

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.11.013

文章编号: 1005-8982(2016)11-0063-05

论著

系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞 Toll 样受体 9 和核因子 - κ B 水平的测定及其临床意义

陈海莲¹, 杨晓娥²

(1. 山东省菏泽市立医院 皮肤科, 山东 菏泽 274000; 2. 山东省曹县县立医院 皮肤科, 山东 曹县 274400)

摘要:目的 测定系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血单个核细胞(PBMCs)Toll 样受体 9(TLR9)和核因子 - κ B(NF- κ B)水平并分析其临床意义。**方法** 选取 2013 年 4 月-2014 年 12 月该院风湿免疫科收治的 60 例 SLE 患者作为研究对象,其中 35 例 SLE 患者处于活动期作为活动组,25 例 SLE 患者处于缓解期作为缓解组。同时选取该院健康体检者 30 例作为对照组。对比 3 组 PBMCs 中 TLR9 和 NF- κ B 水平,观察 SLE 患者 PBMCs 中 TLR9、NF- κ B 水平与脏器受累和免疫抑制剂种类的相关性。**结果** 活动组 PBMCs 中 TLR9 水平低于缓解组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);缓解组 PBMCs 中 TLR9 水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。活动组 PBMCs 中 NF- κ B 水平低于缓解组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);缓解组 PBMCs 中 NF- κ B 水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。皮疹、白细胞降低表现阳性患者与阴性患者 PBMCs 中 TLR9 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。发热、浆膜炎、血尿表现阳性患者与阴性患者 PBMCs 中 TLR9 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。浆膜炎、血尿表现阳性患者与阴性患者 PBMCs 中 NF- κ B 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。发热、皮疹、白细胞降低表现阳性患者与阴性患者 PBMCs 中 NF- κ B 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** SLE 患者 TLR9 水平较正常人群明显降低,NF- κ B 水平较正常人群明显升高,同时 TLR9 水平的降低与发热、浆膜炎、血尿的临床表现相关。NF- κ B 水平升高与发热、皮疹、白细胞降低的临床表现相关,严密监测 SLE 患者 PBMCs 中 TLR9 和 NF- κ B 水平变化对患者的临床诊治有重要价值。

关键词: 系统性红斑狼疮;外周血单个核细胞;Toll 样受体 9;核因子 - κ B;水平测定;临床意义

中图分类号: R593.241

文献标识码: A

TLR9 and NF- κ B levels in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus and their clinical significance

Ha-lian Chen¹, Xiao-e Yang²

(1. Department of Dermatology, Heze Manicipal Hospital, Heze, Shangdong 274000, China; 2. Department of Dermatology, Caoxian County Hospital, Caoxian, Shandong 274400, China)

Abstract: Objective To explore and analyze the levels of toll-like receptor 9 (TLR9) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and its clinical significance. **Methods** Sixty SLE patients in the Department of Rheumatology and Immunology of our hospital from April 2013 to December 2014 were selected as the research objects, including 35 SLE patients in active stage as active group and 25 cases of SLE patients in remission stage as remission group. At the same time, 30 healthy cases in our hospital were selected as control group. TLR9 and NF- κ B levels in PBMCs were compared between the three groups. The correlations of TLR9 and NF- κ B levels in

收稿日期:2015-05-25

PBMCs with organ involvement and types of immunosuppressants were observed. **Results** The level of TLR9 in PBMCs of the active group was significantly lower than that of the remission group and the control group ($P < 0.05$). The level of TLR9 in PBMCs of the remission group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The level of NF- κ B in PBMCs in the active group was significantly lower than that of the remission group and the control group ($P < 0.05$). The level of NF- κ B in PBMCs of the remission group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The TLR9 in PBMCs in the patients with skin rash and decreased white blood cells was not significantly different from that in the patients without skin rash or decreased white blood cells ($P > 0.05$). The TLR9 level in PBMCs of the patients with fever, serositis or hematuria was significantly different from that of the patients without fever, serositis or hematuria ($P < 0.05$). There was no significant difference in the NF- κ B level between the patients with and the patients without serositis or hematuria ($P > 0.05$). The level of NF- κ B in PBMCs of the patients with serositis or hematuria was not significantly different from that of the patients without serositis or hematuria. The level of NF- κ B in PBMCs of the patients with fever, rash or decreased white blood cells was statistically different from that in PBMCs of the patients with negative findings ($P < 0.05$). **Conclusions** TLR9 level significantly decreases while NF- κ B level significantly increases in patients with systemic lupus erythematosus compared to that in normal population. Decreased TLR9 level is correlated with fever, serositis and hematuria. Increased NF- κ B level is correlated with fever, rash and reduced white cell count. Close monitoring of TLR9 and NF- κ B level changes in PBMCs of system lupus erythematosus patients has important value in clinical diagnosis and treatment of the disease.

