

乙酰胆碱受体抗体阳性重症肌无力外周血单个核细胞 miRNA 表达谱

谭颖¹, 管宇宙¹, 朱立², 崔丽英^{1,3}

1. 中国医学科学院北京协和医院神经内科/北京协和医学院, 北京市 100010

2. 中国医学科学院北京协和医院核医学科, 北京市 100010

3. 中国医学科学院神经科学中心, 北京市 100010

摘要:目的 本研究对比乙酰胆碱受体抗体阳性重症肌无力患者 (AchR-MG) 和正常对照组外周血单个核细胞 miRNA, 预测对 AchR-MG 发病可能产生影响的通路, 为进一步探讨发病机制打下基础。方法 采用病例对照研究方法, 基于高通量测序, 筛选了 AchR-MG 特异性表达的 miRNA。利用 TargetScan、miRanda 进行靶基因交叉预测, 利用基因条目 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 进行富集分析。结果 共筛选出差异性 miRNA 28 种, 其中上调 17 种, 下调 11 种。差异最显著的前 5 个为: mmu-miR-3968、miR-4785、miR-210-3p、miR-664a-3p、miR-2277-5p。miR-4785 预测到 METTL22、TMEM38A、ZNF324、ITGB4、CDC34 等 395 种靶基因。最终识别了 319 条 GO term ($P < 0.01$), 获得了 119 个的风险通路 ($P < 0.05$)。结论 AchR-MG 特异性表达 miR-4785、miR-210-3p、miR-664a-3p、miR-2277-5p 等 28 种 miRNA。以 Wnt 信号通路为代表的多种通路可能参与 AchR-MG 的发病。

关键词:重症肌无力; 乙酰胆碱受体抗体; miRNA; 基因条目; 京都基因与基因组百科全书; 富集分析

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.06.001

Expression profile of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells of patients with myasthenia gravis with acetylcholine receptor antibodies

TAN Ying, GUAN Yu-Zhou, ZHU Li, CUI Li-Ying. Department of Neurology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100010, China

Corresponding author: GUAN Yu-Zhou, E-mail: guanyuzhou001@163.com

Abstract: Objective To investigate the difference in the expression profile of microRNAs (miRNAs) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) between patients with myasthenia gravis with acetylcholine receptor antibodies (AchR-MG) and healthy controls, predict the possible pathways involved in the development of AchR-MG, and to lay a foundation for further research on the pathogenesis of AchR-MG. **Methods** A case-control study was performed to screen out specifically expressed miRNAs in AchR-MG patients based on high-throughput sequencing. TargetScan and miRanda were used for cross-prediction of target genes, and gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed. **Results** A total of 28 differentially expressed miRNAs were screened out, among which 17 were upregulated and 11 were downregulated. The top 5 differentially expressed miRNAs were mmu-miR-3968, miR-4785, miR-210-3p, miR-664a-3p, and miR-2277-5p. A total of 395 target genes, such as METTL22, TMEM38A, ZNF324, ITGB4, and CDC34, were predicted for miR-4785. A total of 319 GO terms were identified ($P < 0.01$), and 119 risk pathways were obtained ($P < 0.05$). **Conclusions** A total of 28 specifically expressed miRNAs are found in AchR-MG, including miR-4785, miR-210-3p, miR-664a-3p, and miR-2277-5p. Multiple pathways, including the Wnt signaling pathway, may be involved in the pathogenesis of AchR-MG.

Key words: myasthenia gravis; acetylcholine receptor antibody; microRNA; gene ontology; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; enrichment analysis

基金项目:首都临床特色应用研究(Z181100001718145)

收稿日期:2019-09-21;修回日期:2019-12-03

作者简介:谭颖(1985-),女,主治医师,硕士学位,主要从事神经肌肉病、神经免疫的研究。

通信作者:管宇宙,女,教授,博士学位,主要从事神经肌肉病、神经免疫的研究。E-mail:guanyuzhou001@163.com。

乙酰胆碱受体 (anti-acetylcholine receptor, AchR) 抗体阳性的重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 患者占总体 85% ~ 90%, 其发病被认为与体液免疫相关, 胸腺中的异常生发中心伴 B 细胞浸润与 AchR 抗体滴度有关^[1], 但抗体和基因对临床疗效分层的价值目前仍不明晰^[2]。本病涉及到许多复杂的机制, 如何理解各临床型之间的转化、如何更好地监测病情波动等, 仍是临床研究面临的问题。

