

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2022.03.01

· “迈瑞杯”临检发展专栏 ·

系统性红斑狼疮患者血浆和外周血细胞人巨细胞病毒 miR-UL22a-3p 水平变化及价值*

魏文雁¹, 王成^{1,2}, 张明威¹, 周万青³, 张春妮¹, 张辰宇², 汪俊军¹(1.南方医科大学第一临床医学院 & 东部战区总医院临床检验科, 南京 210002; 2.南京大学生命科学学院, 南京 210046; 3.南京鼓楼医院临床检验科, 南京 210008)

摘要:目的 探讨人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)编码的 hcmv-miR-UL22a-3p 在系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者血浆及外周血细胞中的水平变化及临床价值。方法 选取 2019 年 10 月至 2020 年 1 月于东部战区总医院确诊的 SLE 患者(SLE 组)及同期年龄、性别匹配的体检健康者(对照组)各 49 例,收集 SLE 组及对照组血浆和外周血细胞标本。根据 SLE 疾病活动指数将 SLE 组分为活动期与非活动期;根据是否合并肾炎将 SLE 组分为单纯 SLE 组和狼疮性肾炎组。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测血浆和外周血细胞标本中 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平。ROC 曲线、相关性分析、Logistic 回归分析血浆和血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 对于 SLE 的临床诊断价值。结果 qRT-PCR 结果显示, hcmv-miR-UL22a-3p 在 SLE 组血浆中的水平低于对照组 [0.000 67(0.000 26, 0.001 6) vs 0.002 1(0.001 5, 0.004 3), $P < 0.001$]; 在患者血细胞中的水平高于对照组 [0.003 1(0.001 6, 0.004 5) vs 0.001 6(0.001 1, 0.002 3), $P < 0.001$], 狼疮性肾炎患者血细胞中 hcmv-miR-UL22a-3p 水平高于单纯 SLE 组 [0.004 2(0.002 4, 0.015) vs 0.002 4(0.001 4, 0.004 2), $P < 0.05$]。相关性分析显示, 血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平与白细胞计数呈正相关($r = 0.309, P < 0.05$); 血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 水平与患者血沉呈正相关, 而与补体 C3、血清蛋白水平、白细胞计数呈显著负相关(r 分别为 0.321、-0.352、-0.295 和 -0.327, P 均 < 0.05)。血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平区分 SLE 与对照的 ROC 曲线下面积(AUC^{ROC})为 0.792(95%CI:0.701~0.883), 敏感性为 75.5%, 特异性为 79.6%; 血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 水平区分 SLE 与对照的 AUC^{ROC}为 0.744(95%CI:0.647~0.841), 敏感性为 69.4%, 特异性为 63.3%; 血细胞和血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平比值联合区分 SLE 与对照的 AUC^{ROC}为 0.830(95%CI:0.751~0.910), 敏感性为 71.4%, 特异性为 85.7%。多因素 Logistic 回归分析显示, 在校正年龄、性别影响后, 血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平的降低($OR = 0.083, 95\%CI:0.027 \sim 0.250, P < 0.001$)、血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 水平的升高($OR = 17.537, 95\%CI:3.748 \sim 82.047, P < 0.001$)以及血细胞与血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 的高比值($OR = 1.676, 95\%CI:1.223 \sim 2.297, P < 0.001$)与 SLE 的发生密切相关。结论 SLE 患者血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平下调, 血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 水平上调, 血细胞和血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平比值可作为 SLE 的潜在辅助诊断生物标志物。

关键词:人巨细胞病毒; miRNA; 血浆; 外周血细胞; miR-UL22a-3p; 系统性红斑狼疮

中图分类号: R446

文献标志码: A

Levels and clinical value of human cytomegalovirus-encoded miR-UL22a-3p in plasma and peripheral blood cells of patients with systemic lupus erythematosus

