doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.11.031 ◇临床医学◇

分拣微管连接蛋白17在重症肌无力中的表达及相关性分析

马健钰
作者单位:南阳市第一人民医院西药科,河南 南阳 473000

摘要:目的 研究分拣微管连接蛋白17(SNX17)蛋白在重症肌无力(MG)中的表达情况,并分析其与重症肌无力发病的关系,探讨其临床意义。**方法** 选取2014年10月至2016年12月南阳市第一人民医院确诊的重症肌无力病人(MG组)80例,健康对象(对照组)50例,采用免疫组化法检测组织中SNX17蛋白的表达,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测组织中SNX17 mRNA的水平;用蛋白质印迹法检测SNX17蛋白表达水平,分析其与病人临床病理参数关系。**结果** SNX17 mRNA及蛋白在重症肌无力病人中表达水平(78.75%)明显高于对照组(32.00%)($P=0.000$);SNX17蛋白的表达与病人组织学分化程度、临床病理学分期及淋巴结转移情况无明显关系($P=0.000$)。**结论** SNX17蛋白与重症肌无力发病具有密切的关联,与临床病理参数无明显的关系。

关键词:重症肌无力; 微管连接蛋白; 连接蛋白类; 胸腺组织

Correlation analysis of SNX17 protein expression and pathogenesis of myasthenia gravis and analysis of its mechanism

MA Jianyu
Author Affiliation:Department of Western Medicine,Nanyang First People's Hospital,Nanyang,Henan 473000,*China*

Abstract: Objective To investigate the expression of sorting microtubule associated protein 17 (SNX17) protein in myasthenia gravis and analyze the relationship between SNX17 and the pathogenesis of myasthenia gravis, and the clinical significance of which were discussed.**Methods** Total of 80 patients with myasthenia gravis (group MG) and 50 healthy subjects (control group) accepted in our hospital between October 2014 and December 2016 were selected.Immunohistochemical method was used to detect the expression of SNX17 protein in tissues.The the levels of SNX17 mRNA in tissues were detected by RT-PCR.The expression of SNX17 protein was detected by western-blot.The relationship between the parameters and clinical pathological parameters were analyzed.**Results** The expression levels of SNX17mRNA and protein of patients with myasthenia gravis were significantly higher than those of the control group(78.75% *vs.* 32.00%) ($P=0.000$).The expression of SNX17 protein was not correlated with histological differentiation, clinicopathological staging and lymph node metastasis($P=0.000$).**Conclusion** SNX17 protein is closely related to the pathogenesis of myasthenia gravis, and has no obvious relationship with clinical pathological parameters.

Key words: Myasthenia gravis; Nexin; Connexins; Thymus

重症肌无力(myasthenia gravis,MG)是最常见的神经肌肉接头免疫疾病,以突触后膜乙酰胆碱受体数量减少、结构变化导致的终板膜崩解为主要病理特征。研究[1]发现重症肌无力可受多基因调控并具有较高的遗传倾向,与免疫球蛋白重链基因、T细胞受体基因及乙酰胆碱受体均具有密切联系。

研究[2]证实低密度脂蛋白受体相关蛋白与膜表面MuSK形成的复合体对于神经肌肉接头的功能至关重要。此外,先前的研究[3]发现重症肌无力病人的肌肉组织分拣微管连接蛋白17(sorting nexin 17,SNX17)表达水平较高,与乙酰胆碱受体亚单位基因共定位于神经肌肉接头,低密度脂蛋白受体相关蛋白4(low density lipoprotein receptor-relatedprotein,LRP4)在细胞内的代谢与SNX17关系密切,但国内研究资料较少。故此,本研究就SNX17蛋白在重症肌无力中的表达情况,并分析其与重症肌无力发病的关系,探讨其临床意义,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年10月至2016年12月南阳市第一人民医院确诊的重症肌无力病人(MG组)80例(MG组)、健康对象50例(对照组)。MG组,男性43例,女性37例,年龄范围为25~56岁,年龄(37.6±11.2)岁,;病临床分期Ⅰ期19例,Ⅱ期23例,Ⅲ期17例;Ⅳ期21例;胸腺瘤22例,胸腺增生18例,眼肌型16例,全身型24例;对照组,男性30例,女性20例,年龄范围为23~52岁,年龄(35.5±10.3)

