

## 4-1BBL/4-1BB 信号对系统性红斑狼疮患者 外周血淋巴细胞活化的影响

高元元<sup>1</sup> 吴俊英<sup>1,2</sup> 李柏青<sup>2</sup> 王 慧<sup>1</sup> 梁友宝<sup>2</sup> 梁 华<sup>2</sup>

**[摘要]**目的:探讨 4-1BBL/4-1BB 信号对系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血淋巴细胞活化及共刺激分子表达的影响。方法:用 CD3 单抗刺激 SLE 患者外周血单个核细胞,并用抗 4-1BBL 单抗阻断 4-1BBL/4-1BB 共刺激信号,流式细胞术检测阻断前后 T、B 细胞上 4-1BB、CD40L、4-1BBL、CD40 以及 CD69 表达水平。结果:SLE 患者 T 细胞上 CD69 表达明显高于正常对照组( $P < 0.01$ );SLE 患者外周血 T 细胞上 4-1BB、CD40L 和 B 细胞上 4-1BBL、CD40 表达明显高于正常对照组( $P < 0.01$ ),活化后 T 细胞上共刺激分子表达升高更加明显( $P < 0.01$ );抗 4-1BBL 单抗阻断后 4-1BB、CD40L 表达明显下降( $P < 0.01$ ),B 细胞上 CD40 表达下降,与 SLE 未活化组和活化组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:SLE 患者外周血 T、B 细胞活化水平升高,4-1BBL/4-1BB 信号对其活化状态维持可以起重要作用。

**[关键词]** 红斑狼疮,系统性;4-1BB;CD40L;CD69

**[中国图书资料分类法分类号]** R 593.24 **[文献标识码]** A

### The effect of costimulatory signal 4-1 BBL/4-1 BB on the activation of peripheral blood lymphocytes with systemic lupus erythematosus

GAO Yuan-yuan<sup>1</sup>, WU Jun-ying<sup>1,2</sup>, LI Bai-qing<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, LIANG You-bao<sup>2</sup>, LIANG Hua<sup>2</sup>

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science;

2. Department of Immunology Bengbu Medical College Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of costimulatory signal 4-1BBL/4-1BB in the activation of the T lymphocytes and the expression of costimulatory molecule of patients with (SLE). **Methods:** The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated with anti-CD3 and the costimulatory signal of 4-1BBL/4-1BB was blocked by anti-4-1BBL. The expressions of 4-1BB, CD40L, 4-1BBL, CD40 and CD69 of T cell and B cell before blocked and after blocked by anti-4-1BBL were detected by flow cytometry. **Results:** The expression of CD69 on T cells of SLE patients showed significant difference ( $P < 0.01$ ) with healthy controls. The expressions of 4-1BB, CD40L, 4-1BBL and CD40 on the lymphocytes of SLE patients were significantly higher than that of normal control ( $P < 0.01$ ). There were obviously increased expression of 4-1BB and CD40L on the T lymphocytes stimulated by anti-CD3 antibody in SLE patients than healthy controls ( $P < 0.01$ ). With the anti-4-1BBL monoantibody blocked, there were decreased expression of 4-1BB, CD40L ( $P < 0.01$ ). The expression of CD40 on B cell was significantly decreased, which is less than SLE unstimulated group and SLE stimulated group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** T cell and B cell activation level of SLE patients were increased and 4-1BBL/4-1BB signals play a role in keeping the activation.

**[Key words]** lupus erythematosus, systemic; 4-1BB; CD40L; CD69

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种复杂的多基因自身免疫性疾病,发病缓慢,常隐袭发生,主要侵袭育龄期女性,临床表现多样且变化多端,常累及机体的皮肤、浆膜、关节、肾小球及中枢神经等多个器官系统。在疾病发生过程中,机体的细胞免疫和体液免疫功能异常,多种自身

抗体(如抗核抗体、抗 DNA 抗体、抗 Sm 抗体、抗血细胞抗体等)的产生可能是导致 SLE 病理性损害的关键原因,但其具体的机制尚不十分清楚<sup>[1]</sup>。近年有研究<sup>[2-5]</sup>报道,共刺激分子在 SLE 的发生发展中起着重要作用,SLE 患者 T 细胞表面 CD28 表达下调,但 4-1BB 表达显著增强,提示 4-1BB 可能为其 T 细胞活化提供重要的共刺激信号,影响着 SLE 的发生发展。本文利用抗 4-1BBL 单抗阻断 4-1BBL/4-1BB 信号通路,观察阻断前后 SLE 患者外周血 T、B 细胞的活化情况以及共刺激分子的表达水平,探讨 4-1BBL/4-1BB 信号系统在 SLE 发病中的作用。

