

CDC27 基因在系统性红斑狼疮中的表达和临床意义

罗清 张露 黄自坤 李俊明

摘要 目的 探讨细胞分化周期蛋白 27(CDC27) 基因在系统性红斑狼疮(SLE) 患者外周血单个核细胞上的表达及临床意义。方法 应用反转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR) 检测 32 例 SLE 患者和 21 例对照者外周血单个核细胞上 cdc27 的表达, 比较两组之间 cdc27 的表达水平, 分析其与 SLE 临床和治疗的关系, 且采用受试者工作特征(ROC) 曲线分析其诊断效能。结果 SLE 组患者外周血单个核细胞的 cdc27 水平显著低于对照组, 差异有统计学意义($Z = 126.0, P < 0.001$), 且与 C-反应蛋白(CRP) ($r_s = -0.462, P = 0.009$), 血沉(ESR) ($r_s = -0.358, P = 0.048$)、单核细胞数量($r_s = -0.386, P = 0.029$) 呈负相关。治疗后 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达水平上调($P = 0.005$)。SLE 组患者和对照组 ROC 曲线下面积(AUC) 为 0.813(95% CI: 0.681 ~ 0.944; $P < 0.001$), 敏感性为 81.25%, 特异性为 80.95%。结论 SLE 患者外周血单个核细胞上 cdc27 的表达水平下调, 且与 SLE 患者的炎症水平以及治疗密切相关, 可能作为 SLE 的潜在诊断指标之一。

关键词 系统性红斑狼疮; 细胞分化周期蛋白 27 基因; 诊断标志物

中图分类号 R 593.24+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0292-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.027

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种以大量病理性自身抗体产生为特征并累及全身器官的自身免疫性疾病, 其发病机制复杂, 为多种基因和环境因素相互作用的结果^[1]。迄今为止, 已经发现多种基因异常与 SLE 的发生和发展密切相关^[2]。细胞分化周期蛋白 27(cell division cycle protein 27, CDC27) 是 12 个不同的亚基组成的细胞周期后期促进复合体(anaphase-promoting com-

plex, APC/C) 的其中一个亚基, 细胞周期后期促进复合体主要经泛素化作用水解周期蛋白和分离酶抑制蛋白以调节细胞周期和有丝分裂的进程^[3]。多项研究^[4]发现, cdc27 异常表达与细胞的增殖、迁移、分泌等功能相关, 并且与垂体柄中断综合征、肿瘤等疾病的发生发展密切相关^[5]。目前, 国内外并未见关于 cdc27 与 SLE 关系的研究报道。该文拟研究 SLE 外周血单个核细胞 cdc27 表达情况及其与临床相关性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 32 例 2018 年 1~7 月在南昌大学第一附属医院风湿免疫科就诊的 SLE 患者, 入选对象均符合美国风湿病学会(ACR) 1997 年制订的 SLE 诊断标准^[6], 并排除其他严重疾病, 其中女 31 例, 男 1 例; 年龄 16~65(41.5 ± 11.7) 岁。对照组 21 例, 均为来自于同时间段南昌大学第一附属医院健康体检正常的健康志愿者, 其中女 19 例, 男 2 例; 年龄 22~59(35.8 ± 8.7) 岁。两组性别和年龄差异无统计学意义。详细收集 SLE 患者的临床表现和相关的实验室检查, 并根据这些指标计算 SLE 疾病活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)^[7]。根据 SLE 的病程将其分为 9 例早期 SLE(病程小于 3 个月) 和 23 例非早期 SLE(病程大于 3 个月)。入选的 32 例 SLE 患者中 8 例于治疗前后抽取样本进行外周血单个核细胞 cdc27 检测。本实验经医院伦理委员会批准, 患者和健康志愿者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器 Ficoll 分离液购自美国 Sigma 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 去除 DNA 的 PrimeScript™ 逆转录试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ 购自大连宝生物 TaKaRa 公司; cdc27 及内参基因 β -actin 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计购自美国 Nanodrop 公司; Applied Biosystems 7500 型荧光定量 PCR 仪器购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

2019-11-14 接收

基金项目: 江西省重点研发计划项目(编号: 20181BBG70013); 江西省教育厅科学技术研究项目(编号: 170008); 江西省自然科学基金(编号: 20171BAB205113); 国家自然科学基金项目(编号: 81360459)

作者单位: 南昌大学第一附属医院检验科, 南昌 330006

作者简介: 罗清, 女, 主管技师, 硕士;

