

白塞氏病患者血浆中微小 RNA 异常表达的初步研究

苗 慧,张新桥,王 红

基金项目:北京市自然科学基金项目(No.7122042)
作者单位:(100730)中国北京市,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室
作者简介:苗慧,在读硕士研究生,研究方向:眼科学。
通讯作者:王红,毕业于中山大学中山眼科中心,博士,主任医师,研究方向:葡萄膜炎学.wanghongyk@sina.com
收稿日期:2018-06-14 **修回日期:**2018-11-28

Preliminary study in aberrant expression of microRNA in plasma of patients with Behcet's disease

Hui Miao, Xin-Qiao Zhang, Hong Wang

Foundation item: Natural Science Foundation of Beijing (No. 7122042)

Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University; Beijing Tongren Eye Center; Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China

Correspondence to: Hong Wang. Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University; Beijing Tongren Eye Center; Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China. wanghongyk@sina.com

Received: 2018-06-14 Accepted: 2018-11-28

Abstract

• **AIM:** To explore the differences of expression pattern of microRNA (miRNA) in plasma from Behcet's disease (BD) syndrome patients and normal controls, searching for diseases-relating biomarkers.

• **METHODS:** Blood samples from 15 cases of BD patients and 15 cases of normal control were collected to extract total RNA in plasma. The miRNAs was labeled, miRNAs array hybridization was performed and then array-scanned and analyzed. We searched verified target genes and selected meaningful miRNAs to underwent real time PCR.

• **RESULTS:** In comparison with the healthy controls, there were 8 anomalous miRNAs, in which 3 miRNAs (hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-483-3p) were up regulated and 5 miRNAs (hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-199a-5p) were down regulated (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The present examination suggests that aberrant levels of miRNAs could contribute to the pathogenesis of BD. Deviant expression of miRNAs may be involved in the activation of Notch1 and SMAD4 pathway in BD, which could offer a novel therapeutic approach for BD.

• **KEYWORDS:** Behcet's disease; microRNA; autoimmunity

Citation: Miao H, Zhang XQ, Wang H. Preliminary study in aberrant expression of microRNA in plasma of patients with Behcet's disease. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(1):26-31

摘要

目的:检测白塞氏病(BD)患者和正常人群血浆中微小核糖核酸(miRNA)的差异表达谱,探讨miRNA在BD发病中的作用,寻找与BD相关的血浆生物标记物。

方法:收集15例活动期BD患者和15例正常人的抗凝静脉血,离心获得血浆,提取总RNA,经miRNA标记、miRNA阵列杂交、miRNA阵列扫描和分析获得BD患者异常表达的miRNA谱。通过miRTarBase(靶基因数据库)检索差异性表达的miRNA已经过验证的靶基因,并选取与免疫学相关的差异性表达的miRNA进行Real time-PCR验证。

结果:活动期BD患者血浆中hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-483-3p较正常人表达上调,hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-224-5p、hsa-miR-454-3p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-199a-5p较正常人表达下调。

结论:miRNA的差异性在BD的发生发展过程发挥重要作用,异常表达的miRNA可能通过Notch1和SMAD4信号通路促进BD发病。

关键词:白塞氏病;微小核糖核酸;自身免疫

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.1.05

引用:苗慧,张新桥,王红.白塞氏病患者血浆中微小RNA异常表达的初步研究.国际眼科杂志 2019;19(1):26-31

0 引言

葡萄膜炎是一类常见的眼病,治疗棘手,易于反复发作,治疗不及时或处理不当易致盲,其主要影响青壮年人群的身心健康,受到全球眼科学界的重视^[1]。多数观点认为,葡萄膜炎是由自身免疫紊乱所致,自身免疫性葡萄膜炎主要是由Th1细胞群(主要介导细胞免疫)、Th17细胞群(主要介导炎症反应)和调节性T细胞群(regulatory cells, Tregs;主要发挥免疫调节作用)及其分泌的相关细胞因子失去平衡引起^[2]。白塞氏病(BD)是我国非常常见的一种非肉芽肿性自身免疫性葡萄膜炎,主要病理改变是闭塞性血管炎,临床上以葡萄膜炎、口腔溃疡、皮肤损害及阴部溃疡为特征。BD的发病与外周血CD4⁺淋巴细胞亚群存在明显的关联,研究发现BD患者外周血中Th1细胞、Th17细胞占CD4⁺T细胞的百分比明显升高,Tregs细胞占CD4⁺T细胞的百分比明显下降^[3-4]。

