

类风湿关节炎患者血清和关节液增加体外培养健康人 PBMC 中 Th1/Tc1 比例的研究

李伟, 王佳怡, 肖春媛, 江美华, 韩捷

(同济大学附属东方医院 风湿免疫科, 上海 200120)

摘要: 探讨类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者血清和关节液干预对体外培养的健康人 PBMC 分泌 IFN- γ 的影响及临床意义。本研究采用 Bio-plex 法检测 RA 患者及健康人血浆中 37 种炎性细胞因子及可溶性受体的含量; 分别用 RA 患者血清(体积分数为 20%)和关节液(体积分数 10%)处理体外分离培养的健康人 PBMC 5 d, 流式细胞术分析 CD3 $^+$ CD8 $^-$ IFN- γ $^+$ (Th1) 和 CD3 $^+$ CD8 $^+$ IFN- γ $^+$ (Tc1) 的细胞含量变化; real-time PCR 技术检测转录因子 T-bet mRNA 的表达变化。结果发现 RA 患者血浆中多种炎性细胞因子和可溶性受体含量升高; RA 患者血清和关节液处理后的健康人 PBMC 中 Th1 和 Tc1 比例升高; Th1 和 Tc1 相关的转录因子 T-bet mRNA 表达上调。这说明 RA 患者血清和关节液可使体外培养的健康人 PBMC 中 Th1 和 Tc1 比例增加, 原因可能与 RA 患者血清及关节液中异常存在的炎性因子和其他可溶性介质有关。

关键词: 类风湿关节炎; Th1; Tc1; 炎症

中图分类号: R593.22

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2018)01-0013-06

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以自身免疫紊乱、慢性炎症、关节破坏为特征的全身性疾病, 我国发病率为(0.26~5)%, 是关节炎中致残率最高的疾病^[1-2]。RA 的发病机制非常复杂, 目前尚未有定论, 认为与环境、遗传、感染和自身免疫异常的共同作用有关, 其中具有促炎作用的 Th1 及其分泌的 IFN- γ 在 RA 疾病发生机制中具有重要作用^[3]。

国内外研究均已证明 RA 患者外周血和关节液中 Th1 的含量高于健康人^[4]。IFN- γ 作为 Th1 型细胞因子在固有和适应性免疫反应中均发挥重要作用, 其可通过激活巨噬细胞和单核细胞, 上调 MHC I 和 II 类抗原表达, 从而提高 APC 抗原提呈能力, 增强 RA 炎症反应^[5]。临床报道称, RA 患者外周血和关节液中 Tc1 的含量亦高于健康人^[6]。Tc1 是一类杀伤性 T 细胞, 也可分泌 IFN- γ 等细胞因子参与机体的免疫调节^[7]。

局部微环境中细胞因子在 T 细胞分化过程中起关键作用, RA 患者外周血和关节液中含有多种促炎和抑炎的介质^[8], 其对 Th1 和 Tc1 作用如何尚未见报道。本研究拟通过观察 RA 患者血清和关

节液对体外培养的健康人 PBMC Th1/Tc1 表型的改变, 探讨 RA 患者血清和关节液对 Th1/Tc1 的影响。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取上海市东方医院风湿免疫科 RA 患者共 35 例, 诊断符合美国风湿病学会 1987 年的分类标准, 且排除活动性感染、肿瘤、妊娠及其他自身免疫性疾病。所有入选患者 3 个月内未用免疫抑制剂及糖皮质激素等药物。其中 5 例患者的血浆用来检测炎性细胞因子的含量, 对照组为 3 例健康人血浆, 均来自健康志愿者, 两组成员的年龄、性别差异无统计学意义。其余留取 20 例 RA 患者的血清及 10 例患者的关节液用来刺激体外培养的健康人 PBMC, 血清对照组为 Gemcell 公司的健康人 AB 血清, 关节液对照组为单纯培养液。健康人 PBMC 来源于实验室志愿者。实验研究在同济大学附属东方医院医学伦理委员会的监督和指导下进行。RA 患者的临床材料见表 1。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养液、重组人 IL-2、双抗(Gibco 公司); 人 AB 血清(Gemcell 公司); 抗人 IFN- γ -PE-A、抗人 CD3-FITC、抗人 CD8a-Per-CP、细胞固定剂破膜剂、抗人 CD3、CD8 功能抗体(eBioscience 公司); 人 PBMC 分离液(STEM-CELL 公司); 佛波醇酯、离子霉素、高尔基体阻断

