

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00063

原发性干燥综合征患者外周血单个核细胞内肿瘤坏死因子受体相关因子6的表达及意义

秦 琴^{1△}, 张建荣^{1△}, 谷明莉¹, 胡志德², 赵东宝^{3*}, 邓安梅^{1*}

1. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

2. 济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031

3. 第二军医大学长海医院风湿免疫科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究肿瘤坏死因子受体相关因子6 (TRAF6) 在原发性干燥综合征 (pSS) 患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 中的表达及意义。 **方法** 采用实时荧光定量反转录 PCR 法检测了 23 例 pSS 患者和 23 例健康对照个体 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的相对表达量, 分析了其与 pSS 患者血清类风湿因子 (RF)、免疫球蛋白浓度、抗 SSA 抗体和抗 SSB 抗体的关系。对其中 9 名接受糖皮质激素治疗的 pSS 患者进行了随访, 观察了治疗前后患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 水平的变化。 **结果** pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的相对表达量是健康对照个体的 2.77 倍 ($P < 0.01$), 且与血清 RF ($r = 0.45$, $P = 0.03$) 和免疫球蛋白水平 ($r = 0.43$, $P = 0.04$) 呈正相关, 但与抗 SSA 抗体和抗 SSB 抗体无关。9 名患者经过治疗后 TRAF6 mRNA 表达下调了约 50% ($P < 0.05$)。 **结论** PBMCs 中的 TRAF6 参与了 pSS 的发病机制, 且是一种潜在的 pSS 标志物。

[关键词] 干燥综合征; 肿瘤坏死因子受体相关因子6; 单核白细胞

[中图分类号] R 593.2

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)01-0063-04

TNF receptor-associated factor 6 expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with primary Sjögren's syndrome and its clinical significance

QIN Qin^{1△}, ZHANG Jian-rong^{1△}, GU Ming-li¹, HU Zhi-de², ZHAO Dong-bao^{3*}, DENG An-mei^{1*}

1. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Ji'nan Military Area Command, Ji'nan 250031, Shandong, China

3. Department of Rheumatology and Immunology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of primary Sjögren's syndrome (pSS) patients and its clinical significance. **Methods** The expression of TRAF6 mRNA was determined by quantified reverse transcriptional PCR in the PBMCs of 23 pSS patients and 23 healthy controls. The correlation of TRAF6 mRNA level with the laboratory findings, including serum rheumatoid factor (RF), globulin, anti-SSA and anti-SSA antibody, were analyzed by Spearman test. Nine of the pSS patients were followed up and their TRAF6 mRNA expression was detected after glucocorticoid treatment for 1-2 months. **Results** The TRAF6 mRNA level in pSS patients was 2.77 times higher than that in the healthy controls ($P < 0.01$). The TRAF6 mRNA level in pSS patients was positively correlated with serum RF ($r = 0.45$, $P = 0.03$) and globulin ($r = 0.43$, $P = 0.04$), but was not associated the anti-SSB and anti-SSA antibody. TRAF6 mRNA level was decreased by about 50% in the patients who were treated with glucocorticoids for 1-2 months ($P < 0.05$). **Conclusion** TRAF6 in PBMCs is involved in the pathogenesis of pSS and it may be a potential biomarker for pSS.

[Key words] Sjögren's syndrome; tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; mononuclear leukocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 63-66]

[收稿日期] 2011-12-02

[接受日期] 2011-12-26

[基金项目] 国家自然科学基金 (30972730), 上海市科委基金 (09JC1405400). Supported by National Natural Science Foundation of China (30972730) and Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (09JC1405400).

[作者简介] 秦 琴, 硕士, 主治医师. E-mail: qq_46@yahoo.com.cn; 张建荣, 副主任技师. E-mail: caoqingzhang@163.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81873311, E-mail: zhaodongbao@eastday.com; Tel: 021-81874093, E-mail: amdeng70@163.com

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种典型的自身免疫性疾病,以泪腺及唾液腺淋巴细胞浸润为典型的病理学特征,长期的自身免疫反应导致唾液腺和汗腺功能丧失,进而引起患者口腔黏膜和眼部角结膜干燥的典型临床表现,部分患者还可能具有腺体外的表现^[1]。SS的发病机制与机体免疫细胞功能的紊乱密切相关。在遗传和环境因素的联合作用下,机体免疫系统固有的精细调控机制被破坏,导致免疫细胞功能异常,从而引发了针对腺体的自身免疫反应^[2]。虽然目前对于SS患者免疫功能异常发生和发展的机制尚不清楚,但是人们已经发现了SS患者免疫细胞内有多种免疫相关分子的表达异常,这些表达异常的免疫分子中,有的是促进SS发展的原因,因而是SS潜在的治疗靶点,有的则仅仅是SS发生和发展的结果,可以为SS的预防以及诊治提供线索^[3]。

肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor-associated factor, TRAF)是一个遗传结构保守的接头蛋白,参与了多种信号转导过程。迄今为止,已经在哺乳动物中发现了7种TRAF,分别为TRAF1~7。其中,TRAF6在免疫应答调控中发挥着十分重要的作用^[4]。本研究采用荧光定量反转录PCR法检测了23例原发性干燥综合征(pSS)患者外周血单个核细胞(PBMCs)中TRAF6 mRNA的表达,分析其与pSS患者实验室检测指标之间的关系以及糖皮质激素治疗对TRAF6的影响,初步探讨了TRAF6在SS中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象 23例pSS均为2011年3月至10月间来我院就诊的患者,其诊断标准符合2002年修订的SS国际分类(诊断)标准^[5]和中华医学会风湿病学分会2010年制订的SS诊断标准^[6]。本研究排除了患有恶性肿瘤的SS患者和近1个月内有感染性疾病病史的患者。23例pSS患者中,男女比为2:21,年龄21~72岁,平均(46±10)岁。所有pSS患者均为首诊患者,就诊前未接受相关治疗。另从同期来我院查体的人群中选择23名健康个体作为对照,健康个体的定义为:(1)常规实验室和影像学检查无明显异常;(2)近1个月内无明显感染性疾病病史。对照组年龄19~68岁,平均(49±13)岁,男女比为2:21。本研究获得第二军医大学长海医院医学伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及PBMCs分离 患者接受治疗前抽取空腹静脉血4 ml,以体积为1:9、浓度为3.8%的枸橼酸钠抗凝。血液采集完毕4 h内采用Ficoll密度梯度离心分离PBMCs(Ficoll分离液购自北京鼎国生物技术有限公司),经生理盐水洗涤2次后加入1 ml TRIzol(购自美国Invitrogen公司),置于-80℃保存。

1.2.2 总RNA的抽提 取TRIzol处理好的匀浆PBMCs于室温静置;加入0.2 ml氯仿,剧烈震荡15 s,4℃静置15 min。然后在4℃条件下,以12 000×g离心15 min,移上层水相至新EP管,加0.5 ml异丙醇混匀后室温静置20 min;4℃、12 000×g离心15 min,弃上清,以75%乙醇洗涤沉淀。之后4℃、12 000×g离心5 min,弃上清。待自然干燥后加入20 μl无RNA酶水溶解RNA。通过1.2%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测提取的总RNA的质量和浓度。

1.2.3 反转录 反转录试剂购自美国Invitrogen公司,按照试剂盒推荐步骤进行反转录,将得到的cDNA置于-80℃保存。

1.2.4 定量PCR 采用荧光染料SYBGreen,以β-actin为内参对反转录得到的cDNA模板进行PCR扩增。根据NCBI基因库中人TRAF6和β-actin mRNA序列,以Primer Express软件设计基因的特异性引物。TRAF6引物序列为5'-ATA AGG GAT GCA GGT CAC AAA TG-3'(f)和5'-TCC TCA AGA TGT CTC AGT TCC AT-3'(r);内参β-actin引物序列为5'-ACC CAG CAC AAT GAA GAT CA-3'(f)和5'-TCG TCA TAC TCC TGC TTG CT-3'(r)。采用TaKaRa公司的Real-time PCR试剂盒在ABI 7500型定量PCR仪上进行PCR,反应条件:95℃ 10 s;95℃ 5 s, 60℃ 34 s,40个循环。每个样本设3复孔,取Ct平均值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示基因表达的相对变化。

1.2.5 pSS患者实验室指标的检测 用美国Beckman Coulter公司Image800系列特定蛋白分析仪及配套试剂检测pSS患者的血清类风湿因子(rheumatoid factor, RF)水平;用Hitachi 7600型全自动生化分析仪及Roche公司试剂检测pSS患者的血清球蛋白水平;用免疫印迹法检测抗SSA和抗SSB抗体,试剂为EUROIMMUN公司产品。上述检测均在患者入院后3 d内进行。

1.2.6 pSS患者的随访 在患者诊断明确后,即开

始按照 SS 治疗指南^[5-6]对患者进行相应的治疗,并在治疗启动后 1~2 个月中检测患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,两组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验或者配对 Wilcoxon 检验,两组数据之间的相关性采用 Spearman 相关性分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的表

