

肌肉活检中 ER 诱导自噬标志物的表达水平与特发性炎症性肌病病情的相关性

孙广珍 王慧 李阳

【摘要】 目的 探讨肌肉活检中 ER 诱导自噬标志物的表达水平与特发性炎症性肌病 (Idiopathic inflammatory myopathy, IIM) 病情的相关性。**方法** 37 例免疫介导坏死性肌病 (Immune-mediated necrotizing myopathy, IMNM) 患者、14 例皮肌炎 (Dermatomyositis, DM) 患者、6 例抗合成酶综合征 (Antisynthase syndrome, ASS) 患者和 10 例对照者纳入研究;采用组织学切片、Western blot 和实时定量聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 检测内质网应激诱导自噬通路的表达水平。**结果** 内质网应激诱导的自噬途径在 IMNM, DM 和 ASS 患者的活检肌肉中被激活,骨骼肌中内质网伴侣蛋白、葡萄糖调节蛋白 78 (Glucose-regulating protein 78, GRP78)/免疫球蛋白结合蛋白 (Immunoglobulin binding protein, BiP) 表达水平与 IMNM 的自噬、肌纤维萎缩、肌坏死、肌再生和疾病活动性相关。**结论** 内质网应激自噬与特发性炎症性肌病患者有关,并与 IMNM 的疾病活动性相关,内质网应激反应可能是 IIM 患者骨骼肌损伤和修复的原因。

【关键词】 内质网应激 自噬 肌张力性 骨骼肌

【中图分类号】 R746 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)01-0048-10

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.01.009

Correlation between the expression of ER-induced autophagy markers in muscle biopsy and idiopathic inflammatory myopathy Sun Guangzhen, Wang Hui, Li Yang. Department of Neurology, Beidahuang Group General Hospital (Heilongjiang Second Cancer Hospital), Harbin 150000

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between the expression of ER-induced autophagy markers in muscle biopsy and idiopathic inflammatory myopathy (IIM). **Methods** Thirty-seven patients with immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM), 14 patients with dermatomyositis (DM), 6 patients with anti-synthase syndrome (ASS), and 10 controls were included in the study. Histological sections, Western blot and real-time quantitative PCR were used to detect the expression of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy pathway. **Results** Endoplasmic reticulum stress-induced autophagy pathway is activated in biopsied muscles of patients with IMNM, DM, and ASS, and the expression of endoplasmic reticulon, glucose-regulatory protein 78 (GRP78)/BiP in skeletal muscle is associated with IMNM autophagy, muscle fiber atrophy, muscle necrosis, muscle regeneration, and disease activity. **Conclusion** Endoplasmic reticulum stress autophagy is associated with IIM patients and disease activity of IMNM, and the endoplasmic reticulum stress response may be the cause of skeletal muscle injury and repair in IIM.

【Key words】 Endoplasmic reticulum stress Autophagy Muscular tone Skeletal muscle

根据临床血清学特征、肌炎特异性抗体和转录组特征,特发性炎症性肌病 (IIM) 目前可分为 4 个主要亚型:DM、IMNM、抗合成酶综合征 (Antisynthase syndrome, ASS) 和散发包涵体肌炎 (Sporadic inclusion body myositis, sIBM)^[1]。尽管它们都具有免疫介导的生理病理机制,但鉴于其不同的血清

学和临床病理特征,亚群之间的发病机制可能不同。IMNM 直到最近才被发现,但骨骼肌功能障碍的分子机制仍然不清楚。肌肉攻击的关键免疫机制包括抗肌炎自身抗体和补体在 IMNM 中对肌肉具有致病性,但一些 IMNM 患者对剧烈的免疫抑制疗法反应不佳^[2],提示非免疫介质在疾病状态下骨骼肌功能障碍中也发挥重要作用。

内质网 (Endoplasmic reticulum, ER) 应激的 3 个传感器,肌醇要求酶 1 (Inositol requires enzyme 1, IRE1)、蛋白激酶 r 样 ER 激酶 (Protein kinase R-

基金项目:黑龙江省卫生健康委员会科研项目 (2021WJ0561)

作者单位:150000 哈尔滨,北大荒集团总医院 (黑龙江省第二肿瘤医院) 神经内科

like ER kinase, PERK) 和激活转录因子 6 (Activation of transcription factor 6, ATF6), 通过识别未折叠蛋白来调节未折叠蛋白反应 (Unfolded protein reaction, UPR) 信号, 这三种传感器通常与内质网管腔中的 GRP78/BiP 结合, 当未折叠的蛋白质在内质网内积聚过多时 BiP 通过解离和加速积累的蛋白质折叠来触发 UPR, UPR 信号通过调节自噬来保护细胞或诱导细胞死亡^[3]。内质网应激诱导的自噬通路的激活是否参与 IMNM 和其他 IIM 亚型仍不清楚。内质网应激可能在 IIM 的病理生理中发挥作用, 可能对肌肉损伤负责, 但它可能矛盾地有助于肌肉恢复^[4]。因此, 内质网应激在 IIM 肌肉中的作用非常复杂, 需要进一步探索。此外, 研究内质网应激相关蛋白在 IIM 中的表达主要集中在 DM、多发性肌炎和 sIBM。因此, 本研究主要探究肌肉活检中 ER 诱导自噬标志物的表达水平与特发性炎症性肌病病情的相关性。

1 材料与方法

1.1 患者选择

肌肉组织和临床资料于 2018 年 1 月 1 日 - 2023 年 6 月 1 日在医院神经内科获得。IMNM 和 DM 的诊断是根据欧洲神经肌肉中心特发性炎症性肌病国际研讨会, 如果肌炎患者的抗合成酶自身抗体检测呈阳性, 则将其归类为 ASS^[5]。受试者表现为弥漫性肌痛、虚弱或不明原因的肌酸磷酸激酶 (Creatine phosphokinase, CK) 水平升高, 但缺乏任何肌病特征, 作为对照者。排除标准包括肌营养不良、代谢性肌病、先天性肌病、癌症相关肌炎、其他结缔组织疾病重叠性肌炎以及感染、药物或毒素引起的肌病患者; 临床资料不充分、组织解冻、受损或不适合切片的患者也被排除在外。在肌肉活检时测定血清 CK 和乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 水平。根据诊断时的手动肌肉测试 (Manual muscle test, MMT)-8 评分 (0~80 分) 评估肌肉力量。本研究经医院伦理委员会批准 (IRB ID 为 CJ-C20181221), 并获得所有受试者的书面知情同意。

所有纳入研究对象的血清均检测肌炎特异性抗体 (Myositis specific antibodies, MSA) 和肌炎相关抗体 (Myositis-related antibodies, MAAs)。使用两种半定量系印迹法 (D-Tek; Euroline); IMNM 特异性抗体 [抗信号识别颗粒 (Anti-signal recognition particles, SRP) 和抗 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 a 还