岁,无MG及其他自身免疫性疾病。两组病人的年龄、性别比较,差异无统计学意义($t=1.072$,$\chi^2=0.488$,$P=0.286$、0.347)。病人或近亲属对研究方案均签署知情同意书。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 纳入排除标准[4]

1.2.1 纳入标准 ①术前未合并其他部位疾病;②术后病理证实为重症肌无力;③手术根治性切除胸腺组织;④有完整规范的术后病理报告及随访资料;⑤无高血压、糖尿病、肾炎、急慢性盆腔炎及子宫内膜异位症等疾病,近期均未服影响前列腺素和血栓素代谢的药物。

1.2.2 排除标准 ①合并其他系统严重疾病者。②未能完成随访者。③贫血及凝血功能障碍;④风湿及免疫系统疾病;⑤严重的肝肾功能疾病;⑥甲状腺功能障碍;⑦因其他部位肿瘤进行过放化疗治疗者。

1.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫组化染色方法、蛋白质印迹法 SNX17引物依据Genebank公司合成的SNX17和β-actin基因序列设计TRIzol法提取胸腺总RNA,逆转录合成cDNA;具体反应体系参照朱明振等[5]的研究,MG组与对照组SNX17、cDNA及内参β-action引物一起扩增。

免疫组化染色法观察胸腺组织SNX17分子形态,待检组织甲醛固定后在波片上将单根肌丝剥离,5%BSA 1h封闭后,1∶50鼠抗人SNX17抗体4 ℃孵育过夜;30 min的37 ℃复温,1∶100AF-g350标记羊抗鼠抗体和α-BTX,1 h孵育(37 ℃),显微镜下观察不同激发光下的SNX17形态和分布情况[6]。

蛋白印迹法检测胸腺细胞中SNX17的蛋白含量,待检标本研磨成匀浆后加入裂解液,30 min室温避光保存30 min,离心(5 000 r/min)5 min后取上清,BCA法侧蛋白浓度,β-actin为内参,每孔20 uL样品,1∶1 000鼠抗人SNX17抗体和1∶2 000兔抗人β-actin抗体4 ℃孵育过夜,30 min的37 ℃复温,1∶4 000 HRP标记羊抗鼠抗体和1∶4 000 HRP标记的羊抗兔抗体1 h孵育(37 ℃),曝光胶片,Quantity One软件测定[7]。

1.4 结果判定标准

1.4.1 免疫组化判定标准 阴性对照用PBS代替一抗进行染色,结果做为阴性;标准光镜下以细胞浆、膜中出现细胞核着色或粗细一致的棕黄色颗粒为阳性染色;采取二次计分法:先将染色按强度计分:0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。再将阳性细胞百分比计分,0分为阳性细胞为<25%,1分为25%. 50%,2分为51%. 75%,3分为≥75%。用染色强度得分与细胞数得分之和作为判断表达的结果,0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为中等阳性(++),5~6分为强阳性(+++)。所有病理切片均由高年资病理医师盲法评定结果[8]。

1.4.2 RT-PCR、蛋白质印迹判定标准 分别以每例标本SNXl7与β-actin Ct值之比,作为该例标本目的基因mRNA的相对表达量;蛋白质印迹曝光结果以胶片上出现目SNX17和β-actin内参条带,且β-actin内参基因的曝光条带在MG组和对照组灰度一样[9]。

1.5 统计学方法 统计软件采用SPSS 17.0,计量资料采用$\bar{x}\pm s$进行统计描述,两组间比较采用t检验;计数资料组间比较采用χ^2检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组组织标本中SNX17蛋白的表达情况比较 SNX17蛋白在重症肌无力胸腺组织中的表达明显高于对照组($\chi^2=28.208$,$P=0.000$),见表1。

