

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0481-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240222

重症肌无力患者外周血单个核细胞中线粒体自噬和凋亡相关基因表达及其诊断价值

蔡东红¹, 李青¹, 柯铃铃¹, 钟慧雅¹, 江其龙², 张涵³, 宋雅芳¹

(1. 广州中医药大学科技创新中心 广州中医药大学脾胃研究所, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院脾胃病科, 广东 广州 510405; 3. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510405)

[摘要] **目的:** 探讨重症肌无力(MG)患者外周血单个核细胞(PBMCs)中线粒体自噬和凋亡相关基因的表达水平, 阐明其对MG诊断的指导价值。**方法:** 收集并提取50名健康对照者(对照组)和50例MG患者(MG组)的PBMCs, 采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法和Western blotting法检测线粒体自噬因子磷脂酶和张力蛋白同源物(PTEN)诱导激酶1(PINK1)、E3泛素连接酶PARK2(Parkin)、泛素结合蛋白62(p62)、微管相关蛋白1轻链3(LC3II)及凋亡因子细胞色素C(Cyt-C)、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶3(caspase 3)和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶9(caspase 9)的mRNA以及蛋白表达水平, 根据mRNA检测结果设定多个不同临界值, 在每个临界值处计算出相应的灵敏度和特异度, 并绘制受试者工作特征(ROC)曲线。**结果:** 与对照组比较, MG组患者PBMCs中的自噬因子PINK1、Parkin和LC3II的mRNA及蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), p62 mRNA和蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 凋亡因子Cyt-C、Bax、caspase 3和caspase 9 mRNA及蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Cyt-C mRNA和蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。ROC曲线检测, PINK1、Parkin、p62和LC3II的ROC曲线下面积(AUC)分别为0.969 6 (95%CI: 0.943 5~0.995 7)、0.944 0 (95%CI: 0.904 7~0.983 3)、0.855 6 (95%CI: 0.776 7~0.934 5)及0.908 8 (95%CI: 0.852 6~0.965 0) ($P<0.01$), 灵敏度分别为92%、92%、78%和84%, 特异度分别为88%、82%、92%和82%; 而Cyt-C、Bax、Bcl-2、caspase 3和caspase 9的AUC均为1.000 ($P<0.01$), 灵敏度和特异度均达到100%。**结论:** MG患者PBMCs中存在线粒体自噬障碍和凋亡增加现象, 其对临床诊断MG具有较高的指导价值。

[关键词] 重症肌无力; 线粒体自噬; 细胞凋亡; 外周血单个核细胞; 诊断价值

[中图分类号] R746.1 **[文献标志码]** A

Expression of mitophagy and apoptosis related genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with myasthenia gravis and its clinical diagnosis value

CAI Donghong¹, LI Qing¹, KE Lingling¹, ZHONG Huiya¹, JIANG Qilong²,
ZHANG Han³, SONG Yafang¹

[收稿日期] 2023-04-21

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82374391); 广东省科技厅自然科学基金面上项目(2023A1515011127); 广东省教育厅生物医药与健康重点领域专项(2021ZDZX2032)

[作者简介] 蔡东红(1992-), 女, 广东省揭阳市人, 医学硕士, 主要从事脾胃病与神经肌肉病的基础与临床方面的研究。

[通信作者] 宋雅芳, 研究员, 博士研究生导师 (E-mail: sallysongyue@163.com)

(1. Science and Technology Innovation Center, Institute of Spleen and Stomach Diseases, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Department of Spleen and Stomach Diseases, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the expression levels of mitochondrial autophagy and apoptosis-related genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in the patients with myasthenia gravis (MG), and to clarify its diagnostic value for MG. **Methods:** The PBMCs from 50 healthy controls (control group) and 50 MG patients (MG group) were collected and extracted. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of mitochondrial autophagy factors phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1 (PINK1), E3 ubiquitin-protein ligase PARK2 (Parkin), ubiquitin-binding protein p62 (p62), microtubule-associated proteins light chain 3 type II (LC3 II), and apoptotic factors cytochrome C (Cyt-C), B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cysteine-containing aspartic acid protease 3 (caspase 3), and cysteine-containing aspartic acid protease 9 (caspase 9) mRNA and protein. Different cut-off values were set based on the mRNA detection results, and the corresponding sensitivity and specificity at each cut-off value were calculated. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn. **Results:** Compared with control group, the expression levels of autophagy factors PINK1, Parkin, and LC3 II mRNA and protein in the PBMCs in MG group were significantly decreased ($P < 0.01$), while the expression levels of p62 mRNA and protein were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression levels of apoptotic factors Cyt-C, Bax, caspase 3, and caspase 9 mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and while the expression levels of Cyt-C mRNA and protein were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression levels of Bcl-2 mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.01$). The ROC curve analysis results showed that the area under the curve (AUC) for PINK1, Parkin, p62, and LC3 II were 0.969 6 (95%CI: 0.943 5–0.995 7), 0.944 0 (95%CI: 0.904 7–0.983 3), 0.855 6 (95%CI: 0.776 7–0.934 5), and 0.908 8 (95%CI: 0.852 6–0.965 0) ($P < 0.01$), respectively, and the sensitivities were 92%, 92%, 78%, and 84%, and the specificities were 88%, 82%, 92%, and 82%, respectively; whereas the AUC for Cyt-C, Bax, Bcl-2, caspase 3, and caspase 9 was 1.000 ($P < 0.01$), and the sensitivity and specificity reached 100%. **Conclusion:** Mitochondrial autophagy disorder and increased apoptosis are found in the PBMCs in the patients with MG, which has a higher guiding value for clinical diagnosis of MG.

