

不同 RF 型类风湿性关节炎患者 Th17 相关细胞因子表达研究

厉吉霞^{1,2} 姜虹² 由红雷² 王斌^{1△} 钱冬萌¹

(1 青岛大学医学院病原微生物教研室 山东 青岛 266021; 2 烟台市烟台山医院 山东 烟台 264001)

摘要 目的:探讨类风湿因子阳性与阴性类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者外周血中辅助 T 细胞(Th17)及相关细胞因子白介素 17(interleukin, IL-17), 白介素 6(interleukin, IL-6)表达的差异。**方法:**收集 RA 患者 51 例, 根据 RF 测定分为 RF⁺、RF⁻ 组, 健康查体者(对照组)20 例, 采用流式细胞术检测受检者外周血单个核细胞(PBMC)的 Th17 细胞的百分率; 以酶联免疫吸附法(ELISA)检测受检者血浆中 IL-17, IL-6 的水平。**结果:**RA 患者 CD4⁺IL-17⁺T 细胞, IL-17、IL-6 水平平均高于对照组, RF 因子阳性与阴性 RA 患者之间 CD4⁺IL-17⁺T 细胞, IL-17、IL-6 表达水平均存在差异有统计学意义。**结论:**在 RA 中不同 RF 型免疫反应和炎症表达的不同, 可能与 Th17 及相关细胞因子表达差异有关。

关键词:类风湿性关节炎; 类风湿因子; Th17; IL-17; IL-6

中图分类号:R593.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-729-03

Expression of Th17 Type Cytokines in Rheumatoid Arthritis Patients with RF⁺ and RF⁻

LI Ji-xia^{1,2}, JIANG Hong², YOU Hong-lei², WANG Bin^{1△}, QIAN Dong-meng¹

(1 Department of pathogenic microorganism Qingdao University Medical College, 266021, Qingdao China;

2 Yantai hospital, 264001, Yantai China)

ABSTRACT Objective: To investigate the different expression of Th17 type cytokines in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients with rheumatoid factor positive (RF⁺) and rheumatoid factor negative (RF⁻). **Methods:** 51 RA patients including RF⁺ and RF⁻ and 20 healthy subjects were studied. The percentage of Th17 cell in single PBMC was determined by flow cytometry and the levels of IL-17 and IL-6 in plasma were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in all subjects. **Results:** Th17 cell and the concentrations of IL-6 and IL-17 were significantly higher in RA patients than in healthy controls. Furthermore, Th17 and the concentrations of IL-6 and IL-17 in RF⁺ cases were higher than that in RF⁻ cases. **Conclusions:** Different immune reaction and inflammation expression in RA patients with or without RF may relate with the differences of the expression of Th17 type cytokine.

Key words: Rheumatoid arthritis; Rheumatoid factor; Th17 cell; IL-17; IL-6.

Chinese Library Classification: R 593.21 **Document code:** Article: A

ID: 1673-6273(2011)04-729-03

前言

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节慢性炎症和骨质破坏为主的自身免疫性疾病, 它由多种因素引发, 在 RA 的发病和进展中 T 细胞起关键的作用, 而辅助 T 细胞(Th17)是最近发现的一种新型的 CD4⁺T 细胞亚群, 通过分泌白介素 17(IL-17)等细胞因子参与滑膜炎, 是一类重要的介导炎症反应的细胞。而类风湿性关节炎中 RF 阳性和阴性的患者临床特征和治疗均有所不同, 阳性组具有更多的免疫反应和炎症表达^[1], 本研究旨在进一步探讨类风湿因子阳性与阴性类风湿关节炎患者 Th17 及相关细胞因子表达是否存在差异。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2008 年 1 月 -2009 年 12 月烟台山医院风湿科 RA