表1 重症肌无力病人和健康对照者组织标本中SNX17蛋白表达情况比较

组别	例数	-/例	+/例	++/例	+++/例	阳性率/例(%)
对照组	50	34	9	5	2	16(32.00)
MG组	80	17	17	24	22	63(78.75)

2.2 两组组织标本中SNX17 mRNA及蛋白的表达水平比较 MG组SNX17 mRNA含量明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$),见表2。SNX17蛋白含量明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$),见表3。

表2 重症肌无力病人和健康对照者标本中SNX17 mRNA含量比较

组别	例数	SNX17 mRNA相对含量/$\bar{x}\pm s$	SNX17 mRNA表达率/例(%)
对照组	50	0.51±0.07	16(32.00)
MG组	80	0.79±0.09	63(78.75)
$t(\chi^2)$值		18.732	(28.208)
P值		0.000	0.000

表3 重症肌无力病人和健康对照者标本中SNX17蛋白含量比较

组别	例数	SNX17蛋白相对含量/$\bar{x}\pm s$	SNX17蛋白表达率/例(%)
对照组	50	0.49±0.05	16(32.00)
MG组	80	0.75±0.07	63(78.75)
$t(\chi^2)$值		22.857	(28.208)
P值		0.000	0.000

表4 重症肌无力胸腺组织SNX17蛋白表达与临床病理因素的关系/例(%)

组别	例数	年龄		性别		组织学分化程度		TNM分期	
		≥40岁	<40岁	男	女	胸腺瘤+胸腺增生	眼肌+全身	Ⅰ期+Ⅱ期	Ⅲ期+Ⅳ期
SNX17阳性	63	33(52.8)	30(47.62)	35(55.56)	28(44.44)	29(46.32)	34(53.97)	31(49.21)	32(50.79)
SNX17阴性	17	7(41.18)	10(58.82)	8(47.06)	9(52.94)	11(64.71)	6(35.29)	11(64.71)	6(35.29)
χ^2值		0.672		0.389		1.867		1.290	
P值		0.412		0.533		0.172		0.256	

2.3 重症肌无力胸腺组织标本中的SNX17蛋白表达与病人临床病理学特征的关系 SNX17蛋白表达和相对含量在不同的性别、年龄、临床分期、组织学分级间比较,均差异无统计学意义($P>0.05$),见表4。

3 讨论

MG属于一类自身免疫性疾病,年发病率为4~11/100万,患病率为77~150/100万,女性患病率大于男性,约3:2,各年龄段均有发病,本病临床表现多样,存在全身骨骼肌无力和易疲劳等表现[10]。MG主要有两种病理变化:(1)神经-肌肉接头突触后膜终板膜乙酰胆碱受体亚单位基因数量减少;(2)是胸腺异常,主要涉及AChR抗体、MuSK抗体和LRP4抗体加速相应自身抗原溶解或直接抑制其功能,阻碍AChR在突触后膜聚集,影响神经冲动的传递,进而导致肌无力[11]。

最新的研究[12]在胞膜内吞转运方面发现了重要的新型调节蛋白家族—SNX家族,该家族主要位于细胞溶酶体内,它们的过度表达能够调节细胞膜表面受体转运并位于早期内涵体小室的特殊部位,被鉴定为和LDLR家族成员相互作用的合体。因此,MG病人淋巴细胞分化程度与胸腺SNX17表达密切相关,高表达的SNX17可促使胸腺细胞内吞率上升,并以此影响病人免疫功能,最终参与MG。但目前国内研究资料较少,本研究深入探讨了SNX17蛋白在重症肌无力中的表达情况,结果显示SNX17 mRNA及蛋白在重症肌无力病人中表达水平明显高于对照组($P<0.05$),说明SNX17蛋白与重症肌无力发病具有密切的关联,这也与先前的研究相符[13]。

