

系统性红斑狼疮患者 STAT4 基因 mRNA 和血清中 IL-12、IFN- γ 的表达

杨小蕾, 邓丹琪

(昆明医科大学第二附属医院皮肤科, 云南 昆明 650101)

[摘要] **目的** 研究 SLE 患者 STAT4 的表达与患者血清中细胞因子 IL-12、IFN- γ 的关系, 探讨它们在 SLE 发病中的作用与狼疮疾病活动程度的关系. **方法** 应用 QPCR 检测患者血液中 STAT4 的表达. 应用 ELISA 方法检测正常对照组与 SLE 患者血清中 IL-12、IFN- γ 的水平. 所有数据资料用 Plink 1.06 及 SPSS16.0 软件进行统计分析. **结果** (1) SLE 病人 STAT4 mRNA 的相对表达量高于正常对照组 ($P < 0.01$), STAT4 表达水平与 SLEDAI 评分成正相关 ($r = 0.385$, $P < 0.05$); (2) rs10181656 G 等位基因的突变与 STAT4 mRNA 的表达水平升高有关; (3) SLE 组 IFN- γ 、IL-12 含量高于正常组 ($P < 0.01$); IFN- γ 、IL-12 含量与 SLEDAI 评分呈正相关 ($P < 0.05$); (4) STAT4 mRNA 的表达与 IFN- γ ($r = 0.335$, $P < 0.05$)、IL-12 ($r = 0.401$, $P < 0.05$) 显著正相关, 与其他临床及实验室指标蝶形红斑 ($r = 0.471$, $P < 0.000$)、粘膜溃疡 ($r = 0.552$, $P = 0.000$)、浆膜炎 ($r = 0.311$, $P = 0.014$)、肾损害 ($r = 0.247$, $P = 0.042$)、血液损害 ($r = 0.256$, $P = 0.0037$) 成正相关 ($P < 0.05$). **结论** (1) SLE 患者中 STAT4 基因的表达水平增高并与 SLE 疾病活动相关, 可以作为监测病情活动性的检测指标; (2) SLE 患者的 IFN- γ 、IL-12 异常高表达, 而且与 SLEDAI 评分呈正相关, IFN- γ 、IL-12 可以作为判断 SLE 疾病活动的参考指标. STAT4 对 IL-12、IFN- γ 的表达有正相调节作用, 在基因水平上调控 IL-12、IFN- γ 并促进其 mRNA 的表达.

[关键词] 系统性红斑狼疮; STAT4; SLEDAI; IL-12; IFN- γ

[中图分类号] R758.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2013) 04-0035-08

The Expression Levels of STAT4 mRNA and Serum Levels of IL-12 and IFN- γ in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

YANG Xiao-lei, DENG Dan-qi

(Dept. of Dermatology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the STAT4 mRNA expression levels, the serum levels of IL-12 and IFN- γ in peripheral blood of patients and normal individuals, and to explore its possible role in the pathogenesis of SLE. **Methods** STAT4 expression of SLE patients and normal controls were analyzed with QPCR technique. ELISA was applied to determine the serum levels of IFN- γ and IL-12. The data were analyzed with the Plink 1.06 software and spss 16.0. **Results** 1. The expression levels of STAT4 mRNA of SLE patients were significantly higher than those of control groups ($P < 0.01$). There was a correlation between STAT4 and SLEDAI ($r = 0.385$, $P < 0.05$). 2. The G-allele of rs10181656 increased the expression of STAT4 mRNA. 3. The serum levels of IFN- γ and IL-12 of SLE patients were significantly higher than those of normal controls ($P < 0.01$). The serum levels of IFN- γ and IL-12 were positively correlated to SLEDAI ($P < 0.05$). 4. The expression levels of STAT4 mRNA showed a positive correlation with IFN- γ ($r = 0.335$, $P = 0.009$) and IL-12 ($r = 0.401$, $P = 0.002$), and showed a positive correlation with serositis, hematological, kidney damage and butterfly rash ($P < 0.05$).

[基金项目] 云南省科技厅科技计划联合专项基金资助项目 (2008C0025R)

[作者简介] 杨小蕾 (1982~), 女, 云南保山市人, 医学硕士, 助教, 现任职于昆明医科大学继续教育学院, 主要从事教学管理工作.

[通讯作者] 邓丹琪. E-mail: danqid@hotmail.com

Conclusions 1. The expression levels of STAT4 mRNA of SLE increase and correlate with SLEDAI, so the expression levels of STAT4 might be used as a referential indicator, suggesting STAT4 may play a role in development of SLE and correlate with the severity of SLE. 2. The serum levels of IFN- γ and IL-12 increase, and show a positive correlation with SLEDAI, suggesting that IFN- γ , IL-12 may be as parameters of SLE activity. According to the mRNA expression levels of STAT4 associated with IFN- γ and IL-12, we conclude that STAT4 may have active effect on IFN- γ and IL-12 in the gene level. STAT4 may regulate IFN- γ , IL-12 and enhance the mRNA expression of the two cytokines.