近年来,随着对微小核糖核酸(miRNA, miRNA)研究的深入,发现miRNA在与CD4⁺T细胞的产生与分化相关的信号通路中起着非常重要的作用。miRNA表达关键酶Dicer酶的缺失明显影响T细胞的分化与功能,这可能意味着miRNA的异常表达与自身免疫性葡萄膜炎的发病有着不可忽视的关系^[3-4]。miRNA可调控免疫系统的正常发育和生理功能,其结构和功能的异常影响免疫细胞的

表1 Real time-PCR 引物序列

基因名称	双向引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
hsa-miR-425-5p	GSP:5'GGGGAATGACACGATCACTC3' R:5'GTGCGTGTCTGGAGTCC3'	60	65
hsa-miR-34a-5p	GSP:5'GGGGTGGCAGTGTCTTAGC3' R:5'CAGTGCCTGTCTGGAGT3'	60	64
hsa-miR-34c-5p	GSP:5'GGGAGGCAGTGTAGTTAGC3' R:5'CAGTGCCTGTCTGGAGT3'	60	66
hsa-miR-129-5p	GSP:5'GCTTTTTGCGGTCTGG3' R:5'TGCGTGTCTGGAGTCC3'	60	59
hsa-miR-144-3p	GSP:5'GGGGGTACACTATAGATGA3' R:5'CAGTGCCTGTCTGGAG3'	60	66
hsa-miR-483-3p	GSP:5'GGGGTCACTCTCTCCTCC3' R:5'GTGCGTGTCTGGAGTCC3'	60	63
hsa-miR-301a-3p	GSP:5'GGCGGTGCAATAGTATTGT3' R:5'CAGTGCCTGTCTGGAG3'	60	65
hsa-miR-454-3p	GSP:5'GGGGTAGTGCAATATTGCTTA3' R:5'GTGCGTGTCTGGAGTCC3'	60	66
hsa-miR-224-5p	GSP:5'GGGGCAAGTCACTAGTGGT3' R:5'GTGCGTGTCTGGAGTCC3'	60	64
hsa-miR-17-5p	GSP:5'GGGGCAAAGTCTTACAGTCC3' R:5'GTGCGTGTCTGGAGTCC3'	60	65
hsa-miR-199a-5p	GSP:5'GGTGTCCAGTGTTCAGAC3' R:5'CAGTGCCTGTCTGGAGT3'	60	67

注:GSP表示miRNA的特异引物,R表示与GSP相匹配的引物。

分化、发育及功能,并参与多种自身免疫性疾病的发生、发展^[5-6]。随着二者相互作用机制的阐明及miRNA检测技术的发展,其在自身免疫性疾病中的研究已成为miRNA研究中的前沿领域之一。上述研究结果提示,异常表达的miRNA可能在BD的发病过程中发挥重要作用,但目前关于miRNA在BD中的研究较少,很多机制尚未明确。本研究以miRNA在BD中的异常表达及探索其可能的调控路径作为切入点,研究BD的发病机制,以期对其有更深入的认识,并为其防治提供新的治疗靶点及策略。

1 对象和方法

1.1 对象 选取2016-03/2017-11于我院就诊的发病期BD患者15例作为BD组,均为男性,年龄23~45岁,均符合国际公认的BD诊断标准^[7],排除其它免疫性疾病及全身其他系统疾病。选取同期于我院体检中心体检的健康人15例作为对照组,均为男性,年龄25~41岁,排除免疫性疾病及眼部疾病。本研究经本院伦理委员会审批通过,所有受检者均对本研究知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与设备 主要试剂:Trizol LS Reagent、无RNA酶糖原(Invitrogen Life Technologies),氯仿、异丙醇、100%乙醇(上海化学试剂有限公司)、75%乙醇(DEPC水配制)。主要设备:Axon GenePix 4000B微阵列扫描仪(Axon Instruments, USA)、GenePix Pro 6.0软件(Axon)、洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)。

1.2.2 提取血浆 清晨采取空腹肘静脉血4mL置于含有EDTA的紫色抗凝真空管,震荡混匀,室温静置1h。将血

液分装至1.5mL无RNA酶EP管中,每管1000μL。3000r/min、20°C离心5min后观察无溶血,提取上清液至1.5mL无RNA酶EP管中。移液过程中注意不能吸取细胞层,保持血浆不被污染,将血浆分装后于-80°C保存。

