

论著·临床研究

重症肌无力患儿外周血单个核细胞中热休克蛋白 90 的表达

刘润宁, 黄志

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014)

[摘要] 目的 重症肌无力(myasthenia gravis, MG)是一种自身免疫性疾病,发病机制自今仍未完全清楚。在其他自身免疫性疾病研究中发现热休克蛋白 90(heat shock protein 90, HSP90)表达有异常,该研究探讨 MG 儿童外周血单个核细胞(PBMC)中 HSP90 亚型 mRNA 表达水平和血清皮质醇的水平,以了解机体的应激状态。**方法** 对新发 MG 患儿 36 例及健康儿童 19 例(作为对照组)留取新鲜血液,取其上清液用化学发光法测定血清皮质醇水平;从其血细胞中分离出 PBMC,采用 RT-PCR 方法检测 HSP90 α 和 HSP90 β 亚型 mRNA。**结果** MG 患儿 HSP90 α (0.7329 ± 0.2120)、HSP90 β (0.7193 ± 0.2869) mRNA 表达水平比对照组(分别为 0.5574 ± 0.2084 , 0.4892 ± 0.2104)明显升高($P < 0.01$);MG 患儿血清皮质醇(285.04 ± 146.39 nmol/L)水平比对照组(196.25 ± 64.52 nmol/L)升高($P < 0.05$)。**结论** HSP90 α 和 HSP90 β mRNA 表达水平升高可能与 MG 疾病本身有关;而血清皮质醇水平升高表明机体处于高应激状态或可能与患儿糖皮质激素受体异常有关。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11(6):453-456]

[关键词] 重症肌无力;热休克蛋白 90;皮质醇;儿童

[中图分类号] R746.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)06-0453-04

Expression of heat shock protein 90 in peripheral blood mononuclear cells of children with myasthenia gravis

LIU Run-Ning, HUANG Zhi. Department of Neurology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Huang Z, Email: huangzhi3500@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective Myasthenia gravis is an autoimmunity disease and its pathogenesis has not been fully identified. Heat shock protein 90 (HSP90) shows an abnormal expression in other autoimmunity diseases. This study examined the mRNA expression of two isoforms of HSP90 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and serum cortisol content in children with myasthenia gravis. **Methods** Thirty-six children with myasthenia gravis and 19 healthy children were enrolled. Serum cortisol content was measured by the chemiluminescence assay. The expression of HSP90 α and HSP90 β mRNA in PBMC was detected by the RT-PCR technique. **Results** The mRNA expression of HSP90 α (0.7329 ± 0.2120) and HSP90 β (0.7193 ± 0.2869) in children with myasthenia gravis was significantly higher than that in healthy controls (0.5574 ± 0.2084 and 0.4892 ± 0.2104 respectively) ($P < 0.01$). Serum cortisol content (285.04 ± 146.39 nmol/L) in children with myasthenia gravis was also higher than that in the healthy controls (196.25 ± 64.52 nmol/L) ($P < 0.01$). **Conclusions** The high mRNA expression of HSP90 α and HSP90 β in PBMC might be associated with the development of myasthenia gravis. The high serum cortisol level indicates a high stress state or might be correlated to the glucocorticoid receptor abnormality in children with myasthenia gravis. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(6):453-456]

Key words: Myasthenia gravis; Heat shock protein 90; Cortisol; Child

热休克蛋白 90(heat shock protein 90, HSP90)是一种在正常状态下含量极低或无,而结构上高度保守的、普遍存在于真核生物中的蛋白质^[1],HSP90 主要存在于淋巴细胞的细胞浆中,而核内含量极微,其只有两个亚型 α 和 β ,同源性达 76%^[2]。据报道主要发挥作用的是 HSP90 β ^[3]。在原来的科学研究中大多只做 HSP90 总蛋白的研究,为了进一步阐明其作用机制,我们选择研究 HSP90 两个亚型。有研究表明 HSP90 是糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的重要伴侣分子,它的存在有利于 GR 的活化,并且使激素与受体快速而牢固地结合、定向转运及功能的发挥,因此推测 HSP90 的存在可能对糖皮质激素功能的发挥起着重要作用。GR 是糖皮质激素(体内皮质醇)结合蛋白,血清皮质醇的变化直接或间接反应机体的应激状态、对激素的敏感性和 GR 的功能和数量。许多实验研究发现,HSP90 在人类多种自身免疫性疾病的发生、发展过程中发挥着重要的作用^[4,5],但尚未发现

