



电子、语音版

·论著·

## hsa\_circ\_0047056 激活 T 细胞在重症肌无力中作用的研究

李业<sup>1</sup>, 吕媛芝<sup>2</sup>, 欧阳宇顿<sup>2</sup>, 罗朝辉<sup>2</sup>, 罗梦川<sup>3</sup>

1. 福建医科大学协和医院神经内科, 福建 福州 350001

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南 长沙 410008

3. 中南大学湘雅医院老年病科, 湖南 长沙 410008

**摘要:**目的 探索 hsa\_circ\_0047056 活化 T 细胞在重症肌无力(MG)中的作用。方法 采用实时荧光定量核酸扩增检测验证 hsa\_circ\_0047056 在 MG 患者的外周血单个核细胞的表达与临床疾病的相关性。构建 hsa\_circ\_0047056 的过表达质粒及 siRNA 化合物, 转染 Jurkat 细胞。采用流式细胞仪检测 CD69 的活化变化。采用酶联免疫吸附测定法检测相关炎症因子表达情况。结果 实时荧光定量核酸扩增检测验证了 hsa\_circ\_0047056 在 MG 中的高表达( $P<0.05$ ), 且其与定量 MG 评分得分和 AchR 滴度呈正相关( $P<0.05$ )。流式细胞仪检测发现 hsa\_circ\_0047056 过表达能够激活 Jurkat 细胞表面 CD69 的表达, 酶联免疫吸附测定结果显示, 其能够增加白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 2、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  等炎症因子的表达; 沉默 hsa\_circ\_0047056 则具有相反的功能。结论 MG 患者中 circ\_0047056 通过调控 T 细胞的活化参与疾病进展。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2024, 51(6): 29-35]

关键词: 重症肌无力; hsa\_circ\_0047056; T 细胞; CD69

中图分类号: R746.1

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2024.06.005

### Role of hsa\_circ\_0047056 activation of T cells in myasthenia gravis

LI Ye<sup>1</sup>, LÜ Yuanzhi<sup>2</sup>, OUYANG Yuzhen<sup>2</sup>, LUO Zhaohui<sup>2</sup>, LUO Mengchuan<sup>3</sup>

1. Department of Neurology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China

2. Department of Neurology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China

3. Department of Geriatrics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China

Corresponding author: LUO Mengchuan, Email: dm\_anlace@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of hsa\_circ\_0047056 activation of T cells in MG. **Methods** Quantitative real-time PCR was used to validate the correlation between the expression of hsa\_circ\_0047056 in peripheral blood mononucleated cells of MG patients and the clinical features of MG. The plasmid with hsa\_circ\_0047056 overexpression and the siRNA compound of hsa\_circ\_0047056 were constructed and transfected into Jurkat cells. Flow cytometry was used to measure the change in the activity of CD69. ELISA was used to measure the expression of related inflammatory cytokines. **Results** Quantitative real-time PCR validated the high expression of hsa\_circ\_0047056 in MG ( $P<0.05$ ), which was positively correlated with quantitative MG score and AchR titer ( $P<0.05$ ). Flow cytometry confirmed that the overexpression of hsa\_circ\_0047056 could activate the expression of CD69 on the surface of Jurkat cells, and ELISA showed that hsa\_circ\_0047056 could increase the expression of the inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$ , interleukin-2, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$ , while silencing hsa\_circ\_0047056 showed opposite changes. **Conclusions** hsa\_circ\_0047056

基金项目: 国家自然科学基金(82101474)。

收稿日期: 2024-06-25; 修回日期: 2024-09-04

作者简介: 李业(1984—), 男, 住院医师, 博士, 主要从事神经免疫方向研究。Email: 454382507@qq.com。

通信作者: 罗梦川(1987—), 女, 主治医师, 博士, 主要从事神经免疫方向研究。Email: dm\_anlace@163.com。

0047056 may be involved in the disease progression of MG by regulating the activation of T cells.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2024, 51(6): 29–35]

