

抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体影响因素及功能的研究

刘 莹 郭 莎 张 伟

摘 要 **目的** 探讨 SLE 患者血清中抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体水平的降低与慢性炎症的关系;研究血清中抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体与血清 IgM 总浓度的关系;研究血清中抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体在凋亡细胞清除中的作用。**方法** 采用 ELISA 的方法对比健康人、SLE 患者及 IgA 肾病患者血清中的抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体水平;采用 ELISA 的方法及 Spearman 相关性分析研究血清中抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体与血清 IgM 总浓度的关系;采用流式细胞检测技术测定抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体与凋亡细胞的结合情况。**结果** SLE 患者血清抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体水平显著低于健康人及 IgA 肾病患者,而健康人与 IgA 肾病患者二者间该抗体水平则不存在统计学差别;健康人及 SLE 患者血清总 IgM 抗体浓度无统计学差别且这两类人群的血清抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体与总 IgM 抗体浓度呈正相关;抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体与凋亡细胞无明显结合。**结论** SLE 患者血清中抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体水平低下与患者体内存在的慢性炎症无直接关系;SLE 患者血清中抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体浓度的降低不是由于总 IgM 抗体浓度降低引起的,抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体与血清总 IgM 抗体浓度呈正相关;抗 H3_{1~19} K9me IgM 抗体与凋亡细胞的清除无直接关系。

关键词 系统性红斑狼疮 组蛋白修饰 IgM 自身抗体

Factors and Functions of IgM anti - H3_{1~19} K9me Autoantibodies. Liu Ying, Guo Sha, Zhang Wei. Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To understand whether low levels of serum IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies in systemic lupus erythematosus (SLE) patients were caused by chronic inflammation; To study the relationship between serum concentration of IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies and total IgM antibody; To study the effect of serum IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies in apoptotic cell clearance. **Methods** Levels of serum IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies of healthy people, SLE patients and IgA nephropathy patients were compared by ELISA. Serum concentrations of IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies and total IgM by ELISA were detected and their relationship was analyzed using Spearman test. Flow cytometry was used to detect the binding of IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies with apoptotic cell. **Results** Serum concentration of IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies in SLE patients were significantly lower than both healthy people and IgA nephropathy patients but there was no significant difference between healthy people and IgA nephropathy patients. There was no significant difference in total IgM between healthy people and SLE patients and serum concentrations of IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies were positively related with total IgM. IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies did not bind to apoptotic cells. **Conclusion** Reduction of IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies in SLE patients was not caused by chronic inflammation. Reduction of IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies in SLE patients was not caused by reduction of total IgM. IgM anti - H3_{1~19} K9me autoantibodies had no relationship with clearance of apoptotic cells.

Key words SLE; Histone modification; IgM; Autoantibody

蛋白质翻译后修饰是重要的生物学现象,但是在某些情况下也可能产生新的抗原表位而引起自身免疫反应。系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种慢性的全身型的自身免疫病,临床表现多种多样,如皮疹、关节炎、贫血、肾炎、癫痫发作等,其中 90% 的患者为女性^[1]。患者产生多种病理

性自身抗体,其中相当一部分是针对细胞核成分的,如双链 DNA、核小体等^[2]。作为核小体的主要成分,组蛋白也是 SLE 中常见的自身抗原。组蛋白可以进行各种翻译后修饰,如乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等,大多数的翻译后修饰发生在组蛋白的氨基尾部^[3]。H3 组蛋白 N 端尾部有许多可修饰位点,修饰后可产生很多新表位,但是目前针对其 1~19 位氨基酸残基修饰的自身抗体还不清楚。在前期的研究工作中,笔者发现 SLE 患者血清中针对 H3 组蛋白 N

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30972717)

作者单位:100005 北京,中国医学科学院基础医学研究所免疫室/北京协和医学院基础学院

端 1~19 位氨基酸第 9 位赖氨酸一甲基化修饰肽段 (H3₁₋₁₉K9me) 的 IgM 抗体较健康人有显著降低。为了深入了解该抗体,笔者从功能和影响因素入手,进行了进一步探索。本研究旨在了解该抗体清除凋亡细胞方面的作用和影响这种抗体的生理和病理因素。

