

· 论著 ·

桥本甲状腺炎患者血浆外泌体 miRNA 表达谱研究

赵静¹ 李菲² 晏蔚田² 肖瑶² 魏军平²

¹北京市西城区广外医院肾病科 100055; ²中国中医科学院广安门医院内分泌科 100053

通信作者:魏军平, Email: wei junping@126.com

【摘要】 目的 检测桥本甲状腺炎患者 (Hashimoto's thyroiditis, HT) 甲状腺功能正常组、HT 合并亚临床甲状腺功能减退 (SCH) 组以及对照组外泌体微小 RNAs (microRNAs, miRNAs), 探讨 HT 病程中不同甲状腺状态下的 miRNA 差异表达谱及其相应的生物学功能。**方法** 选取 HT 甲状腺功能正常者、HT 合并 SCH 患者及健康志愿者各 3 人, 提取外周血浆外泌体进行 miRNA 高通量测序, 统计分析 3 组间差异表达 miRNA, 并进行靶基因预测、基因本体功能 (GO) 及京都基因与基因组百科全书通路 (KEGG pathway) 分析。**结果** 得到 75 条差异表达 miRNA ($\log_2 FC > 1$ 且 $Q\text{-value} \leq 0.001$), 数据挖掘后获得 hsa-miR-324-3p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-532-3p 等 10 条核心 miRNA。GO 分析表明, 差异 miRNA 的靶基因主要参与细胞过程、生物调节、代谢过程等生物学过程, 具备结合、催化活性、转录调节活性等分子功能。KEGG 分析得到的通路主要为环磷酸腺苷 (cAMP) 信号通路、人类表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor, ErbB) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路等。**结论** HT 患者血浆外泌体 miRNA 较健康人存在差异表达, 其在甲状腺功能正常与 SCH 两种不同状态中也存在差异表达。hsa-miR-324-3p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-423-5p 及 hsa-miR-532-3p 等 miRNA 可能通过 cAMP、ErbB 及 HIF-1 等信号通路在 HT 病程进展中发挥一定的作用。

【关键词】 桥本甲状腺炎; 外泌体; 微小 RNAs; RNA 测序

基金项目:国家自然科学基金 (81573961); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金资助项目 (ZZ11-030); 首都卫生发展科研专项 (2014-2-4152, 2020-2-4154)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20200911-09024

Differential expression profiles of plasma exosomal miRNA in Hashimoto's thyroiditis patients Zhao Jing¹, Li Fei², Yan Weitian², Xiao Yao², Wei Junping². ¹Department of Nephrology, Beijing Xicheng Guangwai Hospital, Beijing 100055, China; ²Department of Endocrinology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Corresponding author: Wei Junping, Email: wei junping@126.com

【Abstract】 Objective To detect the exosomal miRNA in the cases of Hashimoto's thyroiditis (HT) with euthyroidism, HT combined with subclinical hypothyroidism and healthy control, and to explore the differential expression profiles of miRNA in different thyroid states in the course of HT and their corresponding biological functions. **Methods** Three cases of HT with euthyroidism, 3 cases of HT with subclinical hypothyroidism and 3 cases of healthy volunteers were enrolled in this study. The miRNA were extracted from peripheral plasma of these 9 samples, then high-throughout miRNA sequencing technology was performed for screening differential expression profiles, which followed by target gene prediction, Gene ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway (KEGG pathway) analysis. **Results** A total of 75 differentially expressed miRNAs were found ($\log_2 FC > 1$ and $Q\text{-value} \leq 0.001$), and 10 core miRNAs were obtained through data mining, including hsa-miR-324-3p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-532-3p, etc. The results of GO enrichment analysis showed that these differential miRNA targeted genes mainly participated in a variety of biological processes such as cellular process, biological regulation

and metabolic processes. Besides, they were involved in binding, catalytic activity, transcription regulation activity and other molecular functions. cAMP signaling pathway, ErbB signaling pathway and HIF-1 signaling pathway were the main pathways obtained by enrichment analysis of KEGG pathway. **Conclusion** There are differential expression profiles of exosomal miRNA in HT patients, and also in the two different states of normal thyroid function and subclinical hypothyroidism. MiRNAs such as hsa-miR-324-3p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-423-5p and hsa-miR-532-3p may play an important role in the progression of HT through cAMP signaling pathway, ErbB signaling pathway and HIF-1 signaling pathway.

