

补体经典途径在泪腺良性淋巴上皮病变发生中的作用

靳雨月^{1*}, 柳睿^{2*}, 李静², 陈圆圆¹, 马倩南¹, 马建民², 丁怡¹

引用:靳雨月,柳睿,李静,等.补体经典途径在泪腺良性淋巴上皮病变发生中的作用.国际眼科杂志 2022;22(11):1776-1781

基金项目:北京市自然科学基金项目(No.7222025);北京市医院管理中心“登峰”人才培养计划项目(No.DFL20190201)

作者单位:¹(261042)中国山东省潍坊市,潍坊医学院;
²(100730)中国北京市,首都医科大学附属北京同仁医院北京同仁眼科中心北京市眼科研究所眼科学与视觉科学北京市重点实验室

*:靳雨月和柳睿对本文贡献一致。

作者简介:靳雨月,毕业于潍坊医学院,硕士,研究方向:眼科学;柳睿,博士研究生,研究方向:眼科学。

通讯作者:马建民,毕业于首都医科大学,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:眼肿瘤、眼眶病。jmma@sina.com

收稿日期:2022-06-16 修回日期:2022-10-10

摘要

目的:分析补体系统(CS)及其经典途径在泪腺良性淋巴上皮病变(LGBLEL)发病机制中的作用。

方法:采集LGBLEL患者和眼眶海绵状血管瘤(CH)患者的病变组织标本,使用蛋白质组学方法分析差异蛋白,而后采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫组织化学染色(IHC)和蛋白质印迹法(Western Blotting)验证CS信号通路中差异蛋白表达的变化,明确其在LGBLEL发病机制中的作用。

结果:蛋白质组学分析结果表明,相对于眼眶CH患者,LGBLEL患者病变泪腺组织中CS信号通路重要蛋白C3、C5、C9、C1q等表达均发生改变;RT-PCR检测结果显示,与眼眶CH患者相比,LGBLEL患者病变泪腺组织中C1qA、C5、C9 mRNA表达升高;免疫组织化学染色结果显示,与眼眶CH患者相比,LGBLEL患者病变泪腺组织中C1qA、C3、C5、C9表达明显增多;Western Blotting检测结果显示,与眼眶CH患者相比,LGBLEL患者病变泪腺组织中C1qA、C3、C9蛋白表达水平明显升高。

结论:CS参与LGBLEL的发病机制,其经典途径可能是其发挥作用的途径之一。

关键词:泪腺;良性淋巴上皮病变;补体信号通路;经典途径;发病机制

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.11.03

Study on the role of classical complement pathway in the development of benign lymphoepithelial lesions of lacrimal gland

Yu-Yue Jin^{1*}, Rui Liu^{2*}, Jing Li², Yuan-Yuan Chen¹, Qian-Nan Ma¹, Jian-Min Ma², Yi Ding¹

Foundation items: Natural Science Foundation of Beijing (No. 7222025); Beijing Hospitals Authority Ascent Plan (No.

DFL20190201)

¹Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China; ²Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University; Beijing Tongren Eye Center; Beijing Institute of Ophthalmology; Beijing Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Beijing 100730, China

* Co-first authors: Yu-Yue Jin and Rui Liu

Correspondence to: Jian-Min Ma. Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University; Beijing Tongren Eye Center; Beijing Institute of Ophthalmology; Beijing Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Beijing 100730, China. jmma@sina.com

Received: 2022-06-16 Accepted: 2022-10-10

Abstract

• AIM: To analyze the role of complement system (CS) and its classical pathway in the pathogenesis of lacrimal gland benign lymphoepithelial lesions (LGBLEL).

• METHODS: The tissues of patients with LGBLEL or orbital cavernous hemangioma (CH) were collected. Proteomics analysis was used for the identification of different proteins. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemical staining (IHC) and Western Blotting were employed to verify the changes of the differential proteins in CS signal pathway, in order to identify its role in the pathogenesis of LGBLEL.

• RESULTS: The results of proteomic analysis showed that the expression levels of proteins C3, C5, C9 and C1q in CS signal pathway in the lacrimal gland tissues of LGBLEL patients were all changed compared with those of orbital CH patients. The results of RT-PCR showed that the mRNA expression levels of C1qA, C5 and C9 in patients with LGBLEL were significantly higher than those patients with orbital CH. The results of IHC showed that the expression levels of C1qA, C3, C5 and C9 were significantly increased in patients with LGBLEL compared with those patients with orbital CH. The results of Western Blotting showed that the protein expression levels of C1qA, C3, and C9 were significantly increased in patients with LGBLEL compared with those patients with orbital CH.

