

系统性硬化症血清细胞因子表达谱变化及调控机制

朱红林, 杜倩, 谌威霖, 左晓霞, 李全贞, 刘思佳[△]

(中南大学湘雅医院风湿免疫科, 长沙 410008)

[摘要] **目的:**分析系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)血清细胞因子表达谱,探讨其可能的调控机制。**方法:**收集30例SSc患者及80例正常对照组血清和外周血单个核细胞DNA,按照SSc有无合并肺间质病变(interstitial lung disease, ILD)分为SSc合并ILD组及SSc不合并ILD组,根据皮肤受累程度,分为弥漫性系统性硬化症(diffuse cutaneous scleroderma, dcSSc)组和局限性系统性硬化症(limited cutaneous scleroderma, lcSSc)组,根据SSc患者血清中是否存在抗拓扑异构酶-1抗体(即抗Scl-70抗体),分为SSc Scl-70(+)组及SSc Scl-70(-)组。使用Luminex MAGPIX检测系统和Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay试剂盒检测血清中的27种细胞因子:白细胞介素(interleukin, IL)1 β (IL-1 β)、IL-1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12P70、IL-13、IL-15、IL-17、碱性纤维生长因子(basic fiber growth factor, BASIC FGF)、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、人干扰素诱导蛋白10(interferon-gamma induced protein 10, IP-10)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、人巨噬细胞炎性蛋白1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)、人巨噬细胞炎性蛋白1 β (macrophage inflammatory protein 1 β , MIP-1 β)、人血小板衍生生长因子BB(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)、调节激活正常T细胞表达和分泌细胞因子(regulated on activation in normal T-cell expressed and secreted, RANTES)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。利用Illumina 450K甲基化芯片检测单个核细胞DNA全基因组甲基化位点变化。**结果:**与正常对照组相比较,12种细胞因子(BASIC FGF、eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1RA、IL-6、IP-10、MCP-1、TNF- α 和RANTES)在SSc中表达明显升高($P < 0.05$),IL-5在SSc中表达降低($P < 0.05$),其余细胞因子表达差异无统计学意义。与lcSSc组比较,9种细胞因子(eotaxin、IL-5、MCP-1、IL-2、RANTES、IL17A、IL-8、MIP-1 β 和PDGF-BB)在dcSSc组增高,但差异无统计学意义。与SSc不合并ILD组相比较,IL-15在SSc合并ILD组增高[18.2(172.97) ng/L vs. 2.03(0.05) ng/L, $P < 0.05$];与SSc Scl-70(-)组相比较,IP-10在SSc Scl-70(+)组表达降低[1 030(2 196.6) ng/L vs. 1 878(2 964) ng/L, $P < 0.05$]。分析血清细胞因子与红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的相关性发现,IL-6与ESR正相关($r = 0.04$, $P = 0.017$);MCP-1($r = 0.49$, $P = 0.043$)和MIP-1 β ($r = 0.41$, $P = 0.007$)与CRP正相关。分析细胞因子甲基化位点变化,发现IL-10 TSS1500区的cg17744604、IL-12P70TSS200区的cg06111286、IL-1 β TSS200区的cg07935264、IL-1ra TSS1500区的cg01467417、IL-1ra 5'非翻译区的cg03989987和VEGF TSS200区的cg21099624均呈低甲基化。**结论:**SSc患者血清存在多种细胞因子变化,且细胞因子变化与皮肤受累程度、肺纤维化有关,多种细胞因子表达受甲基化调控。

[关键词] 系统性硬化症;细胞因子;全基因组甲基化

[中图分类号] R593.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2019)04-0716-07

doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2019.04.021

Altered serum cytokine expression profile in systemic sclerosis and its regulatory mechanisms

ZHU Hong-lin, DU Qian, CHEN Wei-lin, ZUO Xiao-xia, LI Quan-zhen, LIU Si-jia[△]

(Department of Rheumatology and Immunology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the expression profile of serum cytokines in patients with systemic

基金项目:国家自然科学基金(81671622,81771765)、湖南省自然科学基金(2018JJ3823) Supported by the National Natural Science Foundation of China (81671622,81771765), and Hunan Provincial Natural Science Foundation (2018JJ3823)

