

·临床研究·

IL-10在系统性红斑狼疮患者PBMC B细胞刺激因子表达中的作用

叶玉津, 梁柳琴, 许韩师, 杨岫岩, 詹钟平, 连帆, 尹培达
(中山大学附属第一医院风湿科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血单个核细胞(PBMCs)B细胞刺激因子(Blys)基因和蛋白在体外的表达及IL-10对其表达的影响。【方法】梯度密度离心法分离25例系统性红斑狼疮患者和20名女性健康志愿者外周血单个核细胞,分为2组,IL-10(100 ng/mL)组和培养基组(仅含RPMI1640培养基),分别于培养0、6、12、24、72 h离心收集PBMCs,RT-PCR法检测刺激后0-24 h细胞Blys mRNA表达,流式细胞仪和直接免疫荧光法检测72 h膜结合型Blys蛋白表达。【结果】系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞Blys mRNA和蛋白表达体外高于健康对照($P < 0.001$)。IL-10显著增强健康对照和系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞Blys mRNA表达,12 h作用最强(0.487 ± 0.058 vs 0.251 ± 0.050 , $P < 0.001$; 0.638 ± 0.084 vs 0.392 ± 0.059 , $P < 0.001$)。IL-10显著增强健康对照和系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞膜结合型Blys蛋白表达(FACs, 4.53 ± 0.71 vs 3.24 ± 0.57 , $P < 0.001$; 5.79 ± 0.91 vs 4.55 ± 0.83 , $P < 0.001$)。直接免疫荧光法检测外周血单个核细胞膜结合型Blys蛋白显示,IL-10刺激后Blys表达增强。【结论】IL-10可上调系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞Blys基因和蛋白表达。

关键词: 系统性红斑狼疮; B淋巴细胞刺激因子; IL-10; 外周血单个核细胞

中图分类号: R593.24

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0054-05

Role of Interleukin-10 on Expression of B Lymphocyte Stimulator in Peripheral Blood Mononuclear Cells of SLE Patients

YE Yu-jin, LIANG Liu-qin, XU Han-shi, YANG Xiu-yan, ZHAN Zhong-ping, LIAN Fan, YIN Pei-da
(Department of Rheumatology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To determine the expression of membrane-bound B lymphocyte stimulator (Blys) protein and its mRNA in vitro of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from systemic lupus erythematosus (SLE) patients, and to investigate the role of interleukin-10 (IL-10) on the expression of Blys. 【Methods】PBMCs were obtained from 25 SLE patients and 20 healthy volunteers. They were randomized into IL-10 (100 ng/mL) group and media group. PBMCs were collected at 0, 6, 12, and 24 h for Blys mRNA assessment using semi-quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR). PBMCs were also collected at 72 h for membrane-bound Blys protein detection using flow cytometry and direct immunofluorescence. 【Results】The expression of Blys mRNA and membrane-bound protein in PBMCs was significantly higher in SLE patients than healthy controls in vitro ($P < 0.001$). IL-10 enhanced Blys mRNA expression in PBMCs in both healthy controls and SLE patients, with the greatest effect at 12 h (0.487 ± 0.058 vs 0.251 ± 0.050 , $P < 0.001$; 0.638 ± 0.084 vs 0.392 ± 0.059 , $P < 0.001$). IL-10 also increased the expression of membrane-bound Blys protein in both healthy controls and SLE patients (FACs, mean fluorescence intensity, 4.53 ± 0.71 vs 3.24 ± 0.57 , $P < 0.001$; 5.79 ± 0.91 vs 4.55 ± 0.83 , $P < 0.001$). Direct immunofluorescence by confocal micrography also indicated that IL-10 increase the expression of membrane-bound Blys protein. 【Conclusion】In vitro, the expression of Blys mRNA and membrane-bound protein was elevated in SLE patients, and IL-10 had positive effects on its expression.

