

[文章编号] 1000-4718(2005)12-2474-05

狼疮肾炎 PBMC 高表达抗 ds-DNA 抗体和 IL-6 由 MAPK^{ERK1/2} 通路介导*

张涤华¹, 李幼姬^{1△}, 王俭勤¹, 梁柳琴², 杨念生¹, 黄锋先¹, 叶任高¹, 余学清¹
(中山大学附属第一医院 ¹肾内科, ²风湿科, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的:探讨有丝分裂原激活的蛋白激酶-细胞外调节激酶 1/2(MAPK^{ERK1/2})信号通路在系统性红斑狼疮合并肾炎(LN)患者外周血单个核细胞(PBMC)中自发高水平表达白细胞介素 6(IL-6)和抗双链 DNA 抗体(抗 ds-DNA 抗体)中的作用。方法:分离培养患者 PBMC,利用蛋白免疫印迹法、逆转录 PCR 法和酶联免疫吸附法分别检测 MAPK^{ERK1/2}磷酸化活化程度、IL-6 表达和抗 ds-DNA 抗体水平,并与正常对照组比较。结果:26 例 LN 患者与 21 例健康对照者比较,体外培养 LN 患者 PBMC MAPK^{ERK1/2}信号通路呈高度活化状态,并自发表达高水平 IL-6 和抗 ds-DNA 抗体,组间有显著差异(P<0.05)。应用特异性阻断剂 PD98059 阻断 LN 患者 PBMC MAPK^{ERK1/2}信号通路活化可显著抑制 IL-6 和抗 ds-DNA 抗体的自发高表达。结论:LN 患者 PBMC 中 MAPK^{ERK1/2}信号通路异常活化,并介导 PBMC 自发高水平表达 IL-6 和抗 ds-DNA 抗体。

[关键词] 狼疮肾炎; 信号转导; 有丝分裂素激活蛋白激酶类; 白细胞介素 6

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Extracellular signal - regulated kinase1/2 pathway mediates PBMC spontaneous over - expressions of IL - 6 and anti - dsDNA antibody in patients with lupus nephritis

ZHANG Di - hua¹, LI You - ji¹, WANG Jian - qin¹, LIANG Liu - qin², YANG Nian - sheng¹, HUANG Feng - xian¹, YE Ren - gao¹, YU Xue - qing¹

(¹Department of Nephrology, ²Department of Rheumatology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat - sen University, Guangzhou 510080, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the significance of extracellular signal - regulated kinase1/2(MAPK^{ERK1/2}) pathway in spontaneous over - expression of IL - 6 and anti - dsDNA antibody in the periphery blood mononuclear cells (PBMC) from patients with lupus nephritis (LN). **METHODS:** PBMC were obtained and cultured from 26 LN patients and 21 healthy persons. Semi - quantity immunoblot, retrotranscriptase polymerase chain reaction, and ELISA were used to determine the activation state of MAPK^{ERK1/2} pathway, IL - 6 and anti - dsDNA antibody expression in PBMC. **RESULTS:** MAPK^{ERK1/2} activation, IL - 6 and anti - dsDNA antibody expression in PBMC of LN patients significantly increased compared with that of normal persons. When the MAPK^{ERK1/2} pathway was blocked by a specific antagonist PD98059, spontaneous expression of IL - 6 and anti - dsDNA antibody in LN PBMC were significantly inhibited. **CONCLUSION:** Abnormal activation of MAPK^{ERK1/2} pathway mediates the over - expression of IL - 6 and anti - dsDNA antibody in PBMC of patients with LN, suggesting that MAPK^{ERK1/2} pathway may play an important role in the pathogenesis of LN.

[KEY WORDS] Lupus nephritis; Signal transduction; Mitogen - activated protein kinases; Interleukin - 6

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种常见的自身免疫性疾病,常累及肾脏。免疫细胞功能紊乱在狼疮肾炎(lupus nephritis, LN)的发生和发展中起重要作用,主要表现为患者外周免

疫耐受缺陷、免疫细胞功能异常并产生一系列针对自身抗原的免疫反应。已证实 LN 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)体外培养过程中呈异常活化状态,并自发表达高水平白

[收稿日期] 2005-06-17 [修回日期] 2005-07-18

* [基金项目] 中山大学 211 工程基金项目(No.98150);中山大学科研基金项目(No.200035)

