

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.04.20

◆ 论著 ◆

女性类风湿关节炎患者 miR-146a、miR-23b 的表达及雌激素对其的影响

祝静^{1,2,3}, 晏波^{1,2}, 蒋瑶¹, 王东生⁴, 邢艳^{1,2,3}

(1. 川北医学院医学检验系; 2. 川北医学院附属医院检验科; 3. 川北医学院转化医学研究中心, 四川南充 637000; 4. 四川省肿瘤医院检验科, 四川成都 610000)

【摘要】目的: 比较女性类风湿关节炎(RA)患者 miR-146a、miR-23b 的表达水平与健康者的差异, 分析 miRNAs 与炎症因子 IL-17 及实验室指标的相关性, 以明确 miR-146a、miR-23b 是否与 RA 相关; 分析雌激素对 miR-146a、miR-23b 及 IL-17 表达的影响, 以明确雌激素影响 RA 的可能机制。**方法:** 实时荧光定量 PCR 检测 27 例女性 RA 患者及 27 名女性健康体检者 PBMCs 中 miR-146a、miR-23b 的表达水平, 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血浆 IL-17 的浓度, 统计分析 RA 患者 miR-146a、miR-23b 及 IL-17 的表达水平与健康者的差异; 收集 RA 患者临床实验室指标 ESR、CRP、抗 CCP 抗体、RF 的检测结果, 计算 DAS28 评分, 分析 miR-146a、miR-23b 分别与血浆 IL-17、ESR、CRP、抗 CCP 抗体、RF 及 DAS28 的相关性。再用雌二醇处理 RA 组和对照组的 PBMCs 后同样检测 miR-146a、miR-23b 及培养上清 IL-17 的水平, 分析雌激素处理前后其水平变化。**结果:** 女性 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a、miR-23b 显著高于健康对照 ($P < 0.05$), miR-146a、miR-23b 的表达水平分别与血浆 IL-17、ESR、血清 CRP、抗 CCP 抗体、RF、DAS28 之间均无显著相关性 ($P > 0.05$)。经雌二醇处理后, 女性 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a、miR-23b 无显著变化 ($P > 0.05$), 培养上清 IL-17 浓度显著增高 ($P < 0.05$), 健康体检者 PBMCs 中 miR-146a 的表达水平明显下调 ($P < 0.05$), miR-23b 的表达水平无明显变化 ($P > 0.05$)。**结论:** 女性 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a、miR-23b 的表达水平显著上调。雌激素可能一方面通过增强 IL-17 的表达参与 RA 的病程, 另一方面通过下调 PBMCs 中 miR-146a 的表达阻止健康人向 RA 发展。

【关键词】 类风湿关节炎; 雌激素; miR-146a; miR-23b; 白细胞介素-17

【中图分类号】 R593.2 **【文献标志码】** A

Expression of miR-146a and miR-23b in peripheral blood mononuclear cells in female patients with rheumatoid arthritis and the effects of estrogen on them

ZHU Jing^{1,2,3}, YAN Bo^{1,2}, JIANG Yao¹, WANG Dong-sheng⁴, XING Yan^{1,2,3}

(1. Department of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 3. Transforming Medicine Research Centre, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 4. Department of Laboratory, Sichuan Cancer Hospital, Chengdu 610000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To compare the expression levels of miR-146a and miR-23b in female patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy people, and analyze the correlation between miRNAs and inflammatory factors IL-17 and laboratory indicators, so as to clarify whether miR-146a and miR-23b are related to RA, to analyze the effect of estrogen on the expression of miR-146a, miR-23b and IL-17, so as to clarify the possible mechanism of estrogen affecting RA. **Methods:** The expression levels of miR-146a and miR-23b were measured by RT-qPCR in 27 female RA patients and 27 female healthy individuals, and the concentration of IL-17 in plasma and culture supernatant was measured by ELISA. The difference of expression level of miR-146a, miR-23b and IL-17 in RA patients and healthy individuals was analyzed. Collected the clinical laboratory indexes of RA patients including ESR, CRP, anti CCP antibody, RF and calculating the score of DAS28, the correlation between miR-146a and miR-23b with IL-17, ESR, CRP, anti CCP antibodies, RF and DAS28 were analyzed, respectively. In addition, the levels of miR-146a, miR-23b and IL-17 were also detected after PBMCs treatment by estradiol between RA group and control group, and the differences were analyzed. **Results:** The expression levels of miR-146a and miR-23b in female RA patients increased compared to those in the healthy individuals ($P < 0.05$). There was no significant correlation between miR-146a or miR-23b with IL-17, ESR, CRP, anti CCP antibody, RF and DAS28 ($P > 0.05$). After estrogen treatment, there was no significant change in miR-146a and miR-23b in female RA patients, the concentration of IL-17 in supernatant in female RA pa-

