Graves 病患者外周血单个核细胞中 microRNA－142－3p 的表达水平及其意义

胡　婷　裴晓艳　于　磊　徐二琴　金国玺

摘　要　目的　比较微小 RNA－142－3p(microRNA－142－3p, miR－142－3p)在 Graves 病(Graves′ disease, GD)患者和正常健康对照者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中的表达水平变化,探讨 miR－142－3p 在 Graves 病发生、发展中的可能作用和机制。**方法**　用密度梯度离心法分别提取 37 例 Graves 病患者与 15 例正常健康志愿者的 PBMC,用 RT－qPCR 分别检测两组 PBMC 中 miR－142－3p 的表达水平。分析 miR－142－3p 水平与 TT_3、TT_4 和 TRAb 的相关性。**结果**　miR－142－3p在 GD 患者 PBMC 中表达水平(0.378±0.199)较正常健康对照组(1.104±0.421)明显下调,差异有统计学意义($P=0.003$)。miR－142－3p 与 TRAb、TT_4、TT_3 呈负相关($r=-0.364$, $P=0.027$; $r=-0.437$, $P=0.007$; $r=-0.337$, $P=0.042$)。同时,通过分析受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线发现:miR－142－3p 对 Graves 病有一定的诊断价值,ROC 曲线下面积(AUC)=0.917(95% CI:0.806～1.028)。**结论**　miR－142－3p 表达下调与 Graves 病相关,在疾病的发生、发展中可能起到重要作用。

关键词　miR－142－3p　Graves 病　PBMC

中图分类号　R581.1　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2019.10.032

Expression of microRNA－142－3p in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Graves Disease.　*Hu Ting, Pei Xiaoyan, Yu Lei, et al. Dept. of Endocrinology, 1st Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui 233000, China*

Abstract　Objective　To compare the expression levels of microrna－142－3p (miR－142－3p) in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of patients with Graves disease (GD) and healthy controls. To explore the possible role and mechanism of miR－142－3p in the occurrence and development of Graves′ disease. **Methods**　PBMC was extracted from 37 patients and 15 healthy controls by density gradient centrifugation, and the levels of miR－142－3p were detected by Taq Man real－time (RT) PCR. The correlation between miR－142－3p level and TT_3, TT_4 and TRAb was analyzed. **Results**　The expression level of miR－142－3p in PBMC of GD patients (0.378±0.199) was significantly lower than that of normal healthy control group (1.104±0.421). The difference was statistically significant ($P=0.003$). MiR－142－3p was negatively correlated with TRAb, TT_4 and TT_3 ($r=-0.364$, $P=0.027$; $r=-0.437$, $P=0.007$; $r=-0.337$, $P=0.042$). Meanwhile receiver operating characteristic curve (ROC) suggested that the value of miR－142－3p in diagnosis for GD was high (AUC)=0.917 (95% CI:0.806－1.028). **Conclusion**　The down－regulation of miR－142－3p expression is associated with Graves disease and may play an important role in the occurrence and development of the disease.

Key words　MiR－142－3p; Graves disease; PBMC

Graves 病是一种自身免疫性疾病,Graves 病在女性中发生率约为 3%,另有 0.5% 的男性在其一生中会有发展为 Graves 病的可能性[1]。微小 RNA 是一类广泛存在于真核生物中的非编码单链小 RNA 分子,通过降解靶基因 mRNA 或抑制其蛋白质产物的生成参与调控人体一系列重要生理病理反应,特别是与机体免疫功能关联密切。近年来,越来越多的研究表明许多微小 RNA 在甲状腺功能亢进中发挥重要作用[2]。有研究报道在甲状腺组织以及 Graves 病患者中有 miRNA 异常调节的现象,有些与外周血单核细胞表达有关的特定 miRNA 可能成为治疗 Graves 病的新靶点[3,4]。未成熟的 miR－142 产生两种异构形式,即引导链 miR－142－3p 和副链 miR－142－5p,其中 miR－142－3p 主要分布于 T 细胞,起到 $CD4^+$ T 细胞负性调控因子的作用,能够降低 $CD4^+$ T 细胞的生物活性。miR－142－3p 表达失调与多种人类疾病有关,包括各种炎性疾病、癌症、胚胎发育异常等,尤其是对免疫相关疾病有较大影响[5,6]。探索 miR－

基金项目:安徽省蚌埠市科技局科技指导项目(20160328)

