

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.13.001

## 青蒿琥酯干预大鼠胶原诱导性关节炎中 Foxp3 的表达\*

洪学志, 刘 佳, 庄辰晨, 林 东, 朱梦雅, 莫汉有<sup>△</sup>  
(桂林医学院附属医院风湿免疫科, 广西桂林 541001)

**[摘要]** 目的 研究青蒿琥酯干预下表达 Foxp3 的调节性 T 细胞在大鼠胶原诱导性关节炎(CIA)脾淋巴细胞及滑膜中表达及意义。方法 建立大鼠 CIA 模型,分为对照组、CIA 模型组、CIA 模型+不同浓度青蒿琥酯组、CIA 模型+甲氨蝶呤(MTX)组、CIA 模型+硫酸羟氯喹组、CIA 模型+甲基泼尼松龙组。流式检测脾淋巴细胞中 Foxp3 表达,免疫组化检测 Foxp3 在大鼠踝关节滑膜细胞中表达。结果 CIA 模型+20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>青蒿琥酯组中 Foxp3 在脾淋巴细胞及滑膜组织中的表达明显高于其他浓度青蒿琥酯组、CIA 模型+硫酸羟氯喹组( $P<0.05$ ),与 CIA 模型+甲基泼尼松龙组在脾淋巴细胞表达中有差异( $P<0.05$ ),与 CIA 模型+甲氨蝶呤组无差异( $P>0.05$ )。结论 青蒿琥酯可上调 T 淋巴细胞及滑膜中 Foxp3 的表达,且与剂量呈正相关,当剂量在 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>时效果最明显。

**[关键词]** 关节炎,实验性;关节炎,类风湿;Foxp3;青蒿琥酯

**[中图分类号]** R392.8

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)13-1729-04

## Expression of Foxp3 in rat collagen-induced arthritis through artesunate intervention\*

Hong Xuezhi, Liu Jia, Zhuang Chenchen, Lin Dong, Zhu Mengya, Mo Hanyou<sup>△</sup>

(Department of Rheumatology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of regulatory T cells expressing Foxp3 in rat synovial cells and T lymphocytes of collagen-induced arthritis(CIA) through artesunate intervention and their significance. **Methods** The CIA model in SD rats was established and divided into the control group, CIA model group, CIA and different concentrations of artesunate groups, CIA and methotrexate(MTX) group, CIA and hydroxychloroquine (HCQ) group, CIA and methylprednisolone(MP) group. The lymphocytes were extracted from spleen. The expression of Foxp3 in different groups of CIA rats were detected by flow cytometry (FCM). The immunohistochemical method was used to detect Foxp3 expression in rats ankle synovial cells. **Results** Foxp3 expression in spleen lymphocyte and synovial tissue in CIA and 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> artesunate group was obviously higher than that in other artesunate groups, CIA and hydroxychloroquine group( $P<0.05$ ), but the expression of Foxp3 in the CIA and spleen lymphocytes had statistical difference compared with CIA and methylprednisone group and had no statistical difference compared with the CIA and methotrexate group( $P>0.05$ ). **Conclusion** Artesunate can up-regulate the expression of Foxp3 in T lymphocytes and synovial tissue, moreover is positively correlated with the dosage. When the dose is 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, the effect is most significant.

**[Key words]** arthritis, experimental; arthritis, rheumatoid; Foxp3; artesunate

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性、对称性、持续性致残率极高的一种全身反应性自身免疫性疾病,其病变特点是血管翳形成、自身抗体产生以及骨与软骨的损伤,常伴有心血管、肺、心理等系统性症状<sup>[1]</sup>。在骨侵蚀破坏过程中新生血管形成与细胞外基质降解是其两个至关重要的环节。目前临床中以中和炎性因子及减少炎性因子的释放取得了很好的疗效。CD4<sup>+</sup>调节性 T 细胞在抑制自身抗原原答以及维持免疫平衡和免疫耐受方面起到关键的作用<sup>[2]</sup>。在动物模型与人类中,调节性 T 细胞的突变与缺失都会引起自身免疫性疾病的发生,证实调节性 T 细胞在维持外周免疫耐受以及保持免疫平衡中起到重要作用。Foxp3 是 CD4<sup>+</sup>调节性 T 淋巴细胞的特异性标志<sup>[3]</sup>,在调控 CD4<sup>+</sup>调节 T 细胞的发育、表达及功能中发挥了决定性作用<sup>[4-5]</sup>。目前大量试验证实青蒿琥酯为一种低毒、高效的潜在免疫抑制剂<sup>[6]</sup>,先前研究表明,青