**Keywords:** myasthenia gravis; hsa\_circ\_0047056; T cells; CD69

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是最常见的自身免疫性神经肌肉接头相关疾病。研究表明,70%~80%的MG患者血清中可检测到乙酰胆碱受体抗体(acetylcholine receptor-antibody, AchR-Ab)<sup>[1-2]</sup>。有研究显示,MG患者体内CD4<sup>+</sup>T细胞被异常激活,激活后的自身反应性CD4<sup>+</sup>T细胞不断增殖分化,异常分泌Th1/Th17相关的 $\gamma$ 干扰素、白细胞介素(interleukin, IL)-1、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 等炎症细胞因子;功能异常的Treg细胞不能正常发挥调节免疫反应的功能,且可能通过分泌IL-17炎症因子,共同刺激B细胞的成熟分化,抗体表位的转换,最终导致神经肌肉接头的传递功能受损及肌无力症状<sup>[3-4]</sup>。因此,明确CD4<sup>+</sup>T细胞异常调节的原因,在MG的发生发展及治疗中具有十分重要的意义<sup>[5]</sup>。越来越多的研究表明,CD4<sup>+</sup>T细胞的异常活化增殖及各亚群之间的相互转化受转录因子、表观遗传学和转录翻译后等多种因素调控<sup>[6]</sup>。近年来,随着非编码RNA表观遗传学在调控免疫细胞中发挥越来越重要的作用,已成为免疫学领域研究的热点。我们前期的研究也发现,长链非编码RNA IFNG-AS1在中MG中异常表达,影响HLA-DRB1等基因的表达,还影响CD4<sup>+</sup>T细胞的激活<sup>[7]</sup>。

环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类不具有5'端帽子和3'端poly(A)尾巴,以共价键形成环状结构的非编码RNA。circRNA在哺乳动物体内大量存在,因其闭环结构不易被核酸外切酶RNaseR降解,具有高度保守性和稳定性的特点<sup>[8]</sup>。circRNAs通过不同作用机制在疾病的形成和发展中发挥重要作用。circRNAs通常具有组织限制性和癌症特异性表达模式。有研究表明,这些分子具有潜在的临床应用价值,可作为诊断疾病和预测预后的生物标志物<sup>[9]</sup>。Dong等<sup>[10]</sup>通过接受免疫检测点治疗(immune checkpoint blockades, ICB)的晚期黑色素瘤患者的circRNA表达谱发现,circFAM117B等可通过miR-142-5p/PD-L1轴增加PD-L1的表达,从而降低T细胞活性,引起免疫逃逸。虽然circRNA的作用功能很广泛,但是circRNA在MG中的研究比较少<sup>[11-12]</sup>。Lv等<sup>[13]</sup>利用circRNA芯片筛选了MG中差异的circRNA,hsa\_circ\_0047056和hsa\_circ\_5333-4在MG中高表达,随后验证了hsa\_circ\_5333-4可以作为MG的一个临床诊断的生物标志物。但是对hsa\_circ\_0047056并未进一步的研究。

本研究首先验证hsa\_circ\_0047056在MG中的表达,随后通过干扰和过表达hsa\_circ\_0047056在Jurkat细胞中的表达,探索过表达hsa\_circ\_0047056与T细胞激活的

相关性,以及相关炎症因子表达的情况。以明确circ\_0047056在MG中的异常表达与T细胞的异常激活的关系,为MG患者的治疗提供新的依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

本研究的研究对象包括2021年3月至2023年8月在中南大学湘雅医院就诊的36例MG门诊患者(MG组)及10例正常对照者(对照组)。

MG组入组标准:(1)具有典型MG临床特征,并至少具备下列条件之一可确诊为MG,即①新斯的明试验阳性或胆碱酯酶抑制药治疗有效;②肌电图低频重复电刺激阳性和(或)单纤维肌电图阳性;③AchR-Ab检测阳性<sup>[14]</sup>。(2)入组前6个月内未使用免疫调节剂和(或)胸腺切除治疗。(3)对本研究知情同意。

MG组排除标准:(1)合并肿瘤、HIV感染;(2)合并严重并发症;(3)妊娠/哺乳期女性;(4)入组前1个月内或治疗过程中行血浆置换或丙种球蛋白治疗;(5)治疗过程中加用免疫抑制剂和(或)停用激素;(6)合并其他自身免疫性疾病。

