

◇ 临床医学研究 ◇

Blimp-1 在系统性红斑狼疮患者外周血 B 细胞中的表达和临床意义

王曼茹, 孔菲菲, 厉小梅, 金莉, 方璇, 李向培, 汪国生, 钱龙

摘要 目的 检测系统性红斑狼疮(SLE)患者和健康者外周血 CD19⁺ B 细胞中 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1(Blimp-1) mRNA 的表达,并探讨 Blimp-1 在 SLE 的临床意义。方法 应用实时荧光定量 PCR 技术检测 40 例 SLE 患者和 20 例健康者外周血 CD19⁺ B 细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达水平,应用流式细胞术检测外周血中 CD19⁻CD138⁺浆细胞/CD19⁺ B 细胞比例、CD19⁺CD27⁺记忆性 B 细胞/CD19⁺ B 细胞比例,分析 SLE 患者 Blimp-1 表达与 B 细胞亚群及临床相关指标的相关性。结果 ① SLE 组 CD19⁺ B 细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达水平高于正常对照组($P < 0.05$)、活动组高于稳定组($P < 0.05$);② SLE 组 CD19⁻CD138⁺浆细胞/CD19⁺ B 细胞比例显著高于正常对照组($P < 0.01$)、活动组高于稳定组($P < 0.05$);SLE 组与正常对照组外周血中 CD19⁺CD27⁻记忆性 B 细胞/CD19⁺ B 细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$);③ SLE 患者 Blimp-1 表达与 CD19⁻CD138⁺浆细胞/CD19⁺ B 细胞比例呈正相关性($r_s = 0.336$, $P = 0.034$),与 CD19⁺CD27⁺记忆性 B 细胞/CD19⁺ B 细胞比例无显著相关性($r_s = -0.271$, $P = 0.116$),与抗 ds-DNA 抗体、免疫球蛋白 IgG 呈正相关性($r_s = 0.493$, $P = 0.006$; $r_s = 0.527$, $P = 0.004$),与抗核小体抗体、抗 C1q 抗体呈正相关性($r_s = 0.452$, $P = 0.040$; $r_s = 0.522$, $P = 0.015$),与白细胞数量、血小板数量呈负相关性($r_s = -0.367$, $P = 0.046$; $r_s = -0.386$, $P = 0.035$)。结论 Blimp-1 在 SLE 患者 B 细胞中表达升高,与浆细胞明显相关,提示 Blimp-1 可能通过促进 B 细胞分化而参与 SLE 的发病。

关键词 系统性红斑狼疮;Blimp-1;B 细胞

中图分类号 R 593.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)10-1428-04

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及全身多器官多系统的慢性自身免疫性疾病。研究^[1-2]表明 SLE 的发生与 B 细胞的

免疫功能异常密切相关,自身反应性 B 细胞受到抗原刺激后活化增殖并分化为浆细胞,浆细胞分泌多种致病性自身抗体导致 SLE 的发生。B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1(B lymphocyte induced maturation protein-1, Blimp-1)是 PR 区锌指蛋白家族的一员,是 B 细胞终末分化的主调节因子,促进 B 细胞分化为浆细胞并产生抗体,Blimp-1 在浆细胞的存活中发挥重要作用^[3-5]。近年研究^[6-8]显示,Blimp-1 是 SLE 的一个易感基因,在 SLE 患者外周血单核淋巴细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中表达升高,但其在在外周血 B 细胞中的表达情况尚未见报道。因此,该研究通过检测 SLE 患者外周血 CD19⁺ B 细胞中 Blimp-1 的表达及将其与浆细胞及实验室指标的相关性进行分析,初步探讨 Blimp-1 在 SLE 发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2012 年 2~12 月就诊于安徽医科大学附属省立医院风湿免疫科的 40 例确诊 SLE 患者,其中男 4 例,女 36 例,年龄 21~52 岁(33.4 ± 9.6)岁,诊断均符合 2009 年美国风湿病学会(American Collage of Rheumatology, ACR)修订的 SLE 分类诊断标准^[9],并排除感染、肿瘤及其他自身免疫性疾病。根据 SLE 疾病活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)将 SLE 患者分为活动组 20 例(SLEDAI > 5 分),稳定组 20 例(SLEDAI 评分 ≤ 5 分)。同时选取 20 例健康成年者作为正常对照组,其中男 2 例,女 18 例,年龄 23~57(38.3 ± 7.8)岁,两组间年龄及性别差异无统计学意义。所有对象根据伦理学要求并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 人淋巴细胞分离液(北京索莱宝公司);磁珠分选柱、CD19 磁珠(德国 Miltenyi Biotec 公司);TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司);Prime Script 逆转录试剂盒、SYBR Green PCR 试剂盒、PCR 引物(日本 TaKaRa 公司),Blimp-1 引物:上游 5'-CTTGTGGCACTGGGAGCAC-3',下游 5'-

