

关节液 Th17 细胞变化在类风湿关节炎免疫炎症中的作用*

林 辉¹, 周燕莉², 李 箭³, 李宇娟³, 赵 毅¹, 严 冰¹, 刘 毅^{1△}

1. 四川大学华西医院 风湿免疫科 (成都 610041); 2. 泸州医学院 风湿科 (泸州 646000);
3. 四川大学华西医院 骨科 (成都 610041)

【摘要】 目的 检测类风湿关节炎(RA)患者外周血和关节液 Th17 细胞的变化,探讨该细胞亚群在 RA 免疫炎症机制中的作用。**方法** 采用流式细胞术检测 15 例 RA 患者外周血、关节液及 15 例健康对照外周血 Th17 细胞比例;分析 RA 患者关节液 Th17 细胞比例与临床炎症指标的相关性;通过 real-time PCR 检测外周血和关节液淋巴细胞维甲酸相关孤儿受体 γ t(ROR γ t)、白细胞介素(IL)-17 基因表达。**结果** ①活动期 RA 患者关节液 Th17 细胞比例 $[(1.89 \pm 0.88)\%]$ 高于配对外周血 $[(1.03 \pm 0.57)\%]$ 和健康对照组 $[(0.35 \pm 0.18)\%]$,差异有统计学意义($P < 0.01$);②RA 患者关节液 Th17 细胞比例与血清 C 反应蛋白(CRP)呈正相关($r = 0.519, P = 0.047$);③活动期 RA 患者关节液淋巴细胞 ROR γ t、IL-17 基因表达水平平均高于配对外周血和健康对照组($P < 0.01$)。**结论** RA 患者关节液中 Th17 细胞的变化反映了 RA 关节炎症和系统炎症的差异,揭示了关节损伤的机制。

【关键词】 Th17 细胞 关节液 类风湿关节炎 流式细胞术

The Role of T Helper 17 Cells of Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis LIN Hui¹, ZHOU Yan-li², LI Jian³, LI Yu-juan³, ZHAO Yi¹, YAN Bing¹, LIU Yi^{1△}. 1. Department of Rheumatology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Rheumatology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 3. Department of Orthopaedic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: yi2006liu@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of Th17 cells of synovial fluid (SF) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** RA patients with knee synovial fluid ($n = 15$) and healthy volunteers ($n = 15$) were enrolled. The amounts of Th17 cells in peripheral blood and SF were measured by flow cytometry. Since there was no SF in healthy control, only the amounts of Th17 cells in peripheral blood were measured. The correlation between the amounts of SF Th17 cells and clinical inflammatory parameters was evaluated. Retinoic acid-related orphan receptor γ (ROR γ t), interleukin-17 (IL-17) gene expression in lymphocytes were assessed by real-time PCR. **Results** ① The percentages of Th17 cells in SF from RA patients $(1.89 \pm 0.88)\%$ were significantly higher than that in paired PB from RA patients $(1.03 \pm 0.57)\%$ and that in PB from healthy controls $(0.35 \pm 0.18)\%$; ② The frequency of Th17 cells in SF from RA patients correlated positively with serum CRP ($r = 0.519, P = 0.047$); ③ The mRNA levels of ROR γ t and IL-17 were increased in SF lymphocyte population from RA patients compared to paired PB from RA patients and healthy controls ($P < 0.01$). **Conclusion** Increases of Th17 cells in synovial fluid of patients with RA might attribute to the difference between local joint inflammation and systemic inflammation, and participates in joint damage.

【Key words】 Th17 cells Synovial fluid Rheumatoid arthritis Flow cytometry

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是炎症性自身免疫性疾病的代表之一,T 细胞异常活化,分化为不同功能亚群,产生大量细胞因子,导致的关节滑膜炎、软骨及骨质破坏是其主要临床特征。其中,T 淋巴细胞浸润和滑膜成纤维细胞过度增生,

尤其 CD4⁺ T 细胞浸润,是 RA 免疫炎症发生的中心环节^[1]。早期认为 RA 是以 Th1 细胞占主导的器官特异性自身免疫性疾病,但是 Th1 细胞因子——干扰素 γ (IFN γ)缺失导致 RA 动物模型胶原诱导性关节炎(CIA)发生更严重的炎症反应,而另一种细胞因子白细胞介素(IL)-17 缺失却可抑制 CIA 的免疫反应。说明除 Th1 细胞外,还有另外一群分泌 IL-17 的细胞发挥着更强的致病作用。2005 年将这种分泌 IL-17 的 Th 细胞命名为 Th17 细