1.2.3 提取RNA 分别取BD组和对照组各10例受检者的抗凝静脉血血浆样品解冻后4°C 12000r/min离心10min,取250μL血浆转至1.5mL的离心管中,加入750μL的Trizol LS Reagent试剂混匀。匀浆后于15°C~30°C孵育5min。加入0.2mL氯仿,剧烈振荡15s,5°C~30°C孵育3min。4°C 12000r/min离心15min,可见混合液体分为下层的红色酚氯仿相,中间层和上层的无色水相,RNA全部于水相中。将水相转移至新离心管,并加入500μL异丙醇,混匀后15°C~30°C孵育10min,4°C 12000r/min离心10min,可见管底部和侧壁上形成胶状沉淀块即RNA沉淀。移去上清液,加入1mL 75%乙醇,清洗RNA沉淀。振荡后,4°C 7500r/min离心5min。去除乙醇溶液,空气中干燥RNA沉淀5~10min,保存于-70°C备用。

1.2.4 miRNA标记和miRNA阵列杂交 将提取的血浆RNA样本交由Kang Chen-Biotech(中国上海)进行miRNA标记和miRNA阵列杂交。通过Axon GenePix 4000B微阵列扫描仪扫描, GenePix Pro 6.0软件读取图像的原始强度。归一化后,将每个miRNA点获得的平均值用于统计分析,计算绿色信号与红色信号的比率。本研究筛选上调和下调的miRNA的阈值分别是倍数变化>2.00和倍数变化<0.50。通过miRTarBase数据库检索显著差异性表达的miRNA已经过验证的靶基因,并选取与免疫学相关的差异性表达的miRNA进行Real time-PCR验证。

表2 miRTarBase数据库筛选出的与免疫学相关的差异性表达 miRNA 及其靶基因

靶基因	miRNA
CDKN1A	hsa-miR-520b、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-17-5p
MCL1	hsa-miR-193-3p
Notch1	hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-34a-5p、hsa-miR-144-3p
MAP4K4	hsa-miR-520e
BMI1	hsa-miR-300、hsa-miR-487b-3p
DR1	hsa-miR-513b-5p
SMAD4	hsa-miR-483-3p、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-224-5p、hsa-miR-454-3p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-199a-5p
RUNX3	hsa-miR-301a-3p
HLA-G	hsa-miR-152-3p
DNMT1	hsa-miR-152-3p
JAK1	hsa-miR-17-5p
PTEN	hsa-miR-17-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-141-3p
ATM	hsa-miR-374a-5p

表3 差异性表达的 miRNA 的 Real time-PCR 检测结果

miRNA	BD 组 (n=5)	对照组 (n=5)	t	P
hsa-miR-34c-5p	1.47±0.31	0.78±0.24	3.51	0.0079
hsa-miR-129-5p	0.78±0.24	0.92±0.28	-0.77	0.4654
hsa-miR-34a-5p	1.09±0.31	0.83±0.25	1.32	0.2243
hsa-miR-144-3p	1.09±0.17	0.76±0.22	2.40	0.0429
hsa-miR-483-3p	1.62±0.28	0.98±0.22	3.58	0.0072
hsa-miR-301a-3p	0.57±0.14	1.03±0.19	-3.93	0.0044
hsa-miR-224-5p	0.40±0.06	0.73±0.18	-3.58	0.0071
hsa-miR-454-3p	0.58±0.11	1.01±0.20	-3.77	0.0055
hsa-miR-17-5p	0.63±0.12	1.20±0.37	-6.90	0.0203
hsa-miR-199a-5p	0.34±0.11	0.87±0.10	-5.11	0.0001

1.2.5 Real time-PCR 检测 分别取 BD 组和对照组各 5 例受检者的抗凝静脉血血浆样本,提取 RNA,方法同 1.2.3。由 Kang Chen-Biotech(中国上海)进行 Real time-PCR 检测。Real time-PCR 引物序列见表 1。反应体系:2×Master Mix 5μL,10μmol/L 的 PCR 特异引物 GSP 0.5μL,10μmol/L 的 PCR 特异引物 R 0.5μL,水 2μL。反应条件:95℃,10min;95℃,10s;60℃,60s,40 个 PCR 循环。hsa-miR-425-5p 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行结果分析。BD 组与对照组受检者血浆 miRNA 的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的比值 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1.5$ 表示显著上调, $2^{-\Delta\Delta Ct} < 0.5$ 表示显著下调。