材料与方法

1. 研究对象:儿童系统性红斑狼疮患者的样本及资料收集于 2001~2012 年,来自首都儿科研究所儿童风湿科,共 62 名(男性 11 名,女性 51 名)。患者年龄 2~14 岁,平均年龄 10.69 ± 3.12 岁。成人系统性红斑狼疮患者的样本及资料收集于 2012 年,来自北京协和医院肾内科,共 75 名(男性 11 名,女性 64 名)。患者年龄 19~67 岁,平均年龄 35.00 ± 11.19 岁。所有 SLE 患者的发病情况都符合由美国风湿学会所制订的分类标准^[4]中的至少 4 项。SLE 病情活动度的评估依据 2000 年修订的 SLEDAI 评分标准^[5],即 0~4 分:无疾病活动;5~9 分:轻微疾病活动;10~14 分:中等程度的疾病活动;15 分以上:严重的疾病活动;20 分以上:非常严重的疾病活动。健康对照者的实验样本及资料来自于常规健康体检人群且在样本收集时未发现有任何风湿疾病。IgA 肾病患者的血液样本及资料来自于北京协和医院肾内科,共 49 例(其中包括男性 24 例,女性 25 例;患者年龄 19~68 岁,平均年龄 37.27 ± 11.51 岁)。所有患者都经过肾脏穿刺活检确诊为 IgA 肾病。

2. 试剂及抗体:H3₁₋₁₉K9me 多肽(北京中科亚光公司,多肽与 BSA 的交联由北京爱博生公司完成),交联了 H3₁₋₁₉K9me 多肽的 Sepharose(琼脂糖凝胶)CL-4B 珠子(北京爱博生公司),喜树碱(方程生物科技有限公司),凋亡检测试剂盒(嘉美生物技术有限公司),小牛血清白蛋白(北京元亨圣马生物技术研究),ABTS(Amresco 公司),Tween-20(Fluka 公司)。小鼠抗人 IgM(KT16,北京爱博生公司),小鼠抗人 IgG(KT47,北京爱博生公司),HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(A2554, Sigma 公司),大鼠抗人 IgG(KT48,北京爱博生公司),HRP 标记的小鼠抗人 IgG(KT47,北京爱博生公司),HRP 标记的小鼠抗人 IgM(KT38,北京爱博生公司),FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(F5262, Sigma 公司)。

3. 方法:(1)健康人血清中抗 H3₁₋₁₉K9me IgM 抗体的提纯:将 30 μ l 交联了 H3₁₋₁₉K9me 多肽的 Sepharose CL-4B 珠子(K9me beads)加入到健康人混合血清中,4℃混悬过夜。将血清与 K9me beads 的混悬液加入平衡后的离心柱中,离心 1min,离心柱中的 K9me beads 用 PBS 洗涤后用于抗 H3₁₋₁₉K9me 抗体的洗脱。与血清混悬过的 K9me beads 用 1mol/L 的 NaCl 洗涤 5 次,洗去杂蛋白的 K9me beads 用 PBS 洗涤 1 次,0.1mol/L 甘氨酸(pH 值 2.5)50 μ l 室温浸珠 5min,离心得到的洗脱液中加入 2mol/L 的 Tris·HCl(pH 值 8.5)1.7 μ l 中和。重复以上洗脱过程 5 次,分别收集每次的洗脱液于管中。检测各管中抗体洗脱液的 OD_{280nm}值,并用 ELISA 方法确定各管抗体使用的最佳稀释度。(2)ELISA 检测血清中抗 H3₁₋₁₉K9me IgM 抗体:板孔中包被 H3₁₋₁₉K9me 多肽,SLE 患者及健