基金项目: 四川省学术和技术带头人培养基金(740/74130801)

作者简介: 祝静(1987-), 女, 硕士, 助教。E-mail: 2357789063@qq.com

通讯作者: 邢艳, 博士, 教授。E-mail: 381679399@qq.com

tients was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of miR-146a in healthy individuals was significantly down-regulated ($P < 0.05$), the expression level of miR-23b did not change significantly ($P > 0.05$). **Conclusion:** The expression levels of miR-146a and miR-23b in female RA patients are up-regulated. Estrogen may be involved in the development of RA by up-regulation IL-17. On the other hand, estrogen may prevent healthy people from developing to RA by down-regulation of miR-146a in the PBMCs in healthy individuals.

【Key words】 Rheumatoid arthritis; Estrogen; miR-146a; miR-23b; IL-17

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、炎性、系统性的自身免疫性疾病, 以对称性多关节炎为主要临床表现, 可致关节软骨、肌腱韧带等组织或脏器损害, 严重者可致残, 是人类劳动力丧失的主要原因之一。流行病学调查显示, RA 的发病率存在逐年增高的趋势, 其确切病因至今仍不清楚, 目前普遍认为免疫功能紊乱是 RA 发病最主要和最重要的原因。RA 患者女性发病率约为男性的 3 倍, 女性体内雌激素水平明显高于男性。雌激素在人体免疫功能中发挥着重要作用, 包括调节 T 细胞、B 细胞以及 NK 细胞等多种免疫细胞的功能^[1-3], 其水平改变可导致免疫系统功能紊乱, 这是许多自身免疫性疾病发生的重要原因。microRNAs (miRNAs) 是一类小分子 RNA 的总称, 它们在转录后水平对基因的表达起调控作用^[4-5]。研究^[6-8]表明, miRNAs 在免疫反应、细胞增殖分化、肿瘤发生等过程中发挥着重要作用, 近年来 miRNAs 在自身免疫性疾病、肿瘤性疾病中的研究成为热点。

miR-146a 是最早在 RA 中研究的 miRNAs 之一, 研究表明, miR-146a 在 RA 患者关节滑膜组织及外周血循环中异常表达, 可能与 miRNAs 在人体内的免疫调节作用有关^[9]。miR-23b 是近年来新发现的在 RA 患者中异常表达的 miRNA, Zhu 等^[10]研究发现, IL-17 可以下调 RA 患者成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synovial cells, FLSs) 中 miR-23b 的表达, 且 miR-23b 的表达水平与 IL-17 的浓度呈负相关。而本研究小组前期研究^[11]发现, 雌激素处理 RA 患者 FLSs 后, 培养上清中 IL-17 浓度增高。结合这两项研究推测, 既然雌激素能引起 IL-17 增高, 而 IL-17 可以通过下调 miR-23b 的表达来参与 RA 的病程, 那么雌激素可能与 miR-23b 的调控有关, 且雌激素也可能对 RA 患者中异常表达的 miR-146a 等 miRNAs 存在调控作用。因此, 课题组选择了一个与 RA 密切相关的经典 miRNA 和一个新锐 miRNA 来重点研究。

本课题检测女性活动期 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 与 miR-23b 的表达水平以及血浆 IL-17 的浓度, 了解它们在 RA 患者和健康人群间的差异, 并分析 miR-146a、miR-23b 分别与 RA 重要的炎性细胞因子 IL-17 以及常用实验室检测指标的相关性; 然后, 用一定浓度的雌激素处理 PBMCs, 检测 PBMCs 中 miR-146a、miR-23b 和培养上清 IL-17 表达

水平的变化, 探讨雌激素对 miR-146a、miR-23b 以及 IL-17 表达的影响, 揭示雌激素是否对 miR-146a、miR-23b 和 IL-17 的表达具有调控作用, 阐释雌激素对 RA 作用的具体机理。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