[**Key words**] Systemic lupus erythematosus; STAT4; SLEDAI; IL-12; IFN- γ

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是自身免疫介导的, 以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病。该疾病有两个主要临床特征, 即血清中出现以抗核抗体 (antinuclear antibody, ANA) 为代表的多种自身抗体和累及多系统多器官^[1-3]。SLE 是一种自身免疫病, 有着明显的免疫调节紊乱, 异常表达的细胞因子参与 SLE 的发病, 有的研究观察到 SLE 外周血单个核细胞中 IL-2, IFN- γ , TNF- α 和 IL-12 生成减少^[4-6], 但是许多实验又证明了 SLE 中 IL-12, TNF- α , IFN- γ 等表达水平升高^[6,7], 这些结果表明了 SLE 中复杂的细胞因子网络可能在 SLE 的发病和活动中起到重要作用。IL-12 是一种具有多种生物学活性的免疫调节因子, 它可由巨噬细胞和树突细胞产生, 其通过特异识别表达在 NK 细胞, 活化的 T 和 B 细胞表面的 IL-12R, 经由 JAK/STAT 途径向细胞内转导信号, 最终实现诱导 NK 细胞和活化 T 细胞 IFN- γ 的表达, 增强效应细胞的细胞毒性, 诱导活化 T 细胞的增殖并促进 Th1 细胞极化的生物学效应^[8]。IFN- γ 是水溶性二聚体的细胞因子, 是 II 型干扰素的唯一成员。IFN- γ 主要由活化的 T 淋巴细胞和 NK 细胞产生, 它是 I 型辅助 T 细胞的标志性的细胞因子。IFN- γ 具有抗病毒、免疫调节及抗肿瘤特性。可以与结合到 IFN- γ 受体, IFN- γ 结合激活其受体调节 JAK/STAT 通路。已有研究表明, 干扰素诱导基因在系统性红斑狼疮患者中的表达水平显著上升^[9], IL-12 与自身免疫系统疾病密切相关, 并参与狼疮性肾炎的发生和发展^[10]。前期的研究显示 STAT4 基因的 RS10181656 与 SLE 相关, 因为一个基因除编码特定蛋白质的结构序列外, 还包含有一些非转录序列。如顺式激活原件, 内含子以及增强子等 DNA 片段。这些片段中有些结构具有调节基因转录功能的功能。如果这些功能序列发生改变, 尽管可能并不影响基因编码蛋白质的性质, 但是蛋白质的表达可能因此受到一定程度的影响。因此笔者进一步研究其对基因功能的影响及分析细胞因子

与 STAT4 基因之间的关系及它们之间的相互作用能否引起自身免疫性疾病中的免疫紊乱。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 根据知情同意原则, 所有研究对象来自昆明医科大学第二附属医院皮肤性病 / 风湿免疫科 2008 年 1 月至 2010 年 12 月住院及门诊根据 1997 年美国风湿病协会 (ACR) 修订的 SLE 分类标准诊断的 SLE 患者 (389 例), 对照者为正常体检者或者在皮肤科门诊就诊的无 SLE 和自身免疫性疾病的患者。同时要求其一、二、三级亲属中也均无 SLE 患者。其中病人 378 例, 男 41 例, 女 337 例, 男女比为 1:8.2, 平均 (32.10 ± 10.04) 岁。正常对照组 389 人, 男 46 例, 女 343 例, 男女比为 1:7.5, 平均 (27.41 ± 13.90) 岁, 与病例组在性别和年龄构成等方面均无显著差异 ($P > 0.05$)。临床资料的采集: (1) 采血前, 详细询问所有患者病史, 记录就诊时存在的有关的症状、体征及进行体格检查; (2) 进行相关实验室检查: 拍摄胸部正位 X 光片、心脏彩超、血常规检查、小便常规检查、ANA 和抗 ds-DNA 抗体的检测、ENA 抗体谱检测、补体检测、根据系统性红斑狼疮疾病活动指数 (SLEDAI) 判断疾病的活动情况。

1.1.2 主要试剂 QPCR 检测目的基因 STAT4 的试剂: 1) RNApure pure 血液样本总 RNA 提取试剂盒 (天根生化); 2) Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化); 3) 无水乙醇 (国产); RNase H (Invitrogen); 4) Taq PCR Master Mix (天根生化); 5) Realmaster Mix (SYBR Green) (天根生化); 6) 引物 (Invitrogen)。RNA 提取试剂: 1) 红细胞裂解液; 2) 裂解液 RL; 3) 去蛋白液 RW1; 4) 漂洗液 RW; 5) RNase-free ddH₂O (瓶装); 6) RNase-free 吸附柱 CR2; 7) RNase-free 过滤柱 CS; 8) DNase I (1 500 U); 9)

缓冲液 RDD;10)RNase-free ddH₂O (管装);11)RNase-free 离心管 (1.5 mL);12)RNase-free 收集管 cDNA 第一链合成试剂:1)Quant reverse Transcriptase 2)oligo (dT)15(10 μ M) 3)Random (10 μ M) 4)10 $\times$ RT mix 5)RNase-free ddH₂O 6)超纯 dNTP (2.5 mM each) PCR:1)ddH₂O (天根生化);2)2*pcr master mix(天根生化)Qpcr:1)ddH₂O(天根生化)2)2.5*RealMasterMix/20*SYBR solution (天根生化). IL-12 与 IFN- γ 的测定:人 IL-12 ELISA 试剂盒(武汉晶美生物工程有限公司) 人 IFN- γ ELISA 试剂盒(武汉大风生物工程有限公司) .