KEYWORDS Myasthenia gravis; Mitophagy; Apoptosis; Peripheral blood mononuclear cell; Diagnostic value

重症肌无力 (myasthenia gravis, MG) 是由自身抗体介导的获得性神经-肌肉接头 (neuromuscular junction, NMJ) 传递障碍的自身免疫性疾病^[1]。临床表现为骨骼肌波动性无力及易疲劳, 活动后加重, 休息后可减轻。流行病学研究^[2]显示: MG 的全球年发病率为 (1.0~2.9) /10 万, 患病率为 (10~35) /10 万。目前临床对 MG 的诊断和治疗主要是针对其免疫发病机制, 然而临床上仍有 5%~10% 的血清抗体双阴性 MG 患者诊断不明确, 这给 MG 治疗带来一定的困难^[3]。近年来, MG 的线粒体损伤机制逐渐得到广泛关注。MG 的线粒体形态学改变、能量代谢障碍和融合分裂失衡现象及机制

等均已得到证实。线粒体融合分裂和自噬是线粒体质量控制的核心环节, 两者之间相互影响、相互转化, 此外, 线粒体自噬障碍会进一步导致细胞凋亡。目前 MG 线粒体融合分裂失衡机制已得到证实, 而关于线粒体自噬及凋亡在 MG 发病中的作用机制仍尚未完全阐明^[4-5]。本研究通过探讨 MG 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达的差异, 阐明 MG 患者 PBMCs 中存在线粒体自噬障碍和凋亡增加的现象, 对在临床中协助诊断 MG 具有一定的指导意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集2018年10月—2020年12月于广州中医药大学第一附属医院脾胃病科住院的符合MG诊断标准的50例MG患者作为试验组(MG组),以来自广州中医药大学第一附属医院体检科体检人员和医院工作人员中符合条件的健康对照者共50名作为正常对照组(对照组)。MG诊断标准:符合必备条件,同时至少符合参考条件中的其中一项。必备条件:典型的MG症状,骨骼肌波动性无力和易疲劳,休息可缓解。参考条件:①新斯的明或滕喜龙试验阳性;②肌电生理改变,重复神经电刺激(repetitive nerve stimulation, RNS)呈现衰减现象;单纤维肌电图有Jitter(颤抖)大于55 μ s或阻滞的表现;③抗乙酰胆碱受体抗体试验阳性;④影像学检查发现胸腺增生或肿瘤;⑤疲劳试验阳性。MG患者纳入标准:所有患者年龄为14~75岁,入院第一诊断为MG,并符合Osseman分型中的II型;患者临床资料完整,知情并同意加入本课题,并签署知情同意书。MG患者排除标准:①除MG疾病外,并发其他自身免疫性疾病;②临床资料缺项;③近期发生严重的感染性疾病,或并发较为严重的心脑血管疾病及恶性肿瘤等;④近期发生肌无力危象,以及近3个月内曾使用激素类和(或)免疫抑制剂等方法治疗者;⑤近期曾参与其他临床研究。健康对照者纳入标准:①年龄在14~75岁;②无MG病史,且未并发心肺及精神等疾病;③知情并同意加入本课题。本研究经医院医学伦理委员会批准同意,伦理审批号:NO. ZYYECK [2018] 075,健康对照者和MG患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器 Ficoll-Paque PREMIUM淋巴细胞分离液购自美国GE Healthcare公司,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自中国碧云天公司,全蛋白提取试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自中国凯基生物公司,ECL化学发光液购自美国Bio-Rad公司,anti-B细胞淋巴瘤2(B cell lymphoma 2, Bcl-2)、anti-含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶9(cysteine containing aspartic protease 9, caspase 9)和anti-磷脂酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)诱导激酶1(PTEN-induced putative kinase protein 1, PINK1)、anti-微管相关蛋白1轻链3 II型(microtubule-associated protein 1 light chain 3 type II, LC3 II)和anti-GAPDH购

