

类风湿关节炎活动期患者血浆外泌体 miRNAs 差异表达筛选与生物信息学分析及验证

陆 健¹, 冯 萍¹, 吴 静², 杨 欢¹

(1. 苏州大学附属第二医院, 江苏苏州 215004; 2. 苏州市广济医院, 江苏苏州, 215137)

摘要: **目的** 筛选类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 活动期患者和健康体检者血浆外泌体 (exosomes) 中差异表达的微小核糖核酸 (microRNAs, miRNAs), 并进行生物信息学分析, 以探讨血浆外泌体 miRNAs 在 RA 致病中的作用及其潜在临床应用价值。 **方法** 选取 2023 年 01 ~ 04 月就诊于苏州大学附属第二医院风湿免疫科的 39 例 RA 患者作为研究对象, 同时选取 39 例健康体检者作为正常对照。利用 Illumina 高通量测序技术检测血浆外泌体中 miRNAs 的表达水平, 以 $\log_2(\text{Fold Change})$ 绝对值 >1 和 P 值 <0.05 为条件获得差异表达的 miRNAs。按照 P 值从小到大的顺序挑选 6 条 miRNAs 进行生物信息学分析, 并利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time fluorescence PCR, qRT-PCR) 验证。 **结果** 与对照组相比, RA 患者血浆外泌体中存在 22 条异常表达的 miRNAs, 4 条上调, 18 条下调。其中, miR-30b-5p, miR-144-3p, miR-20a-5p, miR-223-5p, miR-425-3p 和 miR-589-5p 的水平变化显著。GO 和 KEGG 富集分析结果显示, 差异表达的 miRNAs 可能通过调节转化生长因子- β (TGF- β) 和 PI3K/AKT 信号通路参与疾病进展, 涉及 Th17 细胞分化、细胞间相互作用和蛋白磷酸化等生物学过程。qRT-PCR 验证结果显示, 与对照组相比, RA 患者血浆外泌体 miR-144-3p 和 miR-425-3p 的表达水平明显降低, 差异具有统计学意义 ($t=3.617, 3.595$, 均 $P<0.001$), 而 miR-30b-5p, miR-223-5p, miR-589-5p 和 miR-20a-5p 的表达差异均无统计学意义 ($t=1.956, 1.331, 1.662, 1.861$, 均 $P>0.05$)。 **结论** RA 患者血浆外泌体的 miRNAs 表达谱发生改变, 可能通过 TGF- β 等信号通路参与疾病进展, 外泌体 miR-144-3p 和 miR-425-3p 是 RA 疾病诊断的潜在血清学标志物。

关键词: 类风湿关节炎; 外泌体; 微小核糖核酸; 生物信息学分析

中图分类号: R593.22; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 02-062-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.02.012

Bioinformatics Analysis and Validation of Differential Expression of miRNAs in Plasma Exosomes from Patients with Active Rheumatoid Arthritis

LU Jian¹, FENG Ping¹, WU Jing², YANG Huan¹ (1. the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215004, China; 2. Suzhou Guangji Hospital, Jiangsu Suzhou 215137, China)

Abstract: Objective To screen differentially expressed microRNAs (miRNAs) in plasma exosomes of active rheumatoid arthritis (RA) patients and healthy controls and conduct bioinformatics analysis for exploring the role and potential clinical application value of miRNAs in the pathogenesis of RA. **Methods** From January 2023 to April 2023, 39 RA patients who visited the Rheumatology and Immunology Department of the Second Affiliated Hospital of Soochow University were selected as the study subjects, while 39 healthy individuals were selected as normal controls. The expression levels of miRNAs in plasma exosomes were detected by Illumina high-throughput sequencing technology, and the differentially expressed miRNAs were obtained by $\log_2(\text{Fold Change})$ absolute value >1 and P value <0.05 . Six miRNAs were selected by the order from small to large P -value for bioinformatics analysis and validated using quantitative real-time fluorescence PCR (qRT-PCR). **Results** Compared with healthy controls, 22 aberrantly expressed miRNAs were detected in plasma exosomes of RA patients, of which 4 were up-regulated and 18 were down-regulated. Among them, miR-30b-5p, miR-144-3p, miR-20a-5p, miR-223-5p, miR-425-3p, and

