

# 儿童狼疮性肾炎患者中 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 的表达

丁艳<sup>1,2</sup>, 廖旺<sup>1</sup>, 向伟<sup>2</sup>, 杨慧兰<sup>3</sup>, 何小解<sup>4</sup>, 党西强<sup>4</sup>, 易著文<sup>4</sup>

**摘要** 目的 通过实时定量逆转录 PCR (RT-PCR)、肾脏免疫组化和 ELISA 3 种方法研究儿童狼疮性肾炎 (LN) 中 EB 病毒 (EBV) 潜伏膜蛋白 1 (LMP-1) 的表达, 试图探讨 LMP-1 在儿童 LN 中的致病机制。方法 41 例 LN 患儿和 12 例健康对照组, 分别用 RT-PCR 法、免疫组化法、ELISA 法检测两组外周血单核细胞 (PBMCs)、肾脏组织及血清中 LMP-1 的表达。结果 ① RT-PCR 法、免疫组化法、ELISA 法检测 LN 患儿和健康对照者的阳性率分别为 65.9% vs 8.3%, 95.1% vs 16.7%, 22.0% vs 8.3%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ② 3 种方法检测 LMP-1 的表达, 免疫组化法检测阳性率高于其他两种方法, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 儿童 LN 中存在 EBV 潜伏期基因 LMP-1 表达异常, 其中肾脏组织中表达阳性率最高, 提示 LMP-1 可能参与了儿童 LN 的发病。

**关键词** 儿童; 狼疮性肾炎; 潜伏膜蛋白 1; EB 病毒

**中图分类号** R 373.9; R 758.69

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)05-0676-04

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是累及全身多系统的自身免疫性疾病, 表现为 T、B 淋巴细胞异常活化和大量自身抗体产生<sup>[1]</sup>。儿童 SLE 通常临床表现较严重, 起病时急而重, 是儿童时期预后较差的一种疾病。SLE 患者几乎 100% 肾活检发现有肾脏受累, 其中 45% ~ 85% 有肾损害临床表现, 儿童狼疮性肾炎 (lupus nephritis, LN) 比成人更普遍、更严重<sup>[2-3]</sup>。近年来 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 感染与 SLE 发生发展的关系已成为 SLE 研究的热点<sup>[4-5]</sup>。EBV 具有嗜 B 淋巴细胞的特性, 可终生潜伏于 B 淋巴细胞, 对机体免疫系统

造成持续和慢性刺激。EBV 基因编码的抗原和 SLE 患者的自身抗原具有较高的同源性, 有诱发自身免疫的可能<sup>[5]</sup>。该研究通过实时定量逆转录 PCR (RT-PCR)、肾脏免疫组化和 ELISA 3 种方法研究儿童 LN 中 EBV 潜伏期基因之潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP-1) 的表达, 试图探讨 LMP-1 在儿童 LN 中的致病机制。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 实验组来源于海南省妇幼保健院皮肤科与中南大学湘雅二医院儿童医学中心小儿肾脏专科, 选取了 2009 年 1 月 ~ 2013 年 11 月收治的 LN 患儿 41 例, 其中女 30 例, 男 11 例; 年龄 6 ~ 16 (11.1 ± 2.4) 岁。SLE 的诊断依据为 1982 年美国风湿病协会修正的诊断标准<sup>[6]</sup>, 诊断为 SLE 基础上行肾穿刺活检确诊为 LN。12 例健康对照组肾脏组织及静脉血均来自海南省妇幼保健院小儿外科急诊创伤的患儿, 患儿及患儿家族中无自身免疫性疾病史。其中女 8 例, 男 4 例, 年龄 7 ~ 17 (12.3 ± 3.3) 岁。实验组和对照组的年龄经 *t* 检验显示差异无统计学意义, 性别构成比比较采用  $\chi^2$  检验, 两组间差异无统计学意义。本研究通过海南省妇幼保健院和中南大学湘雅二医院伦理委员会的批准, 每个患儿家属均签署了知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR 法检测 LMP-1 基因的表达** 细胞分离及 RNA 提取: 抽取 LN 患儿及健康对照组肝素抗凝静脉血 10 ml。用淋巴细胞分离液常规分离外周血单核细胞 (PBMCs), 用 TRIzol<sup>®</sup> 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 提取 RNA。cDNA 合成采用逆转录试剂盒 (美国 Fermentans 公司), 反应体系: 1 ~ 5  $\mu$ g RNA, 5 × Reaction Buffer 5  $\mu$ l, 2.5 U/ $\mu$ l Poly A Polymerase 1  $\mu$ l, RT Mix 1  $\mu$ l, 总体积 25  $\mu$ l, 37 °C 反应 1 h, 85 °C 5 min。实时 PCR: 采用 Icyler IQ 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司) 检测 EBV 基因 LMP1 的表达。引物序列由上海博亚生物技术有限公司合成, LMP1 上游引物: 5'-TTGGTGTACTC-CTACTGATGATCACC-3', 下游引物: 5'-AG-TAGATCCAGATACCTAAGACAAGT-3'; PCR 反应体

