

强直性脊柱炎患者外周血单个核细胞踝蛋白 1 表达的研究

邓伟明 廖泽涛 黄志祥 郭欣 李天旺

【摘要】 目的 探讨强直性脊柱炎 (AS) 患者、类风湿关节炎 (RA) 患者及健康志愿者 (HV) 外周血单个核细胞 (PBMC) 中踝蛋白 1 的表达水平及其差异。方法 采集 AS、RA 患者及 HV 外周血样本各 30 例, 流式细胞术分析 CD3⁺ T 细胞及 CD14⁺ 单核细胞中踝蛋白 1 蛋白平均荧光强度 (MFI), 逆转录 PCR (RT-PCR) 检测 PBMC 中踝蛋白 1 mRNA 表达水平, 比较组间踝蛋白 1 在蛋白及 mRNA 表达的差异。结果 在 CD3⁺ T 细胞及 CD14⁺ 单核细胞中, AS 患者的踝蛋白 1 MFI 水平均高于 HV 和 RA 患者 (P 均 <0.05), 而 HV 与 RA 患者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。RT-PCR 提示 AS 患者、HV 及 RA 患者踝蛋白 1 mRNA 相对表达水平分别为 1.37 ± 0.22 、 0.26 ± 0.05 、 0.27 ± 0.06 , AS 患者的踝蛋白 1 mRNA 相对表达水平均高于 HV 和 RA 患者 (P 均 <0.05)。结论 AS 患者 PBMC 中踝蛋白 1 表达水平明显高于 HV 及 RA 患者, 提示踝蛋白 1 可能在 AS 发病机制中发挥作用。

【关键词】 强直性脊柱炎; 外周血单个核细胞; 踝蛋白 1; 平均荧光强度; 逆转录聚合酶链反应

Expression of Talin 1 in peripheral blood mononuclear cell in patients with ankylosing spondylitis

Deng Weiming, Liao Zetao, Huang Zhixiang, Guo Xin, Li Tianwang. Department of Rheumatology and Immunology, Guangdong No. 2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, China

Corresponding author, Li Tianwang, E-mail: litian-wang@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of Talin 1 (TLN 1) in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) among patients with ankylosing spondylitis (AS), rheumatoid arthritis (RA) and healthy volunteer (HV). **Methods** Collect samples of peripheral blood in 30 patients with AS, HV and RA respectively. The mean fluorescence intensity (MFI) of TLN 1 in the CD3⁺ T lymphocytes and CD14⁺ monocytes were analyzed by flow cytometry. Also, the mRNA expression of TLN 1 in PBMC was detected by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein and mRNA level of TLN 1 were compared among AS, RA and HV groups. **Results** MFI of TLN 1 in CD3⁺ T lymphocytes and CD14⁺ monocytes of AS patients were both significantly higher than those of HV and RA patients ($P < 0.05$), while there was no statistically significant difference between HV and RA patients ($P > 0.05$). Moreover, the relative mRNA level of TLN 1 in patients with AS was 1.37 ± 0.22 , significantly higher than that of HV and RA patients (0.05 ± 0.27 and 0.26 ± 0.06 respectively, both $P < 0.05$). **Conclusion** TLN 1 was up-regulated in the PBMC of AS patients, indicated that TLN 1 might play an important role in the pathogenesis of AS.

【Key words】 Ankylosing spondylitis; Peripheral blood mononuclear cell; Talin 1; Mean fluorescence intensity; Reverse transcription-polymerase chain reaction

强直性脊柱炎 (AS) 是一种常见的炎症性系统性风湿病, 其发病率及致残率均较高, 但病因及

发病机制至今尚未完全明确^[1-2]。整合素是一类普遍存在的跨膜糖蛋白, 参与细胞间及细胞与胞外基

质 (ECM) 间的黏附及细胞信号的转导, 介导包括炎症性疾病在内多种疾病的发生与发展^[3]。踝蛋白 1 在整合素信号通路的活化过程中发挥了至关重要的调节作用。既往的蛋白质组学研究初步发现, AS 患者 PBMC 的踝蛋白 1 表达上调, 提示整合素信号通路可能涉及 AS 的发病及炎症调节^[4]。故本研究拟通过流式细胞术 (FCM) 检测 AS 患者单核及 T 细胞中踝蛋白 1 蛋白平均荧光强度 (MFI), 并以逆转录-PCR (RT-PCR) 法检测 AS 患者 PBMC 中踝蛋白 1 mRNA 的表达情况, 同时以健康志愿者 (HV) 及类风湿关节炎 (RA) 患者为对照, 比较踝蛋白 1 在 3 组中的表达差异, 初步探讨踝蛋白 1 在 AS 发病及炎症活动中的作用及其临床意义。

