

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.10.009

网络首发 [https://www.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200318.1423.020.html\(2020-03-19\)](https://www.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200318.1423.020.html(2020-03-19))

miRNA-499 多态性对桥本甲状腺炎易感性的影响*

吴平平¹, 章 燕², 黄海华², 甘华侠^{2△}

(1. 九江学院附属医院皮肤科, 江西九江 332000; 2. 南昌大学第一附属医院内分泌科, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨 miRNA-499(rs3746444)单核苷酸多态性(SNPs)与中国江西地区汉族人群桥本甲状腺炎(HT)发病的相关性。**方法** 选取江西本地汉族 HT 患者(观察组, $n=96$)及同期健康者(对照组, $n=80$)为研究对象,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法检测 miRNA-499 基因多态性,分析比较不同基因型的分布频率及对疾病严重程度的影响。**结果** 观察组及对对照组的 miRNA-499(rs3746444)均存在 T/T、T/C、C/C 3 种基因型,基因型分布频率差异无统计学意义($P>0.05$);T/C vs. T/T 基因型分布频率差异有统计学意义($P<0.05$);T、C 等位基因分布频率在两组间的差异无统计学意义($P>0.05$);TPOAb ≥ 600 U/mL 及 TPOAb <600 U/mL 两亚组间基因型分布频率及等位基因分布频率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** miRNA-499 T/C 基因型可能是 HT 发病的风险因素,miRNA-499 多态性与疾病严重程度无关。

[关键词] 微 RNAs;桥本病;单核苷酸多态性**[中图分类号]** R581.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)10-1589-04

Effect of polymorphism in miRNA-499 on susceptibility of Hashimoto's thyroiditis*

WU Pingping¹, ZHANG Yan², HUANG Haihua², GAN Huaxia^{2△}

(1. Department of Dermatology, the Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000, China; 2. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association of single nucleotide polymorphisms(SNPs) in miRNA-499 (rs3746444) with Hashimoto's thyroid disease(HT) susceptibility among Chinese Han population in Jiangxi. **Methods** HT patients(the experiment group, $n=96$) and healthy people(the control group, $n=80$) in Jiangxi Han population were selected as subjects. The single nucleotide polymorphisms(SNPs) in miRNA-499 (rs3746444) was genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). The distribution frequency of genetic polymorphisms in miRNA-499 and the effects on disease severity were analyzed and compared. **Results** There were three genotypes of miRNA-499(rs3746444) polymorphism T/T, T/C and C/C in both the experiment group and the control group, there was no significant difference in distribution frequency between different genotypes ($P>0.05$). The distribution frequency between the genotypes T/C and T/T had statistically significant differences ($P<0.05$), but there was no statistically significance between the frequency of allele C and T ($P>0.05$). The genotype distribution frequency and allele distribution frequency between the TPOAb ≥ 600 U/mL group and the TPOAb <600 U/mL group had no statistically significance ($P>0.05$). **Conclusion** The genotype T/C of miRNA-499(rs3746444) may be a risk factor for HT. miRNA-499 polymorphism was not associated with the disease severity.

[Key words] microRNAs; hashimoto disease; single nucleotide polymorphisms

桥本甲状腺炎(hashimoto's thyroiditis, HT)也称慢性淋巴细胞性甲状腺炎,是一种以自身甲状腺组织为抗原的,由体液免疫和细胞免疫共同介导的慢性炎性自身免疫性疾病^[1]。HT 患者甲状腺组织间隙中

可见弥漫性淋巴细胞浸润及血液中抗甲状腺抗体升高,主要的抗甲状腺抗体为甲状腺球蛋白抗体(thyroglobulin antibody, TGAb)及抗甲状腺过氧化物酶抗体(anti-thyroid peroxidase antibody, TPOAb),逐渐

* 基金项目:江西省重点研发计划项目(20161BBG70179)。 作者简介:吴平平(1989-),主治医师,硕士,主要从事甲状腺疾病研究。

△ 通信作者, E-mail:13870922888@126.com。

导致甲状腺功能减退,最终引起 HT 的发生。HT 的发病机制可能与性别、年龄、感染、高碘饮食、吸烟、压力、辐射及遗传易感性等因素有关。大量研究表明,多基因遗传因素对其发生、发展起主要作用。