△通讯作者 Tel: 020-88342802; E-mail: ZDHCHQ@pub.guangzhou.gd.cn

细胞介素 6(IL-6)和自身抗体,但其细胞信号机制尚不明确。蛋白激酶-细胞外调节激酶 1/2(MAPK^{ERK1/2})信号途径在细胞增殖、分化、细胞周期调节、细胞凋亡和细胞因子合成等多方面起重要作用,本研究拟观察 MAPK^{ERK1/2}信号通路在 LN 患者 PBMC 活化状态和自发表达 IL-6 及抗双链 DNA 抗体(抗 ds-DNA 抗体)中的作用。

材 料 和 方 法

1 病例选择

选择 1999 年 7 月至 2002 年 3 月于本院就诊的 SLE 并经肾活检病理检查明确存在肾脏病变病例 26 例,另选择健康志愿者 21 例为正常对照。所有 SLE 患者均符合美国风湿病协会 1982 年修订的 SLE 诊断标准并有肾炎表现。其中女性 22 例,男性 4 例,平均年龄(27±5)岁。病程 2 月-5 年。肾活检病理 WHO 狼疮肾炎分型:V 型 3 例,IV 型 11 例,III 型 7 例,II 型 5 例。所有病例研究期间均排除合并感染。对照组女性 17 例,男性 4 例,平均年龄(26±4)岁。LN 病例均记录完整临床及实验室检查资料。本研究经医院医务处同意并取得患者知情同意书。

2 PBMC 分离和培养

取静脉血 15 mL,肝素抗凝,PBS(pH 7.4)稀释后,以等比例淋巴细胞分离液 Ficoll 密度离心法分离 PBMC;PBS(pH 7.4)洗涤细胞 2 次,台盼蓝拒染法测得活细胞 > 95%,以含 10 mL/L 热灭活胎牛血清 RPMI-1640 培养基冲洗 1 次,培养基制备成细胞悬液 2×10^9 /L 后,以 1 mL/孔置于 24 孔培养板上,5% CO₂ (体积分数)培养箱 37 °C 培养 24 h。

细胞培养实验分组:正常对照组 PBMC 分成 3 个实验组①培养基培养组(培养基组),以含 10 mL/L 热灭活胎牛血清 RPMI-1640 培养基培养。②脂多糖(LPS)培养组(LPS 组),培养液中含 1 mg/L LPS。③LPS + MAPK^{ERK1/2}特异性阻断剂 PD98059 预处理培养组(LPS + PD98059 预处理组),培养液含 LPS,培养前细胞经 50 μmol/L PD98059 预处理。狼疮肾炎组 PBMC 除上述分组外,另设 PD98059 预处理培养基培养组(PD98059 预处理组)。

3 细胞收集和裂解

培养细胞悬液以 2 000 r/min 离心 10 min,PBS(pH 7.4)洗涤 2 次,加入 50 μL SDS 裂解液(62.5 mmol/L Tris-HCl, 20 g/L SDS, 体积分数 10% 甘油, 50 mmol/L DTT, 1 g/L 溴酚蓝),冰浴下超声碎裂 12 s 裂解 DNA 及降低裂解产物粘滞性,瞬间低温离心后

样品存于 -70 °C 冰箱备用。裂解产物蛋白浓度测定采用改良 Bradford 法。

4 MAPK^{ERK1/2}磷酸化活化检测

用 PhosphoPlus Western 蛋白免疫印迹试剂盒(BioLabs 公司)检测。取 25 μg 细胞裂解产物上清液进行电泳,方法按试剂盒说明书进行。医学图像分析仪定量分析 X 光显影电泳条带 MAPK^{ERK1/2} 总量及 MAPK^{ERK1/2}磷酸化产物量,以灰度均值 × 条带面积表示。

5 IL-6 mRNA 表达水平检测

总 RNA 提取和逆转录反应试剂盒来自 Gibco 公司。实验操作按说明书方法进行。PCR 扩增试剂来自加拿大真达公司。IL-6 引物设计及 PCR 扩增方法按有关文献进行^[1]。

IL-6(639 bp)引物的序列如下:上游引物 5' - ATGAACTCCTTCTCCACAAGC,下游引物 3' - CTA-CATTTGCCGAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG。内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因通过基因库获得,其引物通过 DNASIS 软件设计完成。GAPDH(463 bp)引物的序列如下:上游引物 5' - ACTGCCACCCAGAA-GACTGTGGATGG,下游引物 3' - TTACTCCTTGGAG-GCCATGTGGGCC。

