

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:27 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.048.html

多发性骨髓瘤与系统性红斑狼疮患者血浆 IL-2、TNF- α 检测

叶倩龄, 翟志敏, 王会平, 秦慧, 张家奎

摘要 目的 检测多发性骨髓瘤(MM) (“免疫过度受抑”疾病)与系统性红斑狼疮(SLE) (“免疫过度激活”疾病)患者血浆白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,并对结果进行分析。方法 SLE、MM患者和健康对照均于清晨空腹抽取静脉血3 ml,酶联免疫法测定血浆IL-2、TNF- α 水平。结果 与对照者比较,MM患者、SLE患者血浆IL-2水平差异无统计学意义;MM患者TNF- α 水平显著低于对照者($P < 0.05$),SLE患者TNF- α 水平显著高于对照者($P < 0.05$)。MM患者血浆IL-2、TNF- α 水平显著低于SLE患者($P = 0.01$, $P < 0.01$)。年龄 < 55 岁组MM患者血浆IL-2、TNF- α 均显著高于 ≥ 55 岁组($P < 0.01$, $P = 0.03$);肾功能不全MM患者血浆IL-2水平显著高于肾功能正常MM患者($P = 0.01$)。有与无首诊盘形红斑的SLE患者之间,其血浆IL-2、TNF- α 水平差异有统计学意义($P = 0.02$, $P = 0.02$)。结论 TNF- α 在体内微环境的生理失衡是MM患者的“免疫过度受抑”与SLE患者“免疫异常激活”的原因之一,IL-2的影响作用则有待进一步深入。

关键词 多发性骨髓瘤; 系统性红斑狼疮; 白细胞介素-2; 肿瘤坏死因子- α ; 血浆

中图分类号 R 593

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0255-04

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是以骨骼破坏、肾损害、血钙过量为主要表现的恶性浆细胞克隆增生性肿瘤^[1],其恶性增生的浆细胞是不再具有分化能力的B细胞,呈现“免疫过度受抑”。系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是典型的系统性自身免疫性疾病,患者体内自身反应性T、B淋巴细胞异常活化^[2],表现为“免疫过度激活”。白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)是反映机体免疫功能的重要细胞因子,参与体内微环境的生理平衡,它们一旦失衡(如上升或下降),则会诱发相应的免疫紊乱与异常。IL-2和TNF- α 参与了MM

发病过程^[3]及SLE免疫病理损伤过程^[4]。该研究旨在同时检测与比较MM(免疫过度受抑)和SLE(免疫过度激活)患者体内IL-2、TNF- α 的血浆水平。

1 材料与方法

1.1 病例资料 17例MM患者,其中男8例,女9例;年龄30~84(61.06 \pm 11.49)岁,均为安徽医科大学第二附属医院血液内科住院患者。所有患者符合中国2013最新MM诊断标准(满足全部3条标准)^[5]。依据国际分期系统(international staging system, ISS) β_2 -微球蛋白(β_2 -microglobulin, β_2 -GM)检验值分组, β_2 -GM < 3.5 mg/L为I期, β_2 -GM > 5.5 mg/L为III期,介于两者之间为II期^[5]。其中,年龄 > 55 岁12例, < 55 岁者5例;III期患者9例,I期和II期患者8例;肾功能异常者7例,肾功能正常者10例。

16例SLE患者,均为女性,年龄11~53(28.63 \pm 8.11)岁,为安徽医科大学第一附属医院、安徽医科大学第二附属医院与安徽省立医院风湿免疫科门诊及住院患者。所有患者符合美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)1997年修订的SLE分类标准^[6]。SLE疾病活动评分依据SLE活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI)量表进行判定^[7],将评分 < 10 分者判定为非活动期患者, ≥ 10 分者判定为活动期患者。其中,首诊颧部红斑9例(56.2%)、首诊盘形红斑5例(31.2%)、肾损7例(43.7%)、关节炎6例(37.5%)为主,其后依次为口腔溃疡、光敏感、胸膜炎。SLEDAI评分 > 10 分者5例,SLEDAI评分 < 10 分者11例。

