

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2018)03-0219-04

TWEAK-Fn14 轴相关因子在皮炎患者中的表达

童芳¹, 夏育民², 王萍¹

(1. 皖南医学院 微生物学与免疫学教研室, 安徽 芜湖 241002; 2. 西安交通大学第二附属医院 皮肤与性病科, 陕西 西安 710004)

【摘要】目的: 研究肿瘤坏死因子样弱凋亡诱导因子(TWEAK)与它的受体成纤维细胞生长诱导因子14(Fn14)及其下游的细胞因子单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、 γ -干扰素诱导蛋白10(IP-10)、调节正常T细胞表达和分泌的活性因子(RANTES)、Ro52在皮炎(DM)中的表达。方法: 免疫组化检测皮炎病人与健康对照组皮肤和肌肉中TWEAK、Fn14、MCP-1、RANTES、IP-10、Ro52的表达水平, 并进行半定量分析。结果: 免疫组化结果显示, 皮炎患者皮肤中各蛋白的表达水平高于健康对照组; 皮炎患者肌肉中各蛋白的表达水平高于健康对照组。结论: TWEAK/Fn14信号轴可能参与皮炎的发病机制。

【关键词】皮炎; 肿瘤坏死因子样弱凋亡诱导因子; 成纤维细胞生长诱导因子14; Ro52; 免疫组化

【中图分类号】R 593.26; R 392.11 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.03.004

Expression of TWEAK-Fn14 axis related factors in patients with dermatomyositis

TONG Fang, XIA Yumin, WANG Ping

Department of Microbiology and Immunology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the expression of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis(TWEAK) and its receptor deficiency of fibroblast growth factor-inducible 14(Fn14), together with the downstream cytokines MCP-1, IP-10, RANTES, and Ro52 in patients with dermatomyositis(DM). **Methods:** Immunohistochemistry was performed to detect the expression levels of TWEAK, Fn14, MCP-1, RANTES, IP-10, and Ro52 in the skins and muscles of dermatomyositis patients and healthy controls. Then the results were analyzed by semi-quantitative method. **Results:** Immunohistochemistry indicated significantly higher expression levels of these proteins in the lesion skin of dermatomyositis patients than those in healthy controls. Moreover, the expression levels of these proteins were significantly higher in the involved muscle of dermatomyositis patients than those of healthy controls. **Conclusion:** TWEAK-Fn14 signaling may be involved in the pathogenesis of DM.

【Key words】 Dermatomyositis; TNF-related weak inducer of apoptosis; Fibroblast growth factor-inducible 14; Ro52; immunohistochemistry

皮炎(Dermatomyositis, DM)是一种特发性炎症性肌病,以炎症浸润为主,主要影响骨骼肌和皮肤。皮肤病理表现为表皮萎缩、基底膜变性真皮间质黏蛋白沉积^[1]。肌肉活检呈现II型肌纤维萎缩、坏死和肌核膜集中肥大等特征性变化^[2]。DM是一种少见病,影响儿童和成人,男女比例约为2:1,目前病理机制尚不清楚^[3]。

肿瘤坏死因子样弱凋亡诱导因子(TNF-related weak inducer of apoptosis, TWEAK)和成纤维细胞生长诱导因子14(fibroblast growth factor-inducible 14, Fn14)在组织损伤和患有疾病时有所增加^[4]。两者结合后在TNF受体相关因子(TRAF)协同作用下

激活下游信号通路,上调一系列促炎因子,如调节正常T细胞表达和分泌的活性因子(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, RANTES)、 γ -干扰素诱导蛋白10(interferon gamma-induced protein 10, IP-10)和单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)^[5-6],趋化巨噬细胞、淋巴细胞等参与局部的炎症反应。迄今为止,有关TWEAK-Fn14在DM中表达的报道非常有限。Ro52是一个52 ku的胞内蛋白,与光敏性有关,在一些炎症性皮肤病的表皮中高表达。但皮炎中Ro52是否表达鲜有报道。

收稿日期: 2017-10-16

作者简介: 童芳(1991-),女,2015级硕士研究生,(电话)15555368875,(电子信箱)tongfang@163.com;