2014-05-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81373187);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH162);中华医学会临床专项基金(编号:12040730373)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院风湿免疫科,合肥 230001

作者简介:王曼茹,女,硕士研究生;

厉小梅,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:lixiaomei1@medmail.com.cn

ACACACGGGAGAAAAGCCAC-3'。GAPDH 引物:上游 5'-GAAGATGG-TGATGGGATTTC-3',下游 5'-GAAGGTGAAGGTCTCGAGT-3';DEPC 水(美国 Sigma 公司);FITC 标记的鼠抗人 CD138 抗体、PerCP5.5 标记的鼠抗人 CD19 抗体、APC 标记的鼠抗人 CD27 抗体(美国 eBioscience 公司);实时定量 PCR 仪 ABI 7500 型(美国 ABI 公司),FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 PBMCs 收集 清晨空腹抽取 SLE 患者及健康对照者肘静脉血 20 ml,经乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,采用密度梯度离心法分离出 PBMCs,分别用于流式检测 B 细胞亚群和磁珠分选 CD19⁺ B 细胞(溶于 1 ml TRIzol 试剂,放入 -80 °C 冰箱保存)。

1.3.2 RNA 提取和 cDNA 合成 将冻存的 CD19⁺ B 细胞放在冰上待其融化后,用三氯甲烷、异丙醇、75% 乙醇萃取、沉淀,提取细胞 RNA,将 RNA 溶于无 RNA 酶水中,测定其浓度与纯度。使用 Prime-Script 逆转录试剂盒中 5 × 引物处理缓冲液 2 μl、反转录酶混合液 0.5 μl、寡脱氧核苷酸引物(50 μmol/L) 0.5 μl、随机六核苷酸引物(100 μmol/L) 0.5 μl,加入模板 RNA(终浓度 ≤ 500 ng),最后加入 RNase Free dH₂O 至 10 μl,充分混合后放在水浴箱中 37 °C 15 min,85 °C 5 s 灭活。逆转录得到的 cDNA 存放于 -80 °C 冰箱,待 PCR 反应时应用。

1.3.3 荧光实时定量 PCR 反应 荧光实时定量 PCR 反应液配制:SYBR Green PCR 混合液(2 ×) 10 μl、正向引物(10 μmol/L) 0.8 μl、反向引物(10 μmol/L) 0.8 μl、ROX 校正染料(50 ×) 0.4 μl、cDNA 模板 2 μl、ddH₂O 6 μl,充分混匀后加入光反应八连管中,置于 ABI 7500 实时定量 PCR 仪中进行反应,设置反应条件为:95 °C 30 s 预变性→(95 °C 5 s→60 °C 34 s) 40 个循环。应用双标准曲线法计算基因相对表达量。

1.3.4 流式检测 B 细胞亚群 将 PBMCs 用 400 μl PBS 重悬,分至 5 支流式管,设空白对照、CD19-PerCP5.5 单标、CD138-FITC 单标、CD27-APC 单标、CD19-PerCP5.5 + CD138-FITC + CD27-APC 三标本样管。CD19-PerCP5.5 抗体所加量为 2 μl,CD27-APC 抗体所加量为 2 μl,CD138-FITC 抗体所加量为 5 μl。然后混匀,4 °C 避光孵育 30 min;各管加入 2 ml PBS 混匀;离心 4 °C,1 000 r/min,5 min,弃上清液;各管加固定液 200 μl 混匀,4 °C 避光待测;24 h

