s,退火 58°C 30 s,延伸 72°C 30 s;总共进行 40 的循环。最后计算 RA 患者的目的基因表达相对于健康对照组患者变化的倍数。

2 结 果

2.1 总 RNA 的质量、定量分析 RNA 质量的鉴定标准是可见清晰的 28 s 和 18 s 条带,且无降解,在肉眼观察下可见 28 s 条带的亮度是 18 s 条带亮度的 2 倍左右。提取、纯化后的总 RNA 经 Agilent 2100 分析仪检测分析,可见所有样本的 $\text{RIN} \geq 7$,且 $28\text{ s}/18\text{ s} \geq 0.7$ 。即总 RNA 的样本质量达标,完整性较好,可用于芯片杂交实验,可满足本研究的需要,见图 1。

2.2 IncRNA 表达谱分析

2.2.1 IncRNA 和 mRNA 的差异表达 进行 Agilent Human IncRNA Microarray 芯片杂交后使用 Agilent Gene Spring 软件

对检测数据进行分析可得,IncRNA 在 RA 患者的 PBMCs 和健康人的 PBMCs 中共存在 1 623 条差异表达,mRNA 差异表达则有 851 条,且差异倍数均大于 2 ($P < 0.05$)。其中,表达上调的 IncRNA 有 1 207 条,占 74.37%;表达下调的 IncRNA 有 416 条,占 25.63%。差异表达的 mRNA 中,上调的有 591 条,占 69.48%;下调的有 260 条,占 30.55%。

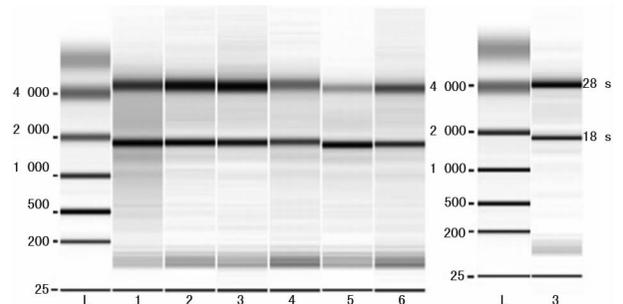


图 1

2.2.2 GO、Pathway 分析 通过对差异表达的基因进行 GO 分析,发现差异表达的 mRNA 的主要功能是参与蛋白激酶、核苷酸、金属离子的结合和转录调节等。Pathway 分析则表明,差异表达的基因的主要功能是参与 B 细胞受体信号通路、TNF 信号通路等。构建 IncRNA-mRNA 共表达网络后,获得 IncRNA-mRNA 对共 227 对。经过 Cis-、Trans-分析预测最有可能与 RA 发病相关的 IncRNA 为 NONHSAT 031501、NONHSAG 027875、FR378506。

2.2.3 Real-time PCR 验证 验证实验针对差异表达倍数较大的部分 IncRNA 和与 RA 发病有关的 IncRNA 进行验证,包括 uc. 80+、NONHSAT 031501、NONHSAT 120696、GAPDH、NONHSAG 027875。结果显示 NONHSAT 120696、uc. 80+、NONHSAT 031501 在扩大样本中得到较好的验证,与芯片杂交的结果相仿,见表 2。

表 2 Real-time PCR 验证实验与芯片杂交实验对比

IncRNA 名称	倍数变化(n)	
	Real-time PCR 验证	芯片杂交
NONHSAT 120696	4.952	5.254
uc. 80+	3.541	3.970
NONHSAT 031501	2.716	2.691

3 讨 论

RA 是一种以对称性多关节炎为主要临床表现的常见自身免疫性疾病,可导致关节的畸形甚至功能丧失^[4],其发病原因至今未明,至今尚无彻底根治的治疗方案。有研究已证实,肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6、白细胞介素 1b 等炎症因子与 RA 的发病有关^[5-6]。红细胞沉降率、C 反应蛋白、类风湿因子、

抗角蛋白抗体的检查结合患者临床表现有利于 RA 的诊断,可有效降低误诊率。但临床明确诊断的 RA 患者一般已发生不可逆的病理改变,临床上需要更早期的诊断标志物发现早期的 RA 以及时逆转其病理改变。

近年来,有报道称 lncRNA 参与了自身免疫功能的调节^[7-8]。lncRNA 是一类长度大于 200 bp 的非编码 RNA,按照其在基因组中与邻近蛋白质编码基因的位置可分为 5 类:正义 lncRNA、反义 lncRNA、双向 lncRNA、基因内 lncRNA 和基因间 lncRNA^[9]。lncRNA 不参与蛋白质的合成,但可调控蛋白质的合成,表现为参与转录的调控、影响转录后的加工、表观遗传沉默、核内运输^[10]。lncRNA 作用的多样性和其在基因表达中的作用有关,其表达的异常则可能引起多种疾病或功能失调症。越来越多的研究表明,lncRNA 与肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病和其他疾病的发病有密切关系^[11]。

