

• 论 著 •

外周血单个核细胞自噬相关基因 LC3 II、Beclin-1 与类风湿关节炎的相关性研究*

吴 茜¹, 赵莉平¹, 李彦魁¹, 方亚妮¹, 张荣强^{2△}

陕西中医药大学: 1. 医学技术学院; 2. 公共卫生学院, 陕西咸阳 712046

摘要: **目的** 检测并分析类风湿关节炎(RA)患者外周血单个核细胞(PBMC)中 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平和羟氯喹治疗前后的变化情况, 以及其与疾病活动度、炎症介质的关系。 **方法** 收集 2018 年 4 月至 2019 年 9 月陕西中医药大学附属医院风湿肾病科确诊的 RA 住院患者 58 例作为 RA 组, 同期体检健康者 46 例作为健康对照组。根据 28 关节疾病活动度评分(DAS28), 将 RA 组分为活动期组(高度、中度、低度活动度组)及缓解期组。利用实时荧光定量 PCR 检测 RA 组及健康对照组, RA 组中治疗前组(无羟氯喹使用史, 16 例)及治疗后组(使用羟氯喹并达到临床缓解期, 14 例) LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平。采用酶联免疫吸附试验法检测 RA 组肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的水平, 利用统计学方法分析 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 在 RA 组和治疗前后组的表达情况, 并分析 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平与不同疾病活动度及炎症介质的关系。 **结果** RA 组 PBMC 中的 LC3 II 的 mRNA 相对表达水平高于健康对照组, 差异有统计学意义($t=2.894, P<0.01$); RA 活动期组 LC3 II 的 mRNA 相对表达水平高于缓解期组, 差异有统计学意义($t=2.872, P<0.05$)。同时, LC3 II 的 mRNA 相对表达水平与 DAS28 评分及炎症介质 TNF- α 水平呈正相关($r=0.783, 0.671, P<0.05$), 但与 C 反应蛋白无相关性($P>0.05$)。与治疗后组比较, 治疗后组 RA 患者 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平显著下降, 差异有统计学意义($P<0.05$)。 **结论** 自噬相关基因 LC3 II 在 RA 中具有监测疾病活动度及疗效的临床价值。

关键词: 类风湿关节炎; 疾病活动度; 炎症; 自噬

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.03.012

中图法分类号: R593.22

文章编号: 1673-4130(2021)03-0305-04

文献标志码: A

Relationship between autophagy related genes LC3 II, Beclin-1 in peripheral blood mononuclear cells and rheumatoid arthritis*

WU Qian¹, ZHAO Liping¹, LI Yankui¹, FANG Yani¹, ZHANG Rongqiang^{2△}

1: School of Medical Technology; 2: School of Public Health, Shaanxi

University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China

Abstract: **Objective** To detect and analyze the relative expression level of LC3 II and Beclin-1 mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with rheumatoid arthritis (RA) and the changes before and after hydroxychloroquine treatment, as well as their relationship with disease activity and inflammatory mediators. **Methods** From April 2018 to September 2019, 58 patients with RA diagnosed in the Department of rheumatic nephropathy, Affiliated Hospital of Shaanxi University of traditional Chinese medicine were selected as RA group, and 46 healthy people were selected as healthy control group. According to 28 joint disease activity score (DAS28), RA group was divided into active stage group (high, moderate and low activity group) and remission stage group. Real time quantitative PCR was used to detect the mRNA relative expression levels of LC3 II and Beclin-1 in RA group and healthy control group, before treatment group (without hydroxychloroquine use history, 16 cases) and after treatment group (using hydroxychloroquine and reaching clinical remission stage, 14 cases). The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) in RA group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The relative expression levels of LC3 II and Beclin-1 mRNA in RA

* 基金项目: 陕西省重点研发计划(2020SF-076); 陕西省卫生健康委员会卫生健康科研项目(2018A017); 陕西省教育厅重点科学研究计划(19JS015); 陕西中医药大学青年基金项目(2017QN11)。

作者简介: 吴茜, 女, 讲师, 主要从事类风湿关节炎的分子机制及标志物筛查研究。 △ 通信作者, E-mail: zhangrxianyang@163.com。

本文引用格式: 吴茜, 赵莉平, 李彦魁, 等. 外周血单个核细胞自噬相关基因 LC3 II、Beclin-1 与类风湿关节炎的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(3): 305-308.