内进行流式检测。每次检测前对仪器进行流量监测和调控。检测时先根据前向角和侧向角散射光信号,对淋巴细胞群和单个核细胞进行设门,分别以 CD19-PerCP5.5 单标、CD138-FITC 单标、CD27-APC 单标管调节仪器 FL1、FL2 之间的补偿。每次获取设门内细胞 10 000 个以上并保存数据。用 WinMD 2.9 软件分析流式数据。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;不符合正态分布资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,2 组间比较采用独立样本非参数秩和检验,多组间首先采用 Kruskal-Wallis *H* 法检验,再进行两两独立样本非参数秩和检验;变量间相关性分析采用 Spearman 进行检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 外周血 CD19⁺ B 细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达 SLE 组 Blimp-1 mRNA 表达显著高于正常对照组($P < 0.05$);SLE 活动组 Blimp-1 mRNA 的表达显著高于 SLE 稳定组($P < 0.05$);Blimp-1 mRNA 表达 SLE 稳定组与正常对照组比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 SLE 组与正常对照组 CD19⁺ B 细胞中 Blimp-1 的相对表达水平 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	Blimp-1 相对表达量
SLE	40	0.020(0.012 0.051)*
SLE 活动	20	0.031(0.016 0.224)#
SLE 稳定	20	0.018(0.010 0.027)
正常对照	20	0.013(0.008 0.033)

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与稳定组比较: # $P < 0.05$

2.2 外周血中 B 细胞亚群的比例 与正常对照组相比, SLE 组 CD19⁻CD138⁺ 浆细胞/CD19⁺ B 细胞比例显著增高($P < 0.01$); SLE 活动组 CD19⁻CD138⁺ 浆细胞/CD19⁺ B 细胞比例显著高于 SLE 稳定组($F = 8.15, P < 0.05$); CD19⁻CD138⁺ 浆细胞/CD19⁺ B 细胞比例在 SLE 稳定组与正常对照组差异无统计学意义; SLE 组与正常对照组 CD19⁺CD27⁻ 记忆性 B 细胞/CD19⁺ B 细胞比例差异无统计学意义。见表 2。

2.3 Blimp-1 的表达水平与 B 细胞亚群间的相关性 SLE 患者 Blimp-1 表达与 CD19⁻CD138⁺ 浆细

表2 SLE组与正常对照组浆细胞、记忆B细胞占
CD19⁺ B细胞的比例 $[(\bar{x} \pm s)]\%$

组别	n	浆细胞/B细胞	记忆B细胞/B细胞
SLE	40	0.11 ± 0.10 ^{**}	0.38 ± 0.15
SLE 活动	20	0.14 ± 0.14 [#]	0.37 ± 0.14
SLE 稳定	20	0.05 ± 0.04	0.38 ± 0.15
正常对照	20	0.03 ± 0.01	0.36 ± 0.07

与正常对照组比较:^{**} $P < 0.01$;与稳定组比较:[#] $P < 0.05$

胞/CD19⁺ B细胞比例呈显著正相关性($r_s = 0.336$, $P = 0.034$)与CD19⁺CD27⁺记忆性B细胞/CD19⁺ B细胞比例无显著相关性。

2.4 SLE患者Blimp-1 mRNA的表达水平与临床表现、实验室指标的相关性 将SLE患者按有无关节炎(痛)、皮疹、浆膜炎或肾炎进行分组,均未发现B细胞中Blimp-1 mRNA表达差异有统计学意义。采用Spearman秩相关分析SLE患者Blimp-1表达与白细胞数量、血小板数量呈负相关($P < 0.05$),与抗ds-DNA抗体、免疫球蛋白IgG呈显著正相关性($P < 0.05$),与狼疮活动指标抗核小体抗体、抗C1q抗体呈正相关性($P < 0.05$),与ANA滴度、补体、贫血、中性粒细胞及淋巴细胞百分比均无显著相关性,见表3。

