

行政院國家科學委員會補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計畫名稱：微型核糖核酸-181a、介白素-2 與僵直性脊椎炎發生之相關  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生：詹佳燕  
學生計畫編號：NSC 101-2815-C-040-034-B  
研究期間：101年07月01日至102年02月28日止，計8個月  
指導教授：翁瑞宏

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 102年03月29日

## 摘要

中央耐受性的失能可能會造成自體免疫疾病的發生，而微型核糖核酸 (microRNA；miR)-181a 在中央耐受性 (central tolerance) 中扮演著關鍵的角色。miR-181a 高度表現可提高 T 細胞接受器 (T cell receptor；TCR) 訊息傳遞的強度，可能使活化的 T 細胞高度表現；高度表現的 miR-181a 也會調控介白質 (interleukin-2；IL)-2 的表現，而 IL-2 亦會影響 T 細胞的負選擇 (negative selection)。然而，miR-181a 與 IL-2 於僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis；AS) 發展中之分子角色是不清楚的；因此，本研究被設計來評估 miR-181a 與 IL-2 表現對於僵直性脊椎炎發生的效應。以即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction) 測定 128 名僵直性脊椎炎病患與 128 名經由性別與年齡配對之健康對照的血液 miR-181a 表現量，並且以酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay) 方法來偵測血清 IL-2 蛋白的濃度。結果觀察到僵直性脊椎炎病患相較於對照具有顯著較高的血清 IL-2 表現，並且僵直性脊椎炎病患之血液 miR-181a 與 IL-2 表現具有顯著的正相關 ( $r = 0.32$ ,  $P < 0.01$ )。此外，同時攜帶 miR-181a 高度表現/IL-2 高度表現者相較於同時攜帶 miR-181a 低度表現/IL-2 低度表現者具有 2.87 倍 (95% Confidence interval = 1.46-5.62) 的僵直性脊椎炎發生危險。同此，miR-181a 與 IL-2 的表現可能相關於僵直性脊椎炎的發生。

關鍵字：中央耐受性、微型核糖核酸-181a、介白質-2、僵直性脊椎炎。

## 前言

僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis ; AS) 是血清陰性脊椎關節炎疾病，並且 95% 的病患是人類白血球抗原 (human leukocyte antigen ; HLA)-B27 陽性 [1]。然而，僵直性脊椎炎的致病機轉尚未完全地被釐清。人體免疫系統透過 T 細胞與 B 細胞接受器上不同區域基因序列之重組，而發展出預防自體反應淋巴球產生功能的機制，稱為自體免疫耐受性 (immunological self-tolerance)，包含了中央耐受性 (central tolerance) 與周邊耐受性 (peripheral tolerance)。中央耐受性發生在胸腺 (thymus)，過程中包括正選擇 (positive selection) 與負選擇 (negative selection) [2]。正選擇是指未成熟的  $CD4^+ CD8^+$  T 細胞上的 T 細胞接受器 (T cell receptor ; TCR) 與主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex ; MHC) 上的 HLA class I 和 II 分子進行交互作用，以保留能與自體細胞互相合作的 T 細胞；經過篩選後的 T 細胞即進入負選擇階段，而其它未通過正選擇的 T 細胞則經由細胞凋亡 (apoptosis) 而降解。負選擇的過程會刪除掉對自體細胞具有專一性辨認的 T 細胞，而存留下的就是自然 T 細胞 (naive T cell) [3]。因此，正選擇與負選擇在中央耐受性的過程中扮演著重要的角色；並且中央耐受性的失能可能與自體免疫疾病發生具有相關性。重要的是，僵直性脊椎炎患者相較於健康對照被發現具有較高的  $CD4^+$  T 細胞及  $CD8^+$  T 細胞表現，比較高的表現可能是相關於 T 細胞的活化訊息傳遞 [4, 5]。

MicroRNA (miR)-181a 在胸腺中具有高度的表現，並且在造血幹細胞 (hematopoietic stem cells) 和原始細胞 (progenitor cells) 中也具有高度的表現；相反地，在活化的  $CD4^+$  T 細胞與  $CD8^+$  T 細胞中則具有較低的表現 [6]，這可能是與 miR-181a 具有調控淋巴細胞的生長和分化有關。miR-181a 的高度表現會去抑

制 TCR 訊息傳遞路徑的蛋白酪氨酸磷酸酶 22 (protein tyrosine phosphate non-receptor type 22 ; PTPN22)、雙特異性去磷酸酶 5 (dual specificity phosphatase 5 ; DUSP-5)、雙特異性去磷酸酶 6 (dual specificity phosphatase 6 ; DUSP-6)、蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (Src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 ; SHP-2) 磷酸化，導致啟動 TCR 訊息傳遞路徑的閾值降低，並且提高 TCR 訊息傳遞路徑的訊息強度，使 T 細胞過度活躍 [7]。而 miR-181a 的高度表現亦可能會影響 T 細胞的正選擇與負選擇，導致 T 細胞的過度表現 [7]。然而，miR-181a 與僵直性脊椎炎的 T 細胞大量表現之關係則尚未被釐清。