1.2 方法

提取外周静脉血 (SLE 患者和正常对照各 50 例, 其中的 50 例 SLE 患者已经进行了 Sequenom SNP 基因分型实验), 将样本血液放入 5 mL 的试管中, 内含已配置好的抗凝 DTA 溶液 0.4 mL(抗凝剂为 EDTA, 禁用肝素, 因为肝素抑制聚合酶链反应) .

QPCR 用 RNAprep pure 血液总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, Agilent2100 检测 RNA 纯度. Quant cDNA 第一链合成试剂盒反转录合成 cDNA. 通过 qPCR 方法检测 STAT4 基因在病例组和正常组的表达差异.

1) 检测用引物序列: STAT4-F:CAGTGAAA-GCCATCTCGGAGGA; STAT4-R:TGTAGTCTCGC-AGGATGTCAGC; GAPDH:F:GGTCTCCTCTGACTT-CAACA; GAPDH:F:GGTCTCCTCTGACTTCAACA.

2) PCR 反应体系见表 1.

表 1 PCR 反应体系	
Tab. 1 PCR reaction conditions	
组 分	体 积
超纯水	10.75 μ L
2.5*RealMasterMix/20*SYBR solution	11.25 μ L
上游引物 (10uM)	1 μ L
下游引物 (10uM)	1 μ L
模板	1 μ L
总体系	25 μ L

3) PCR 反应条件如下:

95 $^{\circ}$ C	2 min	} 40 周期
95 $^{\circ}$ C	10 s	
61 $^{\circ}$ C	30 s	
70 $^{\circ}$ C	45 s	

ELISA 试剂盒进行血浆中 IL-12、IFN- γ 的测定. 结果判读: 使用 CurveExpert1.3, 根据标准品浓度及 OD 值绘制标准曲线, 然后根据待测样品的 OD 值在该曲线上计算出相应的 IL-12、IFN- γ 含量.

1.3 统计学分析

基因的相对定量方法及分析: 统计分析时用 Δ CT 代表基因的相对定量, CT 是目标扩增产物达到设定阈值所经历的循环数, 每个 CT 值与该模板的起始拷贝数的对数成负相关. Δ CT = 目的基因 CT 值 - 内参基因 CT 值. 运用 SDS2.1 软件对收集检测的荧光信号进行分析, 最后获得的 CT 值, Δ CT 值与 mRNA 表达量呈反比关系. 以目的基因 CT 值减去内参基因 CT 值作为 Δ CT 值, 再减去板间对照样本的 Δ CT 值作为 $\Delta\Delta$ CT 值, 以 $2^{-\Delta\Delta$ ct} 值量化代表目的基因的相对表达量. 各因子之间以及和 SLE 患者部分临床表现和实验指标的相关性采用相关性分析, 正态分布的采用 Pearson 相关性分析. SLE 病例组不同基因型 STAT4 基因 mRNA 表达比较, 采用 *t* 检验.

2 结果

2.1 RNA 的完整性

2.1.1 总 RNA 纯度检测 上述所提取的全血 RNA, 经 ND1000 分光光度计 A260/A280 比值检测在 1.7 ~ 2.1 之间, 浓度为 0.2 ~ 0.4 μ g/ μ L, 符合实验的要求.

2.1.2 总 RNA 完整性的检测 RNA 提取结果显示 SLE 患者和正常人 RNA 经琼脂糖凝胶电泳, 可观察到两 18 s、28 s 两条带, 说明了提取的 RNA 的完整性, RNA 完整无降解, 可以满足后面实验的要求, 如图 1 所示, 图为部分 RNA 的电泳图.

2.2 PCR 的检测结果

内参 GAPDH 基因以及 STAT4 基因的引物的溶解曲线、扩增曲线如图 (2 ~ 5), 实时荧光定量检测 GAPDH、STAT4 扩增产物的特异性. 通过溶解曲线和扩增曲线可以看出产物特异性较高.

SLE 患者和正常对照组 STAT4 基因 mRNA 的表达水平比较: SLE 患者 STAT4mRNA 的相对表达量高于正常组, 统计结果 SLE 组和正常组比较有显著差异 ($P=0.022$), 差异具有统计学意义如图 6 所示.

