

系统性红斑狼疮患者高表达的 CD154 促进自身抗体分泌

李玉杰^{1,2}, 李幼姬², 张涤华², 许元文², 董秀清²

(中山大学附属第一医院 1. 急诊科, 2. 肾内科, 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(PBMC)CD154表达水平、及 CD40/CD154 对 SLE 患者分泌自身抗体的影响和地塞米松(Dex)对此的作用。【方法】选择 SLE 活动期患者(10 例)和正常对照者(11 例),分离 PBMC,检测其 CD154 的表达水平;培养 PBMC,应用 CD40 mAb 和 Dex 进行干预,使用 ELISA 法检测培养液上清抗 dsDNA 水平。【结果】活动期组 PBMC CD154 表达水平明显高于对照组 $6.4\% \pm 2.1\%$ vs $1.5\% \pm 1.2\%$, ($P < 0.05$); 活动期组培养液上清抗 dsDNA 抗体水平明显高于对照组 [11.8 ± 6.8] U/mL vs (5.6 ± 2.3) U/mL (RPMI 1640), (11.4 ± 7.0) U/mL vs (6.3 ± 2.1) U/mL (IgG), P 均 < 0.05]; CD40 mAb 使两组培养液上清抗 dsDNA 抗体水平明显增高[活动期组: (18.6 ± 7.7) U/mL vs (11.8 ± 6.9) U/mL, 对照组: (8.3 ± 4.4) U/mL vs (5.6 ± 2.3) U/mL, P 均 < 0.05]。在活动期组, Dex 明显抑制 CD40 mAb 引起的 PBMC 培养液上清抗 dsDNA 抗体水平的增高 [(8.8 ± 5.2) U/mL vs (18.6 ± 7.7) U/mL, $P < 0.05$], 使其低于非特异性处理时水平 [(8.8 ± 5.2) U/mL vs (11.8 ± 6.8) U/mL, $P < 0.05$]; Dex 不影响对照组。【结论】活动期 SLE 患者 PBMC 表达的 CD154 水平升高,此能够促进抗 dsDNA 抗体的分泌,而 Dex 能够抑制其作用。

关键词: 红斑狼疮, 系统性; 自身抗体; CD154; 地塞米松

中图分类号: R593.24

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0511-04

Increased CD154 Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulates Secretion of Autoantibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

LI Yu-jie^{1,2}, LI You-ji², ZHANG Di-hua², XU Yuan-wen², DONG Xiu-qing²

(1. Department of Emergency, 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of CD154 on peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and the effects to secretion of autoantibodies by CD154 and dexamethasone in the patients with systemic lupus erythematosus (SLE). 【Methods】The PBMC from active SLE patients and healthy control were isolated and sent to measure expression of CD154 by flow cytometry, the left PBMC were cultured and treated with CD40 mAb or Dex. The supernatant concentration of anti-dsDNA antibody was measured by ELISA. 【Results】(1) The expression of CD 154 on PBMC (%) in active SLE were higher than that in healthy control (6.4 ± 2.1 vs 1.5 ± 1.2 , $P < 0.05$). (2) The supernatant concentration of anti-dsDNA antibody in active SLE were higher than that in healthy control [11.8 ± 6.8 vs 5.6 ± 2.3 (RPMI 1640), 11.4 ± 7.0 vs 6.3 ± 2.1 (IgG) U/mL, all $P < 0.05$]. (3) CD40 mAb could significantly increase the supernatant concentration of anti-dsDNA antibody in the two groups [18.6 ± 7.7 vs 11.8 ± 6.9 (active SLE), 8.3 ± 4.4 vs 5.6 ± 2.3 (control) U/mL all $P < 0.05$]. (4) Dexamethasone could decrease the elevated supernatant concentration of anti-dsDNA caused by CD40 mAb in active SLE (8.8 ± 5.2 vs 11.8 ± 6.8 U/mL $P < 0.05$) to a lower level (8.8 ± 5.2 vs 11.8 ± 6.8 U/mL $P < 0.05$), but no effects to healthy control. 【Conclusion】The expression of CD154 on PBMC were increase and could stimulate the secretion of anti-dsDNA in active SLE, and this effect were inhibited by Dex.

