

miRNA-mRNA 网络参与高脂饮食损伤甲状腺功能的生物信息学分析

窦涛¹, 窦乃馨¹, 汪如¹, 杨芊¹, 管庆波¹, 王磊², 于春晓¹

1. 内分泌糖脂代谢与脑老化教育部重点实验室, 山东第一医科大学附属省立医院内分泌代谢病科, 山东省内分泌与脂代谢重点实验室, 山东 济南 250021

2. 山东第一医科大学附属中心医院 胃肠外科, 山东 济南 250021

摘要: **目的** 通过生物信息学方法分析参与高脂饮食损伤甲状腺功能的 miRNA-mRNA 调控网络, 为早期干预脂毒性损伤甲状腺功能提供新的靶点。 **方法** 给予大鼠高脂饮食 8 周, 建立甲状腺功能损伤大鼠模型, 以正常饮食组为对照, Agilent 芯片检测甲状腺 miRNA 和 mRNA 表达, RStudio 的 limma 包筛选差异 miRNA 和 mRNA。miRwalk 预测差异 miRNA 调控的潜在下游靶基因, 利用微生信网站将预测的靶基因和差异 mRNA 取交集, 建立差异 miRNA-差异 mRNA 网络。通过在线网站 Metascape 对交集 mRNA 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 注释和京都基因和基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析。利用 String 在线网站进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 使用 Cytoscape 可视化 PPI 网络, CytoNCA 插件筛选枢纽基因。基于关键基因建立高脂饮食损伤甲状腺功能的潜在 miRNA-mRNA 网络。 **结果** 筛选出 27 个上调和 6 个下调 miRNA, 775 个上调和 543 个下调 mRNA, 下调 miRNA 的靶点 mRNA 与芯片筛选的上调 mRNA 有 301 个重叠, 上调 miRNA 的靶点 mRNA 与芯片筛选的下调 mRNA 有 278 个重叠, 分别获得 491 和 777 个 miRNA-mRNA 对。GO 和 KEGG 分析发现差异 mRNA 富集到与甲状腺激素合成和细胞增殖等相关通路。进一步筛选出 Src/Pebp1、I11b、Plcg1、Igf1、Ntrk2 等 10 个枢纽基因, 建立了包括 miR-3473/Src、miR-339-3p/Igf1、miR-674-5p/Igf1、miR-339-3p/Ntrk2、miR-99b-3p/Ntrk2 等的关键 miRNA-mRNA 调控对。 **结论** miR-3473、Igf1 和 Ntrk2 等可能作为核心 miRNA 和 mRNA, 参与调控高脂饮食损伤甲状腺功能。

关键词: 甲状腺功能减退; 高脂饮食; miRNA-mRNA 网络

中图分类号: R581.2 文献标志码: A 文章编号: 1673-3770(2025)04-0151-10

引用格式: 窦涛, 窦乃馨, 汪如, 等. miRNA-mRNA 网络参与高脂饮食损伤甲状腺功能的生物信息学分析[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2025, 39(4): 151-160. DOU Tao, DOU Naixin, WANG Ru, et al. Bioinformatic analysis of miRNA-mRNA network involved in thyroid function impairment by high-fat diet[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2025, 39(4): 151-160.

Bioinformatic analysis of miRNA-mRNA network involved in thyroid function impairment by high-fat diet

DOU Tao¹, DOU Naixin¹, WANG Ru¹, YANG Qian¹, GUAN Qingbo¹, WANG Lei², YU Chunxiao¹

1. Key Laboratory of Endocrine Glucose & Lipids Metabolism and Brain Aging, Ministry of Education, Department of Endocrinology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Shandong Key Laboratory of Endocrinology and Lipid Metabolism, Jinan 250021, Shandong, China

2. Department of Gastroenterology, Affiliated Central Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China

Abstract: Objective To analyze the miRNA-mRNA regulatory network involved in high-fat diet-induced damage to thyroid function using bioinformatics methods, and to provide new targets for early intervention in lipid toxicity-induced thyroid dysfunction.

Methods Rats were fed a high-fat diet for 8 weeks to establish a model of thyroid function damage, with a normal diet group as control. Agilent chips were used to detect thyroid miRNA and mRNA expression, and the “limma” package in RStudio was used to screen for differentially expressed miRNA and mRNA. The miRwalk was used to predict potential downstream target genes regulated by differentially expressed miRNA. The predicted target genes and differentially expressed mRNA were intersected using weishengxin

websites to establish a differential miRNA-mRNA network. Gene ontology (GO) annotation and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis of the intersected mRNA were performed using the Metascape website. protein-protein interaction (PPI) analysis was conducted using the String online platform, and the PPI network hub was visualized using Cytoscape, hub genes were selected using the CytoNCA plugin in Cytoscape. A potential miRNA-mRNA network affecting thyroid function due to high-fat diet was established based on the selected hub genes. **Results** 27 upregulated and 6 downregulated miRNAs, 775 upregulated and 543 downregulated mRNAs were screened, with 301 overlapping mRNAs between downregulated miRNA targets and upregulated mRNAs, and 278 overlapping mRNAs between upregulated miRNA targets and downregulated mRNAs, resulting in 491 and 777 miRNA-mRNA pairs, respectively. GO and KEGG analysis revealed that differential mRNAs were enriched in pathways related to thyroid hormone synthesis and cell proliferation. Further screening identified 10 hub genes including Src, Pebp1, Il1b, Plcg1, Igf1, etc. A key miRNA-mRNA regulatory network was established based on these hub genes, including regulatory pairs such as miR-3473/Src, miR-339-3p/Igf1, miR-674-5p/Igf1, miR-339-3p/Ntrk2, miR-99b-3p/Ntrk2. **Conclusion** The miRNA and mRNA, such as miR-3473, Igf1 and Ntrk2 may be involved in high-fat diet-induced damage to thyroid function.