2.3 SLE 患者 STAT4 基因 mRNA 的表达水平与 SLEDAI 积分的比较

在 SLE 患者中, STAT4 的表达量 ($0.071 \pm$

0.024)；与 50 例病人 SLEDAI 平均积分 (22.38 ± 5.134) 之间成正相关 ($r=0.396$, $P=0.002$)，如图 7 所示。

2.4 血清中 IFN- γ 、IL-12 的表达

2.4.1 SLE 组和正常组中 IFN- γ 和 IL-12 水平 SLE 组和正常组中 IFN- γ 水平分别为 (504.11 ± 133.76) PG/mL、(226.93 ± 52.00) PG/mL，其含量的比较差异有显著性， $P<0.01$ 。SLE 组和正常组中 IL-12 水平分别为 (765.09 ± 226.24) PG/mL，(156.92 ± 78.24) PG/mL，其含量差异具有显著性 $P<0.01$ (表 3)。

2.4.2 IFN- γ 、IL-12 与 SLE 疾病活动度的相关性 根据病人的临床表现、相关实验室指标按 SLEDAI 评分标准，50 例 SLE 病人的平均 SLEDAI 评分为 (22.38 ± 5.134)。经 Pearson 相关性分析，SLE 患者外周血 IFN- γ 水平、IL-12 水平与 SLEDAI 积分之间具有相关性分别 (图 8、图 9)。

2.4.3 STAT4 基因 mRNA 表达水平与 IFN- γ 、IL-12 的相关性 经 Pearson 相关性分析，SLE 患者 STAT4 基因 mRNA 表达量 (0.071 ± 0.024) 与外周血 IFN- γ 的水平 ($P<0.0001$)，见图 10。IL-12 的水平均成正相关 ($P=0.001$)，见图 11。

2.5 STAT4 基因 mRNA 表达水平与 SLE 患者各临床表型的相关性

在 SLE 患者中 STAT4 基因 mRNA 的表达量与蝶形红斑 ($r=0.471$, $P=0.000$)、粘膜溃疡 ($r=0.552$, $P=0.000$) 浆膜炎 ($r=0.311$, $P=0.014$)、肾损害 ($r=0.247$, $P=0.042$)、血液损害 ($r=0.256$, $P=0.0037$) 成正相关，如表 4 所示。

2.6 rs10181656G 等位基因与 STAT4 基因 mRNA

NA 表达量的关系

选取了之前提取了 RNA 的 50 例 SLE 患者和 50 例正常对照，分析 rs10181656 不同基因型的患病率，根据基因型分为 2 组 (CC 组；GG+CG 组)，结果显示 GG+CG 组的患病率远远高于 CC 组，(GG+CG: 42%, CC: 8%, $P=0.004$)，如图 12 所示。同时分析这 2 组基因型 (CC 组；GG+CG 组) 的 mRNA 的表达量，经 t 检验，2 组的 STAT4 基因 mRNA 的表达量 (CC 组 0.0054 ± 0.012 ；GG+CG 组 0.1155 ± 0.207) 之间有显著差异性 ($P=0.017$)，如图 13 所示。

3 讨论

SLE 是一种常见的自身免疫性疾病，好发于育龄期妇女，与遗传、感染、内分泌及诸多环境因素有关，由于机体免疫调节功能紊乱导致多系统慢性炎症性病变。研究证明，细胞因子异常表达可能参与自身免疫性疾病的发病。JAK/STAT 信号途径是继 Ras 途径之后的又一重要的细胞因子信号转导通路。在信号转导和转录活化因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 家族的各成员中，主要被 IL-12 激活的 STAT4 蛋白被认为在 Th1/Th2 的分化调控及因此失调引发的各种炎症性疾病中发挥着重要的作用。1995 年发现第 1 个能诱导 STAT4 磷酸化而活化的细胞因子 IL-12，随后陆续发现 IFN $2\alpha/\beta$ ，IL-23 也可激活 STAT4。但 IL-12 仍为 STAT4 标志性的激活因子。当 IL-12 与相应受体结合后，IL-12R 发生二聚化，激活与之偶联的蛋白酪氨酸激酶 (janus kinase, JAK) (JAK2 和 TYK2)，继而使受体信号转导链 $\beta 2$

表 2 SLE 组和正常组的 STAT4 基因 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 The relative expression of STAT4 mRNA in SLE group and control group ($\bar{x} \pm s$)

样 品	GAPDH Ct 值平均值	STAT4 Ct 值平均值	Δ CT	$\Delta \Delta$ CT	$2^{-\Delta \Delta CT}$	STAT4mRNA 相对表达量
病例组平均值	13.513	25.503	11.99	0	1	0.071 ± 0.024
正常组平均值	14.656	29.605	14.948	2.957	0.128	0.011 ± 0.061

表 3 各血清中 IFN- γ 、IL-12 水平 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 3 The serum levels of IFN- γ and IL-12 in each group ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	IFN- γ (PG/mL)	IL-12 (PG/mL)
对照组	50	226.93 ± 52.00	156.92 ± 78.24
病例组	50	$504.11 \pm 133.76^{**}$	$765.09 \pm 226.24^{**}$

与对照组比较，** $P<0.01$ 。

表 4 STAT4 基因 mRNA 表达水平与 SLE 患者各临床表型的相关性 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 The correlation between the expression levels of STAT4 mRNA and the clinical types of SLE ($\bar{x} \pm s$)

表 型	STAT4mRNA	<i>r</i>	<i>P</i>
关节炎	0.0778 $\pm$ 0.191	0.036	0.402
蝶形红斑	0.0731 $\pm$ 0.188	0.471	0.000
粘膜溃疡	0.0752 $\pm$ 0.185	0.552	0.000
浆膜炎	0.0177 $\pm$ 0.041	0.311	0.014
肾损害	0.0625 $\pm$ 0.155	0.247	0.042
免疫学异常	0.0723 $\pm$ 0.459	0.063	0.333
血液减少	0.0754 $\pm$ 0.177	0.256	0.037
神经炎	0.0991 $\pm$ 0.552	0.031	0.425

