

网络出版时间: 2024-12-26 16:52:36 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1136.018>

◇ 临床医学研究 ◇

线粒体 DNA D-loop 区单核苷酸多态性及拷贝数与皮肤炎发病风险关系

檀紫瑞¹ 张晶晶² 贾园园² 彭晨星³ 赵宇飞²(河北医科大学第四医院¹ 胸外科、² 风湿免疫科, 石家庄 050011;³ 河北医科大学第二医院风湿免疫科, 石家庄 050000)

摘要 目的 探究线粒体 DNA (mtDNA) 的 D-loop 区单核苷酸多态性 (SNPs) 和 mtDNA 拷贝数与皮肤炎 (DM) 发病风险的关系及其影响因素。方法 收录 74 例 DM 患者和 92 例健康受试者, 从外周血液中提取基因组 DNA, 利用 PCR 技术将 mtDNA 的 D-loop 区目的片段进行扩增, 对产物进行测序; 应用高灵敏度活性氧 (ROS) 检测套件, 测定血清 ROS 水平; 采用流式免疫荧光微球技术测定细胞因子白细胞介素 (IL) -5、IL-13、干扰素 (IFN) - γ 、IL-2、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-4 表达水平, 使用 Wilcoxon 秩和检验评估细胞因子与 DM 风险相关 SNPs 的潜在相关性; 进行实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 分析, 测量 mtDNA 的相对拷贝数。结果 DM 患者组存在 2 个与其发病风险有关的多态性变异位点 (16304T/C、16519T/C), 线粒体 D-loop 区的等位基因 16304C ($\chi^2 = 4.937$, $P = 0.026$) 和 16519C ($\chi^2 = 4.405$, $P = 0.036$) 与 DM 患者发病风险有关; DM 风险相关等位基因 16304C 与 IL-4 低表达相关 ($P = 0.016$)。DM 患者中的 mtDNA 拷贝数高于对照组 ($P < 0.001$)。结论 线粒体 D-loop 区 SNPs 可能是 DM 风险的潜在生物标志物, SNPs 可能通过影响细胞因子参与 DM 的发生。DM 的 mtDNA 拷贝数呈现高表达, mtDNA 拷贝数的增加可能会导致线粒体功能障碍, 从而引发 DM 的发病。

关键词 皮肤炎; D-loop 区; SNPs; 细胞因子; ROS; mtDNA 拷贝数; 发病风险

中图分类号 R 593.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0130-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.018

皮肤炎 (dermatomyositis, DM) 是一种非化脓性炎症病变, 主要累及横纹肌, 可伴有或不伴有多种皮肤损害。已有证据提示 DM 的发生涉及以 I 型干扰素 (interferon, IFN) 通路及以 T、B 淋巴细胞为主的免疫和以内质网应激、线粒体损伤等为主的非免疫因素共同参与^[1-2]。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是由 16 569 碱基对组成的双链环状 DNA, D-loop 区位于 mtDNA 的非编码区, 该区域的突变会调节 mtDNA 的表达、线粒体功能氧化磷酸化和 ATP 的产生^[3]。mtDNA 拷贝数的水平与氧化应激直接相关^[4], 其被视为反映线粒体功能紊乱的生物标记指标。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 通过介导线粒体功能障碍、激活肌肉分解代谢和自噬途径, 在 DM 的骨骼肌损伤中起着关键作用^[5]。细胞因子通过其促炎、

抗炎以及直接影响肌肉在 DM 的发展中发挥重要作用^[6]。课题组先前已经证实在特发性炎性肌病 (idiopathic inflammatory myopathies, IIM) 中 D-loop 区单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 以及 mtDNA 拷贝数的风险预测价值, 该研究拟探究 D-loop 区 SNPs 是否可作为 DM 的风险预测标志物^[7], 并进一步测定 ROS 及细胞因子水平, 探究 SNPs 对 DM 作用的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2021 年 11 月—2022 年 1 月, 于河北医科大学第二医院、河北医科大学第四医院风湿免疫科就诊的 74 例 DM 患者为实验组, 入选患者符合 Bohan/Peter 建议的 1975 年 PM/DM 诊断标准^[8-9]。排除标准: ① 年龄在 <16 岁及 >75 岁的患者; ② 妊娠、哺乳期的妇女; ③ 患有先天性心脏病、肿瘤、甲状腺疾病、慢性肾病或阿尔茨海默病者。另选取同期在河北医科大学第二医院、河北医科大学第四医院体检的 92 例正常人群作为对照组。