Key words: Hypothyroidism; High-fat diet; miRNA-mRNA network

甲状腺功能减退症是由于甲状腺激素合成和分泌减少或组织作用减弱导致的全身代谢减低综合征。探索甲状腺功能减退症的病因及分子机制对于早期预防和治疗甲状腺功能减退及相关疾病具有重要意义。脂毒性对甲状腺功能有一定的影响^[1]。既往研究发现高脂饮食喂养 8 周的大鼠,血清甲状腺素(thyroxine, T4)水平无明显变化,促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)水平升高^[2],提示高脂饮食喂养 8 周,大鼠的甲状腺已经受到脂毒性的影响,但其机制有待进一步研究。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长约 22 个核苷酸的非编码 RNA,可通过降解 mRNA 或抑制 mRNA 翻译,参与其转录后调控^[3]。miRNA 与甲状腺生理功能和甲状腺功能减退症相关^[4],也在高脂饮食的毒性作用中充当重要角色,如高脂肪饮食可以降低心脏中 miRNA-29b 的表达,进而增加心肌对缺血/再灌注损伤的易感性^[5],miR-379 缺失可保护小鼠免受高脂饮食引起的肾损伤^[6]。然而,miRNA 是否参与高脂饮食损伤甲状腺功能及其机制目前尚不清楚。

在本研究中,我们通过生物信息学方法挖掘高脂饮食诱发的脂毒性损伤甲状腺功能的进程中,可能在早期发挥作用的 miRNA-mRNA 对。筛选高脂饮食与对照饮食大鼠之间甲状腺的差异表达 miRNA(differentially expressed miRNA, DEmiRNA)和 mRNA(DEmRNA),并预测 DEmiRNA 的靶点,构建 DEmiRNA-DEmRNA 网络。对网络中的 DEmRNA 进行 GO 注释和 KEGG 通路分析和 PPI 分析,确定枢纽基因。最后,建立与高脂饮食对甲状腺影响相关的早期潜在关键 miRNA-mRNA 网络。这将为早期干预脂毒性对甲状腺的损害提供新的可能靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

所有动物实验均经山东省立医院动物伦理委员会批准。体质量 190 ~ 210 g 的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)在山东省立医院实验动物中心饲养,恒温恒湿,12:12 h 明暗循环。将大鼠随机分为两组,分别饲喂对照低脂饮食(ND, Research Diets, D12450B;蛋白质 20 kcal%,碳水化合物:70 kcal%,脂肪:10 kcal%, Research Diets)和高脂饮食(HFD, Research Diets, D12492;蛋白质 20 kcal%,碳水化合物:20 kcal%,脂肪:60 kcal%, Research Diets),连续喂养 8 周,每隔 2 周测量体重,8 周后留取血液标本,以异氟烷麻醉后二氧化碳吸入安乐死,取甲状腺组织置于液氮中冷冻保存。测量血清总 T4 和 TSH,基于文献报道^[2],以 TSH 水平升高而 T4 水平没有变化作为甲状腺功能异常标准,剔除体重和激素水平存在明显异常或建模未成功的大鼠,最终对照组 3 只大鼠,高脂组 2 只大鼠符合入组标准,进行以下实验和分析(图 1)。

1.2 获取 miRNA 及 mRNA 的表达信息

委托上海伯豪生物技术有限公司对大鼠甲状腺组织进行芯片分析。对大鼠甲状腺组织进行 RNA 抽提、纯化、质检,质检合格之后进行芯片实验,芯片采用 Agilent Rat miRNA 8x15K 芯片(70154)和 Agilent Rat lncRNA 4 * 44K 芯片(042966)。miRNA 表达信息来自 miRNA 芯片, mRNA 表达信息来自 lncRNA 芯片。

1.3 筛选 DEmiRNA、DEmRNA

使用 RStudio 软件(4.2.0 版)的“limma”包筛选 DE miRNA、DE mRNA, $|\log_2FC| > 0, P < 0.05$ 被认为

有统计差异,并用“ggplot2”、“pheatmap”包绘制火山图和热图。

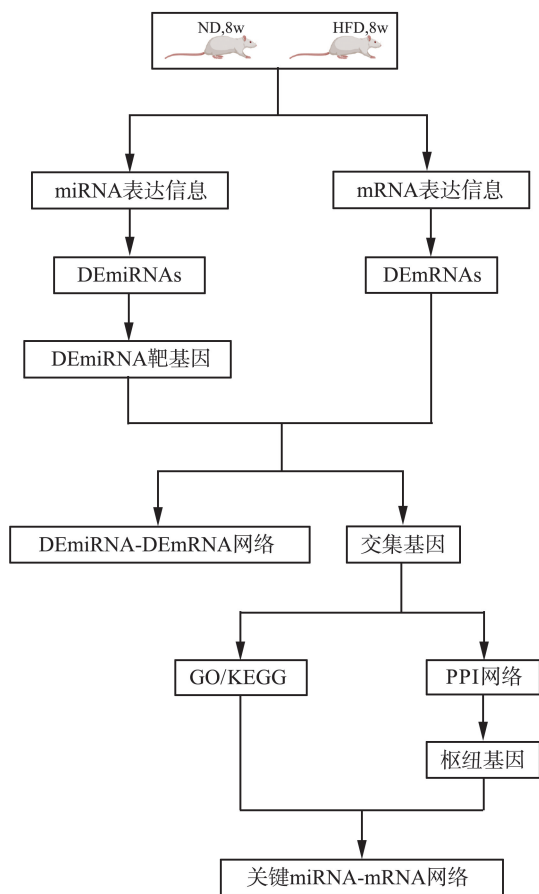


图 1 分析流程图
 Figure 1 Analysis flowchart

1.4 预测 miRNA 靶基因

miRWalk 可提供大鼠已知基因的预测和验证的 miRNA 结合位点^[7]。使用 miRWalk 3.0 版本预测大鼠 miRNA 的靶基因。

1.5 GO 注释和 KEGG 通路分析

Metascape 可提供基因注释和功能富集的在线

网站^[8]。采用该网站对 DE mRNA 进行 GO 注释,包括生物过程 (Biological Process, BP)、细胞成分 (Cellular Component, CC) 和分子功能 (Molecular Function, MF), 以及进行 KEGG 通路分析。Metascape 默认参数 Min Overlap: 3, P Value: 0.01, Min Enrichment: 1.5。

1.6 PPI 网络的构建和枢纽基因的筛选

蛋白质-蛋白质相互作用不仅包括物理相互作用,还包括功能关联。STRING 数据库整合了蛋白质之间所有已知和预测的关联^[9]。我们使用 STRING 数据库对 DE mRNA 进行 PPI 分析,交互得分设置为 ≥ 0.4 , 隐藏孤立的节点,并使用 Cytoscape 软件 (3.10.1 版) 进行可视化。利用 Cytoscape 的插件 CytoNCA 可对 PPI 网络进行中心性分析,识别 PPI 网络中的必需蛋白质^[10]。度中心性 (Degree Centrality, DC) 判断网络中节点的重要性,中介中心性 (Betweenness Centrality, BC) 和接近中心性 (Closeness Centrality, CC) 表示节点之间相互作用程度。使用微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 的韦恩图对 DC、BC、CC 排名前十的基因取交集,获取枢纽基因。