微 RNAs (miRNAs) 可通过调控各种基因的表达广泛参与细胞代谢、分化、增殖、凋亡、免疫应答及肿瘤的形成,对维持免疫稳态和免疫细胞正常功能起重要调节作用^[2]。miRNAs 在自身免疫性疾病中通过调节免疫细胞的发育、分化、成熟、免疫信号转导等参与生物学过程,可能成为疾病诊断的分子标志物,还可能为疾病治疗提供新的靶点^[3-6]。miRNAs 前体上的遗传突变可以导致其从前体向成熟的转化受限,影响下游 miRNAs 的表达,从而在转录后水平改变靶基因的蛋白质表达,最终影响疾病的发生、发展和预后^[7-8]。研究表明 miRNA-499 在 rs3746444 位点的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与类风湿性关节炎、慢性牙周炎和种植体周围炎、溃疡性结肠炎等多种炎症疾病的严重程度及疾病的活动度有关^[9-14],但其与 HT 发病风险的关系研究较少。因此,本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法检测 miRNA-499 的 SNPs 对江西汉族人群 HT 遗传易感性的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究共纳入江西本地汉族人受试者 176 例。观察组:依据 2008 年中华医学会内分泌学分会《中国甲状腺疾病诊治指南》诊断标准,选取 2014 年 3 月至 2016 年 2 月南昌大学第一附属医院内分泌科门诊确诊 HT 患者 96 例。对照组:同期南昌大学第一附属医院体检科健康体检者 80 例,体检结果均正常,无各种慢性炎症性疾病及心脑血管疾病等,从未服用任何对甲状腺功能及抗体有影响的药物。受试者及家属均对本研究知情同意,并经医院伦理委员会批准。

观察组分为两亚组,TPOAb \geq 600 U/mL 组(58 例):患者诊断 HT 期间未使用过免疫调节药物,TPOAb 水平持续大于或等于 600 U/mL;TPOAb $<$ 600 U/mL 组(38 例):患者诊断 HT 期间未使用过免疫调节药物,且 TPOAb 水平持续小于 600 U/mL。

1.2 标本与试剂

采集受试者静脉全血 2 mL 置于抗凝管中,-80 °C 保存。全血基因组 DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,2 \times Taq PCR Master Mix 购自 Trans 生化科技有限公司,限制性内切酶 Bcl I 购自 NEB 公司,PCR 引物由金瑞斯生物科技公司提供。

1.3 方法

1.3.1 全血基因组 DNA 提取

吸取 0.3 mL 全血加入含 0.9 mL 红细胞裂解液的 2 mL 离心管中,室温放置 10 min 后 2 000 \times g 离

心 10 min,弃去上清液,重悬白细胞团,加入 0.3 mL 细胞核裂解液迅速吹打混匀,加入 0.1 mL 蛋白沉淀液后 2 000 \times g 离心 10 min,吸取上清液至新离心管中,依次加入异丙醇和 70%乙醇抽提和纯化 DNA,加入 25 μ L DNA 溶解液常温溶解 60 min 后 4 °C 过夜,-20 °C 长期保存。

1.3.2 目的基因 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳

按照 Taq PCR Master Mix 试剂盒操作说明进行目的基因 miRNA-499 扩增,上样于 2% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物浓度及纯度,引物序列见表 1。

1.3.3 PCR 产物酶切及琼脂糖凝胶电泳

按 1.0 μ L PCR mix、7.0 μ L PCR 产物、1.0 μ L Bcl I、NEBbuffer 1.0 μ L、去离子水 1.0 μ L 配制酶切反应体系,50 °C 温育 15 min,上样于 3.5% TAE 琼脂糖凝胶进行电泳,Bcl I 回文结构见表 1。