蒿琥酯不仅能通过对 NF-κB 通路的调节抑制脂多糖(LPS)对滑膜细胞的刺激,减少肿瘤坏死因子(TNF)-α的释放<sup>[7-8]</sup>,还可抑制白细胞介素(IL)-17、TNF-α的分泌,最终两者的协同作用使滑膜细胞分泌炎症因子减少,从而减少血管翳的形成及骨与软骨的侵蚀<sup>[9-10]</sup>。本课题拟从 T 淋巴细胞转录因子角度探讨青蒿琥酯是否通过上调翼状螺旋/叉头转录因子(Foxp3)而起免疫调节作用;明确青蒿琥酯确切治疗靶位,为以后临床实际中应用青蒿琥酯治疗 RA 提供坚实的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SD 大鼠,雄性,70 只,体质量 100 g 左右,鼠龄 4 周。桂林医学院实验动物中心提供。

**1.2 主要试剂** 天然牛 II 型胶原:Chondrex 公司(美国),每瓶 5 mL;弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, IFA);Sigma 公司(美国),每瓶 10 mL;淋巴细胞激活剂,含高尔基体阻

断剂(BD):BD Pharmingen 公司(美国);抗大鼠 Foxp3 抗体(PE),抗大鼠 CD4 抗体(APC),大鼠 IgG2a 同型对照(PE),Foxp3 转录因子染色缓冲液:eBioscience(美国);青蒿琥酯 桂林南药股份有限公司;甲氨蝶呤(methotrexate,MTX),每片 2.5 mg,上海信谊制药厂;甲基泼尼松龙(Prednisone,Pred),每支 20 mg,湖北远成药业有限公司;硫酸羟氯喹(hydroxychloroquine,Hcq),每片 0.1 g,上海中西制药有限公司。Anti-Foxp3 抗体(Abcom 公司,美国)。

### 1.3 方法

**1.3.1 CIA 动物模型的制备** 实验前在冰上将牛 II 型胶原缓慢滴加至等体积的弗氏完全佐剂(CFA)中并用注射器充分乳化,使得胶原终浓度为 1 mg/mL。将制备好的胶原和佐剂混合物置于冰上保存备用。初次免疫:戊巴比妥钠(0.1 mL/100 g)麻醉大鼠,并将尾根部鼠毛用手术刀刮除,CIA 模型组大鼠给予 0.2 mL 的胶原乳化液尾根部皮内注射,对照组健康大鼠尾根部给予等量的生理盐水皮内注射;加强免疫:于第 7 天给予模型组对侧尾根部加强免疫 0.1 mL 的乳化液,对照组给予对侧尾根部等量的生理盐水。最终采用 AI 评分<sup>[11]</sup> 6 分以上的动物模型来进行实验,有 56 只造模成功。

**1.3.2 实验分组** 将关节炎评分达到 6 分以上的 CIA 模型大鼠随机分为 7 组(每组 8 只)并与健康对照大鼠(9 只)共分为 8 组,分别给予不同的药物观察。具体如下:健康大鼠对照组(A组);CIA 模型对照组(B组);CIA 模型+青蒿琥酯(5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)为 C 组;CIA 模型+青蒿琥酯(10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)为 D 组;CIA 模型+青蒿琥酯(20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)为 E 组;CIA 模型+硫酸羟氯喹(40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)为 F 组;CIA 模型+甲氨蝶呤(每周 2.7 mg/kg)为 G 组;CIA 模型+甲基泼尼松龙(5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)为 H 组。

根据先前的研究<sup>[12]</sup>,设初次免疫为第 0 天,灌胃给药开始于初次免疫后第 14 天,灌胃过程持续 18 周,到大鼠全部处死历时 20 周,3 周为 1 个疗程。青蒿琥酯、甲氨蝶呤、硫酸羟氯喹、甲基泼尼松龙采用灌胃给药法,A、B 组分别予等量蒸馏水灌胃及等量生理盐水注射。

**1.3.3 流式细胞术具体步骤** 取 2 管细胞,分别加入 0.5 μL 淋巴细胞激活剂。混匀后,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 6 h。加入 1 mL 流式缓冲液(FACS buffer),离心 1 500 r/min,5 min,弃上清液。细胞表面染色:将细胞用 200 μL FACS buffer 进行重悬,重悬后于各染色管中加入 CD4-APC 表面染色试剂 5 μL,混匀后于室温暗处孵育 30 min。固定与破膜:分别加入 1 mL Foxp3/Transcription Factor,在 4 °C 暗处条件下孵育 40 min。细胞内染色:每管加入 100 μL 破膜剂 buffer,而后在胞内染色管中分别加入 5 μL 大鼠 IgG2a 同型对照(PE)和 5 μL Foxp3-PE 荧光抗体,充分混匀后于 4 °C 暗处孵育 30 min。取出后加入 1 mL 破膜剂 buffer,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液;将细胞重悬于 200 μL FACS buffer 中,上机分析。流式细胞术结果分析:用 CD4 设门,选定 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞;绘制散点图,在此基础上确定 CD4<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup> 调节 T 细胞百分比。然后利用上游的统计方法进行分析。

