

• 论 著 •

重症肌无力患者外周血单个核细胞中 KLF4、ROR γ t 与 miR-206 水平变化的临床意义

王加平, 朱继平, 孟晓波, 梅 燕, 秦文敬
(江苏省连云港市东海县人民医院检验科 222300)

摘 要:目的 检测重症肌无力患者外周血单个核细胞(PBMC)中锌指样转录因子 4(KLF4)、孤儿核受体 γ t(ROR γ t)、microRNA-206 的表达水平,探讨它们在重症肌无力患者发病中的作用。方法 采集重症肌无力患者及健康对照者清晨空腹外周血标本,梯度离心得到人 PBMC。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 PBMC 中 KLF4、ROR γ t mRNA、microRNA-206 的相对表达量。结果 重症肌无力患者 PBMC 中 KLF4 mRNA 为 0.594 ± 0.181 ,健康对照者为 0.089 ± 0.025 ;重症肌无力患者 PBMC 中 ROR γ t mRNA 表达水平为 0.570 ± 0.266 ,健康对照者为 0.067 ± 0.016 ,重症肌无力患者均显著高于健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。重症肌无力患者 PBMC 中 microRNA-206 表达水平为 0.053 ± 0.018 ,健康对照者为 0.134 ± 0.056 ,重症肌无力患者显著低于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。重症肌无力患者 PBMC 中 KLF4、ROR γ t 相对表达量与 microRNA-206 表达水平平均呈负相关($r = -0.675, P < 0.05, r = -0.806, P < 0.05$)。结论 重症肌无力患者 PBMC 中 KLF4 mRNA、ROR γ t mRNA 的表达水平增高及 microRNA-206 表达水平下降,和疾病的发生和发展有密切的关系。

关键词:重症肌无力; 单个核细胞; 锌指样转录因子 4; 孤儿核受体 γ t; microRNA-206

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)11-1500-03

The significance of the levels of KLF4, ROR γ t, microRNA-206 in peripheral blood mononuclear cells of patients with myasthenia gravis

WANG Jiaping, ZHU Jiping, MENG Xiaobo, MEI Yan, QIN Wenjing

(Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Donghai County, Lianyungang, Jiangsu 222300, China)

Abstract:Objective To detect the expression levels of Kruppel-like factor 4 (KLF4), orphan nuclear receptor gamma t (ROR γ t) and microRNA-206 (miR-206) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with myasthenia gravis(MG) and to explore the effects of these indicators on the pathogenesis of MG. **Methods** Fasting blood samples from patients with MG and healthy controls were collected in the morning. PBMCs were isolated by standard density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque solution in all the subjects. The expression levels of KLF4, ROR γ t mRNA and microRNA-206 were extracted from PBMCs which were stimulated by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and ionomycin, and then the mRNAs was transcribed reversely into cDNA. The expression levels of KLF4, ROR γ t mRNA and microRNA-206 were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** The level of KLF4 in the patients with MG 0.594 ± 0.181 was significantly higher than that of healthy controls 0.089 ± 0.025 ($P < 0.05$) and the level of ROR γ t in the patients with MG 0.570 ± 0.266 was also significantly higher than that of healthy controls 0.067 ± 0.016 ($P < 0.05$). The expression level of miR-206 in the patients of MG 0.053 ± 0.018 was significantly lower than that of the healthy controls 0.134 ± 0.056 ($P < 0.05$). In addition, the expression levels of KLF4 ($r = -0.675, P < 0.05$) and ROR γ t ($r = -0.806, P < 0.05$) were negatively correlated with the level of miR-206 in MG patients. **Conclusion** The increased expression levels of KLF4 and ROR γ t and decreased expression level of miR-206 may be closely correlated with the occurrence and development of MG.

Key words: myasthenia gravis; mononuclear cells; kruppel-like factor 4; ROR γ t; microRNA-206

重症肌无力(MG)是一种以胸腺为靶器官的自身免疫性疾病^[1]。有研究表明,辅助性 T 细胞 17(Th17)参与 MG 的发病, Th17 是近年来新命名的一类辅助性 CD4⁺ T 细胞亚群,其具有独特的分化途径和转录因子(ROR γ t),以能够诱导编码白细胞介素-17(IL-17)的下游基因表达为主要特征^[2-3]。锌指样转录因子 4(KLF4)是一种含锌指修饰结构的蛋白,是 Th17 分化的正调节因子^[4-5]。MicroRNA(miRNA)是一类短的非编码 RNA,大约 20~22 个核苷酸,介导 RNA 干扰并且在翻译水平抑制蛋白表达。已经证实人类 KLF4 是 miR-206 的靶分子