Key words: lupus erythematosus, systemic; autoantibody; CD154; dexamethasone

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):511-514]

收稿日期: 2006-12-28

基金项目: 广东省医学科学研究基金(A2001151); 广东省自然科学基金(04300354)

作者简介: 李玉杰(1962-), 男, 安徽肥东人, 博士, 副教授

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种多系统受累的自身免疫性疾病, 以多克隆 B 细胞活化和产生多种自身抗体为特征, 此种自身抗体的产生是抗原驱动和 T 细胞依赖性的, 其外周血细胞具有高增殖特性^[1,2]; 而共刺激分子, 特别是 CD40/CD154 在 B 细胞的功能调控中起重要作用, 已有文献报道 SLE 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 表达的 CD154 水平增高^[3-5], 但少有 CD154 对 B 细胞抗体分泌功能影响的研究。我们应用流式细胞术检测 SLE 患者 PBMC 表达的 CD154 水平; 并使用 CD40 mAb 刺激培养的 PBMC, 而使用 Dex 进行干预; 采用 ELISA 法检测 PBMC 培养液上清抗 dsDNA 抗体的变化, 探讨 CD40/CD154 在 SLE 的表达及其对 B 细胞分泌自身抗体功能的影响, 判断 Dex 的可能作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

活动期组: 2003 年 1-3 月收住本院肾内科 SLE 患者 10 人, 均为新收住的 SLE 患者, 符合美国风湿病学会 1982 年 SLE 诊断标准^[6], 未应用大剂量糖皮质激素和/或其它免疫抑制剂, SLEDAI 10 分^[7], 男性 1 例, 女性 9 例, 年龄 20~68 (33±14) 岁, SLEDAI 10~27 (16±5) 分。对照组: 健康志愿者 11 人, 全部女性, 年龄 19~31 (25±4) 岁。两组间年龄分布无显著性差异 ($P > 0.05$)。

1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂 淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂), RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司), 新生牛血清 (杭州四季青生物有限公司), CD154/RPE 反应液 (DAKO 公司), 重组人 IL-4 (R&D 公司), 小鼠 IgG (Zymed 公司), 小鼠抗人 CD40 单抗 (R&D 公司), 地塞米松 (Dex, Sigma 公司); 抗 dsDNA ELISA 试剂盒 (ZEUS Scientific 公司)。

1.2.2 标本采取与处理 新入院病人第 2 天晨空腹采取静脉血 10 mL, 立即注入含 20 μ L (250 U) 肝素钠的无菌离心管, 轻搓摇匀; 1 000 r/min ($r = 15$ cm) 水平离心 10 min, 分离出血浆后, 采用密度梯度离心法常规分离外周血单个核细胞 (PBMC), 用含 100 mL/L 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基调配成浓度为 10^6 /mL 的细胞悬液, 取 500 μ L 进

行流式细胞检测; 取所余细胞悬液 4 mL 均分为 4 份, 放入直径 35 mm 的培养皿, 每份标本均加入 IL-4 (终浓度 20 ng/mL), 分为第 1 组 (RPMI 1640 组), 第 2 组 [IgG 组 加入小鼠 IgG (终浓度 2.5 μ g/mL)], 第 3 组 [CD40 mAb 组 加入小鼠抗人 CD40 单抗 (CD40 mAb, 终浓度 2.5 μ g/mL)], 第 4 组 [Dex 组 加入 CD40 mAb (终浓度 2.5 μ g/mL) 和 Dex (终浓度 10^{-5} mmol/mL)]; 将上述处理后的细胞悬液放入培养箱, 于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 条件下培养 24 h; 将细胞悬液离心后, 培养液上清冷藏 (-20 $^{\circ}$ C), 用于检测抗 dsDNA 抗体含量。

1.2.3 流式细胞检测 取分离好的 PBMC, 用 PBS 洗 2 次后加入 CD154/RPE 反应液 10 μ L, 室温暗处孵育 30 min; 用 PBS 洗 2 次后加入 PBS 重悬, 流式细胞仪检测每份样品中 10^4 细胞, 计算表达 CD154 的阳性细胞数, 得出阳性荧光细胞百分率 (%)。

1.2.4 培养液上清抗 dsDNA 抗体含量的检测 采用酶联免疫吸附分析法 (ELISA), 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理

所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 11.0 进行分析, 组间比较用方差分析 (one way ANOVA), 并进行两两比较; 两组间比较用独立样本 t 检验, 组内比较用配对样本 t 检验; 以 $P < 0.05$ 为显著性差异标准。

2 结果

2.1 SLE 患者 PBMC 表达 CD154 水平

活动期组 SLE 患者 PBMC 表达 CD154 为 6.4% \pm 2.1%, 显著高于对照组的 1.5% \pm 1.2% ($P < 0.05$)。

2.2 CD40/CD154 对 B 细胞分泌自身抗体的影响

表 1 培养液上清抗 dsDNA 抗体水平比较

Table 1 The supernatant concentration of anti-dsDNA antibody (U/mL)

