文章编号:1000-5404(2010)18-1921-04

论著

# Th1/Th2 细胞因子谱在类风湿关节炎患者外周血和关节积液中的表达及意义

李景怡[1,2],方勇飞[2],邹丽云[1],张晋宇[1],傅晓岚[1],柏千苹[2],万 瑛[1],吴玉章[1] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部全军免疫学研究所[1],西南医院风湿病中心[2])

**【摘要】 目的** 鉴定类风湿关节炎患者外周血和关节积液中 Th1/Th2 细胞因子谱的表达并探讨其在炎症中的意义。**方法** 采用微量样本多指标流式蛋白定量技术(cytometric bead array,CBA)检测 41 例类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)患者(2006 年 1 月至 2007 年 12 月西南医院风湿病中心首诊病例)血清和关节积液中 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α 和 IFN-γ 的表达。对照组($n=5$)为西南医院健康查体人员。**结果** 与对照组和/或 RA 患者外周血比较,RA 患者关节积液中 IL-2、IL-4、IFN-γ、IL-6 和 IL-10 的表达显著增高($P<0.01$),IFN-γ 和 IL-6 的表达在 RA 患者外周血中也显著增高($P<0.01$),TNF-α 的表达在 RA 患者关节积液和外周血中也增高($P<0.05$),并且在关节积液中 IFN-γ/IL-4 比例显著增高($P<0.01$)。与抗环瓜氨酸肽抗体(cyclic citrullinated peptide,CCP)阴性的患者相比,CCP 抗体阳性的患者关节积液中 IL-2、IL-6 表达增高($P<0.05$),TNF-α 和 IFN-γ 的表达显著增高($P<0.01$)。**结论** Th1/Th2 极化失衡是 RA 炎症损伤的主要免疫病理机制,在关节局部是以 Th1 极化诱导的炎症反应为主,并且 CCP 抗体阳性患者关节炎症程度明显高于 CCP 抗体阴性患者。

**【关键词】** 类风湿关节炎;Th1 细胞;Th2 细胞;抗环瓜氨酸肽抗体
**【中图法分类号】** R593.22;R392-33;R392.11 **【文献标志码】** A

# Th1/Th2 cytokines' profile in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis

Li Jingyi[1,2], Fang Yongfei[2], Zou Liyun[1], Zhang Jinyu[1], Fu Xiaolan[1], Bai Ganping[2], Wan Ying[1], Wu Yuzhang[1] ([1]Institute of Immunology, College of Basic Medical Sciences, [2]Department of Rheumatology and Traditional Chinese Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the expressions and significances of Th1/Th2 cytokines in the peripheral blood (PB) and synovial fluid (SF) of patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Totally 15 PB samples and 36 knee joint SF were collected from 41 RA patients who diagnosed for the first time in our department from January 2006 to December 2007. They all were diagnosed as RA according to the diagnostic criteria of American College of Rheumatology (ACR) and received no any immunosuppressive treatment. Another 5 samples from health individuals served as normal control. Expressions of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α and IFN-γ were examined by cytometric bead array (CBA). Serum expression of cyclic citrullinated peptide (CCP) was measured by ELISA. **Results** Expressions of IL-2 (6.32 ± 0.34 pg/ml), IL-4 (5.83 ± 0.30 pg/ml), IFN-γ (18.62 ± 11.52 pg/ml), IL-6 (6 217.78 ± 4 336.18 pg/ml) and IL-10 (35.28 ± 8.02 pg/ml) were significantly increased in the SF of RA patients ($P<0.01$). Expression of IFN-γ (18.62 ± 11.52 pg/ml) was significantly increased in PB of RA patients ($P<0.01$). Expression of TNF-α was increased in SF (17.34 ± 4.78 pg/ml) and PB (29.48 ± 14.26 pg/ml) of RA patients ($P<0.05$). Furthermore, ratio of IFN-γ/IL-4 (3.34 ± 0.42) was significantly increased in SF than in PB of RA and healthy donor ($P<0.01$). Moreover, compared with CCP-negative patients, the expressions of IL-2 (5.41 ± 1.37 pg/ml) and IL-6 (5 360.21 ± 3 705.78 pg/ml) were increased ($P<0.05$), and the expressions of TNF-α (15.99 ± 3.75 pg/ml) and IFN-γ (29.04 ± 12.46 pg/ml) were very significantly increased in CCP-positive patients ($P<0.01$). **Conclusion** Altered polarization of Th1/Th2 is the principal mechanism of immunopathogenesis in RA. In topical part of arthritis, Th1 polarization induces the inflammation. Furthermore, inflammation of arthritis may

