

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

在僵直性脊椎炎中，循環微型核糖核酸 (miR-27, miR-29, miR-125b, miR-146a, miR-155) 與其標的基因、發炎體基因多形性、骨重塑與發炎標記、以及臨床表徵之相關

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 103-2314-B-040-007-
執行期間：103年08月01日至104年07月31日
執行單位：中山醫學大學公共衛生學系（所）

計畫主持人：翁瑞宏
共同主持人：陳俊傑、魏正宗
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：林玟君
大專生-兼任助理人員：黃靚宜
博士班研究生-兼任助理人員：黃家禎

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 10 月 27 日

中文摘要：骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins; BMPs) 是由成骨細胞 (osteoblasts) 所分泌，可以影響僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis; AS) 的新骨形成 (bone formation)。微型核糖核酸 (microRNA; miR)-29 抑制無翼的 (Wingless; Wnt) 蛋白抑制者 Dickkopf 1 (DKK1) 與分泌型捲曲相關蛋白 (secreted frizzled related protein; sFRP) 2，miR-27 也抑制 Wnt 抑制者 sFRP1、DKK2 與 adenomatous polyposis coli (APC) 以調節 Wnt 訊息路徑。然而，Wnt 訊息路徑被活化時，也可能進一步地誘發 BMPs 表現。我們比較 BMP-2、BMP-4、BMP-7、miR-29、miR-27、以及其標的基因表現在僵直性脊椎炎病患和健康對照之間的差異，風濕藥物對於僵直性脊椎炎病患的這些分子表現之影響也被評估。結果觀察到 73 名脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患分別相較於 62 名健康對照和 9 名無脊椎黏合的病患具有較高的血清 BMP-4 與 BMP-7 濃度 ($p < 0.01$)。脊椎黏合與無脊椎黏合的僵直性脊椎炎患者也分別相較於健康對照，具有顯著較高的 miR-27b、miR-29a 與 miR-29b，以及較低的 sFRP1 與 sFRP2 mRNA 表現。此外，相較於未接受藥物治療的僵直性脊椎炎病患，接受藥物治療的病患具有較低的 miR-27b 表現。因此，BMPs、miR-27 與 Wnt 抑制者蛋白可能相關於僵直性脊椎炎的新骨形成。

另一方面，miR-146a 結合腫瘤壞死因子接受器相關因子-6 (TNF-receptor-associated-factor-6; TRAF-6) 和 IL-1 接受器相關激酶 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1; IRAK1) 亦可能抑制細胞核因子 κ B (nuclear factor κ B; NF- κ B) 活性。因此，我們探討是否 miR-146a rs2910164 G/C、IRAK1 rs3027898 A/C 和 rs1059703 T/C 基因多形性與僵直性脊椎炎的發展和臨床徵狀具有相關。總計，有 450 名台灣僵直性脊椎炎病患與 438 名健康對照被納入於我們的研究，攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 對偶基因成對分析 (pairwise analysis) 中顯示，G/A (OR 2.84; 95% CI 1.34-6.03)、G/C (OR 1.71; 95% CI 1.27-2.30)、與 C/A (OR 1.53; 95% CI 1.09-2.16) 對偶基因相較於 C/C 對偶基因具有顯著較高的僵直性脊椎炎發生危險性；如此的結果在男性中被發現，但不在女性中。此外，攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 G/A 成對對偶基因的僵直性脊椎炎病患相較於攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 C/C 成對對偶基因的病患具有一個顯著較高的虹彩炎 (uveitis) 發生危險。因此，miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 多形性可能是相關於僵直性脊椎炎的發生以及其臨床徵狀。

中文關鍵詞：僵直性脊椎炎、新骨形成、骨形成蛋白、miR-27、Wnt 抑制者、miR-146a、IL-1 接受器相關激酶 1

英文摘要：Bone morphogenetic proteins (BMPs), is secreted by osteoblasts, might influence the bone formation in ankylosing spondylitis (AS). MicroRNA (miR)-29 suppresses Dickkopf 1 (DKK1) and secreted frizzled related protein 2 (sFRP2) of the Wingless (Wnt) inhibitors, and miR-27 also suppresses sFRP1, DKK2, and adenomatous polyposis coli (APC) of the Wnt inhibitors to regulate the Wnt signal pathway. When Wnt signal pathway was activated, it might

further induced BMPs expression. We compared the differences of microRNA, and their target genes expressions between AS and controls. The influence of rheumatologic drugs on the expressions of these molecules in AS was also assessed. Results observed that 73 patients with spinal fusion had higher serum levels of BMP-4 and BMP-7 than either 62 healthy controls or 79 patients without spinal fusion ($p < 0.01$), respectively. Patients with spinal fusion and those without spinal fusion also had the significantly increased miR-27b, miR-29a, miR-29b, and lower sFRP1 mRNA and sFRP2 mRNA expressions than healthy controls; respectively. In addition, compared to AS patients without receiving drug treatment, those with receiving drug treatment had a lower miR-27b expression. Therefore, BMPs, miR-27, and Wnt inhibitor proteins might relate to the bone formation in AS.

On the other hand, miR-146a targets TNF-receptor-associated-factor-6 (TRAF-6) and interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), and it is possible to suppress nuclear factor κ B (NF- κ B) activity. Therefore, we investigated whether miR-146a rs2910164 G/C, IRAK1 rs3027898 A/C and rs1059703 T/C genetic polymorphisms associated with AS development and clinical characteristics. Total of 450 Taiwanese AS and 438 controls were recruited in our study. Analysis of the miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 alleles showed G/A, G/C, and C/A had a significantly greater risk of AS occurrence than the C/C alleles. Such results were found in males, but not in females. In addition, AS with miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 G/A pairwise alleles had a significantly higher risk of uveitis development than patients with miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 C/C pairwise alleles. Therefore, miR-146a rs2910164 and IRAK1 rs3027898 polymorphisms might be associated with the development of AS, as well as its clinical manifestations.

英文關鍵詞：ankylosing spondylitis, bone formation, bone morphogenetic protein, miR-27, Wingless inhibitors, miR-146a, IL-1 receptor

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

計畫名稱：在僵直性脊椎炎中，循環微型核糖核酸 (miR-27, miR-29, miR-125b, miR-146a, miR-155) 與其標的基因、發炎體基因多形性、骨重塑與發炎標記、以及臨床表徵之相關

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 103-2314-B-040-007-

執行期間：2014 年 08 月 01 日至 2015 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學 公共衛生學系

計畫主持人：翁瑞宏

計畫參與人員：陳俊傑、魏正宗、黃家禎、林玟君、黃靚宜

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，_____ (請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送)

中 華 民 國 104 年 09 月 15 日

摘要

骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins ; BMPs) 是由成骨細胞 (osteoblasts) 所分泌，可以影響僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis ; AS) 的新骨形成 (bone formation)。微型核糖核酸 (microRNA ; miR)-29 抑制無翼的 (Wingless ; Wnt) 蛋白抑制者 Dickkopf 1 (DKK1) 與分泌型捲曲相關蛋白 (secreted frizzled related protein ; sFRP) 2，miR-27 也抑制 Wnt 抑制者 sFRP1、DKK2 與 adenomatous polyposis coli (APC) 以調節 Wnt 訊息路徑。然而，Wnt 訊息路徑被活化時，也可能進一步地誘發 BMPs 表現。我們比較 BMP-2、BMP-4、BMP-7、miR-29、miR-27、以及其標的基因表現在僵直性脊椎炎病患和健康對照之間的差異，風濕藥物對於僵直性脊椎炎病患的這些分子表現之影響也被評估。結果觀察到 73 名脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患分別相較於 62 名健康對照和 9 名無脊椎黏合的病患具有較高的血清 BMP-4 與 BMP-7 濃度 ($p_s < 0.01$)。脊椎黏合與無脊椎黏合的僵直性脊椎炎患者也分別相較於健康對照，具有顯著較高的 miR-27b、miR-29a 與 miR-29b，以及較低的 sFRP1 與 sFRP2 mRNA 表現。此外，相較於未接受藥物治療的僵直性脊椎炎病患，接受藥物治療的病患具有較低的 miR-27b 表現。因此，BMPs、miR-27 與 Wnt 抑制者蛋白可能相關於僵直性脊椎炎的新骨形成。

另一方面，miR-146a 結合腫瘤壞死因子接受器相關因子-6 (TNF-receptor-associated-factor-6 ; TRAF-6) 和 IL-1 接受器相關激酶 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1 ; IRAK1) 亦可能抑制細胞核因子 κ B (nuclear factor κ B ; NF- κ B) 活性。因此，我們探討是否 miR-146a rs2910164 G/C、IRAK1 rs3027898 A/C 和 rs1059703 T/C 基因多形性與僵直性脊椎炎的發展和臨床徵狀具有相關。總計，有 450 名台灣僵直性脊椎炎病患與 438 名健康對照被納入於我們的研究，攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 對偶基因成對分析 (pairwise analysis) 中顯示，G/A (OR 2.84 ; 95% CI 1.34-6.03)、G/C (OR 1.71 ; 95% CI 1.27-2.30)、與 C/A (OR 1.53 ; 95% CI 1.09-2.16) 對偶基因相較於 C/C 對偶基因具有顯著較高的僵直性脊椎炎發生危險性；如此的結果在男性中被發現，但不在女性中。此外，攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 G/A 成對對偶基因的僵直性脊椎炎病患相較於攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 C/C 成對對偶基因的病患具有一個顯著較高的虹彩炎 (uveitis) 發生危險。因此，miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 多形性可能是相關於僵直性脊椎炎的發生以及其臨床徵狀。

關鍵詞：僵直性脊椎炎、新骨形成、骨形成蛋白、miR-27、Wnt 抑制者、miR-146a、IL-1 接受器相關激酶 1

Abstract

Bone morphogenic proteins (BMPs), is secreted by osteoblasts, might influence the bone formation in ankylosing spondylitis (AS). MicroRNA (miR)-29 suppresses Dickkopf 1 (DKK1) and secreted frizzled related protein 2 (sFRP2) of the Wnt inhibitors, and miR-27 also suppresses sFRP1, DKK2, and adenomatous polyposis coli (APC) of the Wnt inhibitors to regulate the Wnt signal pathway. When Wnt signal pathway was activated, it might further induced BMPs expression. We compared the differences of BMP-2, BMP-4, BMP-7, miR-29, miR-27, and their target genes expressions between AS patients and healthy controls. The influence of rheumatologic drugs on the expressions of these molecules in AS patients was also assessed. Results observed that 73 patients with spinal fusion had higher serum levels of BMP-4 and BMP-7 than either 62 healthy controls or 79 patients without spinal fusion ($p_s < 0.01$), respectively. AS patients with spinal fusion and those without spinal fusion also had the significantly increased miR-27b, miR-29a, miR-29b, and lower sFRP1 mRNA and sFRP2 mRNA expressions than healthy controls; respectively. In addition, compared to AS patients without receiving drug treatment, those with receiving drug treatment had a lower miR-27b expression. Therefore, BMPs, miR-27, and Wnt inhibitor proteins might relate to the bone formation in AS.

On the other hand, miR-146a targets TNF-receptor-associated-factor-6 (TRAF-6) and interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), and it is possible to suppress nuclear factor kB (NF-kB) activity. Therefore, we investigated whether miR-146a rs2910164 G/C, IRAK1 rs3027898 A/C and rs1059703 T/C genetic polymorphisms associated with AS development and clinical characteristics. A total of 450 Taiwanese AS patients and 438 healthy controls were recruited in our study. Pairwise analysis of the miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 alleles showed G/A (OR 2.84, 95% CI 1.34-6.03), G/C (OR 1.71, 95% CI 1.27-2.30), and C/A (OR 1.53, 95% CI 1.09-2.16) had a significantly greater risk of AS occurrence than the C/C alleles. Such results were found in males, but not in females. In addition, AS patients with miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 G/A pairwise alleles had a significantly higher risk of uveitis development than patients with miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 C/C pairwise alleles. Therefore, miR-146a rs2910164 and IRAK1 rs3027898 polymorphisms might be associated with the development of AS, as well as its clinical manifestations.

Key words: ankylosing spondylitis, bone formation, bone morphogenetic protein, miR-27, Wnt inhibitors, miR-146a, IL-1 receptor

目錄

摘要	I
Abstract.....	II
目錄	III
第一部分：僵直性脊椎炎病患其骨形成蛋白與微型核糖核酸-27 和-29 與 Wnt 蛋白抑制者的相關.....	4
前言	4
材料與方法	5
研究對象與流行病學資料	5
影像學評估與巴斯僵直性脊椎炎指數	5
實驗室檢測	5
反轉錄和定量即時 RT-PCR.....	6
統計分析	6
研究結果	6
討論	7
參考文獻	10
第二部分：微型核糖核酸-146a (miR-146a) 與其標的 IL-1 接受器相關激酶 1 (IRAK1) 基因多形性對於僵直性脊椎炎之易感受性	17
前言	17
材料與方法	17
研究對象	17
實驗室分析	18
統計分析	18
結果	19
討論	20
參考文獻	22

第一部分：僵直性脊椎炎病患其骨形成蛋白與微型核糖核酸-27 和-29 與 Wnt 蛋白抑制者的相關

前言

僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis ; AS) 的脊椎影像學，顯示出不規則的侵蝕、硬化、以及脊椎骨形成方椎 (squaring) 症狀 [1]；隨著疾病進展，相鄰的脊椎骨會形成韌帶骨贅 (syndesmophytes)，並且最終會形成骨橋 (bony bridge) 症狀 [2]。骨形成是由間質細胞 (mesenchymal cell) 分化的成骨細胞 (osteoblasts) 所調控，可以快速地形成新骨 [2]；除了發炎以外，其它機制也可能貢獻於脊椎黏合的致病機轉。脊椎韌帶骨贅會在發炎的脊椎邊緣形成，但是它也可能發生在無發炎的部位 [3]。