group and before and after treatment were analyzed by statistical method, and the relationship between the relative expression levels of LC3 II and Beclin-1 mRNA and different disease activity and inflammatory mediators were analyzed. **Results** The relative expression levels of LC3 II mRNA in PBMC of RA group was higher than that of healthy control group ($t=2.894, P<0.01$); the relative expression level of LC3 II mRNA in active RA group was higher than that in remission group ($t=2.872, P<0.05$). Meanwhile, the relative expression level of LC3 II mRNA was positively correlated with DAS28 score and TNF- α level ($r=0.783, 0.671, P<0.05$), but there was no correlation with C-reactive protein ($P>0.05$). Compared with before treatment, the relative expression levels of LC3 II mRNA and Beclin-1 mRNA in RA patients decreased significantly after treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Autophagy related gene LC3 II has clinical value in monitoring disease activity and curative effect in RA.

Key words: rheumatoid arthritis; disease activity; inflammation; autophagy

类风湿关节炎(RA)是一种慢性关节炎,可导致关节软骨、骨质破坏并造成功能丧失^[1]。这种慢性疾病发病机制复杂,是遗传、环境、免疫等多种因素共同作用的结果^[2]。其中,激活的免疫细胞不断释放炎症介质是导致滑膜持续性炎症及关节软骨和骨质破坏的重要原因。因此,在临床应用中,一方面通过观察RA患者炎症相关指标的变化,监测病程进展;另一方面,以抑制及平衡机体炎症为主要的治疗手段,缓解病情^[3]。

细胞自噬是指在外界不良环境因素影响下(包括饥饿、氧化应激、感染、营养缺乏),可被诱导产生并通过一系列途径将细胞内物质运送到溶酶体中进行降解的过程^[4]。近年来研究发现,细胞自噬不仅可以形成自噬小体传递吞噬物到溶酶体中,以发挥细胞保护作用,而且它在确保重要免疫细胞行使正常功能及调控炎症信号等方面同样扮演着重要角色^[4-6]。本研究旨在分析自噬相关基因 LC3 II、Beclin-1 在 RA 患者外周血单个核细胞(PBMC)中相对表达水平的变化,以及其与炎症因子的相关性,探讨细胞自噬在 RA 患者中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 4 月至 2019 年 9 月陕西中医药大学附属医院风湿肾内科确诊的 RA 住院患者 58 例作为 RA 组。纳入标准:(1)符合 2010 年美国风湿病学会和欧洲抗风湿病联盟修订的 RA 分类标准^[7];(2)无羟氯喹药物使用史。排除标准:排除患有其他自身免疫性疾病、感染、肿瘤。根据 28 关节疾病活动度评分(DAS28 评分),将 RA 组分为活动期组(高、中、低 3 个疾病活动度亚组,分别为 18、11、12 例)及缓解期组(17 例)。RA 组中选取 16 例初诊病例(无羟氯喹药物治疗史)作为治疗前组;使用含羟氯喹药物的治疗方案正规治疗后,随访 14 例(2 例患者失访)达到临床缓解期的 RA 患者作为治疗后组。收集同期体检健康者 46 例作为健康对照组。RA 组和健康对照组的一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

1.2 仪器与试剂 Ficoll 淋巴细胞(北京索莱宝公

司);Trizol 试剂、反转录试剂盒、TB Green Premix Ex Taq II PCR 定量试剂盒(日本 TaKaRa);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELASA)试剂盒(南京建成生物科技有限公司);Nano Drop-2000 紫外分光光度计(美国 Thermo);Sure Cyclor 8800 热循环仪(美国安捷伦);Step One Plus 实时荧光定量 PCR(qPCR)仪(美国 ABI);全自动酶标仪(美国 Biotek)。

表 1 RA 组和健康对照组一般资料比较				
组别	<i>n</i>	性别 (女/男, <i>n</i> / <i>n</i>)	年龄 ($\bar{x}\pm s$, 年)	体质量指数 ($\bar{x}\pm s$, kg/m ²)
RA 组	58	46/12	50.17 $\pm$ 12.48	20.67 $\pm$ 2.19
健康对照组	46	35/11	45.73 $\pm$ 12.41	21.06 $\pm$ 2.23