热休克蛋白 90(heat shock protein 90, HSP90)是一种在正常状态下含量极低或无,而结构上高度保守的、普遍存在于真核生物中的蛋白质^[1],HSP90 主要存在于淋巴细胞的细胞浆中,而核内含量极微,其只有两个亚型 α 和 β ,同源性达 76%^[2]。据报道主要发挥作用的是 HSP90 β ^[3]。在原来的科学研究中大多只做 HSP90 总蛋白的研究,为了进一步阐明其作用机制,我们选择研究 HSP90 两个亚型。有研究表明 HSP90 是糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的重要伴侣分子,它的存在有利于 GR 的活化,并且使激素与受体快速而牢固地结合、定向转运及功能的发挥,因此推测 HSP90 的存在可能对糖皮质激素功能的发挥起着重要作用。GR 是糖皮质激素(体内皮质醇)结合蛋白,血清皮质醇的变化直接或间接反应机体的应激状态、对激素的敏感性和 GR 的功能和数量。许多实验研究发现,HSP90 在人类多种自身免疫性疾病的发生、发展过程中发挥着重要的作用^[4,5],但尚未发现

[收稿日期]2008-10-29;[修回日期]2009-04-20

[作者简介]刘润宁,女,硕士研究生,医师。主攻方向:小儿神经系统免疫性疾病。

[通讯作者]黄志,男,教授,主任医师,重庆医科大学附属儿童医院,邮编:400014。

HSP90 或其亚型与重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 发病及其他关系的相关研究。本研究的目的是观察 MG 患儿与对照组儿童外周血单个核细胞 (PBMC) 中 HSP90 两个亚型的表达情况并比较其差异, 以及血清皮质醇含量的变化情况。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 MG 诊断 诊断标准必要条件: ①骨骼肌无力, 有典型活动后加重、休息后减轻, 即“晨轻暮重”的临床特征; ②疲劳试验阳性; ③新斯的明试验阳性或 (和) 胆碱酯酶抑制剂治疗有效。支持条件: ①血清乙酰胆碱受体抗体阳性; ②重复神经电刺激阳性; ③MRI 显示胸腺增生或者胸腺瘤^[6]。

1.1.2 MG 组患儿的入选标准 ①未曾患过自身免疫性疾病, 且未使用过激素史的新发病患儿; ②虽然曾使用过激素, 但已停用激素 6 个月以上且复发的患儿; ③单用溴吡啶斯的明治疗, 症状改善不明显者。符合上述任何一条均可作为纳入标准。所有入选患儿最近无感染、手术、外伤、精神创伤、不适药物等加重 MG 的诱发因素。

1.1.3 对照组 重庆市健康儿童微量元素抽查群体, 均知情同意。入选儿童无自身免疫性疾病、无感染、手术、外伤、精神创伤、不适药物等病史。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 所有患儿及对照组均于上午 8~10 时空腹取静脉血 3 mL, 肝素抗凝后保存于 4℃ 冰箱, 并在 3~4 h 内用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离 PBMC, 将细胞浓度调至 2×10^6 , 用于 RNA 的提取。

1.2.2 总 RNA 提取 按 EZgeno 试剂说明书要求操作, 提取总 RNA, 取 2 μ L 样品用紫外分光光度仪分别测定 280 nm 吸收值 (*A* 值), 鉴定纯度并测定浓度, 其余标本于 -70℃ 保存备用。

1.2.3 RT-PCR ①逆转录合成 cDNA 反应体系: cDNA 合成按照逆转录试剂盒 (BioRT) 说明书操作进行, 具体步骤如下: 5 $\times$ RT Buffer 4 μ L; dNTP Mixture (10 mM) 2 μ L; Oligo-dt1 μ L; RNase inhibitor (40 U/ μ L) 1 μ L; AMV Reverse Transcriptase 1 μ L; 试验样品 RNA 7 μ L; RNase free H₂O 4 μ L; 总体积为 20 μ L。②反应条件: 轻搅拌混匀后, 在 PCR 仪上进行反应, 条件为 42℃ 45 min; 95℃ 5 min; 4℃ 5 min; 循环 1 次。合成的 cDNA 于 -20℃ 保存用于 PCR 反应。