• CONCLUSION: The CS has been shown to participate in the pathogenesis of LGBLEL and its classical pathway may be one of the pathways which plays a role.

• KEYWORDS: lacrimal gland; benign lymphoepithelial lesions; complement signaling pathway; classical pathway; pathogenesis

Citation: Jin YY, Liu R, Li J, et al. Study on the role of classical complement pathway in the development of benign lymphoepithelial lesions of lacrimal gland. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022; 22(11):1776-1781

0 引言

泪腺良性淋巴上皮病变 (lacrimonasal gland benign lymphoepithelial lesions, LGBLEL) 是一种慢性炎症性病变, 主要临床表现为双侧泪腺无痛性肿大伴眼睑肿胀^[1-2]。近年来, 医学上对“IgG4 相关性疾病” (immunoglobulin G4-related disease, IgG4-RD) 概念的认识逐渐深入, 部分学者关注到 IgG4 表达水平与 LGBLEL 发病机制有关, 且 LGBLEL 的病理学表现和 IgG4 相关性眼病 (immunoglobulin G4-related ophthalmic disease, IgG4-ROD) 具有相似性, 均表现为病变组织中淋巴细胞和浆细胞弥漫性浸润、纤维组织增生等, 因此认为 IgG4 阳性表达的 LGBLEL 属于 IgG4-RD 的范畴^[3-4]。

补体系统 (complement system, CS) 是先天性和适应性免疫系统的重要组成部分, 其在各种疾病中起着重要作用, 如炎症、自身免疫性疾病和免疫缺陷性疾病等, 被认为是无菌性慢性炎症性病变的关键因素^[5-6]。根据激活物的不同, CS 的激活途径可分为经典途径、甘露糖结合凝集素途径 (MBL 途径) 和旁路途径三种^[7]。研究发现, CS 和 IgG4-RD 的发生有关。IgG 可通过经典途径激活补体 C3, 并启动扩增和激活下游补体 C5~C9; IgG4 可通过旁路途径直接激活补体 C3, 再依次激活下游补体 C5~C9, 最终发挥免疫调节作用^[8-9]。经典途径的激活需要 C1q 的参与, 而三种途径激活后均需要 C3 及 C5~C9 的参与^[10]。

目前关于 CS 和 LGBLEL 的相关研究较少, 二者是否存在关联, 以及存在怎样的关联仍在探索中。Li 等^[11]通过转录组测序分析了 CS 在 LGBLEL 发病机制中的作用, 初步揭示了 CS 与 LGBLEL 发病之间可能存在的关系。本研究先采用蛋白质组学技术对 LGBLEL 的病变泪腺标本进行检测, 并在此基础上使用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)、免疫组织化学染色和 Western Blotting 检测等方法进一步验证, 探讨 CS 及其经典途径在 LGBLEL 发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 采集 2010-07/2013-10 于首都医科大学附属北京同仁医院经病理组织学检查明确诊断的 LGBLEL 患者 6 例 (LGBLEL 组) 和眼眶海绵状血管瘤 (cavernous hemangioma, CH) 患者 6 例 (CH 组) 的病变组织标本进行蛋白质组学分析, 其中 LGBLEL 患者男女性别构成为 1:5, 年龄 28~64 (中位数 38.5) 岁; CH 患者男女性别构成为 1:2, 年龄 31~55 (中位数 51.5) 岁。另采集 2018-10/2019-08 于首都医科大学附属北京同仁医院经病理组织学检查明确诊断的 LGBLEL 患者 4 例和眼眶 CH 患者 3 例的病变组织标本进行验证实验, 其中 LGBLEL 患者男女性别构成为 1:3, 年龄 45~50 (中位数 46.0) 岁; 眼眶 CH 患者男女性别构成为 2:1, 年龄 45~53 (中位数 48.0) 岁。本研究获得伦理委员会审核批准 (No. TRECKY2013-KS-05), 所有患者完全理解本研究的目的, 并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 病变组织标本采集 LGBLEL 和眼眶 CH 的病变组织标本由临床医师在术中进行采集, 迅速转移至标准化实验室处理备用。病变组织标本一部分冷冻保存备用, 另一部分浸泡于 10% 福尔马林用于石蜡包埋和切片。

1.2.2 蛋白质组学分析 RIPA 法提取组织中蛋白质, 检测蛋白质浓度、总量和均一性, 质检合格后使用 Q Exactive 质谱仪 (Thermo Scientific 公司) 进行二级质谱鉴定和蛋白定量。实验过程具体按照 TMT[®] Mass Tagging Kits and Reagents 试剂盒 (Pierce 公司) 和 iTRAQ[™] Reagents 试剂盒 (AB Sciex 公司) 说明书进行样品处理和标记, 混合标记后的样品用于 C18 柱分级。将样品充分溶解后上样到液质联用仪, 进行二级质谱测序, 生成原始文件并进行分析。

