行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

計畫名稱：	微型核醣核酸-21、計畫性細胞死亡-4 與僵直性脊椎炎發生之相關

執行計畫學生： 邱尚彥

學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-036-B

研究期間： 100 年 07 月 01 日至 101 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 101 年 03 月 30 日

摘要：

脊椎骨質流失可能是辨別僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis；AS) 的症狀之一，這是相關於蝕骨細胞 (osteoclast) 與造骨細胞 (osteoblast) 的作用失衡。特別的是，激活蛋白 (activator protein-1；AP-1) 高度表現可造成關節炎病患的滑膜異常增生以及局部免疫失調。而微型核醣核酸 (microRNA-21；miR) -21 與骨蝕生成作用 (osteoclastogenesis) 具有相關，當 AP-1 轉錄因子與 miR-21 的促進子結合時，可誘導 miR-21 的高度表現；並且 miR-21 會與計畫性細胞死亡-4 (programmed cell death 4；PDCD4) 結合，以抑制 PDCD4 的表現，進而導致蝕骨細胞的活化與成熟。然而，miR-21 與 PDCD4 在僵直性脊椎炎致病機轉中的角色，目前並不清楚。因此，我們設計一個以醫院為基礎的病例對照研究來評估 miR-21 與 PDCD4 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 85 名僵直性脊椎炎病患與 85 名經由性別與年齡配對之健康對照的血清 miR-21 與 PDCD4 mRNA 表現量，並且以酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA) 方法來偵測骨骼再吸收標記第一型膠原蛋白 (C-telopeptides；CTX) 的表現。我們的結果觀察到，miR-21 高度表現者相較於低度表現者具有 4.38 倍的僵直性脊椎炎發生危險性 (95% confidence interval；95% C.I. = 1.89-10.15)；PDCD4 mRNA 高度表現者相較於 PDCD4 mRNA 低度表現者也具有 3.82 倍的疾病發生危險性 (95% C.I. = 1.63-8.95)。此外，僵直性脊椎炎病患之血清 miR-21 與 CTX 的表現具有顯著的正相關存在 (r = 0.27，P = 0.014)；如此的結果在疾病持續時間< 10 年的病患中，更為明顯 (r = 0.44，P = 0.001)。因此，我們的結果建議著血清 miR-21 表現可能與僵直性脊椎炎的發生具有相關，並且可能在疾病初期於骨蝕生成作用中扮演關

鍵的角色。

關鍵字：僵直性脊椎炎、微型核醣核酸-21、計畫性細胞死亡-4、第一型膠原蛋白、骨蝕生成作用。

前言：

僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis；AS) 是種血清陰性脊椎關節炎疾病，並且 95%的病人是人類白血球抗原 (human leukocyte antigen；HLA) -B27 陽性 [1]。其典型症狀為下背疼痛 (low back pain)、脊椎活動受限及晨間僵硬 (stiffness) [2]。當疾病侵犯脊椎與周邊關節時，肌腱、韌帶、關節膜及骨骼交接點皆有可能因受到侵犯而產生發炎反應；相關的發炎反應會造成骨骼的破壞、鈣化或纖維化 [3]。然而，僵直性脊椎炎的致病機轉尚未完全地被釐清。

脊椎骨質流失可能是辨別僵直性脊椎炎的症狀之一 [4]，骨質密度的減少與蝕骨細胞 (osteoclast) 和造骨細胞 (osteoblast) 之間的態勢失衡相關；在類風溼性關節炎 (rheumatoid arthritis；RA)、更年期骨質疏鬆症 (osteoporosis) 等疾病中，已經發現蝕骨細胞具有較高的表現 [5]。蝕骨細胞是由單核球細胞 (monocyte) 及巨噬細胞 (macrophage) 所衍生的多核細胞 [6]，蝕骨細胞的成熟需要不同族群細胞相互作用。在慢性關節炎的動物模式下，局部及全身性的骨質流失是由於發炎反應所誘發的蝕骨細胞造成骨蝕作用 (bone resorption) 的結果 [7]。在腫瘤壞死因子-α (tumor necrosis factor-α；TNF-α) 基因轉殖小鼠中，也發現 TNF-α 會促進蝕骨細胞前驅物 (osteoclast precursor) 的擴張和分化 [8]；而發炎反應所造成的骨蝕作用可導致骨骼、關節的破壞及後續的脊椎黏合 [9]。骨蝕作用可藉由對於骨骼再吸收標記測量，如血清中的第一型膠原蛋白 (type I collagen telopeptides；C-telopeptides [CTX]) 濃度 [10]，來幫助我們辨識到僵直性脊椎炎病患之骨骼再吸收的改變。