对象与方法

一、研究对象

纳入初诊活动期 AS 患者 30 例 (AS 组), 同时纳入活动期 RA 患者 30 例 (RA 组)。AS 组患者入组标准: ①年龄 20~40 岁; ②符合 1984 年修订的 AS 纽约标准; ③无其他慢性病病史; ④入选前 3 个月内无急性感染史; ⑤入组前 3 个月内未使用过任何缓解疾病的抗风湿药物及糖皮质激素; ⑥无生物制剂使用史; ⑦毕氏 AS 疾病活动指数 (BASDAI) ≥ 4 。RA 组患者入组标准: ①年龄 20~40 岁; ②诊断上满足 1987 年美国风湿病学会修订的 RA 分类标准; ③为初治或病情反复的患者, 近 3 个月内未使用过糖皮质激素及其他免疫抑制剂; ④疾病活动度评分 (DAS28-4) 均 > 5.1 分; ⑤近 2 个月内无任何急性感染病史; ⑥无其他慢性病病史。另纳入年龄 20~40 岁的 30 名 HV (HV 组) 作对照。本研究经医院伦理委员会批准, 所有入组的个体均为自愿参加试验, 并于入选时签署知情同意书。

二、标本采集

对入组的每例个体, 均以真空 EDTA 抗凝管 (2 ml 及 4 ml 各 1 管) 于空腹状态经外周静脉采血 6 ml, 立刻置 4℃ 冰箱保存备用。其中 2 ml 静脉血于 6 h 内进行免疫荧光染色处理并于当日进行 FCM 分析; 4 ml 静脉血于 2 h 内用于分离 PBMC, 并提取总 RNA 用于 RT-PCR 实验。

三、方法

1. 踝蛋白 1 的蛋白表达水平检测

取依地酸二钠 (EDTA) 抗凝全血标本 100 μ l, 分别加入 PE anti-human CD14 (美国 BD Biosciences)、PE-CY5 anti-human CD3 (美国 BD Biosci-

ences) 各 5 μ l 混匀, 经过避光孵育及离心后, 加入红细胞裂解液并离心, 弃去上清后充分固定, 在破膜之后加入踝蛋白 1 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology), 最后加入 FITC 标记的二抗 (美国 Santa Cruz Biotechnology), 避光孵育待测。以 FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson) 检测及分析 PBMC (CD14⁺ 单核细胞及 CD3⁺ T 细胞) 中踝蛋白 1 的 MFI 值。

2. 踝蛋白 1 的 mRNA 表达水平检测

采用 RT-PCR 法, 将 Trizol Regent (美国 Introgen 公司) 加入 PBMC 裂解细胞, 然后按 1 ml 含细胞裂解产物的 Trizol 加 200 μ l 氯仿的比例加入氯仿萃取总 RNA, 并以异丙醇将总 RNA 析出后加入 DEPC 水溶解。按照 RevertAid 逆转录试剂盒 (加拿大 Fermentas) 说明书合成模板 DNA。通过 Primer Premier 5.0 设计引物, 其中踝蛋白 1 基因的引物序列为: 上游 5'-CTGACAACAACCCTCAACGA-3', 下游 5'-CTGTGGCAATGACATCTTCC-3', 踝蛋白 1 基因扩增长度为 1 186 bp; 选用 GAPDH 为内参基因, 其引物序列为: 上游 5'-TCCACCACCCTGTTGTTGTA-3', 下游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', GAPDH 基因扩增长度为 452 bp。PCR 反应总体积 20 μ l, 按照 2 倍体积 Taq Plus PCR Master Mix (中国天根生物技术) 说明书将各成分充分混合后, 按照 94℃ 预变性 3 min、94℃ 变性 30 s、60℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。最后取 PCR 产物置 2% 琼脂糖凝胶电泳, 成像仪拍摄并分析踝蛋白 1 mRNA 的相对表达水平 (踝蛋白 1 mRNA 的光密度值/GAPDH mRNA 的光密度值)。

