

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00446

· 短篇论著 ·

# 皮炎患者外周血 B 淋巴细胞刺激因子的表达

## B lymphocyte stimulator expression in PBMCs isolated from patients with dermatomyositis

付泽娴<sup>1</sup>, 薛平<sup>2\*</sup>, 白净<sup>1</sup>, 代杰<sup>2</sup>, 李嘉明<sup>2</sup>, 谢绍建<sup>2</sup>

1. 河北工程大学附属医院外科, 邯郸 056029

2. 河北医科大学第二医院外科学研究中心, 石家庄 050000

**[摘要]** **目的:**观察皮炎(DM)患者外周血 B 淋巴细胞刺激因子(BLyS)的含量及其 mRNA 在外周血单个核细胞(PBMCs)中的表达。**方法:**ELISA 法测定 10 例皮炎患者外周血中 BLyS 含量,同时采用 RT-PCR 技术检测 BLyS mRNA 在 PBMCs 中的表达情况,并取健康体检者作对照。**结果:**皮炎患者外周血 BLyS 为  $(10.25 \pm 1.19) \mu\text{g/L}$ ,显著高于健康对照组  $[(3.19 \pm 0.65) \mu\text{g/L}; t=5.186, P<0.01]$ ;BLyS mRNA 在皮炎患者外周血单个核细胞中高表达  $(0.39 \pm 0.04)\%$ ,明显高于健康对照组  $[(0.17 \pm 0.01)\%; t=5.611, P<0.01]$ 。**结论:**皮炎患者外周血中 BLyS 含量较正常人明显增高,同时伴有 PBMCs BLyS mRNA 的高表达,提示 BLyS 分子水平的改变与皮炎的发生发展有着密切关系。

**[关键词]** B 淋巴细胞刺激因子;皮炎;外周血单个核细胞**[中图分类号]** R 593.26 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0446-02

B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulators, BLyS), 又称为 BAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)或 TALL-1(TNF- and apoL-related leukocyte expressed ligand 1),是 1999 年发现的一种与免疫相关的细胞因子,属 TNF 配体超家族的新成员。主要调节 B 细胞的存活、增生和分泌大量免疫球蛋白、并能部分抑制 Fas1 的促凋亡作用。近年国外的研究显示<sup>[1]</sup>,BLyS 过量表达与体液免疫为主的自身免疫疾病密切相关。皮炎(dermatomyositis, DM)是以体液免疫为主的自身免疫疾病,针对自身抗原产生的记忆性 B 细胞是此病持续、迁延及难治的根源,有效删除自身反应性记忆性 B 细胞是提高 B 细胞免疫治疗皮炎疗效的关键<sup>[2]</sup>。

本研究利用 ELISA 和 RT-PCR 技术对 DM 患者外周血中及 PBMCs 中 BLyS 的表达情况进行检测,从而探讨 BLyS 的转录水平与皮炎的关系,为临床通过干预 BLyS 来调控 B 淋巴细胞的功能,提高 DM 免疫治疗疗效提供试验数据和理论依据。

### 1 材料和方法

1.1 资料 收集 10 例我院 2006 年门诊皮炎患者,对照组为 10 例门诊健康体检者。入选标准:(1)患者发病 3 个月以内;(2)3 个月内无发热且未曾行治疗者;(3)患者符合中华医学会风湿病分会制定的皮炎诊断标准:I 特征性的皮肤损害;II 肌电图异常;III 肌活检异常,符合 I + II 或 I + III 即可诊断。排除标准:(1)患有其他免疫相关疾病或免疫缺陷

者;(2)妇女孕期或服用避孕药物者;(3)肿瘤患者;(4)合并有其他疾病而服用免疫抑制剂者。

1.2 试剂 ELISA 一步反应试剂盒购自奥地利 Bender 公司,TRIzol 购自 Invitrogen 公司。cDNA 第一链反应试剂盒购自 Fermentas 公司。PCR 引物序列由上海生工生物工程公司合成。