當 c-Fos 與 c-Jun 結合後會形成激活蛋白-1 (activator protein-1；AP-1) 轉錄因子 [11]；而在類風濕性關節炎病患的滑膜組織中具有高度表現的 AP-1，並且

高度表現的 AP-1 會造成滑膜異常增生與局部免疫失調等病徵 [12]。而微型核醣核酸-21 (microRNA-21；miR-21) 也被發現與骨蝕生成作用 (osteoclastogenesis) 具有相關 [13]，並且在 miR-21 的促進子上有許多 AP-1 轉錄因子辨識的區域；當 AP-1 轉錄因子與 miR-21 的促進子結合後，可進一步地誘導 miR-21 的表現 [14]。Sugatani 等人 [13] 最近觀察到骨髓分化單核球/巨噬細胞前驅物 (bone marrow-derived monocyte/macrophage precursors；BMMs) 於細胞核因子 κB 配位體接受器活化因子 (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand；RANKL) 誘導的蝕骨細胞生成過程中，miR-21 表現量具有顯著的增加；當抑制 miR-21 的表現時，蝕骨細胞也具有較低的骨吸收活性。因此，高度表現的 miR-21 可能與蝕骨細胞的活化具有相關。此外，計畫性細胞死亡-4 (programmed cell death 4；PDCD4) 也被觀察到具有抑制 AP-1 活性的功能 [15]；Sugatani 等人 [13] 更進一步地觀察到高度表現的 miR-21 在 BMMs 培養過程中具有抑制 PDCD4 蛋白的表現，而蝕骨細胞的表現會顯著高於對照組。因此，miR-21 的高度表現可能會減弱 PDCD4 的表現，並且導致蝕骨細胞的大量表現。

特別的是，在肝細胞癌與慢性肝炎病患 [16]、以及乳癌病患 [17] 的研究中，均觀察到病患相較於健康對照具有顯著較高的血清 miR-21 表現。因此，具有較高的血清 miR-21 表現者可能會減弱其 PDCD4 的表現，進而影響蝕骨細胞生成反應，並且相關於僵直性脊椎炎的發生。在本研究中，我們執行一項以醫院為基礎的病例對照研究來評估血清 miR-21 與 PDCD4 mRNA 表現對於僵直性脊椎炎發生的效應。

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，並且研究設計與研究結果均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85名僵直性脊椎炎病患為病例組，病例需經由免疫風濕專科醫師確診及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 [18]。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性別與年齡 (± 5歲) 所配對；健康對照共計為85名。而對照是選取於同一教學醫學中心執行健康檢查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、發炎性腸症及甲狀腺疾病者，則被排除於研究樣本外。

參與者的同意書皆被獲取，問卷所涵蓋的問題包括人口學特質、詳細的個人及家族疾病史。個人疾病史，包括個人發病年數、併發症、藥物使用狀況以及現今治療情形也都被詢問；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。發病年數的資料包括了發病年齡、疾病持續時間與延遲診斷時間；發病年齡的定義為初始症狀的發生年齡，初始症狀包括周邊關節炎、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情形。發炎性大腸炎的定義為大腸或小腸有發炎的情形，如潰瘍性大腸炎與克隆氏症 (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。藥物使用狀況為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)。

生化指標、HLA-B27基因與骨骼再吸收標記

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，並且被分離成為血漿、buffy coat、淋巴球和紅血球。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 μl的血液與30 μl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 [19]。

骨骼再吸收標記CTX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0.02-3.38 ng/ml。以50 μl的血清樣本，加入事先黏附抗體 (MAb 1H1l) 的酵素免疫分析盤孔內，然後在37^{o}C下培養一小時。清洗掉後，加入100 μl的二次單株抗體於每個孔內，室溫下培養二小時，然後再度洗掉；再加入100 μl的受質TMB (TM blue；3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine) 於37^{o}C下培養30分鐘，即可產生顏色。以450 nm波長在ELISA reader中偵測每個樣本的吸光值，並與標準樣本所得的吸光值作比對後，來決定樣本中CTX的濃度。

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 μl DZPC-氯仿混合均勻。於4^{o}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 μl之99% isopropanol，混合均勻後置於-20°C下10分鐘。再於4^{o}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 ^{o}C下離心12000 rpm 15分鐘，移去上清液；待RNA沉澱物乾燥後，加入RNase-free H_2O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 (ng/μl)。