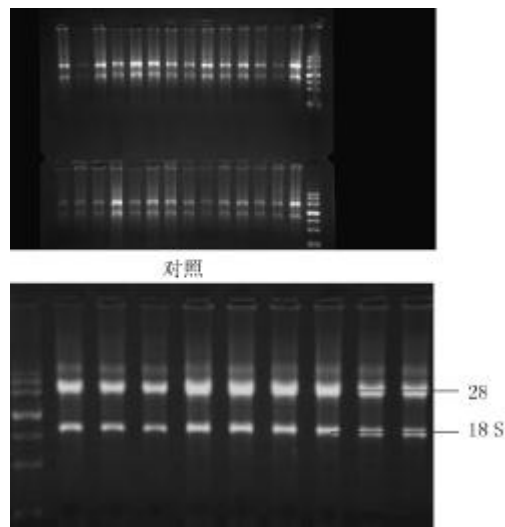


图 1 RNA 电泳图
Fig. 1 RNA electrophoresis figure

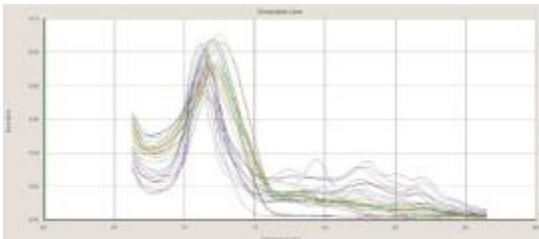


图 4 STAT4 基因溶解曲线
Fig. 4 The dissociation curve of STAT4

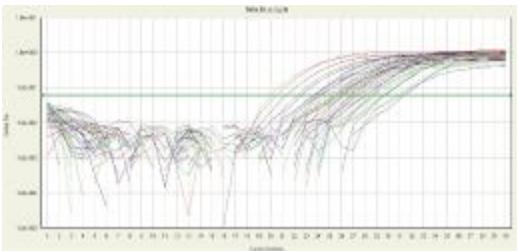


图 5 STAT4 基因扩增曲线
Fig. 5 The amplification curve of STAT4

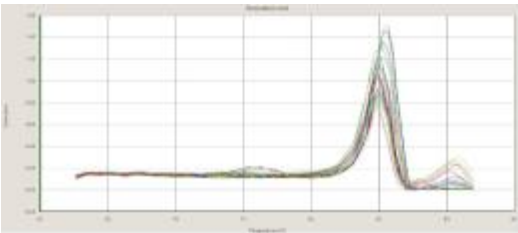


图 2 内参 GAPDH 基因溶解曲线
Fig. 2 The dissociation curve of the internal control GAPDH

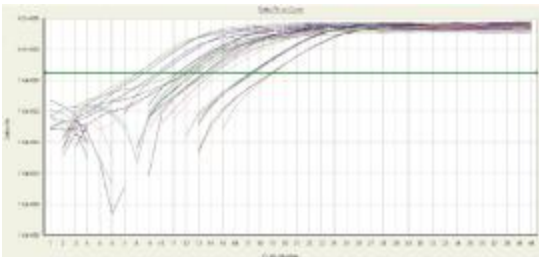


图 3 内参 GAPDH 基因扩增曲线
Fig. 3 The amplification curve of the internal control GAPDH

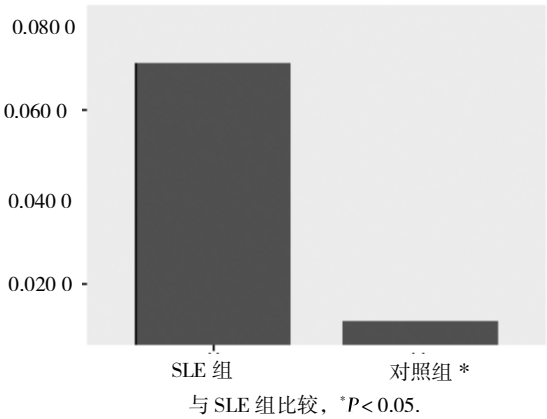


图 6 SLE 患者组与正常对照组 STAT4mRNA 表达水平的比较
Fig. 6 Comparison of the relative expression levels of STAT4 mRNA between SLE group and control group

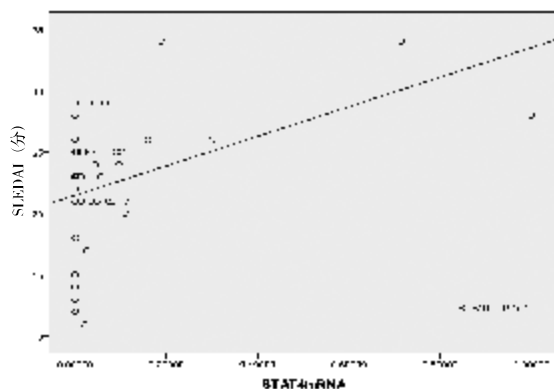


图 7 STAT4 基因 mRNA 的表达量与 SLEDAI 积分的相关性

Fig. 7 The correlation between the expression levels of STAT mRNA and SLEDAI calculus

