

• 论著 •

环瓜氨酸多肽对类风湿关节炎患者外周血淋巴细胞分泌 $\text{INF-}\gamma$ 及 IL-4 的影响

姚茹冰 高佩芳 沈思钰 郭郡浩 蔡辉

中图分类号: R593.22 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)08-0571-03

摘要: 目的 观察环瓜氨酸多肽(CCP)对类风湿关节炎(RA)患者外周血 T 淋巴细胞分泌 $\text{INF-}\gamma$ 、IL-4 的影响。方法 分离培养 24 例 RA 患者和 16 例健康人外周血淋巴细胞,分为以下 3 组处理,RA 空白对照组:RA 患者外周血淋巴细胞分离培养不加任何药物干预;RA CCP 组:RA 患者外周血淋巴细胞加 CCP 干预(CCP 终浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$);健康空白对照组:健康人外周血淋巴细胞分离培养不加任何药物干预。上述各组细胞培养 72 h 后,酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞培养上清中 $\text{INF-}\gamma$ 及 IL-4 水平。结果 与健康空白对照组外周血 T 淋巴细胞分泌的 $\text{INF-}\gamma$ 、IL-4 及 $\text{INF-}\gamma/\text{IL-4}$ 相比,RA 空白对照组 $\text{INF-}\gamma$ 水平升高($P < 0.05$),IL-4 水平下降($P < 0.01$), $\text{INF-}\gamma/\text{IL-4}$ 升高($P < 0.01$);与 RA 空白对照组相比,RA CCP 组 $\text{INF-}\gamma$ 水平进一步升高($P < 0.05$),IL-4 水平进一步下降($P < 0.05$), $\text{INF-}\gamma/\text{IL-4}$ 进一步升高($P < 0.01$)。结论 CCP 对 RA 患者外周血 T 淋巴细胞分泌 Th1 及 Th2 型细胞因子 $\text{INF-}\gamma$ 及 IL-4 有明显的调节作用,可能在 RA 发病机制中起重要的作用。

关键词: 类风湿关节炎; 环瓜氨酸多肽; T 淋巴细胞; $\text{INF-}\gamma$; IL-4

The effect of cyclic citrullinated peptide on secretion of interferon- γ and interleukin-4 by peripheral blood lymphocyte in rheumatoid arthritis patients YAO Rubing, GAO Peifang, SHEN Siyu, et al.
Department of Combination of Traditional and Western Medicine, Nanjing Military Hospital, Nanjing 210002, China

Corresponding author: YAO Rubing, Email: yaorubing@sina.com

Abstract: **Objective** To observe the effect of cyclic citrullinated peptide (CCP) on secretion of interferon- γ and interleukin-4 by peripheral blood lymphocyte in rheumatoid arthritis patients (RA). **Methods** Peripheral blood lymphocytes (PBLs) of 24 RA patients and 16 healthy volunteers were separated and cultured. The cultures were divided into three groups: RA control group, PBLs of RA were cultured without addition of any drugs; RA CCP group, PBLs of healthy volunteers were cultured with addition of CCP ($20 \mu\text{g/ml}$); healthy control group, PBLs of RA were cultured without addition of any drugs. $\text{INF-}\gamma$ and IL-4 were determined using ELISA method after a 72-hour culture. **Results** Compared with healthy control group, $\text{INF-}\gamma$ and the ratio of $\text{INF-}\gamma$ to IL-4 ($P < 0.05$) increased, and IL-4 decreased ($P < 0.01$) in RA control group. Compared with RA control group, $\text{INF-}\gamma$ ($P < 0.05$) and the ratio of $\text{INF-}\gamma$ and IL-4 ($P < 0.01$) were up-regulated, and IL-4 was down-regulated ($P < 0.05$) in RA CCP group. **Conclusion** CCP regulates Th1 and Th2 cytokines, $\text{INF-}\gamma$ and IL-4, by peripheral blood T lymphocyte in RA patients and it may play an important role in pathogenesis of RA.

