

系统性红斑狼疮患者外周血 BMP/Smads 信号通路相关基因表达及与 OPG/RANKL 的相关性分析

宋冬明¹, 崔婷¹, 刘瑞霞¹, 裘影影¹, 芮金兵¹, 费小明², 李晶¹, 汤郁^{1*}

(¹ 江苏大学附属医院风湿科, ² 血液科, 江苏 镇江 212001)

[摘要] 目的: 研究系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 BMP/Smads 信号通路相关基因表达, 了解其与 OPG/RANKL 相关性, 探讨其在 SLE 骨代谢中的意义。方法: 选取 SLE 患者 26 例及正常对照组 20 例, 运用实时定量 PCR 方法检测两组外周血单个核细胞 BMP/Smads 信号通路相关基因 BMP-2、Smad1、Smad5、Smad8 及 RANKL、OPG 的表达, ELISA 法定量检测血清中 RANKL、OPG 水平, 计算 OPG/RANKL 比值; 分析 Smad1、Smad5、Smad8 基因表达量与疾病活动相关指标及 OPG/RANKL 相关性。结果: SLE 患者外周血单个核细胞 OPG/RANKL 系统中 OPG 基因 mRNA 表达水平较正常对照组减低 (0.0025 ± 0.0007 vs. 0.0176 ± 0.0067 , $P < 0.05$), RANKL 基因 mRNA 表达水平无统计学差异 (0.0033 ± 0.0010 vs. 0.0024 ± 0.0009 , $P > 0.05$), SLE 患者 OPG/RANKL 比值较正常对照组明显减低 (0.2296 ± 0.0712 vs. 0.6095 ± 0.1651 , $P < 0.01$)。SLE 患者 Smad1、Smad8 基因 mRNA 表达水平较正常对照组明显减低 (0.0031 ± 0.0004 vs. 0.0066 ± 0.0007 ; 0.0033 ± 0.0005 vs. 0.0056 ± 0.0006 , $P < 0.01$), Smad5 基因 mRNA 表达较正常对照组减低 (0.0017 ± 0.0003 vs. 0.0042 ± 0.0004 , $P < 0.05$), SLE 患者与正常对照组 BMP-2 基因 mRNA 表达水平无统计学差异 (0.0069 ± 0.0020 vs. 0.0105 ± 0.0021 , $P > 0.05$)。SLE 患者组血清 RANKL 表达较正常对照组明显增高 ($P < 0.01$), OPG 表达在两者间无明显统计学意义 ($P > 0.05$), SLE 血清 OPG/RANKL 较正常对照组明显减低 ($P = 0.006$)。相关性分析显示, SLE 患者 Smad8 mRNA 水平、OPG/RANKL 均与血沉呈正相关 ($P < 0.05$)。OPG mRNA 水平与 Smad8 mRNA 表达水平呈正相关 $P < 0.01$, 而 RANKL 与 Smad1 mRNA 基因表达呈负相关 ($P < 0.01$)。结论: SLE 患者体内 BMP/Smads 系统基因表达存在异常, 可能与 SLE 的骨代谢异常相关。

[关键词] 系统性红斑狼疮; 外周血单个核细胞; 骨代谢; 基因表达

[中图分类号] R593.24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)01-055-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160111

Gene expressions of BMP/Smad signaling pathway in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and the correlation analysis with OPG/RANKL

Song Dongming¹, Cui Ting¹, Liu Ruixia¹, Qiu Yingying¹, Rui Jinbing¹, Fei Xiaoming², Li Jing¹, Tang Yu^{1*}

(¹Department of Rheumatism, ²Department of Hematology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the mRNA levels of genes of BMP/Smad signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and to determine their correlations with the ratio of OPG/RANKL, thus to further investigate the effect of BMP/Smad pathway on the bone metabolism of SLE patients. **Methods:** The mRNA levels of RANKL, OPG, BMP-2 and Smad1/5/8 gene in peripheral peripheral blood mononuclear cells from 26 SLE patients and 20 normal controls were detected by real-timePCR (RT-PCR), and the protein level of OPG and RANKL were measured by ELISA. The correlation analysis between these genes of BMP/Smad signaling and the ratio of OPG/RANKL or some indexes of disease activity were studied. **Results:** The mRNA levels of OPG decreased in SLE patients compared with normal controls (0.0025 ± 0.0007 vs. 0.0176 ± 0.0067 , $P < 0.05$), and RANKL levels had no differences between the two groups (0.0033 ± 0.0010 vs. 0.0024 ± 0.0009 ,

