

Hsa-circRNA-102685 在克罗恩病黏膜组织中的表达及意义

秦芳芳 曹 勇 张 喆 唐与浓

【摘要】 目的 探讨环状 RNA-102685 (hsa-circRNA-102685) 在克罗恩病 (CD) 黏膜组织中的表达水平及意义。方法 选取 2013 年 6 月至 2018 年 6 月中国医科大学附属盛京医院及辽宁省金秋医院收治的共 104 例 CD 患者作为研究对象,另选取同期 100 例结肠息肉患者作为对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测 hsa-circRNA-102685 的相对表达量,并分析其与 CD 严重程度及患者预后的关系。结果 CD 组患者 hsa-circRNA-102685 的相对表达量高于对照组,活动期 CD 患者 hsa-circRNA-102685 的相对表达量高于缓解期 CD 患者,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。轻度组 CD 患者 hsa-circRNA-102685 的相对表达量低于中度组及重度组,且中度组低于重度组,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。104 例 CD 患者随访期间的预后不良发生率为 54.81%。预后不良组患者 hsa-circRNA-102685 的相对表达量高于预后良好组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示,吸烟、肛周病变、肠切除术史、疾病行为、hsa-circRNA-102685 与 CD 患者的预后密切相关。结论 Hsa-circRNA-102685 与 CD 严重程度及患者预后关系密切,检测 hsa-circRNA-102685 的相对表达量有助于评估患者的预后。

【关键词】 环状 RNA-102685; 克罗恩病; 严重程度; 预后

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2020.04.009

Expression and significance of hsa-circRNA-102685 in the mucosa of Crohn's disease QIN Fangfang, CAO Yong, ZHANG Zhe. Department of Digestive Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China; TANG Yunong. Department of Digestive Medicine, Jinqiu Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110015, China

【Abstract】 Objective This paper aims to investigate the expression and significance of circular RNA-102685 (hsa-circRNA-102685) in the mucosa of Crohn's disease (CD). **Methods** A total of 104 CD patients admitted to Shengjing Hospital of China Medical University and Jinqiu Hospital of Liaoning Province from June 2013 to June 2018 were selected and assigned as the study group while 100 patients with colonic polyps in the same period were assigned to the control group. The relative expression of hsa-circRNA-102685 was detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR), and its relationship with CD severity and prognosis was analyzed. **Results** The relative expression of hsa-circRNA-102685 in the CD group was higher than that in the control group, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The relative expression of hsa-circRNA-102685 in patients in the active period was higher than that in the remission period, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The relative expression of hsa-circRNA-102685 in the mild group was lower than that in both the moderate group and the severe group, and that in the moderate group was lower than that in the severe group, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The incidence of poor prognosis was 54.81% in 104 CD patients during follow-

up. The relative expression of hsa-circRNA-102685 in the poor prognosis group was higher than that in the good prognosis group, with a statistically significant difference ($P<0.05$). The Logistic multivariate analysis showed that smoking, perianal lesions, history of bowel resection, disease behavior, and hsa-circRNA-102685 were closely associated with the prognosis of patients with CD. **Conclusions** Hsa-circRNA-102685 is closely related to the severity and prognosis of CD. Detection of the relative expression of hsa-circRNA-102685 is helpful in evaluating the prognosis of patients with CD.