基金项目: 江苏省卫健委医学科研项目 (Z 2023043): 类风湿关节炎相关血浆外泌体 miR-144-3p 活化 B 细胞促进自身抗体产生及其应用价值的研究; 江苏省妇幼保健协会科研项目 (FYX202123): 血清及血清外泌体来源的 hsa_circ_0065214 在乳腺癌中的作用机制及临床应用研究; 苏州市科技计划项目 (关键技术) (SKY2021045): 血清及血清外泌体来源 circSCAP_020 作为乳腺癌新型肿瘤标志物的技术应用研究; 苏州大学附属第二医院科研预研基金 (SDFEYBS2203): 类风湿性关节炎患者血浆外泌体调控 B 细胞异常分化及其致病机制研究。

作者简介: 陆健 (1993-), 男, 博士, 主管技师, 主要从事临床检验诊断学及医学免疫学, E-mail: ljsdf2y@163.com。

通信作者: 杨欢 (1982-), 女, 博士, 主任技师, 主要从事临床检验诊断学及分子生物学, E-mail: zjyhcherry@126.com。

miR-589-5p showed changed significantly. GO and KEGG enrichment analysis indicated that differentially expressed miRNAs may be involved in disease progression through regulation of signaling pathways such as TGF- β and PI3K/AKT, which were related to biological processes such as Th17 differentiation, intercellular interactions, and protein phosphorylation. The qRT-PCR validation results showed that the expression of miR-144-3p and miR-425-3p were significantly reduced in plasma exosomes of RA patients compared to healthy controls ($t=3.617, 3.595$, all $P<0.001$), while the differences of miR-30b-5p, miR-223-5p, miR-589-5p, and miR-20a-5p expression were not statistically significant ($t=1.956, 1.331, 1.662, 1.861$, all $P>0.05$). **Conclusion** The expression profile of plasma exosomal miRNAs changed in RA patients, which may be involved in disease progression through TGF- β and other signaling pathways. Exosome-derived miR-144-3p and miR-425-3p may be potential serological markers for RA diagnosis.

Keywords: rheumatoid arthritis; exosomes; miRNAs; bioinformatics analysis

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是我国临床重大难治性自身免疫性疾病, 其特征是受累关节出现不可控的炎症和软骨破坏, 最终导致关节功能障碍和畸形。多数患者来院诊治时已进入疾病中后期, 常规药物虽能抑制疾病的进展, 缓解临床症状, 但无法根治^[1]。因此, RA 的早期诊断至关重要。但截止目前, 临床上仍缺乏有效的早期诊断标志物。

外泌体 (exosomes) 是一种细胞分泌的微小囊泡, 能够选择性携带来源细胞的核酸和蛋白分子, 参与细胞间的信号通讯^[2-5]。研究表明, 炎性细胞分泌的外泌体在 RA 中具有致病性^[6-8], 探究 RA 患者外泌体的性质变化可以揭示疾病的发病机制。此外, 被包裹的生物分子受到外泌体双层膜结构的保护, 性质稳定, 不易降解, 作为疾病标志物显示出了巨大的临床应用前景^[9]。本研究聚焦于 RA 患者血浆来源外泌体, 利用高通量测序技术筛选异常表达的 miRNAs, 并利用 qRT-PCR 进行验证。同时, 通过靶基因预测、基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析等生物信息分析手段, 挖掘其可能参与的信号网络和生物学过程, 以期探究血浆外泌体 miRNAs 在 RA 疾病进展中的作用及其可能的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2023 年 01 ~ 04 月在苏州大学附属第二医院风湿免疫科就诊的 39 例 RA 患者作为实验组。其中, 男性 9 例, 女性 30 例, 平均年龄 58.67 ± 2.02 岁。所有患者均处于疾病活动期。同时, 选取 39 例健康体检者作为对照组。其中, 男性 9 例, 女性 30 例, 平均年龄 56.05 ± 1.98 岁。两组之间性别组成一致, 年龄差异无统计学意义 ($t=0.924, P>0.05$)。收集血浆样本, 提取外泌体, 并从两组中随机抽取 10 例样本用于外泌体的含量比较, 9 例样本用于 small RNA 高通量测序, 20 例样本用于 qRT-PCR 验证。RA 患者纳入标准: ① RA 患者符合 2009 年美国风湿病学会修订的类

