论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0898-03

TNIP1基因及其编码蛋白ABIN1在进行期寻常型银屑病中的表达及意义

张 娜,阎 衡,张东梅,陈 艳,郝 飞 (400038 重庆,第三军大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所)

[摘要] **目的** 研究TNFα诱导蛋白3相互作用蛋白1(TNFα-induced protein 3-interacting protein 1,TNIP1) mRNA及其编码蛋白在进行期寻常型银屑病患者体内的表达水平,探讨其在银屑病发病机制中的意义。**方法** 研究分为两组,病例组为2011年10月至2012年4月我院皮肤科收治的进行期寻常型银屑病患者25例,男性13例,女性12例,年龄(33.0±8.3)岁;健康对照组为我院体检中心健康人群共25例,男性14例,女性11例,年龄(31.3±9.9)岁。通过荧光定量PCR和Western blot检测TNIP1 mRNA及其编码蛋白ABIN1在病例组和对照组外周血淋巴细胞中的表达,免疫组化染色法检测ABIN1蛋白在患者皮损和健康对照者皮肤中的定位和表达。**结果** 病例组外周血淋巴细胞中TNIP1 mRNA的相对表达量(0.292 1±0.101 6)显著低于健康对照组(1.085 9±0.266 3)($P<0.05$),ABIN1蛋白在病例组外周血淋巴细胞中的表达(0.093 2±0.003 9)与健康对照组(0.290 9±0.057 8)相比也有显著差异($P<0.05$)。ABIN1蛋白主要表达在健康对照者皮肤的表皮层,且主要表达在细胞核外,病例组皮损中ABIN1蛋白的表达明显减少。**结论** 银屑病患者TNIP1 mRNA及其蛋白的低表达可能与银屑病的发生、发展有密切的联系。

[关键词] TNIP1;ABIN1;寻常型银屑病;免疫印迹;RT-PCR;免疫组化
[中图法分类号] R392.2; R446.6; R758.63 [文献标志码] A

Expression profiles and significance of TNIP1 and its coding protein ABIN1 in advanced vulgaris psoriasis

Zhang Na, Yan Heng, Zhang Dongmei, Chen Yan, Hao Fei (Department of Dermatology, Chongqing Institute of Dermatovenereology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the difference of the expression of TNFα-induced protein 3-interacting protein 1 (TNIP1) and its coding protein, A20-binding inhibitor of NF-κB activation (ABIN-1) between patients suffering from vulgaris psoriasis and health individuals in order to figure out the role of TNIP1 in the progress of vulgaris psoriasis. **Methods** Twenty-five psoriasis patients (13 males and 12 females, mean age of 33.0±8.3) admitted to our department from October 2011 to April 2012 were enrolled. Twenty-five healthy control subjects (14 males and 11 females, mean age of 31.3±9.9) were subjected from the department of physical examination of our hospital. There was no significant difference between these 2 groups in age or gender. The mRNA expression of TNIP1 and the expression of its translational protein ABIN1 in the peripheral lymphocyte were detected by QRT-PCR and Western blotting. Immunohistochemical assay was also employed to study the expression of ABIN1 in the skin. **Results** The expression of TNIP1 mRNA in the peripheral lymphocyte was notably lower in vulgaris psoriasis group than the healthy control (0.292 1±0.101 6 *vs* 1.0859±0.266 3, $P<0.05$). The expression of ABIN1 in the peripheral lymphocyte was also remarkably lower in vulgaris psoriasis group (0.093 2±0.003 9) than the healthy group (0.290 9±0.057 8, $P<0.05$). Besides, ABIN1 protein was over-expressed in the epidermis and mainly in the extranuclear in normal skin, but its expression level was very low in skin lesion of patients. **Conclusion** Mild expression of TNIP1 and ABIN1 might be related to the pathogenesis of vulgaris psoriasis.