原酶 (Anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase, HMGCR)], DM 相关抗体 [抗线粒体 (Antimitochondria, Mi) 2 α 和 β , 抗转录中介因子 1 γ (Antitranscriptional mediator 1 gamma, TIF1 γ), 抗黑色素瘤分化相关蛋白 5 (Anti-melanoma differentiation associated protein 5, MDA5), 抗核基质蛋白 2 (Antinuclear matrix protein 2, NXP2) 和抗小泛素样修饰物激活酶 1 (Anti-microubiquitin-like modifier activator enzyme 1, SAE1)], 抗合成酶抗体 [抗组氨酸-TRNA 合成酶 (Antihistidine-trna synthetase, JO1), 抗丙烯酸-TRNA 合成酶 (Resistant to acrylyl-TRNA synthetase, PL-12)、抗甘酰基-TRNA 合成酶 (Antiglycyl-trna synthetase, EJ)、抗异酰基-TRNA 合成酶 (Anti-isoacyl-trna synthetase, OJ) 和抗苏酰-TRNA 合成酶 (Anti-threonyl-trna synthase, PL-7)], 包涵体肌炎 (Inclusion body myositis, IBM) 特异性抗体 [人胞质 5 核苷酸酶 1A 抗体 (Human cytoplasmic 5 nucleotidase 1A antibody, CN-1A)、抗 KU、抗 PMSCL100、抗 PMSCL75 和抗 RO52 抗体)。

1.2 肌肉活检和免疫组织化学

所有入组患者均行骨骼肌活检诊断。采用苏木精-伊红、改良格莫瑞染色 (Gomory dyeing, GOMORI)、酸性磷酸酶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)-四氮唑还原酶、苏丹黑、细胞色素 C 氧化酶、琥珀酸脱氢酶、周期性酸性希夫酶、油红 O 和肌球蛋白 ATP 酶等常规方法对一系列 7 μ m 厚的冷冻切片进行染色。免疫组化染色采用以下一抗: BiP (1:2000), 溶酶体相关膜蛋白 2 (Lysosome associated membrane protein 2, LAMP2) (1:2000), 螯合蛋白 1 (Chelate 1, p62) (1:4000), LC3 (1:2000), 肌肉环指蛋白 2 (Ringfinger protein 2, RING), 肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶 1 (Muscle cell specific ubiquitin protein ligase 1, MuRF1) (1:50), 肌肉萎缩 F-box (Muscle atrophy F-box, MAFbx)/抗阿罗蛋白-1 (Antiaroprotein-1, Atrogin-1) (1:50), 肌营养不良蛋白 (1:30) 和神经细胞粘附分子/神经细胞粘附分子 1 抗体 (Nerve cell adhesion molecule-1 antibody, CD56) (1:50); 然后根据制造商的方案, 应用辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗小鼠二抗 IgG 抗体 (SV0004, Boster) 或合适的 Alexa 氟偶联二抗 (Invitrogen)。

1.3 Western Blot (蛋白印迹)

解剖肌肉组织, 再加入磷酸酶抑制剂的细胞裂

解缓冲液,裂解物在 4 °C 下以 12000 r/min 离心 15 min;收集上清液,用比辛胆酸法测定蛋白水平,总蛋白(20~40 μ g)在 8%~10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上电泳,转移到硝化纤维素过滤膜上;后用一抗探测膜:GRP78/BiP(1:10, Cell Signaling Technology),p62(1:10, Proteintech),人自噬相关蛋白 12(Human autophagy associated protein 12, ATG12)(1:10, Cell Signaling Technology),Beclin-1(1:10, Cell Signaling Technology),磷酸化丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 p38 γ 抗体(Phosphorylated mitogen-activated protein kinase phosphatase p38 γ antibody, Phospho-SAPK)/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)(Thr183/Tyr185)(Phospho-c-Jun N-terminal kinaseselisa, P-JNK)(1:10, Cell Signaling Technology),JNK1(1:10, Cell Signaling Technology),磷酸化真核启动因子 2 α 抗体(Phosphorylated eukaryotic promoter 2 α antibody, Phospho-eIF2 α , P-eIF2 α)(1:10, Cell Signaling Technology),eIF2 α (1:10, Cell Signaling Technology),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(1:5000, Proteintech);后用辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗小鼠二抗(1:5000, Cell Signaling Technology)孵育膜,用化学发光试剂显示靶蛋白条带,用 Fiji 软件评估。

1.4 逆转录定量聚合酶链反应(Reverse transcriptional quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)

使用赛默飞试剂盒(Invitrogen)从肌肉标本中提取总 RNA,使用 PrimeScript™ RT Master Mix(Takara)合成 cDNA;采用 SYBRGREEN I 核苷酸胶体染料(SYBRGREEN I nucleotide colloidal dye, SYBR-Green)检测方法对 GAPDH、自噬相关 5(Autophagy correlates 5, ATG5)、自噬相关 2B(Autophagy associated 2B, ATG2B)、磷酸酶和紧张素同源物(Tensioning congeners, PTEN)诱导的推定激酶 1(Putative kinase 1, PINK1)、CAAT 区/增强子结合蛋白(CAAT region/enhancer binding protein, C/EBP)同源蛋白(CHOP)、BiP、固体 1(SQSTM1)、ER 降解增强 α -甘醇苷酶样蛋白 1(α -Glycosidase-like protein 1 enhanced by ER degradation, EDEM1)、Bcl2 相互作用蛋白 3(BINP3)和 X-框结合蛋白 1(X-frame-binding protein 1, X-box),结合蛋白 1(Binding protein 1, XBP1)的引物

进行 RT-qPCR 分析,以 GAPDH 为内参,采用 Bio-Rad CFX Connect 系统进行 RT-qPCR 反应,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算靶基因的折叠变化。

1.5 透射电子显微镜

将样本在 4 °C、2.5%戊二醛固定 48 h,1%四氧化锇后固定,环氧树脂包埋,对肌肉标本进行超微结构分析;后用醋酸铀酰和柠檬酸铅对超薄切片进行染色,使用日立 TEM 系统在 80.0 KV 下进行分析。

1.6 数据处理和统计学分析

在每个部分中随机选择了 5 个放大倍率(200 倍)的部位,后人工统计肌纤维总数,计算每切片中靶抗体阳性肌纤维、坏死肌纤维和再生肌纤维的平均百分比;利用 Fiji 软件分析抗肌营养不良蛋白 2 免疫染色勾勒出的每条肌纤维的直径。变异系数的计算方法:变异系数 = $1000 \times \text{肌纤维最小直径的标准差} / \text{平均肌纤维最小直径}$ (Arouche-Delaperche et al., 2017)。坏死肌纤维可定义为圆形、苍白和/或透明化纤维,并伴有肌层完整性丧失/外观粗糙,并通过联合抗肌营养不良蛋白 2 免疫组织化学染色和伊红进行评估。CD56 阳性肌纤维被定义为肌纤维再生。束周区位于肌束外围的肌纤维区域(倒数两层),切片分析采用 Fiji 软件。

计量数据显示为中位数(四分位数间距)[$M(P_{25}, P_{75})$]以及均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$);分类变量用频率(n)和百分比(%)表示;采用 Shapiro-Wilk 检验、Anderson-Darling 检验、D'agostino 和 Pearson 检验、Kolmogorov-Smirnov 检验验证数据分布的正态性;采用 Kruskal-Wallis H 检验后进行事后 Dunn 检验或单向方差分析后进行 Bonferroni 校正,以确定 3 组比较是否存在显著差异。斯皮尔曼相关性被用来分析所有的相关性。使用 GraphPad Prism 8.01 软件进行统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 临床数据比较