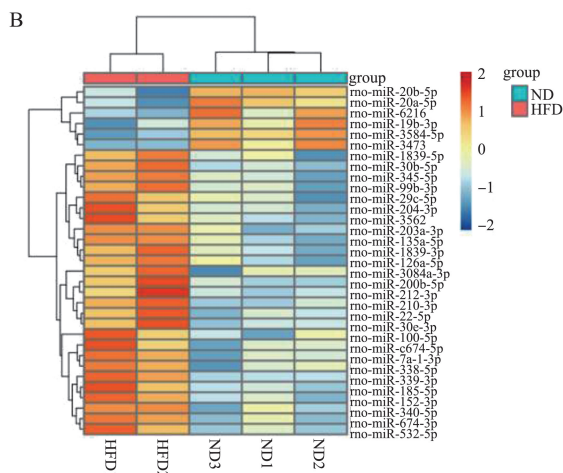
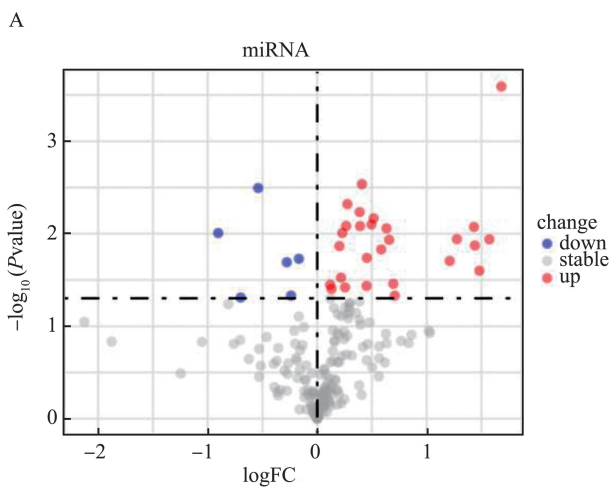
1.7 miRNA-mRNA 网络可视化

使用 Cytoscape 软件对 miRNA-mRNA 网络进行可视化,橘色表示上调,蓝色表示下调。

2 结果

2.1 高脂饮食大鼠甲状腺的 DE miRNA 和 DE mRNA

与普通饮食相比,高脂饮食大鼠甲状腺共筛选出 33 个 DE miRNA,包括 27 个上调 miRNA 和 6 个下调 miRNA (图 2A、B), 以及 1 318 个 DE mRNA, 包括 775 个上调 mRNA 和 543 个下调 mRNA (图 2C、D)。



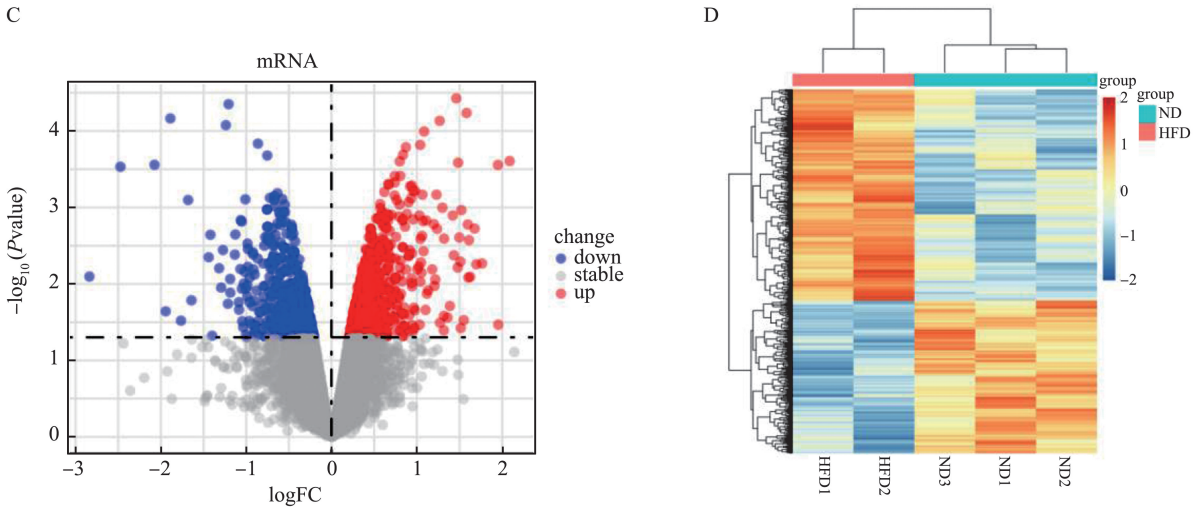


图 2 DEmiRNA 和 DEMRNA 的火山图和热图
A~B:DEmiRNA 的火山图和热图;C~D:DEmRNA 的火山图和热图
Figure 2 Volcano and heatmap of DEmiRNA and DEMRNA
A-B: Volcano and heatmap of DEmiRNA; C-D: Volcano and heatmap of DEMRNA

2.2 DEmiRNA 靶向的 mRNA 以及 DEmiRNA-DEM RNA 网络的预测

miRNA 能够通过 与 mRNA 的 3'非翻译区结合抑制 mRNA 翻译或促进 mRNA 降解来调节转录后水平的基因表达。通过 miRNA 与 mRNA 的反向关系可以预测 miRNA-mRNA 负调控网络。我们进一步利用 miRWalk 3.0 预测 DEmiRNA 的靶点,6 个下调的 DEmiRNA 有 8 030 个潜在靶点(图 3A),27 个上调的 DEmiRNA 有 11 802 个潜在靶点(图 3B)。

我们选取预测的靶点与筛选的 DEMRNA 重叠部分的 mRNA 构建 miRNA-mRNA 网络。下调 DEmiRNA 的靶点 mRNA 与芯片筛选的上调 DEMRNA 有 301 个重叠 mRNA(图 3A),上调 DEmiRNA 的靶点 mRNA 与芯片筛选的下调 DEMRNA 有 278 个重叠 mRNA(图 3B)。6 个下调的 DEmiRNA 和 301 个上调 DEMRNA 构建了 491 对 miRNA-mRNA,26 个上调的 DEmiRNA 和 278 个下调 DEMRNA 构建了 777 对 miRNA-mRNA。

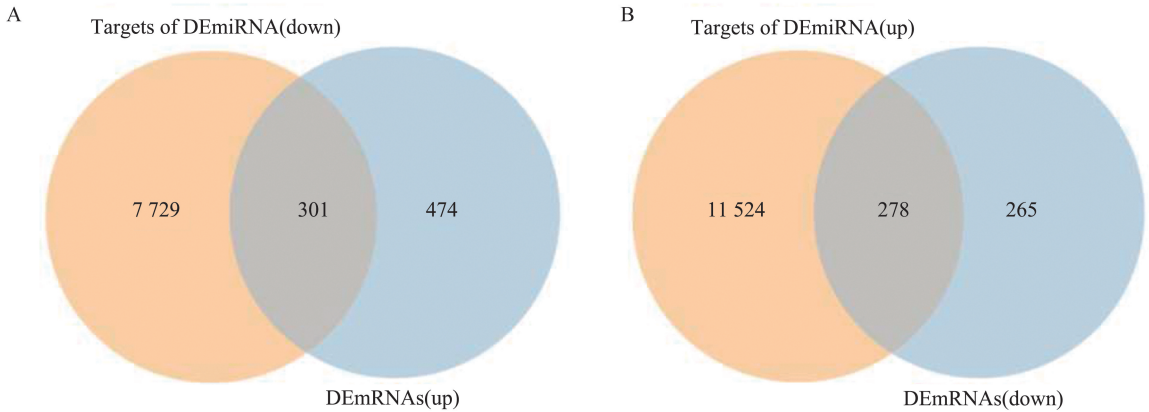


图 3 miRNA-mRNA 网络的构建
A: 下调 DEmiRNA 的靶向 mRNA 与上调 DEMRNA 的韦恩图;B: 上调 DEmiRNA 的靶向 mRNA 与下调 DEMRNA 的韦恩图