【Key words】 Circular RNA-102685; Crohn's disease; Severity; Prognosis

克罗恩病(CD)是一种肠道慢性炎性疾病,发病率呈逐年升高趋势^[1]。CD 的发病原因尚未完全明确,其具有复发率高、并发症多等特点^[2-3]。随着 CD 的进展,患者可出现肠道狭窄、瘘管等肠道结构性损伤,严重者可发生癌变^[4]。因此,尽早评估 CD 患者的病情,对于制定有效干预措施,从而改善患者的预后具有重要意义。有研究显示,血清胆碱酯酶、红细胞沉降率(ESR)等指标评估 CD 严重程度的敏感度均较低^[5]。因此,急需探寻敏感度、准确度较高的生物学标志物用于评估 CD 的严重程度。有研究指出,Toll 样受体可通过调节 B 细胞的促炎活性参与 CD 的发生、发展过程^[6-7],另有细胞研究表明环状 RNA-102685(hsa-circRNA-102685)可能参与了 Toll 样受体信号转导通路^[8],因此推测 hsa-circRNA-102685 可能参与了 CD 的发生和发展。本文探讨了 hsa-circRNA-102685 在 CD 黏膜组织中的表达水平及意义,并分析其与 CD 严重程度及患者预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 6 月至 2018 年 6 月中国医科大学附属盛京医院及辽宁省金秋医院收治的共 104 例 CD 患者作为研究对象(设为 CD 组),CD 诊断标准参照《中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》^[9]。结肠镜检查结果显示,CD 患者中缓解期 41 例,活动期 63 例。纳入标准:(1)符合 CD 的诊断标准;(2)初次确诊为 CD;(3)年龄 ≥ 18 岁;(4)入组前未服用免疫抑制剂、非甾体类抗炎药等;(5)签署知情同意书。排除标准:(1)合并消化道恶性肿瘤;(2)合并严重的心、肝、肾功能障碍;(3)合并全身感

染性疾病;(4)随访失联。选取同期在本院接受单发息肉切除术的 100 例结肠息肉患者作为对照组。104 例 CD 患者中男性 64 例,女性 40 例,年龄 18~36 岁,平均年龄为(27.93 \pm 3.19)岁。对照组中男性 58 例,女性 42 例,年龄 20~34 岁,平均年龄为(28.44 \pm 3.23)岁。两组在性别($\chi^2=0.266$, $P=0.606$)、年龄($t=1.135$, $P=0.258$)方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究获得医院医学伦理委员会批准。

1.2 检测方法

抽取患者入组次日清晨空腹外周静脉血 10 mL,室温下 4 000 r/min 离心 10 min,离心半径为 8 cm,分离上层血清,置于-20℃冰箱,待测。采用免疫比浊法检测血清 C 反应蛋白(CRP)水平,试剂盒购自北京世纪沃德生物科技有限公司;采用 Sysmex XE-5000 全自动血细胞分析仪(购自日本希森美康)测定血液 ESR、白蛋白、血红蛋白水平。

采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 CD 组和对照组的 hsa-circRNA-102685 相对表达量。采集患者黏膜组织后,30 min 内将保存组织样本的冻存管置于液氮罐中保存待检。在液氮中研磨 CD 患者的炎性组织及对照组的正常黏膜组织,采用 TRIzol 试剂法提取总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 的纯度及表达水平。应用核酸蛋白仪和琼脂糖电泳对提取的 RNA 进行分析。取 5 μ L 总 RNA,85℃水浴 5 min 后加入反转录反应液,44℃孵育 60 min 后终止,留取产物待用。扩增条件为:95℃预变性 5 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 hsa-circRNA-102685 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列
hsa-circRNA-102685	正向:5'-CAGACCGACGAGTCTCCTGG-3'
	反向:5'-TTGCTGATCCCGCTATGG-3'
GAPDH	正向:5'-GGAGCGAGATCCCTC-CAAAAT-3'
	反向:5'-GGCTGTTGTCACT-TCTCATGG-3'

1.3 CD 严重程度评估

根据克罗恩病活动指数(CDAI)评分评估疾病活动期的严重程度,主要包括腹痛、腹部包块、腹泻及伴随疾病 4 个方面^[9]。腹痛按轻度、中度、重度疼痛分别记为 1、2、3 分;腹部包块按照可疑、确定、伴触痛分别记为 1、2、3 分;腹泻每日 1 次记 1 分;伴随疾病包括关节痛、虹膜炎、结节性红斑、坏疽性脓皮病、阿弗他溃疡、裂沟、新瘻管、脓肿,每种症状记 1 分。CDAI 评分 ≤ 4 分为缓解期, >4 分为活动期。CDAI 评分 5~7 分为轻度,8~16 分为中度, >16 分为重度。