受试者的临床特征和肌肉活检表现见表 1,纳入了 37 例诊断为 IMNM 的患者,包括 20 例抗 SRP 抗体患者、5 例抗 HMGCR 抗体患者和 12 例血清阴性患者;选取 14 例诊断为 DM 的患者,包括抗 MDA5($n=1$)、抗 Mi-4($n=4$)、抗 SAE1($n=4$)、抗 NXP2($n=3$)和抗 TIF- γ ($n=2$);纳入 6 例 ASS 患者,包括抗 Jo-1($n=5$)和抗 EJ 抗体($n=1$)阳性。与 DM 和 ASS 患者比较,IMNM 患者更可能是女性

表 1 各组临床数据比较

项目	对照组(<i>n</i> = 10)	IMNM 组(<i>n</i> = 37)	DM 组(<i>n</i> = 14)	ASS 组(<i>n</i> = 6)
年龄[<i>M</i> (<i>P</i> 25, <i>P</i> 75), 岁]	31(15, 42)	48(35, 54)	45(40, 55)	56(52, 60)
女[<i>n</i> (%)]	2(20)	27(73)	10(50)	3(50)
疾病持续时间[<i>M</i> (<i>P</i> 25, <i>P</i> 75), d]	2(1, 9)	5(2, 10)	4(2, 11)	8(3, 12)
MMT8[<i>M</i> (<i>P</i> 25, <i>P</i> 75)]	80(80, 80)	73(68, 75)	73(68, 78)	78(72, 80)
MSA 阳性[<i>n</i> (%)]	0	25(68)	20(100)	6(100)
MAA 阳性[<i>n</i> (%)]	2(20)	12(32)	6(30)	3(50)
CK[<i>M</i> (<i>P</i> 25, <i>P</i> 75), U/L]	67(57, 81)	2905(1729, 5331)	351(153, 1627)	3377(2310, 7528)
LDH(U/L)[<i>M</i> (<i>P</i> 25, <i>P</i> 75), U/L]	170(146, 204)	711(393, 839)	330(221, 631)	496(383, 1225)
病情[<i>n</i> (%)]				
散射性坏死	0	36(97)	12(60)	3(50)
散射再生	0	32(87)	12(60)	3(50)
束周肌纤维萎缩	0	0	9(45)	2(33)
束周肌纤维坏死	0	0	6(30)	2(33)
束周区域的肌纤维再生	0	0	8(40)	2(33)

(73%对 53%和 50%), IMNM 和 ASS 患者血清 CK 和 LDH 水平均高于 DM(CK:IMNM 患者 2905 (108~17100) U/L, ASS 患者 3377(498~12546) U/L, DM 患者 372(32~7063) U/L; LDH: IMNM 患者 711(140~2712) U/L, ASS 患者 496(255~1867) U/L, DM 患者 347(144~1370) U/L。IMNM 患者的病理特征为弥散性肌纤维坏死(97%)和肌纤维再生(87%)。20 例糖尿病患者中 45%表现为筋膜周围萎缩, 30%表现为筋膜周围坏死。2 例 ASS 患者表现为筋膜周围坏死和再生。1 例有抗 SAE1 和抗 EJ 抗体的患者病理表现主要为束周萎缩, 而非束周坏死, 该患者被分为 DM 组。

2.2 特发性炎症性肌病患者的肌肉样本中内质网应激诱导的自噬相关蛋白和基因的表达水平

探讨了内质网应激诱导的自噬途径相关蛋白在 IIM 活检骨骼肌中的表达水平, ER 伴侣蛋白 GRP78/BiP 触发 UPR, 加速积累的蛋白质折叠活性, 防止蛋白质聚集; 通过 Western blot 检测的 BiP 蛋白水平在 IMNM 和 DM 患者活检样本中与对照组样本比较显著升高, 在 ASS 患者活检样本中发现了 BiP 表达增加的趋势。Western blot 检测 UPR 经典信号通路的 2 个关键分子 JNK 和 eIF2α, 与对照组比较, IMNM 中 JNK 蛋白的相对表达水平显著上调, 而 p-JNK1 蛋白的相对表达水平未显著升高; DM 组和 ASS 组 JNK 和 P-JNK1 的表达水平与对照组比较, 均无明显差异。IMNM 患者活检标本中 eIF2α 表达水平升高, 而 DM 组和 ASS 组与对照组比较无显著差异。与对照组比较, IMNM 和 DM 中 p-EIF2α 蛋白表达水平上调, 而 ASS 组与对照组无明显差异。自噬体形成起始所需的蛋白 Beclin-1 水平在 IMNM, DM 和 ASS 患

者活检样本中升高, 自噬形成所需蛋白 ATG12 水平在 IMNM 和 DM 中显著上调。p62 是形成被自噬消除的蛋白质聚集体所需的蛋白质, 在 IMNM 患者中水平显著增高(*P* = 0.04)。

采用 RT-qPCR 检测内质网应激诱导自噬相关基因, 与 Western blot 检测一致; 与对照组比较, IMNM 和 DM 中 BiP 基因水平表达显著升高; 与对照组比较, 对照组和 ASS 的 BiP 水平没有显著差异。内质网应激反应基因(Er stress response gene, EDEM1)编码内质网应激时激活的内质网相关降解的主要成员, 在 IMNM, DM 和 ASS 患者的活检中发现其水平显著高于对照组, XBP1 通过诱导 EDEM 参与 ER 相关降解, XBP1 基因表达水平在 IMNM 标本中显著升高, 而对照组与 DM 或对照组与 ASS 均无显著差异。CHOP(内质膜应激诱导细胞凋亡的介质)在 DM 中水平显著升高, 与对照组比较, IMNM 或 ASS 中 CHOP 的表达没有显著增加。与对照组比较, IMNM 或 DM 患者的骨骼肌活检显示 ATG5 基因表达水平显著升高, 而对照组和 ASS 没有显著差异。ATG2B 也编码自噬体形成所需的蛋白质, 与对照组比较, 在 DM 中水平升高, 而在 IMNM 或 ASS 中没有表达。SQSTM1 编码 p62, 一种连接多泛素化蛋白与 LC3 的蛋白, 在 IMNM 或 ASS 的标本中没有明显差异调节, 但在 DM 中与对照组比较水平显著上调。线粒体自噬是 1 个自噬消除受损线粒体的过程, PINK1 和 BINP3 编码参与有丝分裂的蛋白, IMNM 组、DM 组和 ASS 组的 PINK1 基因水平均显著升高, DM 组 BINP3 表达水平上调。然而, 在 IMNM 患者中以及在任何一个 ASS 患者中 BINP3 的表达没有显著增加(表 2、图 1)。

