

effects of pressures from -10 to -175 mmHg[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2010, 125(2):502-509.

13 Cuccia G, Mucciardi G, Morgia G, et al. Vacuum-assisted closure for the treatment of Fournier's gangrene[J]. *Urol Int*, 2009, 82(4):426-431.

14 陈安富. 负压封闭引流联合臭氧水冲洗治疗感染创面的实验研

究[D]. 广州:南方医科大学, 2013.

15 李宗玉. 臭氧水在创面治疗中应用的实验研究[D]. 济南:第二军医大学, 2010.

[收稿日期 2018-05-01][本文编辑 韦所苏 刘京虹]

## 临床论著

# 类风湿关节炎患者外周血 miR-203 和 MMP-3 表达及其临床意义

武崇文, 杨喜永, 赵小燕, 郑锡铭

作者单位: 463000 河南, 驻马店市中心医院检验科

作者简介: 武崇文(1989-), 男, 大学本科, 医学学士, 检验师, 研究方向: 临床检验。E-mail: 396152567@qq.com

通讯作者: 郑锡铭(1989-), 男, 医学硕士, 主管检验师, 研究方向: 临床病原微生物与免疫学检验。E-mail: xmzhengxxmu@163.com

**[摘要]** **目的** 探讨微小 RNA203(miR-203)和基质金属蛋白酶3(MMP-3)在类风湿关节炎(RA)患者外周血中的表达及其临床意义。**方法** 选取2016-11~2017-05在该院住院诊断为RA患者60例作为RA组, 同期健康体检者30名作为健康对照组, QRT-PCR检测miR-203表达水平, ELISA法检测MMP-3表达水平。ROC曲线分析评价其对RA诊断灵敏度及特异度。**结果** RA组miR-203和MMP-3表达均高于对照组, 其在活动期升高更明显。相关性分析显示两者存在显著正相关关系( $r=0.700, P<0.01$ ); miR-203、MMP-3与类风湿因子(RF)、抗环瓜氨酸抗体(ACCP)、血沉(ESR)、C-反应蛋白(CRP)及28处关节疾病活动度评分(DAS28)存在正相关( $r=0.639, 0.474, 0.528, 0.518, 0.765, 0.816, 0.568, 0.520, 0.613, 0.594, P<0.01$ )。ROC曲线分析表明血浆miR-203及MMP-3对RA具有较高的诊断灵敏度和特异度, 联合检测能提高对RA的临床诊断能力。**结论** miR-203及MMP-3在RA患者外周血中存在差异表达, 并具有较强临床诊断能力, 有望成为新的临床诊断指标。

**[关键词]** 微小RNA203; 基质金属蛋白酶3; 类风湿关节炎

**[中图分类号]** R 593.24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)09-1011-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.09.21

**Expressions and clinical significances of miR-203 and MMP-3 in patients with rheumatoid arthritis** WU Chong-wen, YANG Xi-yong, ZHAO Xiao-yan, et al. Department of Laboratory, Zhumadian Central Hospital, Henan 463000, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expressions of microRNA-203(miR-203) and matrix metalloproteinase-3(MMP-3) in the peripheral blood of the patients with rheumatoid arthritis(RA) and their clinical significances. **Methods** Sixty RA patients in our hospital were selected as the RA group, and 30 persons who took physical examination as the healthy control group. The expression of miR-203 was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction(QRT-PCR) and the expression of MMP-3 by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). ROC curve analysis was performed to evaluate the diagnostic sensitivity and specificity of RA. **Results** The expressions of miR-203 and MMP-3 in the RA group were higher than those in the control group, and the expressions increased significantly in the active phase, and there was a significant positive correlation between them( $r=0.700, P<0.01$ ). Correlation analysis showed that there were positive correlations between miR-203, MMP-3 and RF, ACCP, ESR, CRP and DAS28( $r=0.639, 0.474, 0.528, 0.518, 0.765, 0.816, 0.568, 0.520, 0.613, 0.594, P<0.01$ ).