收稿日期: 2017-04-10

基金项目: 上海市卫生局科研课题计划(20134136)

作者简介: 李伟(1987—), 女, 硕士生, 研究方向: 风湿免疫

通信作者: 韩捷(E-mail: hbjgj85528@163.com)

剂(Peprotech公司); TRIzol(Invitrogen公司); Bio-PlexPro™ Human Inflammation Assays kit(美国Bio-Rad公司); 引物由上海生工生物有限公司设计合成; 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)试剂盒(TaKaRa公司)。

表1 RA患者材料汇总

临床材料	血清组 (n=25)	关节液组 (n=10)
年龄(岁)	62.9±10.5	62.8±8.3
性别(男/女)	3/22	6/4
病程(年)	7.7±8.5	3.3±1.6
RF(IU/mL)	262.8±308.1	133.4±127.6
ESR(mm/h)	69.0±32.2	70.8±30.3
CRP(mg/L)	29.1±29.4	30.3±18.9
抗 CCP(IU/mL)	353.9±516.3	119.0±202.4
关节肿胀数(28个关节计数)	10.3±10.4	11.5±6.5
关节压痛数(28个关节计数)	9.8±10.3	10.6±6.5
DAS28评分	5.1±1.4	5.5±0.8

1.3 实验方法

1.3.1 RA患者血清和关节液制备 20例符合标准的RA患者禁食12 h后,采集清晨空腹未抗凝的静脉血5 mL,4℃静置1 h,3 000 r/min离心10 min,吸取上层血清并做好标记于80℃冰箱保存备用。10例RA患者抽取未抗凝的关节液5 mL,4℃、3 000 r/min离心20 min,吸取上层关节液并做好标记置于80℃冰箱保存。血清和关节液均在无菌条件下处理分装。

1.3.2 RA患者血浆中炎性细胞因子及可溶性受体的含量测定 RA患者及健康对照人群血浆中炎性细胞因子及可溶性受体的含量通过Bio-PlexPro™ Human Inflammation Assays kit检测,细胞因子检测按照操作说明通过Bio-Plex悬液分析系统(Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA)平台检测。

1.3.3 RA患者血清、关节液和健康人PBMC共培养 健康人肝素抗凝外周血经密度梯度离心法分离PBMC,用PBS洗涤2次后重悬于培养液中(含10%人AB血清、1%丙酮酸钠、1%非必需氨基酸、1%双抗及20 IU/mL重组人IL-2),调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,接种于96孔细胞培养板内(提前用抗人CD3 1 μ g/mL和抗人CD28 1 μ g/mL在37℃孵育3 h),每孔200 μ L,置于37℃、5% CO₂培

养箱内进行培养。实验分组如下:(1)观察RA患者血清对正常人PBMC分化影响:实验组(添加体积分数为20%的RA患者血清)、对照组(添加体积分数为20%的健康人AB血清);(2)观察RA患者关节液对正常人PBMC分化影响:实验组(添加体积分数为10%的RA患者关节滑液)、对照组(添加体积分数为10%的单纯RPMI 1640培养液)。共培养5 d,第3天半换液,并按比例添加RA患者血清及关节液。每次实验重复3次。

1.3.4 细胞染色及流式细胞术检测 细胞培养第5天,每孔均加入佛波醇酯(50 ng/mL)、离子霉素(1 μ g/mL)刺激2 h后加入高尔基体阻断剂(10 μ g/mL),继续培养3 h,收集细胞于流式细胞管内,PBS洗涤重悬后加入5 μ L抗人CD3-FITC抗体和5 μ L抗人CD8a-PerCP抗体进行表面染色,混匀后4℃避光静置20 min;用含5% BSA的PBS洗涤2次后通过细胞固定和破膜试剂对细胞通透性进行处理,加入5 μ L PE标记的抗人IFN- γ 抗体,室温避光孵育30 min。PBS洗涤细胞,离心后弃上清,重悬细胞后采用BD FACSCalibur流式细胞仪进行检测,结果用FlowJo软件分析。在FSC-SSC点图上选定淋巴细胞群,然后以CD3和SSC设门分析这群细胞中CD4 $^+$ 或CD8 $^+$ T细胞内IFN- γ 表达情况。由于佛波醇酯+离子霉素刺激后会明显降低CD4分子的表达,而对CD8分子表达没有影响,因此本研究选择CD3 $^+$ CD8 $^-$ 的细胞群代表CD4 $^+$ T细胞来分析Th1的比例。