对照组入组标准:(1)体检各项指标正常,无自身免疫性疾病病史、肿瘤病史及手术史;(2)入组前3个月未服用任何药物;(3)对本研究知情同意。

签订知情同意后,收集受试者的外周静脉血标本及相关临床资料。本研究通过了中南大学湘雅医院医学伦理委员会的伦理审查(批准号:202103344)。

各组年龄、性别之间差异均无统计学意义( $P < 0.05$ ),其临床相关信息见表1。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 量化MG患者疾病严重程度

采用定量MG(QMG)评分来量化MG患者的疾病严重程度。

#### 1.2.2 RNA的提取

采用红细胞裂解法提取MG患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),然后采用试剂盒提取外周血PBMC的RNA。

#### 1.2.3 hsa\_circ\_0047056沉默及过表达细胞验证

通过siDirect version 2.1设计hsa\_circ\_0047056的siRNA序列(5'UUAACAUGGCAUCUUCGACAC'GUCCAAGAUGCCAUGUUAAGU3),合成siRNA。同时通过化学合成hsa\_circ\_0047056 ORF序列,构建至过表达质粒PCD3.1(+),构建重组质粒PCD3.1-hsa\_circ\_0047056,转化大肠杆菌,挑选阳性克隆,测序验证,扩大培养,采用

表1 MG患者的一般临床资料

编号	年龄/岁	性别	病程	QMG评分/分	胸腺CT	AchR(ELISA)/(mmol/L)	编号	年龄/岁	性别	病程	QMG评分/分	胸腺CT	AchR(ELISA)/(mmol/L)
1	42	女	10个月	25	n	/	19	60	女	4个月	6	n	5.15
2	53	男	13个月	24	n	36.18	20	35	女	12个月	3	n	/
3	46	男	17个月	17	胸腺瘤	/	21	51	女	6个月	9	胸腺瘤	27.59
4	22	男	5年	11	n	40.23	22	35	女	1个月	4	胸腺瘤	0.06
5	59	男	1个月	6	胸腺瘤	21.88	23	47	女	5年	4	n	1.43
6	40	女	18个月	28	n	/	24	26	男	1个月	6	n	/
7	23	女	5个月	20	n	12.72	25	24	女	6个月	8	n	9.34
8	50	女	2年	21	n	/	26	68	男	4年	10	n	0.74
9	37	男	6个月	16	n	18.36	27	29	女	2个月	6	胸腺瘤	0.26
10	55	女	6年	18	n	3.52	28	25	女	1个月	5	n	/
11	23	女	3个月	9	n	31.13	29	59	女	1个月	10	n	3.32
12	14	男	12年	7	胸腺瘤	/	30	28	女	12个月	15	n	/
13	16	男	1个月	13	n	5.15	31	56	男	3年	11	n	0.08
14	25	男	2个月	16	n	0.74	32	60	女	5个月	4	n	0.35
15	42	男	4年	15	胸腺瘤	/	33	32	女	5个月	8	n	/
16	32	女	18个月	4	n	0.06	34	40	女	20个月	18	n	27.59
17	48	女	1个月	4	n	13.78	35	59	男	30个月	18	n	1.92
18	37	男	8个月	4	n	0.08	36	40	男	20个月	8	n	9.34

注:QMG评分=定量MG评分;n=无胸腺瘤;/=未进行该项检查。

OMEGA(bio-tek)公司提供的Fastfilter Endo-Free Plasmid Maxi Kit试剂盒,提取质粒。

Jurkat T细胞培养于含10%的FBS加1%双抗1640培养基中。将培养基置于37℃含5%二氧化碳的饱和湿度培养箱中。利用脂质体3000转染circ\_0047056的过表达质粒和干扰siRNA及对照,其方法见参考文献<sup>[7]</sup>。37℃培养箱中培养24h后,提取RNA,通过实时PCR检测siRNA的效率。hsa\_circ\_0047056的引物是:正向5'-TCCAAAATCACAAAGGCCATGA-3';反向5'-TCTAAGTGATCTCTGTGGCAC-3'。验证过表达和干扰效率。