**[收稿日期]** 2010-11-26

**[作者单位]** 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心 2. 免疫学教研室 安徽 蚌埠 233030

**[作者简介]** 高元元(1983-),女,硕士研究生,检验师。

**[通讯作者]** 吴俊英,硕士研究生导师,教授。Email: jywu8191@126.com

com

## 1 材料与方法

1.1 病例选择 选择2010年4~7月在蚌埠医学院第一附属医院风湿免疫科住院的SLE患者22例(SLE组),诊断均符合1982年美国风湿病学会SLE分类标准,并除外其他全身性疾病和感染性疾病。其中男5例,女17例;年龄12~70岁。正常对照组为健康体检者,男6名,女16名;年龄22~38岁。2组在年龄、性别构成等方面具可比性。

1.2 主要试剂和仪器 淋巴细胞分离液(中国医学科学院生物医学研究所);胎牛血清(杭州四季青公司);RPMI 1640培养基(GIBCO公司);抗人CD3单克隆抗体、rhIL-2(李柏青博士惠赠);鼠抗人4-1BBL单抗、CD137L-PE(美国BD公司);CD3-FITC(天津协科),CD19-FITC(Ancell公司),CD137-PE、CD40-PE、CD40L-PE(均为eBioscience公司),CD69-PE(Invitrogen公司),同型对mIgG2-PE(Invitrogen公司);流式细胞仪Calibur(美国BD公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞(PBMC)的分离和刺激 分别抽取SLE组患者、正常对照组晨起空腹静脉血10 ml于肝素抗凝管中,常规密度梯度离心法分离获取PBMC,调整细胞密度为 $1.5 \times 10^6$ 个/ml备用。用抗CD3单抗刺激T细胞活化,并按以下分组实验:(1)实验孔1,加入SLE组患者PBMC悬液1 ml;(2)实验孔2,加入SLE组患者PBMC悬液1 ml,抗CD3单抗(终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ )和rhIL-2(终浓度 $50 \text{ u/ml}$ );(3)实验孔3,SLE组患者PBMC悬液1 ml,抗CD3单抗(终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ )和rhIL-2(终浓度 $50 \text{ u/ml}$ ),再加入抗4-1BBL单抗(终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ );同时设置正常对照组。将上述各实验组置 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 和95%湿度条件下孵育12 h,加入刺激物及收集细胞前均以锥虫蓝拒染法检测细胞活力,活细胞达到95%以上。

1.3.2 流式细胞术检测T细胞上CD69表达 收集上述各组细胞悬液于离心管中,加入等体积预冷的PBS混匀, $1500 \text{ r/min}$ 离心5 min,弃上清,用PBS重悬细胞,调整密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml,分别取 $30 \mu\text{l}$ 细胞悬液加入流式管中,再分别加入荧光标记的鼠抗人单克隆抗体CD3-FITC/CD69-PE,阴性对照加入相同荧光标记的同种型免疫球蛋白 $A^\circ\text{C}$ 避光孵育30 min,孵育后的细胞悬液用1 ml PBS洗涤2次后每管再分别加入 $300 \mu\text{l}$  PBS重悬,用流式细胞仪检测,并用Cellquest软件分析T淋巴细胞表达

CD69的阳性细胞数。

### 1.3.3 流式细胞术检测T、B细胞共刺激分子表达

将上述培养细胞悬液收集于离心管中,加入等体积预冷PBS混匀, $1500 \text{ r/min}$ 离心5 min,弃上清,用PBS重悬细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml,分别取 $30 \mu\text{l}$ 细胞悬液加入流式管中,再分别加入荧光标记的鼠抗人单克隆抗体CD3-FITC/CD137-PE、CD19-FITC/CD137L-PE、CD3-FITC/CD40L-PE、CD19-FITC/CD40-PE,阴性对照加入相同荧光标记的同种型免疫球蛋白 $A^\circ\text{C}$ 避光孵育30 min,孵育后的细胞悬液用1 ml PBS洗涤2次后每管再分别加入 $400 \mu\text{l}$  PBS重悬,用流式细胞仪检测,并用Cellquest软件分析淋巴细胞表达共刺激分子的阳性细胞数。

