

EZH2 在强直性脊柱炎患者中的表达及与 Th17 分化的关系

张岱阳¹, 李拓^{2*}, 罗政¹, 尹锐¹, 胡睿¹

(恩施土家族、苗族自治州中心医院 1. 脊柱外科, 2. 眼科, 湖北恩施 445000)

摘要: 观察果蝇 Zesle 基因增强子 2 (EZH2) 在强直性脊柱炎患者中的表达及与辅助性 T 细胞 17 (Th17) 分化的关系。选择本院收治的强直性脊柱炎患者 84 例为病例组, 同期健康体检者 50 例为对照组, 检测外周血单个核细胞中 EZH2 与 Th17 细胞比率、IL-6、IL-17、IL-23、TGF- β 的水平和相关性。结果显示, 与对照组相比, 病例组外周血单个核细胞中 EZH2 与 Th17 细胞比率、IL-6、IL-17、IL-23、TGF- β 的水平均显著升高; EZH2 在患者外周血中呈高表达且与 Th17 分化呈正相关。结果说明, EZH2 可能通过刺激 Th17 细胞分化, 促进自身抗体形成, 参与强直性脊柱炎发生发展。

关键词: Zesle 基因增强子 2; 强直性脊柱炎; 表达水平; Th17; 相关性; 细胞

中图分类号: R593.23 文献标识码: A

Expression of EZH2 in patients with ankylosing spondylitis and its relationship with Th17 differentiation

ZHANG Daiyang¹, LI Tuo^{2*}, LUO Zheng¹, YIN Rui¹, HU Rui¹

(1. Department of Spinal Surgery, 2. Department of Ophthalmology, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China)

Abstract: To explore the expression of Drosophila Zesle gene enhancer 2 (EZH2) in patients with ankylosing spondylitis and its relationship with helper T cell 17 (Th17) differentiation. 84 patients with ankylosing spondylitis admitted to our hospital were selected as the case group. 50 healthy controls were used as the control group, the levels and correlations EZH2 between IL-17, IL-23, and TGF- β were analyzed. Results showed compared to the control group, the ratio of EZH2 and Th17, and the levels of IL-6, IL-17, IL-23 and TGF- β in peripheral blood in the case group were significant higher, and EZH2 is positively correlated with Th17 differentiation. Results indicated that EZH2 may promote the formation of autoantibodies by stimulating the differentiation of Th17 cells and participate in the development of ankylosing spondylitis.

Key words: EZH2; ankylosing spondylitis; expression level; Th17; correlation; cell

强直性脊柱炎是一种主要侵犯脊柱、累及骶髋关节的慢性自身免疫炎症性疾病, 以骶髋关节和脊柱附着点、中轴骨骼炎症为主要症状, 患者致残率高, 对生活质量造成严重影响^[1-2]。该病发病隐匿, 病因较为复杂, 多认为与遗传、感染、免疫、炎性细胞浸润、细胞因子失衡等因素相关^[3]。研究表明^[4] Th17 可参与调控机体免疫平衡且在多种自身免疫疾病发生及进展过程中起重要作用。果蝇 Zesle 基因增强子 2 (enhancer of zesle homolog2, EZH2) 是一种重要的组蛋白甲基化转移酶, 其可催化组蛋白 H3 上 27 位的赖氨酸三甲基化 (H3K27me3) 而抑制靶

基因表达^[5]。研究发现^[6] EZH2 介导的 H3K27me3 在辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 分化过程中扮演重要角色。但 EZH2 在强直性脊柱炎患者中的表达及与 Th17 分化的关系尚不清楚。本研究通过检测 EZH2 在强直性脊柱炎患者外周血中表达水平并探讨其与 Th17 分化的关系, 以为强直性脊柱炎的防治提供新的方向, 现将研究结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2018 年 6 月至 2019 年 6 月本院收治的强直性脊柱炎患者 84 例为病例组, 男 46 例, 女 38 例; 年龄 22 ~ 70 岁, 平均年龄 (36.27 ± 5.56) 岁; 病程 1

~8 年,平均病程(3.61±1.70)年。纳入标准:①符合强直性脊柱炎诊断标准^[1];②无脊柱炎病史或认知功能障碍;③入院资料齐全;④心、肝、肾、肺功能正常;⑤所有入选者对本研究内容知情同意。排除标准:①合并恶性肿瘤或先天性心脏瓣膜发育异常;②合并过敏性疾病或自身免疫性疾病;③纳入研究前 3 个月进行过免疫调节治疗;④妊娠期、哺乳