[基金项目] 国家自然科学基金(81202358, 81571582); 江苏省六大人才高峰(WSN-039); 镇江市社会发展项目(SH2013028); 2013年镇江市学术技术带头人专项基金

*通信作者(Corresponding author), E-mail: cattlemouse@sohu.com

$P > 0.05$), which led to a decreased ratio of OPG/RANKL ($0.229 6 \pm 0.071 2$ vs. $0.609 5 \pm 0.165 1$, $P < 0.01$). Both the mRNA levels of Smad1 and Smad8 were significantly decreased in SLE patients than those in controls ($0.003 1 \pm 0.000 4$ vs. $0.006 6 \pm 0.000 7$; $0.003 3 \pm 0.000 5$ vs. $0.005 6 \pm 0.000 6$, $P < 0.01$), and also the level of Smad5 was decreased ($0.001 7 \pm 0.000 3$ vs. $0.004 2 \pm 0.000 4$, $P < 0.05$). There were no differences on the BMP-2 gene expression between the two groups ($0.006 9 \pm 0.002 0$ vs. $0.010 5 \pm 0.002 1$, $P > 0.05$). Serum protein levels of RANKL were higher in SLE patients than those in controls ($P < 0.01$), while OPG levels had no differences between the two groups, which led to an decreased ratio of OPG/RANKL ($P = 0.006$) in SLE patients. Analysis showed that positive correlation between mRNA level of Smad8, ratio of OPG/RANKL and ESR levels of SLE patients ($P < 0.05$). Moreover, mRNA levels of Smad8 and OPG were found positively related ($P < 0.01$), while that of Smad1 and RANKL were negatively related ($P < 0.01$). **Conclusion:** The gene expressions of BMP/Smads signaling pathway were abnormal in SLE patients, which may be involved in the mechanism of unbalanced bone metabolism of patients.

[Key words] systemic lupus erythematosus; peripheral blood mononuclear cells; bone metabolism; gene expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(01):055-059]

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种累及多脏器的、常见的自身免疫性疾病。近年来 SLE 患者生存率显著提高,骨骼代谢异常成为影响 SLE 患者生活质量的突出问题。参与骨代谢的信号通路包括 OPG/RANKL、BMP/Smads 等。本研究旨在检测 SLE 患者外周血单个核细胞以上信号通路基因的表达情况及相互之间的关系,探讨其与 SLE 患者疾病活动的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

选择 2013 年 3—10 月在江苏大学附属医院风湿科就诊的 SLE 患者共 26 例,其中女 23 例,男 3 例,年龄 11~57 岁,平均(29.93 ± 13.70)岁,所有患者符合美国风湿病学会 1997 年分类标准。本研究纳入患者均为非初发,其中抗 ds-DNA 阳性者 16 例,补体 C3 减低者 18 例。

正常对照组 20 例,其中女 17 例,男 3 例,年龄 13~54 岁,平均(31.60 ± 11.75)岁,均为健康体检者,年龄与患者组相比无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 实时定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)

采集 SLE 患者和正常对照组外周静脉血 5 mL,肝素抗凝。淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司)从外周血中分离出淋巴细胞,TRIzol (Invitrogen Life Technologies 公司,美国)抽提淋巴细胞 RNA,SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit (TaKaRa 公司,日本)检测 OPG、RANKL、BMP-2、Smad1/5/8、mRNA 的表达量,以 GAPDH 作为内参照,每个样本设置 3 个复孔,取其平均值进行比较。qRT-PCR 后获得其 C_T 值,与 GAPDH 的 C_T 差值记为 ΔC_T ,以

$2^{-\Delta C_T}$ 表示 RANKL 和 OPG 在淋巴细胞中的相对表达量。上述基因引物序列如下:OPG 上游引物 5'-GCAATCGCACCCACAACCG-3',下游引物 5'-AGCTTGCACCACTCCAAATCCAG-3';RANKL 上游引物 5'-TGATGAAAGGAGGAAGCAC-3',下游引物 5'-CCAAACATCCAGGAAATACA-3';BMP-2 上游引物 5'-AGAAAAACGTCAAGCCAAAC-3',下游引物 5'-AATCCAGTCATTCCACCCCA-3';Smad1 上游引物 5'-CAAGATCCCTAGTGGGTGTA-3',下游引物 5'-CCTGGCGGTGGTATTCT-3';Smad5 上游引物 5'-CTATGTTGGTGGAGAGGTG-3',下游引物 5'-CT-TACAGACAGTGGTGGGA-3';Smad9 上游引物 5'-TAACTACGAGGGACCAGCCAAG-3',下游引物 5'-CAGGACACCCAGGTTGTTAAAT-3'。