WEI Wenyan¹, WANG Cheng^{1,2}, ZHANG Mingwei¹, ZHOU Wanqing³, ZHANG Chunni¹, ZHANG Chenyu², WANG Junjun¹(1. The First School of Clinical Medicine, Southern Medical University & Department of Clinical Laboratory, Eastern Theater General Hospital of PLA, Nanjing 210002, Jiangsu; 2. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210046, Jiangsu; 3. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To investigate the levels and clinical value of human cytomegalovirus (HCMV)-encoded miR-UL22a-3p (hcmv-miR-UL22a-3p) in plasma and peripheral blood cells of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** The plasma and peripheral blood cell samples were collected from 49 SLE patients diagnosed in Eastern Theater General Hospital of PLA during October 2019 and January 2020, and 49 age and gender-matched healthy controls, respectively. SLE patients were divided into active stage and non-active stage according to disease activity index of SLE, and into simple SLE and lupus nephritis according to whether nephritis was combined. The expression levels of hcmv-miR-UL22a-3p in plasma and peripheral blood cells were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The clinical value of hcmv-miR-UL22a-3p in the diagnosis

* 基金项目:国家自然科学基金(81871702, 81772282);江苏自然科学基金(BK20211132)。

作者简介:魏文雁, 1996 年生, 女, 硕士研究生, 主要从事临床检验诊断学研究。

通信作者:汪俊军, 主任技师, 教授, 博士研究生导师, E-mail: wangj9202@163.com。

of SLE was evaluated by the receiver operating characteristic (ROC) curve, correlation analysis and logistic regression analysis.

Results The expression levels of hcmv-miR-UL22a-3p in plasma of SLE patients were significantly lower than that in healthy controls (0.000 67 [0.000 26, 0.001 6] vs 0.002 1 [0.001 5, 0.004 3], $P < 0.001$), while those in peripheral blood cells were inverse (0.003 1 [0.001 6, 0.004 5] vs 0.001 6 [0.001 1, 0.002 3], $P < 0.001$). Moreover, the expression levels of hcmv-miR-UL22a-3p in peripheral blood cells of patients with lupus nephritis were significantly higher than that in patients with simple SLE (0.004 2 [0.002 4, 0.015] vs 0.002 4 [0.001 4, 0.004 2], $P < 0.05$). The correlation analysis showed that the levels of plasma hcmv-miR-UL22a-3p were positively correlated with the number of white blood cells (WBC) ($r = 0.309, P < 0.05$), and that the levels of hcmv-miR-UL22a-3p in peripheral blood cells were positively correlated with erythrocyte sedimentation rate (ESR), and negatively with serum complement C3 and albumin (ALB) levels and the number of WBC ($r = 0.321, -0.352, -0.295$ and -0.327 , respectively, $P < 0.05$). The area under the ROC curve (AUC^{ROC}), sensitivity and specificity of plasma hcmv-miR-UL22a-3p in the diagnosis of SLE were 0.792 (95% CI: 0.701-0.883), 75.5% and 79.6%, respectively. The AUC^{ROC} , sensitivity and specificity of peripheral blood cell hcmv-miR-UL22a-3p in the diagnosis of SLE were 0.744 (95% CI: 0.647-0.841), 69.4% and 63.3%, respectively. The AUC^{ROC} , sensitivity and specificity of the ratio of peripheral blood cell and plasma hcmv-miR-UL22a-3p in the diagnosis of SLE were 0.830 (95% CI: 0.751-0.910), 71.4% and 85.7%, respectively. Multivariate logistic regression analysis showed that the decreased plasma hcmv-miR-UL22a-3p level ($OR = 0.083, 95\% CI: 0.027-0.250, P < 0.001$), increased peripheral blood cell hcmv-miR-UL22a-3p level ($OR = 17.537, 95\% CI: 3.748-82.047, P < 0.001$) and increased ratio of hcmv-miR-UL22a-3p in blood cells and plasma ($OR = 1.676, 95\% CI: 1.223-2.297, P < 0.001$) were closely related to the occurrence of SLE after adjusting age and gender. **Conclusion** The levels of plasma hcmv-miR-UL22a-3p are down-regulated and the levels of blood cell hcmv-miR-UL22a-3p are up-regulated in patients with SLE. The ratio of hcmv-miR-UL22a-3p in blood cells and plasma may serve as a potential biomarker for the diagnosis of SLE.