在 T 細胞中，介白質 (interleukin ; IL)-2 的合成受到 TCR 和 CD28 訊息傳遞路徑調控 IL-2 的訊息核糖核酸 (messenger RNA ; mRNA) 所影響 [8]；而 IL-2 和 IL-2 接受器的訊息傳遞被阻斷，即可能會導致自體免疫疾病的發生 [9, 10]。早期一項研究在 IL-2 接受器訊息被阻斷的未成熟胸腺細胞中觀察到，胸腺細胞的增生和 TCR 的表現都有被抑制的結果 [11]；一項 IL-2 基因剔除小鼠的研究也發現，隨著時間的增加，胸腺細胞具有異常的現象，這可能與胸腺中的 T 細胞負選擇受損有關 [12]。因此，IL-2 在 T 細胞耐受性中可能是一個重要的調節者。

重要的是，miR-181a 也被報告可誘導 IL-2 的表現 [7]，進而提高 T 細胞的敏感度。然而，miR-181a 與 IL-2 的表現在僵直性脊椎炎發展中之分子角色是不清楚的。我們的假說是，個體的 miR-181a 表現可能正向相關於 IL-2 的表現；並且 miR-181a 與 IL-2 的高度表現可能相關於僵直性脊椎炎之發生。

## 材料與方法

### 研究對象與流行病學資訊

我們的研究過程均符合赫爾辛基宣言 (Declaration of Helsinki) 的規定，並且研究設計通過中山醫學大學附設醫院倫理委員會的審查。在取得許可後，於中山醫學大學附設醫院免疫風濕科收集 128 名僵直性脊椎炎病患為病例組，病例經由免疫風濕科醫師確診以及 X 光評估；並且進行指尖離地試驗 (finger to floor test)、腰椎彎曲試驗 (Schober test)、以及評估關節疼痛程度及數目。若病患具有下列特徵：(1) 下背痛合併晨間僵硬超過三個月，(2) 腰椎運動範圍受限 (Schober 試驗小於 5 公分)，(3) 擴胸運動範圍受限 (擴胸試驗小於 5 公分)，(4) X 光顯示有關節炎 (雙側皆第二級以上，或單側第三級以上)；而符合以上 1 至 3 點之任一點加上第 4 點 (1984 年 New York 標準)，即可確定為僵直性脊椎炎病例 [13]。本研究之病例與對照的配對比例為 1：1，健康對照是以病例之年齡 ( $\pm 5$  歲) 與性別所配對；健康對照共計為 128 名。而對照是選取於同一教學醫學中心執行健康檢查並且無脊椎關節炎相關疾病之健康成人，對照若在健康檢查期間一週內具有懷孕、三個月內具有服藥情形、具有骨質疏鬆症、骨折、牛皮癬、萊特氏症候群 (Reiter's syndrome)、心血管疾病、發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease)、以及甲狀腺疾病者，則被排除於研究樣本外。

參與者的同意書在收集問卷資料前皆被獲取，問卷所涵蓋的問題包括人口學特質、詳細的個人以及家族疾病史。而個人疾病史包括個人發病年齡、發病年數、藥物使用狀況、以及現今治療情形也被詢問，疾病家族史的定義則為研究對象之一等親親屬具有關節炎病變疾病者。發病年齡的定義為初始症狀的發生年齡，初始症狀包括軸性症狀 (axial symptom)、周邊關節炎、虹彩炎或接骨點發炎等，疾病持續時間的定義為初始症狀的發生年齡至病患被收案時之年齡的間距，延遲診斷時間的定義為初始症狀的發生年齡至病患確診時之年齡的間距。周邊關節炎的

定義為至少有一處的關節出現腫脹的情形；發炎性腸道疾病的定義為大腸或小腸有發炎的情形，如潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis) 與克隆氏症 (Crohn's disease)；而虹彩炎的定義為單側或兩側眼睛的中層部位 (middle layer) 具有發炎的反應。此外，藥物的使用狀況則是詢問患者近三個月內有無服用非類固醇抗發炎止痛劑 (non-steroidal anti-inflammatory drugs) 或免疫調節劑 (disease modifying anti-rheumatic drugs)。

### 臨床評估

本研究使用中文版巴斯僵直性脊椎炎疾病活性指數 (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index ; BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index ; BASFI)、巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (Bath Ankylosing Spondylitis Global ; BAS-G)，來評估僵直性脊椎炎病患的疾病活性與日常生活機能；這些中文版評估工具已被證實在評估臨床症狀的變化上具有良好的內部一致性 (Cronbach's  $\alpha$ ) 以及觀察者內信度 (intraclass correlation coefficient) [14]。

### 生化指標與 HLA-B27 基因

所有研究對象之靜脈血被收集在含有抗凝血劑 (heparin) 的採血管中，並且這些樣本在同一天內被處理並儲存於-70°C 下。生化指標的測量，則包括紅血球沉降速率 (erythrocyte sedimentation rate ; ESR)、C-反應蛋白 (C-reactive protein ; CRP)、以及 A 型免疫球蛋白 (immunoglobulin A ; IgA)。HLA-B27 之檢測，是將 50  $\mu$ l 的血液與 30  $\mu$ l 以 FITC (fluorescein isothiocyanate) 標示的 anti-HLA-B27 (clone GS 145.2 [IgG1, Kappa]) 以慢速震盪混合 3 秒後，於暗處靜置於室溫下培

養 15 分鐘。對於每個樣本再加入 2 ml 的溶解液後，慢速震盪混合 3 秒，並且培養 10 分鐘。隨後，以 200 xg 離心 5 分鐘，再以 PBS 沖洗兩次並除去上清液，然後以慢速震盪離心讓剩餘的細胞脆片回溶。最後，加入 0.25 ml 的 1% 三聚甲醛 (paraformaldehyde) 混合後以流式細胞儀 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 測定之。在本研究中，樣本之中位數螢光強度若大於或相等於標準標記 (decision marker)，即為 HLA-B27 陽性 [15]。