自美国Abcam公司,anti-含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶3(cysteine-containing aspartic protease 3, caspase 3)、anti-Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 related X protein, Bax)、anti-细胞色素C(cytochrome C, Cyt-C)、anti-E3泛素连接酶PARK2(E3 ubiquitin ligase PARK2, Parkin)和anti-SQSTM1/泛素结合蛋白62(ubiquitin binding protein p62, p62)购自美国CST公司, TB Green™ Premix Ex Taq™ II和PrimeScriPt™ RT Master Mix购自日本TaKaRa公司, TRNzol-A⁺购自中国广茂化学试剂有限公司,正向引物和反向引物购自上海捷瑞生物工程有限公司。高速冷冻离心机(型号:5424R)购自美国Eppendorf公司,酶标仪(型号:800TS)购自美国Bio-Tek公司,电泳系统(型号:1645050)、化学发光成像系统(型号:1708265)和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪(型号:CFX96™)均购自美国Bio-Rad公司,紫外分光光度计(型号:K5500)购自北京凯奥科技发展有限公司。

1.3 外周血采集及单个核细胞的提取 采用EDTA抗凝采血管抽取健康对照者和MG患者空腹外周血约5 mL,采用Ficoll密度梯度离心法淋巴细胞分离液分离PBMCs,置于-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.4 RT-qPCR法检测PBMCs中线粒体自噬和凋亡相关基因表达水平 采用TRIzol法提取PBMCs总RNA,并用紫外分光光度计测量RNA的浓度和纯度。然后严格按照PrimeScriPt™ RT Master Mix Kit说明书将RNA逆转录为cDNA。按照说明书进行荧光定量PCR,所需目的基因引物序列见表1。PCR扩增条件:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火30 s,40个循环。反应结束后观察扩增曲线和溶解曲线。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算自噬和凋亡相关基因mRNA表达水平。

1.5 Western blotting法检测PBMCs中线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达水平 在装有PBMCs的离心管中加入提前配制好的蛋白裂解液提取细胞蛋白,BCA法测定蛋白浓度。按照计算体系加入相应蛋白到10% SDS-PAGE凝胶孔中进行电泳,完成电泳后将凝胶转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h,随后加入一抗4℃孵育过夜,目标蛋白抗体按1:1 000比例稀释,GAPDH按1:5 000比例稀释。回收一抗后,根据一抗动物种

表1 目的基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences of target genes

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
PINK1	GTGGACCATCTGGTTCAACAGG	GCAGCCAAAATCTGCGATCACC
Parkin	CCAGAGGAAAGTCACCTGCGAA	CTGAGGCTTCAAATACGGCACTG
p62	AAGCCGGGTGGGAATGTTG	GCTTGGCCCTTCGGATTCT
LC3 II	AAGGCGCTTACAGCTCAATG	CTGGGAGGCATAGACCATGT
caspase 3	ATTGTGGAATTGATGCGTGA	GGCAGGCCTGAATAATGAAA
caspase 9	GCTGTTCAGGCCCATATGAT	GGACTCACGGCAGAAGTTCA
Bcl-2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCA	TCACTTGTGGCCAGATAGG
Bax	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	GGAGGAAGTCCAATGTCCAG
Cyt-C	GCGTGTCTTGGACTTAGAG	GGCGGCTGTGTAAGAGTATC
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

属分别加入相对应的二抗, 室温下孵育 1.5 h。二抗孵育结束后, 使用凝胶成像系统对目的条带进行曝光, 采用 Image J 软件对条带进行灰度分析定量, 以 GAPDH 为内参蛋白, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.6 PMBC 中线粒体自噬和凋亡相关基因 mRNA 的受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线的绘制 计算曲线下面积(area under curve, AUC), 评估线粒体自噬和凋亡基因对 MG 诊断的灵敏度、特异度及预测价值。约登指数也称正确指数, 约登指数=灵敏度+特异度-1, 约登指数越大说明真实性越大。通过 SPSS 软件计算出所有组别对应的约登指数, 约登指数最大值所对应的即为最佳的指标阈值, 筛选出相应指标所对应的敏感度及特异度。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学分析。2 组研究对象的性别构成比以例数表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 2 组研究对象的年龄, PBMCs 中的 PINK1、Parkin、p62、LC3 II、Cyt-C、Bax、Bcl-2、caspase 3 和 caspase 9 mRNA 及蛋白表达水平符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组研究对象的一般资料 对照组研究对象中男性 25 名, 女性 25 名, 平均年龄为 (40.2 ± 16.0) 岁, MG 组患者中男性 18 例, 女性 32 例, 平均年龄为 (44.2 ± 16.6) 岁。2 组研究对象性别

