

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.26.006  
文章编号: 1005-8982 (2018) 26-0038-07

## EGCG 对 Ro52 介导的 THP-1 细胞凋亡及炎症因子的影响

张懿<sup>1</sup>, 刘畅<sup>2</sup>

(1. 锦州医科大学, 辽宁 锦州 121000; 2. 锦州医科大学附属第一医院  
内分泌科, 辽宁 锦州 121000)

**摘要: 目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 对 SSA/Ro52 (Ro52) 介导的人单核-巨噬细胞株 THP-1 凋亡及炎症因子分泌的影响。**方法** 构建稳定 Ro52 过表达质粒 (pCMV-Ro52), pCMV-Ro52 转染 THP-1 细胞 48 h, 检测 Ro52 mRNA 和蛋白表达水平的变化, 采用膜联蛋白-荧光素异硫氰酸酯和碘化丙锭双染检测 THP-1 细胞凋亡率, 酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-13 水平。pCMV-Ro52 质粒转染 48 h 后, 分别使用 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 处理细胞 24 h, 检测 Ro52 表达的变化、THP-1 细胞的凋亡, 以及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平。**结果** pCMV-Ro52 促进 Ro52 表达 ( $P < 0.05$ ), 上调 THP-1 细胞凋亡率及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平 ( $P < 0.05$ ); 在 Ro52 过表达的 THP-1 细胞中, 与 0 mg/L EGCG 组相比, 10、20 和 50 mg/L EGCG 组 Ro52 蛋白表达水平、凋亡率及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** Ro52 过表达可促进人单核-巨噬细胞 THP-1 凋亡及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 分泌; EGCG 可减弱 Ro52 介导的 THP-1 细胞凋亡, 减少炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 的分泌。

**关键词:** 单核-巨噬细胞; Ro52; 细胞凋亡; 炎症因子; 表没食子儿茶素没食子酸酯

**中图分类号:** R593.241

**文献标识码:** A

## Effect of EGCG on Ro52-induced apoptosis of THP-1 cells and inflammatory factors

Yi Zhang<sup>1</sup>, Chang Liu<sup>2</sup>

(1. Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

**Abstract: Objective** To explore the influence of epigallocatechin gallate (EGCG) on apoptosis of human monocyte macrophage cell line (THP-1) and expression of inflammatory cytokines through Ro52 over-expression. **Methods** Ro52 over-expression plasmid (pCMV-Ro52, 20  $\mu$ g) was constructed and transfected into THP-1 cells for 48 h. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the mRNA level of Ro52 and the protein expression level of Ro52 was detected by Western blot. The apoptosis of THP-1 cells was detected by Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-13 were measured by ELISA. After 48 h of pCMV-Ro52 plasmid transfection, the cells were treated with EGCG at different concentrations (0, 5, 10, 20 and 50 mg/L) for 24 h. The protein expression level of Ro52, the expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-13 and the apoptosis rate of THP-1 cells were detected. **Results** pCMV-Ro52 (20  $\mu$ g) significantly increased the

收稿日期: 2018-02-03

[通信作者] 刘畅, E-mail: changliulnedu@163.com; Tel: 13909896598

mRNA and protein levels of Ro52 ( $P < 0.05$ ) and up-regulated the apoptosis rate of THP-1 cells and the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-13 ( $P < 0.05$ ). In the Ro52-overexpressed THP-1 cells, compared with the 0 mg/L group, the Ro52 protein levels, the cell apoptosis rates and the levels of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-13) were significantly decreased in the 10 mg/L, 20 mg/L and 50 mg/L EGCG-treated groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The over-expression of Ro52 could promote the apoptosis of THP-1 cells and the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-13. EGCG can attenuate Ro52-induced apoptosis of THP-1 cells and secretion of inflammatory cytokines.