1.2 标本采集 经实验组和对照组受试者知情同

2024-11-10 接收

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划 (编号: 20221248)

作者简介: 檀紫瑞, 男, 主治医师;

赵宇飞, 男, 主治医师, 通信作者, E-mail: zhaoyufei724@aliyun.com

意后,抽取3 ml外周静脉血样,置于促凝管内,离心采集上层血清和包括白细胞在内的下层血凝块,立即转入-20℃的冷藏室内恒温保存,并经河北医科大学第二医院(编号:2021-R490)和河北医科大学第四医院(编号:2021KY179)伦理委员会批准。

1.3 方法

1.3.1 mtDNA提取、PCR扩增及基因测序 采用血凝块基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取DNA后置于-80℃恒温保存。经定量鉴定合格后的DNA,利用聚合酶链反应(PCR)扩增目的片段,上游引物为:5'-CCCCATGCT-TACAAGCAAGT-3',下游引物为:5'-GCTTTGAG-GAGGTAAGCTAC-3'。扩增目的片段长度为982 bp。采用美国Thermo公司的绿色体系预混试剂盒,反应体系为25 μl,DreamTaq Green Master Mix(2) 12.5 μl,上下游引物各1 μl,基因组DNA 1 μl,9.5 μl无酶水。PCR的反应条件是:95℃预变性2 min,95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,总循环38次,最后72℃延伸5 min。PCR扩增产物经琼脂糖凝胶纯化后,采用BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit循环测序反应试剂盒进行DNA测序。同一标本采用双向、重复测序。

登录网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)搜索Homo sapiens mitochondrion下载标准人类mtDNA序列。利用DNAMAN测序分析软件将DM患者及正常人外周血mtDNA的D-loop区序列分别与基因库标准人类mtDNA的D-loop区序列进行对比,发现变异后,使用Chromas软件查看测序图,证实变异确实存在。当DM患者外周血mtDNA D-loop区核苷酸序列与标准序列不符时,认为其为多态性。

1.3.2 ROS测定 使用BBOXiProbe®血清ROS检测试剂盒(上海BestBio Technology公司产品)测定DM患者血清ROS水平。在避光96孔板中加入100 μl血清、10 μl O12探针,用移液器吹打,使之充分混合。37℃恒温箱避光孵育30 min。置于酶标仪中,检测荧光强度时激发波长为488 nm,发射波长为530 nm。

1.3.3 细胞因子测定 流式免疫荧光微球技术用于细胞因子的测定。按Multi-Analyte Flow Assay Kit试剂盒说明书检测DM患者的白细胞介素(interleukin, IL)-5、IL-13、IFN-γ、IL-2、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、IL-4的水平。使用流式细胞仪定量分析待检物质特异性微珠

区域PE荧光信号,使用BioLegend的LEGENDplex V8.0数据分析软件(美国圣迭戈BioLegend公司产品)生成标准曲线并确定特异性分析物的浓度。

1.3.4 mtDNA拷贝数测定 选取线粒体基因烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶1(ND1)以核基因人β-血红蛋白(HGB)基因2对引物对同一个研究对象血液标本进行实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)检测,并以核DNA为基准对mtDNA拷贝数进行相对定量。引物如下:HGB_f(forward) 5'-GTG-CACCTGACTCCTGAGGAGA-3', (reverse) 5'-CCTT-GATACCAACCTGCCAG-3'; ND1_f(forward) 5'-CC-CTAAACCCGCCACATCT-3', (reverse) 5'-GAGCG-ATGCTGAGAGCTAAGGT-3'。

本实验采用30 ng基因组DNA与3 μl qPCR SYBR Green Mix(5)加入1 μl正向和反向引物,使最终体积为15 μl。使用实时荧光定量PCR仪进行扩增,HGB和ND1具体反应条件为:95℃、10 min,(95℃、15 s 60℃、1 min)40个循环。将配制的产物进行qPCR,使用Applied Biosystems 7500实时荧光定量PCR仪进行分析以测量相对mtDNA拷贝数。每个样本设2个复孔。将固定的DNA样本放在托盘的相同位置作为参考。每个标本中mtDNA的拷贝数是用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对表达公式($\Delta C_T = C_{TND1} - C_{THGB}$)。通过计算ND1基因的平均 C_T 值与HGB基因的平均 C_T 值之差来确定 ΔC_T 。样本 ΔC_T 和参考 ΔC_T 之间的差异得出了 $\Delta\Delta C_T$ 的值。