ROC curve analysis showed that plasma miR-203 and MMP-3 had high diagnostic sensitivity and specificity for RA, and the combined detection improved the clinical diagnostic ability of the disease. **Conclusion** The differential expressions of miR-203 and MMP-3 in the peripheral blood of the patients with RA have strong clinical diagnostic efficacy, and miR-203 and MMP-3 are expected to become a new clinical diagnostic indicators.

[**Key words**] microRNA-203(miR-203); Matrix metalloproteinase-3(MMP-3); Rheumatoid arthritis(RA)

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因复杂的、受多因素影响,以对称性多关节炎为主要临床表现的异质性、系统性、自身性免疫疾病,主要侵害关节滑膜和组织软骨<sup>[1,2]</sup>。微小RNA203(miR-203)作为一种小片段单链非编码RNA,在转录后水平抑制mRNA的翻译来调控靶基因的蛋白表达,与包括自身免疫性疾病在内的多种疾病的发生密切相关<sup>[3]</sup>。基质金属蛋白酶3(MMP-3)作为蛋白水解酶家族的一员,在RA的发病过程中,能够降解关节软骨,促进血管生成,临床上可用于对滑膜损伤、病情严重程度和预后的评估<sup>[4]</sup>。本次研究旨在探索miR-203和MMP-3在RA患者外周血中的表达及其意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 采用随机数字表法抽取2016-11~2017-05在我院住院的RA患者60例作为RA组,诊断均符合2010年美国风湿病学会及欧洲抗风湿病联盟(ACR/EULAR)共同修订的RA诊断标准<sup>[5]</sup>,其中男18例,女42例;年龄26~63(45.8±6.7)岁。统计患者入院时28关节肿胀数(SW28)、28关节压痛数(T28)、总体健康评定(GH),并计算疾病活动评价分数(disease activity score, DAS28), $DAS28 = 0.56 \times \sqrt{T28} + 0.28 \times \sqrt{sw28} + 0.70 \times \ln(ESR) + 0.014 \times (GH)$ (sqrt为求开方函数,ln为求log为底的自然对数),以DAS28<2.6作为疾病稳定组, DAS28≥2.6作为疾病活动组,本组患者中稳定组24例,活动组36例。随机选取本院同期健康体检者30名作为对照组,年龄28~58(45.1±8.3)岁。选取的研究对象均排除其他自身免疫性疾病和重要器官系统疾病,两组一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。以上样本的收集均获得患者知情同意及医院伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂及仪器** 自动免疫分析仪、自动血沉分析仪(Beckman Coulter公司)检测。Small RNA试剂盒(TaKaRa公司);Trizol试剂、逆转录试剂盒、qRT-CR荧光定量试剂盒、Nano-Drop17(赛默飞公司);Analytic jena荧光定量PCR仪(伯乐公司)。所有引物均由上海生工公司合成。

## 1.3 方法

**1.3.1 small RNA提取及cDNA合成** 患者及健康体检者空腹采乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝静脉血4 ml, 3 000 rpm/min,离心10 min分离血浆。按试剂盒操作说明书提取small RNA作为模板,使用茎环特异性引物,参照Thermo Scientific反转录说明书进行cDNA合成,反转录条件为42℃ 60 min,70℃ 5 min,4℃保存。

**1.3.2 标准曲线构建及RT-PCR检测** 以miR-203-mimics作为标准品,倍比稀释构建 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 共6个浓度梯度:取标准质粒2 μl作为模板,与样本同时行反转录和RT-PCR,构建标准曲线。采用Top Green qPCR SuperMix反应体系:Top Green qPCR SuperMix 10 μl,上、下游引物各1.0 μl,模板2 μl,加水至20 μl。反应条件:95℃ 30 s 1 cycles; 95℃ 5 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s 40 cycles;设置3个平行复孔,检测结果取平均值,以标准曲线法进行qPCR定量分析。

**1.3.3 临床指标检测** ELISA法检测外周血MMP-3、类风湿因子(rheumatoid factor, RF)和抗环瓜氨酸抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibody, ACCP),魏氏法检测血沉(ESR),免疫比浊法检测C反应蛋白(C-reactive protein, CRP),所有操作严格按照仪器及配套试剂说明书进行。