1.3.5 Real-time PCR法检测培养后细胞T-bet mRNA的表达 TRIzol法分别提取血清和关节液刺激培养后细胞的总RNA,反转录合成cDNA,real-time PCR法检测T-bet mRNA表达变化。GAPDH上游引物为5'-CTGGGCTACACTGAG-CACC-3';下游引物为5'-AAGTGGTCGTT-GAGGGCAATG-3'。T-bet上游引物为5'-CACGTCCACAAACATCCTGT-3';下游引物为5'-GATCATCACCAAGCAGGGAC-3'。PCR反应条件:95℃预变性30 s;95℃5 s、60℃34 s,扩增40个循环。实验重复3次。

1.4 统计学处理 采用GraphPad Prism 7(GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA)软件对所有数据进行统计学分析,定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 RA患者和健康人血浆中Th1相关细胞因子的含量比较 本研究通过 Bio-PlexProTM Human Inflammation Assays kit 检测了5例RA患者及3例健康对照者血浆中37种炎性细胞因子及可溶性受体的含量。结果发现RA患者血浆中Th1相关的细胞因子如IFN- γ 、IL-2、IL-12(p40)、IL-12(p70)及可溶性受体TNF-R1、sTNF-R2的含量均较健康对照组明显升高(表2)。

表2 RA患者和健康人血浆中Th1相关细胞因子的含量比较

细胞因子及可溶性受体(pg/mL)	RA组	健康对照组	P值
IL-2	61.7±2.2	34.1±6.9	0.003**
IL-12(p40)	317.9±17.3	200±23.2	0.006**
IL-12(p70)	23.5±1.4	12.6±2.6	0.007**
IL-27	161.9±13.8	88.2±13.6	0.010*
sTNF-R1	1 086.4±206.5	410.8±30.4	0.040*
sTNF-R2	1 560.2±137.8	823.6±75.1	0.008**
IFN- γ	268.7±18.9	180.7±19.0	0.020*

注: *与对照组比较, $P < 0.05$; **与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 RA患者血清对Th1和Tc1的影响 体外培养的健康人PBMC分别给予体积分数为20%的RA患者血清刺激和健康人血清对照处理, 第3天半换液并按体积分数添加RA患者血清和健康人血清。流式细胞术检测培养后的细胞中Th1、Tc1比例变化。与健康血清组比较, RA患者血清处理组细胞

中Th1比例显著高于健康对照组, $P < 0.0001$; RA组Tc1显著高于健康对照组, $P < 0.001$ (表3、图1)。

表3 RA患者血清处理组和未处理组的PBMC中Th1和Tc1比例变化($\bar{x} \pm s$)

组别	Th1(%)	Tc1(%)
RA患者血清组	14.98±0.34***	16.93±0.78***
健康人血清组	8.15±0.18	8.85±1.35

注: ***表示同健康人血清组相比, $P < 0.0001$; **表示同健康人血清组比较, $P < 0.001$

2.3 RA患者关节液对Th1和Tc1的影响 体外培养的健康人PBMC给予体积分数10%的RA患者关节液处理, 对照组给予等体积的培养液。培养5d后流式细胞术分析, RA患者关节液处理组Th1和Tc1比例显著高于培养液对照组($P < 0.05$, 表4、图2)。

表4 RA患者关节液处理组和未处理组的PBMC中Th1和Tc1比例变化($\bar{x} \pm s$)

