

紫外线对 SLE 白介素 - 6 和白介素 - 10mRNA 表达的影响

徐文英¹ 郭庆^{2*}

摘要 :目的 探讨紫外线对系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血单个核细胞(PBMC)表达白介素 - 6(IL-6)、白介素 - 10(IL-10)mRNA 的影响。方法 提取 SLE 患者及健康对照的 PBMC ,用不同剂量 311nm 窄谱中波紫外线(NB-UVB)照射 ,以实时荧光相对定量聚合酶链反应分析照射前后 PBMC IL-6、IL-10mRNA 的相对表达。结果 SLE 患者中狼疮肾炎(LN)患者 PBMC 高表达 IL-6、IL-10mRNA ,与非狼疮肾炎(非 LN)患者及正常人差异很大 ,分别是正常人的 (105.44±112.94)倍和(1.82±3.41)倍、(28.41±21.14)倍和(1.17±1.43)倍 ,其中狼疮肾炎(LN)患者 PBMC 高表达 IL-6、IL-10 mRNA ,且与临床中 24h 尿蛋白定量高度相关($r=0.82$, 0.87 , $P<0.05$) ,而非狼疮肾炎系统性红斑狼疮患者与正常人相比 ,差异无统计学意义($t'=0.43$, 0.87 , $P>0.05$)。在紫外线照射后 LN 患者 PBMC IL-6、IL-10mRNA 的表达有升高也有降低 ,升高组 SLE 疾病活动指数、抗 SSA 抗体阳性率以及光敏性发生率明显高于降低组。结论 紫外线可改变 SLE 患者 PBMC 表达 IL-6、IL-10mRNA ,紫外线可能通过此途径影响 SLE 病情。

关键词 紫外线 红斑狼疮 白介素 - 6 白介素 - 10

中图分类号 :R758.69 文献标识码 :A 文章编号 :1009-9727(2012)3-290-03

Effect of ultraviolet ray on expression of IL6 and IL10mRNA in peripheral blood monocytes of systemic lupus erythematosus cases. XU Wen-ying GUO Qing(Department of Dermatology ,Sun Yat-Sen Memorial Hospital ,Sun Yat-Sen University Guangzhou 510120 Guangdong P. R. China; Corresponding author :GUO,Qing E-mail:guoqingzsy@163.com)

Abstract :Objective To observe the impact of ultraviolet ray on the expression of IL-6,IL-10mRNA of peripheral blood monocytes (PBMC)from systemic lupus erythematosus (SLE). Cases. Methods PBMC were isolated from SLE patients and healthy controls .Then they were irradiated with 311 nm narrow band-ultraviolet ray (NB-UVB)in various dosages.IL-6,IL-10mRNA expression was measured by real-time quantitative PCR. Results The expression of IL-6, IL-10mRNA in SLE patient was very different. IL-6 IL-10mRNA were highly expressed in PBMC from lupus nephritis (LN) and its expression was highly related with 24-hour urinary protein quantitative ($r=0.82$, 0.87 , $P<0.05$). However, compared with normal subjects,the expression of IL-6 IL-10 mRNA in Non-lupus nephritis patients was not significantly different ($t=0.43$, 0.87 , $P>0.05$). The expression of IL-6 IL-10mRNA in LN could increase or decrease after exposed to ultraviolet ray. But the anti-SSA antibody positive rate,systemic lupus erythematosus activity index (SLEDAI)and photosensitivity in exopression-elevated group was obviously higher thqan that of the expression-reduced group. Conclusion The expression of IL-6, IL-10mRNA of PBMC in SLE cases woould change after exposure to NB-UVB and NB-UVB may affect the pathogenesis of SLE in this way.

Key words :Ultraviolet Ray; Lupus Erythematosus; IL-6;IL-10

系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus , SLE)是环境、基因等多种因素作用下的自身免疫性疾病。紫外线与 SLE 关系密切 ,它可诱发和加重 SLE 病情 ,加重皮损、肾脏损害、关节痛、发热等。已知 PBMC 分泌 IL-6、IL-10 异常在 SLE 发病机制中扮演着重要角色。但紫外线对 SLE 患者 PBMC 表达 IL-6、IL-10mRNA 的影响尚未明确。本文拟通过观察紫外线对 SLE 患者 PBMC 表达 IL-6、IL-10mRNA 的影响 ,探讨紫外线影响 SLE 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 对象 选择 2011 年 5 月~11 月住院 SLE 患

