

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.12.004

ZBTB20 在 SLE 患者外周血 B 细胞中的表达和临床意义*

裴露¹, 王婷婷², 朱峰², 胡文坛², 刘红春^{2△}

(1. 河南中医药大学第二附属医院检验科, 郑州 450002;

2. 郑州大学第一附属医院检验科, 郑州 450003)

[摘要] **目的** 研究锌指和 BTB 结构域蛋白 20(ZBTB20)在系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 B 细胞中的表达,并探讨 ZBTB20 在 SLE 中的临床意义。**方法** 采用 RT-PCR 技术检测 36 例 SLE 患者(SLE 组)和 30 例健康对照者(对照组)外周血 CD19⁺B 细胞中 ZBTB20 mRNA 的表达水平;Western blot 检测分析外周血 ZBTB20 蛋白水平;流式细胞术检测 B 细胞亚群所占比例。分析 SLE 患者 B 细胞中 ZBTB20 mRNA 的表达与 B 细胞亚群比例变化的关系及与临床指标(抗 ds-DNA 抗体、抗核抗体、免疫球蛋白 IgG、抗 ENA 抗体)的相关性。**结果** SLE 组外周血 CD19⁺B 细胞中 ZBTB20 mRNA 的表达明显高于对照组($P<0.05$);SLE 组患者外周血 ZBTB20 蛋白水平高于对照组($P<0.05$)。与对照组相比,SLE 患者外周血 B 细胞亚群,CD19⁺B 细胞比例降低($P<0.05$),CD19⁻CD138⁺浆细胞/CD19⁺B 细胞之间的比值及 CD19⁻CD138⁺浆细胞比例明显增高($P<0.05$);SLE 患者 B 细胞中 ZBTB20 mRNA 的表达水平与 CD19⁻CD138⁺浆细胞/CD19⁺B 细胞的比值呈正相关($P<0.05$);ZBTB20 mRNA 与抗 ds-DNA 抗体、免疫球蛋白 IgG、抗核抗体、抗 ENA 抗体均呈正相关($P<0.05$)。**结论** ZBTB20 可能通过促进 B 细胞分化从而参与 SLE 发病。

[关键词] 红斑狼疮,系统性;ZBTB20;锌指蛋白;B 细胞**[中图法分类号]** R593.241**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)12-1580-03

Expression of zinc finger protein ZBTB20 in peripheral blood B cells in patients with SLE and its clinical significance*

PEI Lu¹, WANG Tingting², ZHU Feng², HU Wentan², LIU Hongchun^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450003, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of zinc finger and BTB domain containing 20 (ZBTB20) in peripheral blood B cells of the patients with systemic lupus erythematosus (SLE), and to investigate its clinical significance in SLE. **Methods** The ZBTB20 mRNA expression level in peripheral blood CD19⁺B cells of 36 cases of SLE (SLE group) and 30 healthy controls (control group) was detected by RT-PCR. The ZBTB20 protein level was detected by western blot; the proportion of B cell subset was measured by flow cytometry. Then the relationship between the ZBTB20 mRNA expression with B cells subset proportion change and its correlation with clinical indicators [anti-dsDNA antibody, immunoglobulin G (IgG), anti-nucleosome antibody (ANA) and anti-extractable nuclear antigen (ENA) antibody] in SLE patients were analyzed. **Results**

The expression level of ZBTB20 mRNA in peripheral blood CD19⁺B cells of the SLE group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). The peripheral blood ZBTB20 protein level was higher than that of the control group ($P<0.05$); the peripheral blood B cells subsets and CD19⁺B cells proportion in the SLE patients were decreased, while the CD19⁻CD138⁺ plasmocytes/CD19⁺B cells ratio and CD19⁻CD138⁺ plasmocytes proportion were significantly increased ($P<0.05$). The expression level of ZBTB20 mRNA in B cells of SLE patients was positively correlated with the ratio of CD19⁻CD138⁺ plasmocytes/CD19⁺B cells ($P<0.05$). The expression of ZBTB20 mRNA was positively correlated with anti-ds-DNA antibody, ANA and anti-ENA antibody ($P<0.05$). **Conclusion** ZBTB20 might participate in the pathogenesis of SLE possibly via promoting B cells differentiation.