1.2.2 血清 OPG 和 RANKL 水平测定

采用酶联免疫吸附法检测,按照说明书进行操作。OPG、RANKL 酶联免疫(ELISA)试剂盒分别购自美国 Bio Vendor 公司和 Sigma 公司。

1.2.3 SLE 患者抗 ds-DNA、补体 C3 水平测定

由江苏大学附属医院中心实验室分别采用 ELISA 及免疫散射比浊法检测。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS16.0 软件进行统计学处理,两组间计量资料比较采用成组 t 检验,成组设计资料不满足 t 检验的则采用 Mann-Whitney U 秩和检验,变量之间的相关性采用 Pearson 相关分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 患者外周血单个核细胞 OPG 和 RANKL

mRNA 的表达

OPG 基因 mRNA 表达水平较正常对照组减低 (0.0025 ± 0.0007 vs. 0.0176 ± 0.0067 , $P < 0.05$, 图 1A), RANKL mRNA 水平较正常对照组增高, 但两者无统计学差异 (0.0033 ± 0.0010 vs. 0.0024 ± 0.0009 , $P > 0.05$, 图 1B)。

2.2 SLE 患者血清 OPG、RANKL 蛋白水平

RANKL 蛋白表达较正常对照组明显增高 [(362.492 ± 76.180) pg/mL vs. (179.372 ± 39.800) pg/mL, $P < 0.01$], OPG 蛋白表达与正常对照组相比无明显统计学差异 [(299.582 ± 235.467) pg/mL vs. (213.389 ± 38.243) pg/mL, $P > 0.05$], 血清 OPG/RANKL 较正常对照组明显减低 ($P=0.006$)。

2.3 SLE 患者外周单个核细胞 BMP-2、Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 的表达

BMP-2 基因 mRNA 表达水平与正常对照组相比无统计学差异 (0.0069 ± 0.0020 vs. 0.0105 ± 0.0021 , $P > 0.05$), Smad1 (0.0031 ± 0.0004 vs. 0.0066 ± 0.0007), Smad5 (0.0017 ± 0.0003 vs. 0.0042 ± 0.0004), Smad8 (0.0033 ± 0.0005 vs. 0.0056 ± 0.0006) mRNA 水平较对照组显著降低 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.4 SLE 患者血清 OPG/RANKL 比值与补体 C3、

ESR 及抗 ds-DNA 的相关性

SLE 患者血清中 OPG/RANKL 水平与其血沉水平呈正相关, 相关系数 $r=0.721$, 相关性显著, $P < 0.01$, 而与体内补体 C3、抗 ds-DNA 水平则无明显相关性 ($P > 0.05$, 图 3A)。

2.5 SLE 患者 BMP-2、Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 水平与 C3、ESR 及 ds-DNA 相关性

相关性分析显示: SLE 患者 Smad8 mRNA 水平与血沉呈负相关, $r=-0.626$, 相关性显著 ($P < 0.05$, 图 3B), 而补体 C3、抗 ds-DNA 水平与其基因表达量无明显相关性 ($P > 0.05$)。BMP-2、Smad1、Smad5 mRNA 水平则与补体 C3、ESR 及 ds-DNA 无明显相关性 ($P > 0.05$)。

2.6 SLE 患者 OPG、RANKL 与 BMP-2/Smad1/5/8 mRNA 表达水平的相关性分析

通过 Pearson 相关性检验发现: OPG mRNA 在 SLE 患者外周血中表达水平与 Smad8 mRNA 表达水平呈正相关, $r=0.763$, 相关性显著 ($P=0.004$, 图 4A), 而 RANKL 与 Smad1 mRNA 基因表达呈负相关, $r=-0.670$, 相关性显著 ($P=0.012$, 图 4B)。