期女性;⑤合并其他风湿性疾病;⑥合并心脑血管疾病。另选同期在本院健康体检者 50 例为对照组,男 27 例,女 13 例;年龄 21~68 岁,平均年龄(35.12±5.68)岁。两组年龄、性别等基线资料比较,差异无显著性($P>0.05$)(表 1)。研究过程遵循人体试验委员会制定的伦理学标准。

表 1 两组基线资料

基线资料	<i>n</i>	年龄(岁)	体重(kg)	男性(例,%)	饮酒史(例,%)	吸烟史(例,%)	脊柱创伤史(例,%)
病例组	84	36.27±5.56	65.34±5.27	46(54.76)	50(59.52)	34(40.48)	38(45.24)
对照组	50	35.12±5.68	66.33±5.18	27(54.00)	30(60.00)	19(38.00)	23(46.00)
<i>t</i> / χ^2		1.149	1.058	0.007	0.003	0.08	0.007
<i>P</i>		0.253	0.292	0.932	0.957	0.777	0.932

1.2 研究方法

1.2.1 外周血单个核细胞中 EZH2 mRNA 水平
采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(Real time fluorescence quantitative-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)检测,方法如下:采集两组受试者空腹外周静脉血 2 mL,置于 EDTA 抗凝管(山东奥赛特医疗器械有限公司)中,采用人淋巴细胞分离液(北京冬璞泰和科技有限责任公司)分离外周血单个核细胞,采用总 RNA 提取试剂盒(上海玉博生物科技有限公司)提取总 RNA,总 RNA 按照逆转录试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司)操作步骤合成 cDNA,以此 cDNA 为模板行 PCR 扩增,根据扩增曲线读取循环数(Ct),基因的相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.2 Th17 细胞比率测定 采用流式细胞术检测,方法如下:采集两组受试者空腹外周静脉血 2 mL,置于肝素钠抗凝管中,分离并提纯外周血单个核细胞,将其接种于 6 孔板中(1×10^6 /mL),加入佛波醇乙酯(北京依托华茂生物科技有限公司)25 ng/mL 2 μ L,离子霉素(上海联硕生物科技有限公司)1 μ g/mL 10 μ L,放入 37 $^{\circ}$ C 无菌细胞培养箱(德国 Binder 公司)中培养 1 h,向培养箱中加入 1 μ L 高尔基阻断剂(上海懋康生物科技有限公司)培养 6 h 后收集细胞,采用 5 μ L IL-17A PE(苏州派普泰克生物科技有限公司)标记 Th17 细胞,采用 NovoCyte 流式细胞仪(杭州艾森生物有限公司)检测 Th17 细胞百分率,检测结果以阳性细胞百分数表示。

1.2.3 检测方法 血清白细胞介素 1(Interleukin 1, IL-1)、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)、IL-17、IL-23 水平:采用酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检

测,方法如下:采集两组受试者空腹外周静脉血 2 mL,3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,采用 IL-6 检测试剂盒(武汉默沙克生物科技有限公司)测定血清 IL-6 水平,采用 IL-17 检测试剂盒(上海信裕生物科技有限公司)测定血清 IL-17 水平,采用 IL-23 检测试剂盒(上海信然生物技术有限公司)测定血清 IL-23 水平,采用 TGF- β 检测试剂盒(上海博湖科技发展有限公司)测定血清 TGF- β 水平。

1.3 统计学方法

本研采用 SPSS22.0 软件上,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,*t* 检验比较两组 EZH2、Th17 细胞比率、IL-6、IL-17、IL-23、TGF- β 等,计数资料以百分数(%)表示,采用 χ^2 检验比较,采用 Pearson 相关分析强直性脊柱炎患者外周血中 EZH2 与 Th17、IL-6、IL-17、IL-23、TGF- β 的相关性, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组外周血单个核细胞中 EZH2 mRNA 水平

病例组外周血单个核细胞中 EZH2 mRNA 水平明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。

表 2 两组外周血单个核细胞中 EZH2 mRNA 水平

组别	<i>n</i>	EZH2 mRNA
对照组	50	1.12±0.12
病例组	84	1.93±0.15
<i>t</i>		32.480
<i>P</i>		<0.001

2.2 两组 Th17 细胞比率

病例组 Th17 细胞比率明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 3)。

表 3 两组 Th17 细胞比率

组别	<i>n</i>	Th17 细胞(%)
对照组	50	2.44±0.34
病例组	84	5.45±0.37
<i>t</i>		46.920
<i>P</i>		<0.001

2.3 两组 Th17 相关细胞因子水平

病例组血清 IL-6、IL-17、IL-23、TGF-β 水平明显高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 4)。

表 4 两组 Th17 相关细胞因子水平 (pg/mL)