骨形成蛋白 (Bone morphogenetic proteins ; BMPs) 屬於轉化生長因子- β (transforming growth factor- β ; TGF- β) 超級家族成員，能夠誘導成骨細胞的分化 [4]。體內試驗觀察到不同的骨形成蛋白表現在僵直性脊椎接合點發炎 (ankylosing enthesitis) 過程，並且免疫組織化學染色結果顯示，脊椎關節病變病患的標的細胞也有類似的活化骨形成蛋白訊息路徑 [5]。相較於健康對照，僵直性脊椎炎病患具有較高的 BMP-2、BMP-4、以及 BMP-7 表現，並且 BMP 蛋白的過度表現相關於巴斯僵直性脊椎炎疾病活性指數 (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index ; BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎放射指數 (Bath Ankylosing Spondylitis Radiological Index ; BASRI)、以及修飾後斯托克僵直性脊椎炎脊椎分數 (modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score ; mSASSS) [6, 7]。此外，僵直性脊椎炎病患的 BMPs 可能在脊椎黏合過程扮演一個關鍵的角色。

無翼的 (Wingless ; Wnt) 蛋白與細胞表面的捲曲接受器 (frizzled receptors) 和低密度脂蛋白受體相關蛋白 5/6 (LDL receptor-related protein 5/6 ; LRP 5/6) 組成的複合物結合，可抑制由 APC (Adenomatous polyposis coli)、肝醣合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β ; GSK-3 β)、axin、 β -catenin、和 CK1 α 組成的多重蛋白複合物，進而允許 β -catenin 的累積；而累積的 β -catenin 可以進入細胞核中，並且啟動標的基因的轉錄。然而，在 Wnt 訊息缺乏的情況下， β -catenin 主要被 GSK-3 β 磷酸化而降解 [8]。另一方面，Dickkopf1 (DKK1) 與分泌型捲曲相關蛋白 (secreted frizzled related protein ; sFRP) 是 Wnt 的關鍵抑制者，藉由與 LRP 5/6 的結合來抑制 Wnt 與 Frizzled 形成複合物，並且阻斷抑制他們參與在 Wnts 的訊息路徑 [9]。在直接的骨形成過程中，骨骼先趨細胞 (skeletal progenitor cells) 可藉由 Wnts 訊息直接分化成成骨細胞 [4]；此外，BMPs 在軟骨內骨形成 (endochondral bone formation) 的早期階段是不可或缺的，並且 Wnts 與其抑制者也可能在此階段具有重要的調節角色 [4]。近期的報告已經指出，接受抗腫瘤壞死因子- α (anti-tumor necrosis factor- α ; anti-TNF- α) 治療的僵直性脊椎炎病患相較於未接受 anti-TNF- α 治療的病患具有顯著較高的血清 DKK-1 濃度 [10]，並且無脊椎韌帶骨贅的僵直性脊椎炎病患相較於有脊椎韌帶骨贅的病患具有顯著較高的血清 DKK-1 濃度 [11]。這些觀察建議著 BMPs 和 Wnt 訊息路徑在僵直性脊椎炎的新骨形成過程中，可能扮演著關鍵角色。

MiR-29 家族成員包括 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c，已經被報告可藉由 Wnt 訊息路徑來誘導，並且 miR-29a 會抑制 Wnt 抑制者 DKK1 和 sFRP2 的表現，以促進成骨細胞的形成 [12, 13]。此外，在人類胚胎成骨 1.19 細胞株 (human fetal osteoblastic 1.19 cell line ; hFOB) 中，miR-27 (miR-27a 和 miR-27b) 可直接結合並且抑制 APC 基因表現，以活化 Wnt 訊息路徑 [14]。證據指出 sFRP1 和 DKK2 基因是 miR-27 的標的基因 [15]，並且 sFRP1 和 DKK2 對於 miR-27 的抑制可能促進成骨細胞的形成 [16]。因此，我們有興趣比較在僵直性脊椎炎病患與健康對照之間的血清 BMP-2、BMP-4、以及 BMP-7、全血 miR-29、miR-27、以及其標的基因的表現程度之差異。而非類固醇抗發炎藥物 (nonsteroidal antiinflammatory drugs ; NSAIDs) 不只減緩疾病的症狀和合併症，也可能延緩僵直性脊椎炎病患的脊椎僵硬進展 [17, 18]。於是，BMPs、和全血 miR-29、miR-27、以及其標的基因的表現也在不同的藥物治療型態中被評估，並且這些分子標記之表現與巴斯僵直性脊椎炎 (Bath Ankylosing Spondylitis ; BAS) 指數、發炎指標、以及實驗室檢驗之相關也被評估。

材料與方法

研究對象與流行病學資料

從 2014 年 8 月至 2015 年 7 月之間，共有 152 名僵直性脊椎炎病患從中山醫學大學附設醫院免疫風濕科門診被收集；所有病患均有完整的影像學紀錄，使用修飾過的 New York 準則來確認 [19]，並且認知功能並未受到其它疾病（如癡呆）所影響。薦腸骨關節炎 (sacroiliitis) 是經由一名合格的放射科醫師來確認，並且僵直性脊椎炎是經由一名合格的免疫風濕科醫師所確診。詳細的臨床史被記錄，包括初始症狀發病年齡、僵直性脊椎炎家族史、藥物史、以及脊椎關節外的相關併發症。僵直性脊椎炎的初始症狀發病年齡被定義為首次症狀（脊椎症狀、周邊關節炎、虹彩炎 [uveitis] 或接骨點發炎 [enthesitis]）的發病時間，延遲診斷時間的定義為僵直性脊椎炎的初始症狀的發生與確診之間的間距，家族史被定義為具有僵直性脊椎炎、發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease; IBD)、反覆性關節炎 (reactive arthritis)、或乾癬性關節炎 (psoriatic arthritis) 的一等親親屬。在目前的研究中，僵直性脊椎炎病患有服用 NSAIDs (萬客適 [Arcoxia]、希樂葆 [Celebrex]、美洛西卡 [Meloxicam]、和痛停錠 [Aceclofenac]) 和疾病調節抗風濕藥物 (disease modifying anti-rheumatic drugs; DMARDs; 斯樂腸溶錠 [Salazpyrine] 和滅殺除癌錠 [Methotrexate]) 藥物，NSAIDs 與 DMARDs 之使用被定義為藥物服用超過三個月。周邊關節炎被定義為至少有一個腫脹的關節呈現，並且發炎性腸道疾病被定義為大腸和小腸有發炎的情形，包括潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis) 與克隆氏症 (Crohn's disease)。虹彩炎被定義為眼睛的中介層 (middle layer) 具有發炎反應呈現，包括單眼或雙眼。這些症狀均是由風濕科醫師、腸胃科醫師、與眼科醫師所確診。

健康對照組共有 62 名潛在的健康對照，是隨機地於同一醫學中心執行一般健康檢查的就診病患之中所選取，並且他們沒有風濕或自體免疫的症狀。本研究符合赫爾辛基宣言 (Declaration of Helsinki)，並且研究設計和最終結果的執行是經由中山醫學大學附設醫院人體試驗委員會的批准，所有的研究對象均提供知情同意書來參與本研究。

影像學評估與巴斯僵直性脊椎炎指數

兩位風濕免疫科醫師以雙盲的方式使用 mSASSS 和 BASRI 來進行髖關節、腰椎、以及頸椎的評估，評估方法如先前研究所敘述 [6, 20]。總 BASRI 分數 (範圍 2-16 分) 是以髖部 BASRI 分數 (BASRI-hip joint, 範圍: 0-4 分) 與脊椎 BASRI 分數 (BASRI-spine, 範圍: 2-12 分; 納入髖關節 [2-4 分]、腰椎 [0-4 分]、以及頸椎 [0-4 分]) 來建構。在 mSASSS (0-72 分) 部分，腰椎和頸的前端 24 個部位各進行 0-3 分的評估範圍。在影像學評估上，由於 BASRI 相較於 mSASSS 有一個重大的缺點是無法評估微小的影像學變化 [21]；因此在目前的研究中，僵直性脊椎炎病患的 mSASSS 分數之中位數被運用來區分為脊椎黏合者 (mSASSS \geq 10 分) 或無脊椎黏合者 (mSASSS $<$ 10 分) [6]。

僵直性脊椎炎病患的疾病活性、身體功能、與整體身心狀態分別是以巴斯僵直性脊椎炎疾病活性指數 (BASDAI)、巴斯僵直性脊椎炎功能性指數 (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASFI)、以及巴斯僵直性脊椎炎健康綜合評分 (Bath Ankylosing Spondylitis Global; BAS-G) 來評估，BASDAI、BASFI、與 BAS-G 的修飾後中文版具有良好的組間相關係數 (intra-class correlation) 與 Cronbach's alpha [22]。

實驗室檢測

周邊血液被收集，並且離心來分離成血清和細胞，隨後冷凍於 -80°C 。我們根據製造商所提供的步驟來使用模組化的酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 以偵測骨形成標記，包括血清 BMP-2 (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA)、BMP-4 (R&D Systems Inc.)、以及 BMP-7 (R&D Systems Inc.)，這些參數的組內與組間的檢測變異係數均是低於 10%。僵直性脊椎炎的發炎指標，包括紅血球沉降速率 (erythrocyte sedimentation rate; ESR) 與 C-反應蛋白 (CRP) 是在中山醫學大學附設醫院的中央實驗室被測量；人類白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA)-B27 的帶原狀態是以流式細胞儀來測定之 [23]。

反轉錄和定量即時 RT-PCR

總 RNA 包括微小 RNA 是利用 PAXgene™ Blood RNA kit (Qiagen, Milan, Italy) 並根據製造商所提供的步驟從全血中被萃取，並且以 DNase (Qiagen, Valencia, CA, USA) 來處理。RNA 的良好完整性和純度被定義為具有 A260/A280 比值介於 1.8-2.0 之間。

對於準確的 miRNA 分析，特定製作的反轉錄與定量聚合酶鏈鎖反應試劑組 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 被使用來評估 miR-27a、miR-27b、miR-29a、miR-29b、以及 miR-29c 的表現，並且藉由使用 TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) 進行反轉錄反應對於即時聚合酶鏈鎖反應，是取 1 ml 稀釋後的反轉錄產物與 5 ml 2x Taqman PCR master mixture (No AmpErase UNG)、0.4 ml TaqMan MicroRNA Assay、以及 3.6 ml Nuclease-free water 混合，最終體積為 10 ml。所有反應是在 Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) 進行。即時 PCR 皆進行三重複，包括沒有模板的對照。miR-27a、miR-27b、miR-29a、miR-29b、以及 miR-29c 相對表現的計算是使用比較的循環閾值 (cycle threshold; CT, 2-DDCT) 方法來計算 [24]，並且以 RNU6B 來作為內部對照以標準化數值。

sFRP1、DKK2、APC、sFRP2、和 DKK1 mRNA 的表現是使用 KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) 來測量，執行的步驟是：42°C 5 分鐘、95°C 3 分鐘，接續再進行 95°C 3 秒鐘、60°C 30 秒鐘共 40 個循環數。GAPDH 被當作為內部對照，標的序列是以不同的引發子組合來進行增幅，sFRP1 的引發子為 forward 5'-GAG CCG GTC ATG CAG TTC TT-3'，reverse 5'-CAT TGG GCG GCG TCA T-3'；DKK2 的引發子為 forward 5'-GGT TTT GCT GTG CTC GTC ATT-3'，reverse 5'-AGC CCA TGA GAA CCC TTC TTG-3'；APC 的引發子為 forward 5'-GAG CAA AGA CAA TCA AGG AAT CAA-3'，reverse 5'-CCT GCT GTC CAA AAT GTG GTT-3'；sFRP2 的引發子為 forward 5'-GGT GCT GTG GCT CAA AGA CA-3'，reverse 5'-CAG CTC CCC ACC CTG TTT C-3'；DKK1 的引發子為 forward 5'-TAG CAC CTT GGA TGG GTA TTC C-3'，reverse 5'-ACA GTC TGA TGA CCG GAG ACA A-3'；GAPDH 的引發子為 forward 5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC-3'，reverse 5'-GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT-3'。標的基因的相對表現量是相對於 GAPDH 的表現量來標準化，以 $\Delta Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\text{GAPDH})$ 來表示，以 $\Delta\Delta Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\text{GAPDH})$ 來表示，sFRP1、DKK2、APC、sFRP2、和 DKK1 mRNA 複製數相較於 GAPDH 複製數的比值然後以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法計算 [24]。

統計分析

在脊椎融合、無脊椎融合的僵直性脊椎炎病患、以及健康對照之間的收案時之年齡比較是以變異數分析 (analysis of variance; ANOVA) 來執行。而其它變項的分佈是以 Kolmogorov-Smirnov normality test 進行檢定，並且這些變項呈現偏態分佈；因此，這些連續變項是以中位數 (第一四分位數 [first quartile; Q1]-第三四分位數 [third quartile; Q3]) 呈現，並且兩組之間的差異是以 Wilcoxon rank-sum test 進行比較，三組之間的比較是以 Kruskal-Wallis test 合併 post-hoc multiple comparisons (Bonferroni test) 進行分析。類別變項是以個數 (%) 呈現，並且以 χ^2 -test 或 Fisher's exact test 進行不同獨立組間的比較。斯皮爾曼等級相關 (Spearman rank correlation) 被使用來評估兩個變項之間的相關。使用雙尾統計檢定，p 值小於 0.05 被視為統計顯著，統計分析是使用 SAS 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA) 視窗軟體。

研究結果

具有脊椎黏合與無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患、以及健康對照之人口學、臨床、與影像學特徵被歸納於表一，性別比例 ($p < 0.01$) 與收案時的平均年齡 ($p < 0.01$) 在這三組之間是顯著的不同。在僵直性脊椎炎病患中，脊椎黏合者相較於無脊椎黏合者具有顯著較晚的初始症狀發病年齡 (Wilcoxon rank-sum test)、顯著較高比例的髖關節病變 (Fisher's exact test)、顯著較高的 ESR 和 CRP 數值、以及顯著較高的 BASDAI、BASFI、BAS-G、BASRI、BASRI spine、與 mSASSS 分數。然而，疾病病程、延遲診斷時間、周邊關節炎比例、虹彩炎比例、發炎性腸道疾病比例、HLA-B27 比例、以及 NSAIDs 和 DMARDs 使用比例在這兩種病患分組之間並無顯著差異被發現。

在表 2，脊椎黏合的病患分別相較於無脊椎黏合的病患 (BMP-4: 149.8 vs 144.2 pg/mL; $p = 0.008$ ；

BMP-7: 28.1 vs 19.4 pg/mL; $p = 0.005$) 與健康對照 (BMP-4: 149.8 vs 140.5 pg/mL; $p < 0.001$; BMP-7: 28.1 vs 17.9 pg/mL; $p < 0.001$) 具有顯著較高的 BMP-4 和 BMP-7 濃度。脊椎黏合與無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患也分別相較於健康對照, 具有顯著較高的 miR-27b、miR-29a、miR-29b、較低的 sFRP1、與 sFRP2 mRNA 表現。然而, BMP-2、miR-27a、DKK2 mRNA、APC mRNA、miR-29c、與 DKK1 mRNA 表現在僵直性脊椎炎病患與健康對照分組之間並無顯著差異。