2015-02-02 接收

基金项目: 海南省自然科学基金 (编号: 814314.309079)

作者单位: <sup>1</sup>海南省人民医院皮肤科, 海口 570102

<sup>2</sup>海南省妇幼保健院皮肤科, 海口 570206

<sup>3</sup>广州军区广州总医院皮肤科, 广州 510010

<sup>4</sup>中南大学湘雅二医院儿童医学中心小儿肾脏专科, 长沙 410011

作者简介: 丁艳, 女, 博士研究生;

何小解, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者; E-mail: hexj7150@163.com;

向伟, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者; E-mail: xiangwei8@163.com

积为 20  $\mu\text{l}$ , 反应体系为 2  $\times$  SYBR Green qPCR Mix 10  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 上下游引物各 1  $\mu\text{l}$ , cDNA 1  $\mu\text{l}$ , 无酶水 7  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 之后每一步 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 引物 58  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 30 s, 共进行 35 个循环。采用标准曲线相对定量法进行结果分析。

### 1.2.2 免疫组化法检测肾脏组织中 LMP-1 的表达

肾脏组织块经固定、石蜡包埋、脱蜡、水化及高温高压抗原修复等前期处理后, PBS 缓冲液洗片 3 次, 滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育 10 ~ 15 min。滴加一抗(此实验中一抗无需稀释) 100  $\mu\text{l}$ , 置于湿盒内 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。滴加生物素标记羊抗鼠二抗工作液, 室温孵育 10 ~ 15 min。滴加 HRP 标记链霉亲和素, 室温孵育 10 ~ 15 min。PBS 漂洗后 DAB 显色, 在显微镜下观察染色程度; 苏木精复染(30 s ~ 2 min), 1% 盐酸酒精分化(1 s); 自来水冲洗 10 ~ 15 min; 烘干后中性树胶封片, 镜检。在均一条件下随机选取切片的 5 个视野拍照( $\times 200$ )。

### 1.2.3 ELISA 法检测血清中 LMP-1 抗体的水平

ELISA 试剂盒购于上海蓝基公司, 严格按照说明书操作。结果判定: 置酶标 450 nm 波长处测定样本吸光度(optical density, OD) 值, 根据标准品制定的标准曲线换算出各样本浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。计数阳性率使用百分比表示, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验或使用 Fisher 精确概率法。

## 2 结果

2.1 RT-PCR 法检测 LMP-1 基因的表达 RT-PCR 法检测 41 例 LN 患儿和 12 例健康对照者, 发现 27 例(65.9%) 患儿和 1 例(8.3%) 健康对照者 PBMCs 中 LMP-1 基因表达呈阳性, LN 患儿的 LMP-1 基因表达的阳性率与健康对照者相比, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.12, P < 0.05$ )。见图 1。