之一^[6]。本研究采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 MG 患者人外周血单个核细胞(PBMC)中 KLF4、ROR γ t mRNA 和 miR-206 的表达水平,并分析 KLF4、ROR γ t 与 miR-206 表达的相关性,探讨这几个因素在 MG 发病中的作用机制,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1 月至 2015 年 6 月在本院经临床确诊的 MG 患者 27 例,选择的 MG 病例根据典型的临床症状、新斯的明试验阳性或神经重复电刺激递减试验阳性确

诊^[7],其中男 16 例,女 11 例,平均年龄(49±14)岁;健康对照组选择本院体检中心健康体检者 20 例,其中男 13 例,女 7 例,平均年龄(51±9)岁,均无近期感染或自身免疫病史。两组研究对象之间性别、年龄差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 实时荧光 PCR 仪为美国伯乐 CFX 96 型, Ficoll-Hypaque 人淋巴细胞分离液从天津灏阳生物制品有限公司采购,淋巴细胞刺激剂佛波酯(PMA)、离子霉素(Ionomycin)从 Sigma 公司采购。上海生工合成 PCR 引物、TrizaoI 和 SYBR Green 购自 Invitrogen 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 清晨采取研究对象空腹静脉血 3~5 mL, 肝素钠抗凝,采用 Ficoll-Hypaque 人淋巴细胞分离液梯度离心获得人 PBMC,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,将细胞数调整为 1×10^6 /mL,加入 24 孔细胞培养板,放置在含有 PMA(50 ng/mL)和 Ionomycin (1.0 μg/mL) RPMI-1640 的培养基中, 37℃、5%CO₂ 饱和温度条件下温育 5 h 后,收集细胞。

1.3.2 样本中 KLF4、RORγt mRNA 及 miR-206 相对表达量检测 从将 PBMCs 刺激 5 h 后收集的细胞中提取总 mRNA。按照 TOYOBO 试剂盒说明书反转录成 cDNA。新合成的 cDNA 置于-20℃冰箱中备用。采用 CFX 96 实时荧光 PCR 仪按照 Bio-Rad SYBR Green Super Mix 说明书进行检测。所用引物序列:KLF4 上游引物为 5'-CAA GTC CCG CCGCTC CAT TAC CAA-3',下游引物为 5'-CCA CAG CCG TCC CAG TCA CAG TGG-3';RORγt 上游引物为 5'-CCT GGG CTC CTC GCC TGA CC-3',下游引物为 5'-TCT CTC TGC CCT CAG CC TTG CC-3';β-actin 上游引物为 5'-CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3',下游引物为 5'-CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3',以 β-actin 为参照进行校准;miR-206 上游引物为 5'-GAG TGC TGG AAT GTA AGG AAG-3',下游引物为 5'-GCA GGG TCC GAG GTA TTC-3',以 small nuclear-RNA 即 snRNA 为参照。每份标本同时采用相同反应体系和条件进行检测,PCR 扩增 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析。正态分布资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用非配对 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MG 患者与健康对照组 PBMC 中 KLF4、RORγt mRNA 及 miR-206 表达水平比较 见表 1。MG 患者 PBMC 中 KLF4 和 RORγt mRNA 相对表达量显著高于健康对照组,差异有统计学意义($t=6.563,7.552,P<0.05$),miR-206 相对表达量显著低于健康对照组,差异也有统计学意义($t=2.579,P<0.05$)。

表 1 两组 PBMC 中 KLF4 mRNA、RORγt mRNA 和 miR-206 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	KLF4	RORγt	miR-206
MG 患者	0.594±0.181*	0.570±0.266*	0.053±0.018*
健康对照组	0.089±0.025	0.067±0.016	0.134±0.056

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 MG 患者 PBMC 中 KLF4 和 RORγt 相关性分析 见图 1。对 MG 患者 PBMC 中 KLF4 和 RORγt mRNA 相对表达量