研究對象的血清 BMPs 濃度分別與 sFRP1、DKK2、APC、sFRP2、以及 DKK1 mRNA 表現之相關, 呈現於表 3。在脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患中, BMP-4 濃度分別顯著地負向相關於 sFRP1 ($r = -0.49$, $p < 0.001$)、APC ($r = -0.26$, $p = 0.039$)、以及 sFRP2 mRNA ($r = -0.45$, $p < 0.001$) 表現; BMP-7 也顯著地負向相關於 sFRP1 ($r = -0.44$, $p < 0.001$)、DKK2 ($r = -0.25$, $p = 0.049$)、APC ($r = -0.41$, $p < 0.001$)、sFRP2 ($r = -0.40$, $p = 0.001$)、以及 DKK1 mRNA ($r = -0.26$, $p = 0.041$) 表現。此外, 在無無脊椎黏合的病患中, BMP-4 ($r = 0.26$, $p = 0.020$) 與 BMP-7 ($r = 0.25$, $p = 0.028$) 分別正向相關於 sFRP1 mRNA 表現。然而, 在僵直性脊椎炎病患中, BMP-2 濃度無相關於 sFRP1、DKK2、APC、sFRP2、與 DKK1 mRNA 表現。在健康對照中, 無相關性在 BMPs 濃度與 sFRP1、DKK2、APC、sFRP2、與 DKK1 mRNA 表現之間亦被觀察到。

同樣地, miR-27 和 miR-29 以及它們的標的基因之相關被呈現於表 4。在脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患中, miR-27a 分別與 DKK2 ($r = -0.35$, $p = 0.005$) 和 APC mRNA ($r = -0.35$, $p = 0.006$); 以及 miR-27b 分別與 sFRP1 ($r = -0.28$, $p = 0.025$) 和 DKK2 ($r = -0.31$, $p = 0.016$) 之間具有顯著的負向相關; 在無脊椎黏合的病患中, 在 miR-27a 與 APC mRNA ($r = 0.18$, $p = 0.030$)、miR-27b 與 sFRP1 mRNA ($r = 0.18$, $p = 0.026$)、miR-29a 與 DKK1 ($r = 0.16$, $p = 0.048$)、以及 miR-29c 與 sFRP2 mRNA ($r = 0.20$, $p = 0.015$) 之間具有顯著的正向相關。在健康對照中, miR-29a 與 DKK1 mRNA ($r = 0.26$, $p = 0.28$)、以及 miR-29c 分別與 sFRP1 ($r = 0.30$, $p = 0.011$)、APC ($r = 0.25$, $p = 0.030$)、sFRP2 ($r = 0.30$, $p = 0.013$)、和 DKK1 mRNA ($r = 0.26$, $p = 0.027$) 之間具有顯著的正向相關。

服用 NSAIDs 已經被報告相關於僵直性脊椎炎的延緩脊椎進展 [17, 18]。進一步地, 我們評估 BMPs、miR-27、sFRP1 mRNA、DKK2 mRNA、APC mRNA、miR-29、sFRP2 mRNA、與 DKK1 mRNA 在不同治療型態的僵直性脊椎炎病患之表現程度。在我們的僵直性脊椎炎病患中, 有 70 名病患具有 NSAIDs 使用以及 32 名病患具有 DMARDs 使用 (表 5)。相較於無藥物治療的僵直性脊椎炎病患, 服用 Meloxicam 藥物者具有顯著較低的 BMP-4 濃度 (136.5 vs 147.9, $p = 0.024$)。服用 Arcoxia (0.74 vs 2.38, $p = 0.005$)、Celebrex (0.68 vs 2.38, $p < 0.001$)、Meloxicam (0.64 vs 2.38, $p = 0.011$)、以及 DMARDs (Salazpyrine) (0.69 vs 2.38, $p < 0.001$) 的病患也分別相較於未接受藥物治療的病患具有顯著較低的 miR-27b 表現。服用 Arcoxia (DKK2: 94.51 vs 3.53, $p < 0.001$; sFRP2: 0.9 vs 15.1, $p = 0.003$) 與 DMARDs (DKK2: 64.59 vs 3.53, $p = 0.003$; sFRP2: 0.9 vs 15.1, $p = 0.003$) 也具有顯著較高的 DKK2 mRNA 和較低的 sFRP2 mRNA 表現。此外, 服用 Salazpyrine 的病患具有顯著較低的 miR-29b 表現 (0.87 vs 1.43, $p = 0.024$)。然而, BMP-2、BMP-7、miR-27a、sFRP1 mRNA、APC mRNA、miR-29a、miR-29c、與 DKK1 mRNA 表現在有無接受藥物治療的病患之間並無顯著差異被觀察到。

我們也在不同治療型態的僵直性脊椎炎病患中評估 BMP 濃度與實驗室檢查、BAS 指數、以及 mSASSS 分數之間的相關。在調整年齡、性別、以及疾病病程的效應後, 無接受藥物治療的僵直性脊椎炎病患其 BMP-4 濃度是正向地相關於脊椎 BASRI 分數 ($r = 0.33$, $p = 0.028$)。在服用 Celebrex 的僵直性脊椎炎病患中, BMP-4 濃度分別正向地相關於 BAS-G ($r = 0.56$, $p = 0.032$)、脊椎 BASRI ($r = 0.54$, $p = 0.012$)、以及 mSASSS ($r = 0.57$, $p = 0.011$)。然而, 在服用不同藥物型態的僵直性脊椎炎病患中, BMP-2 和 BMP-7 濃度與其它指標之間並無顯著相關被觀察到。

討論

僵直性脊椎炎的結構性傷害特徵是新骨形成, 可導致脊椎和髖關節的逐步僵硬 [2]。而磷酸化 Smad 蛋白可在自發性關節炎模式中被偵測到, 活化的 BMP 訊息會促進軟骨細胞分化與新骨形成 [5]。在目前的研究中, 僵直性脊椎炎病患相較於健康對照具有較高的血清 BMP-4 與 BMP-7 濃度, 並且在脊椎黏合病患相較於無脊椎黏合病患也具有較高的 BMP-4 與 BMP-7 濃度。因此, BMP-4 與 BMP-7 可能是僵直性脊椎炎病患的脊椎黏合過程中的重要蛋白。先前 Chen 等人 [6] 在僵直性脊椎炎病患中

觀察到具有較高的血清 BMP-2、BMP-4、與 BMP-7 濃度；Park 等人 [7] 也在僵直性脊椎炎病患觀察到相較於健康對照具有顯著較高的血清 BMP-2 和 BMP-7 濃度，但是 BMP-4 濃度並無較高。然而，其它研究則發現 BMP-7 濃度在僵直性脊椎炎病患和健康對照間並無差異 [25, 26]。血清研究不一致的結果可能是因為病患具有不同的疾病病程與不同的脊椎嚴重度所致。在 Park 等人 [7] 的研究中，病患的平均疾病病程是 1.6 年；而在目前的研究和其它的研究中，僵直性脊椎炎病患具有較長的疾病病程（至少 10 年）。此外，我們的結果發現，在無接受藥物治療的僵直性脊椎炎病患其 BMP-4 濃度正向相關於脊椎 BASRI 指數，這個結果是相似於一項由 Chen 等人 [6] 所執行的原先研究。因此，免疫風濕藥物亦可能對於 BMP 的表現產生影響。

Wnt 和它的抑制者在發炎所誘導的僵直性脊椎炎之骨質僵硬過程中可能扮演一個調節者 [27]，較低活性的 Wnt 抑制者可能活化成骨細胞以誘導骨形成和骨質破壞 [28-30]。在一項納入 55 名僵直性脊椎炎病患和 33 名健康對照的小型病例對照研究中，觀察到血清 sFRP-1 和 DKK-1 蛋白濃度在病患與健康對照之間並無差異 [31]；然而，另外一項病例對照研究（45 名僵直性脊椎炎病患和 50 名健康對照）則發現僵直性脊椎炎病患相較於健康對照具有顯著增加的血清 DKK-1 濃度 [10]，不一致的結果，可能是因為較少的樣本數。在原先的一項研究中，無脊椎韌帶骨贅的病患相較於有脊椎韌帶骨贅的病患具有顯著較高的血清 DKK-1 濃度 [11]；此結果建議著，遲緩的 Wnt 訊息可抑制新骨形成和後續的脊椎韌帶骨贅生長以及脊椎僵硬。在現今的研究中，僵直性脊椎炎病患相較於健康對照具有顯著較低的 sFRP1 和 sFRP2 mRNA 表現；我們的結果也反映著 sFRP1 和 sFRP2 mRNA 的較低表現可能誘導 Wnt 訊息傳遞路徑，以活化成骨細胞和新骨形成。此外，我們在脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患中觀察到，血清 BMP-4 濃度分別負向地相關於全血 sFRP1、APC、以及 sFRP2 mRNA 表現，並且 BMP-7 濃度也負向地相關於 sFRP1、DKK2、APC、sFRP2、以及 DKK1 mRNA 表現。此結果證明了，在脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患中，較低的 Wnt 抑制者表現可能誘發 Wnt 蛋白表現，並且隨後增加了刺激 BMPs 的表現。進一步地，不同的 BMPs 在軟骨分化的不同階段是受到不同的 Wnt 抑制者所調控 [32]。在目前的研究中，無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患其 BMP-4 與 BMP-7 濃度是正向地相關於 sFRP1 mRNA 表現；然而，脊椎黏合的病患其 BMP-4 與 BMP-7 濃度是負向地相關於 sFRP1 mRNA 表現。脊椎黏合的病患相較於無脊椎黏合者具有顯著較高的 BMP-4 與 BMP-7 濃度、以及較低的 sFRP1 mRNA 表現，這可能暗示著，sFRP1 mRNA 在僵直性脊椎炎的早期階段（無脊椎黏合）具有高度的表現，並且與 BMP-4 與 BMP-7 濃度呈現正向相關，以維持正常的骨質代謝；在僵直性脊椎炎的後期，較低的 sFRP1 mRNA 表現無法抑制 BMP-4 與 BMP-7 的過度表現，而導致成骨細胞過度分化與新骨形成。

增加的 miR-27 表現已經被提議可以藉由結合 Wnt 抑制者以抑制 Wnt 抑制者的表現 [14, 15]。在目前的研究中，僵直性脊椎炎病患相較於健康對照具有顯著增加的 miR-27b 表現；此外，脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患其 miR-27a 表現是分別地負向相關於 DKK2 與 APC mRNA 表現；並且 miR-27b 表現是分別負向地相關於 sFRP1 與 DKK2 mRNA 表現，然而，這些結果在無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患與健康對照中並不顯著。這可能是增加的 miR-27 表現鍵合至 Wnt 抑制者 DKK2 與 APC 來引動 Wnt 訊息，並且導致僵直性脊椎炎的發生以及在僵直性脊椎炎病患中的脊椎黏合。此外，在無脊椎黏合的病患中，miR-27a 是正向相關於 APC mRNA 表現，miR-27b 也是正向相關於 sFRP1 mRNA 表現。一項解釋是在僵直性脊椎炎與早期階段 miR-27 的表現是不足以抑制 Wnt 抑制者；因此，在此階段可見 miR-27 與部分 Wnt 抑制者表現的正相關性。

在現今的研究中，僵直性脊椎炎病患相較於健康對照具有顯著較高的 miR-29a 與 miR-29b 表現，這可能是 miR-29 結合標的基因以調控 Wnt 訊息，導致僵直性脊椎炎的發生。然而，在僵直性脊椎炎病患中，並無法觀察到 miR-29 相關於 sFRP2 與 DKK1 表現。這可能是，miR-29b 透過結合其 miR-29 可能去結合其它相關基因，例如膠原蛋白相關基因 (collagen-associated genes) [15]，以調控骨形成作用。我們在健康對照中，miR-29a 與 DKK1 mRNA 表現的正向相關以及 miR-29c 與 sFRP1、APC、sFRP2、與 DKK1 mRNA 表現的正向相關都被觀察到；miR-29a 的結果可能暗示著，在健康對照甚至在不具有脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患中，Wnt 抑制者的表現是增加的以減弱成骨細胞的分化。同時，miR-29 也是過度表現的，但是 miR-29 如此的過度表現是不足以去抑制 Wnt 抑制者。因此，在此狀況下，miR-29 與 Wnt 抑制者表現的正向相關在健康對照被觀察到，甚至在無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患中被觀察到是正向相關於 DKK1 mRNA 表現，並且 miR-29c 正向相關於 sFRP2 表現。我們推論較高的 Wnt 抑

制者維持成骨細胞在骨質代謝模式中的正常表現，並且同時 miR-29 也會大量表現，但是此 miR-29 表現並不足以影響新骨形成。然而，這些假設仍須進一步的加以驗證。