1.2.3 RT-PCR 检测 剪碎组织加入裂解液, 提取 RNA。设计 PCR 引物, 按照 PCR 试剂盒 (AQ131-01; 全式金) 说明书进行操作, 采用反转录法合成总 RNA 的 cDNA, 并将其作为模板进行 RT-PCR。PCR 反应条件为: 95℃/3min; 95℃/30s; 55℃/20s; 72℃/20s; 40 个循环, 以 GAPDH 作为内参。引物序列见表 1。

1.2.4 免疫组织化学染色 组织切片常规脱蜡入水, H₂O₂ 室温孵育消除内源性过氧化物酶, 4℃ 条件下一抗 (1:100) 孵育过夜, 37℃ 二抗孵育 30min, DAB 染色, 苏木精染色, 封片, 显微镜下观察。CS 信号通路相关蛋白一抗: C3 (DF13224; Affinity Biosciences)、C5 (DF7719; Affinity Biosciences)、C9 (DF3964; Affinity Biosciences)、C1qA (ab76425; Abcam)。

1.2.5 Western Blotting 检测 组织加入裂解液后离心, 提取蛋白并测定浓度。制备电泳凝胶, 将蛋白样品与 5× loading buffer 混合后于 100℃ 处理 5min, 每孔上样 100μg 总蛋白, 常规电泳、转膜、抗体 (一抗工作浓度: 1:500) 孵育, 最后使用 ECL 显色系统进行免疫印迹显色。CS 信号通路相关蛋白一抗: C3 (DF13224; Affinity Biosciences)、C5 (DF7719; Affinity Biosciences)、C9 (DF3964; Affinity Biosciences)、C1qA (ab76425; Abcam)。

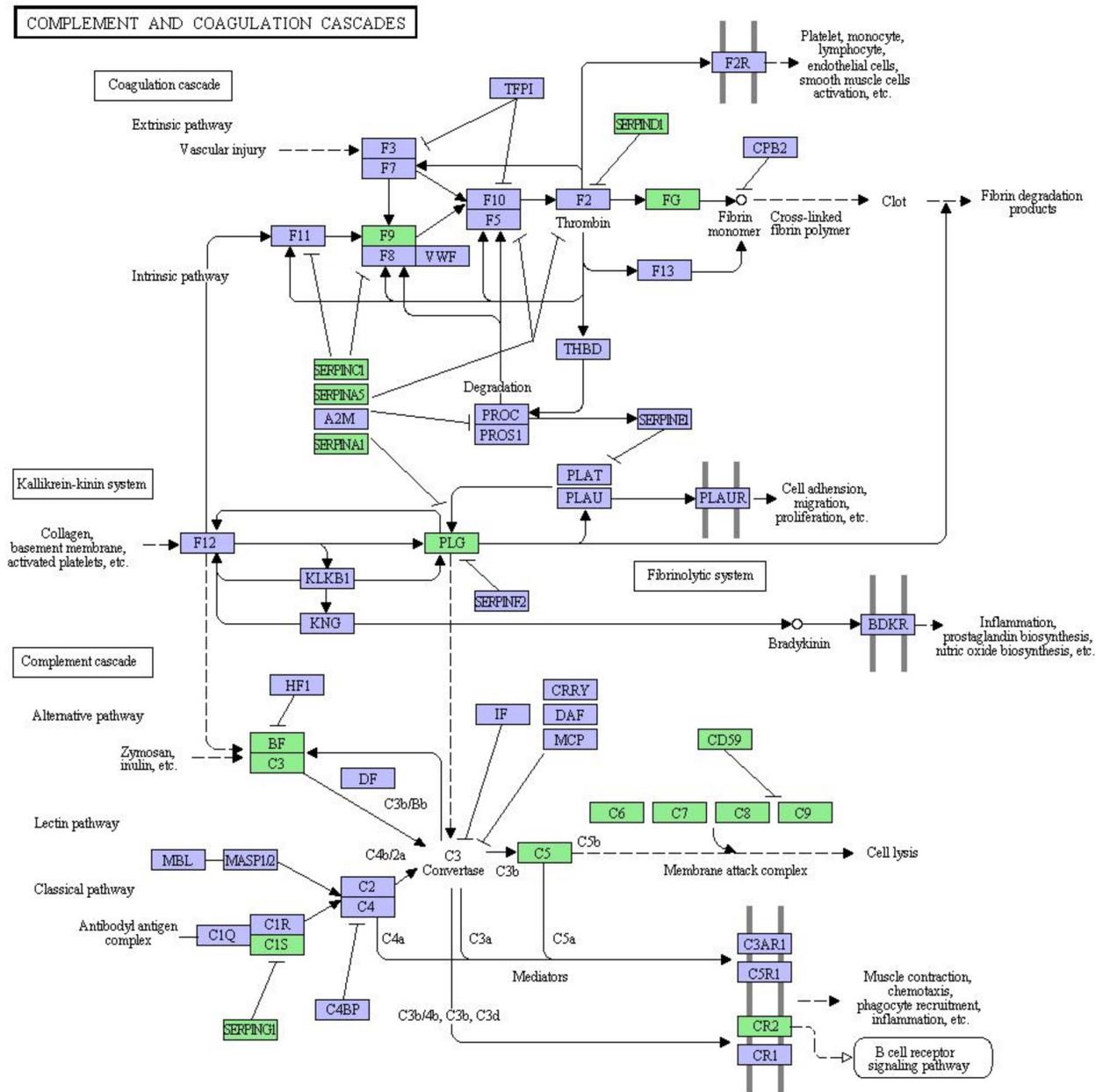
统计学分析: 使用 SPSS 25.0 软件和 Graphpad prism 8 软件进行统计分析和制图。计量资料的组间差异比较采用独立样本 *t* 检验 (其中 CH 患者病变组织中 C3 mRNA 表达水平的检测结果不符合正态分布, 采用 Mann-Whitney *U* 检验进行分析)。*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白质组学分析差异性蛋白表达 蛋白质组学分析结果表明, 相对于眼眶 CH 患者, LGBLEL 患者病变泪腺组织中 CS 信号通路重要蛋白 C3、C5、C9、C1q 等表达均发生改变 (图 1), 提示 CS 信号通路在 LGBLEL 组织中表达具有差异。