* 国家自然科学基金项目(No. 81102274)和成都市科技攻关项目(No. 10GGYB644SF-023)资助
△ 通讯作者, E-mail: yi2006liu@163.com

胞^[2]。维甲酸相关孤儿受体 γ t (retinoic acid-related orphan receptor gamma t, ROR γ t) 是 Th17 细胞特异性转录因子,可激活 *IL-17* 基因,促进 *IL-17* 分泌,诱导初始 T 细胞向 Th17 细胞分化。

虽然 Th17 细胞在 CIA 和 RA 发病中的功能已得到初步认识,但是在 RA 患者关节局部炎症中的作用及其与全身免疫反应的关系尚需进一步论证。本研究旨在从 Th17 细胞比例和 ROR γ t、*IL-17* 基因角度,观察 Th17 细胞在活动期 RA 患者关节液和外周血中的变化,了解 Th17 细胞在关节局部炎症和全身免疫反应中的作用,为探讨 RA 患者关节液 Th17 细胞分化调控机制提供理论和实验依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

中、重度活动期合并膝关节积液的 RA 患者 15 例,女性 13 例,男性 2 例,平均年龄(49.87 ± 9.34)岁,所有患者均符合 1987 年美国风湿病学会(ACR)修订的 RA 诊断标准或 2009 年欧洲抗风湿病联盟(EULAR)RA 分类标准。疾病活动度判断采用疾病活动指数(DAS)28, $DAS28 \geq 3.2$ 定为疾病中、重度活动。标本采集前 1 个月患者均未接受改善病情抗风湿药(disease modifying anti-rheumatic drugs,DMARDs)和激素类药物,入选患者平均 DAS28 为 6.41 ± 1.47 ,类风湿因子(RF)阳性的占 73.3%(11 例)。健康对照组 15 例,其中女性 13 例,男性 2 例,平均年龄(45.53 ± 8.44)岁,无自身免疫性疾病、肿瘤及近期感染史。健康对照组无关节积液。本研究取得四川大学华西医院医学伦理委员会批准,并获得受试者的知情同意。

1.2 试剂与仪器

佛波酯(PMA)、离子霉素(Ion)、莫能霉素(Monensin)购自 Sigma 公司;FITC-抗人 CD4、PE-抗人 IL-17 及相应同型对照抗体购自美国 eBioscience 公司;固定与透膜试剂盒(FIX/PERM)购自美国 Beckman 公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;ROR γ t、*IL-17*、 β -actin 引物,上海英骏生物技术有限公司合成;人淋巴细胞分离液(Ficoll)购自天津灏洋生物制剂公司;FACS Aria 流式细胞仪为美国 BD 公司产品,实时荧光定量 PCR 仪 CFX-96 为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 研究方法

1.3.1 临床资料记录 详细记录每个 RA 患者的年龄、性别、病程、肿胀关节数、压痛关节数,魏氏法

检测血沉(ESR),速率散色比浊法检测 C 反应蛋白(CRP)、RF,ELISA 法检测抗 CCP 抗体(ACPA),计算疾病活动性指标 DAS28 评分。

1.3.2 流式细胞仪(FCM)检测 Th17 细胞 采用 Ficoll 密度梯度分离 RA 患者和健康对照者外周血淋巴细胞(PBLs)、RA 患者关节液淋巴细胞(SFLs),以含 10%FBS 的 1640 培养液重悬细胞,加入 PMA(50 ng/mL)、离子霉素(500 ng/mL)和莫能霉素(1 mL/L),37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中培养 5 h。取细胞悬液 100 μ L,加入 10 μ L FITC 标记的抗人 CD4,于 4 °C 避光孵育 30 min 后洗涤 2 次。加入 100 μ L 固定剂 A 反应 15 min,洗涤 1 次,再加入透膜剂 B 100 μ L,反应 5 min,加入 10 μ L PE 标记的抗人 IL-17,同时设同型对照反应管,反应 30 min 后洗涤 2 次,以 300 μ L PBS 重悬细胞,进行 FCM 检测,结果用 Flowjo7.6.1 软件分析。