Keywords: systemic lupus erythematosus; peripheral blood mononuclear cell; toll-like receptor 9; nuclear factor- κ B; clinical significance

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 属于风湿性疾病中的一种, 近年来发病率逐渐提高, 已成为风湿免疫科常见的疾病之一^[1]。目前, 普遍认为系统性红斑狼疮的发病原因与免疫因素有关, 是一种以免疫耐受紊乱, T 细胞与 B 细胞途径异常活化和抗自身抗体出现为特征的免疫缺陷病。系统性红斑狼疮的临床表现差异很大^[2], 可以表现为全身多器官脏器受累, 因而早期准确的诊断及发病机制的研究显得尤为重要。目前, 对于系统性红斑狼疮的诊断主要以抗核抗体 (antinuclear antibody, ANA)、抗 dsDNA 抗体等血生化指标为主。但多年的临床应用结果表明, 该检测效果不能令人满意。Toll 样受体 9 (toll-like receptors 9, TLR9) 是一种固有免疫受体^[3], 不仅直接参与抵抗病原微生物的侵袭, 同时通过释放特异的炎症因子和启动相应免疫细胞在免疫应答中发挥重要作用。核因子 - κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种重要的转录调控因子^[4], 主要通过启动子及增强子的作用促进多种细胞因子及免疫细胞的活化, 在免疫应答早期发挥至关重要的作用。因此, 本实验通过检测系统性红斑狼疮患者及健康体检者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) TLR9 和 NF- κ B 水平, 分析其临床意义, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 4 月 -2014 年 12 月本院风湿免疫科收治的 60 例系统性红斑狼疮患者作为研究对象。其中, 35 例 SLE 患者处于活动期作为活动组, 25 例 SLE 患者处于缓解期作为缓解组。同时, 选取本院健康体检者 30 例作为对照组。全部患者在本院确诊, 并签署知情同意书, 本实验经本院医学伦理学会审核。活动组男性 4 例, 女性 31 例; 年龄 15 ~ 61 岁, 平均 (35.2 ± 9.8) 岁; 病程 2 ~ 12 年, 平均 (5.3 ± 2.4) 年。缓解组男性 3 例, 女性 22 例; 年龄 14 ~ 60 岁, 平均 (35.4 ± 8.9) 岁; 病程 3 ~ 11 年, 平均 (5.6 ± 2.5) 年。对照组男性 4 例, 女性 26 例; 年龄 12 ~ 61 岁, 平均 (36.3 ± 9.4) 岁; 病程 2 ~ 11 年, 平均 (5.1 ± 3.1) 年。两组性别、年龄、病程等一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 纳入标准

① 年龄 10 ~ 65 岁; ② 符合现代内科学第 4 版关于系统性红斑狼疮的诊断标准; ③ 患者依从度高, 可以完成实验计划; ④ 临床资料齐全; ⑤ 告知本研究目的、方法及意义, 同意参加并签署同意书。

1.3 排除标准

① 合并强制性脊柱炎、类风湿性关节炎、骨关节

炎等免疫系统疾病;②合并肿瘤、糖尿病、妊娠等。

1.4 实验方法

1.4.1 分离外周血单个核细胞 上午 7:00 所有系统性红斑狼疮患者及健康体检者在无菌操作下采集空腹静脉血 5 ml, 放置于抗凝试剂管内, 与磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)等比例充分混合后摇匀。将 5 ml 细胞分离液缓慢加入混合液中, 在 15 cm 半径水平转子的离心机上以 2 000 r/min 离心 20 min。离心后离心管内液体分为 4 层, 第 1 层以血清为主, 第 2 层以乳白色单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)为主, 第 3 层是透明分离层, 第 4 层以红细胞为主。采集第 2 层液体后加入细胞洗涤液 12 ml, 摇匀后以 1 500 r/min 离心 10 min, 舍弃上清液后取沉淀 PBMCs 得 PBMCs 悬液。