### RNA 萃取

將從血液樣本抽離出的 buffy coat 置於微量離心管中，加入 1 ml TRIzol 試劑後，靜置冰上 20 分鐘；再加入 200  $\mu$ l DZPC-氯仿混合均勻。於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘後，將上清液移置新的微量離心管；再加入 500  $\mu$ l 之 99% isopropanol，混合均勻後置於 -20°C 下 10 分鐘。再於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘後，移去上清液，並且加入 1 ml 75% 之 RNA-ethanol 混合均勻。於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘，移去上清液；待 RNA 沉澱物乾燥後，加入無 RNase 之去離子水將沉澱物溶解。接著進行 RNA 定量：將 RNA 以 DEPC-treated water 稀釋 25 倍，使用分光光度計在 260 nm 與 280 nm 波長下測量總 RNA 的濃度 (比值需大於 1.8)，吸光值即為 RNA 濃度 ( $\mu$ g/ $\mu$ l)。

### miR-181a 之反轉錄與即時定量聚合酶鏈鎖反應

TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems, CA, USA) 被應用於定量 miR-181a。首先進行反轉錄 (reverse transcription; RT)，取 5  $\mu$ l 待測之 miRNA 加入 0.15  $\mu$ l dNTP、1.0  $\mu$ l RTase、1.5  $\mu$ l 10x RT buffer、0.19  $\mu$ l RNase inhibitor、3

$\mu\text{l}$  5x RT-引子、以及 4.16  $\mu\text{l}$  Nuclease free  $\text{H}_2\text{O}$ ；miR-181a 引子分別為 forward：5'-GCC GCT AGC TTA TCA GAC TGA TGT-3'、reverse：5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'，反應條件如下：16°C 30 分鐘、42°C 30 分鐘、85°C 5 分鐘。反應完後保存於-20°C，以進行後續的即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction)。取 5  $\mu\text{l}$  反轉錄後的 cDNA，加入 1  $\mu\text{l}$  20x 引子、10  $\mu\text{l}$  2x Master Mix、以及 4  $\mu\text{l}$  Nuclease free  $\text{H}_2\text{O}$  置於 96 孔盤中並進行二重複。以 RNU6B 當作內部對照，RNU6B 引子分別為 forward：5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3'、reverse：5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'，PCR 循環條件為 95°C 15 分鐘、95°C 15 秒、60°C 1 分鐘，共 40 回合。即時定量 PCR 的儀器是使用 Step One Plus Real-Time RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，以光纖管即時紀錄每一個 cycle 的螢光訊號，來定量經由 PCR 放大的基因片段。在即時定量 PCR 的過程中，當螢光訊號超過閾值時，此時的循環數則被認定為循環閾值 (cycle threshold；Ct)；而公式  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  可應用於計算 miRNA 的相對表現量， $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{待測基因}) - \text{Ct}(\text{對照基因})$ 。

## IL-2 測定

血清 IL-2 是使用酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA) 方法來偵測；偵測極限為 7 pg/ml。首先，加入 100  $\mu\text{l}$  的抗體溶液和 100  $\mu\text{l}$  標準樣本、對照樣本、與待測血清到 96 孔盤中，於室溫下培養兩小時。清洗掉後，加入 200  $\mu\text{l}$  IL-2 結合物，室溫下培養兩小時；再度清洗後，加入 200  $\mu\text{l}$  的受質 TMB (TM blue；3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 於 37°C 下培養 20 分鐘，終止反應後即可產生顏色。以 450 nm 波長在 ELISA 偵測儀中測得每個樣本的吸



光值，並與標準樣本所得的吸光值作比對後，來決定樣本中 IL-2 的濃度。

### 統計方法

病例與對照的性別、年齡、臨床特徵、併發症、生化評估、藥物使用、與巴斯僵直性脊椎炎量表，若為連續性變項以平均值 ± 標準差表示，並以 student's *t*-test 進行檢定；若為類別性變項則以個數與百分比呈現，並以  $\chi^2$ -test 檢定進行。以 Kolmogorov-Smirnov test 檢定 miR-181a ( $P < 0.01$ ) 與 IL-2 ( $P < 0.01$ ) 之表現並未符合常態分佈，因此進一步地將 miR-181a 與 IL-2 表現量轉換為對數數值 ( $\log_{10}$ ) 來呈現並進行分析。隨後，以對照組的 miR-181a 與 IL-2 表現之中位數區分為高度表現與低度表現，並且以 *t*-test 與  $\chi^2$ -test 檢定 miR-181a 與 IL-2 表現在病例與對照組之間的差異。皮爾森相關 (Pearson correlation) 檢定被使用來評估僵直性脊椎炎病患與健康對照的 miR-181a 與 IL-2 表現之相關。多變項條件邏輯斯模式 (multiple conditional logistic model) 被應用來求取每個變項的相對危險性 (relative risk ; RR) 以及 95% 信賴區間 (confidence interval ; CI)，而 miR-181a 與 IL-2 表現對於僵直性脊椎炎發生之交互作用是藉由概似比檢定 (likelihood ratio test) 以計算  $\chi^2$  值與 *P* 值；在交互作用的檢定中，將僅具有主效應項 (main effects terms) 的模式與同時具有主效應項和交互作用項 (interaction term) 的模式進行比較。*t*-test 檢定也被使用來評估 BASDAI、BASFI、BAS-G、ESR、CRP、IgA 在 miR-181a 與 IL-2 表現分組之間的差異，隨後使用多變項邏輯斯迴歸模式 (multiple logistic regression model) 在調整性別、年齡、疾病持續時間、以及藥物使用之效應後，計算 miR-181a 與 IL-2 表現分別對於僵直性脊椎炎病患之周邊關節炎、虹彩炎、與發炎性腸道疾病發生之勝算比 (odds ratio ; OR) 以及 95% 信