3 讨论

SLE 是一种病因和发病机制尚不完全清楚的自身免疫性疾病, 目前认为可能与遗传、环境等因素综合作用引起的机体免疫调节功能紊乱有关^[1]。T、B 淋巴细胞功能异常是 SLE 患者发病的关键环节^[2-3]。随着诊疗水平的提高, SLE 患者的骨量减少、骨质疏松等骨代谢异常问题日益受到重视。骨平衡的维持依赖于破骨与成骨的有序过程, 其中 OPG/RANKL、BMP/Smads 等骨代谢关系因子组成的信号通路发挥了重要的作用。

研究显示 SLE 患者血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 (IL-6) 等炎症因子升高^[4], 异常增高的 TNF- α

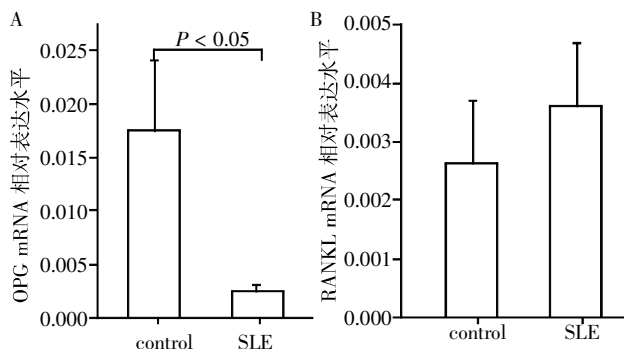


图 1 OPG、RANKL mRNA 表达水平

Figure 1 The mRNA levels of OPG and RANKL

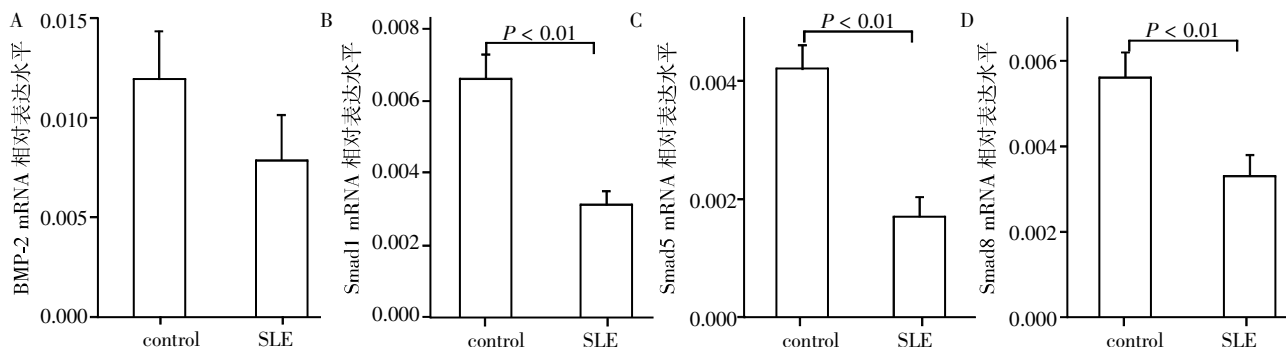


图 2 SLE 患者外周单个核细胞 BMP-2、Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 的表达

Figure 2 The mRNA levels of BMP-2, Smad1, Smad5 and Smad8

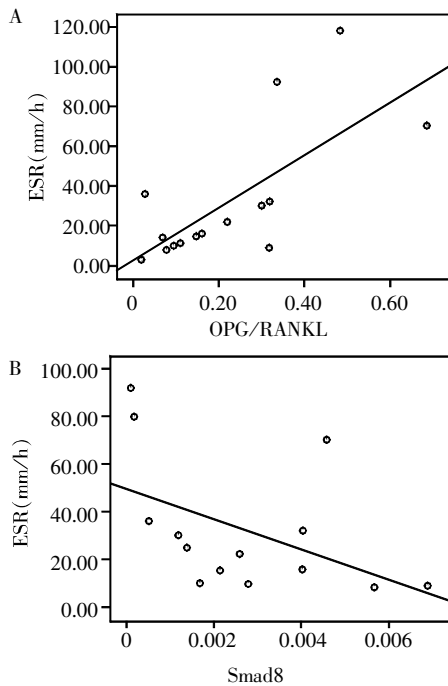


图 3 SLE 患者 OPG/RANKL 和 Smad8 mRNA 水平与血沉的相关性

Figure 3 The relationship between OPG/RANKL ratio and ESR or the mRNA levels of Smad8 and ESR of SLE patients