Key words: Rheumatoid arthritis; Cyclic citrullinated peptide; T lymphocyte; $\text{INF-}\gamma$; IL-4

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的以关节滑膜炎为特征的慢性、全身性、自身免

疫性疾病。其病因尚不明确,多种参与发病的机制在炎症关节内同时和依序发生,其中抗原依赖性 T 淋巴细胞活化可能是最早发生的改变,之后 T 细胞亚群的失衡引起异常免疫反应,导致关节损伤,在 RA 发病中起重要作用。近年来的研究显示抗环瓜氨酸多肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体对

基金项目: 南京军区南京总医院青年基金课题(Q2008041)

作者单位: 210002 南京,南京军区南京总医院中西医结合科

通讯作者: 姚茹冰, Email: yaorubing@sina.com

RA 的诊断具有高度的敏感性和特异性,其抗原 CCP 与 RA 的发病及致病过程密切相关^[1]。本实验通过观察 CCP 刺激 RA 患者外周血淋巴细胞后 T 细胞亚群相关细胞因子分泌水平的变化,研究 CCP 抗原特异性 T 淋巴细胞在 RA 发病中的作用,从而为使用药物干预 CCP 抗原激活 T 细胞治疗 RA 提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2009 年 5 月至 2009 年 9 月我院就诊的 24 例 RA 患者,均符合美国风湿病学会(ACR)1987 年 RA 诊断标准^[2]。同时满足以下入选条件:血清抗 CCP 抗体阳性;近 1 个月内未用过免疫抑制剂;近 1 个月内未服用 >10 mg/d(按泼尼松剂量计算)的肾上腺糖皮质激素。其中女 19 例,男 5 例,年龄 28~81 岁,病程 3 月~40 年,平均病程 8.7 ± 2.6 年。选取 16 名健康志愿者作为对照,其中女 10 例,男 6 例,年龄 25~29 岁。

1.2 试剂与仪器

人工合成环瓜氨酸肽(CCP-HQC/HQE/STX/GRS/RGR/CGRSGS)由上海华大天源公司合成制备,纯度>95.0%;Hyclone 改良型 RPMI 1640 培养基(含 25 mmol/L Hepes 和 2 mmol/L 谷氨酰胺),Gibco 公司产品;人外周血淋巴细胞分离液,TBD 公司产品;胎牛血清,杭州四季青公司产品;植物血凝素(PHA),Sigma 公司产品;IFN- γ 、IL-4 试剂盒为美国 R&D 公司进口分装。

台式水平离心机(安徽科大创新),超净工作台(苏州安泰),CO₂ 培养箱(美国 NAPCO 公司),荧光倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),BIO-RAD Model 680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);96 孔细胞培养板(美国 Corning 公司)。

1.3 人外周血淋巴细胞分离培养、上清收集

无菌采取肝素抗凝静脉血 6~8 ml,1000 r/min 离心 5 min,取适量血浆于 -20℃ 冻存备用。去血浆后的血细胞用生理盐水重悬,用 Ficoll 密度梯度离心(2100 r/min 离心 25 min),缓慢吸取白雾状淋巴细胞层。将收集到的淋巴细胞集中于一支离心管中,用 5 倍于细胞悬液的 1640 培养基(不含血清)洗涤 2 次,以 2000 r/min 和 1500r/min 离心各 10 min,弃大部分上清。将洗涤后得到的淋巴细胞团用少量 RPMI1640 培养基(含 10% 胎牛血清、10 μ g/ml PHA)轻轻打散,血细胞计数板统计并调节细胞浓度

至 1×10^6 /ml,于细胞悬液中加入 10% 的自体血浆^[3],混匀。接种于 24 孔细胞培养板,每孔 1 ml。

分为以下 3 组处理,RA 空白对照组:RA 患者外周血淋巴细胞分离培养不加任何药物干预;RA CCP 组:RA 患者外周血淋巴细胞分离培养加 CCP 干预(CCP 终浓度为 20 μ g/ml);健康空白对照组:健康人外周血淋巴细胞分离培养不加任何药物干预。置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。培养 72 h 后,于 4℃,3000 r/min 离心 5 min 收集各组细胞培养上清,-20℃ 冻存备用。