风湿关节炎的诊断标准; ②无既往病史, 且处在疾病活动期 ($\text{DAS28} \geq 2.6$); ③无其他自身免疫性疾病; ④标本采集得到患者知情同意。健康对照者纳入标准: ①血细胞检测正常; ②无自身免疫性疾病病史; ③血清类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)、抗环瓜氨酸肽 (cyclic citrullinated peptide, CCP) 抗体、C 反应蛋白 (C reactive protein, CRP) 和红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR) 均正常; ④抗核抗体定量阴性; ⑤标本采集得到本人知情同意。

1.2 仪器与试剂 纳米颗粒追踪分析仪 (ZetaView[®], Particle Metrix); 透射电镜 (G2 spirit FEI, Tecnai); 测序仪 (HiSeq[™] 2500, Illumina); 实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96, Bio Rad); 电泳仪 (Basic, Bio-Rad); 化学发光成像仪 (ImageQuant LAS 4010, GE Healthcare); 酶标仪 (800 TS, BioTek); ExoQuick-TCTM 外泌体提取试剂和 CD63-ExoELISA 定量试剂盒 (SBI); BCA 蛋白定量试剂盒 (康为世纪); CD63, CD9 和 Calnexin 抗体 (Abcam); TSG101 抗体 (Santa cruz); TRIZOL 总 RNA 抽提试剂 (Thermo Fisher); TruSeq small RNA 样本制备试剂盒 (Illumina); miRNA 引物 (上海生工); miRNA 逆转录试剂盒和定量 PCR 试剂盒 (锐博生物)。

1.3 方法

1.3.1 血浆外泌体的制备与鉴定: 所有研究对象均采集空腹静脉血 (EDTA-K₂ 抗凝) 5 ml, 并在 2h 内完成血浆分离 (3 000 r/min, 4℃离心 10 min)。将上层淡黄色血浆转移至离心管 (无 RNA 酶) 中, 进行第二次离心 (3 000 g, 4℃离心 15min), 以充分去除细胞碎片。收集上清进行第三次离心 (12 000 g, 4℃离心 10min)。三次离心后, 0.22 μm 滤器过滤血浆。将 400 μl 血浆与 100 μl ExoQuick-TCTM 外泌体提取试剂混合, 充分震荡后 4℃静置 30 min; 最后, 1 500 g, 4℃离心 30min, 弃掉上清, 沉淀即为外泌体。利用 BCA 蛋白定量试剂盒检测外泌体蛋白浓度; 利用纳米颗粒追踪分析仪检测外泌体粒径分布; 利用 CD63-ExoELISA 试剂盒检测

血浆外泌体粒子数;利用透射电镜对外泌体进行形态学观察;利用 Western blot 检测外泌体特征性蛋白 CD63, CD9, TSG101 和 Calnexin 的表达。

1.3.2 外泌体 small RNA 高通量测序:收集 9 例处于疾病活动期的 RA 患者(将随机的 3 例合并成 1 组,共计 3 组)和 9 例健康对照者血浆样本(将随机的 3 例合并成 1 组,共计 3 组)。采用 Trizols 法提取血浆外泌体中的总 RNA,构建 small RNA 文库后利用 Illumina HiSeq™ 2500 测序平台进行测序分析,以得到差异表达的 miRNAs。

1.3.3 miRNA 靶基因的预测、KEGG 和 GO 富集分析:联合应用 TargetScan, miRDB, miRTarBase 和 miRWalk 四款软件预测 miRNA 的靶基因,条件为至少有两个数据库预测到同一靶基因。以 $P < 0.05$ 为显著性阈值,利用 GO 富集分析发现与靶基因相关的分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)和细胞组成(cellular component, CC)。利用 KEGG 富集分析发掘与靶基因相关的信号转导及疾病通路。

1.3.4 qRT-PCR 检测方法:利用 Trizol 法提取 RA 组和健康对照组外泌体 RNA, poly(A) 加尾后,使用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。应用 SYBR Green 进行 qRT-PCR 扩增分析,反应体系为 20 μ l, 条件为: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 20s,