MM对照者6例,其中男3例,女3例,年龄30~76(49.67 \pm 4.41)岁;SLE对照者13例,均为女性,年龄17~45(33.54 \pm 9.13)岁。对照来自安徽医科大学第一附属医院、安徽医科大学第二附属医院体检中心健康检验者和安徽医科大学研究生健康个体健康献血员,无心、肝、肺、肾等重要脏器疾患,血常规及肝肾功能检查均正常,且不具备MM或

2015-12-08 接收

基金项目: 安徽医科大学校科研基金(编号: 2015xkj032)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院血液科,合肥 230601

作者简介: 叶倩龄,女,住院医师,医学硕士;

翟志敏,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: zzzm889@163.com

SLE 诊断标准中的任何一条。

1.2 主要试剂 检测人血浆 IL-2、TNF-α 的 ELISA 试剂盒购自上海中亚科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 血液标本采集 得到受试对象或其家属知情同意后，SLE、MM 患者和对照者于清晨空腹抽取静脉血 3 ml，置于抗凝管 4 h 内分离血浆(1 500 r/min，5 min)，留存于 -80 °C 低温冰箱中，操作过程中避免反复冻融。

1.3.2 ELISA 测定血浆 IL-2、TNF-α 采用双抗体一步夹心法 ELISA 定量测定 IL-2、TNF-α 含量。严格按照说明书步骤操作：往预先包被 IL-2/TNF-α 抗体的包被微孔中，依次加入标准品、标本、HRP 标记的检测抗体，经过温育并彻底洗涤；用底物 TMB 显色，TMB 经过氧化物酶的催化后转化呈蓝色，并在酸的作用下最终转化成的黄色；颜色的深浅和样品中的 IL-2/TNF-α 浓度呈正相关；用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(optical density, OD) 值，IL-2/TNF-α 的 OD 值单位均为 pg/ml，根据 OD 值得出标准曲线，剔除极值，计算得出样品浓度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.01 统计软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示；组间比较用 Student *t* (方差齐采用) 或 Satterthwaite *t* 检验(方差不齐采用)。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 血浆 IL-2、TNF-α 水平比较 MM 患者血浆 IL-2 水平与对照者比较，Satterthwaite *t* 检验，差异无统计学意义，TNF-α 水平显著低于对照组 ($P < 0.05$)，见表 1。SLE 患者血浆 IL-2 水平与对照比较，差异无统计学意义，但 TNF-α 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)，见表 2。MM 与 SLE 患者血浆 IL-2、TNF-α 水平差异有统计学意义 (Satterthwaite *t* = 2.82, $P = 0.01$; *t* = 3.98, $P < 0.01$)。

表 1 MM 患者与对照 IL-2、TNF-α 水平的比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

项目	MM (n=17)	对照 (n=6)	t 值	P 值
IL-2	286.53 ± 97.77	396.69 ± 257.89	-1.02	0.35
TNF-α	18.27 ± 6.42	22.93 ± 1.41	-2.81	0.01

表 2 SLE 患者与对照 IL-2、TNF-α 水平的比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

项目	SLE (n=16)	对照 (n=13)	t 值	P 值
IL-2	467.60 ± 238.40	379.20 ± 221.50	1.02	0.31
TNF-α	34.02 ± 14.55	21.37 ± 11.81	2.53	0.02

2.2 MM 患者年龄、临床分期及主要临床检测指标血浆 IL-2、TNF-α 水平 年龄 <55 岁 MM 患者血浆 IL-2、TNF-α 显著高于 ≥55 岁患者 ($P < 0.01$, $P = 0.03$)。I、II 期患者血浆 IL-2、TNF-α 与 III 期患者差异无统计学意义。肾功能不全 MM 患者血浆 IL-2 水平显著高于肾功能正常 MM 患者 ($P = 0.01$)；但 TNF-α 水平与肾功能正常 MM 患者，差异无统计学意义。血红蛋白 (hemoglobin, Hb)、血小板计数 (platelets, PLT)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 与尿 β2-GM 分组后，差异均无统计学意义。见表 3。