miRNA 一般由 22 个核苷酸组成, 可以特异性结合到目标 mRNA 的 3' 端, 导致 mRNA 降解或抑制下游蛋白的表达, 调控目标基因的转录和表达。在 MG 中差异表达的 miRNA 参与的生物学过程涵盖了淋巴细胞功能、细胞因子产生等。Cron 等^[3]发现早发型 MG 的 miR-150 上调。Cao 等^[4]发现 miR-653 通过干扰 TRIM9 的功能影响淋巴细胞的增生和凋亡。Bao 等^[5]筛选了 126 种与 MG 相关的 miRNA, 并确定了上述 miRNA 的富集通路。这些研究为 miRNA 在重症肌无力中的作用奠定了理论证据。本实验将对

比未经免疫治疗的 AchR-MG 患者和正常人外周血单个核细胞的 miRNA, 并采用高通量测序, 以提高实验的敏感性。通过生物富集分析, 预测对 AchR-MG 发病可能产生影响的通路, 为进一步的研究打下理论基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究采用病例对照研究方法, 从北京协和医院门诊入组 4 例 AchR-MG, 所有患者为首次诊断, 尚未接受任何免疫性治疗。纳入标准: ①有重症肌无力典型的临床和电生理特征; ②放射免疫沉淀法检测外周血血清中乙酰胆碱受体抗体 ≥ 0.4 nmol/L。同期入组了 4 例年龄、性别匹配的正常对照组, 正常对照组排除标准: ①任何已知的自身免疫性疾病病史; ②任何已知的肿瘤病史; ③合并高血压、糖尿病。研究对象基本资料见表 1。本研究获得了北京协和医院伦理委员会审批, 所有入组患者均签署了知情同意书。研究方案获得了北京协和医院研究委员会审核, 许可号 JS-1685。

表 1 研究对象 (AchR-MG) 的临床资料

编号	性别	年龄	病程 (年)	MGFA 评分	MGFA 分型	AchR-Ab (nmol/L)	其他自身抗体	免疫药物
1	女	28	1	4	IIA	5.83	无	无
2	女	58	1	8	IIA	3.41	ANA1:80	无
3	男	40	3	6	IIA	1.28	AMA-M2 弱阳性	无
4	男	68	1.5	12	IIB	10.47	无	无

注: MGFA: 美国重症肌无力协会; AchR-Ab: 乙酰胆碱受体抗体滴度; ANA: 抗核抗体; AMA-M2: 抗线粒体抗体 M2 型

1.2 研究方法

1.2.1 采血和 RNA 的提取 在获得研究对象书面同意后采取血样 8 ml, 混入 PBS, 转入淋巴细胞分离液, 离心后清洗、回收; 溶解于 TRIzol 后, 放入 -80°C 冰箱保存。用 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 试剂法提取收集 RNA, Agilent 2100 Bioanalyzer 检测样品纯度。

1.2.2 提取 miRNA 和构建 cDNA 文库 采用 15% 聚丙烯酰胺胶对总 RNA 进行分离, 选择 miRNA (18 ~ 30 nt)。根据 TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina) 流程进行文库制备。使用 Qubit 2.0 对文库进行初步定量至浓度为 1 ng/ μl , 用 Agilent 2100 对文库的插入片段大小进行检测, 再通过 Q-PCR 使文库有效浓度 > 2 nM。

1.2.3 高通量测序 将 miRNA 和外源人工合成

的 miR-168 内参稀释至 10 nM 后, 进行测序 (Illumina, Santiago, CA, USA), 用测序软件进行实时分析, 后续用 ACGT 101-miR 软件 (LC Sciences, Houston, TX, USA) 进行分析。

1.2.4 差异 miRNA 筛选 用主成分分析法 (Principal Component Analysis) 分析两组内各样本的生物学重复性, 差异 miRNA 用 DEseq 程序分析, 差异定义为 $P < 0.05$ (P 值经过多重矫正)。按照差异 miRNA 的 P 值从小到大进行排序, 如表 2 和表 3。分别绘制火山图 (图 1) 和热图 (图 2)。