Figure 3 Construction of miRNA-mRNA network
A: Venn diagram of targets of downregulated DEmiRNA and upregulated DEMRNA; B: Venn diagram of targets of upregulated DEmiRNA and downregulated DEMRNA

2.3 DEMRNA 的功能分析

为了了解 DEMRNA 的功能,分别对上述 miRNA-mRNA 网络中上调和下调的 DEMRNA 进行了 GO 注释和 KEGG 通路分析。BP 结果显示上调的

DEmRNA 富集到分泌、多元醇代谢、转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β 生成的调控等生物过程(图 4A),下调的 DEMRNA 富集到整合钙离子释放到胞质、钙离子整合的负调控、蛋白激酶 C

(protein kinase C, PKC) 信号的负调控、钙离子跨膜进入细胞质等生物过程(图 4B)。CC 结果显示上调的 DEmRNA 富集到神经元间突触、神经元细胞体等细胞成分(图 4C), 下调的 DEmRNA 富集到锚定连接、参与细胞粘附的蛋白质复合物等细胞成分(图 4D)。MF 结果显示上调的 DEmRNA 富集到 3',5'-环-GMP 磷酸二酯酶活性等分子功能(图

4E), 下调的 DEmRNA 富集到细胞黏附分子结合等分子功能(图 4F)。KEGG 分析显示上调的 DEmRNA 富集到磷脂酰肌醇信号系统、钙信号通路、甲状腺激素合成、以及 cAMP 信号通路等通路(图 4G), 下调的 DEmRNA 富集到 PI3K-Akt 信号通路、甘油酯代谢、磷脂酰肌醇信号系统以及甲状腺激素合成等通路(图 4H)。

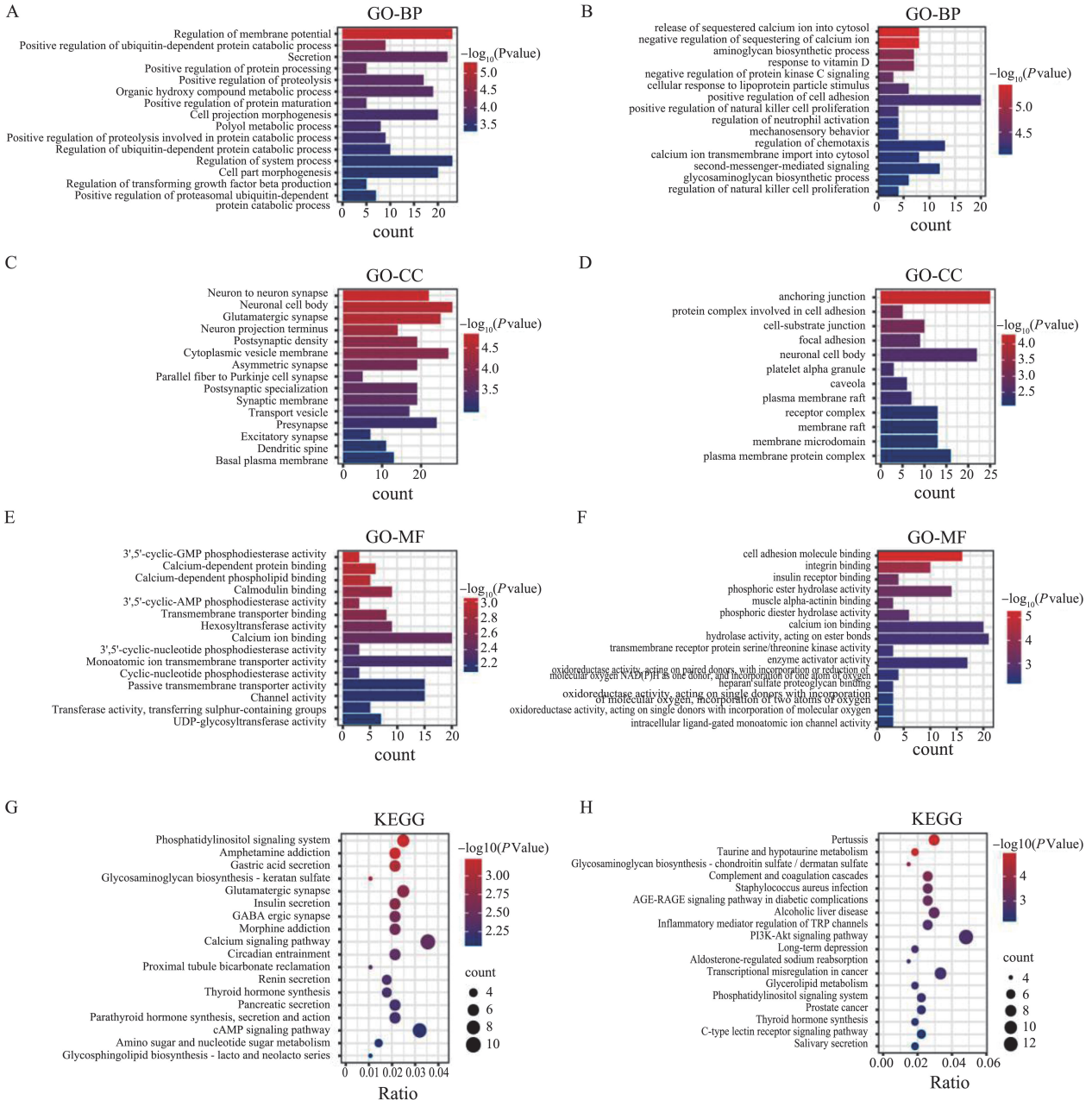


图 4 GO 注释和 KEGG 通路分析

A: 上调 DEmRNA 的 GO-BP 注释; B: 下调 DEmRNA 的 GO-BP 注释; C: 上调 DEmRNA 的 GO-CC 注释; D: 下调 DEmRNA 的 GO-CC 注释; E: 上调 DEmRNA 的 GO-MF 注释; F: 下调 DEmRNA 的 GO-MF 注释; G: 上调 DEmRNA 的 KEGG 通路; H: 下调 DEmRNA 的 KEGG 通路