【Keywords】 Hashimoto's thyroiditis; Exosomal; MicroRNAs; RNA-Seq

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81573961); The Fundamental Research Funds for the Central Public Welfare Research Institutes(ZZ11-030); The Capital's Funds for Health(2014-2-4152, 2020-2-4154)

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20200911-09024

桥本甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis, HT) 是导致甲状腺功能减退症 (hypothyroidism, 简称甲减) 的最常见原因, 它通过细胞和抗体介导的免疫过程来破坏甲状腺细胞, 从而在病程的不同时期呈现出甲状腺功能正常、亢进、减退等多种状态^[1-2]。在我国, 亚临床甲减 (subclinical hypothyroidism, SCH) 占全部甲减的 90% 以上^[3-4]。但截至目前, HT 的病因及病理机制仍未阐明。循环微小 RNA (miRNA) 是存在于血清、血浆、尿液等体液中的 miRNA, 可介导细胞间相互作用、动植物间相互交流, 并以稳定性及耐受性良好、方便取样等优势, 有望作为 HT 的理想生物标志物及治疗靶点。本研究收集中国中医科学院广安门医院内分泌科门诊就诊的 HT 患者 (包括甲状腺功能正常组及 SCH 组) 和健康人群外周血, 提取血浆外泌体 miRNA 进行 RNA 测序, 筛选差异表达 miRNA 谱, 并进行靶基因预测以及功能、通路分析, 试图阐述 HT 患者甲状腺功能正常期、SCH 期参与的 miRNA 及相应的生物学功能, 探讨 miRNA 在 HT 疾病进程中所发挥的调控作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 03 月至 2019 年 03 月期间, 在中国中医科学院广安门医院内分泌科门诊就诊的 HT 患者 3 例为 HT 组, 入选标准为甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb) 和抗甲状腺球蛋白抗体阳性。HT 合并 SCH 患者 3 例为 SCH 组, 入选标准为符合 HT 标准且甲状腺功能检查促甲状腺激素升高, 血清游离甲状腺素 (FT₄)、总甲状腺素 (TT₄) 正常。选取同时期健康体检者 3 名为对照组。本研究

已通过医院伦理委员会批准, 所有研究对象均知情并已签署知情同意书。

1.2 标本采集与处理 受试者空腹 10 h 以上, 抽取清晨静脉全血 6 ml, 用乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝管采血后立即离心, 离心条件为: 离心力 815 g, 时间为 10 min, 温度 4℃, 后用移液器吸取上部血浆, 分装入 Paxgene 冻存管, 置于 -80℃ 冰箱保存。将获取的血浆样本送入深圳华大基因科技服务有限公司, 采用 total exosome isolation (thermo fisher scientific) 试剂盒提取外泌体, 使用 QIAGEN 试剂盒提取总 RNA, 准备测序。

1.3 miRNA 文库的制备与测序 (1) 质检合格的总 RNA 样品通过聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 电泳切胶回收目的片段范围的小 RNA。(2) 在 3' 端连上接头。(3) 加入 RT 引物, 和 3' 端的接头杂交 (同时杂交游离的接头片段)。(4) 在 5' 端连上接头, 形成逆转录体系, 在 RT 引物引导下得到一链 cDNA。(5) 使用高敏聚合酶对 cDNA 扩增, 富集同时含有两端接头的 cDNA, 放大文库产量。(6) 分离 100 ~ 120 bp 范围聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物, 进行文库定量及 pooling 环化处理, 环化文库经过滚环复制生成 DNA 纳米球, 质控合格后上机测序。

1.4 miRNA 信息分析

1.4.1 数据过滤及注释 利用 BGISEQ-500 平台, 对富集到的 18 ~ 30 nt 小 RNA 片段进行测序, 对有效数据进行序列长度分布统计, 将筛选后的高质量序列分类注释, 获取样品中各组成成分及表达量信