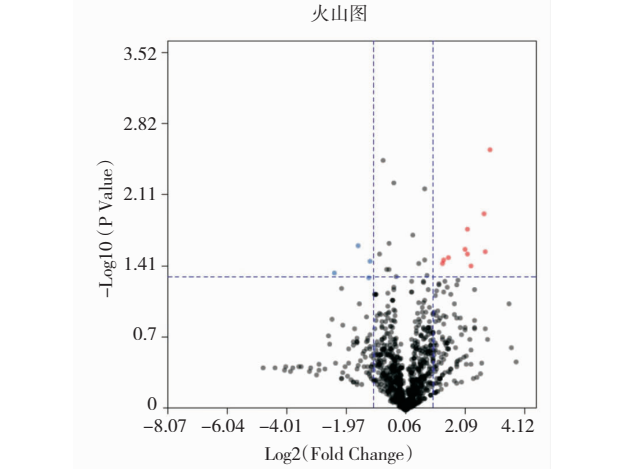
1.2.5 靶基因预测 采用 TargetScan 和 miRanda 软件对差异 miRNA 分子进行靶基因预测, 将 TargetScan 算法中靶基因得分小于 50 的舍去, 同时将 miRanda 算法中最大自由能大于 -10 的去除。

表 2 AchR-MG 和对照组的差异 miRNA(上调)列表

miRNA	log2(fold change)	t 值	P 值
mmu-miR-3968	0.47	7.59	3.05×10^{-4}
miR-4785	2.90	5.37	2.66×10^{-3}
miR-2277-5p_R-1	0.66	4.19	6.50×10^{-3}
miR-1273h-5p	2.67	3.44	1.13×10^{-2}
miR-1264_R-1	2.12	3.47	1.64×10^{-2}
miR-130b-5p_R + 1	0.22	3.20	1.85×10^{-2}
miR-7977_R + 3_1ss6AG	0.38	4.49	2.07×10^{-2}
hsa-miR-1-3p_1ss21AG	2.04	4.09	2.58×10^{-2}
hsa-miR-1273c_R-1	2.70	3.10	2.69×10^{-2}
hsa-miR-3677-3p	2.10	2.99	2.90×10^{-2}
eca-miR-191b_1ss2AG	1.45	2.91	3.14×10^{-2}
miR-3140-5p	1.31	3.01	3.26×10^{-2}
miR-1296-5p	0.66	3.48	3.28×10^{-2}
miR-1285-3p	1.24	2.73	3.54×10^{-2}
miR-532-5p	0.45	2.70	3.56×10^{-2}
ssc-miR-339	0.22	2.84	3.73×10^{-2}
miR-21-3p	0.73	2.67	4.62×10^{-2}

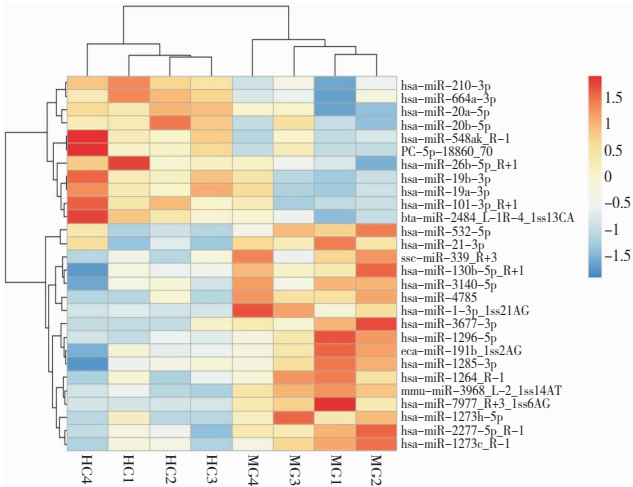
表 3 AchR-MG 和对照组的差异 miRNA(下调)列表

miRNA	log2(fold change)	t 值	P 值
miR-210-3p	-0.77	-5.08	3.43×10^{-3}
miR-664a-3p	-0.43	-4.35	5.73×10^{-3}
miR-101-3p_R + 1	-0.56	-3.05	2.27×10^{-2}
bta-miR-2484	-1.63	-3.04	2.35×10^{-2}
miR-548ak_R-1	-0.88	-3.06	2.89×10^{-2}
miR-19b-3p	-1.23	-2.77	3.33×10^{-2}
miR-20a-5p	-0.66	-3.12	4.02×10^{-2}
miR-20b-5p	-0.58	-2.70	4.12×10^{-2}
PC-5p-18860_70	-0.44	-2.63	4.47×10^{-2}
hsa-miR-26b-5p_R + 1	-0.31	-2.50	4.75×10^{-2}
hsa-miR-19a-3p	-1.28	-2.53	4.97×10^{-2}