**【基金项目】** 国家自然科学基金(30801030)
**【通信作者】** 吴玉章,电话:(023)68752234,E-mail:wuyuzhang@yahoo.com

be more severe in CCP-positive RA patients than negative ones.

**[Key words]** arthritis, rheumatoid; Th1 cells; Th2 cells; cyclic citrullinated peptide

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30801030). Corresponding author: Wu Yuzhang, Tel: 86-23-68752234, E-mail: wuyuzhang@yahoo.com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是以慢性滑膜炎、进行性骨质破坏和关节功能丧失为特征的自身免疫性疾病。其病理特征为关节滑膜的淋巴细胞浸润及活化,最终导致滑膜异常增殖、血管翳形成、软骨和骨的破坏。早期免疫病理学研究[1]即发现:RA滑膜组织中$CD4^+$T细胞呈弥漫性浸润;这些$CD4^+$T细胞识别了MHC-Ⅱ分子和自身抗原肽复合物,在APC细胞表达的共刺激分子的作用下被激活,分泌大量的促炎性细胞因子,进而活化滑膜巨噬细胞,导致炎症的加重和进展,然而具体炎症机制尚未阐明。

早期基于啮齿动物关节炎模型的研究结果[2,3]提示Th1细胞分泌的细胞因子IFN-γ和TNF-α是滑膜炎症的主要致病因素,然而基于患者的研究并非完全一致,通常认为诊断明确的RA患者,滑膜T细胞表达低水平的IFN-γ、TNF-α和IL-10,不表达IL-2和IL-4[4],最近一项研究[5]显示超早期患者的关节积液中细胞因子表达谱呈现Th2极化状态,主要表达IL-4、IL-5和IL-13,当这些患者最终符合RA的分类标准时,滑液中这些Th2极化的细胞因子却难以检测到。基于RA患者的异质性,选择不同时期的患者作为研究对象会得到不同的结果。另一方面,目前生物制剂如TNF-α单抗和IL-6单抗是治疗RA的最新策略,并在临床上获得良好的疗效,但少部分RA患者对上述药物并无确切的治疗效果,进一步提示不同患者其炎症机制也不尽相同。抗环瓜氨酸肽抗体(cyclic citrullinated peptide, CCP)是新近发现于RA患者的自身抗体,其敏感性和特异性均高于类风湿因子,研究[6]发现CCP抗体阳性和阴性的患者对于TNF-α单抗的治疗效果有较大差异。本研究检测RA患者血清和关节积液中Th1/Th2细胞因子谱表达水平的变化,并比较这些细胞因子在CCP抗体阳性和阴性的RA患者中的表达差异,有助于进一步阐明不同分期患者的关键作用环节,为进一步阐明RA的免疫病理机制和临床个体化治疗奠定基础和提供必要的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

RA患者41例,均为2006年1月至2007年12月于第三军医大学西南医院风湿病中心首诊病例,其中男性7例,女性34例;年龄19~63(43.00±9.31)岁,病程0.5~9(4.8±4.3)年。所有病例符合1987年美国风湿病学会(ACR)诊断标准,无其他合并症,未曾接受免疫抑制剂治疗。其中采集外周血15例,双膝关节积液36例。对照组($n=5$)均为西南医院健康查体人员,男性2例,女性3例,年龄22~42(35.58±7.42)岁。

