

· 数据挖掘 ·

基于miRNA测序技术探讨补中益气汤治疗自身免疫性 甲状腺炎的潜在机制

刘子玉¹, 王智民², 宋因³, 曹慧敏³, 陈丝³, 尹远平⁴, 高天舒^{2*}, 杨潇^{4*}

(1. 辽宁中医药大学 研究生学院, 沈阳 110847;

2. 辽宁中医药大学 附属医院, 沈阳 110032;

3. 辽宁中医药大学 中医药创新工程技术中心, 沈阳 110847;

4. 辽宁中医药大学 附属第二医院, 沈阳 110034)

[摘要] 目的:探讨补中益气汤对自身免疫性甲状腺炎(AIT)小鼠甲状腺组织miRNA表达的影响。方法:选择NOD.H-2^{h4}小鼠共30只,随机分为正常组、模型组、补中益气汤组(BG组),每组各10只。根据分组给予小鼠含0.05%碘化钠水8周构建小鼠AIT模型后,灌胃给药8周取材。观察每组小鼠甲状腺组织病理改变情况,并对每组小鼠甲状腺组织差异miRNA进行实验验证及生物信息学分析。结果:与正常组比较,模型组甲状腺组织炎性细胞浸润明显,血清甲状腺球蛋白抗体(TgAb)水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,BG组甲状腺组织炎症程度减轻,血清TgAb水平显著降低($P<0.01$)。与正常组比较,模型组小鼠白细胞介素(IL)-6、IL-17表达显著增高($P<0.01$),IL-1 β 表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,BG组IL-1 β 、IL-6、IL-17表达明显降低($P<0.05$)。与正常组比较,模型组得到154个差异表达miRNA;与模型组比较,BG组得到112个差异表达miRNA。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)结果表明miR-326-3p、miR-128-3p、miR-223-5p、miR-141-3p、miR-871-3p、miR-204-3p表达与测序结果趋势一致。基因本体(GO)功能富集于T细胞活化调节、氧化应激、miRNA结合等方面;京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集于磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路等途径。差异miRNA预测得到3个关键基因,果蝇母源抗皮肤生长因子蛋白(Smad3)、Janus相关激酶2(JAK2)、信号转导和转录激活因子3(STAT3)。结论:补中益气汤可能通过调节6种miRNA干预自身免疫性甲状腺炎。

[关键词] 补中益气汤; 自身免疫性甲状腺炎; miRNA测序; 生物信息学分析; 炎症

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0192-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221415

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220831.1125.002.html>

[网络出版日期] 2022-08-31 15:08

Potential Mechanism of Buzhong Yiqitang for Autoimmune Thyroiditis Based on miRNA Sequencing

LIU Ziyu¹, WANG Zhimin², SONG Nan³, CAO Huimin³, CHEN Si³, YIN Yuanping⁴,
GAO Tianshu^{2*}, YANG Xiao^{4*}

(1. Graduate School of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM),
Shenyang 110847, China;

[收稿日期] 2022-04-29

[基金项目] 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用国家重点实验室开放基金项目(zyzx1804);辽宁省科技厅自然科学基金项目(2019-MS-207);国家自然科学基金青年基金项目(81503474,82104805);辽宁省教育厅科学技术研究项目(L201923);沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(RC200370);国家自然科学基金面上项目(81874441);尹远平全国名老中医药专家传承工作室

[第一作者] 刘子玉,在读硕士,从事中医药防治自身免疫性甲状腺炎研究,E-mail:894458722@qq.com

[通信作者] *高天舒,博士,主任医师,从事中医药防治内分泌代谢病,E-mail:gaotianshu67@163.com;

*杨潇,博士,主任医师,从事中医药防治自身免疫性甲状腺炎研究,E-mail:17924948@qq.com

2. *Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China;*
3. *Innovative Engineering Technology Center of TCM, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China;*
4. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110034, China)*

[Abstract] **Objective:** To determine the influence of Buzhong Yiqitang on miRNA expression in thyroid tissues of mice with autoimmune thyroiditis (AIT). **Method:** Thirty female 8-week-old NOD.H-2^{h4} mice were randomly assigned into normal control group, model group, and Buzhong Yiqitang group (BG), 10 in each group. Mice were subjected to a diet containing 0.05% sodium iodide for 8 weeks to build the AIT mouse model. After 8 weeks of administration (*ig*), samples were collected. A thyroid biopsy was performed on each group of mice, and differential miRNAs in thyroid tissues from each group of mice were analyzed based on experimental validation and bioinformatics. **Result:** Compared with the conditions of normal control group, thyroid lymphocytes had significant inflammatory infiltration, and there was an increase in serum TgAb level and interleukin (IL)-6 and IL-17 expression and a decrease in IL-1 β expression in mice of the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In addition, 154 differentially expressed miRNAs were found. Compared with the conditions of model group, the degree of thyroid tissue inflammation was alleviated, and serum TgAb level, and IL-1 β , IL-6 and IL-17 expression of mice treated with the Buzhong Yiqitang were reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Additionally, 112 differentially expressed miRNAs were identified in the BG group. Validation using real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) showed the same trend for miR-326-3p, miR-128-3p, miR-223-5p, miR-141-3p, miR-871-3p, and miR-204-3p as that obtained from miRNA sequencing. In particular, gene ontology (GO) functions were enriched for regulation of T cell activation, oxidative stress, and miRNA binding. Pathways identified by Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) database tended to be enriched in phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/protein kinase B (Akt), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathways. Based on miRNA prediction differences, three key genes were identified: SMAD3, JAK2, and STAT3. **Conclusion:** Bushong Yiqitang might treat autoimmune thyroiditis by regulating 6 miRNAs.