息,并对所有小 RNA 片段进行分类注释。

1.4.2 差异 miRNA 筛选 对计算比对后的小 RNA 表达水平进行 TPM 标准化,以标准化后的数据进行后续差异比较分析。基于 MA-plot 计算差异表达,对差异检验得到的 P 值再用 Q 值进行多重假设检验校正,对于符合差异表达量两倍以上(即 $\log_2 FC > 1$)且 Q 值 ≤ 0.001 者,认为是显著差异表达基因。

1.4.3 miRNA 靶基因预测 采用 RNAhybrid、miRanda 及 TargetScan 软件进行 miRNA 靶基因预测,取三者交集作为预测结果,并结合相应的条件进行过滤。

1.4.4 miRNA 靶基因的功能与通路富集分析 对靶基因进行基因本体功能(GO)注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路功能注释。以校正后 P 值即 Q 值 ≤ 0.05 为阈值,对满足此条件的 GO 条目和 Pathway 定义为在差异表达小 RNA 对应的靶基因中显著富集。

2 结果

2.1 小 RNA 长度分布 对测序得到的原始数据进行过滤,过滤掉无插入片段序列、插入片段过长的序列、低质量序列等杂质,得到干净序列,统计小 RNA 的序列种类及数量,并对小 RNA 的长度分布进行统计,显示 miRNA 长度集中分布在 21 ~ 22 nt,说明本次测序质量良好。

2.2 差异表达 miRNA 对照组与 HT 组比较,筛选出差异表达 miRNA 207 条,其中 52 条 miRNA 表达上调,155 条 miRNA 表达下调。对照组与 SCH 组比较,差异表达 miRNA 410 条,其中 72 条 miRNA 表达上调,338 条 miRNA 表达下调。HT 组与 SCH 组比较,差异表达 miRNA 377 条,其中 97 条 miRNA 表达上调,280 条 miRNA 表达下调。