收集 27 例来自本院 2014 年 5 月至 2015 年 7 月住院的女性活动期 RA 患者, 诊断均符合 1987 年美国风湿病学会 (ACR) 修订的 RA 分类标准, 平均年龄 (54.3 ± 9.7) 岁。所有入选研究对象均无其他风湿性或感染性疾病, 2 周内未使用过激素或免疫抑制剂治疗。收集 27 名女性健康体检者作为正常对照组, 平均年龄 (50.3 ± 7.7) 岁。对照组年龄与 RA 患者组没有显著差异。本实验得到当地伦理委员会支持, 所有参与者均知情同意。收集 RA 患者的临床资料包括压痛和肿胀关节计数以及重要实验室检测指标结果。

1.2 主要材料与试剂

人外周血淋巴细胞分离液来自天津灏洋生物制品科技有限公司, 雌二醇来自美国 Sigma 公司, 总 RNA 提取主要试剂 Trizol 来自美国 Invitrogen 生命技术公司, 实时荧光定量 PCR 试剂盒来自瑞士 Roche 公司, IL-17 高敏 ELISA 试剂盒来自美国 eBioscience 公司。

1.3 引物的设计与合成

设计茎环引物和实时荧光定量 PCR 引物, 皆由上海生工公司合成。

1.4 方 法

1.4.1 标本采集及处理 27 例女性 RA 患者及 27 名女性健康体检者均采集晨起空腹外周静脉血 5 mL, 肝素抗凝, 采血后 2 h 内无菌分离 PBMCs 并收集血浆。一部分 PBMCs 用来提取总 RNA 并反转录成 cDNA, RT-qPCR 测定 miR-146a 与 miR-23b 的表达水平, 另一部分 PBMCs 用雌二醇处理并做细胞培养 (方法见 1.4.5)。

1.4.2 miR-146a 及 miR-23b 的 RT-qPCR 检测 使用三步法进行 miRNAs 扩增反应, 预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 600 s; 循环条件 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 34 s, 共 40 个循环。每个标本均做 3 个复孔, miR-146a 及 miR-23b 的结果用相对表达量表示。

1.4.3 血浆 IL-17 浓度测定 ELISA 法检测 RA 患

者及健康体检者血浆 IL-17 的浓度(高敏 ELISA,按试剂盒说明书操作)。

1.4.4 收集 RA 患者实验室数据 收集 RA 患者疾病诊断或病情评估相关的重要实验室指标的检测值,包括血沉(ESR)、血清 C 反应蛋白(CRP)、抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体、IgM 型类风湿因子(IgM 型 RF),计算 RA 患者的疾病活动指数 28(DAS28)。

1.4.5 雌二醇处理 RA 患者及健康者 PBMCs 用 RPMI-1640 完全培养液将分离的 PBMCs 调整成浓度为 1×10^6 /mL 的细胞悬液。将 PBMCs 悬液混匀后加入 12 孔培养板中,再加入终浓度为 1×10^{-7} mol/L 的雌二醇(预实验设置雌二醇终浓度分别为 1×10^{-6} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-8} mol/L 三个浓度,处理时间分别为 3、6、12、24、48 h,结果发现,RA 患者 PBMCs 中 miR-146a、miR-23b 的表达在 1×10^{-7} mol/L 处理 6 h 时变化最明显,据此确定雌二醇的浓度为 1×10^{-7} mol/L 和培养的时间为 6 h),同时设空白对照,处理孔和空白孔均设复孔,置 37 °C,5% CO₂ 的培养箱孵育 6 h。

1.4.6 测定 E₂ 处理后 miR-146a、miR-23b 及 IL-17 表达水平的变化 收集 PBMCs 和培养上清,用上述方法检测 PBMCs 中 miR-146a、miR-23b 的表达水平及培养上清 IL-17 浓度在处理组与对照组表达的变化。

1.5 统计学分析

实验结果采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。检测数据为正态分布时,统计描述用($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料两组数据的比较采用成组或配对 *t* 检验,两组变量之间的相关性检验采用 Pearson 相关分析;检测数据为非正态分布时,统计描述用中位数(M)和四分位间距(25% ~ 75%)表示,两组数据的比较采用秩和检验,两组变量之间的相关性检验采用 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 组与健康对照组 miR-146a、miR-23b 表达水平比较