表 1 引物序列

| 名称 | 序列 |
|-----------|---|
| miRNA-499 | 正向:5'-CAAAGTCTTCACTTCCCTGCCA-3' 反向:5'-GATGTTTAACTCTCTCCACGTGATC-3' |
| BclI回文结构 | 5'-TGATCA-3' 3'-ACTAGT-5' |

1.4 统计学处理

实验数据使用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。各组数值变量进行正态性检验,分类变量及 Hardy-Weinberg 平衡分析使用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-499 基因 PCR 扩增和酶切结果

各组试验对象全血 DNA 均扩增出 miRNA-499,且未见明显杂带,纯度高(图 1A)。miRNA-499 基因多态性在 rs3746444 位点主要表现为 3 种基因型,其中 T/T 为野生型,T/C、C/C 为突变型,其 PCR 扩增产物经限制性内切酶 Bcl I 酶切后 3 种基因型均可见(图 1B),T/T 基因型可见 120 bp 和 26 bp 两个条带,T/C 基因型可见 146 bp、120 bp 和 26 bp 3 个条带,C/C 基因型可见 146 bp 条带。

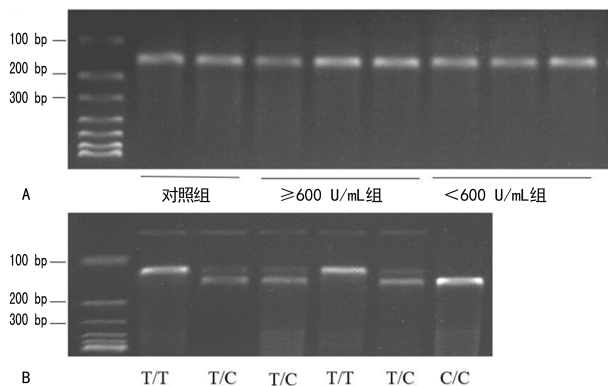
2.2 miRNA-499 基因多态性

对照组、观察组两亚组间基因型分布均通过 Hardy-Weinberg 平衡检测,研究对象具有群体代表性。

miRNA-499 多态性(rs3746444)在健康人群(对照组)和 HT 患者(观察组)中的基因型和等位基因分布见表 2。观察组与对照组 miRNA-499 在 rs3746444 T/C 多态性分布上无明显差异($\chi^2 = 5.847, P = 0.054$)。miRNA-499 野生基因型(T/T)的频率在观察组(39.6%)中明显低于对照组(57.5%),而携带变异基因型(T/C+C/C)的江西汉族人群与 T/T 基因型相比,患 HT 的风险增加了 2.07 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。病例中杂合基因型(T/C)的发生率为

52.1%(50/96), 高于对照组的 37.0%(28/80), 且该基因型患 HT 的风险明显高于 T/T 基因型。变异型纯合基因型(C/C)患 HT 的风险虽为 T/T 型的 1.61 倍, 但差异无统计学意义。还不能认为 miRNA-499(rs3746444) C 等位基因为 HT 易感性的危险因素 ($P>0.05$)。

TPOAb \geq 600 U/mL 组和 TPOAb $<$ 600 U/mL 组基因型和等位基因分布见表 3。两亚组 3 种基因型分布差异无统计学意义 ($\chi^2=0.944, P=0.624$), 各基因型与等位基因与 TPOAb 表达量无明显相关性。



A: miRNA-499 基因扩增; B: Bcl I 酶切。

图 1 miRNA-499 基因 PCR 扩增及酶切后琼脂糖凝胶电泳结果

表 2 观察组和对照组 miRNA-499 基因型和等位基因频率分布[n(%)]

| 项目 | 观察组(n=96) | 对照组(n=80) | OR | P |
|---------|-----------|-----------|------|-------|
| 基因型频率 | | | | |
| T/T | 38(39.6) | 46(57.5) | 1.00 | — |
| T/C | 50(52.1) | 28(37.0) | 2.51 | 0.016 |
| C/C | 8(8.3) | 6(7.5) | 1.61 | 0.409 |
| T/C+C/C | 58(60.4) | 34(42.5) | 2.07 | 0.019 |
| 等位基因频率 | | | | |
| T | 126(65.6) | 120(75.0) | 1.00 | — |
| C | 66(34.4) | 40(25.0) | 1.57 | 0.056 |

