

β-arrestin1 在实验性自身免疫性葡萄膜炎中的表达

任亚琳,王增智,严浩

基金项目:深圳市南山区科技局资助项目(No. 2009015);深圳市科技计划资助项目(No. 201102127)
作者单位:(518600)中国广东省深圳市,广东医学院附属南山医院眼科
作者简介:任亚琳,女,博士后,副主任医师,研究方向:葡萄膜炎。
通讯作者:任亚琳. rensz2008@gmail.com
收稿日期:2012-03-15 **修回日期:**2012-06-04

Study on the expression of β-arrestin1 in experimental autoimmune uveitis

Ya-Lin Ren, Zeng-Zhi Wang, Hao Yan

Foundation items: Shenzhen Nanshan Science and Technology Fund, China (No. 2009015); Shenzhen Science and Technology Fund, China(No. 201102127)
Department of Ophthalmology, Guangdong Medical School Affiliated Nanshan Hospital, Shenzhen 518600, Guangdong Province, China
Correspondence to: Ya-Lin Ren. Department of Ophthalmology, Guangdong Medical School Affiliated Nanshan Hospital, Shenzhen 518600, Guangdong Province, China. rensz2008@gmail.com
Received:2012-03-15 **Accepted:**2012-06-04

Abstract

- **AIM:** To study the expression of β-arrestin1 in the spleen cells of experimental autoimmune uveitis (EAU).
- **METHODS:** The mice were injected into the foot with IRBP R16. On day 3, the spleen was extracted and the single cell suspension was made. Immunohistochemistry and RT-PCR were done on these spleen cells.
- **RESULTS:** The expression of β-arrestin1 on the spleen cells of EAU groups was much higher than that in the normal groups.
- **CONCLUSION:** β-arrestin1 might play an important role on the EAU.
- **KEYWORDS:** experimental autoimmune uveitis; β-arrestin 1

Citation: Ren YL, Wang ZZ, Yan H. Study on the expression of β-arrestin1 in experimental autoimmune uveitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(7):1242-1244

摘要

目的:初步探讨 β-arrestin1 在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)中的表达。
方法:成功建立 EAU 动物模型后,通过免疫组织化学和 RT-PCR 的方法检测 β-arrestin1 在 EAU 小鼠脾脏细胞中的表达。
结果:免疫组织化学和 RT-PCR 均提示 β-arrestin1 在 EAU 小鼠脾脏细胞中的表达较正常小鼠增高。

结论:β-arrestin1 可能在 EAU 的发生发展中起着重要作用。
关键词:实验性自身免疫性葡萄膜炎;β-arrestin1
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.07.05

引用:任亚琳,王增智,严浩. β-arrestin1 在实验性自身免疫性葡萄膜炎中的表达. 国际眼科杂志 2012;12(7):1242-1244

0 引言

葡萄膜炎是一种常见的眼病,目前对其发病机制尚不完全清楚。2007年,Pei等通过对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)动物模型的研究发现,Bcl-2的表达受到β-arrestin1的表观遗传调控^[1]。Pei等发现β-arrestin1通过乙酰化Bcl-2启动子区域的组蛋白H4,从而增加CD4 T细胞的存活和模型对EAE的易感性。由此可见,β-arrestin1在免疫应答中起着重要的作用。葡萄膜炎也是人类常见的一类自身免疫性疾病,Bora等的最近研究表明Bcl-2在葡萄膜炎的发生发展中起着重要作用^[2],而β-arrestin1是否参与了此类疾病的发生尚不清楚。本研究正是基于上述研究的最新进展,探讨β-arrestin1在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)动物模型形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6a小鼠16只,雌性,8周龄(SPF级,广东医学院实验动物中心提供),体质量20~26g。将C57BL/6a小鼠随机分为2组,其中EAU组给予免疫IRBP抗原,对照组不做任何注射。弗式完全佐剂(Sigma),小鼠淋巴细胞分离液(达科为),RPMI 1640培养液(Gibco),β-arrestin1鼠单抗(Biolegend),细胞总RNA磁珠提取试剂盒(Bioeasy),RT-PCR试剂盒(Invitrogen),引物,探针(Invitrogen),AB7300实时荧光PCR仪(ABI)。

1.2 方法

1.2.1 EAU的常规诱导 准确称取IRBP R16多肽,用生理盐水配制IRBP溶液为4mg/mL,与等体积弗式完全佐剂混合后乳化。采用后足垫皮下免疫,每只小鼠注射0.1mL免疫原,免疫剂量为200μg/只。免疫3d后,处死小鼠,取脾分离淋巴细胞。