组别	Th1(%)	Tc1(%)
RA患者关节液组	15.50±0.65*	23.16±1.73*
培养液对照组	11.90±1.43	15.78±1.47

注: *表示同培养液对照组比较, $P < 0.05$

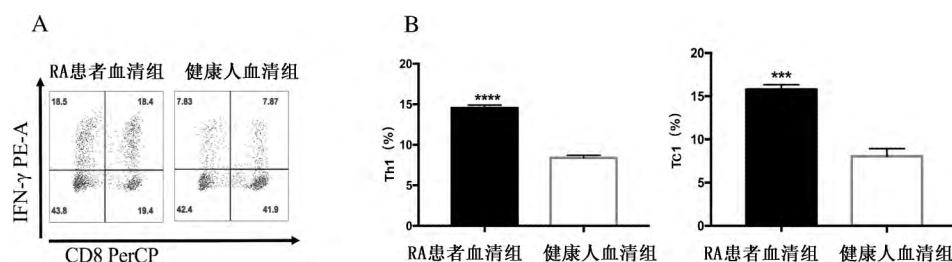


图1 RA患者血清刺激后的健康人PBMC中Th1、Tc1含量与健康人血清对照组比较

注: ***表示 $P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$

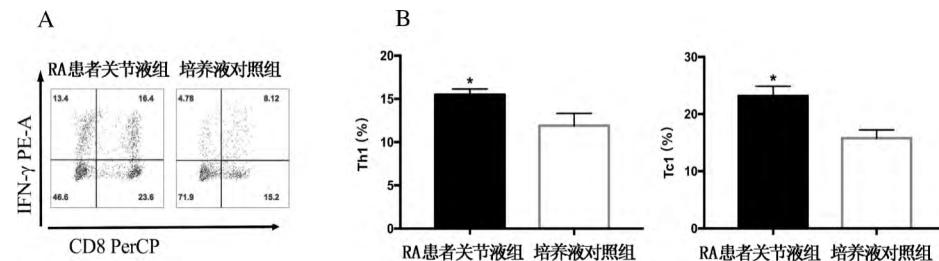
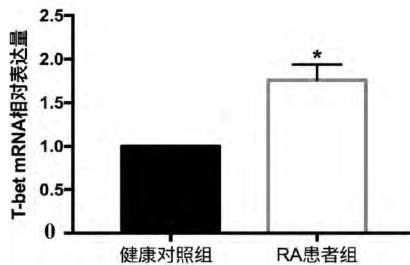


图2 RA患者关节液刺激后的健康人PBMC中Th1、Tc1含量与培养液对照组比较

注: *表示 $P < 0.05$

2.4 T-bet mRNA 的表达比较 RA 患者血清和关节液分别处理 PBMC 72 h, 通过 real-time PCR 技术检测 T-bet mRNA 的表达。与对照组比较, RA



患者血清刺激组和关节液刺激组的 T-bet mRNA 的相对表达量均较对照组显著升高 ($P < 0.05$, 图 3)。

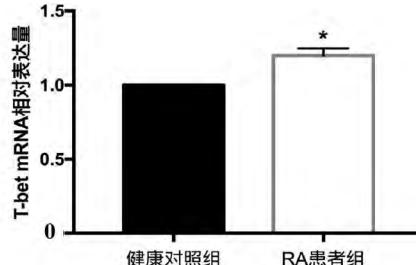


图 3 T-bet mRNA 的表达变化

注: *与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

RA 是以关节滑膜增生及骨和软骨破坏为主要特征的系统性自身免疫病, 临幊上常表现为多关节肿胀、疼痛、畸形和功能受损。Th1 是由初始 CD4⁺ T 细胞经过复杂的过程分化而成^[9], 在分化过程中受到多种因素影响, 包括抗原的量和刺激的时间、抗原提呈细胞的类型、初次免疫发生的部位及细胞因子环境等^[9], 而在这些因素中, 细胞因子对于 Th1 的分化具有最显著的影响。IFN- γ 、IFN- α 、IL-23、IL-27 等都能通过直接或间接的方式促进 Th1 的分化^[10]。分化后的 Th1 能够继续分泌多种炎性因子, 如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 等, 这些细胞因子能够介导机体的免疫炎症反应, 在 RA 疾病的进展中发挥了十分重要的作用。目前有关 Th1 的研究主要集中于其功能的危害性, 而关于 RA 患者体内 Th1 升高机制的研究相对较少。一些探索 Th1 分化的基础研究也主要以针对某一种或者几种已知的细胞因子组合的固定条件为前提来研究对 T 淋巴细胞亚群的影响。但是, 单独用某一分子进行体外细胞实验, 与机体内复杂的病理生理过程有很大差异, RA 患者炎性内环境对 T 淋巴细胞的影响究竟与健康人的内环境有何区别, Zheng 等^[11]曾报道在体外培养的健康人 PBMC 中添加 RA 患者的关节液, 刺激 96 h 后发现 CD4⁺ IFN- γ ⁺ 细胞的含量较培养液对照组升高。本次研究中也得到了与其类似的结果, 说明 RA 患者的关节液中含有能够促进 Th1 增殖分化的成分。

