

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

李玉杰, 李幼姬, 叶任高, 孔庆瑜, 余学清, 董秀清

(中山大学附属第一医院肾内科, 教育部肾脏病临床研究重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus SLE)外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells PBMCs)的细胞周期相改变和药物的影响,探讨其在SLE发病中的作用。【方法】用流式细胞分析技术,检测SLE患者(活动期和静止期)PBMCs的细胞时相构成比例,观察药物对其的影响,并和正常人进行比较;分析SLE患者细胞周期时相构成比例和血清抗dsDNA抗体的相关性。【结果】①基础状况下,SLE患者PBMCs的细胞周期时相构成比例(%)和正常人之间无明显差别(均 $P > 0.05$)。②植物凝集素(phytohemagglutinin, PHA)使活动期SLE患者PBMCs的 G_0/G_1 期比例减低($P < 0.01$)和S期比例增高($P < 0.01$)、缓解期SLE患者PBMCs S期比例增高($P < 0.01$)、正常人PBMCs各时相均无明显改变。③用地塞米松(dexamethasone, Dex)后,活动期SLE患者PBMCs各期时相比比例无改变,缓解期SLE患者PBMCs G_0/G_1 期比例增高($P < 0.001$)和S期比例减低($P < 0.001$),正常人PBMCs的 G_0/G_1 期比例增高($P < 0.05$)。④活动期SLE患者血清抗dsDNA抗体和 G_0/G_1 期比例呈负相关($r = -0.787, P = 0.001$)、和S期比例呈正相关($r = 0.855, P = 0.0001$)。【结论】SLE患者PBMCs具有较强的潜在增殖活性,其时相构成比例和血清抗dsDNA抗体相关,可能和其发病及病程有关。

关键词: 狼疮, 系统性; 流式细胞术; 细胞周期

中图分类号: R593.24*1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)03-0274-03

Cell Cycle-Phase and It's Changes of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

LI Yu-jie, LI You-ji, YE Ren-gao, KONG Qing-yu, YU Xue-qing, DONG Xiu-qing

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

Abstract: 【Objective】To investigate the changes of cell cycle-phase of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and the effects of all changes by drugs. 【Methods】The constituent ratio of different cell cycle-phase of PBMCs in patients with active and inactive SLE and health control were examined by flow cytometric analysis. After stimulated by phytohemagglutinin (PHA) and depressed by dexamethasone (Dex), these examinations were repeated. The correlation between constituent ratio of different cell cycle-phases of PBMCs and serum anti-dsDNA antibody level were analysed. 【Results】① There were no significant difference at the constituent ratio of different cell cycle-phase of PBMCs in SLE and health control at basal status. ② Stimulated by PHA, the constituent ratio of phase G_0/G_1 of PBMCs decreased markedly in active SLE ($P < 0.01$), the phase S increased in active and inactive SLE (all $P < 0.01$), and there were no changes of PBMCs in health control. ③ Depressed by Dex, the constituent ratio of phase G_0/G_1 of PBMCs increased significant in inactive SLE ($P < 0.001$) and health control ($P < 0.05$), the phase S decreased in inactive SLE ($P < 0.001$), and there were no changes of PBMCs in active SLE. ④ In patients with active SLE, there were negative correlation between anti-dsDNA antibody level and constituent ratio of phase G_0/G_1 ($P = 0.001$), there were positive correlation between anti-dsDNA antibody level and constituent ratio of phase S ($P = 0.0001$). 【Conclusion】There were

收稿日期: 2002-12-02

基金项目: 广东省医学科学研究基金资助项目(2001151); 中山医科大学“211工程”重点科研基金资助项目(98151)

作者简介: 李玉杰(1962-), 男, 安徽肥东人, 博士生, 副主任医师; 叶任高, 通讯作者, 教授, 博士生导师。

strong latent proliferation activity of PBMCs in patients with SLE and correlation between constituent ratio of different cell cycle-phase of PBMCs and serum anti-dsDNA antibody level. These may be related to the pathogenesis etiology and the course of SLE.