[△] Corresponding author's e-mail, celialiu@csu.edu.cn

网络出版时间:2019-6-19 14:26:38 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20190619.0914.012.html>

sclerosis (SSc) and explore its possible regulatory mechanisms. **Methods:** Serum and DNA of peripheral blood mononuclear cells were collected from 30 SSc patients and 80 normal controls (NCs). According to the presence or absence of interstitial lung disease (ILD) in SSc, the patients were divided into SSc with ILD group and SSc without ILD group. According to the degree of skin involvement, the patients were divided into diffuse systemic scleroderma (dcSSc) group and limited systemic scleroderma (lcSSc) group. According to the presence of anti-topoisomerase-1 antibody (anti-Scl-70 antibody) in the serum of patients with SSc, they were divided into SSc Scl-70 (+) group and SSc Scl-70 (-) group. 27 cytokines in serum were detected by Luminex MAGPIX detection system and Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay kit: interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17, basic fiber growth factor (BASIC FGF), eotaxin, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ), interferon-gamma induced protein 10 (IP-10), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β), platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB), regulated on activation in normal T-cell expressed and secreted (RANTES), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Methylation sites were detected by Illumina 450K methylation chip. **Results:** Compared with NCs group, the expression of 12 cytokines (BASIC FGF, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IP-10, MCP-1, TNF- α and RANTES) in the SSc group significantly increased ($P < 0.05$), IL-5 was decreased expression in the SSc group ($P < 0.05$), there was no significant difference in the expressions of the other 14 cytokines. Compared with lcSSc group, 9 cytokines (eotaxin, IL-5, MCP-1, IL-2, RANTES, IL17A, IL-8, MIP-1 β and PDGF-BB) increased in dcSSc group, but there was no significant difference. Compared with SSc without ILD group, IL-15 increased in SSc with ILD group [18.2(172.97) ng/L vs. 2.03(0.05) ng/L, $P < 0.05$]. Compared with SSc Scl-70 (-) group, the expression of IP-10 decreased in SSc Scl-70 (+) group [1 030 (2 196.6) ng/L vs. 1 878 (2 964) ng/L, $P < 0.05$]. The correlation analysis of serum cytokines with erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) showed that IL-6 was positively correlated with ESR ($r = 0.04$, $P = 0.017$), MCP-1 ($r = 0.49$, $P = 0.043$) and MIP-1 β ($r = 0.41$, $P = 0.007$) positively correlated with CRP. By analyzing the changes of methylation sites of cytokines, it was found that cg17744604 in IL-10 TSS1500 region, cg06111286 in IL-12P70 TSS200 region, cg07935264 in IL-1 β TSS200 region, cg01467417 in IL-1ra TSS1500 region, cg03989987 in IL-1ra 5' UTR region and cg21099624 in VEGF TSS200 region were all hypomethylated. **Conclusion:** There were different cytokines expression profiles in the serum of SSc patients, and the altered cytokines were correlated with the degree of skin damage and pulmonary fibrosis. Many cytokines were regulated by methylation.

KEY WORDS Systemic sclerosis; Cytokine; Genome-wide methylation

系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)是一种病因不明的高度异质性的自身免疫病,其主要特征是微血管功能障碍、慢性炎症、免疫异常以及皮肤和内脏器官进行性纤维化。SSc患病率约为1/10 000,在风湿病中病死率最高^[1]。肺间质病变(interstitial lung disease, ILD)和肺动脉高压是导致SSc死亡的主要并发症^[1-2]。SSc根据皮肤受累程度,分为弥漫性系统性硬化症(diffuse cutaneous scleroderma, dcSSc)和局限性系统性硬化症(limited cutaneous scleroderma, lcSSc)两种主要亚型。dcSSc皮肤受损广泛,常累及四肢、躯干和腹壁,病情进展快,发病5年内容易出现脏器衰竭。lcSSc皮肤受损局限于肢体末端或面部,或仅累及手指(指端硬化),病情进展缓慢^[3]。SSc发病机制复杂,多种细胞因子参与纤维化的发生发展,如血小板源性生长因子、内皮素1、白介素(interleukin, IL)-6和IL-13等,但目前由于SSc血清细胞因子受疾病病程、治疗药物、样本量和检测方法的影响,其表达变化在各研究中报道不一致^[4-6]。本研究采用Luminex MAG-

PIX检测系统对SSc血清中27种细胞因子进行高通量检测,并将其表达量与SSc亚型、临床指标进行相关性分析。

在前期研究中,本课题组利用高通量芯片技术对SSc外周血单个核细胞进行全基因组DNA甲基化分析^[7]。本研究中,进一步将细胞因子的表达与全基因组DNA甲基化进行整合分析,以探讨细胞因子的调控机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集中南大学湘雅医院2013年12月至2016年6月入院的SSc患者30例,28例汉族,1例苗族,1例瑶族。男性11例,女性19例。年龄为13~64岁,平均年龄(44.23 \pm 12.86)岁,病程1个月至9年。根据SSc患者肺部影像学高分辨CT表现诊断患者是否合并ILD,分为SSc合并ILD组[SSc ILD(+)]及SSc不合并ILD组[SSc ILD(-)]组,各15例;根据皮肤受累程度,分为dcSSc组20例和