**1.3.4 免疫组化检测步骤** 踝关节取材:腹腔注射适量的水合氯醛,然后采用脱颈椎脱臼法处死大鼠,截取右下肢,切除脂肪等软组织后,切取后肢胫骨下端、腓骨下端并分离踝关节,用 PBS 冲洗后浸泡于 PBS 中。留取踝关节常规脱钙、石蜡包埋。

按照试剂说明书步骤检测大鼠踝关节滑膜组织 Foxp3 水平。

**1.4 统计学处理** SPSS17.0 统计学软件用于对所得数据分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  来表示,单因素方差分析用于组间比较,两样本之间的比较采用两独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 CIA 大鼠的临床表现** 本研究采用尾根部皮内注射的方法免疫大鼠,初次免疫后 9~21 d,有 56 只造模成功(56/61)。初次免疫 9 d 后开始出现关节炎,表现为足小趾或踝关节出现红肿(图 1),部分大鼠后腿不能爬行或出现肘关节红肿。在免疫后第 42 天左右 CIA 模型组关节炎指数达到高峰以后逐渐转为慢性期。初次免疫后第 10 周,C 组关节炎指数在 9.0 分左右,D 组关节炎指数在 7.0 分左右,E 组关节炎指数在 5.0 分左右,H 组关节炎指数在 3.0 分左右,G 组关节炎指数在 5.0 分左右,F 组关节炎指数在 7.5 分左右,B 组关节炎指数在 10.5 分左右。初次免疫后第 21 周,C 组关节炎指数在 7.0 分左右,D 组关节炎指数在 5.0 分左右,E 组关节炎指数在 3.0 分左右,H 组关节炎指数在 3.0 分左右,G 组关节炎指数在 5.0 分左右,F 组关节炎指数在 7.5 分左右,B 组关节炎指数在 11.0~14.0 分左右,由此可见 E 组在改善关节症状方面疗效显著。

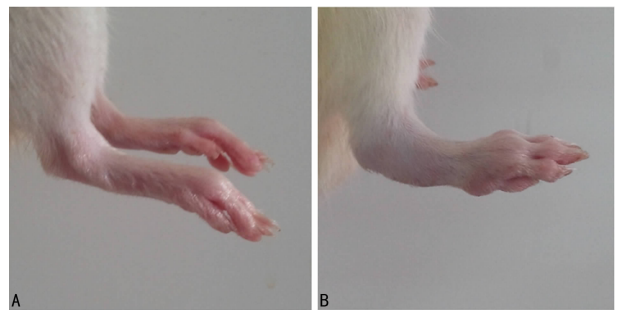
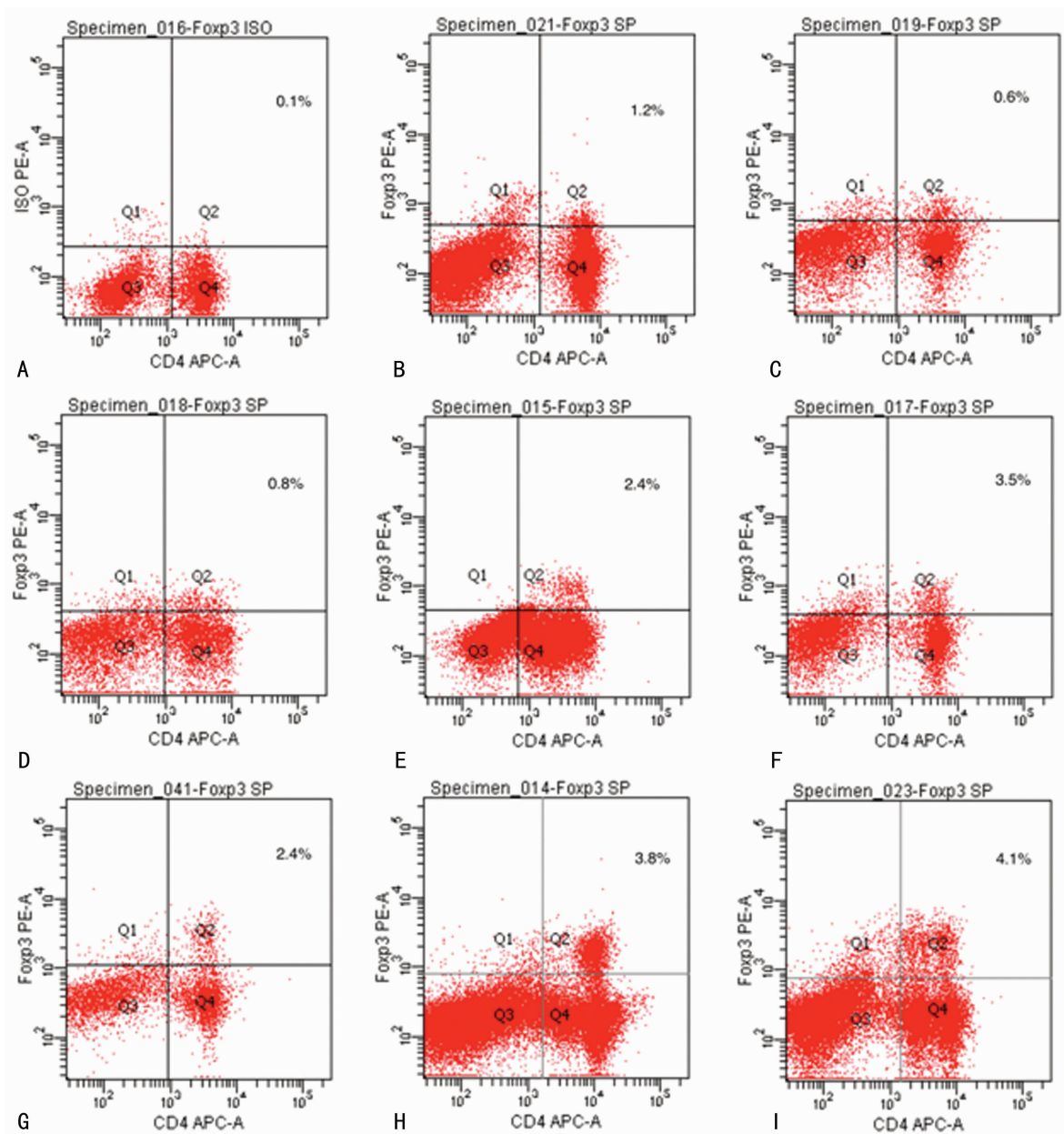