表 1 RT-PCR 引物序列

| 基因 | 引物序列 (5'-3') |
|-------|--------------------------|
| GAPDH | F: GCCTTCGGTGTCCCACTGC |
| | R: GGCTGGTGGTCCAGGGGTCT |
| C1qA | F: TGGTGACCGAGGACTTGTG |
| | R: GCTGCTCTTGATGTTTCCT |
| C3 | F: CCAGTTTCGAGGTCATAGTGG |
| | R: CCGTCCAGCAGTACCTTCC |
| C5 | F: CGCTTGACCAGTTGGTAGG |
| | R: CTTCCCTGGCCTGATTTTC |
| C9 | F: ATGTCACAATGCGATCCTT |
| | R: CTCGCCAGTCATTGTCACC |



04610.4/3/09
 (c) Kanehisa Laboratories

图1 CS信号通路及相关蛋白质表达 绿色代表上调蛋白,紫色代表下调蛋白。

2.2 RT-PCR 检测 CS 信号通路相关基因的表达

RT-PCR检测结果表明,与眼眶CH患者相比,LGBLEL患者病变泪腺组织中CS信号通路重要基因C1qA ($t = -21.966, P < 0.001$)、C5 ($t = -6.013, P = 0.002$)和C9 ($t = -6.102, P = 0.009$) mRNA表达水平均明显升高,而C3 mRNA虽然也表现出了升高的趋势,但差异无统计学意义 ($P = 0.057$),见图2。

2.3 免疫组织化学染色检测 CS 信号通路相关蛋白的表达

免疫组织化学染色结果表明,LGBLEL患者病变泪腺组织中C1qA、C3、C5和C9染色呈棕黄色,表达水平明显高于眼眶CH患者(图3)。

2.4 Western Blotting 检测 CS 信号通路相关蛋白表达

Western Blotting检测结果表明,与眼眶CH患者相比,LGBLEL患者病变泪腺组织中C1qA ($t = -7.232, P = 0.001$)、C3 ($t = -2.843, P = 0.036$)、C9 ($t = -4.324, P = 0.008$)蛋白表达水平均明显升高,C5也表现出升高趋势,

但差异无统计学意义 ($t = -2.383, P = 0.063$),见图4。

3 讨论

LGBLEL被认为属于IgG4-RD的范畴,而IgG、IgG4在补体激活过程中具有重要作用^[8]。Sugimoto等^[12]研究发现IgG4可能参与IgG4-RD低补体血症患者补体的激活。Muraki等^[13]报道36%的IgG4相关性自身免疫性胰腺炎患者血清补体C3和C4减少,提示补体激活系统参与了IgG4相关性自身免疫性胰腺炎的发病机制。另有研究报道IgG4-RD中C5a显著增加,并建议将其作为治疗靶点,但此结论存在争议^[14-15]。Breville等^[16]报道了1例罕见的补体介导的继发于IgG4-RD的血管微血栓疾病患者,提示IgG4自身抗体具有诱导补体介导的血管性微血栓形成作用。Montañez等^[17]研究显示IgG免疫复合物可以引起补体C3a、C5a和C5b-9的释放。上述研究表明,CS的激活参与IgG4-RD的发生机制,这为CS与LGBLEL直接关联提供了研究基础。