**Keywords:** monocyte-macrophages; Ro52; apoptosis; inflammatory factors; epigallocatechin gallate

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 累及多系统、多器官, 发病机制复杂<sup>[1-2]</sup>。茶多酚活性成分表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 对狼疮性肾炎的调控作用显著<sup>[3-4]</sup>。SSA/Ro52 (Ro52) 是 SLE 的关键调控靶点<sup>[5-9]</sup>, 其调控机制可能与单核-巨噬细胞凋亡和炎症反应密切相关<sup>[10-13]</sup>。EGCG 能显著抑制正常体细胞中 Ro52 的表达<sup>[14]</sup>。然而, 单核-巨噬细胞中 EGCG 与 Ro52 的功能和调控关系并不清楚。本研究旨在探索不同浓度 EGCG 对 Ro52 介导的单核-巨噬细胞 THP-1 凋亡及炎症反应的调控效应, 为 SLE 发病机制的研究提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

**1.1.1 主要材料** 人单核-巨噬细胞 THP-1 (中国科学院上海微生物所菌种保藏中心), Ro52 过表达质粒 (pCMV-Ro52) (北京 Biovector 公司)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-13 检测试剂盒购自美国 Trevigen 公司, M-MLV 逆转录酶 (美国 Clontech 公司), SYBR Green Master Mix (美国 Life Technologies 公司), BCA 蛋白检测试剂盒、anti-Ro52、anti-甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、辣根过氧化酶二抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, RPMI 1640 培养基 (美国 Abcam 公司), 膜联蛋白-荧光素异硫氰酸酯 (Annexin V-fluorescein isothiocyanate, AV-FITC) (美国 BD Pharmingen 公司), 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (美国 Sigma 公司), Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (德国 Fermentas 公司), 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) (美国 Millipore 公司), 酶联免疫吸附

法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (美国 Santa Cruz 公司) Image-Pro Plus 6 软件 (美国 Media Cybernetics 公司), BD FACSCalibur™ 系统 (美国 BD 公司), Beckman CXP 软件 (美国 Brea 公司)。

### 1.2 人单核-巨噬细胞 THP-1 的培养与分组

**1.2.1 人单核-巨噬细胞 THP-1 的培养** 在 37℃、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 条件下, 用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基培养人单核-巨噬细胞 THP-1。细胞 2 d 或 3 d 换液 1 次, 细胞融合率达 80% 时, 进行传代, 将细胞浓度调整为  $1.0 \times 10^6$  个/ml 用于后续实验。

**1.2.2 细胞分组** 正常培养的 THP-1 细胞为对照组, 20  $\mu$ g pCMV-Ro52 为 pCMV-Ro52 组, 20  $\mu$ g pCMV-NC 为 pCMV-NC 组<sup>[15]</sup>, 以及 Ro52 过表达 48 h 后继续使用 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 处理 24 h 的 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 组<sup>[16]</sup>。

### 1.3 Ro52 过表达质粒的构建与细胞转染

采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 对 人源 Ro52 的 cDNA (NM\_003141.3) 进行扩增, 并且将产物插入 pCMV 质粒, 进行转染效率优化筛选。将浓度为  $1.0 \times 10^6$  个/ml 的 THP-1 细胞转入 24 孔板中培养, 参考谢军等<sup>[17]</sup>的研究, 使用 pCMV-NC 质粒或者 pCMV-Ro52 分别对 THP-1 细胞进行转染。48 h 后采用 qRT-PCR 进行扩增。Ro52 正向引物: 5'-AGAGAGACTTCACCTGTTCTGT-3', 反向引物: 5'-TCAGTTCCTAATGCCACCT-3'。采用 Western blot 检测 THP-1 细胞中 Ro52 的表达。

### 1.4 qRT-PCR

参照 qRT-PCR 试剂盒说明书抽提细胞总 RNA, 采用 Trizol 试剂盒和逆转录试剂盒将 5.0  $\mu$ g RNA 作为模板合成 cDNA, 用 SYBR Green Master Mix 进行基因表达的实时分析。反应条件: 95℃ 变性 5 min,

95℃延伸 5 s, 60℃退火 1 min, 共 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 的相对表达量, 每组数据以倍数变化进行展示。GAPDH 用于 qRT-PCR 结果的标准化处理。