SNX17蛋白属于部分细胞表面短暂表达的细胞粘附蛋白,与血小板选择蛋白胞浆结构具有相互作用,并调节粒细胞与血小板选择蛋白的相互作用[13]。LDLR具有重要的胆固醇代谢及脂肪代谢的调节作用,作为重要的细胞膜蛋白,可介导血浆低密度脂蛋白在细胞间的出入。因而,SNXl7的高度表达可能导致病人脂肪代谢紊乱,参与MG的发病、发展过程。此外,研究[14]提示SNXl7的高度表达能影响淋巴细胞的分化,增强胸腺细胞内吞率,进而影响机体免疫功能并参与MG发生过程。研究[15-16]报道SNX17能降低溶酶体降解速率并抑制血小板选择蛋白进入溶酶体,并诱导免疫细胞的细胞非正常增殖,导致机体合并免疫耐受终止症状。因此,临床研究认为SNX17可通过介导溶酶体的活性,诱使T淋巴细胞的异常增殖而诱发MG。本研究发现SNX17蛋白的表达与病人组织学分化程度、临床病理学分期及淋巴结转移情况无明显关系。上述结果提示SNX17蛋白与MG的发展过程并无显著联系,但具体机制还需要相关研究深入探讨、证实。

综上所述,SNX17蛋白与重症肌无力发病具有密切的关联,与临床病理参数无明显的关系。

参考文献

[1] 李若冰,马琪林.重症肌无力相关抗体研究进展[J].实用临床医药杂志,2016,20(21):224-226.

[2] OSBORNE DG,PIOTROWSKI JT,DICK CJ,et al.SNX17 affects t cell activation by regulating t cell receptor and integrin recycling [J].Journal of Immunology,2015,194(9):4555-4566.

[3] 高欣,于会艳,孙亮,等.分拣蛋白相关受体1基因多态性和2型糖尿病的相关性研究[J].中华保健医学杂志,2015,17(1):24-27.

[4] 冯小朵,吉训超.重症多形红斑型药疹合并糖尿病1例分析[J].安徽医药,2017,21(2):371-373.

[5] 朱明振,张婧,张迎娜,等.重症肌无力患者肌细胞分拣微管连接蛋白17的表达及作用[J].中华实验外科杂志,2015,32(11):2754-2757.

[6] 闫斌,朱明振,李卫君,等.实验性自身免疫性重症肌无力模型大鼠腓肠肌低密度脂蛋白受体相关蛋白4表达的特点[J].临床神经病学杂志,2017,30(2):131-133.

[7] LIU M,LIU S,LIU B,et al.Bulbar paralysis and facial paralysis due to metastatic hepatocellular carcinoma:a case report and literature review[J].Medicine,2016,95(4):e2632.DOI:10.1097/MD.0000000000002632.

[8] 秦雪梅,陈群,鲁卫华,等.重症肌无力并发反拗性危象1例报告[J].山东医药,2015,18(30):109-109.

[9] AL-SHAHOUMI R,BRADY LI,SCHWARTZENTRUBER J,et al.Two cases of congenital myasthenic syndrome with vocal cord paralysis[J].Neurology,2015,84(12):1281-1282.

[10] 王娟,顼宝玉.重症肌无力的治疗进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(18):2125-2127.

[11] BEESON D.Congenital myasthenic syndromes:recent advances [J].Current Opinion in Neurology,2016,29(5):565-571.

[12] 莫建义.重症肌无力病因、发病机制、分子靶向治疗研究进展[J].卒中与神经疾病,2017,24(3):262-264.
[13] LOGAN CV,COSSINS J,RODRÍGUEZ CPM,et al.Congenital myasthenic syndrome type 19 is caused by mutations in COL13A1, encoding the atypical non-fibrillar collagen type VIII α1 Chain[J]. American Journal of Human Genetics,2015,97(6):878-885.
[14] 熊飞,林莉.儿童甲状腺功能亢进症合并重症肌无力危象一例[J].中国小儿急救医学,2016,23(6):431-432.
[15] 汪杰,李宏增,李川,等.重症肌无力患者的免疫指标与临床疗效分析[J].现代生物医学进展,2016,16(31):6162-6164.
[16] 徐林,金立军.高危急性冠脉综合征病人经皮冠状动脉支架植入术术后发生氯吡格雷抵抗的相关因素及预后分析[J].安徽医药,2017,21(4):687-691.