者 ,诊断均符合 1997 年美国风湿病学会(ACR)修订的 SLE 分类标准。疾病活动性根据 2000 年修订的 SLE 疾病活动指数 (SLEDAI-2000)判断 ,46 例 SLE 患者中狼疮肾炎(lupus nephritis ,LN)患者 36 例 ;健康对照组 20 名 ,为本院健康志愿者 ,均排除自身免疫病和慢性炎症性疾病。SLE 和健康对照组的性别、年龄差异无统计学意义。

1.1.2 主要仪器和试剂 311nm 窄谱中波紫外线治疗仪(NB-UVB)(德国 Waldmann 公司) ;Light Cycler480 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司) ;nanodrop2000 (thermo scientific) ;人淋巴细胞分离液(Ficoll)(美国 MP Biomedicals 公司) ; IL-6 和 IL-10 基因扩增引

作者单位 :中山大学孙逸仙纪念医院皮肤科 广东 广州 510120

作者简介 徐文英(1984~) ,女 ,瑶族 ,硕士研究生 ,主要从事结缔组织病(红斑狼疮为主)研究。

* 通讯作者 E-mail :guoqingzsy@163.com

物、RNAiso Plus、Prime Script RT reagent kit、SYBR Premix Ex Taq(日本 TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PBMC 的分离培养 无菌 EDTA 抗凝管抽取静脉血 6ml,用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC,加适量含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100mg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基。台盼蓝拒染实验检查细胞活性并计数细胞,当活细胞率达 95%以上进行实验。

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 合成 将分离到的 PBMC 用 PBS 充分吹匀后分别以 0.300ml/cm² NB-UVB 进行照射,照射后将 PBS 弃去,加入上述 RPMI1640 培

养液,将细胞浓度调为 2×10⁶,放入 CO₂ 孵箱中继续培养,24h 后分别取 PBMC 进行 RNA 提取,具体步骤参照说明书进行。使用 nanodrop2000 检测总 RNA 的浓度和纯度,要求 A260 / A280 比值在 1.8~2.0。经凝胶电泳检测 RNA 完整性后,利用反转录试剂盒将总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链,总反应体系 20μl,总 RNA 的加入量为 1μg。合成的 DNA 模板保存于 -20℃ 冰箱中。

1.2.3 RT-PCR 反应 将 cDNA 稀释 5 倍后,采用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行实时相对定量聚合酶链反应(Real-time PCR,RT-PCR)。PCR 总反应体

表 1 引物序列及预扩增片段长度
Table 1 Length of primer sequence and preamplified fragments

基因 Gene	(5'-3')	(3'-5')	扩增片段长度 Amplified length(bp)
β actin	TGGCACCAGCACAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	186bp
IL-6	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA	TGTCCTGCAGCCACTGGTTC	196bp
IL10	GAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGA	AGTTCACATGCGCCTTGATGTC	198bp

系为 20μl,包括 2μl DNA 模板,10μl SYBR Premix Ex Taq,10μmol/L 目的基因和内参基因 F/R 引物各 0.8μl(见表 1),DEPC 水 6.4μl。所有反应信息被 Light Cycler 480 PCR 扩增仪收集,用 Advanced Relative Quantification 方法进行分析。循环结束后,以 20℃/s 升至 95℃,再以 20℃/s 降至 65℃ 15s,以 0.1℃/s 升至 95℃进行溶解曲线分析,以检验 PCR 反应的特异性。采用比较 Ct 法进行基因相对表达量分析,根据扩增曲线得到的 Ct 值,计算出各组目的基因和内参基因 Ct 值的差值 ΔCt,利用公式计算出相对于对照组,处理组中目的基因的表达相对于内参基因的改变倍数。计算公式 ①改变倍数=2^{-ΔΔCt};②ΔΔCt=(Ct 目的基因 - Ct 内参基因)_{未知样本组} - (Ct 目的基因 - Ct 内参基因)_{对照组}。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件完成统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,IL-10 和 IL-6 之间的表达关系用 spearman 相关,临床特征与 IL-10、IL-6mRNA 之间的关系用偏相关分析,临床特征与 IL-10、IL-6mRNA 表达变化之间的关系用四格表 fisher 精确检验,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 SLE 患者 IL-6、IL-10 mRNA 的相对表达 与正常人相比,SLE 患者 PBMC IL-6、IL-10 mRNA 的表达差异很大,其中 LN 患者 PBMC 高表达 IL-6、IL-10 mRNA,分别是正常人(105.44±112.94)倍和(28.41±21.14)倍,而非狼疮肾炎系统性红斑狼疮患者(非 LN 组)分别为(1.82±3.41)倍和(1.17±1.43)