MiR-21與PDCD4 mRNA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-21。首先進行反轉錄 (reverse transcription；RT)，取5 μl待測之miRNA加入0.15 μl dNTP、1.0 μl RTase、1.5 μl 10x RT buffer、0.19 μl RNase inhibitor、3 μl 5x RT-primers、以及4.16 μl Nuclease free H_2O；miR-21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 ^{o}C 5分鐘。反應完後補上5 μl Nuclease free H_2O，以進行後續的聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chian reaction；PCR)。取5 μl反轉錄後的cDNA，加入1 μl 20x primers、10 μl 2x Master Mix及4 μl Nuclease free H_2O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^{o}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ABI PRISM 7000 Real Time RT-PCR System and TaqMan Gene Expression probe (Applied Biosystems)，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。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)；所有的即時PCR反應數據將以$2^{-\Delta\Delta CT}$ (cycle threshold) 法計算 [20]。

PDCD4 mRNA之反轉錄反應是使用RT-PCR kit (Promega) 進行反應，取2 μg的total RNA加熱70^{o}C 10分鐘後，隨即放置冰浴中冷卻2分鐘，再加入4 μl的5倍MMLV buffer、2 μl的10 mM dNTP、0.5 μl的recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor (40 U/μl)、0.5 μl的MMLV Reverse transcriptase RNase H(-)point mutant、1 μl的Random primer (500 ng/μl)、及RNase-free H_2O補至最終體積為20 μl。於PCR儀器中進行下列反應：42°C 90分鐘、72°C 10分鐘、4°C 5分鐘來合成cDNA，儲存於-20°C冰箱中備用。使用standard SYBR Green PCR kit進行PDCD4定量分析，

PDCD4引子分別為forward：5’-AGT GGA TTA ACT GTG CCA ACC A- 3’、reverse：5’-CTC CTG CAC CAC CTT TCT TTG- 3’。寡核苷酸藉由TIB Molbiol Inc形成，每管反應物包含了25 μl FastStart TaqMan Probe Master、0.5 μl UPL探針、0.5 μl forward引子、0.5 μl reverse引子、18 μl Nuclease-free H_2O及5 μl RNA。使用GAPDH當作內部對照，使加入PCR反應中的不同cDNA總量可以標準化；GAPDH的放大使用UPL Reference Gene Assays，反應物含有10 μl FastStart TaqMan Probe Master、0.5 μl探針、0.5 μl引子混合物及4 μl Nuclease-free H_2O。GAPDH引子分別為forward：5’-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC-3’、reverse：5’-GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT-3’。即時PCR反應開始於42^{o}C 5分鐘、95°C 3分鐘；接下來進行40回合循環：95°C 3秒鐘、60°C 30秒鐘；根據Ct值來計算待測之PDCD4 mRNA的相對表現量。

統計方法

病例與對照的性別、年齡、臨床表徵、生化指標、miR-21、PDCD4 mRNA表現與骨骼再吸收指標 (CTX)，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，以 χ^2-test 檢定兩組類別性變項之分佈。隨後，以對照組的 miR-21、PDCD4 mRNA 與 CTX 之表現依中位數區分為高度表現與低度表現兩組，並且使用多變項條件對數模式 (multiple conditional logistic model) 求取每個變項的相對危險性 (relative risk；RR) 以及 95%信賴區間 (95% confidence interval；95% C.I.)。皮爾森相關 (Pearson correlation) 被使用來分別評估僵直性脊椎炎病患的 miR-21 與 CTX 表現之相關；進一步地，此相關性也在疾病持續時間≥ 10 年與< 10 年分組中被分析。全

部數據以 SAS 9.1 分析，所有的 *P* 值以雙尾檢定來計算。

結果：

本研究中，分別有 85 名經由年齡及性別配對之僵直性脊椎炎患者與健康對照被納入分析。病例與對照之基本特徵及臨床指標呈現於表一。研究對象為男性之比例為 75.3%，病例及對照的平均年齡分別是 36.4 ± 11.0 (標準差) 歲與 36.7 ± 11.4 歲 ($P = 0.89$，*t*-test)。僵直性脊椎炎病患的發病年齡是 27.4 ± 11.2 歲，疾病持續時間是 8.9 ± 8.3 年，疾病的延遲診斷時間是 1.2 ± 2.9 年。此外，在僵直性脊椎炎病患中，22 名 (25.9%) 具有周邊關節炎、22 名 (25.9%) 具有虹彩炎以及 2 名 (2.4%) 具有發炎性腸道疾病的症狀。此外，92.9%的病患攜帶 HLA-B27 陽性，ESR、CRP 與 IgA 分別為 24.5 ± 21.3 mm/h、1.1 ± 1.8 mg/dl 以及 303.5 ± 103.3 mg/dl；65.9%的病患有服用非類固醇抗發炎止痛劑，45.9%的病患有使用免疫調節劑。