在我們的僵直性脊椎炎病患中，服用 NSAID 和 DMARD 的比例分別有 63.8% 和 36.5%。在一項臨床試驗中，持續服用 NSAIDs 藥物的僵直性脊椎炎病患相較於只有需求時服用 NSAIDs 藥物的病患具有較低的放射學進展 [18]；因此，NSAIDs 藥物可能對於僵直性脊椎炎病患骨形成作用之相關分子表現具有調節作用。有趣的是，原先一項在大腸癌細胞株的試驗中觀察到，NSAIDs (celecoxib) 可以降低 Wnt 訊息 [33]。在現今的研究中，觀察到服用 Meloxicam 治療的僵直性脊椎炎病患相較於無治療病患具有顯著較低的 BMP-4 濃度。相較於無服用 NSAIDs 或 DMARDs 藥物的僵直性脊椎炎病患，服用 Arcoxia 的病患有顯著較低的 miR-27b 和 sFRP mRNA，以及較高的 DKK2 mRNA 表現，服用 Celebrex 和 Meloxicam 的病患有分別具有較低的 miR-27b 表現，前列腺素-2 (prostaglandins-2; PGE-2) 是骨質合成和促進成骨細胞分化與增生的重要調節因子，具有誘發 BMP 的表現 [34]；而 Meloxicam 與 Arcoxia 是 COX-2 抑制劑，並且具有藉由抑制 PGE-2 的生成之抗發炎效應 [35]。因此，在服用 Meloxicam 或 Arcoxia 的僵直性脊椎炎病患可能具有抑制 PGE-2 的生成與延緩新骨生成的效果。此外，我們觀察到服用 DMARD 的僵直性脊椎炎病患相較於無治療者有顯著較低的 DKK2 與 sFRP2 mRNA 表現。一項原先的實驗觀察到，加入 100 µg/ml Sulphasalazine (Salazpyrine) 至 UMR 106 大鼠骨肉瘤細胞中，具有顯著減少的細胞增生，而 UMR 106 小鼠骨肉瘤細胞反映的是成骨細胞後期階段的情形 [36]。然而，目前並沒有研究探討 DMARDs 藥物在 Wnt 訊息上的效應。根據現今的結果，我們假設服用 DMARDs 藥物的僵直性脊椎炎病患可能修飾 Wnt 抑制者的表現。在我們的研究中，服用 NSAIDs 治療的僵直性脊椎炎病患相較於無治療者也具有顯著較低的 miR-27b 表現，並且 NSAIDs 是可能具有回復 miRNA 表現的能力 [36]。此外，我們觀察到服用 DMARDs (Salazpyrine) 的僵直性脊椎炎病患相較於未接受藥物治療的病患有較低的 miR-27b 與 miR-29b 表現；然而，目前並沒有研究探討 DMARDs 與這些分子之間的相關。現今的研究也觀察到，服用 Celebrex 治療的僵直性脊椎炎病患其 BMP-4 濃度正向相對於脊椎 BASRI 與 mSASSS 指數。在軟骨細胞分化過程中，Celebrex 可以抑制 COX-2 的表現，進而抑制 BMP-2 的誘發的軟骨內骨化 (endochondral ossification) [37]。因此，我們推論 Celebrex 可能無法改變 BMP-4 濃度，進而無法改善脊椎黏合的情形。

在現今的研究中，mRNA 的表現是藉由即時定量 PCR 進行三重覆來被測量，並且三重覆的 Ct 數值的差異必須小於 0.5。因此，我們的 RNA 表現數據具有良好的信度。未來的研究納入較大數量的病患是必須的，以對於在僵直性脊椎炎的致病機轉中的結果獲得更深入的瞭解。當僵直性脊椎炎病患不論處於急性期或非急性期皆被納入，選樣偏差 (selection bias) 是可能會發生的。因為我們的較少樣本數，亦可能會限制我們的統計檢定力去偵測到較小的差異；我們的資料是從單一醫學中心所收集，也可能會有引介偏差 (referral bias)。

總而言之，脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患具有增加的血清 BMP-4 與 BMP-7 濃度，並且 BMP-4 濃度是正向地相對於脊椎 BASRI 分數；此外，脊椎黏合的病患有其 BMP-4 濃度與 miR-27b 分別負向相對於 sFRP1 mRNA 表現。我們的結果支持著 BMPs 可能在僵直性脊椎炎的致病機轉中扮演一項重要的角色。

參考文獻

1. Schett G, Rudwaleit M. Can we stop progression of ankylosing spondylitis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;24:363-71.
2. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:399-405.
3. Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, et al. The relationship between inflammation and new bone formation in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R104.
4. Carter S, Braem K, Lories RJ. The role of bone morphogenetic proteins in ankylosing spondylitis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012;4:293-9.
5. Lories RJ, Derese I, Luyten FP. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest* 2005;115:1571-9.
6. Chen HA, Chen CH, Lin YJ, et al. Association of bone morphogenetic proteins with spinal fusion in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2010;37:2126-32.
7. Park MC, Park YB, Lee SK. Relationship of bone morphogenetic proteins to disease activity and radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2008;37:200-4.
8. Schett G, Zwerina J, David JP. The role of Wnt proteins in arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4:473-80.
9. Baron R, Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 2007;148:2635-43.
10. Daoussis D, Liossis SN, Solomou EE, et al. Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2010;62:150-8.
11. Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:572-4.
12. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, et al. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J Biol Chem* 2010;285:25221-31.
13. Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem* 2009;108:216-24.
14. Wang T, Xu Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402:186-9.
15. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2009;284:15676-84.
16. van der Horst G, van der Werf SM, Farih-Sips H, et al. Downregulation of Wnt signaling by increased expression of Dickkopf-1 and -2 is a prerequisite for late-stage osteoblast differentiation of KS483 cells. *J Bone Miner Res* 2005;20:1867-77.
17. Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, et al. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1616-22.
18. Wanders A, Heijde Dv, Landewé R, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:1756-65.
19. 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* 1984;27:361-8.
20. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, et al. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Ann Rheum Dis* 2005;64:127-9.
21. Wanders AJ, Landewé RB, Spoorenberg A, et al. What is the most appropriate radiologic scoring method for ankylosing spondylitis? A comparison of the available methods based on the Outcome Measures in Rheumatology Clinical Trials filter. *Arthritis Rheum* 2004;50:2622-32.
22. Wei JC, Wong RH, Huang JH, et al. 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* 2007;26:1685-91.
23. 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* 2001;255:15-22.
24. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*

- 2008;3:1101-8.
25. Wendling D, Cedoz JP, Racadot E, et al. Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2007;74:304-5.
 26. Wendling D, Cedoz JP, Racadot E. Serum levels of MMP-3 and cathepsin K in patients with ankylosing spondylitis: effect of TNFalpha antagonist therapy. *Joint Bone Spine* 2008;75:559-62.
 27. Haynes KR, Pettit AR, Duan R, et al. Excessive bone formation in a mouse model of ankylosing spondylitis is associated with decreases in Wnt pathway inhibitors. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R253.
 28. Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13:156-63.
 29. Sathi GA, Inoue M, Harada H, et al. Secreted frizzled related protein (sFRP)-2 inhibits bone formation and promotes cell proliferation in ameloblastoma. *Oral Oncol* 2009;45:856-60.
 30. Fujita K, Janz S. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer* 2007;6:71.
 31. Taylan A, Sari I, Akinci B, et al. Biomarkers and cytokines of bone turnover: extensive evaluation in a cohort of patients with ankylosing spondylitis. *BMC Musculoskelet Disord* 2012;13:191.
 32. Lories RJ, Luyten FP. Bone morphogenetic protein signaling in joint homeostasis and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:287-98.
 33. Tuynman JB, Vermeulen L, Boon EM, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits c-Met kinase activity and Wnt activity in colon cancer. *Cancer Res* 2008;68:1213-20.
 34. Samoto H, Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, et al. Prostaglandin E2 stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and fibroblast growth factor 2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene. *J Biol Chem* 2003;278:28659-67.
 35. Fleischmann R, Iqbal I, Slobodin G. Meloxicam. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:1501-12.
 36. Preston SJ, Clifton-Bligh P, Laurent MR, et al. Effect of methotrexate and sulphasalazine on UMR 106 rat osteosarcoma cells. *Br J Rheumatol* 1997;36:178-84.
 37. Saito Y, Suzuki H, Imaeda H, et al. The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 2013;132:1751-60.

表 1：脊椎黏合、無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患、與健康對照之人口學特質、臨床評估、實驗室檢驗、與影像學資料

特徵	僵直性脊椎炎病患		健康對照 n = 62
	脊椎黏合	無脊椎黏合	
	n = 73	n = 79	
性別 (男性)	64 (87.7%) ^a	53 (67.1%)	44 (71.0%) ^{**}
收案時之年齡 (歲)	43.8 ± 12.2 ^b	32.7 ± 9.8	39.2 ± 12.6 ^{**}
臨床表徵			
初始症狀發病年齡 (歲)	29.0 (20.0-45.0) ^{c,*}	22.0 (20.0-26.0)	
疾病病程 (年)	12.0 (5.0-17.5)	8.0 (3.0-14.0)	
延誤診斷疾病期間 (年)	1.0 (0.0-5.5)	0.5 (0.0-5.0)	
臨床症狀			
周邊關節炎	17 (23.3%)	12 (15.2%)	
虹彩炎	19 (26.0%)	16 (20.3%)	
發炎性腸道疾病	4 (5.5%)	1 (1.3%)	
髖關節病變	15 (20.6%) ^{a,**}	3 (3.8%)	
實驗室檢驗			
HLA-B27 ⁺	64 (87.7%)	66 (83.5%)	
紅血球沈降速率 (ESR, mm/hr)	22.5 (15.5-36.0) ^{c,**}	16.0 (11.0-22.0)	
C-反應蛋白 (CRP, mg/dl)	0.66 (0.21-1.69) ^{c,**}	0.23 (0.08-0.74)	
藥物史			
NSAIDs 使用	46 (63.0%)	51 (64.6%)	
DMARDs 使用	29 (39.7%)	24 (30.4%)	
BASDAI	5.0 (3.8-6.2) ^{c,**}	3.8 (2.3-5.5)	
BASFI	2.6 (1.0-4.9) ^{c,**}	0.7 (0.1-1.8)	
BAS-G	6.0 (4.0-7.0) ^{c,**}	3.5 (2.0-6.0)	
BASRI	9.0 (7.0-12.0) ^{c,**}	4.0 (3.0-6.0)	
BASRI-spine	8.0 (7.0-10.0) ^{c,**}	4.0 (3.0-6.0)	
BASRI-hip joint	0.0 (0.0-1.0) ^c	0.0 (0.0-0.0)	
mSASSS	23.0 (15.0-50.0) ^{c,**}	6.0 (4.0-8.0)	

^a χ^2 -test 或 Fisher's exact test 被使用來進行類別變項的比較。^b 平均值 ± 標準差，並且 ANOVA 被使用來進行三組間的比較。^c 資料以中位數 (Q1-Q3) 來呈現，並且 Wilcoxon rank sum test 被使用來進行兩組不同脊椎黏合狀態的僵直性脊椎炎病患之比較。* 0.01 < p < 0.05。 ** p < 0.01。

表 2：脊椎黏合、無脊椎黏合之僵直性脊椎炎病患、與健康對照的骨生成相關指標

特徵	僵直性脊椎炎病患			p ^a
	脊椎黏合	無脊椎黏合	健康對照	
	n = 73	n = 79	n = 62	
BMP-2 (pg/mL)	113.7 (95.5-178.9)	111.8 (88.2-150.3)	108.2 (88.0-159.3)	0.41
BMP-4 (pg/mL)	149.8 (136.8-159.3) ^{b,d}	144.2 (109.3-151.7) ^c	140.5 (106.4-147.9)	<0.01
BMP-7 (pg/mL)	28.1 (20.0-42.9) ^{b,d}	19.4 (14.0-35.0)	17.9 (14.0-27.9)	<0.01
sFRP1 (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	9.5 (4.0-39.4) ^b	11.6 (1.4-42.0) ^c	31.1 (7.8-71.7)	0.02
sFRP2 (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	11.4 (0.8-30.5) ^b	10.7 (0.7-26.2) ^c	16.4 (3.4-85.2)	<0.01
DKK1 (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	0.9 (0.5-1.5)	0.8 (0.6-2.2)	0.8 (0.5-1.9)	0.56
DKK2 (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	15.9 (2.9-128.4)	3.5 (2.4-94.5)	3.7 (1.0-265.0)	0.20
APC (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	17.8 (6.1-65.8)	22.0 (7.3-55.5)	30.0 (0.9-96.8)	0.82
miR-27a (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	4.7 (1.2-16.9)	3.4 (0.6-13.7)	14.8 (0.7-97.1)	0.24
miR-27b (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	1.4 (0.4-7.2) ^b	1.0 (0.3-4.3) ^c	0.3 (0.1-4.1)	<0.01
miR-29a (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	1.2 (0.6-3.8) ^b	1.1 (0.4-3.5) ^c	0.1 (0.02-0.9)	<0.01
miR-29b (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	6.8 (1.1-20.2) ^b	1.3 (0.1-4.2)	1.2 (0.1-5.9)	<0.01
miR-29c (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	1.2 (0.2-12.7)	1.2 (0.2-8.9)	6.0 (0.2-47.5)	0.18

^a 資料以中位數 (Q1-Q3) 來呈現，並且 Kruskal-Wallis test 被使用來進行三組之間的比較。

^b 脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患 vs 健康對照：0.01 < p < 0.05；post-hoc multiple comparison (Bonferroni test). ^c 無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患 vs 健康對照：0.01 < p < 0.05；post-hoc multiple comparison (Bonferroni test). ^d 脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患 vs 無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患：0.01 < p < 0.05；post-hoc multiple comparison (Bonferroni test).