1.4 随访

采用复诊方式对 CD 患者进行为期 3 年的跟踪随访,记录患者预后情况。本研究将复发、CD 相关再入院及发生 CD 相关结肠直肠癌定义为预后不良。随访起始时间为 2013 年 6 月 20 日,截止时间为 2018 年 6 月 13 日。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。服从正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 S-N-K 检验。计数资料用例(%)表示,采用卡方检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 hsa-circRNA-102685 评估 CD 患者预后的价值。采用多因素 Logistic 回归方法分析影响 CD 患者预后的相关因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 hsa-circRNA-102685 相对表达量的比较

CD 组患者 hsa-circRNA-102685 的相对表达量为 4.27 ± 0.93 , 高于对照组 (2.35 ± 0.62), 且差异具有统计学意义 ($t = 17.280, P < 0.05$)。

2.2 不同病变部位 CD 患者 hsa-circRNA-102685 相对表达量的比较

CD 组患者中,病变位于回肠末端($n = 37$)、结肠($n = 34$)、回结肠($n = 33$)者的 hsa-circRNA-102685 相对表达量分别为 4.31 ± 1.02 、 4.26 ± 0.95 、 4.24 ± 0.89 。不同病变部位 hsa-circRNA-102685 相对表达量的差异无统计学意义 ($F = 0.014, P = 0.991$)。

2.3 不同严重程度 CD 患者 hsa-circRNA-102685 相对表达量的比较

缓解期 CD 患者 hsa-circRNA-102685 的相对表达量为 3.72 ± 0.87 , 低于活动期 (4.62 ± 0.95),

差异有统计学意义 ($t = 4.878, P < 0.001$)。63 例活动期 CD 患者按照 CDAI 评分评估为轻度组 19 例、中度组 25 例、重度组 19 例。轻度组、中度组、重度组 CD 患者的 hsa-circRNA-102685 相对表达量分别为 3.93 ± 0.90 、 4.55 ± 0.94 、 5.40 ± 1.03 , 3 组比较差异有统计学意义 ($F = 11.768, P < 0.001$), 其中重度组 hsa-circRNA-102685 的相对表达量高于中度组及轻度组, 且中度组高于轻度组, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

2.4 hsa-circRNA-102685 与 CD 患者预后的关系

104 例 CD 患者在随访期间的预后不良发生率为 54.81% (57/104), 其中 CD 复发 23 例 (22.12%)、CD 相关再入院 33 例 (31.73%)、结肠癌变 1 例 (0.96%)。预后不良组患者 hsa-circRNA-102685 的相对表达量为 4.83 ± 1.02 , 高于预后良好组 (3.59 ± 0.96), 差异有统计学意义 ($t = 6.335, P < 0.001$)。Hsa-circRNA-102685 评估 CD 患者预后的 ROC 曲线下面积(AUC)、敏感度、特异度和最佳截断点分别为 0.806 (95%CI: 0.716~0.877)、84.21%、68.09% 和 3.81。见图 1。

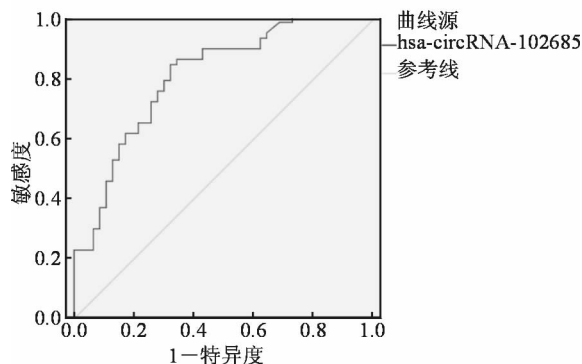


图 1 hsa-circRNA-102685 评估 CD 患者预后的 ROC 曲线

2.5 不同预后患者的基本资料比较

预后良好组与预后不良组在年龄、性别、体质指数(BMI)、病变部位、肠道损伤、治疗方案、治疗时间方面比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 预后不良组中吸烟、肛周病变、肠切除手术史、疾病穿透行为的占比及 CRP、ESR 水平高于预后良好组, 而白蛋白、血红蛋白水平低于预后良好组, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。具体见表 2。