1.2.4 Jurkat细胞的转染和刺激

Jurkat细胞的转染和刺激方法见参考文献<sup>[7]</sup>。Jurkat细胞接种于24孔板中,每孔约1×10<sup>6</sup>个细胞,按照说明书转染si-hsa\_circ\_0076490 siRNA和过表达质粒。置于37℃含有5%二氧化碳的培养箱中继续培养24h。给予25ng/mL的PMA和500ng/mL的离子霉素刺激,继续培养4h后收获细胞和培养上清液。酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测培养上清液中细胞因子的分泌。

1.2.5 CD4<sup>+</sup>T细胞活化的流式检测

流式细胞学检测Jurkat细胞转染后细胞表面CD69的表达,转染24h后细胞,1000转/min离心5min,弃上清,加入0.5mL的1×PBS液重悬细胞,细胞计数5×10<sup>6</sup>个。4℃,400转/min,离心5min,小心吸弃上清后,使用涡旋震荡器震荡EP管管底,以确保管底的沉淀物或残留液体得到充分地混合或分散,加入200μL的PBS液重悬细胞,

分装为2管,其中1管加入转染后的细胞作为空白对照管;避光加入流式抗体CD69,对照空白管不加抗体;混匀后4℃避光孵育30min;每管加入1mL的PBS液洗涤未结合的抗体,4℃,400转/min离心5min;重复步骤洗涤1次;每管加入300μL的PBS液重悬细胞,4℃,避光保存,用流式细胞仪检测细胞表面CD69的表达。

1.2.6 ELISA检测

采用ELISA(ELISA Ready-Set-Go, ebioscience)试剂盒,按照说明书操作,检测培养上清中IL-1β、IL-2、IL-6、IL-4、IL-17、TNF-α的浓度。

1.3 统计学方法

采用Graphpad Prism 5.01软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用双尾法t检验。两变量之间的相关性采用皮尔逊相关系数分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hsa\_circ\_0047056在MG患者PBMC中的表达

与对照组相比较, MG组患者PBMC中hsa\_circ\_0047056的表达明显上调,差异有统计学意义(P<0.05)。MG不合并胸腺瘤患者hsa\_circ\_0047056的表达较MG合并胸腺瘤患者低,差异不具有统计学意义(P>0.05)。见表2、表3。

PBMC中hsa\_circ\_0047056的表达与MG患者临床症状严重度评分(QMG评分)呈正相关(r=0.336, P=0.045;图1A)。PBMC中hsa\_circ\_0047056的表达与MG患者血清AchR-Ab浓度呈正相关(r=0.519, P=0.013;图1B)。

表2 hsa\_circ\_0047056在MG患者与正常对照中表达的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	hsa_circ_0047056的相对表达
MG患者	36	3.16±1.67
正常对照	10	1.47±0.49
t值		3.141
P值		0.003

表3 hsa\_circ\_0047056在不同类型MG患者中表达的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	hsa_circ_0047056的相对表达
MG不合并胸腺瘤	30	3.18±1.58
MG合并胸腺瘤	6	2.62±1.27
t值		0.821
P值		0.417