表 3：在分別脊椎黏合、無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患、與健康對照之中，BMPs 與 sFRP1 mRNA、DKK2 mRNA、APC mRNA、sFRP2 mRNA、以及 DKK1 mRNA 之間的相關

mRNA 表現	僵直性脊椎炎病患								
	脊椎黏合			無脊椎黏合			健康對照		
	BMP-2	BMP-4	BMP-7	BMP-2	BMP-4	BMP-7	BMP-2	BMP-4	BMP-7
sFRP1	r = -0.11	r = -0.49**	r = -0.44**	r = 0.002	r = 0.26*	r = 0.25*	r = 0.06	r = 0.004	r = -0.02
DKK2	r = -0.10	r = -0.13	r = -0.25*	r = 0.05	r = 0.13	r = -0.001	r = 0.15	r = 0.16	r = -0.05
APC	r = -0.07	r = -0.26*	r = -0.41**	r = 0.18	r = 0.12	r = 0.02	r = 0.14	r = -0.08	r = -0.09
sFRP2	r = -0.16	r = -0.45**	r = -0.40**	r = 0.02	r = 0.11	r = 0.06	r = -0.04	r = 0.03	r = 0.02
DKK1	r = 0.05	r = -0.05	r = -0.26*	r = 0.11	r = -0.04	r = -0.20	r = -0.04	r = -0.14	r = 0.05

斯皮爾曼等級相關被使用來進行統計檢定。 ** $p < 0.01$, * $0.01 < p < 0.05$ 。

表 4：分別在脊椎黏合、無脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患、與健康對照之中，miR-27 和 miR-29 與它們的標的基因之相關

mRNA 表現	僵直性脊椎炎病患										健康對照				
	脊椎黏合					無脊椎黏合									
	miR-27a	miR-27b	miR-29a	miR-29b	miR-29c	miR-27a	miR-27b	miR-29a	miR-29b	miR-29c	miR-27a	miR-27b	miR-29a	miR-29b	miR-29c
sFRP1	r = 0.21	r = -0.28*	r = 0.03	r = 0.11	r = -0.02	r = 0.04	r = 0.18*	r = 0.16	r = 0.09	r = 0.17	r = 0.08	r = 0.14	r = 0.21	r = 0.19	r = 0.30*
DKK2	r = -0.35**	r = -0.31*	r = 0.06	r = 0.15	r = -0.13	r = 0.12	r = -0.06	r = 0.14	r = -0.06	r = -0.02	r = 0.10	r = -0.14	r = 0.16	r = 0.01	r = -0.06
APC	r = -0.35**	r = 0.22	r = 0.06	r = 0.03	r = 0.08	r = 0.18*	r = 0.16	r = 0.22	r = 0.07	r = 0.20	r = 0.09	r = 0.04	r = 0.17	r = 0.11	r = 0.25*
sFRP2	r = 0.05	r = 0.03	r = 0.15	r = 0.18	r = 0.17	r = 0.20	r = 0.03	r = 0.07	r = 0.12	r = 0.20*	r = 0.25	r = 0.08	r = 0.13	r = 0.15	r = 0.30*
DKK1	r = 0.16	r = 0.02	r = 0.15	r = -0.07	r = -0.11	r = 0.08	r = 0.05	r = 0.16*	r = 0.14	r = 0.15	r = 0.13	r = 0.23	r = 0.26*	r = 0.19	r = 0.26*

斯皮爾曼等級相關被使用來進行統計檢定。 ** $p < 0.01$, * $0.01 < p < 0.05$ 。

表 5：在不同藥物治療型態的僵直性脊椎炎病患中，BMP-4、miR-27b、DKK2 mRNA、miR-29b、與 sFRP2 mRNA 之表現程度

治療型態	n	BMP-4 (pg/mL)	miR-27b ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	DKK2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	miR-29b ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	sFRP2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
無治療	77	147.9 (138.0-157.8)	2.38 (0.94-8.59)	3.53 (2.09-65.16)	1.43 (0.22-5.99)	15.1 (6.5-29.6)
有治療	75	141.9 (108.0-153.8)	0.70 (0.19-1.25)**	27.65 (2.77-223.75)*	1.16 (0.001-3.10)	3.1 (5.9-22.1)**
NSAIDs 使用	70	141.9 (106.4-153.8)	0.73 (0.28-1.25)**	11.79 (2.67-212.33)*	1.07 (0.02-3.04)	3.1 (0.6-18.2)**
Arcoxia	19	141.9 (106.4-155.5)	0.74 (0.09-2.14)**	94.51 (4.51-653.58)**	1.16 (0.05-4.53)	0.9 (0.6-13.9)**
Celebrex	36	144.2 (105.7-154.7)	0.68 (0.36-1.16)**	3.87 (2.73-162.70)	0.89 (0.13-2.60)	3.3 (0.6-27.2)
Meloxicam	18	136.5 (109.3-141.9)*	0.64 (0.07-1.13)*	3.26 (2.33-31.29)	0.79 (0.0004-5.97)	8.9 (0.6-13.1)
DMARDs 使用	32	143.9 (106.4-152.8)	0.69 (0.08-1.74)**	64.59 (3.57-398.46)**	0.87 (0.0001-2.04)*	0.9 (0.5-15.9)**

資料以中位數 (Q1-Q3) 來呈現。由於使用 Aceclofenac 藥物人數較少 (n=5)，於是他們並沒有呈現於表中。32 位使用 DMARDs 的病患 (n=32) 是服用 Salazpyrine 藥物，並且有一位是使用 Salazpyrine 合併 Methotrexate 藥物。BMP-4、miR-27b、DKK2 mRNA、miR-29b、與 sFRP2 mRNA 表現在不同治療型態組與無治療組之間的比較是使用 Wilcoxon rank sum test。 ** p < 0.01， * 0.01 < p < 0.05。

第二部分：微型核糖核酸-146a (miR-146a) 與其標的 IL-1 接受器相關激酶 1 (IRAK1) 基因多形性對於僵直性脊椎炎之易感受性

前言

僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis; AS) 是特徵為脊椎與髖關節慢性發炎的一種自體免疫疾病，並且它也會影響周邊關節 [1]。男性較女性更易罹病 [2]；人類白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) -B27 基因是高度相對於僵直性脊椎炎，但是僅貢獻於僵直性脊椎炎病患的基因變異之 23.3% [3]，暗示著其它基因因子可能被預期來貢獻於疾病易感受性。

由巨噬細胞 (macrophages) 與單核球細胞 (monocytes) 所衍生出的前發炎細胞激素腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) 與介白質素-1 β (interleukin-1 β ; IL-1 β) 可能是僵直性脊椎炎致病機轉的發炎反應之關鍵調節者 [4, 5]。微型核糖核酸 (microRNA; miR)-146a 也被提出可與腫瘤壞死因子接受器相關因子 6 (TNF-receptor-associated-factor6; TRAF6) 和 IL-1 接收器相關激酶 1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1; IRAK1) 基因鍵結 [6]；因此，miR-146a 向下調節 TRAF6 與 IRAK1 基因，並且藉由負向回饋 (negative feedback) 在微調 (fine-tuning) 先天免疫反應中扮演一個角色 [6]。IRAK1 是細胞核因子 κ B (nuclear factor κ B; NF- κ B) 的鐸/介白質素-1 接受器 (toll/IL-1 receptor; TIR) 活化的一個重要分子 [7]，IRAK1 藉由類鐸接受器 (toll-like receptor; TLRs) 的配位基來活化，也是關鍵的細胞內訊息蛋白 [8]；它被認為是 TLRs 與轉錄因子 NF- κ B 的 TRAF-6 細胞質內活化者之間的連結者，隨後增加包括 TNF- α 在內的標的基因之轉錄 [9, 10]。因此，miR-146a 與 IRAK1 可能在僵直性脊椎炎的致病機轉中具有一個特殊的決定效應。

MiR-146a 基因位於染色體 5q34 之 LOC285628 基因的 exon 2 位置 [11]，並且構成一個 G>C 核苷酸置換 (rs2910164)，導致 miR-146a 前驅物的長髮夾型 (stem) 區域由 G:U 改變至 C:U 的錯誤配對 (mismatch) [12]。然而，miR-146a G 對偶基因和 C 對偶基因的成熟表現是不一致的；Xu 等人 [13] 發現 miR-146a G 對偶基因相較於 C 對偶基因具有較高的成熟 miR-146a 表現，而其它兩項研究則發現相反的結果 [14, 15]。IRAK1 基因位於染色體 Xq28，並且具有兩個單一核苷酸多形性 (single nucleotide polymorphism; SNP)；rs3027898 (A>C) 在 3' 非轉譯區域 (3'-untranslated region) 內，以及 rs1059703 (T>C) 在 exon 12 內 [16]。在一項具有小樣本數的希臘人研究中 [12]，IRAK1 rs3027898 基因多形性之分佈在 29 名乾癬性關節炎 (psoriasis arthritis; PsA) 病患與 66 名健康對照、以及在 49 名僵直性脊椎炎病患與 66 名健康對照之間觀察到統計差異，IRAK1 rs1059703 基因型在此研究中也是相對於乾癬性關節炎的發生。此外，IRAK1 rs3027898 A 對偶基因者相較於 C 對偶基因攜帶者具有顯著較高的類風溼性關節炎 (rheumatoid arthritis; RA) 發生危險 [16]。然而，miR-146a 和 IRAK1 基因多形性在僵直性脊椎炎致病機轉中的角色仍然是不清楚的。

現今的研究驗證 miR-146a rs2910164、IRAK1 rs3027898 和 rs1059703 基因多形性與僵直性脊椎炎發生之相關。在僵直性脊椎炎病患中，疾病的嚴重程度與併發症可能被基因因子大幅地決定 [17]；因此，我們也評估 miR-146a rs2910164、IRAK1 rs3027898 和 rs1059703 基因多形性與臨床徵狀之相關性。

材料與方法

研究對象

兩個病患和健康對照的獨立世代是從不同的風濕科門診中所納入；第一個世代是由在 2001 年 1 月至 2001 年 12 月於南台灣 (台灣，嘉義) 的台中榮民總醫院嘉義分院之 102 名僵直性脊椎炎病患和 102 名健康對照所組成，第二個世代是由在 2006 年 11 月至 2015 年 8 月於中台灣 (台灣，台中) 的中山醫學大學附設醫院之 348 名僵直性脊椎炎病患和 336 名健康對照所組成。所有的僵直性脊椎炎病患年齡是 16-65 歲，他們是使用修飾過的 New York 準則來診斷 [18]，並且認知功能並未受到其他疾病所影響，如癡呆。詳細的臨床史，納入了初始症狀發病年齡、僵直性脊椎炎家族史、藥物史、以及脊椎關節外的症狀。初始症狀發病年齡被定義為首次症狀 (脊椎症狀 [axial symptom]、周邊關節炎、虹

彩炎 [uveitis] 或接骨點發炎 [enthesitis]) 發病的時間。家族史被定義為具有僵直性脊椎炎之一等親親屬，藥物史則定義為超過三個月的非類固醇抗發炎藥物 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) 或疾病調節抗風濕藥物 (disease modifying anti-rheumatic drugs; DMARDs) 之使用。薦腸關節炎 (sacroiliitis) 是由一名合格的放射科醫師來確診，周邊關節炎被定義為至少有一個腫脹關節之呈現。發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease; IBD) 被定義為結腸和小腸具有發炎反應呈現，包括潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis) 和克隆氏症 (Crohn's disease)。虹彩炎被定義為眼睛的中介層 (middle layer) 具有發炎反應呈現，包括單眼或雙眼。這些症狀均是由風濕科醫師、腸胃科醫師、與眼科醫師確診，並被記錄於臨床病歷中。

以病例之年齡 (± 5 歲) 與性別進行頻率配對的對照，是隨機地於同一醫學中心執行一般健康檢查的就診病患之中所選取；他們與病例居住於相同地區，並且無明顯的疾病史或異常的實驗室檢查數值。一般健康問卷在樣本收集時被執行，以決定是否此研究對象可作為健康對照。在收集僵直性脊椎炎病患和健康對照的所有資料之前，知情同意書即被獲得。我們的研究設計和最終結果是經由中山醫學大學附設醫院和台中榮民總醫院嘉義分院的人體試驗委員會所批准，完整的研究符合赫爾辛基宣言 (Declaration of Helsinki)。

實驗室分析

周邊血液被收集並且離心分離出血清和細胞。發炎標記包括紅血球沈降速率 (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) 被測量，異常的 ESR、CRP、與 IgA 分別被定義為 > 0.8 mg/dl、 > 20 mm/h、以及 > 350 mg/dl [19]。HLA-B27 攜帶狀態是以流式細胞儀 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 來評估 [20]。

從周邊血液萃取的基因體 DNA 是使用 AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific Corporation, Union City, CA, USA)。MiR-146a rs2910164 G/C 多形性是使用聚合酶鏈鎖反應-限制片段長度多形性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 來分析 [16]。用以增幅 rs2910164 的引發子為 5'-CAT GGG TTG TGT CAG TGT CAG AGC T-3' 和 5'-TGC CTT CTG TCT CCA GTC TTC CAA-3'，DNA (0.5 μ l) 被加入至包含有 200 ng 引發子、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM 之去氧核糖三磷酸 (dNTPs)、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、以及 0.1% 的胎牛血清白蛋白 (BSA) 的 PCR 緩衝液中，最終的體積為 50 μ l。增幅條件包括變性 (94°C 下 30 秒)、接序為 35 回合的重鍊 (58°C 下 30 秒)、以及延展 (72°C 下 30 秒)。PCR 產物以 SacI 消化，同型合子 GG 基因型個體有一段 147 bp 產物片段，同型合子 CC 基因型個體有 122 bp 以及 25 bp 片段，並且異型合子 GC 基因型個體有全部三段產物片段。

IRAK1 rs3027898 A/C 與 rs1059703 T/C 基因多形性是以 TaqMan 測定 (assay IDs: C_15765198_10 for rs3027898 以及 C_8966368_10 for rs1059703)，使用 StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 執行，並且以 SDS v3.0 software (Applied Biosystems) 來分析。每一個反應的最終體積是 5 μ l，包含 2.5 μ l TaqMan Genotyping Master Mix、0.125 μ l TaqMan probes mix、1 μ l (10 ng) 基因體 DNA、以及 1.375 μ l 水。即時定量 PCR 反應包括在 95°C 下十分鐘的先前變性步驟，接序是 40 回合，每個回合由 95°C 下 15 秒與 60°C 下一分鐘所組成。大約 10% 的隨機選取樣本被直接定序來檢驗原先基因型的結果，而所有樣本的重複試驗都具有一致的結果。

統計分析

在第一型誤差 (α) 程度是 0.05，第二型誤差 (β) 程度是 0.2 之下，健康對照的 miR-146a rs2910164 GG 基因型頻率是 0.12 [13]，IRAK1 rs3027898 A 對偶基因型頻率是 0.18 [21]，若欲偵測相對危險性 (relative risk) 是 1.8，並且病例與對照所需之最小樣本數目是 362。我們增加了額外的研究對象 (~20%) 以避免少數研究對象可能會失去追蹤 (loss to follow up)；最後，我們納入了 450 名病例與 438 名經由年齡與性別配對的對照。