僵直性脊椎炎病例及對照之 miR-21、PDCD4 mRNA 與 CTX 的表現與相對危險性，呈現於表二。僵直性脊椎炎病患相較於健康對照，有顯著較高的血清 miR-21 表現量 (4.02 vs. 0.86，$P < 0.001$)、PDCD4 mRNA 表現量 (2.89 vs. 1.95，$P < 0.001$)、以及 CTX 濃度 (0.53 vs. 0.33，$P < 0.001$)。隨後，以健康對照的血清 miR-21、PDCD4 mRNA 與 CTX 表現量之中位數來分別區分為高度與低度表現兩組。具有 miR-21 高度表現者在病例組中為 85.7%；並且相較於 miR-21 低度表現者，具有 miR-21 高度表現者具有 4.38 倍的僵直性脊椎炎發生危險性 (95% C.I. = 1.89-10.15)。PDCD4 mRNA 高度表現者在病例組中為 75.3%；而相較於 PDCD4 mRNA 低度表現者，PDCD4 mRNA 高度表現者具有 3.82 倍的僵直

性脊椎炎發生危險性 (95% C.I. = 1.63-8.95)。同樣地，具有 CTX 高度表現者在病例組中為 69.9%;並且相較於血清 CTX 低度表現者,CTX 高度表現者具有 2.19 倍的僵直性脊椎炎發生危險性 (95% C.I. = 1.10-4.40)。

隨後，我們分析了僵直性脊椎炎病患其血清 miR-21 與 CTX 表現之相關。在圖一中，我們可以觀察到病患其血清 miR-21 與 CTX 的表現具有顯著的正相關存在 (r = 0.27，P = 0.014)。進一步地，將僵直性脊椎炎病患以疾病持續時間區分成≥ 10 年與< 10 年兩組；在疾病持續時間< 10 年的病患中，其血清 miR-21 與 CTX 的表現呈現更明顯的正相關 (r = 0.44，P = 0.001；圖二 (a))。然而，在疾病持續時間≥ 10 年的病患中，其血清 miR-21 與 CTX 的表現則不具有顯著相關的存在 (圖二 (b))。

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miR-21與PDCD4 mRNA表現量；並且相較於低度表現者，miR-21高度表現者具有顯著較高的僵直性脊椎炎發生危險性，而PDCD4高度表現者也具有較高的疾病發生危險。此外，僵直性脊椎炎病患血清中骨骼再吸收標記CTX的濃度也顯著高於健康對照；而相較於低度表現者，CTX高度表現者也具有較高的僵直性脊椎炎發生危險性。進一步地，僵直性脊椎炎病患的miR-21與CTX之表現呈現顯著的正相關；並且此結果在疾病持續時間小於10年的僵直性脊椎炎病患中更為明顯。

我們的研究發現,僵直性脊椎炎的病患相較於健康對照具有顯著較高的血清miR-21表現，而如此的結果可能與miR-21的表現具有調節蝕骨細胞的活化有

關。最近，Stagakis等人 [21] 也在全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus) 的病患中發現，其$CD4^+$ T細胞具有miR-21的高度表現。此外，在類風濕性關節炎病患的滑膜組織中也已經被觀察到具有高度表現的AP-1，並且高度表現的AP-1可造成滑膜異常增生與局部免疫失調的症狀 [12]。在miR-21的促進子上已經被發現具有許多AP-1轉錄因子之結合位置 [14]，而c-Fos是構成AP-1轉錄因子的要件之一 [11]，並且可以藉由轉錄調控來影響單核球細胞的發展 [22]。然而，在缺乏c-Fos的骨髓分化單核球/巨噬細胞前驅物 (BMMs) 培養過程中發現miR-21的表現會顯著地減少；特別的是，當抑制miR-21表現時，蝕骨細胞也具有較低的骨吸收活性 [13]。因此，miR-21的表現可能會受到AP-1轉錄因子的影響，並且改變骨蝕作用的表現。

在我們的研究中也發現到僵直性脊椎炎病患相較於健康對照具有較高的PDCD4 mRNA的表現，並且PDCD4高度表現者相較於低度表現者具有顯著較高的疾病發生危險。PDCD4已經被發現具有抑制細胞增生和細胞週期，以及誘導細胞凋亡的功能 [23]；而PDCD4在細胞凋亡的過程中可受到環氧化酶 (cyclooxygenase；COX) -2抑制劑 [24] 與Akt磷酸化蛋白激酶 [25] 所調控，並且COX-2在計畫性細胞死亡過程中扮演抑制的功能 [26]。另一方面，PDCD4已經被發現是miR-21的標的基因 [27, 28]，藉由鍵結到PDCD4 mRNA的3’ UTR位置，進而影響PDCD4 mRNA的降解與轉譯作用 [28, 29]。Sugatani等人 [13] 在小鼠骨髓分化單核球/巨噬細胞前驅物 (BMMs) 培養過程中，觀察到 miR-21的過度表現會使PDCD4的表現明顯地減少；此外，PDCD4也被觀察到具有抑制c-Fos活性的功能。因此，miR-21的高度表現可能會抑制PDCD4的表現，並且誘導蝕骨細胞的活化。然而，c-Fos、miR-21與PDCD4在骨蝕生成過程中也可能存在著正