王萍,女,副教授,硕士生导师,(电子信箱)wangping_152@163.com,通信作者。

1 材料及方法

1.1 材料 选取西安交通大学第二附属医院皮肤科病理室2012年1月~2016年9月皮炎石蜡标本,其中包括皮肤组织10例,男性1例,女性9例,年龄19~73岁,平均年龄(50.4±14.04)岁;肌肉组织5例,年龄39~69岁,平均年龄(54.2±11.45)岁。另选用整形手术切除的正常皮肤组织和骨外伤患者的正常肌肉组织作为对照,其中包括皮肤组织6例,年龄25~51岁,平均年龄(38.6±11.01)岁;肌肉组织5例,年龄37~64岁,平均年龄(51.6±11.97)岁。本研究经医院伦理委员会审批,所有标本取材均签署知情同意书。

1.2 主要试剂及配制 兔抗人TWEAK多克隆IgG购自美国Santa公司。Anti-TWEAKER IgG、Anti-RANTES IgG、Anti-MCP-1 IgG、Anti-IP-10 IgG均为美国Abcam公司产品。兔抗人Ro52多克隆抗体为美国Santa公司产品。兔/鼠通用型Streptavidin-HRP试剂盒(内含内源限速酶封闭缓冲液、山羊血清封闭液、DAB)购自中国康为世纪公司。HRP标记的兔/鼠通用型二抗购自丹麦Dako公司。Mayer改良苏木素购自中国Heart公司。中性树胶购自中国上海。

抗原修复液:柠檬酸10 mmol/L,EDTA-Na₂ 1 mmol/L,Tween-20 500 μL,调节pH至6.0,加蒸馏水定容至1000 mL;组织通透液0.1% Triton-100:1 mL Triton-100加入1000 mL PBS缓冲液中,使其充分溶解;0.1% PBST:1 mL Tween-20加入1000 mL PBS缓冲液中,使其充分溶解。

1.3 主要仪器 石蜡切片机、烤片机均为德国Leica公司产品;正置显微镜为日本尼康株式会社生产。

1.4 实验方法

1.4.1 石蜡切片的制备 手术标本用生理盐水彻底冲洗,经4%多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋4 μm厚连续切片。每个标本取13张,其中1张用于常规HE染色,其余行免疫组织化学染色。

1.4.2 免疫组化染色采用SP法 切片常规脱蜡,抗原修复3% H₂O₂灭活内源性过氧化物酶,用正常山羊血清封闭,滴加一抗(4 mg/L,用封闭液稀释,PBS替代一抗作为阴性对照)和适量HRP-标记的兔鼠通用型二抗(PBS替代二抗作为阴性对照),DAB显色,苏木精轻度复染,然后脱水,透明,中性树胶封片,用光学显微镜观察并摄片。

1.4.3 结果判定和图像分析 用Image-ProPlus软件测定某一视野下阳性染色细胞的光密度(optical density,OD),每张切片随机选取10个视野,对每组样本阳性染色细胞的OD值取平均值,进行表达情况分析。

1.5 统计学方法 采用SPSS 18.0软件进行统计分析,所有数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异的比较采用t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

切片经染色后,TWEAK、Fn14、MCP-1、RANTES、IP-10和Ro52阳性细胞的细胞质/膜呈淡黄色、黄色或黄褐色,细胞核不着色。我们采用免疫组化的方法检测TWEAK、Fn14、MCP-1、RANTES、IP-10、Ro52在DM患者皮肤组织和正常皮肤组织中的表达情况。结果显示各蛋白在DM皮肤中表达较健康组织升高(图1a、b)。DM皮肤组织各蛋白的平均光密度值较健康皮肤组织增高(表1、图1c),差异有统计学意义(P<0.05)。