Key words: systemic lupus erythematosus; B lymphocyte stimulator; IL-10; peripheral blood mononuclear cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 54-58]

收稿日期: 2006-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070717)

作者简介: 叶玉津(1973-), 女, 广东龙川人, 主治医师, 博士; 梁柳琴, 副教授, 通讯作者. E-mail: liangliuqin@tom.com

B淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulat, or Blys)^[1-3], 是近年发现的一种与免疫相关的细胞因子, 属 TNF 配体超家族新成员, 对 B 细胞具有强的促增殖、分化和分泌抗体作用。研究显示, Blys 转基因鼠可出现狼疮样症状^[4]; 狼疮鼠模型(MRL/MP- Lpr/Lpr 和 NZB/WF1)中^[5], 随时间延长及疾病进展, Blys 水平进行性升高, 且与狼疮鼠肾损害有关, 用可溶性 Blys 受体治疗可显著延长狼疮鼠存活期。除实验动物外, 系统性红斑狼疮患者也表现出血浆可溶性 Blys 明显升高^[6,7]。Blys 表达增强可能引起狼疮患者体内 B 细胞过度增殖, 产生大量自身抗体, 形成免疫复合物并沉积, 从而导致组织器官损害^[4], 所以 Blys 在红斑狼疮疾病发生和发展中起重要作用。目前关于 Blys 作用信号途径的研究显示, Blys 主要通过受体 BR3 相结合^[8], 诱导与 NF- κ B(NF- κ B)有关的抗凋亡活性, 导致 Bcl-2 家族蛋白间的比例改变, 主要是下调凋亡前蛋白 Bax 而上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL, 从而减少 B 细胞的凋亡, 影响其生长发育^[9,10]。但调节系统性红斑狼疮 Blys 表达上游因素的研究罕见。本文在体外检测狼疮患者外周血单个核细胞 Blys 基因和蛋白表达, 探讨 IL-10 对 Blys 表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

25 例系统性红斑狼疮患者, 为来自 2003 年 10 月至 2004 年 7 月广州中山大学附属第一医院住院和门诊病人, 均符合 1982 年美国风湿病协会制定的诊断标准, 男 2 例, 女 23 例, 年龄(31 \pm 14)岁; 20 名健康志愿者, 均为女性, 年龄(28 \pm 10)岁。两组年龄、性别无显著性差异。

1.2 细胞处理及分组

抽取系统性红斑狼疮患者和健康人静脉血 10 mL 注入含 50 μ L 肝素的无菌离心管, 梯度密度离心法提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear, PBMCs), 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度为 1 \times 10⁶/mL 待用。在 24 孔培养板中加入 PBMCs, 每孔 1 mL, 每份标本分 2 组, 每组 5 孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4 h 后, 第 1 组加入 IL-10(100 ng/mL, Sigma 公

司), 第 2 组为对照组(仅含 RPMI 1640 培养基)。分别于培养 0、6、12、24 h 离心收集第 1 至第 4 孔 PBMCs 用于 Blys mRNA 的检测。于 72 h 离心收集第 5 孔 PBMCs 用于膜结合型 Blys 蛋白检测。每孔细胞均进行台盼蓝拒染法检测细胞活力(活细胞达 90%)。

1.3 PBMCs Blys mRNA 表达

按照 Trizol 试剂盒说明分别提取培养 0、6、12、24 h 后 PBMCs 总 RNA。半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR): 根据 RT 试剂盒(MBI 公司)说明书逆转录合成 cDNA 作为 PCR 模板。RT-PCR 引物序列(Blys 正链 5'-ACA GAA AGG GAG CAG TCA CG-3', 负链 5'-AAC GGC ACG CTT ATT TCT GCT-3' (393 bp); 内参照 -actin 正链 5'-GGA TTC CTA TGT GGG CGA CG-3', 负链 5'-GGA ACC GCT CAT TGC CAA TG-3' (617 bp))(上海生物工程公司)。PCR 扩增反应体系(25 μ L): 去离子水 15.25 μ L, 10 \times 缓冲液 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, Blys 正负链引物混和液 2.5 μ L, Tag DNA 聚合酶 0.25 μ L, DNA 模板 1.5 μ L。95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 数码凝胶图像分析系统作条带密度扫描, 结果以 Blys 与 -actin 的比值(A_{Blys}/A_{-actin} 值)表示。