2.3 聚类分析差异表达 miRNA 对 3 组间显著差异 miRNA 取交集,得到 75 条 miRNA 共表达,结果见图 1。

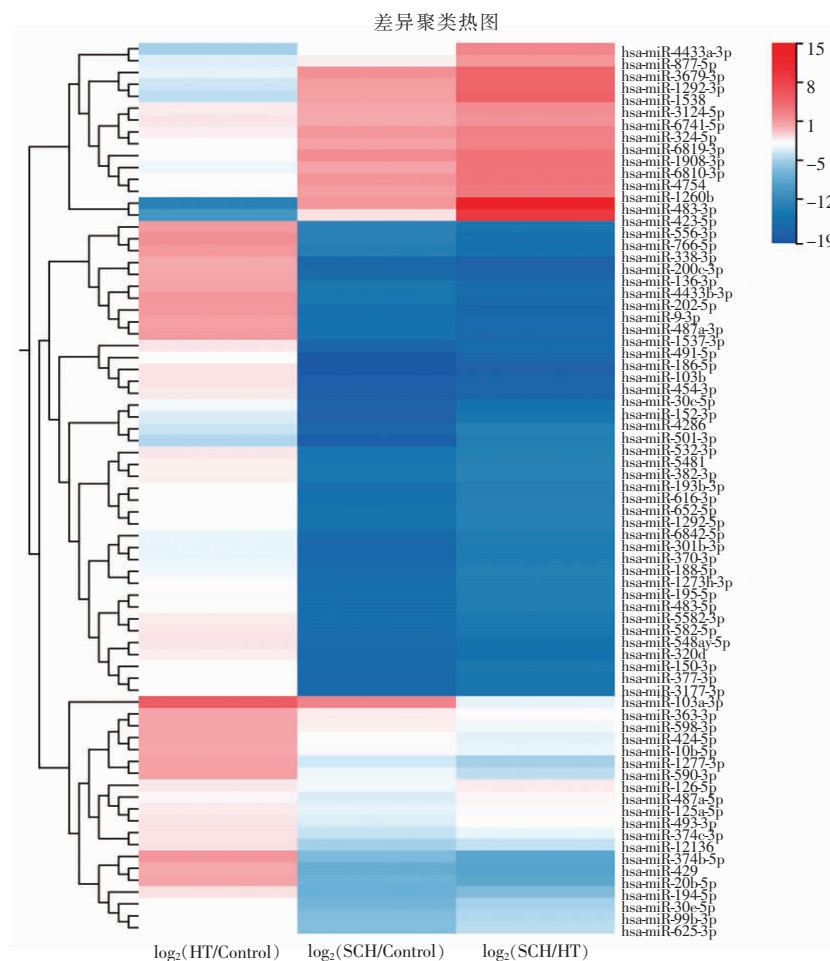


图 1 各组间差异表达 miRNA 统计

2.4 靶基因的 GO 注释富集分析 GO 富集分析表明,差异miRNA靶基因显著富集的细胞成分主要为细胞质 (cytoplasm)、细胞膜 (membrane)、细胞质膜 (plasma membrane)、投射神经元 (neuron projection)、突触 (synapse), 分子功能为蛋白质结合 (protein binding)、激酶活性 (kinase activity)、核酸结合 (nucleotide binding)、转移酶活性 (transferase activity)、氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity), 生物学过程主要为磷酸化作用 (phosphorylation)、轴突导向 (axon guidance)、RNA 聚合酶对转录的正向调控 (positive regulation of transcription by RNA polymerase II)、RNA 聚合酶对转录的负向调控 (negative regulation of transcription by RNA polymerase II)、蛋白磷酸化作用 (protein phosphorylation)。

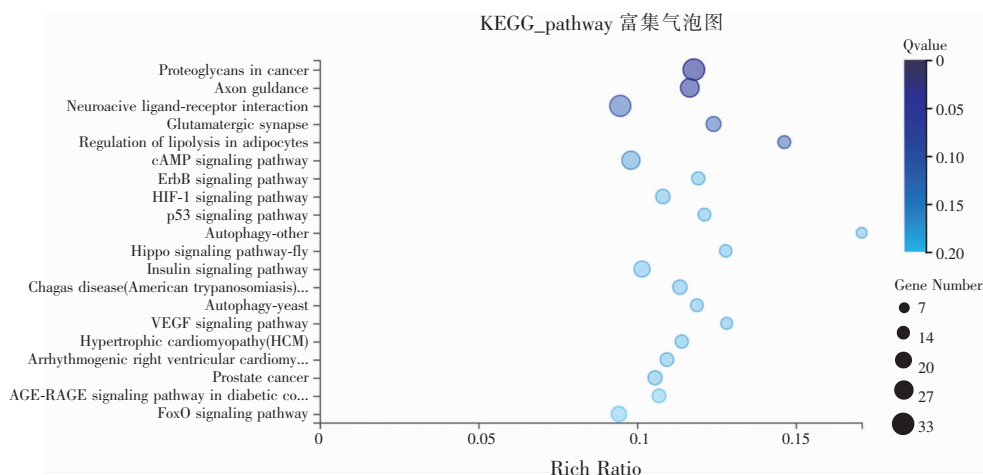
2.5 KEGG Pathway 分析 KEGG Pathway富集分析显示,靶基因主要参与调控环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、人类表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor, ErbB) 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、Hippo信号通路、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factors, VEGF) 信号通路、叉头框转录因子 O (forkhead box O transcription factors, FoxO) 信号通路等。同时,这些靶基因富集在自噬、p53 信号通路等细胞进程中,还与轴突导向、谷氨酸能神经突触、脂肪细胞中的脂肪分解调控、胰岛素信号通路等生物

系统相关,见图 2。

2.6 核心 miRNA 的筛选 对 75 个差异 miRNA 进行靶基因预测得到 1 988 个靶标,其中 mRNA 1 196 个,环状 RNA (circRNA) 721 个,长链非编码 RNA (lncRNA) 65 个,pseudo假基因 6 个。筛选与两个及以上的 mRNA 同时存在靶向关系的 miRNA,挑选 node 连接数大于 100 的核心 miRNA,获得 10 个核心 miRNA,分别为 hsa-miR-324-3p、hsa-miR-6741-5p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-4433a-3p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-1538、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-4433b-3p、hsa-miR-1260b、hsa-miR-1908-3p。分析其靶基因,绘制 miRNA、mRNA、circRNA 调控网络图,如图 3 所示,hsa-miR-423-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-532-3p 及 hsa-miR-370-3p 与相应的 circRNA、mRNA 组成相应的内源竞争 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 调控网络。

