

重症肌无力患者血清 miR-126、Foxp3 mRNA 的表达及临床意义

黄攀¹, 徐敏², 何晓英³

(1. 德阳市人民医院 神经内科, 德阳 618000; 2. 德阳市第二人民医院 神经内科, 德阳 618000; 3. 西南医科大学附属医院 神经内科, 泸州 646000)

摘要: 为探讨重症肌无力(myasthenia gravis, MG)患者血清 miR-126、叉头翼状螺旋转录因子 3(forkhead box P3, Foxp3) mRNA 的表达及临床意义, 为 MG 发病机制研究提供更多的依据, 选择 63 例 MG 患者为 MG 组, 50 例体检正常者为对照组。采用 RT-PCR 检测血清 miR-126、Foxp3 mRNA 的表达水平, 并采用 Spearman 相关性分析法分析 miR-126 与 Foxp3 mRNA 的相关性。结果显示, MG 组患者血清 miR-126 的相对表达量(2.59 ± 0.84)高于对照组(1.05 ± 0.73 , $P < 0.01$), 而 Foxp3 mRNA 的相对表达量(1.58 ± 0.81)低于对照组(3.15 ± 0.96 , $P < 0.01$); miR-126 核苷酸序列在人、小鼠、狗等 7 个物种间存在高度保守性; MG 组患者血清 miR-126 与 Foxp3 mRNA 呈负相关($r = -0.852$, $P < 0.01$)。提示 MG 患者存在 miR-126 及 Foxp3 mRNA 的差异表达, 且高表达的 miR-126 可能通过抑制 Foxp3 mRNA 的表达参与 MG 的致病。

关键词: 重症肌无力; 微小 RNA-126; 叉头翼状螺旋转录因子 3 mRNA

中图分类号: R741.02

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)03-0206-05

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种神经-肌肉接头传递功能障碍的获得性自身免疫性疾病, 发病与患者体内多种免疫反应、免疫耐受信号通路有关^[1]。叉头翼状螺旋转录因子 3(forkhead box P3, Foxp3)是一种能调节机体自身免疫耐受反应的转录因子^[2], Foxp3 的表达量减少可提示机体自身免疫反应增强, 而其表达量的增加则具有防止自身免疫性疾病发生的作用。因此, 其表达量的变化可在一定程度上反应自身免疫性疾病的治疗效果^[3-4]。

miRNA 是一种具有调控机体生长发育、疾病发生的长度为 17~22 个核苷酸的小分子非编码 RNA 物质^[5]。miR-126 是众多 miRNA 家族成员中的一员, 已被证实是一种与血管生成有关的“关键调控因子”, 在多种心脑血管疾病中存在差异表达谱^[6]。然而随着研究的深入, 发现 miR-126 还具有免疫调控作用, 如敲减 miR-126 基因的小鼠体内 CD4⁺ T 淋巴细胞增殖、活化能力明显上调^[7], miR-126 能影响小鼠腹腔内巨噬细胞的增殖

能力和功能相关的分子表达^[8], miR-126 基因敲减后能显著影响小鼠胸腺细胞特别是 CD4~+SP 细胞的发育^[9]。那么, MG 患者外周血中是否存在 miR-126 的差异表达谱? 若存在, 其在 MG 发病中具有何种作用? 基于以上疑问, 本研究采用 RT-PCR 检测 MG 患者外周血 miR-126、Foxp3 mRNA 的相对表达量, 并通过相关性分析法探究二者的关系, 以期为后期深入探讨 miR-126 在 MG 发病中的作用和机制提供前期研究基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2013 年 7 月至 2018 年 3 月德阳市人民医院收治的 MG 患者(63 例)为 MG 组, 其中男性 28 例、女性 35 例, 年龄(34.68 ± 8.84)岁。选择同期体检正常者(50 例)为对照组, 其中男性 22 例、女性 28 例, 年龄(35.36 ± 9.24)岁。2 组研究对象在年龄、性别、合并症等方面具有可比性。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 (1)MG 诊断符合《重症肌无力诊断和治疗中国专家共识》^[10]; (2)神志清楚, 能配合本研究者; (3)经 CT 或 MRI 检查证实无脑梗死、颅内动脉瘤、颅内动静脉畸形、脑出血疾病者; (4)MG 临床资料完整者; (5)患者或其家属签署知情同意书; (6)首次确诊 MG 者。