—: 无数据。

表 3 两亚组间 miRNA-499 基因型和等位基因频率分布[n(%)]

| 项目 | TPOAb \geq 600 U/mL (n=58) | TPOAb $<$ 600 U/mL (n=38) | OR | P |
|---------|---------------------------------|------------------------------|------|-------|
| 基因型频率 | | | | |
| T/T | 25(43.1) | 13(34.2) | 1.00 | — |
| T/C | 29(50.0) | 21(55.3) | 0.72 | 0.458 |
| C/C | 4(6.9) | 4(10.5) | 0.52 | 0.343 |
| T/C+C/C | 33(56.9) | 25(65.3) | 0.69 | 0.383 |
| 等位基因频率 | | | | |
| T | 79(68.1) | 47(61.8) | 1.00 | — |
| C | 37(31.9) | 29(38.2) | 0.76 | 0.371 |

—: 无数据。

3 讨论

近年来, HT 的发病率逐年增高, 被认为是目前最常见的免疫性疾病^[15-16]。由于可能存在共同的遗传背景, HT 可单独发生或与其他自身免疫性疾病(如 1 型糖尿病、干燥综合征)共同发生^[17], 也可与其他甲状腺疾病共同发生。尤其值得注意的是 HT 合并甲状腺癌的发生率为 0.5%~30.0%^[18]。HT 是多种因素参与导致的疾病, 在特定易感基因的基础上由环境诱发导致甲状腺球蛋白和甲状腺过氧化物酶增加, 导致抗甲状腺抗体的产生, 其中基因多态性约占 70% 致病的可能性, 而环境暴露占 30% 致病的可能性^[10]。

研究认为 miRNA-499 rs3746444 多态性通过作用于 IL-17 β 受体、IL-2 β 受体、IL-18 受体、IL-23 α 、IL-6、IL-2、IL-21 等炎症信号分子参与影响类风湿性关节炎^[19]、溃疡性结肠炎^[14]等自身免疫性和慢性炎症性疾病的严重程度及活动度, 这些炎症分子同样在 HT 的发病中发挥重要影响^[20-21]。本研究中, 虽然不能认为江西汉族人群 miRNA-499(rs3746444) 的 SNPs 与 HT 的易感性明确相关, 但考虑到 $P=0.056$, 该结果可能与样本量不足有关。进一步研究发现, 突变基因型(T/C+C/C)患 HT 的风险较野生基因型(T/T)显著增加, 与 T/T 基因型相比, T/C 基因型患 HT 的风险明显升高, 而 C/C 基因型无明显差异, 可以认为突变杂合子基因型(T/C)可能是 HT 发病的危险因素。临床上 HT 的诊断主要依靠临床表现、甲状腺功能的实验室指标及抗甲状腺抗体 TGAb、TPOAb 等的升高进行综合判断。TPOAb 的滴度与甲状腺内浸润的淋巴细胞数量呈正相关^[22]。本研究中 TPOAb \geq 600 U/mL 组与 TPOAb $<$ 600 U/mL 组两组间 rs3746444 T/C 3 种基因型和等位基因的分布频率比较差异无统计学意义, 提示 rs3746444 T/C 多态性不影响 TPOAb 的水平。

综上所述, 本研究通过病例对照试验证明 miRNA-499(rs3746444) 突变杂合子基因型可能与江西汉族人群 HT 易感性相关。miRNA-499 的 SNPs 未发现与 TPOAb 水平相关, 可能需要增加样本量, 联合其他 miRNAs, 加入影响 HT 发病的其他指标进行大规模的研究, 进一步阐明 miRNAs 多态性对 HT 的发病、发展的影响。

参考文献

[1] AJJAN R A, WEETMAN A P. The pathogenesis of hashimoto's thyroiditis: further developments in our understanding[J]. Horm Metab Res, 2015, 47(10): 702-710.