1.4 流式细胞仪检测 PBMCs 膜结合型 Blys 蛋白表达

收集培养 72 h PBMCs, 0.5 g/100 mL 多聚甲醛固定 10 min, 加破膜剂, 室温 15 min, 加 PE 标记的抗人 Blys 单抗(R&D 公司) 100 μ L, 室温 20 min, PBS 洗涤 2 次后上机检测。

1.5 直接免疫荧光法检测 Blys 蛋白表达

取 1 滴 PBMCs 悬液(1 \times 10⁶/mL) 滴于载玻片上, 均匀涂开, 风干后置于冰丙酮中固定。10 g/100 mL 牛血清白蛋白 15 μ L 阻断 30 min。加抗人 Blys 单抗 15 μ L, 避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 于镜下检测。

1.6 统计学处理

数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 SPSS13.0 统计分析软件包进行数据分析; SLE 和对照组间及不同时间点间的差异采用重复测量资料的方差分析比较。流式细胞仪检测结果采用析因设计资料的方差分析比较。

2 结果

2.1 培养基组 PBMCs Blys mRNA 表达

不加刺激剂的培养基组 (只含有培养基) 中, PBMCs Blys mRNA 在 0、6、12 和 24 h 不同时点的表达差异无统计学意义, 狼疮患者 Blys mRNA 表达在不同时点高于健康对照 (表 1, 图 1)。

表 1 培养基组 PBMCs Blys mRNA 表达

	n	0 h	6 h	12 h	24 h
SLE patient	25	0.384 ± 0.045 ¹⁾	0.401 ± 0.051 ¹⁾	0.420 ± 0.079 ¹⁾	0.419 ± 0.060 ¹⁾
Healthy control	20	0.266 ± 0.046	0.258 ± 0.063	0.275 ± 0.050	0.292 ± 0.098

SLE: systemic lupus erythematosus

1) Compared with healthy controls, F = 148.64, P < 0.001

2.2 IL-10 刺激组 PBMCs Blys mRNA 的表达

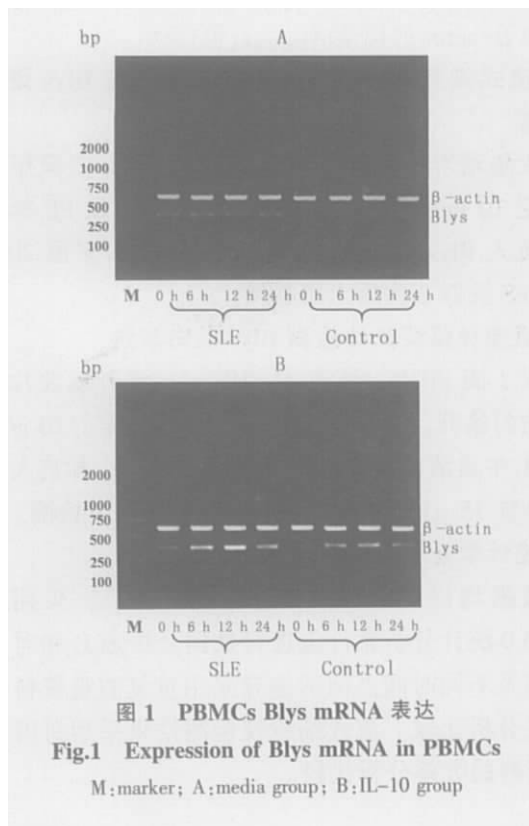
不同时间点间 PBMCs Blys mRNA 表达的差别具有统计学意义。IL-10 刺激后, 系统性红斑狼疮患者和健康对照 PBMCs Blys mRNA 表达 6 h 开始升高 (6 h vs 0 h, P < 0.001), 12 h 达到高峰 (12

h vs 0 h, P < 0.001; 12 h vs 6 h, P < 0.001; 12 h vs 24 h, P < 0.001), 24 h 恢复刺激前水平 (24 h vs 0 h, P > 0.05)。狼疮患者 Blys mRNA 表达在不同时点均高于健康对照 (表 2, 图 1)。

