

## 外周血环状 RNA DLGAP4 与类风湿关节炎合并心力衰竭的关系

高爱红<sup>1</sup> 田伟<sup>2</sup>

(1. 陕西省核工业二一五医院心血管内科, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西省核工业二一五医院病理科, 陕西 咸阳 712000)

**【摘要】目的** 探讨外周血环状 RNA(circRNA)DLGAP4 表达水平与类风湿关节炎(RA)合并心力衰竭(HF)的关系。**方法** 选取陕西省核工业二一五医院 2017 年 8 月—2019 年 8 月收治的 RA 患者 42 例为研究对象,根据是否合并 HF 分为 RA 组( $n=28$ )和 RA+HF 组( $n=14$ ),并选取同期进行体检的健康人 30 例为对照组。酶联免疫吸附试验检测外周血中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素-6(IL-6)水平,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测外周血中 circDLGAP4 和 miR-143 的表达水平,Spearman 相关分析 circDLGAP4、miR-143 表达水平与 RA 合并 HF 的相关性,并利用受试者操作特征曲线(ROC)评估 circDLGAP4、miR-143 表达水平诊断 RA 合并 HF 的效能。**结果** RA 组患者外周血中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 miR-143 水平高于对照组, circDLGAP4 表达水平低于对照组, RA+HF 组患者的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 miR-143 水平高于 RA 组, circDLGAP4 表达水平低于 RA 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); Spearman 相关分析结果显示: circDLGAP4 表达水平与 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 miR-143 均呈负相关( $r=-0.5207$ 、 $-0.4327$  和  $-0.7567$ ,  $P$  均  $<0.05$ ); ROC 结果显示: circDLGAP4 诊断 RA 合并 HF 的 AUC 为 0.772, 95% CI 为 0.621~0.923, 截断值为 0.67 时的敏感度为 83.3%, 特异度为 73.3%。**结论** RA 患者外周血中 circDLGAP4 表达水平显著降低,且合并 HF 时降低更显著,同时 circDLGAP4 表达水平对 RA 合并 HF 的诊断有一定的价值。

**【关键词】** 类风湿关节炎;心力衰竭;环状 RNA;DLGAP4;微小 RNA-143

**【DOI】** 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.08.020

## Relationship Between Circular RNA DLGAP4 in Peripheral Blood and Rheumatoid Arthritis Complicated with Heart Failure

GAO Aihong<sup>1</sup>, TIAN Wei<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiovascular Medicine, The 215th Hospital of Shaanxi Nuclear Industry, Xianyang 712000, Shaanxi, China; 2. Department of Pathology, The 215th Hospital of Shaanxi Nuclear Industry, Xianyang 712000, Shaanxi, China)

**【Abstract】Objective** To explore the relationship between circular RNA (circRNA) DLGAP4 in peripheral blood and rheumatoid arthritis (RA) complicated with heart failure (HF). **Methods** 42 patients with RA admitted to our hospital from August 2017 to August 2019 were enrolled as research objects and divided into RA ( $n=28$ ) and RA+HF group ( $n=14$ ) based on whether complicated with HF. 30 healthy people contemporarily underwent physical examination were selected as control group. Levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in peripheral blood were detected by ELISA, and expressions of circDLGAP4 and miR-143 were tested by qRT-PCR. Correlations of circDLGAP4 and miR-143 with RA complicated with HF were calculated by Spearman analysis. The diagnostic efficiency of circDLGAP4 and miR-143 for RA complicated with HF was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curves. **Results** Levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and miR-143 in peripheral blood were higher while with a lower expression of circDLGAP4 in RA group than control group. Compared with RA group, levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and miR-143 were elevated accompanied with a declined expression of circDLGAP4 in RA+HF group ( $P<0.05$ ). Results of Spearman analysis showed the expression of circDLGAP4 was negatively correlated with TNF- $\alpha$ , IL-6 and miR-143 ( $r=-0.5207$ ,  $-0.4327$ ,  $-0.7567$ ;  $P<0.05$ ). ROC curves indicated AUC and 95% CI of circDLGAP4 in diagnosis for RA complicated with HF were 0.772 and 0.621~0.923, respectively. When cut-off value was 0.67, the sensitivity and specificity were 83.3% and 73.3% respectively. **Conclusion** The expression level of circDLGAP4 in peripheral blood of RA patients is significantly decreased with a further decline when complicated with HF. Expression of circDLGAP4 would be of certain value in diagnosis for RA complicated with HF.

