

Gαq 在多发性肌炎患者外周血 T 淋巴细胞中的表达及意义*

杨 闵¹, 梁 燕¹, 何 燕², 左 川¹, 尹 耕¹, 谢其冰^{1△}

1. 四川大学华西医院 风湿免疫科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 分析 Gαq 在多发性肌炎(PM)患者外周血 CD3 阳性 T 淋巴细胞中的表达,以及与 PM 的临床评价指标肌力评估(MMT)、肌炎活动性评估(MDAA)、肌酸激酶(CK)、血沉(ESR)、C-反应蛋白(CRP)的相关性。**方法** 收集 30 例初发 PM 患者外周血标本,以 30 例健康志愿者作为对照。采用非科帕克密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMCs);通过免疫细胞磁珠分选技术得到 CD3 阳性 T 淋巴细胞,提取总 RNA 和总蛋白;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real time-PCR)检测 Gαq 蛋白和 mRNA 水平;采用 Pearson 相关性检验分析 PM 患者外周血 T 淋巴细胞中 Gαq mRNA 表达水平与 MMT、MDAA、CK、ESR、CRP 的相关程度。**结果** 与健康对照组比较,PM 患者外周血 CD3 阳性 T 淋巴细胞中 Gαq 在蛋白水平和 mRNA 水平的表达降低($P<0.001$)。PM 患者外周血 T 淋巴细胞中 Gαq mRNA 表达水平与 MMT ($r=-0.704$, $P<0.001$)、MDAA($r=-0.793$, $P<0.001$)、CK($r=-0.670$, $P<0.001$)呈负相关,但与 ESR、CRP 无相关性。**结论** Gαq 蛋白在 PM 患者 T 淋巴细胞的表达增高,并且与 PM 病情活动性指标呈负相关,提示 Gαq 与 PM 的发病密切相关。

【关键词】 多发性肌炎 Gαq T 淋巴细胞 疾病活动度

Expression of Gαq in Peripheral Blood T Lymphocytes of Patients with Polymyositis and Its Correlation with Disease Activity YANG Min¹, LIANG Yan¹, HE Yan², ZUO Chuan¹, YIN Geng¹, XIE Qi-bing^{1△}. 1. Department of Rheumatology and Immunology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: xieqibing1971@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the expression of Gαq in peripheral blood T lymphocytes of the patients with polymyositis (PM) and its correlation with disease activity evaluated by the clinical markers [manual muscle test (MMT), myositis disease activity assessment (MDAA), creatine phosphokinase (CK), erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP)]. **Methods** Blood samples were obtained from 30 patients with first onset PM and 30 healthy volunteers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from these patients were collected and CD3⁺ T cells from PBMCs were sorted out with magnetic beans. The mRNA and protein expression levels of Gαq in T cells were measured by RT-PCR and Western blot. Student's unpaired 2-tailed t-test was applied to identify Gαq expression difference between PM patients and healthy controls. Pearson's correlation between Gαq mRNA expression of PM and clinical evaluation markers MMT, MDAA, CK, ESR or CRP was determined. **Results** Compared to health control, PM patients had significantly lower expression levels of Gαq protein and mRNA in peripheral blood CD3⁺ T cells ($P<0.001$). Negative correlation was found between Gαq mRNA level and MMT ($r=-0.704$, $P<0.001$), MDAA ($r=-0.793$, $P<0.001$) or CK ($r=-0.670$, $P<0.001$), and no correlation was found between Gαq mRNA level and ESR or CRP. **Conclusion** Gαq expression in T cells of PM is lower than that in normal control and has negative correlation with PM disease activity.