### 1.2 主要试剂与仪器

人Th1/Th2 Cytometric Bead Array kit、FACS Aria流式细胞仪(BD公司,美国);抗CCP ELISA试剂盒(INOVA公司,德国)。

### 1.3 方法

1.3.1 流式细胞术检测IL-2、IL-4、IL-6、IL10、TNF-α和IFN-γ的表达 ①倍比稀释人IL-2、TNF-α、IFN-γ、IL-4、IL-6、IL-10细胞因子标准品。②混合Th1/Th2细胞因子捕获微球,200×$g$离心5 min;吸取同体积的Serum Enhancement Buffer,重悬微球;室温避光孵育30 min。③准备检测样本:关节积液样品800×$g$、4 ℃离心5 min;取上清12 000×$g$、4 ℃离心20 min,收集上清-20 ℃冻存备用;分别2倍和10倍稀释后检测。④样本管加50 μl的捕获微球(预先混匀)和50 μl的PE检测抗体;标准管加50 μl的不同浓度的标准品,样品管加50 μl的待测样本;室温避光孵育3 h后,加1 ml的Wash Buffer,200×$g$离心5 min;加300 μl的Wash Buffer重悬。⑤仪器设定:A、B、C 3管每管加50 μl的Setup Beads,B管加50 μl的FITC标记的阳性对照质控,C管加50 μl的PE标记的阳性对照质控;室温避光孵育30 min;A管加450 μl的Wash Buffer,B、C管加400 μl的Wash Buffer;设定FCM。

1.3.2 ELISA法检测33例RA患者血清抗CCP抗体 1∶40稀释浓缩洗涤液;制备1∶101稀释的患者样品;试剂盒配制的倍比稀释标准品;每孔100 μl加入试剂盒配制的空白对照、阴性对照、标准品及待测样品血清,在室温下孵育30 min;充分洗涤后,每孔加入0.1 ml HRP酶标抗体,室温下孵育30 min并再次洗涤,每孔加入100 μl TMB显色液,室温下避光孵育30 min;最后每孔加入100 μl HRP终止液,30 min后、1 h内在450 nm波长检测光密度值。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,计量资料均采用$\bar{x}\pm s$表示。组间显著性比较采用非独立$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 RA患者关节积液和血浆中Th1/Th2细胞因子表达水平的变化

与对照组和RA患者外周血相比,RA患者关节积液中的IL-6和IL-10的水平均显著增加($P<0.01$),与对照组外周血相比,RA患者关节积液中的IL-2和IL-4的水平均显著增加($P<0.01$);与RA患者外周血相比,关节积液中的IL-2和IL-4的水平也显著增加($P<0.05$);与对照组外周血相比,RA患者外周血和关节积液中IFN-γ的水平均显著增加($P<0.01$)。与对照组外周血相比,RA患者关节积液和外周血中的TNF-α水平均显著增加($P<0.05$)。见表1,图1。

### 2.2 RA患者关节积液中IFN-γ/IL-4比例的变化

与对照组比较,RA患者关节积液中IFN-γ/IL-4比例显著增加(1.21±0.34 *vs* 3.34±0.42,$P<0.05$),提示关节炎症局部为Th1极化,而RA患者外周血中IFN-γ/IL-4比例(1.67±0.47)与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