1.4 统计学处理 使用SPSS 19.0软件进行统计分析,预先使用PASS 15.0进行样本量估算,本研究探究两组人群与等位基因表达的关联,欲探究出中等程度效应量大小的关联,当 χ^2 检验自由度为1时,总样本量为117人可以实现90%检验效能。采用 t 检验对DM组和对照组的年龄进行比较,采用 χ^2 检验对DM组和对照组的性别进行比较。采用 χ^2 检验对DM组的D-loop区变异和对照组进行比较。对于计数资料,首先进行正态测试,对于符合正态的数据则采用 t 检验,若不符合则采用Wilcoxon秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般特征 将DM患者与对照组的年龄和性别进行比较,结果显示,两组患者的年龄($t = -1.102, P = 0.273$)和性别($\chi^2 = 0.311, P = 0.577$)之间的差异无统计学意义,说明DM组和对

照组具有均衡的可比性。本研究统计了 74 例糖尿病患者的临床特征包括肌痛(28 例)、肌无力(42 例)、向阳疹(47 例)、Gotttron 征(39 例)、披肩征及 V 字征(39 例)、间质性肺疾病(interstitial lung disease, ILD)(41 例)、吞咽困难(10 例); 25 例患者测定了肌炎抗体谱, 包括 anti-Mi2(7 例)、anti-Tif1- γ (4 例)、anti-NXP2(1 例)、anti-MDA5(9 例)、anti-SAE(4 例); 以及部分化验结果, 肌酸激酶 336. 50(1 892. 00)(U/L) 及 370. 50(356. 00)(U/L)。

2.2 mtDNA 的 D-loop 区 SNPs 与 DM 患者发病风险的关系 DM 组与对照组 mtDNA 的 D-loop 区段 SNPs 分布频率统计(表 1) 采用 χ^2 检验, 共发现 2 个多态性变异位点(16304T/C、16519T/C) 与 DM 发病风险相关(图 1A ~ D)。线粒体 D-loop 区的等位基因 16304C($\chi^2 = 4. 937$, $P = 0. 026$) 和 16519C($\chi^2 = 4. 405$, $P = 0. 036$) 与 DM 患者发病风险有关。

表 1 DM 患者和对照组线粒体 D-loop 区 SNPs 的频率分布[n (%)]

Tab. 1 Frequency distribution for mitochondrial D-loop single nucleotide polymorphisms between DM patients and controls [n (%)]

Nucleotide	DM patients ($n = 74$)	Controls ($n = 92$)	χ^2 value	P value
103G/A	69 (93. 2)	88 (95. 7)	0. 464	0. 496
146T/C	61 (82. 4)	81 (88. 0)	1. 044	0. 307
150C/T	57 (77. 0)	78 (84. 8)	0. 850	0. 356
151C/T	68 (91. 9)	91 (98. 9)	3. 418	0. 064
152T/C	60 (81. 1)	71 (77. 2)	0. 376	0. 540
195T/C	66 (89. 2)	82 (89. 1)	0	0. 990
199T/C	73 (98. 6)	86 (93. 5)	1. 585	0. 208
204T/C	67 (90. 5)	86 (93. 5)	0. 490	0. 484
207G/A	70 (94. 6)	87 (94. 6)	0	1. 000
235A/G	68 (94. 4)	81 (88. 0)	0. 661	0. 416
249A/del	55 (74. 3)	72 (78. 3)	0. 354	0. 552
489T/C	36 (48. 6)	48 (52. 2)	0. 204	0. 652
523-524AC/del	54 (73. 0)	54 (58. 7)	3. 678	0. 055
16266C/T	69 (93. 2)	86 (93. 5)	0	1. 000
16290C/T	70 (94. 6)	82 (89. 1)	1. 586	0. 286
16291C/T	67 (90. 5)	87 (94. 6)	0. 991	0. 320
16298T/C	67 (90. 5)	88 (95. 7)	1. 004	0. 316
16304T/C	61 (82. 4)	86 (93. 5)	4. 937	0. 026
16311T/C	66 (89. 2)	86 (93. 5)	0. 977	0. 323
16316A/G	72 (97. 3)	86 (93. 5)	0. 604	0. 437
16319G/A	67 (90. 5)	75 (81. 5)	2. 697	0. 101
16327C/T	70 (94. 6)	89 (96. 7)	0. 087	0. 768
16362T/C	41 (55. 4)	54 (58. 7)	0. 181	0. 670
16519T/C	38 (51. 4)	62 (67. 4)	4. 405	0. 036