Key words: human cytomegalovirus; miRNA; plasma; peripheral blood cell; miR-UL22a-3p; systemic lupus erythematosus

系统性红斑狼疮(SLE)是一种累及多系统的自身免疫性疾病,但其发病机制仍不明确^[1]。人类巨细胞病毒(HCMV)是一种 β 疱疹病毒,在人群中的感染率高达90%以上,且与多种自身免疫病(包括SLE)的发生、发展关系密切^[2-3]。最新研究表明,人外周血中存在多种HCMV miRNA,其可作为疾病新型生物标志物,参与疾病分子病理过程。血浆中hcmv-miR-UL112已被证实可作为原发性高血压新型标志物,并可通过诱导血管内皮细胞功能障碍促进原发性高血压发生^[4]。本课题组既往研究表明,血清hcmv-miR-US4-3p可作为糖尿病肾病肾损害的潜在辅助诊断生物标志物^[5]。hcmv-miR-UL22a-3p和hcmv-miR-UL22a-5p可显著抑制SMAD3转录和蛋白质表达,并通过经典TGF- β 通路阻断信号传导,维持病毒在髓系细胞中的终生感染及再激活,在免疫性疾病的发生过程中发挥重要作用^[6]。然而,关于hcmv-miR-UL22a-3p在SLE患者外周血中的表达水平变化、潜在来源及临床价值,国内目前尚未见报道。因此,本研究拟通过检测SLE患者和健康人对照血浆和外周血细胞中hcmv-miR-UL22a-3p的水平,初步探讨hcmv-miR-UL22a-3p在SLE患者血浆和血细胞中的表达变化及潜在的临床价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2019年10月至2020年1月在中国人民解放军东部战区总医院门诊或住院确诊的SLE患者49例,其中女性42例,男性7例,年龄(37.39 ± 12.00)岁,所有患者均符合1997年美国风湿病学会分类诊断标准^[7],其中13例患者合并狼疮性肾炎。根据SLE疾病活动指数(SLEDAI)判断疾病活动度^[8],24例处于非活动期(SLEDAI < 5.0分),25例处于活动期(SLEDAI ≥ 5.0 分)。选取同期在健康体检中心体检各项指标正常的健康人49例作为健康人对照组,其中女性42例,男性7例,年龄(37.86 ± 11.88)岁。SLE患者与健康人对照组之间性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 试剂及仪器 5418型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),Thermo Scientific Multiskan GO全波长酶联仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),MaxyGene II梯度PCR仪(美国Corning公司),TL988-IV 96实时荧光定量PCR仪(西安天隆科技公司)。酸性水饱和酚(北京索莱宝公司),Trizol试剂(美国Life Technologies公司),分析纯级氯仿、异丙醇、无水乙醇(上海国药集团试剂公司),人工合成的MiR2911成熟体(上海Invitrogen公司),miRNA逆转录引物、qRT-PCR引物及TaqMan探针(美国ABI公司),逆转录体系和qRT-PCR试剂(大连TaKaRa公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 所有受试者均禁食 12 h 以上用 EDTA-K₂ 抗凝真空采血管采集静脉血 3~5 mL, 血液标本采集后迅速在室温下以 1 500×g 离心 10 min, 用 Eppendorf(EP) 管分别收集上层血浆和下层外周血细胞, 置于-80 °C 保存备用。