女性 RA 患者组与健康对照组比较,PBMCs 中 miR-146a 的表达水平 [$51.18E-04$ ($28.20E-04$, $93.55E-04$) vs. $34.96E-04$ ($26.31E-04$, $43.34E-04$), $P = 0.012$], miR-23b 的表达水平 [$3.02E-04$ ($1.62E-04$, $6.71E-04$) vs. $1.75E-04$ ($0.91E-04$, $3.11E-04$), $P = 0.024$],均显著增高。

2.2 RA 组与健康对照组 IL-17 浓度比较

女性 RA 患者组与健康对照组比较,血浆 IL-17 浓度 [2.08 (0.92 , 5.47) pg/mL vs. 0.80 (0.09 , 1.84) pg/mL, $P = 0.002$]显著增高。

2.3 女性 RA 患者 miR-146a、miR-23b 分别与 IL-17 及实验室指标的相关性

2.3.1 女性 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 的表达水平与血浆 IL-17、ESR、血清 CRP、抗 CCP 抗体、RF、DAS28 评分无显著相关性(表 1)。

2.3.2 女性 RA 患者 PBMCs 中 miR-23b 的表达水平与血浆 IL-17、ESR、血清 CRP、抗 CCP 抗体、RF、DAS28 评分也无显著相关性,见表 2。

表 1 miR-146a 与 IL-17 及实验室指标的相关性

指标	四分位数	r 值	P 值
IL-17	2.08(0.92,5.47)	0.145	0.508
ESR	49.0(38.0,62.0)	0.191	0.349
CRP	38.2(13.6,66.7)	-0.088	0.663
抗 CCP 抗体	70.3(17.3,200.0)	-0.068	0.810
IgM 型 RF	182.0(46.5,404.8)	-0.056	0.787
DAS28	5.6(4.2,6.8)	0.143	0.477

表 2 miR-23b 与 IL-17 及实验室指标的相关性

指标	四分位数	r 值	P 值
IL-17	2.08(0.92,5.47)	0.200	0.361
ESR	49.0(38.0,62.0)	0.052	0.802
CRP	38.2(13.6,66.7)	-0.234	0.239
抗 CCP 抗体	70.3(17.3,200.0)	0.073	0.805
IgM 型 RF	182.0(46.5,404.8)	-0.221	0.279
DAS28	5.6(4.2,6.8)	-0.219	0.303

2.4 E₂ 处理 PBMCs 后 miR-146a、miR-23b 及 IL-17 水平的变化

RA 患者和健康体检者 PBMCs 经浓度为 1×10^{-7} mol/L 的 E₂ 处理 6 h 后:(1) RA 患者:处理组与空白对照组相比,miR-146a 表达水平 [$50.69E-04$ ($40.44E-04$, $103.44E-04$) vs. $53.89E-04$ ($19.60E-04$, $77.72E-04$), $P = 0.295$], miR-23b 表达水平 [$1.36E-04$ ($0.52E-04$, $3.28E-04$) vs. $1.62E-04$ ($0.47E-04$, $3.72E-04$), $P = 0.931$]均没有显著差异;培养上清 IL-17 浓度 0.95 (0.82 , 1.02) pg/mL vs. 0.78 (0.67 , 0.89) pg/mL, $P = 0.034$,存在显著差异。结果表明,雌激素使 RA 患者 IL-17 浓度增高,对 PBMCs 中 miR-146a 及 miR-23b 的表达没有明显影响。(2) 健康对照:处理组与空白对照组相比,miR-146a 表达水平 [$28.73E-04 \pm 17.23E-04$ vs. $30.80E-04 \pm 15.81E-04$, $P < 0.001$],显著降低;miR-23b 表达水平 [$1.26E-04$ ($0.69E-04$, $2.32E-04$) vs. $1.40E-04$ ($0.74E-04$, $3.14E-04$), $P = 0.585$]及培养上清 IL-17 浓度 [0.73 (0.64 , 0.83) pg/mL vs. 0.75 (0.72 , 0.86) pg/mL, $P = 0.221$]没有显著差异。结果表明,雌激素下调健康对照者 miR-146a 的表达,