[Keywords] Buzhong Yiqitang; autoimmune thyroiditis; miRNA sequencing; bioinformatics; inflammation

自身免疫性甲状腺炎(AIT)又被称为桥本甲状腺炎(HT),是一种常见的器官特异性自身免疫疾病。AIT发病率约为0.03%~0.05%,多为中青年女性^[1]。AIT是导致甲状腺功能减退的主要原因,随着病情的发展,20%~30%的患者出现甲状腺功能减退,患者出现心律失常、便秘、黏液性水肿等症状,甚至导致女性月经紊乱、男性不育等严重影响患者生存质量^[2]。目前有关AIT发病机制尚不明确,而miRNA在AIT发生发展、免疫调节等方面的作用受到广泛关注。miRNAs是一类高度保守的单链非编码内源RNA,由20~24个核苷酸组成,通过参与调节其下游基因翻译过程,发挥调节炎症、免疫等生物学功能^[3]。研究发现,AIT患者甲状腺组织中存在多种miRNAs的表达异常,miRNA有望作为AIT诊疗标志分子^[4]。中医药在缓解AIT患者临床症

状、降低甲状腺球蛋白抗体(TgAb)滴度水平,调节自身免疫状态等方面疗效显著^[5]。补中益气汤出自《脾胃论》,具有补气健脾、调节免疫之功效,其处方组成为黄芪、白术、甘草、人参、橘皮、升麻、柴胡和当归。多项研究均表明采用以补中益气汤为主方治疗桥本甲状腺炎效果较好。有研究提出补中益气汤加减治疗早、中期桥本甲状腺炎效果最佳,并且可有效降低血清TgAb水平^[6-7]。前期本团队王英娜等^[8]发现加味补中益气汤联合优甲乐可有效减轻桥本甲状腺炎患者症状。药理研究证实补中益气汤能够改善脾虚型大鼠血清代谢物轮廓^[9]。本方中“要药”升麻、柴胡能够改善脾虚小鼠的疲劳状态,在调节小鼠免疫功能方面发挥关键增效作用^[10]。叶涵婷等^[11]发现白术水煎液能够下调溃疡性结肠炎大鼠白细胞介素(IL)-6、IL-17水平表达,抑制

炎症因子的释放及炎性细胞分化。实验研究发现本方可调控AIT大鼠血清甲状腺功能,下调血清TgAb等自身免疫抗体水平,有效缓解甲状腺组织炎性细胞浸润程度^[12-13]。前期团队研究亦证实本方通过抑制AIT小鼠甲状腺miR-155/细胞因子信号抑制物1(Socs1)/转录激活蛋白3(STAT3)和miR-125a-3p/白细胞介素-23受体(IL-23R)/IL-17信号通路,干预IL-6、IL-17等炎症因子的释放,减轻甲状腺组织免疫浸润^[14-16]。因此,本研究旨在探索AIT小鼠甲状腺组织miRNA表达谱变化情况,为补中益气汤治疗AIT提供更多的实验依据,为筛选治疗AIT新靶点及寻找中药新适应症提供新思路。

1 材料

1.1 动物 美国Jackson实验室引进NOD.H-2^{h4}小鼠(品系号No.004447,动物合格证编号2211A01937),于辽宁中医药大学实验动物中心SPF级实验室内繁殖饲养,许可证号SYXK(辽)2013-0009。本实验经辽宁中医药大学伦理委员会批准,批件号2018YS(DW)-026-01。

1.2 药物 补中益气汤组成,黄芪18g(根部,货号21050101,产地甘肃),白术9g(根茎,货号211202,产地安徽),甘草9g(根茎,货号21060102,产地内蒙古),人参6g(根部,货号201101,产地江苏),橘皮6g(干燥成熟果皮,货号21100133,产地湖南),升麻6g(根茎,货号210401,产地辽宁),柴胡6g(根部,货号201101,产地山西),当归3g(根部,货号220301,产地甘肃),均购自辽宁中医药大学附属第二医院,生药质量浓度为1.0g·mL⁻¹。本研究所采用的中药饮片由辽宁中医药大学附属第二医院杨潇教授完成鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》要求。

1.3 试剂与仪器 TRIzol Reagent(美国Invitrogen公司),碘化钠(上海国药集团化学试剂有限公司),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号C0105),抗甲状腺球蛋白抗体(Anti-TG)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号AEA355Mu),IL-1 β 、IL-6、IL-17酶联免疫吸附测定试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为JL202254、JL202268、JL202535),2xEs Taq MasterMix、miRNA cDNA Synthesis Kit、miRNA实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Assay Kit(康为世纪生物科技股份有限公司,批号分别为19321、CW2141S、CW2142S)。

Eclipse E100型正置光学显微镜(日本Nikon公

司),TriStar.2LB942型多功能酶标仪(德国Berthold公司),NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina(美国New England Biolabs公司),Qubit Fluorometers(美国Thermo Fisher Scientific公司),Qseq100 DNA Analyzer(中国台湾Bioptic公司),LightCycler型Rea-time PCR仪(德国Roche公司),Hiseq Xten型测序仪(美国Illumina公司)。