lcSSc 组 10 例;根据 SSc 患者血清中是否存在抗拓扑异构酶-1 抗体(即抗 Scl-70 抗体),分为 SSc Scl-70(+)组 20 例及 SSc Scl-70(-)组 10 例。80 例正常对照(normal controls, NCs)均为汉族人,男性 30 例,女性 50 例,年龄为 21 ~ 80 岁,平均年龄(38.58 ± 13.73)岁。所有 SSc 患者均符合 1980 年美国风湿病学会制定的分类标准^[8],该标准包括以下条件:(1)主要条件:近端皮肤硬化,即手指及掌指(跖趾)关节近端皮肤增厚、紧绷和肿胀,可累及整个肢体、面部、颈部和躯干(胸、腹部)。(2)次要条件:①指硬化:上述皮肤改变仅限手指。②指尖凹陷性瘢痕或指垫消失:由于缺血导致指尖凹陷性瘢痕或指垫消失。③双肺底部纤维化:在立位胸部 X 线片上,可见条状或结节状致密影,以双肺底为著,也可呈弥漫斑点或蜂窝状肺,但应除外原发性肺病所引起的这种改变。符合上述主要条件或次要条件 2 条及 2 条以上者,可诊断为 SSc。NCs 来自同时期中南大学湘雅医院体检的健康志愿者。本研究通过中南大学伦理委员会审批(批准号:201303293),所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞因子芯片分析

本实验收集 30 例 SSc 患者及 80 例正常对照组血清,采用 Luminex MAG-PIX 检测系统(MAGPIX, Luminex 公司,美国)和 Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay 试剂盒(Bio-Plex, Bio-Rad 公司,美国),分析血清样本中的 27 种细胞因子:IL-1 β 、IL-1 受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12P70、IL-13、IL-15、IL-17、碱性纤维生长因子(basic fiber growth factor, BASIC FGF)、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、人干扰素诱导蛋白 10(interferon-gamma induced protein 10, IP-10)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、人巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)、人巨噬细胞炎性蛋白 1 β (macrophage inflammatory protein 1 β , MIP-1 β)、人血小板衍生生长因子 BB(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)、调节激活正常 T 细胞表达和分泌细胞因子(regulated on activation in normal T-cell expressed and secreted, RANTES)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和血管内皮生长因

子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。使用 xPONENT 4.2 软件(Luminex 公司,美国)绘制标准曲线并计算细胞因子的浓度(ng/L)。

1.2.2 全基因组 DNA 甲基化分析

全基因组 DNA 甲基化分析方法详见本课题组已发表文章^[7]。本实验提取 30 例 SSc 患者及 80 例 NCs 外周血单个核细胞 DNA,利用 Illumina 450K 甲基化芯片(Infinium, Illumina 公司,美国)检测全基因组 485 000 个 CpG 位点。实验步骤如下:使用 EZ DNA 甲基化试剂盒(Zymo Research Corp, Zymo Research 公司,美国)将 1 μ g 外周血单核细胞 DNA 进行转化、染色和扫描。利用 R 3.5.1 软件包(Bell Laboratories 实验室,美国)进行数据提取和归一化处理。归一化处理后的数据使用 SAM 软件(斯坦福大学,美国)进行分析, $P < 0.05$ 被认为是具有差异的甲基化位点。全基因组 DNA 甲基化程度(β 值)用 0 ~ 1 之间的数值表示,0 代表完全未甲基化,1 代表完全甲基化。基因转录本可分为几个功能区,分别为 TSS200(转录起始位点到上游 200 nt)、TSS1500(转录起始位点到上游 200 nt 至 1 500 nt)、5'非翻译区(5'UTR)、第 1 外显子区、基因主体和 3'非翻译区(3'UTR)。

1.3 统计学分析

使用 Perseus 1.5.5.0 软件(Max Planck Institute of Biochemistry, 德国)和 Graphpad Prism 7 软件(GraphPad Software 公司,美国)进行统计分析,正态分布的计量资料两两比较采用两样本 t 检验,非正态分布资料组间比较采用 Mann-Whitney U 检验,细胞因子与红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)或 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的相关性分析采用 Spearman 相关性分析。细胞因子表达值数据用中位数(四分位距)[Median (IQR)]表示,全基因组 DNA 甲基化程度用均值(Mean)表示, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞因子在 SSc 中的表达变化

