

· 论 著 ·

系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞中 PDCD5 mRNA 的表达及意义*

赵丽娜, 张秀军, 宁树成, 贺宝玲, 赵 杰

(华北煤炭医学院生物科学系, 河北唐山 063000)

摘要:目的 通过检测系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血单个核细胞(PBMC)凋亡相关基因程序化细胞死亡因子 5(PDCD5)mRNA 表达变化,从而探讨 PDCD5 基因与 SLE 发生与发展的关系。方法 应用逆转录 PCR(RT-PCR)半定量检测 67 例 SLE 患者和 50 例健康者 PBMC 中 PDCD5 mRNA 的表达。结果 SLE 活动期患者 PDCD5 mRNA 阳性表达率明显高于健康者($P=0.00$);SLE 活动期患者 PDCD5 mRNA 表达水平明显高于稳定期患者和健康者($P<0.01$),稳定期患者 PDCD5 mRNA 比健康者也明显升高($P<0.01$)。SLE 活动期患者 PBMC 中 PDCD5 的表达与反应 SLE 疾病活动的指标如 SLEDAI、补体 C3、抗 ds-DNA 抗体等呈显著相关($P<0.05$)。狼疮性肾炎患者和非狼疮性肾炎患者 PDCD5 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 SLE 患者 PBMC 中 PDCD5 表达上调,且与 SLE 疾病活动相关,提示 PDCD5 通过增加表达量而导致异常淋巴细胞凋亡,参与 SLE 的发生、发展。

关键词:系统性红斑狼疮;程序化细胞死亡因子 5;凋亡;外周血单个核细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.002

中图分类号:R593.241;R446.61

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1939-03

Expression and significance of PDCD5 mRNA in peripheral blood mononuclear cells from SLE patients*

ZHAO Li-na, ZHANG Xiu-jun, NING Shu-cheng, et al.

(Department of Biological Sciences of North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of programmed cell death 5 gene(PDCD5) mRNA in peripheral blood mononuclear cells(PBMC) from Systemic lupus erythematosus(SLE) patients and investigate the role of PDCD5 in the occurrence and development of SLE. **Methods** The expression of PDCD5 mRNA in PBMC from 67 SLE patients and 50 healthy cases were detected by semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** The positive rate of PDCD5 mRNA from active SLE patients was significantly higher than that in normal cases($P=0.00$). The expression levels of PDCD5 mRNA in active SLE patients was significantly higher than that of inactive SLE patients and that of normal cases. PDCD5 mRNA expression levels of inactive SLE patients was significantly higher than that of normal cases($P<0.01$). Significant correlation was found between the PDCD5 expression in PBMC from active SLE patients and clinical parameters such as SLEDAI, C3 and anti ds-DNA antibody($P>0.05$). There was no significant difference in the expression of PDCD5 between lupus nephritis patients and non-lupus nephritis patients($P<0.05$). **Conclusion** The up-regulation of expression of PDCD5 mRNA associated with disease activities in PBMC from SLE patients indicates that the abnormal apoptosis of lymphocytes resulted from the overexpression of PDCD5 perhaps plays an important role in the pathogenesis of human SLE.

Key words: systemic lupus erythematosus; PDCD5; apoptosis; peripheral blood mononuclear cells

程序化细胞死亡因子 5(programmed cell death 5, PDCD5)是由北京大学人类疾病基因中心从白血病细胞株 TF-1 细胞中克隆得到的凋亡相关基因,具有促进多种细胞凋亡和抑制增殖的效应^[1]。系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种典型的自身免疫性疾病,其发病机制复杂,尚未完全阐明。近年来淋巴细胞凋亡紊乱并伴随一些凋亡相关基因表达异常已成为 SLE 病因研究热点。SLE 患者外周血单个核细胞(peripheral blood monocyte, PBMC)早期凋亡增加,导致细胞内物质释放入血,成为自身抗原,促进自身反应性淋巴细胞激活,产生自身抗体,进而形成循环免疫复合物沉积于多个器官,造成多系统损害,从而促进 SLE 的发生、发展^[2]。目前研究发现 SLE 患者血清中 PDCD5 蛋白水平表达明显高于

健康者,而 PDCD5 在 SLE 患者 PBMC 中 mRNA 水平的表达情况还少见报道^[3]。因此从基因水平研究 PDCD5 表达对阐明凋亡在 SLE 发病中的作用有更为重要的意义。