Figure 4 GO annotation and KEGG pathway analysis

A: GO-BP annotation of upregulated mRNAs; B: GO-BP annotation of downregulated mRNAs; C: GO-CC annotation of upregulated mRNAs; D: GO-CC annotation of downregulated mRNAs; E: GO-MF annotation of upregulated mRNAs; F: GO-MF annotation of downregulated mRNAs; G: KEGG pathways of upregulated mRNAs; (H) KEGG pathways of downregulated mRNAs

2.4 PPI 网络构建和枢纽基因筛选

上调 DEmRNA 的 PPI 网络包含 191 个节点, 258 条边, 下调 DEmRNA 的 PPI 网络包含 195 个节点, 304 条边。通过 DC、BC 和 CC 三种算法筛选出 PPI 调控网络中差异基因的枢纽基因。每种算法筛

选的前十个基因被认为是枢纽基因(表 1), 再使用韦恩图对三种算法得出的枢纽基因取交集, 得出最终的枢纽基因(图 5)。4 个上调的枢纽基因为 Src、Pebp1、Cfl1、Cacna1c, 6 个下调的枢纽基因为 Itgb2、Il1b、Plcg1、Ntrk2、Igf1、Hsp90ab1。

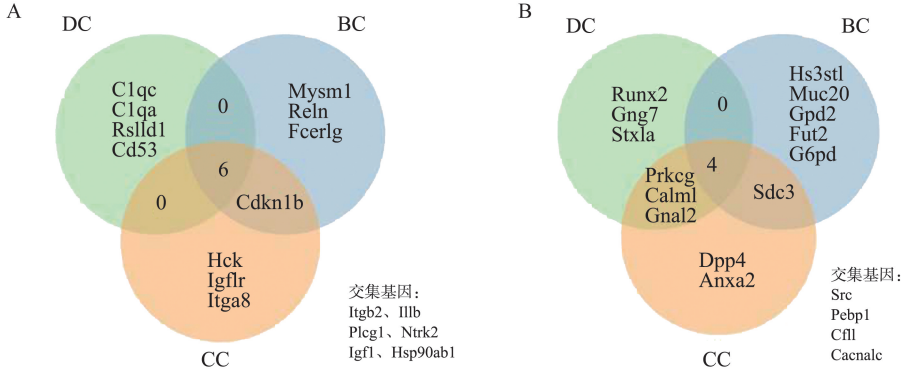


图 5 PPI 网络和枢纽基因

A: 上调差异基因按度中心性、中介中心性和接近中心性排序的前 4 个差异基因的韦恩图; B: 下调差异基因按度中心性、中介中心性和接近中心性排序的前 6 个差异基因的韦恩图

Figure 5 PPI network and hub genes

A: Top 4 upregulated mRNAs by degree centrality, betweenness centrality, and closeness centrality; B: Top 6 downregulated mRNAs by degree centrality, betweenness centrality, and closeness centrality

表 1 前 10 位按 DC、BC 和 CC 排序的上调或下调差异基因
Table 1 Top 10 up- or down-regulated mRNAs sorted by DC, BC, and CC

	基因	度中心性	基因	中介中心性	基因	接近中心性
上调	Src	26	Src	21 836.783 0	Src	0.034 565 147
	Pebp1	10	Pebp1	9 384.988 0	Pebp1	0.034 167 850
	Prkcg	9	Sdc3	6 346.177 2	Prkcg	0.034 017 872
	Runx2	8	Hs3st1	5 685.058 0	Cfl1	0.033 927 456
	Gng7	8	Muc20	5 013.710 4	Cacna1c	0.033 885 073
	Cfl1	7	Cfl1	4 876.571 3	Sdc3	0.033 869 207
	Stx1a	7	Gpd2	4 401.743 7	Gna12	0.033 790 097
	Calm1	7	Fut2	4 008.000 0	Dpp4	0.033 779 576
	Gna12	7	Cacna1c	3 965.239 7	Calm1	0.033 763 807
	Cacna1c	6	G6pd	3 844.263 2	Anxa2	0.033 721 834
下调	Itgb2	24	Itgb2	10 808.457 0	Itgb2	0.072 714 440
	Il1b	17	Cdkn1b	7 666.739 3	Cdkn1b	0.071 827 054
	Plcg1	15	Hsp90ab1	6 190.491 0	Igf1	0.071 802 020
	Ntrk2	13	Plcg1	5 386.035 6	Plcg1	0.071 702 056
	Igf1	13	Igf1	5 189.179 0	Ntrk2	0.071 181 750
	C1qc	13	Ntrk2	5 173.061 0	Hsp90ab1	0.070 985 526
	C1qa	13	Mysm1	3 567.391 6	Il1b	0.070 887 820
	Hsp90ab1	11	Il1b	3 286.014 4	Hck	0.070 839 060
	Rsl1d1	11	Reln	3 068.703 9	Igf1r	0.070 790 380
	Cd53	11	Fcer1g	2 536.243 0	Itga8	0.070 766 060

2.5 关键的 miRNA-mRNA 网络

以上富集到甲状腺激素合成通路的关键基因和筛选出的枢纽基因可能是在高脂损伤甲状腺功能过程中起关键作用的基因, 因此我们把这些基因参与

构建的 miRNA-mRNA 网络认为是关键网络。基于已建立的 miRNA-mRNA 网络, 进一步得出 17 个差异 miRNA 调控富集到甲状腺激素合成通路的 10 个差异 mRNA, 共构建了 22 对关键 miRNA-mRNA 对

(图 6A), 包括 miR-3473/Atp1a3、miR-3473/Atp1b1 等。19 个差异 miRNA 调控 10 个枢纽基因, 共构建 31 对关键 miRNA-mRNA 对, 包括 miR-339-3p/