循环 40 次, 70 $^{\circ}$ C 10s。以 RNU6 作为其内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对检测结果进行分析。引物序列: hsa-miR-20a-5p: 5'-GCGTAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG-3'; hsa-miR-30b-5p: 5'-GCTGTA AACATCCTACACTCAGCT-3'; hsa-miR-144-3p: 5'-CGGCCGCTACAGTATAGATGATGT-3'; hsa-miR-223-5p: 5'-GCCGTGTATTTGACAAGCTGAGTT-3'; hsa-miR-425-3p: 5'-ATCGGGAATGTCGTGTCCGC-3'; hsa-miR-589-5p: 5'-TGAGAACCA CGTCTGCTCTGAG-3'。

1.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析,连续性变量符合正态分布者用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间的差异比较采用非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 患者血浆外泌体的鉴定和含量检测 RA 患者血浆外泌体在电镜下呈圆盘状结构,粒径在 50 ~ 150 nm 之间,见图 1A, 1B。Western blot 结果显示,所提取的外泌体表达 CD63, CD9 和 TSG101 蛋白,不表达内质网蛋白 Calnexin,见图 1C。外泌体定量结果显示,与对照组相比,RA 活动期患者血浆外泌体的含量显著升高 [$(2.06 \pm 0.08) \times 10^{11}/\text{ml}$ vs $(1.81 \pm 0.06) \times 10^{11}/\text{ml}$], 差异具有统计学意义 ($t=2.446$, $P < 0.05$)。

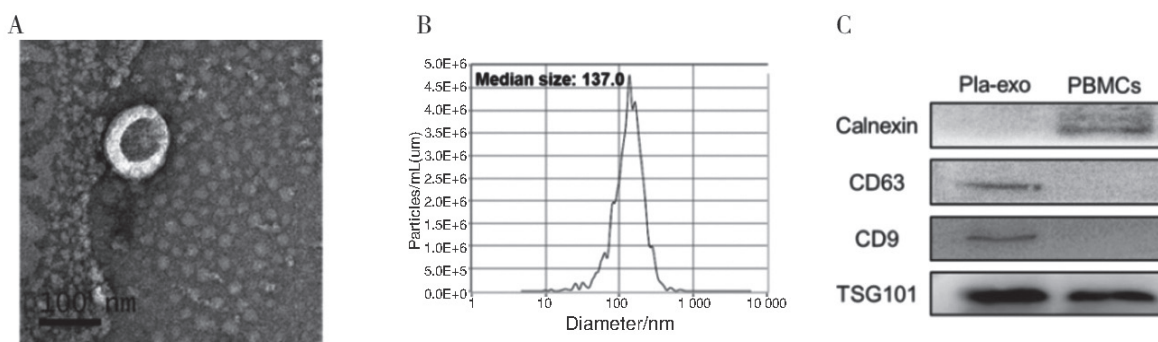


图 1 RA 患者血浆 exosomes 的鉴定

2.2 RA 患者与健康对照者血浆外泌体 miRNAs 的差异性分析 测序结果显示, RA 组样本的基因序列与健康对照组存在显著差异, RA 特异性序列占总序列的 50% 以上,见图 2A。以 $P < 0.05$ 为筛选标准,测序共发现了 22 条差异表达的 miRNAs。其中,在 RA 患者中上调的有 4 条,下调的有 18 条,见图 2B。通过查阅文献并综合考虑 P 值大小和含量变化,我们筛选出了 6 条可能与 RA 疾病相关的 miRNAs (miR-30b-5p, miR-144-3p, miR-20a-5p, miR-223-5p, miR-425-3p 和 miR-589-5p), 见图 2C。

2.3 miRNAs 靶基因的 GO 和 KEGG 富集分析 利用 miRDB, miRWalk, TargetScan 和 miR TarBase 四个

数据库对上述 6 条 miRNAs 进行靶基因预测,并进行生信分析。GO 富集分析结果显示,候选 miRNAs 所调控的靶基因主要涉及髓系细胞分化、蛋白质磷酸化以及蛋白酶体分解等生物学过程。这些基因还与 mRNA 转录、细胞间相互作用以及丝氨酸/苏氨酸激酶活性的调节有关,见图 3A。KEGG 富集分析结果显示,这些靶基因与 PI3K/AKT 和 TGF- β 等信号通路相关,并且还参与了 Th1, Th2 和 Th17 等炎症细胞的分化,提示这些差异性表达的 miRNAs 可能与 RA 疾病中的炎症发生有关,见图 3B。