Key words: lupus erythematosus, systemic; flow cytometry; cell cycle

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(3):274~276,294]

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种慢性自身免疫性疾病,引起多器官损害,具有产生多种自身抗体的特点。淋巴细胞在SLE的发生发展中具有重要作用,包括T细胞分泌的细胞因子和B细胞产生的自身抗体,此类细胞功能的改变和其生存状态(增殖、分化和凋亡)有关^[1,2]。本研究选择在SLE发生发展中起重要作用的外周血细胞,采用流式细胞术对SLE患者和正常人的细胞周期时相构成进行研究,包括使用药物(植物凝集素和地塞米松)干预的影响;同时分析血清抗dsDNA抗体和细胞周期相构成比例间的相关性,了解细胞周期相改变和功能的关系,探讨细胞周期时相改变在SLE中发病中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本院肾内科和风湿内科住院病人(2002年7月-10月)共26例,全部符合美国风湿病协会SLE诊断标准^[3],除外使用大剂量免疫抑制剂(糖皮质激素、细胞毒药物)者。依据SLEDAI标准^[4],病人为活动期组(>9分)和缓解期组。活动期14例,男2例,女12例,年龄16~38(25±6)岁;缓解期12例,男3例,女9例,年龄19~44(29±9)岁。正常对照组10例,全部女性,年龄18~30(23±4)岁,为健康体检者和志愿者。3组间年龄差异无显著性(均 $P > 0.05$)。

1.2 细胞分离及处理

肝素钠抗凝外周静脉血5 mL,用淋巴细胞分离液按常规操作分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),取 10^6 细胞进行检测。均分所余PBMCs,加入含100 mL/L新生牛血清(杭州四季青公司)的RPMI 1640培养基(Gibco公司),调整细胞数为 10^6 /mL,分别加入植物凝集素(phytohemagglutinin, PHA, Sigma公司,终浓度2 mg/L)和地塞米松(dexamethasone, Dex, Sigma公司,终浓度 10^{-5} mol/L)。处理后的PBMCs放入培养箱于37℃、5% CO₂条件下培养24 h后收

集细胞,以磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,加入700 mL/L乙醇固定12~24 h。

1.3 流式细胞术检测

取固定的培养细胞,以PBS洗2次,调整细胞数为每管(100 μL) 10^6 后加入专用DNA染液(Coulter公司,内含RNase10 mg/L和propidium iodide, PI 50 mg/L)0.5 mL,避光染色30 min,以流式细胞仪(Coulter公司,PN6604451)分析每份样品中至少 10^4 细胞,用Multicycle软件(Phoenix公司)分析细胞周期相,分为G₀/G₁、S、G₂/M期,得出每份样品的构成比例(%)。

1.4 血清抗dsDNA抗体测定

用ELISA法,试剂为ZEUS Scientific Inc产品。

1.5 统计学分析

统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS10.0进行分析,组间比较用方差分析(one way ANOVA)并进行两两比较,组内比较用配对 t 检验,相关分析用Pearson法,取 $P < 0.05$ 为显著性差异标准。

2 结果

2.1 基础状况下细胞周期时相的构成

流式细胞分析结果说明,未予处理的基础状况下,正常人和SLE患者(活动期和缓解期)PBMCs的细胞周期时相构成比之间无差别(均 $P > 0.05$),见表1。

2.2 PHA刺激后细胞周期时相的改变

用PHA刺激后,活动期SLE患者PBMCs的G₀/G₁期时相比比例减低($P < 0.01$),S期比例增高($P < 0.01$),G₂/M期比例有改变,但无差异。缓解期SLE患者PBMCs在PHA刺激后,其G₀/G₁期和G₂/M期的构成比例变化不明显,而S期比例增高($P < 0.01$)。正常人PBMCs在PHA刺激后,各时相均无明显改变,见表1。

2.3 Dex作用后细胞周期时相的改变

Dex应用后,活动期SLE患者PBMCs的G₀/G₁期,S期和G₂/M时相比比例无改变。缓解期SLE患者

表 1 3 组 PBMCs 不同时相的构成

Table 1 The constituent ratio of cell cycle-phase

(%)

	G ₀ /G ₁			S			G ₂ /M		
	Basal	PHA	Dex	Basal	PHA	Dex	Basal	PHA	Dex
Active	95.6±3.7	93.5±2.8 ¹⁾	96.2±3.7	3.8±3.7	5.7±2.5 ¹⁾	3.4±3.8	0.7±1.2	0.8±0.8	0.4±0.4
Inactive	96.5±2.3	95.6±2.1	98.1±1.4 ²⁾	2.3±1.2	3.5±1.5 ¹⁾	1.3±0.9 ²⁾	1.2±1.7	0.9±1.5	0.6±0.9
Control	96.2±2.4	94.6±2.6	98.5±0.9 ³⁾	2.7±2.4	3.3±0.7	2.0±2.7	1.1±1.6	2.2±2.8	0.2±0.3

Compared with basal: 1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.001$, 3) $P < 0.05$

PBMCs 在 Dex 作用后,其 G₀/G₁ 期的构成比例增高 ($P < 0.001$),S 期比例减低 ($P < 0.001$),G₂/M 期变化不明显。Dex 可以使正常人 PBMCs 的 G₀/G₁ 时相比比例增高 ($P < 0.05$),而 S 期和 G₂/M 期时相比比例均无明显改变,见表 1。