1.4.2 外周血 PBMCs 中 TLR9 水平测定 将取得的 PBMCs 悬液加入到 2.5 ml RNase Free 的 Eppendorf(EP)试剂管内, 2 000 r/min 离心 5 min, 加入 1.5 ml Trizol 液体, 室温静置 3 min, 舍弃上清液后加入 500 μ l 异丙醇充分摇匀, 加入 3.5 ml RNase Free EP 管内, 将 EP 管置于冰水混合物上, 加入 30 μ l 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水解 RNA 沉淀物, 30 min 后再将 EP 试剂管加入 60 $^{\circ}$ C 水浴器中水浴 10 min, 促使 RNA 沉淀物充分溶解。依照 TLR9 基因序列, 由上海生共生物工程集团公司合成提供模板 RNA。将模板 RNA 加入 RNase Free 试剂管, 放置于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪, 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后冷却 3 min, 振荡摇匀, 放置于 PCR 仪进行逆转录反应, 反应条件如下: 45 $^{\circ}$ C 预变性 60 min, 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 4 $^{\circ}$ C 退火 5 h, 置入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存 cDNA。使用免疫荧光定量测定法依据 cDNA 测定 TLR9 水平, cDNA 模板在正、反向引物引导下进行反应, 最终样品用美国辉瑞 Green Texas 分析仪测出 TLR9 水平。

1.4.3 外周血 PBMCs 中 NF- κ B 水平测定 由上海生共生物工程集团公司提供 NF- κ B 结合的 DNA 引物, 采用寡核苷酸激酶法以 r-P-ATP(15 mCi/ml) 标记 NF- κ B 探针。在 PBMCs 溶液中加入 3 ml Ficoll 溶液, 1 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液后加入生理盐水冲洗, 加入匀浆缓冲液和核提取液萃取 NF- κ B 结合蛋白, 以等量的核蛋白提取液加入 r-P-ATP(标记 NF- κ B 的探针液), 摇匀使两者充分结合, 45 g/L 聚丙烯酰胺电泳后立即用 X 放射线显影, 分析 NF- κ B 水平。

1.5 观察指标

比较 3 组外周血单个核细胞 TLR9 和 NF- κ B 水平。分析系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞 TLR9、NF- κ B 水平与脏器受累和免疫抑制剂种类的相关性。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 t 检验, 计数资料以率表示, 用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较

活动组女性比例、年龄、病程与缓解组比较, 差异无统计学意义($\chi^2=0.004, 1.542$ 和 $0.973, P=0.900, 0.777$ 和 0.936)。活动组女性比例、年龄、病程与对照组比较, 差异无统计学意义($\chi^2=0.021, 1.790$ 和 $1.236, P=0.683, 0.777$ 和 0.647)。缓解组女性比例、年龄、病程与对照组比较, 差异无统计学意义($\chi^2=0.241, 0.891$ 和 $1.265, P=0.719, 0.771$ 和 0.519)。见表 1。

2.2 3 组外周血单个核细胞 TLR9 水平比较

活动组外周血单个核细胞 TLR9 水平为(0.52 ± 0.26), 低于缓解组(1.25 ± 0.43)和对照组(2.21 ± 0.57), 差异有统计学意义($t=10.624, P=0.000; t=12.841, P=0.000$)。缓解组外周血单个核细胞 TLR9 水平低于对照组, 差异有统计学意义($t=5.397, P=0.025$)。

2.3 3 组外周血单个核细胞 NF- κ B 水平比较

活动组外周血单个核细胞 NF- κ B 水平低于缓解组和对照组, 差异有统计学意义($t=15.703, P=0.000; t=22.322, P=0.000$)。缓解组外周血单个核细胞 NF- κ B 水平低于对照组, 差异有统计学意义($t=4.770, P=0.034$)。

2.4 SLE 患者外周血单个核细胞 TLR9 水平与脏器受累的相关性

皮疹、白细胞降低表现阳性患者与阴性患者外周血单个核细胞 TLR9 水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。发热、浆膜炎、血尿表现阳性患者与阴性

表 1 3 组患者一般资料比较

组别	例数	女性例(%)	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	病程 / (年, $\bar{x} \pm s$)
活动组	35	31(88.57)	35.2 \pm 9.8	5.3 \pm 2.4
缓解组	25	22(88.00)	35.4 \pm 8.9	5.6 \pm 2.5
对照组	30	26(86.67)	36.3 \pm 9.4	5.1 \pm 3.1