收稿日期: 2018-08-27

基金项目: 四川省应用基础研究计划项目(2014JC0166); 四川省卫生厅资助项目(110368)

作者简介: 黄攀(1990—), 男, 硕士生, 主要从事脑血管疾病研究

通信作者: 何晓英(E-mail: 102050228@qq.com)

1.2.2 排除标准 (1)合并严重内科系统疾病者；(2)合并严重心、肝、肾、肺功能不全者；(3)合并自身免疫性疾病或正在使用抑制免疫功能的药物者；(4)合并恶性肿瘤及非首次确诊 MG 者。

1.3 主要试剂及仪器 三氯甲烷(批号 10006818)、无水乙醇(批号 10009218)、异丙醇(批号 80109218)由国药集团化学试剂厂提供, 反转录酶试剂盒(批号 C-28025 M-MLV)、10 mmol/L dNTP MIX(批号 C-18427-013)、TRIzol Reagent(批号 15596-026)由 Invitrogen 公司提供, SYBR[®] Premix Ex Taq[™](批号 RR420A)由 TaKaRa 公司提供。TGL-16c 型台式离心机购自上海安亭科学仪器厂, TGL-16 型冷冻离心机购自湖南湘仪仪器厂, IMS-20 型制冰机购自常熟学科电器有限公司, TC-XP 型基因扩增仪购自杭州博日科技有限公司, SW-CJ-1FD 型超菌工作台购自苏州安泰有限公司, StepOne[™] Real-Time PCR System 购自 Life Technologies 公司。

1.4 RT-PCR 抽取研究对象空腹肘静脉血, 分离收集血清样本, 取 200 μ L 血清样本按照 TRIzol 法进行 RNA 提取。采用核酸蛋白测定仪进行 RNA 纯度判定, 以 D_{260}/D_{280} 比值 1.8~2.0 为纯度较高。采用反转录酶试剂盒进行 cDNA 合成。以 cDNA 为模板, 在如下反应体系中进行扩增: 引物工作液 (2.5 μ mol/L) 1.0 U, $2 \times$ qPCR Mix 5.0 μ L, ddH₂O 2.8 μ L, Rox 0.2 μ L, Template 1.0 μ L, 总体积 10 μ L, 行 3 复孔。扩增循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 40 个

循环, 取 3 复孔平均值作为结果。miR-126 引物序列: Forward, 5'-TCGTACCGTGAGTAATAATGCG-3'; Reverse, 5'-CTCAACTGGTGTCTGTCGTCGAGTC-3'。Foxp3 引物序列为: Forward, 5'-GGGTAGCCATG-GAAACAGCAAGTA-3'; Reverse, 5'-TCGCATGTT-GTGGAACTTGAAGTAG-3'。内参基因选择 U6, 序列为: Forward, 5'-CTCGCTTCGGCAGCACAT-3'; Reverse, 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.5 miR-126 及 Foxp3 mRNA 相对表达量的计算

在 RT-PCR 中采用 3 复孔法计算其平均 Ct 值, Ct 值不能在统计分析中作为原始数据进行分析, 需进行标准化, 其计算公式为: $\Delta Ct = Ct \text{ 值}_{\text{miR-126 或 Foxp3 mRNA}} - Ct \text{ 值}_{\text{U6}}$, 采用 $2^{-\Delta Ct}$ 代表各目标 miRNA 及 Foxp3 的相对表达量进行统计学处理。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 t 检验, 相关性分析采用 Spearman 相关性分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-126 在人类基因组中的位置及保守性分析 通过 UCSC 数据库 (<http://genome-asia.ucsc.edu>) 可以找到 miR-126 在人类基因组中的位置以及保守性程度。结果显示: miR-126 在人类基因组中位于 9 号染色体长臂 34 区 3 带 136670602~136670686 位点上, 长度约 85 bp; miR-126 核苷酸序列在人、鸡、狗、小鼠、大象、非洲爪蛙、恒河猴 7 个物种之间高度保守。(图 1)