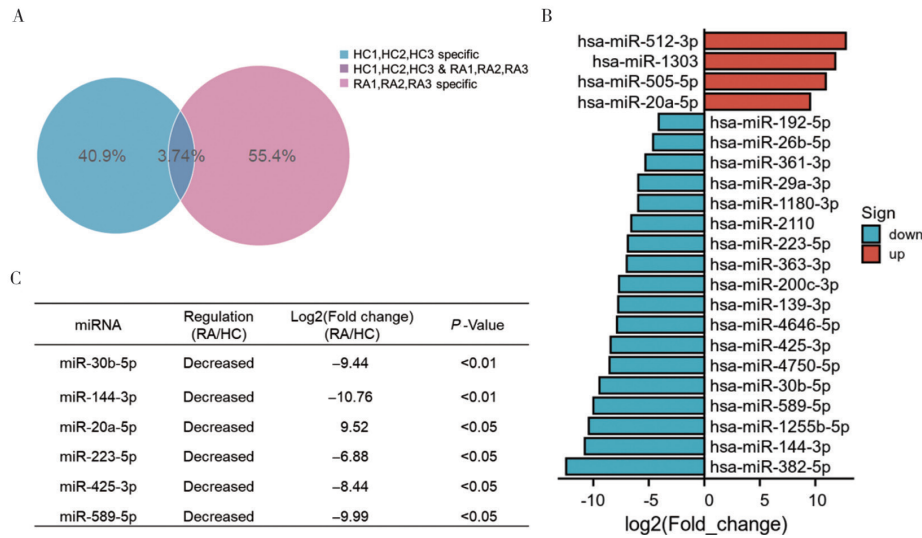


图2 RA患者与健康对照者血浆外泌体 miRNAs 的差异性分析

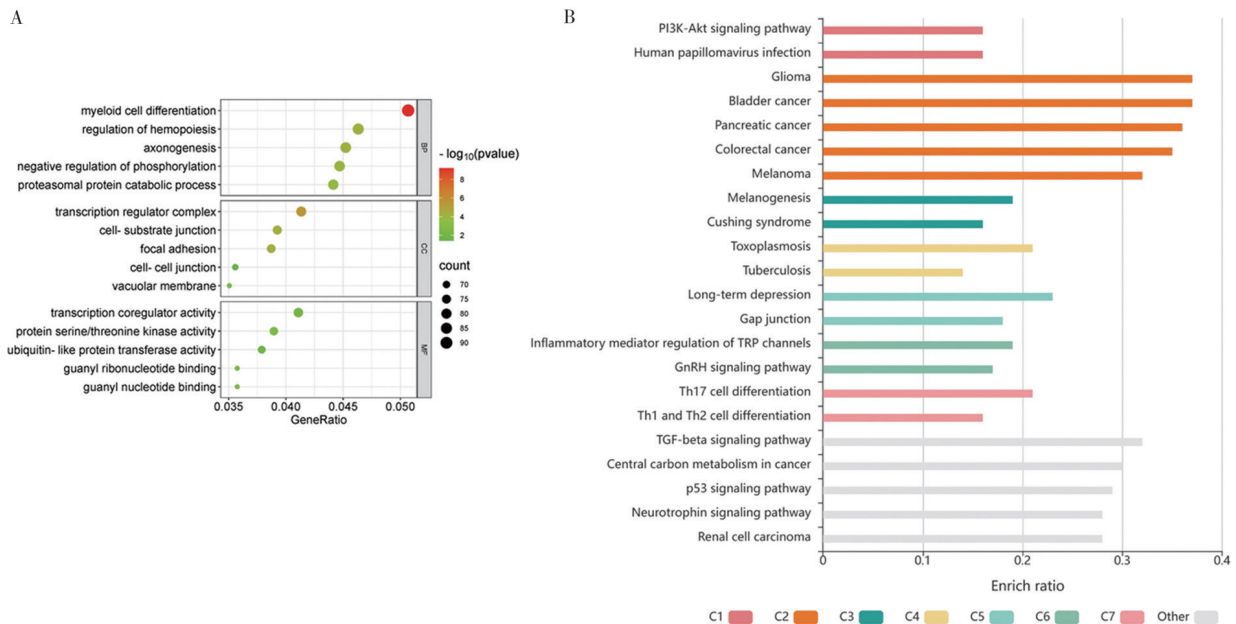


图3 miRNAs 靶基因的 GO 和 KEGG 富集分析

2.4 差异表达 miRNAs 的 qRT-PCR 验证 见表1。收集 RA 患者和健康对照者血浆样本,提取外泌体 RNA,利用 qRT-PCR 验证 miR-30b-5p, miR-144-3p, miR-20a-5p, miR-223-5p, miR-425-3p 和 miR-589-5p 的表达。结果显示,与对照组相比,RA 活动期患者血浆外泌体 miR-144-3p 和 miR-425-3p 的表达水平显著降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.001$),而 miR-20a-5p, miR-30b-5p, miR-223-5p 和 miR-589-5p 的表达差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

3 讨论

类风湿关节炎(RA)早期诊断对于疾病的预防和生活质量的改善至关重要。抗 CCP 抗体可出现于症状发生前的数月至数年间^[10],因此,该抗体的血清学检测仍被广泛应用于 RA 的诊断和预测^[11]。然而,抗 CCP 抗体并非 RA 特有,血清学阳性也可

见于其他疾病,如 Sjogren's 综合征、系统性红斑狼疮、乙肝病毒感染和心内膜炎等^[12]。值得注意的是,37% 的 RA 患者为抗 CCP 抗体阴性^[13]。对于这部分患者来说,早期诊断变得十分困难。因此,寻求新的血清学标志物对于提高 RA 早期诊断效率尤为重要。

表1 差异表达 miRNAs 的 qRT-PCR 验证 ($\bar{x} \pm s$)

miRNAs	健康对照组 (n=20)	RA 患者组 (n=20)	t 值	P 值