1.4 统计学方法 采用方差分析、 $q$ 检验和相关分析。

## 2 结果

2.1 阻断4-1BBL/4-1BB信号对SLE组患者外周血T细胞活化的影响 SLE组患者外周血T细胞CD69表达明显高于正常对照组( $P < 0.01$ ),抗CD3单抗刺激活化后表达显著升高( $P < 0.01$ ),应用抗4-1BBL单抗阻断后T淋巴细胞上CD69的表达明显下降( $P < 0.01$ )(见表1)。

表1 SLE患者外周血T、B细胞CD69表达水平( $n_i = 22$ ;  $\bar{x} \pm s$ )

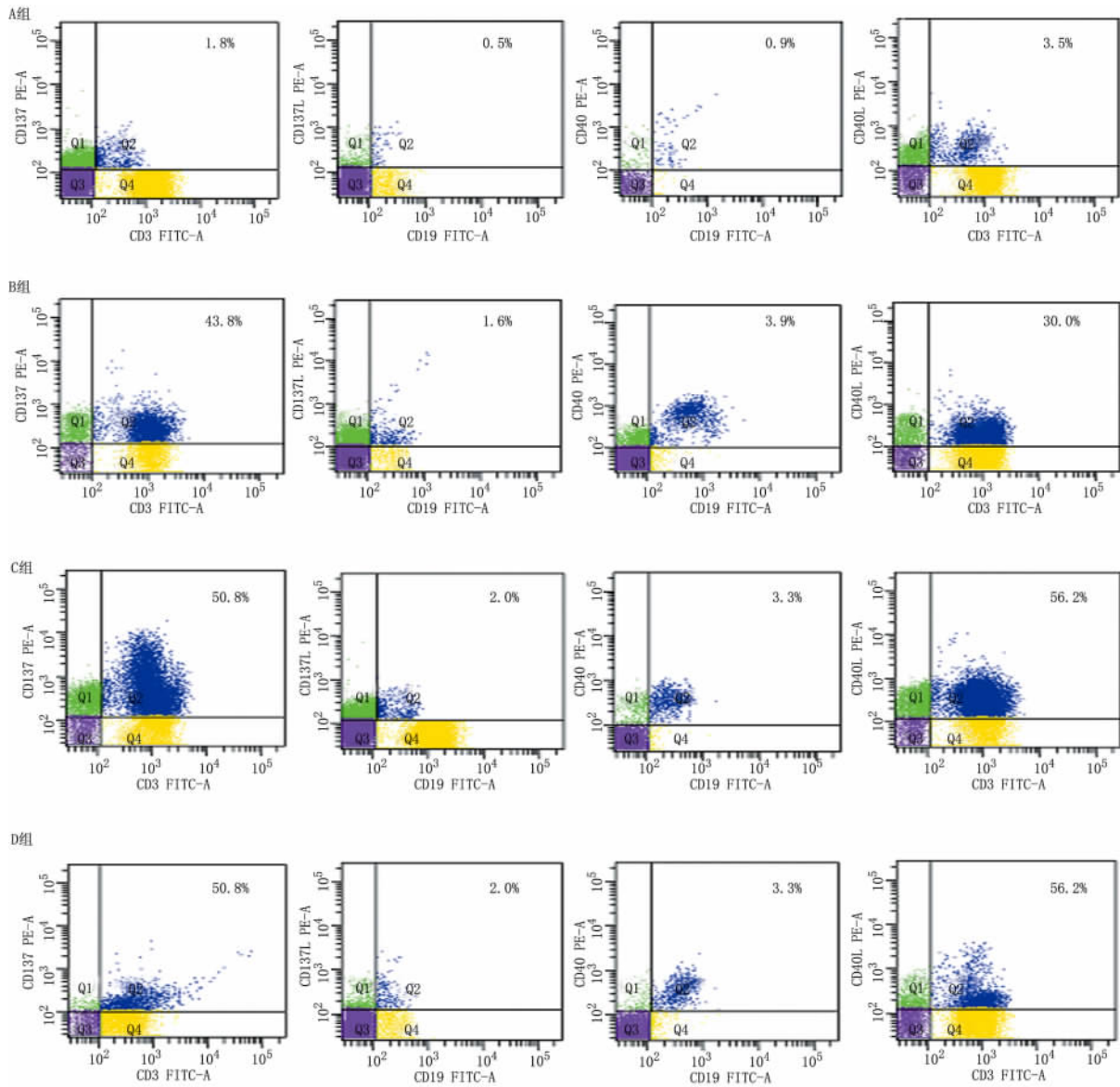
分组	CD69/CD3
正常对照组	$0.77 \pm 0.46$
SLE未活化组	$9.99 \pm 3.64^{**}$
SLE活化组	$34.40 \pm 19.27^{***\#\#}$
SLE阻断组	$16.28 \pm 7.05^{**\#\#\Delta}$
$F$	40.85
$P$	$< 0.01$
$MS_{\text{组内}}$	108.624