2.3 DM 患者、健康对照组的 ROS 水平 DM 患者的 ROS 水平高于对照组, 但差异无统计学意义($P = 0. 064$), 见图 2。

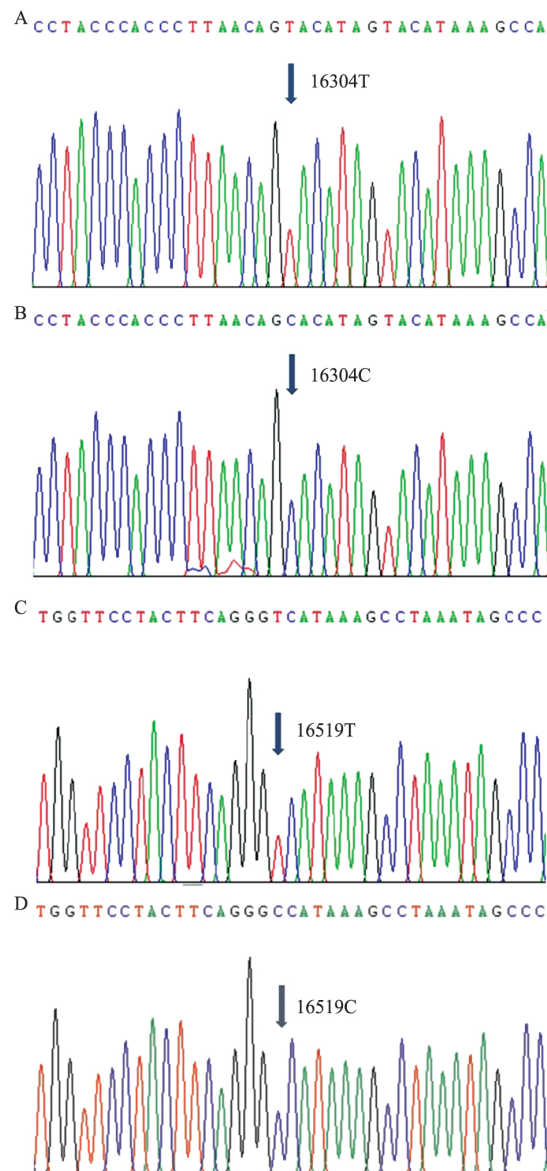


图 1 D-loop 区 SNPs 位点测序图

Fig. 1 SNPs sequencing map in D-loop region

A: The T genotype at position 16304; B: The C genotype at position 16304; C: The T genotype at position 16519; D: The C genotype at position 16519.

2.4 DM 患者的细胞因子水平及与发病相关 SNPs 的关系 使用 Wilcoxon 秩和检验评估细胞因子包括 IL-5、IL-13、IFN- γ 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α 和 IL-4 水平与 DM 风险相关 SNPs 的潜在相关性, DM 风险相关等位基因 16304C 与 IL-4 低表达显著相关 [T 5. 650(4. 610) vs C 4. 540(2. 640), $P = 0. 016$, 图 3] 而 16519C 未发现与细胞因子表达相关。上述数据表明, 这些与细胞因子表达相关的 DM 风险相关 SNPs 可能参与 DM 的发展。