Igf1、miR-674-5p/Igf1、miR-339-3p/Ntrk2、miR-99b-3p/Ntrk2、miR-3473/Src 等(图 6B)。

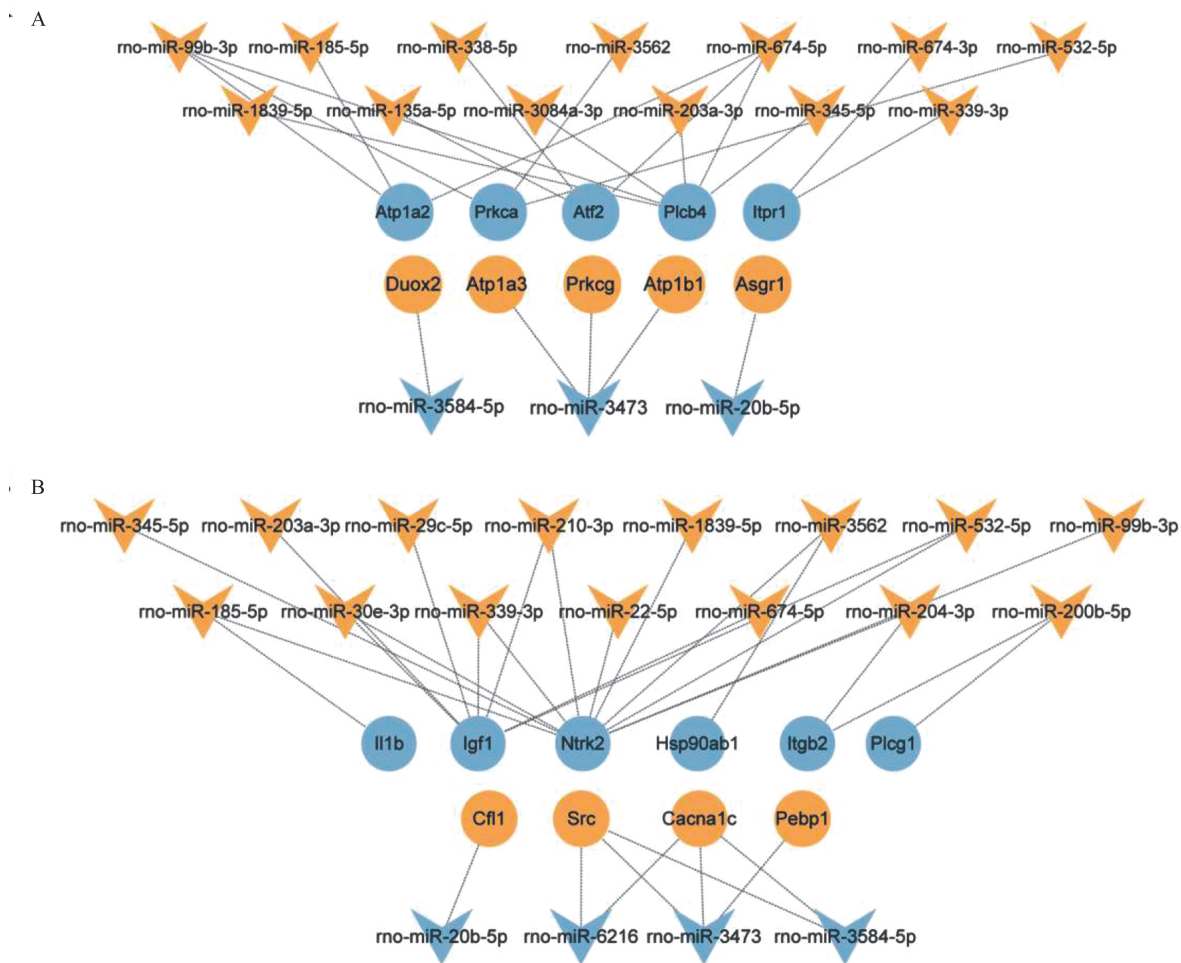


图 6 关键 miRNA-mRNA 网络的构建

A: 富集到甲状腺激素合成通路的基因与 DE miRNA 构建的关键 miRNA-mRNA 网络; B: 枢纽基因与 DE miRNA 构建的关键 miRNA-mRNA 网络

Figure 6 Construction of key miRNA-mRNA networks

A: The key miRNA-mRNA network constructed by mRNAs enriched in thyroid hormone synthesis pathway and DE miRNAs; B: The key miRNA-mRNA network constructed by hub genes and DE miRNAs

3 讨论

甲状腺功能减退症作为常见的内分泌疾病, 影响患者生活质量, 增加人民经济负担^[11]。调查显示我国甲状腺功能减退症患病率约为 17.8%, 其起病隐匿, 早期不易被发现, 严重程度不一, 严重则可危及生命^[12-13]。随着经济水平的提高, 部分人群喜欢食用高脂肪食物, 而脂肪摄入过量则会导致营养过剩, 脂肪在身体各处囤积, 对身体造成巨大的负担。研究表明高脂饮食可损伤甲状腺功能, 挖掘其中的机制, 尤其是早期的相关分子改变, 对早期预防和治疗甲状腺功能减退及相关疾病具有重要意义。本研究建立高脂饮食诱导甲状

腺功能减损伤的大鼠模型, 进一步分析甲状腺的差异表达 miRNA 和 mRNA, 构建 miRNA-mRNA 网络。对网络中的 mRNA 进行 GO 注释、KEGG 通路富集, 并绘制 PPI 网络、筛选枢纽基因, 最后得出关键的 miRNA-mRNA 网络, 为深入探讨脂毒性影响甲状腺功能的机制提供了新的思路。

GO 分析发现上调的 DEmRNA 显著富集到分泌、多元醇代谢、TGFβ 产生的调控等生物过程, 下调的 DEmRNA 富集到整合钙离子释放到胞质、钙离子整合的负调控、PKC 信号的负调控、钙离子跨膜进入细胞质等生物过程。甲状腺功能有赖于甲状腺激素的合成和分泌, 分泌受损则会影响甲状腺功能。肌醇是种环状多元醇, myo-肌醇 (myo-inositol,

MI)是首先被发现的同工型,是三磷酸肌醇(inositol triphosphate, IP3)的前体,TSH水平的增加可导致甲状腺细胞主动积累MI,而MI可以通过依赖磷脂酶C(phospholipase C, PLC)的IP3/Ca²⁺和二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)/PKC途径来调节甲状腺细胞中H₂O₂介导的碘化,导致H₂O₂的生成增加,这是碘有机化和甲状腺激素生物合成的关键步骤^[14]。IP3激活Ca²⁺从内质网释放到胞质激活PKC通路还可激活MAPK通路,而MAPK可刺激甲状腺细胞DNA合成和增殖^[15]。由此可见MI代谢的不平衡、钙离子的失调、PKC信号的受阻都会影响甲状腺功能。钠-碘同向转运体(sodium iodide symporter, NIS)介导的I-摄取在甲状腺激素生物合成中起着关键作用^[16]。而TGF-β可负调控NIS的表达,抑制碘化物的摄取和代谢,抑制甲状腺球蛋白(thyroglobulin, TG)和甲状腺过氧化物酶(thyroid peroxidase, TPO)的表达,从而抑制甲状腺激素的合成^[17-18],TGF-β还是甲状腺细胞分化成熟的负调控因子^[19]。提示高脂饮食可能通过调控以上通路影响甲状腺功能。

KEGG通路分析富集到甲状腺激素合成通路,参与甲状腺功能的调节。富集到PI3K-Akt信号通路,PI3K-Akt通路可以调节细胞的基本功能,与甲状腺细胞的增殖和存活相关^[20-21],而PI3K-Akt途径的激活又可抑制TSH诱导的NIS表达^[22]。此外还富集到磷脂酰肌醇信号系统通路即依赖PLC的IP3/Ca²⁺和DAG/PKC双信号系统,从而激活下游参与甲状腺激素的合成调控。脱碘酶(iodothyronine, DIO)可改变甲状腺激素分子的生物活性,而cAMP级联反应可调控DIO2影响T4向T3的转化从而影响甲状腺功能^[23]。以上的分析表明,高脂饮食可能通过影响这些生物过程或通路来影响甲状腺功能。