1.3.3 Real-time PCR 检测淋巴细胞 ROR γ t、*IL-17* 基因表达 采用 Ficoll 密度梯度分离出 PBLs 和 SFLs,直接加入 Trizol 抽提 RNA,并反转录获得 cDNA。取 cDNA 为模板,采用 SYBR Green I 嵌合荧光法实时定量 PCR,建立 PCR 反应体系(总体积 10 μ L)。引物设计如下:ROR γ t 上游,5'-CGGGCCTACAATGCTGACA-3',下游,5'-GCCACCGTATTTGCCTTCAA-3';*IL-17* 上游,5'-CAGATTACTACAACCGATCC-3',下游,5'-CATGTGGTAGTCCACGTTCC-3'; β -actin 上游,5'-TGGAGAAAA TCTGGCACCAC-3',下游,5'-GAGGCGTACAGG GATAGCAC-3'。PCR 循环条件:95 °C 5 s $\rightarrow$ 各基因退火温度(ROR γ t 为 60 °C,*IL-17* 为 57 °C, β -actin 为 57 °C)10 s $\times$ 40 循环。用 CFX Manager v1.6 软件计算出每样本合格数据的 Ct 值,用同板 β -actin 的 Ct 值减去样本靶基因平均 Ct 值,得到 $-\Delta Ct$ 值,用 $2^{-\Delta Ct}$ 代表样本靶基因 mRNA 的起始拷贝量。

1.3.4 统计学方法 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验,配对两组间比较采用配对 *t* 检验,Th17 细胞阳性率与病情活动指标的相关性分析采用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 患者外周血和关节液 Th17 细胞比例

活动期 RA 患者关节液 CD4⁺T 细胞中 Th17 细胞比例高于配对外周血和健康对照组外周血

$[(1.89 \pm 0.88)\% \text{ vs. } (1.03 \pm 0.57)\%、(0.35 \pm 0.18)\%]$, 活动期 RA 患者外周血 Th17 细胞比例也高于健康对照组外周血 ($P < 0.01$)。见

图 1。
2.2 RA 患者关节液 Th17 细胞比例与临床炎症指标相关性分析

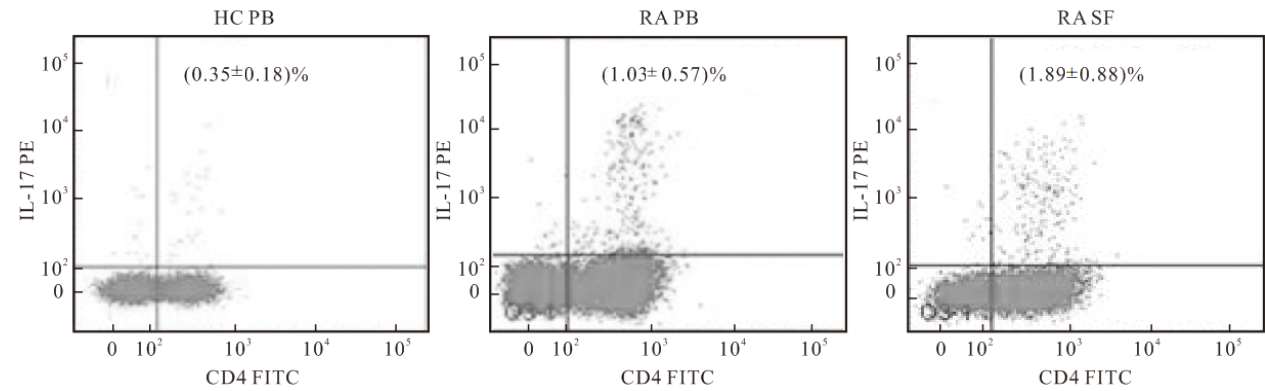


图 1 3 组对象 CD4⁺ T 细胞中 Th17 细胞比例比较
Fig 1 Percentage of Th17 cells in CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood of healthy control (HC PB), peripheral blood of RA patients (RA PB) and synovial fluid of RA patients (RA SF)

RA 患者关节液 CD4⁺ T 细胞中 Th17 细胞比例与炎症指标 CRP 呈正相关 ($r = 0.519, P = 0.047$, 图 2), 与 ESR、DAS28、RF、ACPA 无相关性。