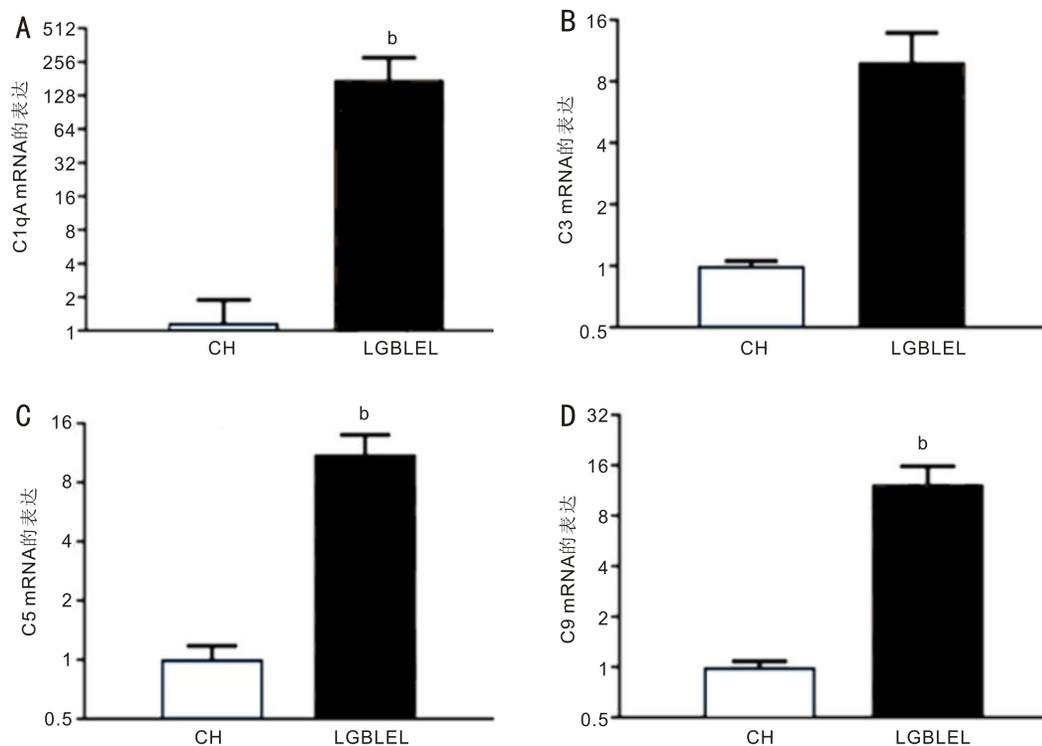


图2 CS信号通路重要基因表达水平 A: C1qA; B: C3; C: C5; D: C9。^b $P < 0.01$ vs CH。

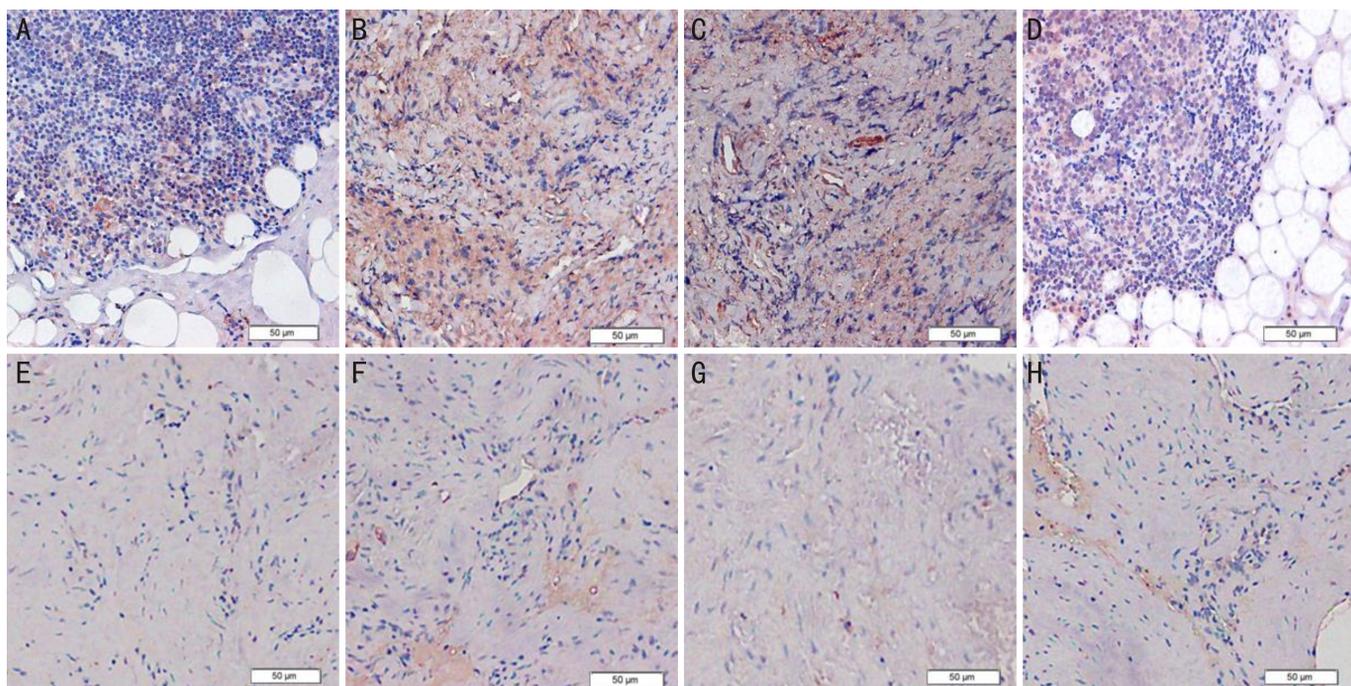


图3 免疫组织化学染色观察CS信号通路相关蛋白表达 A~D: LGBLEL患者。A: C1qA; B: C3; C: C5; D: C9。E~H: 眼眶CH患者。E: C1qA; F: C3; G: C5; H: C9。

经典途径是CS发挥作用的途径之一, C1q是CS经典途径重要的组成成分。C1q由C1qA、C1qB、C1qC等亚基组成^[18], 激活物与C1q结合激活经典途径, C3、C5、C9则是补体活化过程中, 在三种补体通路中均发挥重要作用的组成成分^[10]。已有研究显示, CS的相关基因和蛋白在LGBLEL组织中均发生了明显改变, 这表明CS可能参与LGBLEL的发病机制, 并且其经典途径可能参与了该过程。

蛋白质组学技术能够反映特定状态下的蛋白质图谱, 直接显示蛋白质丰度或状态, 是监测疾病蛋白质变化、探

索疾病发生机理的常用方式之一^[19-20]。作为近年来常见的检测技术, 蛋白质组学技术具有高效、快捷、全面等优点, 通过蛋白质组学技术进行分析, 能够对疾病组织中发生变化的蛋白质有初步的较为全面的了解, 在此基础上进一步对表达异常的蛋白质进行验证, 能够更快更准确地锁定与疾病相关的蛋白质, 为了解疾病的发生机制提供依据。

本研究采用蛋白质组学技术检测LGBLEL的病变泪腺标本, 发现C1q、C3、C5、C9等补体相关蛋白质发生了改变, 提示CS可能参与LGBLEL的发病机制。通过RT-PCR、