倍,与 LN 组比较,差异有统计学意义(t'=5.14,3.67,P<0.05),但与正常人相比,差异均无统计学意义(t'=0.43,0.87,P>0.05)。

2.2 紫外线照射前后 IL-6、IL-10mRNA 的表达变化与照射前相比,LN 患者 PBMC IL-6、IL-10mRNA 的表达有升高(升高组)也有降低(降低组),升高组 IL-6 和 IL-10mRNA 分别为照射前的(2.92±0.97)倍和(2.60±0.82)倍,降低组分别为(0.33±0.09)倍和(0.37±0.08)倍。而正常人 PBMC 经紫外线照射后其 IL-6、IL-10mRNA 的表达均降低,分别为照射前的(0.13±0.03)倍和(0.29±0.03)倍。紫外线照射后,IL-6、IL-10mRNA 表达降低的 LN 患者,其表达 IL-6mRNA 的降低程度也较同等剂量处理下的正常人组稍低(t'=4.66,P<0.05),而升高组 IL-6、IL-10 mRNA 的表达较正常组更明显升高(t'=8.10,7.96,P<0.05)。

2.3 临床特征与 IL-6、IL-10mRNA 表达的相关性 LN 患者 PBMC IL-6 与 IL-10 的表达显著性相关(r=0.94,P<0.05)。PBMC 表达 IL-6 和 IL-10mRNA 与临床中 LN 患者 24h 尿蛋白定量高度相关(r=0.82,0.87,P<0.05)。而与 LN 患者 SLE 疾病活动指数(SLEDAI)、血浆白蛋白水平以及尿红细胞个数之间无相关性(r_{IL-6}=0.26,0.23,0.24,r_{IL-10}=0.919,0.17,0.20,P>0.05)。

2.4 IL-6、IL-10mRNA 表达变化与临床特征的关系 紫外线照射后 LN 患者 PBMC 表达 IL-6、IL-10mRNA 有升高也有降低,升高组抗 SSA 抗体阳性率、光敏性发生率以及 SLEDAI 均显著高于降低组(P<0.05)。

而升高组与降低组 24h 尿蛋白定量以及抗 ds- DNA 抗体阳性率无统计学差异($P>0.05$) ,见表 2。

表 2 IL- 6、IL- 10mRNA 表达的变化与临床特征

Table 2 The relationship between changes of IL- 6 ,IL- 10mRNA expression and clinical features

项目 Item	水平 Level	升高组 Elevation	降低组 Reduction	P 值
抗 SSA 抗体 AntissA Ab	阳性(n)Positive	15	4	<0.05
	阴性(n)Negative	5	12	
光敏性 Photosensitivity	阳性(n)Positive	13	3	<0.05
	阴性(n)Negative	7	13	
抗 ds- DNA 抗体 Antids- DNA Ab	阳性(n)Positive	17	11	>0.05
	阴性(n)Negative	3	5	
SLEDAI		15.45± 2.67	9.44± 4.50	<0.05
24h 尿蛋白定量 Protein in 24h		1.92± 0.89	2.00± 0.98	>0.05

3 讨论

已明确 PBMC 分泌 IL- 6、IL- 10 异常在 SLE 发病机制中扮演着重要角色。IL- 6、IL- 10 是经典的多功能细胞因子 ,又称 B 细胞分化因子 ,在免疫调节和炎症反应中起着重要的作用。多项研究结果表明 IL- 6 与 SLE 患者 B 细胞过度活化有关^[1] ,同时 IL- 6 还可能直接参与介导了 SLE 的肾脏损伤^[2] ,IL- 10 可刺激 B 细胞增殖和分化但抑制其凋亡 ,诱导自身抗体的产生^[3]。因而 IL- 6、IL- 10 在 SLE 发病机制中备受重视。本研究结果显示 SLE 患者 PBMC IL- 6、IL- 10 mRNA 的表达差异很大 ,其中 LN 患者 PBMC 高表达 IL- 6、IL- 10 mRNA ,而非狼疮肾炎系统性红斑狼疮患者与正常人相比 ,其 PBMC 表达 IL- 6、IL- 10 mRNA 差异无统计学意义。基因表达量的多少受启动子调控 ,Santos MJ 等人发现 IL- 6 启动子 174 位点的基因多态性与葡萄牙白人系统性红斑狼疮的易感性无关 ,而与其发生肾炎的易感性相关^[4]。同时国内学者也发现 IL- 10 基因 - 592 位点的多态性与狼疮性肾炎发生发展密切相关^[5] ,这些均与本研究结论一致。同时这也与目前的研究观点认为细胞因子与 SLE 的发生关系不大 ,但与 SLE 亚型形成及病情严重程度密切相关一致。同时本实验发现作为与 LN 关系密切的两大细胞因子 IL- 6 和 IL- 10 ,其表达水平显著性相关($r=0.94$ $P<0.05$)。同时 IL- 6 和 IL- 10 的表达与临床中 LN 患者 24 小时尿蛋白定量高度相关($r=0.82$, 0.87 , $P<0.05$) ,而与 LN 患者 SLEDAI 无关 ,与周燕斌等的研究结果一致^[6]。提示 PBMC 高表达 IL- 6、IL- 10 mRNA 与 LN 发生发展及临床尿蛋白严重程度密切相关。