1 临床资料

1.1 一般资料 选择 2007 年 3 月至 2007 年 12 月在唐山市开滦医院风湿免疫科门诊就诊和住院 SLE 患者 67 例,其中男 5 例,女 62 例;年龄 9~68 岁,平均(35.22±14.20)岁。均符合美国风湿协会(ARA)SLE 的诊断标准,排除患有其他全身性疾病者。以 SLE 疾病活动性指数(the systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)评价疾病活动程度,将 SLE 患者分为活动期患者 45 例(SLEDAI≥9 分),稳定期患者 22 例(SLEDAI<9 分);活动期患者中初发病例 17 例,已用激

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671092)。

素或免疫抑制剂治疗病例 28 例;依据狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)诊断标准,将 SLE 患者分为 LN 35 例,非 LN 32 例。同期选择性别、年龄与之匹配的健康者 50 例,其中女 46 例,男 4 例;年龄 14~62 岁,平均(34.36±15.84)岁。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 人 PDCD5 mRNA 序列(accession no. AF014955),利用 Primer Premier 5.0 设计引物,正向:5'-CAA CAG GAA GCA AAG CAC-3',反向:5'-GAT CTT AAC TTC TGCCT AGAC-3',预期 PCR 扩增片段长度为 384 bp。内参照 β -actin 引物序列,正向:5'-CCC AGG CAC CAG GGC GTG ATG GT 3',反向:5'-GGA CTC CAT GCC CAG GAA GGA A 3',预期扩增片段长度为 701 bp。两对引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成,经 PAGE 纯化。

1.2.2 总 RNA 提取与 RT-PCR 反应 取肝素抗凝血 5 mL,淋巴细胞分离液分离 PMBC。使用 Trizol 试剂提取细胞内总 RNA。具体操作步骤按说明书进行,用紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度。25 μ L 逆转录反应体系为:总 RNA 2 μ g, Oligod(T)15(50 pM) 2.5 μ L,5 \times MML-V 反转录酶缓冲液 5 μ L,dNTP (10 mmol/L) 5 μ L,RNasin (40 u/ μ L) 0.5 μ L,MML-V 反转录酶(200 u/ μ L)1 μ L,DEPC-H₂O 根据 RNA 加入量补齐。37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,72 $^{\circ}$ C 加热 10 min,以灭活 MML-V 反转录酶,-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。PCR 扩增体系:取 2 μ L cDNA,分别加入 10 pmol 特异性 PDCD5(或 β -actin)上游和下游引物,12.5 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix 和 8.5 μ L DDW,反应体系为 25 μ L。经优化的 PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min,再以 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s;PDCD5 特异引物的退火温度为 61 $^{\circ}$ C,复性 45 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;优化的循环次数亦分别为 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物电泳和半定量分析检测 将 10 μ L PCR 产物加样至 1%琼脂糖凝胶样品孔中,在 1 \times TAE 电泳缓冲液中电泳鉴定 PCR 产物,紫外灯下观测电泳结果,照相记录实验结果。用凝胶影像分析软件(quantity one)测定每个条带的光密度值,并计算样品 PDCD5 条带与内参照 β -actin 条带的光密度比值,该值是 PDCD5 基因的相对表达值(relative index, RI),作为半定量 RT-PCR 结果。

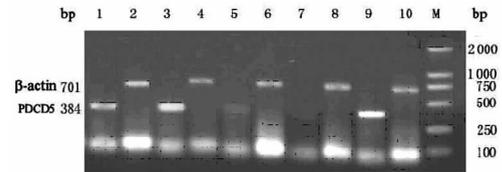
1.3 统计学方法 数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS11.5 统计软件处理数据,进行 χ^2 检验、单因素方差分析和 Pearson 相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDCD5 mRNA 在 SLE 活动期患者、稳定期患者和健康者 PBMC 中阳性表达率的比较 PDCD5 阳性表达率在健康者、稳定期患者、活动期患者中呈逐渐升高趋势。SLE 活动期患者 PDCD5 mRNA 表达阳性率与健康者比较,差异有统计学意义($\chi^2=14.34, P=0.00$);而活动期患者与稳定期患者比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.04, P=0.31$),稳定期患者与健康者比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.27, P=0.07$),见表 1。

2.2 PDCD5 mRNA 在 SLE 活动期患者、稳定期患者和健康者 PBMC 中表达水平的比较 PDCD5 在健康者、稳定期患者、活动期患者中的表达水平逐步升高,见图 1。方差分析结果显示, $F=80.48, P=0.00$ 。SLE 活动期患者 PBMC 中 PDCD5 mRNA 平均表达水平明显高于稳定期患者和健康者(P