3 讨论

HT 自 1912 年首次报道至今已 100 余年,因近年来发病率明显升高及其与甲状腺乳头状癌关系密切,受到国内外广泛关注^[5]。miRNA 是一类非编码小分子 RNA,在转录后水平负调控 mRNA 的表达,在细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学进程中发挥重要作用。既往 HT 相关 miRNA 研究中,Zhao 等^[6]发现,HT 患者血浆中 miR-20a-3p、miR-205、miR-296、miR-375、miR-451、miR-500a 存在差异表达且均上调,miR-451、miR-375、miR-500a 与促甲状腺激素水平相



注:cAMP:环磷酸腺苷信号通路;ErbB:人类表皮生长因子受体;HIF-1:缺氧诱导因子-1;VEGF:血管内皮生长因子信号通路;HCM:肥厚性心肌病;AGE-RAGE:晚期糖基化终产物及其受体;FoxO:叉头框转录因子

图2 KEGG pathway 富集分析结果(top20)

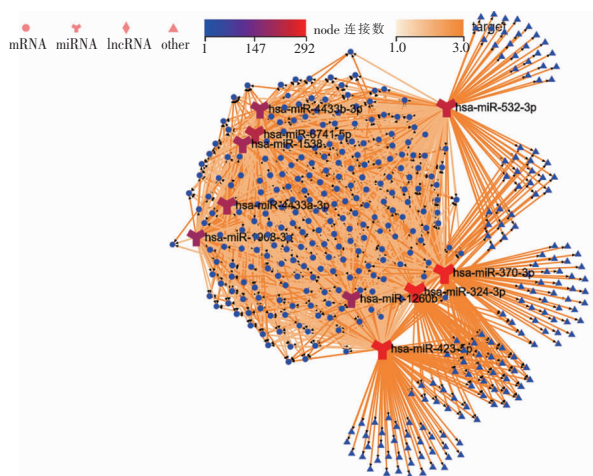


图 3 10 个核心 miRNA 及网络调控图

关, miR-20a-3p 与抗甲状腺球蛋白抗体水平有关。其中 miR-20a-5p、hsa-miR-205-5p、hsa-miR-375-3p、hsa-miR-451a 在本次研究中被鉴定到, 且与文献报道的表达趋势相一致。甲减相关 miRNA 研究方面, Massolt 等^[7] 探讨了不同甲状腺状态下的 miRNA 表达, 结果发现分析的 384 种 miRNA 在不同甲状腺状态下并未呈现统计学差异。

本次研究中, 笔者通过对 HT 组、HT 伴 SCH 组、对照组血浆外泌体 miRNA 进行高通量测序分析, 发现 miR-126-5p、miR-10b-5p、miR-374c-3p 等 75 条 miRNA 表达量在 3 组间存在显著差异。深度挖掘获得 10 个核心 miRNA, 其中 hsa-miR-532-3p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-324-3p 及 hsa-miR-423-5p 这 4 个 miRNA 与相应的 circRNA、mRNA 构成相应的 ceRNA 调控网络, 进而影响靶基因的表达并可能在 HT 的发病及进展中发挥作用。这些 miRNA 在 HT 的既往研究中少有报道。miR-532-3p 在非小细胞肺癌组织中存在差异表达, 可能通过靶向 FoxP3 抑制非小细胞肺癌的转移和增殖^[8], 在结肠直肠癌^[9]、乳腺癌^[10]、肝细胞癌^[11] 等疾病中存在差异表达。miR-370-3p 可能通过 Wnt 信号通路在甲状腺癌的增殖和侵袭中发挥作用^[12]。miR-370 可抑制活性氧的产生, 减轻炎症反应^[13], 并在胃癌^[14] 中发挥肿瘤抑制作用。miR-423-5p 在甲状腺乳头状癌患者血清外泌体中表达显著升高, 与乳头状甲状腺癌细胞的迁移和侵袭相关, 是潜在的肿瘤标志物以及治疗靶点之一^[15]。