僵直性脊椎炎病患和健康對照的人口學、臨床徵狀、以及 miR-146a rs2910164 G/C、IRAK1 rs3027898 A/C 與 rs1059703 T/C 多形性的基因型，若為連續性變項被以平均值 ± 標準差 (standard deviation; SD) 來表示；若為類別性變項則以個數 (%) 來呈現。Student's *t*-test 與 χ^2 -test (或 Fisher's exact test) 被分別使用來比較在僵直性脊椎炎病患與健康對照之間的連續性變項與類別性變項。哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium) 是以適合度檢定 (goodness-of-fit) 來比較在健康對照之間的 miR-146a rs2910164 G/C、IRAK1 rs3027898 A/C 與 rs1059703 T/C 基因型頻率與期望頻率來加以驗證。對於在 IRAK1 多形性的兩個位點間之對偶基因成對，其連鎖不平衡 (Linkage disequilibrium; LD) 係數 ($D' = D/D_{\max}$ [或是 $D' = D/D_{\min}$ ，如果 D' 是負值]) 被評估 [22]，成對的 LD 係數 (D') 與 r^2 值是以 Haploview 軟體來計算。進一步地，使用邏輯斯迴歸模式 (logistic regression model) 來計算 miR-146a rs2910164 G/C、IRAK1 rs3027898 A/C、以及 rs1059703 T/C 基因型和對偶基因在僵直性脊椎炎發生上的獨立和合併效應的勝算比 (odds ratio; OR) 以及 95% 信賴區間 (95% confidence interval [CI])，並且 Cochran-Armitage trend test 被執行來檢定趨勢。在僵直性脊椎炎病患中，有興趣的對偶基因與 CRP、ESR、和 IgA 的異常程度以及臨床徵狀發生之相關性是以邏輯斯迴歸模式來檢定。所有的 *P* 值是以雙尾統計檢定來計算，並且數值 < 0.05 被考慮為統計顯著性，並且 *P* 值也藉由 Bonferroni-Holm 程序進行多重比較 (multiple comparison) 調整。全部的分析是使用視窗版 SAS 9.1 (SAS Inc, Cary, NC, USA)。

結果

由於在我們南台灣世代和中台灣世代之間，人口學與臨床特徵 (表 1)、以及 miR-146a rs2910164、IRAK1 rs3027898 和 rs1059703 多形性 (表 2) 的頻率是同質性的，我們合併這兩個世代以增加統計檢定力。總計，450 名僵直性脊椎炎病患與 438 名健康對照被納入本研究中，性別比例 (男性: 68.4% vs. 68.0%; $P = 0.896$, χ^2 -test) 與平均年齡 (38.8 歲 vs. 39.8 歲; $P = 0.195$, *t*-test) 在僵直性脊椎炎病患與健康對照之間並無差異。在僵直性脊椎炎病患之中，初始症狀發病平均年齡、平均疾病病程、以及平均延誤診斷疾病時間分別是 29.8 歲、9.0 年、與 3.6 年；此外，27.1% 被診斷具有周邊關節炎、19.3% 具有虹彩炎、並且 4.9% 具有發炎性腸道疾病。HLA-B27 基因陽性的僵直性脊椎炎病患數目為 408 名 (90.7%)，服用 NSAIDs 與 DMARDs 的比例分別是 48.4% 與 33.6%。

MiR-146a rs2910164 G/C、IRAK1 rs3027898 A/C 和 rs1059703 T/C 基因多形性在僵直性脊椎炎病患與健康對照的頻率，被呈現在表 3。MiR-146a rs2910164 ($P = 0.065$)、IRAK1 rs3027898 ($P = 0.428$) 和 rs1059703 ($P = 0.112$) 基因多形性的頻率，是一致於哈溫平衡的期望頻率。在調整年齡和性別的效應後，miR-146a rs2910164 GG 基因型者相較於 CC 基因型者具有 1.70 倍 (95% CI 1.10-2.61; $P_{\text{corr}} = 0.044$) 較高的僵直性脊椎炎發生危險；進一步地，miR-146a rs2910164 GG 基因型者相較於 GC/CC 基因型者也具有一個顯著較高的僵直性脊椎炎發生危險 (OR 1.71; 95% CI 1.15-2.56; $P_{\text{corr}} = 0.027$)，G 對偶基因者相較於 C 對偶基因者也具有一個較大的危險 (OR 1.20, 95% CI 0.99-1.45; $P = 0.069$)。當 IRAK1 rs3027898 C 對偶基因者被選擇為參考組，rs3027898 A 對偶基因者也具有 1.44 倍 (95% CI 1.06-1.96; $P_{\text{corr}} = 0.038$) 較高的僵直性脊椎炎發生危險。然而，IRAK1 rs1059703 基因多形性並無相關於僵直性脊椎炎的發生。因為 IRAK1 基因是位於 X 染色體，我們也以性別進行分層，來評估這些單一核苷酸多形性在僵直性脊椎炎發生的效應。MiR-146a rs2910164 GG 基因型的男性相較於 GC/CC 基因型的男性具有 1.98 倍 (95% CI 1.22-3.21; $P_{\text{corr}} = 0.024$) 的較大危險，IRAK1 rs3027898 A 對偶基因的男性相較於 C 對偶基因的男性也具有 1.78 倍 (95% CI 1.13-2.81; $P = 0.024$) 的較大危險。然而，miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 基因多形性與僵直性脊椎炎發生之相關性並未在女性中被觀察到。

我們估計在 IRAK1 rs3027898 與 rs1059703 基因多形性之間的連鎖不平衡 (LD)，IRAK1 rs3027898 是與 rs1059703 具有高度的連鎖不平衡 ($D' = 0.98$; $r^2 = 0.87$)；因此，IRAK1 rs3027898 基因型被選入在後續的分析中。進一步地，miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 成對對偶基因分析發現，在調整性別與年齡的效應後，G/A (OR 2.84, 95% CI 1.34-6.03)、G/C (OR 1.71, 95% CI 1.27-2.30)、與 C/A (OR 1.53, 95% CI 1.09-2.16) 相較於 C/C 對偶基因與顯著較高的僵直性脊椎炎危險具有相關性 (表 4)，

miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 對偶基因的合併效應也呈現出劑量效應的證據 (P for trend < 0.001)。顯著的結果在男性之中被呈現，但並未在女性之中。

MiR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 對偶基因在僵直性脊椎炎病患的 CRP、ESR、與 IgA 數值之合併效應也被評估 (表 5)。相較於 C/C 對偶基因，異常 ESR (> 20 mm/h) 的危險性在 miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 的 G/A 成對對偶基因中是顯著較高的，其次是 C/A 與 G/C 對偶基因 (P for trend = 0.001)。雖然，在調整干擾因子之效應後，miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 G/A (OR 2.16, 95% CI 0.86-5.41)、G/C (OR 1.50, 95% CI 0.96-2.34)、與 C/A (OR 1.52, 95% CI 0.90-2.59) 成對對偶基因之僵直性脊椎炎病患相較於 C/C 成對對偶基因的僵直性脊椎炎病患並沒有顯示出顯著的異常 ESR 危險性。此外，CRP 與 IgA 的異常比率是無相關於這些單一核苷酸多形性。

同樣地，在僵直性脊椎炎病患中的虹彩炎發展也被執行 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 成對對偶基因分析 (表 6)。在調整干擾的效應後，攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 G/A 成對對偶基因之僵直性脊椎炎病患相較於攜帶成對 C/C 對偶基因的病患具有 3.56 倍 (95% CI 1.43-8.87) 較大的虹彩炎發生危險。顯著的相關性在男性之中被觀察到，但並未在女性之中。然而，周邊關節炎與發炎性腸道疾病的發生並未相關於 miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 多形性 (數據未呈現)。

討論

本研究發現 miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 多形性的獨立和合併效應是相關於僵直性脊椎炎的發生，特別是在男性之中。此外，攜帶 miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 G/A 成對對偶基因之僵直性脊椎炎病患具有一個顯著較高的虹彩炎發生危險。

已經證實了 miR-146a 鍵結在 TLR 和 IL-1 接受器訊息路徑的兩個關鍵接附分子 (adaptor molecules)，TRAF6 與 IRAK1 [6, 23]。從此，miR-146a 已經被顯示去抑制 NF- κ B 活性 [23]。整體而言，miR-146a 藉由負向回饋路徑在調節發炎反應中清楚地扮演著一項關鍵的角色 [6]。在 miR-146a 前驅物的長髮夾型區域具有一個單一核苷酸多形性 G $>$ C (rs2910164) [12]，我們的研究顯示 miR-146a rs2910164 GG 基因型者相較於 miR-146a C 對偶基因者具有一個顯著較高的僵直性脊椎炎發生危險；可能的解釋是 miR-146 G 對偶基因相較於 C 對偶基因的較低表現，無法抑制標的基因 TRAF6 與 IRAK1 分別與 TNF- α 以及 IL-1 β 結合，在後果上導致發炎與僵直性脊椎炎的發展。然而，在一項具有小樣本數目 (49 名僵直性脊椎炎病患與 66 名健康對照) 的希臘研究中，miR-146a rs2910164 基因型並未被發現是相關於僵直性脊椎炎的發生 [12]。如此的歧異可能歸因於僵直性脊椎炎在不同種族之間的遺傳異質性 (genetic heterozygosity)。MiR-146a C 對偶基因在健康的希臘人與土耳其人族群之中的頻率為 20.0%-27.6% [12, 16, 24]；在我們的健康對照中，miR-146a C 對偶基因的頻率是 65.3%，可比於先前在中國人的對照中所報告的頻率 (63.4%) [13]，如此的結果也確認了我們基因型的技術。

IRAK1 是參與在 TIR 訊息路徑上的絲氨酸 (serine)/ 噁寧胺酸 (threonine) 蛋白激酶 [7]，TIR 路徑的活化最終促使 NF- κ B 轉移至細胞核內，導致前發炎調節者相依於 NF- κ B 之表現 [9]。Nguyen 等人 [25] 也發現 IRAK1 在 C 端區域包含一個 TRAF6 結合的基序，死亡區域 (death domain) 的刪除或大多數的 C 端區域明顯地增強了 IRAK1 活化 NF- κ B 路徑的能力。由於 IRAK1 基因是位於在 X 染色體上，因此 IRAK1 基因多形性具有其獨特性 [16]。Rs1059703 T \rightarrow C 的置換也已經被強調可能增強了 IRAK1 的剪裁 (splicing) 以產生更多較穩定的異構物 (isoform)，進而導致 NF- κ B 的持續性活化 [26]。在我們的研究中，IRAK1 基因的 rs3027898 和 rs1059703 基因型具有高度的連鎖不平衡；因此，rs3027898 多形性可能也會影響 NF- κ B 活性以及相關的免疫反應。我們的結果顯示 IRAK1 rs3027898 AA 基因型者相較於 CC 基因型者具有顯著增加的僵直性脊椎炎發生危險；在對偶基因層面，IRAK1 rs3027898 A 對偶基因者相較於 C 對偶基因者也具有較高的僵直性脊椎炎發生危險。一項先前的希臘人研究觀察到，IRAK1 rs3027898 A 對偶基因者相較於攜帶 CC 基因型者在乾癱性關節炎的發生上呈現保護的效應，並且 rs3027898 基因型頻率在僵直性脊椎炎病患和健康對照之間顯著地不同 [12]。此歧異可能是由種族的差異所解釋，IRAK1 rs3027898 A 對偶基因頻率在健康的希臘人族群中是

77.3%-77.9% [12, 16]；然而，在我們的健康對照中的頻率是 14.7%，因此，IRAK1 可能僅在特定的族群中對於僵直性脊椎炎擔任易感受性基因。在現今的研究中，我們並未觀察到 IRAK1 rs1059703 基因多形性相關於僵直性脊椎炎的發展；可能是受限於我們的統計檢定力 (18.0%)。未來需要更多的研究，加以確認 rs3027898 功能性多形性在僵直性脊椎炎發展上的效應。

我們的研究進一步地觀察到，攜帶 miR-146a rs2910164 G 與 IRAK1 rs3027898 A 對偶基因的組合者有最高的僵直性脊椎炎發生危險。一項可能的解釋是由 rs3027898 A 對偶基因所轉譯出的 IRAK1，其較差功能對於 NF- κ B 的活化是較具易感受性的；並且由 rs2910164 G 對偶基因所轉譯的 miR-146a，其較低表現無法抑制 IRAK1 的表現。攜帶 rs2910164 G 與 rs3027898 C 對偶基因的組合者也是具有較高的僵直性脊椎炎發生危險，如此的結果可歸因於 rs2910164 G 對偶基因。我們也觀察到攜帶 rs2910164 C 與 rs3027898 A 對偶基因的組合者有增加的僵直性脊椎炎危險，這應該是 rs3027898 A 對偶基因的效應。因此，miR-146a rs2910164 和 IRAK1 rs3027898 多形性的合併效應可能貢獻於僵直性脊椎炎的發展。

相較於女性，僵直性脊椎炎的盛行率在男性中是較高的 [2, 27]，遺傳可能大幅地貢獻至僵直性脊椎炎的致病機轉中，並且進一步地導致男性與女性對於僵直性脊椎炎顯現出不同的易感受性。有趣的是，IRAK1 基因是位於 X 染色體 [16]；在現今的研究中，IRAK1 rs3027898 A 對偶基因的男性相較於 C 對偶基因的男性具有較高的發病危險；合併的 miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 易感受性基因型在男性中是更明顯地相關於僵直性脊椎炎的發生，但此結果在女性中並非顯著。可能是具有僵直性脊椎炎的男性擁有較高的遺傳負荷效應 (genetic load effect) 來發展出僵直性脊椎炎 [2]。因此，此結果可能部分解釋僵直性脊椎炎的性別差異。由於現今研究的女性僵直性脊椎炎病患較少，建議在未來的研究納入較大數目的女性病患，再一次的驗證 IRAK1 rs3027898 基因型在僵直性脊椎炎發展的效應。

僵直性脊椎炎的發炎標記可能受到基因因素所調控 [19]。在本研究中，我們觀察到無論是 miR-146a rs2910164 G 對偶基因或是 IRAK1 rs3027898 A 對偶基因的僵直性脊椎炎病患具有較高的異常 ESR (> 20 mm/h) 比例；雖然在調整共變項效應後，此顯著性並未被維持住。可能合理的解釋是因為 miR-146a rs2910164 G 對偶基因和 IRAK1 rs1059703 A 對偶基因可能增加了 NF- κ B 活化和相關的發炎反應。在現今的研究中，同時攜帶 miR-146a rs2910164 G 與 IRAK1 rs3027898 A 對偶基因的僵直性脊椎炎病患也具有增加的虹彩炎危險。在僵直性脊椎炎中，虹彩炎的盛行率大約是 20-30% [27]；在現今的研究中，有 19.3% 的僵直性脊椎炎病患具有虹彩炎症狀。證據已經被建立，顯示細菌的產物可與 HLA-B27 進行交叉反應而觸發僵直性脊椎炎的發展 [28]。微生物的產物也被懷疑是在僵直性脊椎炎中的虹彩炎之觸發者，並且是藉由在眼睛內被明確表現出的 TLR4 [29]，這可能是由 rs2910164 G 對偶基因所轉譯出的 miR-146a 表現無法抑制 IRAK1 rs3027898 A 對偶基因的過度表現。因此，這些結果建議著 miR-146a 與 IRAK1 的交互作用是相關於在僵直性脊椎炎病患中的虹彩炎之發展。在未來，功能性的研究將是需要來驗證我們目前的結果。