作者单位:233000　蚌埠医学院第一附属医院内分泌科(胡婷、裴晓艳、于磊、金国玺);蚌埠医学院诊断教研室(徐二琴)

通讯作者:金国玺,电子信箱:jyzjyz1999@163.com

142 - 3p 在各种疾病中的作用逐渐成为研究热点,但其在甲状腺自身免疫性疾病中的国内外研究极少,尤其是 Graves 病方面,国内目前仍未见相关报道。本项实验拟探究 miR - 142 - 3p 在 Graves 病中的可能作用,并试讨论其能否成为 Graves 病诊治的新的生物学标志物与干预靶点。

对象与方法

1. 研究对象:选择 2018 年 2 月 ~2018 年 7 月期间于蚌埠医学院第一附属医院内分泌科门诊确诊为 Graves 病的患者 37 例,同期收集体检中心的健康志愿者 15 例,分别作为 GD 组和正常对照组。两组研究对象性别、年龄等一般情况比较,差异无统计学意义。本实验已取得笔者医院伦理学委员会审批,所有患者均知情同意,并签署知情同意书。

2. GD 组纳入标准:①患者有多食善饥、体重降低、怕热多汗、心率增快等高代谢症状和体征;②甲状腺不同程度肿大;③外周血 FT_3、FT_4 增高,TSH 减低,TRAb 增高。排除标准:妊娠或哺乳期女性、合并感染者、合并其他内分泌疾病、合并其他各系统器质性疾病。

3. 正常对照组(健康组)纳入标准:①外周血 FT_3、FT_4、TSH 正常;②全身各系统体检结果正常;③年龄、性别与 GD 组相匹配。妊娠、哺乳期女性除外。

4. PBMC 与提取总 RNA:两组研究对象分别于清晨抽取外周静脉血 5ml,全血置于 EDTA 抗凝管中,加入淋巴细胞分离液 5ml,以密度梯度离心法进行分离,取其外周血单个核细胞(PBMC)。用总 RNA 快速提取试剂盒(上海 Sagon 公司)按操作说明提取总 RNA。

5. RT - qPCR 检测 miR - 142 - 3p 表达水平:采用 ABScriptⅡ cDNA First - Strand Synthesis Kit 试剂盒(武汉 ABclonal 公司)进行反转录反应;采用 2X SYBR Green Fast qPCR Mix No Rox 试剂盒(武汉 ABclonal 公司)进行 qPCR。该实验以 U6 为内参,U6 和 miRNA 引物由上海傲集生物科技有限公司合成。miR - 142 - 3p 反转录引物序列:5′ - GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCCATA - 3′; miR - 142 - 3p 上游引物序列:5′ - CAGCTGGGTGTAGTGTTTCCTACTT - 3′; MiR - 142 - 3p 下游引物序列:5′ - ACGCAGGGTCCGAGGTATTC - 3′; U6 上游引物序列:5′ - CTCGCTTCGGCAGCACA - 3′; U6 下游引物序列:5′ - AACGCTTCACGAATTTGCGT - 3′; RT 反应体系:2μg RNA 溶液,Oligo(dT)18(1μl),5 × Reaction Buffer(4μl),10mmol/L dNTP Mix(2μl),RNAase 抑制剂(20U/μl,1μl)和反转录酶(200U/μl,1μl)。65℃ 预变性 5min,42℃ 保温 60min,结束后 70℃保温 5min 灭活反转录酶。qPCR 反应体系:2 × qPCR Mix(12.5μl);7.5μmol/L 基因引物(2.0μl);反转录产物(2.5μl);ddH_2O(8.0μl)。反应条件 95℃预变性 10min,95℃15s,60℃60s,循环 40 次,反应结束后 60℃→95℃,每 30s 升温 1℃条件下进行熔解曲线分析。每个样本均进行 3 次检测,应用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 miRNA - 142 - 3p 的相对表达水平。

6. ELISA 法检测相关指标:每例于清晨空腹抽取外周静脉血 2ml,室温静置 1h 后在 4℃下以 3000r/min 离心 10min,取上层血清进行检测,采用化学发光法,测定血清 TSH、TT_3、TT_4、FT_3、FT_4、TRAb 等指标(美国 Siemens Healthcare Diagnostics 公司)。