1.3 实验方法

1.3.1 临床及实验室资料收集及整理 收集 RA 组患者临床及实验室资料,整理到 Excel 表中。包括(1)患者性别、年龄、体质量指数等一般资料;(2)患者既往史:患病史、用药史;(3)患者现病史:28 肿胀关节计数(SJC)、28 疼痛关节计数(TJC)、患者全身视觉模拟评分(100-mm VAS);(4)患者实验室检查结果:C 反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)。利用 DAS28 评分软件计算患者 DAS28 评分。

1.3.2 PBMC 分离、RNA 提取及 cDNA 合成 使用乙二胺四乙酸二钾抗凝管空腹采集静脉血 3 mL,离心分离血浆后,差速密度梯度离心法分离 PBMC, Trizol 法提取细胞中的总 RNA,微量分光光度计检测 RNA 浓度、纯度[吸光度(A)_{260/280} 比值],将符合标准的 RNA 样本统一调整至 50 ng/ μ L,反转录为 cDNA,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.3.3 qPCR qPCR 采用核酸染料法,以 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因,每个标本做 3 个复孔,使用 Step One Plus qPCR 仪进行 PCR 扩增。引物由 TaKaRa 公司设计合成,序列见表 2。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。基因相对表达水平采用($2^{-\Delta\Delta Ct}$)表示,其中 $\Delta\Delta Ct =$

(Ct_{RA组目的基因} - Ct_{RA组内参基因}) - (Ct_{健康对照组目的基因} - Ct_{健康对照组内参基因})。

表 2 内参基因及目的基因的引物序列		
基因	引物序列	Tm 值(℃)
β-actin	5':TGG CAC CCA GCA CAA TGA A	64.7
	3':CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A	62.3
LC3II	5':TGT CAA CAT GAG CGA GTT GGT	61.7
	3':CGT CCT CGT CTT TCT CCT GCT	63.2
Beclin-1	5':AAG GGT CTA AGA CGT CCA ACA A	60.0
	3':GCC TGG GCT GTG GTA AGT AAT G	62.9

1.3.4 TNF-α 检测 使用无抗凝剂采血管采集 RA 患者 3 mL 血液,分离血清,ELISA 法检测 RA 患者 TNF-α 水平。

1.4 统计学处理 应用 SPSS22.0 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间计量资料比较采用单因素方差分析;计数资料以率表示,2 组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman 相关。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RA 组 PBMC 中 LC3 II、Beclin-1 mRNA 的相对表达水平 LC3 II、Beclin-1 mRNA 在 2 组 PBMC 中均有表达,RA 组与健康对照组相比,LC3 II mRNA 相对表达水平显著升高,差异有统计学意义($t = 2.894, P < 0.01$),而 2 组 Beclin-1 mRNA 相对表达水平差异无统计学意义($t = 1.847, P > 0.05$)。见表 3。

表 3 RA 组及健康对照组 PBMCs 中 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	LC3 II	Beclin-1
RA 组	58	3.75 ± 1.97	1.28 ± 0.91
健康对照组	46	0.94 ± 0.65	0.98 ± 0.23
<i>t</i>		2.894	1.847
<i>P</i>		0.006	0.158

2.2 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平与 RA 疾病活动度的相关性 活动期组 LC3 II 的 mRNA 相对表达水平较缓解期组显著升高(4.31 ± 2.86 vs. 0.96 ± 0.81),差异有统计学意义($t = 2.872, P < 0.05$);Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平没有显著变化(1.32 ± 0.67 vs. 0.91 ± 0.18),差异无统计学意义($t = 1.186, P > 0.05$)。

高度活动期组、中度活动期组、低度活动期组、缓解期组中 LC3 II mRNA 的相对表达水平比较,差异有统计学意义($F = 2.56, P < 0.05$),且随疾病活动度升高,呈上升趋势。DAS28 评分与 LC3 II mRNA 相对表达水平呈正相关($r = 0.783, P < 0.05$)。而高度活动期组、中度活动期组、低度活动期组、缓解期组中