表1 DM患者和健康对照组皮肤中各蛋白平均光密度值

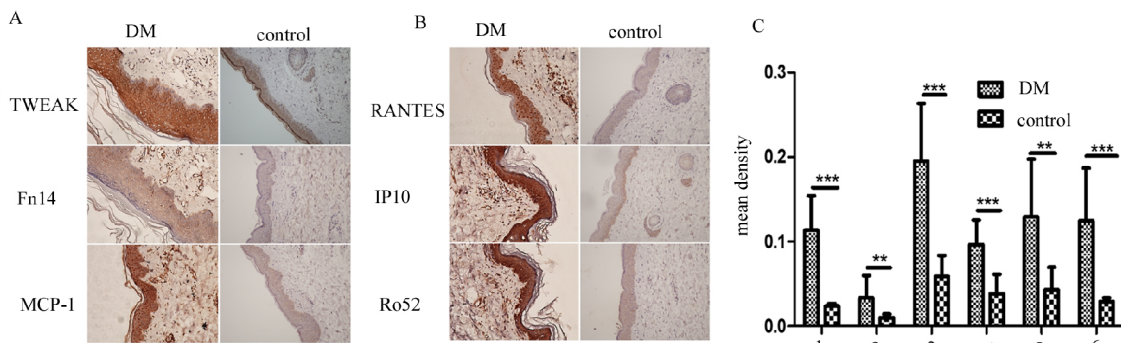
Table with 5 columns: Protein, DM组(n=10), 健康对照组(n=6), t, P. Rows include TWEAK, Fn14, MCP-1, RANTES, IP-10, Ro52.

用同样方法检测各蛋白在DM患者肌肉组织和正常肌肉组织中的表达情况。结果显示在DM肌肉组织中各蛋白的表达较健康肌肉组织升高(图2a、b)。DM肌肉组织各蛋白的平均光密度值较健康肌肉组织增高(表2、图2c),差异有统计学意义(P<0.05)。

表2 DM患者和健康对照组肌肉中各蛋白平均光密度值

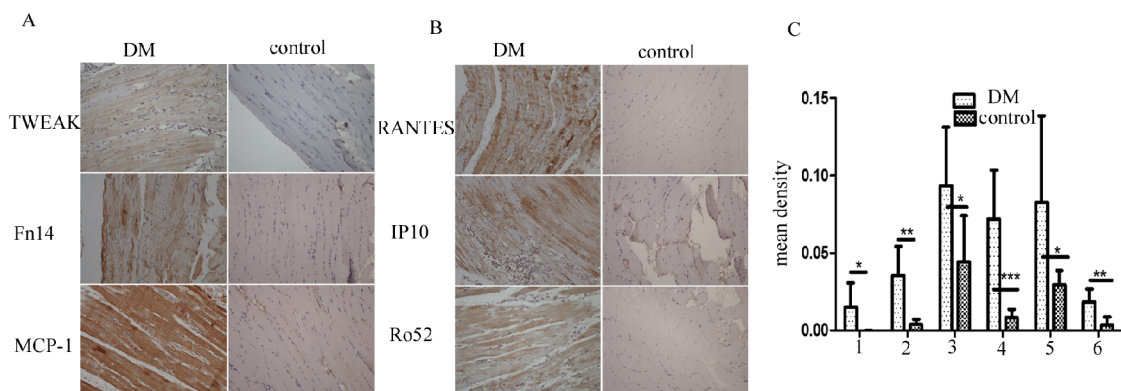
Table with 5 columns: Protein, DM组(n=5), 健康对照组(n=5), t, P. Rows include TWEAK, Fn14, MCP-1, RANTES, IP-10, Ro52.

注:* (×10⁻⁵)。



A. TWEAK、Fn14、MCP-1 在 DM 患者和健康对照组皮肤中的表达;B. RANTES、IP-10、Ro52 在 DM 患者和健康对照组皮肤中的表达;C. DM 患者和健康对照组皮肤组织各蛋白的平均光密度值。免疫组织化学染色 ×200。1. TWEAK;2. Fn14;3. MCP-1;4. RANTES;5. IP-10;6. Ro52, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

图1 TWEAK、Fn14、MCP-1、RANTES、IP-10、Ro52 在 DM 患者和健康对照组皮肤中的表达



A. TWEAK、Fn14、MCP-1 在 DM 患者和健康对照组肌肉中的表达;B. RANTES、IP-10、Ro52 在 DM 患者和健康对照组肌肉中的表达;C. DM 患者和健康对照组肌肉组织各蛋白的平均光密度值。免疫组织化学染色 ×200。1. TWEAK;2. Fn14;3. MCP-1;4. RANTES;5. IP-10;6. Ro52, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

图2 DM 患者和健康对照组肌肉组织中各蛋白的表达

3 讨论

TWEAK 属于 TNF 超家族多功能细胞因子,通过结合并激活细胞上的受体 Fn14 发挥作用,Fn14 为 TNF 受体超家族(TNFRSF)蛋白^[7]。TWEAK 最初被合成为 II 型跨膜蛋白,但它在细胞内可被弗林蛋白酶裂解,释放出可溶性的细胞因子,以自分泌或旁分泌的方式作用于细胞^[8]。Fn14 是 I 型跨膜蛋白,可高度诱导多种生长因子,包括表皮生长因子(EGF)、血小板源性生长因子(PDGF)和血管内皮生长因子(VEGF)。