2.4 抗 dsDNA 抗体水平和 PBMCs 时相构成比例相关性分析

活动期 SLE 患者血清抗 dsDNA 抗体水平为每 mL(0.37±0.24) kU,明显高于缓解期 SLE 患者(0.19±0.02) kU ($P < 0.05$)。活动期 SLE 患者血清抗 dsDNA 抗体水平与基础状态 G₀/G₁ 期比例呈明显负相关 ($r = -0.787$, $P = 0.001$),与基础状态 S 期比例呈显著正相关 ($r = 0.855$, $P = 0.0001$)。缓解期 SLE 患者血清抗 dsDNA 抗体水平和基础状态各时相比比例无相关性。

3 讨论

我们的结果表明,正常情况下患者和正常人 PBMCs 的细胞时相构成比例无显著差别。用 PHA 刺激后,活动期 SLE 患者 PBMCs 的 G₀/G₁ 期比例减低、S 期比例增高,缓解期患者 PBMCs 的 S 期比例增高,正常人 PBMCs 各时相均无明显改变。PHA 能够刺激静止的淋巴细胞进行有丝分裂,是研究淋巴细胞生理的标准试剂。PHA 是一种钙结合蛋白质,与细胞膜受体结合后,影响胞膜上腺苷酸环化酶 (Acase) 活性,继而通过一系列复杂的细胞内信号转导过程(IP₃,PKC,CAMP-PKA),促进 DNA 等合成,引起细胞增殖^[5]。此外,PHA 能够诱导辅助性 T 淋巴细胞(Th)表达 CD40L;同时,我们此前的资料表明,SLE 患者 PBMCs 表达的 CD40L 增多(待发表资料),CD40L/CD40 的相互作用促进 T 细胞活化和细胞因子的产生,参与 B 细胞增殖、活化及抗体的产生,改变了 PBMCs 的细胞周期,这可能与调节 CDK 等有关^[6]。PHA 刺激引起的 PBMCs 细胞时相改变,在 SLE 患者之间(活动期和缓解期)和 SLE

患者与正常人之间的差别,表明不同人群 PBMCs 对 PHA 的反应有差别,SLE 患者的 PBMCs 具有较强的潜在增殖能力,这可能和淋巴细胞信号转导异常有关,这种异常增殖能力引起 T、B 淋巴细胞功能改变在 SLE 的发病中具有重要作用。

用地塞米松后,活动期 SLE 患者 PBMCs 各期时相比比例无改变,缓解期 SLE 患者 PBMCs 的 G₀/G₁ 期的构成比例增高、S 期比例减低;正常人 PBMCs 的 G₀/G₁ 时相比比例增高。糖皮质激素广泛应用于治疗自身免疫性疾病,其可以使多种细胞在增殖过程中停滞于 G₁ 晚期,这与以下因素有关^[7,8]:抑制促进细胞进程的细胞周期调节蛋白(如 cyclins、CDKs、pRb/p110),上调抑制细胞周期的 CKI(如 p21^{Cip1}、p27^{Kip1}、p53)。此外,我们的资料证实,Dex 能够抑制 PBMCs CD40L 的表达,继而干扰 PBMCs 的细胞周期进程。本研究表明,不同于缓解期 SLE 患者和正常人,活动期 SLE 患者 PBMCs 潜在的增殖能力,受 Dex 影响较小,此现象的原因尚待进一步探讨,亦可能和 SLE 患者 PBMCs 的某些内在缺陷有关,在发病和治疗反应变化(激素耐受/抵抗)方面起一定作用。

SLE 产生的多种自身抗体中,抗 dsDNA 抗体具有高度特异性,被认为与 SLE 的发生和发展有关,为诊断 SLE 的特异性指标,亦为疾病活动性的敏感指标,已成为评定临床状况和预后的指标,甚至成为先于临床表现具有指导诊断意义的标志物^[9]。我们的结果表明,在活动期 SLE 患者,其血清抗 dsDNA 抗体水平和基础状态 G₀/G₁ 期比例呈负相关 ($P < 0.01$)、和基础状态 S 期比例呈正相关 ($P < 0.001$);而缓解期 SLE 患者血清抗 dsDNA 抗体水平和基础状态各时相比比例无相关性。细胞周期进程中,伴随着 G₁ 期向 S 期的转化,其 DNA 和蛋白质的合成增加,为向 G₂ 期和 M 期的进程作准备;因此,S 期与 T、B 细胞的功能(细胞因子的产生和抗体的分泌)关系密切。我们推测,SLE 患者 PBMCs

(下转第 294 页 to page 294)