1.3 ELISA 检测外周血 BLyS 含量 按照反应试剂盒操作说明得出标准曲线和方程,将所得到的样本血清 ELISA 检测结果(3 次测定的平均值)根据方程换算出 BLyS 血清浓度。

1.4 PBMCs 细胞的分离及细胞总 RNA 提取 取外周血 20 ml,利用密度梯度离心法,获取 PBMCs,按照 TRIzol 细胞裂解法操作说明书提取组织样本总 RNA(液氮保存)备用。

1.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 紫外分光光度计定量总 RNA,调整浓度为  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。按 cDNA 第一链反应试剂盒说明书采用随机引物法合成 cDNA。用 GAPDH 作为内参参照 PCR 检测。BLyS 引物序列,上游:5'-GCT GGT CGG GAG AAG AGG AAA A-3',下游:5'-CAG TAT CCC ACG GAA ATA ACC T-3',扩增长度 393 bp。GAPDH 引物序列,上游:5'-AAC GGA TTT GGT CGT ATT G-3',下游:5'-GGA AGA TGG TGA TGG GAT T-3',扩增长度 576 bp。PCR 参数:94℃ 5 min 变性;94℃ 35 s,52℃ 40 s,71℃ 55 s,38 个循环;72℃ 延伸 7 min。PCR 产物于 2% 琼脂糖电泳,电压 60 V,55 min。Gel ID 凝胶图像分析系统摄片并测定分析其光密度。计算各个样本 BLyS 表达水平,表达量的相对值=待测基因扩增条带的灰度值/GAPDH 基因扩增条

**[收稿日期]** 2007-12-11 **[接受日期]** 2008-02-25**[作者简介]** 付泽娴,硕士. E-mail: fuzexian@hotmail.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0311-87222483, E-mail: wfa2983@163.com

带的灰度值。

1.6 统计学处理 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,运用 GraphPad Prism 4.0 对各组间数据比较行  $t$  检验,  $P < 0.05$  有统计学差异。

## 2 结果

2.1 皮炎患者外周血中 BLyS 水平 根据 BLyS 标准样品得出的标准曲线方程为:  $Y = 0.06345 + 0.097854194X$ , 皮炎患者血清中 BLyS 含量为  $(10.25 \pm 1.19) \mu\text{g/L}$ , 显著高于健康对照组  $(3.19 \pm 0.65) \mu\text{g/L}$  ( $t = 5.186, P < 0.01$ )。

2.2 BLyS mRNA 在外周血 PBMCs 中的表达 BLyS mRNA 在皮炎患者和健康对照组外周血 PBMCs 中的表达量相对值分别是  $(0.39 \pm 0.04)\%$  和  $(0.17 \pm 0.01)\%$  (图 1), BLyS mRNA 在皮炎患者 PBMCs 中的表达明显增高, 与对照组相比具有显著统计学差异 ( $t = 5.611, P < 0.01$ )。