本研究有一些限制。首先，選樣偏差 (selection bias) 是無法避免的，因為不論處於活性期或非活性期的僵直性脊椎炎病患皆被納入在我們的研究中。其次，我們的研究並沒有確認的世代，並且單一的病例對照研究對於 miR-146a 以及 IRAK1 基因多形性與僵直性脊椎炎之易感受性的相關性可能無法被穩固；目前的樣本數目是較少的，較大規模的世代研究將是需要來對於我們的結果提供進一步的證據。族群分層是另外一個潛在的選項，現今研究只有納入中國漢人，雖然族群分層可能在目前研究中產生偽陽性的結果，這可以部分解決在其它研究評估這些基因型在他們自己族群中的角色，特別是在中國華人族群。最後，僅有 42 名僵直性脊椎炎病患在我們的研究中是 HLA-B27。因此，在非 HLA-B27⁺ 的研究對象中，難以評估 miR-146a 與 IRAK1 的基因效應。此外，miR-146a 和 IRAK1 基因型與僵直性脊椎炎之間的相關性並非由機率所貢獻，因為樣本數目是由三個基因型所決定，以避免第一型誤差產生 [30]。*P* 值也進一步利用 Bonferroni-Holm correction 進行校正。

總結，miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 基因型是相關於僵直性脊椎炎的發生，並且這兩

個多形性的合併效應可能貢獻於僵直性脊椎炎的危險，這些效應在男性中是更為明顯的。

參考文獻

1. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 2007;369:1379-90.
2. Calin A, Brophy S, Blake D. Impact of sex on inheritance of ankylosing spondylitis: a cohort study. *Lancet* 1999;354:1687-90.
3. Robinson PC, Brown MA. The genetics of ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2012;38:539-53.
4. Gratacós J, Collado A, Filella X, et al. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* 1994;33:927-31.
5. Bal A, Unlu E, Bahar G, et al. Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2007;26:211-5.
6. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12481-6.
7. Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:265-80.
8. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782-7.
9. Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 2003;11:293-302.
10. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003;2003:re3.
11. Xu WD, Lu MM, Pan HF, et al. Association of microRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation* 2012;35:1525-9.
12. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, et al. The role of microRNA-146a (miR-146a) and its target IL-1R-associated kinase (IRAK1) in psoriatic arthritis susceptibility. *Scand J Immunol* 2010;71:382-5.
13. Xu T, Zhu Y, Wei QK, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2008;29:2126-31.
14. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 2008;29:1963-6.
15. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7269-74.
16. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, et al. A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine* 2010;77:411-3.
17. Hamersma J, Cardon LR, Bradbury L, et al. Is disease severity in ankylosing spondylitis genetically determined? *Arthritis Rheum* 2001;44:1396-400.
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* 1984;27:361-8.
19. Lee WY, Chang YH, Lo MK, et al. Polymorphisms of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 and cytokine genes in Taiwanese patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 2010;75:119-26.
20. 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* 2001;255:15-22.
21. Zhang H, Pu J, Wang X, et al. IRAK1 rs3027898 C/A polymorphism is associated with risk of

- rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2013;33:369-75.
22. Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-5.
 23. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging* 2009;1:402-11.
 24. Akkız H, Bayram S, Bekar A, et al. No association of pre-microRNA-146a rs2910164 polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma development in Turkish population: a case-control study. *Gene* 2011;486:104-9.
 25. Nguyen T, De Nardo D, Masendycz P, et al. Regulation of IRAK-1 activation by its C-terminal domain. *Cell Signal* 2009;21:719-26.
 26. Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1335-41.
 27. Zeboulon N, Dougados M, Gossec L. Prevalence and characteristics of uveitis in the spondyloarthropathies: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2008;7:955-9.
 28. Ringrose JH. HLA-B27 associated spondyloarthropathy, an autoimmune disease based on crossreactivity between bacteria and HLA-B27?. *Ann Rheum Dis* 1999;58:598-610.
 29. Rosenbaum JT, Rosenzweig HL, Smith JR, et al. Uveitis secondary to bacterial products. *Ophthalmic Res* 2008;40:165-8.
 30. Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, et al. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:434-42.

表1：兩個僵直性脊椎炎病例對照世代之中的人口學與臨床特徵

特徵	全部		南台灣世代		中台灣世代	
	病例	對照	病例	對照	病例	對照
人數	450	438	102	102	348	336
性別：男性 (%)	308 (68.4%)	298 (68.0%)	78 (76.5%)	75 (73.5%)	230 (66.1%)	224 (66.7%)
年齡 (歲)	38.8 ± 11.4 ^a	39.8 ± 11.7	38.1 ± 11.7	38.8 ± 11.9	39.0 ± 11.3	40.1 ± 11.6
臨床表徵						
初始症狀發病年齡 (歲)	29.8 ± 11.5		29.0 ± 12.4		30.0 ± 11.3	
疾病病程 (年)	9.0 ± 9.1		9.1 ± 8.6		8.9 ± 9.3	
延誤診斷疾病時間 (年)	3.6 ± 6.1		2.7 ± 4.4		3.9 ± 6.5	
臨床症狀						
周邊關節炎	122 (27.1%)		34 (33.3%)		88 (25.3%)	
虹彩炎	87 (19.3%)		24 (23.5%)		63 (18.1%)	
發炎性腸道疾病	22 (4.9%)		4 (3.9%)		18 (5.2%)	
實驗室檢查						
HLA-B27 ⁺	408 (90.7%)		91 (89.2%)		317 (91.1%)	
紅血球沈降速率 (mm/hr)	25.0 ± 20.7		25.7 ± 20.7		24.7 ± 20.8	
C-反應蛋白 (mg/dl)	1.1 ± 1.7		1.3 ± 2.0		1.0 ± 1.6	
A型免疫球蛋白 (mg/dl)	320.1 ± 128.1		342.3 ± 152.6		312.9 ± 119.1	
藥物史						
DSAID使用	218 (48.4%)		50 (49.0%)		168 (48.3%)	
DMARD使用	151 (33.6%)		46 (45.1%)		105 (30.2%)	

^a 平均值 ± 標準差。

表2：在兩個僵直性脊椎炎病例對照世代之中，miR-146a rs2910164、IRAK1 rs3027898和rs1059703基因型和對偶基因之頻率

	南台灣世代		<i>P</i> ^a	勝算比 (95% CI) ^b	中台灣世代		<i>P</i> ^a	勝算比 (95% CI) ^b
	病例	對照			病例	對照		
人數	102	102			348	336		
miR-146a rs2910164								
GG	19 (18.6%)	12 (11.8%)	0.215	1.69 (0.72-3.99)	54 (15.5%)	32 (9.5%)	0.059	1.77 (1.07-2.92) ^c
GC	39 (38.2%)	48 (47.1%)		0.80 (0.44-1.46)	166 (47.7%)	168 (50.0%)		1.04 (0.76-1.44)
CC	44 (43.2%)	42 (41.1%)		1.00 (ref)	128 (36.8%)	136 (40.5%)		1.00 (ref)
GG	19 (18.6%)	12 (11.8%)	0.114	1.89 (0.84-4.22)	54 (15.5%)	32 (9.5%)	0.018	1.73 (1.09-2.76) ^c
GC/CC	83 (81.4%)	90 (88.2%)		1.00 (ref)	294 (84.5%)	304 (90.5)		1.00 (ref)
G	77 (37.7%)	72 (35.3%)	0.469	1.16 (0.77-1.74)	274 (39.4%)	232 (34.5%)	0.064	1.23 (0.98-1.53)
C	127 (62.3%)	132 (64.7%)		1.00 (ref)	422 (60.6%)	440 (65.4%)		1.00 (ref)
IRAK1 rs3027898								
A	24 (19.1%)	17 (13.2%)	0.202	1.56 (0.79-3.08)	94 (20.2%)	68 (15.1%)	0.046	1.40 (1.00-1.98)
C	102 (80.9%)	112 (86.8%)		1.00 (ref)	372 (79.8%)	381 (84.9%)		1.00 (ref)
IRAK1 rs1059703								
T	24 (19.1%)	23 (17.8%)	0.802	1.09 (0.58-2.06)	95 (20.4%)	79 (17.6%)	0.282	1.19 (0.85-1.66)
C	102 (80.9%)	106 (82.2%)		1.00 (ref)	371 (79.6%)	370 (82.4%)		1.00 (ref)

在對照中，所觀察到的基因型頻率符合哈溫平衡（在南台灣世代中的 miR-146a rs2910164， $P = 0.620$ ；中台灣世代中的 miR-146a rs2910164， $P = 0.052$ ）。

^a 以 χ^2 -test 來檢定基因型或對偶基因頻率之分佈。

^b 調整年齡和性別的效應。

^c $0.01 < P_{corr} < 0.05$ ，Bonferroni-Holm test。

表 3：在僵直性脊椎炎病患和健康對照中，miR-146a rs2910164、IRAK1 rs3027898 和 rs1059703 基因型和對偶基因的頻率

	全部			男性			女性		
	病患	對照	勝算比	病患	對照	勝算比	病患	對照	勝算比
	n = 450	n = 438	(95% CI) ^a	n = 308	n = 298	(95% CI) ^d	n = 142	n = 140	(95% CI) ^d
miR-146a rs2910164									
GG	73 (16.2%)	44 (10.1%)	1.70 (1.10-2.61) ^b	55 (17.9%)	29 (9.7%)	1.84 (1.10-3.09) ^b	18 (12.7%)	15 (10.7%)	1.38 (0.63-3.00)
GC	205 (45.6%)	216 (49.3%)	0.98 (0.74-1.30)	134 (43.5%)	152 (51.0%)	0.87 (0.62-1.23)	71 (50.0%)	64 (45.7%)	1.26 (0.76-2.08)
CC	172 (38.2%)	178 (40.6%)	1.00 (ref)	119 (38.6%)	117 (39.3%)	1.00 (ref)	53 (37.3%)	61 (43.6%)	1.00 (ref)
GG	73 (16.2%)	44 (10.1%)	1.71 (1.15-2.56) ^b	55 (17.9%)	29 (9.7%)	1.98 (1.22-3.21) ^b	18 (12.7%)	15 (10.7%)	1.22 (0.59-2.52)
GC/CC	377 (83.8%)	394 (89.9%)	1.00 (ref)	253 (82.1%)	269 (90.3%)	1.00 (ref)	124 (87.3%)	125 (89.3%)	1.00 (ref)
G	351 (39.0%)	304 (34.7%)	1.20 (0.99-1.45) ^c	244 (39.6%)	210 (35.2%)	1.20 (0.95-1.52)	107 (37.7%)	94 (33.6%)	1.19 (0.84-1.68)
C	549 (61.0%)	572 (65.3%)	1.00 (ref)	372 (60.4%)	386 (64.8%)	1.00 (ref)	177 (62.3%)	186 (66.4%)	1.00 (ref)
IRAK1 rs3027898									
AA	-	-	-	-	-	-	7 (4.9%)	6 (4.3%)	1.21 (0.39-3.76)
AC	-	-	-	-	-	-	45 (31.7%)	38 (27.1%)	1.26 (0.75-2.12)
CC	-	-	-	-	-	-	90 (63.4%)	96 (68.6%)	1.00 (ref)
A	118 (19.9%)	85 (14.7%)	1.44 (1.06-1.96) ^b	59 (19.2%)	35 (11.7%)	1.78 (1.13-2.81) ^b	59 (20.8%)	50 (17.9%)	1.20 (0.79-1.82)
C	474 (80.1%)	493 (85.3%)	1.00 (ref)	249 (80.8%)	263 (88.3%)	1.00 (ref)	225 (79.2%)	230 (82.1%)	1.00 (ref)
IRAK1 rs1059703									
TT	-	-	-	-	-	-	9 (6.3%)	8 (5.7%)	1.11 (0.41-3.00)

TC	-	-	-	-	-	-	42 (29.6%)	41 (29.3%)	1.03 (0.61-1.73)
CC	-	-	-	-	-	-	91 (64.1%)	91 (65.0%)	1.00 (ref)
T	119 (20.1%)	102 (17.7%)	1.17 (0.87-1.57)	59 (19.2%)	45 (15.1%)	1.33 (0.87-2.04)	60 (21.1%)	57 (20.4%)	1.05 (0.70-1.57)
C	473 (79.9%)	476 (82.3%)	1.00 (ref)	249 (80.8%)	253 (84.9%)	1.00 (ref)	224 (78.9%)	223 (79.6%)	1.00 (ref)

^a 調整年齡和性別的效應。

^b $0.01 < P_{corr} < 0.05$, Bonferroni-Holm test 。

^c $P = 0.069$ 。

^d 調整年齡的效應。

表 4：在僵直性脊椎炎的發展上，miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 的成對對偶基因分析

	全部			男性			女性		
	病患	對照	勝算比 (95% CI) ^a	病患	對照	勝算比 (95% CI) ^d	病患	對照	勝算比 (95% CI) ^d
	對偶基因 數目 = 592	對偶基因 數目 = 578		對偶基因 數目 = 308	對偶基因 數目 = 298		對偶基因 數目 = 284	對偶基因 數目 = 280	
G/A 對偶基因	24 (4.1%)	10 (1.7%) ^b	2.84 (1.34-6.03) ^c	19 (6.2%)	3 (1.0%) ^b	7.63 (2.22-26.16) ^c	5 (1.8%)	7 (2.5%)	0.83 (0.26-2.67)
G/C 對偶基因	156 (26.3%)	113 (19.6%)	1.71 (1.27-2.30) ^c	54 (17.5%)	26 (8.7%)	2.50 (1.51-4.15) ^c	102 (35.9%)	87 (31.1%)	1.35 (0.93-1.97)
C/A 對偶基因	94 (15.9%)	75 (13.0%)	1.53 (1.09-2.16) ^c	40 (13.0%)	32 (10.8%)	1.52 (0.92-2.52)	54 (19.0%)	43 (15.3%)	1.45 (0.91-2.31)
C/C 對偶基因	318 (53.7%)	380 (65.7%)	1.00 (ref)	195 (63.3%)	237 (79.5%)	1.00 (ref)	123 (43.3%)	143 (51.1%)	1.00 (ref)
P for trend			< 0.001			< 0.001			0.160