患者外周血单个核细胞 TLR9 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.5 SLE 患者外周血单个核细胞 NF- κ B 水平与脏器受累的相关性

浆膜炎、血尿表现阳性患者与阴性患者外周血单个核细胞 NF- κ B 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。发热、皮疹、白细胞降低表现阳性患者与阴性患者外周血单个核细胞 NF- κ B 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 SLE 患者脏器受累与外周血单个核细胞 TLR9 水平的相关性

临床表现	阳性患者例(%)	TLR9 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)		P 值
		阳性患者	阴性患者	
浆膜炎	34(56.67)	0.72 \pm 0.11	1.78 \pm 0.42	0.012
血尿	32(53.33)	0.82 \pm 0.13	1.54 \pm 0.37	0.021
发热	45(75.00)	0.79 \pm 0.14	1.65 \pm 0.38	0.043
皮疹	28(46.67)	0.83 \pm 0.13	0.75 \pm 0.10	0.241
白细胞降低	24(40.00)	0.84 \pm 0.14	0.78 \pm 0.13	0.351

表 3 SLE 患者脏器受累与外周血单个核细胞 NF- κ B 水平的相关性

临床表现	阳性患者例(%)	NF- κ B (ng/L, $\bar{x} \pm s$)		P 值
		阳性患者	阴性患者	
浆膜炎	34(56.67)	0.66 \pm 0.11	0.63 \pm 0.12	0.362
血尿	32(53.33)	0.56 \pm 0.13	0.55 \pm 0.09	0.332
发热	45(75.00)	1.45 \pm 0.32	0.65 \pm 0.13	0.041
皮疹	28(46.67)	1.52 \pm 0.33	0.55 \pm 0.07	0.023
白细胞降低	24(40.00)	1.68 \pm 0.42	0.77 \pm 0.15	0.015

3 讨论

3.1 SLE 与当今 TLR9 和 NF- κ B 研究成果

SLE 是一种免疫相关疾病,发病过程中细胞免疫、体液免疫紊乱及自身抗体的产生是重要的致病因素^[9]。系统性红斑狼疮临床表现差异很大,多种器官脏器均可受累,一旦病情发展恶化,最终可出现多器官衰竭而死亡,因此对系统性红斑狼疮发病机制及诊断的研究显得十分重要。目前,对于系统性红斑狼疮的诊断主要以抗核抗体 ANA、抗 dsDNA 抗体等血生化指标为主^[9],但是多年的临床应用结果表明,该检测效果不能令人满意。Toll 样受体 9 是一种固有免疫受体,不仅直接参与抵抗病原微生物的侵袭,同时通过释放特异的炎症因子和启动相应免疫细胞在免疫应答中发挥重要作用。美国学者

CHONG 等^[7]研究发现,在狼疮鼠构建的模型中,TLR9 可通过 MyD81 信号传导通路活化 B 细胞的增殖活动,产生 dsDNA 抗体,刺激抗原提呈细胞表面共刺激受体的过度表达,而当选择性抑制 PBMCs 内 TLR9 表达后,狼疮鼠体内自身抗体减少,系统性红斑狼疮的症状减轻。NF- κ B 是一种重要的转录调控因子^[8-10],主要通过启动子及增强子的作用,促进多种细胞因子及免疫细胞的活化,在免疫应答早期发挥至关重要的作用。NF- κ B 是一种以二聚体形式存在的核因子,由 p50 和 p65 两个亚基组成。NF- κ B 活化后可进入细胞核内^[11-12],调控 TNF- β 和 IL-1 的表达。因为 TLR9 和 NF- κ B 在系统性红斑狼疮发病中起重要作用,已成为系统性红斑狼疮研究中的热点。目前,风湿免疫学界对 TLR9 和 NF- κ B 的研究仍处于较早期的阶段,对 TLR9 和 NF- κ B 在系统性红斑狼疮发病中的确切作用仍不是很了解^[13]。