【Key words】 Polymyositis Gαq T lymphocytes Disease activity

多发性肌炎(PM)是特发性炎性肌病(IIM)的主要类型之一,是一种以近端肌无力和横纹肌非化

脓性炎症为特点的自身免疫病。PM 的发病机制不清,目前认为主要是由细胞免疫介导的免疫损伤^[1]。免疫病理提示 PM 患者肌纤维细胞表面 MHC-I 类分子的表达显著上调,肌内膜(endomysium)区域出现 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、巨噬细胞、浆细胞、树突状细胞(DCs)等免疫细胞的浸润,尤以 CD8⁺ T 细胞和巨噬细胞为甚^[2]。自身反应性 T 细胞在发

* 国家自然科学基金(No. 81172869 及 No. 30901339)、四川省科技攻关项目(No. 2009SZ0173)和四川省应用基础项目(No. 2010JY0011)资助

△ 通讯作者, E-mail: xieqibing1971@163.com

病中起重要作用,但其参与发病的机制还知之甚少。G 蛋白(guanine nucleotide-binding proteins)在哺乳动物细胞中的共同功能是传导来自 1 000 多种 G 蛋白偶联受体(G-protein coupled receptors, GPCR)的信号,并将外界信号转化为细胞应答^[3,4]。G 蛋白是三聚体蛋白质,包含 α 、 β 和 γ 3 个亚单位,根据 α 亚单位的不同又将 G 蛋白分为 Gs、Gi/o、Gq/11 和 G12/13 四个亚家族。Gq 是 Gq/11 亚家族成员之一,G α q 是由 *Gnaq* 编码的 Gq 蛋白的功能单位,广泛表达于组织器官中^[4]。由于 Gq 的广泛表达并可结合多种 GPCR,其功能可表现在包括免疫系统在内的多个系统中。迄今为止,G α q 与自身免疫的关系在动物实验中已经得到证实,但在人类自身免疫病中的作用研究还属空白。本研究探讨了 G α q 在 PM 中的表达异常以及与疾病活动性的关系,为后续研究 G α q 如何参与 PM 免疫发病机制提供支撑。

1 对象和方法

1.1 研究对象及分组

PM 组:30 例,所有 PM 患者均为初次发病,符合 2003 年 Dalakas 诊断标准^[5],采集标本前均未接受糖皮质激素及其它免疫抑制剂治疗。所有患者均排除合并其它风湿性疾病、活动性感染、肿瘤、高血压、冠心病、糖尿病等。患者来源于四川大学华西医院风湿免疫科门诊及病房(2009 年 10 月至 2011 年 10 月),其中女性 16 例,男性 14 例,年龄 20~69 岁,平均(41.76 $\pm$ 13.71)岁,病程 0.5~12.5 月,平均(5.17 $\pm$ 2.14)月。

对照组:30 例,均为健康志愿者,其中女性 15 名,男性 15 名,年龄 20~58 岁,平均(40.55 $\pm$ 10.32)岁。

入选 PM 患者及健康对照的人口统计学特征差异无统计学意义。本研究遵循四川大学华西医院关于人体试验的伦理学标准并已获得入选对象的知情同意。

1.2 PM 临床评估指标

分别对 30 例 PM 患者进行肌力评估(MMT)^[2]、肌炎活动性评估(MDAA)^[6,7]。

1.3 主要试剂与仪器

Anti-CD3 Biotin 购自 eBioscience 公司, Anti-mouse CD3 PE-CY5 购自 Beckman 公司, monoclonal antibodies anti-G α q 购自 BD 公司, Streptavidin Microbeads 购自 Miltenyi 公司,

Tubulin 内参标记抗体购自 Beyotime 公司, Anti-rabbit IgG、HRP linked Antibody 和 Anti-mouse IgG、HRP linked Antibody 购自 Cell Signaling 公司, iScript cDNA Synthesis Kit、SsoFast EvaGreen Supermix 购自 Bio-Rad 公司。仪器包括 Cytomics™ FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)、-80 ℃低温冰箱、台式冷冻高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司)、CCD 凝胶成像系统、PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、Vortex 震荡器、倒置相差显微镜等。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞制备及纯度鉴定 采集 PM 患者及健康志愿者外周血 20 mL,肝素钠抗凝。采用密度梯度离心法(Ficoll)从血液样本中分离获得外周血单个核细胞(PBMCs),再应用免疫细胞磁珠分选法(MACS)得到 CD3⁺ T 淋巴细胞。分选后的细胞计数,取 1 $\times$ 10⁵ 细胞以 anti-human CD3 PE-Cy7 抗体标记后用流式细胞仪检测纯度。