miR-144-5p	1.03 ± 0.08	0.63 ± 0.07	3.617	<0.001
miR-425-3p	0.97 ± 0.05	0.70 ± 0.05	3.595	<0.001
miR-20a-5p	1.56 ± 0.14	1.18 ± 0.14	1.861	0.071
miR-30b-5p	0.90 ± 0.11	0.61 ± 0.10	1.956	0.058
miR-223-5p	1.76 ± 0.22	1.43 ± 0.13	1.331	0.191
miR-589-5p	0.81 ± 0.06	1.05 ± 0.14	1.662	0.105

外泌体作为一种膜性囊泡,能够选择性包裹亲本细胞中的生物分子。与传统血清学指标相比,外泌体在血液中更稳定,是一种全新的具有巨大临床应用前景的生物标志物^[14-15]。因此,我们将生物标志物的发掘集中在血浆外泌体的 miRNAs 上,不仅因为其具有作为血清标志物的潜力^[16-18],也因为它能够调节相关致病基因的表达^[19]。研究表明,滑膜细胞中异常表达的 miRNAs (miR-23b, miR-155, miR-22 和 miR-146 等)可通过调节基质金属蛋白酶和细胞因子分泌等方式参与 RA 疾病的发展^[19-21]。此外,血浆游离 miRNAs 的水平与 RA 疾病活动和预后显著相关^[22]。其中,至少有两项研究证实 RA 患者血浆 miR-155 的水平显著高于健康对照者。有趣的是,也有研究表明,miR-155 在 RA 患者血浆中的水平是降低的,甚至没有变化。同样的,根据不同的研究报道,miR-22 在 RA 患者血浆中的变化也不一致^[22]。这种现象可能由于 miRNAs 分析技术、研究设计和疾病阶段等因素的差异引起,也可能与循环 miRNAs 在外周血中的不稳定性和短半衰期有关。由于双层膜结构保护了外泌体中的 miRNAs,使其性质稳定,半衰期长。因此,血浆中的外泌体 miRNAs 作为疾病标志物在临床应用中具有广阔前景。