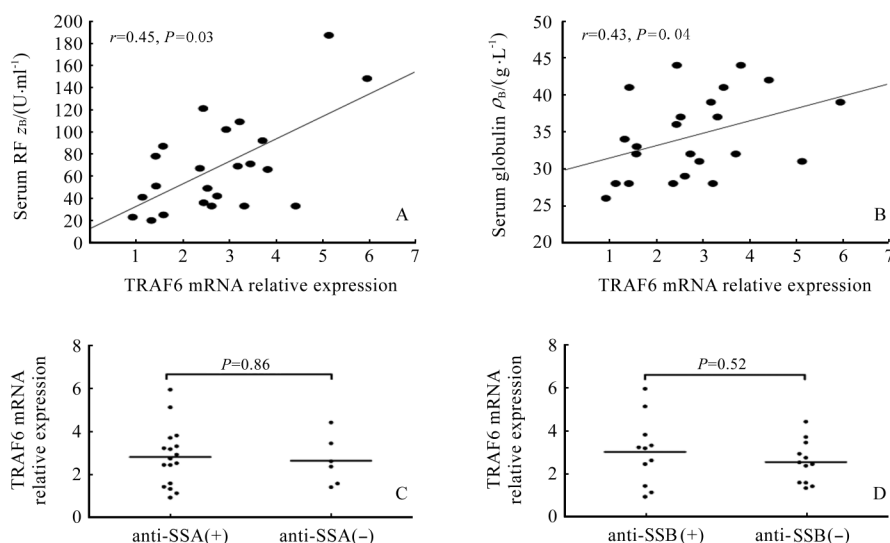


图 1 pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 与其实验室特征的关系

Fig 1 Relationship between TRAF6 mRNA and laboratory findings in pSS patients

pSS: Primary Sjögren’s syndrome; PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells; TRAF6: TNF receptor-associated factor 6; RF: Rheumatoid factor. A: Correlation of TRAF6 mRNA level with serum RF; B: Correlation of TRAF6 mRNA level with globulin; C: Correlation of TRAF6 mRNA level with anti-SSA antibody; D: Correlation of TRAF6 mRNA level with anti-SSB antibody. A,B: Spearman test; C,D: Mann-Whitney U test

2.3 治疗前后 pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的表达变化 对 9 名接受糖皮质激素治疗的 pSS 患者进行了随访,在接受糖皮质激素治疗 1~2 个月,检测了患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的表达。结果发现,患者在接受糖皮质激素治疗后,TRAF6 mRNA 表达均下调了约 50%,差异具有统计学意义

结果显示,pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的相对表达量为健康个体的 2.77 倍,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 TRAF6 mRNA 表达水平和实验室特征性检测指标的关系 结果显示:pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 水平与血清 RF 水平(图 1A, $r=0.45, P=0.03$)以及球蛋白水平(图 1B, $r=0.43, P=0.04$)呈正相关。但 TRAF6 mRNA 在抗 SSA/SSB 抗体阴性和阳性患者中的差异无统计学意义(图 1C、1D, P 均 >0.05)。

($P<0.05$,表 1)。

2.4 治疗前后 pSS 患者血清 RF 和免疫球蛋白水平的变化 9 名接受糖皮质激素治疗的 pSS 患者在接受糖皮质激素治疗 1~2 个月,血清 RF 和免疫球蛋白水平降低,差异有统计学意义(P 均 <0.05 ,表 1)。

表 1 治疗前后 pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的表达及血清 RF、免疫球蛋白水平

Tab 1 Expression of TRAF6 mRNA in PBMCs and serum RF and globulin in pSS patients before and after treatment

$n=9$

Index	Before treatment	After treatment	P value
TRAF6 mRNA	3.335(2.698, 3.335)	1.885(1.328, 2.258)	0.012
Serum RF $z_B/(U \cdot ml^{-1})$	86.500(53.250, 138.250)	51.500(36.750, 80.750)	0.017
Serum globulin $\rho_B/(g \cdot L^{-1})$	34.000(29.500, 40.500)	32.000(29.250, 34.750)	0.027

pSS: Primary Sjögren’s syndrome; PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells; TRAF6: TNF receptor-associated factor 6; RF: Rheumatoid factor. The results were presented as median (interquartile range) and compared by Wilcoxon test

3 讨论

本研究检测了 pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的表达,发现患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的表达量较健康对照个体增高,且与患者的实验室特征指标有一定相关性;糖皮质激素可以下调 pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的表达。这些结果提示:TRAF6 可能参与了 pSS 的发病机制;PBMCs 中 TRAF6 mRNA 是潜在的 pSS 标志物。