构成比和年龄分布比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

2.2 2 组研究对象 PBMCs 中线粒体自噬相关基因 mRNA 表达水平 与对照组比较, MG 组患者 PBMCs 中 PINK1、Parkin 和 LC3 II mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 而 p62 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 2 组研究对象 PBMCs 中 PINK1、Parkin、p62 和 LC3 II mRNA 表达水平

Tab. 2 Expression levels of PINK1, Parkin, p62, and LC3 II mRNA of subjects in two groups ($n=50, \bar{x} \pm s$)

Group	PINK1	Parkin	p62	LC3 II
Control	0.969 ± 0.274	0.985 ± 0.286	0.931 ± 0.328	1.037 ± 0.344
MG	0.425 ± 0.166*	0.486 ± 0.198*	1.646 ± 0.535*	0.537 ± 0.198*

* $P < 0.01$ compared with control group.

2.3 2 组研究对象 PBMCs 中凋亡相关基因表达水平 与健康对照组比较, MG 组患者 PBMCs 中 Cyt-C、Bax、Caspase 3 和 Caspase 9 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

2.4 2 组研究对象 PBMCs 中线粒体自噬相关蛋白表达水平 与对照组比较, MG 组患者 PBMCs 中 PINK1、Parkin 和 LC3 II/I 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 而 p62 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.5 2 组研究对象 PBMCs 中凋亡相关蛋白表达水平 与对照组比较, MG 组患者 PBMCs 中 Cyt-C、Bax、caspase 3 和 caspase 9 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平明显降

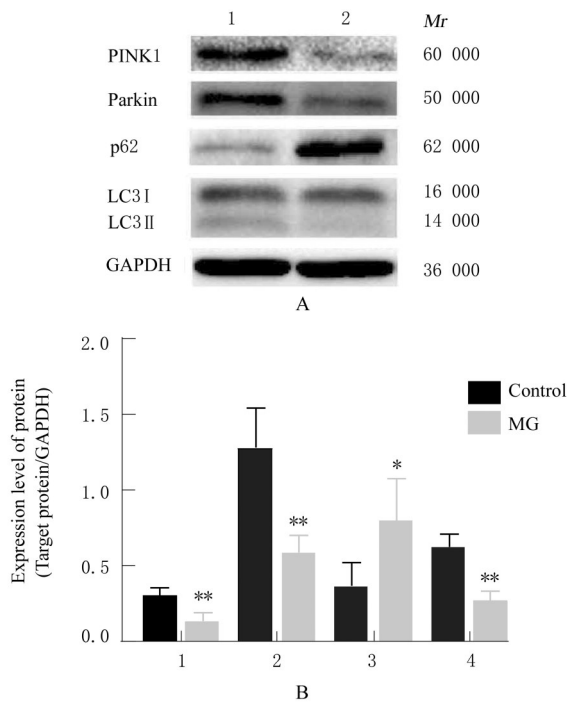
表3 2组研究对象PBMCs中Cyt-C、Bax、Bcl-2、caspase 3和caspase 9 mRNA表达水平

Tab. 3 Expression levels of Cyt-C, Bax, Bcl-2, caspase 3, and caspase 9 mRNA in PBMCs of subjects in two groups

(n=50, $\bar{x} \pm s$)

Group	Cyt-C mRNA	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA	Caspase 3 mRNA	Caspase 9 mRNA
Control	1.000±0.141	1.000±0.147	1.000±0.144	1.000±0.128	1.000±0.129
MG	1.994±0.104*	2.022±0.145*	0.536±0.079*	1.999±0.135*	2.025±0.120*

*P<0.01 compared with control group.