可同时促进破骨细胞分泌 RANK 和成骨细胞分泌 RANKL, RANK 和 RANKL 结合, 招募共结合分子, 激活核因子 κ B(NF- κ B), 继而激活下游蛋白 NFATc1, 继而启动破骨细胞活化和成熟的相关基因, 从而活化破骨细胞、加速破骨细胞的成熟, 导致骨破坏增加^[5-6]; 破骨活化的同时, 可刺激成骨细胞表达 OPG, OPG 与 RANK 的结合可抑制其与 RANKL 的结合, 从而抑制破骨的过程^[6]。因此 OPG/RANKL 的比值一定程度上反映了细胞成骨与破骨的代谢状态。

本研究发现, SLE 患者外周血单个核细胞 OPG mRNA 水平较正常对照组低, RANKL mRNA 表达无差异, 而郑一君等^[7]研究发现初发 SLE 患者外周血淋巴细胞 OPG、RANKL 的基因表达均较正常对照组低; Carmona-Fernandes 等^[8]检测 103 例 SLE 患者血清发现 OPG 蛋白表达较对照组低, RANKL 蛋白的表达在两者间无统计学差异, 而本研究则显示, SLE 患者血清 RANKL 表达增高, OPG 表达与正常对照组无差异。不同的研究由于患者的选择、用药情况、疾病的活动度等不同, 可能得出不同的结果。但 RANKL/OPG 比值无论在 mRNA 还是蛋白水平均升高, 提示 SLE 患者破骨相对处于活跃状态。

本研究所纳入的患者均为非初发 SLE 患者, 均有使用糖皮质激素史, 研究显示糖皮质激素可通过

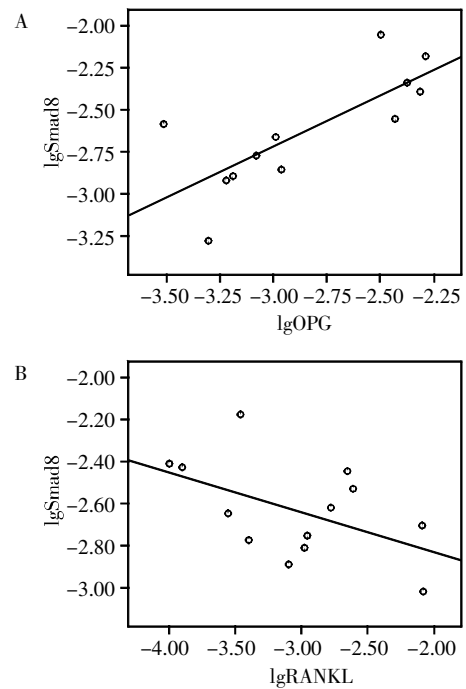


图 4 SLE 患者 OPG、RANKL 与 Smad1、Smad8 mRNA 水平的相关性分析

Figure 4 The relationship between the mRNA levels of Smad1, Smad8 and OPG, RANKL of SLE patients

抑制 OPG 的生成, 促进成骨细胞表面 RANKL 的表达, 致使导致 RANKL/OPG 比值增高, 促进破骨细胞分化、活化, 导致骨量的减少^[9]。因此, 本研究不能完全排除糖皮质激素对 RANKL/OPG 结果的影响。

BMP/Smads 通路是调控成骨的重要通路之一。BMP 蛋白与其 II 型受体结合并激活该受体后, 进一步磷酸化 I 型受体, 使 Smad1/5/8 蛋白磷酸化, 进入核内调控相关成骨因子的转录^[10]。本课题组前期研究发现体外培养的 SLE 患者骨髓间充质干细胞 (BMMSCs) 中 BMP/Smads 信号通路抑制, 成骨能力低下^[11]; 在此, 进一步检测患者外周血单个核细胞, 显示 Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 表达水平明显减少, 提示 SLE 患者成骨的相对低下状态。

ESR、补体 C3、dsDNA 水平均是 SLE 活动的指标之一。ESR 是 SLE 活动的非特异指标, 其增长往往提示有炎症反应^[12]; 而文献报道血清 C3 则与狼疮的血管炎、dsDNA 水平与狼疮患者肾损害相关^[12-13]。本研究发现 SLE 患者 Smad8 mRNA 水平与 ESR 呈负相关, 而未发现其与补体 C3、dsDNA 的相关性, 提示炎症可能是 BMP/Smads 抑制的原因之一, 将进一步研究 Smad8 mRNA 与各脏器受累情况的相关性。