1.3.2 RNA 提取

1.3.2.1 血浆总 RNA 提取 用酸性苯酚-氯仿一步法提取血浆总 RNA。步骤: 100 μL 血浆中加入 300 μL DEPC 水、200 μL 水饱和酚和 200 μL 氯仿, 剧烈震荡, 室温静置 15 min 后于 4 °C、12 000×g 离心 20 min。上清液与 1.5 倍体积的异丙醇和 1/10 体积的醋酸钠溶液(3 mol/L, pH5.3) 混匀, -20 °C 静置 1 h 后于 4 °C、16 000×g 离心 20 min。所得 RNA 沉淀加入 75%乙醇(DEPC 水稀释)洗涤, 室温晾干约 10 min 后加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀。待 RNA 完全溶解后置-80 °C 保存备用。每份血浆样本在提取过程中均加入 20 μL 人工合成的浓度为 10⁷ fmol/L 的植物 MIR2911(5'-GGCCGGG GACGGGCUGGGA-3') 成熟体作为外源性参照, 用于校正 RNA 提取效率和误差。

1.3.2.2 外周血细胞 RNA 提取 用 Trizol 法提取外周血细胞 RNA。步骤: 500 μL 外周血细胞样本中加入 1 mL Trizol 试剂、200 μL 氯仿充分涡旋混匀, 室温静置 10 min 后于 4 °C、16 000×g 离心 20 min。取上清与等体积异丙醇混匀, 于-20 °C 静置 1 h 后于 4 °C、16 000×g 离心 20 min。所得 RNA 沉淀加入 75%乙醇(DEPC 水稀释)洗涤, 室温晾干约 10 min 后加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀, 待 RNA 完全溶解后, 测其纯度及浓度, 取纯度均大于 1.8、浓度定量至 0.5 μg/μL 的 RNA 样本用于逆转录, 以 U6 作为内源性参照。

1.3.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 基于 TaqMan 探针的 qRT-PCR 法检测血浆和外周血细胞样本中 hcmv-miR-UL22a-3p(5'-UCACCAGAAUGCU AGUUUGUAG-3') 的表达水平^[9]。逆转录反应及 qRT-PCR 总反应体系和扩增条件: 逆转录反应体系为 10 μL, 包括 DEPC 水 3.5 μL, 5×AMV 缓冲液 2.0 μL, dNTPs 1.0 μL, 逆转录引物 1.0 μL, AMV 逆转录酶 0.5 μL, RNA 样本 2.0 μL。反应条件: 16 °C 30 min; 42 °C 30 min; 85 °C 5 min。cDNA 样本置于

-20 °C 保存。qRT-PCR 反应体系为 20 μL, 包括 ddH₂O 14.77 μL, 10×PCR 缓冲液 2.0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL, dNTPs 0.4 μL, Taq 聚合酶 0.3 μL, miRNA 检测引物和探针 0.33 μL, cDNA 1.0 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环。hcmv-miR-UL22a-3p 的相对表达量采用 2^{-ΔCt} 法计算, 公式: ΔCt(血浆) = Ct_{目的miRNA} - Ct_{MIR2911}; ΔCt(外周血细胞) = Ct_{目的miRNA} - Ct_{U6}。每个 Ct 值为相应样本重复测定 3 次后所得的均值, 同时以 ddH₂O 作为阴性对照。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析。非正态分布计量资料采用 [M (P₂₅, P₇₅)] 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。正态分布资料采用均数±标准差表示, 两组间比较采用两独立样本的 t 检验。变量间的相关性分析采用 Spearman 相关分析。采用 ROC 曲线评估 hcmv-miR-UL22a-3p 表达对 SLE 患者的临床诊断价值。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 患者血浆和外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平 qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, SLE 患者血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平显著降低 (P<0.001); SLE 组活动期与非活动期比较差异无统计学意义 (P>0.05); 与单纯 SLE 组相比, 狼疮性肾炎组患者 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平差异无统计学意义 (P>0.05)。与对照组相比, 血细胞中 SLE 组患者 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平升高 (P<0.001); SLE 组活动期与非活动期比较差异无统计学意义 (P>0.05); 与单纯 SLE 组相比, 狼疮性肾炎组患者 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平升高 (P<0.05)。见表 1。

2.2 血浆和外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 与 SLE 患者临床指标之间的相关性分析 Spearman 相关性分析显示, 血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 与白细胞数目呈正相关 (P<0.05); 血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 与血沉呈正相关 (P<0.05), 而与补体 C3、血清蛋白、白细胞计数均呈负相关 (P<0.05)。见表 2。