图 1 A 组大鼠;B 组大鼠。

图 1 大鼠踝关节的比较

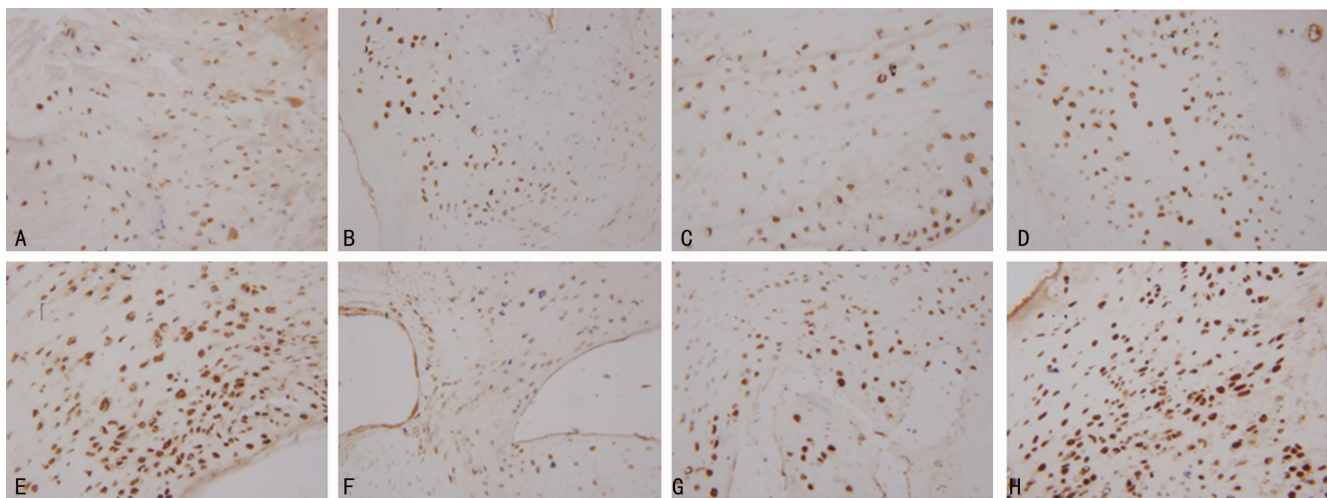
**2.2 脾淋巴细胞表达 Foxp3 流式细胞学检测** A~H 组 Foxp3 表达百分比(%)分别为 1.171±0.191、0.529±0.138、0.729±0.095、2.342±0.217、3.471±0.123、2.371±0.162、3.771±0.109、4.014±0.271。与 A 组比较,Foxp3 在 B 组中表达降低( $P < 0.05$ );在 C、D、E 各组比较中发现 Foxp3 表达呈剂量依赖性增长,E 组中 Foxp3 表达最高,且组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );其中 D 组与 F 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但 E 组与 F 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );G 组与 E 组比较差异有统计学意义( $P > 0.05$ );H 组中 Foxp3 表达量最高,与 E 组、G 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。流式细胞学检测 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中 Foxp3 的表达见图 2。