向回饋 (positive feedback) 的關係 [13]。我們的結果顯示僵直性脊椎炎病患相較於健康對照具有顯著較高的血清miR-21與CTX表現，並且在僵直性脊椎炎病患中觀察到此二者表現具有顯著的正相關；而如此的結果建議著miR-21的高度表現可能會調控蝕骨細胞的活化，並且miR-21在骨蝕生成作用上可能扮演著重要的角色。但是，我們也觀察到PDCD4的高度表現者相較於低度表現者具有顯著較高的僵直性脊椎炎發生危險；此結果與PDCD4身為miR-21的標的基因之角色是不符的。如此結果的可能解釋是PDCD4的表現除了受到miR-21所調控外，亦受到其它因子的影響，包括COX-2抑制劑 [24] 與Akt磷酸化蛋白激酶 [25]。此外，較少的樣本數可能也是造成如此歧異結果的原因；建議未來的研究應納入更多的樣本數，並且需要更多的功能性研究進一步地在僵直性脊椎炎的致病機轉中加以驗證我們現今所觀察到的結果。

脊椎骨質流失可能是辨別僵直性脊椎炎的症狀之一 [4]。先前研究也在疾病持續時間< 5年的僵直性脊椎炎病患中發現，有半數以上的病患具有臀部或脊椎骨質疏鬆的症狀；相對地，在疾病持續時間> 10年的僵直性脊椎炎病患中，29%的病患具有臀部骨質疏鬆，而僅有4%的病患具有腰椎骨質疏鬆 [4]。因此，僵直性脊椎炎的骨質流失可能與疾病的持續時間有關。有趣的是，在現今的研究中，我們將僵直性脊椎炎病患依據疾病持續時間分成≥ 10年與< 10年兩組，結果發現疾病持續時間< 10年的病患其血清miR-21表現與蝕骨細胞標記CTX濃度呈現明顯的正相關；然而，如此結果並未在疾病持續時間≥ 10年的病患中被發現。在一項氣喘小鼠的研究中發現，發炎反應可誘導miR-21的表現 [30]，而僵直性脊椎炎病患的疾病活性也可以導致骨蝕作用的增加 [4]。因此，我們推論具有較高疾病活性的早期僵直性脊椎炎病患，特別是處於持續發炎狀態者，可能會增加其

miR-21的表現，進而促使蝕骨細胞的活化與成熟。然而，我們的研究缺乏骨質密度數值與詳細的骨質代謝指標，建議未來的研究可以納入這些指標進行進一步的探討。

對於測定血清 miR-21 與 PDCD4 mRNA 表現的測定，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，因此我們的研究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 miR-21 以及 PDCD4 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-21 以及 PDCD4 表現與僵直性脊椎炎發生之相關性；我們的結果顯示，僵直性脊椎炎病患具有顯著較高的血清 miR-21 的表現，並且與蝕骨細胞標記 CTX 的表現呈現顯著正相關，尤其在疾病持續時間< 10 年的病患中。我們的結果建議著，miR-21 的表現可能影響僵直性脊椎炎的發生，並且可能在疾病初期於骨蝕生成作用中扮演關鍵的角色。

致謝：

本研究感謝行政院國家科學委員會的補助 (100-2815-C-040 -036-B) 以及魏正宗醫師在病人收案上的幫忙。

參考文獻：

1. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. Lancet. 369(9570):1379-90, 2007.
2. Mardjuadi A, Nasution AR, Kunmartini S, et al. Clinical features of spondyloarthropathy in Chinese and native Indonesians. Clin Rheumatol. 18(6):442-5, 1999.
3. Braun J, Bollow M, Sieper J. Radiologic diagnosis and pathology of the spondyloarthropathies. Rheum Dis Clin North Am. 24(4):697-735, 1998.
4. Karberg K, Zochling J, Sieper J, et al. Bone loss is detected more frequently in patients with ankylosing spondylitis with syndesmophytes. J Rheumatol. 32(7):1290-8, 2005.
5. Nemeth K, Schoppet M, Al-Fakhri N, et al. The role of osteoclast-associated receptor in osteoimmunology. J Immunol. 186(1):13-8, 2011.
6. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 423(6937):337-42, 2003.
7. Gravallese EM. Bone destruction in arthritis. Ann Rheum Dis. 61 Suppl 2:ii84-6, 2002.
8. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, et al. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. Arthritis Rheum. 50(1):265-76, 2004.
9. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, et al. Ankylosing spondylitis: an overview. Ann Rheum Dis. 61(Suppl 3):iii8–iii18, 2002.
10. Rosen HN, Moses AC, Garber J, et al. Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. Calcif Tissue Int. 66(2):100-3, 2000.
11. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in

inflammatory bone and skin disease. Arthritis Res Ther. 10(1):201, 2008.