2 结果

2.1 差异性表达的 miRNA 本研究发现,与正常对照组相比,BD 组共检出具有差异性表达的 miRNA 358 个,其中上调 miRNA 223 个,下调 miRNA 135 个,见图 1。

2.2 差异性表达的 miRNA 靶基因生物信息学分析 通过 miRTarBase 数据库可检索到的本研究发现的与免疫学相关的差异性表达的 miRNA 靶基因见表 2。本研究发现的显著异常表达的 miRNA 靶基因主要集中在 CDKN1A、Notch1、SMAD4,其中 Notch1 和 SMAD4 信号通路免疫系统疾病的相关性较高,故选择相应的 miRNA 进行 Real time-PCR 验证。

2.3 Real time-PCR 检测结果 通过 Real time-PCR 法检测与免疫系统疾病相关性较高的 miRNA,溶解曲线见图 2~11。检测结果显示,两组患者血浆 hsa-miR-34a-5p

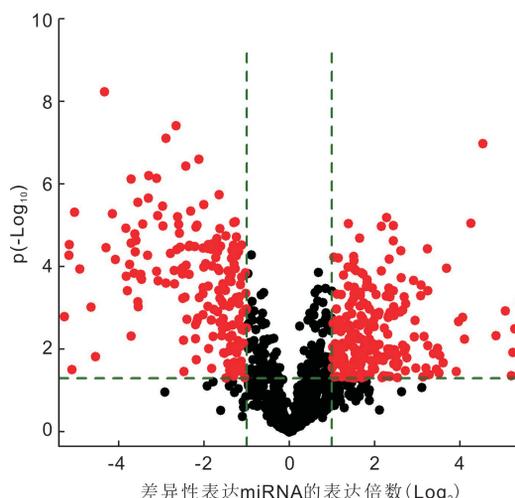


图1 差异性表达的 miRNA 火山图 红色表示符合筛选要求的 miRNA。

和 hsa-miR-129-5p 水平差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);BD 患者血浆中 hsa-miR-34c-5p ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.88$)、hsa-miR-483-3p ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.64$) 较正常人显著上调,hsa-miR-144-3p ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.43$) 表达上调;hsa-miR-199a-5p ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.40$) 较正常人显著下调,hsa-miR-301a-3p ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.55$)、hsa-miR-224-5p ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.55$)、hsa-miR-454-3p ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.57$)、hsa-miR-17-5p ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.53$) 较正常人表达下调,见表 3。

3 讨论

BD 是我国常见的致盲率较高的葡萄膜炎类型之一,患病人数约占全国葡萄膜炎患者总数的 16.5%^[8],具有较高的代表性。BD 的发病与外周血 CD4⁺ 淋巴细胞亚群具有不可忽视的关系,BD 患者外周血中 Th1 细胞、Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分比明显升高,Tregs 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分比明显下降。随着对 miRNA 的深入研究,发现当 miRNA 表达关键酶 Dicer 酶缺失时,Th 细胞的分化与功能会受到明显的影响,提示自身免疫性葡萄膜炎的发生可能与 miRNA 的异常表达有着密不可分的关系^[3-4]。