[**Key words**] TNIP1; ABIN1; vulgaris psoriasis; Western blotting; QRT-PCR; immunohistochemistry

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81101200). Corresponding author: Hao Fei, Tel: 86-23-68765917; E-mail: haofei62@medmail.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(81101200)
[通信作者] 郝 飞,电话:(023)68765917,E-mail:haofei62@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1105.016.html(2013-03-21)

银屑病的病因和发病机制尚不十分清楚,目前公认银屑病是遗传和环境因素共同作用的结果,免疫介导的炎症反应是其主要的病理机制[1]。TNFα诱导蛋白3相互作用蛋白1(TNFα-induced protein 3-interac-

ting protein 1,TNIP1)基因是一种新型的内源性炎症调控因子。近年来开展的全基因组关联研究(Genome-wide association study,GWAS)发现,TNIP1 是中国和欧美银屑病患者的易感基因,其单个核苷酸的遗传多态性与银屑病的发病相关[2-4]。研究证实,TNIP1 不仅参与炎症介导的反应过程,也参与免疫功能的调节[5]。为此,本研究拟采用免疫印迹和 RT-PCR 法检测 TNIP1 及其编码蛋白 A20 结合抑制 NF-κB 激活因子(A20-binding inhibitor of NF-κB activation, ABIN-1)在寻常型银屑病患者和健康对照者外周血淋巴细胞中的表达差异,同时通过免疫组化染色检测 ABIN1 蛋白在患者皮损和健康对照者皮肤中的分布和表达,初步探讨 TNIP1 介导银屑病发病的可能机制。

1 资料与方法

1.1 病例资料

本研究获第三军医大学西南医院伦理委员会批准,并与受试者签署知情同意书后进行,试验共分为 2 组。病例组为 2011 年 10 月至 2012 年 4 月我院皮肤科收治的寻常型银屑病患者 25 例,其中男性 13 例,女性 12 例,年龄(33.0 ± 8.3)岁,符合以下标准:①汉族,年龄区段为 18 ~ 60 岁;②临床明确诊断为寻常型银屑病(进行期);③根据《银屑病皮疹面积和严重程度评分法》[6](PASI)皮损严重程度为中度;④无银屑病性关节炎;⑤就诊前 3 个月内无系统药物治疗史;⑥近期无其他疾病和相关药物的应用史。健康对照 25 例,其中男性 14 例,女性 11 例,年龄(31.3 ± 9.9)岁,汉族,年龄 20 ~ 55 岁,为我院体检中心健康人群,血尿常规、肝肾功等检测均正常。病例组和健康对照组性别(P = 0.777)、年龄(P = 0.509)分布平衡,均无统计学差异。

采集患者及健康志愿者外周静脉血 6 mL 用于 RT-PCR 和免疫印迹检测。随机选取 6 名患者活检切取皮损处 2 cm × 1 cm 大小皮肤组织,同时在 4 名健康对照者相同部位取材(健康对照者为我科就诊行病理活检的其他患者,经病理活检证实为正常皮肤组织,且排除银屑病及其他炎症性疾病),用于免疫组化检测。

1.2 主要材料与试剂

PCR System7500 为 Applied Biosy Stems 产品,低温离心 Centrifuge 5417R 机购于 eppendorf 公司,Dec2000 凝胶成像系统为 Bio-Rad 产品。Rever Tre Ace-a-反转录试剂盒购于 TOYOBO 公司,2 × PCR Mix *Taq*、TRNzol 试剂、RIPA 裂解液购于北京天根公司,人外周血淋巴细胞分离液购于天津灏洋公司。

1.3 RT-PCR 检测

分离外周血淋巴细胞,用 TRNzol 法提取总 RNA;用反转录试剂盒反转录为 cDNA 后,PCR 扩增 TNIP1 和 β-actin 基因片段,引物由 Invitrogen 公司合成,分别为:TNIP1 上游 5′-CAGAATGAGTTGCTGAAACA-3′,下游:5′-TCTCCTCATCTTTGAATGCT-3′,共合成长度 175 bp;β-actin 上游:5′-CAACCAACTGGGACGACAT-3′,下游:5′-GCACAGCCTGGATAGCAAC-3′,扩增产物长度为 159 bp。以 β-actin 的引物作为内参对照。反应条件:94 ℃变性 5 min;94 ℃变性 30 s、57 ℃退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s,共进行 30 个循环;末次循环后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物凝胶成像,电泳图像采用 Dec 2000 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)分析。

1.4 QRT-PCR 检测

首先提取 RNA,反转录成 cDNA。接着进行 QRT-PCR。反应体系为:SYBR Premix Ex *Taq*(2 ×) 10 μL,TNIP1 上下游引物(10 μmol/L)各1 μL,β-Actin 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,cDNA 稀释后取 1 μL,补超纯水至 20 μL。每个样品设 3 复孔,置于 Bio-Rad real time PCR 仪扩增,QRT-PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 1 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,扩增 40 个循环(实时定量);95 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,55 ℃ 10 s 81 个循环(溶解曲线),用参照基因的$^{\triangle}$Ct 法计算基因的相对表达量。