表 1 SLE 患者血浆和外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平

分组	n	hcmv-miR-UL22a-3p					
		血浆			血细胞		
		相对表达量	Z 值	P 值	相对表达量	Z 值	P 值
对照组	49	0.002 1(0.001 5,0.004 3)			0.001 6(0.001 1,0.002 3)	-4.16	0.000 *
SLE 组	49	0.000 67(0.000 26,0.001 6)	-4.981	0.000 *	0.003 1(0.001 6,0.004 5)		
非活动期	24	0.000 46(0.000 17,0.001 1)			0.003 7(0.001 5,0.113)	-1.45	0.147
活动期	25	0.000 86(0.000 35,0.003)	-1.91	0.056 [△]	0.002 3(0.001 6,0.004)		
单纯 SLE	36	0.000 57(0.000 26,0.002 5)			0.002 4(0.001 4,0.004 2)	-2.276	0.023 [#]
狼疮性肾炎	13	0.000 67(0.000 32,0.000 97)	-0.34	0.734	0.004 2(0.002 4,0.015)		

注：*，与对照组相比， $P < 0.05$ ； Δ ，与非活动期相比， $P < 0.05$ ；#，与单纯 SLE 相比， $P < 0.05$ 。

表 2 hcmv-miR-UL22a-3p 和 SLE 患者临床指标的相关性

变量	hcmv-miR-UL22a-3p			
	血浆		血细胞	
	r	P 值	r	P 值
年龄	0.049	0.739	-0.037	0.803
病程	0.049	0.740	0.148	0.310
补体 C3	0.273	0.093	-0.352	0.028 *
补体 C4	0.208	0.204	-0.141	0.391
血沉	-0.027	0.860	0.321	0.033 *
活动度评分	-0.273	0.058	0.261	0.070
血肌酐	0.012	0.938	-0.221	0.132
血清蛋白	0.018	0.907	-0.295	0.046 *
血小板	0.036	0.808	0.035	0.816
血白细胞计数	0.309	0.033 *	-0.327	0.023 *
尿蛋白	-0.317	0.141	0.255	0.241
C 反应蛋白	-0.063	0.673	0.165	0.268

注：*， $P < 0.05$ 。

2.3 血浆和外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 对 SLE 的预测及区分价值 ROC 曲线分析显示，血浆和血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 以及血细胞与血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平比值均能够较好地区分 SLE 患者和健康人对照，血浆区分 SLE 患者和健康人对照的 ROC 曲线下面积 (AUC^{ROC}) 为 0.792 (95%CI:0.701~0.883)，当 cut-off 值为 0.001 3 时，血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 诊断 SLE 的敏感性为 75.5%，特异性为 79.6%。外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 区别 SLE 患者和健康人对照 AUC^{ROC} 为 0.744 (95%CI:0.647~0.841)，当 cut-off 值为 0.001 9 时，敏感性为 69.4%，特异性为 63.3%。血细胞和血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平比值联合区分 SLE 患者和健康人对照的 AUC^{ROC} 为 0.830 (95%CI:0.751~0.910)，当 cut-off 值为 1.81 时，敏感性为 71.4%，特异性为 85.7%。见图 1。

2.4 Logistic 回归分析 单因素 Logistic 回归分别纳入血浆 hcmv-miR-UL22a-3p、血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 以及血细胞与血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平比值分析，结果显示在 SLE 和对照组的二分类变量模型中，低水平的血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 和高水平血

细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 以及血细胞与血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 的高比值与 SLE 发生相关 ($OR = 0.083$, 95%CI:0.027~0.250, $P < 0.001$; $OR = 17.537$, 95%CI:3.748~82.047, $P < 0.001$; $OR = 1.676$, 95%CI:1.223~2.297, $P < 0.001$)。