miRNA 是一类由基因组脱氧核糖核酸(DNA)编码的由 21~25 个核苷酸序列组成的单股非编码核糖核酸

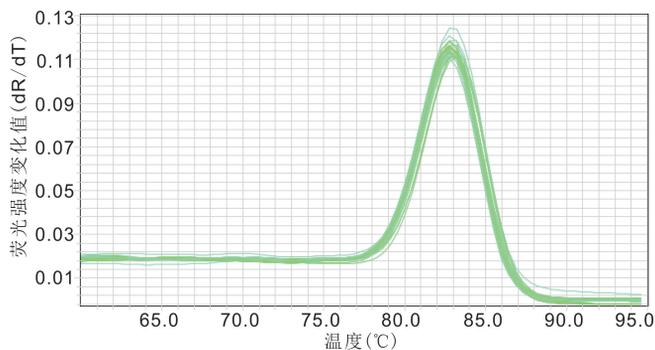


图2 hsa-miR-17-5p 溶解曲线。

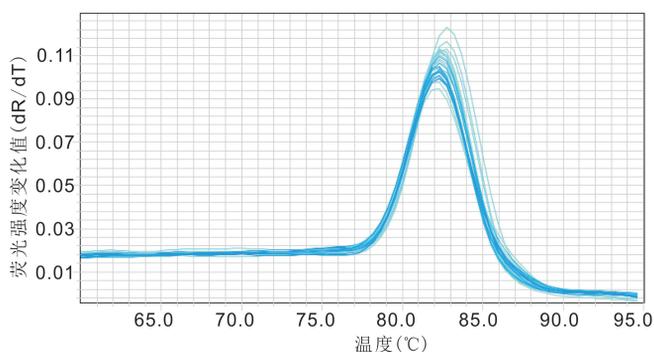


图7 hsa-miR-199a-5p 溶解曲线。

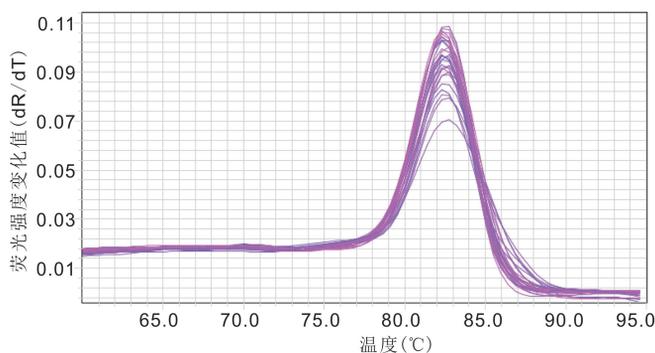


图3 hsa-miR-34a-5p 溶解曲线。

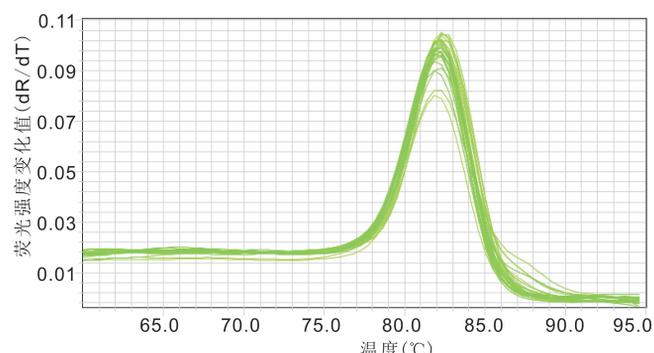


图8 hsa-miR-224-5p 溶解曲线。

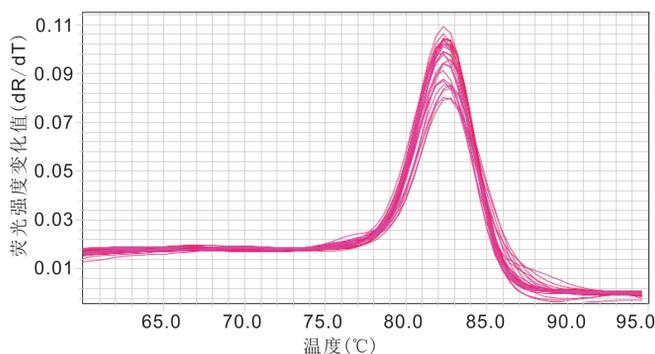


图4 hsa-miR-34c-5p 溶解曲线。

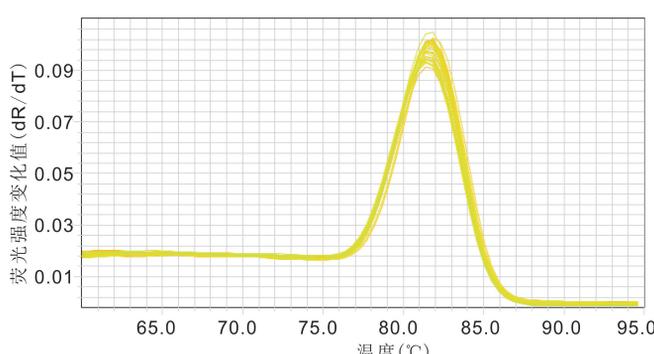


图9 hsa-miR-301a-3p 溶解曲线。

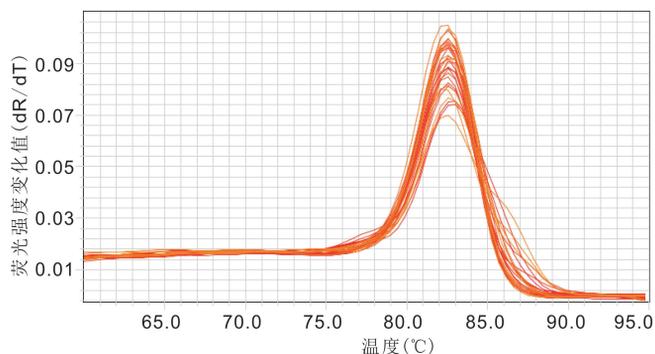


图5 hsa-miR-129-5p 溶解曲线。

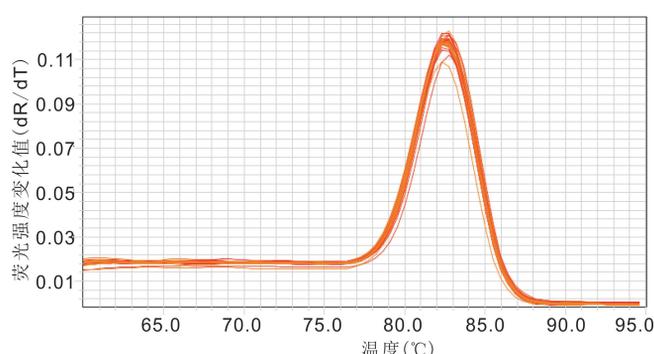


图10 hsa-miR-454-3p 溶解曲线。

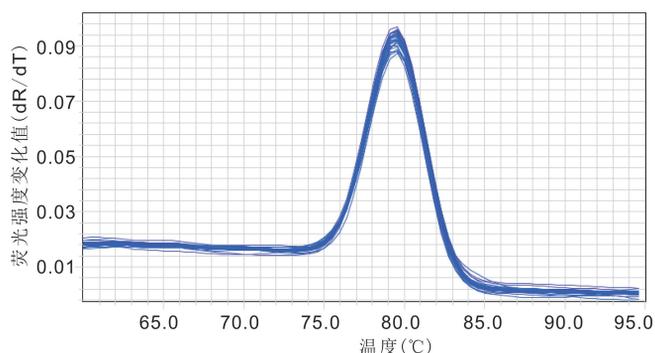