表 2 特发性炎症性肌病患者的肌肉样本中内质网应激诱导的自噬相关蛋白和基因的表达水平($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	IMNM 组	DM 组	ASS 组	F	P
BIP	1.23 ± 0.32	3.46 ± 0.28*	3.89 ± 0.29*	1.86 ± 0.26	6.47	0.00
P-JNK1	1.34 ± 0.27	1.72 ± 0.22	1.81 ± 0.24	0.96 ± 0.29	0.47	0.43
JNK	1.27 ± 0.31	2.41 ± 0.22*	1.83 ± 0.39	1.06 ± 0.29	3.34	0.00
P-eIF2α	1.21 ± 0.29	2.47 ± 0.26*	2.59 ± 0.26*	1.46 ± 0.25	7.47	0.00
eIF2α	1.20 ± 0.31	2.36 ± 0.22*	2.56 ± 0.24*	1.36 ± 0.8	6.77	0.00
Beclin-1	1.20 ± 0.34	3.54 ± 0.28*	5.83 ± 0.29*	3.99 ± 0.21*	14.56	0.00
ATG12	1.43 ± 0.32	3.89 ± 0.22*	4.87 ± 0.28*	1.76 ± 0.22	8.41	0.00
P62	1.23 ± 0.21	2.48 ± 0.25*	2.33 ± 0.26	1.06 ± 0.28	3.68	0.02
BIP mRNA	1.09 ± 0.38	3.06 ± 0.29*	3.45 ± 0.28*	1.46 ± 0.29	6.49	0.00
EDEM1 mRNA	1.11 ± 0.23	3.74 ± 0.22*	4.85 ± 0.28*	6.06 ± 0.2*	9.47	0.00
XBP1 mRNA	1.23 ± 0.27	2.78 ± 0.26*	1.53 ± 0.32	1.58 ± 0.24	3.45	0.03
CHOP mRNA	1.14 ± 0.25	1.48 ± 0.25*	1.99 ± 0.21	1.46 ± 0.22	4.43	0.00
ATG5 mRNA	1.15 ± 0.28	2.67 ± 0.21*	2.88 ± 0.31*	1.36 ± 0.23	7.71	0.00
ATG2B mRNA	1.26 ± 0.25	1.54 ± 0.23	2.49 ± 0.23*	1.46 ± 0.21	4.56	0.01
SQSTM1 mRNA	1.03 ± 0.22	1.96 ± 0.22*	1.67 ± 0.24	1.56 ± 0.21	3.49	0.02
PINK1 mRNA	1.01 ± 0.21	2.49 ± 0.22*	2.58 ± 0.24*	3.06 ± 0.28*	8.64	0.00
BNP3 mRNA	1.04 ± 0.26	1.42 ± 0.22	2.08 ± 0.21*	1.46 ± 0.22	3.64	0.03

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

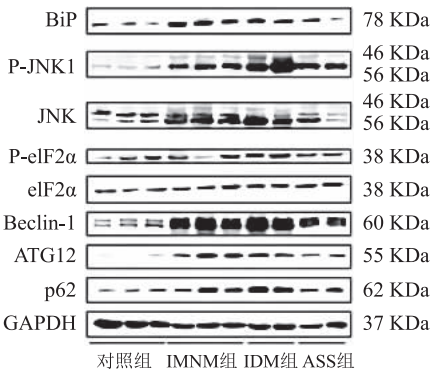


图 1 蛋白印迹检测特发性炎症性肌病患者的肌肉样本中内质网应激诱导的自噬相关蛋白和基因的表达水平

2.3 患者中 BiP, p62, LC3 和溶酶体相关膜蛋白 2 (Lysosome associated membrane protein 2, LAMP2) 表达水平

IIM 患者的 BiP 肌浆免疫染色相对较强,对照组骨骼肌中未观察到 BiP 肌浆免疫染色阳性,IMNM 活检肌肉中 BiP 染色呈弥散性或散在性,而 DM 和 ASS 伴筋膜周围损伤时 BiP 阳性染色主要分布在筋膜周围区,在 IMNM 中观察到 p62, LC3(抗体识别 LC3I 和-II)和 LAMP2 的弥漫性细而均匀的肌浆染色。在 DM 和 ASS 伴筋膜周围损伤的骨骼肌活检中点状

p62,LC3 和 LAMP2 的分布主要局限于筋膜周围区域。对照组标本一致显示其肌浆无阳性染色;IMNM 骨骼肌中 BiP 阳性肌纤维百分比显著升高($P < 0.0001$),而对照组与 DM 或 ASS 的 BiP 水平无明显升高。IMNM 中 p62 和 lc3 阳性肌纤维百分比显著升高,而与对照组比较,DM 中未检测到显著增高。在 IMNM 患者中发现 LAMP2 阳性肌纤维百分比升高。此外,与 DM 患者比较,IMNM 患者的 BiP, p62 和 LC3 的肌浆染色水平显著升高。通过透射电镜在 IIM 肌肉组织中检测到溶酶体中含有碎片和非特异性颗粒物质的液泡(表 3、图 2)。

2.4 肌浆 BiP 表达水平与特发性炎性肌病的自身溶酶体积累和失调过程相关

组织学切片显示 LAMP2 阳性肌纤维分布在单个 BIP 阳性肌纤维中,肌浆 BiP 表达的百分比与 IMNM($r = 0.9, P < 0.0001$), DM($r = 0.9, P < 0.0001$)和 ASS($r = 0.9, P = 0.02$)中溶酶体标记物 LAMP2 阳性肌纤维的百分比密切相关。IMNM 中 BiP 表达水平与 p62、LC3 表达水平密切相关($r = 0.4, P = 0.01$; $r = 0.4, P = 0.01$)。在 DM 活检肌肉中 BiP 和 LC3 的表达百分比存在显著相关性(r

表 3 患者中 BiP, p62, LC3 和溶酶体相关膜蛋白 2(LAMP2)表达水平($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	IMNM 组	DM 组	ASS 组	F	P
BIP	1.03 ± 0.22	11.42 ± 0.38*	4.23 ± 0.22*	1.46 ± 0.24	15.47	0.00
P26	1.31 ± 0.25	7.72 ± 0.28*	3.31 ± 0.21*	1.66 ± 0.29	7.43	0.00
LC3	1.21 ± 0.30	6.47 ± 0.24*	3.85 ± 0.31*	1.46 ± 0.26	5.37	0.01
LAMP2	1.21 ± 0.29	4.45 ± 0.27*	1.59 ± 0.25	1.26 ± 0.21	3.45	0.00

注：与对照组比较，* $P < 0.05$

= 0.6, $P = 0.002$),而在 DM 中 BiP 和 p62 的表达水平没有相关性。在 ASS 中 BiP 表达水平与 p62 水平有很强的相关性($r = 1.0, P = 0.006$),而 BiP