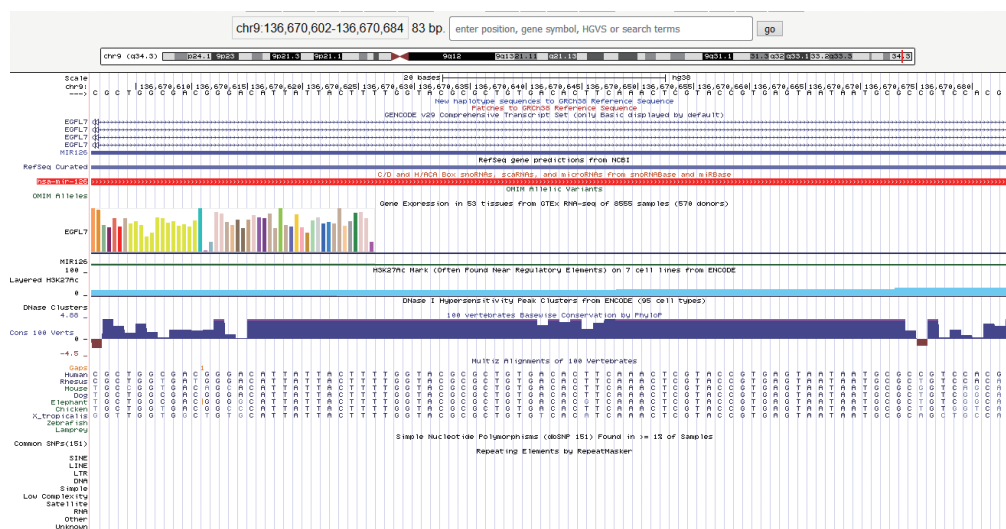


图 1 miR-126 在人类基因组中的位置及保守性分析

2.2 MG组与对照组血清 miR-126、Foxp3 mRNA 相对表达量的比较 MG组患者血清 miR-126 的相对表达量(2.59 ± 0.84)高于对照组(1.05 ± 0.73 , $P < 0.01$),而 MG组患者血清 Foxp3 mRNA 的相对表达量(1.58 ± 0.81)低于对照组($3.15 \pm$

0.96 , $P < 0.01$)。(图 2)