注:以 log2(fold change) 为横坐标, -log10(P 值) 为纵坐标,对差异表达分析中所有的 miRNA 绘制火山图。其中散点代表 miRNA 在不同样本中差异表达倍数变化。阈值 |log2(Foldchange)| > 1, P < 0.05。红色代表上调 miRNA,蓝色代表下调 miRNA,灰色的点未达到上述差异标准的 miRNA。

图 1 差异 miRNA 的火山图



注:纵坐标代表不同样本,实验组为 MG1、MG2、MG3 和 MG4,对照组为 HC1、HC2、HC3 和 HC4。不同色块表示 miRNA 在不同样品中表达变化。表达量越大越接近红色,表达量相对较小接近蓝色。图上方的树形图对不同样本的聚类分析可以看到,实验组的总体 miRNA 表达与对照组存在较大差异。左侧树状图代表来自不同样本不同基因的聚类结果。

图 2 差异 miRNA 的热图

1.2.6 基因条目和京都基因与基因组百科全书富集分析 采用基因条目(Gene Ontology, GO)/京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopaedia of Genes and Genomes, KEGG)的显著富集分析,应用超几何检验方式,获得差异基因在整个基因背景中的富集通路。

1.3 统计学分析

对高通量测序获得的 miRNA 数据,采用 t 检验。用 Benjamini-Hochberg 方法矫正 GO 和 KEGG 富集分析获得的 P 值。P < 0.05 为差异具有统计学意义。上述分析采用 SPSS 软件 19.0 版本。

2 结果

2.1 临床症状

4 例 AchR-MG 患者中有 2 例分别合并抗核抗体(ANA)1:80 和抗线粒体抗体(AMA-M2)弱阳性,均无其他临床症状,经风湿免疫科会诊排除了自身免疫性疾病。

2.2 RNA 质量

2100 峰图基线平稳,RNA 28S 和 18S 条带清晰并很少见到降解的 5S 条带。所有样本均达到 RIN ≥ 11.0,28S/18S > 1.2。

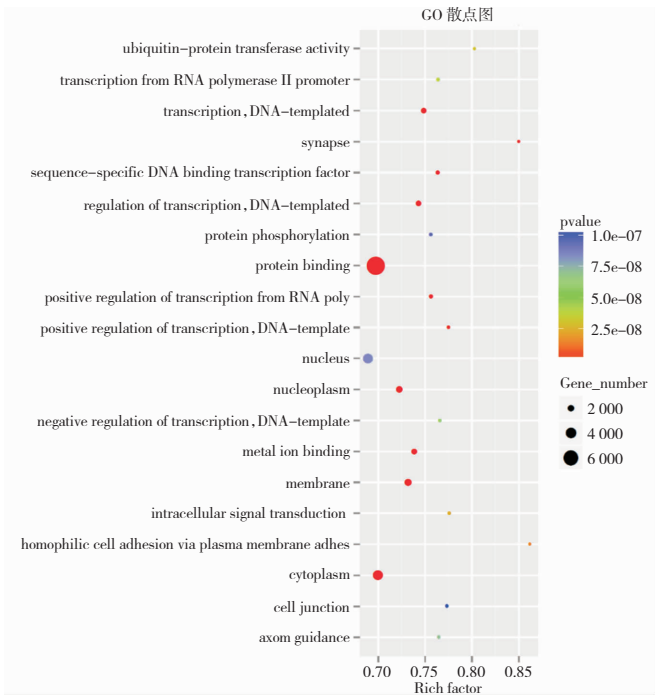
2.3 两组差异 miRNA 筛选和靶基因预测

如表 2、表 3,共筛选出差异性 miRNA 共 28 种,

其中上调 17 种,下调 11 种。以两组差异较大的 miR-4785 为例,预测到 METTL22、TMEM38A、ZNF324、ITGB4、CDC34 等 395 种靶基因。miR-210-3p 也是一种较为重要的 miRNA,用同样方法预测到包括 CREB3L3、PDZD4 在内的 537 种。