的相关性采用直线相关分析,图 1 显示 KLF4 与 RORγt 之间呈正相关($r=0.705,P<0.05$)。

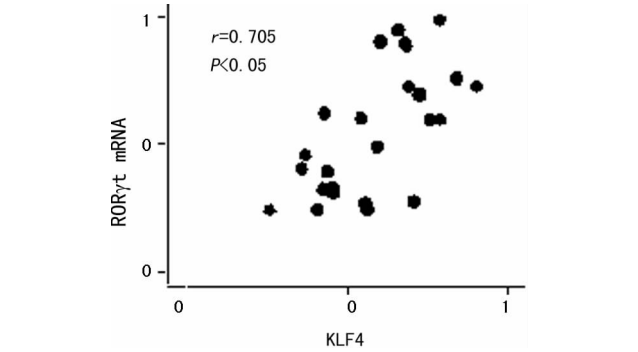


图 1 MG 患者 PBMC 中 KLF4 和 RORγt mRNA 相关性分析

2.3 MG 患者 PBMC 中 KLF4、RORγt 与 miR-206 的相关性分析 见图 2、3。采用直线相关分析 MG 患者 PBMC 中 KLF4 和 RORγt mRNA 分别与 miR-206 相对表达量的相关性,图 2、3 结果显示,KLF4 和 RORγt mRNA 与 miR-206 的表达水平之间均呈负相关($r=-0.675,-0.806,P<0.05$)。

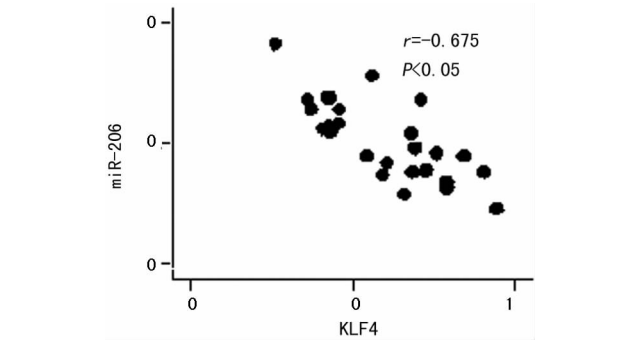


图 2 MG 患者 PBMC 中 KLF4 与 miR-206 相关性分析

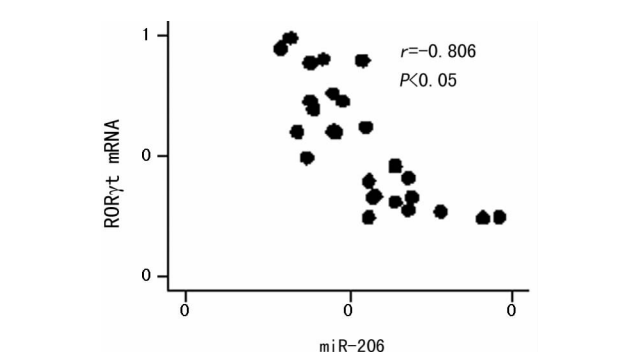


图 3 MG 患者 PBMC 中 RORγt mRNA 与 miR-206 相关性分析

3 讨论

MG 是一种自身免疫性疾病,以 T 细胞辅助、抗体介导、补体参与的神经肌肉接头传递障碍为特征,有研究结果表明,免疫调节细胞参与 MG 诱导和发病过程^[1]。Th17 是一类与 Th1 和 Th2 不同的 CD4⁺ T 细胞新亚群,这类细胞主要以分泌 IL-17 而得名^[7-8]。RORγt 是 Th17 特异性的主要转录因子,调控 IL-17 的分泌^[2]。有研究表明,Th17 细胞数目上调可导致免疫耐受失衡,引发 MG 等自身免疫性疾病发病^[3]。本研究

发现, MG 患者外周血 Th17 特异性转录因子 RORγt 的表达呈显著性增高, 由此提示 Th17 与 MG 的发生和发展密切相关。

KLF 家族是真核生物中一大类基础转录因子, 在真核细胞的基因转录调控过程中起重要作用^[9]。KLF4 是其家族中目前研究最多的一员, 包含 3 个结构域: 高度保守的 C-端 DNA 结合结构域、高度可变的 N-端转录调节结构域及核定位序列^[10]。KLF4 能结合靶基因富含 Gc 的启动子序列, 促进或抑制下游基因表达, KLF4 对 Th17 的分化具有正调节作用^[5]。本研究发现, 在 MG 患者 PBMC 中 KLF4 mRNA 的表达也显著增高, 而且与 RORγt mRNA 的表达呈正相关($r=0.705$, $P<0.05$)。本研究结果提示, MG 患者 PBMC 中 KLF4 mRNA 可以通过促进 RORγt 活性而上调 Th17 表达, 促进 Th17 细胞分化。