7. 统计学方法:本研究采用 Graph Pad Prism 5.0 做图,采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料用均数 ± 标准差($x \pm s$)表示,数据符合正态分布采用 t 检验。组内相关性分析用 *Pearson* 相关性分析法。运用受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线分析 miR - 142 - 3p 的诊断价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组 PBMC 中 miR - 142 - 3p 表达水平比较:GD 组 PBMC 中 miR - 142 - 3p 的表达水平(0.378 ± 0.199)较正常对照组(1.104 ± 0.421)明显降低(P = 0.003,图 1)。

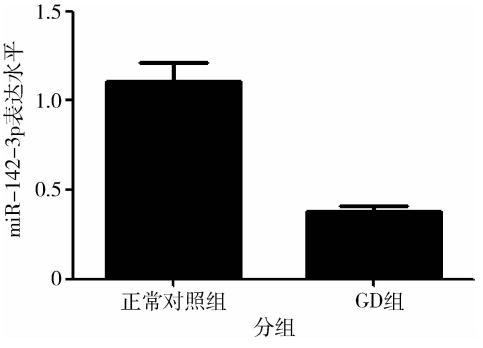

图 1 正常对照组与 GD 组 PBMC 中 miR - 142 - 3p 相对表达水平比较

2. miR - 142 - 3P 与 TT_3、TT_4、FT_3、FT_4、TRAb 等指标的相关性分析:分析 GD 患者 PBMC 中 miRNA - 142 - 3P 水平与 GD 患者临床资料之间的关系,miR - 142 - 3P 与年龄及性别无明显相关性(r = - 0.108,

$P = 0.524$；$r = 0.059$，$P = 0.730$）；miR－142－3P 与 TRAb 呈负相关（$r = -0.364$，$P = 0.027$，图 2）；miR－142－3P 与 TT_4 呈负相关（$r = -0.437$，$P = 0.007$，图 3）；miR－142－3P 与 TT_3 呈负相关（$r = -0.337$，$P = 0.042$，图 4）；miR－142－3P 与 FT_3 呈负相关（$r = -0.392$，$P = 0.017$，图 5）；miR－142－3P 与 FT_4 呈负相关（$r = -0.326$，$P = 0.049$，图 6）。

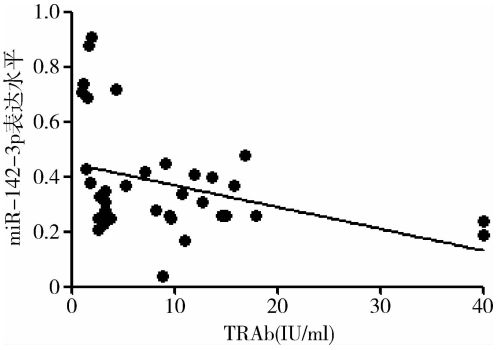

图 2　miR－142－3p 表达水平与 TRAb 的相关性

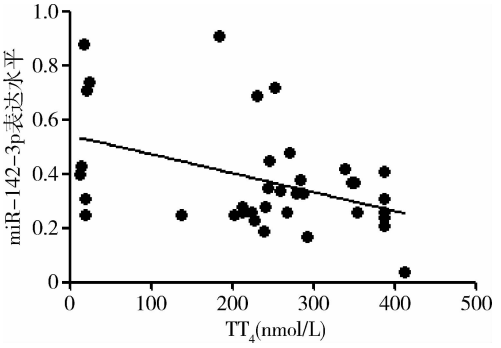

图 3　miR－142－3p 表达水平与 TT_4 的相关性

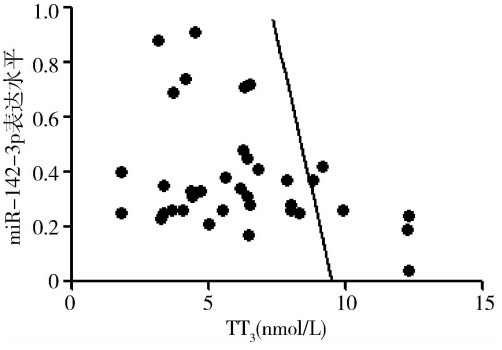

图 4　miR－142－3p 表达水平与 TT_3 的相关性

3. miR－142－3p 诊断效能：ROC 分析发现，miR－142－3p 对 GD 有一定的诊断价值，ROC 曲线下面积（AUC）=0.917（95% CI：0.806～1.028，图 7），通过 ROC 曲线确定的 miR－142－3p 诊断临界值为 0.490，其敏感度为 83.8%（95% CI：67.99%～93.81%），特异性为 93.3%（95% CI：68.05%～99.83%）。