李俊明, 男, 主任技师, 博士, 责任作者, E-mail: lisir361@

163.com

1.3.1 外周血单个核细胞提取 采集 SLE 患者及对照者清晨空腹 EDTA 抗凝外周血 2 ml, 6 h 内送检。采用 Ficoll 分离液分离提取外周血单个核细胞, 用 TRIzol 试剂处理, 放 -80°C 冰箱保存。

1.3.2 总 RNA 提取 按 TRIzol 试剂操作说明书提取 SLE 患者及对照组外周血单个核细胞的总 RNA, 使用 Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计对获得的总 RNA 进行定量和质量分析。

1.3.3 RT-PCR 检测 采用 RT-PCR SYBR Green 法, 以 β -actin 作为内参进行 cdc27 的检测。提取外周血单个核细胞总 RNA 后, 取 $1\ \mu\text{l}$ 总 RNA, 利用 PrimeScript 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。采用 $20\ \mu\text{l}$ 反应体系进行检测, PCR 引物序列见表 1。反应体系包括: $1\ \mu\text{l}$ 反转录产物、 $0.5\ \mu\text{mol/L}$ 上游引物、 $0.5\ \mu\text{mol/L}$ 下游引物、 $1\times$ SYBR 荧光染料试剂。PCR 反应条件为: 95°C 、10 min 95°C 、15 s, 60°C 、1 min 72°C 、30 s 40 个扩增循环。所有样品做 3 个复孔。RT-PCR 使用 ABI7500 仪器进行。分析待测标本的扩增溶解曲线, 均为单峰, 无非特异性扩增。根据待测标本的 Ct 值, 采用相对定量法对 RT-PCR 结果进行分析, 计算 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ [8]。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

名称	引物序列(5' ~ 3')
cdc27	F: AGAAGTTATGTTGTGGCCTTGG
	R: AGGTACAACAGCAGCATGGTTC
β -actin	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态分布的计量资料以中位数表示。正态分布数据分析采用 t 检验, 非正态分布数据分析采用非参数检验, 治疗前后数据分析根据是否是正态分布采用配对 t 检验或配对 Wilcoxon 检验。两个变量之间相关性采用 Spearman 相关分析。受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析评价外周血单个核细胞 cdc27 诊断 SLE 的敏感性和特异性。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 患者及对照者外周血单个核细胞中 cdc27 的表达 结果如图 1 所示, SLE 组患者外周血单个核细胞的 cdc27 水平低于对照组, 分别为 $0.049(0.020, 0.064)$ 和 $0.140(0.080, 0.200)$, 差异

有统计学意义($Z = 126.0, P < 0.001$)。

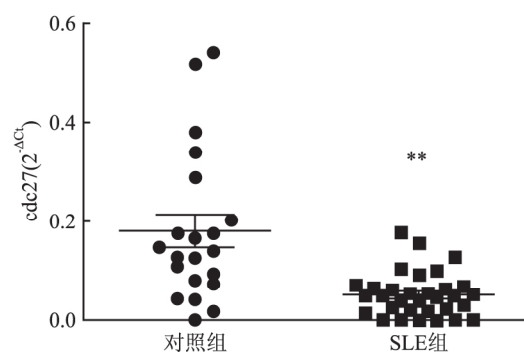


图 1 SLE 组患者和对照组外周血单个核细胞 cdc27 的表达与对照组比较: ** $P < 0.001$

2.2 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达与临床的关系 收集 SLE 患者的红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、血常规各参数、免疫球蛋白 G、补体 3、补体 4、自身抗体、蛋白尿、血尿、脓尿、发热、关节炎、胸膜炎、皮疹等实验室指标和临床表现, 分析这些指标与 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 的关系。结果显示, SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 与 CRP($r_s = -0.462, P = 0.009$)、ESR($r_s = -0.358, P = 0.048$)、单核细胞数量($r_s = -0.386, P = 0.029$)呈负相关, 而与其他指标不相关。此外, 本文分析了早期 SLE 与非早期 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达, 虽然早期 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达水平低于非早期, 但差异无统计学意义。

2.3 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达与治疗的关系 8 例 SLE 患者根据病情严重程度选择相应的治疗 1 周后, 比较治疗前后 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达水平, 结果如表 2 所示, 治疗后 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达水平上调, 差异有统计学意义($P = 0.0051$)。

表 2 SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达与治疗的关系($n = 8, \bar{x} \pm s$)

分组	cdc27 表达	t 值	P 值
治疗前	0.034 ± 0.018	4.011	0.0051
治疗后	0.050 ± 0.016		

2.4 外周血单个细胞 cdc27 对 SLE 诊断价值的评估 为了评估外周血单个细胞 cdc27 对 SLE 诊断价值, 对 SLE 患者和对照者的外周血单个细胞 cdc27 表达水平进行 ROC 分析, 结果如图 2 所示, ROC 曲

