

脐带间充质干细胞对类风湿关节炎患者免疫系统的作用

付 坤, 曹小燕, 熊 焰, 陶 洪

(十堰市人民医院风湿免疫科, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cell, UC-MSC)移植治疗类风湿关节炎的疗效及免疫相关因子变化情况。方法 类风湿关节炎患者 30 例, 15 例常规药物治疗者为对照组, 15 例在常规药物治疗基础上加行 UC-MSC 移植治疗者为观察组, 评定 2 组治疗前、后 ACR20 临床缓解状况评分、DAS28 关节活动度评分及 HAQ 健康评分, 检测治疗前及治疗后 3 个月患者血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-17、类风湿因子、C-反应蛋白水平及血清 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、B 细胞比例, 并进行 2 组间比较。结果 治疗前, 观察组 DAS28 评分[(5.12 \pm 0.33)分]、HAQ 评分[(3.71 \pm 0.46)分]、ACR20 评分[(6.34 \pm 0.74)分]与对照组[(5.09 \pm 0.27)、(3.69 \pm 0.31)、(6.29 \pm 0.61)分]比较差异均无统计学意义($P>0.05$); 治疗后 3 个月, 观察组 DAS28 评分[(3.84 \pm 0.28)分]、HAQ 评分[(2.43 \pm 0.64)分]、ACR20 评分[(3.07 \pm 0.38)分]低于对照组[(4.76 \pm 0.36)、(3.31 \pm 0.52)、(4.87 \pm 0.73)分]和治疗前($P<0.05$), 对照组 DAS28 评分、HAQ 评分、ACR20 评分与治疗前比较差异无统计学意义($P>0.05$); 治疗前, 观察组与对照组 TNF- α [(2.19 \pm 0.51)、(2.21 \pm 0.54) μ g/L]、IFN- γ [(9.60 \pm 1.34)%、(9.56 \pm 1.21)%]、IL-4[(6.91 \pm 0.31)、(6.85 \pm 0.29)u/mL]、IL-17[(2.51 \pm 0.52)、(2.52 \pm 0.45)u/mL]、类风湿因子[(198.54 \pm 136.32)、(194.81 \pm 125.56)u/mL]、C-反应蛋白水平[(32.84 \pm 20.25)、(33.74 \pm 25.41)mg/L]及 CD3⁺[(6.07 \pm 0.64)%、(6.12 \pm 0.61)%]、CD4⁺[(3.65 \pm 0.34)%、(3.69 \pm 0.32)%]、CD8⁺[(1.86 \pm 0.24)%、(1.87 \pm 0.21)%]和 B 细胞比率[(16.46 \pm 2.13)%、(16.72 \pm 2.27)%]比较差异均无统计学意义($P>0.05$), 治疗后 3 个月, 观察组 IL-4 水平[(12.40 \pm 0.46)u/mL]、CD4⁺比率[(4.82 \pm 0.38)%]、CD8⁺比率[(2.67 \pm 0.32)%]高于治疗前和对照组治疗后[(7.64 \pm 0.21)u/mL、(3.94 \pm 0.31)%、(2.19 \pm 0.31)%], TNF- α [(0.84 \pm 0.24) μ g/L]、类风湿因子[(94.32 \pm 73.75)u/mL]、C-反应蛋白水平[(13.55 \pm 11.37)mg/L]低于治疗前和对照组治疗后[(1.67 \pm 0.37) μ g/L、(167.08 \pm 89.17)u/mL、(29.48 \pm 18.56)mg/L] ($P<0.05$), IL-17 水平[(3.02 \pm 0.62)u/mL]及 IFN- γ [(11.74 \pm 1.47)%]、CD3⁺[(6.63 \pm 0.75)%]、B 细胞比率[(12.41 \pm 2.93)%]与治疗前及对照组治疗后[(2.76 \pm 0.43)u/mL、(10.34 \pm 1.04)%、(6.27 \pm 0.72)%、(15.24 \pm 1.87)%]比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 移植 UC-MSC 可降低类风湿关节炎患者机体炎性相关因子, 提高免疫相关因子水平。