### 1.5 Western blot 检测

收集各处理组细胞进行裂解, 并抽提总蛋白质。采用 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离不同大小的蛋白质, 用聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 进行湿法转膜。用 3% 脱脂牛奶对转膜完成的 PVDF 膜室温封闭 1.5 h, PBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 采用一抗包括 goat 源性的 Ro52 (1 : 900) 和 GAPDH (1 : 2 000) 4℃孵育过夜。洗去一抗, 在室温条件下用辣根过氧化物酶二抗 (1 : 18 000) 孵育 1.5 ~ 2.0 h, 洗涤抗体液。采用增强化学发光法显影。Western blot 检测结果用 Image-Pro Plus 6 软件进行图像分析。

### 1.6 细胞凋亡实验

收集各组细胞, 采用 BD FACSCalibur™ 系统、AV-FITC 及 PI 试剂盒, 依据试剂盒说明书进行细胞凋亡检测。主要步骤为: 不同处理条件下的细胞以  $1.0 \times 10^6$  个/ml 的密度悬浮于 100 ml 结合缓冲液, 将细胞用 AV-FITC 和 PI 孵育 15 min, 在 FC-500 流式细胞仪上使用 Beckman CXP 软件进行分析。

### 1.7 ELISA

收集各组细胞, 将细胞悬液 6 070 r/min 离心 15 min。将上清液收集并储存于 80℃, 用于炎症因子分析。根据试剂盒说明书进行操作, 炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 采用 ELISA 试剂盒进行检测。

### 1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Ro52 过表达效果

**2.1.1 Ro52 mRNA 检测** pCMV-Ro52 转染 48 h 后对 Ro52 mRNA 和蛋白表达的影响。对照组、pCMV-NC 组、pCMV-Ro52 组 Ro52 mRNA 相对表达量分别为 ( $0.988 \pm 0.021$ )、( $1.003 \pm 0.029$ ) 和 ( $2.558 \pm 0.418$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=8.543, P=0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验,

pCMV-Ro52 组 Ro52 mRNA 表达水平较对照组升高 ( $P < 0.05$ ); 而 pCMV-NC 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 pCMV-NC 组相比, pCMV-Ro52 组 Ro52 mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。

**2.1.2 Ro52 蛋白** 对照组、pCMV-NC 组、pCMV-Ro52 组 Ro52 蛋白相对表达量分别为 ( $0.989 \pm 0.021$ )、( $1.000 \pm 0.065$ ) 和 ( $2.291 \pm 0.815$ ), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=62.134, P=0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, pCMV-Ro52 组 Ro52 蛋白表达水平较对照组升高 ( $P < 0.05$ ); 而 pCMV-NC 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 pCMV-NC 组相比, pCMV-Ro52 组 Ro52 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。结果表明, pCMV-Ro52 转染 THP-1 细胞 48 h 可上调 Ro52 的表达。见图 1。

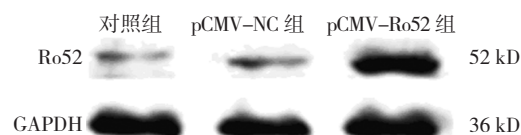


图 1 各组 Ro52 蛋白的表达

### 2.2 Ro52 过表达对 THP-1 细胞凋亡的影响

Ro52 过表达质粒 pCMV-Ro52 转染细胞 48 h 后检测其对 THP-1 细胞凋亡比例的影响。对照组、pCMV-NC 组、pCMV-Ro52 组 THP-1 细胞凋亡率分别为 ( $2.401 \pm 1.030$ )%、( $2.532 \pm 0.512$ )% 和 ( $10.337 \pm 0.987$ )%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=62.134, P=0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, pCMV-Ro52 组 THP-1 细胞凋亡率较对照组升高 ( $P < 0.05$ ); 而 pCMV-NC 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 pCMV-NC 组相比, pCMV-Ro52 组 THP-1 细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ )。结果表明, pCMV-Ro52 转染 THP-1 细胞 48h 可上调 THP-1 细胞凋亡率。见图 2。

### 2.3 Ro52 过表达对 THP-1 细胞炎症因子水平的影响

Ro52 过表达质粒 pCMV-Ro52 转染细胞 48 h 后对照组、pCMV-NC 组、pCMV-Ro52 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, pCMV-Ro52 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平较对照组升高 ( $P < 0.05$ ); pCMV-NC 组与对照组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平比较, 差异无统计学