1.4.2 Western blot 检测 G α q 蛋白的表达

1.4.2.1 总蛋白的制备 将磁珠分选所得淋巴细胞转移至 EP 管,离心 300 $\times$ g/5 min,25 ℃,弃上清;加 1 mL PBS 混匀,洗涤细胞,离心 300 $\times$ g/5 min,25 ℃,弃上清;加入 100 μ L Lysis Buffer,冰上反复吹打混匀 10 min;离心 12 000 $\times$ g/10 min,4 ℃;将上清移至新 EP 管中。用 BCA 法测定蛋白浓度,贮存于-80 ℃备用。

1.4.2.2 凝胶电泳 取 PM 患者和健康志愿者按照 1.4.2.1 方法制备的总蛋白各 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳,然后转至 PVDF 膜上,封闭液室温封闭 1 h 后,加入 G α q 和 Tubulin 一抗,4 ℃孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的相应二抗室温孵育 1 h。再用 TBST 洗 3 次,TBS 洗一次后加入化学发光剂放入 CCD 凝胶成像系统检测。

1.4.3 Real time-PCR 检测 *Gaq* mRNA 的表达

将 1.4.1 提取的 CD3⁺ T 淋巴细胞提取总 RNA 逆转录合成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应。内参照 *GAPDH* 上游引物:5'-GTGAA CCATGAGAAGTATGACAAC-3',下游引物:5'-CATGAGTCCTTCCACGATACC-3';*Gnaq* 上游引物:5'-GTTGATGTGGAGAAGGTGTCTG-3',下游引物:5'-GTAGGCAGGTAGGCAGGGT-3'。PCR 反应条件:95.0 ℃ 30 s;95.0 ℃ 5 s,62.3 ℃ 10 s,40 个循环后进行数据收集及实时定量分析;55.0~95.0 ℃ 10 s,81 个循环,数据收集及熔解曲

线分析。通过熔解曲线判断其是否存在非特异扩增,然后使用 PCR 扩增产物,制作 PCR 反应的标准曲线,确定扩增效率。采用相对定量法,以内参基因 *GAPDH* 的表达量为参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *Gαq* 的相对表达量。

1.4.4 肌酸激酶(CK)、血沉(ESR)和 C-反应蛋白(CRP)的检测 采集患者空腹静脉血,应用酶速率法检测 CK、魏式法检测 ESR、速率散色比浊法检测 CRP。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检

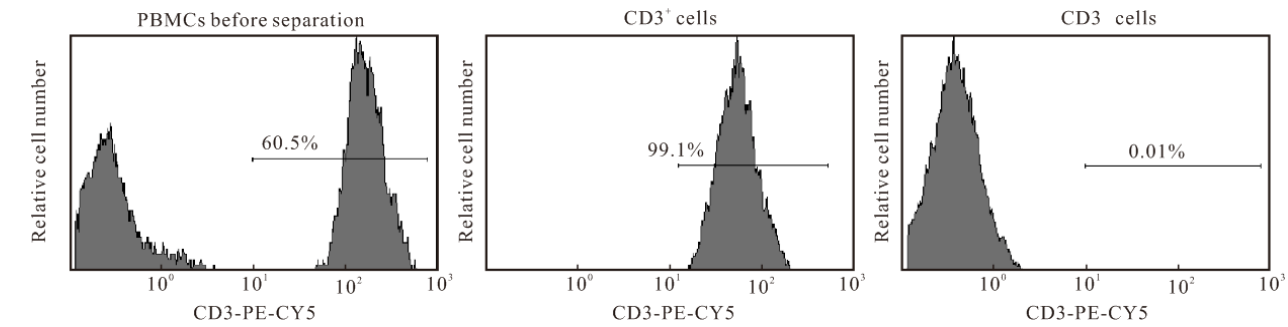
验,采用 Pearson 法对两变量进行相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 应用免疫磁珠分选 PBMCs 后淋巴细胞纯度鉴定结果

