

· 临床研究 ·

系统性红斑狼疮患者静脉血 BCMA 和 CD138⁺ 浆细胞的研究*

牛晓昶^{1,2}, 曾照芳², 贾佳³, 李艳林², 夏季¹, 黄恒柳¹, 邓少丽^{1△}

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042; 2. 重庆医科大学检验系 400016; 3. 重庆医科大学附属儿童医院 400014)

摘要:目的 探讨系统性红斑狼疮(SLE)患者和健康者静脉血 B 淋巴细胞成熟抗原(BCMA)表达和 CD138⁺ 浆细胞数量的差异。方法 将 40 例 SLE 患者血液标本作为 SLE 组, 30 例健康人血液标本作为对照组, 采用荧光定量实时聚合酶链反应及酶联免疫吸附测定(ELISA)技术检测 BCMA 的表达, 流式细胞技术检测静脉血 CD138⁺ 浆细胞数量。结果 SLE 组患者静脉血中 BCMA mRNA 水平、蛋白含量以及 CD138⁺ 浆细胞的数量明显高于对照组($P < 0.05$)。结论 SLE 患者中浆细胞数量的增多可能与 BCMA 高表达相关。

关键词: B 淋巴细胞; 浆细胞; 红斑狼疮, 系统性; 聚合酶链反应; 酶联免疫吸附测定

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)07-0643-03

A study of BCMA and CD138⁺ plasmacytoid cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus*

Niu Xiaochang^{1,2}, Zeng Zhaofang², Jia Jia³, Li Yanlin², Xia Ji¹, Huang Hengliu¹, Deng Shaoli^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: **Objective** To study the differences of B cell maturation antigen(BCMA) expression and the amount of CD138⁺ plasmacytoid cells in venous blood between patients with systemic lupus erythematosus(SLE) and healthy people. **Methods** 40 blood samples of patients with SLE served as SLE group and 30 blood samples of healthy people served as control group. Fluorescent quantitative real time-polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) were used to detect the expression of BCMA. Flow cytometry was adopted to assay the amount of CD138⁺ plasmacytoid cells in venous blood. **Results** The mRNA level and protein content of BCMA and the amount of CD138⁺ plasmacytoid cells in venous blood of patients in SLE group were significantly higher than those in control group($P < 0.05$). **Conclusion** The increased amount of plasmacytoid cells in patients with SLE may be related to the high expression of BCMA.

Key words: B-lymphocytes; plasma cells; lupus erythematosus, systemic; polymerase chain reaction; enzyme-linked immunosorbent assay

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)简称红斑狼疮,是由多克隆自身反应性 B 细胞介导的自身免疫性疾病, B 细胞异常激活并异常分化为浆细胞和记忆性效应细胞,其直接的致病因子是多克隆自身抗体,并以免疫复合物的形式造成多种组织器官损伤。虽然目前对于引起 SLE 的确切病因仍不明确,但是 SLE 中异常浆细胞分泌多种致病性自身抗体导致 SLE 的发生已成共识,这些抗体主要来源于浆细胞。浆细胞存活及其抗体分泌功能主要由 B 淋巴细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)调控,虽然 BCMA 作用的相关机制至今尚未完全清楚,但是已有研究显示 BCMA 在浆细胞的存活中发挥重要作用^[1]。因此,阻断 BCMA 可选择性抑制浆细胞的存活,减少抗体的分泌, BCMA 成为治疗 SLE 的潜在靶点。白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)138 是浆细胞特异的膜抗原,是成熟浆细胞的标记。本研究从 BCMA 蛋白维持浆细胞存活的角度出发,探讨 BCMA 表达和 CD138⁺ 浆细胞数量在 SLE 患者和健康人体内存在的差异,为研究 SLE 的发病机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 主要试剂包括:人 BCMA 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司, Ficoll 细胞分离液购自美国 GE 公司, 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)购自北京中杉金桥生物技术有限公司, Trizol 为 Invitrogen 公司产品, 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)原液为 Sigma 公司产品, 实时聚合酶链反应(real time-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自 Promega 公司。抗 CD138-藻红蛋白(phycoerythrin, PE)、CD38-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、CD19-FITC、CD45-藻红蛋白-花青苷 5(phycoerythrin cyanin 5, PC5)、CD56-PE、IgG1-PE/IgG1-FITC/IgG1-PC5 抗体均购自 BECKMAN 公司, Taq 酶购自 Promega 公司。主要仪器包括: CFX-96 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)、ND-1000 微量紫外可见分光光度计(美国 Nanodrop 公司)、流式细胞仪(美国 Beckman 公司), MK3 酶标分析仪(芬兰雷勃公司)。