**1.4 统计学方法** 应用SPSS17.0统计软件进行数据分析,正态分布计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,偏态分布计量资料采用中位数(下四分位数,上四分位数)表示,组间比较采用独立样本t检验或秩和检验,相关分析采用Pearson相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组miR-203、MMP-3的表达及相关临床指标比较** 相对于对照组,RA组血浆miR-203、MMP-3、RF、ACCP、CRP及ESR表达显著升高( $P<0.05$ )。见表1。

**2.2 RA患者miR-203、MMP-3及相关临床指标在不同时期表达水平比较** 活动组患者血浆miR-203、MMP-3、RF、ACCP、ESR、CRP表达水平及DAS28高于稳定组( $P<0.05$ )。见表2。

表1 两组 miR-203、MMP-3 的表达及相关临床指标比较 [ (x̄ ± s), M(P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>) ]

组别	例数	miR-203 (cope/μl)	MMP-3 (ng/L)	RF (IU/ml)	ACCP (IU/ml)	ESR (mm/h)	CRP (mg/ml)	DAS28
RA组	60	3572.15 (3198.99, 4320.99)	188.66 ± 33.62	67.44 ± 36.24	92.71 ± 47.54	42.22 ± 27.27	31.97 ± 12.15	4.18 ± 1.63
对照组	30	2317.81 (1849.85, 3048.91)	103.1 ± 20.79	7.65 ± 4.66	4.89 ± 4.33	9.60 ± 3.08	2.67 ± 1.24	-
Z/t	-	-7.703	-7.130	-7.635	-6.301	-6.391	-7.703	-
P	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-

表2 RA患者 miR-203、MMP-3 及相关临床指标在不同时期表达水平比较 [ (x̄ ± s), M(P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>) ]

组别	例数	miR-203 (cope/μl)	MMP-3 (ng/L)	RF (IU/ml)	ACCP (IU/ml)	ESR (mm/h)	CRP (mg/ml)	DAS28
活动组	36	3714.72 (3294.95, 4320.92)	202.23 ± 31.29	81.53 ± 32.52	117.84 ± 6.68	51.92 ± 26.85	39.02 ± 9.37	5.66 ± 1.28
稳定组	24	3358.31 (3198.99, 3698.99)	168.30 ± 26.24	46.29 ± 19.21	55.06 ± 7.07	27.67 ± 21.04	21.38 ± 7.11	3.58 ± 1.29
Z/t	-	-5.402	-4.414	-4.158	-4.210	-3.630	-5.583	-6.098
P	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.3 miR-203、MMP-3 与临床指标相关性分析结果

Pearson 相关分析显示,血浆 miR-203 与 MMP-3、RF、ACCP、ESR、CRP 及 DAS28 存在显著相关性 ( $r = 0.700, 0.639, 0.474, 0.528, 0.518, 0.765$ ); 血浆 MMP-3 与 RF、ACCP、ESR、CRP 及 DAS28 存在显著相关性 ( $r = 0.816, 0.568, 0.520, 0.613, 0.594$ )。见表3。

表3 miR-203、MMP-3 与临床指标相关性分析结果

项目	miR-203		MMP-3	
	r	P	r	P
MMP-3	0.700	0.000	-	-
RF	0.639	0.000	0.816	0.000
ACCP	0.474	0.001	0.568	0.000
ESR	0.528	0.000	0.520	0.000
CRP	0.518	0.000	0.613	0.000
DAS28	0.765	0.000	0.594	0.000

### 2.4 RA患者 miR-203 和 MMP-3 的 ROC 曲线分析结果

为评估血浆 miR-203 和 MMP-3 对 RA 的诊断价值,对其表达量进行 ROC 曲线分析,根据统计结果中各可能切点的灵敏度和特异度,计算约登 (Youden) 指数,并选择其最大的切点为临界点,对应值为诊断临界值,miR-203 诊断临界值为 3 203 cope/μl 时,灵敏度为 98.33%,特异度为 83.33%;MMP-3 诊断临界值为 155.95 ng/L 时,灵敏度为 86.67%,特异度为 93.33%。见表4,图1。