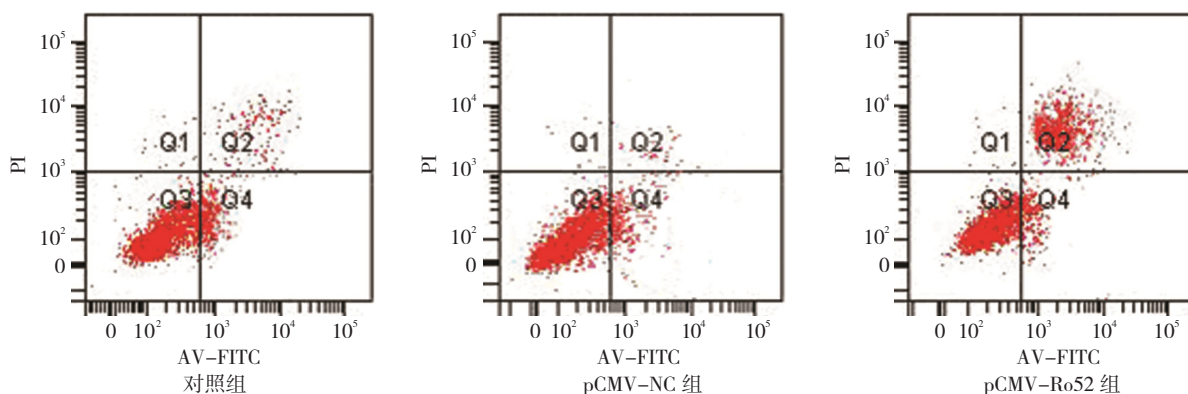


图 2 Ro52 过表达对 THP-1 细胞凋亡的影响

意义 ( $P > 0.05$ ); 与 pCMV-NC 组相比, pCMV-Ro52 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平升高 ( $P < 0.05$ )。结果表明, pCMV-Ro52 转染 THP-1 细胞 48 h 可上调 THP-1 细胞分泌的炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  与 IL-13。见表 1。

表 1 各组炎症因子水平的变化 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-13
对照组	1.034 $\pm$ 0.021	1.011 $\pm$ 0.032	1.002 $\pm$ 0.072
pCMV-NC 组	1.030 $\pm$ 0.064	1.026 $\pm$ 0.064	1.074 $\pm$ 0.050
pCMV-Ro52 组	2.233 $\pm$ 0.491 <sup>†</sup>	2.157 $\pm$ 0.336 <sup>†</sup>	2.335 $\pm$ 0.316 <sup>†</sup>
F 值	5.347	9.257	14.352
P 值	0.002	0.001	0.001

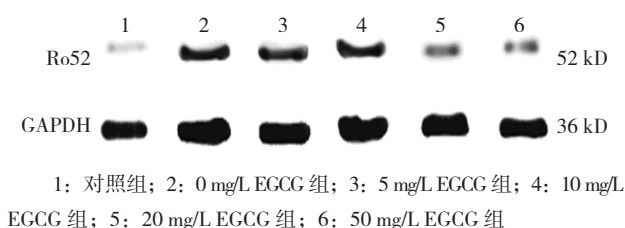
注: <sup>†</sup> 与对照组、pCMV-NC 组比较,  $P < 0.05$

## 2.4 EGCG 抑制 Ro52 的过表达

使用 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 处理过表达 Ro52 的细胞 24 h, 对照组, 以及 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 组 Ro52 蛋白相对表达量分别为 (0.974  $\pm$  0.069)、(2.425  $\pm$  0.562)、(2.032  $\pm$  0.683)、(1.907  $\pm$  0.637)、(1.715  $\pm$  0.367)、(1.308  $\pm$  0.102), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 31.342, P = 0.000$ )。进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, 与 0 mg/L EGCG 组相比, 20 和 50 mg/L EGCG 组 Ro52 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与 10 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与 5 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

## 2.5 EGCG 调控 THP-1 细胞凋亡

使用不同浓度 (0、5、10、20 和 50 mg/L) EGCG 处理过表达 Ro52 的 THP-1 细胞 24 h 后, 对照组, 以及 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 组 THP-1 细