康人血清以 1:100 稀释,依次加入小鼠抗人 IgM(KT16)和 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(A2554)进行检测。(3)ELISA 检测血清中 IgM 抗体的总浓度:小鼠抗人 IgM(KT16)用包被液稀释至 2.5 μ g/ml,100 微升/孔于 96 孔反应板中 4℃包被过夜。PBS-T 冲洗板孔,加入封闭液 200 微升/孔,室温封闭 2h。血清样本用封闭液稀释至一定浓度(成人 IgM 检测:1/1600;儿童 IgM 检测:1/800),100 微升/孔,室温孵育 1h。PBS-T 冲洗板孔,HRP 标记的小鼠抗人 IgM(KT38)用 PBS-T 以 1/1000 稀释,100 微升/孔,室温避光孵育 1h。PBS-T 冲洗板孔,显色液现用现配,100 微升/孔,室温避光显色 30min 后上机检测。(4)Jurkat 细胞凋亡的诱导及检测:Jurkat 细胞在 24 孔板中,用无血清的 RPMI1640 培养基 37℃、5% CO₂ 于孵箱中培养过夜,使得多数细胞处于相同的细胞周期。将细胞浓度调整至 1×10^6 个/毫升左右,24 孔板每孔中加入 1ml 调整好浓度的细胞,并向其中加入 6 微升/孔的凋亡诱导剂(终浓度为 6 μ g/ml),37℃、5% CO₂ 培养 8h。用去离子水将 $10 \times$ Binding Buffer 稀释为 1 $\times$ Binding Buffer,将诱导凋亡的细胞收集于管中,用 4℃预冷的 PBS 清洗细胞 1 次,加入 200 微升/管的 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞,向各管中加入 5 微升/管的 Annexin V-FITC,室温避光孵育 15min。最后向各管中加入 5 微升/管的 PI,室温避光孵育 5min。将标记好的流式细胞样本用 200 目筛网过滤,1h 内上机检测。(5)凋亡细胞与健康人、SLE 患者血清以及抗 H3₁₋₁₉K9me IgM 抗体结合的检测:向收集有凋亡细胞的各管中分别加入血清或纯化的抗 H3₁₋₁₉K9me IgM 抗体(检测血清中 IgM 抗体与凋亡细胞的结合时,加入的血清量为 2 微升/管;纯化的抗 H3₁₋₁₉K9me IgM 抗体加入量为 5 微升/管),冰上孵育 1h。1% BSA 清洗细胞 3 次,向各管中分别加入 1 微升/管的 KT16(检测 IgM)冰上孵育 1h。1% BSA 清洗细胞 3 次,向各管中加入 0.5 微升/管的 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(F5262),冰上避光孵育 40min。1% BSA 清洗细胞 2 次,PBS 清洗细胞 1 次,4℃、400 $\times g$ 离心 3min,弃上清。以 300 微升/管的 PBS 重悬细胞,并用 120 微升/管的 4% 多聚甲醛固定细胞,4℃避光保存待测,检测前以 200 目筛网过滤。

4. 统计学方法:本文中所有数据均用 GraphPad Prism 软件(Version 5.01)分析。符合正态分布的数据中,非配对 *t* 检验用于两组间差别的分析,配对 *t* 检验用于组内差别的分析。Mann-Whitney 检验用于非正态分布数据的分析。Spearman 检验用于计算非正态分布数据间的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. SLE 患者血清中抗 H3₁₋₁₉K9me IgM 抗体水平的降低与慢性炎症的关系:如图 1 所示,IgA 肾病患者血清中抗 H3₁₋₁₉K9me IgM 抗体的水平略有下降,但降低不明显。而 SLE 患者与健康人及 IgA 肾病患者相比,血清中该抗体的水平则有明显下降。可见慢

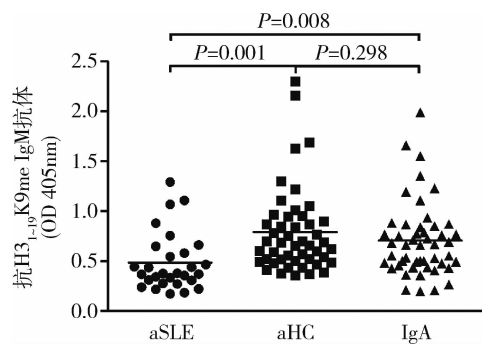


图1 SLE患者与IgA肾病患者和健康人血清中抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体水平的比较

ELISA方法检测29例成人SLE患者(aSLE)、48例健康成人(aHC)、49例IgA肾病患者血清中抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体的水平。各组检测结果均用OD_{405nm}值表示,横线代表各组检测结果的平均值,*P*值通过Student's *t*检验计算得出。

性炎症反应不是造成SLE患者体内该抗体水平显著下降的主要原因。

2. 血清总IgM与抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体水平的相关性分析:SLE患者与健康人血清总IgM抗体的水平无统计学差异,只是SLE患者血清中的总IgM抗体水平相对比较分散(图2A和B)。SLE患者和健康人血清中抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体的水平与总IgM抗体水平呈正相关($r \geq 0.383$,图2)。

3. 凋亡细胞与健康人、SLE患者血清及纯化的抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体的结合:如图3所示,Jurkat细胞用喜树碱诱导凋亡8h后,有相当比例的细胞处于晚期凋亡阶段(图3A),加入健康人及SLE患者血清与凋亡细胞结合,流式检测结果显示,两种血清中的IgM抗体与凋亡细胞的结合无统计学差异(图3B),