[Key words] lupus erythematosus, systemic; ZBTB20; zinc finger protein; B cells

* 基金项目:河南省科技攻关基金资助项目(172102310028);河南省教育厅重点科技攻关项目(18A320007);河南省卫计委医学科技攻关普通项目(201602042)。 作者简介:裴露(1990-),检验技师,在读硕士,主要从事自身免疫性疾病治疗方面研究。 △ 通信作者, E-mail: xingyunerliu@163.com。

系统性红斑狼疮(SLE)是一种因 B 细胞异常活化, T 细胞激活机制异常, 机体对免疫复合物清除障碍并累及全身多器官多系统的慢性自身免疫性疾病^[1-2]。目前 SLE 的发病机制尚不明确, 一般认为其机制是由遗传、自身免疫等诸多因素共同作用, 使机体免疫系统功能发生紊乱而引起机体发病。有研究表明 SLE 中由 B 细胞异常分化的浆细胞对自身抗原具有特异性和高亲和力, 并且可以产生大量的抗体而导致 SLE 的发病^[3-4]。锌指和 BTB 结构域蛋白 20 (ZBTB20), 也称为 HOF、DPZF 和 Zfp288, 与 Bcl6 同源, 是一种广泛的锌指复合体^[5]。同时 ZBTB20 也参与细胞功能, 包括细胞转录、增殖及肿瘤的发生^[6-7]。近年有研究表明, ZBTB20 是淋巴细胞分化重要的转录因子, 通过调控免疫细胞相关增殖、分化通路参与到免疫反应中, 可诱导异常的体液免疫反应, 尤其是 B 细胞过度活化引起的自身免疫性疾病的发病。ZBTB20 依赖干扰素调节因子-4 (IRF4) 启动 B 细胞分化为浆细胞, 促进其生发中心反应, 维持浆细胞的寿命并且分泌免疫球蛋白^[8]。因此, ZBTB20 在 SLE 的发病机制中起了至关重要的作用, 与 B 细胞过度活化分化为浆细胞并且持续分泌自身抗体相关。该研究主要通过检测 ZBTB20 在 SLE 外周血 CD19⁺ B 细胞中的表达及与浆细胞的相关性, 初步探讨 ZBTB20 与 SLE 发病的相关性及可能参与的发病机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究对象 从郑州大学第一附属医院风湿免疫科 2016 年 8 月至 2017 年 2 月的住院患者中选取 36 例初次确诊 SLE 的患者为 SLE 组, 其中男 2 例, 女 34 例, 年龄 19~48 岁, 平均(31±7)岁。患者均符合 2009 年美国风湿病学会 (ACR) 制订的 SLE 诊断标准, 排除患有感染, 肿瘤及其他自身免疫性疾病的患者。对照组为 30 例健康体检者, 其中男 4 例, 女 26 例, 年龄 24~50 岁, 平均(35±6)岁。两组在性别及年龄方面的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。所有对象签署知情同意书, 研究经本院伦理委员会批准。

1.1.2 试剂与材料 人外周血淋巴细胞分离液 (天津市灏洋生物制品科技有限公司); 磁珠分选柱、CD19 磁珠 (德国美天旎公司); FITC 标记的抗人 CD138 抗体 (美国 BD 公司, 批号: 347193, 1:100 稀释); PerCPCY5.5 标记的鼠抗人 CD19 抗体 (美国 eBioscience 公司); TRIzol 试剂和反转录试剂盒 (日本 Takara 公司); PCR 试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司); PCR 引物 (上海生工生物工程有限公司), ZBTB20 引物上游序列: 5'-CCGCAGACAAACCAGCTAGA-3', 下游序列: 5'-AAGGCTGTTGTAGGACGCTC-3'。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 引物上游序列: 5'-AGAAGGCTGGGCTCATTTG-3', 下游序列: 5'-

AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。

1.2 方法

1.2.1 分离外周血单个核细胞 (PBMCs) 清晨空腹抽取 SLE 组及对照组肘静脉血 10 mL, 经乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝, 保存于 4 °C, 采集后 2 h 内处理标本, 用 Ficoll 梯度密度离心法分离 PBMCs, 分别用于磁珠分选提取 CD19⁺ B 细胞和流式细胞检测 B 细胞亚群。

1.2.2 RT-PCR 检测 ZBTB20 的表达 TRIZOL 法提取磁珠分选的 CD19⁺ B 细胞总 RNA, Oligo-dT 逆转录为 cDNA, 之后冻存于 -80 °C 冰箱以备用。管家基因 GAPDH 为内参, 之后放入 PCR 仪中进行扩增。反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 进行 1 个循环; 变性 95 °C 10 s, 60 °C 退火延伸 45 s, 40 个循环; 65~95 °C 绘制溶解曲线。采用双标准曲线法计算基因相对表达量。