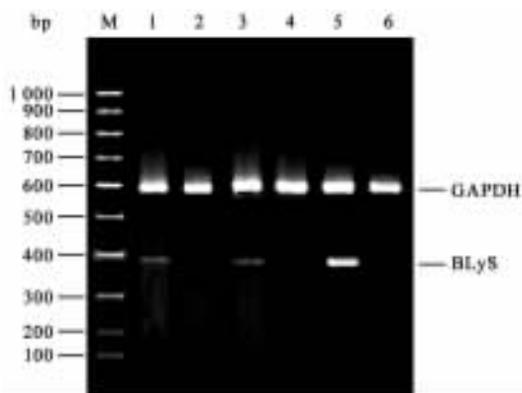


图 1 BLyS mRNA 在正常人和皮炎患者外周血 PBMCs 中的表达水平

M: Marker; 1, 3, 5 为皮炎患者外周血; 2, 4, 6 为正常对照组

## 3 讨论

BLyS 属肿瘤坏死因子家族,是由 Shu 等<sup>[3]</sup>于 1999 年首先发现并克隆的一种新的细胞因子,随后又有几个研究小组相继发表了相关的论文<sup>[4-6]</sup>。BLyS 主要由中性粒细胞和巨噬细胞分泌,活化的 T 细胞和树突状细胞也有少量表达。BLyS 作为一种 B 淋巴细胞的共刺激因子,在 IgM 抗体或 IL-4 存在下能专一地刺激 B 细胞增殖和分化,在体液免疫中有重要的作用<sup>[7]</sup>; 而其在体内的过量表达又与自身免疫性疾病密切相关<sup>[8]</sup>。由于 BLyS 具有调控机体免疫应答等重要功能,特别是对于维持生发中心 (germinal center, GC) B 细胞的增殖和抗原特异性 IgM 的分泌具有重要作用,目前已经受到广泛重视<sup>[9]</sup>。

DM 临床难治性的主要原因之一就是 B 淋巴细胞不可控制的过度增生,因此本研究就血浆 BLyS 质量浓度在 DM 疾病发生发展中的表达情况,以及血浆 PBMCs BLyS mRNA 的表达进行探讨分析,进而为阐明 DM 的发病机制提供实验依据。有动物实验表明 BLyS 的过度表达可引起 B 淋巴细

胞过多和功能异常所致的自身免疫疾病<sup>[10]</sup>,阻断 BLyS 的作用可以缓解模型鼠的病情<sup>[11]</sup>。本研究结果显示 DM 患者血浆中总的 BLyS 的质量浓度明显高于正常人,同时其 mRNA 表达明显上调。这说明 DM 患者体内存在高表达的 BLyS mRNA,使得 BLyS 表达过度,进而使调节刺激 B 细胞增殖分化的作用加强,从而对 DM 的发生发展起到了促进作用,提示通过对皮炎患者体内 BLyS 基因表达进行调控,可能达到限制 B 淋巴细胞功能和增殖的目的,从而通过控制 B 淋巴细胞找到一条提高皮炎免疫治疗疗效的新途径<sup>[12]</sup>。

## [参考文献]

- [1] 刘桂红,赵瑞景,朱铁年. B 淋巴细胞刺激因子与自身免疫性疾病[J]. 国外医学:生理、病理科学与临床分册,2005,25:166-169.
- [2] Kern C, Cornuel J F, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway[J]. Blood, 2004,103:679-688.
- [3] Shu H B, Hu W H, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens[J]. J Leukoc Biol, 1999, 65:680-683.
- [4] Moore P A, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur D W, Feng P, et al. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator[J]. Science, 1999, 285:260-263.
- [5] Schneider P, Mackay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer J L, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth[J]. J Exp Med, 1999, 189:1747-1756.
- [6] Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, Yu G L, Aggarwal B B. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor- $\kappa$ B, and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase[J]. J Biol Chem, 1999, 274:15978-15981.
- [7] Cheema G S, Roschke V, Hilbert D M, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases[J]. Arthritis Rheum, 2001, 44:1313-1319.
- [8] Kalled S L, Ambrose C, Hsu Y M. BAFF: B cell survival factor and emerging therapeutic target for autoimmune disorders[J]. Expert Opin Ther Targets, 2003, 7:115-123.
- [9] Eisenberg R, Albert D. B-cell targeted therapies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2:20-27.
- [10] Laäbi Y, Strasser A. Immunology. Lymphocyte survival-ignorance is BLyS[J]. Science, 2000, 289:883-884.
- [11] Biji M, Horst G, Limburg P C, Kallenberg C G. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Ann Rheum Dis, 2001, 60:523-526.
- [12] 周演武,谢菲,周琳,姜加陶,侯彦强,耿红莲,等. 人外周血单个核细胞 BLyS<sub>127-285</sub> 的克隆、表达和纯化[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25:1335-1337.