关键词: 类风湿关节炎; 脐带间充质干细胞; 免疫系统

Influence of umbilical cord mesenchymal stem cell on immune system in patients with rheumatoid arthritis

FU Kun, CAO Xiao-yan, XIONG Yan, TAO Hong

(Department of Rheumatology and Immunology, Shiyan Renmin Hospital, Shiyan 442000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of umbilical cord mesenchymal stem cell (UC-MSC) transplantation on rheumatoid arthritis and the changes of immune related factors. **Methods** In 30 patients with rheumatoid arthritis, 15 patients received conventional drug therapy (control group) and the other 15 patients received UC-MSC transplantation in addition to conventional drug treatment (observation group). Both two groups were assessed ACR20 clinical remission score, disease activity score (DAS) 28 and Health Assessment Quantity (HAQ) score before and after treatment. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-4, IL-17, rheumatoid factor, C-reactive protein (CRP), and the ratios of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and B cells were measured before and after treatment and compared between two groups. **Results** There were no significant differences in DAS28 scores (5.12 \pm 0.33 vs 5.09 \pm 0.27), HAQ scores (3.71 \pm 0.46 vs 3.69 \pm 0.31) and ACR20 scores (6.34 \pm 0.74 vs 6.29 \pm 0.61) between observation group and control group before treatment ($P>0.05$). After 3-month treatment, DAS28 score (3.84 \pm 0.28), HAQ score (2.43 \pm 0.64) and ACR20 score (3.07 \pm 0.38) in observation group were significantly lower than those in control group (4.76 \pm 0.36, 3.31 \pm 0.52, 4.87 \pm 0.73) ($P<0.05$) and before treatment in observation group ($P<0.05$). There were no significant differences in DAS28 score, HAQ score and ACR20 score in control group after treatment in comparison with those before treatment ($P>0.05$). Before treatment, there were no significant differences

in the levels of TNF- α ((2.19 \pm 0.51), (2.21 \pm 0.54) μ g/L), IFN- γ ((9.60 \pm 1.34)%, (9.56 \pm 1.21)%), IL-4 ((6.91 \pm 0.31), (6.85 \pm 0.29) u/mL), IL-17 ((2.51 \pm 0.52), (2.52 \pm 0.45) u/mL), rheumatoid factor ((198.54 \pm 136.32), (194.81 \pm 125.56) u/mL), CRP ((32.84 \pm 20.25), (33.74 \pm 25.41) mg/L), CD3⁺ ratio ((6.07 \pm 0.64)%, (6.12 \pm 0.61)%), CD4⁺ ratio ((3.65 \pm 0.34)%, (3.69 \pm 0.32)%), CD8⁺ ratio ((1.86 \pm 0.24)%, (1.87 \pm 0.21)%) and B cell ratio ((16.46 \pm 2.13)%, (16.72 \pm 2.27)%) between observation group and control group ($P>0.05$). After 3-month treatment, IL-4 level ((12.40 \pm 0.46) u/mL), CD4⁺ ratio ((4.82 \pm 0.38)%) and CD8⁺ ratio ((2.67 \pm 0.32)%) in observation group were significantly higher than those before treatment and in control group after 3-month treatment ((7.64 \pm 0.21) u/mL, (3.94 \pm 0.31)%, (2.19 \pm 0.31)%), and the levels of TNF- α ((0.84 \pm 0.24) μ g/L), rheumatoid factor ((94.32 \pm 73.75) u/mL) and CRP ((13.55 \pm 11.37) mg/L) in observation group were significantly lower than those before treatment and in control group after treatment ((1.67 \pm 0.37) μ g/L, (167.08 \pm 89.17) u/mL, (29.48 \pm 18.56) mg/L) ($P<0.05$). The IL-17 level ((3.02 \pm 0.62) u/mL), IFN- γ ratio ((11.74 \pm 1.47)%), CD3⁺ ratio ((6.63 \pm 0.75)%) and B cell ratio (12.41 \pm 2.93) in observation group after 3-month treatment showed no significant differences in comparison with those before treatment and control group after treatment ((2.76 \pm 0.43) u/mL, (10.34 \pm 1.04)%, (6.27 \pm 0.72)%, 15.24 \pm 1.87) ($P>0.05$). **Conclusion** UC-MSC transplantation can reduce the levels of inflammatory factors in patients with rheumatoid arthritis and improve the levels of immune-related factors.