RPMI	IgG	CD40	mAb	Dex
Active SLE	11.8 \pm 6.8 ¹⁾	11.4 \pm 7.0 ¹⁾	18.6 \pm 7.7 ²⁾	8.8 \pm 5.2 ^{2),3)}
Control	5.6 \pm 2.3	6.3 \pm 2.1	8.3 \pm 4.4 ²⁾	5.4 \pm 3.3

Compared with control, 1) $P < 0.05$; Compared with RPMI, 2) $P < 0.05$; Compared with CD40 mAb, 3) $P < 0.05$

在两组内部,其 PBMC 培养液上清抗 dsDNA 抗体水平在 RPMI 1640 和 IgG 两组之间无明显差异(均 $P > 0.05$);在非特异性处理(RPMI 1640 和 IgG)情况下,活动期组培养液上清抗 dsDNA 抗体水平明显高于对照组(均 $P < 0.05$);应用 CD40 mAb 后,两组培养液上清抗 dsDNA 抗体水平明显增高(均 $P < 0.05$),在活动期组 Dex 能够抑制 CD40 mAb 引起的抗体水平增高($P < 0.05$),甚至使其低于非特异性处理时水平($P < 0.05$,表 1)。

3 讨论

3.1 SLE 时 CD40/CD154 的功能改变

CD40/CD154 在体液免疫、细胞免疫和细胞内信号转导方面具有极为重要的作用,能够促进 B 细胞生长、克隆转化和抗原依赖性抗体产生,参与了 SLE 的发生和发展^[8,9]。本研究发活动期 SLE 患者 PBMC CD154 表达水平增高,提示了此与疾病活动性的关系。

3.2 CD40/CD154 对 B 细胞自身抗体分泌的影响

SLE 产生的多种自身抗体中,抗 dsDNA (double stranded DNA) 抗体具有高度特异性,被认为与 SLE 的发生有关:循环或黏附于多种器官的 DNA,与循环抗 DNA 抗体反应,形成免疫复合物,激活炎症系统(如补体),在多器官、系统导致组织损害,引起免疫复合物(IC)介导的疾病^[1]。大量研究证实,抗 dsDNA 抗体是诊断 SLE 的特异性指标,亦为疾病活动性的敏感指标,已成为评定临床症状和预后的指标,甚至可能成为先于临床表现具有指导诊断意义的标志物^[10]。

本研究结果表明,在非特异性处理情况下,活动期组 PBMC 培养液上清抗 dsDNA 抗体水平明显高于对照组(均 $P < 0.05$);CD40 mAb 明显增高两组 PBMC 培养液上清抗 dsDNA 抗体水平(均 $P < 0.05$);Dex 明显抑制活动期组 CD40 mAb 促进抗 dsDNA 抗体合成的作用($P < 0.05$),甚至使其低于非特异性处理时水平($P < 0.05$)。研究证实,CD40/CD154 和 CD28/CD80:CD86 在 SLE 自身抗体的产生中具有重要作用^[9,11,12],应用 CD154 单抗、CTLA-4Ig、CD80 单抗和/或 CD86 单抗可以阻止狼疮的进展和抗 dsDNA 抗体的产生^[13,14]。本研究结果说明,CD40/CD154 能够促进抗 dsDNA 抗体的产生,其可能途径包括直接作用、间接通过上调 CD28/

CD80 CD86。Dex 对 CD40 mAb 引起的抗 dsDNA 抗体分泌促进作用能够产生有效抑制,提示其可能通过抑制 CD40/CD154 和/或 CD28/CD80:CD86 及其继发改变等产生临床疗效。

因此,SLE 患者 PBMC 表达的 CD154 水平增高,其和 CD40 的配接促进了 B 细胞分泌抗 dsDNA 抗体,而 Dex 对此有明显抑制作用,可能在临床治疗中起作用。

参考文献:

- [1] WALLACE D J, HAHN B H. Dubois' lupus erythematosus [M]. 5th edition, Baltimore: Williams & Wilkins, 1997: 69- 220.
- [2] 李玉杰,李幼姬,叶任高,等. 系统性红斑狼疮外周血单个核细胞周期相改变及药物影响 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2003,24(3): 274- 276.
- [3] KATSIARI C G, LIOSSIS S N, SOULIOTIS V L, et al. Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Immunol, 2002, 103(1): 54- 62.
- [4] CHAVEZ- RUEDA K, LEGORRETA- HAQUET M V, CERVERA- CASTILLO H, et al. Prolactine effect on CD69 and CD154 expression by CD4 + cells from systemic lupus erythematosus patients [J]. Clin Exp Rheumatol, 2005, 23(6): 769- 777.
- [5] GOULES A, TZIOUFAS A G, MANOUSAKIS M N, et al. Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases [J]. J Autoimmun, 2006, 26(3): 165- 171.
- [6] TAN E M, COHEN A S, FRIES J F, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11): 1271- 1277.
- [7] BOMBARDIER C, GLADMAN D D, UROWITZ M B, et al. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients [J]. Arthritis Rheum, 1992, 35(6): 630- 640.
- [8] NISHIOKA Y, LIPSKY P E. The role of CD40- CD40 ligand interaction in human T cell- B cell collaboration [J]. J Immunol, 1994, 153(3): 1027- 1036.
- [9] YAZDANY J, DAVIS J. The role of CD40 ligand in systemic lupus erythematosus [J]. Lupus, 2004, 13(5): 377- 380.
- [10] ARBUCKLE M R, JAMES J A, KOHLHASE K F, et al. Development of anti- dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus [J]. Scand J Immunol, 2001, 54(1- 2): 211- 219.