2.3 MG组患者血清 miR-126 与 Foxp3 mRNA 的相关性分析 MG组患者血清 miR-126 的相对表达量与 Foxp3 mRNA 的相对表达量呈负相关($r = -0.852$, $P < 0.01$)。(图 3)

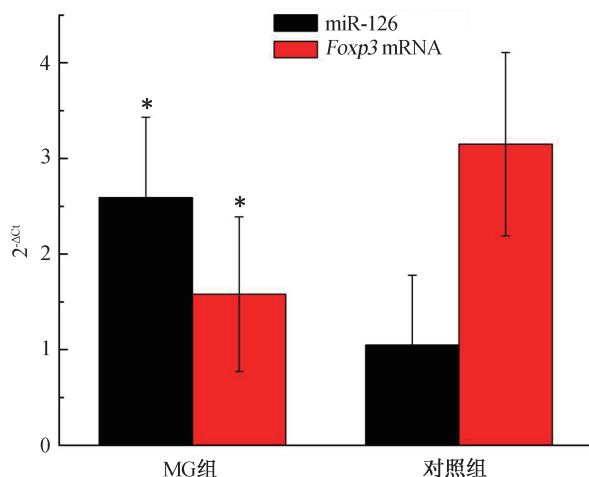


图 2 2组研究对象血清 miR-126、Foxp3 mRNA 相对表达量的比较
注:与对照组相比, * $P < 0.01$

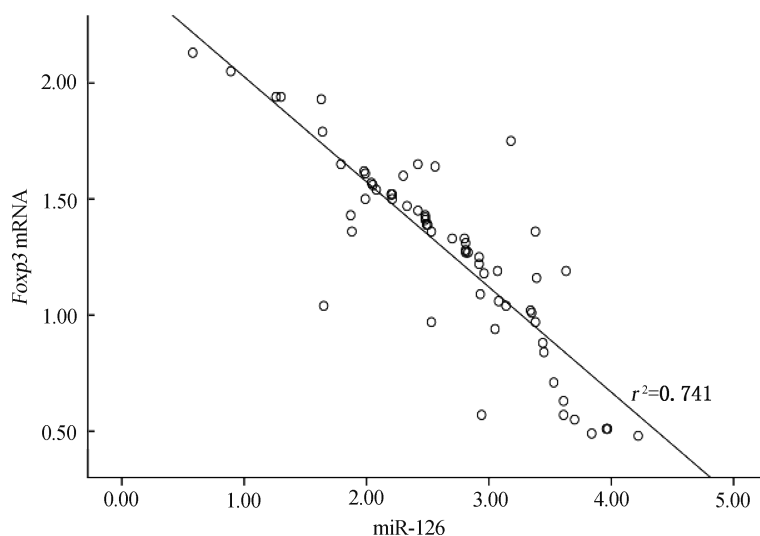


图 3 MG组患者血清 miR-126 与 Foxp3 mRNA 的相关性分析

3 讨论

MG 的发病机制尚未完全明确,但公认该病是一种在遗传背景下发生的由自身免疫抗体介导的与突触后膜乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AchR) 损害有关的疾病,其实质是一种机体自身免疫反应与免疫耐受平衡失常的疾病^[11-12]。目前,对于 MG 发病机制的研究主要集中在免疫效

应方面,而对于免疫耐受在 MG 中的作用研究甚少^[13-14]。CD4⁺Treg 是一类具有调控体内自身免疫反应作用的 T 淋巴细胞亚群, CD4⁺Treg 阶段是 T 淋巴细胞分化成熟过程中的一个必经阶段,与自身免疫性疾病关系密切,CD4⁺Treg 的异常表达常导致自身免疫性疾病的发生^[15]。Foxp3 是一种新近被发现的特异性转录因子,广泛表达于体内 CD4⁺Treg 阶段,具有介导 Treg 在外周表达及功

能维持的作用^[16-17]。多项研究显示, MG患者存在Foxp3表达水平的下调, 提示Foxp3参与了MG的发病^[18], 其机制可能为低表达的Foxp3对自身免疫反应的抑制减弱, 机体自身免疫耐受能力降低, 导致突触后膜的AChR遭到自身抗体的破坏^[19]。

miRNA是一类长度为17~22个核苷酸的小分子非编码RNA物质, 通过与靶基因mRNA完全或不完全碱基互补配对结合而在转录水平上发挥对靶基因表达负性调控的作用, 广泛参与对机体生长发育、疾病发生的调控中。miR-126是众多miRNA家族成员中的一员, 目前研究发现其具有多种作用, 如有学者发现表达上调的miR-126能够抑制卵巢癌细胞SKOV3在体外的迁移和侵袭, 提示低表达的miR-126可能与卵巢癌病情进展有关; Qi等^[20]研究发现miR-126可以通过调节VEGF、VCAM-1、PAK1等多个与血管生成有关的靶基因参与调控血管生成。最新研究表明, miR-126除具备以上作用外, 还具有调控免疫的作用, 如: 在敲减miR-126的UC模型大鼠中溃疡及炎性细胞浸润程度较非miR-126敲减大鼠重^[21]; 在支气管哮喘患儿中miR-126的表达水平明显升高, 且具有预测儿童支气管哮喘的作用^[22]; 秦安东等^[23]通过基础实验发现, miR-126具有调控CD4⁺T_H17⁺淋巴细胞的外周诱导及免疫抑制功能。