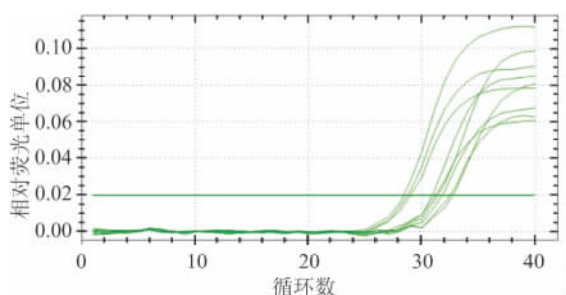


图1 LMP-1 的 RT-PCR 扩增曲线图

2.2 免疫组化法检测 LN 患儿肾脏组织中 LMP-1 的表达 41 例 LN 患儿和 12 例健康对照者肾脏组织中 LMP-1 蛋白表达结果如下: 39 例(95.1%) LN 患儿和 2 例(16.7%) 健康对照者表达呈阳性, LN 患儿肾脏的 LMP-1 表达的阳性率与健康对照者相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。

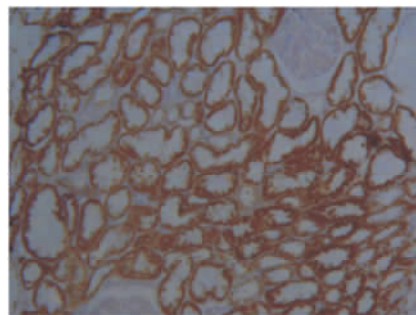


图2 LMP-1 在 LN 患儿肾脏组织细胞中的阳性表达 DAB  $\times 200$

2.3 ELISA 法检测血清中 LMP-1 蛋白水平 41 例 LN 患儿和 12 例健康对照者血清中 LMP-1 抗体的表达结果如下: 9 例(22.0%) LN 患儿和 1 例(8.3%) 健康对照者呈阳性表达, LN 患儿血清的 LMP-1 抗体表达的阳性率与健康对照者相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.4 3 种方法检测 LN 患儿 LMP-1 表达阳性率的比较 3 种方法检测 LN 患儿 EBV 潜伏期基因 LMP-1 的表达, 其检出阳性率比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 26.971, P = 0.000$ ): 免疫组化法和 ELISA 法的检出阳性率比较, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 42.260, P < 0.001$ ), 免疫组化法和 RT-PCR 法的检出阳性率比较, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 9.400, P = 0.002$ )。见表 1。

表1 不同检测方法检测 41 例 LN 患儿 LMP-1 情况比较

| 检测方法   | 阳性数(n) | 阴性数(n) | 阳性率(%) |
|--------|--------|--------|--------|
| RT-PCR | 27     | 14     | 65.9** |
| 免疫组化   | 39     | 2      | 95.1   |
| ELISA  | 9      | 32     | 22.0** |

与免疫组化法比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 三种方法间比较:  $P < 0.01$

## 3 讨论

国内外的大量研究<sup>[4-5]</sup>表明, SLE 患者中 EBV 血清学阳性率、病毒载量及 EBV 基因的表达都显著高于健康对照者, 提示 EBV 在 SLE 的发病中起着重要的作用。EBV 在感染 B 淋巴细胞后, 表达多种潜

伏蛋白 LMP-1 是其中一种,属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,是一种跨膜蛋白,通过激活相关信号传导通路诱导细胞异常生物学行为。LMP1 提供替代 B 细胞的存活和分化的信号<sup>[5]</sup>。国外的研究<sup>[7-8]</sup>表明 LMP-1 能够通过多种机制加重 SLE 的自身反应性,包括直接激活 B 细胞,增强 B 细胞活化的协同刺激信号,刺激 B 细胞活化因子(BAFF)的产生,能够协助打破自我耐受等<sup>[9]</sup>。本研究通过 RT-PCR、免疫组化法和 ELISA 法检测均发现儿童 LN 的 LMP-1 的表达显著增加,提示 LMP-1 在儿童 LN 中可能起到重要的致病作用。

James et al<sup>[10]</sup>发现 99% 的 SLE 患者为 EBV 血清学阳性,Yu et al<sup>[11]</sup>报道 SLE 患者外周血中有 81.6% 为 EBV DNA 阳性,而健康对照者只有 48.9% 阳性,本研究显示使用 ELISA 法检测 LN 患儿血清中 LMP-1 蛋白的表达,仅有 22% 的阳性率,RT-PCR 法检测 LN 患儿血液中 LMP-1 基因表达,仅有 65.9% 的阳性率,均低于国外的研究。考虑可能原因是:① 国外 EBV 血清学研究是针对 EBV 壳抗原(VCA)的抗体研究,存在敏感性高但特异性较低的问题。② 本实验是针对 LMP-1 DNA 的特异性检测,故检出率较国外 EBV DNA 检测阳性率低。