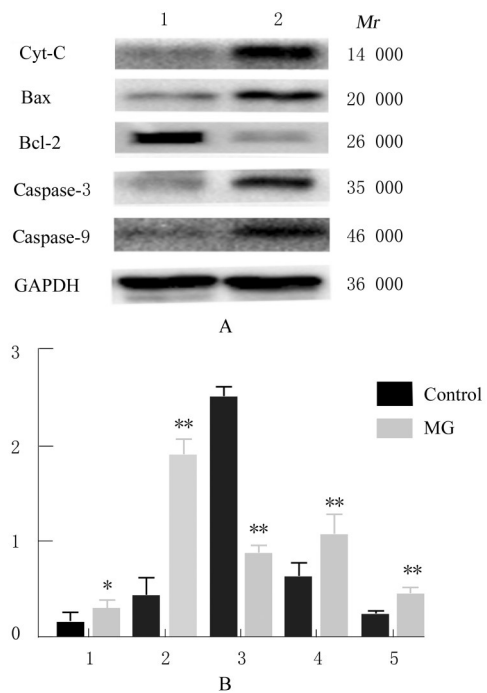
Lane 1: Control group; Lane 2: MG group; 1: PINK1; 2: Parkin; 3: p62; 4: LC3 II / LC3 I. *P<0.05, **P<0.01 vs control group.

图1 2组研究对象PBMCs中PINK1、Parkin、p62和LC3 II/LC3 I蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 1 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of PINK1, Parkin, p62 and LC3 II / LC3 I proteins in PBMCs of subjects in two groups

低 (P<0.01)。见图2。

2.6 2组研究对象PBMCs中线粒体自噬及凋亡相关基因mRNA的ROC曲线 结合约登指数结果, 可得自噬相关基因PINK1、Parkin、p62和LC3 II的灵敏度分别为92%、92%、78%和84%, 特异度分别为88%、82%、92%和82%。凋亡相关基因的灵敏度和特异度均为100%。PINK1、Parkin、p62和LC3 II的AUC分别为0.969 6 (95%CI: 0.943 5~0.995 7)、0.944 0 (95%CI: 0.904 7~0.983 3)、0.855 6 (95%CI: 0.776 7~0.934 5)及0.908 8 (95%CI: 0.852 6~0.965 0) (P<0.01),



Lane 1: Control group; Lane 2: MG group; 1: Cyt-C; 2: Bax; 3: Bcl-2; 4: Caspase 3; 5: Caspase 9. *P<0.05, **P<0.01 vs control group.

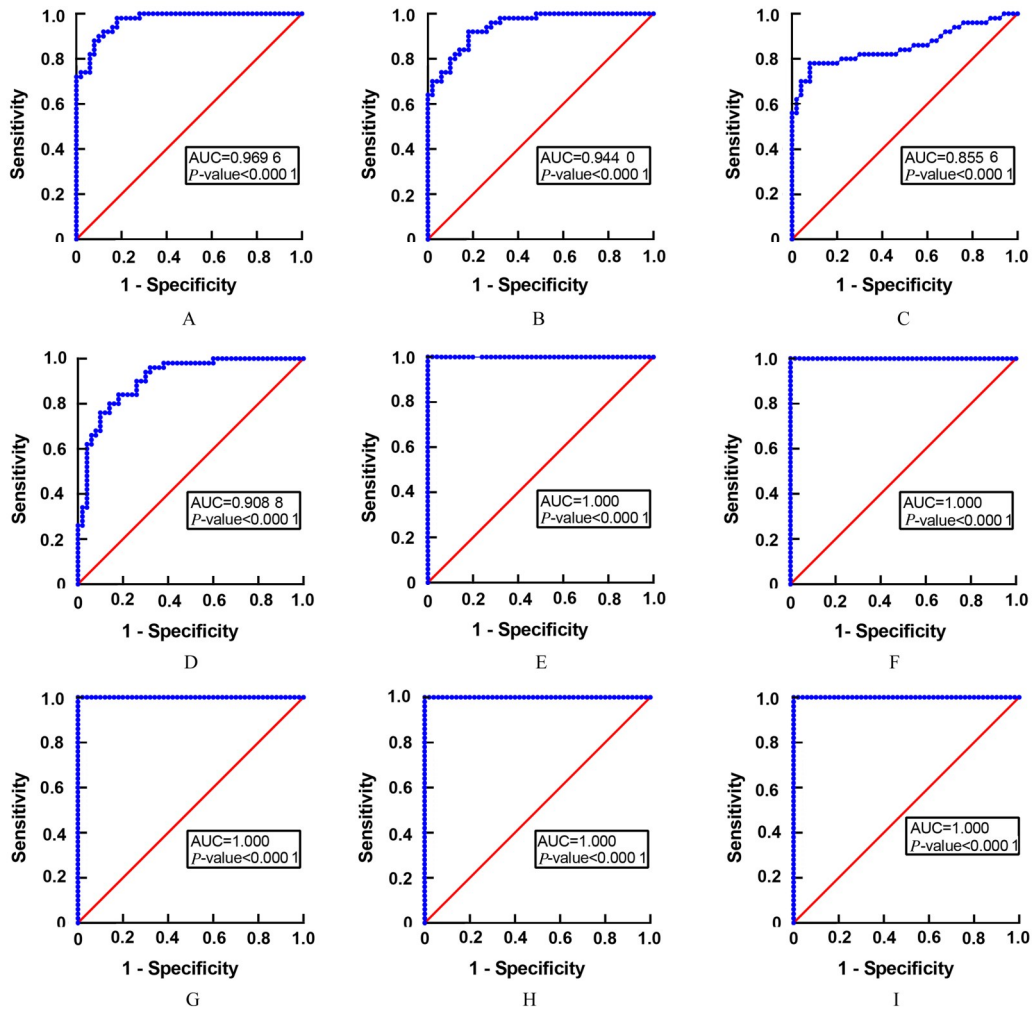
图2 2组研究对象PBMCs中Cyt-C、Bax、Bcl-2、caspase 3和caspase 9蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of Cyt-C, Bax, Bcl-2, caspase 3 and caspase 9 protein in PBMCs of subjects in two groups