患者 51 例, 女性 46 例, 男性 5 例, 年龄(22-68 岁), 平均为(42.6±12.0 岁), 疾病诊断符合 1987 年美国风湿病学会(ARA)修订的标准, 根据 RF 测定, 将其分为 RF 阳性组及 RF 阴性组。健康对照组 20 例(男 5 例, 女 15 例, 平均年龄[(36.2±6.2)岁], 经体检肝功、血脂、血糖、心电图均无异常。

1.2 采集

受检者均晨起空腹采集肘静脉血 10ml, 以 EDTA-K2 进行抗凝, 标本采集后立即摇匀, 进行血浆和血细胞的分离, 血浆分装于 EP 管内, -80℃ 冰箱保存备用, 细胞层用以分离单个核细胞。

1.3 材料和仪器

淋巴细胞分离液购自天津灏阳生物制品公司; PE 标记的抗人 CD3 单克隆抗体(PE-CD3), PerCP 标记的抗人 CD4 单克隆抗体(PerCP-CD4)及同型对照, FITC 抗人 IL-17mAbIgG1 及同型对照购自美国 Biolegend 公司; 固定和打孔剂 Fix/PerM 购自美国 eBioscience 公司; 人类白细胞抗原 17(IL-17)、人类白细胞抗原 6(IL-6)均购自美国 R&D 公司; 流式细胞仪型号为美国 COULTER EPICS XL; 酶标仪选用深圳雷社生命科学股份有限公司生产的 RT-6000 酶标分析仪。

作者简介: 厉吉霞(1972-), 女, 硕士, 主管检验师, 主要研究方向: 病原生物学, 13723956560, E-mail: yantailiyunhong@126.com

△ 通讯作者: 王斌, E-mail: wangbin31@yahoo.com

(收稿日期: 2010-11-03 接受日期: 2010-11-27)

1.4 方法

1.4.1 外周血单个核细胞的提取 (PBMC) 细胞层加 PBS 缓冲液混匀,缓慢加至淋巴细胞分离液的上层,2000rpm 离心 10 分钟,吸取中间的白色细胞层,即为单个核细胞,用 PBS 洗涤细胞,分离得 PBMC。

1.4.2 细胞染色 制备好的 PBMC 细胞悬液,以 PBS 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,取一定量的细胞按照试剂说明书推荐的用量加入荧光标记抗体 PE-CD3、PerCPCD4 表面染色,对照管加入同型对照抗体。进行细胞内的免疫荧光染色,加固定剂,室温暗处孵育 15 分钟,离心弃上清;加破膜剂温暗处孵育 10 分钟, PBS 洗涤后,在大约 $100\mu\text{l}$ 的细胞沉淀中加入 $2\mu\text{l}$ 正常的大鼠血清,4℃避光封闭 15 分钟。封闭结束后,直接加入抗人 IL-17 荧光抗体或同型对照,4℃避光孵育 30 分钟。加 PBS 洗液,1500rpm,离心 7 分钟,弃上清。以 $200\mu\text{l}$ 的 PBS 重悬细胞沉淀,流式细胞仪分析 $\text{CD4}^+\text{IL-17}^+$ 百分率。

1.4.3 IL-6、IL-17 的检测 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA),严格按照试剂盒操作说明进行试验。-80℃冰箱保存备用血浆复溶后集中检测,每个样本重复测定一次。手工绘制标准曲线,测定并计算 IL-6、IL-17 的含量。

1.5 统计学分析

所有计量资料均用 表示,应用统计软件进行统计学处理,采用样本间两两比较的秩和检验(Nemenyi 法)。P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RF 阳性与阴性组外周血 Th17 细胞分析

与对照组相比,RA 患者(RF^+ 、 RF^-)外周血 $\text{CD4}^+\text{IL17}^+\text{T}$ 细胞比率均明显升高 (P 均 <0.05);RF 阳性组与 RF 阴性组外周血 $\text{CD4}^+\text{IL17}^+\text{T}$ 细胞比率存在明显差异 (P 均 <0.05)。(见表 1,)