与 LC3 表达水平没有相关性,即内质网应激可能是 IIM 中自溶酶体积累和失调的重要触发因素(图 3)。

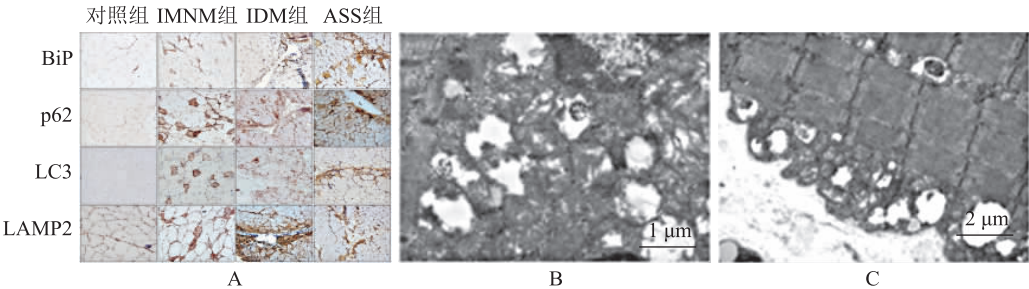


图 2 患者中 BiP,p62,LC3 和溶酶体相关膜蛋白 2(LAMP2)表达水平 A 为来自对照受试者的肌肉组织显示无阳性染色,而来自 IMNM 患者的活检肌肉中有分散的 BiP,p62,LC3 和 LAMP2 阳性染色;DM 患者和 ASS 患者的这些分子阳性染色分布主要在囊泡周围区域($\times 200$ 倍);B,C 为透射电子显微镜(Transmission electron microscope,TEM)显示溶酶体弥漫性分布含有碎片和非特异性颗粒物质

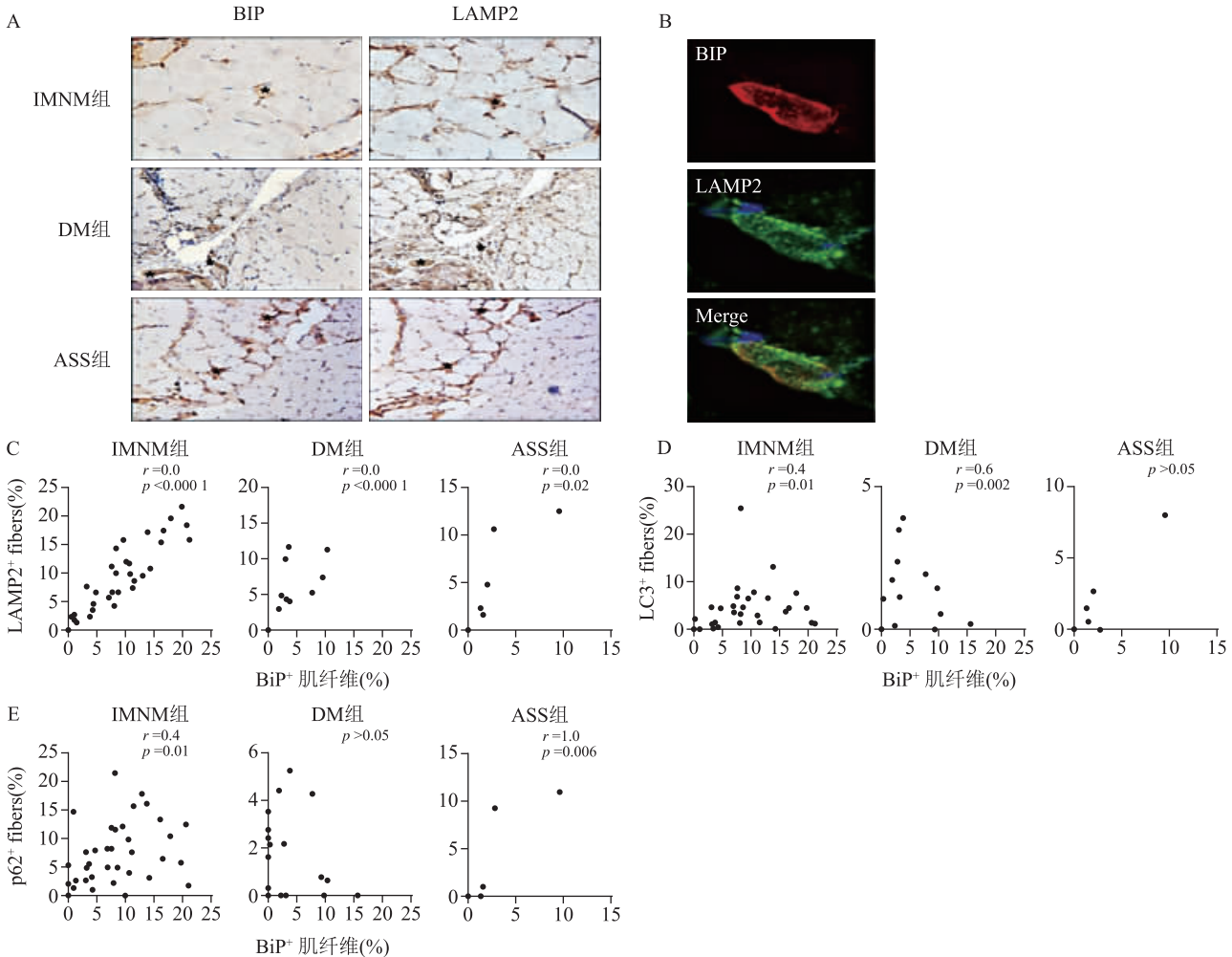


图 3 肌浆 BiP 表达水平与特发性炎症性肌病的自身溶酶体积累和失调过程相关 A 为 IMNM 患者、DM 患者和 ASS 患者的连续切片显示部分 BIP 阳性肌纤维 LAMP2 染色阳性(示例*)($\times 200$ 倍);B 为 IMNM 患者的双 IF 染色显示同一肌纤维中有 BiP 和 LAMP2 的染色(标尺 = 50 μm);C 为 IMNM,DM 和 ASS 患者中 LAMP2 阳性百分比与肌浆 BiP 表达水平的关系;D 为 IMNM,DM 和 ASS 患者肌肉组织中 BiP 和 LC3 阳性表达百分比的关联;E 为 IMNM,DM 和 ASS 患者骨骼肌切片中 BiP 和 p62 表达水平的相关性

2.5 肌浆 BiP 表达水平与特发性炎性肌病的肌纤维萎缩相关

组织学切片显示许多 MuRF1 阳性肌纤维分布在 BiP 阳性肌纤维中,IMNM 和 DM 患者肌肉活检显示 BiP 表达水平与 MuRF1 表达水平强烈相关($r = 0.7, P < 0.0001$; $r = 0.8, P < 0.0001$)。同样,在 IMNM($r = 0.8, P < 0.0001$)和 DM($r = 0.8, P < 0.0001$)患者中 BiP 表达百分比与 MAFbx 水平显著相关。在 ASS 患者中 BiP 与 MuRF1, BiP 与 MAFbx 的表达水平无显著相关性。变异系数与

BiP 在 IMNM 患者中的表达水平密切相关($r = 0.5, P < 0.0001$),而在 ASS 患者中无显著相关性,在 DM 患者中变异系数与 BiP 表达水平也存在相关性($r = 0.6, P = 0.01$)。即内质网应激可能在 IIM 患者骨骼肌萎缩中起重要作用,特别是在 IMNM 和 DM 患者中(图 4)。