研究进一步通过PPI网络了解蛋白质-蛋白质相互作用,并且筛选出4个上调的枢纽基因Src、Pebp1、Cfl1、Cacna1c,6个下调的枢纽基因Itgb2、Il1b、Plcg1、Ntrk2、Igf1、Hsp90ab1。SRC编码酪氨酸蛋白激酶,可激活PI3K-AKT途径^[24]和增加NIS细胞表面水平^[25],SRC对甲状腺功能的影响是这些联合作用的结果。Pebp1编码磷酸乙醇胺结合蛋白1,在维持细胞完整性方面具有多种功能,可抑制MAPK途径和NF-κB的活化,而NF-κB参与介导各种细胞类型的细胞增殖、存活、黏附、侵袭和新生血管形成,对甲状腺细胞存活和关键甲状腺标志物的表达至关重要^[26-28]。ITGB2是整合素β2的一个

重要亚基,整合素可以调节细胞的存活、增殖、粘附以及迁移,也可以控制各种代谢信号和途径,还与免疫过程密切相关^[29]。自身免疫性甲状腺疾病是甲状腺功能减退症的病因之一,甲状腺滤泡中存细胞因子白介素1B(IL-1B),细胞因子在许多情况下表现出多效性,IL-1B通常与炎症和自身免疫的刺激有关,也可能刺激T调节性淋巴细胞的产生,从而抑制自身免疫性疾病的发展^[30]。PLCG1编码的磷酸酶C伽马(PLCγ)1是调控NF-κB重要的酶^[31],可通过调控NF-κB的表达影响甲状腺功能。Hsp90ab1编码热休克蛋白90β,该蛋白可以促进各种生物过程,包括新陈代谢、细胞生长和神经功能,抑制Hsp90ab1还可导致NF-κB活性下降^[36]。以上基因均与炎症和氧化应激相关,提示炎症和氧化应激可能在高脂饮食损伤甲状腺功能过程中发挥重要作用,其具体的机制有待于进一步研究。

甲状腺激素合成通路的关键基因和筛选出的枢纽基因可能是在高脂损伤甲状腺功能过程中起关键作用的基因,17个差异miRNA调控富集到甲状腺激素合成通路的10个差异mRNA,共构建了22对关键miRNA-mRNA对,19个miRNA与10个枢纽基因构建了31对关键miRNA-mRNA对。在关键miRNA-mRNA网络中,miRNA可能通过靶向关键基因,调控它们的功能作用从而影响甲状腺功能。我们发现两组miRNA-mRNA调控网络中存在共同的miRNA,包括miR-3473、miR-339-3p、miR-99b-3p、miR-674-5p等。其中,miR-3473可调控甲状腺激素合成通路相关基因Atp1a3、Prkcg和Atp1b1,枢纽基因Src、Pebp1和Cacna1c等多个基因发挥作用,提示miR-3473可能在高脂饮食损伤甲状腺功能过程中发挥重要作用。而Ntrk2、Igf1则是受最多关键调控网络中miRNA调控的mRNA,在高脂饮食组中显著下调。文献报道,Ntrk2即Trk2可通过与脑源性神经营养因子结合,激活PLCγ途径,还可激活PI3K-Akt、MAPK通路^[32],我们推测Ntrk2可参与调控甲状腺功能。IGF-I可增加TG和TPO表达水平,还可以持续增强甲状腺上皮细胞中的TSH作用,调控甲状腺细胞的增殖,支持甲状腺的正常功能、体积和激素合成^[33-35],IGF-I减少影响甲状腺激素合成和甲状腺功能。因此我们推测miR-3473、Ntrk2、Igf1是高脂饮食损伤甲状腺功能的核心理miRNA和mRNA,可能是干预的有效靶点,miR-3473/Src、miR-339-3p/Igf1、miR-674-5p/Igf1、miR-339-3p/Ntrk2、miR-99b-3p/Ntrk2等是其中的关键调控对。

综上所述,本研究利用生物信息学方法对对照饮食和高脂饮食大鼠甲状腺的 miRNA 和 mRNA 展开分析。GO 和 KEGG 分析表明,高脂饮食导致甲状腺功能减退是多基因多通路作用的结果,进一步在枢纽基因的基础上构建了关键 miRNA-mRNA 调控网络,包括 miR-3473/Src、miR-339-3p/Igf1、miR-674-5p/Igf1、miR-339-3p/Ntrk2、miR-99b-3p/Ntrk2 等 miRNA-mRNA 调控对,其中 miR-3473、Ntrk2、Igf1 可能是高脂饮食损伤甲状腺功能的核心 miRNA 和 mRNA,相关的机制值得在进一步的研究中深入探讨验证。本研究为进一步了解脂毒性影响甲状腺的机制奠定了理论基础,为健康饮食预防脂毒性损伤甲状腺功能提供了有力的支持。miRNA 可作为疾病的诊断和预后的生物标志物,还可通过 miRNA 模拟物补充 miRNA 或者 miRNA 抑制剂抑制 miRNA 治疗疾病^[37],我们的研究为干预高脂饮食导致的甲状腺功能减退提供了潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] 马世瞻, 赵家军. 内分泌与脂代谢[J]. 华西医学, 2018, 33(5): 491-498. doi:10.7507/1002-0179.201804027
MA Shizhan, ZHAO Jiajun. Endocrinology and lipid metabolism[J]. West China Medical Journal, 2018, 33(5): 491-498. doi:10.7507/1002-0179.201804027

[2] Zhang XH, Shao SS, Zhao LF, et al. ER stress contributes to high-fat diet-induced decrease of thyroglobulin and hypothyroidism [J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2019, 316(3): 510-518. doi:10.1152/ajpendo.00194.2018

[3] de Sousa MC, Gjorgjieva M, Dolicka D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(24): 6249. doi:10.3390/ijms20246249

[4] 赵静, 柏力荀, 李菲, 等. MicroRNA 在甲状腺功能减退症中的作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(2): 260-266. doi:10.11842/wst.2019.02.017
ZHAO Jing, BAI Litao, LI Fei, et al. Role of microRNA in hypothyroidism [J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2019, 21(2): 260-266. doi:10.11842/wst.2019.02.017

[5] Guedes EC, da Silva IB, Lima VM, et al. High fat diet reduces the expression of miRNA-29b in heart and increases susceptibility of myocardium to ischemia/reperfusion injury[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(6): 9399-9407. doi:10.1002/jcp.27624

[6] Abdollahi M, Kato M, Lanting LD, et al. Role of miR-

379 in high-fat diet-induced kidney injury and dysfunction [J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2022, 323(6): 686-699. doi:10.1152/ajprenal.00213.2022

