

PI3-K 与活动性狼疮肾炎 Th2 细胞因子的关系

王俭勤, 李幼姬, 李志坚, 张涤华, 周道远, 许韩师, 叶任高

(中山医科大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】了解磷脂酰肌醇三激酶(PI3-K)在活动性狼疮肾炎患者外周血单个核细胞中的表达,并探讨其与 Th2 细胞因子的关系。【方法】利用免疫沉淀、免疫印迹和 RT-PCR 技术检测 12 例正常人和 14 例活动性狼疮肾炎患者外周血单个核细胞 PI3-K 磷酸化产物、IL-6 mRNA 和 IL-10 mRNA 表达,观察 PI3-K 特异性抑制剂 PY294002 对活动性狼疮肾炎患者外周血单个核细胞 IL-6 mRNA 和 IL-10 mRNA 表达的影响。【结果】自发培养时活动性狼疮肾炎组外周血单个核细胞 PI3-K 磷酸化产物明显高于健康对照(1.14 ± 0.23 vs 0.46 ± 0.12 , $P = 0.023$), CD3 单抗诱导下活动性狼疮肾炎组 PI3-K 磷酸化产物表达仍然高于健康对照组(2.09 ± 0.63 vs 0.65 ± 0.14 , $P = 0.016$)。活动性狼疮肾炎组外周血单个核细胞 PI3-K 磷酸化产物表达量与 IL-6 mRNA 和 IL-10 mRNA 呈正相关关系($r = 0.652$, $P = 0.008$; $r = 0.718$, $P = 0.007$)。PI3-K 特异性抑制剂 PY294002 明显抑制了抗 CD3 单抗诱导的活动性狼疮肾炎组 IL-6 mRNA (2.32 ± 0.51 vs 0.57 ± 0.15 , $P = 0.009$)和 IL-10 mRNA (1.71 ± 0.33 vs 0.67 ± 0.11 , $P = 0.006$)的表达。【结论】PI3-K 过度活化可能介导了 IL-6 和 IL-10 细胞因子的高效表达而参与狼疮肾炎的发病过程。

关键词: 红斑狼疮, 系统性; 肾小球肾炎; 1-磷脂酰肌醇 3-激酶

中图分类号: R593.24⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2001)03-0195-04

Corelation of PI3-K Phosphorylated Products and Th2 Cytokine in Patients with Active Lupus Nephritis

WANG Jian-qin, LI You-Ji, LI Zhi-jian, ZHANG Di-hua, ZHOU Dao-yuan, XU Han-shi, YE Ren-gao

(Department of Nephrology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To observe the expression of PI3-K phosphorylated products and elucidate the correlation between PI3-K phosphorylated products and Th2 cytokine in peripheral blood mononuclear cell (PBMC). 【Methods】14 patients with active lupus nephritis and 12 controls were selected, PI3-K phosphorylated products were detected by immunoprecipitation and Western blotting, RT-PCR was used to observe interleukin-6 mRNA and interleukin-10 mRNA expression. 【Results】In either spontaneous condition or stimulated by anti-CD3 antibody, the expression of PI3-K phosphorylated products in patients with active lupus nephritis were higher than those of the controls (1.14 ± 0.23 vs 0.46 ± 0.12 , $P = 0.023$; 2.09 ± 0.63 vs 0.65 ± 0.14 , $P = 0.016$). The expression of PI3-K phosphorylated products in active lupus nephritis showed a positive correlation with interleukin-6 mRNA and interleukin-10 mRNA ($r = 0.652$, $P = 0.008$; $r = 0.718$, $P = 0.007$). PY294002, one of specific inhibitor of PI3-K, inhibited significantly the expression of interleukin-6 mRNA (2.32 ± 0.51 vs 0.57 ± 0.15 , $P = 0.009$) and interleukin-10 mRNA (1.71 ± 0.33 vs 0.67 ± 0.11 , $P = 0.006$) in stimulated PBMC in active lupus nephritis. 【Conclusion】PI3-K can involve in the pathogenesis of lupus nephritis by inducing the overexpression of interleukin-6 and interleukin-10.