**2.3 免疫组织化学法检测大鼠踝关节滑膜组织中 IL-17/Foxp3 的表达** 免疫组织化学分析结果显示,Foxp3 除了表达于滑膜细胞层及血管周围外,在软骨表面也有表达,其主要定位于细胞核及胞浆中,为棕褐色颗粒。A~H 组 Foxp3 值分别为:0.048 7±0.008 6、0.018 4±0.004 3、0.037 9±0.009 6、0.043 4±0.004 2、0.061 7±0.007 2、0.034 3±0.008 4、0.054 3±0.008 2、0.065 9±0.008 2,方差分析显示 B 组 Foxp3 表达明显低于其他组( $P < 0.05$ ),E 组 Foxp3 表达与 G 组、C 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。各组大鼠关节滑膜 Foxp3 免疫组化染色见图 3。



A:Foxp3 同型对照;B:A组;C:B组;D:C组;E:D组;F:E组;G:F组;H:G组;I:H组。

图 2 流式细胞学检测 CD4 T 淋巴细胞中 Foxp3 的表达



A:A组; B:B组; C:C组; D:D组; E:E组; F:F组; G:G组; H:H组。

图 3 各组大鼠关节滑膜 Foxp3 免疫组化染色(×200)

### 3 讨 论

RA 是以小关节病变为主要临床表现可以累及全身的系统性自身免疫性疾病。RA 的病因、发病机制尚未明确阐明,目前 CIA 模型是研究 RA 常用的最经典动物模型<sup>[13]</sup>。青蒿素及其衍生物被临床认为是治疗恶性和氯喹抵抗的疟疾最有效和安全的药物。青蒿琥酯是青蒿素的一种半合成衍生物。最近研究提示,青蒿素及其衍生物可能还具有抗炎和免疫调节作用。前期研究发现,青蒿琥酯除调节 NF- $\kappa$ B 信号途径抑制 LPS 诱导的 RA 滑膜细胞分泌 TNF- $\alpha$  外,其尚可下调 IL-17 的活性而发挥作用<sup>[14]</sup>。本文拟从 T 淋巴细胞转录因子角度探讨其是否通过上调转录因子 Foxp3 的表达进而发挥其免疫调节作用。

本文采用体外培养不同药物干预的 CIA 大鼠滑膜细胞及体内 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞研究发现,青蒿琥酯能明显抑制类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的增生,并且呈剂量依赖性。经过青蒿琥酯的干预,无论是 5、10、20 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> 均可上调大鼠滑膜细胞蛋白及大鼠体内 T 淋巴细胞对 Foxp3 的表达。其中以 20 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> 最为显著,且优于传统治疗类风湿关节炎用药羟氯喹,但与甲氨蝶呤作用相当,略低于甲泼尼龙组。结合以往实验予大鼠体外胃饲青蒿琥酯可明显减轻大鼠关节肿胀及前期发现其可抑制 IL-17、TNF- $\alpha$ 、MMP3 等。本研究认为青蒿琥酯在控制及缓解 CIA 大鼠的症状有明显作用,其抑制 IL-17、TNF- $\alpha$ 、MMP3 及炎性因子的主要机制可能是通过上调 Foxp3 的基因及蛋白表达,从而达到抑制炎性因子、治疗类风湿关节炎的目的<sup>[15]</sup>。

本研究揭示了青蒿琥酯通过调控 T 淋巴细胞转导信号通路,诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞高表达 Foxp3,进而调控 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs 细胞的生长、分化与繁殖,调控身体多个生物学过程以及对机体的免疫功能进行调节。本研究分析了青蒿琥酯可能的治疗靶点,为青蒿琥酯在干预人滑膜细胞提供试验基础并为其用于 RA 临床治疗的深入研究提供理论依据<sup>[16]</sup>。