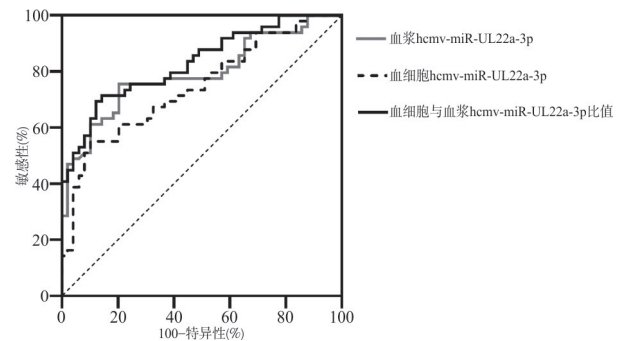


图 1 hcmv-miR-UL22a-3p 对 SLE 预测的 ROC 曲线

当以单纯 SLE 和狼疮性肾炎为二分类变量时，结果显示仅高水平的血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 与狼疮性肾炎发生相关 ($OR = 7.296$, 95%CI:1.328~40.098, $P < 0.05$)，血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；进一步以 SLE 活动期和 SLE 非活动期为二分类变量时，血浆及血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 水平与 SLE 是否处于活动期均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

多因素 Logistic 回归分析结果显示，在以 SLE 和对照组为二分类变量时，在校正年龄、性别影响后，低水平的血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 和高水平的血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 以及血细胞与血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 的高比值仍与 SLE 的发生密切相关 ($OR = 0.079$, 95%CI:0.026~0.243, $P < 0.001$; $OR = 18.661$, 95%CI:3.955~88.044, $P < 0.001$; $OR = 1.681$, 95%CI:1.224~2.31, $P < 0.001$)。当以单纯 SLE 和狼疮性肾炎为二分类变量时，在校正年龄、性别影响后，高水平的血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 仍与狼疮性肾炎的发生相关 ($OR = 14.772$, 95%CI:1.958~111.433, $P < 0.05$)。

3 讨论

近年来,病原微生物的潜伏感染与人类疾病的关系受到广泛关注,HCMV 感染与 SLE 发生、发展密切相关,HCMV miRNA 在此过程中发挥重要作用^[2]。研究显示,HCMV 能够通过其编码的 miRNA 调节多种生物学过程,如囊泡运输、细胞周期调控、凋亡、免疫逃逸及病毒潜伏和激活^[10]。同时,外周血中特定变化的 HCMV miRNA 具备作为疾病新型分子标志物潜能,参与疾病发生、发展。本研究发现,SLE 患者 hcmv-miR-UL22a-3p 在血浆中的表达水平低于健康人群,而在外周血细胞中高于健康人群,提示联合检测血细胞与血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 有望成为 SLE 的辅助诊断指标。

大量研究显示,多种不同疾病(包括自身免疫病)患者外周血循环中 HCMV 编码的 miRNA 具备作为分子标志物潜能。本课题组既往研究表明,口腔扁平苔藓(OLP)患者血浆中 hcmv-miR-UL112-3p、hcmv-miR-UL22a-5p、hcmv-miR-UL148d、hcmv-miR-UL36-5p 和 hcmv-miR-UL59 的表达水平显著高于健康个体血浆^[9]。血浆 hcmv-miR-UL112 可通过诱导血管内皮细胞功能障碍促进原发性高血压发生,已被证实可作为原发性高血压的新型标志物^[4]。研究表明,HCMV 感染婴儿的血清细胞外囊泡中 hcmv-miR-US25-1-5p 和 hcmv-miR-UL112-3p 的水平与肝损伤显著相关,提示 HCMV miRNA 可以作为疾病发生、发展的非侵入性或微创生物学标志物^[11]。本研究中的 ROC 曲线及 Logistic 回归分析结果显示,SLE 患者血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 水平下调,外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 水平上调,血细胞和血浆 hcmv-miR-UL22a-3p 高比值均能较好区分 SLE 患者和健康人群,且与 SLE 发生密切相关,提示其具有作为 SLE 生物学标志物的潜能。