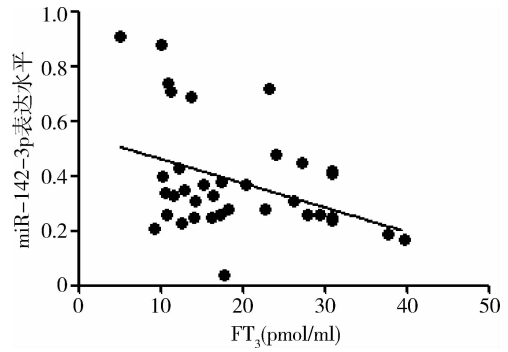

图 5　miR－142－3p 表达水平与 FT_3 的相关性

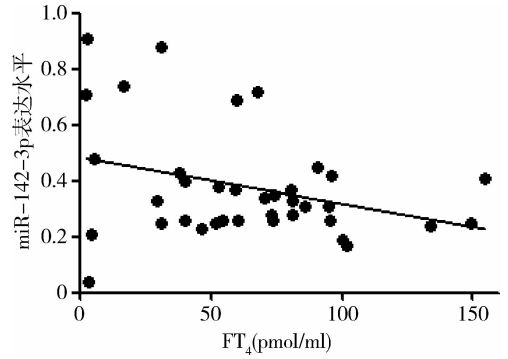

图 6　miR－142－3p 表达水平与 FT_4 的相关性

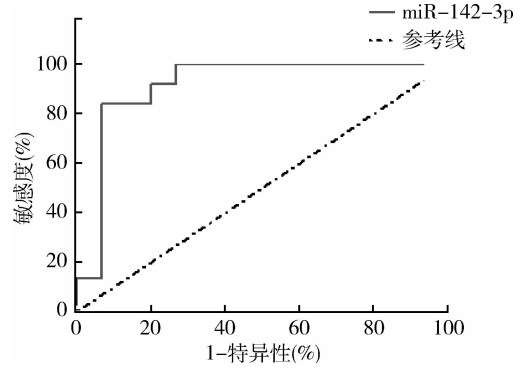

图 7　miR－142－3p 诊断 GD 的 ROC 曲线

讨　　论

Graves 病每年发生率约为（20～30）/1000000，多在 30～60 岁发病[1]。Graves 病发病机制尚未完全阐明，仅证实其是针对甲状腺滤泡细胞膜上促甲状腺激素受体（thyroid stimulating hormone receptor，TSHR）产生的抗体（TRAb）所引起的一种自身免疫性疾病。此种抗体是由 B 淋巴细胞所产生，但其具体作用机制不明，目前主流观点认为其主要由于抑制性 T 淋巴细

胞功能降低所致,即免疫监护和调节功能的遗传性缺陷使患者在遭受精神刺激、感染等应激时,体内免疫稳定性被破坏,B 细胞增生,在辅助 T 细胞的辅助下分泌大量自身抗体(TRAb)而致病[7,8]。

microRNA 是在真核生物中发现的一类内源性的非编码小分子 RNA,它能在细胞活动从分裂、增生到凋亡的各个阶段皆起到调控作用,其中在调控先天免疫及后天免疫中的作用尤为关键,可以通过影响 DNA 甲基化及 TLR 信号通道等多个环节控制各种免疫细胞亚群的分化[9]。许多研究显示了不同的 miRNA 在细胞中的生物学作用过程,包括细胞增殖,细胞凋亡和通过迁移下调各种靶向蛋白质编码的表达基因[10,11]。Liu 等[12] 首次发现 miRNA 的变化在 Graves 病患者体内有重要意义,其利用 miRNA 芯片技术评估患者和健康者外周血单核细胞(PBMC)内 847 种人类 miRNA 的表达,与健康者比较,Graves 病患者 PBMC 内表达 miRNA 差异有意义的有 16 种,变化最明显的有 miR - 154、miR - 376b、miR - 431 和 miR - 142 - 3P,该研究利用 qRT - PCR 技术检测 GD 患者和 GD 恢复期 PBMC 内 miRNA 的水平,发现 Graves 病患者体内 PBMC 中的 miR - 154、miR - 376b、miR - 431、miR - 142 - 3p 表达显著减少。本研究结果证实了在 Graves 病患者体内 PBMC 中 miR - 142 - 3p 表达水平较正常对照组显著降低,这与其研究结果一致。