流式细胞术分析证实纯化后的 CD3⁺ T 细胞数量 > 95% (附图)。

2.2 外周血 CD3⁺ T 细胞 Gαq 蛋白和 mRNA 的表达



附图 应用免疫磁珠分选 CD3⁺ T 淋巴细胞纯度鉴定
Fig Purity assay of CD3⁺ T lymphocytes sorted by immunomagnetic beads

PM 患者外周血 CD3⁺ T 细胞 *Gαq* 蛋白的表达 (0.74 ± 0.28) 低于对照组 (1.52 ± 0.50 , $t = 7.489$, $P = 0.000$), *Gαq* mRNA 的表达 (0.63 ± 0.27) 也低于对照组 (1.41 ± 0.50 , $t = 7.480$, $P = 0.000$)。

2.3 PM 患者外周血 CD3⁺ T 细胞 Gαq mRNA 表达与疾病特征的相关性

PM 患者 *Gαq* mRNA 水平与 MMT、MDAA、CK 呈负相关 ($P < 0.001$), 与 ESR、CRP 均不相关 ($P > 0.05$), 见附表。

附表 PM 患者外周血 CD3⁺ T 细胞 *Gαq* mRNA 表达与 MMT、MDAA、CK、ESR、CRP 的相关性

Table	Correlation between <i>Gαq</i> mRNA expression and MMT, MDAA, CK, ESR, CRP in PM patients				
	MMT	MDAA	CK	ESR	CRP
<i>r</i>	-0.704	-0.793	-0.670	-0.188	-0.119
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.321	0.531

3 讨论

迄今为止, IIM 的发病机制还不清楚。普遍接受的观点认为它是由免疫性炎症介导的自身免疫损伤。PM 和皮肌炎(DM)是 IIM 的经典疾病,但是目前认为二者已知的发病机制不尽相同。PM 以 T 淋巴细胞异常活化为核心,病理可见大量 CD8⁺ T 细

胞、CD4⁺ T 细胞、巨噬细胞、浆细胞、DCs 等在肌内膜聚集。其发病的基本免疫过程是: DCs 吞噬抗原, 在 MHC-I、MHC-II、辅助刺激因子、细胞因子等辅助下, 将抗原递呈给幼稚 T 细胞, 使之成为记忆性 T 细胞, 在穿孔蛋白(perforin)的作用下, CD8⁺ T 细胞广泛攻击表达 MHC-I 类分子的肌细胞, 造成肌纤维变性、坏死^[2,8]。值得注意的是, T 细胞的参与是 PM 发病的中心环节, 因此, 在本研究中我们把 T 细胞作为重点关注的对象。

Gαq 是 G 蛋白 α 亚单位中的亚家族成员, 主要功能是将 GPCR 接受的胞外信号转化为细胞应答, 近 40% 的 GPCR 依赖 *Gαq* 将信号传递至细胞内。同时, *Gαq* 广泛表达于包括 T 细胞在内的多种细胞中, 可结合多种 GPCR 信号, 故其功能可表现在多个系统中, 对细胞内信号传导的调控作用也是广泛的^[4,9,10]。*Gαq* 与自身免疫也有密切关系。已有文献报道 *Gαq* 对 T 淋巴细胞的调控作用, 提示抑制 *Gαq* 基因可以明显增强 T 细胞受体(TCR)诱导的 Lck 活化受阻时的 T 淋巴细胞迁移, 认为 *Gαq* 的活化水平可以调控 T 淋巴细胞在接受 TCR 刺激后的激活状态^[11,12]。