**【Key words】** Rheumatoid arthritis; Heart failure; Circular RNA; DLGAP4; microRNA-143

基金项目: 陕西省自然科学基金 (2013JM4106)

通信作者: 田伟, E-mail: 2529021166@qq.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一类以持续性滑膜炎、全身性炎症及自身出现抗体为特征的结缔组织病<sup>[1]</sup>,在中国的发病率为0.3%~0.4%,好发于20~45岁,发展至晚期可导致关节强直和畸形,极大地影响患者的生活质量<sup>[2]</sup>。不仅如此,RA通常还会累及心血管系统,增加心血管疾病患病风险。有研究显示,RA患者心血管死亡率是一般人群的1.5倍,其中心力衰竭(heart failure, HF)是显著的致死因素<sup>[3]</sup>。HF作为一类心脏结构或功能受损而导致心室充盈和/或射血功能受损的综合征,是多种心血管疾病的终末阶段<sup>[4]</sup>,目前关于RA合并HF的有关研究较少。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类特殊的非编码RNA,由前体RNA可变剪接产生的一类不具有游离的5'端帽子和3'端poly(A)尾巴,以共价键形成环形结构的非编码RNA分子,且不易被核酸外切酶RNaseR降解<sup>[5]</sup>。随着研究的不断深入发现, circRNA能通过与血管动脉粥样性疾病<sup>[6]</sup>、癌症<sup>[7]</sup>及自身免疫性疾病<sup>[8]</sup>等相关联的微小RNA(miRNA)相互作用进而调控疾病的发生和发展过程,提示circRNA及其相互作用的miRNA可能成为一类新的生物标志物或治疗靶点。有研究发现其能通过靶向负调控miR-143表达而改善缺血性脑卒中的损伤<sup>[9]</sup>。因此本研究通过检测RA合并HF患者、单纯RA患者及健康人外周血中circDLGAP4和miR-143水平,来分析circDLGAP4表达水平与RA合并HF的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取陕西省核工业二一五医院2017年8月—2019年8月期间收治的RA患者42例为研究对象。男性11例,女性31例,年龄25~67岁,平均(38.9±10.8)岁。均符合美国风湿病学会修订的RA分类标准<sup>[10]</sup>,HF诊断标准参考《美国心衰诊断及治疗指南》<sup>[11]</sup>,并符合纽约心脏病学会心功能分级Ⅱ~Ⅲ级。排除标准:(1)合并系统性急慢性感染或炎症性疾病;(2)合并恶性肿瘤;(3)合并其他自身免疫性疾病;(4)合并严重心、肝、肾功能不全者。另选取同期进行体检的健康人30例为对照组,男性10例,女性20例,年龄23~70岁,平均(39.5±9.1)岁。所有入组对象均知情并签署同意书。本研究经医院伦理委员会审核批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样本采集

RA患者于入院次日清晨(对照组于体检时)用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝管采集外周血3 mL,低温条件下

3 000 r/min离心10 min后收集上清,分为2份,1份保存于-20℃用于肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白介素-6(IL-6)的检测,另1份保存于-80℃用于RNA表达检测。

#### 1.2.2 TNF-α和IL-6水平检测

利用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测外周血中TNF-α和IL-6水平,试剂盒由上海广锐生物科技有限公司提供,检测过程严格按照试剂盒操作说明进行。