TRAF6 在免疫细胞信号转导过程中发挥的作用主要包括:在固有免疫应答过程中,TRAF6 作为 TLR 受体通路的重要信号分子,将 TLR 受体感知到的抗原信号传递给下游的信号分子,包括 TAB2、TAK1 和 NF- κ B,最终启动炎症因子的表达,引起局部或者全身的免疫应答反应^[4,7]。值得注意的是,炎症反应是“双刃剑”,虽然适度的炎症反应有利于抗原的清除和组织的修复,但是过度或者失控的炎症反应将会导致机体的损伤,其中急性的炎症反应可能引发全身炎症反应综合征(SIRS),而慢性的炎症反应则会导致自身免疫性疾病的发生^[8-9]。本研究发现 pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 表达上调,提示 pSS 患者的“TLR/TRAF6/炎症介质”信号通路可能处于过度活化状态,导致了长期、持续的炎症反应。以往的研究也发现 pSS 患者外周血炎症因子 TNF- α 、IL-6 等水平显著高于健康个体^[10-12]。

当然, PBMCs 中 TRAF6 表达也有可能系 T 或者 B 淋巴细胞内 TRAF6 表达上调所致。目前已知,在 T 细胞与 B 细胞相互作用的过程中, B 细胞内的 TRAF6 发挥着十分重要的信号转导作用,介导了由 CD40L/CD40 传递的共刺激信号,促进 B 细胞的活化、增殖以及抗体的产生^[7]。pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 表达上调,也提示其可能是导致 B 细胞过度活化,自身抗体产生的原因之一。此外,也有研究发现,TRAF6 对于维持 T 细胞的功能至关重要, T 细胞内 TRAF6 特异性缺失的小鼠更容易出现自身免疫病的病变^[13]。这些结果都提示:TRAF6 参与了 pSS 的发病机制。

为进一步明确 TRAF6 与 pSS 的发病机制是否相关以及 TRAF6 是否可以作为评价 pSS 病情的标志物,本研究进一步分析了 pSS 患者 PBMCs 中 TRAF6 mRNA 的表达水平与血清 RF、免疫球蛋白、抗 SSA 和 SSB 抗体的关系。本研究发现 pSS 患者 PBMCs 中的 TRAF6 mRNA 表达与患者的血清 RF 水平、免疫球蛋白水平呈正相关,不仅进一步证

实了 TRAF6 参与了 pSS 的发病机制,提示 TRAF6 也是一种潜在的 pSS 标志物,对 pSS 的预防以及诊疗可能具有一定的价值。

总之,本研究发现 TRAF6 参与了 pSS 的发病机制,同时也是潜在的 pSS 标志物。对 TRAF6 在 pSS 发病机制中的作用进行深入的研究,可能有助于我们深入了解 pSS 的发病机制,同时也可能为 pSS 的治疗提供新的靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Fox R I. Sjögren's syndrome[J]. *Lancet*, 2005, 366:321-331.
- [2] Nikolov N P, Illei G G. Pathogenesis of Sjögren's syndrome[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2009, 21:465-470.
- [3] Voulgarelis M, Tzioufas A G. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 6:529-537.
- [4] 袁平,周翔宇. TRAF6 在机体炎症和免疫应答中作用的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2010, 30:262-264.
- [5] Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos H M, Alexander E L, Carsons S E, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group[J]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61:554-558.
- [6] 中华医学会风湿病学分会. 干燥综合征诊断及治疗指南[J]. *中华风湿病学杂志*, 2010, 14:766-768.
- [7] Chung J Y, Lu M, Yin Q, Lin S C, Wu H. Molecular basis for the unique specificity of TRAF6[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 597:122-130.
- [8] Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition[J]. *Immunol Rev*, 2009, 227:5-8.
- [9] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. *Cell*, 2006, 124:783-801.
- [10] Szodoray P, Papp G, Horvath I F, Barath S, Sipka S, Nakken B, et al. Cells with regulatory function of the innate and adaptive immune system in primary Sjögren's syndrome[J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157:343-349.
- [11] Roescher N, Tak P P, Illei G G. Cytokines in Sjögren's syndrome[J]. *Oral Dis*, 2009, 15:519-526.
- [12] Roescher N, Tak P P, Illei G G. Cytokines in Sjögren's syndrome: potential therapeutic targets[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69:945-948.
- [13] King C G, Kobayashi T, Cejas P J, Kim T, Yoon K, Kim G K, et al. TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis[J]. *Nat Med*, 2006, 12:1088-1092.

[本文编辑] 尹茶