四、统计学处理

使用 SPSS 13.0 统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素分析, 多组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。计数资料组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、研究对象的临床特征

AS 组 30 例患者, 年龄 (27.6 \pm 7.6) 岁, 男 18 例、女 12 例; RA 组 30 例患者, 年龄 (30.1 \pm 5.9) 岁, 男 12 例、女 18 例; HV 组 30 名, 年龄 (27.4 \pm 6.2) 岁, 男 17 例、女 13 例。3 组研究对象的年龄和性别构成比较差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

二、PBMC 中踝蛋白 1 的蛋白表达水平比较

在 CD14⁺ 单核细胞及 CD3⁺T 细胞中, AS 组踝蛋白 1 的 MFI 值均高于 HV 组及 RA 组 (P 均 < 0.05), 而 HV 组与 RA 组间比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05), 见表 1。

表 1 AS、HV 与 RA 的 PBMC 中踝蛋白 1 MFI 值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	踝蛋白 1 的 MFI 值	
		CD14 ⁺ 单核细胞	CD3 ⁺ T 细胞
HV 组	30	28.3 ± 10.1	9.8 ± 3.2
RA 组	30	26.3 ± 9.9	9.4 ± 3.3
AS 组	30	37.7 ± 11.7 ^{ab}	16.6 ± 4.7 ^{ab}
F 值		11.213	32.254
P 值		< 0.001	< 0.001

注: CD14⁺ 单核细胞中, AS 组与 HV 组比较 $q = 5.21$ 、 $^aP < 0.05$, AS 组与 RA 组比较 $q = 6.24$ 、 $^bP < 0.05$; CD3⁺T 细胞中, AS 组与 HV 组比较 $q = 9.49$ 、 $^aP < 0.05$, AS 与 RA 组比较 $q = 10.16$ 、 $^bP < 0.05$

三、PBMC 中踝蛋白 1 mRNA 表达水平比较

AS 组、HV 组及 RA 组 PBMC 中踝蛋白 1 mRNA 的相对表达水平分别为 1.37 ± 0.22 、 0.26 ± 0.05 及 0.27 ± 0.06 , 3 组间比较差异有统计学意义 ($F = 536.948$, $P < 0.001$), AS 组 PBMC 中踝蛋白 1 mRNA 的相对表达水平明显高于 HV 组 ($q = 37.70$, $P < 0.05$) 及 RA 组 ($q = 37.36$, $P < 0.05$), 而 RA 组与 HV 组比较差异无统计学意义 ($q = 0.34$, $P > 0.05$), 见图 1。