在本研究中,我们发现 RA 活动期患者的血浆外泌体含量显著升高,且外泌体中有 22 条 miRNAs 异常表达。我们重点对 miR-144-3, miR-425-3p 和 miR-30b-5p 等 6 条差异表达的 miRNAs 进行生物信息学分析,并进行小样本的 qRT-PCR 验证。结果显示,这些 miRNAs 可能通过调节 TGF- β 和 PI3K/AKT 等信号通路参与疾病的发生和发展,涉及 Th17 细胞分化、细胞间相互作用和蛋白磷酸化等生物学过程。qRT-PCR 验证结果显示,miR-144-3p 和 miR-425-3p 的表达水平在 RA 患者血浆外泌体中显著下调,提示其在 RA 疾病进展中可能发挥了重要作用。有趣的是,miR-144 被证实能够通过调节巨噬细胞功能参与 RA 疾病的发生^[23-24],miR-425 也与滑膜成纤维细胞的功能失调有关^[25]。尽管如此,小规模样本分析可能产生不可靠的结果,准确的数据比较仍需大规模的前瞻性群组研究。此外,本研究仅对比了 RA 活动期患者与健康体检者血浆来源外泌体的异质性,后期评估外泌体 miRNAs 作为 RA 疾病血清学指标的应用价值仍需纳入静息期和不同发病阶段患者的相关数据。

截止目前为止,有关外泌体 miRNAs 的生物学功能和临床应用仍处于早期阶段,相关挑战仍需克服。例如:高效的外泌体提取方法和标准化流程有待开发和建立;外泌体 miRNAs 的生物学功能和具体作用方式需进一步阐明;血浆外泌体 RNA 提取

效率低下,缺乏高灵敏的外泌体 miRNAs 检测手段等。但是,随着外泌体研究的深入和相关检测技术的发展,外泌体相关指标作为新型血清学标志物也将成为可能^[26-27]。总之,通过高通量测序技术,我们在 RA 患者血浆外泌体中发现了一组差异表达的 miRNAs,证实了血浆外泌体 miR-144-3p 和 miR-425-3p 作为 RA 血清学标志物的可能性。尽管如此,这些 miRNAs 在 RA 疾病进展中的确切作用机制仍需进一步阐明,以期尽早实现血浆外泌体 miRNAs 作为 RA 疾病血清学标志物的开发和应用。

参考文献:

- [1] SPARKS J A. Rheumatoid arthritis[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2019, 170(1): ITC1-ITC16.
- [2] MAIA J, CAJA S, STRANO MORAES M C, et al. Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018, 6: 18.
- [3] BELLIN G, GARDIN C, FERRONI L, et al. Exosome in cardiovascular diseases: a complex world full of hope[J]. *Cells*, 2019, 8(2): 166.
- [4] SAEEDI S, ISRAEL S, NAGY C, et al. The emerging role of exosomes in mental disorders[J]. *Translational Psychiatry*, 2019, 9(1): 122.
- [5] LIU Wanying, BAI Xiaodan, ZHANG Ao, et al. Role of exosomes in central nervous system diseases[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2019, 12: 240.
- [6] TOFIÑO-VIAN M, GUILLÉN M I, ALCARAZ M J. Extracellular vesicles: A new therapeutic strategy for joint conditions [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 153:134-146.
- [7] LIU Dan, FANG Yuxuan, RAO Yujun, et al. Synovial fibroblast-derived exosomal microRNA-106b suppresses chondrocyte proliferation and migration in rheumatoid arthritis via down-regulation of PDK4[J]. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 2020, 98(3): 409-423.
- [8] ALGHAMDI M, ALAMRY S A, BAHLAS S M, et al. Circulating extracellular vesicles and rheumatoid arthritis: a proteomic analysis[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 79(1): 25.
- [9] LIU Jinyi, REN Liwen, LI Sha, et al. The biology, function, and applications of exosomes in cancer[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(9): 2783-2797.
- [10] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN A J, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [11] BUGATTI S, MANZO A, MONTECUCCO C, et al. The clinical value of autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5: 339.
- [12] VAN DELFT M A M, HUIZINGA T W J. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Autoimmunity*, 2020, 110: 102392.
- [13] VAN STEENBERGEN H W, DA SILVA J A P,