1: 对照组; 2: 0 mg/L EGCG 组; 3: 5 mg/L EGCG 组; 4: 10 mg/L EGCG 组; 5: 20 mg/L EGCG 组; 6: 50 mg/L EGCG 组

图 3 不同浓度 EGCG 对 Ro52 蛋白表达的影响

胞凋亡率分别为 (2.362  $\pm$  0.213)%、(10.380  $\pm$  0.682)%、(10.061  $\pm$  0.123)%、(9.650  $\pm$  0.781)%、(6.352  $\pm$  0.902)%、(5.234  $\pm$  0.321)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 82.354, P = 0.000$ )。进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, 与 0 mg/L EGCG 组相比, 20 和 50 mg/L EGCG 组细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与 10 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与 5 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 4。

## 2.6 EGCG 阻断 Ro52 对细胞炎症因子的影响

**2.6.1 TNF- $\alpha$**  使用不同浓度 (0、5、10、20 和 50 mg/L) EGCG 处理过表达 Ro52 的 THP-1 细胞 24 h 后, 对照组, 以及 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, 与 0 mg/L EGCG 组相比, 20 和 50 mg/L EGCG 组 TNF- $\alpha$  水平降低 ( $P < 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与 10 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与 5 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

**2.6.2 IL-1 $\beta$**  对照组, 以及 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 组 IL-1 $\beta$  水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, 与 0 mg/L EGCG 组相比, 20 和 50 mg/L EGCG 组 IL-1 $\beta$  水平降低 ( $P < 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与