而Cyt-C、Bax、Bcl-2、caspase 3和caspase 9的AUC均为1.000 (P<0.01), AUC均大于0.8, 表明线粒体自噬和凋亡相关基因对MG的诊断具有较高的指导价值。见图3。

3 讨论

MG是国内外公认的疑难病, 近年来, MG的线粒体损伤机制研究取得突破。线粒体是细胞生命活动的“动力站”, 对骨骼肌维持正常生理功能、细胞稳态及再生有重要的调节作用^[6]。研究^[7]发现: MG患者PBMCs线粒体动力学的平衡被打破, 线粒体分裂活跃并且出现形态学改变。



A: PINK1; B: Parkin; C: p62; D: LC3 II; E: Cyt-C; F: Bax; G: Bcl-2; H: Caspase 3; I: Caspase 9.

图3 2组研究对象PBMCs中线粒体自噬和凋亡相关基因mRNA的ROC曲线

Fig. 3 ROC curves of mitochondrial autophagy and apoptosis-related gene mRNA in PBMCs of subjects in two groups

TANG等^[8]研究发现MG患者的骨髓干细胞中存在自噬缺陷,并且导致细胞发生凋亡。此外,本课题组前期研究^[4-5]已证实MG患者PBMCs和动物模型中存在线粒体能量代谢障碍及融合分裂失衡等现象,对临床诊断MG具有一定的指导意义。本研究通过检测MG患者PBMCs中的线粒体自噬和凋亡指标的表达水平,进一步探讨线粒体自噬和凋亡与MG发病的相关性,评估其对临床诊断MG的指导价值。

线粒体自噬由LEMASTERS^[9]首次提出,是一种选择性去除受损线粒体的过程,在肌肉的发生过程中对线粒体形态重塑的调节至关重要,其功能障碍会阻止成肌细胞融合成肌管,影响骨骼肌功能,导致肌肉萎缩和肌无力等症状,而PTEN诱导激酶1 (PTEN-induced putative kinase protein 1, PINK1) / E3泛素连接酶PARK2 (Parkin) 通路在成肌细胞分化

的早期即被激活,是调控线粒体自噬的重要通路^[10]。微管相关蛋白1轻链3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 及LC3 I所形成的共轭体LC3 II和泛素结合蛋白p62 (由SQSTM1基因编码,全称sequestosome 1) 作为PINK1和Parkin的下游蛋白,对维持正常线粒体自噬功能起至关重要的作用^[11]。

本研究结果显示:MG患者PBMCs中的线粒体自噬相关基因PINK1、Parkin和LC3 II/LC3 I的mRNA及蛋白表达水平降低,p62 mRNA和蛋白表达水平升高。MUCHA等^[12]研究发现:在杜氏肌营养不良 (duchenne muscular dystrophy, DMD) 患者和动物模型中发现肌营养不良蛋白缺乏主要是由于自噬缺陷,PINK1基因表达水平明显降低,表明PINK1低表达所导致的自噬缺陷参与杜氏肌营养不良 (duchenne muscular dystrophy, DMD)

的发病。SEABRIGHT等^[13]研究发现:在骨骼肌细胞中, Parkin的正常激活可诱导线粒体自噬,从而维持细胞的稳态,当Parkin蛋白表达水平降低时,骨骼肌线粒体出现自噬障碍和功能异常。SMITH等^[14]研究发现在肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)中可以观察到细胞出现大量破碎及圆形的线粒体累积,并且证实该现象是由Parkin功能异常及p62基因缺陷导致自噬缺陷无法清除受损线粒体所引起的。TANG等^[8]研究证实:与健康对照组比较, MG患者的骨髓单个核细胞中LC3 II蛋白表达水平明显降低, p62蛋白表达水平明显升高,表明MG存在线粒体自噬障碍。WANG等^[15]研究发现: MG患者的调节性T淋巴细胞存在线粒体自噬体成熟障碍, LC3 II蛋白表达水平明显低于对照组。