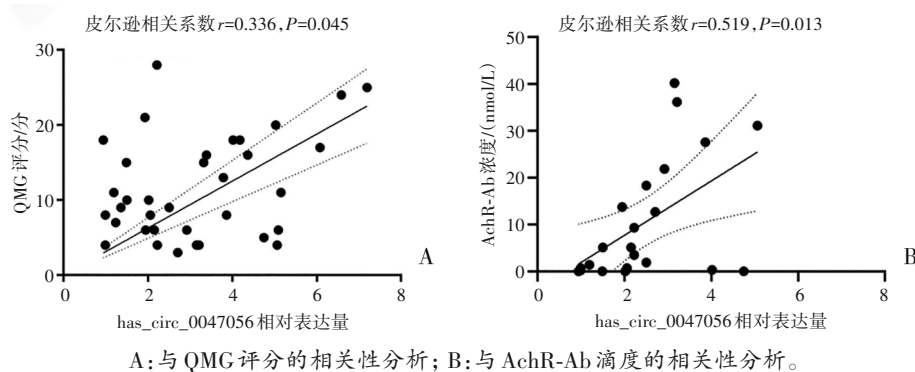


图1 hsa\_circ\_0047056在MG患者PBMC中的表达与临床表现相关性分析

2.2 hsa\_circ\_0047056对Jurkat细胞活化的影响

hsa\_circ\_0047056 过表达质粒和 siRNA,通过转染 Jurkat 细胞后,采用实时 PCR 检测效率,hsa\_circ\_0047056 转染后较对照组表达水平升高,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。而 hsa\_circ\_0047056 干扰后其表达降低,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表4、表5。

表4 hsa\_circ\_0047056过表达质粒效率检测 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	hsa_circ_0047056的相对表达
hsa_circ_0047056过表达	5.80±0.26
过表达对照	1.00±0.18
t值	22.110
P值	0.001

表5 hsa\_circ\_0047056 siRNA干扰效率检测 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	hsa_circ_0047056的相对表达
hsa_circ_0047056干扰	0.56±0.13
干扰对照	1.00±0.16
t值	5.365
P值	0.006

采用脂质体转染 hsa\_circ\_0047056 过表达质粒和 siRNA 及对照,应用流式细胞学检测转染后 Jurkat 细胞表面 CD69 的表达,与对照组相比,hsa\_circ\_0047056 过表达后,CD69 的比例明显上升,而干扰 hsa\_circ\_0047056 过表

达后,CD69 的比例明显下降,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表6、表7、图2。

表6 hsa\_circ\_0047056 过表达质粒对 CD69 阳性细胞的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	CD69 阳性细胞/%
hsa_circ_0047056 过表达	71.30±1.47
过表达对照	62.63±2.84
t值	10.730
P值	0.005

表7 hsa\_circ\_0047056 siRNA 干扰对 CD69 阳性细胞的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	CD69 阳性细胞/%
hsa_circ_0047056 干扰	67.93±2.34
干扰对照	75.57±2.06
t值	6.471
P值	0.007

2.3 hsa\_circ\_0047056 干预后对细胞因子的影响

检测了转染刺激 24 h 后 Jurkat 细胞培养上清液中细胞因子及 T 细胞亚群细胞相关细胞因子的变化,转染 hsa\_circ\_0047056 可以使炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6 和 TNF- $\alpha$  上升,而干扰 hsa\_circ\_0047056 可以使这些炎症因子下调(表8、表9)。但是对 IL-4 和 IL-17 的分泌却无明显影响(表10、表11)。

表8 hsa\_circ\_0047056过表达质粒对IL-1β、IL-2、IL-6和TNF-α表达的影响 (x̄±s)

组别	IL-1β/(pg/mL)	IL-2/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
hsa_circ_0047056 过表达	31.42±1.53	20.56±2.11	39.76±4.21	5.09±0.52
过表达对照	18.56±0.51	11.64±0.96	20.57±0.68	3.83±0.47
t值	13.740	6.651	7.797	3.108
P值	0.002	0.002	0.015	0.036

表9 hsa\_circ\_0047056 siRNA 干扰对IL-1β、IL-2、IL-6和TNF-α表达的影响 (x̄±s)

组别	IL-1β/(pg/mL)	IL-2/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
hsa_circ_0047056 干扰	11.45±1.54	7.44±1.24	13.49±1.06	3.16±0.34
干扰对照	18.44±1.55	11.64±0.96	20.38±1.13	4.05±0.12
t值	4.932	2.984	5.415	4.292
P值	0.005	0.040	0.005	0.012

表10 hsa\_circ\_0047056过表达质粒对IL-4和IL-17表达的影响 (x̄±s)

组别	IL-4/(pg/mL)	IL-17/(pg/mL)
hsa_circ_0047056 过表达	18.76±4.36	25.41±1.31
过表达对照	20.83±1.33	23.13±2.22
t值	0.787	1.535
P值	0.474	0.199