[2] ZAMORE P D, HALEY B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309(5740): 1519-1524.

[3] KONFORTE D, DIAMANDIS E P, VAN VEN-

- ROOIJ W J, et al. Autoimmune diseases: early diagnosis and new treatment strategies[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(11): 1510-1514.
- [4] YANG Y, ZHANG K, ZHOU R. Meta-analysis of pre-miRNA polymorphisms association with susceptibility to autoimmune diseases[J]. *Immunol Invest*, 2014, 43(1): 13-27.
- [5] ZHU S, PAN W, QIAN Y. MicroRNA in immunity and autoimmunity[J]. *J Mol Med*, 2013, 91(9): 1039-1050.
- [6] LATINI A, CICCACCI C, NOVELLI G, et al. Polymorphisms in miRNA genes and their involvement in autoimmune diseases susceptibility[J]. *Immunol Res*, 2017, 65(4): 811-827.
- [7] DUAN R H, PAK C H, JIN P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(9): 1124-1131.
- [8] 刘利英, 徐纪茹, 宋土生, 等. miRNA 及其靶位点多态性的研究进展[J]. *遗传*, 2010, 32(11): 1091-1096.
- [9] EL-SHAL A S, ALY N M, GALIL S M, et al. Association of microRNAs genes polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients[J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(6): 626-631.
- [10] YANG B, CHEN J, LI Y, et al. Association of polymorphisms in pre-miRNA with inflammatory biomarkers in rheumatoid arthritis in the Chinese Han population[J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(1): 101-106.
- [11] SONG G G, BAE S C, SEO Y H, et al. The association between susceptibility to inflammatory arthritis and miR-146a, miR-499 and IRAK1 polymorphisms[J]. *Z Rheumatol*, 2015, 74(7): 637-645.
- [12] KADKHODAZADEH M, JAFARI A R, AMID R, et al. MiR146a and MiR499 gene polymorphisms in iranian periodontitis and peri-implantitis patients[J]. *J Long Term Eff Med Implants*, 2013, 23(1): 9-16.
- [13] 朱州, 倪秉强, 陈日新, 等. miR-499A>G 基因多态性与汉族人群大肠癌发病及预后关联分析[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(13): 2151-2154.
- [14] OKUBO M, TAHARA T, SHIBATA T, et al. Association study of common genetic variants in pre-microRNAs in patients with ulcerative colitis[J]. *J Clin Immunol*, 2011, 31(1): 69-73.
- [15] SMITH A, ECCLES-SMITH J, D'EMDEN M, et al. Thyroid disorders in pregnancy and postpartum[J]. *Aust Prescr*, 2017, 40(6): 214-219.
- [16] MCLEOD D S, COOPER D S. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity[J]. *Endocrine*, 2012, 42(2): 252-265.
- [17] STAGNARO-GREEN A. Approach to the patient with postpartum thyroiditis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(2): 334-342.
- [18] WIERSINGA W M. Thyroid autoimmunity[J]. *Endocr Dev*, 2014, 26: 139-157.
- [19] FATTAH S A, GHATTAS M H, SALEH S M, et al. Pre-micro RNA-499 gene polymorphism rs3746444 T/C is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in Egyptian population[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2018, 33(1): 96-101.
- [20] ZAKE T, SKUJA S, KALERE I, et al. Upregulated tissue expression of T helper (Th) 17 pathogenic interleukin (IL)-23 and IL-1 β in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease[J]. *Endocr J*, 2019, 66(5): 423-430.
- [21] RUGGERI R M, SAITTA S, CRISTANI M, et al. Serum interleukin-23 (IL-23) is increased in Hashimoto's thyroiditis[J]. *Endocr J*, 2014, 61(4): 359-363.
- [22] PANDIT A A, VIJAY WARDE M, MENON P S. Correlation of number of intrathyroid lymphocytes with antimicrobial antibody titer in Hashimoto's thyroiditis[J]. *Diagn Cytopathol*, 2003, 28(2): 63-65.

(收稿日期: 2019-10-08 修回日期: 2020-01-16)