^a 調整年齡和性別的效應。

^b $P < 0.01$ ， χ^2 -test。

^c $0.01 < P_{corr} < 0.05$ ，Bonferroni-Holm test。

^d 調整年齡的效應。

表 5：在僵直性脊椎炎病患中，miR-146a rs2910164 和 IRAK1 rs3027898 對偶基因與 C-反應蛋白 (CRP)、紅血球沉降速率 (ESR)、以及 A 型免疫球蛋白 (IgA) 之相關

rs2910164 / rs3027898	CRP (mg/dl)		勝算比	ESR (mm/hr)		勝算比	IgA (mg/dl)		勝算比
	> 0.8	≤ 0.8	(95% CI) ^a	> 20	≤ 20	(95% CI) ^a	> 350	≤ 350	(95% CI) ^a
G/A 對偶基因	10 (5.5%)	14 (3.4%)	1.12 (0.45-2.79)	15 (5.2%)	9 (3.0%)	2.16 (0.86-5.41)	10 (6.0%)	14 (3.3%)	1.15 (0.46-2.88)
G/C 對偶基因	47 (25.8%)	109 (26.6%)	1.28 (0.80-2.06)	87 (30.2%)	69 (22.7%)	1.50 (0.96-2.34)	39 (23.5%)	117 (27.5%)	0.79 (0.48-1.29)
C/A 對偶基因	22 (12.1%)	72 (17.6%)	0.81 (0.44-1.46)	51 (17.7%)	43 (14.1%)	1.52 (0.90-2.59)	20 (12.1%)	74 (17.4%)	0.56 (0.30-1.06)
C/C 對偶基因	103 (56.6%)	215 (52.4%)	1.00 (ref)	135 (46.9%)	183 (60.2%)	1.00 (ref)	97 (58.4%)	221 (51.8%)	1.00 (ref)
P for trend			0.930			0.001			0.566

^a 調整年齡、性別、疾病病程、和藥物史的效應。

表 6：對於僵直性脊椎炎病患的虹彩炎發生，miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 之成對對偶基因分析

	全部			男性			女性		
	有	無	勝算比 (95% CI) ^b	有	無	勝算比 (95% CI) ^d	有	無	勝算比 (95% CI) ^d
rs2910164/rs3027898									
G/A 對偶基因	11 (9.6%)	13 (2.7%)	3.56 (1.43-8.87) ^c	9 (15.3%)	10 (4.0%)	5.24 (1.80-15.24) ^c	2 (3.6%)	3 (1.3%)	1.36 (0.20-9.04)
G/C 對偶基因	26 (22.6%)	130 (27.3%)	0.83 (0.48-1.43)	11 (18.6%)	43 (17.3%)	1.34 (0.59-3.05)	15 (26.8%)	87 (38.2%)	0.61 (0.30-1.26)
C/A 對偶基因	16 (13.9%)	78 (16.3%)	0.86 (0.45-1.65)	6 (10.2%)	34 (13.7%)	0.74 (0.26-2.10)	10 (17.9%)	44 (19.3%)	0.83 (0.35-1.94)
C/C 對偶基因	62 (53.9%)	256 (53.7%)	1.00 (ref)	33 (55.9%)	162 (65.0%)	1.00 (ref)	29 (51.8%)	94 (41.2%)	1.00 (ref)
P for trend			0.379			0.019			0.208
rs2910164/ rs3027898									
G/A 對偶基因	11 (9.6%)	13 (2.7%)	3.79 (1.55-9.29) ^c	9 (15.3%)	10 (4.0%)	5.11 (1.81-14.49) ^c	2 (3.6%)	3 (1.3%)	1.66 (0.26-10.75)
其他組合 ^a	104 (90.4%)	464 (97.3%)	1.00 (ref)	50 (84.7%)	239 (96.0%)	1.00 (ref)	54 (96.4%)	225 (98.7%)	1.00 (ref)

^ars2910164 C 或 rs3027898 C 對偶基因者被選擇為參考組。

^b多變項非條件式邏輯斯迴歸被建構在調整年齡、性別、疾病病程、和藥物史之效應後，以獲得 rs2910164 與 rs3027898 之成對對偶基因在虹彩炎發生的調整後勝算比與相對應的 95% CI。

^c0.01 < P_{corr} < 0.05, Bonferroni-Holm test。

^d調整年齡、疾病病程、和藥物史之效應。

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：104 年 03 月 25 日

計畫編號	MOST 103-2314-B-040-007-		
計畫名稱	在僵直性脊椎炎中，循環微型核糖核酸 (miR-27, miR-29, miR-125b, miR-146a, miR-155) 與其標的基因、發炎體基因多形性、骨重塑與發炎標記、以及臨床表徵之相關		
出國人員姓名	翁瑞宏	服務機構及職稱	中山醫學大學 公共衛生學系
會議時間	104 年 03 月 12 日至 104 年 03 月 14 日	會議地點	義大利
會議名稱	(中文) 國際風濕及自身免疫研討會 (英文) International Congress on Controversies in Rheumatology & Autoimmunity (CORA 2015)		
發表題目	(中文) 微型核糖核酸-146a (miR-146a) 與其標的 IL-1 接受器相關激酶 1 (IRAK1) 基因多形性在僵直性脊椎炎之易感受性 (英文) Genetic polymorphisms of microRNA-146A (MIR-146A) and its target interleukin-1-receptor-associated kinase 1 (IRAK1) in ankylosing spondylitis susceptibility		

參加第三屆 International Congress on Controversies in Rheumatology & Autoimmunity (CORA 2015) 研討會會議出國報告

本人過去多次參與世界頂級的學術研討會，深感在會議中與學者的交流與學習對於自己在研究上的邏輯思考以及視野都有極大的幫助，於是再一度提出申請參加本年度國際風濕與自體免疫研討會 (International Congress on Controversies in Rheumatology & Autoimmunity, CORA 2015)。2015 年的第三屆 CORA 研討會於 3 月 12 日至 3 月 14 日在義大利南部的美麗濱海小鎮索倫多 (Sorrento) 的 Hilton Hotel 舉行，會議的進行包括口頭報告，壁報展示和廠商展示三部分。台灣共有七名學者與會，我們也於 3 月 12 日上午進行壁報展示，向與會學者介紹我們的研究成果。

我們今年於 CORA 2015 研討會所發表的研究題目是 Genetic polymorphisms of microRNA-146A (MIR-146A) and its target interleukin-1-receptor-associated kinase 1 (IRAK1) in ankylosing spondylitis susceptibility。僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis; AS)，為血清陰性脊椎關節病變中典型的自體免疫疾病，也是一項慢性發炎疾病；特別的是，微型核糖核酸 (microRNA; miR)-146a 結合腫瘤壞死因子接受器相關因子-6 (TNF-receptor-associated-factor-6; TRAF-6) 和 IL-1 接受器相關激酶 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1; IRAK1) 來抑制細胞核因子 κ B (nuclear factor κ B; NF- κ B) 活性。我們的研究的目的即是來探討是否 miR-146a rs2910164 G/C、IRAK1 rs3027898 A/C 和 rs1059703 T/C 基因多形性與僵直性脊椎炎的發展和臨床徵狀具有相關。總計，有 450 名台灣僵直性脊椎炎病患與 438 名健康對照被納入於我們以醫院為基礎的病例對照研究。我們的結果顯示著攜帶 miR-146a rs2910164 GG 基因型者相較於攜帶 GC/CC 基因型者具有 1.70 倍 (95%信賴區間 [confidence interval; CI] 1.10-2.61) 的僵直性脊椎炎之較高危險，攜帶 IRAK1 rs3027898 A 對偶基因者相較於攜帶 C 對偶基因者也具有一個顯著的僵直性脊椎炎增加危險 (勝算比 [odds ratio; OR] 1.44; 95% CI 1.06-1.96)。在 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 對偶基因成對分析 (pairwise analysis) 中顯示，G/A (OR 2.84; 95% CI 1.34-6.03)、G/C (OR 1.71; 95% CI 1.27-2.30)、與 C/A (OR 1.53; 95% CI 1.09-2.16) 對偶基因相較於 C/C 對偶基因具有顯著較高的僵直性脊椎炎危險；如此的

結果在男性中被發現，但不在女性中。此外，攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 G/A 成對對偶基因的僵直性脊椎炎病患相較於攜帶 miR-146a rs2910164/IRAK1 rs3027898 C/C 成對對偶基因的病患具有一個顯著較高的虹彩炎 (uveitis) 危險。因此，miR-146a rs2910164 與 IRAK1 rs3027898 多形性可能是相關於僵直性脊椎炎的發生以及其臨床徵狀。

同時間，韓國以及墨西哥的研究團隊亦與我們於同會場共同提出兩篇關於僵直性脊椎炎的研究論文，並且進行交流，其題目分別為”Analysis of atlantoaxial ankylosis (AAA) and atlantoaxial subluxation (AAS) in ankylosing spondylitis” 以及“Correlation bewteen the levels of IgG and IgG3 anti-p30 from salmonella typhimurium and BASDAI in patients with ankylosing spondylitis”。

本次與會，聽取世界各國研究團隊的研究成果，最大的收獲是感受到相關研究計劃、新想法和新技術對生命科學研究的貢獻。由於全球現今對於新發現的免疫疾病患者人數眾多，影響因素廣，因此極須尋找新的解決之途徑；而全球科學家們也正努力且迅速地提出相關的臨床診斷、自體免疫性疾病的發病機制、以及日後的疾病管理，因此將相關的研究成果進行交流，將有助於學界對於風濕免疫疾病的防治工作。

在會議中，以色列籍的 Yehuda Shoenfeld 教授特別講授了環境因子如肥胖、抽菸、矽、以及鹽等對於自體免疫疾病的影響，特別是在本身具有基因易感受性者，例如 HLA-DRB1。特別的是，Shoenfeld 教授的研究團隊提出由脂肪細胞分泌的脂肪細胞激素 (adipokine) 可能參與在自體免疫反應；抽菸則可透過自由基的產生、金屬蛋白酶的釋出、細胞計劃性死亡機制、細胞激素的表現、抗雌激素效應 (anti-estrogenic effect)、以及調控細胞免疫機制等等途徑來影響自體風濕免疫疾病的發展，而抽菸甚至可與一些基因共享 HLA 抗原決定位置 (epitope)，因而產生自體風濕免疫疾病的協同效應。此外，一些非 HLA 基因亦可能參與日益增加的自體風濕免疫疾病之發展，例如 CTLA-4。會場中也舉辦有一些議題的正反討論，例如對於脊椎關節炎病患的生物製劑治療，需要何種證據？另一方面，廠商也在會場中介紹了最新的產品，例如對於紅斑性狼瘡的診斷可利用新發展的 anti-DFS70 抗體，在病患中其表現是顯著低於健康對照；當然地，對於病患的疾病活性測量仍是疾病管理的重要依據。

這次的會議行程豐富、內容精采，對於本人在研究思路的拓廣、研究的進行及實驗之計畫都有莫大助益。最後建議，希望科技部或教育部能多鼓勵與補助研究學者與碩博士班學生參加大型國際學術會議，不僅能吸收新知更能拓展國際觀。(攜回資料：會議論文摘要)

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/09/15

科技部補助計畫	計畫名稱: 在僵直性脊椎炎中, 循環微型核糖核酸 (miR-27, miR-29, miR-125b, miR-146a, miR-155) 與其標的基因、發炎體基因多形性、骨重塑與發炎標記、以及臨床表徵之相關
	計畫主持人: 翁瑞宏
	計畫編號: 103-2314-B-040-007- 學門領域: 公共衛生及環境醫學
無研發成果推廣資料	

103年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：翁瑞宏		計畫編號：103-2314-B-040-007-					
計畫名稱：在僵直性脊椎炎中，循環微型核糖核酸 (miR-27, miR-29, miR-125b, miR-146a, miR-155) 與其標的基因、發炎體基因多形性、骨重塑與發炎標記、以及臨床表徵之相關							
成果項目		量化			單位	備註 (質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等)	
		實際已達成數 (被接受或已發表)	預期總達成數 (含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	無
		研究報告/技術報告	0	0	100%		無
		研討會論文	0	0	100%		無
		專書	0	0	100%	章/本	無
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	無
		已獲得件數	0	0	100%		無
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	無
		權利金	0	0	100%	千元	無
	參與計畫人力 (本國籍)	碩士生	1	1	100%	人次	碩士班研究生研究助學金1名 72,000元。
		博士生	1	1	100%		博士班研究生研究助學金1名 96,000元。
博士後研究員		0	0	100%	無		
專任助理		0	0	100%	無		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	無
		研究報告/技術報告	0	0	100%		無
		研討會論文	1	1	100%		義大利蘇聯多國際研討會發表 (Third international congress on controversies in Rheumatology & Autoimmunity) Genetic polymorphisms of microRNA-146A (MIR-146A) and its target interleukin-1-receptor-

							associated kinase 1 (IRAK1) in ankylosing spondylitis susceptibility。
		專書	0	0	100%	章/本	無
專利		申請中件數	0	0	100%	件	無
		已獲得件數	0	0	100%		無
技術移轉		件數	0	0	100%	件	無
		權利金	0	0	100%	千元	無
參與計畫人力 (外國籍)		碩士生	0	0	100%	人次	無
		博士生	0	0	100%		無
		博士後研究員	0	0	100%		無
		專任助理	0	0	100%		無

其他成果 (無法以量化表達之 成果如辦理學術活動 、獲得獎項、重要國 際合作、研究成果國 際影響力及其他協助 產業技術發展之具體 效益事項等，請以文 字敘述填列。)	無						
--	---	--	--	--	--	--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處 計畫 加填 項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以100字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

我們的結果顯示，脊椎黏合的僵直性脊椎炎病患具有增加的血清BMP-4與BMP-7濃度，並且BMP-4濃度是正向地相關於脊椎BASRI分數。我們的結果支持著BMPs可能在僵直性脊椎炎的致病機轉中扮演一項重要的角色。此外，miR-146a rs2910164與IRAK1 rs3027898多形性可能是相關於僵直性脊椎炎的發生以及其臨床徵狀。此結果也可以幫助我們更深入地瞭解僵直性脊椎炎病患的周邊關節炎之發生機制。並且本研究所獲得之結果，對於國人疾病發生的預防與治療，具有可觀的幫助；對於衛生保健機構在制訂相關保健政策及措施時，也可提供參考性的數據資料。