表3 SLE患者B细胞中Blimp-1 mRNA表达水平
与实验室指标的相关性

实验室指标	r_s 值	P 值
白细胞	-0.367	0.046
血红蛋白	-0.130	0.493
血小板	-0.386	0.035
IgG	0.527	0.004
IgM	0.324	0.990
IgA	0.306	0.114
C3	-0.174	0.364
C4	-0.110	0.571
ANA 滴度	0.120	0.528
抗 ds-DNA 抗体	0.493	0.006
抗核小体抗体	0.452	0.040
抗 C1q 抗体	0.522	0.015

3 讨论

转录抑制因子Blimp-1是一种DNA结合蛋白,由PR区锌指蛋白1基因编码,可促进B细胞分化为浆细胞并分泌抗体^[3-4]。研究^[6]显示在人类基因组中Blimp-1基因是SLE的一个易感基因。狼疮鼠模型研究^[10]显示,Blimp-1能与其上游分子IRF5形成基因轴,调节小鼠狼疮易感基因座中的3个基因

Ifi202、Aim2、Fcgr2b的表达,进而导致小鼠狼疮样疾病的发生。有研究^[8]显示SLE患者外周血中Blimp-1 mRNA表达水平较正常对照者升高,提示Blimp-1可能在SLE发病机制中起了重要作用。

本研究显示,SLE组外周血CD19⁺ B细胞中Blimp-1 mRNA表达水平显著高于正常对照组,与研究^[7-8]结果一致,提示Blimp-1在SLE患者中的表达是异常的,可能参与SLE发病。本研究亦显示,SLE组CD19⁺CD138⁺浆细胞/CD19⁺ B细胞比例显著高于正常对照组,且SLE患者Blimp-1表达水平与浆细胞比例呈显著正相关性,与免疫球蛋白IgG水平、抗ds-DNA抗体、抗核小体抗体、抗C1q抗体均呈显著正相关性,表明Blimp-1可能通过促进浆细胞生成并分泌自身抗体参与SLE发病。Zhou et al^[11]研究发现将编码Blimp-1 siRNA的合成腺病毒注入狼疮小鼠体内,使小鼠B细胞中Blimp-1表达显著降低,发现浆细胞分化受到明显抑制,血清抗ds-DNA抗体的生成受到抑制而保持在基础水平,小鼠寿命较对照组延长。

抗ds-DNA抗体是SLE特征性抗体,与抗核小体抗体、抗C1q抗体均是SLE的活动指标。本研究显示SLE患者Blimp-1表达水平与这3种抗体呈显著正相关性,且SLE活动期患者Blimp-1表达水平、浆细胞比例均高于SLE稳定期患者,提示SLE患者Blimp-1表达水平可能与疾病活动度有关,Blimp-1表达水平越高,疾病活动度越高。此外,本研究显示Blimp-1表达水平与白细胞、血小板数量呈负相关性,推测SLE患者Blimp-1表达升高导致浆细胞异常分化并产生自身抗体,这些自身抗体也包括破坏外周淋巴细胞、中性粒细胞的抗体、抗血小板抗体、抗血小板生成素抗体等,使白细胞、血小板受到破坏或生成减少。本研究中SLE患者Blimp-1表达水平与ANA滴度、补体、贫血、中性粒细胞及淋巴细胞比例均无显著相关性,也未发现与不同临床亚型的关联,可能与本组患者各临床亚型组的例数较少有关。

综上所述,SLE患者外周血B细胞中Blimp-1表达上调,可能与SLE发病有关,其可能的机制是Blimp-1促进B细胞分化从而导致抗体分泌异常,且可能与疾病活动度相关。因此,推测特异性抑制Blimp-1可能对SLE治疗具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] Rahman A, Isenberg D A. Systemic lupus erythematosus [J]. N