本实验 41 例 LN 患儿肾脏组织免疫组化检测结果显示 95.1% 的患儿有 LMP-1 的表达,较 Yu et al<sup>[12]</sup>报道的阳性率(58.6%)高,可能与本实验均为 LN 儿童患者,儿童的 EBV 感染率较成人更高、更容易累及肾脏有关。

3 种方法检测 LN 患儿 LMP-1 的表达,肾脏组织免疫组化阳性率最高,较其它两种方法有显著性差异,提示 EBV 感染表达的 LMP-1 可能与儿童 LN 的肾脏病变有重要关系,肾脏组织免疫组化可能成为诊断 EBV 相关性 LN 的重要手段,而 ELISA 法及 RT-PCR 法检测血液中 LMP-1 的表达可能成为预示 LN 的诊断方法。

### 参考文献

- [1] 丁艳,肖嵘,张燕,等. SLE 患者 T 淋巴细胞 CD70 基因表达及其启动子区域甲基化状态的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2013, 46(2): 80-4.
- [2] Mina R, von Scheven E, Ardoin S P, et al. Consensus treatment plans for induction therapy of newly diagnosed proliferative lupus nephritis in juvenile systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012, 64(3): 375-83.
- [3] Sato V A, Marques I D, Goldenstein P T, et al. Lupus nephritis is more severe in children and adolescents than in older adults [J]. *Lupus* 2012, 21(9): 978-83.
- [4] Draborg A H, Duus K, Houen G. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Dev Immunol* 2012, 370516.
- [5] Larsen M, Sauce D, Deback C, et al. Exhausted cytotoxic control of Epstein-Barr virus in human lupus [J]. *PLoS Pathog* 2011, 7(10): e1002328.
- [6] Tan E M, Cohen A S, Fries J F, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 1982, 25(11): 1271-7.
- [7] Wrobel C M, Geiger T R, Nix R N, et al. High molecular weight complex analysis of Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 1 (LMP-1): Structural insights into LMP-1's homo-oligomerization and lipid raft association [J]. *Virus Res* 2013, 178(2): 314-27.
- [8] Peters A L, Stunz L L, Meyerholz D K, et al. Latent Membrane Protein 1, the EBV-Encoded Oncogenic Mimic of CD40, Accelerates Autoimmunity in B6.Sle1 Mice [J]. *J Immunol* 2010, 185(7): 4053-62.
- [9] Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus [J]. *J Exp Med* 2005, 201(5): 703-11.
- [10] James J A, Neas B R, Moser K L, et al. Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(5): 1122-6.
- [11] Yu S F, Wu H C, Tsai W C, et al. Detecting Epstein-Barr virus DNA from peripheral blood mononuclear cells in adult patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan [J]. *Med Microbiol Immunol* 2005, 194(3): 115-20.
- [12] Yu X X, Yao C W, Tao J L, et al. The expression of renal Epstein-Barr virus markers in patients with lupus nephritis [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(5): 1135-40.

## The expression of LMP-1 gene in juvenile lupus nephritis

Ding Yan<sup>1,2</sup>, Liao Wang<sup>1</sup>, Xiang Wei<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Dermatology, Hainan General Hospital, Haikou 570102, <sup>2</sup>Dept of Dermatology, Maternal and Child Health Care Hospital of Hainan Province, Haikou 570206)

**Abstract Objective** To discuss the role of latent membrane protein 1 (LMP-1) in the pathogenesis of juvenile lupus nephritis (LN) through investigating expression of LMP-1 by RT-PCR, immunohistochemistry and ELISA. **Methods** RT-PCR, immunohistochemistry and ELISA were applied to detect expression of LMP-1 in PBMCs, kid-