賴區間。所有的  $P$  值皆以雙尾檢定來計算，並且以  $P < 0.05$  定義為顯著性，全部數據以 SAS 9.2 來分析。

## 結果

僵直性脊椎炎病患以及對照之基本特徵與臨床指標，呈現於表一。在全部研究對象中，男性比例為 71.9%；病例以及對照的平均年齡分別是  $37.2 \pm 11.7$  (標準差) 歲與  $37.2 \pm 12.1$  歲。僵直性脊椎炎病患的發病年齡是  $27.4 \pm 11.2$  歲，疾病持續時間是  $8.9 \pm 8.3$  年、疾病的延遲診斷時間是  $1.2 \pm 2.9$  年。此外，在僵直性脊椎炎病患中，38 名 (29.7%) 具有周邊關節炎、31 名 (24.2%) 具有虹彩炎、以及 5 名 (3.9%) 具有發炎性腸道疾病的症狀。此外，90.6% 的病患攜帶 HLA-B27 陽性，75.8% 的病患服用非類固醇抗發炎止痛劑，46.1% 的病患使用免疫調節劑；並且僵直性脊椎炎病患的巴斯僵直性脊椎炎活性指數 (BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (BASFI)、以及巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G) 分別為  $4.2 \pm 2.2$ 、 $2.2 \pm 2.4$ 、以及  $4.4 \pm 2.9$  分。

血液 miR-181a 與 IL-2 表現在僵直性脊椎炎病患以及健康對照之分佈，呈現於表二。血液 miR-181a 表現在僵直性脊椎炎病患與健康對照兩組之間並未具有統計顯著差異；然而，病患相較於健康對照則具有顯著較高的 IL-2 表現 ( $P < 0.01$ ， $t$ -test)。進一步地，分別以健康對照的血液 miR-181a 與 IL-2 表現量之中位數來區分為高度表現與低度表現兩組，結果顯示僵直性脊椎炎病例相較於對照具有顯著較高比例的 IL-2 高度表現 (81.1% vs. 18.9%； $P < 0.01$ ， $\chi^2$ -test)。僵直性脊椎炎病患其血液 miR-181a 與 IL-2 表現量也具有顯著的正相關 ( $r = 0.28$ ， $P < 0.01$ ；圖一(a))，同樣的結果也在健康對照中被觀察到 ( $r = 0.32$ ， $P < 0.01$ ；圖一(b))。

個體之血液 miR-181a 與 IL-2 表現對於僵直性脊椎炎發生之合併效應，呈現於表三。以同時攜帶 miR-181a 低度表現/IL-2 低度表現者為參考組，則同時攜帶 miR-181a 高度表現/IL-2 高度表現者相較於參考組具有 2.87 倍 (95% CI = 1.46-5.62,  $P < 0.01$ ) 的僵直性脊椎炎發生危險。由於同時攜帶 miR-181a 高度表現/IL-2 低度表現者具有較少的人數，因此，合併血液 miR-181a 低度表現/IL-2 高度表現者與 miR-181a 高度表現/IL-2 低度表現者以增加統計檢定力，則攜帶至少一項 miR-181a 或 IL-2 高度表現者相較於參考組具有 3.76 倍 (95% CI = 1.90-7.47,  $P < 0.01$ ) 的僵直性脊椎炎發生危險。特別的是，擁有愈多項 miR-181a 或 IL-2 高度表現者對於僵直性脊椎炎的發生危險性則更具有增加的趨勢 ( $P = 0.003$ )。

接續地，僵直性脊椎炎病患其巴斯僵直性脊椎炎評估指數以及生化指標在不同的血液 miR-181a 與 IL-2 表現分組間之差異呈現於表四。在調整年齡、性別、疾病持續時間、以及服用藥物之效應後，我們觀察到具有血液 miR-181a 高度表現的僵直性脊椎炎病患相較於低度表現者具有較高的 ESR 值 (29.4 vs. 21.3 mm/h,  $P = 0.04$ )。其他變項在血液 miR-181a 與 IL-2 表現之分組間，則並未具有顯著差異。

僵直性脊椎炎病患有無周邊關節炎、虹彩炎以及發炎性腸道疾病之發展與其攜帶不同的血液 miR-181a 與 IL-2 表現之間的關係，也被進一步地分析 (表五)。在調整年齡、性別、疾病持續時間、以及服用藥物之效應後，攜帶 IL-2 高度表現之僵直性脊椎炎病患相較於低度表現之病患具有 3.95 倍 (95% CI = 1.01-14.74,  $P = 0.04$ ) 罹患周邊關節炎的危險。

## 討論

在我們的研究中發現，僵直性脊椎炎病患相較於健康對照具有顯著較高的血清 IL-2 濃度。同時攜帶血液 miR-181a 高度表現/IL-2 高度表現者與攜帶至少一項血液 miR-181a 高度表現或 IL-2 高度表現者也具有顯著較高的僵直性脊椎炎發生危險，並且 miR-181a 高度表現以及 IL-2 高度表現也分別相關於僵直性脊椎炎病患的發炎反應與周邊關節炎的發生。