表 2 IL-10 刺激组 PBMCs Blys mRNA 表达

	n	0 h	6 h	12 h	24 h
SLE patient	25	0.392 ± 0.059 ¹⁾	0.483 ± 0.068 ¹⁾	0.638 ± 0.084 ^{1), 2)}	0.371 ± 0.072 ¹⁾
Healthy control	20	0.251 ± 0.050	0.342 ± 0.037	0.487 ± 0.058 ²⁾	0.256 ± 0.053

1) Compared with healthy control, F = 154.68, P < 0.001; 2) Compared with 0, 6, 24 h, P < 0.001



2.3 PBMCs 膜结合型 Blys 蛋白的表达及 IL-10 对其表达的影响

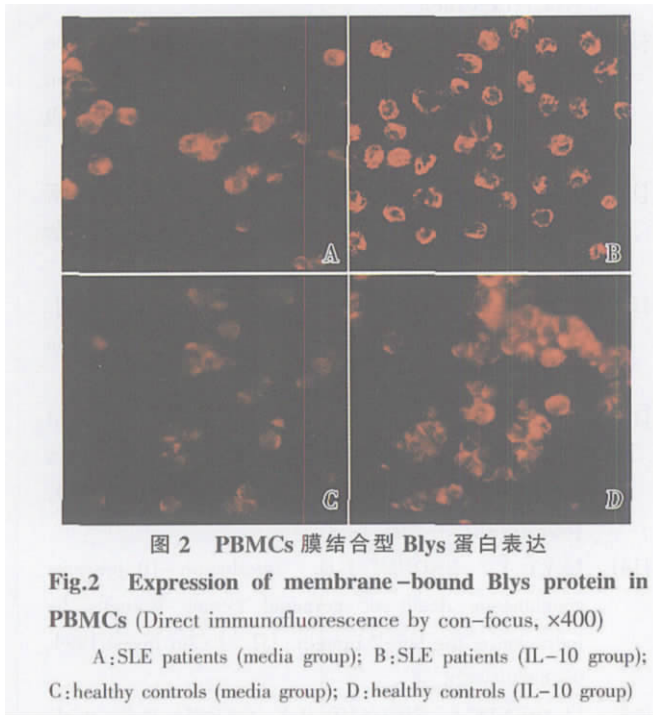
根据析因设计资料的方差分析, 流式细胞仪检测结果显示, 系统性红斑狼疮患者 PBMCs 膜结合型 Blys 蛋白表达强于健康对照组, 差别有统计学意义 (F = 60.54, P < 0.001); IL-10 可增强 PBMC 膜结合型 Blys 蛋白表达, 差别有统计学意义 (表 3)。系统性红斑狼疮患者和健康对照组间和刺激物 (IL-10) 之间不存在交互作用。

表 3 PBMCs 膜结合型 Blys 蛋白表达

	n	Mean fluorescence intensity
		Media group IL-10 group
SLE patient	25	4.55 ± 0.83 ¹⁾ 5.79 ± 0.91 ^{1), 2)}
Healthy control	20	3.24 ± 0.57 4.53 ± 0.71 ²⁾

1) Compared with healthy controls, F = 60.54, P < 0.001; 2) Compared with media group, F = 59.13, P < 0.001

直接免疫荧光法激光共聚焦荧光显微镜检测 PBMCs Blys 蛋白表达, 较直观的反应了 Blys 蛋白在细胞中的分布, Blys 主要分布 PBMCs 的细胞膜上。同样的, 狼疮患者 Blys 蛋白的表达强于健康对照组, 而 IL-10 增强其表达(图 2)。