1.2.3 Western blot 分析外周血 ZBTB20 蛋白水平 用红细胞裂解液提取 PMBCs, 然后提取细胞总蛋白, 检测外周血 ZBTB20 蛋白的表达。

1.2.4 荧光标记人外周血 PBMC 及流式细胞术检测 用 400 μL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬 PBMCs, 设置空白对照、CD19⁻ PerCPCY5.5 2 μL 单标、CD138-FITC 4 μL 和 CD138-FITC 4 μL + CD19⁻ PerCPCY5.5 2 μL 双标样本管, 轻轻混匀后, 置 4 °C 避光孵育 30 min; 各管加入 2 mL PBS 后混匀; 1 000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 弃上清液; 重复加入 PBS 2 mL 混匀, 再以 1 000 r/min, 4 °C, 离心 5 min; 各个管中加固定液 200 μL, 混匀后, 4 °C 避光 1~2 h 后上机检测。使用美国 BD 公司的 FACS caliber 流式细胞仪检测各管 CD19⁻ CD138⁺ 浆细胞/CD19⁺ B 细胞比例, FlowJo 软件进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 和 GraphPad Prism 5 软件进行分析, 符合正态的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数的比较采用 *t* 检验; 非正态分布, 方差不齐的计量资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

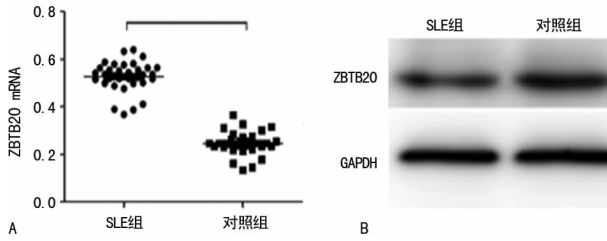
2 结果

2.1 外周血 CD19⁺ B 细胞 ZBTB20 mRNA 和外周血 ZBTB20 蛋白表达 SLE 组 ZBTB20 mRNA 的表达水平 (0.527±0.181) 明显高于对照组 (0.246±0.145), 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 1A。SLE 组 ZBTB20 蛋白的表达水平高于对照组 ($P<0.05$), 见图 1B。

2.2 SLE 组 B 细胞亚群的比例 与对照组比, SLE 组 CD19⁺ B 细胞比例降低, CD19⁻ CD138⁺ 浆细胞比例及 CD19⁻ CD138⁺ 浆细胞/CD19⁺ B 细胞比值明显增高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见表 1、图 2。

2.3 CD19⁺ B 细胞中 ZBTB20 mRNA 表达水平与 B 细胞亚群的相关性分析 SLE 患者中 ZBTB20 mRNA

NA 表达水平与 CD19⁻CD138⁺浆细胞比例呈明显正相关($r=0.165, P=0.028$),与 CD19⁻CD138⁺浆细胞/CD19⁺B 细胞的比值也呈正相关($r=0.225, P=0.021$);与对照组无相关性($r=-1.45, P=0.32$),见图 3。



A: 两组外周血 CD19⁺B 细胞中 ZBTB20 mRNA 表达, B: 两组 ZBTB20 蛋白水平

图 1 两组 ZBTB20 表达水平

表 1 SLE 组 B 淋巴细胞亚群之间的比较[M(P₂₅, P₇₅)]

组别	n	CD19 ⁺ B 细胞	CD19 ⁻ CD138 ⁺ 浆细胞	CD19 ⁺ B 细胞/ CD19 ⁻ CD138 ⁺ 浆细胞
SLE 组	36	4.85(2.53, 5.97)	0.38(0.25, 0.56)	0.09(0.05, 0.15)
对照组	30	6.42(4.11, 7.85)	0.17(0.08, 0.31)	0.03(0.01, 0.04)