3.2 SLE 患者外周血 PBMCs 中 TLR9 和 NF- κ B 水平及其与脏器受累的相关性

本实验结果发现,SLE 活动期患者 PBMCs 中 TLR9 水平明显低于缓解期患者和健康人群,而 SLE 缓解期患者 TLR9 水平又明显低于体检健康人群,提示外周血 PBMCs 中 TLR9 水平在 SLE 活动期患者最低,正常人群最高,SLE 缓解期患者介于两者之间。而在 SLE 活动期患者 PBMCs 中 NF- κ B 水平明显高于缓解期患者和健康人群,而 SLE 缓解期患者 NF- κ B 水平又明显高于体检健康人群,提示外周血 PBMCs 中 TLR9 水平在 SLE 活动期患者最高,正常人群最低,SLE 缓解期患者介于两者之间^[14-15]。在对外周血 PBMCs 中 TLR9、NF- κ B 与 SLE 受累脏器的相关性研究中发现,皮疹、白细胞降低表现阳性患者与阴性患者外周血单个核细胞 TLR9 水平比较,差异无统计学意义;发热、浆膜炎、血尿表现阳性患者 PBMCs 中 TLR9 水平较阴性患者明显降低。浆膜炎、血尿表现阳性患者与阴性患者外周血单个核细胞 NF- κ B 水平比较,差异无统计学意义;发热、皮疹、白细胞降低表现阳性患者 PBMCs 中 NF- κ B 水平较阴性患者明显升高。

综上所述,系统性红斑狼疮患者 TLR9 水平较正常人群显著降低,NF- κ B 水平较正常人群显著升高。同时 TLR9 水平的降低与发热、浆膜炎、血尿的临床表现相关,NF- κ B 水平升高与发热、皮疹、白细胞降低的临床表现相关。严密监测系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞 TLR9 和 NF- κ B 水平

变化对患者的临床诊疗有重要价值。

参 考 文 献:

- [1] 史晓飞,王可,樊琳琳,等. Toll 样受体 9 与系统性红斑狼疮患者的临床特点相关性[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2013, 7(3): 224-227.
- [2] 李宁,石咏军,刘冠贤,等. NF- κ B 与系统性红斑狼疮鼠树突状细胞参与免疫耐受机制的关系[J]. 广东医学, 2012, 33(11): 1539-1542.
- [3] 温斯健,郑文军,林有坤,等. 三氧化二砷对系统性红斑狼疮患者 Toll 样受体 9 及干扰素调节因子 5 mRNA 表达的影响[J]. 中华风湿病学杂志, 2014, 18(4): 227-231.
- [4] 周红霞. 系统性红斑狼疮患者外周血 B 淋巴细胞中 TLR9 的表达及其临床意义[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(11): 1560-1562.
- [5] 王海婷,叶霜. 中性粒细胞胞外网络线粒体 DNA 及其抗体与系统性红斑狼疮病情活动性的关系[J]. 中华风湿病学杂志, 2014, 18(11): 738-742.
- [6] 陈海凤,姚根宏,陈纬纬,等. SLE 患者血清对骨髓间充质干细胞衰老的作用及机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 33(11): 1536-1539.
- [7] CHONG B F, TSENG L C, KIM A, et al. Differential expression of BAFF and its receptors in discoid lupus erythematosus patients[J]. Journal of Dermatological Science, 2014, 73(3): 216-222.
- [8] 温斯健,吴飞云,林有坤,等. 广西壮族、汉族系统性红斑狼疮与 Toll 样受体 9 基因多态性研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2014, 47(6): 404-408.
- [9] 代荣琴,张金彪,刘玉枝,等. 系统性红斑狼疮自身抗体研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2014, 37(5): 419-423.
- [10] 程娟,马华林,戴勇,等. 系统性红斑狼疮外周血单个核细胞磷酸化蛋白质组学研究[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 12(7): 962-965.
- [11] 廖洪. 系统性红斑狼疮患者狼疮性肾炎诊断的多指标临床评价[J]. 四川医学, 2014, 35(1): 108-110.
- [12] ANTONELLI A, FERRARI S M, GIUGGIOLI D, et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 10 in autoimmune diseases[J]. Autoimmunity Reviews, 2014, 13(3): 272-280.
- [13] WANG F M, YU F, TAN Y, et al. The serum levels of connective tissue growth factor in patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis[J]. Lupus, 2014, 23(7): 655-664.
- [14] ROMITI R, ANZAI A, NICO M M, et al. Genital discoid lupus: a rare manifestation of cutaneous lupus erythematosus[J]. Lupus, 2014, 23(7): 707-710.
- [15] ZIMNY A, SZMYRKA-KACZMAREK M, SZEWCZYK P, et al. In vivo evaluation of brain damage in the course of systemic lupus erythematosus using magnetic resonance spectroscopy, perfusion-weighted and diffusion-tensor imaging[J]. Lupus, 2014, 23(1): 10-19.

(童颖丹 编辑)