2.3 SLE 主要临床表现血浆 IL-2、TNF-α 水平 SLE 患者有、无首诊盘形红斑，其 IL-2、TNF-α 血浆水平差异有统计学意义 ($P = 0.02$, $P = 0.02$)。首诊出现颧部红斑、出现肾损、光敏感、口腔溃疡、胸膜炎、关节炎 (阳性组, +) 与无上述相应首诊临床表现分组 (阴性组, -)，血浆 IL-2、TNF-α 水平差异无统计学意义。见表 4。

3 讨论

细胞因子网络成员在体内的失衡与疾病的免疫紊乱密切相关。本实验检测了 IL-2 和 TNF-α 在 MM 和 SLE 患者血浆水平，为进一步研究这两个重要的细胞免疫调节因子在 MM 的“免疫过度受抑”和 SLE 的“免疫过度激活”中的作用奠定基础。

IL-2 是一种 T 细胞生长因子，主要是由辅助性 T 细胞产生，小部分是由 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞产生^[8]。IL-2 可以通过与其受体结合并传递信号对各免疫细胞产生不同影响，并特异性获得靶细胞的定向分化 and 功能活性^[9]；某些免疫细胞功能的差异取决于 IL-2 浓度及靶细胞表面 IL-2 受体的构型和强度等^[10]。与对照血浆 IL-2 比较，MM 患者偏高，SLE 患者偏低，且 MM 患者 IL-2 水平显著低于 SLE 患者，说明 MM 患者由于 B 淋巴细胞分化增殖终末阶段一浆细胞大量恶性增生，抑制 IL-2 的产生与分泌，促使患者表现“免疫过度受抑”；SLE 患者体内 IL-2 可能参与并促进自身 T、B 细胞的异常活化过程，是患者表现免疫过度激活的因素之一。但 MM、SLE 血浆 IL-2 与对照比较，差异均无统计学意义，这或许由于受到免疫网络其它相关细胞因子调控或是 IL-2 受体等的影响，MM、SLE 患者 IL-2 水平上升或下降至接近基线 (对照组) 水平。但本次研究病例与对照的样本量较少，且未对其它细胞因子与 IL-2 受体进行检测，提示 IL-2 对免疫相关疾病

表3 MM 患者临床检测指标血浆 IL-2、TNF- α 水平($\bar{x} \pm s$ $\mu\text{g/ml}$)

项目	IL-2	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	TNF- α	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄		3.02	<0.01		2.36	0.03
≥ 55 岁	244.13 \pm 85.13			15.90 \pm 6.01		
<55 岁	371.32 \pm 60.11			23.00 \pm 4.50		
分期		1.18	0.25		1.21	0.25
I、II 期	278.13 \pm 82.06			16.30 \pm 5.30		
III 期	326.25 \pm 84.94			20.05 \pm 7.22		
肾功能		2.89	0.01		1.17	0.30
不全	356.99 \pm 73.70			16.99 \pm 6.10		
正常	241.69 \pm 85.46			20.78 \pm 6.86		
Hb		1.44	0.17		0.27	0.79
<110 g/L	300.73 \pm 90.92			18.08 \pm 6.95		
≥ 110 g/L	215.50 \pm 119.57			19.20 \pm 3.20		
PLT		0.99	0.34		0.96	0.35
<100 $\times 10^9$ /L	314.87 \pm 71.27			20.10 \pm 3.94		
$\geq 100 \times 10^9$ /L	268.49 \pm 110.82			17.10 \pm 7.54		
LDH		1.22	0.24		0.55	0.59
>246	280.10 \pm 68.81			18.65 \pm 7.52		
≤ 246	337.96 \pm 92.60			20.49 \pm 5.20		
$\beta 2$ -GM		1.10	0.29		0.61	0.55
<1.8	353.46 \pm 53.51			17.73 \pm 6.94		
≥ 1.8	273.24 \pm 101.32			20.81 \pm 6.11		