# Treg 在慢性阻塞性肺疾病患者外周血及肺组织中的表达

章颖妹 严 青 刘 辉 石建邦 夏淮玲 徐晓玲

**摘要** 目的 观察慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者外周血及肺组织中调节性T淋巴细胞(Treg)的表达并与肺功能正常者进行对照比较,探讨Treg在COPD患者气道炎症中的作用以及吸烟对其表达的影响。方法 收集24例肺功能正常的非吸烟者(NS组)、22例肺功能正常的吸烟者(S组)、25例患有COPD的吸烟者(COPD组)为研究对象,分别采用流式细胞术、免疫组织化学染色法检测3组研究对象外周血及肺组织中Treg表达。结果 COPD组的外周血中Treg表达均显著高于S组及NS组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),S组的外周血Treg表达高于NS组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );COPD组的肺组织中Treg表达均显著低于S组及NS组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),S组的肺组织中Treg表达水平低于NS组,差异无统计学意义;3组外周血Treg总表达与第1秒用力呼气容积( $FEV_1$ )/预计值(%)负相关( $P < 0.0001$ ),与吸烟量(年支)呈显著正相关( $P < 0.0001$ ),3组肺组织中Treg总表达与 $FEV_1$ /预计值(%)无相关性( $P = 0.338$ ),与吸烟量(年支)呈显著负相关( $P = 0.031$ )。结论 COPD患者外周血中Treg表达上调,其肺组织中Treg表达下调。吸烟量与外周血中Treg表达呈正相关,与肺组织中Treg表达呈负相关。

**关键词** T淋巴细胞;调节性;慢性阻塞性肺疾病;吸烟;气道炎症

中图分类号 R 563.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0679-04

2015-02-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH158)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院呼吸内科,合肥 230001

作者简介:章颖妹,女,硕士研究生;

徐晓玲,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xxlahh08@163.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是气道慢性炎症性疾病,以不完全可逆、进行性发展的气流受限为特征的疾病,发病机制未明确。目前主要认为吸烟为COPD主要危险因素,但是在所有吸烟者中只有近乎50%为COPD<sup>[1]</sup>。调节性T淋巴细胞(regulatory T lymphocytes, Treg)是一个 $CD4^+$ T细胞亚群,其主要功能为调节效应T淋巴细胞和维持自身免疫功能平衡<sup>[2]</sup>,叉头状转录因子(forkhead box P3, Foxp3)的表达可作为其标志分子。近年研究<sup>[3]</sup>提示Treg可能参与调节吸烟烟雾等有害气体或颗粒诱导的气道免疫炎症反应。该研究旨在观察COPD患者外周血及肺组织中Treg表达并与肺功能正常者进行对照比较,探讨Treg在COPD患者气道炎症中的作用以及吸烟对其表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集安徽医科大学附属省立医院2012年1月~2013年12月胸外科行肺部切除手术的71例患者,男女不限,年龄 $>35$ 岁。根据患者的术前肺功能检查结果以及患者吸烟史,分为肺功能正常非吸烟组(NS组,  $n = 24$ ),肺功能正常吸烟组(S组,  $n = 22$ ),患有COPD吸烟组(COPD组,  $n = 25$ )。COPD定义根据《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》(2007年修订版)<sup>[4]</sup>诊断标准,吸入支气管舒张剂后第一秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second,  $FEV_1$ )/用力肺活量(forced vital capacity, FVC)  $<70%$ ;排除标准(满足其中之一):①患有风湿免疫系统疾病或者自身免疫缺陷者或过敏

ney tissue and serum from 20 patients with LN and 12 healthy control subjects respectively. **Results** ① There was significant difference between juvenile LN patients and healthy controls by RT-PCR, immunohistochemistry and ELISA. Positive rate were 65.9% vs 8.3%, 95.1% vs 16.7%, 22.0% vs 8.3%, respectively ( $P < 0.05$ ). ② Positive rates of LMP-1 in juvenile LN were significantly different among three methods and the positive rate detected by immunohistochemistry was higher than the other two methods ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The results demonstrate that there are aberrant expression of LMP-1 gene in juvenile LN, the positive rate of LMP-1 in kidney tissue is highest, suggesting that LMP-1 gene may contribute to the pathogenesis of juvenile LN.

**Key words** juvenile; lupus nephritis; latent membrane protein 1; Epstein-Barr virus