所有引物均由上海细胞生物技术研究所有合成。PCR 扩增产物于 10 mg/L 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,并测定电泳条带吸光度 A 值,以 GAPDH 为内参照计算相对单位。

6 细胞培养上清液 IL-6、抗 ds-DNA 抗体和 IgG 水平检测

IL-6、抗 ds-DNA 抗体和 IgG 水平检测采用 ELISA 法测定,IL-6 ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司,微量 IgG 及抗 ds-DNA 抗体 ELISA 试剂盒购自上海太阳生物技术公司。

7 统计学处理

计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异分析用 *t* 检验。

结 果

1 体外培养 LN 患者 PBMC MAPK^{ERK1/2}磷酸化活化水平

LN 组与正常对照组培养基培养 PBMC 裂解产物蛋白免疫印迹电泳定量图像分析结果表明,LN 组 MAPK^{ERK1/2}磷酸化蛋白条带平均灰度值为 $1\ 286.53 \pm 416.65$,正常对照组为 763.62 ± 255.75 ,LN 组显著高于正常对照组, $P < 0.05$ (图 1)。

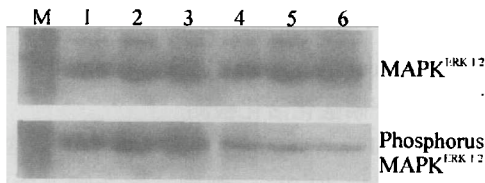


Fig 1 PBMC MAPK^{ERK1/2} phosphorus status comparison in LN and normal control group (Western blotting). M: molecular marker; Lane 1-3: LN group; Lane 4-6: normal control group.

图1 LN与正常对照培养基组PBMC MAPK^{ERK1/2}磷酸化状态免疫印迹结果

2 LN患者PBMC体外培养IL-6 mRNA的表达

对LN组与正常对照组PBMC mRNA进行RT-PCR扩增后,获得639 bp的IL-6片段及463 bp的内参照GAPDH片段。LN组PBMC在培养基培养和LPS培养时IL-6 mRNA表达均显著高于正常对照组(0.52 ± 0.10 vs 0.16 ± 0.11, P < 0.01; 0.84 ± 0.21 vs 0.45 ± 0.13, P < 0.05)(图2)。

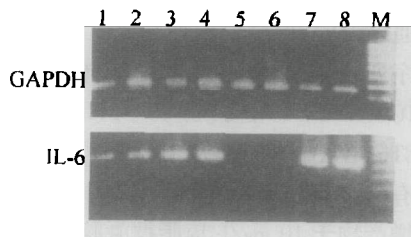


Fig 2 RT-PCR products of PBMC IL-6 mRNA in LN and normal control group. M: DNA marker; Lane 1,2: normal control group LPS culture; Lane 3,4: LN group medium culture; Lane 5,6: normal control group medium culture; Lane 7,8: LN group LPS culture.

图2 LN与正常对照PBMC IL-6 mRNA RT-PCR扩增产物琼脂糖电泳

3 PD98059对PBMC MAPK^{ERK1/2}磷酸化活化的影响

蛋白免疫印迹结果提示PD98059可阻断LN培养基组和LPS组PBMC MAPK^{ERK1/2}的磷酸化活化,也可阻断LPS诱导正常对照组的PBMC MAPK^{ERK1/2}磷酸化活化(图3)。

4 PD98059对PBMC IL-6 mRNA表达的影响

MAPK^{ERK1/2}磷酸化活化特异性阻断剂PD98059可显著抑制LN组PBMC IL-6 mRNA的自发性高表达,LN培养基组和PD98059预处理组PBMC IL-6 mRNA表达水平分别为0.60 ± 0.07和0.16 ± 0.12, P < 0.01; PD98059也可显著抑制LPS诱导的正常对照组PBMC IL-6 mRNA表达,正常对照LPS组与LPS + PD98059预处理组PBMC IL-6 mRNA水平图像分

析结果分别为0.54 ± 0.08和0.14 ± 0.10, P < 0.01(图4)。

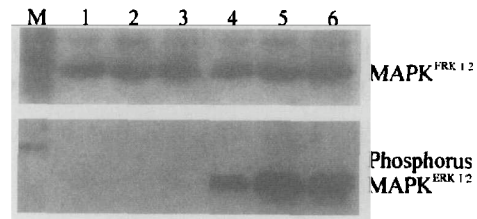


Fig 3 Blocking effects of PD98059 on PBMC MAPK^{ERK1/2} phosphorus activation (Western blotting). M: molecular marker; Lane 1: LN with PD98059 treatment; Lane 2: LN group LPS culture with PD98059 treatment; Lane 3: normal control group LPS culture with PD98059 treatment; Lane 4: normal control group LPS culture; Lane 5: LN group LPS culture; Lane 6: LN group medium culture.