表4 SLE 患者主要临床表现 IL-2、TNF- α 水平($\bar{x} \pm s$ $\mu\text{g/ml}$)

临床表现	IL-2				TNF- α			
	+	-	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	+	-	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
盘形红斑	660.12 \pm 142.02	380.08 \pm 224.11	2.55	0.02	45.79 \pm 11.48	28.66 \pm 12.80	2.55	0.02
颧部红斑	511.69 \pm 222.22	410.90 \pm 263.78	0.83	0.42	37.75 \pm 14.51	29.22 \pm 14.17	1.18	0.26
肾损	428.93 \pm 241.68	497.67 \pm 245.83	0.57	0.58	32.51 \pm 17.36	35.19 \pm 12.93	0.37	0.72
光敏感	481.54 \pm 255.31	464.38 \pm 245.19	0.12	0.91	37.49 \pm 8.84	33.22 \pm 15.74	0.45	0.66
口腔溃疡	326.36 \pm 385.78	500.19 \pm 200.25	1.17	0.26	24.84 \pm 18.64	36.14 \pm 13.44	1.26	0.23
关节炎	380.91 \pm 287.42	519.60 \pm 202.02	1.15	0.27	27.26 \pm 15.63	38.07 \pm 12.98	1.52	0.15

的影响作用有待于进一步深入。

TNF- α 是一种主要由巨噬细胞和单核细胞产生,在促炎、抗肿瘤与自身免疫调节方面有着重要作用的免疫调节因子^[11];被认为是迄今发现的抗肿瘤作用最强的细胞因子,其抗肿瘤效能主要是通过对肿瘤细胞的毒性作用和调节免疫系统功能发挥。SLE 等自身免疫性疾病患者 TNF- α 水平较高^[12],被认为是 TNF- α 抑制 T 细胞信号传导、促进 B 细胞和树突状细胞的生长以及诱导凋亡分子的产生等,参与自身免疫性疾病的发病机制^[13]。血浆 TNF- α 水平,MM 患者显著低于对照,SLE 显著高于对照,MM 患者血浆 TNF- α 水平远低于 SLE 患者血浆 TNF- α 水平,这表明 TNF- α 作为与 IL-2 一样的 Th1 型细胞因子,在 MM 患者免疫过度受抑和 SLE 患者免疫过度激活中发挥着作用,且这种作用效应比 IL-2 更为独立。血浆 TNF- α 水平或可作为免疫性疾病 MM、SLE 患者的临床检测指标。

MM 高年龄患者生存期短、预后差^[14],本研究根据我国发病中位年龄 55 岁^[15]将 MM 患者分为两组,<55 岁组血浆 IL-2、TNF- α 浓度水平高于 ≥ 55 岁组,这提示:年龄不同患者体内这两个细胞因子的不同可能是年龄影响预后的原因之一,且有必要动态追踪观察 MM 患者,尤其是高龄 MM 患者血浆 IL-2、TNF- α 水平,更好地改善其生存与预后。肾损 MM 患者血浆 IL-2 水平高于肾功能正常 MM 患者,是因为 IL-2 作为一种促炎性因子在 MM 肾功能损害的进展中可能起到了一定的作用。首诊盘形红斑 SLE 患者的血浆 IL-2、TNF- α 水平均显著高于首诊无盘形红斑 SLE 患者,说明 IL-2、TNF- α 可能介入了 SLE 患者盘形红斑的形成。

参考文献

- [1] Sun J, Wen X, Jin F, et al. Bioinformatics analyses of differentially expressed genes associated with bisphosphonate-related osteo-