2.6 影响 CD 患者预后的因素分析

根据 CRP、ESR、白蛋白、血红蛋白、hsa-circRNA-102685 评估 CD 患者预后的最佳截断值将其转换为二分类变量。将吸烟(否 = 0, 是 = 1)、

肛周病变(无 = 0, 有 = 1)、肠切除术史(无 = 0, 有 = 1)、疾病行为(非狭窄非穿透、狭窄 = 0, 穿透 = 1)、CRP($<80.37\ \mu\text{mol/L}$ = 0, $\geq 80.37\ \mu\text{mol/L}$ = 1)、ESR($<12.59\ \text{mm/h}$ = 0, $\geq 12.59\ \text{mm/h}$ = 1)、白蛋白($\geq 28.53\ \text{g/L}$ = 0, $<28.53\ \text{g/L}$ = 1)、血红蛋白($\geq 124.15\ \text{g/L}$ = 0, $<124.15\ \text{g/L}$ = 1)、hsa-circRNA-102685(<3.82 = 0, ≥ 3.82 = 1)作为自变量, 将 CD 患者的预后情况(预后良好 = 0, 预后不良 = 1)作为因变量, 纳入多因素 Logistic 回归模型, 结果显示吸烟、肛周病变、肠切除术史、疾病行为、hsa-circRNA-102685 与 CD 患者的预后密切相关。见表 3。

表 2 不同预后患者的基本资料比较

项目	预后不良($n=57$)	预后良好($n=47$)	统计值	P 值
年龄/岁	27.42 \pm 4.17	28.55 \pm 4.20	$t=1.371$	0.173
性别/例(%)			$\chi^2=0.190$	0.663
男	34(59.65)	30(63.83)		
女	23(40.35)	17(36.17)		
BMI/kg \cdot m ⁻²	21.35 \pm 3.16	21.84 \pm 2.22	$t=0.896$	0.372
吸烟/例(%)			$\chi^2=4.000$	0.045
是	26(45.61)	14(29.79)		
否	31(54.39)	33(70.21)		
肛周病变/例(%)			$\chi^2=3.929$	0.047
有	21(36.84)	9(19.15)		
无	36(63.16)	38(80.85)		
CRP/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	86.73 \pm 16.48	72.39 \pm 15.45	$t=4.542$	<0.001
ESR/mm \cdot h ⁻¹	15.38 \pm 3.62	11.83 \pm 3.05	$t=5.339$	<0.001
白蛋白/g \cdot L ⁻¹	25.28 \pm 5.71	30.81 \pm 6.52	$t=4.610$	<0.001
血红蛋白/g \cdot L ⁻¹	120.43 \pm 13.72	125.82 \pm 11.83	$t=2.120$	0.036
病变部位/例(%)			$\chi^2=1.030$	0.597
回肠末段	18(31.58)	19(40.43)		
结肠	19(33.33)	15(31.91)		
回结肠	20(35.09)	13(27.66)		
肠道损伤/例(%)			$\chi^2=0.881$	0.348
是	5(8.77)	2(4.26)		
否	52(91.23)	45(95.74)		
肠切除术史/例(%)			$\chi^2=4.620$	0.032
有	8(14.04)	1(2.13)		
无	49(85.96)	46(97.87)		
疾病行为/例(%)			$\chi^2=7.343$	0.025
非狭窄非穿透	13(22.81)	21(44.68)		
狭窄	18(31.58)	15(31.91)		
穿透	26(45.61)	11(23.40)		
治疗方案/例(%)			$\chi^2=0.693$	0.405
激素联合免疫抑制剂	43(75.44)	32(68.09)		
抗 TNF- α 抗体	14(24.56)	15(31.91)		
治疗时间/年	1.03 \pm 0.17	1.05 \pm 0.15	$t=0.629$	0.531