1.4 细胞上清中 IL-4、IFN- γ 的检测

用酶联免疫吸附法(ELISA)测定培养细胞上清中 IL-4、IFN- γ 的含量,经对倍稀释后,严格按 ELISA 试剂盒说明书操作。于酶标仪 450/630 nm 双波长下读取吸光度(OD)值。根据标准曲线,换算出样品中 IL-4 和 IFN- γ 的浓度。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 15.0 进行数据的处理分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s$)表示。同组人群不同干预方法之间均数的比较采用配对 *t* 检验,人群组间均数的比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

结果如表 1 所示,与健康空白对照组外周血 T 淋巴细胞分泌的 IFN- γ (79.77 $\pm$ 18.05)、IL-4 (150.37 $\pm$ 29.52) 及 IFN- γ /IL-4 (1.08 $\pm$ 0.24) 相比,RA 空白对照组 IFN- γ 水平升高(182.45 $\pm$ 20.95),IL-4 水平下降(62.95 $\pm$ 6.88),IFN- γ /IL-4 升高(2.84 $\pm$ 0.23),差异均有统计学意义(*P* < 0.05,*P* < 0.01,*P* < 0.01)。

与 RA 空白对照组相比,RA CCP 组 IFN- γ 水平进一步升高(195.32 $\pm$ 19.55),IL-4 水平进一步下降(56.67 $\pm$ 7.39),IFN- γ /IL-4 进一步升高(3.28 $\pm$ 0.26),差异均有统计学意义(*P* < 0.05,*P* < 0.05,*P* < 0.01)。

表 1 CCP 对 RA 患者外周血淋巴细胞培养上清分泌 IFN- γ 、IL-4 的影响

组别	n	IFN- γ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ /IL-4
健康空白对照组	16	79.77 $\pm$ 18.05	150.37 $\pm$ 29.52	1.08 $\pm$ 0.24
RA 空白对照组	24	182.45 $\pm$ 20.95*	62.95 $\pm$ 6.88**	2.84 $\pm$ 0.23**
RA CCP 组	24	195.32 $\pm$ 19.55#	56.67 $\pm$ 7.39#	3.28 $\pm$ 0.26##

注:与健康空白对照组相比,**P* < 0.05;与健康空白对照组相比,***P* < 0.01;与 RA 空白对照组相比,#*P* < 0.05;与 RA 空白对照组相比,##*P* < 0.01

3 讨论

RA 的病因及发病机制至今不完全明确,多数观点认为 T 细胞在 RA 发病机制中起着关键作用,T 细胞被不明因素激活后分泌的细胞因子参与 RA 的诱发和延续。具体而言,RA 患者不正常的 T 细胞库是 RA 发病的内在因素,T 细胞通过直接接触或分泌介质的方式调节其他致病细胞的作用,控制 RA 的发生和发展。

研究表明,RA 患者存在高比例潜在性自身反应性 T 细胞,当自身反应性 T 细胞克隆体积增大到某一阈值时成为致病性 T 细胞并竞争性地抑制其他正常 T 细胞的增殖,导致 T 细胞克隆多样性明显减少。对 RA 患者细胞因子的分析发现,过量的 Th1 细胞产物可引起局部慢性炎症和基质破坏,Th2 型细胞因子含量很低或检测不出。进一步的研究发现浸润到滑膜的 $CD4^+CD28^-$ T 细胞不需要共刺激信号(或通过其他信号转导)就能产生过量的 $IFN-\gamma$,它们还表达穿孔素,溶解细胞,诱发炎症;T 细胞存在向 Th2 表型分化障碍^[4]。RA 也因此被归类为 Th1/Th2 功能失衡,Th1 活性超过 Th2 活性诱发的疾病,促炎性的 Th1 及其细胞因子 $IFN-\gamma$ 和抗炎性的 Th2 及其细胞因子 IL-4 的不平衡被认为在 RA 的发病机制中有重要作用^[5]。