#### 1.2.3 circDLGAP4和miR-143相对表达水平检测

根据RNA提取试剂盒相关操作提取外周血上清中总RNA,凝胶电泳检测RNA完整后按照反转录试剂盒说明书进行cDNA的合成,反转录体系(10 μL):2×miRNA反应混合液5 μL,0.1%BSA 1 μL,miRNA PrimeScript® RT酶混合物1 μL,总RNA 0.5 μL,去RNA酶ddH<sub>2</sub>O 2.5 μL;反应条件设置:37℃ 60 min, 85℃ 5 s,4℃ 30 min。合成cDNA后,按照实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒说明书检测目的基因的相对表达量,PCR体系10 μL:SYBR® Pmix Ex TapII(2×)5 μL,上游引物0.4 μL,下游引物0.4 μL, ROX Reference DyeII(50×)0.2 μL, cDNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 3 μL。详细操作见试剂盒说明书。PCR反应参数设置:50℃激活聚合酶5 min,95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火和延伸34 s,反应进行40个循环。溶解曲线绘制:95℃ 15 s,60℃ 60 s,85℃ 15 s,60℃ 15 s,每个样孔设置3个复孔。circDLGAP4上游引物:5'-CGAGACGGCTACTGGTTCCT-3',下游引物:5'-GGTGGCGGGTCTTCTTATAC-3';miR-143上游引物:5'-GGTGCAGTGCTGCATCTCTGGT-3',下游引物:5'-CAGAGATGCAGCACTGCACCTT-3';内参基因GAPDH上游引物:5'-TGTTGCCATCAATGACCCCTT-3',下游引物:5'-CTCCACGACGTACTCAGCG-3',引物委托上海生物信息技术研究中心合成。用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算表达量,重复实验3次。

### 1.3 统计学方法

SPSS 17.0软件分析数据,计量资料均行正态性、方差齐性检验,不符合正态分布变量进行自然对数转化使其呈正态或近似正态分布, $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较单因素方差分析,LSD-*t*检验分析组内差异;采用受试者操作特征曲线(ROC)分析circDLGAP4诊断RA合并HF的价值;*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RA患者和对照组患者的实验室检测指标比较

RA组患者外周血中TNF-α和IL-6水平高于对照组,RA+HF组患者的TNF-α、IL-6水平高于RA组,差

异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

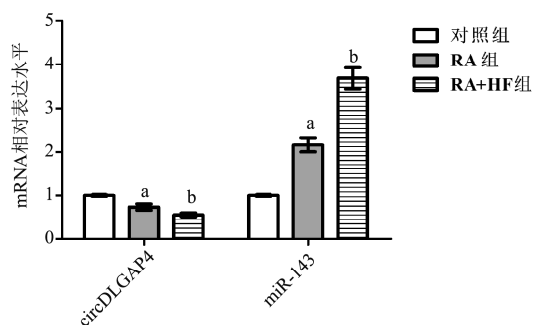
表 1 外周血中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TNF- $\alpha$ /(ng · L <sup>-1</sup> )	IL-6/(ng · L <sup>-1</sup> )
对照组	30	25.41 $\pm$ 3.28	547.25 $\pm$ 41.43
RA 组	28	108.25 $\pm$ 10.57 <sup>a</sup>	852.36 $\pm$ 102.36 <sup>a</sup>
RA+HF 组	14	154.63 $\pm$ 17.32 <sup>b</sup>	1180.64 $\pm$ 159.67 <sup>b</sup>
F		902.922	208.478
P		<0.001	<0.001

注:<sup>a</sup>:与对照组比较, $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>:与 RA 组比较, $P < 0.05$ 。

## 2.2 RA 患者和对照组患者外周血中 circDLGAP4 和 miR-143 表达水平比较

RA 组患者外周血中 miR-143 水平高于对照组, circDLGAP4 表达水平低于对照组, RA+HF 组患者的 miR-143 水平高于 RA 组, circDLGAP4 表达水平低于 RA 组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。



注:a:与对照组比较, $P < 0.05$ ; b:与 RA 组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 外周血中 circDLGAP4 和 miR-143 表达水平比较

## 2.3 circDLGAP4 表达水平与 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 miR-143 水平的相关性分析

Spearman 相关分析结果显示: circDLGAP4 表达水平与 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 miR-143 均呈负相关( $r = -0.5207$ 、 $-0.4327$  和  $-0.7567$ ,  $P$  均  $< 0.05$ )。见表 2。

表 2 circDLGAP4 表达水平与 TNF- $\alpha$ 、IL-6、miR-143 水平的相关性分析

项目	Spearman 相关性	
	r	P
TNF- $\alpha$	-0.5207	<0.001
IL-6	-0.4327	<0.001
miR-143	-0.7567	<0.001

## 2.4 circDLGAP4 诊断 RA 合并 HF 的 ROC 分析

ROC 结果显示: circDLGAP4 诊断 RA 合并 HF 的 AUC 为 0.772, 95% CI 为 0.621~0.923, 截断值为 0.67 时的敏感度为 83.3%, 特异度为 73.3%。见图 2, 表 3。