表11 hsa\_circ\_0047056 siRNA 干扰对IL-4和IL-17表达的影响 (x̄±s)

组别	IL-4/(pg/mL)	IL-17/(pg/mL)
hsa_circ_0047056 干扰	20.50±1.59	25.71±3.65
干扰对照	19.38±1.58	26.28±2.24
t值	0.858	0.232
P值	0.439	0.828

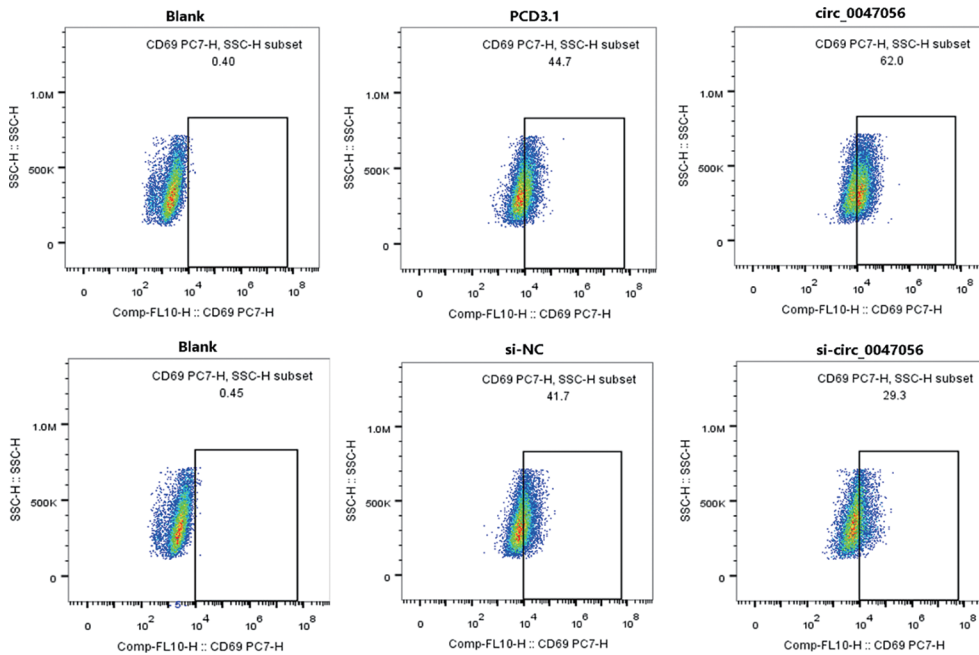


图2 流式细胞仪检测过表达和干扰circ\_0047056对Jurkat细胞表面分子CD69活化影响示意图

3 讨论

异常活化的CD4<sup>+</sup>T细胞参与了MG的发病,特别是其亚群细胞Th1/Th2/Th17/Treg之间的平衡在维持体内正常免疫反应中起至关重要的作用<sup>[6,15]</sup>。激活后的自身反应性CD4<sup>+</sup>T细胞会不断增殖并分化,导致各亚群细胞比例失衡。这些异常的T细胞会分泌过多的促炎性细胞因子,而功能异常的Treg则无法有效地调节这种过度的免

疫反应。此外,这些功能异常的Treg还会分泌炎症细胞因子,与异常分泌的促炎性细胞因子共同刺激B细胞的成熟与分化<sup>[16]</sup>。

异常激活的CD4<sup>+</sup>T细胞及其亚群(包括Th1、Th2、Th17和Treg)之间的比例与功能失调,会导致体内的免疫紊乱和过度免疫反应。这种失调促使浆细胞产生更多的抗体,从而参与MG的发生和发展过程。CD69作为T细