首先对 NCs 组和 SSc 组细胞因子表达谱进行比较,在 27 种细胞因子中,12 种细胞因子(BASIC FGF、eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-6、IP-10、MCP-1、TNF- α 和 RANTES)在 SSc 中表达明显升高,IL-5 在 SSc 中表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);进一步比较 dcSSc 组和 lcSSc 组细胞因子表达谱变化,eotaxin、IL-5、MCP-1、IL-2、RANTES、IL17A、IL-8、MIP-1 β 和 PDGF-BB 在 dcSSc 组增高,但差异无统计学意义(表 1)。

表1 血清细胞因子表达谱在SSc、dcSSc和lcSSc组中的变化/(ng/L),中位数(四分位距)

Table 1 Altered serum cytokine expression profiles in SSc, dsSSc and lcSSc groups/(ng/L), Median (IQR)

Cytokine	NCs (n = 80)	SSc (n = 30)	P value (NC vs. SSc)	lcSSc (n = 10)	dcSSc (n = 20)	P value (lcSSc vs. dcSSc)
BASIC FGF	64.27 (42.37)	88.51 (46.58)	0.002	94.07 (49.47)	86.70 (48.08)	>0.05
Eotaxin	145.90 (89.30)	178.80 (155.70)	0.039	139.40 (127.30)	188.60 (156.60)	>0.05
G-CSF	75.87 (58.45)	113.90 (104.84)	<0.001	122.40 (149.89)	108.00 (82.50)	>0.05
GM-CSF	30.75 (57.51)	53.17 (124.65)	0.039	106.50 (96.09)	42.76 (134.16)	>0.05
IFN- γ	65.50 (75.52)	198.60 (149.60)	<0.001	259.20 (224.60)	194.90 (116.90)	>0.05
IL-5	8.76 (23.13)	3.28 (4.27)	0.001	3.28 (10.23)	4.63 (4.57)	>0.05
IL-1 β	1.62 (27.08)	6.58 (6.64)	<0.001	7.69 (5.82)	5.46 (10.36)	>0.05
IL-1ra	143.70 (177.36)	481.60 (613.10)	<0.001	541.40 (514.60)	359.50 (399.10)	>0.05
IL-6	21.58 (32.72)	35.92 (31.39)	0.002	34.49 (40.10)	33.86 (21.01)	>0.05
IP-10	766.00 (523.40)	1 307.00 (2 506.40)	0.002	2 096.00 (2 885.00)	1 094.00 (2 081.60)	>0.05
MCP-1	118.30 (73.10)	229.60 (319.40)	<0.001	180.30 (284.18)	261.00 (548.40)	>0.05
TNF- α	43.17 (33.35)	62.64 (43.74)	<0.001	63.43 (61.72)	55.81 (39.60)	>0.05
RANTES	23 404.00 (27 482.00)	52 632.00 (75 694.00)	0.019	42 802.00 (80 383.00)	71 752.00 (75 270.00)	>0.05
IL-2	37.29 (54.92)	5.04 (30.77)	0.053	4.48 (36.44)	5.04 (29.21)	>0.05
VEGF	153.10 (139.00)	204.00 (278.90)	0.052	304.80 (338.20)	150.30 (285.10)	>0.05
IL-10	19.43 (30.78)	19.84 (15.76)	>0.05	23.91 (36.54)	18.92 (12.44)	>0.05
IL-15	13.88 (46.35)	2.03 (20.51)	>0.05	2.03 (7.33)	2.03 (42.40)	>0.05
IL-17A	92.95 (108.01)	127.20 (64.19)	>0.05	119.00 (76.45)	143.50 (97.83)	>0.05
MIP-1 α	7.46 (23.51)	6.76 (4.90)	>0.05	7.56 (5.43)	6.66 (4.48)	>0.05
IL-4	7.30 (17.02)	5.92 (3.51)	>0.05	6.39 (6.85)	5.98 (4.23)	>0.05
IL-7	23.91 (19.28)	19.26 (15.27)	>0.05	20.67 (29.32)	19.79 (13.86)	>0.05
IL-8	48.05 (55.05)	41.05 (32.61)	>0.05	36.59 (54.53)	42.06 (31.75)	>0.05
IL-9	35.19 (71.11)	36.04 (32.79)	>0.05	43.78 (52.64)	35.57 (26.95)	>0.05
IL-13	21.49 (23.94)	17.51 (43.08)	>0.05	21.25 (88.46)	16.15 (15.30)	>0.05
MIP-1 β	317.80 (280.30)	290.60 (260.70)	>0.05	254.30 (273.70)	324.60 (231.60)	>0.05
IL-12P70	45.26 (25.25)	45.89 (45.64)	>0.05	57.69 (43.41)	41.08 (43.54)	>0.05
PDGF-BB	4 623.00 (2 680.00)	4 701.00 (2 770.00)	>0.05	3 911.00 (2 521.00)	5 598.00 (3 036.00)	>0.05

SSc, systemic sclerosis; dcSSc, diffuse cutaneous scleroderma; lcSSc, limited cutaneous scleroderma; NCs, normal controls; BASIC FGF, basic fibroblast growth factor; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; IFN- γ , interferon- γ ; IL, interleukin; IL-1ra, interleukin-1 receptor antagonist; IP-10, interferon-gamma induced protein 10; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; TNF- α , tumor necrosis factor α ; RANTES, regulated on activation in normal T-cell expressed and secreted; VEGF, vascular endothelial growth factor; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1 α ; MIP-1 β , macrophage inflammatory protein 1 β ; PDGF-BB, platelet-derived growth factor BB.