表 3 circDLGAP4 诊断 RA 合并 HF 的效能

因素	AUC	截断值	标准误	P	95% CI
circDLGAP4	0.772	0.67	0.077	0.006	0.621~0.923

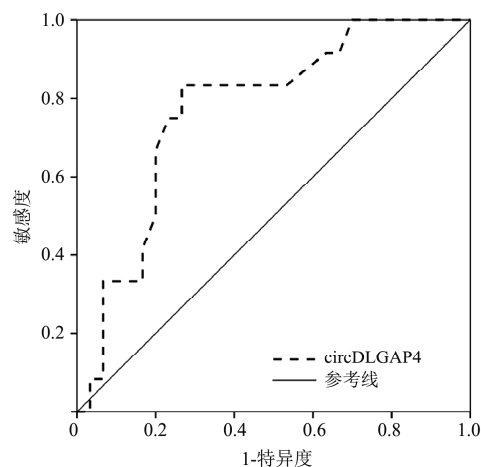


图 2 circDLGAP4 诊断 RA 合并 HF 的 ROC 曲线

## 3 讨论

RA 作为一种慢性自发性自身免疫疾病, 其发病机制尚未完全阐明, 但目前研究表明, RA 是受遗传因素和环境因素共同作用、打破免疫系统平衡而导致的一类疾病<sup>[12]</sup>。RA 患者的心血管损伤极为常见, 其中 HF、缺血性心脏病与 RA 心血管高病死率关系密切, 与普通人相比 RA 发生 HF 的概率大约是其 2 倍<sup>[13]</sup>, 但目前 RA 合并 HF 的病因及机制尚未完全阐明。由于 HF 的诊断多以临床症状或 Framingham HF 标准来进行, 但 RA 患者通常伴随有肺部疾病或全身性疾病, 而一些非特异性的水肿及呼吸困难等会被误诊为 HF, 心脏彩超和脑利尿钠肽在 RA 合并 HF 的诊断有较高参考价值, 但检测较为麻烦<sup>[14-15]</sup>。因此寻找早期诊断及特异性高的血清分子标志物对 RA 合并 HF 患者的诊断及防治具有积极意义。circRNA 在早期研究中被认为是一类剪接副产物或错误剪接而形成的一类低丰度 RNA 分子, 但随着高通量测序技术和生物信息学的快速发展, 发现 circRNA 与人类基因表达关系密切, 并且具有广泛、高度稳定、时序和疾病特异性等生物学特征, 提示其可能具有成为生物标志物或治疗靶点的潜在价值<sup>[16]</sup>。近年来有大量研究显示 RA 患者外周血单核细胞中 circRNA 表达异常<sup>[17]</sup>, 例如 Zheng 等<sup>[18]</sup>利用微阵列芯片检测技术, 发现在 RA 患者中, 有 255 个 circRNA 表达显著上调, 329 个 circRNA 表达显著下调, 同时验证了 circRNA 可能通过与下游靶基因参与到 RA 的氧化应激以及炎症反应, 进而促进 RA 病情发展。circDLGAP4 是由 Discs 大同源物关联蛋白家族 DLGAP4 基因 8、9、10 外显子反向剪接而成。本研究结果显示, RA 组患者外周血中 miR-143 水平明显升高, 而 circDLGAP4 水平显著降低, 合并 HF 患者的外周血中 miR-143 水平以及 circDLGAP4 水平变化更显著, 提示下调表达的 circDLGAP4 可能与 RA 合并

HF 密切相关。对外周血中炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平检测发现, RA 合并 HF 患者的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著高于单纯 RA 患者, 可能是因为高水平的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 能诱导内皮功能障碍, 介导炎症性血管损伤, 并保持促炎症状态, 影响心肌功能从而增加 HF 发生风险。Yang 等<sup>[19]</sup> 研究表明, RA 患者滑膜组织中 miR-143 表达水平显著升高, 通过抑制 miR-143 表达能降低 TNF- $\alpha$  处理刺激而导致 Ras-MAPK 信号通路激活。本研究初步推测 circDLGAP4 可能通过靶向负调控 miR-143 表达, 调控下游炎症信号通路相关基因蛋白的表达, 进而抑制 RA 引起的慢性炎症反应, 降低 HF 发生的风险。Spearman 相关性分析结果也证实了 circDLGAP4 表达水平与 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 miR-143 均呈负相关, 提示 circDLGAP4 降低可能与 RA 并发 HF 相关。为了进一步验证 circDLGAP4 诊断 RA 并发 HF 的价值, 本研究采取了 ROC 分析, 结果显示 circDLGAP4 诊断 RA 并发 HF 的 AUC 为 0.772, 具有一定的诊断效能, 提示其具有成为 RA 并发 HF 分子标志物的潜力。