2.6 肌浆 BiP 表达水平与特发性炎性肌病的肌纤维坏死和再生相关

在 IMNM,DM 和 ASS 患者中大量坏死细胞显示强烈的 BiP 阳性染色,在 IMNM($r = 0.6, P <$

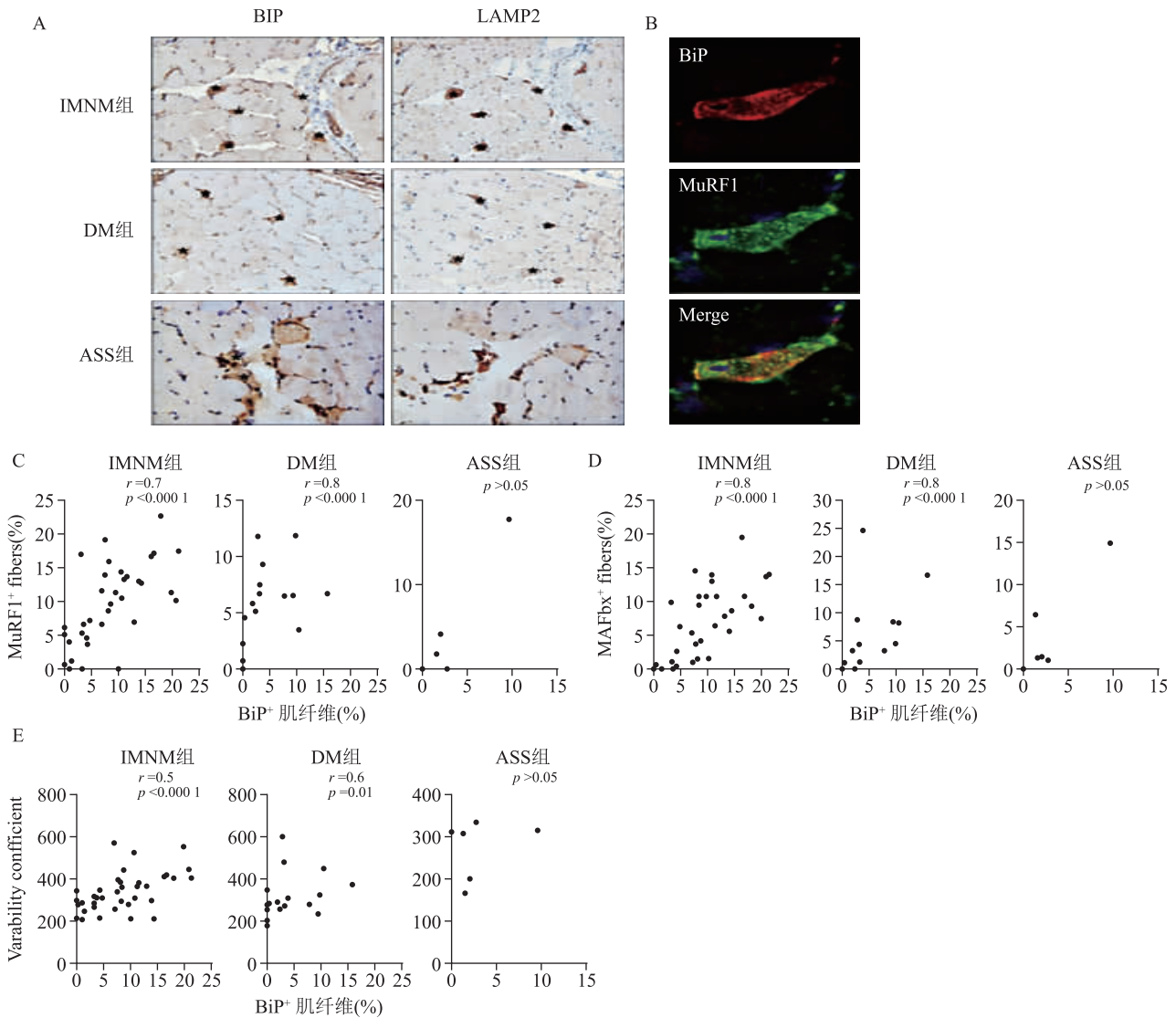


图 4 肌浆 BiP 表达水平与特发性炎性肌病的肌纤维萎缩相关 A 为 IMNM,DM 和 ASS 患者肌肉的 BiP 染色显示这些细胞异常阳性(示例 *);这些细胞肌无指蛋白-1(Muscle ring finger protein-1, MuRF1)阳性($\times 200$ 倍);B 为免疫荧光技术(Immunofluorescence, IF)染色显示 IMNM 患者同一肌纤维中 BiP 和 MuRF1 的染色(标尺 = $50 \mu\text{m}$);C 为 IMNM,DM 和 ASS 患者肌肉组织中 BiP 阳性百分比与肌浆 MuRF1 表达水平的关系;D 为 IMNM,DM 和 ASS 患者肌肉活检中 BiP 表达水平与肌浆性萎缩 F-box(MAFbx)表达水平的关系;E 为 IMNM,DM 和 ASS 患者骨骼肌切片中 BiP 表达水平与变异系数的相关性

0.0001)和DM($r=0.8,P<0.0001$)患者中BiP表达水平与坏死细胞百分比密切相关。ASS患者中肌坏死比例与BiP表达水平呈无明显相关趋势($r=0.8,P=0.06$)。从IMNM和DM患者中活检的一些再生肌纤维的BiP染色呈阳性。在IMNM($r=0.7,P<0.0001$)和DM($r=0.8,P=0.003$)患者中BiP的表达水平与CD56阳性纤维作为再生纤维的比例显著相关。虽然在ASS患者肌肉切片中有少数再生肌纤维的BiP呈阳性(图5),但在ASS患者肌肉中没有发现它们之间的显著关系(图5)。在IIM患者肌肉活检中只有偶尔在相对正常的肌纤维中发现BiP阳性。即内质网应激可能参与了IMNM和DM患者的肌坏死和肌纤维再生的病理过程

(图5)。

2.7 BiP 的表达水平与免疫介导的坏死性肌病的肌无力相关

IMNM患者血清LDH水平与BiP表达水平呈弱正相关($r=0.3,P=0.045$)(图6)。同样,在IMNM患者肌肉活检中BiP表达水平与MMT-8评分呈负相关($r=-0.3,P=0.049$)(图6)。血清CK水平与IMNM患者中BiP阳性肌纤维百分比没有关联(图6)。DM或ASS患者血清CK和LDH水平、MMT-8评分和BiP表达水平无显著相关性(图6)。