2 方法

2.1 造模方法 选用AIT易感NOD.H-2^{h4}小鼠,自由饮用0.05%碘化钠水8周,建立AIT小鼠模型^[17]。

2.2 分组及给药 选用8周龄NOD.H-2^{h4}小鼠30只,随机分组分为正常组、模型组、补中益气汤组(BG组),每组10只。正常组饲以蒸馏水,其余各组饲以含0.05%碘化钠水,8周造模成功。BG组按小鼠的给药量为人的9.1倍计算(人的标准体质量60kg换算为小鼠平均体质量为25g),根据本课题组前期研究^[15-16],补中益气汤最佳质量分数为9.56g·kg⁻¹。正常组、模型组灌服等量蒸馏水,1次/d,灌胃8周后取材。

2.3 小鼠甲状腺组织病理学改变 处死前12h小鼠禁食不禁水,采用1%戊巴比妥钠(50mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉后处死各组动物,迅速钝性解剖甲状腺组织,在4%多聚甲醛中固定36h,切片石蜡包埋进行HE染色,然后中性胶封块,观察各组小鼠甲状腺组织炎性细胞浸润程度。

2.4 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清TgAb、IL-1 β 、IL-6及IL-17水平 麻醉后,摘除小鼠眼球取血约1.5mL,室温静置8h,以3500r·min⁻¹离心15min(离心半径8cm),分离上清液。根据ELISA试剂盒的具体操作说明检测血清TgAb和IL-1 β 、IL-6和IL-17水平。

2.5 各组小鼠甲状腺组织差异表达miRNA分析

2.5.1 甲状腺组织RNA的抽提与纯化 随机选取各组小鼠各3只,按照试剂盒说明书提取甲状腺组织RNA,采用Qubit Fluorometer进行定量分析。

2.5.2 文库构建与高通量测序 使用小RNA文库试剂盒构建双端测序文库。将纯化产物合成cDNA文库并进行定量检测以确定片段大小。集群由cBot生成,使用Illumina Hiseq X平台进行测序。

2.5.3 miRNA表达谱分析及靶标预测 将每个miRNA序列读长与miRNA参考数据库结果比对,计算miRNA表达水平。参考文献以 $|\log_2(FC)|>1$, $P<0.05$ 标准^[18-19]筛选差异表达miRNA。

2.5.4 Real-time PCR验证差异表达miRNA 选择差异表达miRNA(miR-326-3p、miR-128-3p、miR-223-5p、miR-141-3p、miR-871-3p、miR-204-3p)进行Real-time PCR验证。提取并纯化各组小鼠甲状腺组织miRNA进行Real-time PCR分析。应用TRIzol法提取RNA,微量分光光度计检测RNA的浓度和纯度。将RNA反转录形成cDNA。Real-time PCR总体积20 μL:cDNA模板2 μL,上下游引物各1 μL、SYBR Green 10 μL及双蒸水6 μL。Real-time PCR条件为92 °C预变性2 min,94 °C变性15 s,65 °C退火25 s,67 °C延伸15 s,共35个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法表示miRNA的相对表达量。以U6为内参,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

miRNAs	引物(5'-3')	扩增长度/bp
miR-326-3p	ACACTCCACCTGGGCTCCT	67
miR-128-3p	ACACAGGTTGGGATCGGTTG	53
miR-223-5p	GCCGAAACAUUCAACGCUGUC	75
miR-141-3p	CTCAAGGCAACCTACCGAAAG	64
miR-871-3p	TGACTGGCAACATACTG	78
miR-204-3p	GTTTGCTGGGAAGGCAAAAG	63
U6	GGAACGATACAGAGAAGATTAG	94

2.5.5 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 分别采用TargetScan、miRDB、miRWalk数据库预测与上述差异miRNA互作的靶基因,为提高预测的可靠性,本次研究仅保留同时出现在3个数据库中的靶基因。将上述获得的核心靶点信息导入生物学信息注释数据库(DAVID, <https://david.ncicrf.gov/>)中,对其进行GO富集分析和KEGG通路注释分析,运用微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/login/>)制作GO富集分析结果的柱状图和KEGG通路注释分析结

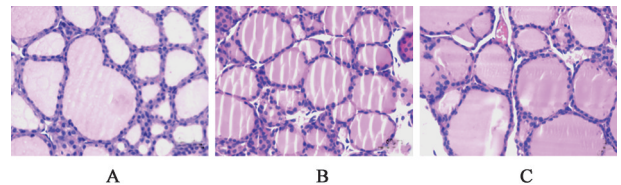
果的气泡图。采用Benjamini-Hochberg法进行多重假设检验校正,将假阳性和假阴性结果的比例尽可能控制在可接受范围,校正 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义,检验水准(α)为0.05。

2.6 差异表达miRNA与靶基因网络的构建 运用Cytoscape 3.9.1软件构建差异表达miRNA与其靶基因的网络,对差异表达miRNA与靶基因的网络进行分析筛选关键基因。