12. Asahara H, Fujisawa K, Kobata T, et al. Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum. 40(5):912-8, 1997.
13. Sugatani T, Vacher J, Hruska KA. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. Blood. 117(13):3648-57, 2011.
14. Fujita S, Ito T, Mizutani T, et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. J Mol Biol. 378(3):492-504, 2008.
15. Loh PG, Yang HS, Walsh MA, et al. Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pdcd4. EMBO J. 28(3):274-85, 2009.
16. Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. Mol Carcinog. 50(2):136-42, 2011.
17. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, et al. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. Clin Chem. 57(1):84-91, 2011.
18. 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.
19. Chou CT, Tsai YF, Liu J, et al. 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.
20. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative

C(T) method. Nat Protoc. 3(6):1101-8, 2008.

21. Stagakis E, Bertsias G, Verginis P, et al. Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. Ann Rheum Dis. 70(8):1496-506, 2011.
22. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. Oncogene. 26(47):6816-28, 2007.
23. Wei ZT, Zhang X, Wang XY, et al. PDCD4 inhibits the malignant phenotype of ovarian cancer cells. Cancer Sci. 100(8):1408-13, 2009.
24. Zhang Z, DuBois RN. Detection of differentially expressed genes in human colon carcinoma cells treated with a selective COX-2 inhibitor. Oncogene. 20(33):4450-6, 2001.
25. Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, et al. Akt phosphorylates and regulates Pdcd4 tumor suppressor protein. Cancer Res. 65(24):11282-6, 2005.
26. Chang YW, Jakobi R, McGinty A, et al. Cyclooxygenase 2 promotes cell survival by stimulation of dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity. Mol Cell Biol. 20(22):8571-9, 2000.
27. Zhu Q, Wang Z, Hu Y, et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. Oncol Rep. 27(5):1660-8, 2012.
28. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(7):2257-61, 2006.
29. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. Oncogene. 27(31):4373-9, 2008.

30. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. J Immunol. 182(8):4994-5002, 2009.

表一：僵直性脊椎炎病例及對照之基本特徵與臨床指標

變項	病例	對照
個數	85	85
性別 (男性)	64 (75.3%)	64 (75.3%)
年齡 (歲)	36.4 ± 11.0[a]	36.7 ± 11.4
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	22 (25.9%)	
虹彩炎	22 (25.9%)	
發炎性腸道疾病	2 (2.4%)	
生化指標		
HLA- B27^{+}	79 (92.9%)	
紅血球沉降速率 (ESR, mm/h)	24.5 ± 21.3	
C反應蛋白 (CRP, mg/dl)	1.1 ± 1.8	
A型免疫球蛋白 (IgA, mg/dl)	303.5 ± 103.3	
藥物使用		
非類固醇抗發炎止痛劑	56 (65.9%)	
免疫調節劑	39 (45.9%)	