[7] Sticht C, de La Torre C, Parveen A, et al. miRWalk: an online resource for prediction of microRNA binding sites [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0206239. doi:10.1371/journal.pone.0206239

[8] Zhou YY, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1523. doi:10.1038/s41467-019-09234-6

[9] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): 605-612. doi:10.1093/nar/gkaa1074

[10] Liu YY, Yin ZL, Wang Y, et al. Exploration and validation of key genes associated with early lymph node metastasis in thyroid carcinoma using weighted gene co-expression network analysis and machine learning [J]. Frontiers in Endocrinology, 2023, 14: 1247709. doi:10.3389/fendo.2023.1247709

[11] Chiovato L, Magri F, Carlé A. Hypothyroidism in context: where we've been and where we're going [J]. Advances in Therapy, 2019, 36(Suppl 2): 47-58. doi:10.1007/s12325-019-01080-8

[12] 中国医师协会中西医结合医师分会内分泌与代谢病学专业委员会. 成人原发性甲状腺功能减退症病证结合诊疗指南 [J]. 世界中医药, 2023, 18(16): 2265-2272. doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2023.16.002

[13] Chaker L, Razvi S, Bensenor IM, et al. Hypothyroidism [J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8(1): 30. doi:10.1038/s41572-022-00357-7

[14] Benvenga S, Nordio M, Laganà AS, et al. The role of inositol in thyroid physiology and in subclinical hypothyroidism management [J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 662582. doi:10.3389/fendo.2021.662582

[15] Jing L, Zhang Q. Intrathyroidal feedforward and feedback network regulating thyroid hormone synthesis and secretion [J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 992883. doi:10.3389/fendo.2022.992883

[16] Riesco-eizaguirre G, Santisteban P, de La vieja A. The complex regulation of NIS expression and activity in thyroid and extrathyroidal tissues [J]. Endocrine-Related Cancer, 2021, 28(10): 141-165. doi:10.1530/ERC-21-0217

[17] Kardalas E, Sakkas E, Ruchala M, et al. The role of transforming growth factor beta in thyroid autoimmunity;

- current knowledge and future perspectives[J]. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2022, 23(3): 431-447. doi:10.1007/s11154-021-09685-7
- [18] Fernández-méndez C, Santisteban P. A critical balance between PAX8 and the hippo mediator TAZ determines sodium/iodide symporter expression and function[J]. *Thyroid*, 2022, 32(3): 315-325. doi: 10.1089/thy.2021.0191
- [19] Romitti M, Eski SE, Fonseca BF, et al. Single-cell trajectory inference guided enhancement of thyroid maturation in vitro using TGF-beta inhibition[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 657195. doi:10.3389/fendo.2021.657195
- [20] Dong S, Liu QY, Jiang M, et al. Xiao-Luo-Wan treats propylthiouracil-induced goiter with hypothyroidism in rats through the PI3K-AKT/RAS pathways based on UPLC/MS and network pharmacology[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 289: 115045. doi:10.1016/j.jep.2022.115045
- [21] 康春媚, 李山, 郭志玲. 基于调控 PI3K-AKT 通路探讨艾灸关元穴治疗甲状腺功能减退的作用机制[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(10): 1831-1835. doi: 10.13935/j.cnki.sjzx.211012
- KANG Chunmei, LI Shan, GUO Zhiling. Research on the mechanism of moxibustion at Guanyuan acupoint in treating hypothyroidism based on regulating PI3K-AKT pathway[J]. *World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2021, 16(10): 1831-1835. doi:10.13935/j.cnki.sjzx.211012
- [22] Oh JM, Ahn BC. Molecular mechanisms of radioactive iodine refractoriness in differentiated thyroid cancer: impaired sodium iodide symporter (NIS) expression owing to altered signaling pathway activity and intracellular localization of NIS[J]. *Theranostics*, 2021, 11(13): 6251-6277. doi:10.7150/thno.57689
- [23] Russo SC, Salas-lucia F, Bianco AC. Deiodinases and the metabolic code for thyroid hormone action[J]. *Endocrinology*, 2021, 162(8): bqab059. doi:10.1210/endo/bqab059
- [24] Pelaz SG, Tabenero A. Src: coordinating metabolism in cancer[J]. *Oncogene*, 2022, 41(45): 4917-4928. doi: 10.1038/s41388-022-02487-4
- [25] Faria M, Domingues R, Bugalho MJ, et al. Analysis of NIS plasma membrane interactors discloses key regulation by a SRC/RAC1/PAK1/PIP5K/EZRIN pathway with potential implications for radioiodine re-sensitization therapy in thyroid cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(21): 5460. doi:10.3390/cancers13215460
- [26] Rajkumar K, Nichita A, Anoor PK, et al. Understanding perspectives of signalling mechanisms regulating PEBP1 function[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2016, 34(6): 394-403. doi:10.1002/cbf.3198
- [27] Giuliani C, Bucci I, Napolitano G. The role of the transcription factor nuclear factor-kappa B in thyroid autoimmunity and cancer[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 471. doi:10.3389/fendo.2018.00471
- [28] 王芳, 陈华, 商丽红, 等. U0126 对子宫内位异位症大鼠 MEK/ERK/NF-κB 通路及增殖侵袭的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2021, 59(9): 148-154. doi:10.6040/j.issn.1671-7554.0.2021.0865
- WANG Fang, CHEN Hua, SHANG Lihong, et al. Effects of U0126 on MEK/ERK/NF-κB pathway, proliferation and invasion in rats with endometriosis[J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2021, 59(9): 148-154. doi:10.6040/j.issn.1671-7554.0.2021.0865
- [29] Xu HS, Zhang AK, Han XY, et al. ITGB2 as a prognostic indicator and a predictive marker for immunotherapy in gliomas[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2022, 71(3): 645-660. doi:10.1007/s00262-021-03022-2
- [30] Mikoś H, Mikoś M, Obara-moszy Ska M, et al. The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD)[J]. *Endokrynologia Polska*, 2014, 65(2): 150-155. doi:10.5603/EP.2014.0021
- [31] Tao PF, Han X, Wang QT, et al. A gain-of-function variation in PLCG1 causes a new immune dysregulation disease[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2023, 152(5): 1292-1302. doi: 10.1016/j.jaci.2023.06.020
- [32] Brivio P, Sbrini G, Corsini G, et al. Chronic restraint stress inhibits the response to a second hit in adult male rats: a role for BDNF signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6261. doi: 10.3390/ijms21176261
- [33] Smith TJ. Insulin-like growth factor pathway and the thyroid[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 653627. doi:10.3389/fendo.2021.653627
- [34] López-márouez A, Carrasco-López C, Fernández-Méndez C, et al. Unraveling the complex interplay between transcription factors and signaling molecules in thyroid differentiation and function, from embryos to adults[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 654569. doi:10.3389/fendo.2021.654569