(收稿日期:2018-03-08,修回日期:2018-05-21)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.11.032 ◇临床医学◇

辅助性T细胞22及其细胞因子水平在慢性乙型肝炎病人中的变化特点及临床意义

何进伟,宋梅,邓家艳,李乐,汪明星
作者单位:连州市人民医院感染科,广东 清远 513400
作者简介:汪明星,男,副主任医师,研究方向为病毒性肝炎,肝硬化,E-mail:zhanglqwe@163.com
基金项目:清远市科技计划项目(170807211901012)

摘要:目的 探讨慢性乙型肝炎(CHB)病人辅助性T细胞22(Th22)及其细胞因子水平及意义。**方法** 选取2017年1月至2018年3月在连州市人民医院治疗的CHB病人40例(观察组),同时选取健康者40例作为对照组,检测两组Th22细胞、白细胞介素-22(IL-22)水平。**结果** 观察组Th22细胞、IL-22水平分别为(2.57±0.48)%和(25.69±5.30)pg/mL,明显高于对照组(t=20.123和13.884,P=0.000和0.000);丙氨酸氨基转移酶(ALT)>5倍正常值病人,Th22细胞、IL-22水平分别为(3.10±0.90)%和(30.02±5.22)pg/mL,明显高于2~5倍正常值和<2倍正常值病人(t=5.382和4.855,5.182和5.282,P=0.000和0.002,0.000和0.000<0.05);不同HBV DNA病人Th22细胞、IL-22水平比较差异无统计学意义(r=0.473和0.127,P=0.234和0.512);Th22、IL-22与ALT呈正相关(r=0.413和0.367,P=0.002和0.012),Th22与IL-22呈正相关(r=0.487,P=0.003)。**结论** CHB病人中Th22和IL-22水平明显升高,与ALT水平有一定相关性,值得进一步研究。
关键词:乙型肝炎,慢性; 辅助性T细胞22; 白细胞介素-22; 丙氨酸氨基转移酶

Characteristics and clinical significance of helper T cell 22 and its cytokine levels in chronic hepatitis B (CHB)

HE Jinwei,SONG Mei,DENG Jiayan,LI Le,WANG Mingxing
Author Affiliation:Department of Infections,Lianzhou People's Hospital,Qingyuan,Guangdong 513400,*China*

Abstract:Objective To investigate the level and significance of helper T cell 22 (Th22) andthe cytokines in chronic hepatitis B (CHB).**Methods** From January 2017 to March 2018,40 cases of CHB patients were selected in Lianzhou People's Hospital (observation group),and 40 healthy subjects were selected as control group,and two groups of Th22 cells and interleukin-22 (IL-22) were detected.**Results** The level of Th22 cells and IL-22 in the observation group was (2.57±0.48)% and (25.69±5.30) pg/mL, which were significantly higher than that in the control group (P<0.05).The levels of Th22 and IL-22 in patients with alanine aminotransferase (ALT)>5 times of normal value were (3.10±0.90)% and (30.02±5.22) pg/mL,which were significantly higher than those of 2-5 times normal values and<2 times normal values (P<0.05).There were no significant difference in Th22 cell and IL-22 level in patients with different HBV DNA (P>0.05).Th22 and IL-22 were positively correlated with ALT (r=0.413 and 0.367, P<0.05),and Th22 was positively correlated with IL-22 (r=0.487,P<0.05).**Conclusion** The levels of Th22 and IL-22 in CHB patients are significantly higher,with a certain correlation with ALT,which is worth further study.
Key words: Hepatitis B,chronic; Helper T cell 22; Interleukin-22; Alanine aminotransferase

辅助性T细胞22(Th22)是最近发现的辅助性T细胞新亚群[1],表达CC类趋化因子受体(CCR)6、CCR4和CCR10,并产生白细胞介素(IL)-22、IL-26和IL-13,其中IL-22是最主要的效应因子[2]。同时,