图6 hsa-miR-144-3p 溶解曲线。

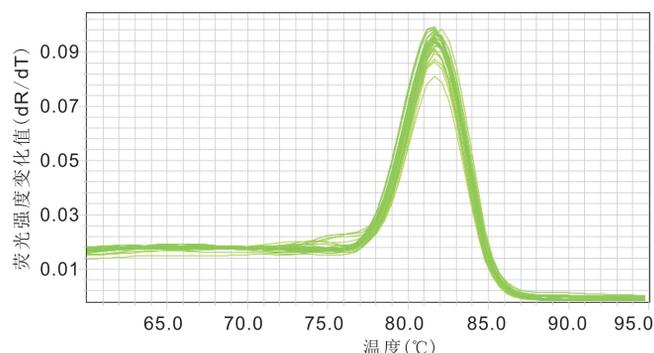


图11 hsa-miR-483-3p 溶解曲线。

(RNA)。miRNA 虽小,但其可以直接作用于活细胞内的特异性目的基因信使核糖核酸(mRNA)的3'端非编码区,抑制目的基因 mRNA 的表达,从而抑制相应蛋白质的合成,参与调节多个生理过程。miRNA 的产生主要经过原始 miRNA(primary microRNA, pri-miRNA)、前体 miRNA(precursor microRNA, pre-miRNA)、双体 miRNA 后成为成熟 miRNA^[5]。miRNA 在动植物转录后水平参与基因表达调控,通过与靶分子 mRNA 碱基配对降解 mRNA 或阻碍其翻译发挥生物学效应^[9]。miRNA 在免疫细胞中广泛表达,并影响免疫反应的各个阶段^[5]。多种免疫过程都受到 miRNA 的调控,包括粒细胞发育、T 细胞和 B 细胞的成熟与分化、抗原递呈过程、Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)的信号级联、细胞因子的产生等^[10]。循环 miRNA 可丰富而稳定地存在于体液中。在疾病状态下,循环 miRNA 的表达谱有特征性的改变,循环 miRNA 可作为一种无创伤性生物标志物参与疾病的诊疗过程。