KEGG pathway 分析表明, cAMP 信号通路、ErbB 信号通路、HIF-1 信号通路、Hippo 信号通路、VEGF 信号通路、FoxO 信号通路等是主要富集的几个通路。cAMP 信号通路广泛参与调节肝细胞、肌肉细胞、甲状腺细胞等多种细胞的生理反应, 在激素合成与分泌、糖脂代谢、蛋白合成、基因转录等进程中发挥重要作用。ErbB 信号通路通过介导磷脂酰肌醇激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 途径、Janus 激酶/信号转导与转录激活子 (JAK/STAT) 途径和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号传导途径来调节细胞增殖、分化、凋亡和细胞运动。HIF-1 信号通路为缺氧应激反应的关键通路, 广泛参与肿瘤、炎症、自身免疫性疾病、代谢性疾病等病理生理过程中。Hippo 信号通路是调控细胞增殖和凋亡的关键信号转导通路, 参与调控机体炎症发生发展、免疫细胞分化发育、癌症发生、组织再生及干细胞功能等多种生物学进程。

综上所述, 本研究通过对 HT 不同甲状腺功能时期血浆外泌体 miRNA 表达谱进行分析, 结果表明, hsa-miR-324-3p、hsa-miR-6741-5p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-4433a-3p、hsa-miR-423-5p 等 75 条 miRNA 在 HT 的不同阶段存在差异表达, 筛选出的 10 条核心 miRNA 中 hsa-miR-532-3p、hsa-miR-370-3p、hsa-miR-324-3p 及 hsa-miR-423-5p 与相应的 circRNA、mRNA 构成 ceRNA 调控网络, 值得进一步开展后续研究。GO 富集及 KEGG 通路功能分析发现, 差异 miRNA 调控的靶基因与炎症发生及进展、缺氧应激调控、细胞增殖及凋亡相关的通路密切相关。此外, 本研究也存在一些不足, 如研究样本数量偏小、未进行 PCR 验证等, 下一步需继续扩大样本量, 进行 RT-PCR 验证等, 深入探讨 miRNA 在 HT 疾病进程中发挥的调节作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimotos' thyroiditis: epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33 (6): 101367. DOI: 10.1016/j.beem.2019.101367.
- [2] 中华医学会内分泌学分会《中国甲状腺疾病诊治指南》编写