对 miR-23b 及 IL-17 的表达没有明显影响。

3 讨论

雌激素是一种性激素,其水平改变可导致免疫系统功能紊乱,甚至诱发多种自身免疫性疾病。李雪璐^[12]研究发现,女性活动期系统性红斑狼疮患者血浆中雌二醇浓度显著高于正常对照,并且与 IFN- α 、IL-10 及 TNF- α 的水平呈正相关,一定浓度的雌二醇可能通过抑制中性粒细胞凋亡促进 SLE 的发生与发展。Yan 等^[13]研究发现雌激素下调多发性肌炎巨噬细胞中 miR-21 的表达并且诱导炎症细胞浸润。同样,大量的研究表明雌激素也参与了 RA 的病程^[14-15],雌激素在 RA 发病机制中的具体作用尚不完全明确。实验表明,结合雌激素的复合药物可以抑制 RA 小鼠的关节炎,并防止相关骨丢失^[16],Lin 等^[17]研究发现,植物激素的代谢物雌马酚也能通过调节炎症和骨代谢来抑制 RA 小鼠疾病的进展和 RA 引起的骨质侵蚀。而我们前期研究发现,雌激素在女性活动期 RA 患者血浆中浓度显著增高,经雌二醇处理 FLSs, IL-17 等致炎因子增高,结果表明雌激素促进 RA 的进程^[11]。

miRNAs 在人体固有免疫或适应性免疫调节过程中发挥着重要作用,研究者第一次发现 miRNAs 在自身免疫性疾病发病过程中占据重要作用是在 2007 年^[18]。近年来,越来越多的研究证明 miRNAs 在 RA 疾病发生、发展和预后转归中起着不可忽视的作用。Bae 等^[9]研究了 RA 患者关节滑膜组织及关节液中 miR-146a 的表达情况,发现 miR-146a 的表达水平与对照组骨关节炎(osteoarthritis, OA)相比明显增高。冯知涛等^[19]则研究了 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 的表达水平,发现其显著高于正常对照组。本课题研究了女性活动期 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 的表达水平,结果也表明 miR-146a 的表达明显高于健康对照组($P < 0.05$),与冯知涛等研究结果一致,提示 miR-146a 在女性 RA 患者 PBMCs 中存在异常表达。Zhu 等^[10]研究发现 miR-23b 在 RA 患者炎症损伤组织中表达下调,Liu 等^[20]研究发现 RA 患者血浆中 miR-23b 的表达水平明显增高,而 miR-23b 在 RA 患者 PBMCs 中的表达情况鲜见报道。本研究首次检测了女性活动期 RA 患者 PBMCs 中 miR-23b 的表达水平,结果发现其显著高于正常对照($P < 0.05$),说明女性 RA 患者 PBMCs 中的 miR-23b 表达异常,且其表达模式与血浆一致而不同于炎症损伤部位。

本研究还发现女性 RA 患者血浆重要的炎症因子 IL-17 浓度明显高于健康对照($P < 0.05$),说明 IL-17 可能参与了 RA 的病理过程。研究 miR-146a 及 miR-23b 分别与 RA 患者重要的炎症因子 IL-17、

实验室指标 ESR、CRP、抗 CCP 抗体、RF 及 DAS28 评分的相关性,有助于明确 miRNAs 与 RA 疾病之间的关系。朴雪梅等^[21]研究发现 RA 患者(女性 12 例,比例 21.4%;男性 44 例,比例 78.6%)PBMCs 中 miR-146a 的表达水平与 ESR、CRP 呈负相关。Abou-Zeid^[22]等研究发现 RA 患者(女性 64 例,比例 91.5%;男性 6 例,比例 8.5%)PBMCs 中 miR-146a 的表达水平与 ESR、DAS28 评分呈正相关。而我们的研究表明女性活动期 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a、miR-23b 的表达水平与 IL-17、ESR、CRP、抗 CCP 抗体、RF、DAS28 评分均无显著相关性。本实验之所以选择女性患者作为研究对象,是因为 RA 受性激素的影响很大,且 RA 患者以女性居多,故本研究只纳入女性患者。由此可见,RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 的表达水平与实验室指标的相关性,不同的研究者有不同的结果,可能与纳入病例的性别、年龄、种族等有关。PBMCs 中 miR-23b 的表达水平与实验室指标的相关性还鲜见报道。

此外,用雌二醇处理并培养 PBMCs 的结果表明,与空白对照相比, 1×10^{-7} mol/L 浓度的雌激素在 6 h 时间点上可使 RA 患者 PBMCs 培养上清 IL-17 浓度增高,使健康女性 PBMCs 中 miR-146a 的表达下调,对 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 及 miR-23b 的表达没有明显影响,雌激素对 IL-17 具有正向调控作用,提示雌激素可能通过促进 IL-17 的分泌参与 RA 的炎性病变;同时,雌激素刺激后,RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 的表达水平没有明显变化,而健康女性 miR-146a 的表达下调。综合实验结果,我们推测,雌激素对 RA 患者和健康人的作用不同,一方面可增强 IL-17 的表达参与 RA 的发生发展,另一方面下调 PBMCs 中 miR-146a 的表达阻止健康人向 RA 发展,具体作用尚需进一步深入研究。