### 参考文献

- [1] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *N E J Med*, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [2] Yuan X, Cheng G, Malek TR. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance[J]. *Immunol Rev*, 2014, 259(1): 103-114.
- [3] Gran B, Zhang GX, Yu S, et al. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis; evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination[J]. *J Immunol*, 2002, 169(12): 7104-7110.
- [4] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *Nature Immunol*, 2003, 4(4): 330-336.
- [5] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. *Science (New York)*, 2003, 299(569): 1057-1061.
- [6] Xu H, He Y, Yang X, et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF-alpha-induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF-kappaB and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Rheumatol (Oxford)*, 2007, 46(6): 920-926.
- [7] Granet C, Maslinski W, Miossec P. Increased AP-1 and NF-kappaB activation and recruitment with the combination of the proinflammatory cytokines IL-1beta, tumor necrosis factor alpha and IL-17 in rheumatoid synoviocytes[J]. *Arthr Res Ther*, 2004, 6(3): 190-198.
- [8] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system[J]. *Ann Rev Immunol*, 2009, 27: 693-733.
- [9] Kim JM, Jeong JG, Ho SH, et al. Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(18): 1543-1550.
- [10] Pan RY, Chen SL, Xiao X, et al. Therapy and prevention of arthritis by recombinant adeno-associated virus vector with delivery of interleukin-1 receptor antagonist[J]. *Arthr Rheum*, 2000, 43(2): 289-297.
- [11] Cho YG, Cho ML, Min SY, et al. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis[J]. *Autoimm Rev*, 2007, 7(1): 65-70.
- [12] 刘丽娟, 蒋川, 彭明欢, 等. 青蒿琥酯对胶原诱导型关节炎大鼠的影响[J]. *中药材*, 2013, 36(5): 790-792.
- [13] Durie FH, Fava RA, Foy TM, et al. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40[J]. *Science*, 1993, 261(5126): 1328-1330.
- [14] 莫汉有, 王丽芳, 周润华, 等. 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血 IL-17、MMP-3 及 MMP-9 的影响[J]. *重庆医学*, 2011, 40(7): 628-630.
- [15] Aldieri E, Atragne D, Bergandi L, et al. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF- $\kappa$ B activation[J]. *FEBS Letters*, 2003, 552(2/3): 141-144.
- [16] Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases[J]. *Arthr Res Ther*, 2009, 11(3): 224.

(收稿日期: 2015-11-29 修回日期: 2015-12-16)

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.13.002

## miR-137 基因多态性与中国南方人群精神分裂症的关联性研究\*

罗旭东<sup>1</sup>,符家武<sup>2</sup>,梁爱萍<sup>3</sup>,殷静雯<sup>1△</sup>

(广东医科大学附属第一医院:1.精神心理科;2.神经内科;3.血液透析中心,广东湛江 524001)

**[摘要]** **目的** 采用中国南方汉族人群样本对 miR-137 基因多态性与精神分裂症的相关性进行研究。**方法** 收集 944 例精神分裂症患者(精神分裂症组)及 938 例健康对照者(对照组)外周血液,采用 SnaPshot 技术对 rs1625579 位点进行基因分型,比较该位点等位基因频率分布在精神分裂症组和对照组,以及在精神分裂症患者临床变量分组中的差异。**结果** 在精神分裂症组和对照组中基因型分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.426, P = 0.035$ ),等位基因分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.813, P = 0.028$ )。按性别分组后,女性精神分裂症患者和对照组之间基因型分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 3.928, P = 0.047$ ),等位基因分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 3.957, P = 0.047$ )。**结论** 研究结果证实了 miR-137 基因多态性与精神分裂症的相关性,同时发现了 miR-137 在精神分裂症发病调控过程中的性别特异性。

**[关键词]** 多态现象,遗传;基因;精神分裂症;miR-137;rs1625579 多态性;汉族**[中图分类号]** R749.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)13-1733-03

## Association of miRNA-137 polymorphism with schizophrenia in a southern Chinese Han population\*

Luo Xudong<sup>1</sup>, Fu Jiawu<sup>2</sup>, Liang Aiping<sup>3</sup>, Yin Jingwen<sup>1△</sup>

(1. Department of Psychiatry; 2. Department of Neurology; 3. Department of Hemodialysis, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

**[Abstract]** **Objective** To assay the association between miR-137 gene polymorphism and schizophrenia in a southern Chinese Han population. **Methods** We genotyped 944 schizophrenic patients and 938 controls for the risk single nucleotide polymorphism (SNP) rs1625579 by the SnaPshot technique and compared the clinical profiles and neurocognitive functions of different genotypes. **Results** Both the genotype and allele distributions of the rs1625579 SNP were significantly different between patients and controls ( $\chi^2 = 4.426, P = 0.035; \chi^2 = 4.813, P = 0.028$ ). Gender-stratified analysis revealed the significant difference in genotype and allele distributions in female patients ( $\chi^2 = 3.928, P = 0.047; \chi^2 = 3.957, P = 0.047$ ). **Conclusion** The results of our study verifies that miR-137 gene polymorphism is associated with schizophrenia. It is discovered that miR-137 has the gender specificity in the regulation process of schizophrenia pathogenesis.