胞激活早期的标志物,表达于激活的CD4<sup>+</sup>T细胞上,其受体也在T细胞活化的早期阶段表达,因此常被用作T细胞活化的标志<sup>[17]</sup>。本研究的结果显示,hsa\_circ\_0047056在MG患者PBMC中表达上升。hsa\_circ\_0047056过表达质粒转染后Jurkat细胞表面CD69的表达上升,T细胞的活化增加,分泌的炎性细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平明显增加,而在转染针对hsa\_circ\_0047056的干扰siRNA(si-hsa\_circ\_0047056)后,观察到CD69的表达水平显著下降,并且炎症因子的表达也随之降低。这一结果表明,hsa\_circ\_0047056具有刺激作用,能够影响MG患者T细胞与自身B细胞共培养体系中B细胞产生的抗体水平。具体而言,当hsa\_circ\_0047056的表达被干扰后,B细胞产生的抗体水平明显下降。既往有研究发现,CD4<sup>+</sup>T细胞活化可以促进Th1、Th17亚群细胞亚群向Th2、Treg亚群转化<sup>[18]</sup>,另外,IL-2对T细胞各亚群细胞的活化均有影响,本研究转染了hsa\_circ\_0047056均使Th1和Th2亚群细胞分泌的细胞因子IL1和IL2产生了明显的影响,对其他亚群细胞影响不大。AChR-Ab是MG最常见的致病抗体,大约80%的MG患者血清中有AChR-Ab,AChR-Ab对MG的诊断具有重要价值,但其与疾病严重程度之间的关系存在争议<sup>[19]</sup>。

有文献表明,AChR-Ab滴度与疾病严重程度成正比<sup>[20]</sup>。高AChR-Ab浓度的MG患者易从眼肌型进展为全身型。同时通过影响分泌细胞因子的表达,从而影响AChR-Ab的表达。这些研究结果为我们提供了合理解释,即在本研究中观察到的MG患者体内hsa\_circ\_0047056的表达水平与AChR-Ab的滴度之间存在正相关。

在Li等<sup>[6]</sup>的研究中,通过构建lncRNA芯片筛选鉴定了563个差异的lncRNAs分子,450个mRNA分子以及19个差异的转录因子,构建了差异表达网络。同时发现,Fos1能与LINK01566的启动子区结合,从而影响LINK01566的表达,调控MG患者中CD4<sup>+</sup>T细胞的活化。

在本研究中,通过对hsa\_circ\_0047056的基因序列进行分析,hsa\_circ\_0047056是基因ROCK1中的一段非编码RNA序列。有研究提示,Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK1和ROCK2)是两种同工型,其激酶结构域具有92%的同源性,当与GTP结合形式的Rho结合时被激活,从而调节下游靶标的磷酸化<sup>[21]</sup>。ROCK1和ROCK2参与了各种细胞活动,包括细胞形状、迁移能力、增殖和凋亡<sup>[22]</sup>。ROCK1和ROCK2是发生肿瘤、心血管疾病以及小鼠自身免疫疾病的重要分子。此外,ROCK1也被证实参与T细胞受体信号传导和T细胞抗原的递呈效应<sup>[23]</sup>。ROCK1和ROCK2抑制或ROCK1敲低会干扰髓系细胞中的CD80、CD86、MHC-II表达以及IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS和TNF生成。同时,髓系细胞中的NF- $\kappa$ B信号传导减少<sup>[24]</sup>。总之,ROCK1和ROCK2抑制会在多个层面干扰免疫激

活。本研究发现,hsa\_circ\_0047056能够激活T细胞的活化,但是否通过参与调控ROCK1的表达或者具有其肽段相似的功能,还有待研究。

综上所述,MG患者中高表达的hsa\_circ\_0047056与QMG评分和AChR-Ab滴度呈正相关,过表达hsa\_circ\_0047056能够激活T细胞的活化,增加炎症的因子的表达参与MG疾病的进展。