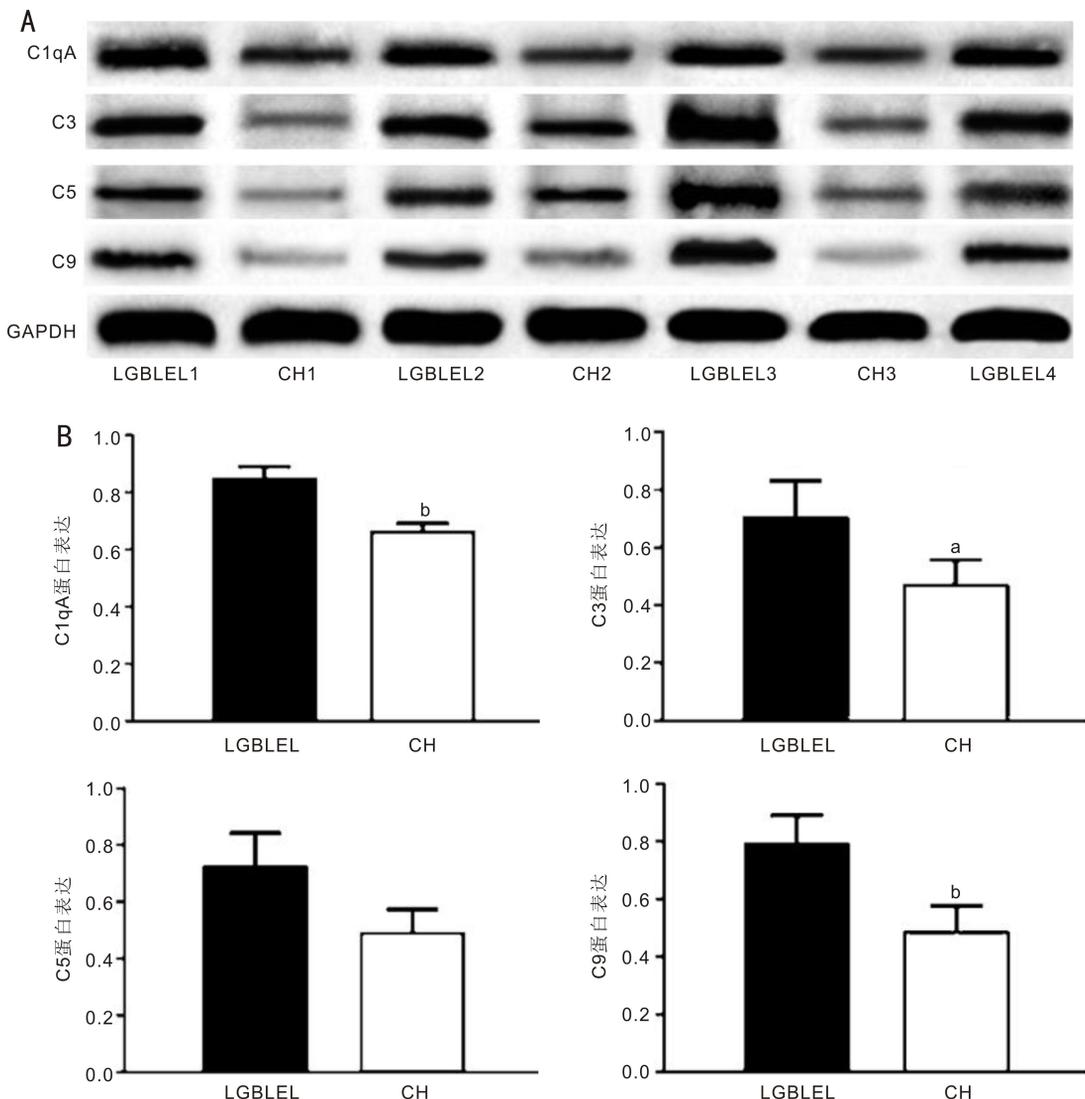


图4 Western Blotting 检测 CS 信号通路相关蛋白表达 A: Western Blotting 检测结果; B: Western Blotting 检测结果量化分析。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs LGBLEL。

免疫组织化学染色和 Western Blotting 法在蛋白质组学的基础上对这些蛋白的改变进行验证,进一步探讨 CS 在 LGBLEL 发病机制中可能的作用。研究结果显示,与眼眶 CH 患者相比,LGBLEL 患者病变泪腺组织中 C1qA ($P < 0.001$)、C5 ($P = 0.002$)、C9 ($P = 0.009$) mRNA 表达升高,C1qA ($P = 0.001$)、C3 ($P = 0.036$)、C9 ($P = 0.008$) 蛋白表达水平明显升高;免疫组织化学染色结果显示,与眼眶 CH 患者相比,LGBLEL 患者病变泪腺组织中 C1qA、C3、C5、C9 染色明显增多。但可能由于样本量偏小的原因,虽然在 LGBLEL 患者病变泪腺组织中,C3 mRNA 和 C5 蛋白水平检测表现出了升高的趋势,但差异并没有统计学意义。此外,C1qA 的变化趋势与前期已有研究存在一致性^[11],但与蛋白质组学的结果存在差异,分析可能是由于蛋白质组学的结果检测范围过大存在误差所致。总之,本研究结果提示,CS 参与 LGBLEL 的发病机制,且其经典途径可能是其发挥作用的途径之一。

LGBLEL 属于 IgG4-RD,而 IgG4 在补体激活过程中具有重要作用,表明 IgG4 可能通过激活 CS 在 LGBLEL 中发挥作用。目前关于 CS 在 IgG4-RD 中的作用仍然存在争议^[21]。IgG4 不能与 C1q 相结合,因此被认为不能激活经

典途径,但最近有研究提到,虽然 IgG4 不能直接与 C1q 相结合,但是可能影响其他类型 IgG 与 C1q 的结合^[22-23]。此外,IgG4 还能够激活旁途径参与补体途径的调控,但由于时间等因素的局限本研究并未对此进行深入研究。由于正常泪腺组织难以获得,故根据前期研究^[11]本研究选择眼眶 CH 患者的病变组织作为对照进行研究。总之,本研究在蛋白质组学的基础上验证了 CS 参与 LGBLEL 发病机制的过程,并进一步提出经典途径可能在该过程中发挥作用。