**[Key words]** polymorphism, genetic; genes; schizophrenia; miR-137; rs1625579 polymorphism; Han nationality

精神分裂症是由多基因参与的多表型疾病<sup>[1]</sup>,是由易感基因失调的“积累”而导致的神经系统功能障碍<sup>[2]</sup>。在神经系统中,miRNA 通过级联效应调控多个神经发育信号通路和多个靶基因的表达进而精细地调节胚胎期及成年期的神经发生、突触发育、树突蛋白的合成、轴突导向和神经元塑形等过程。miRNA 表达失调会引起神经结构和功能异常<sup>[3-5]</sup>,导致精神分裂症异常表型的产生<sup>[6]</sup>。近年来 miR-137 与精神分裂症的关系成为研究热点,miR-137 调控的靶基因参与大脑结构发育和功能成熟的各个环节,包括对神经细胞的增殖、分化、成熟,突触可塑性及神经细胞间信号传递<sup>[7-10]</sup>。同时其多个靶基因已被证实与精神分裂症相关,包括 T 细胞因子 4(T cell factor-4, TCF-4)<sup>[11]</sup>、L 型钙通道  $\alpha 1C$  亚基(calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit, CACNA1C)<sup>[12-14]</sup>、锌指蛋白 804A(zinc finger protein 804A, ZNF804A)<sup>[15]</sup>、CSMD1(CUB and sushi multiple domains 1)和 C10orf26(homo sapiens chromosome 10 open reading frame 26)<sup>[11]</sup>等。因此,miR-137 可能作为精神分裂症基因调控网络的核心因子,在精神分裂症的发病过程中起着重要的作用。

miR-137 基因位于 1 号染色体 1p22,存在多个单核苷酸多

态性位点。其中,rs1625579 在全基因组关联性研究(GWAS)被发现是与精神分裂症关联性最强的位点<sup>[16]</sup>。但是在随后的研究中,该位点与精神分裂症的关系研究出现不一致的结果,在部分欧洲的人群样本中未显示出差异<sup>[17-19]</sup>。而在中国人群样本中,前期研究发现该位点与精神分裂症存在关联性<sup>[20]</sup>。但由于在不同种族人群中等位基因频率的差异易导致研究结果的异质性,特别是 rs1625579 位点等位基因 G 频率较低。为了保证统计效力,本研究进一步扩大样本量,在中国南方人群中验证 rs1625579 与精神分裂症的相关性,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 精神分裂症组血液样本采自 2013 年 9 月至 2014 年 11 月本院精神心理科、解放军第 422 医院、深圳市南山区慢性病防治院 944 例。其中男 603 例,女 341 例,平均年龄( $35.37 \pm 13.79$ )岁。纳入标准:(1)符合美国精神障碍诊断与统计手册第 4 版(DSM-IV)精神分裂症的诊断标准,采取结构化临床访谈(structured clinical interview for DSM-IV, SCID),由两名主治医师以上精神科医师共同完成;(2)生物学父母均为汉族;(3)发病年龄 18~55 岁。排除标准:(1)符合 DSM-IV 诊断标准的分裂情感障碍、心境障碍、精神发育迟滞、

谵妄、痴呆等其他精神障碍；(2)物质滥用所致精神障碍；(3)患有严重的不稳定躯体疾病；(4)妊娠或哺乳期妇女。对照组血液样本采用本院体检中心同期体检者 938 例。其中男 565 例，女 373 例，平均年龄(36.29±12.55)岁。纳入标准：(1)身体健康；(2)个体间无血缘关系；(3)生物学父母为汉族。排除标准：(1)有精神疾病史或精神疾病家族史及家族性遗传病史；(2)患有严重躯体和神经系统疾病、长期物质滥用史；(3)妊娠或哺乳期妇女。精神分裂症组和对照组的年龄和性别分布差异无统计学意义( $P>0.05$ )。所有病例签署知情同意书，本研究已通过本院伦理委员会审查。

## 1.2 方法

### 1.2.1 血液样本采集

在患者知情同意后，抽取外周静脉血 2 mL，乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝，-20℃保存备基因组 DNA 提取。

### 1.2.2 基因组 DNA 提取

应用 TIANamp Blood DNA Kit(天根生化科技有限公司，中国)提取基因组 DNA。应用紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度。