Key words: Rheumatoid arthritis; umbilical cord mesenchymal stem cell; immune system

类风湿关节炎是一种以关节慢性炎症为主的自身免疫性疾病,确切发病机制目前尚不明确,一般认为与免疫系统存在密切关系^[1-2]。本文回顾性分析 15 例行脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cell, UC-MSC)移植治疗的类风湿关节炎患者临床资料,分析其疗效及免疫相关因子变化情况,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 10 月—2016 年 6 月十堰市人民医院诊治的类风湿关节炎患者 30 例,男 14 例,女 16 例;年龄 30~75 岁。类风湿关节炎诊断符合 1987 年美国风湿病学协会诊断标准。纳入标准:(1)无其他严重并发症;(2)2 个月内未接受过血制品治疗。依据治疗方法不同,15 例行常规药物治疗者为对照组,男 7 例,女 8 例;年龄(46.3 \pm 5.2)岁。另 15 例在常规药物治疗基础上加行 UC-MSC 移植治疗者为观察组,男 7 例,女 8 例;年龄(47.5 \pm 4.6)岁。2 组年龄、性别比例比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究经十堰市人民医院医学伦理委员会审批通过,患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 UC-MSC 制备 将新获得(本院产科)的脐带组织用 10 mL 含有 10%青、链霉素的 PBS 溶液冲洗 2 次,剪成 0.5 mm \times 0.5 mm 小块后,置入 50 mL 离心管中,加入质量分数 0.5%透明质酸酶,置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中消化 15 min。溶液呈半黏稠状态时,离心半径 8 cm,2 000 r/min 离心 5 min,使用 100 μ m 滤网过滤液体,将过滤后液体放置在细胞培养皿中,加入体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养,体积分数 5% CO₂ 条件下培养细胞至 80%~90%丰度(3~5 d),进行细胞传代。

1.2.2 治疗方法 对照组采用来氟米特、甲氨蝶呤片、塞来昔布、双氯芬酸钠缓释片进行常规治疗;观察组在对照组治疗基础上,静脉注射 UC-MSC(1 \times 10⁸)

50 mL,共 4 次,每次间隔 1 个月。

1.2.3 免疫相关因子检测 治疗前及治疗后 3 个月,分别采集患者肘静脉血 10 mL,离心半径 8 cm,2 000 r/min 离心 5 min,取上层血清,采用 Luminex200 多功能液相芯片分析系统检测血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素(interleukin, IL)-4、-17 及类风湿因子、C-反应蛋白水平,应用美国 BD 公司 FACSClibur 流式细胞仪检测血清 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 B 细胞比例。

1.3 观察指标 治疗前及治疗后 3 个月,根据 ACR20 类风湿关节炎临床缓解标准^[1]、DAS28 标准^[3]分别对治疗效果及关节活动度进行评价和评分,并采用健康评定量表(Health Assessment Quantity, HAQ)^[4]评价患者状况;比较 2 组治疗前、后 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-17 水平及 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 B 细胞比率。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较采用 t 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 2 组疗效评价 治疗前,2 组 DAS28、HAQ、ACR20 评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后 3 个月,观察组 DAS28、HAQ、ACR20 评分低于治疗前及对照组治疗后($P<0.05$),对照组治疗后与治疗前比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 2 组疗效评价 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	DAS28 评分		HAQ 评分		ACR20 评分	
	治疗前	治疗后 3 个月	治疗前	治疗后 3 个月	治疗前	治疗后 3 个月
观察组	5.12 \pm 0.33	3.84 \pm 0.28 ^{ab}	3.71 \pm 0.46	2.43 \pm 0.64 ^{ab}	6.34 \pm 0.74	3.07 \pm 0.38 ^{ab}
对照组	5.09 \pm 0.27	4.76 \pm 0.36	3.69 \pm 0.31	3.31 \pm 0.52	6.29 \pm 0.61	4.87 \pm 0.73