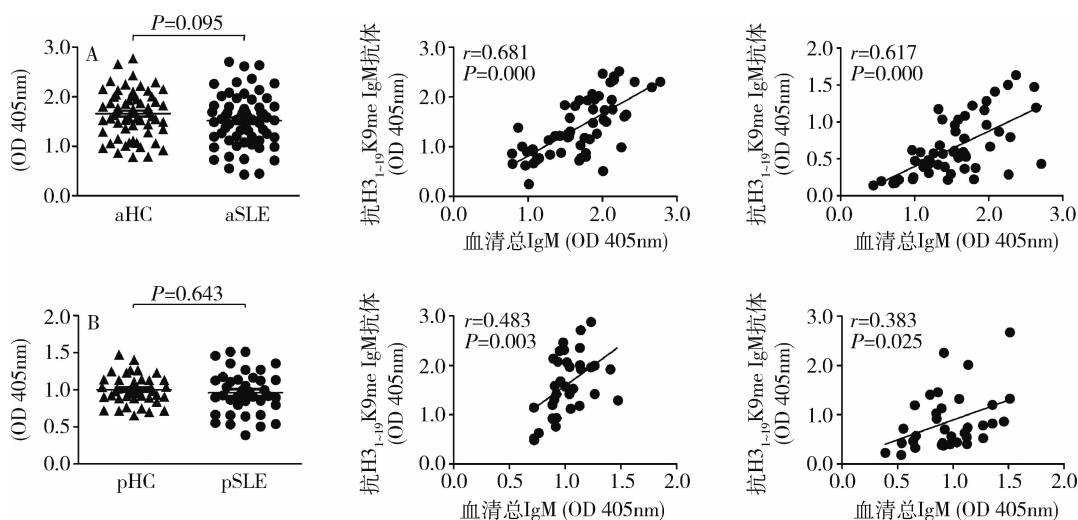


图2 血清总IgM与抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM的相关性

A. 健康成人与成人SLE患者血清中总IgM抗体的比较(左)及健康成人(中)和成人SLE患者(右)血清中总IgM抗体与抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体的相关性分析; B. 健康儿童与儿童SLE患者血清中总IgM抗体的比较(左)及健康儿童(中)和儿童SLE患者(右)血清中总IgM抗体与抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体的相关性分析

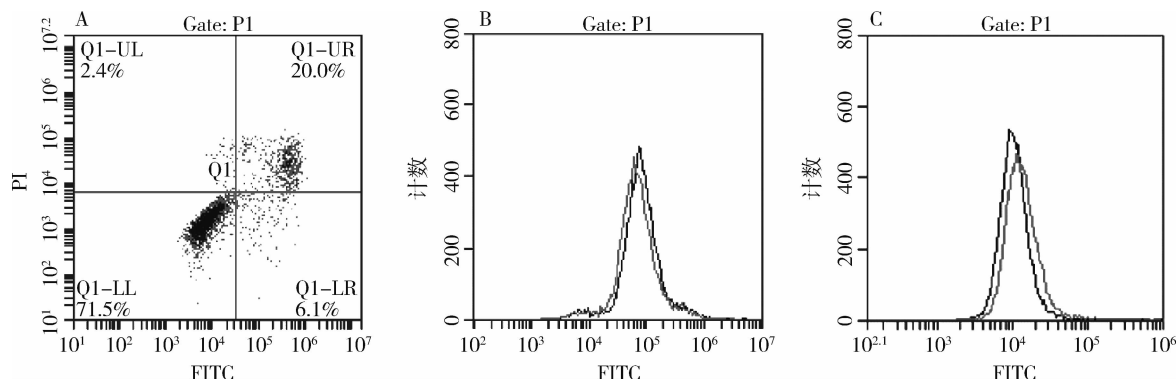


图3 凋亡细胞与健康人、SLE患者血清及抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体的结合

A. 6μg/ml的喜树碱诱导8h后,Jurkat细胞的凋亡情况; B. SLE患者及健康人血清中的IgM抗体与凋亡细胞的结合情况; C. 正常细胞及凋亡细胞与抗H₃₁₋₁₉-K9me IgM抗体的结合情况。以上为3次以上实验中较具代表性的结果

说明 SLE 患者与健康人的 IgM 抗体在清除凋亡细胞能力方面可能不存在统计学差异。抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体与凋亡细胞和正常细胞的结合并无统计学差异,说明该抗体可能与凋亡细胞的清除无直接关联(图 3C)。