3 讨论

RA 是一种常见的以关节滑膜组织慢性炎症为主要表现的自身免疫性疾病, 影响世界上约 1% 的人口^[3]。Th17 细胞是新近发现的辅助性 CD4⁺ 细胞, 在 RA 的发病中占据重要地位。研究证实, Th17 细胞及其产生的细胞因子 IL-17, 可作用于滑膜细胞, 促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 和 IL-6 释放^[4]; 吸引中性粒细胞和巨噬细胞, 募集到 RA 关节腔内, 扩大炎症反应^[5]; 诱导滑膜成纤维细胞基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达, 促进软骨降解^[6]; 通过 NF- κ B 受体激活因子 (RANK)/NF- κ B 配体激活因子 (RANKL) 推动成骨细胞向破骨细胞转化, 导致骨质侵蚀、破坏^[7,8]。因此, 探讨 Th17 细胞在 RA 患者关节滑膜或滑液中的作用和功能对于深刻了解 RA 关节损伤机制具有重要意义。

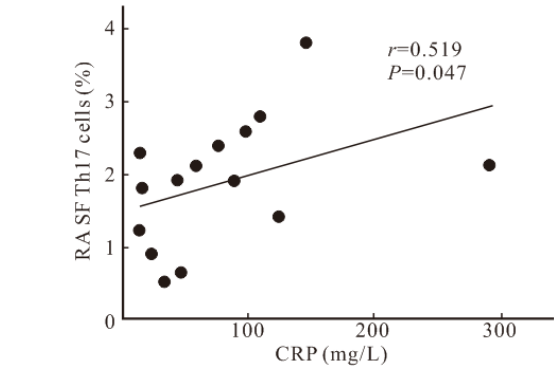


图 2 RA 患者关节液 CD4⁺ T 细胞中 Th17 细胞比例与 CRP 的相关性
Fig 2 Correlation between the percentage of Th17 cells in CD4⁺ T lymphocytes in synovial fluid of RA patients (RA SF) and C reactive protein (CRP) in synovial fluid of RA patients

2.3 RA 患者外周血和关节液 ROR γ t、IL-17 mRNA 水平

结果显示: 活动期 RA 患者关节液淋巴细胞 ROR γ t、IL-17 mRNA 水平较健康对照组外周血升高 ($0.894 \pm 0.182 \text{ vs. } 0.233 \pm 0.097, 1.884 \pm 0.693 \text{ vs. } 0.270 \pm 0.122, P < 0.01$), 亦高于配对外周血 ($0.894 \pm 0.182 \text{ vs. } 0.684 \pm 0.150, 1.884 \pm 0.693 \text{ vs. } 0.847 \pm 0.299, P < 0.01$)。另外, 活动期 RA 患者外周血淋巴细胞 ROR γ t、IL-17 mRNA 水平也高于健康对照组外周血 ($P < 0.01$)。

在本研究中我们发现, 活动期 RA 患者外周血 Th17 细胞比例较健康对照组增高, 这与大部分报道相符。说明 Th17 细胞在 RA 全身炎症反应过程中发挥重要作用。关节是 RA 病变累及的主要靶器官, 我们更关注 RA 关节局部炎症。本研究又测定了配对 RA 患者外周血和关节液 Th17 细胞的变化, 发现关节液 Th17 细胞比例升高明显, 高于配对 RA 患者外周血, 考虑与 RA 患者外周血和关节液 T 细胞特性和炎性环境不同有关^[9]: ① CD28 和 T 细胞受体 ζ (TCR ζ) 链表达差异。De Santis 等^[10]指出, 关节液较外周血来源的 T 细胞 CD28 与 TCR ζ 链表达减少。Ferraccioli 等^[11]又发现, RA 患者

CD4⁺ T 细胞 CD28 和 TCR ζ 链表达减少与疾病活动度 DAS44 呈显著相关。进一步研究证实,这些 TCR ζ 链缺陷的 Th 细胞较 TCR ζ 链相对正常的 Th 细胞产生高水平的 IL-17^[12]。因此,RA 患者关节液 CD28 与 TCR ζ 链结构和功能的异常可能导致 Th17 细胞在 RA 全身炎症反应和关节局部炎症中的差异分布。②免疫炎症模式转变。RA 患者关节液好似一个“致炎细胞因子池”,调控效应性 T 细胞表型转换,造成 Th17 细胞在关节液中的扩增,关节炎症进一步加重^[4,13]。基于这一理论,学者们提出了 RA 关节局部免疫反应可能存在着由“抗原刺激模式”向“细胞因子刺激模式”的转换^[11]。