注: TNF- α 为肿瘤坏死因子- α

表 3 影响 CD 患者预后的因素分析

项目	β 值	标准误	Wald 值	P 值	OR 值	95%CI
吸烟	2.381	0.872	8.097	0.004	12.173	2.175~65.621
肛周病变	2.647	0.946	10.053	<0.001	15.835	3.382~76.062
CRP	1.276	0.710	3.215	0.071	3.611	0.893~14.587
ESR	1.052	0.648	2.482	0.115	2.870	0.746~11.932
白蛋白	-0.988	0.538	1.979	0.160	0.833	0.672~1.661
血红蛋白	-1.188	0.679	2.863	0.086	0.691	0.531~1.255
肠切除术史	2.703	1.203	12.872	<0.001	16.884	3.726~83.206
疾病行为	2.274	0.846	6.393	0.010	10.635	1.863~52.731
hsa-circRNA-102685	1.962	0.763	5.735	0.038	9.427	1.520~44.771

3 讨论

circRNA 是区别于传统线性 RNA 的一类新型非编码 RNA,具有闭合环状结构,在人类细胞中广泛表达^[10-11]。circRNA 可通过吸附 miRNA 调控靶基因的表达^[12]。近年来,关于 circRNA 用于疾病诊断及靶向治疗已成为临床研究的热点。Hsa-circRNA-102685 作为 circRNA 家族一员,可参与细胞凋亡过程。有研究表明,hsa-circRNA-102685 对 p53 基因具有调节作用,而 p53 基因的异常表达与 CD 的发生、发展密切相关^[8]。目前有关 hsa-circRNA-102685 在 CD 中的表达水平及与患者病情之间关系的报道较少,本文就 hsa-circRNA-102685 与 CD 严重程度的关系进行了探讨。

本研究结果显示,CD 组患者 hsa-circRNA-102685 的相对表达量低于对照组,提示 hsa-circRNA-102685 可能与 CD 的发生存在联系。进一步研究发现,活动期 CD 患者的 hsa-circRNA-102685 相对表达量高于缓解期,提示 hsa-circRNA-102685 可作为评估 CD 病情的潜在标志物。随后,本研究比较了不同严重程度 CD 患者的 hsa-circRNA-102685 相对表达量,结果显示重度组患者的 hsa-circRNA-102685 相对表达量高于中度组及轻度组,而中度组高于轻度组,表明 hsa-circRNA-102685 可能与 CD 严重程度相关。本研究通过随访发现,预后不良组患者的 hsa-circRNA-102685 相对表达量高于预后良好组,提示检测 hsa-circRNA-102685 相对表达量可能有助于评估 CD 患者的预后。因此,本研究进一步构建了 hsa-circRNA-102685 评估 CD 患者预后的 ROC 曲线,结果显示 hsa-circRNA-102685 评估患者预后的 AUC 为 0.806,提示效能较高。多因素 Logistic 回归分析显

示,吸烟、肛周病变、肠道损伤、肠切除术史、疾病行为与 CD 患者的预后密切相关,与既往的研究结果相符^[13-14]。

Toll 样受体可识别肠道内致病菌的 DNA,且活化后的 Toll 样受体可通过激活肠道白细胞介素-10(IL-10)等炎症因子,参与肠道免疫反应^[15]。肠道菌群免疫失衡后被 Toll 样受体识别,在机体免疫、肠道炎症反应、遗传基因等多种因素作用下表达升高,引起下游相关因子如 IL-1、核因子- κ B 的变化,促使 CD 发生^[16-17],hsa-circRNA-102685 可促进 Toll 样受体表达^[8]。此外,hsa-circRNA-102685 具有调节 p53 基因表达的作用,p53 可促进炎症因子聚集,且 p53 磷酸化后可促进结肠黏膜细胞凋亡,并调节其下游基因,参与 CD 的病理生理过程^[18]。由此推测,hsa-circRNA-102685 可能通过调节 Toll 样受体及 p53 的表达,参与 CD 的疾病进展。