表 1 RF^+ 、 RF^- 患者及对照组外周血 Th17 细胞结果比较

Table1 Comparision of TH17 cell in RF^+ , RF^- and health control cases

group	difference of rank-sum	margin	P
No.1and No2	16.5000	14.3733	<0.0500
No1and No3	41.2500	14.5831	<0.0500
No2 and No3	24.7500	15.7837	<0.0500

No1:RF positive cases, No2:RF negative cases, No3:control. cases

2.2 外周血 IL-17、IL-6 含量比较

与对照组相比,RA 患者(RF^+ 、 RF^-)外周血 IL-17、IL-6 含量

均明显升高 (P 均 <0.05);RF 阳性组与 RF 阴性组 IL-17、IL-6 含量存在明显差异(P 均 <0.05)。(见表 2、表 3)

表 2 RF^+ 、 RF^- 患者及对照组外周血 IL-17 结果比较

Table 2 Comparision of IL-17 in RF^+ , RF^- and health control cases

group	difference of rank-sum	margin	P
No.1and No2	16.6905	14.3728	<0.0500
No1and No3	41.6417	14.5826	<0.0500
No2 and No3	24.9512	15.7832	<0.0500

No1:RF positive cases,No2:RF negative cases,No3:control. cases

表 3 RF^+ 、 RF^- 患者及对照组外周血 IL-6 结果比较

Table 3 Comparision of IL-6 in RF^+ , RF^- and health control cases

group	difference of rank-sum	margin	P
No.1and No2	14.6310	14.3721	<0.0500
No1and No3	36.4083	14.5819	<0.0500
No2 and No3	21.7774	15.7824	<0.0500

No1:RF positive cases ,No2:RF negative cases ,No3:control. cases

3 讨论

在 RA 发病中,有遗传、环境、感染、激素等因素,但具体原因尚不明确。T 淋巴细胞在 RA 发病机制中起着重要的作用。在类风湿关节炎等自身免疫病和过敏原特异性反应研究中发现一种特殊产生白介素 17(interleukin 17,IL-17)的辅助型 T 细

胞(Th17),发挥重要免疫调节作用^[2]。Th17 细胞除分泌 IL-17 外,还分泌 IL-6、TNF- α 等细胞因子,IL-17 是 RA 发病早期炎症因子,在炎症反应中起重要作用。IL-17 可刺激外周血单核细胞(PBMC)来源的巨噬细胞分泌 IL-1 和 TNF- α ,也以联合 IL-1 促进的 RA 滑膜细胞分泌 IL-6 和联合 TNF- α 促进的 RA 滑膜细胞分泌 IL-1、IL-6、IL-8^[8],这说明 IL-17 和 IL-1、TNF- α 有协

同作用,联合阻滞 IL-17 和 TNF- α 或 IL-1 能更有效地控制培养的 RA 滑膜细胞分泌 IL-6,也可以证明这一点^[9]。国内研究显示,RA 患者血清 IL-17 及 IL-6 表达增高,其水平高低反映病情的变化程度,并与病情活动及 RA 检测的其他相关指标有关。本研究结果显示,类风湿关节炎患者外周血 CD4⁺T 细胞中 Th17 细胞比率以及 IL-17,IL-6 的含量均高于健康对照组,提示在 RA 发病过程中 Th17 细胞可能参与诱导疾病炎症的发生发展,而细胞数量的增加可能导致 IL-17 及 IL-6 数量的增加。