注:a 与治疗前比较, $P<0.05$;b 与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 2 组治疗前、后免疫相关因子水平比较 治疗

前,2 组免疫相关因子水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。治疗后 3 个月,观察组血清 TNF- α 、类风湿因子、C-反应蛋白水平低于治疗前及对照组治疗后,IL-4 水平及 CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 比率高于治疗前及对照组治疗后,差异均有统计学意义($P<0.05$),IFN- γ 、IL-17 水平及 B 细胞、CD3 $^{+}$ 比率与治疗前及对照组治疗后比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。对照组治疗后 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-17 水平及 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 、B 细胞比率与治疗前比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 2 组治疗前、后免疫相关因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

项 目	观察组($n=15$)		对照组($n=15$)	
	治疗前	治疗后 3 个月	治疗前	治疗后 3 个月
ρ (TNF- α)/(μ g/L)	2.19 \pm 0.51	0.84 \pm 0.24 ^{ab}	2.21 \pm 0.54	1.67 \pm 0.37 ^a
IFN- γ /%	9.60 \pm 1.34	11.74 \pm 1.47	9.56 \pm 1.21	10.34 \pm 1.04
IL-4/(u/mL)	6.91 \pm 0.31	12.40 \pm 0.46 ^{ab}	6.85 \pm 0.29	7.64 \pm 0.21 ^a
IL-17/(u/mL)	2.51 \pm 0.52	3.02 \pm 0.62	2.52 \pm 0.45	2.76 \pm 0.43
类风湿因子/(u/mL)	198.54 \pm 136.32	94.32 \pm 73.75 ^{ab}	194.81 \pm 125.56	167.08 \pm 89.17
ρ (C-反应蛋白)/(mg/L)	32.84 \pm 20.25	13.55 \pm 11.37 ^{ab}	33.74 \pm 25.41	29.48 \pm 18.56
CD3 $^{+}$ /%	6.07 \pm 0.64	6.63 \pm 0.75	6.12 \pm 0.61	6.27 \pm 0.72
CD4 $^{+}$ /%	3.65 \pm 0.34	4.82 \pm 0.38 ^{ab}	3.69 \pm 0.32	3.94 \pm 0.31 ^a
CD8 $^{+}$ /%	1.86 \pm 0.24	2.67 \pm 0.32 ^{ab}	1.87 \pm 0.21	2.19 \pm 0.31 ^a
B 细胞/%	16.46 \pm 2.13	12.41 \pm 2.93	16.72 \pm 2.27	15.24 \pm 1.87

注:a 与治疗前比较, $P<0.05$;b 与对照组比较, $P<0.05$ 。

3 讨 论

传统非甾体类抗炎药物和慢作用抗风湿药物是临床治疗类风湿关节炎的常用药物,但受口服耐受等因素影响,不能完全控制病情,患者致残率较高。间充质干细胞对机体免疫反应及免疫耐受具有调节作用^[5]。间充质干细胞可抑制 T 细胞增殖活化,调节相关免疫细胞及因子,缓解炎症反应;在趋化因子诱导下可迁移至受损组织,对受损组织进行修复,抑制促炎因子释放,对多种自身免疫性疾病的免疫耐受有良好缓解作用^[6]。此外,间充质干细胞在体外可诱导分化为骨、软骨、脂肪、腱、肌肉等细胞,可聚集至关节病变部位,对关节组织进行损伤修复^[7-8]。研究结果^[9]显示,类风湿关节炎患者关节炎症反应与 CD4 $^{+}$ T 细胞大量浸润呈正相关,而 Th1 细胞可分泌如 IL-1、TNF- α 、IFN- α 等炎性因子,其中 TNF- α 具有促进炎性反应的作用,并贯穿类风湿关节炎发生、发展的过程。