2.2 细胞因子表达谱在SSc ILD(+),SSc Scl-70(+)组中的变化

与SSc ILD(-)组相比较,IL-15在SSc ILD(+)组表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与SSc Scl-70(-)组相比较,IP-10在SSc Scl-70(+)组表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表2)。

2.3 SSc血清细胞因子表达谱与ESR、CRP的相关性分析

血清27种细胞因子与ESR相关性分析发现,17种细胞因子(BASIC FGF、eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-10、IL-12P70、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、VEGF、TNF- α 、IL-13、IL-4、IL-5、IL-7和IL-9)与ESR负相关,IL-6与ESR正相关,其余细胞因子与ESR无相关性;血清27种细胞因子与CRP相关性分析发现,IL-13和PDGF-BB与CRP负相关;MCP-1和MIP-1 β 与CRP正相关,且相关性较大(表3),其余细胞因子与CRP无相关性。

表 2 血清细胞因子表达谱在 SSc ILD(+)、SSc Scl-70(+)组中的变化/(ng/L), 中位数(四分位距)

Table 2 Altered serum cytokine expression profiles in SSc ILD(+)、SSc Scl-70(+) groups/(ng/L), Median (IQR)

Cytokine	SSc ILD(-) (n=15)	SSc ILD(+) (n=15)	P value [ILD(-) vs. ILD(+)]	SSc Scl-70(-) (n=10)	SSc Scl-70(+) (n=20)	P value [Scl-70(-) vs. Scl-70(+)]
BASIC FGF	88.51 (42.70)	99.08 (51.46)	>0.05	77.49 (40.47)	89.70 (50.58)	>0.05
Eotaxin	172.10 (140.60)	185.40 (195.20)	>0.05	158.40 (402.00)	188.60 (179.00)	>0.05
G-CSF	122.40 (128.54)	112.00 (97.04)	>0.05	105.40 (230.59)	115.90 (89.78)	>0.05
GM-CSF	52.97 (86.94)	121.60 (136.55)	>0.05	49.65 (143.35)	53.17 (122.49)	>0.05
IFN-γ	205.90 (131.00)	184.00 (188.80)	>0.05	238.10 (943.10)	187.70 (114.80)	>0.05
IL-12P70	36.59 (44.73)	47.48 (34.56)	>0.05	50.77 (186.11)	45.89 (46.69)	>0.05
IL-1β	6.30 (5.34)	9.23 (23.73)	>0.05	6.58 (40.19)	7.05 (6.57)	>0.05
IL-1ra	460.40 (508.50)	502.90 (792.10)	>0.05	500.90 (6421.90)	456.30 (524.80)	>0.05
IL-6	35.74 (16.38)	36.27 (119.28)	>0.05	27.34 (170.27)	36.36 (33.49)	>0.05
IP-10	1 418.00 (2 969.90)	1 182.00 (2 306.60)	>0.05	1 878.00 (2 964.00)	1 030.00 (2 196.60)	0.039
MCP-1	180.40 (179.90)	323.10 (571.20)	>0.05	175.00 (216.12)	296.90 (499.10)	>0.05
TNF-α	71.00 (39.17)	52.80 (118.41)	>0.05	51.18 (315.81)	69.48 (41.94)	>0.05
VEGF	193.70 (210.20)	298.10 (388.80)	>0.05	275.20 (428.40)	176.30 (232.30)	>0.05
IL-13	24.73 (83.62)	15.12 (36.66)	>0.05	18.94 (76.56)	17.51 (55.58)	>0.05
IL-7	18.19 (18.71)	19.61 (12.01)	>0.05	18.02 (57.74)	21.20 (15.01)	>0.05
RANTES	45 504.00 (74 609.00)	59 759.00 (77 217.00)	>0.05	78 450.00 (76 739.00)	38 953.00 (75 650.00)	>0.05
IL-10	18.28 (11.81)	23.40 (13.45)	>0.05	14.85 (156.50)	21.64 (14.77)	>0.05
IL-15	2.03 (0.05)	18.20 (172.97)	0.024	2.03 (63.31)	2.03 (25.19)	>0.05
IL-17A	122.30 (66.79)	145.20 (112.53)	>0.05	123.90 (43.10)	134.50 (73.82)	>0.05
IL-2	2.84 (16.57)	5.95 (34.50)	>0.05	4.36 (180.43)	5.08 (29.21)	>0.05
MIP-1α	6.76 (3.18)	6.46 (20.36)	>0.05	6.51 (6.51)	7.74 (4.39)	>0.05
IL-4	6.23 (4.63)	5.72 (3.04)	>0.05	6.05 (10.81)	5.85 (3.51)	>0.05
IL-5	3.21 (3.90)	3.34 (4.84)	>0.05	4.09 (10.88)	3.21 (3.21)	>0.05
IL-8	37.45 (21.89)	49.71 (47.20)	>0.05	40.31 (58.24)	41.05 (28.72)	>0.05
IL-9	36.22 (35.10)	35.86 (30.29)	>0.05	33.01 (30.67)	38.56 (29.77)	>0.05
MIP-1β	260.70 (285.40)	310.60 (420.10)	>0.05	312.30 (293.10)	290.60 (243.80)	>0.05
PDGF-BB	4 359.00 (3 072.00)	5 043.00 (3 128.00)	>0.05	4 827.00 (3 340.00)	4 701.00 (2 958.00)	>0.05