1.2.4 PCR 反应扩增 HSP90 α 和 HSP90 β DNA

反应总体积为 25 μ L, 其中 10 $\times$ PCR Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μ L; dNTP Mixture (10 mM) 0.5 μ L; 上游特异性引物 (5 μ L) 0.5 μ L; 下游特异性引物 (5 μ L) 0.5 μ L; Taq mix DNA polymerase 0.5 μ L; cDNA 模板 2.5 μ L; ddH₂O 18 μ L。HSP90 α 反应条件为 94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 50 s; 循环次数为 33 次。HSP90 β 反应条件为 94℃ 30 s; 57℃ 30 s; 72℃ 50 s; 循环次数为 33 次。以管家基因 β -actin 为内对照。 β -actin, HSP90 α , HSP90 β 特异性引物均由北京赛百盛生物工程公司合成。引物序列为 β -actin: 上游引物: 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3', 下游引物: 5'-GTCAAGAAAGGGTGTAAACGCAAC-3'; HSP90 α : 上游引物: 5'-GTGAACGTATGGGTCGTGGAAC-3', 下游引物: 5'-GGACAAATAGAAGGGCTCTGAAT-3'; HSP90 β : 上游引物: 5'-GAC TTGTGTCTTCACCTTGCT-3', 下游引物: 5'-GGTGGAGTTGTC-CCGAAGTG-3'; 预期扩增片段为: β -actin 311 bp、HSP90 α 498 bp、HSP90 β 101 bp。

1.2.5 RT-PCR 反应产物的检测 取 5 μ L 产物与 1 μ L 6 $\times$ loading buffer 混合后上样, 在 2% 琼脂糖胶中电泳, 每个产物跑 3 次电泳。紫外凝胶成像系统上照相, 电泳结果用凝胶电泳分析软件进行分析, 记录每条 DNA 扩增带的灰度值, 将每一种目的 DNA 扩增片段灰度与相应的内参扩增片段灰度的比值, 取 3 次的比值平均值作为 mRNA 水平的定量指标。

1.2.6 血清皮质醇测定 ①分离血清, 取 100 μ L 至样品杯中 (试剂来源于天津德普公司)。②方法: 化学发光法。③步骤: 按 IMMULITE-I/1000 型化学发光分析仪 (购置美国 DPC 公司) 作业指导书操作。正常范围参考值: 138~690 nmol/L (8~10 am)。

1.3 统计学分析方法

数值以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *F* 检验进行两样本方差齐性检验。两个样本间均数的比较用 *t* 检验。数据处理应用 SPSS 11.0 统计软件。

2 结果

2.1 两组儿童一般情况

MG 组共 36 例, 男 20 例, 女 16 例; 平均年龄 (7.4 $\pm$ 3.2) 岁。对照组共 19 例, 男 11 例, 女 8 例; 平均年龄 (6.7 $\pm$ 2.8) 岁。MG 组与对照组年龄、性别差异无显著性 (*P* > 0.05)。

2.2 实验结果

MG 组患儿 HSP 90 α 和 HSP 90 β mRNA 表达水

平明显高于对照组,差异有非常显著性(t 分别 = 2.90,3.08,均 $P < 0.01$);血清皮质醇测定结果也比对照组高,差异有显著性($t = 2.39, P < 0.05$),见图1、表1。

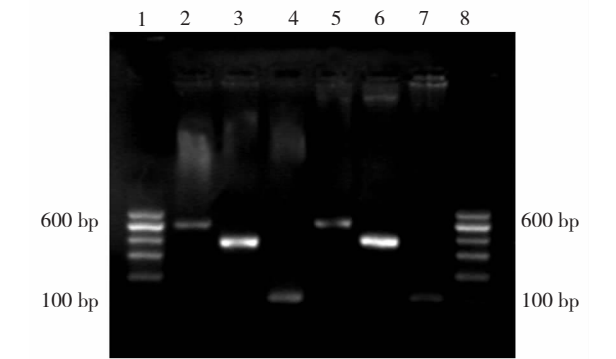


图1 MG组和对照组HSP90 mRNA亚型及内参β-actin扩增产物的电泳图 1,8;DNA标记物(100~600 bp);2~4为MG组;2为MG组HSP90α mRNA;3为MG组β-actin;4为MG组HSP90β mRNA。5~7为对照组;5为对照组HSP90α mRNA;6为对照组β-actin;7为对照组HSP90β mRNA。HSP90α,HSP90β,β-actin扩增产物加样量为5 μL。