收稿日期: 2000-10-25

基金项目: 中山医科大学 211 工程资助课题(15)

作者简介: 王俭勤(1965-), 男, 陕西凤翔人, 博士生, 李幼姬, 博士生导师, 教授

Key words: lupus erythematosus, sytemic; glomerulonephritis; 1-phosphatidylinositol 3-kinase

狼疮肾炎是一种自身免疫复合物性疾病,发病机制尚不清楚。目前普遍认为,T细胞和T细胞依赖的B细胞高度活化是致病性自身抗体产生的重要环节^[1],尤其是Th2细胞过度活化产生的IL-6、IL-10等Th2细胞因子与致病性自身抗体产生有密切关系。许多证据已经表明在狼疮动物模型和人类系统性红斑狼疮存在Th2细胞因子高表达,这些因子在B细胞增殖、分化和自身抗体产生中发挥了重要作用^[2-3]。PI3-K是CD3途径活化Th2细胞的关键信号分子^[4],目前在狼疮肾炎中尚未见报道,为探讨其对Th2细胞因子的调控作用,我们检测了PI3-K磷酸化产物的表达,并观察其特异性抑制剂LY294002对IL-6、IL-10的影响。

1 材料与方 法

1.1 对 象

14例活动性狼疮肾炎患者,均符合美国风湿病协会1982年修订的SLE及狼疮肾炎的诊断标准^[5],男2例,女12例,15~47岁,平均年龄(32±4.7)岁,病程1个月~5年。其中初发9例,复发3例,2例用低剂强的松(5~20 mg/d)维持治疗。所有病例在研究期间均未进行激素、免疫抑制剂冲击治疗。正常对照12例,其中女性10例,21~43岁,平均年龄(30±3.9)岁,两组在年龄、性别构成上无明显差异。

1.2 外周血单个核细胞的分离及培养

每一研究对象于空腹采静脉血10 mL,肝素抗凝,按常规方法提取外周血单个核细胞,2 g/L台盼蓝计数活细胞不低于95%。细胞用含100 mL/L新生小牛血清的RPMI 1640培养基配成 1×10^6 /mL的细胞悬液后分组如下:①自发培养组不加任何刺激剂;②单独加抗CD3抗体(30 μg/L, Sigma);③在②的基础上加入LY294002(5 μmol/L, Santa Cruz);37℃,体积分数为5% CO₂条件下孵育50 min提取蛋白质,12 h后提取细胞总的RNA。

1.3 胞浆蛋白的提取及免疫沉淀

收集细胞,加入细胞裂解液250 μL(Bio Lab),按常规方法提取胞浆蛋白,用PI3-K抗体(兔p85 α, Santa Cruz)进行免疫沉淀,收集沉淀碎片,加入

上样缓冲液30 μL^[6], -70℃保存准备Western blotting。用考马斯亮蓝法检测提取液蛋白浓度,保证每孔上样量的一致性。

1.4 SDS-Page电泳和Western blotting

样品经100 g/L SDS-Page电泳、转膜、封闭,用鼠抗酪氨酸磷酸化抗体(4G10, Promega, 1:500)室温孵育2 h,HRP标记的二抗孵育2 h,洗膜后ECL化学发光(BioLab),X片曝光,显像。用医学图象分析系统测定其吸光度(A值)

1.5 RNA提取及RT-PCR

采用GIBCO公司的TRIZOL RNA提取试剂盒,按操作说明书制备总的RNA,紫外分光光度计测读数 $A_{260}/A_{280} > 1.8$,经RNA甲醛变性测得28 s和18 s 2条带,EB显示强度为2:1,调RNA浓度为1 mg/L后进行RT-PCR。RT-PCR采用GIBCO公司的RT-PCR试剂盒进行cDNA合成,按说明书操作,IL-10、内参照GAPDH引物均由上海细胞生物技术研究所合成。IL-6(639 bp)顺义引物:5'-3' ATGAACCTCCTTCTCCACAAGC,反义引物:5'-3' GTACATTTGCCGAAGAGCCCCTCAGGCTGGACTG。IL-10(351bp)顺义引物:5'-3' AC-CACAGTCCATGAAATCAC,反义引物:5'-3' AG-GTTTCTCCAGGCGGCATG。GAPDH(230 bp)顺义引物:5'-3' ACCACAGTCCATGAAATCAC,反义引物:5'-3' AGGTTTCTCCAGGCGGCATG。PCR产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳后EB显色10 min,紫外透照仪上观察、照相、测定条带A值,以GAPDH作内参,计算相对单位。

1.6 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用t检验,多组间比较先行方差齐性检验(IL-6 mRNA和IL-10 mRNA表达量总体方差相等, $\chi^2 = 5.21$, $P = 0.403$; $\chi^2 = 3.83$, $P = 0.481$)后进行方差分析,相关分析用直线相关分析。所有数据均用SPSS 9.0电脑软件处理。

2 结 果

2.1 外周血单个核细胞PI3-K磷酸化产物的表达
自发培养时,活动性狼疮肾炎组外周血单个核细胞PI3-K磷酸化产物明显高于健康对照组(P

=0.023)。抗CD3抗体(30 μg/mL)诱导下活动性狼疮肾炎组PI3-K磷酸化产物表达仍然高于健康对照组($P=0.016$)(表1,图1)。

表1 活动性狼疮肾炎和对照组PI3-K磷酸化产物表达
Table 1 The expression of PI3-K phosphorylated products in PBMC in active lupus and controls (A)