- 组. 中国甲状腺疾病诊治指南——甲状腺炎:慢性淋巴细胞性甲状腺炎[J]. 中华内科杂志, 2008, 47(9): 784-785. DOI: 10.3321/j.issn:0578-1426.2008.09.032.
- [3] Shan Z, Chen L, Lian X, et al. Iodine status and prevalence of thyroid disorders after introduction of mandatory universal salt iodization for 16 years in China a cross-sectional study in 10 cities [J]. *Thyroid*, 2016, 26(8): 1125-1130. DOI: 10.1089/thy.2015.0613.
- [4] 中华医学会内分泌学分会. 成人甲状腺功能减退症诊治指南 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017, 33(2): 167-180. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2017.02.018.
- [5] Weetman A. A hundred years of Hashimoto's thyroiditis [J]. *Thyroid*, 2013, 23(2): 135-136. DOI: 10.1089/thy.2013.2302.ed1.
- [6] Zhao L, Zhou X, Shan X, et al. Differential expression levels of plasma microRNA in Hashimoto's disease [J]. *Gene*, 2018, 642: 152-158. DOI: 10.1016/j.gene.2017.10.053.
- [7] Massolt ET, Chaker L, Visser TJ, et al. Serum microRNA profiles in athyroid patients on and off levothyroxine therapy [J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0194259. DOI: 10.1371/journal.pone.0194259.
- [8] Jiang W, Zheng L, Yan Q, et al. MiR-532-3p inhibits metastasis and proliferation of non-small cell lung cancer by targeting FOXP3 [J]. *J BUON*, 2019, 24(6): 2287-2293.
- [9] Song X, Wu R, Tao Q, et al. miR-532 promotes colorectal cancer invasion and metastasis by targeting NKD1 [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2019, 65(6): 52-55.
- [10] Zou X, Li M, Huang Z, et al. Circulating miR-532-502 cluster derived from chromosome X as biomarkers for diagnosis of breast cancer [J]. *Gene*, 2020, 722: 144104. DOI: 10.1016/j.gene.2019.144104.
- [11] Wang Y, Yang Z, Wang L, et al. miR-532-3p promotes hepatocellular carcinoma progression by targeting PTPRT [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 991-999. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.145.
- [12] Chen F, Feng Z, Zhu J, et al. Emerging roles of circRNA_NEK6 targeting miR-370-3p in the proliferation and invasion of thyroid cancer via Wnt signaling pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(12): 1139-1152. DOI: 10.1080/15384047.2018.1480888.
- [13] Tian D, Sha Y, Lu JM, et al. MiR-370 inhibits vascular inflammation and oxidative stress triggered by oxidized low-density lipoprotein through targeting TLR4 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 6231-6237. DOI: 10.1002/jcb.26851.
- [14] Zeng Y, Fu M, Wu GW, et al. Upregulation of microRNA-370 promotes cell apoptosis and inhibits proliferation by targeting PTEN in human gastric cancer [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4): 1589-1599. DOI: 10.3892/ijo.2016.3642.
- [15] Ye W, Deng X, Fan Y. Exosomal miRNA423-5p mediated oncogene activity in papillary thyroid carcinoma: a potential diagnostic and biological target for cancer therapy [J]. *Neoplasma*, 2019, 66(4): 516-523. DOI: 10.4149/neo_2018_180824N643.

(收稿日期: 2020-09-11)

(上接第 107 页)

参 考 文 献

- [1] Ishii H, Shimatsu A, Okimura Y, et al. Development and validation of a new questionnaire assessing quality of life in adults with hypopituitarism; adult Hypopituitarism Questionnaire (AHQ) [J]. *PLoS one*, 2012, 7(9): e44304. DOI: 10.1371/journal.pone.0044304.
- [2] McKenna SP, Doward LC, Alonso J, et al. The QoL-AGHDA: an instrument for the assessment of quality of life in adults with growth hormone deficiency [J]. *Qual Life Res*, 1999, 8(4): 373-383. DOI: 10.1023/a:1008987922774.
- [3] Herschbach P, Henrich G, Strasburger CJ, et al. Development and psychometric properties of a disease-specific quality of life questionnaire for adult patients with growth hormone deficiency [J]. *Eur J Endocrinol*, 2001, 145(3): 255-265. DOI: 10.1530/eje.0.1450255.
- [4] Rosilio M, Blum WF, Edwards DJ, et al. Long-term improvement of quality of life during growth hormone (GH) replacement therapy in adults with GH deficiency, as measured by questions on life satisfaction-hypopituitarism (QLS-H) [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(4): 1684-1693. DOI: 10.1210/jc.2003-030134.
- [5] Viral Chikani, Guneo RC, Hickman I, et al. Growth hormone (GH) enhances anaerobic capacity; impact on physical function and quality of life in adults with GH deficiency [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2016, 85(4): 660-668. DOI: 10.1111/cen.13147.
- [6] Kluge M, Schüssler P, Dresler M, et al. Effects of ghrelin on psychopathology, sleep and secretion of cortisol and growth hormone in patients with major depression [J]. *J Psychiatr Res*, 2011, 45(3): 421-426. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2010.09.002.
- [7] Samuels MH, Kolobova I, Niederhausen M, et al. Effects of altering levothyroxine (L-T4) doses on quality of life, mood, and cognition in L-T4 treated subjects [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(5): 1997-2008. DOI: 10.1210/jc.2017-02668.
- [8] Khara M. Male hormones and men's quality of life. [J]. *Curr Opin Urol*, 2016, 26(2): 152-157. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000256.

(收稿日期: 2021-08-31)