结合上述研究结果发现:在MG、DMD和ALS等神经肌肉病中,线粒体存在自噬功能障碍,从而引起骨骼肌细胞稳态失衡和肌细胞损伤。本研究结果表明:MG患者PBMCs中存在线粒体自噬障碍,进一步证实其与MG发病具有密切的相关性。适当的自噬可通过抑制细胞凋亡实现保护骨骼肌的作用,而过度激活或抑制自噬则可进一步诱导凋亡的发生,促进骨骼肌损伤^[16]。

细胞凋亡是指机体为了维持细胞内环境稳定,由基因控制的程序性细胞死亡。在多数脊椎动物中,线粒体通路是主要的调节形式,是由线粒体、Cyt-C、caspases家族和Bcl-2家族一系列基因共同调控的信号网络^[17]。

Bax和Bcl-2均属于Bcl-2家族蛋白,其中Bax属于促凋亡蛋白,Bcl-2属于抗凋亡蛋白,两者相结合可抑制Cyt-C的释放,抑制细胞凋亡。当线粒体凋亡被激活,Cyt-C从线粒体释放到胞质中启动下游级联反应,激活caspase 9和caspase 3,诱导细胞发生凋亡^[18]。研究^[19]发现:线粒体凋亡信号传导与成肌细胞向多核肌管分化有关,在骨骼肌萎缩的情况下,多核肌纤维中的线粒体凋亡发生改变。

本研究结果显示:凋亡相关基因中Cyt-C、Bax、caspase 3和caspase 9 mRNA及蛋白表达水平升高,Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平降低。TANG等^[8]研究发现:与健康对照组比较, MG组患者的骨髓单个核细胞中Bcl-2蛋白表达水平降低,Bax和caspase 3蛋白表达水平升高,表明MG患者骨髓单个核细胞存在自噬障碍和凋亡增加。李艳等^[20]研究发现:

实验性自身免疫性重症肌无力(experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG)大鼠下丘脑的Bcl-2蛋白表达水平降低,Bax蛋白表达水平升高,而肾上腺摘除后Bcl-2蛋白表达水平降低和Bax蛋白表达水平升高更加显著,表明肾上腺摘除可以增加EAMG大鼠的易感性,促进细胞凋亡,从而加重EAMG大鼠的肌无力症状。CHEN等^[21]研究发现:Fukutin相关蛋白(Fukutin-related protein, FKR)基因相关肌营养不良中自噬溶酶体减少,Bcl-2蛋白表达水平降低,而Bax蛋白表达水平升高。在成肌细胞分化过程中,自噬通过调节线粒体介导的凋亡信号,保护分化成肌细胞免受过度细胞凋亡的影响。RAHMAN等^[19]研究发现:亨廷顿舞蹈症动物模型中表现为骨骼肌质量的显著损失,伴随着Cyt-C、caspase 3和caspase 9蛋白活性的升高,说明凋亡增加是该病的重要发病机制。研究^[19]发现:在C2C12成肌细胞中,caspase 9蛋白活性升高会影响成肌细胞的分化,通过抑制caspase 9蛋白的活性可以改善自噬缺陷成肌细胞的分化。AVRUTSKY等^[22]研究证明:caspase 9蛋白上调与慢通道综合征(slow-channel syndrome, SCS)存在的肌无力障碍相关,这是一种由乙酰胆碱受体突变引起的综合征。

适度的细胞凋亡,尤其是caspase通路的激活是骨骼肌发育所必需的。过度激活的凋亡信号导致成肌细胞分化失败,诱导细胞死亡^[21]。结合以上研究结果,说明自噬功能障碍可促进细胞发生凋亡,从而引起肌细胞损伤和肌营养不良等发生,导致骨骼肌失能以及参与神经肌肉病的发病。MG患者PBMCs的凋亡相关基因表达水平异常上升提示MG中可能存在凋亡现象,结合其ROC曲线结果可以得出,凋亡相关指标对诊断MG具有较高的灵敏度、特异度和诊断价值。

综上所述,与对照组比较, MG组患者PBMCs中线粒体自噬和凋亡相关基因表达异常,表明MG患者PBMCs中存在线粒体自噬障碍和凋亡增加。ROC曲线提示自噬和凋亡相关基因在诊断MG中具有较高的灵敏度和特异度,AUC均大于0.8,表明线粒体自噬和凋亡相关基因在临床诊断MG中具有较高的指导价值。虽然肌肉活检和病理检查是诊断MG肌细胞损伤的金标准,然而,考虑肌肉活检为有创检查,临床诊断MG不建议常规进行肌肉活检,而MG患者PBMCs简单易得且创伤小,具有