Beclin-1 mRNA 相对表达水平比较,差异无统计学意义($F = 0.858, P > 0.05$),且与 DAS28 评分也无相关性($r = 0.196, P > 0.05$)。RA 组 LC3 II mRNA 相对表达水平与血清中的 TNF-α 水平呈正相关($r = 0.671, P < 0.05$),但与 CRP 水平无相关性($r = 0.149, P > 0.05$)。Beclin-1 mRNA 相对表达水平与 TNF-α 及 CRP 水平均无相关性($r = 0.270、0.151, P > 0.05$)。RA 不同疾病活动度 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平,见图 1。

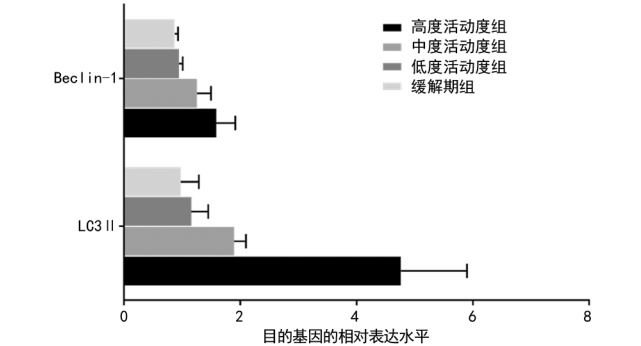


图 1 RA 不同疾病活动度 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 相对表达水平

2.3 治疗前后组 LC3 II、Beclin-1 mRNA 的相对表达水平 与治疗前组比较,治疗后组 LC3 II、Beclin-1 mRNA 相对表达水平显著下降,差异有统计学意义($t = 2.931, P < 0.05$)。见表 4。

表 4 RA 患者 PBMC 中 LC3 II、Beclin-1 的 mRNA 在治疗前后的相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	LC3 II	Belin-1
治疗前组	16	4.21 ± 2.73	1.48 ± 0.23
治疗后组	14	0.75 ± 0.42	0.62 ± 0.19
<i>t</i>		2.931	2.174
<i>P</i>		0.001	0.031

3 讨 论

细胞自噬是一种维持细胞内环境稳态的生存机制,能够在各种不同刺激下诱导产生。通过包裹损伤的细胞器、错误折叠的蛋白质形成自噬小体,并与溶酶体融合完成内容物的降解,从而避免细胞凋亡,起到保护细胞的作用^[8-9]。有研究发现,RA 成纤维滑膜细胞的过度增殖与凋亡抵抗有关,而细胞的凋亡抵抗正是由于自噬作用增强,细胞得到保护的结果^[10]。

RA 作为慢性炎症性疾病,参与其发病的 T 细胞(CD4⁺ T 淋巴细胞)、B 细胞、单核巨噬细胞通过释放多种细胞因子、直接攻击靶组织、抗原呈递、促进破骨细胞分化、形成慢性炎症环境等方式参与 RA 疾病进程^[11-12]。有研究显示,RA 中的 T 细胞异常激活,凋亡减少,并且还能保证其他细胞如成纤维滑膜细胞、单核巨噬细胞、B 细胞等在慢性炎症环境中的生存^[13]。在本研究中,提取 RA 患者及健康者的 PB-

MC, 比较观察自噬相关基因 LC3 II 及 Beclin-1 的相对表达水平, 发现 RA 患者 LC3 II mRNA 相对表达水平高于健康者, 表示外周血 PBMC 中存在自噬现象, 推测 T 细胞凋亡减少或许与其发生自噬有关。

除细胞保护机制, 自噬途径及相关蛋白在机体免疫和炎症反应中同样扮演重要角色。通过平衡免疫和炎症反应的利弊效应, 自噬作用保护机体免受自身免疫性疾病的伤害^[5]。然而, 炎症反应和自噬的具体调节机制迄今尚不明晰, 蔡永青等^[14]研究表明, 自噬在炎症反应中通过抑制作用来维持内环境的稳态。有研究发现, 自噬与炎症因子可互相调节, 一方面, 炎症因子调节自噬, 诱导或抑制细胞自噬; 另一方面, 自噬反过来可以调节炎症因子的产生和释放^[15]。RA 患者可通过疾病活动度反映机体炎症情况, 临床上通常用 DAS28 评分进行评估。本研究在探索自噬与炎症关系中发现, LC3 II mRNA 相对表达水平与疾病活动度呈正相关。LC3 II mRNA 可作为反映疾病活动度的指标监测 RA 患者的病情。另外, 研究显示, TNF- α 作为重要的炎症因子参与 RA 的发生、发展, 并与疾病活动度呈正相关^[16]。本研究也对 LC3 II mRNA 相对表达水平与 TNF- α 的相关性进行分析, 发现 LC3 II mRNA 相对表达水平与 TNF- α 呈正相关。因此, 可进一步证实机体炎症情况与自噬水平有相关性, 但炎症因子与自噬二者是单方面作用还是互为因果还需继续深入研究。