2.5 DM 患者与健康对照组 mtDNA 的拷贝数及

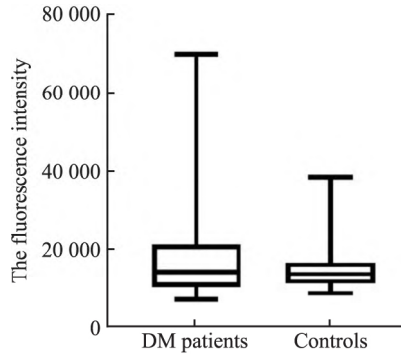


图2 DM患者、健康对照组的ROS水平

Fig. 2 ROS levels in DM patients and healthy controls

相互关系 DM 患者的 mtDNA 拷贝数量高于对照组 ($P < 0.001$), 见图 4A。进一步分析 16304、16519 不同等位基因拷贝数量差异无统计学意义, 见图 4B、C 提示 DM 风险相关 SNPs 不同等位基因不引起 mtDNA 拷贝数的变化。

3 讨论

DM 的发病涉及免疫及非免疫因素共同参与, 由于疾病的异质性及复杂性, 其具体发病机制尚不清楚。本研究发现两个多态性变异位点

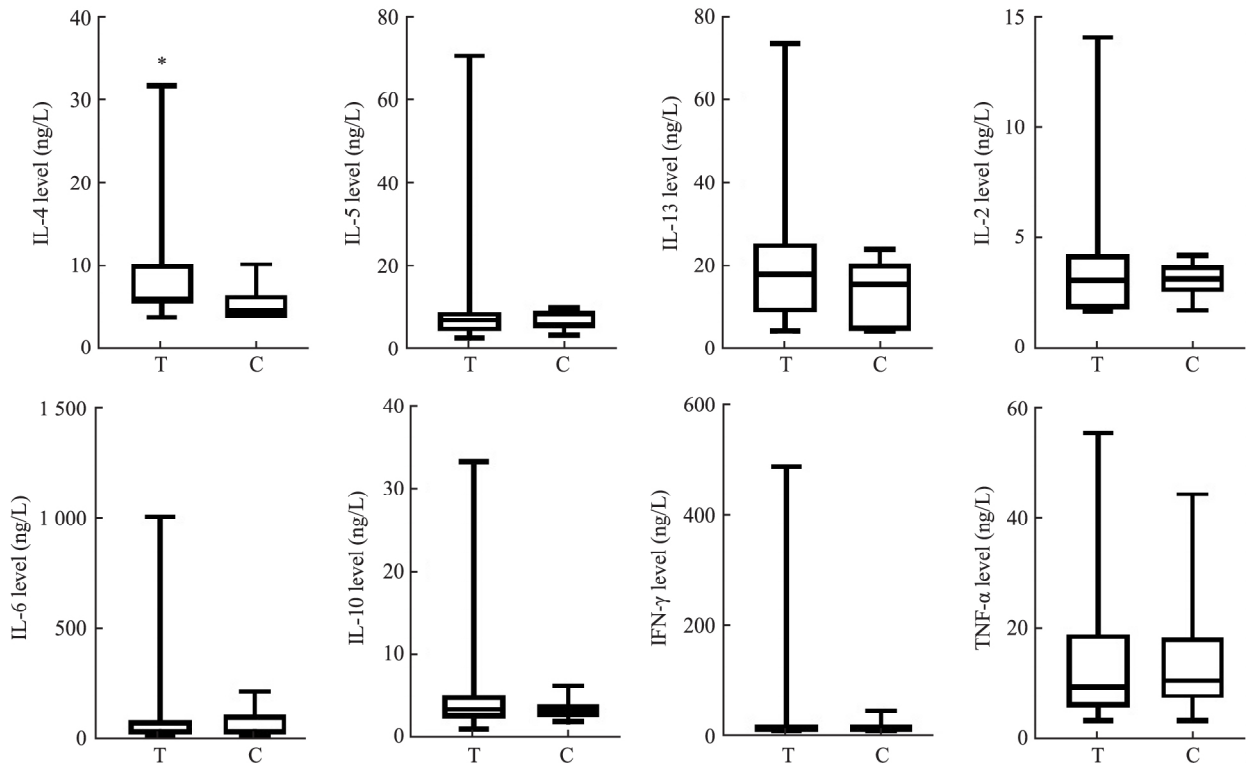


图3 DM 风险相关的 16519 位点中 IL-4、IL-5、IL-13、IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 水平的箱式图

Fig. 3 Boxplot of IL-4, IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α levels in DM risk-associated position 16519

T: Allele T; C: Allele C; * $P < 0.05$ vs Allele C.