紫外线不但与 SLE 光敏性相关 ,还可诱发和加

重 SLE 病情 ,加重肾脏损害、关节痛、发热等。之前的研究主要集中在光敏性方面 ,然而紫外线不仅只作用于表皮处角质形成细胞 ,还可作用于真皮血管内皮细胞、成纤维细胞 ,甚至系统性作用于 PBMC^[7]。紫外线被认为是影响 SLE 最重要的环境因素之一 ,但紫外线对 SLE 的 PBMC 表达 IL- 6、IL- 10mRNA 的影响 ,尚未见报道。本研究发现紫外线照射后 ,LN 患者 PBMC IL- 6、IL- 10mRNA 的表达有升高也有降低 ,而正常人 PBMC IL- 6、IL- 10mRNA 的表达均降低。即便是紫外线照射后 IL- 6、IL- 10mRNA 表达降低的 LN 患者 ,其表达 IL- 6mRNA 的降低程度也较同等剂量处理下的正常人组稍低。且紫外线照射后 IL- 6、IL- 10mRNA 表达升高组的抗 SSA 抗体阳性率、光敏性发生率以及 SLEDAI 均显著高于降低组。提示紫外线可通过改变 LN 患者 IL- 6、IL- 10mRNA 的表达 ,诱发和加重 LN 病情 ,特别是在活动期、抗 SSA 抗体阳性和具光敏性的 LN 患者。

参考文献 :

- [1] E Tackey PE Lipsky et al . Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus[J] . Lupus 2004 ,13 339±343.
- [2] E Fattori C Della Rocca P Costa M Giorgio et al . Development of progressive kidney damage and myeloma kidney in interleukin -6 transgenic mice[J] . Blood ,1994 83 (9) 2570-2579.
- [3] Strasser A ,Whittingham S ,Vaux DL et al . Enforced bcl-2 expression in B lymphocyte cells prolongs antibody responses and elicit autoimmune disease[J] . Pro Natl Acad Sci USA ,1991 88 8661-8665.
- [4] Santos MJ ,Fernandes D ,Capela S ,da Silva JC et al . Interleukin-6 promoter polymorphism -174G/C is associated with nephritis in Portuguese Caucasian systemic lupus erythematosus patients [J] . Clin Rheumatol 2011 ,Mar 30(3) 409-413.
- [5] Zhu LJ ,Liu ZH ,Zeng CH ,Chen ZH ,Yu C et al . Association of interleukin -10 gene -592A/C polymorphism with the clinical and pathological diversity of lupus nephritis [J] . Clin Exp Rheumatol , 2005 ,Nov-Dec 23(6) 854-860.
- [6] Zhou YB ,Li YJ ,Wu YH et al . Study on level in serum and mRNA expression in PBMCs of interleukin-10 and interferon- γ of patients with lupus nephritis [J] . Chin J of Modern Medicine 2006 ,16(4) : 529-532.(In Chinese)
(周燕斌 ,李幼姬 ,吴玉红 ,等 . 狼疮肾炎患者血清及外周血单个核细胞中 IL-10 和 γ 干扰素的表达及意义[J] . 中国现代医学杂志 2006 ,16(4) 529-532.)
- [7] Zhang M ,Wang GS ,Li XP et al . The effect of ultraviolet ray exposure on DNA methylation in systemic lupus erythematosus [J] . Chin J Rheumatol 2009 ,13(3) 188-192.(In Chinese)
(张敏 ,汪国生 ,李向培 ,等 . 紫外线暴露对系统性红斑狼疮患者 DNA 甲基化水平的影响 [J] . 中华风湿病学杂志 2009 ,13(3) : 188-192.)

收稿日期 2011-06-24 编辑 符式刚