<0.01),SLE 稳定期患者 PDCD5 mRNA 表达水平高于健康者,两者比较,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。



1,2:SLE 非活动期;3,4:SLE 活动期;5,6:健康对照;7,8:阴性对照;9,10:阳性对照;M:DNA marker。

图 1 RT-PCR 半定量检测 PDCD5 mRNA 表达电泳图

表 1 PDCD5 mRNA 在 SLE 活动期、稳定期及健康者的阳性表达率和表达水平比较

组别	n	阳性率(%)	表达水平($\bar{x}\pm s$)
SLE 活动期患者	45	93.33*	1.12±0.18* Δ
SLE 稳定期患者	22	81.82	0.81±0.14*
健康者	50	60.00	0.45±0.08

*:与健康者比较, $P<0.01$; Δ :与 SLE 稳定期患者比较, $P<0.01$ 。

2.3 PDCD5 mRNA 在 SLE 活动期患者中的表达与反应疾病活动的临床指标之间的关系 SLE 活动期患者 PBMC 中 PDCD5 mRNA 的表达与反映 SLE 疾病活动的各项指标如 SLE-DAI 评分、抗 ds-DNA 抗体呈显著正相关($P<0.05$),与补体 C3 呈显著负相关($P<0.05$);PDCD5 mRNA 的表达与补体 C4 无显著相关性($P>0.05$),见表 2。

表 2 SLE 活动期 PDCD5 的表达与疾病活动临床指标的相关性

临床指标	r	P
SLEDAI	0.456	0.001
C3(g/L)	-0.531	0.021
C4(g/L)	-0.341	0.066
抗 dsDNA 抗体	0.712	0.015

2.4 PDCD5 mRNA 在 SLE 活动期患者初发病例和已用激素或免疫抑制剂治疗病例表达水平的比较 PDCD5 mRNA 在 SLE 活动期患者初发病例的表达水平为(1.09±0.19),在已治疗病例的表达水平为(1.14±0.18),两者比较差异无统计学意义($t=0.763, P=0.450$)。

2.5 PDCD5 mRNA 在 LN 患者和非 LN 患者中表达水平的比较 PDCD5 mRNA 在 LN 患者和非 LN 患者中的表达水平分别为 1.00±0.24、1.05±0.21, LN 患者的表达水平低于非 LN 患者,但差异无统计学意义($t=1.014, P=0.315$)。

3 讨论

SLE 是一种多发于青年女性的自身免疫性疾病,其发病可能涉及遗传背景、环境因素和免疫异常等诸多因素。有研究表明,SLE 的发病机制与淋巴细胞异常凋亡密切相关。细胞凋亡要受到一系列相关基因的调控,如 Fas、FasL、p53、C-myc、bax、bcl-2 等基因表达异常,可使外周血淋巴细胞凋亡过程发生障碍,从而导致免疫功能失调,诱发 SLE^[4]。凋亡调控基因、

淋巴细胞凋亡与 SLE 之间有着内在本质的联系。PDCD5 是从 TF-1 细胞中克隆得到的新基因,能够促进不同凋亡诱导因素触发下的细胞凋亡。国内外多项研究发现,PDCD5 在与凋亡相关疾病,如恶性肿瘤及自身免疫性疾病的发病过程中起重要作用^[5-8]。但关于 PDCD5 的表达与 SLE 的相关性研究鲜有报道。

本研究检测 PDCD5 mRNA 在 SLE 患者 PBMC 中的表达情况,结果显示 PDCD5 在健康者、SLE 稳定期患者和活动期患者的阳性表达率分别为 60.00%、81.82%、93.33%,提示 PDCD5 基因在健康者和 SLE 患者的 PBMC 中普遍表达,PDCD5 可能对 PBMC(以淋巴细胞为主)的凋亡有重要的调节作用。本研究结果显示,PDCD5 mRNA 在活动期患者的表达阳性率明显高于健康者($P=0.00$);就 PDCD5 mRNA 表达水平而言,活动期患者高于稳定期患者和健康者,稳定期患者高于健康者,三者比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。由此说明,PDCD5 在 SLE 患者 PBMC 中的过表达,尤其是活动期患者表达更多,可能是促进 SLE 的发病和病程进展的重要因素,并且这种表达量的增加在转录水平就已经开始,这与大多数凋亡相关基因在 SLE 外周血表达增多并与病情有相关的趋势的结果一致^[9]。据此推测 PDCD5 可能通过增加表达量而导致淋巴细胞凋亡增多,免疫功能失调,引起 SLE 的发生、发展。至于 PDCD5 表达阳性率和表达水平在三者比较结果不完全一致,考虑可能与样本量有关,造成计数资料和计量资料在统计上的差别。