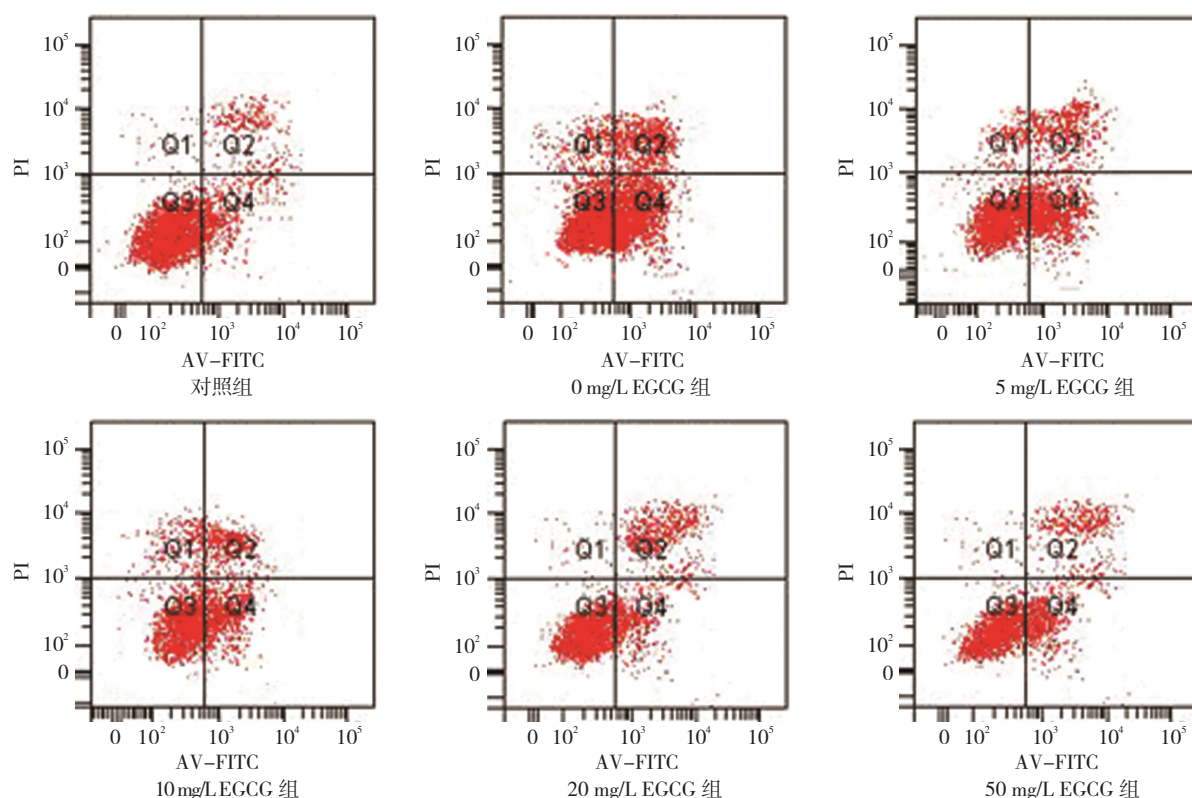


图 4 EGCG 对 THP-1 细胞凋亡的影响

表 2 各组炎症因子水平的变化 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-13
对照组	1.018 $\pm$ 0.134	1.045 $\pm$ 0.084	1.035 $\pm$ 0.086
0 mg/L EGCG 组	2.308 $\pm$ 0.276	2.096 $\pm$ 0.257	2.322 $\pm$ 0.374
5 mg/L EGCG 组	2.043 $\pm$ 0.142	2.089 $\pm$ 0.108	2.159 $\pm$ 0.244
10 mg/L EGCG 组	2.012 $\pm$ 0.291	1.977 $\pm$ 0.172	1.947 $\pm$ 0.138 <sup>†</sup>
20 mg/L EGCG 组	1.725 $\pm$ 0.224 <sup>†</sup>	1.749 $\pm$ 0.177 <sup>†</sup>	1.737 $\pm$ 0.452 <sup>†</sup>
50 mg/L EGCG 组	1.266 $\pm$ 0.260 <sup>†</sup>	1.193 $\pm$ 0.326 <sup>†</sup>	1.187 $\pm$ 0.258 <sup>†</sup>
F 值	22.241	12.857	69.521
P 值	0.001	0.000	0.000

注: † 与 0 mg/L EGCG 组比较,  $P < 0.05$

10 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与 5 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

**2.6.3 IL-13** 对照组, 以及 0、5、10、20 和 50 mg/L EGCG 组 IL-13 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, 与 0 mg/L EGCG 组相比, 10、20 和 50 mg/L EGCG 组 IL-13 水平降低 ( $P < 0.05$ ); 0 mg/L EGCG 组与 5 mg/L EGCG 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

### 3 讨论

#### 3.1 Ro52 参与单核-巨噬细胞凋亡和破坏正常的炎症因子水平

本研究发现, 过表达 Ro52 既可以促进 THP-1 细胞凋亡, 又可以促进 THP-1 细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-13 的分泌。这说明, Ro52 在单核-巨噬细胞的功能紊乱和炎症因子分泌中发挥调控作用。单核-巨噬细胞在 SLE 的起病过程中发挥重要作用, 包括调节炎症反应, 诱导免疫应答、清除凋亡细胞等<sup>[18]</sup>, 同时还发现巨噬细胞在免疫应答启动过程中是多种细胞因子的重要来源<sup>[19]</sup>。TABAS 等<sup>[20]</sup>研究表明, SLE 相关的并发症, 如狼疮肾炎的早期和进展期均可出现大量巨噬细胞的异常凋亡, 巨噬细胞本身负责清除凋亡细胞并调节自身生理性正常凋亡, 而 SLE 患者体内的巨噬细胞吞噬功能异常, 以及自身免疫疾病中巨噬细胞的自身凋亡调控功能同样显示异常, 这暗示巨噬细胞自身异常凋亡可能与 SLE 密切相关。

董晓薇<sup>[9]</sup>等研究表明, SLE 患者血清中靶抗原 Ro52 蛋白表达水平显著升高, 这可能与 SLE 患者心血管疾病加剧并伴有单核-巨噬细胞异常凋亡增加, 以及细胞炎症因子分泌增加有关。Ro52 蛋白是 SLE