Group	n	Spontaneous	Anti-CD3 antibody
LN	14	1.14±0.23	2.09±0.63
Control	12	0.46±0.12	0.65±0.14
P		0.023	0.016

2.2 PI3-K磷酸化产物与IL-6 mRNA、IL-10 mRNA表达的关系

在自发培养条件下,活动性狼疮肾炎组IL-6 mRNA和IL-10 mRNA明显高于健康对照组($P=0.08$, $P=0.006$),在抗CD3抗体(30 μg/L)刺激下活动性狼疮肾炎组IL-6 mRNA和IL-10 mRNA表达均有增加($P=0.003$, $P=0.009$),且高于对照组($P=0.005$, $P=0.008$)。PY294002明显抑制了活动性狼疮肾炎组抗CD3抗体(30 μg/L)

表2 活动性狼疮肾炎和对照组IL-6 mRNA和IL-10 mRNA表达(A值,细胞因子/GAPDH)

Table 2 The expression of interleukin-6 and interleukin-10 mRNA in PBMC in active LN and controls (A, cytokine/GAPDH)

Group	Control	Control+anti-CD3 antibody (n=12)	LN ¹⁾	LN+anti-CD3 antibody ²⁾ (n=14)	LN+anti-CD3 antibody+PY294002 ³⁾ (n=14)
IL-6 mRNA	0.21±0.03	0.31±0.05	0.65±0.10	2.32±0.51	0.57±0.15
IL-10 mRNA	0.34±0.09	0.38±0.04	0.71±0.14	1.71±0.33	0.67±0.11

1) compare with controls $P<0.01$; 2) compare with control+antibody $P<0.01$; 3) compare with LN+anti-CD3 antibody $P<0.01$

3 讨论

Th1/Th2细胞因子比例失衡在某些自身免疫复合物性疾病发生、发展中起了关键性的作用。近年来研究发现系统性红斑狼疮患者血清Th2细胞因子IL-4、IL-6、IL-10增高,而Th1细胞因子IL-2、IFN则降低,因此普遍认为系统性红斑狼疮是一种Th2细胞占优势的疾病^[2,3]。多组研究尚表明,IL-6、IL-10在活动性狼疮有高表达,且与狼疮致病性自身抗体的产生密切相关。本组研究结果也表明活动性狼疮肾炎外周血单个核细胞Th2细胞因子IL-6、IL-10 mRNA表达明显高于健康人,与

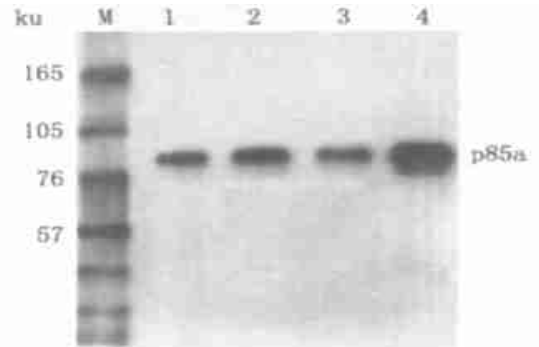


图1 活动性狼疮肾炎和对照组PI3-K磷酸化产物表达
Fig. 1 The expression of PI3-K phosphorylated products in PBMC in active lupus nephritis (LN) and controls

M: Marker; 1: Control in spontaneous condition; 2: LN in spontaneous condition; 3: Control+anti-CD3 antibody; 4: LN+anti-CD3 antibody

诱导的IL-6 mRNA和IL-10 mRNA的表达($P=0.009$, $P=0.006$)。相关分析表明,活动性狼疮肾炎患者外周血单个核细胞PI3-K磷酸化产物与IL-6 mRNA、IL-10 mRNA呈正相关关系($r=0.652$, $P=0.008$; $r=0.718$, $P=0.007$)(表2,图2)。

文献报道一致,然而,Th2细胞在狼疮肾炎过度活化的机制并不清楚。

PI3-K是CD3途径活化Th2细胞的关键信号分子。它被激活后能阻断Caspase-8与死亡诱导信号复合物结合,从而保护活化的Th2细胞免受Fas介导的细胞死亡,但并不保护Th1细胞免受Fas介导的细胞死亡。这可能与CD3途径活化了Th2细胞PI3-K磷酸化有关^[7],本实验结果发现,活动性狼疮肾炎外周血单个核细胞无论在自发培养还是CD3单抗诱导情况下PI3-K磷酸化产物均明显高于健康人。这表明在活动性狼疮肾炎患者外周血单个核细胞存在着PI3-K的过度活化。最近研究表明,PI3-K重要的靶信号分子是Akt/蛋白激酶B,