Zhao 等^[9]发现 TWEAK 可导致小鼠角质形成细胞的炎症反应和细胞凋亡,而 MRL/lpr Fn14 基因敲除小鼠的皮肤病变明显减轻,T 细胞和巨噬细胞浸润减少,说明 TWEAK-Fn14 轴有助于皮肤型红斑狼疮(CLE)的发病。TWEAK 是一种炎性细胞因子,有力地调节着神经损伤引起的骨骼肌萎缩。TWEAK 及其受体 Fn14,是骨骼肌质量的关键调节因子^[10]。Enwere 等证明高浓度的 TWEAK 可通过

激活 NF-κB 通路损害肌肉^[11]。Mittal 等说明 TWEAK-Fn14 轴可能会损害骨骼肌的形成,有助于肌肉萎缩^[12]。也有实验在皮肌炎(DM)和多发性肌炎(PM)患者肌肉组织中检测出高水平的 TWEAK 和 Fn14,且 Fn14 的表达与肌肉疾病活动度呈正相关,同时还发现 TWEAK 蛋白在局部白细胞浸润的地方表达增加,Fn14 mRNA 和蛋白在肌纤维膜上表达上调,于是提出 TWEAK-Fn14 信号在 PM/DM 的发病机制中可能起重要作用^[13]。这与我们的研究结果一致。我们运用免疫组织化学研究了皮肌炎肌肉组织与皮肤中的 TWEAK、Fn14 及下游因子 MCP-1、RANTES 和 IP-10 水平,各蛋白呈阳性表达或呈强阳性表达;在正常组织中,TWEAK、Fn14 表达较弱或几乎不表达。在皮肤组织中,6 种蛋白主要分布在表皮中,在真皮部位炎性细胞浸润的地方表达明显;肌肉组织中各蛋白表达的分布,尚未呈现一定的规律。

Ro52 是一种广泛表达的干扰素诱导蛋白^[14],

可被干扰素或干扰素诱导剂如病毒感染或 Toll 样受体所诱导上调。尤其是中波紫外线(波长 290 ~ 320 nm),又称为中波红斑效应紫外线,可诱发皮肤的损伤,继而激活免疫系统,上调光敏相关蛋白 Ro52 的表达,诱导 Ro52-抗 Ro52 免疫复合物的形成,最终促使皮肤光敏的发生。抗 Ro52 抗体可筛选系统性自身免疫性病,如 SLE、CLE、干燥综合征、系统性硬化、皮炎/多发性肌炎、混合结缔组织病以及 RA 等。大量报道显示抗 Ro52 抗体和 Ro52 与 CLE 的光敏性狼疮密切相关^[15-16]。在紫外线诱导的或自发的 CLE 损伤,以及在其他炎症皮肤中,Ro52 的表达与健康组织相比呈增高趋势^[17]。Liu 等^[18]发现 Ro52 在表达着 TWEAK 和 Fn14 的 CLE 皮损区高表达,此外 TWEAK 在培养的角质形成细胞中可单独上调 Ro52 的表达,证明了 TWEAK/Fn14 调控 Ro52 的表达及其他下游信号。这些研究大多针对皮肤组织,对于自身免疫病肌肉组织是否表达 Ro52 的研究较少。有关于 TWEAK 和 Ro52 在皮炎中同时表达的研究尚未报道。在研究中我们用免疫组化法同时观察了皮肤和肌肉组织与抗 Ro52 抗体的结合情况,发现 Ro52 不仅在 DM 的皮肤组织中表达,在肌肉组织也高表达。TWEAK 与 Fn14 结合后,可以激活核因子- κ B (NF- κ B) 和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 途径,从而上调 Ro52 和一些因子的表达,这些因子包括 MCP-1、RANTES、IP-10,可以招募巨噬细胞和 T 淋巴细胞,浸润的免疫细胞又可以分泌促炎症因子,如 TWEAK 和干扰素 α ,从而加重了皮炎的免疫反应。