张效北等^[10]研究结果显示,采用 MSC 治疗的类风湿关节炎患者的显效率、有效率均明显高于未使用 MSC 治疗的对照组。李慧等^[11]采用 UC-MSC 治疗类风湿关节炎大鼠,观察免疫炎性病理过程,结果显示模型组大鼠血清 IL-1、IL-6、IL-18、TNF- α 、血管细胞黏附分子-1 和中性粒细胞表面 CD11b 表达水平均高于正常组,UC-MSC 组大鼠治疗后血清 IL-1、IL-6、IL-18、TNF- α 、血管细胞黏附分子-1 和中性粒细胞表面 CD11b 表达水平明显低于模型组和治疗前,表明 UC-MSC 可缓解类风湿关节炎的免疫炎性关节症状。

苏毅等^[12]研究结果显示,自体外周血造血干细胞可促进患者造血功能重建,改善近期临床症状。

有学者^[13]认为,以 TNF- α 、趋化因子、IL 等细胞因子为靶点的类风湿关节炎治疗具有良好的治疗效果;韩博等^[14]认为,骨髓间充质干细胞可促进机体损伤修复及细胞再生。本研究结果显示,观察组患者治疗后 3 个月 DAS28、HAQ、ACR20 评分均较治疗前明显下降,且血清 TNF- α 、类风湿因子、C-反应蛋白水平低于治疗前及对照组治疗后,IL-4 水平及 CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 比率高于治疗前及对照组治疗后,差异均有统计学意义,表明移植 UC-MSC 可提高类风湿关节炎患者机体免疫力,降低炎性反应及其所产生的炎性因子水平。

参考文献

[1] 陈俊伟,张少然,闫成兰,等. T 辅助细胞亚型细胞相关因子在类风湿关节炎发病中的作用[J]. 中国药物与临床,2012,12(4): 420-423.

[2] 赵俊桃,李少侠. 类风湿关节炎患者外周血 Th1、Th2 和 Th17 细胞亚群表达比例变化的特点[J]. 医药论坛杂志,2013,34(9):11-12.

[3] van der Heijde DM, van't Hof MA, van Riel PL, et al. Validity of single variables and composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 1992, 51(2):177-181.

[4] Pincus T, Swearingen C, Wolfe F. Toward a multidimensional Health Assessment Questionnaire (MDHAQ): assessment of advanced activities of daily living and psychological status in the patient-friendly health assessment questionnaire format [J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(10):2220-2230.

[5] 王黎明,周建军,白雯,等. 脐带间充质干细胞治疗 17 例类风湿性关节炎患者的临床疗效观察[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(7):659-662.

[6] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(9):726-736.

[7] Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair[J]. Pharmacol Res, 2008, 58(2):88-111.

[8] 马武秀,程迅生,陈肖松. 胎盘间充质干细胞成骨定向分化的研究进展[J]. 中华全科医学,2012,10(6):936-937.

[9] 尹纪伟,赵福涛. 间充质干细胞在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 医学综述,2011,17(5):644-646.

[10] 张效北,李江涛,赵和泰,等. 间充质干细胞治疗类风湿性关节炎患者临床分析[J]. 中国现代医生,2011,49(34):139-140.

[11] 李慧,顾健,林传明,等. 脐带间充质干细胞对 CIA 大鼠炎症因子的干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(36):6701-6704.

[12] 苏毅,赖思含,易海,等. 纯化的自体外周血造血干细胞移植治疗难治性幼年型类风湿性关节炎的初步研究[J]. 实用医院临床杂志,2011,8(4):33-34.

[13] 曾小威,李志刚. 类风湿性关节炎治疗及免疫分子机制研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2015,29(11):1044-1046.

[14] 韩博,蒋玉东,董大明. 骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(3):300-302.

收稿日期:2017-02-12 修回日期:2017-05-27 本文编辑:徐小红