[a] 平均值 ± 標準差。

表二：僵直性脊椎炎病例及對照之血清 miR-21、PDCD4 mRNA 與 CTX 的表現與相對危險性

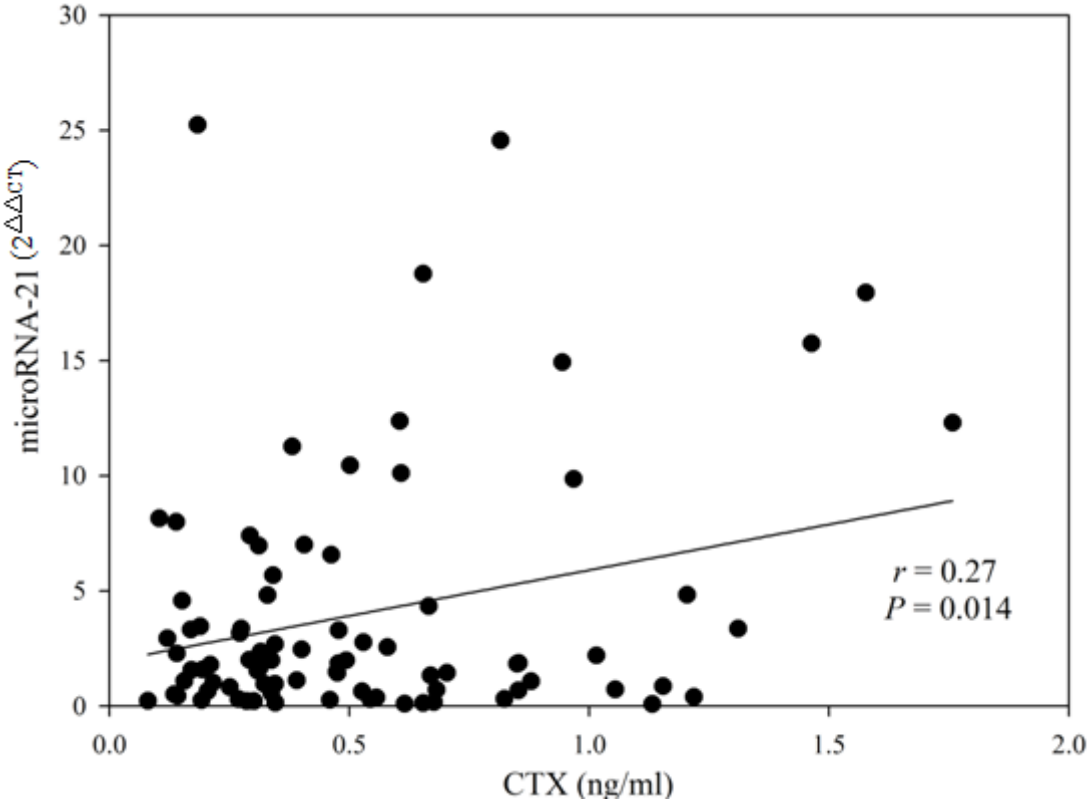
變項	病例 (n = 85)	對照 (n = 85)	RR_m (95% C.I.)[a]	*P* 值
miR-21 表現 ($2^{-\triangle\triangle CT}$)[b]	4.02 ± 5.38	0.86 ± 1.65		< 0.001
miR-21 高度表現 (≥ 0.30)	72 (85.7%)	42 (50.0%)	4.38 (1.89-10.15)	< 0.001
miR-21 低度表現 (< 0.30)	12 (14.3%)	42 (50.0%)	1.00 (reference)	
PDCD4 mRNA ($2^{-\triangle\triangle CT}$)[c]	2.89 ± 1.46	1.95 ± 1.22		< 0.001
PDCD4 高度表現 (≥ 1.59)	64 (75.3%)	43 (50.6%)	3.82 (1.63-8.95)	0.002
PDCD4 低度表現 (< 1.59)	21 (24.7%)	42 (49.4%)	1.00 (reference)	
CTX 濃度 (ng/ml)[d]	0.53 ± 0.37	0.33 ± 0.18		< 0.001
CTX 高度表現 (≥ 0.30)	58 (69.9%)	42 (50.0%)	2.19 (1.10-4.40)	0.027
CTX 低度表現 (< 0.30)	25 (30.1%)	42 (50.0%)	1.00 (reference)	