2.7 统计学方法 采用SPSS 22.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用方差齐性检验和正态性检验,本研究数据均符合正态分布且方差齐,采用方差分析,多组间比较采用最小显著性差异法(LSD)- t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠甲状腺组织病理学改变 正常组可见甲状腺滤泡上皮呈立方,滤泡丰富,排列紧密。模型组甲状腺滤泡上皮细胞呈扁平形,滤泡腔内胶质不均匀,间质可见淋巴细胞浸润。BG组甲状腺滤泡上皮细胞较为完整,胶质含量略减少,淋巴细胞浸润程度减轻,见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.BG组

图1 补中益气汤对AIT小鼠甲状腺组织病理学影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Buzhong Yiqitang on thyroid histopathology in AIT mice (HE, ×400)

3.2 对小鼠血清TgAb、IL-1β、IL-6及IL-17水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠TgAb、IL-6、IL-17表达显著增高($P < 0.01$),IL-1β表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,BG组TgAb、IL-17表达显著降低($P < 0.01$),IL-1β、IL-6表达明显降低($P < 0.05$),见表2。

表2 补中益气汤对AIT小鼠血清TgAb、IL-1β、IL-6、IL-17水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Buzhong Yiqitang on serum TgAb, IL-1β, IL-6 and IL-17 level in AIT mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	TgAb/μg·L ⁻¹	IL-1β/ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	IL-17/ng·L ⁻¹
正常组		28.95±1.86	125.40±41.59	78.73±15.56	62.04±9.89
模型组		59.14±8.08 ²⁾	260.98±57.20 ¹⁾	147.65±17.97 ²⁾	254.65±32.10 ²⁾
BG组	9.56	35.86±5.38 ⁴⁾	136.81±38.82 ³⁾	103.84±18.36 ³⁾	134.15±29.97 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表4同)

3.3 小鼠甲状腺组织差异表达miRNA分析 与正常组比较,模型组筛选出154个差异miRNA,其中

28个上调,102个下调;与模型组比较,BG组筛选到112个差异性miRNA,其中21个上调,97个下调,见

图2。测序结果显示 miR-326-3p、miR-128-3p、miR-223-5p、miR-141-3p、miR-871-3p、miR-204-3p 在造

模后出现表达差异,而在补中益气汤干预后向反方向表达,见表3。

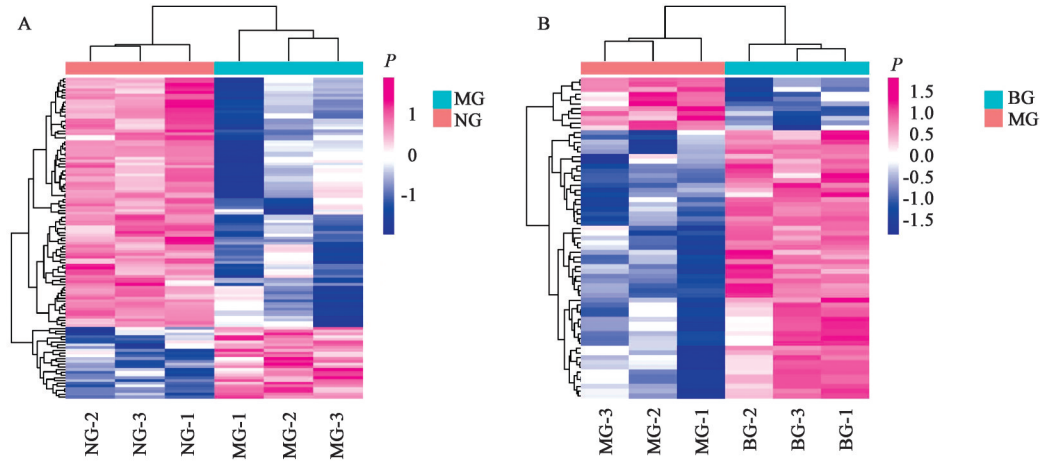


图2 模型组与正常组比较(A)、BG组与模型组比较(B)差异表达 miRNAs 的热图

Fig. 2 Heatmap of differential expression of miRNAs between MG and NG (A), BG and MG (B)

表3 前20个差异表达的 miRNAs

Table 3 Top 20 miRNAs with significant differential expression

ID	模型组与正常组比较		ID	BG组与模型组比较	
	log ₂ FC	P		log ₂ FC	P
miR-326-3p	1.89	1.68×10 ⁻²	miR-123-3p	1.27	4.78×10 ⁻²
miR-128-3p	1.55	1.32×10 ⁻²	miR-871-3p	1.25	9.05×10 ⁻³
miR-223-5p	1.53	1.46×10 ⁻²	miR-141-3p	1.10	4.60×10 ⁻²
miR-8120	1.50	1.46×10 ⁻²	miR-204-3p	1.06	1.24×10 ⁻³
miR-96-5p	1.32	2.31×10 ⁻³	miR-374c-3p	1.03	1.25×10 ⁻²
miR-141-3p	-2.18	2.79×10 ⁻²	miR-128-3p	-3.31	8.34×10 ⁻⁵
miR-871-3p	-2.16	1.15×10 ⁻²	miR-690	-3.14	1.29×10 ⁻²
miR-204-3p	-2.16	4.72×10 ⁻²	miR-326-3p	-2.89	6.80×10 ⁻⁵
miR-679-5p	-1.97	9.29×10 ⁻⁴	miR-6715-5p	-2.78	4.88×10 ⁻³
miR-541-3p	-1.95	2.32×10 ⁻²	miR-223-5p	-2.77	1.04×10 ⁻²