组别	<i>n</i>	IL-6	IL-17	IL-23	TGF-β
对照组	50	3.22±0.39	8.31±1.36	0.05±0.02	0.27±0.05
病例组	84	6.11±0.48	25.87±1.59	0.26±0.02	0.58±0.07
<i>t</i>		36.059	65.161	58.784	26.113
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 强直性脊柱炎患者外周血中 EZH2 与 Th17、IL-6、IL-17、IL-23、TGF-β 的相关性

强直性脊柱炎患者外周血中 EZH2 分别与 Th17、IL-6、IL-17、IL-23、TGF-β 呈正相关($P < 0.05$,表 5)。

表 5 EZH2 与 Th17、IL-6、IL-17、IL-23、TGF-β 的相关性

项目	EZH2	
	<i>r</i>	<i>P</i>
Th17	0.712	<0.001
IL-6	0.669	<0.001
IL-17	0.563	<0.001
IL-23	0.533	0.012
TGF-β	0.486	0.008

3 讨 论

强直性脊柱炎(spondylitis ankylosans, AS)是一种自身免疫性疾病,其特征是炎症高度活动和低度活动相互交替^[7]。研究认为^[8]该病的发生与 Th17 细胞免疫功能异常有关。Th17 是由 TH0 细胞在 TGF-β、IL-6、IL-23 等刺激诱导下分化而成的辅助性

T 细胞,IL-17 为其最主要的分泌产物,参与机体防御调节^[9]。本研究显示病例组外周血中 Th17 细胞比率、TGF-β、IL-6、IL-23 高于对照组,提示 AS 发生可能与 Th17 细胞分化有关。其原因可能是 Th17 激活免疫细胞产生细胞黏附分子,促进血管上皮细胞分泌 IL-17、IL-22 等炎症因子,引导炎症反应。TGF-β、IL-6、IL-23 作为诱导 Th17 细胞分化的关键性细胞因子,在炎症加剧时其分泌也大量增加^[10]。

近年来表观遗传学已被报道在免疫应答过程中发挥作用^[11]。组蛋白甲基化修饰是表观遗传的调控方式之一,其修饰功能主要依赖于组蛋白甲基化转移酶^[12]。EZH2 是一种重要的组蛋白甲基化转移酶,也是多梳抑制复合体 2 的催化亚基,能够催化 H3K27me3,使得染色质抑制蛋白复合体在靶基因特定位点募集,从而抑制靶基因表达^[13]。EZH2 与 H3K27me3 能够抑制 Treg 细胞分化^[14],并能够直接结合 Th2 细胞分化的关键转录因子 Gata3 和 Th1 细胞分化的关键转录因子 Tbx21 的特定位点抑制 2 个基因表达,从而抑制 CD4⁺T 细胞向 Th1、Th2 细胞分化^[15]。本研究显示病例组外周血单个核细胞中 EZH2 mRNA 水平高于对照组,提示 EZH2 在 AS 患者外周血中呈高表达。有研究发现 EZH2 介导的 H3K27me3 与 Th17 分化过程密切相关,这与本研究相符,本研究显示 AS 患者外周血中 EZH2 与 Th17、IL-6、IL-17、IL-23、TGF-β 均呈正相关,提示 EZH2 与 Th17 分化相关,EZH2 可能通过刺激 Th17 细胞分化,促进自身抗体形成,参与 AS 发生发展。

综上所述,EZH2 在 AS 患者外周血中呈高表达且与 Th17 分化呈正相关。EZH2 可能通过刺激 Th17 细胞分化,参与 AS 发生发展,这可能为 AS 的免疫治疗提供新的靶点和途径。本研究为单中心研究,样本量较少,仅对入院时 AS 患者外周血中 EZH2、Th17、IL-6、IL-17、IL-23、TGF-β 水平进行了探讨,缺乏动态观察,仍需扩大样本量进一步研究。

参考文献:

- [1] 孟祖志,杨莹,王传荣.全髋关节置换术治疗强直性脊柱炎 14 例效果观察[J].临床军医杂志,2016,44(2):182-3.
- [2] 班超,葛丽红,牛广明,等.强直性脊柱炎骶髂关节病变磁共振成像定量研究进展[J].磁共振成像,2018,9(2):157-60.
- [3] 黄金星,唐光辉,文波,等.强直性脊柱炎患者 PBMC 中 IP-10、IFN-γ 和 IL-4 mRNA 表达水平及意义[J].中南医学科学杂志,2019,47(4):346-9.
- [4] ABDEL-MONEI A, BAKERY HH, ALLAM G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus[J]. Biomed Pharmacother,2018,101(9):287-92.

[5] BECA F, KENSLER K, GLASS B, et al. EZH2 protein expression in normal breast epithelium and risk of breast cancer: results from the Nurses' Health Studies[J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 128-9.