1.5 Western blot 检测

分离外周血淋巴细胞,按细胞总蛋白提取方法提取总蛋白,取 10 μL 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离,电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶 37 ℃封闭 2 h。1∶500 稀释的 TNIP1 抗体(14990382,EB)4 ℃孵育过夜,TBST 溶液漂洗 3 次后加入 1∶1 000 稀释的二抗室温孵育 2 h,TBST 溶液洗涤 3 次,ECL 试剂发光,凝胶成像系统中扫描图像,最后用 Image Pro Plus 4.5 分析软件分析条带积分光密度值(integrated optical density,IOD)。

1.6 免疫组化检测

活检组织在 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜,梯度乙醇中脱水,经二甲苯透明、石蜡包埋后切片。切片组织进行热抗原修复,经 3% H_2O_2、2% 山羊血清封闭处理后孵育抗体,1∶200 稀释的一抗 TNIP1(14990382,EB)4 ℃过夜,1∶200 稀释的山羊抗小鼠抗体室温孵育 1 h,滴加辣根酶标记链霉卵白素(HRP)工作液室温孵育 1 h,DAB 显色后先后经苏木精复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗的切片作为阴性对照。显微镜下观察,任选取 5 个视野采图,用 Image Pro Plus 4.5 软件测定平均积分吸光度值(average integrated optical density,AIOD)进行半定量分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组样本间的比较采用独立样本 t 检验;计数资料采用 Pearson χ^2 检验;检验水平为 $\alpha = 0.05$。

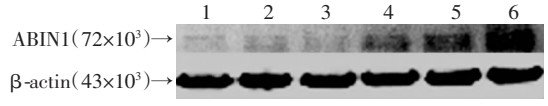
2 结果

2.1 TNIP1 mRNA 在进行期银屑病患者和健康对照者外周血淋巴细胞中的表达比较

RT-PCR 检测结果显示病例组的表达量要低于对照组。进一步通过 QRT-PCR 研究,结果表明 TNIP1 mRNA 在进行期银屑病患者外周血淋巴细胞中的相对表达量(0.292 1 ± 0.101 6)与健康对照组(1.085 9 ± 0.266 3)相比显著降低,差异具有统计学意义(P < 0.05)。

2.2 ABIN1 蛋白在进行期银屑病患者和健康对照者外周血淋巴细胞中的表达差异

Western blot 检测结果表明病例组(IOD = 0.093 2 ± 0.003 9)与健康对照组(IOD = 0.290 9 ± 0.057 8)相比,ABIN1 的表达水平显著降低,差异具有统计学意义(P < 0.05),见图 1。

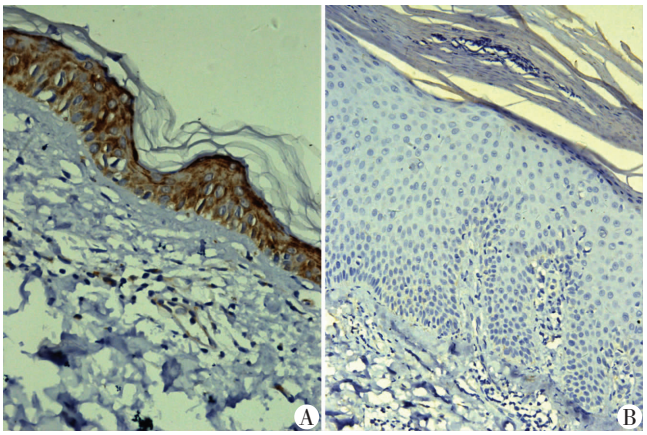


1 ~ 3:病例组;4 ~ 6:对照组

图 1 Western blot 检测病例组和对照组外周血淋巴细胞中 ABIN1 蛋白的表达

2.3 ABIN1在患者皮损和正常对照者皮肤中的分布和表达

免疫组化结果显示,进行期寻常型银屑病患者表皮角化过度伴角化不全,部分可见Munro微脓肿,棘层增生肥厚,表皮突伸长增厚,真皮乳头位置上移,真皮浅层毛细血管增生、扩张,ABIN1表达很低甚至无表达。正常对照组皮肤组织中,ABIN1高表达于表皮各层细胞,且主要表达于细胞核外,真皮层亦可见少量阳性细胞,见图2。



A:对照组;B:病例组

图2 免疫组化检测银屑病病例组及正常皮肤组织中ABIN1蛋白的表达和分布 (S-P ×400)