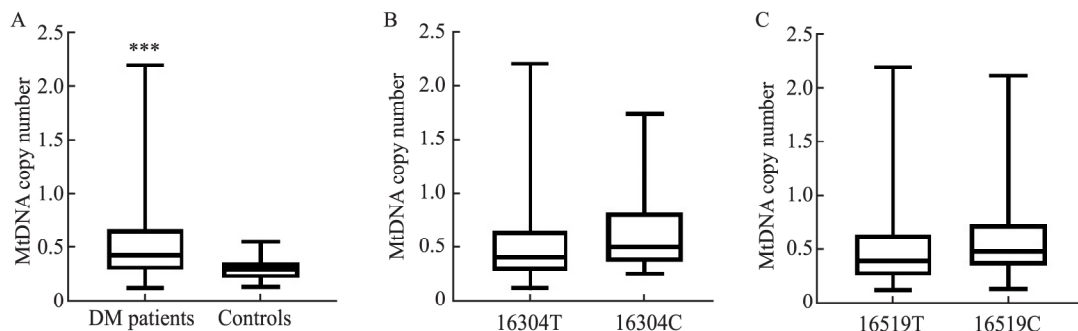


图4 DM患者、健康对照组及风险相关 SNPs 的 mtDNA 拷贝数

Fig. 4 MtDNA copy number of DM patients, healthy controls and risk associated SNPs

A: DM patients; B: position 16304; C: position 16519; T: Allele T; C: Allele C; *** $P < 0.001$ vs healthy controls group.

(16304T/C 和 16519T/C) 与 DM 风险有关,16304 和 16519 的变异形式为 T-C 的单碱基置换,其中 16304 位点位于高可变区(hypervariable segment-I, HV-I)。HV-I 调节 mtDNA 的转录和复制,因此通过产生过多的 ROS 和改变线粒体的功能,该区域的基因改变可能会对机体免疫状态产生影响。位于 HV-I 区域的 16304 位点已被确定为非霍奇金淋巴瘤一个独立的预后标志物^[10]。此外,16519C 等位基因通过增加 DNA 氧化损伤增加了胃癌的致癌性^[11]。Zhang et al^[12] 研究发现 mtDNA 的 D-loop 区的 16519C 等位基因可能通过改变 mtDNA 的复制和转录来促进 ROS 和 IFN- γ 水平,从而影响类风湿关节炎的发生,作为遗传标记的 SNP 位点似乎可以通过免疫及非免疫因素影响免疫病的进程。

本研究中 DM 患者与正常对照组间 ROS 水平无显著区别,但仍显示 DM 患者呈现高 ROS 水平的趋势,似乎提示 DM 患者呈现出高氧化应激水平,氧化损伤在疾病发生中扮演了一定的角色。长期升高的 ROS 水平可能损害电子传递链的功能减少 ATP 的产生,从而导致 IIM 的肌肉损伤^[13]。Meyer et al^[14] 在 DM 线粒体相关研究中发现,对早期未经治疗的 DM 肌肉的转录组分析显示,下调的基因主要是线粒体相关的。此外,线粒体功能障碍增加 ROS 的产生,驱动 I 型 IFN 诱导的基因表达和肌肉炎症,并可能因此维持疾病状态。

DM 被认为是由 I 型 IFN 驱动的,既往文献^[15]证实了细胞因子在 IIM 中存在异常高表达,印证了细胞因子在 IIM 形成及进展中起着关键作用。IL-4 它是介导 2 型免疫反应的重要细胞因子,在调节多种免疫细胞的功能方面发挥着重要作用。先前的研究^[16]表明 IL-4 可以抑制细胞介导的免疫和促进体液免疫。进一步的实验证明,DM 肌肉中的 Th2 细胞产生的细胞因子(如 IL-4)浸润与疾病的较低严重程度相关^[17],这可能是由于 Th2 细胞因子产生 M2 巨噬细胞导致组织修复。另外 IL-4 似乎通过抑制 IFN 诱导的炎症来抵抗 DM 增强肌肉的自我修复能力^[18]。T 细胞活化诱导的细胞因子 IL-4 的表达是由源自线粒体呼吸复合物 I 的氧化信号决定的,DM 风险相关等位基因 16304C 似乎通过影响线粒体氧化功能引起 IL-4 低表达从而引发肌肉炎症。

mtDNA 的拷贝数直接关系到能量储备的变化、氧化应激和代谢,其可被视为反映线粒体功能紊乱的生物标志指标。先前的研究^[19]表明,mtDNA 拷贝数高与线粒体活跃的生物能量功能有关,其特征