在临床上,RA 患者常常表现不同的 RF 型,RF 阳性率为 52%~92%,阳性者疗效差且多有并发症(如周围神经炎及动脉炎等);约 20%类风湿关节炎病人的 RF 为阴性,阴性者病症较轻,且并发症少,极少发生血管炎、关节外病变、神经病变、皮下结节和干燥综合征。最近有研究表明,RA 患者滑膜或滑膜液中活化的 T 淋巴细胞可通过细胞-细胞接触的方式活化巨噬细胞、滑膜细胞和破骨细胞^[9]。目前认为 T 淋巴细胞的活化是 B 淋巴细胞依赖的。B 淋巴细胞可分化为成熟的浆细胞并产生 RF、抗 II 型胶原抗体、抗 HSP(相对分子质量为 65000D)抗体等。RF 是抗变性 IgG 分子 Fc 片断的自身抗体,约 80%RA 患者可产生循环 RF 抗体,它与关节侵袭性病变更明显、关节外病变发生率高和死亡率高有关。受累关节滑液中 RF 以 IgG 型为主,IgG-RF 自身结合形成多聚体复合物,少量 IgM-RF 则进一步加强复合物形成。多聚体复合物沉积于关节软骨表面,激活补体引起关节炎性损伤^[4]。RA 患者虽然表现为不同的 RF 型很常见,但相关的基础研究却不多见。从基因学的角度发现,在不同的 RF 型 RA 患者之间存在基因表达谱的差异,这些差异的基因涉及核苷酸糖、氨基酸、天冬氨酸等物质的代谢,以及细胞因子受体、信号传导等多种生物学途径,对这些基因的功能检索发现它们参与了细胞生长、生理过程、分子结合、催化信号传导等过程^[5]。陈海燕等研究发现 RF 阳性与阴性患者之间存在 CD4CD25 调节性 T 细胞免疫应答的不同^[6]。有资料证实 IL-6 可诱导 B 细胞分化为能分泌 IgG、IgM 型抗体的浆细胞,与促进合成 RF 有关^[7]。

本研究结果显示,RF 阳性组类风湿关节炎患者外周血 CD4⁺T 细胞中 Th17 细胞比率以及 IL-17,IL-6 的含量均高于

RF 阴性组,提示在 RA 发病过程中,不同 RF 型类风湿关节炎患者免疫应答及炎症反应不同,可能与 Th17 及其细胞因子表达差异有关。

参考文献(References)

- [1] 池联秋,孟艳.类风湿关节炎中 RF 阳性及阴性患者临床特征及治疗比较[J].福建医药杂志,2007,29(1):80-82
Chi lian-qiu, Meng yan. Comparison of clinical characteristic and treatment in patients with RF⁺ and RF⁻ rheumatoid arthritis [J]. Fujian Med J, 2007,29(1):80-82(In Chinese)
- [2] Wraith D C, Nicolson K S, Whitley N T. Regulatory CD4⁺ T cells and the control of autoimmune disease [J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16(6):695-701
- [3] Mcinnes B, Leung BP, Liew FY. Cell-cell interaction in synovitis interactions between T lymphocytes and synovial cells [J]. Arthritis Res, 2000,2(5):374-378
- [4] 张莉芸,李小峰,董琛.酷似系统性硬化症的成人早老症一例[J].中华风湿病学杂志,2004,8(5):320
Zhang li-yun, Li xiao-feng, Dong chen. A case with Progeria of adult similar to systemic scleroderma[J]. Chin J Rheumatol, 2004,8(5):320 (In Chinese)
- [5] 吕诚,徐世杰,肖诚,等.类风湿性关节炎 RF 阳性与阴性患者外周血 CD4⁺ 细胞基因表达的差异[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(2):159-161
Lv cheng, Xu shi-jie, Xiao cheng, et al. Gene exprission profile of the peripheral CD4⁺ T cells in patients with RF⁺ and RF⁻ rheumatoid arthritis[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2008,24(2):159-161(In Chinese)
- [6] 陈海燕,韩捷,周洁如,等.类风湿关节炎 RF 阳性与阴性患者 Foxp3 表达的差异[J].同济大学学报(医学版),2010,31(2):58-61
Chen hai-yan, Han jie, Zhou jie-ru, et al. Study an the differences of Foxp3 expression between rheumatoid factor positive and rheumatoid factor negative patients with rheumatoid arthritis[J]. Journal of Tongji University(Medical science), 2010,31(2):58-61(In Chinese)
- [7] Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-receptor antibody:a multicenter, double-blind,placebocontrolled trial [J]. Arthritis Rheum, 2004,50(6):1761-1769