- necrosis of the jaw in patients with multiple myeloma [J]. *Onco Targets Ther* 2015 8: 2681–8.
- [2] 莫莉,许礼发. 调节性 T 细胞与风湿性疾病[J]. *中华临床医师杂志(电子版)* 2011 5(11): 3277–80.
- [3] Podar K, Hideshima T, Chauhan D, et al. Targeting signalling pathways for the treatment of multiple myeloma [J]. *Expert Opin Ther Targets* 2005 9(2): 359–81.
- [4] 张曲鑫,陆进明. 系统性红斑狼疮与细胞因子的研究进展 [J]. *现代生物医学进展* 2009 9(19): 3794–7.
- [5] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国多发性骨髓瘤工作组. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2013年修订) [S]. *中华内科杂志* 2013 52(9): 791–5.
- [6] Hochberg M C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [W]. *Arthritis Rheum* 1997 40(9): 1725.
- [7] Bombardier C, Gladman D D, Urowitz M B, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE [S]. *Arthritis Rheum*, 1992 35(6): 630–40.
- [8] Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 [J]. *Biotechnology*, 1992 24: 304–9.
- [9] Boyman O, Kovar M, Rubinstein M P, et al. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes [J]. *Science* 2006 311(5769): 1924–7.
- [10] Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol* 2012, 12(3): 180–90.
- [11] 樊斌,李德卫,冯渊,等. TNF- α 和 IL-2 在肝移植急性排斥反应中的表达及意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(1): 11–4.
- [12] Chew A L, Bennett A, Smith C H, et al. Successful treatment of severe psoriasis and psoriatic arthritis with adalimumab [J]. *Br J Dermatol* 2004 151(2): 492–6.
- [13] Aringer M, Smolen J S. SLE-Complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Res Ther* 2003 5(4): 172–7.
- [14] Kyle R A, Gertz M A, Witzig T E, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma [J]. *Mayo Clin Proc*, 2003 78(1): 21–33.
- [15] 陶中飞,傅卫军,陈玉宝,等. 206 例多发性骨髓瘤预后因素分析及分期评价 [J]. *癌症* 2006, 25(4): 461–4.

Detection on plasma IL-2 and TNF- α in patients with multiple myeloma and with systemic lupus erythematosus

Ye Qianling, Zhai Zhimin, Wang Huipin, et al

(Dept of Hematology, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To detect plasma level of interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients with multiple myeloma (MM) (which is an abnormal immunosuppressive disease) and with systemic lupus erythematosus (SLE) (which is a disorder characterized by abnormal immuno-activation and further discuss based on the analyses of the results. **Methods** Fasting venous blood samples (3 ml) were taken from MM, SLE patients and healthy controls. Plasma IL-2 and TNF- α were detected with the enzyme-linked immunosorbent. **Results** Plasma IL-2 level didn't show significance between MM or SLE patients and controls. Compared with their healthy controls respectively, plasma TNF- α level of patients with MM was significantly lower ($P < 0.05$) and that of patients with SLE was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with patients with SLE, patients with MM had statistically lower plasma IL-2 and lower plasma TNF- α ($P = 0.01$, $P < 0.01$). Plasma IL-2 and TNF- α of MM patients in group age less than 55 were significantly higher than in group age more than 55 ($P < 0.01$, $P = 0.03$). Plasma IL-2 level of MM patients with renal insufficiency, was significantly higher than MM patients with normal renal function, the difference was statistically significant ($P = 0.01$). Between SLE patients that just first diagnosed with and without disc-shaped erythema, the plasma IL-2 and TNF- α level were statistically significant ($P = 0.02$, $P = 0.02$). **Conclusion** The imbalance of microenvironment caused by the increasing or declining of the cytokine TNF- α , could account for the abnormal immuno-suppression of MM and the abnormal immuno-activation of SLE. Further studies on the effect of IL-2 are needed.

Key words multiple myeloma; systemic lupus erythematosus; interleukin-2; tumor necrosis factor- α ; plasma