**表 1 RA 患者血清和关节积液中 Th1/Th2 细胞因子谱的表达（pg/ml，$\bar{x} \pm s$）**

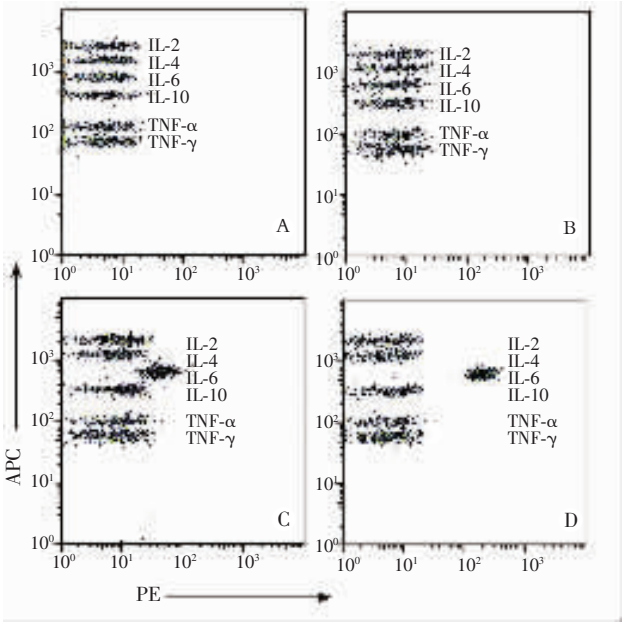
| 检测样本 | $n$ | IL-2 | IL-4 | IL-6 | IL-10 | TNF-α | IFN-γ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 对照组外周血 | 5 | 3.20 ± 0.26 | 2.70 ± 0.25 | 4.54 ± 0.92 | 4.26 ± 0.21 | 5.96 ± 4.40 | 1.24 ± 0.77 |
| RA 患者外周血 | 15 | 4.59 ± 0.82 | 3.64 ± 0.72 | 716.73 ± 375.54[a] | 9.94 ± 1.65 | 29.48 ± 14.26[b] | 14.20 ± 8.94[a] |
| RA 患者关节积液 | 36 | 6.32 ± 0.34[ad] | 5.83 ± 0.30[ad] | 6 217.78 ± 4 336.18[ac] | 35.28 ± 8.02[ac] | 17.34 ± 4.78[b] | 18.62 ± 11.52[a] |

a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与对照组外周血比较；c：$P < 0.01$，d：$P < 0.05$，与 RA 患者外周血比较

**表 2 Th1/Th2 细胞因子谱在抗 CCP 抗体阳性和阴性 RA 患者关节积液中的表达（pg/ml，$\bar{x} \pm s$）**

| 组别 | $n$ | IL-2 | IL-4 | IL-6 | IL-10 | TNF-α | IFN-γ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CCP 阳性组 | 19 | 5.41 ± 1.37[a] | 4.78 ± 2.83 | 5 360.21 ± 3 705.78[a] | 25.77 ± 14.19 | 15.99 ± 3.75[b] | 29.04 ± 12.46[b] |
| CCP 阴性组 | 14 | 2.24 ± 0.92 | 3.90 ± 3.97 | 3 237.39 ± 1 179.10 | 27.56 ± 6.23 | 7.48 ± 5.42 | 7.20 ± 5.36 |

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与 CCP 阴性组比较




A：空白对照样本；B：正常人外周血；C：RA 患者外周血；D：RA 患者关节积液

**图 1 流式细胞术检测 RA 患者血清和关节积液中 Th1/Th2 细胞因子谱的表达**

### 2.3 CCP 抗体阳性的 RA 患者关节积液中 IL-2、IL-6、TNF-α 和 IFN-γ 的表达变化

CCP 抗体阳性 RA 患者（$n = 19$）关节积液中 IL-2、IL-6、TNF-α 和 IFN-γ 的表达水平较 CCP 阴性 RA 患者（$n = 14$）显著增加（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。见表 2。

## 3 讨论

RA 的主要炎症部位是关节滑膜衬里层、关节囊和腱鞘，早期学者们即认识到 RA 与其他器官特异性的自身免疫疾病不同，RA 初期并不会引起细胞死亡和组织破坏，而是以病变部位间质组织的活化和增殖为主要特征。

数十年来，有关滑膜 $CD4^+$ T 细胞的研究不断深入：滑膜 $CD4^+$ T 细胞被自身抗原或细胞因子刺激活化后[7]，分化为不同的功能亚群，如促炎性的 Th1、Th17 细胞，抑炎性的调节性 T 细胞（但在 RA 中功能缺陷）等。这些 $CD4^+$ T 细胞与单核细胞、滑膜细胞通过细胞因子和直接接触相互作用，形成复杂的功能网络，释放 IL-1、TNF-α 等促炎性细胞因子，引起滑膜细胞增殖和骨质破坏。IFN-$\gamma^+$ T 细胞可通过高度表达 RANKL 而导致破骨细胞过度增殖；同时 IFN-γ、IL-2 又刺激巨噬细胞、滑膜成纤维细胞等分泌 IL-1β 和 TNF-α 等促炎性细胞因子而加重炎症反应，导致滑膜细胞异常增殖和血管翳形成，最终引起软骨和骨的破坏[1]。进一步动物实验和临床研究证实[1]，IFN-γ 单抗、TNF-α 单抗均可有效改善关节症状。