3.4 差异表达 miRNA 的 Real-time PCR 验证 各组小鼠甲状腺组织 miR-326-3p、miR-128-3p、miR-223-5p、miR-141-3p、miR-871-3p、miR-204-3p 相对表达量与 miRNA 测序结果趋势一致,提示 miRNA 测序结果可靠,可用于后续生物信息学分析。

见表4。

3.5 差异表达 miRNA 的功能分析 本研究使用 TargetScan、miRDB 和 miRWalk 数据库预测 6 个 miRNAs 的靶基因并进行生物信息学分析。GO 分析发现,靶点基因参与 T 细胞共刺激(GO:0031295)、ERBB 信号通路调节(GO:1901184)、T 细胞活化调节(GO:0050863)等过程;一些基因与细胞成分的结构有关,如细胞核(GO:0005635)、细胞连接(GO:0005911)、PRC1 蛋白质复合物(GO:0035102)等部分;涉及的分子功能有组蛋白乙酰转移酶结合(GO:0035035)、受体激活剂催化活性(GO:0030546)、miRNA 结合(GO:0035198)等进程。KEGG 分析结果显示,差异表达 miRNA 靶基因主要富集在的研究磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路(hsa04151)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路(hsa04010)、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路(hsa04024)、甲状腺激素信号通路(hsa04919)等途径。这些途径可能与补中益气汤改善 AIT 作用机制相关,见增强出版附加材料。

3.6 差异表达 miRNA 与靶基因网络的构建 使用

表4 补中益气汤对 AIT 小鼠甲状腺组织 miR-326-3p、miR-128-3p、miR-223-5p、miR-141-3p、miR-871-3p、miR-204-3p 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Buzhong Yiqitang on miR-326-3p, miR-128-3p, miR-223-5p, miR-141-3p, miR-871-3p and miR-204-3p in thyroid tissue ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	miR-326-3p	miR-128-3p	miR-223-5p	miR-141-3p	miR-871-3p	miR-204-3p
模型组		3.11±0.69 ²⁾	2.72±1.04 ¹⁾	3.75±0.43 ²⁾	0.57±0.05 ¹⁾	0.26±0.07 ²⁾	0.65±0.08 ²⁾
BG组	9.56	1.54±0.55 ³⁾	1.17±0.15 ³⁾	1.22±0.04 ⁴⁾	0.96±0.24 ³⁾	0.72±0.17 ⁴⁾	0.78±0.03 ³⁾

注:设正常组 mRNA 的相对表达为 1

Cytoscape 3.9.1 软件构建上述差异表达 miRNA 及靶基因的作用网络对差异表达 miRNA 与靶基因的网络进行拓扑分析,得到 3 个关键基因:果蝇母源抗皮肤生长因子蛋白(Smad3)、Janus 相关激酶 2(JAK2)、信号转导和 STAT3,见增强出版附加材料。

4 讨论

现代医学研究表明 AIT 的发生与遗传和环境等因素密切相关。临床 HT 分为甲亢、甲功正常、甲减期,目前现代医学在 HT 的甲减期多采用补充左旋甲状腺素替代治疗方案,而初期患者多处于被动随访状态,针对免疫异常目前多无特效药,而中医则发挥特色优势作用。古代医学中对于 AIT 无明确疾病命名,现代中医根据本病的临床表现,认为 AIT 可归属“瘰疬”范畴。AIT 发病与情志、饮食及地域水土等诸多因素有关。多种因素均可导致脾之健运功能失常,气血津液运行不畅,痰瘀搏结于颈而成瘰。课题组前期证实脾气亏虚与 AIT 密切相关,为 AIT 发病之基础^[20]。课题组前期临床研究证实补气健脾法可减轻 AIT 患者症状,缓解患者焦虑情绪^[21]。补中益气汤以黄芪补中益气为君;参、术、甘草补益脾胃为臣药;陈皮调理气机,当归补血和营为佐;升麻、柴胡协同参、芪升举清阳为使。

NOD.H-2^{h4} 小鼠具有 AIT 疾病遗传易感背景,甲状腺球蛋白(Tg)是易患 AIT 的 NOD.H-2^{h4} 小鼠品系主要自身抗原。过量碘诱导 NOD.H-2^{h4} 小鼠 AIT 发生,出现甲状腺组织破坏、血清 TgAb 水平升高等特征。AIT 小鼠甲状腺组织病理与 AIT 临床患者甲状腺组织类型相似,因此动物模型作为 AIT 理想的实验动物模型之一,能够较好的模拟 AIT 的病理生理过程^[17]。目前 AIT 小鼠动物模型评估分为 2 个方面^[22],①形态学改变,甲状腺组织损伤,淋巴细胞浸润;②血清学改变,TgAb 抗体水平显著升高。本研究 NOD.H-2^{h4} 小鼠自由饮用 0.05% 碘化钠饮用水 8 周后构建 AIT 小鼠模型,动物模型成功率达到 90% 以上,与其他研究结果相类似^[23-24]。炎症因子在 AIT 免疫调节中扮演重要角色。IL-1 β 、IL-6 和 IL-17 是细胞免疫应答过程中释放的关键炎症细胞因子,广泛存在于 AIT 等自身免疫性疾病患者血清中,这些炎症因子持续存在加重 AIT 的炎症反应过程,同时阻断上述炎症因子表达也被证明可以降低自身抗体反应,改善免疫状态^[25]。AIT 小鼠血清包括 IL-1 β 、IL-6 和 IL-17 在内的多种炎症因子水平升高,补中益气汤干预后,相关炎症因子水平降低,AIT 小鼠甲状腺炎症浸润情况得到缓解,这与其他相关研