3 讨论

自身免疫和炎症反应在很大程度上促进了IIM

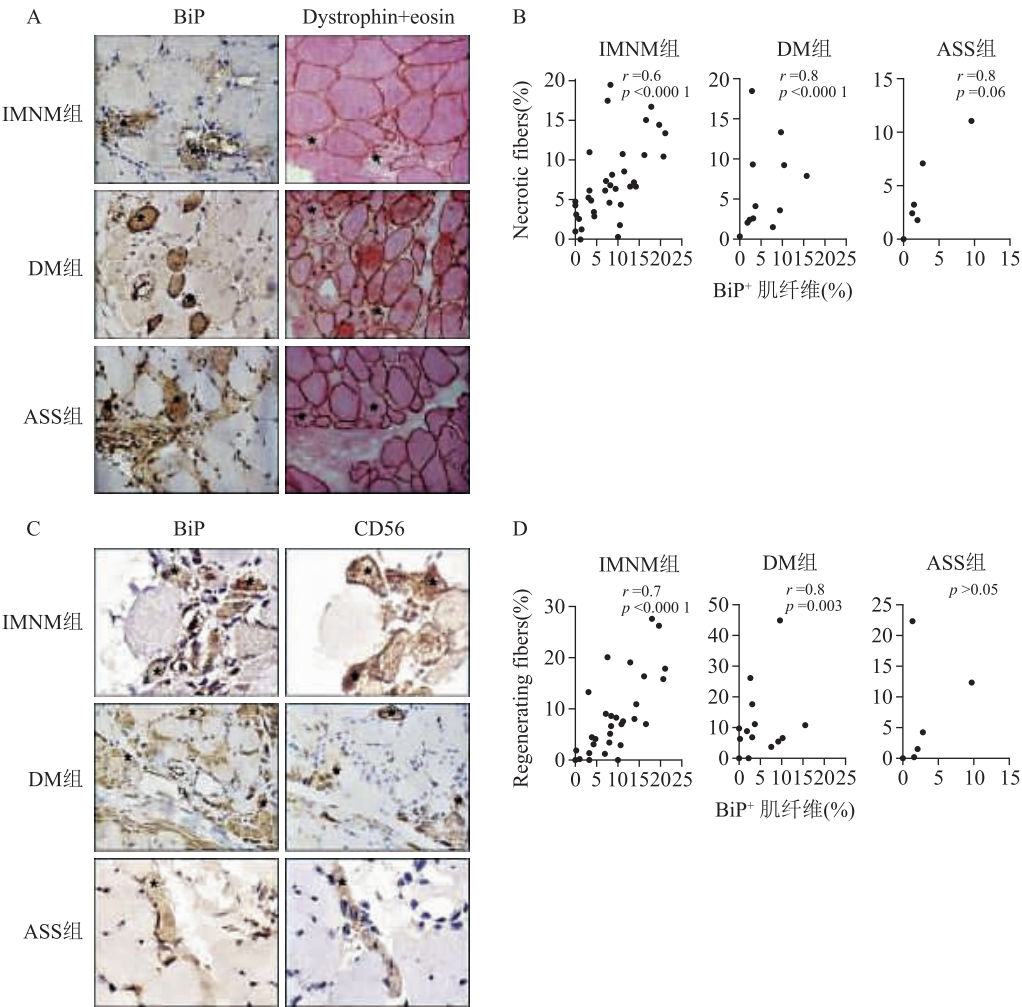


图5 肌浆 BiP 表达水平与特发性炎性肌病的肌纤维坏死和再生相关 A 为 IMNM,DM 和 ASS 患者肌肉切片的肌营养不良蛋白联合伊红染色显示大量坏死纤维(示例*);这些纤维呈 BiP 染色(×400 倍);B 为 IMNM,DM 和 ASS 患者中坏死肌纤维和 BiP 阳性肌纤维百分比的关系;C 为 1 例 IMNM 患者、1 例 DM 患者和 1 例 ASS 患者的 Ncam 阳性肌纤维显示 BiP 染色阳性(示例*)(IMNM,ASS×400 倍),(DM×200 倍);D 为 IMNM,DM 和 ASS 患者肌肉组织中 BiP 表达水平与肌纤维再生百分比的相关性

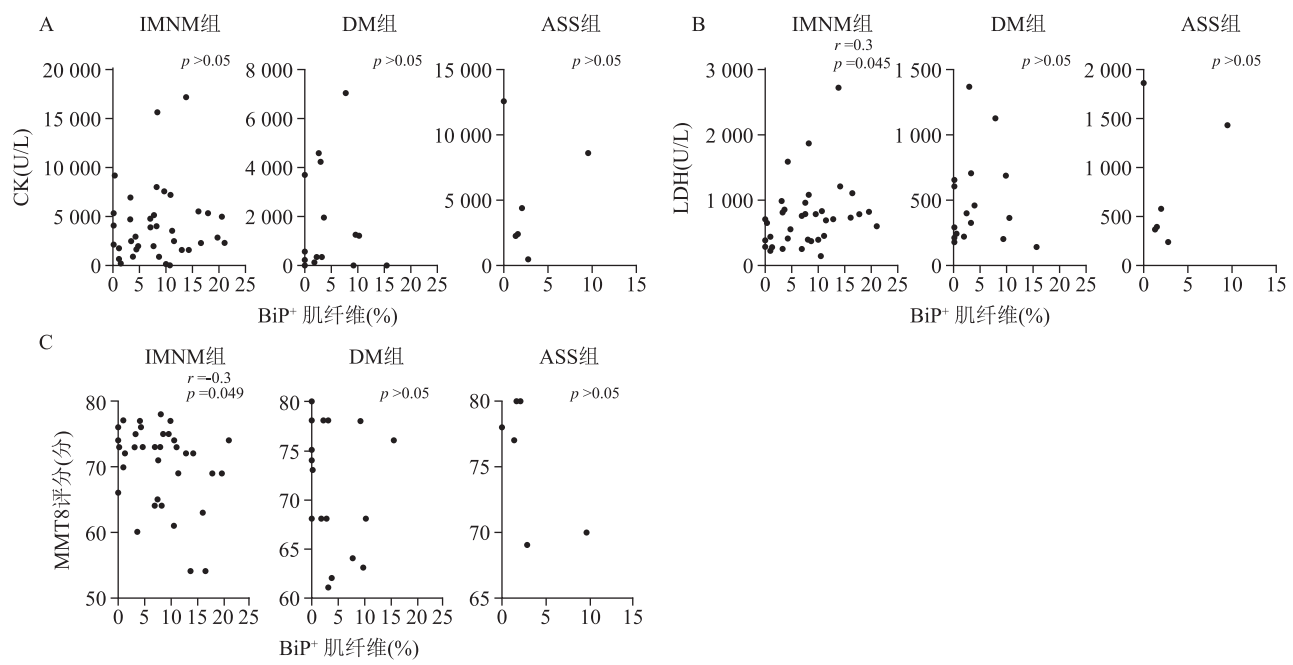


图 6 BiP 的表达水平与免疫介导的坏死性肌病的肌无力相关 A 为 IMNM($n=37$),DM($n=14$)和 ASS($n=6$)患者肌肉组织中 BiP 阳性染色百分比与血清肌酸磷酸激酶(CK)水平的关系;B 为 IMNM($n=37$),DM($n=14$)和 ASS($n=6$)患者肌肉切片中 BiP 表达水平与血清乳酸脱氢酶(LDH)水平的关系;C 为 IMNM($n=37$),DM($n=14$)和 ASS($n=6$)患者 BiP 表达水平与手工肌肉测试(MMT-8)评分的相关性

的发病机制,目前对 IIM 病理生理的研究主要集中在免疫和炎症反应如自身抗体、补体、细胞因子、炎症细胞、干扰素信号以及肌纤维上主要组织相容性复合体 I 类的水平上调^[6]。先前的研究表明了多发性肌炎和 DM 中内质网应激反应激活,但内质网应激的功能作用仍然知之甚少^[7]。本研究结果提示内质网应激介导的自噬激活有可能参与 IIM,还发现内质网应激与 IIM 活检肌肉从破坏到恢复的多种生理和病理过程密切相关。此外,内质网应激与 IMNM 中的肌肉无力相关。