在 T 細胞中，miR-181a 可以藉由抑制 SHP-2、DUSP5、DUSP6、和 PTPN22 磷酸化來調控細胞外訊息調節激酶 (extracellular signal-regulated kinase；ERK)，降低 TCR 訊息傳遞路徑的閾值，以提高 TCR 訊息傳遞路徑的訊息強度，使 T 細胞過度活躍 [7]。然而，我們現今的研究並未發現到 miR-181a 表現在僵直性脊椎炎病患與健康對照之間的顯著差異，一項可能的解釋是 miR-181a 並不是僵直性脊椎炎的周邊血液 T 細胞活化路徑之主要調節者。此外，較少的樣本數可能也是造成現今不顯著結果的原因；建議未來的研究應納入更多的樣本數目，並且需要更多的功能性研究來加以驗證我們現今所觀察到的結果。

IL-2 具有促使 T 細胞增生 [16] 以及抑制 T 細胞凋亡 [17] 的功能。最近的一項研究在僵直性脊椎炎病患中觀察到，相較於正常對照具有顯著較高的 IL-2 表現 [18]，而我們現今的研究也發現相同的結果。此外，IL-2 可以維持已活化 T 細胞和自然殺手細胞 (natural killer cells) 的長期發展與抑制細胞凋亡，並且促進 B 細胞的增生 [19]；因此，僵直性脊椎炎病患的 IL-2 增加表現，可能反映著過度活化的免疫細胞導致免疫耐受性失衡與僵直性脊椎炎的發生。於本研究中，血液 miR-181a 與 IL-2 對於僵直性脊椎炎發生的合併效應也被考量。結果觀察到同時具有 miR-181a 高度表現/IL-2 高度表現者相較於同時具有 miR-181a 低度表現

IL-2 低度表現者呈現顯著較高的僵直性脊椎炎發生危險，並且具有一個 miR-181a 或 IL-2 高度表現者也呈現出較高的僵直性脊椎炎發生危險性；雖然，miR-181a 與 IL-2 表現對於僵直性脊椎炎發生的交互作用並未具有顯著性。然而，擁有愈多項 miR-181a 或 IL-2 高度表現者對於僵直性脊椎炎的發生危險則更具有顯著的增加趨勢。如此的結果說明著相較於同時具有 miR-181a 和 IL-2 低度表現之個體，只要具有一項 miR-181a 或 IL-2 高度表現或許就可能產生僵直性脊椎炎發生的增加危險性；但若同時具有 miR-181a 與 IL-2 兩項高度表現，則僵直性脊椎炎的發生危險性則是更加地提升。並且，這也可能建議著 miR-181a 與 IL-2 對於僵直性脊椎炎的發生效應或許並非擔任最主要的角色；但此二者之作用同時缺陷時，僵直性脊椎炎的發展可能性即會被明顯地呈現。可惜的是，受限於較小的研究樣本數目，特別是在各分層之間，因此所估計的危險性是具有較大的信賴區間。

在我們的僵直性脊椎炎病患中，miR-181a 高度表現者相較於低度表現者具有顯著較高的 ESR 數值。如此的結果可能是 miR-181a 的高度表現會促使 CD4<sup>+</sup> T 細胞增生，進而分泌發炎激素，導致發炎反應的產生 [20]。而如此的發炎反應，可能也是相關於僵直性脊椎炎疾病進展。僵直性脊椎炎的初期症狀是肌腱交界處有發炎現象，隨著病程發展，病患會漸漸出現周邊關節炎、發炎性腸道疾病等併發症；而周邊關節炎是在僵直性脊椎炎病患中最常見的表徵 [21, 22]，在我們現今的僵直性脊椎炎病患中，併發周邊關節炎的比例是 29.7%。特別的是，在我們的僵直性脊椎炎病患之中，IL-2 高度表現者相較於低度表現者具有顯著較高的周邊關節炎發生危險，這可能是 IL-2 會導致 T 細胞的增生以及如 IFN- $\gamma$  等細胞激素的產生 [23]，進而導致發炎性關節炎 [24]。因而，具有 IL-2 高度表現的僵直

性脊椎炎病患是較容易發展出周邊關節炎。

對於血液 miR-181a 的測定，我們是以即時定量 PCR 進行二重複實驗，而二重複實驗所獲得的 Ct 值之差必須在 0.5 以內才能接受；因此，我們的實驗技術是具有良好的的一致性。我們的研究對象是納入年齡在 18 歲以上的僵直性脊椎炎病患，因此我們的結果可能無法推論到整體的僵直性脊椎炎病患，建議未來可以增加幼年型的僵直性脊椎炎病患，以釐清血液 miR-181a 與 IL-2 表現與疾病發生和臨床表徵之相關性。此外，我們的研究資料是收集自單一醫學中心，可能會有引介偏差 (referral bias) 存在；建議未來可以從其他國家收集其他研究世代來加以驗證我們現今所觀察到的結果。

目前，並未有研究探討 miR-181a 和 IL-2 表現與僵直性脊椎炎發生之相關；我們的結果顯示，血液 miR-181a 與 IL-2 表現對於僵直性脊椎炎的發生具有合併效應，並且相關於僵直性脊椎炎病患的發炎反應與併發症。

## 致謝

本研究感謝行政院國家科學委員會的補助 (101-2815-C-040-034-B) 以及魏正宗醫師與王俊堯醫師在研究對象收案上的幫忙。

## 參考文獻

1. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 369(9570):1379-90, 2007.
2. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: Keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*. 2(1):11-9, 2002.
3. Simmonds EJ, Gough SC. Genetic insight into disease mechanisms of autoimmunity. *Br Med Bull*. 71:93-113, 2004.