1.2 材料 选择 2009 年 4 月至 2011 年 6 月于第三军医大学大坪医院就诊的 40 例临床确诊的 SLE 患者作为 SLE 组,均符合 1997 年美国风湿病学会修订的 SLE 诊断标准,年龄 15~54 岁,平均(34.0±6.0)岁。将同期进行健康体检的 30 例健康人作为对照组,年龄 26~49 岁,平均(35.0±5.0)岁。取上述患者及健康人的静脉血进行研究,采集的血液标本用乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝。

1.3 引物 BCMA 引物:上游 5'-GCA TCA AGA GCA AAC CGA AGG-3',下游 5'-TCT ATC TCC GTA GCA CTC AAA GC-3';BCMA 荧光探针:FAM-5'-CGA CTC TGA CCA TTG CTT TCC ATC CCC A-3'。B2M 引物:上游 5'-TCC ATC CGA CAT TGA AGT TGA C-3',下游 5'-ACT ATC TTG GGC TGT GAC AAA G-3';B2M 探针:FAM-5'-TGG TTC ACA CGG CAG GCA TAC TCA-3'。上述引物和荧光探针均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.4 ELISA 法检测 BCMA (1)包被:以 PBS 将 72 μg/mL 捕获抗体稀释至终浓度为 0.4 μg/mL,将其加入空白微孔板(100 μL/孔),室温过夜,0.05% Tween20 洗涤液洗板 3 次,甩干;(2)封闭:以试剂稀释剂(含 1% 牛血清清蛋白的 PBS 液)封闭微孔,每孔 300 μL,室温放置至少 1 h,0.05% Tween20 洗涤液洗板 3 次,甩干,备用;(3)加样:以试剂稀释剂稀释重组人 BCMA 标准品,对倍稀释,稀释后终浓度为 31.25、62.50、125.00、250.00、500.00、1 000.00、2 000.00 pg/mL,将其分别加入 100 μL 标准液或待测血清,室温放置 2 h,以 0.05% Tween20 洗涤液洗板 3 次,甩干;(4)加入生物素化羊抗人 BCMA 抗体:以试剂稀释剂将 36 μg/mL 检测抗体稀释至终浓度为 200 ng/mL,每孔 100 μL,室温放置 2 h,0.05% Tween20 洗涤液洗板 3 次,甩干;(5)加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶(streptavidin-horseradish peroxidase, SA-HRP):SA-HRP 以试剂稀释剂按 1:200 稀释后加入微孔中,每孔 100 μL,避免强光直射,放置室温 20 min,以 0.05% Tween20 洗涤液洗板 3 次,甩干;(6)显色、测定:每孔加入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μL,避免强光直射,放置室温 20 min 后加入终止液 50 μL,在酶标仪上读取 450 nm 处光密度(optical density, OD)值;绘制标准曲线,计算待测样本的 BCMA 含量。

1.5 单个核细胞 RNA 的提取 用 Ficoll 细胞分离液通过离心(离心半径 9 cm,2 000 r/min 离心 20 min),将标本中的单个核细胞分离出来,用 1% PBS 洗涤,然后再离心(2 500 r/min 离心 10 min),去上清液,留单个核细胞于管底。用 Trizol 破裂细胞,氯仿、异丙醇和 75% 乙醇萃取、沉淀,提取细胞 RNA,将 RNA 溶解在无核酸酶水中,测定其浓度和纯度,为不影响实验结果,浓度应不小于 300 ng/μL, A₂₆₀/A₂₈₀ 不小于 2.0。根据 RT-PCR 试剂盒说明书取 1 mg RNA 进行逆转录得到 cDNA, -20 °C 冻存备用。