[a] 經年齡與性別之配對。

[b] 病例與對照組中各有 1 名極端值不被納入分析，miR-21 的表現量是以 RNU6B 當作內部對照。

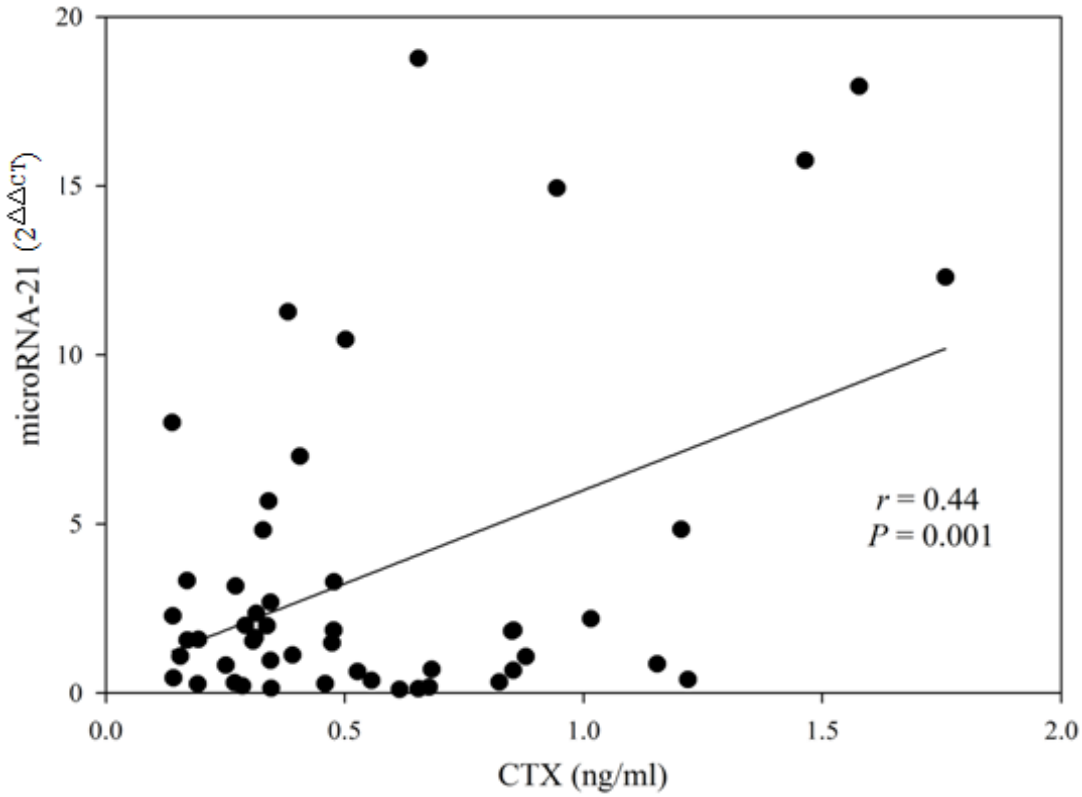
[c]PDCD4 mRNA 的表現量是以 GAPDH 當作內部對照。

[d] 病例組中有 2 名極端值與對照組中有 1 名極端值不被納入分析。

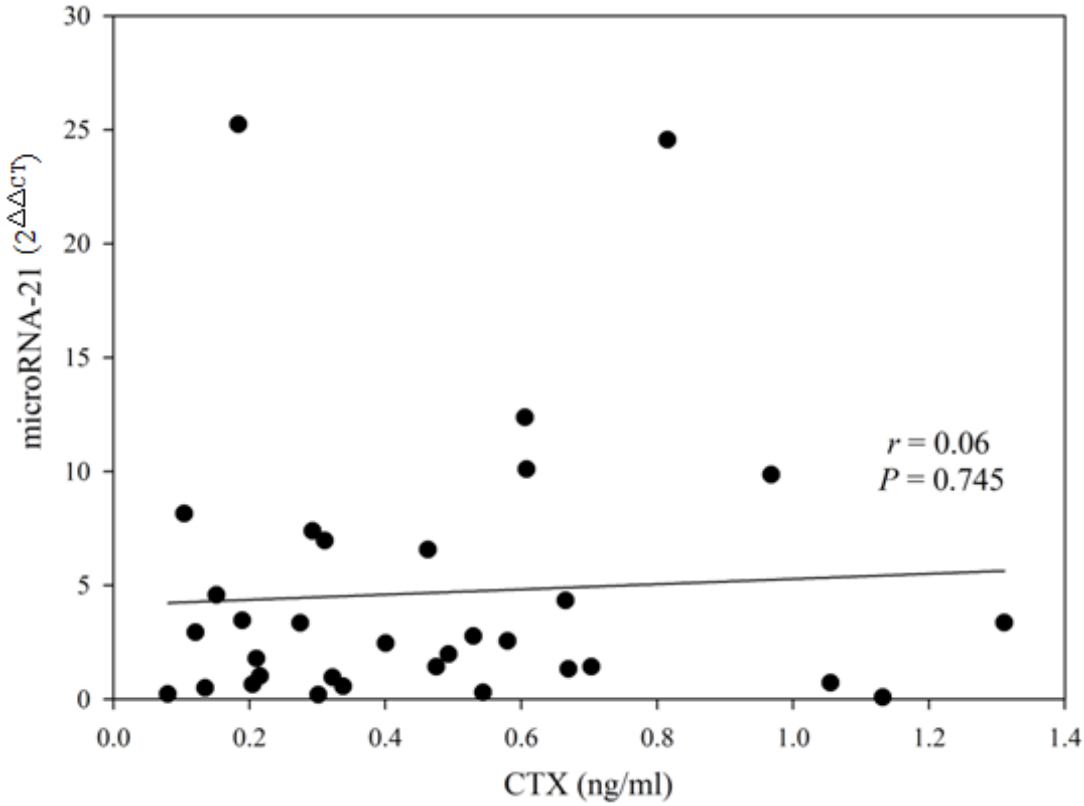


圖一：僵直性脊椎炎病患其血清 miR-21 與 CTX 表現之相關。兩名病患其 CTX 表現量具有極端值，因此不被納入分析；miR-21 的表現量是以 RNU6B 當作內部對照。

(a)



(b)



圖二：(a) 疾病持續時間< 10 年之僵直性脊椎炎病患 (n = 50) 其血清 miR-21 與 CTX 表現之相關；(b) 疾病持續時間≥ 10 年之僵直性脊椎炎病患 (n = 33) 其血清 miR-21 與 CTX 表現之相關，miR-21 的表現量是以 RNU6B 當作內部對照。