$q$ 检验:与正常对照组比较 $**P < 0.01$ ;与SLE未活化组比较, $\#P < 0.05$   $\#\#P < 0.01$ ;与SLE活化组比较 $\Delta P < 0.01$

2.2 阻断4-1BBL/4-1BB信号对SLE组患者外周血T、B细胞共刺激分子表达的影响 实验结果表明SLE组患者T、B淋巴细胞上4-1BB、CD40L、4-1BBL、CD40的表达明显高于正常对照组( $P < 0.05$ );抗CD3单抗刺激活化后T细胞上共刺激分子表达显著升高,与正常对照组、SLE未活化组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而B细胞上共刺激分子表达无明显变化( $P > 0.05$ );应用抗4-1BBL单抗阻断后T细胞上4-1BB、CD40L的表达明显下降,

与正常对照组、SLE 未活化组、SLE 活化组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，B 细胞上 CD40 表达下

降与 SLE 未活化组和活化组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见表 2、图 1)。



A组: 正常对照未刺激组; B组: SLE未刺激组; C组: SLE刺激组; D组: SLE阻断组

图 1 SLE患者各处理组与正常对照体外周血共刺激分子表达

表 2 SLE 患者 T 细胞 CD137、CD40L 和 B 细胞 CD137L、CD40 的表达水平 ( $n_i = 22; \bar{x} \pm s$ )

分组	CD137	CD137L	CD40	CD40L
正常对照组				
PBMC	0.99 ± 0.83	0.49 ± 0.38	0.76 ± 0.70	2.40 ± 2.54
SLE 组				
PBMC	21.88 ± 16.87**	3.43 ± 5.03*	3.56 ± 4.10*	23.84 ± 15.56**
PBMC + anti-CD3	35.13 ± 19.56***	3.33 ± 4.17*	3.83 ± 4.06**	36.20 ± 19.70***△
PBMC + anti-CD3 + anti-4-1BBL	9.18 ± 6.44*##△△	1.61 ± 2.70	1.52 ± 2.26#△	11.66 ± 10.86*##△△
F	27.70	3.55	5.17	25.18
P	<0.01	<0.05	<0.05	<0.01
MS <sub>组内</sub>	177.338	12.531	9.722	188.649

q 检验: 与正常对照组比较\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 SLE 组 PBMC 比较#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; 与 SLE 组 PBMC + anti-CD3 比较△  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.01$

2.3 SLE 患者外周血 T 细胞上 4-1BB 与 CD69 表达相关性分析 SLE 患者外周血经过 CD3mAb 刺激和 4-1BBL mAb 阻断后 4-1BB 的表达与 CD69 均呈正相关关系(见表 3)。

表 3 SLE 患者外周血 T 细胞 4-1BB 与 CD69 表达的相关性分析

SLE 组	<i>r</i>	<i>P</i>
PBMC	0.524	<0.01
PBMC + CD3mAb	0.498	<0.01
PBMC + CD3mAb + 4-1BBL mAb	0.663	<0.01

### 3 讨论

SLE 是一种复杂的多基因自身免疫性疾病,发病机制错综复杂,至今仍未明确,但众所周知,SLE 患者细胞免疫和体液免疫均出现紊乱,B 细胞过度活化产生大量自身抗体是其致病的主要因素。B 细胞的活化需要 T、B 细胞的相互作用,这一相互作用过程包括:(1) 外来抗原或自身成分变异产生抗原与 BCR 结合提供 B 细胞活化的第一信号;(2) B 细胞作为抗原提呈细胞(antigen presenting cell,APC)递呈抗原,为 T 细胞活化提供第一信号;(3) 活化 T 细胞表达的共刺激分子(如 CD40L)与 B 细胞表面相应分子(如 CD40)结合,为 B 细胞活化提供第二信号;(4) B 细胞表达的共同刺激分子(如 B7)与 T 细胞表面相应分子(如 CD28)结合,为 T 细胞活化提供第二信号。在上述作用过程中,T 细胞只有在活化后才能为 B 细胞提供第二信号<sup>[6-7]</sup>。因此,在 SLE 的发病机制中,B 细胞异常活化产生的多种自身抗体可能是引起病理损害的直接原因,而 T 细胞的活化则可能是 B 细胞活化的原动力。SLE 患者的 T 淋巴细胞功能紊乱及其共刺激分子的表达异常在疾病中发挥着重要作用,因而共刺激分子在参与 T 细胞活化及功能异常中的作用成为目前关注的焦点。有研究<sup>[8]</sup>报道 4-1BBL/4-1BB,CD40L/CD40 在许多细胞表面包括肿瘤细胞表面表达,与肿瘤与自身免疫性疾病的发生相关。