表4 RA患者 miR-203、MMP-3、ACCP、RF 的 ROC 曲线分析结果

项目	AUC	95% CI	灵敏度 (%)	特异度 (%)	P
miR-203	0.933	0.843 ~ 0.993	98.33	83.33	0.000
MMP-3	0.963	0.928 ~ 0.997	86.67	93.33	0.000
RF	0.810	0.722 ~ 0.898	81.67	83.33	0.000
ACCP	0.909	0.849 ~ 0.969	83.33	95.00	0.000

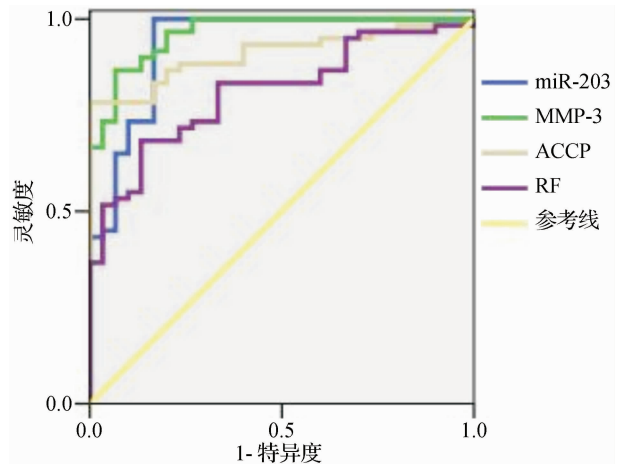


图1 miR-203、MMP-3、ACCP、RF 的 ROC 曲线分析图

### 2.5 联合检测对 RA 的诊断评价 增加检测指标,检测特异度增高;联合检测 RF、ACCP、MMP-3 及 miR-203,检测特异度可达 100%。见表5。

表5 联合检测对 RA 诊断灵敏度和特异度分析

项目	RA组 (n=60)	对照组 (n=30)	灵敏度 (%)	特异度 (%)
RF + ACCP(+)	49	28	81.67	95.00
RF + MMP-3(+)	49	29	81.67	96.67
RF + miR-203(+)	49	29	81.67	96.67
ACCP + MMP-3(+)	50	29	83.33	96.67
ACCP + miR-203(+)	50	29	83.33	96.67
RF + MMP-3 + miR-203(+)	47	29	78.33	96.33
ACCP + MMP-3 + miR-203(+)	47	29	78.33	96.33
RF + ACCP + MMP-3 + miR-203(+)	45	30	75.00	100.00

## 3 讨论

3.1 miRNA 是近年来发现的一类小片段单链非编码 RNA,在转录后水平抑制 mRNA 的翻译来调控靶

基因的蛋白表达,参与多种炎性反应过程和自身免疫性疾病的发病过程,在多种炎性和自身免疫功能调节过程中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。如 miR-145 和 miR-224 在系统性红斑狼疮患者 T 细胞中存在差异表达<sup>[7]</sup>, miR-146a 在自身免疫性疾病中发挥着多重的调控作用<sup>[8]</sup>。Stanczyk 等<sup>[9]</sup>发现,RA 患者滑膜组织中 miR-203 上调表达,并促进 MMP-1 和 IL-6 的表达,其中 IL-6 的高表达受 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响,表明 miR-203 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路对滑膜组织发挥作用,同时 miR-203 可以增加基质金属蛋白酶(MMPs)的产生,在关节破坏方面发挥重要作用。

**3.2** 作为 MMPs 家族的重要成员,MMP-3 可以加剧炎症反应、分解破坏细胞内皮基膜,降解蛋白聚糖等非胶原的基质成分,促进骨的重建及血管翳的形成<sup>[10]</sup>。在 RA 早期就有大量成纤维细胞和软骨细胞一起分泌 MMP-3,使得滑膜液和血液中 MMP-3 明显升高,促进血管翳的形成,侵蚀关节软骨,引起骨组织的破坏,同时 MMP-3 的活化可以使 MMP-9 产生级联放大效应,加剧炎症反应<sup>[11]</sup>。有研究发现,MMP-3 可预示早期 RA 患者在检测该项指标增高 6 ~ 12 个月内可出现关节不同程度的破坏<sup>[12]</sup>。