图3 PD98059对PBMC MAPK^{ERK1/2}磷酸化活化影响蛋白免疫印迹结果

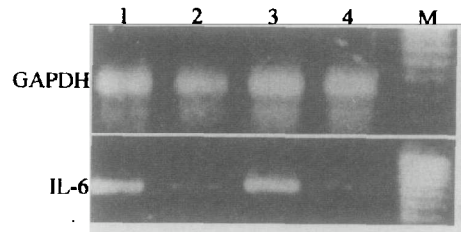


Fig 4 Inhibition effects of PD98059 on PBMC IL-6 mRNA expression in LN and normal control group(RT-PCR). M: DNA marker; Lane 1: normal control group LPS culture; Lane 2: normal control group LPS culture with PD98059 treatment; Lane 3: LN group medium culture; Lane 4: LN group with PD98059 treatment.

图4 PD98059对PBMC IL-6 mRNA表达影响RT-PCR产物琼脂糖电泳

5 PD98059对PBMC培养上清液IL-6、IgG和抗dsDNA抗体表达的影响

PD98059可显著降低LN组PBMC培养上清液IL-6、IgG和抗dsDNA抗体水平,也可显著降低LPS诱导正常对照组PBMC培养上清液IL-6和IgG水平(表1)。

讨论

SLE是一种累及全身各器官、系统的自身免疫性疾病,SLE在机体自身免疫反应和靶器官损伤过程中,炎症细胞因子和自身抗体起着关键作用。IL-6是与免疫调节关系最为密切的炎症性细胞因子之一,广泛作用于T、B淋巴细胞和单核/巨噬细胞。大量研究表明IL-6在SLE及LN的发病中起作用并

表1 PD98059对PBMC培养上清液IL-6、IgG、抗ds-DNA抗体水平影响

Tab 1 Effects of PD98059 on supernatant IL-6, IgG and anti-dsDNA antibody concentration of PBMC culture medium ($\bar{x} \pm s$)

	LN group(<i>n</i> = 26)		Normal control group(<i>n</i> = 21)		
	Medium	PD98059	Medium	LPS	LPS + PD98059
IL-6($\mu\text{g/L}$)	49.04 \pm 9.02	18.59 \pm 15.08*	36.90 \pm 7.01*	46.51 \pm 12.23	14.71 \pm 10.91#
IgG(mg/L)	2.88 \pm 1.96	0.55 \pm 0.79*	1.47 \pm 1.27*	2.41 \pm 2.11	0.22 \pm 0.22#
Anti-dsDNA(binding index, BI)	0.28 \pm 0.13	0.18 \pm 0.08*	—	—	—

* $P < 0.05$ vs LN medium culture group; # $P < 0.05$ vs normal control medium culture group and LPS culture group.

与循环自身抗体水平、疾病活动程度密切相关^[2,3]；体外培养SLE患者PBMC可合成分泌高水平IL-6，其活性与PBMC分泌IgG和抗ds-DNA抗体相关^[5]。我们的实验结果也证实体外培养LN患者PBMC可自发表达高水平IL-6、IgG和抗ds-DNA抗体，而正常对照组PBMC仅在LPS诱导培养条件下表达高水平IL-6和IgG。