已有实验研究协同刺激分子 4-1BB 可能通过 p38MAPK 信号转导通路促使 SLE 患者 T 淋巴细胞的活化与增殖<sup>[9]</sup>。本实验通过抗 CD3 单抗刺激 SLE 患者 PBMC 活化,并且应用抗 4-1BBL 单抗阻断 4-1BBL/4-1BB 信号以观察该信号对 SLE 患者 T 淋巴细胞活化的影响。实验结果表明,阻断 4-1BBL/4-1BB 信号,T 细胞活化收到明显抑制,T 细胞早期

活化的标志 CD69 的表达也随之下降,同时 T 细胞上 4-1BB、CD40L 等共刺激分子的表达也显著下降,但是对 B 细胞上的 4-1BBL、CD40 分子的影响较小,原因并不十分清楚,可能与 B 细胞缺乏共同刺激信号刺激有关。用 IgM 抗体刺激 SLE 患者外周血 B 细胞,B 细胞上的 4-1BBL、CD40 分子可能会显著上升,相反若用抗 CD40L 单抗阻断 CD40/CD40L 信号,则会明显抑制 B 细胞的活化和自身抗体的产生。T、B 细胞相互作用,天然的调节性 T 细胞能够直接抑制产生自身抗体的自体反应性 B 细胞,进而抑制了 SLE 的自体免疫反应<sup>[10]</sup>,然而也有研究<sup>[11]</sup>表明,部分 B 细胞的高反应性并不依赖 T 细胞的辅助。所以 T、B 细胞的相互作用机制非常复杂,有待于进一步的探讨。

综上所述,鉴于研究发现的 SLE 致病机制,人们寻找出了一套治疗 SLE 的免疫疗法,目的都是抑制 T、B 细胞的活化,包括针对免疫细胞如 B 细胞的疗法,针对免疫分子如共刺激分子、细胞因子等的疗法,研究者通过细胞移植,静脉注射 Ig 人化的抗 CD40L 来治疗 SLE。还有研究<sup>[12]</sup>将抗 4-1BB 单抗注射 SLE 模型小鼠体内可以减轻 SLE 小鼠的症状,延长其寿命,这为抗 4-1BB 单抗治疗 SLE 提供了实验依据。这些免疫疗法与以往使用的皮质醇、乙酰唑胺、氨甲喋呤和环磷酰胺等药物疗法相比副作用较小,但 SLE 的治疗仍需要免疫抑制剂和免疫疗法双管齐下的综合治疗。

#### [参 考 文 献]

- [1] Crispin JC, Liossis SN, Kis-Toth K, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances [J]. Trends Mol Med 2010, 16(2): 47-57.
- [2] Choi BK, Kim YH, Kwon PM, et al. 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells [J]. J Immunol, 2009, 182(7): 4107-4115.
- [3] Kaneko H, Saito K, Hashimoto H, et al. Preferential elimination of CD28<sup>+</sup> T cells in systemic lupus erythematosus (SLE) and the relation with activation-induced apoptosis [J]. Clin Exp Immunol, 1996, 106(2): 218-229.
- [4] Vinay DS, Choi JH, Kim JD, et al. Role of endogenous 4-1BB in the development of systemic lupus erythematosus [J]. Immunology, 2007, 122(3): 394-400.
- [5] Shao Z, Sun F, Koh DR, et al. Characterisation of soluble murine CD137 and its association with systemic lupus [J]. Mol Immunol, 2008, 45(15): 3990-3999.
- [6] Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus [J]. N Engl J Med 2008, 358(9): 929-939.