较高的可接受度,值得广泛推广。因此,临床可通过检测MG患者血清PBMCs中的线粒体自噬和凋亡基因的mRNA和蛋白表达水平来指导诊断MG,提高临床诊断MG的准确性,可对目前MG的发病机制和诊断方法起到补充作用,同时,线粒体自噬和凋亡作为线粒体损伤机制的重要组成部分,可作为未来治疗MG的潜在新靶点。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

宋雅芳和江其龙负责实验和论文的整体设计,蔡东红负责实验实施和论文撰写,江其龙、李青和柯铃铃负责病例的收集及样本的采集以及实验实施,张涵、钟慧雅和蔡东红负责数据的统计学分析。

[参考文献]

- [1] 常 婷. 中国重症肌无力诊断和治疗指南(2020版)[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2021, 28(1): 1-12.
- [2] PUNGA ANNA ROSTEDT, MADDISON PAUL, HECKMANN HEANNINE M, et al. Epidemiology, diagnostics, and biomarkers of autoimmune neuromuscular junction disorders [J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(2): 176-188.
- [3] HUIJBERS M G, MARX A, PLOMP J J, et al. Advances in the understanding of disease mechanisms of autoimmune neuromuscular junction disorders [J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(2): 163-175.
- [4] LI L Q, CAI D H, ZHONG H Y, et al. Mitochondrial dynamics and biogenesis indicators may serve as potential biomarkers for diagnosis of myasthenia gravis[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(4): 307.
- [5] JIAO W, HU F Y, LI J Q, et al. Qiangji Jianli Decoction promotes mitochondrial biogenesis in skeletal muscle of myasthenia gravis rats via AMPK/PGC-1 α signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110482.
- [6] 沈 洁, 臧海生, 徐蓓峥, 等. 重症肌无力的中西医治疗进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(36): 4089-4094.
- [7] 岳冬曰. 重症肌无力患者线粒体损害的初步研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [8] TANG J Q, YE Z M, LIU Y, et al. Autophagy-deficiency in bone marrow mononuclear cells from patients with myasthenia gravis: a possible mechanism of pathogenesis[J]. *Int J Neurosci*, 2021, 131(3): 239-253.
- [9] LEMASTERS J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. *Rejuvenation Res*, 2005, 8(1): 3-5.
- [10] HUANG S Y, WANG X N, YU J L, et al. LonP1 regulates mitochondrial network remodeling through the PINK1/Parkin pathway during myoblast differentiation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(6): C1020-C1028.
- [11] LIZAMA B N, CHU C T. Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82: 100972.
- [12] MUCHA O, KAZIRÓD K, PODKALICKA P, et al. Dysregulated autophagy and mitophagy in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy remain unchanged following heme oxygenase-1 knockout[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 470.
- [13] SEABRIGHT A P, LAI Y C. Regulatory roles of PINK1-parkin and AMPK in ubiquitin-dependent skeletal muscle mitophagy[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 608474.
- [14] SMITH E F, SHAW P J, DE VOS K J. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 710: 132933.
- [15] WANG N, YUAN J, KARIM M R, et al. Effects of mitophagy on regulatory T cell function in patients with myasthenia gravis[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 238.
- [16] 贡 歌, 杨 翔, 殷 建, 等. 自噬和凋亡在肌少症中的研究进展[J]. *中国医学科学院学报*, 2018, 40(1): 112-115.
- [17] SUN Y H, SU Q, LI L, et al. miR-486 regulates cardiomyocyte apoptosis by p53-mediated BCL-2 associated mitochondrial apoptotic pathway [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2017, 17(1): 119.
- [18] OBENG E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review[J]. *Rev Brasleira De Biol*, 2021, 81(4): 1133-1143.
- [19] RAHMAN F A, QUADRILATERO J. Mitochondrial apoptotic signaling involvement in remodeling during myogenesis and skeletal muscle atrophy[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2023, 143: 66-74.
- [20] 李 艳, 何前松, 况时祥, 等. HPA轴损伤对实验性重症肌无力大鼠易感性的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(1): 63-67.
- [21] CHEN W, CHEN Y S, LIU Y X, et al. Autophagy in muscle regeneration: potential therapies for myopathies [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(3): 1673-1685.
- [22] AVRUTSKY M I, TROY C M. Caspase-9: a multimodal therapeutic target with diverse cellular expression in human disease [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 701301.