本课题前期通过蛋白芯片技术检测了 5 例 RA 患者和 3 例健康人外周血中炎性因子的含量, 发现 RA 患者血浆中 Th1 相关的细胞因子如 IFN- γ 、

TNF- α 、IL-2 及 IL-12 等的含量均高于健康对照组, 虽然检测的样本较少, 但这些炎性细胞因子的含量升高已较健康对照组有统计学意义。这一方面表明 RA 患者的炎症不仅仅局限在关节周围, 外周血中也发生了改变; 另一方面也表明 T 淋巴细胞所处的环境发生了改变。为了进一步研究 RA 患者血清对健康人 PBMC 的影响, 本课题在体外的健康人 PBMC 培养过程中又给予 RA 患者血清刺激, 5 d 后流式细胞术检测发现 RA 患者血清刺激的 PBMC 中 CD3⁺ CD8⁻ IFN- γ ⁺ (Th1) 细胞的含量明显高于健康人血清对照组。这说明 RA 患者的血清也可以促进健康人 PBMC 表达 Th1。

Tc1 是由初始 CD8⁺ T 细胞分化而来, 亦可通过分泌 IFN- γ 、IL-2 等炎性因子导致组织器官损伤^[12]。RA 外周血中也已发现 Tc1 的含量高于健康对照组^[4]。本课题为了探讨 RA 患者炎性内环境对 Tc1 的影响, 分别在健康人的 PBMC 体外培养过程中给予 RA 患者的血清和关节液刺激, 5 d 后流式细胞术分析发现 RA 患者血清和关节液刺激后的细胞中 CD3⁺ CD8⁺ IFN- γ ⁺ (Tc1) 细胞的含量均明显高于健康对照组。说明 RA 患者的炎性内环境可促进 Tc1 的表达。目前关于 CD8⁺ T 细胞及其亚群在 RA 中作用及机制的研究较少, Tc1 作为 IFN- γ 等致炎因子的重要细胞来源, 可能与 Th1 一样, 在 RA 的发病机制中具有重要的作用。本实验结果提示 CD8⁺ T 细胞及其各亚群在 RA 发病中的作用值得进一步深入研究, 尤其是在 RA 发病机制尚未阐明的情况下。

T 细胞的定向分化有赖于特异性转录因子的持续表达, T-bet 是 Th1、Tc1 特异性转录因子, 可激活 IFN- γ 基因, 促进 IFN- γ 分泌, 诱导初始 T

细胞向 Th1、Tc1 分化^[13]。为了研究 RA 患者血清和关节液增加 Th1、Tc1 比例的可能机制, 本研究利用 real-time PCR 方法研究了经 RA 患者血清和关节液刺激后细胞中 T-bet mRNA 的表达变化, 结果发现 RA 患者血清和关节液刺激组 T-bet mRNA 的表达较对照组升高。这提示 RA 患者的血清和关节液可能通过 T-bet 途径促进 Th1、Tc1 亚群分化。

RA 患者体内免疫调控失常, 内环境复杂, 多种因素相互作用、相互叠加, 共同导致疾病的进一步发展。本研究在体外以 RA 患者的血清和关节液分别模拟了 RA 患者全身和局部的内环境, 并排除感染、急性损伤和其他自身免疫性疾病等干扰因素, 观察了在 RA 患者内环境中 Th1 和 Tc1 的比例变化, 为了解 RA 疾病的致病机制提供帮助。