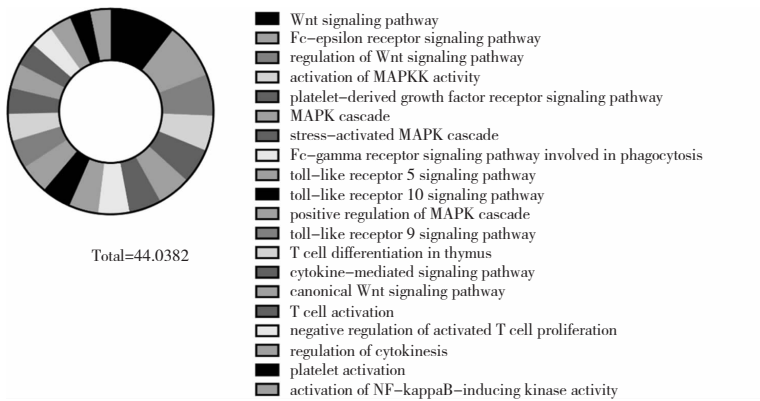
2.4 GO 富集分析

识别了 319 条 GO(图 3)。按与免疫相关进行筛选,找到 21 条 GO,按照重要性排序如图 4 所示,依次为 Wnt signal pathway、Fc-epsilon receptor signaling pathway、regulation of Wnt signaling pathway 等。



注:采用 ggplot2 对 GO 富集分析结果以散点图展示,Rich factor 表示位于该 GO 的差异基因个数/位于该 GO 的总基因数。 P 值代表富集显著程度, P 值越小,GO 富集程度越高; P 值越小,散点颜色接近红色。

图 3 AchR-MG 与健康对照组的 GO 散点图



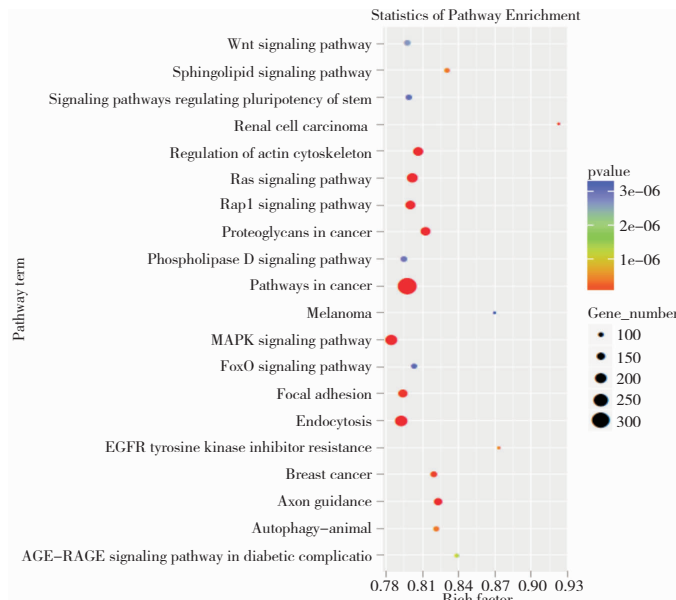
注:以 $-\log_{10}(P \text{ 值})$ 为扇面面积,以不同颜色代表不同通路,绘制了在 GO 富集分析中 P 值小于 0.05 的免疫相关通路的饼图。其中面积越大,代表该通路的 P 值越小,该通路越有意义。

图 4 AchR-MG 与免疫相关的重要 GO

2.5 KEGG 富集分析

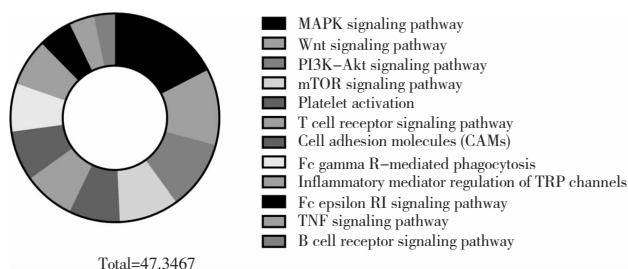
共获得了 119 个风险通路(图 5)。按照 KEGG 数据库信息进一步筛选了与免疫相关的通路,按照

重要性排序如图 6 所示,分别为 Platelet activation、T cell receptor signaling pathway 等。



注:采用 ggplot2 对 KEGG 富集分析结果以散点图展示, Rich factor 表示位于该 KEGG 的差异基因个数/位于该 KEGG 的总基因数, P 值越小, KEGG 富集程度越高, 富集显著性越高; P 值越小, 散点颜色接近红色。