- Engl J Med 2008 ,358(9) :929 – 39.
- [2] Waldman M ,Madaio M P. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis[J]. *Lupus* 2005 ,14(1) :19 – 24.
- [3] Kallies A , Nutt S L. Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp1[J]. *Curr Opin Immunol* 2007 ,19(2) :156 – 62.
- [4] Martin G ,Calame K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes[J]. *Annu Rev Immunol* 2008 ,26:133 – 69.
- [5] Shapiro-Shelef M ,Lin K I ,Savitsky D ,et al. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow[J]. *J Exp Med* 2005 ,202(11) :1471 – 6.
- [6] Gateva V ,Sandling J K ,Hom G ,et al. A large-scale replication study identifies TNIP1 ,PRDM1 ,JAZF1 ,UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Genet* 2009 ,41(11) :1228 – 33.
- [7] 牛晓昶 ,邓少丽 ,曾照芳 ,等. 系统性红斑狼疮患者血液中 PRDM1 和 CD138⁺ 浆细胞表达的研究[J]. *激光杂志* ,2011 ,32(5) :64 – 6.
- [8] Luo J ,Niu X ,Liu H ,et al. Up-regulation of transcription factor Blimp1 in systemic lupus erythematosus[J]. *Mol Immunol* 2013 ,56(4) :574 – 82.
- [9] Petri M. Systemic Lupus International Collaborating Clinic (SLICC) :SLICC revision of the ACR classification criteria for SLE[J]. *Arthritis Rheum* 2009 ,60(Suppl 10) :895.
- [10] Panchanathan R ,Liu H ,Liu H ,et al. Distinct regulation of murine lupus susceptibility genes by the IRF5/Blimp-1 axis[J]. *J Immunol* 2012 ,188(1) :270 – 8.
- [11] Zhou Z ,Ren Y ,Hu Z. Blimp-1 siRNA inhibits B cell differentiation and prevents the development of lupus in mice[J]. *Hum Immunol* 2013 ,74(3) :297 – 301.

The expression of Blimp-1 in peripheral blood B cells from patients with SLE and its clinical significance

Wang Manru ,Kong Feifei ,Li Xiaomei ,et al

(Dept of Rheumatology and Immunology ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001)

Abstract Objective To detect the mRNA expression of B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1) in peripheral blood CD19⁺ B cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy people and explore its clinical significance. **Methods** Expression level of Blimp-1 mRNA in peripheral blood CD19⁺ B cells was determined by real-time PCR in 40 SLE patients and 20 healthy controls. The ratio of CD19⁻CD138⁺ plasma cells and CD19⁺ B cells and the ratio of CD19⁺CD27⁻ memory B cells and CD19⁺ B cells were studied by flow cytometry in peripheral blood from two groups. **Results** ① The expression level of Blimp-1 mRNA in peripheral blood CD19⁺ B cells from SLE patients group was higher than that in normal control group ($P < 0.05$) and the expression level of Blimp-1 in active SLE patients group was higher than that in inactive SLE patients group ($P < 0.05$). ② The CD19⁻CD138⁺ plasma cells/CD19⁺ B cells ratio was increased in SLE patients group compared with healthy control group ($P < 0.01$) and the CD19⁻CD138⁺ plasma cells/CD19⁺ B cells ratio in active SLE patients group was more increased than that in inactive SLE patients group ($P < 0.05$). However ,the CD19⁺CD27⁻ memory B cells/CD19⁺ B cells ratio was not significantly different between SLE patients group and normal control group ($P > 0.05$). ③ The expression level of Blimp-1 was positively correlated with the CD19⁻CD138⁺ plasma cells/CD19⁺ B cells ratio ($r_s = 0.336$, $P = 0.034$) ,not correlated with the CD19⁺CD27⁻ memory B cells/CD19⁺ B cells ratio ($r_s = -0.271$, $P = 0.116$) ,positively correlated with anti-dsDNA antibody and immunoglobulin G ($r_s = 0.493$, $P = 0.006$; $r_s = 0.527$, $P = 0.004$) ,positive correlated with anti-nucleosome antibody and anti-C1q antibody ($r_s = 0.452$, $P = 0.040$; $r_s = 0.522$, $P = 0.015$) ,negatively correlated with white blood cell count and platelet count ($r_s = -0.367$, $P = 0.046$; $r_s = -0.386$, $P = 0.035$). **Conclusion** Blimp-1 expression is up-regulated in SLE patients and significantly correlated with plasma cells ,which suggests that Blimp-1 might be involved in the pathogenesis of SLE by promoting plasma cell differentiation.

Key words systemic lupus erythematosus ;Blimp-1 ;B lymphocytes