1.2.2 脾脏淋巴细胞分离 步骤:(1)处死小鼠,无菌取出脾脏,在灭菌PBS中剥离充分;(2)转脾脏到3.5mL小鼠淋巴细胞分离液中,小心研磨获得脾细胞悬液。转移悬液到15mL离心管中,缓慢加入0.5mL RPMI 1640,2600r/min离心30min;(3)离心结束后,缓慢取出离心管。在上下两层液面分界处,吸取淋巴细胞至15mL离心管中,加入10mL RPMI 1640,1200r/min离心5min,洗涤1次;(4)洗涤结束后,获得小鼠脾脏淋巴细胞。

1.2.3 小鼠脾脏淋巴细胞免疫组织化学染色(ICC)检测β-arrestin1的表达 首先采用750mL/L甲醇,对小鼠脾

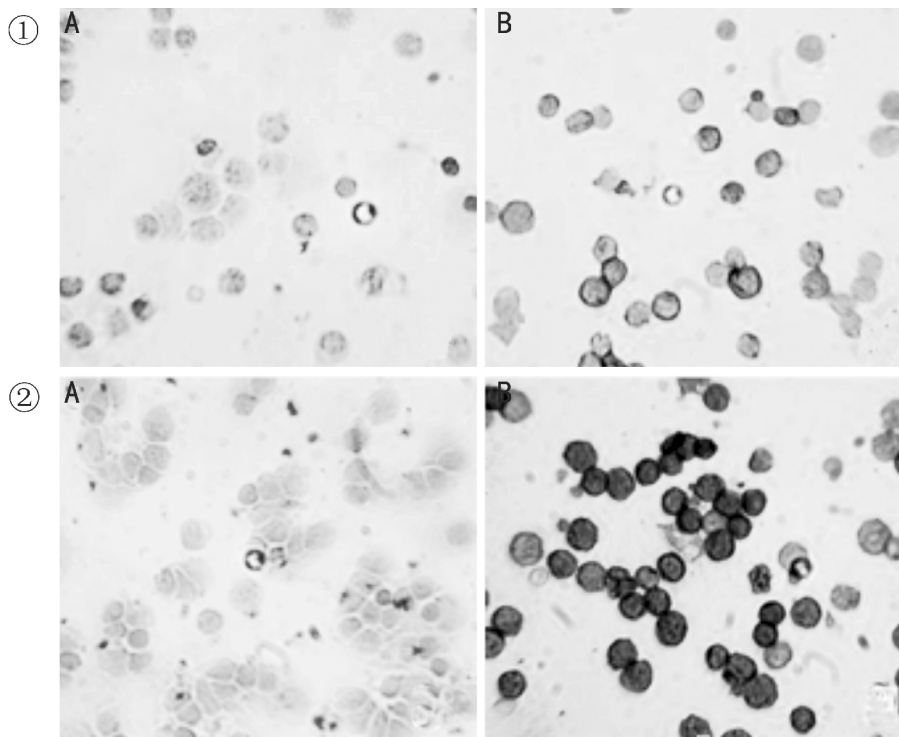


图1 小鼠脾脏淋巴细胞 β -arrestin1 免疫组织化学检测 ($\times 200$) ①:正常组; ②:EAU组;A:阴性对照;B: β -arrestin1。

脏淋巴细胞浸泡 10min,吸去多余甲醇。之后用 PBS 冲洗 3 次,每次 3min。之后进行内源性过氧化酶阻断,采用 30mL/L H_2O_2 浸泡细胞,加入 100 μ L,室温下处理 10min。之后用 PBS 冲洗 3 次,每次 3min。然后经过封闭、一抗(小鼠抗 β -arrestin1 单抗)、二抗(羊抗小鼠-HRP)显色、苏木素和盐酸乙醇处理后,进行显微镜下拍照。

1.2.4 RT-PCR 检测小鼠脾脏淋巴细胞 β -arrestin1 的表达 步骤:(1)Trizol 法提取细胞总 RNA;(2)引物设计与合成:小鼠 β -arrestin F: 5'-GTGCTGTTACTATGACTTGACCA-3';小鼠 β -arrestin R: 5'-ACAAGAACTCTCGGAATCATCT-3';小鼠 β -actin F: 5'-CTCTGTGTGGATCCGGTGGCT-3';小鼠 β -actin R: 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3';(3) cDNA 合成:以不同组细胞总 RNA 为模板,采用 Invitrogen 逆转录试剂盒,合成 cDNA;(4)实时荧光 PCR 扩增目的基因:以不同组细胞的 cDNA 为模板,用荧光染料法检测每组 β -arrestin 及 β -actin 的 Ct 值;(5)实时荧光定量 PCR 结果获取及结果分析:反应结束,设置合适的基线(一般是 3rd ~ 15th cycle),设置阈值(一般为基线的 10 倍),获得每个样品的 Ct 值;也可由软件自动分析,获得每个样品的 CT 值。 β -actin 的表达量是恒定的,用 $\Delta(\Delta Ct)$ 法来考查 TGF- β 1 表达的差异。所有实验重复 3 次,取每个样品的平均 Ct 值进行分析。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组淋巴细胞 β -arrestin1 mRNA 的相对表达量(relative quantification, RQ), $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