miR - 142 - 3p 分布于 T 细胞,有报道显示 miR - 142 - 3p 是潜在的区分调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)与非 Treg 的 miRNA 标记。与正常 $CD4^+$ T 细胞比较,在 Treg 细胞中 miR - 142 - 3p 表达水平下调[13]。Huang 等[14] 研究发现,miR - 142 - 3p 在 T 细胞不同亚群中的差异表达介导细胞间信号转导。miR - 142 - 3p 通过靶向 $CD4^+CD25^-$ T 细胞和 $CD4^+CD25^+$ T 细胞中的腺苷酸环化酶(AC) 9 信使 RNA 负性调控 cAMP 的产生。而 cAMP 在 B 细胞中为诱导抗原刺激的增生和抗体产生提供了必要的信号[15]。本研究结果表明,Graves 病患者外周血单个核细胞中 miR - 142 - 3p 的表达水平下调,而 miR - 142 - 3P 与 TT_3、TT_4 和 TRAb 呈负相关。笔者推测 miR - 142 - 3p 表达下降在甲状腺功能亢进发病中的可能机制为:对 AC9 mRNA 的抑制减弱,导致 AC9 表达增加,从而使 cAMP 合成增加,B 淋巴细胞增生,从而分泌大量抗体导致 GD 发生。

特定的 miRNA 失调与人类疾病有关,包括癌症、感染性疾病以及和机体免疫反应相关的疾病。这使得它们成为重要的致病因子以及这些疾病的潜在治疗目标。结合本研究结果,miR - 142 - 3p 的表达水平不仅在 GD 中显著减少、还与 GD 患者的血清甲状腺激素水平高低相关,笔者认为 miR - 142 - 3p 也许可以成为 Graves 病诊断的生物学标志物和治疗新靶点。一般来说,ROC 曲线下面积越大,诊断实验的鉴别能力越强,0.9 以上表明诊断价值较高。而 miR - 142 - 3P 在诊断 Graves 病中的 ROC 曲线下面积为 0.917,表明 miR - 142 - 3p 对于 Graves 病具有较高的诊断价值,当设置 miR - 142 - 3p 水平在 0.490 时,诊断可有较高的敏感度及特异性。临床中常依据患者出现高代谢症状和体征,甲状腺明显肿大及血清 TT_4、FT_4 增高,TSH 减低,TRAb 阳性等可明确 GD 的诊断。

本研究结果提示在临床诊断中可以联合现有的指标,使 GD 诊断体系更加完善、全面而科学,为某些无明显临床表现及血清学现象的疑难病例诊断提供了一个辅助指标。目前 GD 的治疗主要有抗甲状腺药物、^{131}I 及手术治疗等,其药物不良反应及术后并发症都较难避免,且 GD 疗程较久容易复发。miR - 142 - 3p 的表达水平与 Graves 病相关,在疾病的发生、发展中可能起到重要作用,在治疗上也可作为临床疗效判断的一个标准。进一步研究其作用机制,有望为预防和治疗 Graves 病提供一个新靶点,增加 miR - 142 - 3p 的表达可能是 GD 治疗的一种潜在策略,为新药的开发提供一个思路。

参考文献

1 Burch HB, Cooper DS. Management of Graves disease a review[J]. JAMA,2015, 314(23): 2544 - 2554

2 Yamada H, Itoh M, Hiratsuka I, *et al*. Circulating microRNAs in autoimmune thyroid diseases[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2014, 81(2): 276 - 281

3 Liu R, Ma X, Xu L, *et al*. Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves' disease patients[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(6): E968 - E972

4 Bernecker C, Lenz L, Ostapczuk MS, *et al*. MicroRNAs miR - 146a1, miR - 155 - 2, and miR - 200a1 are regulated in autoimmune thyroid diseases[J]. Thyroid, 2012, 12(22):1294 - 1295

5 Liu L, Hua M, Liu C, *et al*. The aberrant expression of microRNAs and correlations with T cell subsets in patients with immune thrombocytopenia[J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 76453 - 76463

6 Talebi F, Ghorbani S, Chan WF, *et al*. MicroRNA - 142 regulates inflammation and T cell differentiation in an animal model of multiple sclerosis[J]. J Neuroinflammat, 2017, 14(1): 55

(转第 147 页)