4. Duftner C, Goldberger C, Falkenbach A, Würzner R, Falkensammer B, Pfeiffer KP, Maerker-Hermann E, Schirmer M. Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4+CD28- T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther.* 5(5):R292-300, 2003.
5. Schirmer M, Goldberger C, Würzner R, Duftner C, Pfeiffer KP, Clausen J, Neumayr G, Falkenbach A. Circulating cytotoxic CD8(+) CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res.* 4(1):71-6, 2002.
6. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 303(5654):83-6, 2004.
7. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P, Klein LO, Davis MM, Chen CZ. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell.* 129(1):147-61, 2007.
8. Powell JD, Ragheb JA, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz RH. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol Rev.* 165:287-300, 1998.
9. Schorle H, Holtschke T, Hünig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature.* 352(6336):621-4, 1991.
10. Suzuki H, Kündig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Simard JJ, Ohashi PS, Griesser H, Taniguchi T, Paige CJ, Mak TW. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science.* 268(5216):1472-6, 1995.
11. Jenkinson EJ, Kinfston R, Owen JJ. Importance of IL-2 receptors in intra-thymic generation of cells expressing T-cell receptors. *Nature.* 329(6135):160-2, 1987.
12. Wrenshall LE, Stevens ET, Smith DR, Miller JD. Maternal microchimerism

leads to the presence of interleukin-2 in interleukin-2 knock out mice:

implications for the role of interleukin-2 in thymic function. *Cell Immunol.*

245(2):80-90, 2007.

13. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 27(4):361-8, 1984.
14. Wei JC, Wong RH, Huang JH, Yu CT, Chou CT, Jan MS, Tsay GJ, Chou MC, Lee HS. Evaluation of internal consistency and re-test reliability of Bath ankylosing spondylitis indices in a large cohort of adult and juvenile spondylitis patients in Taiwan. *Clin Rheumatol.* 26(10):1685-91, 2007.
15. Chou CT, Tsai YF, Liu J, Wei JC, Liao TS, Chen ML, Liu LY. The detection of the HLA-B27 antigen by immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay-comparison with a flow cytometric procedure. *J Immunol Methods.* 255(1-2):15-22, 2001.
16. Smith KA. T-cell growth factor. *Immunol Rev.* 51:337-75, 1980.
17. Liston A, Siggs OM, Goodnow CC. Tracing the action of IL-2 in tolerance to islet-specific antigen. *Immunol Cell Biol.* 85(4):338-42, 2007.
18. Liu F, Wang F, Wang CC, Li N, Li SF. Expression of IL-2 and IL-11 and its significance in patients with ankylosing spondylitis. *Asian Pac J Trop Med.* 6(1):76-8, 2013.
19. Liu Y, Gao X, Deeb D, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC. Anticancer agent xanthohumol inhibits IL-2 induced signaling pathways involved in T cell proliferation. *J Exp Ther Oncol.* 10(1):1-8, 2012.



20. Baek HJ, Zhang L, Jarvis LB, Gaston JS. Increased IL-4+ CD8+ T cells in peripheral blood and autoreactive CD8+ T cell lines of patients with inflammatory arthritis. *Rheumatology*. 47(6):795-803, 2008.
21. Braun J, Bollow M, Sieper J. Radiologic diagnosis and pathology of the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am*. 24(4):697-735, 1998.
22. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*. 61 Suppl 3:iii8-18, 2002.
23. Combe B, Pope RM, Fischbach M, Darnell B, Baron S, Talal N. Interleukin-2 in rheumatoid arthritis: production of and response to interleukin-2 in rheumatoid synovial fluid, synovial tissue and peripheral blood. *Clin Exp Immunol*. 59(3):520-8, 1985.
24. Conigliaro P, Scrivo R, Valesini G, Perricone R. Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmun Rev*. 10(10):577-81, 2011.

表一：僵直性脊椎炎病例以及對照之基本特徵與臨床指標

變項	病例 (n = 128)	對照 (n = 128)
性別：男性	92 (71.9%)	92 (71.9%)
年齡：歲	37.2 ± 11.7 <sup>a</sup>	37.2 ± 12.1
臨床特徵		
發病年齡 (歲)	27.4 ± 11.2	
疾病持續時間 (年)	8.9 ± 8.3	
延遲診斷時間 (年)	1.2 ± 2.9	
併發症		
周邊關節炎	38 (29.7%)	
虹彩炎	31 (24.2%)	
發炎性腸道疾病	5 (3.9%)	
生化指標		
HLA-B27 <sup>+</sup>	116 (90.6%)	
紅血球沉降速率 (ESR, mm/h)	25.6 ± 20.5	
C反應蛋白 (CRP, mg/dl)	1.0 ± 1.6	
A型免疫球蛋白 (IgA, mg/dl)	308.7 ± 118.6	
藥物使用		
非類固醇抗發炎止痛劑	97 (75.8%)	
免疫調節劑	59 (46.1%)	
巴斯僵直性脊椎炎量表		
巴斯僵直性脊椎炎活性指數 (BASDAI)	4.2 ± 2.2	
巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (BASFI)	2.2 ± 2.4	
巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (BAS-G)	4.4 ± 2.9	