讨 论

由于免疫复合物的沉积引起Ⅲ型超敏反应,SLE 患者组织器官中存在着慢性炎症^[6]。一些炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-6、IL-8 的释放可能会引起体内免疫细胞功能的改变,从而影响抗原的递呈、抗体的分泌。为了了解 SLE 患者体内抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体水平降低与慢性炎症间的联系,需要将其与其他有慢性炎症的非 SLE 患者的血清水平进行比较。IgA 肾病是含有 IgA 的免疫复合物沉积于系膜区所引起的肾小球疾病,患者体内常存在着慢性炎症^[7]。对 IgA 肾病患者的血清进行 ELISA 检测,发现其抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体水平与健康人相比有轻微的降低,但仍显著高于 SLE 患者。这说明机体所处的慢性炎症状态对该抗体的分泌并无明显的影响。而 IgA 肾病患者体内该抗体水平的轻微降低则可能是由于肾病造成的肾小球滤过膜通透性增高,从而引起血清蛋白的流失。

虽然 SLE 患者血清 IgM 抗体的总量与健康人并无差别,但抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体却在二者间有显著的差别,说明 SLE 患者体内该抗体的降低并非是其 IgM 抗体总量降低所造成的。相关性分析的结果显示,健康人和 SLE 患者血清抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 的水平均与总 IgM 抗体水平相关,说明该 IgM 抗体是健康人及 SLE 患者血清中 IgM 抗体的一个较为稳定的组成部分,可能有助于 SLE 的检测和辅助诊断,这一发现或许对 SLE 诊断新指标和诊断试剂盒的发展具有一定的意义。

机体在不同的年龄、不同的代谢状态下均会产生凋亡细胞,对凋亡细胞及时、有效的清除是维持机体免疫平衡的一个重要问题。凋亡细胞清除障碍所造成的自身抗原暴露于免疫系统,是 SLE 可能的发病原因之一。在细胞凋亡过程中,核内 DNA 和组蛋白经某些表观遗传修饰后可能具有一定的抗原性,在细胞凋亡晚期时这些核抗原便可能暴露于细胞膜外,与机体免疫系统相接触。有研究显示,IgM 抗体能够帮助和促进凋亡小体及凋亡细胞碎片的清除,从而避免自身免疫反应的发生^[8]。IgM 五聚体对补体的亲和

力比 IgG 单体高 1000 倍以上,其通过与 C1q 或甘露糖结合凝集素结合,介导巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬清除^[9]。鉴于多数 SLE 患者血清中的抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体水平与健康人相比有明显的降低,笔者怀疑该 IgM 抗体与凋亡细胞的清除相关。通过流式细胞检测发现,从健康人血清中纯化出的抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体与凋亡细胞并无明显结合。因而,这种抗体可能与凋亡细胞的清除并无直接的关系,其实际生理功能仍需进一步的研究。

综上所述,抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体在 SLE 患者中血清水平的降低并非由慢性炎症造成,而可能是由于 SLE 疾病本身所造成。其在 SLE 患者血清中的降低不是由 IgM 抗体总量的降低所引起,且血清含量与 IgM 抗体总量呈正相关。抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体可能不具有清除凋亡细胞的功能。目前对抗 H3₁₋₁₉ K9me IgM 抗体仍然了解甚少,该抗体的其他特性及影响因素也还需深入研究,对该抗体的研究可能为 SLE 发病机制的探索提供一定的思路。

参考文献

- Gurevitz SL, Snyder JA, Wessel EK, *et al.* Systemic lupus erythematosus: a review of the disease and treatment options[J]. *Consult Pharm*, 2013,28(2):110-121
- Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus[J]. *N Engl J Med*, 2008,358(9):929-939
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code[J]. *Science*, 2001,293(5532):1074-1080
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 1997,40(9):1725
- Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000[J]. *J Rheumatol*, 2002,29(2):288-291
- Lacotte S, Brun S, Muller S, *et al.* CXCR3, Inflammation, and autoimmune diseases[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009,1173:310-317
- Oortwijn BD, Roos A, Royle L, *et al.* Differential glycosylation of polymeric and monomeric IgA: a possible role in glomerular inflammation in IgA nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006,17(12):3529-3539
- Litvack ML, Post M, Palaniyar N. IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages[J]. *PLoS One*, 2011,6(3):e17223
- Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010,10(11):778-786

(收稿日期:2013-05-30)

(修回日期:2013-06-04)