等多种自身免疫性疾病过程中的主要靶点<sup>[6-8]</sup>, 可能在调节凋亡和炎症反应过程中扮演重要角色<sup>[21]</sup>。对 SLE 心脏受累患者的研究中发现, 抗 Ro52 抗体与胎儿凋亡的心肌细胞表面 Ro52 抗原结合后激活巨噬细胞<sup>[22]</sup>。同时发现, Ro52 在细胞内免疫过程中发挥重要的凋亡调节作用<sup>[10]</sup>。BLAKE 等<sup>[10]</sup>研究发现, 石棉暴露导致的自身免疫疾病可促进巨噬细胞凋亡, 并且凋亡的巨噬细胞表面 Ro52 表达上调。本研究明确 Ro52 可以调控单核-巨噬细胞的凋亡及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 的分泌。结果表明, Ro52 作为重要的前凋亡分子在自身免疫疾病的巨噬细胞凋亡和炎症反应过程中起促进作用, 而且很有可能是 SLE 免疫调控的一个重要途径。

### 3.2 EGCG 减缓 Ro52 对单核-巨噬细胞凋亡和炎症因子水平的调控

EGCG 是一种绿茶多酚类分子<sup>[3, 23]</sup>, 被称为自身免疫性疾病的潜在治疗武器, 已经在治疗干燥综合征等疾病、增强免疫系统功能与抑制肿瘤发生等领域中有深入研究<sup>[24]</sup>。本研究发现, EGCG 能够在 20 和 50 mg/L 2 个浓度显著减缓 Ro52 过表达质粒转染 THP-1 细胞导致的 Ro52 超高表达, 并且可以阻止 THP-1 细胞被 Ro52 过表达后导致的细胞凋亡增加。与 pCMV-Ro52 组相比, 细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平被 EGCG 抑制。结果表明, EGCG 是一种有效的抗凋亡和抗炎分子, 可以减缓阻断 Ro52 的促细胞凋亡效应和促炎症因子效应。

以往研究同样发现, EGCG 能够有效抑制巨噬细胞凋亡, 减轻免疫细胞的炎症反应<sup>[11, 13]</sup>。HASHIMOTO 等<sup>[25]</sup>研究发现, 抑制 EGCG 可明显诱导小鼠巨噬细胞样细胞的凋亡。研究发现 EGCG 对 Ro52 具有明显的抑制效应<sup>[14]</sup>。本研究结果发现, EGCG 显著抑制 Ro52 诱发的 THP-1 细胞凋亡, 与上述结果一致。HSU 等<sup>[14]</sup>在研究正常人原发性表皮角质形成细胞与永生化人涎腺腺泡细胞功能时发现, EGCG 能够显著抑制 Ro52 等多种自身抗原的表达。结果表明, Ro52 可被 EGCG 负向调控, 并且 EGCG 可通过抑制 Ro52, 介导人单核-巨噬细胞的凋亡与炎症反应。

综上所述, Ro52 过表达可促进人单核-巨噬细胞 THP-1 的凋亡与炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 的分泌。EGCG 可减弱 Ro52 介导的 THP-1 细胞凋亡, 减少炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 的分泌。本实验为进一步研究 SLE 等自身免疫疾病中巨