综上,本研究发现女性活动期 RA 患者 PBMCs 中 miR-146a 及 miR-23b 的表达上调,血浆 IL-17 浓度明显增高,表明女性活动期 RA 患者 miR-146a、miR-23b 及 IL-17 存在异常表达。雌激素一方面增强 IL-17 的表达参与女性 RA 的病程,另一方面下调 PBMCs 中 miR-146a 的表达阻止健康人向 RA 发展。但本研究也有不足之处,由于样本量有限,后期有必要增加样本量,丰富实验内容,进一步深入研究雌激素对 miR-146a 的调控过程,阐释雌激素对 RA 的作用机理。

参考文献

- [1] Collins FL, Stone MD, Turton J, et al. Oestrogen-deficiency induces bone loss by modulating CD14+ monocyte and CD4+ T cell DR3 expression and serum TL1A levels[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2019, 20(1): 326.
- [2] Xiu F, Sabz Ali Z, Palaniyar N, et al. A dual neutrophil-T cell puri-

- fication procedure and methodological considerations in studying the effects of estrogen on human Th17 cell differentiation[J]. *J Immunol Methods*,2019,467:1-11.
- [3] Garnier L,Laffont S,Lélu K, *et al.* Estrogen Signaling in Bystander Foxp3neg CD4+ T Cells Suppresses Cognate Th17 Differentiation in Trans and Protects from Central Nervous System Autoimmunity [J]. *J Immunol*,2018,201(11):3218-3228.
- [4] Filipowicz W,Bhattacharyya SN,Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs; are the answers in sight? [J]. *Nat Rev Genet*,2008,9(2):102-114.
- [5] Lee RC,Feinbaum RL,Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*,1993,75(5):843-854.
- [6] Labi V,Peng S,Klironomos F, *et al.* Context-specific regulation of cell survival by a miRNA-controlled BIM rheostat [J]. *Gene Dev*, 2019,33(23-24):1673-1687.
- [7] Shukla V,Varqhesse VK,Kabekkodu SP, *et al.* Enumeration of deregulated miRNAs in liquid and tissue biopsies of cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*,2019,155(1):135-143.
- [8] 张铭,赵朝,李晓利,等. 胰腺癌患者血浆中 microRNA-100 水平的测定及临床意义[J]. *川北医学院学报*,2015,30(5):600-603.
- [9] Bae SC, Lee YH. MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity; a meta-analysis [J]. *Int J Rheum Dis*,2018,21(7):1335-1342.
- [10] Zhu S,Pan W,Song X, *et al.* The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-alpha [J]. *Nat Med*,2012,18(7):1077-1086.
- [11] 邢艳,蒋红,刘青松,等. 雌激素对 RA 滑膜细胞增殖和炎性介质表达的影响[J]. *免疫学杂志*,2011,27(2):130-133.
- [12] 李雪璐. 雌激素对 SLE 患者中性粒细胞凋亡的影响[D]. 南充:川北医学院,2013.
- [13] Yan W,Chen C,Chen H. Estrogen Downregulates miR-21 Expression and Induces Inflammatory Infiltration of Macrophages in Polymyositis: Role of CXCL10 [J]. *Mol Neurobiol*,2017,54(3):1631-1641.
- [14] Ishizuka M,Hatori M,Suzuki T, *et al.* Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Sci (Lond)*,2004,106(3):293-300.
- [15] 周芳媛,裴银辉,熊艳杰,等. 雌二醇对类风湿关节炎大鼠免疫损伤的干预效果[J]. *华北理工大学学报(医学版)*,2017,19(3):182-185.
- [16] Andersson A,Bernardi AI,Nurkka-Karlsson M, *et al.* Suppression of Experimental Arthritis and Associated Bone Loss by a Tissue-Selective Estrogen Complex [J]. *Endocrinology*,2016,157(3):1013-1020.
- [17] Lin IC,Yamashita S,Murata M, *et al.* Equol suppresses inflammatory response and bone erosion due to rheumatoid arthritis in mice [J]. *J Nutr Biochem*,2016,32:101-106.
- [18] Dai Y,Huang YS,Tang M, *et al.* Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients [J]. *Lupus*,2007,16(12):939-946.
- [19] 冯知涛,李娟,任洁,等. 类风湿关节炎患者外周血 miR-146a 及 miR-16 的表达及与病情活动的相关性研究[J]. *南方医科大学学报*,2011,32(2):320-323.
- [20] Liu X,Ni S,Li C, *et al.* Circulating microRNA-23b as a new biomarker for rheumatoid arthritis [J]. *Gene*,2019,712:143911.
- [21] 朴雪梅,薛鸾,胡建东. 益气清络方对类风湿关节炎患者外周血单个核细胞中 miR-146a 表达的影响[J]. *上海中医药大学学报*,2015,25(1):37-40.
- [22] Abou-Zeid A,Saad M,Soliman E. MicroRNA 146a Expression in Rheumatoid Arthritis: Association with Tumor Necrosis Factor-Alpha and Disease Activity [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*,2011,15(11):807-812.