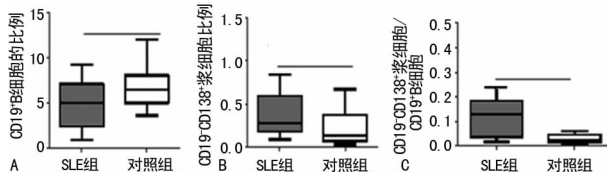


图 2 SLE 组和对照组外周血 B 细胞比例(A)、浆细胞比例(B)、浆细胞/B 细胞(C)比值

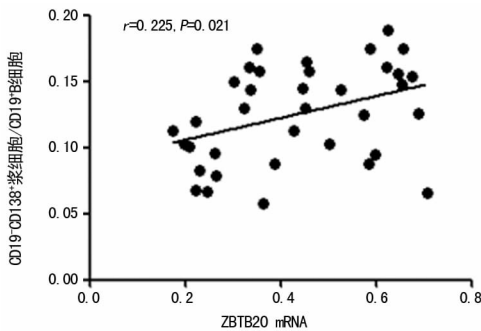


图 3 ZBTB20 mRNA 与 CD19⁻CD138⁺浆细胞/CD19⁺B 细胞比值的相关性分析

2.4 SLE 组 ZBTB20 mRNA 表达与临床指标的相关性 SLE 组 ZBTB20 mRNA 的表达与 SLE 活动期指标均呈明显正相关($P<0.05$),见表 2。

表 2 SLE 组 ZBTB20 表达水平与实验室指标的相关性

项目	r	P
抗 ds-DNA 抗体	0.415	0.007
免疫球蛋白 IgG	0.507	0.005
抗核抗体	0.132	0.015
抗 ENA 抗体	0.121	0.023

3 讨论

ZBTB20 最早是在人树突状细胞中发现的锌指蛋白家族的新成员,因具有 BTB/POZ 结构域和 5 个 C₂H₂ 锌指结构域得名^[9]。近年来,有研究发现 ZBTB20 可通过调控免疫细胞从而参与机体的免疫反应,参与调控的关键就是可以促进 B 细胞分化为浆细胞,维持一部分浆细胞的寿命并分泌抗体,在这个调控过程中可能是由于存在 IRF4-ZBTB20-Blimp1 调节通路从而发挥了重要的作用^[10]。韩国研究者 LEE 等^[11]对 1 596 例 SLE 患者和 2 640 例健康者进行了全基因组关联性研究,从中筛选出 16 个 SLE 新易感基因,ZBTB20 就是其中之一。ELMANN 等^[12]通过对 SLE 模型鼠脾细胞提取总的 RNA 进行检测,患病小鼠 ZBTB20 mRNA 的表达与未患病小鼠相比上调 1.9 倍,RT-PCR 实验进一步证实了微阵列的实验结果。ELMANN 认为,ZBTB20 mRNA 表达明显增加,可能与促进肾组织形成免疫复合物沉淀有关。上述研究结果提示 ZBTB20 在 SLE 发病机制中可能起到了关键作用。本研究结果显示,SLE 组患者外周血 B 细胞中 ZBTB20 mRNA 的表达明显高于对照组,提示 ZBTB20 可能参与 SLE 发病。

ZBTB20 在多种免疫细胞中表达,包括树突状细胞、单核细胞、淋巴细胞等,参与机体获得性免疫和固有免疫^[13]。ZBTB20 通过正向调控 Toll 样受体(TLR),介导核因子 kappa B(NF-κB)激活,参与固有免疫反应^[14-15]。ZBTB20 在生发中心成熟的 B 细胞中表达,随 B 细胞分化成熟 ZBTB20 的表达也逐渐增加,然后依赖干扰素调节因子 4(IRF-4)促进 B 细胞分化为浆细胞,同时也与 B 细胞分化的关键转录因子 B 淋巴细胞成熟蛋白 1(Blimp-1)存在着某种调节作用。本研究显示,SLE 患者外周血 CD19⁺B 细胞比例明显降低,表明 B 细胞过度激活分化为浆细胞是 SLE 发病最主要的免疫学特征之一。并且 SLE 患者 ZBTB20 mRNA 的表达与 CD19⁻CD138⁺浆细胞比例、CD19⁻CD138⁺浆细胞/CD19⁺B 细胞比值均呈正相关,说明 ZBTB20 可能通过参与 B 细胞异常分化而参与 SLE 发病机制。

综上所述,ZBTB20 在 SLE 患者体内的表达水平增加,这与 B 细胞异常分化为浆细胞且分泌的自身抗体有关,提示 ZBTB20 可能通过调节 B 细胞异常分化参与到 SLE 发病机制中,这也为以后研究提供了新思路。

参考文献

[1] RAHMAN A, ISENBERG D A. Systemic lupus erythematosus[J]. N Engl J Med, 2008, 358(9): 929-939.
 [2] RAPOPORT M, BLOCH O. Systemic lupus erythematosus[J]. N Engl J Med, 2012, 366(6): 574.
 [3] TSOKOS G C. Systemic lupus erythematosus[J]. N Engl J Med, 2011, 365(22): 2110-2121. (下转第 1588 页)