究实验结果相似^[26]。

miRNA 是一类具有高度保守性的调控分子,根据调控靶基因的作用模式可分为两种类型,miRNA 作用时与靶基因不完全互补结合,阻止翻译进程而不影响其靶基因转录本稳定性,常见于动物体内;另外 miRNA 可与靶基因序列完全互补结合,形成 RNA 诱导沉默复合体(RISC),最终切割 mRNA,破坏 mRNA 稳定性^[27]。同时 miRNA 对靶基因的调控作用也受 Dicer 酶剪切位点、靶基因结合位点等多种因素影响。有研究发现 miRNA 调控多种机体生物学功能,如细胞分化、细胞凋亡、炎症及免疫反应等^[28-30]。miRNA 作为关键上游调控分子,在 AIT 疾病进展中发挥重要作用。研究表明 HT 患者血清 miR-326 可能通过调控辅助性 T 细胞(Th)17/调节性 T 细胞(Treg)平衡参与疾病进程,miR-206、miR-142-3p、miR-150 表达情况与 HT 进展有关,提示以上 miRNAs 可能对评估本病早期危险性有重要意义^[31-33]。本研究筛选得到多个差异表达分子 miR-326-3p、miR-128-3p、miR-223-5p、miR-141-3p、miR-871-3p、miR-204-3p。研究发现 HT 患者外周血单个核细胞(PBMC)和甲状腺组织中 miR-326 抑制 AMAM17 表达,增强 IL-23 表达参与 HT 的发生发展^[34]。在本研究中亦证实补中益气汤能够调节 miR-326 表达,这可能是该方干预 AIT 的靶点之一。黄钟等^[35]发现 miR-128-3p 上调加重脓毒症大鼠体内炎症反应。miR-141-3p 参与调控心肌细胞损伤过程中炎症反应的发生^[36]。miR-204-3p 过表达可抑制脂多糖诱导的肾小管上皮细胞炎症反应及细胞凋亡^[37]。可见 miR-326-3p、miR-128-3p、miR-141-3p、miR-204-3p 均与免疫及炎症反应相关。前期研究发现补中益气汤能够上调 miR-125-3p 水平,抑制 IL-23R 蛋白表达进而改善 AIT 疾病免疫失常状态^[14]。socs1 是 miR-155 的靶基因,补中益气汤可通过调控该通路影响 Th17 细胞分化,改善 AIT 小鼠免疫失常状态^[15]。在本研究中虽然检测到既往文献中提及的 miR-155 和 miR-125a-3p 表达,但在本次实验中其本底表达量较低、总体表达水平未达到本研究采用的筛选标准,同时考虑到实验样本批次不同,测序文库信号干扰等因素导致实验差异。后续实验将关注丰度较低的 miRNA 表达情况及其分子生物学功能,尽可能避免实验误差。目前尚缺乏关于 miR-223-5p、miR-871-3p 在免疫炎症方面的详尽报道。本研究提示上述 miRNA 可能是补中益气汤干预 AIT 的直接靶点。研究发现与 AIT 疾病相关

的GO功能富集分析条目主要集中在T细胞活化调节、氧化应激、miRNA结合等方面。有证据表明抗程序性死亡抗体(PD-1-Ab)激活细胞增殖抑制记忆CD4⁺T细胞,从而在甲状腺炎症进程中发挥关键作用^[38]。碘诱导NOD.H2^{b4}小鼠甲状腺组织中活性氧的大量累积引起氧化应激反应,这可能是AIT发生发展的重要环节^[39]。KEGG通路分析显示miRNA的靶基因主要富集于PI3K/Akt信号通路、MAPK信号通路等。PI3K/Akt信号通路通过激活细胞氧化应激反应,释放TNF- α 、IL-6、IL-8等多种炎症蛋白,调控免疫反应。汉防己甲素可通过干预PI3K/Akt信号通路,下调IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平,发挥对自身免疫性肾病的保护作用^[40]。MAPK信号通路在炎症反应中发挥重要作用,MAPK通路由ERK通路、JNK通路、p38通路等多个亚家族组成。MAPK通路传导多种外部信号,包括生长、分化、炎症和凋亡等多种细胞反应。差异miRNA预测得到3个关键基因Smad3、JAK2、STAT3。Smad3作为促进转化生长因子(TGF)- β 家族蛋白进入细胞核发挥作用的重要调节分子,能够与酪氨酸激酶磷酸化的TGF- β 受体结合形成多聚体复合物,从而调节下游靶基因转录进程。Smad3对免疫炎症反应具有双向调控作用,在炎症初始阶段,Smad3加重炎症反应,而当炎症反应爆发,Smad3转而负向抑制炎症^[41]。谭燕等^[42]发现Graves病作为一种常见的自身免疫性甲状腺疾病,其患者外周血单个核细胞Smad3蛋白上调促进IL-2表达,可能与机体免疫功能紊乱状态密切相关。孙庆凯等^[43]发现HT患者血浆Smad3表达显著下调,Th17/Treg比例升高,提示Smad3可能在自身免疫性甲状腺疾病中发挥重要作用。JAK2广泛存在于哺乳动物体内,在细胞因子及炎症反应激活调控关系中发挥关键作用。胞浆内活化的JAK2激酶执行胞内相应的信号转导,使STAT3磷酸化形成同源二聚体,结合下游目的基因发挥生物学效应^[44]。JAK2、STAT3是参与调控炎症与氧化应激信号的重要靶点,在Th17分化及IL-6信号转导通路等发挥着重要作用。JAK2、STAT3可激活IL-17、TNF- α 等下游炎症因子,诱导免疫炎症反应,与自身免疫疾病发展相关^[45]。HT患者甲状腺组织内STAT3、p-STAT3表达上调,并且蛋白定位于甲状腺滤泡结构损伤区域,提示STAT3与甲状腺组织损伤有关^[46]。综合以上结果,推测补中益气汤可能通过调控相关信号通路及关键基因发挥药理作用,改善AIT疾病免疫状态。