## 瘦素抵抗肥胖雌性大鼠肺通气功能的损伤研究

姚荣英<sup>1</sup>, 顾璇<sup>2</sup>, 郑玲<sup>3</sup>

**[摘要]**目的:观察高脂饮食诱导的瘦素抵抗肥胖大鼠肺通气功能(PVF)的变化。方法:将30只SD雌性刚离乳大鼠按体重随机分成对照组和高脂组各15只;对照组给予普通饲料喂养,高脂组给予高脂饲料喂养,第8周末按体重增量从高脂组中筛选出7只大鼠作为瘦素抵抗肥胖组,测定2组大鼠的体重、血清瘦素浓度及潮气量(TV)、肺通气量(PV)、用力肺活量(FVC)、最大呼气中段流量(MMEF)、吸气峰流量(PIF)和呼气峰流量(PEF)。结果:瘦素抵抗肥胖组第3周末至第8周末大鼠的体重和第8周末血清瘦素浓度、PV、PIF与PEF均高于对照组( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ),TV、FVC和MMEF差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:饮食诱导的瘦素抵抗性肥胖降低了雌性大鼠的PVF。

**[关键词]** 肥胖; 瘦素抵抗; 肺通气功能; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 589.2 [文献标识码] A

## Study on the pulmonary ventilation function in obese female rats with leptin resistance

YAO Rong-ying<sup>1</sup>, GU Xuan<sup>2</sup>, ZHENG Ling<sup>3</sup>

(1. Department of Preventive Medicine 2. Department of Nursing ,

3. Department of Physiology Bengbu Medical College Bengbu Anhui 233030 China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the changes of pulmonary ventilation function(PVF) in obese rats with leptin resistance induced by high-fat diet. **Methods:** Thirty female Sprague-Dawley weaning rats were randomly divided into control group and high-fat diet group according to their body weight. Fifteen rats were fed with basic diet and 15 rats were fed with high-fat diet. At the end of the 8th week, 7 obese rats were selected by body weight from high-fat diet group as obese group with leptin resistance. The body weight, blood serum leptin concentration, tidal volume(TV), pulmonary ventilation(PV), forced vital capacity(FVC), maximal midexpiratory flow curve(MMEF), peak inspiratory flow(PIF) and peak expiratory flow(PEF) of all rats in two groups were detected. **Results:** The body weight from the 3rd week to the 8th week, blood serum leptin concentration, PV, PIF and PEF of obese group at the end of the 8th week were higher than those of control group( $P < 0.05 - P < 0.01$ ). No significant difference of TV, FVC and MMEF were found between two groups at the end of 8th week. **Conclusions:** Obesity with leptin resistance induced by high-fat diet impairs the PVF of female rats.

**[Key words]** obesity; leptin resistance; pulmonary ventilation function; rats

随着人们的生活方式和饮食结构的改变,儿童肥胖症的发病率也随之不断升高。儿童期肥胖症是

许多疾病的危险因素。近年来发现肥胖儿童存在肺功能异常现象,与正常体重者相比,肥胖患儿呼吸功能异常的比例远远增加,是引起阻塞性睡眠呼吸暂停综合征的主要因素<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2-5]</sup>发现,大多数肥胖者和啮齿类动物存在明显的瘦素抵抗。虽然,肥胖和肺功能异常的确切关系及其机制仍不明确,但越来越多的证据表明,肥胖、瘦素和肺功能之间存在

[收稿日期] 2011-03-14

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(KJ2008B12ZC)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 预防医学系 2. 护理系 3. 生理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 姚荣英(1971-),女,硕士,副教授。

[7] Chatzigeorgiou A, Lyberis M, Chatzilimperis G, et al. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease [J]. *Biofactors* 2009, 35(6): 474-483.

[8] 吴俊英, 钱峰, 张海峰, 等. 4-1BB(CD137)配体在几种肿瘤细胞株上的表达[J]. 蚌埠医学院学报 2003, 28(3): 189-191.

[9] 张榕, 郭韵, 赵丽娟, 等. 阻断4-1BB/4-1BBL通路在系统性红斑狼疮患者T淋巴细胞活化中的作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志 2008, 28(10): 891-894.

[10] Likuni N, Lourenco EV, Hahn BH, et al. Cutting Edge: regulatory

T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus [J]. *J Immunol* 2009, 183(3): 1518-1522.

[11] Kytitaris VC, Juang YT. Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update [J]. *Current Opinion Rheumatol*, 2005, 17(5): 518-522.

[12] Foell J, Strahotin S, O'Neil SP, et al. CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice [J]. *J Clin Invest* 2003, 111(10): 1505-1518.

( 本文编辑 姚仁斌)