有研究表明内质网应激和未折叠的蛋白反应途径的激活可能导致 sIBM 自噬受损,在 IMNM 中描述了伴侣辅助选择性自噬的参与^[8]。本研究结果进一步证实内质网应激介导的自噬激活可能参与了 IMNM。SRP 和 HMGCR 蛋白都位于内质网,这些循环抗体如何与细胞内靶标结合的机制尚不清楚;据报道内质网中的分子伴侣钙连蛋白在多种细胞表面表达如肥大细胞瘤细胞、小鼠脾细胞、成纤维细胞和人 HeLa 细胞^[9]。据推测,血清阳性 IMNM 中的抗原-抗体复合物可能靶向蛋白质翻译结构,作为内质网的潜在直接应激源诱导自噬。本研究结果显示内质网应激反应也可能在 DM 和 ASS 的自噬诱导中发挥作用,尽管 BiP 和自噬溶酶体标志物 LC3,

p62 和 LAMP2 在 DM 和 ASS 中的表达水平低于 IMNM,在肌束周围损伤的 DM 和 ASS 中这些分子主要在肌束周围表达,这种现象与 DM 和 ASS 的关键病理特征一致^[10]。先前的研究表明,DM 的束周萎缩与 1 型干扰素相关通路的激活显著相关,推测内质网应激诱导的 DM 自噬可能与 1 型干扰素诱导基因的水平上调有关。缺氧相关的机制可能是导致 ASS 内质网应激的原因,因为 ASS 的血管周坏死可能归因于血管病变,抗合成酶抗体可能通过阻断转移 RNA 合成来促进自噬^[11]。

越来越多的证据表明内质网应激在骨骼肌重塑中的复杂功能特性。本研究结果表明内质网应激在 IMNM 中具有有害作用,肌浆中的表达水平与肌坏死、肌纤维萎缩和临床疾病活动相关。这与有证据表明内质网应激和 UPR 通路的激活在许多情况下导致骨骼肌萎缩一致。先前的研究表明,抗 SRP 和抗 HMGCR 抗体的致病作用导致纤维萎缩和肌肉再生障碍^[12]。因此,假设抗 SRP 和抗 HMGCR 抗体作为触发器,在血清阳性 IMNM 中通过内质网应激诱导的自噬导致肌纤维萎缩。

肌纤维内质网应激的积累与 IIM 中主要组织相容性复合体 I 类的过度表达共分布,可在肌炎小鼠模型中触发内质网应激。本研究中 BiP 表达水平

与肌坏死呈正相关,可能与肌膜上主要组织相容性复合物 I 类水平上调有关。此外,内质网应激在一定刺激下可增加肿瘤坏死因子及其他炎性细胞因子的表达,这些细胞因子可能会引起永久性肌肉损伤的细胞溶解,反之这些细胞因子从坏死细胞释放本身会引起内质网应激^[13]。内质网应激诱导的细胞凋亡介质 CHOP 的基因和蛋白水平没有上调,并且在 IMNM 肌肉活检中与细胞凋亡相关的分子切割-Caspase 3 蛋白水平也没有升高,这表明内质网应激诱导的细胞凋亡可能在 IMNM 的发病机制中没有明显作用;另一方面,本研究结果表明内质网应激与肌纤维再生等有益过程有关。先前有研究表明,在神经退行性疾病中轻度内质网应激通过促进自噬来抑制 Caspase 的激活和凋亡;在成人骨骼肌组织中低水平的内质网应激可能有利于维持再生肌生成的卫星细胞池^[14]。因此,在 IMNM 和 DM 患者骨骼肌中观察到 BiP 和 CD56 表达水平的显著关联是可以解释的。在考虑针对内质网应激途径的治疗干预之前显然需要进一步评估内质网应激在调节 IIM 疾病进展中的多重作用以及再生肌纤维的确切作用。这项研究有几个局限性:首先,本研究本质上是观察性和描述性的,支撑相关性的复杂机制无法确定;其次,考虑到单个临床中心的样本量相对较小,需要在多个临床中心的更多受试者上进一步证实。

综上所述,本研究评估了 IIM 亚组中 BiP 的表达水平,ER 应激诱导的自噬途径在 IMNM,DM 和 ASS 患者的活检肌肉中被激活,ER 伴侣蛋白、骨骼肌中的葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)/BiP 表达水平与 IMNM 中的自噬、肌纤维萎缩、肌坏死、肌层再生和疾病活动度相关。这些重要的发现可能促进内质网应激诱导自噬标志物的表达在自身免疫性肌肉疾病中的作用过程和机制。

参 考 文 献

[1] Oldroyd AGS, Lilleker JB, Amin T, et al. British society for

rheumatology guideline on management of paediatric, adolescent and adult patients with idiopathic inflammatory myopathy [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2022, 61(5): 1760-1768.

[2] Fujisawa T. Management of myositis-associated interstitial lung disease[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(4): 347.

[3] Di Conza G, Ho PC. ER stress responses; an emerging modulator for innate immunity[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 695.

[4] Ma X, Bu BT. Anti-SRP immune-mediated necrotizing myopathy; a critical review of current concepts[Z], 2022: 1019972.

[5] Acosta I, Matamala JM, Jara P, et al. Miopatías inflamatorias idiopáticas: una mirada actualizada al diagnóstico y el manejo (Idiopathic inflammatory myopathies. A review) [J]. *Rev Med Chil*, 2019, 147(3): 342-355.

[6] Zarrin AA, Bao K, Lupardus P, et al. Kinase inhibition in autoimmunity and inflammation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(1): 39-63.

[7] Snedden AM, Kellett KAB, Lilleker JB, et al. The role of protein aggregation in the pathogenesis of inclusion body myositis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2022, 40(2): 414-424.

[8] Preusse C, Marteau T, Fischer N, et al. Endoplasmic reticulum-stress and unfolded protein response-activation in immune-mediated necrotizing myopathy [J]. *Brain Pathol*, 2022, 32(6): e13084.

[9] Weeding E, Tiniakou E. Therapeutic management of immune-mediated necrotizing myositis[J]. *Curr Treatm Opt Rheumatol*, 2021, 7(2): 150-160.

[10] Fischer N, Preuße C, Radke J, et al. Sequestosome-1 (p62) expression reveals chaperone-assisted selective autophagy in immune-mediated necrotizing myopathies [J]. *Brain Pathology*, 2020, 30(2): 261-271.

[11] Qiu R, Wang Z, Wei X, et al. The pathogenesis of anti-signal recognition particle necrotizing myopathy; a review[Z], 2022: 113936.

[12] Khan N, Kazmi Z. A rare case of Anti-HMGCR and Anti-SRP-positive immune-mediated necrotizing myopathy[J]. *Qatar Med J*. 2022 Feb 22; 2022(1): 6.

[13] Rellmann Y, Eidhof E, Dreier R. Review: ER stress-induced cell death in osteoarthritic cartilage[Z], 2021: 109880.

[14] Han XJ, Goh KY, Lee WX, et al. The importance of mTORC1-autophagy axis for skeletal muscle diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 297.

(2023-07-13 收稿)