ILD, interstitial lung disease; other abbreviations as in Table 1.

2.4 细胞因子的 DNA 甲基化表达调控

进一步分析上述 SSc 中差异表达的细胞因子的 DNA 甲基化位点变化,发现位于 IL-10 TSS1500 区的 cg17744604、IL-12P70 TSS200 区的 cg06111286、IL-1β TSS200 区的 cg07935264、IL-1ra TSS1500 区的 cg01467417、IL-1ra 5' UTR 区的 cg03989987 和 VEGF TSS200 区的 cg21099624 均呈低甲基化(表 4)。

3 讨论

细胞因子是自身免疫和炎症性疾病中的关键炎症介质,在风湿病中,细胞因子不仅在免疫细胞中具

有重要调控作用,在非免疫细胞如成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞和破骨细胞等中也均起着重要作用。细胞因子生物学研究的进步为我们了解 SSc 的发病机制提供了重要帮助^[9]。早在 1992 年,Needleman 等^[10]发现了 IL-2、IL-4 和 IL-6 在 SSc 中表达增高。Hasegawa 等^[11]于 1997 年发现了 IL-4、IL-10 和 IL-13 在 SSc 中表达增高,IL-13 水平与 ESR、CRP 相关。2011 年,该团队利用流式微珠阵列细胞因子检测试剂盒分析了 10 种细胞因子在 31 例日本 SSc 患者中的表达水平,发现 IP-10、膜结合免疫球蛋白、MCP-1 显著性表达增高,IL-6 和 IL-8 表达增高,但差异无统计学意义。IL-2、IL-4、IL-10、TNF-α 和

IFN- γ 在多数样本中未检测到^[12]。Dantas 等^[6]采用酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测了 8 种细胞因子的表达,发现 IL-17A 在 SSc 中增高,但差异无统计学意义,IL-2、IL-4、IL-10、IL-6 和 TNF 未检测到。本研究采用 Luminex MAGPIX 分析了 SSc 患者血清 27 种细胞因子表达谱,发现在 SSc 患者血清中,12 种细胞因子在 SSc 中表达明显升高,IL-5 在 SSc 中表达降低。Luminex MAGPIX 检测方法较 ELISA 更为敏感,我们能检测到所有 SSc 患者及正常对照组中细胞因子的表达变化,且大部分细胞因子表达水平变化与文献^[5]报道相符。本研究还发现细胞因子的表达水平与 SSc 临床特征相关,有 9 种细胞因子在 dcSSc 组中的表达较在 lcSSc 组中的表达更高,IL-15 在 SSc ILD(+) 组增高,IP-10 在 SSc Scl-70(+) 组表达降低。IL-15 是一种多功能的细胞因子,在调节免疫、血管病变和结缔组织分化中具有重要作用。研究报告 SSc 血清中的 IL-15 水平增高,且与肺功能受损相关,在早期 SSc 中,IL-15 与 SSc 纤维化和肺血管疾病及肺血管病变相关^[13]。在抗黑色素瘤分化相关基因-5 (melanoma differentiation related gene-5, MDA5) 抗体阳性的无肌病性皮肌炎合并 ILD 患者中,血清 IL-15 水平在死亡患者中显著高于未死亡患者,提示 IL-15 在抗 MDA5 抗体阳性的无肌病性皮肌炎肺间质病变中发挥着重要作用^[14],结合本研究结果,提示 IL-15 可能是 SSc ILD(+) 的重要生物标志物。IP-10 是由多种细胞分泌的炎症趋化因子,可通过募集淋巴细胞调节免疫反应并抑制血管新生。IP-10 在 SSc ILD(+) 患者中增高,且与心血管累及程度、肺动脉高压和 ESR 上升正相关^[15]。本研究发现,IP-10 与 SSc Scl-70(+) 存在相关性,但其作用和意义还需进一步研究。ESR 和 CRP 属于非特异性的炎症指标,IL-6、MCP-1 和 MIP-1 β 均属于促炎症细胞因子,IL-6 是急性炎症反应细胞因子,在类风湿关节炎等多种炎症性疾病中发挥重要作用。MCP-1 和 MIP-1 β 属于促炎症趋化因子,广泛调节多种免疫细胞的功能,如巨噬细胞、树突细胞和中性粒细胞等^[16]。本研究发现,IL-6、MCP-1 和 MIP-1 β 与 ESR 或 CRP 相关,提示此类细胞因子可能与 SSc 疾病活动度相关,可能成为判断 SSc 疗效的潜在标志物。