本研究通过研究 lncRNA 在 RA 患者和健康人的 PBMCs 中的差异性表达,探讨 RA 的可能发病机制,为临床的早期诊断和靶向治疗提供便利。本研究结果显示,lncRNA 在 RA 患者的 PBMCs 和健康人的 PBMCs 中共存在 1 623 条差异表达,mRNA 差异表达则有 851 条。筛选其中差异倍数较大的 lncRNA 进行 GO、Pathway 分析,结果表明,差异表达的 mRNA 的主要功能是参与蛋白激酶、核苷酸、金属离子的结合和转录调节,还参与 B 细胞受体信号通路、TNF 信号通路的调节。经过 Cis-和 Trans-分析预测和 Real-time PCR 验证实验后找到 3 个 lncRNA 与 RA 有关,分别为 NONHSAT 120696、uc. 80+、NONHSAT 031501。

另外,有研究表明,RA 患者中的上调 lncRNA Hotair 的表达有促进巨噬细胞转移的作用,能激活膜细胞和破骨细胞中金属蛋白酶 2(MMP-2)、金属蛋白酶 13(MMP-13)的表达并且参与到 RA 的发病机制当中,提示 lncRNA Hotair 可能是潜在的 RA 诊断标记^[12]。Lu 等^[13]的研究表明,T 细胞的激活能升高 LOC100503036 的表达,能调节 AMPD1、NFAT1 等多个基因。在 RA 患者中,可见滑膜组织和滑液单个核细胞中的 CD4⁺ 细胞 SFMC 的 GADD45 β 的表达水平显著增高,而 SFMC 可上调健康人 PBMC 中 GADD45 β 和 IFN- γ 的表达^[14],可能与 RA 的发病机制有关。陈莉等^[15]的研究则表明,RA 患者稳定期的 CD8⁺CD28⁻T 细胞较活动期患者和健康人显著增高,而 CD8⁺CD28⁺T 细胞及 CD8⁺CD28⁻/CD8⁺CD28⁺ 比值 RA 活动期和稳定期患者与对照组差异无统计学意义,提示 RA 的发病机制可能与 CD8⁺ 细胞亚群的比例改变有关,机体的细胞免疫功能紊乱可能参与到自身免疫病的发病机制当中。上述研究结果不但说明了 lncRNA 的异常表达与 RA 发病有密切关系,也为自身免疫性相关疾病提供了新的研究方向,且随着后基因组研究时代的来临,基因芯片杂交技术和其他的检测技术得到极大的进步,也促进了对 lncRNA 的深入研究。

综上所述,lncRNA 在 RA 患者的 PBMCs 中的存在差异性表达,且 lncRNA 参与调控编码蛋白质的表达,导致 PBMCs 的功能紊乱,可能与 RA 的发病机制有关。本研究得出 NONHSAT 120696、uc. 80+、NONHSAT 031501 共 3 个 lncRNA 在 RA 患者中有明显差异,但其在 RA 的发病机制的作用还需

要后续的研究继续深入探讨,期待其能成为早期诊断 RA 和靶向治疗 RA 的新方向。

参考文献

- [1] Koenders M, Berg W. Novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2015, 36(4): 189-195.
- [2] Yoon JH, Kim J, Gorospe M. Long noncoding RNA turnover[J]. Biochimie, 2015, 117(15): 15-21.
- [3] 吕芳, 李兴福. 2010 年美国风湿病学会联合欧洲抗风湿病联盟的类风湿关节炎分类标准解读[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(4): 307-310.
- [4] 陈旭, 刘莹, 杨安钢, 等. 长链非编码 RNA 与其他表观遗传修饰的相互调控及其在自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(11): 1567-1570.
- [5] Yamanaka H. TNF as a target of inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2015, 15(2): 129-134.
- [6] Solus JF, Chung CP, Oeser A, et al. Genetics of serum concentration of IL-6 and TNF alpha in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a candidate gene analysis[J]. Clin Rheumatol, 2015, 34(8): 1375-1382.
- [7] Wu G, Pan H, Leng R, et al. Emerging role of long noncoding RNAs in autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2015, 14(9): 798-805.
- [8] Sigdel KR, Cheng A, Wang Y, et al. The emerging functions of long noncoding RNA in immune cells: autoimmune diseases[J]. J Immunol Res, 2015(7146): 1-9.
- [9] 王彦哲, 王筱霞, 汪年松. 长链非编码 RNA 与肾脏疾病[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(5): 458-461.
- [10] 刘宇, 李铁民, 王欣, 等. 长链非编码 RNA HOTAIR 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(18): 2649-2651.
- [11] 李金妹, 张文慧, 张林波. 长链非编码 RNA 及其在疾病发生发展中的作用[J]. 生命的化学, 2015, 36(3): 425-429.
- [12] Song J, Kim D, Han J, et al. PBMC and exosome-derived Hotair is a critical regulator and potent marker for rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Med, 2015, 15(1): 121-126.
- [13] Lu MC, Yu HC, Yu CL, et al. Increased expression of long noncoding RNAs LOC100652951 and LOC100506036 in T cells from patients with rheumatoid arthritis facilitates the inflammatory responses[J]. Immunol Res, 2016, 64(2): 576-583.
- [14] 肖涟波, 欧阳桂林, 何东仪, 等. 类风湿性关节炎滑液刺激 T 细胞表达 GADD45 β 机制的研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(16): 1779-1781.
- [15] 陈莉, 胡宗海, 彭燕, 等. 自身免疫性疾病患者外周血 CD8⁺ 调节性 T 细胞的表达及临床意义[J]. 重庆医学, 2013, 42(12): 1360-1361.