综上所述, 本研究初步探索了外周血 circDLGAP4 表达水平与 RA 合并 HF 的关系, 推测其可能通过靶向负调控 miR-143 而抑制体内炎症反应从而减少 RA 合并 HF 的发生风险, 但本研究只对外周血中 circDLGAP4 表达水平进行了分析, 在滑膜组织中 circDLGAP4 表达水平与 RA 合并 HF 的关系是否与外周血中表达水平一致, 还需进一步研究证实。

#### 参考文献

- [1] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2010, 376 (9746): 1094-1108.
- [2] Dai SM, Han XH, Zhao DB, et al. Prevalence of rheumatic symptoms, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and gout in Shanghai, China: a COPCORD study [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30 (10): 2245-2251.
- [3] Wright K, Crowson CS, Gabriel SE. Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases a focus on heart failure [J]. *Heart Fail Clin*, 2014, 10 (2): 339-352.
- [4] Dudek M, Kałużna-Oleksy M, Migaj J, et al. Difficult diagnosis of heart failure in rheumatoid arthritis: six-year follow-up of constrictive pericarditis [J]. *Kardiol Pol*, 2018, 76 (3): 675.
- [5] Afonina ZA, Myasnikov AG, Shirokov VA, et al. Formation of circular polyribosomes on eukaryotic mRNA without cap-structure and poly (A)-tail: a cryo electron tomography study [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42 (14): 9461-9469.
- [6] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, et al. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6 (12): e1001233.
- [7] Li F, Zhang L, Li W, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (8): 6001-6013.
- [8] Ouyang Q, Wu J, Jiang Z, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42 (2): 651-659.
- [9] Bai Y, Zhang Y, Han B, et al. Circular RNA DLGAP4 ameliorates ischemic stroke outcomes by targeting miR-143 to regulate endothelial-mesenchymal transition associated with blood-brain barrier integrity [J]. *J Neurosci*, 2018, 38 (1): 32-50.
- [10] Villeneuve E, Nam J, Emery P. 2010 ACR-EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis [J]. *Rev Bras Reumatol*, 2010, 50 (5): 481-483.
- [11] Pierce JD, Dalton K, Duke K, et al. Heart failure guidelines and implications for surgically treating heart failure [J]. *AORN J*, 2009, 90 (6): 874-888.
- [12] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2010, 376 (9746): 1094-1108.
- [13] Baniaamam M, Paulus WJ, Blanken AB, et al. The effect of biological DMARDs on the risk of congestive heart failure in rheumatoid arthritis: a systematic review [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18 (5): 585-594.
- [14] Giles JT, Malayeri AA, Fernandes V, et al. Left ventricular structure and function in patients with rheumatoid arthritis, as assessed by cardiac magnetic resonance imaging [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62 (4): 940-951.
- [15] Crowson CS, Myasoedova E, Davis JM 3rd, et al. Use of B-type natriuretic peptide as a screening tool for left ventricular diastolic dysfunction in rheumatoid arthritis patients without clinical cardiovascular disease [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2011, 63 (5): 729-734.
- [16] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs [J]. *Cancer Lett*, 2015, 365 (2): 141-148.
- [17] Tang X, Wang J, Xia X, et al. Elevated expression of ciRS-7 in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. *Diagn Pathol*, 2019, 14 (1): 11.
- [18] Zheng F, Yu X, Huang J, et al. Circular RNA expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis patients, based on microarray chip technology [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (6): 8029-8036.
- [19] Yang Z, Wang J, Pan Z, et al. miR-143-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting IGF1R and IGFBP5 and regulating the Ras/p38 MAPK signaling pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15 (4): 3781-3790.

收稿日期: 2020-04-27