本研究结合全基因组甲基化表达谱,分析了细胞因子的 DNA 甲基化变化,发现 IL-10、IL-12P70、IL-1 β 、IL-1ra 和 VEGF 的转录起始区均存在 DNA 低

甲基化,提示其可能受 DNA 甲基化调控。由于多数细胞因子在体外不稳定,如前文所述多个研究中利用 ELISA 方法无法检测到细胞因子的表达。细胞因子 DNA 甲基化水平与其 mRNA 表达存在一定相关性,且在体外可长期保存,血标本或尿液均易检测,所需标本量少。如果通过检测细胞因子 DNA 甲基化水平替代常规血清细胞因子检测,将对 SSc 的诊断、分类、并发症的预防和预后判断具有更重要的意义^[17]。

表 3 SSc 血清细胞因子表达谱与 ESR、CRP 的相关性

Table 3 The correlation of serum cytokine expression profile with ESR, CRP in SSc

Cytokine	ESR		CRP	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
BASIC FGF	-0.09	0.009	0.12	>0.05
Eotaxin	-0.12	0.013	0.15	>0.05
G-CSF	-0.11	0.004	0.19	>0.05
GM-CSF	-0.04	0.012	0.05	>0.05
IFN- γ	-0.07	0.010	0.10	>0.05
IL-10	-0.09	0.002	0.25	>0.05
IL-12P70	-0.19	<0.001	0.16	>0.05
IL-15	0.09	>0.05	0.08	>0.05
IL-17A	0.05	>0.05	0.14	>0.05
IL-1 β	-0.06	0.008	0.23	>0.05
IL-1ra	-0.02	0.011	0.10	>0.05
IL-2	-0.31	<0.001	0.07	>0.05
IL-6	0.04	0.017	0.30	>0.05
IP-10	-0.02	>0.05	0.09	>0.05
MCP-1	0.09	>0.05	0.49	0.043
MIP-1 α	-0.05	>0.05	0.38	>0.05
TNF- α	-0.06	0.011	0.16	>0.05
VEGF	-0.13	0.024	0.17	>0.05
IL-13	-0.35	<0.001	-0.07	0.050
IL-4	-0.2	0.005	0.04	>0.05
IL-5	-0.07	0.034	0.06	>0.05
IL-7	-0.04	0.006	0.17	>0.05
IL-8	0.09	>0.05	0.32	>0.05
IL-9	-0.21	0.001	0.30	>0.05
MIP-1 β	-0.02	>0.05	0.41	0.007
PDGF-BB	-0.04	>0.05	-0.01	0.042
RANTES	0.17	>0.05	0.02	>0.05

ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; other abbreviations as in Table 1.

表 4 细胞因子甲基化表达的改变

Table 4 Altered methylation expression of cytokines

Cytokine	Gene	Methylation sites	NCs β (Mean)	SSc β (Mean)	$\Delta\beta$	P value	Gene locus	Chromosomal location
IL-10	<i>IL10</i>	cg17744604	0.403	0.297	-0.106	<0.001	TSS1500	1
IL-12P70	<i>IL12B</i>	cg06111286	0.316	0.250	-0.066	0.001	TSS200	5
IL-1 β	<i>IL1B</i>	cg07935264	0.195	0.150	-0.045	<0.001	TSS200	2
IL-1ra	<i>IL1RN</i>	cg01467417	0.127	0.108	-0.019	0.014	TSS1500	2
IL-1ra	<i>IL1RN</i>	cg03989987	0.301	0.238	-0.063	0.006	5'UTR	2
VEGF	<i>VEGFA</i>	cg21099624	0.097	0.089	-0.008	0.011	TSS200	6

SSc, systemic sclerosis; NCs, normal controls; IL, interleukin; IL-1ra, interleukin-1 receptor antagonist; VEGF, vascular endothelial growth factor.