据推测,人类基因组中约 1/3 以上的基因可能是 miRNA 的靶基因。由于信号通路的显著剂量敏感效应,其相关基因被认为是 miRNA 转录调控中极为理想的候选靶基因。Notch 基因于 1917 年在果蝇中发现,因部分基因缺失可导致果蝇翅膀出现缺口(notch)而得名。哺乳动物的 Notch 家族包括 4 种受体(Notch1~4)和 5 种配体(DLL1、DLL3、DLL4、Jagged1、Jagged2),通过这些受体和配体之间的相互作用,可以将某些特定信息在相邻细胞之间进行传递^[11]。Notch 信号通路在免疫调控中的重要性随着研究的深入不断彰显出来,已有研究表明 Notch 信号通路在 Th1 和 Th17 细胞的分化中发挥着关键作用^[7,12-13]。Jiao 等^[14]研究发现,在胶原诱导的类风湿关节炎小鼠模型中,给予 γ 分泌酶抑制剂(可以抑制 γ 分泌酶底物 Notch 的活性,进而影响细胞信号传导和细胞分化)的小鼠的脾和外周淋巴结 Th17 细胞及白细胞介素 17(interleukin 17, IL-17)的数量较对照组明显减少,表明 Notch 信号通路对 Th17 细胞的发育、分化均发挥重要的调节作用。Zheng 等^[15]研究发现,肾移植术后不同恢复程度的患者中 Notch1 和 DLL-4 的表达量与 Th17 细胞水平的变化均呈明显正相关,提示在肾移植急性排斥反应中 Th17 细胞的增殖和分化与 Notch1 和 DLL-4 密切相关。Keerthivasan 等^[8]应用 Notch1 siRNA 阻滞剂特异性阻断 Notch1 信号通路,不但可以降低 Th17 细胞的转录因子视黄酸相关孤儿核受体 γ t(retinoid-related orphan receptor subfamily γ t, ROR γ t)的 mRNA 的表达,亦能显著减少极化状态下 Th17 细胞分泌 IL-17A、IL-17F 等细胞因子,提示 Notch1 至少可通过 ROR γ t 和 IL-17 基因启动子这两个位点调控 Th17 细胞分化和功能。Qi 等^[16]研究表明,活动期 BD 患者存在 Notch1 通道的异常激活,阻断 Notch1 信号通路能倾向性抑制 Th17 细胞免疫反应,而这种倾向性的抑制作用可能是通过信号传导及转录激活因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)的磷酸化水平来实现的。本研究结果表明,活动期 BD 患者血浆中 hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-144-3p 上调,这些 miRNA 的靶基因为 Notch1,提示 hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-

144-3p 的异常上调很可能参与了 Notch1 信号通路的异常激活。异常激活的 Notch 1 信号途径通过调节 STAT3 磷酸化或/和通过 ROR γ t 和 IL-17 基因启动子引起 Th17 细胞的增殖,促进 BD 的发病。

SMAD4 蛋白作为序列保守的 SMAD 蛋白家族的一员,其主要功能是参与转化生长因子 β (TGF- β)超家族细胞内信号转导。SMAD4 在 TGF- β 超家族的信号转导途径中处于中枢地位,对恶性肿瘤的发生、发展及转移有重要影响。近年有研究表明,SMAD4 通过诱导致病性 Th17 细胞的分化参与多发性硬化的发病过程^[17]。机体发生感染时,大量产生的 IL-6 和 TGF- β 通过诱导特定基因的表达影响 Th17 细胞的分化过程^[18]。有研究进一步表明,需要在 TGF- β 和 IL-6 这两个在宏观上有着相反功能的细胞因子的共同作用下起始 Th17 细胞的分化^[19]。Th17 细胞的分化受 ROR γ t 和 ROR α 共同诱导。TGF- β 既能够诱导 ROR γ t 表达又能够诱导 Foxp3 的表达,在 IL-6 缺乏的情况下,TGF- β 诱导产生的 Foxp3 能够抑制细胞的进一步分化;在 IL-6 和 TGF- β 共同存在的情况下,IL-6 可以通过活化 Th17 细胞分化中的重要调控点—STAT3,抑制 Foxp3 的表达并阻止其与 ROR γ t 的相互作用,使 ROR γ t 表达大幅度增加,促进 Th17 细胞的分化^[20]。本研究结果表明,活动期 BD 患者血浆中 hsa-miR-483-3p 异常上调,hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-224-5p、hsa-miR-454-3p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-199a-5p 异常下调,鉴于 SMAD4 对致病性 Th17 细胞的分化诱导作用,我们可以认为这些异常表达的 miRNA 很可能通过 SMAD4 参与 TGF- β 超家族细胞内信号转导,在 IL-6 和 TGF- β 共同存在的情况下,IL-6 活化 STAT3,抑制 Foxp3 的表达并阻止其与 ROR γ t 的相互作用,使 ROR γ t 表达大幅度增加,促进 Th17 细胞的分化,参与 BD 的发病。