- HUIZINGA T W J, et al. Preventing progression from arthralgia to arthritis: targeting the right patients[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2018, 14(1): 32-41.
- [14] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [15] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88: 487-514.
- [16] 王路, 叶莎, 韩霞, 等. 循环外泌体 miRNA 检测对肝细胞癌临床诊断效能的 Meta 分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(4): 59-63.
- WANG Lu, YE Sha, HAN Xia, et al. Meta-analysis of the diagnostic value of circulating exosomes miRNA detection for hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(4): 59-63.
- [17] MIRZAEI R, ZAMANI F, HAJIBABA M, et al. The pathogenic, therapeutic and diagnostic role of exosomal microRNA in the autoimmune diseases [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2021, 358: 577640.
- [18] 刘蕾, 赵鹏, 张军, 等. 急性心肌梗死患者血浆外泌体 miR-21-3p/PTEN/AKT 表达水平及诊断价值研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(5): 118-122.
- LIU Lei, ZHAO Peng, ZHANG Jun, et al. Serum exosomal miR-21-3p/PTEN/AKT expression and diagnostic value in patients with acute myocardial infarction[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(5): 118-122.
- [19] SUH J H, JOO H S, HONG E B, et al. Therapeutic application of exosomes in inflammatory diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1144.
- [20] MUCIENTES A, LISBONA J M, MENA-VÁZQUEZ N, et al. MiRNA-mediated epigenetic regulation of treatment response in RA patients-a systematic review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(21): 12989.
- [21] CONIGLIARO P, TRIGGIANESE P, DE MARTINO E, et al. Challenges in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2019, 18(7): 706-713.
- [22] PENG Xiaole, WANG Qing, LI Wenming, et al. Comprehensive overview of microRNA function in rheumatoid arthritis[J]. *Bone Res*, 2023, 11(1): 8.
- [23] LIU Rui, JIANG Chunbo, LI Jingjing, et al. Serum-derived exosomes containing NEAT1 promote the occurrence of rheumatoid arthritis through regulation of miR-144-3p/ROCK2 axis [J]. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 2021, 12: 2040622321991705.
- [24] ZHOU Guozhu, LI Yuwei, NI Jianping, et al. Role and mechanism of miR-144-5p in LPS-induced macrophages[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 19(1): 241-247.
- [25] LIU Yingjie, PENG Jun, XIONG Xiaochuan, et al. Tofacitinib enhances IGF1 via inhibiting STAT6 transcriptionally activated-miR-425-5p to ameliorate inflammation in RA-FLS[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2022, 477(10): 2335-2344.
- [26] YANG Dongbin, ZHANG Weihong, ZHANG Huanyun, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3684-3707.
- [27] LAI J J, CHAU Z L, CHEN Shengyou, et al. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development[J]. *Advanced Science (Weinh)*, 2022, 9(15): e2103222.
- 收稿日期: 2023-06-22
修回日期: 2023-11-03

(上接第38页)

- [13] CHEN Xiaosu, LÜ Yajing, XU Kejia, et al. DCBLD2 mediates epithelial-mesenchymal transition-induced metastasis by cisplatin in lung adenocarcinoma[J]. *Cancers*, 2021, 13(6): 1403.
- [14] CHEN Hualin, YANG Wenjie, LI Yingjie, et al. Leveraging a disulfidptosis-based signature to improve the survival and drug sensitivity of bladder cancer patients[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1198878.
- [15] HSU C L, LEE E X, GORDON K L, et al. MAP4K3 mediates amino acid-dependent regulation of autophagy via phosphorylation of TFEB[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 942.
- [16] CHUANG H C, HSUEH C H, HSU P M, et al. SARS-CoV-2 spike protein enhances MAP4K3/GLK-induced ACE2 stability in COVID-19[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2022, 14(9): 15904-15914.
- [17] WANG Ziquan, HAN Zhengxiang, ZHANG Lansheng, et al. MicroRNA-98-5p regulates the proliferation and apoptosis of A549 cells by targeting MAP4K3[J]. *Oncology Letters*, 2019, 18(4): 4288-4293.
- [18] ZHUANG Qingyang, HUANG Zhangzhou, ZHUANG Wu, et al. Knockdown of circ-RAD23B inhibits non-small cell lung cancer progression via the miR-142-3p/ MAP4K3 axis[J]. *Thoracic Cancer*, 2022, 13(5): 750-760.
- [19] BRANCH M R, HSU C L, OHNISHI K, et al. MAP4K3 inhibits sirtuin-1 to repress the LKB1-AMPK pathway to promote amino acid-dependent activation of the mTORC1 complex[J]. *Life Science Alliance*, 2023, 6(8): e202201525.
- [20] LIU Fangzhou, YIN Rong, CHEN Xinyuan, et al. Over-expression of miR-206 decreases the euthyrox-resistance by targeting MAP4K3 in papillary thyroid carcinoma[J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2019, 114: 108605.
- 收稿日期: 2023-09-09
修回日期: 2023-11-13