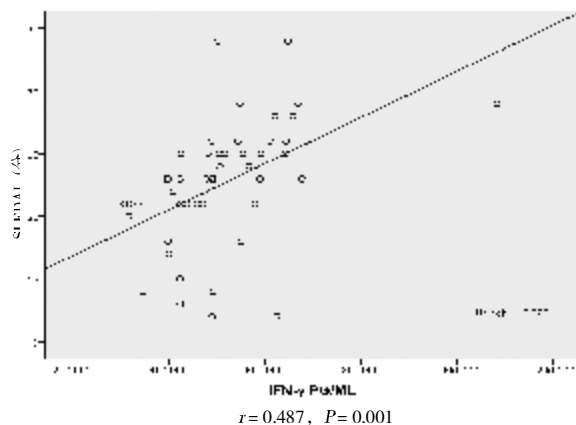


图 8 IFN- γ 浓度与 SLEDAI 积分的相关性

Fig. 8 The correlation between the serum levels of IFN- γ and SLEDAI calculus

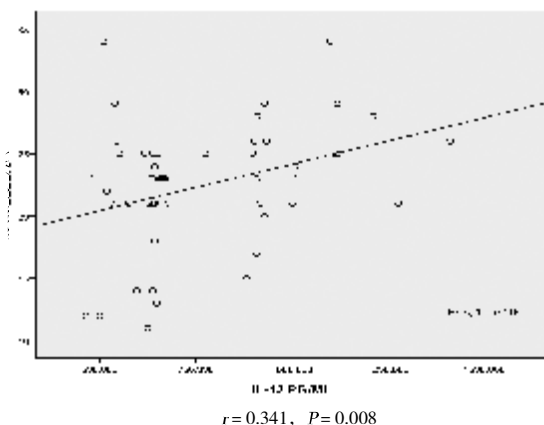


图 9 IL-12 浓度与 SLEDAI 积分的相关性

Fig. 9 The correlation between the serum levels of IL-2 and SLEDAI calculus

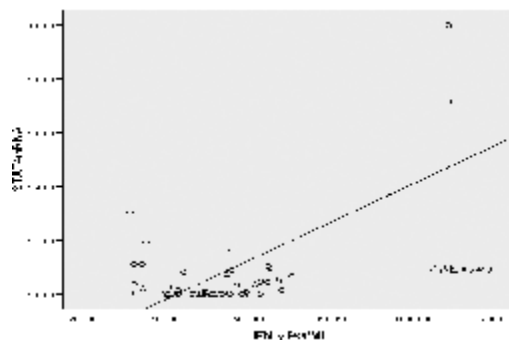


图 10 STAT4 基因 mRNA 的表达量与 IFN- γ 的相关性
Fig. 10 The correlation between the expression levels of STAT4 mRNA and the serum levels of IFN- γ

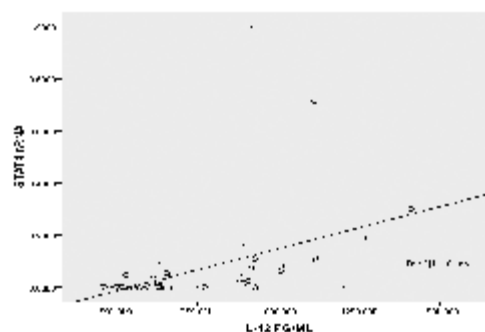


图 11 STAT4 基因 mRNA 的表达量与 IL-12 的相关性
Fig. 11 The correlation between the expression levels of STAT4 mRNA and the serum levels of IL-2

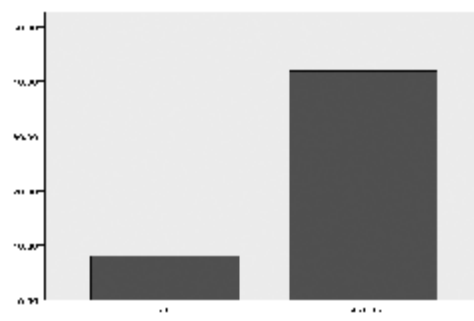


图 12 rs10181656 不同基因型之间患病率的比较

Fig. 12 Comparison of the morbidity among patients with different genotypes of rs10181656

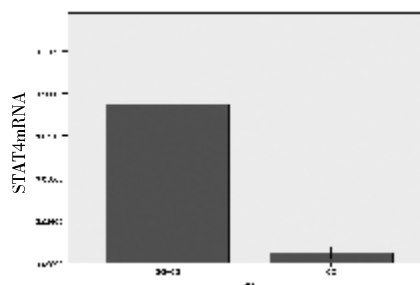


图 13 rs10181656 不同基因型的 SLE 病例 STAT4mRNA 的表达量的比较

Fig. 13 Comparison of the expression levels of STA-4mRNA among SLE patients with different genotypes of rs10181656