总之,在皮炎发病机制中,TWEAK-Fn14 通路很可能起着重要作用,该通路在 DM 中很可能被激活。为了进一步验证 TWEAK-Fn14 信号在皮炎皮肤和肌肉中被激活,我们后续研究除了测定血清中 TWEAK、Fn14 及下游因子水平,还需测定皮肤和肌肉组织中相关 mRNA 表达量,以及分析 TWEAK、Fn14 与疾病严重程度是否存在联系。

【参考文献】

[1] BOLOGNIA JL ,JORIZZO JL ,SCHAFER JV *et al.* Dermatology [M]. 3rd ed. London:ELSEVIER 2012:1875 - 1876.
 [2] SCHWARZ HA ,SLAVIN G ,WARD P *et al.* Muscle biopsy in polymyositis and dermatomyositis:a clinicopathological study [J]. Annals of the Rheumatic Diseases ,1980 39(5) :500 - 507.
 [3] RAVAVARAPU S ,COLEY W ,NAGARAJU K. An update on pathogenic mechanisms of inflammatory myopathies [J]. Current Opinion in Rheumatology 2011 23(6) :579 - 584.
 [4] BURKLY LC ,MICHAELSON JS ,HAHM K *et al.* TWEAKing tis-

sue remodeling by a multifunctional cytokine: Role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease [J]. Cytokine 2007 40(1) : 1 - 16.
 [5] DOERNER JL ,WEN J ,XIA Y *et al.* TWEAK/Fn14 signaling involvement in the pathogenesis of cutaneous disease in the MRL/lpr model of spontaneous lupus [J]. Journal of Investigative Dermatology 2015 135(8) :1986 - 1995.
 [6] CHEN J ,WEI L ,XIA Y. Roles of tumour necrosis factor-related weak inducer of apoptosis/fibroblast growth factor-inducible 14 pathway in lupus nephritis [J]. Nephrology 2017 22(2) :101 - 106.
 [7] WINKLES JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery ,biology and therapeutic targeting [J]. Nature Reviews Drug Discovery 2008 7(5) :411 - 425.
 [8] CHICHEPORTICHE Y ,BOURDON PR ,XU H *et al.* TWEAK ,a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis [J]. Journal of Biological Chemistry ,1997 272(51) :32401 - 32410.
 [9] ZHAO Z ,BURKLY LC ,CAMPBELL S *et al.* TWEAK/Fn14 interactions are instrumental in the pathogenesis of nephritis in the chronic graft-versus-host model of systemic lupus erythematosus [J]. Journal of Immunology 2007 179(11) :7949 - 7958.
 [10] DOGRA C ,CHANGOTRA H ,WEDHAS N *et al.* TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine [J]. FASEB J 2007 21(8) :1857 - 1869.
 [11] ENWARE EK ,HOLBROOK J ,LEIMI-MRAD R *et al.* TWEAK and cIAP1 regulate myoblast fusion through the noncanonical NF- κ B signaling pathway [J]. Sci Signal 2012 5(246) :ra75.
 [12] MITTAL A ,BHATNAGAR S ,KUMAR A *et al.* The TWEAK - Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice [J]. Journal of Cell Biology ,2010 188(6) :833 - 849.
 [13] PENG QL ,SHU XM ,TIAN XL *et al.* Expression of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and fibroblast growth factor-inducible 14 in patients with polymyositis and dermatomyositis [J]. Arthritis Res Ther 2014 16:R26.
 [14] REYMOND A ,MERONI G ,FANTOZZI A *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments [J]. EMBO J 2001 20(9) : 2140 - 2151.
 [15] MEIER HC ,SANDLER DP ,SIMONSICK EM *et al.* Association between vitamin D deficiency and antinuclear antibodies in middle-aged and older U. S. adults [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2016 25(12) :1559 - 1563.
 [16] WOLLINA U ,HANSEL G. The use of topical calcineurin inhibitors in lupus erythematosus: an overview [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol 2008 22(1) :1 - 6.
 [17] OKE V ,VASSILAKI I ,ESPINOSA A *et al.* High Ro52 expression in spontaneous and UV-induced cutaneous inflammation [J]. Journal of Investigative Dermatology 2009 129(8) :2000 - 2010.
 [18] LIU Y ,XU M ,MIN X *et al.* TWEAK/Fn14 activation participates in Ro52-mediated photosensitization in cutaneous lupus erythematosus [J]. Frontiers in Immunology 2017 8:651.