免疫紊乱与 SLE 发病关系密切,HCMV 编码 miRNA 可能在此过程中发挥重要作用。研究表明,Toll 样受体(TLR)的激活可以导致干扰素调节家族(IRF-3)、NF- κ B 和 MAP 激酶的下游激活,产生干扰素- α 和 RNA 结合自身抗体,包括抗 Ro、La、Sm 和 RNP 抗体^[1]。报道显示,hcmv-miR-UL112-3p 可靶向 TLR2,从而调节先天免疫应答,抑制 TLR2 介导的 NF- κ B 信号传导^[12]。最近研究表明,中性粒细胞在受到细胞因子、活化的血小板和血管内皮细胞等因素激活后,刺激 I 型干扰素的产生,促进免疫细胞成熟,并导致组织损伤和血管功能障碍,在

SLE 的发病机制中起重要作用^[13]。而 hcmv-miR-UL112 可以通过下调 I 型 IFN 信号传导,抑制 NK 细胞的细胞毒性来破坏先天免疫,规避宿主免疫反应。hcmv-miR-UL22a-3p 可通过丝裂原活化蛋白激酶途径诱导内皮细胞生长,并可通过激活编码黏附分子、趋化因子和细胞因子-细胞因子受体相互作用等相关分子的基因,诱导内皮细胞功能障碍^[4,14]。T 细胞中靶向 TGF- β 1 信号传导的突变被证实可以导致自身免疫综合征,并与狼疮抗 DNA 或抗 Sm 抗体的产生有关,而 hcmv-miR-UL22a-3p 可通过经典 TGF- β 通路阻断信号传导^[6,15]。本研究通过相关分析显示,血浆与血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 均与白细胞计数呈显著相关,外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 还与补体 C3 相关,其中白细胞计数、补体均属于狼疮活动度评分标准,狼疮活动度评分反映了疾病严重程度和器官受累情况。因此,笔者推测,hcmv-miR-UL22a-3p 可能通过调节免疫细胞导致免疫紊乱,从而促进 SLE 的发生、发展。本研究还发现,狼疮性肾炎组相对单纯 SLE 组血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平上调,单因素及多因素分析显示血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平与狼疮性肾炎发病相关,但鉴于本研究病例数不足,仍需扩大样本量探究 hcmv-miR-UL22a-3p 与狼疮性肾炎之间的关系。

研究表明,细胞外囊泡(EVs)在细胞间通讯中起着重要作用,EVs 内富含供体细胞来源的 miRNA,并可与相关蛋白质形成蛋白质-miR 复合物,防止被核糖核酸酶降解,这些 miRNA 可以被运输至靶器官来调节靶基因^[16]。Ding 等^[9]研究表明,OLP 患者 hcmv-miR-UL59 可能通过潜藏在血浆的外泌体中来实现免疫逃逸,表明受病毒感染的细胞有可能通过分泌外泌体来调节血浆中 HCMV miRNA 水平变化。Zhang 等^[11]检测并分析 HCMV 感染婴儿的血清 EVs 中 miRNA 水平时发现,在感染 6 h 后,EVs 中的 hcmv-miR-US25-1-5p 和 hcmv-miR-UL112-3p 水平升高,且与肝损害密切相关,该研究结果表明病毒可以改变被感染宿主细胞的 EVs 特征,HCMV miRNA 可以通过 EVs 转运至未感染的细胞。然而 HCMV miRNA 与 EVs 之间的具体机制仍未阐明。

本研究结果显示,hcmv-miR-UL22a-3p 在血浆及血细胞中的表达水平不一致,hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平在血浆中降低而在血细胞中升高,且 hcmv-miR-UL22a-3p 在血浆中的表达水平与白细胞

计数呈正相关,而在血细胞中呈负相关,但具体分子机制不清楚。有研究结果显示,hcmv-miR-UL22a-3p可维持病毒在髓系细胞中的终生感染及再激活^[6];另有报道表明,外周血单个核细胞 miR-199a-3p 水平升高与白细胞降低显著相关,且上调的 miR-199a-3p 可显著提高单个核细胞凋亡率^[17]。因此,笔者推测与 miR-199a-3p 作用类似,hcmv-miR-UL22a-3p 同样有利于病毒在细胞内潜伏,可能在白细胞内合成增多,而分泌至外周血中减少,且其在白细胞内高水平的表达可能促使白细胞凋亡,白细胞参与机体炎症和免疫反应的调控,在特异以及非特异性免疫应答中均起重要作用。