胞内段特定区域酪氨酸位点磷酸化,继而作为“锚定点”招募含 SH2 结构域的信号分子 STAT4 单体,并同时使其在 JAKs 作用下激活,活化的 STAT4 单体聚合,形成同源二聚体的形式穿越核膜,识别其特异的 DNA 上的靶序列,启动特异的基因转录^[11]。IL-12 由 p35 和 p40 亚基组成,生理情况下,IL-12 可由巨噬细胞和树突细胞产生,其通过特异识别表达在 NK 细胞,活化的 T 和 B 细胞膜表面的 IL-12R,经由上述 JAK/STAT 途径向胞内转导信号,最终实现诱导 NK 细胞和活化 T 细胞 IFN- γ 的表达,增强效应细胞的细胞毒性,诱导活化 T 细胞的增殖并促进 Th1 细胞的极化的生物学效应^[12]。免疫系统动态平衡的维持依靠多种免疫调节基因的参与,这些免疫调节基因并不能够互补,对于机体正常免疫功能的发挥缺一不可。研究表明,SLE 患者体内存在着细胞因子网络的失衡,免疫系统的稳态被打破,进而导致一系列免疫异常,这在 SLE 的发病机制中发挥重要作用。

笔者检测了 SLE 患者及健康对照者 STAT4 基因 mRNA 表达水平的差异性,结果显示其在患者组中明显升高,由此可推断,STAT4 基因 mRNA 表达与 SLE 这一疾病之间相互关联,进而通过 STAT4 的 mRNA 的表达量与 SLEDAI 积分的关联分析,发现成正相关关系。通过测定 SLE 组与正常对照组人群的 IFN- γ 的含量以及 IL-12 的含量,并将其与 STAT4 的 mRNA 的表达量以及 SLEDAI 积分进行相关性分析,发现在 SLE 患者中 IFN- γ 的含量与 IL-12 的含量异常高表达,并且与 STAT4 的 mRNA 的表达量以及 SLEDAI 积分均成正相关关系。现有研究表明,干扰素诱导基因在系统性红斑狼疮患者中的表达水平显著上升^[13],IL-12 与自身免疫系统疾病密切相关,并参与狼疮性肾炎的发生和发展^[14]。由此进一步验证了 STAT4 基因表达的上升使得干扰素通路异常过度活化,从而促使了 SLE 的发生。此外,SLEDAI 是一个很好地评价 SLE 患者病情活动性的指标,STAT4 基因的表达水平与 IL-12、IFN- γ 有正相关性,提示 STAT4 可能对 IL-12、IFN- γ 的表达有正相调节作用,可能在基因水平上调控 IL-12、IFN- γ 并促进其 mRNA 的表达。实验还检测了 STAT4 基因的表达水平与 SLE 患者各表型的相关性,结果发现 SLE 患者中 STAT4 的 mRNA 的表达量与蝶形红斑、粘膜溃疡、浆膜炎、肾损害、血液损害成正相关。

关于 STAT4 基因多态性与疾病相关性研究越

来越多,在研究中发现的一些与疾病相关的 SNP 基本位于 STAT4 基因的第三内含子中,包括在本研究中的几个 SNP 位点(包括 rs10181656)。已有研究证明内含子能通过选择剪切从而使单一基因产生多种蛋白质,能在不同的水平影响基因的表达,包括影响转录、多腺苷酸化、mRNA 输出及翻译效率等,很多研究显示内含子对于基因的最佳表达是必需的:(1)内含子调节基因表达具有组织特异性;(2)内含子增加蛋白质变异;(3)内含子促进基因转录^[15]。而关于 STAT4 基因 SNP 与 mRNA 的表达的相关性至今尚无报道。因此我们假设 rs10181656 能够影响 STAT4 基因 mRNA 的表达量,为了证明其能够影响 STAT4 基因 mRNA 的表达,实验研究了 rs10181656 不同基因型的病例 STAT4 基因 mRNA 的表达的差别,结果发现 CC 基因型组与 GG+CG 基因型组的 STAT4 基因 mRNA 的表达量之间有显著差异,由此可推测 rs10181656G 位点突变增加了 STAT4 基因 mRNA 的表达量,推测这些 SNP 可能影响基因的剪切或者调控,而才和疾病相关。

总之,SLE 是由多种因素影响导致的免疫功能失调的自身免疫病,笔者研究发现由于 SLE 患者 STAT4 表达水平的升高,IFN- γ 是 STAT4 诱导产生的重要的免疫介质,而 IL-12 作为能诱导 STAT4 磷酸化而活化的细胞因子,IFN- γ 、IL-12 在 SLE 患者中的含量也会升高,可能导致自身免疫耐受平衡被打破。

本研究结果说明了 STAT4 基因内含子多态性可能影响了 STAT4 基因的表达,从而参与了 SLE 疾病的发生和发展,但是确切的机制还需要进一步去探讨。

[参考文献]

- [1] PALOMINO - MORALES R J, ROJAS-VILLARRAGA A, GONZALEZ C I, et al. STAT4 but not TRAF1/C5 variants influence the risk of developing rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Colombians [J]. *Genes Immun*, 2008, 9(4): 379 - 382.
- [2] MARASINI B, MASSAROTTI M, DE MONTI M, et al. Genetic contribution to carotid vascular disease in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Clin Immunol*, 2008, 28(2): 131 - 133.
- [3] ZHOU X J, YU L, ZHU L, et al. Association between polymorphisms in the FCGR2 gene and lupus nephritis in Chinese patients [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2009, 27(4): 609 - 614.