<sup>a</sup> 平均值 ± 標準差。

表二：血液 miR-181a 以及 IL-2 表現在僵直性脊椎炎病患與對照之間的分佈

變項	病例	對照	P 值
	n = 128	n = 128	
$\log_{10}$ miR-181a ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	1.81 ± 0.89	1.88 ± 0.97	0.51 <sup>c</sup>
高度表現 <sup>a</sup>	59 (46.1%)	64 (50.0%)	0.53 <sup>d</sup>
低度表現	69 (53.9%)	64 (50.0%)	
$\log_{10}$ IL-2 (pg/ml) <sup>b</sup>	1.50 ± 0.05	1.47 ± 0.04	< 0.01 <sup>c</sup>
高度表現 <sup>a</sup>	103 (81.1%)	65 (50.8%)	< 0.01 <sup>d</sup>
低度表現	24 (18.9%)	63 (49.2%)	

<sup>a</sup> 以對照組之中位數區分為高度表現以及低度表現。

<sup>b</sup> 有一名病例未測出 IL-2 表現量。

<sup>c</sup> *t*-test。

<sup>d</sup>  $\chi^2$ -test 檢定。

表三：血液 miR-181a 與 IL-2 表現對於僵直性脊椎炎發生之合併效應

變項	病例 (n = 127) <sup>a</sup>	對照 (n = 128)	RR (95% CI)	P 值
miR-181a/IL-2				
miR-181a 高度表現/IL-2 高度表現	53 (41.7%)	46 (35.9%)	2.87 (1.46-5.62)	< 0.01
miR-181a 高度表現/IL-2 低度表現	6 (4.7%)	18 (14.1%)	0.83 (0.29-2.44)	0.74
miR-181a 低度表現/IL-2 高度表現	50 (39.4%)	19 (14.8%)	6.53 (3.06-13.94)	< 0.01
miR-181a 低度表現/IL-2 低度表現	18 (14.2%)	45 (35.2%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		$\chi^2 = 0.969$ (1 df) ; $P = 0.32$		
$P$ for trend = 0.07				
miR-181a 高度表現/IL-2 高度表現	53 (41.7%)	46 (35.9%)	2.87 (1.46-5.62)	< 0.01
miR-181a 高度表現/IL-2 低度表現 + miR-181a 低度表現/IL-2 高度表現	56 (44.1%)	37 (28.9%)	3.76 (1.90-7.47)	< 0.01
miR-181a 低度表現/IL-2 低度表現	18 (14.2%)	45 (35.2%)	1.00 (reference)	
$P$ for trend = 0.003				

<sup>a</sup> 有一名僵直性脊椎炎患者並未測出其 IL-2 表現量。

表四：在僵直性脊椎炎病患中，巴斯僵直性脊椎炎評估指數與生化指標在不同的 miR-181a 與 IL-2 表現分組間之差異

變項	miR-181a		P 值	P 值 <sup>a</sup>	IL-2		P 值	P 值 <sup>a</sup>
	高度表現	低度表現			高度表現	低度表現		
BASDAI	4.4 ± 0.3	4.9 ± 0.3	0.29	0.27	4.3 ± 0.2	3.8 ± 0.5	0.34	0.40
BASFI	2.4 ± 0.3	2.0 ± 0.3	0.32	0.34	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.5	0.94	0.87
BAS-G	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.4	0.75	0.77	4.5 ± 0.3	3.8 ± 0.6	0.32	0.36
ESR (mm/h)	29.4 ± 3.3	21.3 ± 1.9	0.03	0.04	25.8 ± 2.2	24.2 ± 3.8	0.75	0.73
CRP (mg/dl)	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.19	0.24	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.55	0.53
IgA (mg/dl)	299.6 ± 14.6	322.2 ± 18.4	0.34	0.23	309.2 ± 13.5	320.1 ± 22.2	0.74	0.72