综上所述, 本研究证明 RA 患者的血清和关节液能够促进体外培养的健康人 PBMC 分泌 IFN- γ , 其中 Th1 和 Tc1 比例明显升高。这可能说明 RA 患者体内免疫紊乱和长期慢性炎性因子的刺激给 Th1、Tc1 等细胞亚群提供了分化环境, 最终这些分化增殖的细胞继续分泌致炎细胞因子, 慢性炎症和 T 细胞亚群紊乱相互促进、相互影响, 形成恶性循环, 最终导致 RA 疾病的发生发展。目前研究也提示, IFN- γ 在 RA 发病机制中起重要作用: 一方面, 机体在 RA 发生发展过程中表达高水平的 IFN- γ ; 另一方面, 高水平的 IFN- γ 又会加剧 RA 的进一步发展。

参考文献

- [1] Firestein GS. The disease formerly known as rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(3): 1-3.
- [2] Friedewald VE, Ganz P, Kremer JM, et al. AJC editor's consensus: rheumatoid arthritis and atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(3): 1-3.

lar disease[J]. Am J Cardiol, 2010, 106(3): 442-447.

- [3] Cope AP. T cells in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(Suppl 1): S1.
- [4] Henriques A, Gomes V, Duarte C, et al. Distribution and functional plasticity of peripheral blood Th(c)17 and Th(c)1 in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Int, 2013, 33(8): 2093-2099.
- [5] Schurges E, Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma[J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(12): 917-926.
- [6] Berner B, Akca D, Jung T, et al. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry[J]. J Rheumatol, 2000, 27(5): 1128-1135.
- [7] Helena C, Silva JAPD, Margarida SCM, et al. Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis[J]. Autoimmun Rev, 2013, 12(3): 401-409.
- [8] Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis[J]. J Clin Invest, 2008, 118(11): 3537-3545.
- [9] Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up[J]. Gen Dev, 2000, 14(14): 1693-1711.
- [10] Espinosa V, Rivera A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation[J]. Cytokine, 2012, 58(1): 100-106.
- [11] Zheng Y, Sun L, Jiang T, et al. TNFalpha promotes Th17 cell differentiation through IL-6 and IL-1beta produced by monocytes in rheumatoid arthritis[J]. Clin Dev Immunol, 2014, 20(14): 352-385.
- [12] Shrikant PA, Rao R, Li Q, et al. Regulating functional cell fates in CD8 T cells[J]. Immunol Res, 2010, 46(1-3): 12-22.
- [13] Finotto S, Glimcher L. T cell directives for transcriptional regulation in asthma[J]. Springer Semin Immunopathol, 2004, 25(34): 281-294.

Serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis increase the percentage of Th1 and Tc1 in healthy people PBMC *in vitro*

LI Wei, WANG Jia-yi, XIAO Chun-yuan, JIANG Mei-hua, HAN Jie (Department of Rheumatology, East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China)

Abstract: The present study aimed to determine the effects of serum and synovial fluid (SF) of patients with rheumatoid arthritis (RA) on interferon γ (IFN- γ) production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy subjects and assessed their clinical significance. Serum cytokine levels in patients with RA and in healthy subjects were measured by Bio-plexProTM

human cytokine assays. In the experimental group, PBMC isolated from healthy subjects were incubated for 5 days with a mixture composed of serum (20%) and SF (10%) from the patients. Flow cytometry analysis was performed to measure the percentage of $CD3^+ CD8^- IFN-\gamma^+$ (Th1) and $CD3^+ CD8^+ IFN-\gamma^+$ (Tc1) cells in the PBMC from the experimental group. Moreover, real-time PCR was performed to determine the T-bet mRNA expression in PBMC. We found that many kinds of inflammatory cytokines were increased in RA plasma. Compared with the control, the percentage of Th1 and Tc1 cells in the experimental group increased. In addition, the mRNA expression of T-bet increased in PBMC of experimental group. Taken together, our results suggest that deregulation of cytokines and other soluble components in the serum and SF of patients with RA promote the differentiation of healthy PBMC into Th1 and Tc1 cells.

Key words: rheumatoid arthritis; Th1 cell; Tc1 cell; inflammation