miRNA 是一类内源性的具有调控功能的非编码小分子 RNA, 每个 miRNA 可以有多个靶基因, 而几个 miRNAs 也可以调节同一个基因。它通过与靶基因的 3'UTR 结合继而抑制靶基因的表达^[11]。人类的外周血中 KLF4 是 miR-206 的靶分子之一^[6]。本研究发现, MG 患者 PBMC 中 miR-206 表达下降, 相反 KLF4 mRNA 表达水平却呈升高状态, 二者呈明显负相关($r=-0.675$, $P<0.05$), 并且 miR-206 与 RORγt mRNA 表达也表现出显著负相关($r=-0.806$, $P<0.05$), 这可能是由于 miR-206 的低表达从而上调了 KLF4 mRNA 的表达, 进而促进 RORγt mRNA 的高表达, 从而使 MG 患者 PBMC 中 Th17 比例增高。

本研究结果表明, MG 患者 PBMC 中 miR-206 的表达下降可在一定程度使 KLF4 mRNA 表达上调, 进一步促使 RORγt mRNA 表达增强, 最终提高了 Th17 水平, 促进疾病的发生和发展, 相关的分子机制还需进一步研究。

参考文献

[1] Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis; emerging clinical and biological heterogeneity[J]. Lancet Neurol, 2009, 8(5): 475-490.

[2] 王中魁, 魏东宁, 王卫, 等. Th17 细胞与重症肌无力发病及临床严重度相关性研究[J]. 中国神经免疫学和神经病

学杂志, 2013, 20(3): 167-171.

[3] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages[J]. Ann Rev Immunol, 2007, 25(5): 821-852.

[4] Lebson L, Gocke A, Rosenzweig J, et al. Cutting edge: the transcription factor Kruppel-like factor 4 regulates the differentiation of Th17 cells independently of RORγt [J]. J Immunol, 2010, 185(12): 7161-7164.

[5] An J, Golech S, Klaewsongkram J, et al. Kruppel-like factor 4 (KLF4) directly regulates proliferation in thymocyte development and IL-17 expression during Th17 differentiation [J]. FASEB J, 2011, 25(10): 3634-3645.

[6] Parasramka MA, Dashwood WM, Wang R, et al. A role for low-abundance miRNAs in colon cancer: the miR-206/Kruppel-like factor 4 (KLF4) axis [J]. Clin Epigenetics, 2012, 4(1): 16-26.

[7] Pal J, Rozsa C, Komoly S, et al. Clinical and biological heterogeneity of autoimmune myasthenia gravis[J]. J Neuroimmunol, 2011, 231(1/2): 43-54.

[8] 彭素芳, 王建军, 陈建国, 等. 胃癌患者外周血单个核细胞 RORγt 和 IL-17 mRNA 水平的检测及临床意义[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(3): 318-321.

[9] Yang HW, Xia T, Chen ZL, et al. Cloning, chromosomal-localization and expression patterns of porcine Kruppel-like factors 4, -5, -7 and the early growth response factor 2[J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(1): 157-163.

[10] Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, et al. Kruppel-like transcription factors: a functional family[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(10): 1996-2001.

[11] Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(3): 219-230.

(收稿日期: 2016-01-13 修回日期: 2016-03-29)

(上接第 1499 页)

[5] Chen SC, Chang HL, Yan TR, et al. An eight-year study of epidemiologic features of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 77(1): 188-191.

[6] 郭靖. 重症肠道病毒 71 型感染手足口病研究进展[J]. 中国药业, 2015, 24(5): 4-6.

[7] Hong J, Kang B, Kim A, et al. Enhanced detection of enteroviruses in clinical samples by reverse transcription-PCR using complementary locked primer technology[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 615-616.

[8] 王晓. 手足口病常见病原体的核酸检测技术研究进展[J]. 华夏医学, 2014, 27(6): 162-165.

[9] 吕厚明, 房本兰, 姜亚楠. 手足口病不同核酸检测方法敏

感性比较[J]. 医药与保健, 2015, 23(2): 91-92.

[10] Arita M, Ling H, Yan DM, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis cases[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9(1): 1-10.

[11] 戴光跃. 肠道病毒核酸检测在儿童手足口病诊断应用价值[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(27): 172-173.

[12] 樊旭成, 张凯伦, 杨璐鹭. IQTM5 多重实时荧光定量 PCR 仪快速检测肠道病毒 RNA 及其临床意义[J]. 医学信息 (上旬刊), 2011, 24(12): 216-217.

(收稿日期: 2016-01-18 修回日期: 2016-02-25)