SLE 的免疫学特征为体内大量自身抗体的产生,通常认为抗 dsDNA 抗体参与疾病的发展过程。本研究结果显示,SLE 活动期患者 PBMC 中 PDCD5 mRNA 的表达与反应 SLE 疾病活动度的临床指标如 SLEDAI 评分、补体 C3、抗 ds-DNA 抗体呈显著相关($P<0.05$),进一步提示 PDCD5 的表达水平在一定程度反映了 SLE 病情活动的变化。

有文献报道用激素或环磷酰胺治疗后的 SLE 患者 PBMC 的凋亡与治疗前比较,差异无统计学意义。本研究结果也显示,PDCD5 在 SLE 活动期患者的初发病例和已治疗病例的表达差异无统计学意义,这一研究结果排除治疗因素的干扰,进一步说明 SLE 患者 PDCD5 表达的变化是一种内源性的异常,与 SLE 患者本身免疫异常有关。

LN 是 SLE 最常见的严重并发症,目前认为 LN 的发生与自身抗体产生有关,自身免疫复合物在肾小球基底膜沉积,在肾小球内发生免疫炎症反应,引起肾脏损伤。传统观点认为 DNA 与抗 ds-DNA 抗体免疫复合物沉积在肾小球基底膜是引起 LN 发病的重要原因,但已有动物实验证明,并非是抗 ds-

DNA 抗体而是核小体及其抗体家族与 LN 发生密切相关^[10]。本研究结果显示,LN 患者和非 LN 患者的 PDCD5 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),因此尚不能将 PDCD5 作为衡量 SLE 并发肾脏损伤的参考指标。

综上所述,SLE 患者 PBMC 中 PDCD5 的表达上调,并且依赖 SLE 疾病活动程度而升高,提示 PDCD5 可能作为淋巴细胞凋亡的正性调控基因在 SLE 发生、发展中具有重要意义。参与 SLE 发病的细胞凋亡基因众多,今后可进一步探讨 PDCD5 与其他基因的相关性,为 SLE 病因的全面揭示提供重要线索。

参考文献:

- [1] 马大龙. 新细胞因子及细胞凋亡基因的发现与功能研究[J]. 北京大学学报:医学版,2002,34(5):337.
- [2] Mevorach D. Systemic lupus erythematosus and apoptosis: a question of balance[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2003,25(1):49.
- [3] 宋清华,陈英玉,狄春晖,等. TFAR19 蛋白在系统性红斑狼疮患者血清中水平的检测[J]. 中华风湿病学杂志,2003,7(9):563.
- [4] 王冬怀,陈亚宝. 血清中可溶性 Fas FasL 与 SLE 关系的探讨[J]. 海南医学,2002,13(7):70.
- [5] 余康康,刘顺爱,李文凡,等. 促凋亡因子 PDCD5 与 Fas 在肝癌及其癌旁组织中的表达[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(16):1820.
- [6] Ruan GR, Zhao HS, Chang Y, et al. Adenovirus-mediated PDCD5 gene transfer sensitizes K562 Cells to apoptosis induced by idarubicin in vitro and in vivo[J]. Apoptosis, 2008,13(5):641.
- [7] 何焱玲,齐焕英,闻卫斌,等. 银屑病患者皮损表皮细胞促凋亡分子 PDCD5 表达的研究[J]. 中华皮肤科杂志,2004,37(04):215.
- [8] 陈占昆,吕厚山,王宁. PDCD5 在类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡中表达上调[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2008,24(6):563.
- [9] 蒋震,刁庆春. 细胞凋亡相关因子在 SLE 发病中所起的作用[J]. 重庆医学,2008,37(12):1296.
- [10] 姜友珍,莫碧媛. SLE 患者 ANA、抗 dsDNA 及 ENA 联合检测的对照分析[J]. 广西医学,2006,28(4):524.

(收稿日期:2009-11-16 修回日期:2010-01-14)

启 事

接中国学术期刊评价委员会通知,《重庆医学》杂志在《中国学术期刊评价研究报告》(2009—2010)中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊”。

特此公告

《重庆医学》编辑部