参考文献

- 1 Wang XN, Ge X, Li J, et al. B cell receptor signaling pathway involved in benign lymphoepithelial lesions of the lacrimal gland. *Int J Ophthalmol* 2017; 10(5): 665-669
- 2 Ma JM, Li J, Ge X, et al. Clinical research on benign lymphoepithelial lesions of lacrimal gland in 20 Chinese patients. *Chin Med J (Engl)* 2015; 128(4): 493-498
- 3 Yamada K, Kawano M, Inoue R, et al. Clonal relationship between infiltrating immunoglobulin G4 (IgG4)-positive plasma cells in lacrimal glands and circulating IgG4-positive lymphocytes in Mikulicz's disease. *Clin Exp Immunol* 2008; 152(3): 432-439
- 4 Yamamoto M, Takahashi H, Ohara M, et al. A new conceptualization for Mikulicz's disease as an IgG4-related plasmacytic disease. *Mod*

- Rheumatol* 2006; 16(6): 335-340
- 5 Skattum L. Clinical complement analysis—an overview. *Transfus Med Rev* 2019; 33(4): 207-216
- 6 Lo MW, Woodruff TM. Complement: Bridging the innate and adaptive immune systems in sterile inflammation. *J Leukoc Biol* 2020; 108(1): 339-351
- 7 Bjørge L. Komplementsystemet – oppbygning, aktivering, reguleringsfunksjon [The complement system – structure, activation, regulation and function]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1999; 119(2): 226-233
- 8 Kawa S. The immunobiology of immunoglobulin G4 and complement activation pathways in IgG4-related disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017; 401: 61-73
- 9 Wang R, He DF, Zhao LL, et al. Role of complement system in patients with biopsy-proven immunoglobulin G4-related kidney disease. *Hum Pathol* 2018; 81: 220-228
- 10 曹雪涛, 姚智慧, 熊思东, 等. 医学免疫学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社 2018; 40-44
- 11 Li J, Ge X, Wang XN, et al. Complement system in the pathogenesis of benign lymphoepithelial lesions of the lacrimal gland. *PLoS One* 2016; 11(2): e0148290
- 12 Sugimoto M, Watanabe H, Asano T, et al. Possible participation of IgG4 in the activation of complement in IgG4-related disease with hypocomplementemia. *Mod Rheumatol* 2016; 26(2): 251-258
- 13 Muraki T, Hamano H, Ochi Y, et al. Autoimmune pancreatitis and complement activation system. *Pancreas* 2006; 32(1): 16-21
- 14 Fukui S, Fujita Y, Origuchi T, et al. Serum complement factor C5a in IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis* 2019; 78(7): e65
- 15 Umehara H, Kawano M. Response to: 'Serum complement factor C5a in IgG4-related disease' by Fukui et al. *Ann Rheum Dis* 2019; 78(7): e66
- 16 Breville G, Zamberg I, Sadallah S, et al. Case report: severe complement-mediated thrombotic microangiopathy in IgG4-related disease secondary to anti-factor H IgG4 autoantibodies. *Front Immunol* 2020; 11: 604759
- 17 Montañez MI, Mayorga C, Bogas G, et al. Epidemiology, mechanisms, and diagnosis of drug-induced anaphylaxis. *Front Immunol* 2017; 8: 614
- 18 Reid KB, Porter RR. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem J* 1976; 155(1): 19-23
- 19 孙娇, 藏颖颖, 刘清国. 蛋白质组学在高血压研究中的应用进展. *医学综述* 2022; 28(4): 632-637
- 20 McArdle AJ, Menikou S. What is proteomics? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2021; 106(3): 178-181
- 21 纪宗斐, 马玲瑛, 姜林娣. IgG4相关性疾病(IgG4-RD)发病机制的研究进展. *复旦学报(医学版)* 2019; 46(1): 114-118, 142
- 22 Prodjinotho UF, Hoerauf A, Adjobimey T. IgG4 antibodies from patients with asymptomatic bancroftian filariasis inhibit the binding of IgG1 and IgG2 to C1q in a Fc-Fc-dependent mechanism. *Parasitol Res* 2019; 118(10): 2957-2968
- 23 Lilienthal GM, Rahmüller J, Petry J, et al. Potential of murine IgG1 and human IgG4 to inhibit the classical complement and fcγ receptor activation pathways. *Front Immunol* 2018; 9: 958