在肿瘤治疗中, 已提出以自噬作为治疗靶点干预疾病的进程^[17]。RA 同样存在自噬现象, 推测通过抑制自噬可缓解病情。羟氯喹是抑制自噬的有效药物^[18], 在研究中选择 RA 初诊患者(未使用羟氯喹)进行正规治疗(治疗药物中有羟氯喹), 比较治疗前后 RA 患者自噬水平, 结果显示 LC3 II mRNA 相对表达水平在治疗后下降, 推测自噬活性的降低可缓解病情。但是, 在临床治疗过程中难以使用单一药物进行干预, 其他药物造成的影响无法判断。因此, 自噬作为有效治疗靶点仍需通过细胞或动物模型, 控制单因素进行验证。

综上所述, 从 RA 患者和治疗前后自噬相关基因的相对表达水平, 及其与疾病活动度和炎症介质相关性分析结果表明, 自噬水平在活动期 RA 患者中升高, 且与疾病活动度及机体炎症情况呈正相关。自噬相关基因 LC3 II 作为评价 RA 疾病活动度和治疗效果的指标之一, 为临床监测病情及疗效提供帮助。同时, 本研究也为探索自噬、炎症、RA 三者之间的关系提供一定依据, 课题组将针对三者之间的具体作用机制展开进一步的研究。

参考文献

[1] SMOLEN J S, ALETAHA D, MCINNES I B. Rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023-2038.

[2] CROIA C, BURSI R, SUTERA D, et al. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2019, 37(3): 347-357.

[3] CHEN Z, BOZEC A, RAMMING A, et al. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(1): 9-17.

[4] YIM W W Y, MIZUSHIMA N. Lysosome biology in autophagy[J]. Cell Discovery, 2020, 6(1): 1-12.

[5] LEVINE B, MIZUSHIMA N, VIRGIN H W. Autophagy in immunity and inflammation [J]. Nature, 2011, 469(7330): 323-335.

[6] QIAN M, FANG X, WANG X. Autophagy and inflammation[J]. Clin Translat Med, 2017, 6(1): 24-28.

[7] KAY J, UPCHURCH K S. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria [J]. Rheumatology, 2012, 51 (Suppl 6): 5-9.

[8] WU D J, ADAMOPOULOS I E. Autophagy and autoimmunity[J]. Clin Immunol, 2017, 176: 55-62.

[9] GIAMPIERI F, AFRIN S, FORBES-HERNANDEZ T Y, et al. Autophagy in human health and disease: novel therapeutic opportunities[J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 30(4): 577-634.

[10] VOMERO M, MANGANELLI V, BARBATI C, et al. Reduction of autophagy and increase in apoptosis correlates with a favorable clinical outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF drugs[J]. Arthr Research Ther, 2019, 21(1): 39.

[11] WEYAND C M, GORONZY J J. T-cell-targeted therapies in rheumatoid arthritis[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2(4): 201-210.

[12] RANA A K, LI Y, DANG Q, et al. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65: 348-359.

[13] MALEMUD C J. Defective T-cell apoptosis and T-regulatory cell dysfunction in rheumatoid arthritis[J]. Cells, 2018, 7(12): 223-226.

[14] 蔡永青, 胡建辉, 李小丽. 炎症因子调节细胞自噬的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(9): 821-824.

[15] HARRIS J. Autophagy and cytokines[J]. Cytokine, 2011, 56(2): 140-144.

[16] 王志中, 王勇, 牟方祥, 等. 血小板, TNF- α 及 IL-1 β 与活动期类风湿关节炎的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5): 469-472.

[17] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(9): 528-531.

[18] KIM Y, EOM J I, JEUNG H K, et al. Induction of cytosine arabinoside-resistant human myeloid leukemia cell death through autophagy regulation by hydroxychloroquine[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 73(1): 87-96.