是 mtDNA 编码的 *ND1* 基因增加,耗氧率升高,ATP 含量增加,线粒体转录因子 A 蛋白水平表达升高。本研究发现了 mtDNA 的拷贝数变化与 DM 相关,因此,升高的 mtDNA 拷贝数可能导致线粒体功能障碍,从而引发 DM 发病。

综上所述,该研究表明 mtDNA 的 D-loop 区 SNPs 与 DM 发病风险有关,线粒体 D-loop 区 SNPs 可能是 DM 风险的潜在生物标志物。SNPs 可能通过影响细胞因子参与 DM 的发生。另外,DM 的 mtDNA 拷贝数呈现高表达,mtDNA 拷贝数的增加可能会导致线粒体功能障碍,从而引发 DM 的发病。

参考文献

- [1] Coley W, Rayavarapu S, Nagaraju K. Role of non-immune mechanisms of muscle damage in idiopathic inflammatory myopathies [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(2): 209. doi: 10.1186/ar3791.
- [2] Venalis P, Lundberg I E. Immune mechanisms in polymyositis and dermatomyositis and potential targets for therapy [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(3): 397-405. doi: 10.1093/rheumatology/ket279.
- [3] 李会会,王迪迪,杨彬,等. 线粒体 DNA 对 Caco-2 细胞通透性的影响及机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(8): 1175-80. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.001.
- [3] Li H H, Wang D D, Yang B, et al. Effects of mitochondrial DNA on permeability of Caco-2 cells and its mechanism [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(8): 1175-80. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.001.
- [4] Guha, Avadhani N G. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics [J]. *Mitochondrion*, 2013, 13(6): 577-91. doi: 10.1016/j.mito.2013.08.007.
- [5] Lightfoot A P, McArdle A, Jackson M J, et al. In the idiopathic inflammatory myopathies (IIM), do reactive oxygen species (ROS) contribute to muscle weakness? [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(7): 1340-6. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-207172.
- [6] Moran E M, Mastaglia F L. Cytokines in immune-mediated inflammatory myopathies: cellular sources, multiple actions and therapeutic implications [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 178(3): 405-15. doi: 10.1111/cei.12445.
- [7] Zhao Y, Peng C, Lai R, et al. The SNPs of mitochondrial DNA displacement loop region and mitochondrial DNA copy number associated with risk of polymyositis and dermatomyositis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5903. doi: 10.1038/s41598-022-09943-x.
- [8] Bohan A, Peter J B. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts) [J]. *N Engl J Med*, 1975, 292(7): 344-7. doi: 10.1056/nejm197502132920706.
- [9] Bohan A, Peter J B. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts) [J]. *N Engl J Med*, 1975, 292(8): 403-7. doi: 10.1056/nejm197502202920807.
- [10] Diao L, Wei G, Su H, et al. Sequence polymorphisms in the D-