的结论。虽然 PI、GI 在各阶段都不断降低,但妊娠早期和妊娠中期的差异并不明显,这可能是因为在这一时期口腔卫生保持不良所致。

3.2 牙周治疗对妊娠期 GCF-PGE₂ 的影响

GCF-PGE₂ 与牙周病免疫破坏密切相关,它不仅直接促进牙周附着丧失,激活破骨细胞,调节骨吸收,抑制胶原与非胶原合成,还能作为血管扩张剂强化其他炎症介质的作用^[5]。关于牙周治疗对 GCF-PGE₂ 的影响,文献中主要集中在对非妊娠个体的研究^[3]。这些治疗手段主要有口腔卫生教育,龈上洁治,龈下刮治或根面平整结合全身和局部应用抗生素。本研究由于受试对象是妊娠妇女,故在牙周治疗全部过程中没有结合抗生素的使用。结果显示:受试对象在临床状况改善的同时,GCF-PGE₂ 明显降低,与非妊娠个体的研究结论一致。

3.3 GCF-PGE₂ 与牙周临床指数间的关系

周坚等的研究表明:GCF-PGE₂ 水平与牙周袋深度正相关,它可作为检测牙周炎破坏程度的标记物^[8]。然而本实验却未发现 GCF-PGE₂ 与各临床指数间存在相关性。这可能是由于样本数量太少所致。同时,由于来本院就诊的妊娠妇女都有明显的牙龈炎症,以她们中的一部分作为对照来完善本研究,显然不符合医德要求,故不易建立对照组。因此,要进一步研究 GCF-PGE₂ 与牙周临床指数间的相关性,必须设法建立对照组,并增加样本数量。

(上接第 276 页 from page 276)

较高的潜在增殖活性和其 T、B 细胞功能异常有关,其机理可能为细胞周期相的改变(尤 S 期的增加)促进了蛋白等的合成,产生致病作用。

本研究表明,SLE 患者 PBMCs 具有较强的潜在增殖能力,其细胞周期相的构成比例和抗 dsDNA 抗体产生有关;此种细胞周期相的改变和细胞信号转导异常有联系,在 SLE 发病中起作用,且可能和治疗反应有关。

参考文献:

- [1] Dorner T, Putterman C. B cells, BAFF/zTNF4, TACI, and systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Res*, 2001, 3 (4): 197.
- [2] Pagama M. Cell cycle-material and methods[M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996, 5~20.
- [3] 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.
- [4] Bombardier C, Gladman D D, Urowitz M B, et al. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for

参考文献:

- [1] Amar S, Eskinazi E, Soydine M, et al. Influence of hormonal variation on the periodontium in women[J]. *Periodontol* 2000, 1994, 6(1): 79.
- [2] Yalcin F, Eskinazi E, Soydinc M, et al. The effect of sociocultural status on periodontal conditions in pregnancy [J]. *J Periodontol*, 2000, 73(2): 178.
- [3] Damare S M, Wells S, Offenbacher S. Eicosanoids in periodontal diseases: Potential for systemic involvement [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 433(1): 23.
- [4] 付云,凌均荣,李延兵,等. 糖尿病型牙周病患者龈沟液前列腺素 E₂ 及糖化血红蛋白的检测 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(4): 29.
- [5] Sillness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition [J]. *Acta Odontol Scand*, 1964, 22(2): 121.
- [6] Mealey B L. Influence of periodontal infections on systemic health [J]. *Periodontol* 2000, 1999, 21(2): 197.
- [7] Offenbacher S, Jared H L, O'Reilly P G, et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications [J]. *Ann Periodontol*, 1998, 3(3): 233.
- [8] 周坚,邹石莹,赵玉霞,等. 龈沟液中前列腺素 E₂ 和牙周炎关系的探讨 [J]. *中华口腔医学杂志*, 1994, 29(3): 178.

(编辑 刘清海)

lupus patients[J]. *Arthritis Rheum*, 1992, 35 (6): 630.

- [5] Michel M C, van Tits L J, Trenn G, et al. Dissociation between phytohaemagglutinin-stimulated generation of inositol phosphates and Ca²⁺ increase in human mononuclear leucocytes [J]. *Biochem J*, 1992, 285 (1): 137.
- [6] Grousson J, Ffrench M, Concha M, et al. CD40 ligation alters the cell cycle of differentiating keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 114 (3): 581.
- [7] Reil T D, Kashyap V S, Sarker R, et al. Dexamethasone inhibits the phosphorylation of retinoblastoma protein in the suppression of human vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *J Surg Res*, 2000, 92 (1): 108.
- [8] Terada Y, Okado T, Inoshita S, et al. Glucocorticoids stimulate p21CIP1 in mesangial cells and in anti-GBM glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 2001, 59 (5): 1706.
- [9] 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.

(编辑 黄小廷)