CBA 结合流式细胞技术是一种新的检测细胞因子表达水平的方法，可在同一样本中同时检测多种细胞因子，便于在同样实验条件下进行多种细胞因子比例的比对。本研究发现 RA 患者关节积液中 Th1 极化的细胞因子 IFN-γ、TNF-α、IL-2 和 Th2 极化的细胞因子 IL-4、IL-6、IL-10 的表达均显著增加，提示在炎症局部存在着复杂的炎性反应，促炎性细胞因子和抑炎性细胞因子均大量存在，进一步分析发现 IFN-γ/IL-4 比例增高，提示炎症关节局部存在 Th1 极化，另一方面，机体针对自身免疫反应的抗炎机制如 IL-4、IL-6、IL-10 也增高，但不足以完全控制炎症的进展，最终导致炎症的加重和持续存在。其他研究者[8-10]针对不同分期 RA 患者的滑膜炎症的研究，也得到了类似的结果；然而在 RA 患者外周血中，Th1/Th2 是否失衡尚有较大争论，研究[11-13]发现在 RA 患者外周血单个核细胞在体外刺激后，呈现分泌较少的 IFN-γ 和过量的 IL-4，显示出 Th2 极化倾向，而另一项研究[14]发现早期患者外周血的 Th1 极化细胞因子的 mRNA 水平增加，上述结果的差异可能是与选择不同分期的患者有关，此外离体细胞刺激实验并不能完全证实患者体内细胞实际活化状态，而直接针对细胞因子的检测更直接、更准确。我们的研究发现只有 TNF-α 的表达水平显著增高，其他细胞因子则无明显变化，提示炎症以关节局部为主，而非全身性的急性活动期 RA 患者，其外周血的 Th1/Th2 失衡不明显；另一方面，TNF-α 作为 RA 最主要的

促炎性细胞因子，不仅参与了RA的关节炎症，也参与了患者体内免疫稳态被打破。

最新研究[15,16]发现，除Th1极化外，Th17细胞也是RA炎症进展过程中重要的促炎因素，在IL-6和IL-1的作用下，$CD4^+$ T细胞可分化为Th17细胞，其释放IL-17可直接作用于滑膜成纤维细胞，后者表达RANKL而最终导致骨质破坏，在本研究中，我们发现RA患者外周血和关节积液中的IL-6明显增加，提示IL-6可能参与了Th17的分化并最终导致炎症的加重，因此，进一步研究RA患者的Th17细胞分化状态和功能有重要意义。

新的自身抗体如磷酸葡萄糖异构酶抗体等已用于RA的临床诊断[17]，其中最重要的是抗CCP抗体，异常的瓜氨酸化的蛋白可见于多种自身免疫性疾病如银屑病、系统性硬化等，但CCP抗体却是RA特异性自身抗体，目前认为在RA的早期诊断中具有重要意义，但CCP抗体是否与RA炎症程度直接相关尚无定论。抗CCP抗体是新近发现的RA特异性的自身抗体，少见于其他自身免疫性疾病，早期RA患者甚至在发病前即可出现CCP抗体阳性，被认为是RA的标志性抗体。一般认为抗CCP抗体是较好的炎症预测指标，临床发现抗CCP抗体阳性的患者出现关节侵蚀的可能性大于阴性的患者[18]。我们的研究发现CCP抗体阳性RA病关节积液中IL-2、IL-6、TNF-α和IFN-γ的表达水平较CCP阴性患者显著增加，与临床研究吻合，均提示CCP抗体阳性的患者，其炎症程度更严重，因此对于此类患者，有必要早期即开始免疫抑制治疗。而CCP抗体究竟通过何种途径刺激了这些炎性细胞因子的分泌，也需要深入研究。另一方面，目前尚无基于RA免疫病理的临床分类标准，CCP抗体的作用机制和临床特征的进一步阐明，对于RA的不同临床亚型的区分也有重要意义。