(收稿日期:2020-04-16)

学术编辑:王欢)

(上接第 632 页)

- [2] Tani Y,Otaka Y,Kudo M, *et al.* Prevalence of Genu Recurvatum during Walking and Associated Knee Pain in Chronic Hemiplegic Stroke Patients: A Preliminary Survey [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*,2016,25(5):1153-1157.
- [3] 邱继宏,于涛,刘卉. 脑卒中患者膝过伸原因和康复治疗方法研究进展[J]. *中国康复医学杂志*,2019,34(6):746-751.
- [4] 高放,侯莉,严丽蓉,等. 脑卒中偏瘫膝反张患者本体感觉丧失程度及肌电图的改变[J]. *中国老年学杂志*,2010,22(1):3241-3243.
- [5] Bleyenheuft C,Bleyenheuft Y,Hanson P, *et al.* Treatment of genu recurvatum in hemiparetic adult patients; a systematic literature review [J]. *Ann Phys Rehabil Med*,2010,53(3):189-199.
- [6] 李肖荷,甘君学. 恢刺经筋结点治疗中风后痉挛性偏瘫的疗效观察[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*,2017,15(7):858-860.
- [7] 杜玲玲,夏清. 脑卒中偏瘫患者膝过伸步态运动学特点分析[J]. *中国康复*,2018,33(1):7-10.
- [8] 国家中医药管理局脑病急症协作组. 中风病诊断与疗效评定标准(试行) [J]. *北京中医药大学学报*,1996,19(1):55-56.
- [9] 全国第四届脑血管病学术会议. 各类脑血管疾病诊断要点 [J]. *中国实用内科杂志*,1997,17(5):312.
- [10] Loudon JK,Goist HL,Loudon KL. Genu recurvatum Syndrome [J]. *Orthop Sports Phys Ther*,1998,27(5):361-367.
- [11] 盛国滨,刘洋,刘刚,等. 电针治疗脑卒中痉挛期膝过伸的临床疗效观察[J]. *针灸临床*,2017,33(3):28-31.
- [12] 刘海兵,廖麟荣,邓小倩. 脑卒中膝过伸研究新进展[J]. *中国康复*,2014,(2):137-140.
- [13] 孙健. 运动再学习结合普通针刺对脑卒中偏瘫病人膝过伸和步行能力的短期疗效观察[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*,2017,15(15):1915-1918.
- [14] Lu RR,Li F,Zhu B. Electromyographical characteristics and muscle utilization in hemiplegic patients during sit-to-stand activity: an observational study [J]. *Eur J Phys Rehabil Med*,2016,52(2):186-194.
- [15] Gross R,Delporte L,Arsenault L, *et al.* Does the rectus femoris nerve block improve knee recurvatum in adult stroke patients? A kinematic and electromyographic study [J]. *Gait Posture*,2014,39(2):761-766.
- [16] 战祥青,王健,陈正君. 针刺神经入肌点治疗脑卒中后膝关节功能障碍临床观察[J]. *锦州医科大学学报*,2017,38(2):57-59.
- [17] 王凯,杨建全. 运动康复联合针灸对急性脑卒中偏瘫患者肢体运动能力和日常生活活动能力的影响[J]. *西部中医药*,2017,30(7):107-110.

(收稿日期:2020-02-18)

学术编辑:雷泉)