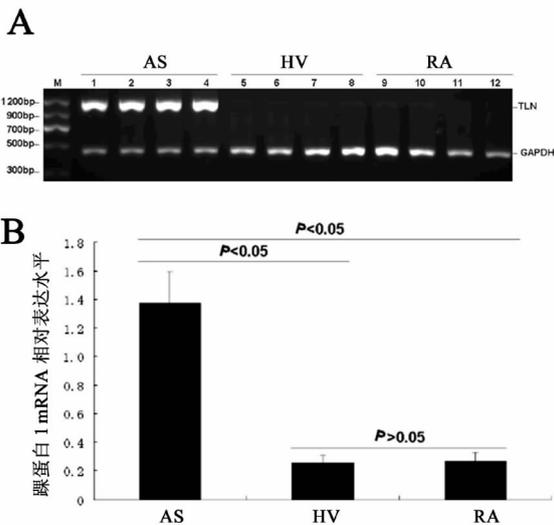


图 1 AS、HV 与 RA 组间 PBMC 中踝蛋白 1 RT-PCR 检测结果

A: 踝蛋白 1 及内参 GAPDH mRNA 在 PBMC 中的表达情况, 其中 M 为标记物、泳道 1~4 为 AS 患者、泳道 5~8

为 HV 个体、泳道 9~12 为 RA 患者; B: 3 组研究对象踝蛋白 1 mRNA 定量结果

讨 论

AS 是一种以中轴关节受累为特征的慢性炎症性风湿病, 其发病机制仍未清楚。有研究表明其发生、发展与自身炎症或免疫系统功能异常有关^[5-6]。多项研究表明, 单核细胞及其分泌的细胞因子在 AS 发病过程中起关键作用^[7-8]。AS 的主要临床症状是慢性炎症反应, 但免疫细胞在其发病过程中的作用日益受关注, 研究表明, 抑制 T 细胞反应可以提高 TNF- α 拮抗剂对 AS 的疗效^[9]。淋巴细胞在 AS 发病机制中发挥重要作用^[10]。但其具体机制尚未明确。本研究探讨了 AS、RA 及 HV 中踝蛋白 1 在单核细胞、淋巴细胞的表达是否存在差异。

整合素家族是一组介导细胞间及细胞与 ECM 间相互作用的受体, 它们不仅可识别细胞外环境, 将信号传到细胞内, 还可经胞内的信号调节其与配体的亲和力, 这个过程也称为整合素的活化。它们参与了细胞增殖、迁移、凋亡与信号传导等生命活动的调节。严重的整合素结构改变及整合素通路异常, 可导致细胞功能的改变乃至疾病的发生。整合素参与了炎症细胞的活化与迁移^[10-12]。Van Damme 等^[13]研究显示, AS 患者肠黏膜 T 细胞中整合素 $\alpha E\beta 7$ 表达增高。许多研究表明, 整合素参与 RA、AS 疾病的发生及发展过程^[14-16]。

踝蛋白 1 是整合素的一个重要配体, 是免疫细胞踝蛋白的关键部分, 在整合素介导细胞黏附过程中起关键作用。其通过与其胞内亚单位结合从而参与整合素通路的活化。在炎症细胞因子刺激下, 白细胞表面的整合素受体由静止构象转换为活性构象, 促使其活化并向炎症区域迁移, 参与炎症性疾病的病理生理过程^[17-18]。AS 是一类慢性炎症性疾病, 其发生、发展机制虽未完全明确, 但整合素在其发病过程中的作用日益受关注。本研究通过基因及蛋白水平检测表明 AS 患者中踝蛋白 1 表达明显高于 HV, 提示踝蛋白 1 在 AS 发生、发展过程中起重要作用。

AS 与 RA 是本质不同的两种疾病, 但 AS 与 RA 在临床表现、病理过程及病变部位上, 均存在交叉及相似的地方, 对于某些早期或不典型病例, 有时临床上也难以鉴别。因此, 本研究中除了设立 HV 对照组外, 同时用 RA 患者作为疾病对照组,

以了解 AS 与 RA 患者间蛋白表达差异的情况。结果显示, 在 RA 患者中并未发现踝蛋白 1 表达增高, 说明 AS 与 RA 炎症的产生可能是通过不同的信号通路调节的, 踝蛋白 1 可能是 AS 潜在的、具有较高特异性的疾病标志物, 经进一步证实后既有可能为 AS 的发病机制提供新的理论依据, 也有可能作为 AS 特异的诊断指标, 用于 AS 的早期诊断及鉴别诊断。