在本研究中, 我们发现 PM 患者 CD3⁺ T 细胞

中 $G_{\alpha q}$ 在 mRNA 及蛋白水平的表达均较健康对照明显降低, 且与反映疾病活动程度的指标 MMT、MDAA、CK 呈负相关, 提示 $G_{\alpha q}$ 在 IIM 的发生发展中起了重要作用。参考上述文献的结论, 我们认为 $G_{\alpha q}$ 参与 IIM 发病的可能机制之一是: $G_{\alpha q}$ 的低表达上调了 T 细胞在接受 TCR 刺激后的活化状态, 使之“过度激活”, 从而强化了 T 细胞介导的自身免疫损伤。最近关于 $G_{\alpha q}$ 与 B 细胞的研究中也有相似的发现, 即 $G_{\alpha q}$ 的缺失可导致发育正常的 B 细胞在外周耐受选择时表现出异常存活, 引致大量具有自反应倾向的过渡期 B 细胞、边缘 B 细胞(MZB)、滤泡 B 细胞(FoB)的蓄积, 与野生型 B 细胞相比, 这些细胞的异常存活源自于它们更能抵抗 B 细胞活化因子(BAFF)减少以及 B 细胞受体(BCR)活化增加等死亡诱导信号^[13]。我们实验室前期工作未发表的结果也在类风湿关节炎(RA)患者 B 细胞中发现了 $G_{\alpha q}$ 的降低以及与 RA 疾病活动性呈负相关。这些证据提示 $G_{\alpha q}$ 作为一个细胞内信号传导的关键分子, 可能在包括 IIM、RA 在内的多种自身免疫病的发病中起到了重要调控作用。我们推测 $G_{\alpha q}$ 的低表达可能导致自身免疫病的易感倾向, 即自身免疫的一些关键环节出现异常, 造成自身免疫性淋巴细胞的增殖、活化, 免疫耐受状态因此被打破。 $G_{\alpha q}$ 在其中如何扮演角色, 即如何影响免疫细胞的分化、功能、活化、迁移及凋亡仍是未知领域, 是我们下一步研究的内容。

参 考 文 献

- 1 Dalakas MC. Review: an update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011; 37(3):226-242.
- 2 Choi JH, Park YE, Kim SI, *et al.* Differential immunohistological features of inflammatory myopathies and dysferlinopathy. *J Korean Med Sci*, 2009; 24(6):1015-1023.
- 3 Hubbard KB, Hepler JR. Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling*, 2006; 18(2):135-150.
- 4 Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 2005; 85(4): 1159-1204.
- 5 Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet*, 2003; 362(9388):971-982.
- 6 Rider LG, Giannini EH, Harris-Love M, *et al.* International Myositis Assessment and Clinical Studies Group: defining clinical improvement in adult and juvenile myositis. *J Rheumatol*, 2003; 30(3):603-617.
- 7 Sultan SM, Allen E, Oddis CV, *et al.* Reliability and validity of the myositis disease activity assessment tool. *Arthritis Rheum*, 2008; 58(11):3593-3599.
- 8 Page G, Chevrel G, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum*, 2004; 50(1):199-208.
- 9 Liggett SB, Kelly RJ, Parekh RR, *et al.* A functional polymorphism of the Galphaq (GNAQ) gene is associated with accelerated mortality in African-American heart failure. *Hum Mol Genet*, 2007; 16(22):2740-2750.
- 10 McGraw DW, Elwing JM, Fogel KM, *et al.* Crosstalk between Gi and Gq/Gs pathways in airway smooth muscle regulates bronchial contractility and relaxation. *J Clin Invest*, 2007; 117(5):1391-1398.
- 11 Ngai J, Inngjerdingen M, Berge T, *et al.* Interplay between the heterotrimeric g-protein subunits galphaq and galphai2 sets the threshold for chemotaxis and TCR activation. *BMC Immunol*, 2009; 10:27. doi:10.1186/1471-2172-10-27.
- 12 Ngai J, Methi T, Andressen KW, *et al.* The heterotrimeric g-protein alpha-subunit galphaq regulates tcr-mediated immune responses through an lck-dependent pathway. *Eur J Immunol*, 2008; 38(11):3208-3218.
- 13 Misra RS, Shi G, Moreno-Garcia ME, *et al.* Galphaq-containing G proteins regulate B cell selection and survival and are required to prevent B cell-dependent autoimmunity. *J Exp Med*, 2010; 207(8):1775-1789.

(2013-06-26 收稿, 2013-07-08 修回)

编辑 汤 洁