**3.3** 本组研究结果显示,RA 组血浆 miR-203、MMP-3 的水平高于对照组,且活动期的水平高于稳定期,表明其水平变化对于临床了解患者的病情具有一定的指导意义;miR-203、MMP-3 与 RA 传统诊断指标 RF、ACCP、ESR、CRP 及 DAS28 存在显著正相关,更进一步说明了 miR-203、MMP-3 参与了 RA 患者的炎症反应,它的水平可直接反映患者的关节炎症和破坏情况,且两者存在显著正相关( $r = 0.700, P < 0.01$ )。miR-203 高表达可以促进 IL-6 的生成,后者可以上调 MMP-3 的表达<sup>[13]</sup>。这提示可以通过干预 miR-203 的表达水平进而调节 MMP-3 的表达,从而为 RA 提供新的治疗手段。

**3.4** 通过 ROC 曲线分析发现,以 RF 为 20.00 IU/ml 作为诊断临界值时,ROC 曲线下面积为 0.810,诊断灵敏度和特异度分别为 81.67% 和 83.33%;ACCP 以 5.00 IU/ml 作为诊断临界值时,ROC 曲线下面积为 0.909,诊断灵敏度和特异度分别为 83.33% 和 95.00%,均与检测试剂盒一致。血浆 miR-203 和 MMP-3 的 ROC 曲线下面积分别为 0.933 和 0.963,表明其对 RA 具有很强的临床诊断能力,联合检测具有更强的临床诊断价值。

综上所述,本研究发现血浆 miR-203 和 MMP-3 在 RA 患者中存在差异表达,其表达水平可作为疾病活动有效的监测指标及潜在的诊断指标。miR-203 可上调 MMP-3 的表达,在疾病过程中发挥重要作用。但由于本组临床病例数较少,有待进一步大样本进行验证,以便为 RA 提供新的临床诊断指标和潜在治疗新方向。

## 参考文献

- 1 郭惠芳,高丽霞. 2016 年风湿免疫病主要临床研究进展[J]. 临床荟萃,2017,32(2):146-151.
- 2 杨阳,李晓军. 类风湿关节炎生物标志物研究进展:从蛋白质到非编码 RNA[J]. 临床检验杂志,2017,35(1):1-4.
- 3 Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, et al. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(2): 373-381.
- 4 董奕裕,张新根,陆建良,等. ICTP、MMP-3、抗 CCP 抗体和 RF 检测对早期 RA 患者的诊断应用[J]. 放射免疫学杂志,2013,26(3):330-333.
- 5 Mjaavatten MD, Bykerk VP. Early rheumatoid arthritis: the performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for diagnosing RA[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2013, 27(4): 451-466.
- 6 郑锡铭,刘鑫,周林林,等. 6 种 miRNAs 在类风湿关节炎患者外周血及关节液中的表达分析[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(12):1686-1691.
- 7 Lu MC, Lai NS, Chen HC, et al. Decreased microRNA(miR)-145 and increased miR-224 expression in T cells from patients with systemic lupus erythematosus involved in lupus immunopathogenesis[J]. Clin Exp Immunol, 2013, 171(1):91-99.
- 8 石宇红,任亚飞,蒋亚男,等. microRNA146a 在自身免疫性疾病中作用的研究进展[J]. 中国临床新医学,2018,11(2):1273-1277.
- 9 Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, et al. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(2):373-381.
- 10 侯传云,李季青,江超,等. 强直性脊柱炎患者血清骨桥蛋白及基质金属蛋白酶-3 检测临床意义研究[J]. 检验医学与临床,2014,3(1):321-322.
- 11 Krabben A, Huizinga TW, Mah AH. Biomarkers for radiographic progression in rheumatoid arthritis[J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(2): 147-169.
- 12 孔卓,吴俊,张海文,等. 血清基质金属蛋白酶-3 与类风湿关节炎的相关性研究[J]. 标记免疫分析与临床,2014,21(6): 636-639.
- 13 Pieter AK, Stanislaw S, Izabela D, et al. Effect of repeated Infliximab therapy on senlmmatrimetallo proteinases and tissue Inhibitors of metalloproteinases in patients with rheumatoidarthritis[J]. Rheumatology, 2004, 31(2): 238-242.

[收稿日期 2017-12-17][本文编辑 韦所苏 刘京虹]