综上所述, 踝蛋白 1 在 AS 患者 PBMC 中的表达水平明显高于 HV 及 RA 患者, 提示踝蛋白 1 可能在 AS 发病及炎症活动过程中起重要调节作用, 但其与踝蛋白 1 的内在联系尚需继续深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, Dagfinrud H, Dijkmans B, Dougados M, Emery P, Geher P, Hammoudeh M, Inman RD, Jongkees M, Khan MA, Kiltz U, Kvien T, Leirisalo-Repo M, Maksymowych WP, Olivieri I, Pavelka K, Sieper J, Stanislawski-Biernat E, Wendling D, Ozgocmen S, van Drogen C, van Royen B, van der Heijde D. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70 (6): 896-904.
- [2] 古洁若. 应关注强直性脊柱炎诊治研究的热点. *新医学*, 2011, 42 (3): 141-143.
- [3] Miyazaki Y, Vieira-de-Abreu A, Harris ES, Shah AM, Weyrich AS, Castro-Faria-Neto HC, Zimmerman GA. Integrin alphaDbeta2 (CD11d/CD18) is expressed by human circulating and tissue myeloid leukocytes and mediates Miyazaki Y, Vieira-de-Abreu A, Harris ES, Shah AM, Weyrich AS, Castro-Faria-Neto HC, Zimmerman GA. Integrin α D β 2 (CD11d/CD18) is expressed by human circulating and tissue myeloid leukocytes and mediates inflammatory signaling. *PLoS One*, 2014, 9 (11): e112770.
- [4] Li T, Zheng B, Huang Z, Lu H, Lin Q, Liao Z, Lin Z, Zhao L, Wang X, Gu J. Over-expression of talin 1 and integrin-linked kinase in PBMCs of patients with ankylosing spondylitis; aptoeomic study. *Clin Exp Rheumatol*, 2010, 28 (6): 828-835.
- [5] Ambarus C, Yeremenko N, Tak PP, Baeten D. Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? *Curr Opin Rheumatol*, 2012, 24 (4): 351-358.
- [6] Chen D, He J, Lu C, Zhou J, Fang K, Liu X, Xu L. Increased expression of T cell immunoglobulin and mucin domain 4 is positively associated with the disease severity of patients with ankylosing spondylitis. *Inflammation*, 2015, 38 (3): 935-940.
- [7] Lin S, Qiu M, Chen J. IL-4 modulates macrophage polarization in ankylosing spondylitis. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35 (6): 2213-2222.
- [8] Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, Mikolajczyk T, Telesinska-Jasiowka D, Klimek E, Kierzkowska I, Guzik T, Grodzicki TK. Blood monocyte heterogeneity and markers of endothelial activation in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2014, 41 (3): 481-489.
- [9] Pang L, Wang L, Suo T, Hao H, Fang X, Jia J, Huang F, Tang J. Tumor necrosis factor-alpha blockade leads to decreased peripheral T cell reactivity and increased dendritic cell number in peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2008, 35 (11): 2220-2228.
- [10] Smith JA. Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15 (1): 489.
- [11] Subramanian P, Mitroulis I, Hajishengallis G, Chavakis T. Regulation of tissue infiltration by neutrophils: role of integrin α 3 β 1 and other factors. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23 (1): 36-43.
- [12] Wee JL, Schulze KE, Jones EL, Yeung L, Cheng Q, Pereira CF, Costin A, Ramm G, van Spruiel AB, Hickey MJ, Wright MD. Tetraspanin CD37 Regulates β 2 Integrin-Mediated Adhesion and Migration in Neutrophils. *J Immunol*, 2015, 195 (12): 5770-5779.
- [13] Van Damme N, Elewaut D, Baeten D, Demetter P, Cuvelier C, Verbruggen G, Mielants H, Veys EM, De Vos M, De Keyser F. Gut mucosal T cell lines from ankylosing spondylitis patients are enriched with alphaEbeta7 integrin. *Clin Exp Rheumatol*, 2001, 19 (6): 681-687.
- [14] 岳枫, 胡波. 人类白细胞抗原、信号转导和转录激活因子、整合素与自身免疫病的相关性研究进展. *中国医药导报*, 2015, 12 (14): 31.
- [15] 杨慧. CD147 及整合素拮抗剂抑制 RA 患者 Th17 细胞分化的作用和意义. 第四军医大学, 2012.
- [16] 刘俊晓, 王嘉祺, 王志学, 丁勇. 黏附分子在类风湿关节炎发病机制中作用的新进展. *医学综述*, 2015, 21 (18): 3277.
- [17] Degroote RL, Hauck SM, Treutlein G, Amann B, Fröhlich KJ, Kremmer E, Merl J, Stangassinger M, Ueffing M, Deeg CA. Expression changes and novel interaction partners of talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis. *J Proteome Res*, 2013, 12 (12): 5812-5819.
- [18] Plavina T, Hincapie M, Wakshull E, Subramanyam M, Hancock WS. Increased plasma concentrations of cytoskeletal and Ca²⁺-binding proteins and their peptides in psoriasis patients. *Clin Chem*, 2008, 54 (11): 1805-1814.

(收稿日期: 2016-03-10)

(本文编辑: 林燕薇)