综上所述,miRNA 的异常表达可通过靶基因影响机体的免疫反应,促使疾病发生。本研究结果表明,miRNA 的异常表达可能促进 BD 的发生及发展,免疫微环境中异常表达的 miRNA 所导致的 BD 患者免疫功能的异常可能是通过靶向 Notch1 和 SMAD4 来实现的,这两条作用通路都与 STAT3 和 ROR γ t 相关,提示 Notch1 和 SMAD4 信号通路可能具有很强的相关性,二者在 BD 的发病过程中起到协同作用。但由于本研究样本数量偏少,还需要进一步扩大样本量以验证上述结论,并进一步探讨异常表达的 miRNA 与 Notch1 和 SMAD4 信号通路在 BD 发病机制中扮演的具体角色,这也是我们未来实验研究的方向。

参考文献

- 1 杨培增. 临床葡萄膜炎. 北京:人民卫生出版社 2004;33-44
- 2 Ruggieri S, Frassanito MA, Dammacco R, et al. Treg lymphocytes in autoimmune uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2012;20(4):255-261
- 3 Cobb BS, Hertweck A, Smith J, et al. A role for Dicer in immune regulation. *J Exp Med* 2006;203(11):2519-2527
- 4 Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, et al. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *Exp Med* 2005;202(2):261-269
- 5 O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10(2):111-122

- 6 Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system; basic principles. *Cell* 2009;136(1):26–36
- 7 International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's Disease (ITR – ICBDD). The International Criteria for Behçet's Disease (ICBDD); a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28(3):338–347
- 8 Keerthivasan S, Suleiman R, Lawlor R, *et al.* Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation. *J Immunol* 2011;187(2):692–701
- 9 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–297
- 10 Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;32(3–4):189–194
- 11 Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti – fibrotic therapy. *Pharmacol Res* 2016;108(5):57–64
- 12 Fang TC, Yashiro – Ohtani Y, Del Bianco C, *et al.* Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 2007;27(1):100–106
- 13 Minter LM, Turley DM, Das P, *et al.* Inhibitors of gamma – secretase block *in vivo* and *in vitro* T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol* 2005;6(7):68–78
- 14 Jiao Z, Wang W, Hua S, *et al.* Blockade of Notch signaling ameliorates murine collagen induced arthritis via suppressing Th1 and Th17 cell response. *Am J Pathol* 2014;184(4):1085–1093
- 15 Zheng K, Tan J, Zhu W, *et al.* Expression levels of Notch 1 and Delta – like 4 in peripheral lymphocytes and their relationship with T helper 17 (Th17) cells in renal transplant recipients. *Transpl Immunol* 2015;33(1):13–19
- 16 Qi J, Yang Y, Hou S, *et al.* Increased Notch pathway activation in Behçet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53(5):810–820
- 17 Honardoost MA, Kiani – Esfahani A, Ghaedi K, *et al.* miR – 326 and miR – 26a, two potential markers for diagnosis of relapse and remission phases in patient with relapsing – remitting multiple sclerosis. *Gene* 2014;544(2):128–133
- 18 Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, *et al.* TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL – 17 – producing T cells. *Immunity* 2006;24(2):179–189
- 19 Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell – produced transforming growth factor – β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1 and Th17 cell differentiation. *Immunity* 2007;26(5):579–591
- 20 Mangan P, Harrington L, Quinn D, *et al.* Transforming growth factor – beta induces development of the T (H) 17 lineage. *Nature* 2006;441(7090):231–234