线下面积 AUC 为 0.813 (95% CI: 0.681 ~ 0.944; $P < 0.001$), Cut-off 值为 0.071 57, 敏感性为 81.25%, 特异性为 80.95%, 阳性预测值为 86.67%, 阴性预测值为 73.91%, 约登指数为 0.622。

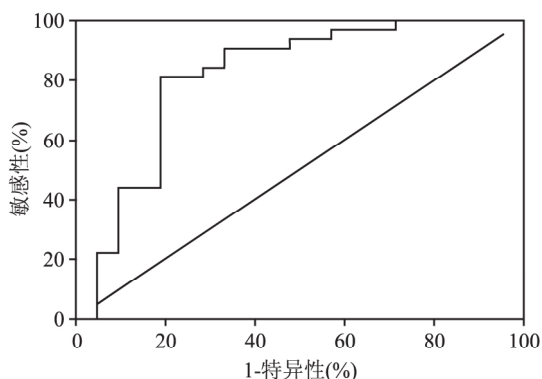


图2 SLE 组患者与对照组外周血单个细胞 cdc27 的受试者工作曲线分析

3 讨论

虽然近二十年来, SLE 的基础和临床研究取得了很大的进展, 生物制剂以及联合治疗策略的使用, 使 SLE 患者的 10 年生存率由过去不足 50% 提高到目前的 90% 以上, 但由于病因及发病机制不完全清楚, 也没有特效药物治疗, SLE 的缓解率仍然不理想。因此, 探寻 SLE 的病因及发病机制至关重要。

CDC27 是 APC/C 复合物中的一个核心原件, 在细胞有丝分裂中发挥着至关重要的作用^[3]。课题组之前的研究^[9]表明 cdc27 与自身免疫性疾病相关。此外, 文献^[10]报道 CDC27 是 TGF- β /Smads 通路的一个下游分子, 磷酸化 CDC27 可参与 TGF- β 诱导的 APC/C 活化, 从而导致相应的抑制基因转录和抑癌作用的发生。而 TGF- β 作为参与维持免疫和耐受的重要效应分子, 已被证实在 SLE 的发生和发展中发挥着至关重要的作用^[11]。故推测 cdc27 可能参与 SLE 发病。但关于 cdc27 在 SLE 中的作用却鲜有报道。本研究对 SLE 组患者和对照组外周血单个核细胞 cdc27 表达水平进行检测, 结果发现纳入分析的两组研究对象外周血单个核细胞 cdc27 不相同, SLE 组患者外周血单个核细胞 cdc27 表达水平显著低于健康对照组, 且随着疾病炎症的严重程度的增加而降低, 即 CRP、ESR 等炎症指标越高, SLE 组患者外周血单个核细胞 cdc27 表达水平越低。本研究进一步分析发现, SLE 组患者外周血单

个核细胞 cdc27 表达水平与治疗相关, SLE 患者经治疗后, 其外周血单个核细胞 cdc27 表达水平明显上升。这些研究结果提示 SLE 组患者外周血单个核细胞 cdc27 表达水平与疾病的严重程度相关。

目前 SLE 的诊断主要依据临床表现和自身抗体, 但其临床表现复杂, 极易误诊; 常用的自身抗体虽然对 SLE 的诊断特异性较好, 但其诊断敏感性都不理想, 约 10% ~ 60%^[12-13]。因此, 临床上目前仍缺乏理想的 SLE 诊断标志物。研究^[14]表明, 多种 SLE 相关基因可能作为该疾病评估严重程度的指标以及潜在的诊断标志物。本研究采用 ROC 曲线分析外周血单个核细胞 cdc27 的诊断价值发现, SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 的 AUC 为 0.813 (95% CI: 0.681 ~ 0.944; $P < 0.001$), 敏感性为 81.25%, 特异性为 80.95%, 对 SLE 的诊断有一定的参考价值^[15]。

综上, SLE 患者外周血单个核细胞 cdc27 表达水平降低, 与疾病炎症水平以及治疗相关。此外, 本研究显示外周血单个核细胞 cdc27 表达水平可能作为 SLE 诊断的潜在指标。但 CDC27 在 SLE 中所执行的具体功能还需进一步探究。