然而, 目前miR-126具有免疫调控作用的研究大多是基础细胞或动物(多数为鼠)研究, 缺乏临床研究。MG是一种具有良好代表性的免疫性疾病, 那么MG患者外周血中是否存在miR-126的差异表达? 本研究采用RT-PCR检测MG患者与非MG患者血清miR-126、Foxp3 mRNA的相对表达水平, 结果发现MG患者血清miR-126的表达水平明显升高, 而Foxp3 mRNA的表达水平明显低于对照组, 说明高表达的miR-126与低表达的Foxp3在MG的发病中具有重要作用。

因miRNA在不同物种间可能存在核苷酸序列保守性的差别, 即在细胞实验或动物实验中miR-126具有免疫调控作用, 而在人类却有可能因为核苷酸序列的不同而不具有免疫调控作用^[24]。为解决这一问题, 本研究首先通过UCSC数据库分析出miR-126在人、小鼠等物种间存在高度同源性, 提示人体内的miR-126也具有调控免疫反应的作用。

同时, 进一步做miR-126与Foxp3 mRNA的相关性分析, 结果表明二者具有负相关关系, 提示在MG中高表达的miR-126可以在一定程度上负性调控Foxp3 mRNA的表达进而参与MG的发病, 这与Qin等^[20]的基础研究结论相吻合。

综上所述, 本研究显示, MG患者血清中存在miR-126的高表达和Foxp3 mRNA的低表达, 且高表达的miR-126可在一定程度上抑制Foxp3的表达, 进而导致MG发病, 这为后期的研究指明了方向。然而, 本研究的不足之处在于研究的样本量少, 且为单中心研究, 相关结论需大规模、多中心研究进行论证。

参考文献

- [1] Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis: Subgroup classification and therapeutic strategies[J]. Lancet Neurol, 2015, 14(10): 1023-1036.
- [2] Liang YJ, Lao XM, Liang LZ, et al. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in human tongue squamous cell carcinoma cell[J]. Int J Oncol, 2015, 46(5): 1935-1943.
- [3] Liu Y, Wang L, Han R, et al. Two lysines in the forkhead domain of foxp3 are key to T regulatory cell function[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29035.
- [4] Wang L, Jin JY, Chen LH. Immune molecules involved in the regulation of CD4⁺Treg[J]. Immunol J, 2018, 34(1): 73-79.
- [5] 郑文, 赵娟娟, 崔盼盼, 等. 微小RNA-21与非小细胞肺癌关系的研究新进展[J]. 现代免疫学, 2017, 37(1): 59-63.
- [6] Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis[J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(4): 581-588.
- [7] Chu FY, Hu Y, Guo MM, et al. The effect of microRNA-126 knockdown on the function of CD4⁺T cells in vitro[J]. Immunol J, 2017, 33(2): 158-163.
- [8] 郭萌萌, 赵娟娟, 陶弋婧, 等. MicroRNA-126基因敲减小鼠腹腔巨噬细胞功能的变化及意义[J]. 现代免疫学, 2015, 35(4): 322-327.
- [9] Guo MM, Hu Y, Zhao JJ, et al. Effect of microRNA-126 knocking down on the development of mouse thymocytes[J]. Basic Clin Med, 2016, 36(3): 289-294.
- [10] 中国免疫学会神经免疫学分会, 中华医学会神经病学分会神经免疫学组. 重症肌无力诊断和治疗中国专家共识[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2012, 19(6): 401-408.
- [11] 李媛, 楚兰, 张艺凡. 重症肌无力免疫学机制研究进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2015, 22(3): 209-214.
- [12] Saruhan-Direskeneli G, Hughes T, Yilmaz V, et al. Genetic heterogeneity within the HLA region in three distinct clinical subgroups of myasthenia gravis[J]. Clin Immunol, 2016, 166-167: 81-88.