[6] 吴家林, 陈香宇, 田钦. 急性病毒感染条件下组蛋白甲基化转移酶 EZH2 对 CD4+ T 细胞 mTOR 信号通路的影响[J]. *免疫学杂志*, 2019, 10(4): 325-7.

[7] 王菁, 王庆文, 尚宏喜, 等. C 反应蛋白在强直性脊柱炎发病机制中的作用研究[J]. *中国药物与临床*, 2015, 19(6): 752-5.

[8] 李文清. 强直性脊柱炎患者外周血 miR-155 表达及 Th17/Treg 平衡的关系[J]. *山西医科大学学报*, 2019, 12(2): 235-40.

[9] JIANG Y, LIU Y, LU H, et al. Epigenetic activation during T helper 17 cell differentiation is mediated by Tripartite motif containing 28[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 121-8.

[10] LI X, CANNON AR, HAMMER AM, et al. IL-23 restoration of Th17 effector function is independent of IL-6 and TGF- β in a mouse model of alcohol and burn injury[J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 26(12): 527-35.

[11] XIAOTIAN Z, XIAOYAN Z, SAIYA H, et al. miRNA-101-3p in-

hibits proliferation and migration of gastric cancer cells by targeting EZH2[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2017, 7(3): 589-96.

[12] ZHANG JJ, CHEN JT, HUA L, et al. miR-98 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation via targeting EZH2 and suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Bio Pharmacotherapy*, 2016, 85(3): 472-80.

[13] WANG ZQ, CAI Q, HU L, et al. Long noncoding RNA UCA1 induced by SP1 promotes cell proliferation via recruiting EZH2 and activating AKT pathway in gastric cancer[J]. *Cell Death and Disease*, 2017, 8(6): 2839-45.

[14] CHEN Q, CHEN X, CHEN Z, et al. Long intergenic non-coding RNA 00152 promotes lung adenocarcinoma proliferation via interacting with EZH2 and repressing IL24 expression[J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16(1): 17-23.

[15] LIU D, LIY, LUO G, et al. LncRNA SPRY4-IT1 sponges miR-101-3p to promote proliferation and metastasis of bladder cancer cells through up-regulating EZH2[J]. *Cancer Letters*, 2017, 21(5): 281-91.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 51 页)

[3] JENABI E, KHAZAEI S. The effect of uterine leiomyoma on the risk of malpresentation and cesarean: a meta-analysis[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2017, 31(1): 87-92.

[4] 陈慧莉, 邱慧. ER、IGF-1 在子宫肌瘤中的表达情况分析[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(20): 4284-6.

[5] 欧阳晨捷. 子宫肌瘤的发病机制研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2016, 26(6): 708-11.

[6] BROHL A S, LI L, ANDIKYAN V, et al. Age-stratified risk of unexpected uterine sarcoma following surgery for presumed benign leiomyoma[J]. *Oncologist*, 2015, 20(4): 433-9.

[7] CLARK DONAT L, TOWER A, CLARK M, et al. Identifying risk factors for urinary retention after hysterectomy for leiomyoma[J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2015, 22(6): 59-62.

[8] 张生兰, 马西文. 宫瘤消胶囊联合米非司酮治疗子宫肌瘤对患者子宫肌瘤体积及激素水平的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(11): 107-10.

[9] 李亮, 宋成文, 杨赛花, 等. IGF-I、IGF-II、ER 及 PR 在子宫组织的表达及肌瘤复发的意义[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30

(17): 2874-6.

[10] 王波. 子宫肌瘤组织内细胞因子的改变及相关性研究[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(22): 4667-8.

[11] 宋茜. 桂枝茯苓丸联合米非司酮治疗子宫肌瘤患者的疗效及对血清性激素和 ER、VEGF、IL-2 水平的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(5): 58-60.

[12] 李楠, 贺丰杰, 李小宁, 等. 宫瘤消胶囊对子宫肌瘤模型大鼠雌孕激素水平及其受体表达的影响[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2015, 16(6): 534-7.

[13] 廖治, 肖洪涛. MicroRNA-18a 及雌激素受体 α 在子宫肌瘤中的表达[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(21): 2128-30.

[14] 张传琪, 张怡舜, 王敏. 子宫肌瘤组织硫酸基转移酶 1A3 与雌激素受体亚型 ER α 、ER β 的表达及临床意义研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2017, 33(02): 205-8.

[15] 徐洁, 吴艳婷, 许茜, 等. 血液中酚类环境雌激素与子宫肌瘤关联性的病例对照研究[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2016, 35(4): 506-10.

(本文编辑:秦旭平)