图 5 AchR-MG 的 KEGG 散点图



注:以 $-\log_{10}(P \text{ 值})$ 为扇面面积, 以不同颜色代表不同通路, 绘制了在 KEGG 富集分析中 P 值小于 0.05 的免疫相关通路的饼图。其中面积越大, 代表该通路的 P 值越小, 该通路越有意义。

图 6 AchR-MG 与免疫有关的 KEGG

3 讨论

MG 涉及到多个生理机制和途径, 例如 Toll 样受体表达增多^[6, 7]; I 型干扰素增高^[8]; Treg 细胞免疫失衡; 异位生发中心的 B 细胞浸润、浆细胞增多^[9]等。研究证实, miRNA 调控与帕金森、痴呆等疾病具有一定关联^[10-13]。在 AchR-MG 中, 已发现下调表达的有: miR-7-5p^[9]、miR-320a^[14]、miR-15b、miR-122、miR-140-3p、miR-185、miR-192、miR-20b、miR-885-5p^[15]、miR-27a-3p^[16]、miR-612^[17]。上调表达的有: miR-150-5p、miR-21-5p、miR-3654、miR-3651^[16-17]。在骨骼肌特异性受体酪

氨酸激酶抗体 (muscle-specific tyrosine kinase, MuSK) MG 中下调的有 miR-210-3p、miR-324-3p^[18], 上调的有 miR-151a-3p、let-7、miR-155^[19, 20]等。MG 患者胸腺瘤中的 miR-125a-3p 异常表达^[21], MG 实验动物中的 miR-145 低水平表达^[22]。

本研究发现, AchR-MG 的外周血单个核细胞中 miRNA 表达差异的共 28 种, 其中上调 17 种, 下调 11 种, 这表明 AchR 抗体致病过程中上调占优势。其中 miR-21 (上调)、miR-20b (下调) 均与文献报道相符^[23, 24]。MiR-21-3p 预测到的靶基因众多, 其中包括 CD80 基因 (gene ID 941), 该基因编码 CD80 又称为 B7-1, 一般存在于活化的 B 细胞、T 细胞、树突状细胞、IFN- γ 活化的单核细胞表面。CD80 可正负两个方向协同调控 T 细胞活化和细胞因子的产生^[25]。此外, CD80 还与结肠癌组织的异常甲基化^[26]、CD4 阳性 T 细胞行为相关^[27]。miR-21-3p 是否通过 CD80 在 MG 中起到致病作用, 有待在今后进行进一步验证。

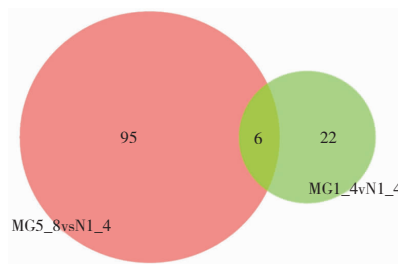
本研究发现了以 Wnt signaling pathway、Fc receptor signaling pathway、T cell signal pathway 为代表的重要 GO。Wnt 信号在细胞增殖等多个面发挥着重要作用^[28], 如系统性红斑狼疮^[29], 该信号有调控 T 细胞增殖和分化的重要作用^[30, 31]。Fc 受体信号通路与 MG 有关, 重组多价 Fc 分子有治疗 MG 的潜

力^[32],高加索人的 FcγRIIA 单核苷酸多态性与 MG 相关^[33]。TCR 信号通路上的 PTPN2 基因多态性与早发型重症肌无力患病风险相关^[34],一些经抗 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 治疗后的个体出现了 MG、多发性肌炎等免疫性疾病^[35, 36]。Wnt signaling pathway、Fc receptor signaling pathway 和 T cell signal pathway 是否参与到 MG 中,有待进一步研究。

在我们的另一项研究中,用同样的方法观察了 MuSK-MG 和正常对照组外周血单个核白细胞 miRNA 的差异,并将 AchR-MG 的差异 miRNA 和 MuSK-MG 得到差异 miRNA 进行了对比,绘制韦恩图(图 7)。取 $P < 0.05$ 为标准,在本研究中 28 个差异表达 miRNA 中,有 6 个同时也是 MuSK-MG 特异性表达的,其余 22 个差异 miRNA 是 AchR 特有的。这 6 个 miRNA 为:miR-548ak_R-1、miR-20b-5p、miR-19a-3p、miR-19b-3p、miR-101-3p_R + 1、bta-miR-2484。