瓜氨酸为人体的非标准氨基酸,不能在蛋白质的翻译过程中被合成,但是在肽酰基精氨酸脱亚胺酶(peptidylarginine deiminase, PAD)的作用下可以使蛋白质中的精氨酸残基转化为瓜氨酸残基,这一过程称为瓜氨酸化,是一种蛋白质的翻译后修饰过程。近几年,瓜氨酸化作用在 RA 发病中的意义越来越引起人们的重视,抗 CCP 抗体在 RA 临床诊断中的应用,显示了很强的疾病特异性,因此,CCP 及其相关抗原逐渐成为最受关注的 RA 自身抗原之一^[6]。多数研究认为,CCP 及其相关抗原诱导的细胞免疫反应对瓜氨酸族抗体的产生进而导致 RA 发病发挥了重要作用,是 RA 发病过程中的原发致病靶抗原。国内相关研究发现,CCP 可刺激多数 RA 患者 T 细胞增殖,在病程早期即可出现^[7]。本实验在上述病因及发病机制的理论及相关研究的基础上,应用合成的 CCP 作为 RA 致病的抗原,研究了其对 RA 外周血 T 细胞分泌 Th1 和 Th2 细胞因子 $IFN-\gamma$ 和 IL-4 的影响。

本实验结果显示,RA 患者外周血淋巴细胞分泌的 $IFN-\gamma$ (182.45 ± 20.95),与健康人 ($79.77 \pm$

18.05)相比明显升高;RA 患者分泌的 IL-4 (62.95 ± 6.88),与健康人 (150.37 ± 29.52)相比明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。RA 患者 $IFN-\gamma/IL-4$ (2.84 ± 0.23)与健康人 (1.08 ± 0.24)相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。RA 患者经 CCP 干预后,外周血淋巴细胞分泌的 $IFN-\gamma$ 进一步升高 (195.32 ± 19.55),IL-4 进一步降低 (56.67 ± 7.39), $IFN-\gamma/IL-4$ 进一步升高 (3.28 ± 0.26),三者与干预前相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

此结果提示,RA 患者确实存在 Th1 活性超过 Th2 活性,促炎性的 Th1 及其细胞因子 $IFN-\gamma$ 和抗炎性的 Th2 及其细胞因子 IL-4 不平衡的状况,合成的 CCP 可能参与活化 RA 外周血抗原特异性 T 细胞,调节 Th1 及 Th2 型细胞因子的分泌,加剧 RA Th1/Th2 亚群失衡的状况,从而在 RA 发病中起重要的作用。

总之,选用适当的药物干预 CCP 抗原对 T 细胞的激活和功能性细胞因子的分泌,成为治疗 RA 不可或缺的治疗途径之一。

【参 考 文 献】

- [1] van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein / peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med*, 2002, 60 (10): 383-388.
- [2] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1988, 31 (3): 315-324.
- [3] Laura Fraccaroli, Julio Alfieri, Luciana Larocca, et al. A potential tolerogenic immune mechanism in a trophoblast cell line through the activation of chemokine-induced T cell death and regulatory T cell modulation. *Human Reproduction*, 2009, 24 (1): 166-175.
- [4] Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O, et al. Synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis are refractory to the T helper type 2 differentiation-inducing effects of interleukin-4. *Immunology*, 1999, 96 (3): 358-364.
- [5] Baek HJ, Zhang L, Jarvis LB, et al. Increased IL-4 + $CD8^+$ T cells in peripheral blood and autoreactive $CD8^+$ T cell lines of patients with inflammatory arthritis. *Rheumatology*, 2008, 47 (6): 795-803.
- [6] 黄梅,贾丽,李晓军. 抗 CCP 抗体在类风湿性关节炎中的临床意义. *医学研究生学报*, 2008, 21 (3): 289-292.
- [7] 穆荣,何箐,栗占国. 环瓜氨酸多肽对类风湿关节炎 T 细胞激活作用的研究. *中华风湿病学杂志*, 2006, 5 (10): 273-275.

(收稿日期: 2010-03-11)