噬细胞的功能、SLE 的预防与治疗, 以及 SLE 的发病机制提供实验依据。

### 参 考 文 献:

- [1] AMEL R, MONIA K, ANIS M, et al. Systemic lupus erythematosus revealed by cytomegalovirus infection[J]. Pan African Medical Journal, 2016, 24: 241.
- [2] GIANFRANCESCO M A, BALZER L, TAYLOR K E, et al. Genetic risk and longitudinal disease activity in systemic lupus erythematosus using targeted maximum likelihood estimation[J]. Genes Immunity, 2016, 17(6): 358-362.
- [3] TSAI P Y, KA S M, CHANG J M, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(3): 744-754.
- [4] APARICIO-SOTO M, SANCHEZ-HIDALGO M, ALARCON-DE-LA-LASTRA C. An update on diet and nutritional factors in systemic lupus erythematosus management[J]. Nutr Res Rev, 2017, 30(1): 118-137.
- [5] 宋涛, 兰小鹏. Ro52 蛋白的分子生物学研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2010, 21(6): 874-878.
- [6] FRANK M, ITOH K, MCCUBBIN V. Epitope mapping of the 52-kD Ro/SSA autoantigen[J]. Clinical Experimental Immunology, 1994, 95(3): 390-396.
- [7] BOŽIČ B, PRUIJN G, ROZMAN B, et al. Sera from patients with rheumatic diseases recognize different epitope regions on the 52-kD Ro/SS-A protein[J]. Clinical Experimental Immunology, 1993, 94(2): 227-235.
- [8] BUYON J P, SLADE S G, REVEILLE J D, et al. Autoantibody responses to the native 52-kDa SS-A/Ro protein in neonatal lupus syndromes, systemic lupus erythematosus, and Sjogren's syndrome[J]. The Journal of Immunology, 1994, 152(7): 3675-3684.
- [9] 董晓薇, 杜宗孝, 朴文花. 自身抗体联合检测诊断系统性红斑狼疮的价值 [J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(9): 831-834.
- [10] BLAKE D J, WETZEL S A, PFAU J C. Autoantibodies from mice exposed to Libby amphibole asbestos bind SSA/Ro52-enriched apoptotic blebs of murine macrophages[J]. Toxicology, 2008, 246(2/3): 172-179.
- [11] 张东芳, 肖鹏, 韩晨露, 等. 表没食子儿茶素-3-没食子酸酯抑制脂多糖诱导的巨噬细胞促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  基因表达 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(4): 402-408.
- [12] AMARILYO G, IIKUNI N, LIU A, et al. Leptin enhances availability of apoptotic cell-derived self-antigen in systemic lupus erythematosus[J]. PLoS One, 2013, 9(11): DOI: org/10.1371/journal.pone.0112826.
- [13] AL GADBAN M M, ALWAN M M, SMITH K J, et al. Accelerated vascular disease in systemic lupus erythematosus: role of macrophage[J]. Clinical Immunology, 2015, 157(2): 133-144.
- [14] HSU S, DICKINSON D P, QIN H, et al. Inhibition of autoantigen

- expression by (-) -epigallocatechin-3-gallate (the major constituent of green tea) in normal human cells[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005, 315(2): 805-811.
- [15] YANG K, SHI H X, LIU X Y, et al. TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response[J]. *J Immunol*, 2009, 182(6): 3782-3792.
- [16] 王婷, 周红, 解鸿翔, 等. EGCG 干预抗  $\beta_2$ GPI/ $\beta_2$ GPI 复合物对 THP-1 细胞的诱导活化作用 [J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(6): 430-433.
- [17] 谢军, 万小健, 卞金俊. TRIM21 促进 T 淋巴细胞凋亡的分子机制及临床应用价值分析 [J]. *上海医学*, 2012, 2: 021.
- [18] THANEI S, TRENDELENBURG M. Anti-C1q autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients induce a proinflammatory phenotype in macrophages[J]. *The Journal of Immunology*, 2016, 196(5): 2063-2074.
- [19] BIERMANN M H, VEISSI S, MAUERÖDER C, et al. The role of dead cell clearance in the etiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus: dendritic cells as potential targets[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2014, 10(9): 1151-1164.
- [20] TABAS I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(1): 36-46.
- [21] MENOR A R, JURADO R A, RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ F J, et al. Association of anti-Ro52, anti-Ro60 and anti-La antibodies with diagnostic, clinical and laboratory features in a referral hospital in Jerez, Spain[J]. *Reumatología Clínica*, 2015, 12(5): 256-262.
- [22] BRIASSOULI P, HALUSHKA M K, REED J H, et al. Paediatric rheumatology: a central role of plasmin in cardiac injury initiated by fetal exposure to maternal anti-Ro autoantibodies[J]. *Rheumatology*, 2013, 52(8): 1448-1453.
- [23] CHACKO S M, THAMBI P T, KUTTAN R, et al. Beneficial effects of green tea: a literature review[J]. *Chin Med*, 2010, 5: 13.
- [24] HSU S, DICKINSON D. A new approach to managing oral manifestations of Sjogren's syndrome and skin manifestations of lupus[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39(3): 229.
- [25] HASHIMOTO K, SAKAGAMI H. Induction of apoptosis by epigallocatechin gallate and autophagy inhibitors in a mouse macrophage-like cell line[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(3A): 1713-1718.

(童颖丹 编辑)