目前研究认为, SLE 患者的骨质疏松是传统的致骨质疏松因素, 如避光、少运动、药物及疾病炎症

等多种因素共同作用的结果^[14]。以 TNF- α 为主的炎症因子诱导破骨细胞的活化是骨量减少的主要机制。本研究发现,SLE 患者血清中 RANKL/OPG 比值水平与其血沉呈正相关,进一步提示了炎症是骨破坏的原因之一。

本课题组前期的体外实验发现,SLE 患者 BMMSCs TNF- α 活化 NF- κ B 信号通路,抑制了 BMP/Smads 信号通路,从而使其成骨减弱^[11]。本研究通过相关分析显示,SLE 患者外周血单个核细胞 BMP 信号通路减弱,Smad8 mRNA 水平与 OPG mRNA 正相关,Smad1 mRNA 水平与 RANKL 与 mRNA 呈负相关,提示破骨的活化抑制 Smads 信号通路,RANKL/OPG 通路与 BMP/Smads 可能存在互相制约的关系。

总之,本研究结果显示,SLE 患者外周血单个核细胞 BMP/Smads 信号通路减弱,RANKL/OPG 比值下降,二者之间可能存在互相制约的关系,与疾病活动有关。今后将进一步探究其在 SLE 骨质疏松发病中的具体机制。

[参考文献]

[1] Sun YN,Feng XY,He L,et al. Prevalence and possible risk factors of low bone mineral density in untreated female patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Biomed Res Int*,2015,2015:510514

[2] Peng SL. Altered T and B lymphocyte signaling pathways in lupus[J]. *Autoimmun Rev*,2009,8(3):179-183

[3] Fernandez D,Perl A. Metabolic control of T cell activation and death in SLE[J]. *Autoimmun Rev*,2009,8(3):184-189

[4] Aringer M,Smolen JS. SLE-complex cytokine effects in a complex autoimmune disease:tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Res Ther*,2003,5(4):172-177

[5] Zwerina J,Hayer S,Tohidast-Akrad M,et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor,interleukin-1,and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis:effects on synovial inflammation,bone erosion,

and cartilage destruction[J]. *Arthritis Rheum*,2004,50(1):277-290

[6] Kwan Tat S,Padrines M,Théoleyre S,et al. IL-6,RANKL,TNF-alpha/IL-1:interrelations in bone resorption pathophysiology[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*,2004,15(1):49-60

[7] 郑一君,胡大伟,陈顺乐,等. RANKL、OPG 在初发系统性红斑狼疮患者中的表达及意义[J]. *中国骨质疏松杂志*,2009,15(1):36-39

[8] Carmona-Fernandes D,José Santos M,Pedro Perpétuo I,et al. Soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin ratio is increased in systemic lupus erythematosus patients[J]. *Arthritis Res Ther*,2011,13(5):R175

[9] Hofbauer LC,Gori F,Riggs BL,et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells:potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Endocrinology*,1999,140(10):4382-4389

[10] Wang L,Zhang X,Guo Y,et al. Involvement of BMPs/Smad signaling pathway in mechanical response in osteoblasts [J]. *Cell Physiol Biochem*,2010,26(6):1093-1102

[11] Tang Y,Xie H,Chen J,et al. Activated NF- κ B in bone marrow mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients inhibits osteogenic differentiation through downregulating Smad signaling [J]. *Stem Cells Dev*,2013,22(4):668-678

[12] Pisetsky DS. Anti-DNA and autoantibodies [J]. *Curr Opin Rheumatol*,2000,12(5):364-368

[13] Alarcón-Segovia D,Tumlin JA,Furie RA,et al. LJP 394 for the prevention of renal flare in patients with systemic lupus erythematosus:results from a randomized,double-blind,placebo-controlled study [J]. *Arthritis Rheum*,2003,48(2):442-454

[14] Garcíá-Carrasco M,Mendoza-Pinto C,Riebeling C,et al. Influence of prevalent vertebral fractures on the quality of life of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Isr Med Assoc J*,2011,13(6):333-337

[收稿日期] 2015-06-23