- [11] NAKAJIMA A, AZUMA M, KODERA S, et al. Preferential dependence of autoantibody production in murine lupus on CD86 costimulatory molecule [J]. *Eur J Immunol*, 1995, 25(11): 3060-3069.
- [12] NAGAFUCHI H, SHIMOYAMA Y, KASHIWAKURA J, et al. Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2003, 21(1): 71-77.
- [13] YE X, ZHU T, BASTACKY S, et al. Prevention and reversal of lupus in NZB/NZW mice by costimulatory blockade with adeno-associated virus-mediated gene transfer [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(12):3975-3986.
- [14] SABAHI R, ANOLIK J H. B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus [J]. *Drugs*, 2006, 66(15): 1933-1948.

(编辑 张恩健)

(上接第 500 页 from page 500)

可得出校正光密度, 从而对酶活性进行相对定量估计。Kleiner^[8] 曾从多个方面系统地研究了多因素对其敏感性及其可行性的影响, 认为此技术可检测到皮克(微微克)的蛋白活性, 因此具有高度灵敏性, 现在已广泛用于检测基质金属蛋白酶的活性。金明等^[9] 在实验中, 为了得到浓度较高的 MMP 样品, 加样前先将睫状肌细胞无血清培养液按 10 倍浓缩。收集样品时, 仅用 0.5 mL 无血清培养液的进行细胞孵育, 从而不需要透析提纯样品, 亦能看到明胶酶条带的改变, 是一种简单可行的方法。由于 MMP 是一类依赖于 Zn^{2+} 的蛋白水解酶类, 所以孵育液中作者加入氯化锌促进反应进行。本研究采用 Zymography 技术检测发现, Travoprost 作用人睫状肌细胞后, 细胞分泌 MMP-2 的活性随作用时间延长而逐渐增强。

通过本实验初步证实了 Travoprost 药物可增加人睫状肌细胞 MMP-2 表达, 增强睫状肌 MMP-2 活性。至于不同浓度 Travoprost 对于人睫状肌细胞 MMP 作用及上游分子调控机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ANTHONY T L, LINDSEY J D, WEINREB R N. Latanoprost s Effects on TIMP -1 and TIMP -2 Expression in Human Ciliary Muscle Cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43 (2): 3705-3711.
- [2] GOLDBERG I, CUNHA-VAZ J, JAKOBSEN J E, et al. Comparison of topical travoprost eye drops given once daily and timold 0.5% given twice daily in parents with open-angle glaucoma of ocular hypertension [J]. *J Glaucoma*, 2001, 10(2):414-422.
- [3] LINDSEY J D, TO H D, WEINREB R N. Induction of c-fos by prostaglandin F2 alpha in human ciliary smooth muscle cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 242-250.
- [4] 王子亮, 庄文权, 陈伟, 等. 基质金属蛋白酶-2 在退变椎间盘髓核组织中的表达 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(6): 557-559.
- [5] WEINREB R N, KASHIWAGI K, KASHIWAGI F, et al. Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(13): 2772-2780.
- [6] OH D J, MARTIN J L, WILLIAMS A J, et al. Analysis of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human ciliary body after latanoprost [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(3): 953-963.
- [7] HUSAIN S, JAFRI F, CROSSON C E. Acute Effects of PGF2 on MMP-2 Secretion from Human Ciliary Muscle Cells: A PKC- and ERK- Dependent Process [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(5):1706-1713.
- [8] KLEINER D E, STETLER-STEVENSON W G. Quantitative zymography: detection of pictogram quantities of gelatinases [J]. *Analy Biochem*, 1994, 218: 325-329.
- [9] 金明, 洪晶, 吴景天, 等. PGF2 类抗青光眼药 Unoprostone 对培养猴睫状肌细胞中胶原、及 MMP-1 表达的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2002(31): 40-42.

(编辑 刘清海)