3 讨论

Blys 由骨髓来源的细胞分泌, 包括单核细胞、巨噬细胞、树突细胞等, 在外周血单个核细胞(PBMCs)中主要为单核细胞和活化的 T 细胞^[1]。它是型跨膜蛋白, 在体内以膜结合型和可溶型两种形式存在。系统性红斑狼疮是一个以抗自身抗原的自身抗体产生为特征的系统性自身免疫性疾病, 但导致 B 细胞耐受性缺乏和启动自身抗体产生的原因尚不十分清楚, 而内源性 Blys 可能是参与红斑狼疮 B 细胞过度活化的重要因素^[4-7]。

本研究前期工作已发现系统性红斑狼疮患者体内 PBMCs 存在 Blys mRNA 和膜结合型蛋白表达增强^[11]。本实验再次证实, 与正常对照相比狼疮患者 PBMCs 中 Blys 存在转录和翻译水平的异常。本实验采用激光共聚焦显微镜直接免疫荧光方法检测 Blys 蛋白表达, 显示 Blys 主要在单个核细胞膜上表达, 较直观的体现了 Blys 的定位和分布情况。

目前关于 Blys 的研究主要集中在动物和 B 细

胞肿瘤上, 且对 Blys 作用下游信号的研究较为透彻, 但对调节 Blys 表达上游因素的研究罕见, 仅有 Nardelli^[12]等发现 IL-10 可增强正常单核细胞和单核细胞来源的肿瘤细胞 Blys 表达。本实验检测了 IL-10 对系统性红斑狼疮患者 PBMC Blys 基因和蛋白表达的影响, 显示 IL-10 在体外可增强狼疮患者 PBMCs Blys mRNA 和蛋白表达。

过去认为抑制性 T 细胞(Ts)功能或数量上的缺陷是导致狼疮 B 细胞过度活化的原因, 而目前则认为 T 辅助细胞(Th)的病态活化是促使 B 细胞多克隆激活的主要原因。Th 细胞主要分为 Th1 和 Th2 细胞, Th1 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 等细胞因子, 诱导 T 细胞增殖和单核细胞活化, 介导细胞免疫反应; Th2 细胞分泌 IL-4、IL-6、IL-10, 参与介导体液免疫; Th1/Th2 比例失衡可导致一系列免疫病理损害。系统性红斑狼疮则存在 Th1/Th2 比例失衡, 其中以 Th2 细胞过度活化为主。在 Th2 细胞因子中, IL-10 与系统性红斑狼疮发病关系非常密切, 是目前狼疮中研究得较为深入明确的细胞因子。IL-10 是一种多功能的细胞因子, 能直接刺激 B 细胞增殖和分化, 促进抗体产生。研究表明, 狼疮患者 PBMC IL-10 mRNA 表达和培养上清 IL-10 水平均明显增高, 并且与自身抗体产生和狼疮活动性密切相关^[13]。IL-10 还增强生发中心 B 淋巴细胞表达抗凋亡蛋白 Bcl-2, 使 B 细胞寿命延长^[14]。除了直接促进 B 细胞的增殖和分化外, 本文的结果提示 IL-10 还可能通过促进 Blys 的表达而间接影响 B 细胞的增殖、存活和分泌功能。

对影响系统性红斑狼疮患者 Blys 分泌上游因素的研究有助于进一步深入探讨狼疮发病机制以及寻找治疗狼疮的新靶点。本研究结果显示系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞的 Blys 基因和膜结合型蛋白的表达均增强, IL-10 可促进 Blys 基因和蛋白的表达, 因此, 阻断 IL-10 的作用, 有助于治疗体液免疫介导的系统性自身免疫病, 如系统性红斑狼疮。已有人尝试应用小鼠抗 IL-10 单抗治疗数例狼疮患者, 延缓了病情进展并延长其生存时间^[15]。本实验为抗 IL-10 抗体应用于人类狼疮患者提供了一定的依据, 当然抗 IL-10 抗体广泛应用于临床还需要更深入的研究和验证。

参考文献:

[1] MOORE P A, BELVEDERE O, ORR A, et al. BLYS:

- member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator [J]. *Science*,1999,285(5425):260-263.
- [2] CROWLEY J E, TREML L S, STADANLICK J E, et al. Homeostatic niche specification among naive and activated B cells: a growing role for the BLYS family of receptors and ligands [J]. *Immunol*, 2005,17(3):193- 199.
- [3] ZHANG X, PARK C S, YOON S O, et al. BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors [J]. *Int Immunol*, 2005,17(6):779- 788.
- [4] KHARE S D, SAROSI I, XIA X Z, et al. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL - 1 transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000,97(7):3370- 3375.
- [5] GROSS J A, JOHNSTON J, MUDRI S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B- cell autoimmune disease [J]. *Nature*,2000,404(6781): 995- 999.
- [6] CHEEMA G S, ROSCHKE V, HILBERT D M, et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune - based rheumatic diseases [J]. *Arthritis Rheum*, 2001,44(6):1313- 1319.
- [7] COLLINS C E, GAVIN A L, MIGONE T S, et al. B lymphocyte stimulator (BLYS) isoforms in systemic lupus erythematosus: disease activity correlates better with blood leukocyte BLYS mRNA levels than with plasma BLYS protein levels [J]. *Arthritis Res Ther*,2005,8(1):R6 [Epub ahead of print].
- [8] CARTER R H, ZHAO H, LIU X, et al. Expression and occupancy of BAFF - R on B cells in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*,2005,52(12):3943- 3954.
- [9] RAHMAN Z S, MANSER T. B cells expressing Bcl- 2 and a signaling- impaired BAFF- specific receptor fail to mature and are deficient in the formation of lymphoid follicles and germinal centers [J]. *J Immunol*,2004,173(10):6179- 6188.
- [10] FU L, LIN- LEE Y C, PHAM L V, et al. Constitutive NF- kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLYS survival pathway in aggressive B - cell lymphomas [J]. *Blood*, 2006,107(11):4540- 4548.
- [11] 叶玉津, 尹培达, 余学清. 系统性红斑狼疮患者 B 细胞刺激因子的表达及其临床意义[J]. *中华风湿病学杂志*,2004,8(7):392- 395.
- [12] NARDELLI B, BELVEDERE O, ROSCHKE V, et al. Synthesis and release of B- lymphocyte stimulator from myeloid cells [J]. *Blood*,2001,97(1):198- 204.
- [13] PARK Y B, LEE S K, KIM D S, et al. Elevated interleukin- 10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 1998,16(3):283- 288.
- [14] LEVY Y, BROUET J C. Interleukin - 10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl- 2 protein [J]. *J Clin Invest*,1994, 93(1):424- 428.
- [15] LLORENTE L, RICHAUD P Y, GARCIA P C, et al. Clinical and biologic effects of anti - interleukin - 10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*,2000,43(8): 1790- 1800.

(编辑 黄小延)

(上接第 53 页 from page 53)

- leukocyte rolling in vivo [J]. *Circ Res*,1996,79(6):1196- 1204.
- [5] PATEL K D, CUVELIER S L, WIEHLER S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment [J]. *Semin Immunol*, 2002,14(2):73- 81.
- [6] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X, et al. New insights into the role of Nuclear Factor - kB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases [J]. *Clin Chem*,1999,45(1):7- 17.
- [7] HOLTZ M L, CRADDOCK S D, PETTIGREW L C. Rapid expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases during post - ischemic reperfusion in rat brain [J]. *Brain Res*,2001, 898(1):49- 60.
- [8] MOILANEN E, VUORINEN P, KANKAANRANTA H, et al. Inhibition by nitric oxide - donors of human polymorphonuclear leukocyte functions [J]. *Br J Pharmacol*,1993,109(3):852- 858.
- [9] KHAN B V, HARRISON D G, OLBRYCH M T, et al. Nitric oxide regulated vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox - sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,93(17):9114- 9119.

(编辑 刘清海)