本研究还发现了 28 种 AchR-MG 特异性表达的 miRNA,找到了多种重要通路,但上述结果仅为初步探索所见,需要在今后的研究中进一步验证。

本研究也存在一些不足,如对照组仅通过病史排除了自身免疫性疾病和肿瘤,但并未进行自身抗体、全身影像学的全面筛查,不能排除潜在的疾病风险。未同时对比双阴性 MG,很难确定这 28 种 miRNA 是否为 AchR-MG 独有的表达谱。此外,筛选试验入组例数较少也带来了一些偏倚。为解决这些缺陷,需要在以后纳入更多的亚组、扩大样本量,并尽量采取多种手段对结果进行重复验证,找到有潜力提示病情进展的 miRNA,对真正可能参与发病的靶基因和相关蛋白进行功能验证。



注:红色圆形内代表 MuSK-MG 特异表达的 miRNA,共 101 个,绿色圆形内代表 AchR-MG 特异表达的 miRNA,共 28 个。两圆交集内有 6 个 miRNA,代表共同差异表达的 miRNA 有 6 个。

图 7 AchR-MG 和 MuSK-MG 差异 miRNA 的韦恩图

参 考 文 献

- [1] Cron MA, Maillard S, Villegas J, et al. Thymus involvement in early-onset myasthenia gravis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2018, 1412(1): 137-145.
- [2] 李海峰.重症肌无力个体化治疗研究方法学的几个问题[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2018, 45(3): 215-220.
- [3] Cron MA, Maillard S, Truffault F, et al. Causes and Consequences of miR-150-5p Dysregulation in Myasthenia Gravis [J]. Front Immunol, 2019, 10(3): 1-14.
- [4] Cao YL, Wang J, Zhang H, et al. MicroRNA-653 Inhibits Thymocyte Proliferation and Induces Thymocyte Apoptosis in Mice with Autoimmune Myasthenia Gravis by Downregulating TRIM9 [J]. Neuroimmunomodulation, 2019, 26(1): 7-18.
- [5] Bo C, Wang J, Zhang H, et al. Global pathway view analysis of microRNA clusters in myasthenia gravis [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3): 2350-2360.
- [6] Cavalcante P, Barzago C, Baggi F, et al. Toll-like receptors 7 and 9 in myasthenia gravis thymus: amplifiers of autoimmunity? [J]. Ann N Y Acad Sci, 2018, 1413(1): 11-24.
- [7] Cordiglieri C, Marolda R, Franzi S, et al. Innate immunity in myasthenia gravis thymus: pathogenic effects of Toll-like receptor 4 signaling on autoimmunity [J]. J Autoimmun, 2014, 52(3): 74-89.
- [8] Cufi P, Dragin N, Ruhlmann N, et al. Central role of interferon-beta in thymic events leading to myasthenia gravis [J]. J Autoimmun, 2014, 52(10): 44-52.
- [9] Barzago C, Nogales-Gadea G, de Baets M, et al. A novel infection-and inflammation-associated molecular signature in peripheral blood of myasthenia gravis patients [J]. Immunobiology, 2016, 221(11): 1227-1236.
- [10] van Kralingen JC, McFall A, Ord ENJ, et al. Altered Extracellular Vesicle MicroRNA Expression in Ischemic Stroke and Small Vessel Disease [J]. Transl Stroke Res, 2019, 10(5): 495-508.
- [11] Funamizu N, Lacy CR, Kamada M. MicroRNA-200b and -301 are associated with gemcitabine response as biomarkers in pancreatic carcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2019, 54(3): 991-1000.
- [12] Starhof C, Hejl AM, Heegaard NHH, et al. The biomarker potential of cell-free microRNA from cerebrospinal fluid in Parkinsonian Syndromes [J]. Mov Disord, 2019, 34(2): 246-254.
- [13] Maldonado-Lasuncion I, Atienza M, Sanchez-Espinosa MP, et al. Aging-related changes in cognition and cortical integrity are associated with serum expression of candidate microRNAs