统计学分析:所用软件为 SPSS 13.0,对数据进行 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞免疫组织化学检测小鼠脾脏淋巴细胞 β -arrestin1 表达 实验结果显示正常小鼠脾脏淋巴细胞 β -arrestin1 表达均为阳性,EAU 组小鼠与正常小鼠对比,其 β -arrestin1 表达水平均显著增强(图 1)。

2.2 RT-PCR 检测小鼠脾脏淋巴细胞 β -arrestin1 表达 RT-PCR 检测结果表明,EAU 组 β -arrestin1 mRNA 水平与正常组对比显著升高($P<0.05$,表 1,2),其 RQ 为:1.361,此结果与免疫组织化学结果相符合,不仅如此,蛋白表达水平也显著增强(图 2)。

3 讨论

葡萄膜炎是一种常见的眼病。在我国保守估计至少有 300 多万患者^[3]。此类疾病多发生于青壮年,通常反复发作,易造成眼组织的严重破坏,视力显著下降,延迟治疗或治疗不当通常导致不可治性盲目,是一种重要的致盲眼病。葡萄膜炎之所以易造成盲目,主要原因与目前尚无理想的预防和治疗方法有关,更深层次的原因是目前对其发病机制尚不完全清楚。近年来,人们对一些调节分子在自身免疫系统疾病发病中的作用的研究为我们探讨葡萄膜炎的发病机制提供了新的思路。

经典的免疫学认为,精确调节 T 细胞凋亡和生存时间对人体产生正确的免疫应答是非常关键的。在获得性免疫中,CD4 T 细胞发挥着重要作用。机体对外周活化的 CD4 T 细胞的调控是十分严格的,其产生和消亡保持着微妙的平衡,若调控失常会导致自身免疫性疾病的发生。在抗原被识别后,CD4 T 细胞增殖分化成效应 T 细胞调节免疫反应,在反应结束后,会通过细胞失活、活化导致的细胞死亡和活化 T 细胞的自身死亡几个机制严格控制效应 T 细胞的数量和活动,从而维持周边免疫耐受。若效应 CD4 T 细胞过多的死亡会导致免疫缺陷,而效应 CD4 T 细胞过久活化和存活则导致自身免疫疾病。

在哺乳动物中,CD4 T 细胞的死亡主要由两条不同的通路介导^[4,5]:(1)细胞表面受体:如 TNF, TRAIL 受体和 Fas,通过和他们的配体作用,活化 caspase 酶直接引起细胞的凋亡;(2)Bcl-2 蛋白家族介导的调控线粒体的途径:Bcl-2 分子就是其中抑制凋亡的重要成员,它通过改变线