- [13] 刘丽华,王丽华,王健健,等.重症肌无力免疫耐受机制及治疗方法的实验研究进展[J].脑与神经疾病杂志,2013,21(2):153-155.
- [14] 王云甫,曹学兵,孙圣刚.重症肌无力免疫耐受治疗的研究进展(综述)[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2003,10(4):247-250.
- [15] Liston A, Nutsch KM, Farr AG, *et al.* Differentiation of regulatory Foxp3(+) T cells in the thymic cortex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(33): 11903-11908.
- [16] Tian Y, Yuzhang WU. Research progress in the regulation of Foxp3 expression[J]. Immunol J, 2010, 26(9): 823-826.
- [17] Shi G, Zeng Q, Wei LI, *et al.* Progress of CD4+CD25+Foxp3+regulatory T cell in autoimmune diseases[J]. Immunol J, 2016, 32(12): 1092-1095.
- [18] Balandina A, Lecart S, Darteville P, *et al.* Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. [J]. Blood, 2005, 105(2):735-741.
- [19] 马铮,王如文,蒋耀光,等.重症肌无力胸腺 Foxp3 基因转录表达水平及其临床意义[J].第三军医大学学报,2007,29(9):767-769.
- [20] Qi DH, Ge HY, Luo X, *et al.* Molecular mechanisms of microRNA-126(miR-126) regulate vascular[J]. Prog Mod Biomed, 2014, 14(28): 5586-5590.
- [21] Feng X, Wang H, Ye S, *et al.* Up-regulation of microRNA-126 may contribute to pathogenesis of ulcerative colitis via regulating NF-kappaB inhibitor IκBα[J]. PLoS ONE, 2012, 7(12):e52782.
- [22] 颜世军,潘秋莎,周炳文,等. microRNA-1 与 microRNA-126 在支气管哮喘急性发作期患儿外周血中的表达及诊断价值[J].河北医学,2016,22(5):714-716.
- [23] 秦安东,刘娟,罗军敏,等. MicroRNA-126 调控 CD4+Foxp3+T 细胞的外周诱导及功能[J].免疫学杂志,2016,32(5):382-387.
- [24] 盛熙晖,杜立新. MicroRNA 及其在人和动物上的研究进展[J].遗传,2007,29(6):651-658.

Expression of miR-126 and Foxp3 mRNA in peripheral blood of patients with myasthenia gravis and its clinical significance

HUANG Pan¹, XU Min², HE Xiao-ying³ (1. Department of Neurology, People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, China; 2. Department of Neurology, the Second People's Hospital of Deyang City, Deyang 618000, China; 3. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the expression and clinical significance of miR-126 and forkhead box P3 (Foxp3) mRNA in peripheral blood of patients with myasthenia gravis (MG), for better understanding of the pathogenesis of MG. 63 patients with MG were enrolled as the MG group and 50 healthy persons were selected as the control group. RT-PCR was used to detect the expression levels of miR-126 and Foxp3 mRNA in peripheral blood of the two groups, and the correlation between miR-126 and Foxp3 mRNA was analyzed by Spearman correlation analysis. The results showed that the expression of miR-126 in peripheral blood of the MG group (2.59 ± 0.84) was higher than that of the control group (1.05 ± 0.73 , $P < 0.01$), while the relative expression of Foxp3 mRNA (1.58 ± 0.81) was lower than that of the control group (3.15 ± 0.96 , $P < 0.01$). The miR-126 nucleotide sequence was highly conserved among 7 species including human, mouse and dog. There was a negative correlation between miR-126 and Foxp3 mRNA in peripheral blood of the MG group ($r = -0.852$, $P < 0.01$). The results indicate that differential expression profiles of miR-126 and Foxp3 mRNA exist in MG patients, and the highly expressed miR-126 may participate in the pathogenesis of MG by inhibiting the expression of Foxp3 mRNA.

Key words: myasthenia gravis; microRNA-126; forkhead box P3 mRNA