LN患者PBMC自发表达高水平IL-6和自身抗体的细胞信号转导机制目前尚不明确。细胞受到外界刺激信号作用后产生功能改变，MAPK信号途径是其中最重要的信号机制之一。目前研究表明MAPK^{ERK1/2}信号途径在细胞增殖、分化、细胞周期调节、细胞凋亡和细胞因子合成等多方面起作用^[4]。Leonard等^[6-13]分别在白血病细胞、巨噬细胞、成纤维母细胞、肾小球系膜细胞、肾脏远曲小管上皮细胞、成骨细胞样细胞、单核细胞、星状细胞和纤维肉瘤细胞系中证实MAPK^{ERK1/2}信号途径参与IL-6基因表达的调控。基于以上研究结果，我们推测LN患者PBMC体外培养过程中自发表达高水平IL-6与MAPK^{ERK1/2}信号途径异常活化有关。实验结果表明，MAPK^{ERK1/2}信号途径在LN患者PBMC中呈显著活化状态，特异性阻断剂PD98059在阻断MAPK^{ERK1/2}信号途径活化的同时，可显著抑制LN患者PBMC IL-6的自发高表达，提示体外培养LN患者PBMC高水平IL-6表达与MAPK^{ERK1/2}信号途径的异常活化状态有关。值得注意的是，本研究结果提示PD98059在阻断MAPK^{ERK1/2}信号途径活化、抑制IL-6表达的同时，也显著抑制LN患者PBMC合成分泌IgG和抗ds-DNA抗体。但在体外培养条件下，阻断PBMC MAPK^{ERK1/2}信号途径的活化并不能完全抑制IL-6 mRNA的合成，提示IL-6基因的表达可能还受其它细胞信号途径的调控。

本研究未对LN患者PBMC MAPK^{ERK1/2}信号途径异常活化的原因作进一步探讨，但研究结果提示MAPK^{ERK1/2}信号途径参与了SLE及LN的自身免疫发

病过程。MAPK信号途径作为目前受到广泛研究的细胞信号途径，其活化机制和细胞生物学效应已较明确，针对该信号途径进行调控和治疗干预，在SLE以及相关疾病的治疗中具有广泛前景^[14,15]，因此，本研究为进一步深入探索SLE和LN发病机制及治疗方法提供了线索。

[参 考 文 献]

- [1] 许韩师, 孙林, 叶任高. 系统性红斑狼疮患儿PBMC IL-6的过度表达[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(6): 312-314.
- [2] Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, et al. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp Rheumatol, 2000, 18(5): 565-570.
- [3] 董光富, 叶任高, 潘云峰, 等. 狼疮肾炎患者外周血单个核细胞IL-17信号转导途径的初步研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(8): 1353-1359.
- [4] Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades[J]. Curr Opin Cell Biol, 1996, 8(2): 205-215.
- [5] Viallard JF, Taupin JL, Miossec V, et al. Analysis of interleukin-6, interleukin-10 and leukemia inhibitory factor (LIF) production by peripheral blood cells from patients with systemic lupus erythematosus identifies LIF as a potential marker of disease activity[J]. Eur Cytokine Netw, 1999, 10(1): 17-24.
- [6] Birkenkamp KU, Esselink MT, Kruijer W, et al. Differential effects of interleukin-3 and interleukin-1 on the proliferation and interleukin-6 protein secretion of acute myeloid leukemic cells: the involvement of ERK, p38 and STAT5[J]. Eur Cytokine Netw, 1999, 10(4): 479-490.
- [7] Leonard M, Ryan MP, Watson AJ, et al. Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells[J]. Kidney Int, 1999, 56(4): 1366-1377.
- [8] Miwa M, Kozawa O, Tokuda H, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinases are involved in interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 synthesis in osteoblasts: modulation not of

- p38 MAP kinase, but of p42/p44 MAP kinase by IL-1-activated protein kinase C[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(11): 5120-5125.
- [9] Tokuda H, Kozawa O, Harada A, et al. p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation is involved in prostaglandin F₂alpha-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts[J]. *Cell Signal*, 1999, 11(5): 325-330.
- [10] Tuyt LM, Dokter WH, Birkenkamp K, et al. Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-kappa B-dependent IL-6 expression in human monocytes[J]. *J Immunol*, 1999, 162(8): 4893-4902.
- [11] van Wagoner NJ, Choi C, Repovic P, et al. Oncostatin M regulation of interleukin-6 expression in astrocytes: biphasic regulation involving the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38[J]. *J Neurochem*, 2000, 75(2): 563-575.
- [12] Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappa B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(6): 3285-3290.
- [13] Junn E, Lee KN, Ju HR, et al. Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-beta 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca²⁺ in TGF-beta 1-induced IL-6 expression[J]. *J Immunol*, 2000, 165(4): 2190-2197.
- [14] Chang F, Steelman LS, Lee JT, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention[J]. *Leukemia*, 2003, 17(7): 1263-1293.
- [15] Smolen JS. Therapy of systemic lupus erythematosus: a look into the future[J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(Suppl 3): S25-S30.
-