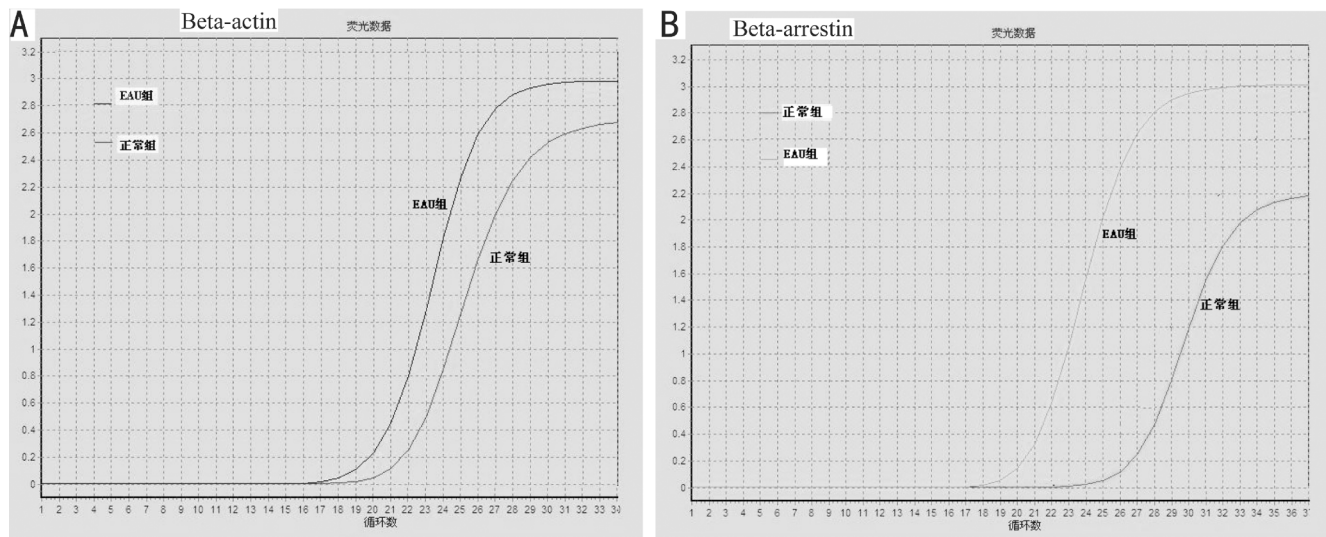


图2 β -arrestin1 在 EAU 的蛋白表达 A: β -actin;B: β -arrestin1。

表1 RT-PCR 检测不同组淋巴细胞 β -arrestin1 及 β -actin 表达

基因检测	raw Ct	
	正常组	EAU 组
β -actin	22.64	19.69
	22.87	18.79
	22.5	19.27
平均	22.67	19.25
β -arrestin1	24.08	28.13
	23.13	27.32
	24.28	28.19
平均	23.83	27.88

表2 各组淋巴细胞 β -arrestin1 mRNA 的相对表达量

分组	Raw Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	RQ
正常组	24.28	1.16	0	1
EAU 组	28.19	3.63	1.47	1.361

粒体膜的完整性控制细胞的凋亡。研究发现 Bcl-2 缺陷鼠,T 细胞易于死亡;而在 Bcl-2 转基因鼠,T 细胞不易凋亡,免疫反应时间延长,会表现出一些自身免疫性疾病的症状。因此,Bcl-2 的表达需要受到严格控制。

直到 2007 年,Pei 等通过对 EAE 动物模型的研究发现,Bcl-2 的表达受到 β -arrestin1 的表观遗传调控^[1]。 β -arrestin 蛋白是多功能的信号分子,被认为能调控多种信号分子的活性和分布^[6],最初作为 G 蛋白配偶受体(G-protein-coupled receptors, GPCRs)的负性调节因子被发现^[7]。 β -arrestin 的成员 β -arrestin1 和 β -arrestin2 在机体内表达广泛,在神经和免疫系统有更高的表达,通过 GPCRs 对信号转导起着重要作用。近几年来, β -arrestin1 被陆续发现了一些新的功能,如通过影响组胺乙酰化和特定基因的转录,从而影响 c-Fos 和 p27 完成对细胞周期调控,通过和胞浆中的 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 及 p53 结合调节 NF- κ B 和 p53

的转录等^[8,9]。Pei 等发现 β -arrestin1 通过乙酰化 Bcl-2 启动子区域的组蛋白 H4,从而增加 CD4 T 细胞的存活和模型对 EAE 的易感性^[1]。由此可见, β -arrestin1 在免疫应答中起着重要的作用。葡萄膜炎也是人类常见的一类自身免疫性疾病,Bora 等最近研究表明,Bcl-2 在葡萄膜炎的发生发展中起着重要作用^[2],而 β -arrestin1 是否参与了此类疾病的发生尚不清楚。

本研究通过免疫组织化学、RT-PCR 研究发现, β -arrestin1 在 EAU 中的基因和蛋白表达均高于正常对照组,由此我们推测 β -arrestin1 在 EAU 的形成和发展中可能起着重要作用。但是 β -arrestin1 能否应用于葡萄膜炎预防和治疗,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Shi Y, Feng Y, Kang J, et al. Critical regulation of CD4+T cell survival and autoimmunity by β -arrestin 1. *Nat Immunol* 2007;8(8):817-824
- 2 Jba P, Matta B, Lyzogubov V, et al. Crucial role of apoptosis in the resolution of experimental autoimmune anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(11):5091-5100
- 3 杨培增. 临床葡萄膜炎. 北京:人民卫生出版社 2006
- 4 Marrack P, Kappler J. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* 2004;22(4):765-787
- 5 Strasser A, Pellegrini MT. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol* 2004;25(11):610-615
- 6 Dewire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, et al. β -arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 2007;69(2):483-510
- 7 Kang J, Shi Y, Xiang B, et al. A Nuclear Function of β -Arrestin1 in GPCR Signaling: Regulation of Histone Acetylation and Gene Transcription. *Cell* 2005;123(5):833-847
- 8 Witherow DS, Garrison TR, Miller WE, et al. β -Arrestin inhibits NF- κ B activity by means interaction with the NF- κ B inhibitor I κ B α . *PANS* 2004;101(23):8603-8697
- 9 Ma L, Pei G. β -Arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci* 2006;120(Pt 2):213-218