- [8] HERRMANN J L, ABARBANELL A M, WEIL B R, et al. Postinfarct intramyocardial injection of mesenchymal stem cells pretreated with TGF- α improves acute myocardial function[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 299(1):R371-378.
- [9] SITTICHOKECHAIWUT A, EDWARDS J H, SCUTT A M, et al. Short bouts of mechanical loading are as effective as dexamethasone at inducing matrix production by human bone marrow mesenchymal stem cell[J]. *Eur Cell Mater*, 2010(20):45-57.
- [10] KIKUCHI H, YAGI H, HASEGAWA H, et al. Therapeutic potential of transgenic mesenchymal stem cells engineered to mediate anti-high mobility group box 1 activity: targeting of colon cancer[J]. *J Surg Res*, 2014, 190(1):134-143.
- [11] VOGEL S, CHATTERJEE M, METZGER K, et al. Activated platelets interfere with recruitment of mesenchymal stem cells to apoptotic cardiac cells via high mobility group box 1/Toll-like receptor 4-mediated down-regulation of hepatocyte growth factor receptor MET[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(16):11068-11082.
- [12] LIN Y, CHEN L, LI W, et al. Role of high-mobility group box-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury and the effect of ethyl pyruvate[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4):1537-1541.
- [13] XU H, WANDERSEE N J, GUO Y, et al. Sick cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation[J]. *Blood*, 2014, 124(26):3978-3981.
- [14] 王晓武, 张卫达, 罗林, 等. 大鼠心肌梗死后心肌高迁移率族蛋白 1 的时程变化[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(9):1688-1690.
- [15] WANG J, HU X, XIE J, et al. Beta-1-adrenergic receptors mediate Nrf2-HO-1-HMGB-1 axis regulation to attenuate hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes injury in vitro[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(2):767-777.
- [16] WANG J, YANG H, HU X, et al. Dobutamine-mediated heme oxygenase-1 induction via PI3K and p38 MAPK inhibits high mobility group box 1 protein release and attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo[J]. *J Surg Res*, 2013, 183(2):509-516.
- [17] KWAK M S, LIM M, LEE Y J, et al. HMGB-1 binds to lipoteichoic acid and enhances TNF- α and IL-6 production through HMGB-1-mediated transfer of lipoteichoic acid to CD14 and TLR2[J]. *J Innate Immun*, 2015, 7(4):405-416.
- [18] YAO H C, ZHOU M, ZHOU Y H, et al. Intravenous high mobility group box 1 upregulates the expression of HIF-1 α in the myocardium via a protein kinase B-dependent pathway in rats following acute myocardial ischemia[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2):1211-1219.

(收稿日期:2017-09-18 修回日期:2017-12-10)

(上接第 1582 页)

- [4] CHONG B F, MOHAN C. Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in systemic lupus erythematosus[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(10):1147-1153.
- [5] ALBAGLI O. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins[J]. *Cell Growth Differ*, 1995, 6(9):1193-1198.
- [6] LEE S U, MAEDA T. POK/ZBTB proteins: an emerging family of proteins that regulate lymphoid development and function[J]. *Immunol Rev*, 2012, 247(1):107-119.
- [7] KAN H. Zinc finger protein ZBTB20 is an independent prognostic marker and promotes tumor growth of human hepatocellular carcinoma by repressing FoxO1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12):14336-14349.
- [8] CHEVRIER S. The BTB-ZF transcription factor Zbtb20 is driven by Irf4 to promote plasma cell differentiation and longevity[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(5):827-840.
- [9] STOGIOS P J. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins[J]. *Genome Biol*, 2005, 6(10):R82.
- [10] WANG Y. Adjuvant-specific regulation of long-term antibody responses by ZBTB20[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(5):841-856.
- [11] LEE H S. Ethnic specificity of lupus-associated loci identified in a genome-wide association study in Korean women[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6):1240-1245.
- [12] ELMANN A. Altered gene expression in mice with lupus treated with edratide, a peptide that ameliorates the disease manifestations[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(7):2371-2381.
- [13] ZHANG W. Identification and characterization of DPZF, a novel human BTB/POZ zinc finger protein sharing homology to BCL-6[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(4):1067-1073.
- [14] WANG Q. Zinc finger protein ZBTB20 expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis[J]. *BMC Cancer*, 2011(11):271.
- [15] GU S, RAN S, QIN F, et al. Human dental pulp stem cells via the NF- κ B pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(5):1725-1734.

(收稿日期:2017-09-14 修回日期:2017-12-25)