3 讨论

银屑病是一种具有复杂遗传背景的多基因疾病,近年来开展的全基因组关联研究(genome-wide association studies,GWAS)已发现多个银屑病的易感基因位点。其中,位于人5号染色体的TNIP1(TNFAIP3 interacting protein1,TNIP1)基因已被研究证实与欧美和中国人群的银屑病相关[2,7]。TNIP1基因位于人染色体5q32-33.1上,含18个外显子,其mRNA表达于多个组织中,尤其是在淋巴细胞、脾脏、骨骼肌呈高表达,与细胞分化、凋亡和炎症反应调节密切关联[8-10]。Elder等[8]研究认为TNIP1的遗传突变可能通过NF-κB通路负向调节炎症信号通路。TNIP1编码的蛋白被称为ABIN-1,ABIN1和A20相互作用可抑制NF-κB信号通路的活化,影响下游的信号转导,最终抑制炎症反应[3]。TNIP1也可独立调节NF-κB通路,研究证实TNIP1突变体在细胞中共表达时可以干扰其对NF-κB的抑制活性,且不依赖于A20。此外,研究还发现,TNIP1 mRNA在静息性T细胞(resting T lymphocytes)表达水平是低的,在活化的CD4+/CD8+ T细胞表达是升高的,表明TNIP1表达上调与T细胞活化相关。由此可见,TNIP1不仅影响TNF介导的炎症反应过程,也可能参与免疫功能的调节[3]。但到目前为止,有关TNIP1参与银屑病等自身免疫性疾病发病的遗传学基础及其机制尚缺乏研究。

本研究发现,与正常对照相比,TNIP1 mRNA及其编码蛋白ABIN1在进行期寻常型银屑病患者外周血淋巴细胞和皮损内的表达均显著降低,提示TNIP1在银屑病中的作用,可能始发于转录水平,进而影响到蛋白水平的变化而发挥作用;TNIP1的低表达可能是导致银屑病患者NF-κB通路活性增强、免疫炎症反应过度的原因[11]。2009年,Nair等[12]报道TNIP1 mRNA在银屑病患者中的表达高于正常对照,在患者皮损区的表达也高于非皮损区。分析其原因可能有:Nair等[12]的研究未报道受试者银屑病皮损严重程度分级结果,且研究对象是欧洲人群;本研究是中国汉族人群,TNIP1在不同种族中的表达可能不一致;此外,结果差异还可能是抗体或试验环境不同所致。

参考文献:

[1] [1] Elder J T, Bruce A T, Gudjonsson J E, *et al*. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology[J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(5):1213-1226.

[2] Sun L D, Cheng H, Wang Z X, *et al*. Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population[J]. Nat Genet, 2010, 42(11): 1005-1009.

[3] Elder J T. Genome-wide association scan yields new insights into the immunopathogenesis of psoriasis[J]. Genes Immun, 2009, 10(3): 201-209.

[4] Chandran V. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis[J]. Indian J Dermatol, 2010, 55(2): 151-156.

[5] Gurevich I, Zhang C, Francis N, *et al*. TNIP1, a retinoic acid receptor corepressor and A20-binding inhibitor of NF-κB, distributes to both nuclear and cytoplasmic locations[J]. J Histochem Cytochem, 2011, 59(12): 1101-1112.

[6] 张长宋, 陈树民. PASI临床指标可靠性评价[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2002, 18(2): 120-121.

[7] Li Y, Begovich A B. Unraveling the genetics of complex diseases: susceptibility genes for rheumatoid arthritis and psoriasis[J]. Semin Immunol, 2009, 21(6): 318-327.

[8] Gaultier A, Arandjelovic S, Niessen S, *et al*. Regulation of tumor necrosis factor receptor-1 and the IKK-NF-kappaB pathway by LDL receptor-related protein explains the antiinflammatory activity of this receptor[J]. Blood, 2008, 111(11): 5316-5325.

[9] Verstrepen L, Carpentier I, Verhelst K, *et al*. ABINs: A20 binding inhibitors of NF-kappa B and apoptosis signaling[J]. Biochemical Pharmacol, 2009, 78(1): 105-114.

[10] Moynagh P N. The NF-kappaB pathway[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 20): 4589-4592.

[11] Cuaz-Perolin C, Billiet L, Bauge E, *et al*. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-kappaB inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE-/- mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(2): 272-277.

[12] Nair R P, Duffin K C, Helms C, *et al*. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways[J]. Nat Genet, 2009, 41(2): 199-204.

(**收稿**:2012-11-12;**修回**:2013-03-06)

(编辑 栾 嘉)