1.6 荧光定量 RT-PCR 检测 反应体系:Free water 3.4 μL、Mix 混合液 5.0 μL、上游引物 0.3 μL、下游引物 0.3 μL、BCMA 探针 0.3 μL、Taq 酶 0.2 μL、cDNA 0.5 μL、总体积 10.0 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 3 min 后,95 °C 变性 10 s,58 °C 退火 30 s,共 45 个循环。计算的周期阈值(cycle threshold, Ct),根据相对定量 2^{-ΔΔCt} 法计算 SLE 组和对照组静脉血 BCMA mRNA 的差异。

1.7 流式细胞术检测 将两组标本在 Ficoll 细胞分离液的作

用下离心(离心半径 9 cm,2 000 r/min 离心 20 min),收集单个核细胞,用 1% PBS 洗涤。将 CD138-PE、CD38-FITC、CD19-FITC、CD45-PC5、IgG1-PE/IgG1-FITC/IgG1-PC5 荧光抗体标记的单个核细胞分为 3 组:(1) CD38-FITC、CD138-PE 及 CD45-PC5 标记细胞组;(2) CD19-FITC、CD138-PE 及 CD45-PC5 标记细胞组;(3) IgG1-PE/IgG1-FITC/IgG1-PC5 及 CD45-PC5 标记细胞组。3 组细胞均孵育 1~2 h 后上机检测。

1.8 统计学处理 应用 SPSS12.0 软件进行统计学处理,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ELISA 检测分析 SLE 组患者血清 BCMA 水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 SLE 患者与健康者血清 BCMA 水平的比较

组别	n	BCMA (ng/mL)
对照组	30	54.55 ± 13.03
SLE 组	40	360.00 ± 20.19*

*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 荧光定量 RT-PCR 分析 经 45 次循环,荧光定量 RT-PCR 反应曲线见图 1。SLE 组患者的 ΔCt 值明显高于对照组的 ΔCt 值,差异有统计学意义($P < 0.05$),SLE 组 $\overline{\Delta Ct}$ 为 0.811,对照组 $\overline{\Delta Ct}$ 为 1.716。经 2^{-ΔΔCt} 法计算($-\Delta\Delta Ct = SLE \text{ 组 } \overline{\Delta Ct} - \text{ 对照组 } \overline{\Delta Ct}$),SLE 组患者 BCMA 基因的含量是对照组的 1.873 倍,见图 2。