### 1.2.3 基因分型

SNaPshot SNP 分型技术进行 rs1625579 位点分型。引物设计采用在线 Primer3 软件。rs1625579F:5'-TTT AGT CAA CAT TTG CAT TTG GAA GC-3'; rs1625579R:5'-CAA CAG ATT CCA AAG GTC TCT AGT GTG C-3'。PCR 反应体系(20 μL)包含 1×GC Buffer I, 3.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.3 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP), 1 U HotStarTaq 聚合酶(Qiagen Inc., 德国), 1 μL 样本 DNA 和 2 μL PCR 引物。PCR 循环程序:95℃ 2 min; 11 cycles×[94℃ 20 s, (65℃±0.5℃)/cycle 40 s, 72℃ 90 s]; 24 cycles×[94℃ 20 s, 59℃ 30 s, 72℃ 90 s]; 72℃ 2 min。PCR 产物经虾碱酶和外切酶 I 纯化后，用 SNaPshot Multiplex kit (Applied Biosystems Co., Ltd., 美国)进行延伸反应。延伸引物序列为 5'-TTT TTT

TTT TTT TTT TTT TTT AAA CAA GGG AAA TGT TAA TCA CAA TTA-3'。延伸产物用虾碱酶纯化，在 ABI3130xl (Applied Biosystems Co., Ltd., 美国)上样。用 Gene Mapper4.1 (Applied Biosystems Co., Ltd., 美国)进行 SNP 分型。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件分析，计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示，组间比较采用  $t$  检验；计数资料用率表示，组间采用  $\chi^2$  检验。并进行哈迪-温伯格平衡(HWE)检测。应用相对危险度(OR)及 95%CI 计算和评估相对风险。采用 QUANTO 1.2 软件进行统计检验力计算，检验水准  $\alpha=0.05$ ，以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

miR-137 多态位点 rs1625579 在精神分裂症组和对照组中基因型和等位基因频率的分布见表 1。两组分布均符合哈迪温伯格平衡定律，在总体样本中 TT、GT、GG 基因型分布分别为 1 655(87.94%)，216(11.48%)，11(0.58%)；在精神分裂症组中 TT、GT、GG 基因型分别为 845(89.51%)，95(10.06%)，4(0.42%)；对照组中 TT、GT、GG 基因型分别为 810(86.35%)，121(12.90%)，7(0.75%)。由于等位基因 G 频率较低，因此合并 GG 和 GT 组与 TT 进行比较。结果显示，在精神分裂症组和对照组中基因型分布差异有统计学意义( $\chi^2=4.426, P=0.035$ )，等位基因分布差异有统计学意义( $\chi^2=4.813, P=0.028$ )。按性别分组后，女性精神分裂症患者和对照组之间基因型分布差异有统计学意义( $\chi^2=3.928, P=0.047$ )，等位基因分布差异有统计学意义( $\chi^2=3.957, P=0.047$ )。在男性精神分裂症患者和对照组中，基因型分布与等位基因分布差异无统计学意义( $P>0.05$ )。对精神分裂症的临床变量与 rs1625579 的基因型间的差异进行统计，结果显示，TT 基因型患者和 G 等位基因携带患者年龄、发病年龄、家族史等临床变量差异无统计学意义( $P>0.05$ )，见表 2。

表 1 miR-137 基因 rs1625579 多态性在精神分裂症组和对照组的基因型及等位基因频率分布

项目	n	基因型[n(%)]		$\chi^2$	P	等位基因[n(%)]		$\chi^2$	P	HWE		OR	95%CI
		TT	GT+GG			T	G			$\chi^2$	P		
总体				4.426	0.035			4.813	0.028			1.344	1.031~1.751
精神分裂症组	944	845(89.51)	99(10.49)			1 785(94.54)	103(5.46)			0.564	0.453		
对照组	938	810(86.35)	128(13.65)			1 741(92.80)	135(7.20)			1.097	0.295		
男				1.477	0.224			1.774	0.183			1.246	0.901~1.724
精神分裂症组	603	533(88.39)	67(11.61)			1 133(93.95)	73(6.05)			0.321	0.571		
对照组	565	486(86.02)	74(13.98)			1 046(92.57)	84(7.43)			1.318	0.251		
女				3.928	0.047			3.957	0.047			1.595	1.003~2.535
精神分裂症组	341	312(91.50)	29(8.50)			652(95.60)	30(4.40)			0.192	0.661		
对照组	373	324(86.86)	49(13.14)			695(93.16)	51(6.84)			0.044	0.835		

表 2 miR-137 基因 rs1625579 多态性与精神分裂症患者临床变量的关联性分析

变量	样本量 (TT/GT+GG)	基因型		$\chi^2/t$	P
		TT	GT+GG		
年龄( $\bar{x}\pm s$ , 岁)	845/99	35.10±13.74	37.66±14.07	1.715	0.089
发病年龄( $\bar{x}\pm s$ , 岁)	829/99	25.10±9.10	26.06±10.18	0.902	0.367