综上所述,hsa-circRNA-102685 与 CD 患者的严重程度及预后密切相关,检测 hsa-circRNA-102685 表达水平有助于评估患者的预后。今后将对 hsa-circRNA-102685 参与 CD 患者严重程度及预后的病理生理机制作进一步探讨。

参 考 文 献

1 巫协宁. 克罗恩病发病机制的初步探索[J]. 国际消化病杂志, 2017, 37(3): 135-139.

2 Domènech E, Garcia V, Iborra M, et al. Incidence and management of recurrence in patients with Crohn's disease who have undergone intestinal resection: the practicrohn study[J]. Inflamm Bowel Dis, 2017, 23(10): 1840-1846.

3 Yang KM, Yu CS, Lee JL, et al. Risk factors for postoperative recurrence after primary bowel resection in patients with Crohn's disease[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(38): 7016-7024.

4 Yano Y, Matsui T, Hirai F, et al. Cancer risk in Japanese

- Crohn's disease patients: investigation of the standardized incidence ratio[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(8): 1300-1305.
- 5 陆世珉, 田山, 苏乐乐, 等. 血清胆碱酯酶评估炎症性肠病活动度的价值分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(3): 282-286.
- 6 McDonnell M, Liang Y, Noronha A, et al. Systemic Toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(1): 298-307.
- 7 Leal RF, Milanski M, Ayrizono M de L, et al. Toll-like receptor 4, F4/80 and pro-inflammatory cytokines in intestinal and mesenteric fat tissue of Crohn's disease[J]. Int J Clin Exp Med, 2013, 6(2): 98-104.
- 8 Qiao YQ, Cai CW, Shen J, et al. Circular RNA expression alterations in colon tissues of Crohn's disease patients[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5): 4500-4506.
- 9 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见[J]. 中华内科杂志, 2008, 47(1): 73-79.
- 10 Pan H, Li T, Jiang Y, et al. Overexpression of circular RNA ciRS-7 abrogates the tumor suppressive effect of miR-7 on gastric cancer via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 440-446.
- 11 Xie H, Ren X, Xin S, et al. Emerging roles of circRNA_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 26680-26691.
- 12 Xu Y, Yao Y, Zhong X, et al. Downregulated circular RNA hsa_circ_0001649 regulates proliferation, migration and invasion in cholangiocarcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(2): 455-461.
- 13 贾雪梅, 张吉翔, 邓欢, 等. 克罗恩病诊断延迟对早期病程的影响[J]. 中华消化杂志, 2018, 38(5): 318-323.
- 14 de Barcelos IF, Kotze PG, Spinelli A, et al. Factors affecting the incidence of early endoscopic recurrence after ileocolonic resection for Crohn's disease: a multicentre observational study [J]. Colorectal Dis, 2017, 19(1): O39-O45.
- 15 Török HP, Bellon V, Konrad A, et al. Functional Toll-Like Receptor (TLR) 2 polymorphisms in the susceptibility to inflammatory bowel disease [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175180.
- 16 Günaltay S, Nyhlin N, Kumawat AK, et al. Differential expression of interleukin-1/Toll-like receptor signaling regulators in microscopic and ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(34): 12249-12259.
- 17 范玉晶, 宋吉涛, 裴风华, 等. TLRs 在溃疡性结肠炎小鼠结肠中的表达研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23(5): 538-539.
- 18 Cui X, Shan X, Qian J, et al. The suppressor of cytokine signaling SOCS1 promotes apoptosis of intestinal epithelial cells via p53 signaling in Crohn's disease[J]. Exp Mol Pathol, 2016, 101(1): 1-11.

(收稿日期:2019-12-06)

(本文编辑:周骏)