参考文献

- [1] 姚芳苒, 黄自坤, 李雪, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血中性粒细胞 PD-L1 表达和临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(5): 740-5.
- [2] Schafer P H, Ye Y, Wu L, et al. Cereblon modulator iberdomide induces degradation of the transcription factors Ikaros and Aiolos: immunomodulation in healthy volunteers and relevance to systemic lupus erythematosus[J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77(10): 1516-23.
- [3] Chang L, Zhang Z, Yang J, et al. Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination[J]. Nature, 2015, 522(7557): 450-4.
- [4] Feng Z, Zhang L, Zhou J, et al. mir-218-2 promotes glioblastoma growth, invasion and drug resistance by targeting CDC27[J]. Oncotarget, 2017, 8(4): 6304-18.
- [5] Xin Y, Ning S, Zhang L, et al. CDC27 facilitates gastric cancer cell proliferation, invasion and metastasis via twist-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(2): 501-11.
- [6] Hochberg M C. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9): 1725.
- [7] Bombardier C, Gladman D D, Urowitz M B, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE[J]. Arthritis Rheum, 1992, 35(6): 630-40.

- [8] Tezcan G , Aksoy S A , Tunca B , et al. Oleuropein modulates glioblastoma miRNA pattern different from *Olea europaea* leaf extract [J]. *Hum Exp Toxicol* , 2019 , 38(9) : 1102 – 10.
- [9] Luo Q , Zhang L , Li X , et al. Identification of circular RNAs hsa_circ_0044235 in peripheral blood as novel biomarkers for rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Immunol* , 2018 , 194(1) : 118 – 24.
- [10] Zhang L , Fujita T , Wu G , et al. Phosphorylation of the anaphase-promoting complex/Cdc27 is involved in TGF- β signaling [J]. *J Biol Chem* , 2011 , 286(12) : 10041 – 50.
- [11] Jin T , Almedhed K , Carlsten H , et al. Decreased serum levels of TGF- β 1 are associated with renal damage in female patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus* , 2012 , 21(3) : 310 – 8.
- [12] Yung S , Chan T M. Mechanisms of kidney injury in lupus nephritis – the role of anti-dsDNA antibodies [J]. *Front Immunol* , 2015 , 6: 475.
- [13] Hu C , Li M , Liu J , et al. Anti-SmD1 antibodies are associated with renal disorder , seizures , and pulmonary arterial hypertension in Chinese patients with active SLE [J]. *Sci Rep* , 2017 , 7(1) : 7617.
- [14] Flint S M , McKinney E F , Lyons P A , et al. The contribution of transcriptomics to biomarker development in systemic vasculitis and SLE [J]. *Curr Pharm Des* , 2015 , 21(17) : 2225 – 35.
- [15] Li S , Zhang J , Tan X , et al. Microarray expression profile of circular RNAs and mRNAs in children with systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Rheumatol* , 2019 , 38(5) : 1339 – 50.

Expression and significance of cell division cycle protein 27 gene on peripheral blood mononuclear cell from patients with systemic lupus erythematosus

Luo Qing , Zhang Lu , Huang Zikun , et al

(*Dept of Clinical Laboratory , The First Affiliated Hospital of Nanchang University , Nanchang 330006*)

Abstract Objective To investigate the expression of cell division cycle protein 27 gene(cdc27) on peripheral blood mononuclear cell(PBMC) from systemic lupus erythematosus(SLE) patients and its significance. **Methods** The expression of cdc27 on PBMC from 32 SLE patients and 21 healthy controls(HC) was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) . The expression of cdc27 on PBMC was compared between SLE patients and HC. Correlations of cdc27 on PBMC with several clinical indexes were analyzed. We also analyzed regular treatment influence on expression of cdc27. Moreover , the receiver operating characteristic(ROC) was used to analyze the diagnostic value of cdc27. **Results** The expression of cdc27 on PBMC in SLE patients was significantly lower than that in HC($U = 126.0$, $P < 0.001$) . The expression of cdc27 on PBMC in SLE patients was negatively correlated with CRP($r_s = -0.462$, $P = 0.009$) , ESR($r_s = -0.358$, $P = 0.048$) , monocytes numbers($r_s = -0.386$, $P = 0.029$) . The expression of cdc27 on PBMC in SLE patients was significantly increased after effective treatment($P = 0.005$) . The area under ROC curve(AUC) , sensibility and specificity of cdc27 on PBMC between SLE patients and HC were 0.813(95% *CI*: 0.681 ~ 0.944; $P < 0.001$) , 81.25% , 80.95% . **Conclusion** The expression of cdc27 on PBMC is decreased in SLE patients and correlated with inflammation and treatment. This study suggests that the cdc27 on PBMC may be a potential diagnosis biomarker of SLE patients.

Key words systemic lupus erythematosus; cdc27; diagnosis biomarker