越来越多的实验和证据表明,miRNA与人类疾病的产生和发展密切相关,miRNA领域的技术不断发展有助于指导基于miRNA治疗方法的未来方向。本研究采用miRNA测序技术揭示补中益气汤干预AIT小鼠甲状腺组织差异microRNA表达谱。生物信息学分析发现补中益气汤可通过改变miRNA表达相关的PI3K/Akt信号通路、MAPK信号通路、cAMP信号通路等途径,最终影响AIT发生发展。后续课题组将针对差异表达的miRNA进行双荧光素酶报告实验以验证其与靶基因的直接作用关系,通过干扰及过表达靶基因验证下游效应分子的功能,进一步阐明miRNA调控网络,理解补中益气汤的作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SHAN Z, CHEN L, LIAN X, et al. Iodine status and prevalence of thyroid disorders after introduction of mandatory universal salt iodization for 16 years in China: A cross-sectional study in 10 cities [J]. *Thyroid*, 2016, 26(8): 1125-1130.
- [2] RALLI M, ANGELETTI D, FIORE M, et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation [J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19(10): 102649.
- [3] CABEJ N R. Epigenetics in health and disease [J]. *Epigenetic Principles of Evolution (Second Edition)*, 2019: 647-731.
- [4] TAHERI M, EGHTEADARIAN R, DINGER M E, et al. Dysregulation of non-coding RNAs in autoimmune thyroid disease [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 117: 104527.
- [5] 邹冉,冯圣钰,杨华,等. 桥本甲状腺炎中医辨证论治研究进展[J]. *世界临床药物*, 2021, 42(7): 590-594.
- [6] 武明东,都广礼. 补中益气汤加减治疗桥本甲状腺炎患者的临床研究[J]. *中成药*, 2020, 42(12): 3359-3361.
- [7] 刘昕怡,彭婧,夏仲元. 扶正消癭八法治疗桥本甲状腺炎[J]. *中国临床保健杂志*, 2020, 23(5): 717-720.
- [8] 王英娜,高天舒. 从脾虚痰瘀论治桥本甲状腺炎30例疗效观察[J]. *新中医*, 2008, 40(12): 52-53.
- [9] 琚婉君,郭蕾,陈少丽,等. 补中益气汤改善脾虚型胃肠动力障碍大鼠代谢组学研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(5): 69-73.
- [10] 郝莹莹,李强,陈少丽,等. 补中益气汤“要药”配伍的关键性增效作用对脾虚小鼠的影响[J]. *中国实验方*