- [4] HORWITZ D A, JACOB C. The cytokine network in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and possible therapeutic implications [J]. Syngner Semin Immunopathol, 1994, 16(2):181 – 200.
- [5] LIU T F, JONES B M. Impaired production of IL-12 in systemic lupus erythematosus. IL-12 production in vitro is correlated negatively with serum IL-10, positively with serum IFN- γ and negatively with disease activity in SLE [J]. Cytokines, 1994, 10(4):148 – 153.
- [6] DAVAS E M, TSIROGIANNI A, KAPPOU I, et al. Serum IL-6, TNF α , p55 srTNF α , p75 srTNF α , srIL-12 α levels and disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. Clin Rheumatol, 1999, 18(9):17 – 22.
- [7] JANADI M, BALLA S, DALAAN A, et al. Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and other rheumatic disease [J]. J Clin Immunol, 1993, 13(1):58 – 67.
- [8] HOM G, GRAHAM R R, MODREK B, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf3-BLK and ITGAM-ITGAX [J]. N Engl J Med, 2008, 358(9):900 – 909.
- [9] KORMAN B D, KASTNER D L, GREGERSEN P K, et al. STAT4: genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2008, 8(5):398 – 403.
- [10] REMMERS E F, PLENCE R M, LEE A T, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [J]. N Engl J Med, 2007, 357(10):977 – 986.
- [11] 林莉, 李小洁, 魏晓丽, 等. STAT4的作用机制及其在疾病中的相关性研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(8):784 – 786.
- [12] CHITINS T, NAJAFIAN N, BENOUE C, et al. Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Clin Invest, 2001, 108(5):739 – 747.
- [13] KLINMAN D K, ALFERD D S. Inquiry into murine and human lupus [J]. Immunol Rev, 1995, 144:157 – 185.
- [14] CALIGARIS C F, BERTERO M T, CONVERSO M, et al. Circulating levels of soluble CD30, a marker of cells producing Th2 type cytokines, are increased in patients with SLE and correlate with disease activity [J]. Clin Exp Rheum, 1998, 13(4):339.
- [15] 靳霞, 吕占军. 内含子的进化及基因表达调节 [J]. 生命的化学, 2008, 28(1):33 – 35.

(2013-02-21 收稿)

(上接第34页)

- Biochem, 2011, 358(1-2):229 – 239.
- [2] ABDULLE A M, PATHAN J Y, MOUSSA N, et al. Association between homocysteine and endothelial dysfunction markers in stroke disease [J]. Nutr Neurosci, 2010, 13(1):2 – 6.
- [3] GARGARI B P, AGHAMOHAMMADI V, ALIASGHAR-ZADEH A. Effect of folic acid supplementation on biochemical indices in overweight and obese men with type 2 diabetes [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 94(1):33 – 38.
- [4] WIJEKOON E P, BROSNAN M E, BROSNAN J T. Homocysteine metabolism in diabetes [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt5):1175 – 1179.
- [5] LIM C P, LOO A V, KHAW K W, et al. Plasma, aqueous and vitreous homocysteine levels in proliferative diabetic retinopathy [J]. Br J Ophthalmol, 2012, 96(5):704 – 707.
- [6] TOUSOULIS D, KAMPOLI A M, STEFANADIS C. Diabetes mellitus and vascular endothelial dysfunction: current perspectives [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2012, 10(1):19 – 32.
- [7] GAZZARUSO C, COPPOLA A, MONTALCINI T, et al. Lipoprotein (a) and homocysteine as genetic risk factors for vascular and neuropathic diabetic foot in type 2 diabetes mellitus [J]. Endocrine, 2012, 41(1):89 – 95.
- [8] 柴雁菁, 顾玉, 贺铭, 等. 同型半胱氨酸对骨骼肌组织 p-Akt (Ser-473) 的影响 [J]. 昆明医科大学学报, 2013, 34(1):5 – 8.
- [9] 王雅楠, 顾玉, 黄尤光, 等. 同型半胱氨酸对骨骼肌细胞 GLUT4 表达和分布的影响 [J]. 昆明医学院学报, 2012, 33(1):16 – 19.
- [10] 龚艳琳, 陆付耳, 董慧, 等. 交泰丸及其单味药对2型糖尿病大鼠异位脂肪沉积的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(12):1297 – 1301.
- [11] LI Y, JIANG C, XU G, et al. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro [J]. Diabetes, 2008, 57(4):817 – 827.
- [12] MORSE E, SELIM E, CUNARD R. PPAR α ligands cause lymphocyte depletion and cell cycle block and this is associated with augmented TRB3 and reduced Cyclin B1 expression [J]. Mol Immunol, 2009, 46(16):3454 – 3461.
- [13] TI Y, XIE G L, WANG Z H, et al. TRB3 gene silencing alleviates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetic rat model [J]. Diabetes, 2011, 60(11):2963 – 2974.
- [14] DU K, HERZIG S, KULKARNI R N, et al. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver [J]. Science, 2003, 300(5625):1574 – 1577.

(2013-02-01 收稿)