RA作为一种异质性疾病，患者临床表现类似，但免疫病理机制和促炎性细胞因子的表达水平不尽相同，本研究初步探讨了患者外周血和关节局部Th1/Th2极化状态，并比较这些细胞因子在CCP抗体阳性和阴性的RA患者中的表达差异，为研究RA不同亚型的分类和研发新型免疫治疗手段提供了实验依据。

## 参考文献：


[1] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003, 423(6937): 356-361.

[2] Fournier C. Where do T cells stand in rheumatoid arthritis?[J]. Joint Bone Spine, 2005, 72(6): 527-532.

[3] Weyand C M, Goronzy J J. T-cell-targeted therapies in rheumatoid arthritis[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2(4): 201-210.

[4] Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, *et al*. Reduced expression of the regulatory $CD4^+$ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(3): 617-627.

[5] Raza K, Falciani F, Curnow S J, *et al*. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4): R784-R795.

[6] Braun-Moscovici Y, Markovits D, Zinder O, *et al*. Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as a predictor of response to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2006, 33(3): 497-500.

[7] Brennan F M, Hayes A L, Ciesielski C J, *et al*. Evidence that rheumatoid arthritis synovial T cells are similar to cytokine-activated T cells: of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB pathways in tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(1): 31-41.

[8] Cope A P, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2007, 25(5 Suppl 46): S4-S11.

[9] Quayle A J, Chomarat P, Miossec P, *et al*. Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly Th1 but also Th2 and mixed (Th0-like) cytokine patterns[J]. Scand J Immunol, 1993, 38(1): 75-82.

[10] Herman S, Zurgil N, Langevitz P, *et al*. Methotrexate selectively modulates TH1/TH2 balance in active rheumatoid arthritis patients[J]. Clin Exp Rheumatol, 2008, 26(2): 317-323.

[11] Mangge H, Felsner P, Herrmann J, *et al*. Early rheumatoid arthritis is associated with diminished numbers of th1 cells in stimulated peripheral blood[J]. Immunobiology, 1999, 200(2): 290-294.

[12] van-Roon J A, Verhoef C M, van-Roy J L, *et al*. Decrease in peripheral type 1 over type 2 T cell cytokine production in patients with rheumatoid arthritis correlates with an increase in severity of disease[J]. Ann Rheum Dis, 1997, 56(11): 656-660.

[13] Haddad A, Bienvenu J, Miossec P. Increased production of a Th2 cytokine profile by activated whole blood cells from rheumatoid arthritis patients[J]. J Clin Immunol, 1998, 18(6): 399-403.

[14] Schulze-Koops H, Lipsky P E, Kavanaugh A F, *et al*. Elevated Th1- or Th0-like cytokine mRNA in peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis. Modulation by treatment with anti-ICAM-1 correlates with clinical benefit[J]. J Immunol, 1995, 155(10): 5029-5037.

[15] Sato K. Th17 cells and rheumatoid arthritis-from the standpoint of osteoclast differentiation[J]. Allergol Int, 2008, 57(2): 109-114.

[16] Gaffen S L. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2009, 11(5): 365-370.

[17] 方勇飞，牟方祥，王欢，等. 血清葡萄糖6-磷酸异构酶在类风湿关节炎诊断中的意义[J]. 第三军医大学学报，2008，30(8)：732-734.

[18] Niewold T B, Harrison M J, Paget S A. Anti-CCP antibody testing as a diagnostic and prognostic tool in rheumatoid arthritis[J]. QJM, 2007, 100(4): 193-201.


（收稿 2010-03-11 修回 2010-04-29）

（编辑 栾 嘉）