- 剂学杂志, 2015, 21(6): 150-154.
- [11] 叶涵婷, 陈超, 朱曙东. 白术水煎液对溃疡性结肠炎大鼠模型及血清IL-6、IL-17的影响[J]. 陕西中医药大学学报, 2014, 37(1): 69-71.
- [12] 刘守尧, 关青青, 韩静, 等. 补中益气颗粒对EAT大鼠Treg/Th17细胞因子表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(5): 404-408, 415.
- [13] 韩静, 袁泉, 刘昕怡, 等. 补中益气颗粒对EAT大鼠甲状腺功能、甲状腺抗体的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(12): 1007-1011.
- [14] 杨潇, 宋囡, 曹慧敏, 等. 基于miR-125a-3p/IL-23R/Th17轴探讨补中益气汤含药血清对AIT小鼠作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(12): 2865-2868.
- [15] 杨潇, 宋囡, 王智民, 等. 补中益气汤通过干预miR-155调控Th17细胞改善自身免疫甲状腺炎小鼠免疫失常[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 36-40.
- [16] 杨潇, 宋囡, 陈宁, 等. 补中益气汤对AIT小鼠甲状腺组织miR-125a-3p、IL-23R表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(11): 2579-2582.
- [17] BRALEY-MULLEN H, SHARP G C, MEDLING B, et al. Spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD. H-2h4 mice[J]. J Autoimmun, 1999, 12(3): 157-165.
- [18] LIN X, LI H, YANG T, et al. Transcriptomics analysis of lens from patients with posterior subcapsular congenital cataract[J]. Genes (Basel), 2021, 12(12): 1904-1918.
- [19] ZHENG X, LIU G, HUANG R. Identification and verification of feature immune-related genes in patients with hypertrophic cardiomyopathy based on bioinformatics analysis [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 752559.
- [20] 王小龙. 甲功正常桥本甲状腺炎患者中医体质特征调查[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- [21] 杨潇, 宋囡, 周喜玉, 等. 补气健脾改善自身免疫甲状腺炎小鼠免疫失常机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(9): 2074-2077.
- [22] 叶登美, 王萍, 陈京, 等. 小鼠自身免疫性甲状腺炎模型构建[J]. 皖南医学院学报, 2015, 34(1): 10-12.
- [23] BRALEY-MULLEN H, YU S. NOD. H-2h4 mice: An important and underutilized animal model of autoimmune thyroiditis and Sjogren's syndrome [J]. Adv Immunol, 2015, 126: 1-43.
- [24] 杨潇. 益气化痰活血方对NOD. H-2~(h4)小鼠甲状腺Th17细胞分化调控的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2014.
- [25] 郭庆玲. 炎症小体在自身免疫甲状腺炎发病机制中的作用及机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [26] 李大鹏. 碘过量通过诱导Th17细胞分化促进桥本氏甲状腺炎发病机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [27] VALIHRACH L, ANDROVIC P, KUBISTA M. Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy[J]. Mol Aspects Med, 2020, 72: 100825.
- [28] KABEKKODU S P, SHUKLA V, VARGHESE V K, et al. Cluster miRNAs and cancer: Diagnostic, prognostic and therapeutic opportunities [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2020, 11(2): e1563.
- [29] 郭新华, 郑洋, 王佳慧, 等. 基于miRNA介导的NLRP3炎症小体活化探讨中医药在肝纤维化发生中作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2409-2418.
- [30] 涂玥, 万毅刚, 顾一煌, 等. 非编码RNA调控自噬的分子机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4545-4551.
- [31] LIU Y, CUI X, WANG S, et al. Elevated microRNA-326 levels regulate the IL-23/IL-23R/Th17 cell axis in Hashimoto's thyroiditis by targeting a disintegrin and metalloprotease 17 [J]. Thyroid, 2020, 30(9): 1327-1337.
- [32] MOU L, LIAO L, ZHANG Y, et al. Ursolic acid ameliorates Nthy-ori 3-1 cells injury induced by IL-1 β through limiting MALAT1/miR-206/PTGS1 ceRNA network and NF- κ B signaling pathway [J]. Psychopharmacology (Berl), 2021, 238(4): 1141-1156.
- [33] 王征, 张浩, 李伟汉, 等. 自身免疫性甲状腺炎甲状腺组织和外周血单个核细胞中微小RNA-142-3p、微小RNA-150表达及临床意义[J]. 安徽医药, 2021, 25(8): 1642-1646.
- [34] ZHAO N, WANG Z, CUI X, et al. *In vivo* inhibition of microRNA-326 in a NOD. H-2h4 mouse model of autoimmune thyroiditis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 620916.
- [35] 黄钟, 孙洁, 姚振滨, 等. 下调miR-128-3p缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 9-16.
- [36] 刘大朋, 李影, 宋涛, 等. 栀子多糖调控miR-141-3p对LPS诱导的心肌细胞炎症反应及凋亡的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, doi: 22.1126.R. 20211021. 1446. 002.
- [37] 郑培明, 王荣. miR-204-3p靶向CYP2E1介导脂多糖诱导的肾小管上皮细胞损伤[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(3): 5.
- [38] YASUDA Y, IWAMA S, SUGIYAMA D, et al. CD4⁺ T cells are essential for the development of destructive thyroiditis induced by anti-PD-1 antibody in

- thyroglobulin-immunized mice [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(593):b7495.
- [39] RUGGERI R M, CAMPENNI A, GIUFFRIDA G, et al. Oxidative stress as a key feature of autoimmune thyroiditis: An update [J]. *Minerva Endocrinol*, 2020, 45(4):326-344.
- [40] YIN J, LIN J, YU J, et al. Tetrandrine may treat membranous glomerulopathy via PI3K/Akt signaling pathway regulation: Therapeutic mechanism validation using Heymann nephritis rat model [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):6499-6515.
- [41] ZHANG H, YU Q L, MENG L, et al. TAZ-regulated expression of IL-8 is involved in chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 693:108571.
- [42] 谭燕, 郑晓雅, 李莎, 等. TRAF-6 调控 TGF- β_1 -Smad2/Smad3 信号通路在 Graves 病免疫发病机制中的作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(9):1105-1111.
- [43] 孙庆凯, 陈占玲, 李春华, 等. 白细胞介素 6/转化生长因子- β 信号异常在桥本甲状腺炎辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞失衡中的作用研究 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2015, 31(4):320-326.
- [44] ALUNNO A, PADJEN I, FANOURIAKIS A, et al. Pathogenic and therapeutic relevance of JAK/STAT signaling in systemic lupus erythematosus: Integration of distinct inflammatory pathways and the prospect of their inhibition with an oral agent [J]. *Cells*, 2019, 8(8):898-910.
- [45] WANG Z, WEI Y, LEI L, et al. RANKL expression of primary osteoblasts is enhanced by an IL-17-mediated JAK2/STAT3 pathway through autophagy suppression [J]. *Connect Tissue Res*, 2021, 62(4):411-426.
- [46] 张程斐. 基于转录组测序研究甲炎康泰对自身免疫性甲状腺炎大鼠的机制影响 [D]. 北京:北京中医药大学, 2021.

[责任编辑 顾雪竹]