本研究利用高通量分析方法检测了 SSc 血清 27 种细胞因子的表达,并与 SSc 亚型、临床指标进行相关性分析,最后探讨了细胞因子的表达调控机制。本研究发现 13 种细胞因子在 SSc 血清中存在表达变化,IL-15 与 SSc ILD 相关,IP-10 与 SSc 抗 Scl-70 抗体相关,IL-6、MCP-1 和 MIP-1 β 与 ESR、CRP 正相关,部分细胞因子受 DNA 甲基化调控。细胞因子在 SSc 血管新生、免疫炎症和纤维化中均发挥着重要作用,其表达受多种免疫细胞影响,单一细胞因子可能不足以反映疾病的活动性或并发症。在今后的研究中,联合使用多种细胞因子进行疗效和预后判断对临床将具有更重要的指导意义^[18-20]。

参考文献

[1] Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis[J]. Lancet, 2017, 390(10103): 1685-1699.
 [2] Allnore Y, Simms R, Distler O, et al. Systemic sclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015;15002. (2015-04-23)[2018-12-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189141>.
 [3] LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis[J]. J Rheumatol, 1988, 15(2): 202-205.
 [4] Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 8(1): 42-54.
 [5] Raja J, Denton CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis[J]. Semin Immunopathol, 2015, 37(5): 543-557.
 [6] Dantas AT, Almeida AR, Sampaio M, et al. Different profile of cytokine production in patients with systemic sclerosis and association with clinical manifestations[J]. Immunol Lett, 2018, 198: 12-16.
 [7] Zhu H, Zhu C, Mi W, et al. Integration of genome-wide DNA methylation and transcription uncovered aberrant methylation-regulated genes and pathways in the peripheral blood mononuclear cells of systemic sclerosis[J]. Int J Rheumatol, 2018;7342472. (2018-09-02)[2018-12-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Integration+of+genome-wide+dna+methylation+and+transcription+uncovered+aberrant+methylation-regulated+genes+and+pathways+in+the+peripheral>.
 [8] Masi AT. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee[J]. Arthritis Rheum, 1980, 23(5): 581-590.

[9] Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis [J]. Mediators Inflamm, 2014; 545493. (2014-03-09)[2018-12-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Burska+A%2C+Boissinot+M%2C+Ponchel+F.+Cytokines+as+biomarkers+in+rheumatoid+arthritis%5B%5D.+Mediators+Inflamm%2C+2014%3A545493>.
 [10] Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma [J]. Arthritis Rheum, 1992, 35(1): 67-72.
 [11] Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, et al. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis[J]. J Rheumatol, 1997, 24(2): 328-332.
 [12] Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, et al. Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with systemic sclerosis [J]. Clin Rheumatol, 2011, 30(2): 231-237.
 [13] Wuttge DM, Wildt M, Geborek P, et al. Serum IL-15 in patients with early systemic sclerosis: a potential novel marker of lung disease[J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(5): R85.
 [14] Takada T, Ohashi K, Hayashi M, et al. Role of IL-15 in interstitial lung diseases in amyopathic dermatomyositis with anti-MDA-5 antibody[J]. Respir Med, 2018, 141: 7-13.
 [15] Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, et al. CXCL10 (alpha) and CCL2 (beta) chemokines in systemic sclerosis: a longitudinal study[J]. Rheumatology (Oxford), 2008, 47(1): 45-49.
 [16] Goser S, Ottl R, Brodner A, et al. Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha in induction of experimental autoimmune myocarditis and effective anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy[J]. Circulation, 2005, 112(22): 3400-3407.
 [17] Feinberg AP. The key role of epigenetics in human disease prevention and mitigation [J]. N Engl J Med, 2018, 378(14): 1323-1334.
 [18] McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis-shaping the immunological landscape[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(1): 63-68.
 [19] van der Heijde D, Cheng-Chung Wei J, Dougados M, et al. Ixekizumab, an interleukin-17A antagonist in the treatment of ankylosing spondylitis or radiographic axial spondyloarthritis in patients previously untreated with biological disease-modifying anti-rheumatic drugs (COAST-V): 16 week results of a phase 3 randomised, double-blind, active-controlled and placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2018, 392(10163): 2441-2451.
 [20] Chen Z, Bozec A, Ramming A, et al. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(1): 9-17.

(2019-01-11 收稿)
(本 文 编 辑 : 刘 淑 萍)