- loop region of mitochondrial DNA and outcome of non-Hodgkin lymphoma[J]. *Mitochondrial DNA* ,2015 ,26(1) : 88 – 91. doi: 10. 3109/19401736. 2013. 823173.
- [11] Guo Z ,Zhao S ,Fan H ,et al. Identification of sequence polymorphisms in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for colon cancer[J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal* , 2016 , 27 (6) : 4244 – 5. doi: 10. 3109/19401736. 2014. 1003920.
- [12] Zhang J ,Zhang J ,Lai R ,et al. Risk-associated single nucleotide polymorphisms of mitochondrial D-loop mediate imbalance of cytokines and redox in rheumatoid arthritis [J]. *Int J Rheum Dis* , 2023 ,26(1) : 124 – 31. doi: 10. 1111/1756 – 185X. 14465.
- [13] Inoue M ,Sato E F ,Nishikawa M ,et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life [J]. *Curr Med Chem* , 2003 , 10 (23) : 2495 – 505. doi: 10. 2174/0929867033456477.
- [14] Meyer A ,Laverny G ,Allenbach Y ,et al. IFN- β -induced reactive oxygen species and mitochondrial damage contribute to muscle impairment and inflammation maintenance in dermatomyositis [J]. *Acta Neuropathol* , 2017 , 134 (4) : 655 – 66. doi: 10. 1007/s00401 – 017 – 1731 – 9.
- [15] Thuner J ,Coutant F. IFN- γ : an overlooked cytokine in dermatomyositis with anti-MDA5 antibodies [J]. *Autoimmun Rev* ,2023 , 22(10) : 103420. doi: 10. 1016/j. autrev. 2023. 103420.
- [16] Harada Y ,Tanaka S ,Motomura Y ,et al. The 3' enhancer CNS2 is a critical regulator of interleukin-4-mediated humoral immunity in follicular helper T cells [J]. *Immunity* , 2012 , 36(2) : 188 – 200. doi: 10. 1016/j. immuni. 2012. 02. 002.
- [17] Fujiyama T ,Ito T ,Ogawa N ,et al. Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4⁺ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis [J]. *Clin Exp Immunol* , 2014 , 177(1) : 110 – 20. doi: 10. 1111/cei. 12311.
- [18] Friedman J R ,Nunnari J. Mitochondrial form and function [J]. *Nature* ,2014 , 505: 335 – 43. doi: 10. 1038/nature12985.
- [19] Lin C S ,Lee H T ,Lee S Y ,et al. High mitochondrial DNA copy number and bioenergetic function are associated with tumor invasion of esophageal squamous cell carcinoma cell lines [J]. *Int J Mol Sci* , 2012 , 13 (9) : 11228 – 46. doi: 10. 3390/ijms130911228.

The relationship between D-loop region single nucleotide polymorphism and copy number of mitochondrial DNA with the risk of developing dermatomyositis

Tan Zirui¹ ,Zhang Jingjing² ,Jia Yuanyuan² ,Peng Chenxing³ ,Zhao Yufei²

(¹Dept of Thoracic Surgery ,²Dept of Immunology and Rheumatology ,The Fourth Hospital of Hebei Medical University ,Shijiazhuang 050011; ³Dept of Immunology and Rheumatology ,The Second Hospital of Hebei Medical University ,Shijiazhuang 050000)

Abstract Objective To explore the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in D-loop region of mitochondrial DNA (mtDNA) and mtDNA copy number and the risk of dermatomyositis (DM) ,and its influencing factors. **Methods** 74 patients with DM and 92 healthy controls were included in the study. Genomic DNA was extracted from peripheral blood and the target fragment of mtDNA D-loop region was amplified by PCR technique ,and the products were subsequently sequenced. Serum levels of ROS were assessed using a high-sensitivity reactive oxygen species detection kit. The expression levels of cytokines ,interleukin (IL) -5 ,IL-13 ,interferon- γ (IFN- γ) ,IL-2 ,IL-6 ,IL-10 ,tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-4 were measured using Flow Fluorescence Immunomicrobeads Assay. Wilcoxon rank-sum test was used to assess the potential correlation between cytokines and SNPs associated with DM risk. The relative copy number of mtDNA was measured using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis. **Results** Two SNPs (16304T/C ,16519T/C) were found to be associated with the risk of developing DM ,and alleles 16304C ($\chi^2 = 4.937$, $P = 0.026$) and 16519C ($\chi^2 = 4.405$, $P = 0.036$) in the mitochondrial D-loop region were confirmed to be associated with DM development risk. The DM risk-associated allele 16304C was significantly associated with lower IL-4 expression ($P = 0.016$) . The mtDNA copy number was significantly higher in DM patients than in controls ($P < 0.001$) . **Conclusion** Mitochondrial D-loop SNPs can be potential biomarkers for DM risk ,and SNPs may be involved in DM by influencing cytokines. DM shows high expression of mtDNA copy number ,and the increase in mtDNA copy number may lead to mitochondrial dysfunction ,which triggers the pathogenesis of DM.

Key words dermatomyositis; D-loop region; SNPs; cytokine; ROS; mtDNA copy number; onset risk

Fund program Medical Science Research Project Plan of Hebei Provincial Health Commission (No. 20221248)

Corresponding author Zhao Yufei ,E-mail: zhaoyufei724@ aliyun. com