#### 参 考 文 献

- [1] IORIO R. Myasthenia gravis: the changing treatment landscape in the era of molecular therapies[J]. Nat Rev Neurol, 2024, 20(2): 84-98.
- [2] MARCUS R. What is myasthenia gravis?[J]. JAMA, 2024, 331(5): 452.
- [3] JIN WL, YANG Q, PENG YY, et al. Single-cell RNA-seq reveals transcriptional heterogeneity and immune subtypes associated with disease activity in human myasthenia gravis[J]. Cell Discov, 2021, 7(1): 85.
- [4] LIU XX, MA Q, QIU L, et al. Quantitative features and clinical significance of two subpopulations of AChR-specific CD4<sup>+</sup>T cells in patients with myasthenia gravis[J]. Clin Immunol, 2020, 216: 108462.
- [5] WENG SH, HUANG LW, CAI BX, et al. Astragaloside IV ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by regulating CD4<sup>+</sup>T cells and altering gut microbiota[J]. Chin Med, 2023, 18(1): 97.
- [6] LI LF, LI DY, JIN JN, et al. FOSL1-mediated LINC01566 negatively regulates CD4<sup>+</sup>T-cell activation in myasthenia gravis[J]. J Neuroinflammation, 2024, 21(1): 197.
- [7] LUO MC, LIU XF, MENG HY, et al. IFNA-ASI regulates CD4<sup>+</sup>T cell activation in myasthenia gravis through HLA-DRB1[J]. Clin Immunol, 2017, 183: 121-131.
- [8] CHEN LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(8): 475-490.
- [9] KRISTENSEN LS, JAKOBSEN T, HAGER H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(3): 188-206.
- [10] DONG Y, GAO Q, CHEN Y, et al. Identification of CircRNA signature associated with tumor immune infiltration to predict therapeutic efficacy of immunotherapy[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2540.
- [11] KONG XT, WU T, CAI HL, et al. Construction of ceRNA network mediated by circRNAs screening from microarray and identification of novel biomarkers for myasthenia gravis[J]. Gene, 2024, 918: 148463.
- [12] LAI XY, BI ZJ, YANG XL, et al. Upregulation of circ-FBL promotes myogenic proliferation in myasthenia gravis by regulation of miR-133/PAX7[J]. Cell Biol Int, 2021, 45(11): 2287-2293.

- [13] LV J, REN L, HAN SS, et al. Peripheral blood hsa-circRNA5333-4: a novel biomarker for myasthenia gravis[J]. Clin Immunol, 2021, 224: 108676.
- [14] 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. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2012, 19(6): 401-408
- [15] MA Q, RAN H, LI YK, et al. Circulating Th1/17 cells serve as a biomarker of disease severity and a target for early intervention in AChR-MG patients[J]. Clin Immunol, 2020, 218: 108492.
- [16] HU YX, WANG J, RAO J, et al. Comparison of peripheral blood B cell subset ratios and B cell-related cytokine levels between ocular and generalized myasthenia gravis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 106130.
- [17] YU L, YANG F, ZHANG FH, et al. CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 905.
- [18] WIGGINS BG, PALLETT LJ, LI XY, et al. The human liver microenvironment shapes the homing and function of CD4<sup>+</sup> T-cell populations[J]. Gut, 2022, 71(7): 1399-1411.
- [19] ROMI F, HONG Y, GILHUS NE. Pathophysiology and immunological profile of myasthenia gravis and its subgroups[J]. Curr Opin Immunol, 2017, 49: 9-13.
- [20] ULLAH U, IFTIKHAR S, JAVED MA. Relationship between low and high anti - acetylcholine receptor antibody titers and clinical severity in myasthenia gravis[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2021, 31(8): 965-968.
- [21] KALE A, ŞENER EF, GÜNAY NE, et al. Evaluation of the rs35996865 polymorphism of the *ROCK1* gene in sepsis[J]. Rev Assoc Med Bras (1992), 2022, 68(5): 586-590.
- [22] MAAS - BAUER K, STELL AV, YAN KL, et al. *ROCK1/2* signaling contributes to corticosteroid - refractory acute graft - versus-host disease[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 446.
- [23] YANG WJ, ZHOU GX, YU TM, et al. Critical role of ROCK2 activity in facilitating mucosal CD4<sup>+</sup> T cell activation in inflammatory bowel disease[J]. J Autoimmun, 2018, 89: 125-138.
- [24] ZANIN-ZHOROV A, BLAZAR BR. ROCK2, a critical regulator of immune modulation and fibrosis has emerged as a therapeutic target in chronic graft - versus - host disease[J]. Clin Immunol, 2021, 230: 108823.

责任编辑:龚学民