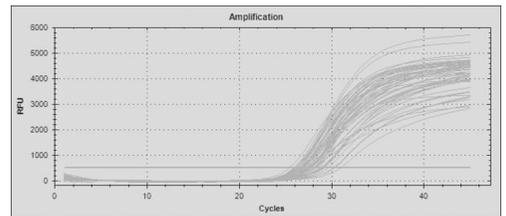


图 1 荧光定量 RT-PCR 反应曲线

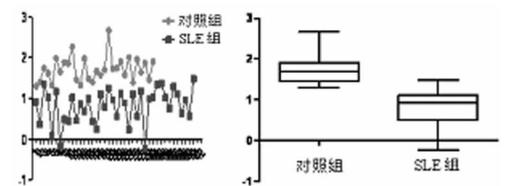


图 2 SLE 组和对照组的 ΔCt 分布情况和 $\overline{\Delta Ct}$ 值

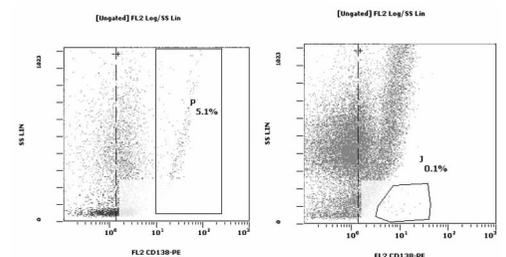


图 3 SLE 组(左)和对照组(右)患者的流式细胞术检测结果

2.3 流式细胞术分析 流式细胞技术检测结果显示,SLE 组

患者静脉血浆细胞数量明显高于对照组,见图 3。

3 讨 论

BCMA 为 B 细胞表面分子,是由 184 个氨基酸残基组成的非糖基化单链 I 型蛋白,属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族,是 I 型跨膜受体^[2]。BCMA 表达于 B 细胞的生发中心^[3]、成熟 B 细胞^[4-5]以及成熟浆细胞表面^[1,6]。B 细胞激活因子(B cell activating factor, BAFF)是 B 细胞产生、发育和自身反应所必需^[7-9]。BCMA 可与 BAFF 配体相结合,其可能机制是 BCMA 与 BAFF 蛋白结合,使抗凋亡基因 *Bcl-2*、*Mcl-1* 的表达上调,维持浆细胞生长,成为长寿浆细胞,从而增加成熟浆细胞的数量及其抗体的分泌^[9]。在自身免疫疾病患者,尤其是 SLE 患者体内可检测出高水平的 BAFF^[10-11],因此,在维持浆细胞的存活中 BCMA 发挥了重要的作用。BCMA 基因位于 16p13, mRNA 全长约 1.2 kb^[12]。人类浆细胞、生发中心 B 淋巴细胞^[3]以及小鼠浆细胞的 BCMA 表达明显升高,其缺失会缩短骨髓长寿浆细胞生存时间^[1]。分析 B 细胞发育过程的基因表达谱,发现 BCMA 随着 B 细胞的发育成熟而出现,其表达量逐渐增加,且只表达于成熟 B 淋巴细胞及浆细胞,为维持浆细胞存活所必需,在 B 细胞发育的时空性上具有一致性^[13]。BCMA 虽在生发中心 B 细胞中表达,但它对外周 B 细胞的数量、各种外周 B 细胞亚型的分布以及 B 细胞的寿命没有明显影响,在成熟 B 细胞分化到浆细胞阶段,其 BCMA 表达较多,BCMA 可能与调控浆细胞存活及抗体分泌功能有关。浆细胞是致病性自身抗体的直接来源,40% 自身抗体分泌性浆细胞是长寿命的,长寿浆细胞产生的自身抗体可反复激活潜在的病理免疫应答反应^[14]。BCMA 基因剔除小鼠有正常的脾结构, B 细胞发育正常, T 细胞非依赖性免疫反应和 T 细胞依赖性免疫反应未见明显异常,但浆细胞数量明显减少,这又证明 BCMA 在维持浆细胞存活中的重要性^[1]。

CD138⁺ 能特异性地标记成熟浆细胞,本研究利用这一特征对 SLE 组和对照组静脉血的单个核细胞进行流式细胞术分析,比较两组 CD138⁺ 浆细胞数量的差异。本研究将荧光定量 RT-PCR 技术、流式细胞术及 ELISA 结合,研究维持浆细胞存活的重要因子 BCMA。其结果显示 SLE 组血清 BCMA 明显高于对照组, SLE 组体内 BCMA 基因表达的相对量是对照组的 1.873 倍,且流式细胞术显示 SLE 组患者静脉血 CD138⁺ 浆细胞的数量也明显高于对照组,提示在 SLE 患者体内 BCMA 基因高表达, SLE 患者体内浆细胞数量的增加与 BCMA 高表达相关,这为进一步了解 SLE 发病机制提供了新的线索,为 SLE 治疗提供了新的方向和靶点。

参考文献:

[1] O'connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells[J]. J Exp Med, 2004, 199(1): 91-98.
 [2] Lofton-Day C, Moore M, Littau A, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-

cell autoimmune disease[J]. Nature, 2000, 404(6781): 995-999.
 [3] Ng LG, Sutherland AP, Newton R, et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells[J]. J Immunol, 2004, 173(2): 807-817.
 [4] Gras MP, Laâbi Y, Linares-Cruz G, et al. BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes[J]. Int Immunol, 1995, 7(7): 1093-1106.
 [5] Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, et al. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population[J]. J Exp Med, 2000, 192(1): 129-135.
 [6] Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells[J]. J Clin Invest, 2003, 112(2): 286-297.
 [7] Mackay F, Schneider P, Rennert P, et al. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival[J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 231-264.
 [8] Mackay F, Silveira PA, Brink R. B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(3): 327-336.
 [9] Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, et al. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL[J]. J Immunol, 2008, 180(6): 3655-3659.
 [10] Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(6): 1313-1319.
 [11] Zhang J, Roschke V, Baker KP, et al. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2001, 166(1): 6-10.
 [12] Shu HB, Johnson H. B cell maturation protein is a receptor for the tumor necrosis factor family member TALL-1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(16): 9156-9161.
 [13] Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 230-242.
 [14] Levesque MC, St Clair EW. B cell-directed therapies for autoimmune disease and correlates of disease response and relapse[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(1): 13-21.