本研究结果还发现,关节液 Th17 细胞水平与血清炎症指标 CRP 呈正相关。既往研究证实,RA 患者关节液含有较外周血更高水平的 IL-6,而 IL-6 可促进 CRP 基因表达^[14],同时 IL-6 本身还可促进 Th17 细胞分化,增多的 Th17 细胞又通过正反馈机制促进 IL-6 与 CRP 产生^[15]。除此之外,我们还观察了关节液 Th17 细胞与 RF、ACPA、ESR、DAS28 的关系,但是没有相关性。ROR γ t 是 Th17 细胞特异性转录调控因子,ROR γ t 活化与 IL-17 基因启动子结合,促进 IL-17 基因转录^[13]。检测 ROR γ t mRNA 与 IL-17 mRNA 从间接与直接途径反映了 IL-17 的转录水平。本研究采用 real-time PCR 检测 RA 患者外周血和关节液淋巴细胞中转录因子 ROR γ t mRNA 与 IL-17 mRNA 水平,结果显示较健康对照组明显升高,而且 RA 患者关节液中两种转录因子水平较对外周血亦明显增高,间接提示 RA 患者关节液 Th17 细胞增多,与流式细胞学 Th17 细胞亚群的变化趋势一致。

综上,本研究结果显示,活动期 RA 患者关节液中 Th17 细胞较外周血明显增多,而且关节液 Th17 细胞比例与全身炎症指标直接相关,进一步表明 Th17 细胞在 RA 病理生理中的重要作用。因此,深入探讨人类关节液 Th17 细胞的分化调控机制,将为揭示 RA 关节损伤的分子机制及发现 RA 潜在的治疗靶点提供新的依据。

参 考 文 献

- 1 Komatsu N, Takayanagi H. Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints. *Adv*

Immunol,2012;115:45-71.

- 2 Park H, Li Z, Yang XO, *et al.* A distinct Lineage of CD4⁺ T cells regulate tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*,2005;6(11):1133-1141.
- 3 Chen G, Zhang X, Li R, *et al.* Role of osteopontin in synovial Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2010;62(10):2900-2908.
- 4 McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*,2007;7(6):429-442.
- 5 Moran EM, Connolly M, Gao W, *et al.* Interleukin-17A induction of angiogenesis, cell migration, and cytoskeletal rearrangement. *Arthritis Rheum*,2011;63(11):3263-3273.
- 6 Van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, *et al.* Th17 cells, but Not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum*,2011;63(1):73-83.
- 7 Pöllinger B, Junt T, Metzler B, *et al.* Th17 cells, not IL-17+ $\gamma\delta$ T cells, drive arthritic bone destruction in mice and humans. *J Immunol*,2011;186(4):2602-2612.
- 8 Sato K, Suematsu A, Okamoto K, *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*,2006;203(12):2673-2682.
- 9 Church LD, Filer AD, Hidalgo E, *et al.* Rheumatoid synovial fluid interleukin-17-producing CD4 T cells have abundant tumor necrosis factor- α co-expression, but little interleukin-22 and interleukin-23R expression. *Arthritis Res Ther*, 2010;12(5):R184.
- 10 De Santis M, Zizzo G, De Luca G, *et al.* Different levels of TCR-zeta chain and ZAP-70 characterize distinct subsets of CD28^{null} T lymphocytes in arthritis patients. *Ann Rheum Dis*, 2010;69(Suppl 3):186.
- 11 Ferraccioli G, Zizzo G. The potential role of Th17 in mediating the transition from acute to chronic autoimmune inflammation: rheumatoid arthritis as a model. *Discov Med*,2011;11(60):413-424.
- 12 Zhang Z, Gorman CL, Vermi AC, *et al.* TCR ζ adim lymphocytes define populations of circulating effector cells that migrate to inflamed tissues. *Blood*,2007;109(10):4328-4335.
- 13 Zhu JF, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*,2010;28:445-489.
- 14 Eklund CM. Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation. *Adv Clin Chem*,2009;48:111-136.
- 15 Korn T, Bettelli E, Oukka M, *et al.* IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*,2009;27:485-517.

(2013-04-08 收稿,2013-07-24 修回)

编辑 余琳