综上所述,联合血浆和外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 的表达水平可能成为 SLE 的潜在生物学标志物,并为研究 HCMV 在 SLE 中潜伏以及致病机制提供线索。但血浆和外周血细胞 hcmv-miR-UL22a-3p 在免疫逃逸、中性粒细胞激活机制和运输方式仍需要进一步实验研究证实。为更深入探究 hcmv-miR-UL22a-3p 对 SLE 患者的临床价值,除扩大样本量外,还应开展前瞻性研究以及临床随访。

4 参考文献

- [1] Justiz VA, Goyal A, Bansal P, *et al.* Systemic lupus erythematosus [J]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- [2] Gugliesi F, Pasquero S, Griffante G, *et al.* Human cytomegalovirus and autoimmune diseases: Where are we? [J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 260.
- [3] Yu Z, Wang Y, Liu L, *et al.* Apoptosis disorder, a key pathogenesis of HCMV-related diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4106.
- [4] Shen K, Xu L, Chen D, *et al.* Human cytomegalovirus-encoded miR-UL112 contributes to HCMV-mediated vascular diseases by inducing vascular endothelial cell dysfunction [J]. *Virus Genes*, 2018, 54(2): 172-181.
- [5] 王萍萍, 王成, 王静, 等. 糖尿病肾病患者血清人巨细胞病毒 miR-US4-3p 水平变化及价值 [J]. *临床检验杂志*, 2021, 39(4): 295-300.
- [6] Hancock MH, Crawford LB, Pham AH, *et al.* Human cytomegalovirus miRNAs regulate TGF- β to mediate myelosuppression while maintaining viral latency in CD34⁺ hematopoietic progenitor cells [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(1): 104-114.e4.
- [7] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(9): 1725.
- [8] Touma Z, Gladman DD, Ibañez D, *et al.* Development and initial validation of the systemic lupus erythematosus disease activity index 2000 responder index 50 [J]. *J Rheumatol*, 2011, 38(2): 275-284.
- [9] Ding M, Wang X, Wang C, *et al.* Distinct expression profile of HCMV encoded miRNAs in plasma from oral lichen planus patients [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 133.
- [10] Diggins NL, Skalsky RL, Hancock MH. Regulation of latency and reactivation by human cytomegalovirus miRNAs [J]. *Pathogens*, 2021, 10(2): 200.
- [11] Zhang J, Huang YJ, Wang Q, *et al.* Levels of human cytomegalovirus miR-US25-1-5p and miR-UL112-3p in serum extracellular vesicles from infants with HCMV active infection are significantly correlated with liver damage [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(3): 471-481.
- [12] Landais I, Pelton C, Streblov D, *et al.* Human cytomegalovirus miR-UL112-3p targets TLR2 and modulates the TLR2/IRAK1/NF κ B signaling pathway [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(5): e1004881.
- [13] Signorini V, Elefante E, Zucchi D, *et al.* One year in review 2020: systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2020, 38(4): 592-601.
- [14] Huang YY, Chen DD, He JY, *et al.* Hcmv-miR-UL112 attenuates NK cell activity by inhibition type I interferon secretion [J]. *Immunol Lett*, 2015, 163(2): 151-156.
- [15] Zhang N, Bevan MJ. TGF- β signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(7): 667-673.
- [16] La Marca V, Fierabracci A. Insights into the diagnostic potential of extracellular vesicles and their miRNA signature from liquid biopsy as early biomarkers of diabetic micro/macrovacular complications [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1974.
- [17] 施善芬, 黎良达, 潘翠萍, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞 miRNA-199a-3p 表达及调控机制 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2018, 12(6): 623-629.

(收稿日期:2021-09-20)

(本文编辑:许晓蒙)