- for Alzheimer Disease [J]. *Cereb Cortex*, 2018, 1(5): 1-12.
- [14] Cheng Z, Qiu S, Jiang L, et al. MiR-320a is downregulated in patients with myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1 [J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(3): 567-576.
- [15] Nogales-Gadea G, Ramos-Fransi A, Suarez-Calvet X, et al. Analysis of serum miRNA profiles of myasthenia gravis patients [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91927.
- [16] Punga T, Le Panse R, Andersson M, et al. Circulating miRNAs in myasthenia gravis: miR-150-5p as a new potential biomarker [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2014, 1(1): 49-58.
- [17] Punga AR, Andersson M, Alimohammadi M, et al. Disease specific signature of circulating miR-150-5p and miR-21-5p in myasthenia gravis patients [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 356(1): 90-96.
- [18] Punga AR, Punga T. Circulating microRNAs as potential biomarkers in myasthenia gravis patients [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1412(1): 33-40.
- [19] Punga T, Bartoccioni E, Lewandowska M, et al. Disease specific enrichment of circulating let-7 family microRNA in MuSK + myasthenia gravis [J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 292(3): 21-26.
- [20] Sabre L, Gupta JT, Russo M, et al. Circulating microRNA plasma profile in MuSK⁺ myasthenia gravis [J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 325(12): 87-91.
- [21] Li J, Qiu D, Chen Z, et al. Altered expression of miR-125a-5p in thymoma-associated myasthenia gravis and its down-regulation of foxp3 expression in Jurkat cells [J]. *Immunol Lett*, 2016, 172(1): 47-55.
- [22] Wang J, Zheng S, Xin N, et al. Identification of novel MicroRNA signatures linked to experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis: down-regulated miR-145 promotes pathogenic Th17 cell response [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(5): 1287-1302.
- [23] Cron MA, Maillard S, Delisle F, et al. Analysis of microRNA expression in the thymus of Myasthenia Gravis patients opens new research avenues [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(6): 588-600.
- [24] Chunjie N, Huijuan N, Zhao Y, et al. Disease-specific signature of serum miR-20b and its targets IL-8 and IL-25, in myasthenia gravis patients [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2015, 26(3): 61-66.
- [25] Bengsch F, Knoblock DM, Liu A, et al. CTLA-4/CD80 pathway regulates T cell infiltration into pancreatic cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(12): 1609-1617.
- [26] Scarpa M, Castagliuolo I, Erroi F, et al. CD80 down-regulation is associated to aberrant DNA methylation in non-inflammatory colon carcinogenesis [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 388.
- [27] Ville S, Poirier N, Blanche G, et al. Co-stimulatory blockade of the CD28/CD80-86/CTLA-4 balance in transplantation: impact on memory T cells? [J]. *Front Immunol*, 2015, 6(411): 1-10.
- [28] Nusse R. Cell signalling: Disarming Wnt [J]. *Nature*, 2015, 519(7542): 163-164.
- [29] Koutsokeras T, Healy T. Systemic lupus erythematosus and lupus nephritis [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(3): 173-174.
- [30] Deng YJ, Huang ZX, Zhou CJ, et al. Gene profiling involved in immature CD4⁺ T lymphocyte responsible for systemic lupus erythematosus [J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(9): 1497-1507.
- [31] Ma J, Wang R., Fang X, et al. Beta-catenin/TCF-1 pathway in T cell development and differentiation [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7(4): 750-762.
- [32] Thirupathi M, Sheng JR, Li L, et al. Recombinant IgG2a Fc (M045) multimers effectively suppress experimental autoimmune myasthenia gravis [J]. *J Autoimmun*, 2014, 52(1): 64-73.
- [33] van der Pol WL, Jansen MD, Kuks JB, et al. Association of the Fc gamma receptor IIA-R/R131 genotype with myasthenia gravis in Dutch patients [J]. *J Neuroimmunol*, 2003, 144(1): 143-147.
- [34] Xiong X, Xiang M, Cheng X, et al. PTPN22 R620W Polymorphism is Associated with Myasthenia Gravis Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21(4): 2567-2571.
- [35] Kang KH, Grubb W, Sawlani K, et al. Immune checkpoint-mediated myositis and myasthenia gravis: A case report and review of evaluation and management [J]. *Am J Otolaryngol*, 2018, 39(5): 642-645.
- [36] Makarios D, Horwood K, Coward J. Myasthenia gravis: An emerging toxicity of immune checkpoint inhibitors [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 82(1): 128-136.