表1 两组HSP90α,β表达水平及皮质醇测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HSP 90α	HSP 90β	血清皮质醇(nmol/L)
对照组	19	0.5574 ± 0.2084	0.4892 ± 0.2104	196.25 ± 64.52
MG组	36	0.7329 ± 0.2120 ^a	0.7193 ± 0.2869 ^a	285.04 ± 146.39 ^b

与对照组比较, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$

3 讨论

MG 是小儿神经科常见疾病之一,虽然在临床治疗过程中有许多措施,但到目前为止糖皮质激素仍然是治疗此病主要而有效的药物。它的主要作用机制是减少炎性细胞因子与粘连分子的表达及降低炎性细胞产生的致炎作用,从而达到缓解MG临床症状的目的。糖皮质激素不仅对MG治疗有效,而且对其他自身免疫性疾病的治疗也有很好的效果^[7]。国内外学者通过对其他自身免疫性疾病的研究发现,糖皮质激素对自身免疫性疾病的疗效(敏感性)的好坏与患儿体内皮质醇水平的高低无明显相关性,而与其GR有无异常密切相关,即GR正常的自身免疫性疾病患儿对糖皮质激素敏感性高,疗效佳,反之亦然。本研究结果显示,患儿血清皮质醇水平虽然在正常范围内,但与对照组相比,差异有显著性($P < 0.05$),血清皮质醇水平增高说明机体处于应激状态,也可能说明体内GR结合GC的能力降低或其数量减少,从而导致糖皮质激素治疗MG效果不佳的情况发生。

众所周知,HSP90是GR的重要伴侣分子。Elbi等^[8]在用HSP90的抑制剂格尔德霉素做实验时发现,HSP90是决定GR亚细胞的定位蛋白。当糖皮质激素缺乏时,HSP90的主要功能是使GR在细胞质-细胞核之间转运,并使其主要存在于细胞核中。Grad等^[9]发现,在PBMC细胞核中GR与HSP90表达呈正相关,而二者形成复合物则主要在细胞浆中,进入细胞核之后两者解聚;同时发现绝大多数GR是以游离状态存在于细胞质中。国内外学者对肾病、哮喘、系统性红斑狼疮肾炎、肿瘤、炎症等病理状态下研究发现,患者的PBMC中HSP90α,β mRNA表达增高,因此推测HSP90可能是疾病在发生、发展过程中对糖皮质激素敏感性和特异性起决定作用的指标^[10]。而本研究发现,MG患儿PBMC中HSP90α,β mRNA表达水平高于对照组,差异有非常显著性($P < 0.01$)。因此,我们认为HSP90α,β mRNA表达的增高可能与MG疾病的发生、发展有关,也可能与机体GR异常有关;另一方面,也可能是HSP90的过度表达抑制了GR与糖皮质激素的结合、转运及功能的发挥,从而导致疾病的发生。但其确切的发病机制及临床价值尚需进一步探讨。

[参 考 文 献]

[1] 李久宏,韩世新,高奎斌. 狼疮肾炎患者热休克蛋白90及亚型mRNA表达的研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2005, 21(1): 1-3.

[2] Sonji S, Ann Sens M, Garrett SH, Gurel V, Todd JH, Sens DA. Expression of hsp 90 in the human kidney and in proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite and cadmium chloride[J]. Toxicol Lett, 2002, 133(2-3):241-254.

[3] Murphy PJ, Morishima Y, Kovacs JJ, Yao TP, Pratt WB. Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone[J]. Biological Chemistry, 2005, 280(40):33792-33799.

[4] 欧阳涓,姜悦. 热休克蛋白90与类固醇激素受体功能的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(4):217-219.

[5] 钱小顺,朱元珏,许文兵,林耀广. 哮喘患者外周血单个核细胞中热休克蛋白90和糖皮质激素受体mRNA的表达[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(7):425-428.

[6] 谢琰臣,矫毓娟,许贤豪,王红,殷剑. 重症肌无力患者外周血单个核细胞中糖皮质激素受体不同五型表达和意义[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(1):56-59.

[7] 李亚琴,曹兰芳. 肾上腺糖皮质激素在幼年特发性关节炎中的应用进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(3):240-242.

[8] Elbi C, Walker DA, Lewis M, Romero G, Sullivan WP. Molecular chaperones function as steroid receptor nuclear mobility factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9):2876-2881.

[9] Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 275(1-2):2-12.

[10] Zhang X, Clark AF, Yorio T. Heat shock protein 90 is an essential molecular chaperone for nuclear transport of glucocorticoid receptor beta[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(2):700-708.

(本文编辑:徐福兰)