<sup>a</sup> 調整年齡、性別、疾病持續時間、以及服用藥物之效應。

表五：血液 miR-181a 與 IL-2 表現和僵直性脊椎炎病患的周邊關節炎、虹彩炎、以及發炎性腸道疾病發生之相關

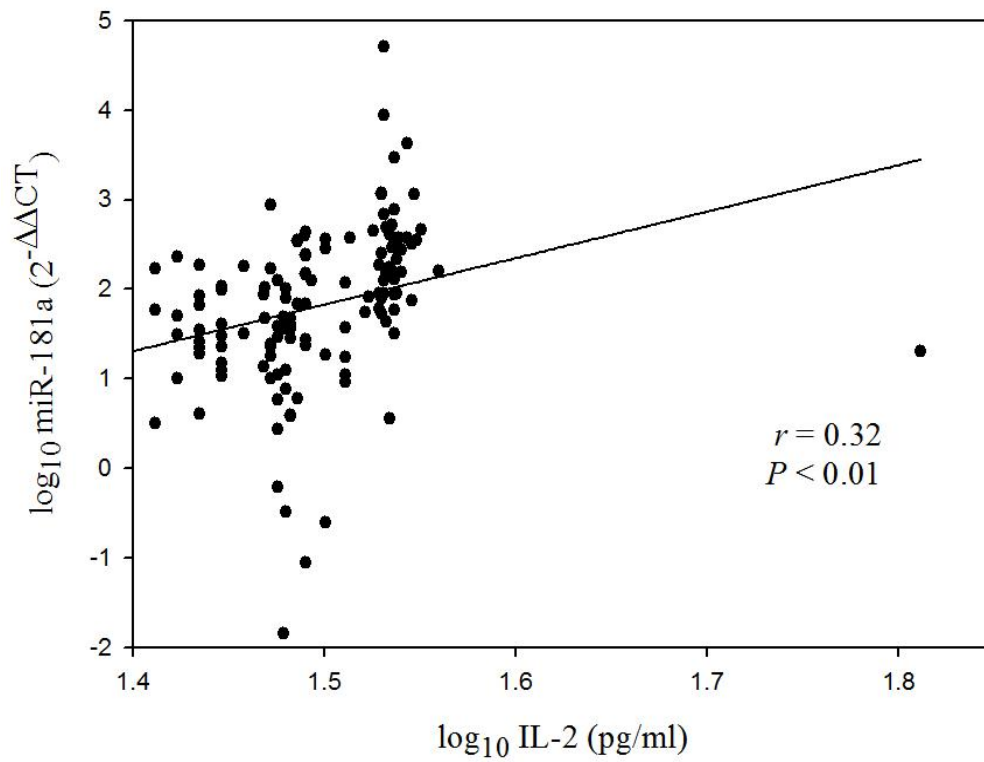
變項	周邊關節炎		虹彩炎		發炎性腸道疾病	
	有	無	有	無	有	無
<b>miR-181a</b>						
高度表現	21 (55.3%)	38 (42.2%)	13 (41.9%)	46 (47.4%)	3 (60%)	56 (45.5%)
低度表現	17 (44.7%)	52 (57.8%)	18 (58.1%)	51 (52.6%)	2 (40%)	67 (54.5%)
OR (95% CI) <sup>a</sup>	1.62 (0.69-3.81)		0.68 (0.28-1.61)		1.23 (0.17-9.01)	
<b>IL-2<sup>b</sup></b>						
高度表現	34 (89.5%)	69 (77.5%)	23 (74.2%)	80 (83.3%)	5 (100%)	98 (80.3%)
低度表現	4 (10.5%)	20 (22.5%)	8 (25.8%)	16 (16.7%)	0 (0%)	24 (19.7%)
OR (95% CI) <sup>a</sup>	3.95 (1.01-14.74) <sup>c</sup>		0.54 (0.20-1.48)		1.51 (0.17-13.81)	

<sup>a</sup> 調整年齡、性別、疾病持續時間、以及服用藥物之效應。

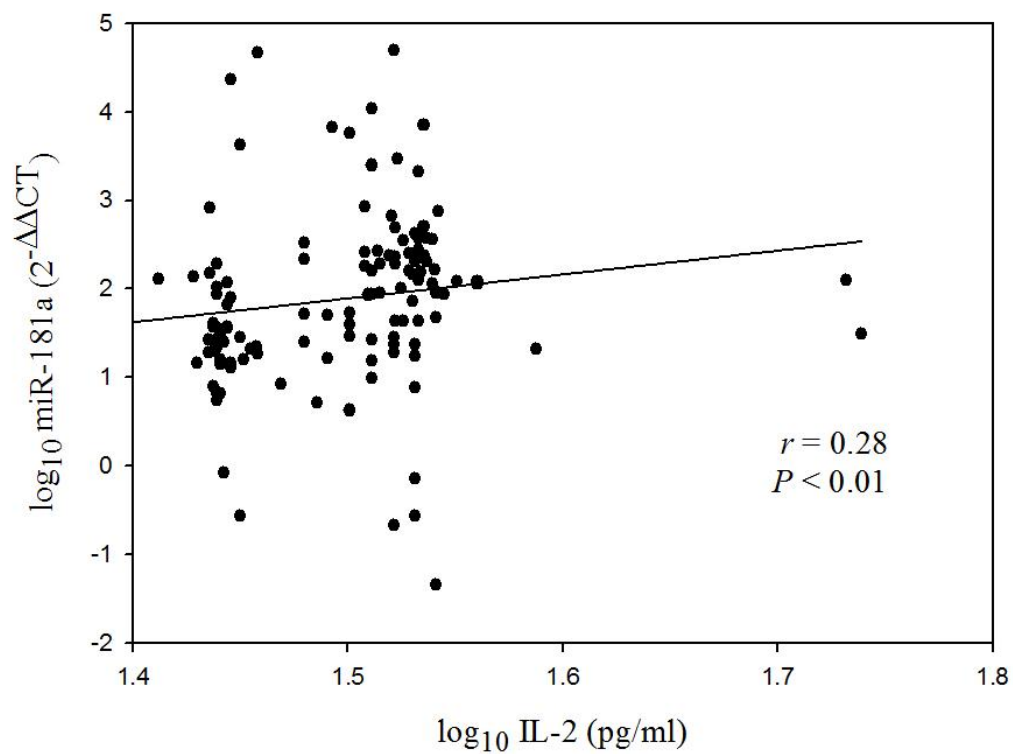
<sup>b</sup> 有一名僵直性脊椎炎患者中並未測出表現量。

<sup>c</sup>  $P = 0.04$ 。

(a)



(b)



圖一：(a) 僵直性脊椎炎病患 (n = 127)，以及 (b) 健康對照者 (n = 128) 其血液 miR-181a 與 IL-2 表現量之相關。有一名僵直性脊椎炎病患並未測到 IL-2 表現量。