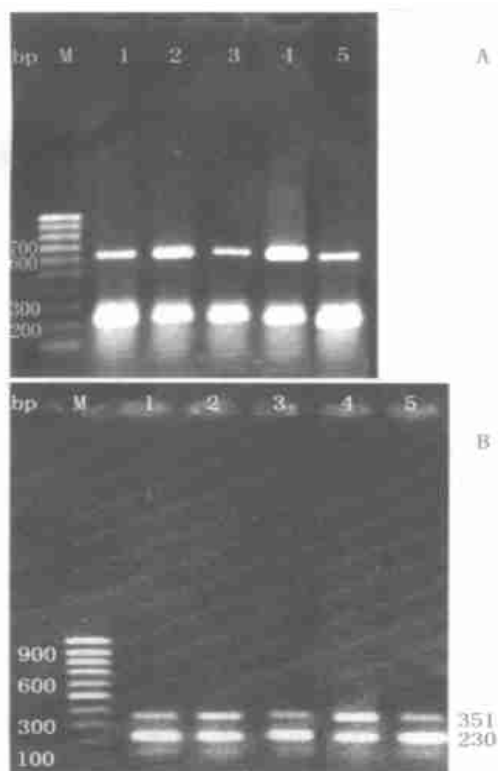


图2 活动性狼疮肾炎组和对照组 IL-6 mRNA(A)和 IL-10 mRNA(B)表达

Fig. 2 The expression of interleukin-6 mRNA(A) and interleukin-10 mRNA(B) in PBMC in active LN and controls

M: Marker 100 bp ladder (BioLab); 1: Control in spontaneous condition; 2: LN in spontaneous condition; 3: Control+ anti-CD3 antibody; 4: LN + anti-CD3 antibody; 5: LN + anti-CD3 antibody + PY294002

后者是转录因子 NF- κ B 的关键调控点^[8], 已发现 NF- κ B 在狼疮肾炎患者表达增高, 且与自身抗体产生相关^[9]。另外, Akt/蛋白激酶 B 还是抗凋亡信号途径中的必须分子, 它能催化 BAD 磷酸化, 促使其与 bcl-2 解离, 后者已发现在活动性狼疮肾炎患者外周淋巴细胞表达增高, 而且与狼疮活动具有相关性^[10], 提示 PI3-K 活化可能促进了活动性狼疮肾炎 bcl-2 表达, 从而保护了 Th2 细胞免受 Fas 介导的细胞凋亡。本实验相关分析表明, PI3-K 磷酸化产物与 IL-6 mRNA、IL-10 mRNA 表达呈正相关关系。PI3-K 特异抑制剂 PY294002 明显抑制了抗 CD3 抗体诱导的活动性狼疮肾炎外周血单个核细胞 IL-6 mRNA、IL-10 mRNA 的表达, 提示 PI3-K 的过度活化在活动性狼疮肾炎 Th2 细胞因子过度表达中起了重要作用。但是, PY94002 并未能完全

抑制 IL-6 mRNA、IL-10 mRNA 表达, 提示 PI3-K 对活动性狼疮肾炎 Th2 细胞因子的调控并不是唯一的, 可能还存在别的信号途径。

参考文献:

- [1] Berden J H. Immunology in medical practice III. Disseminated lupus erythematosus; disturbed apoptosis[J]. Ned Tijdschr Geneeskd, 1997, 141(39): 1848.
- [2] Mohan C, Datta S K. Lupus; key pathogenic mechanisms and contributing factors[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1995, 77(3): 209.
- [3] Richard P Y, Alcocer V J, Liorente L. High levels of Th2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus[J]. Rev Inverst Clin, 1995, 47(4): 267.
- [4] Varadhachary A S, Perdow C, Hu M, et al. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(11): 5778.
- [5] 叶任高, 沈清瑞. 肾脏病诊断与治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 272.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(M). 北京: 科学技术出版社, 1998. 867 ~ 897.
- [7] Varadhachary A S, Peter M E, Perdow S N, et al. Selective up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in Th2 cell inhibits caspase-8 cleavage at the death-inducing complex; a mechanism for Th2 resistance from fas-mediated apoptosis[J]. J Immunol, 1999, 163(9): 4773.
- [8] Franke T F, Yang S Y, Chan T O, et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF activated phosphatidylinositol 3-kinase[J]. Cell, 1995, (5)81: 727.
- [9] 许韩师, 孙林, 叶任高, 等. 系统性红斑狼疮病人外周血单个核细胞 NF- κ B 活性的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(1): 45.
- [10] Lorenz H M, Grunke M, Hieronymus T, et al. In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocyte from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune disease[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(2): 306.

(编辑 黄小延)