DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.026
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
540 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0540-03

CD28/CTLA-4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],吴玉章[1],方勇飞[2],王 勇[2],张静波[1],李 阳[1] (第三军医大学:[1]基础医学部全军免疫学研究所,[2]西南医院中医科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨T细胞辅助刺激分子CD28和CTLA-4在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)中的表达及其与疾病活动的相关性。方法 采集患者外周抗凝血和关节积液,通过淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离其中的淋巴细胞,采用流式细胞术双标染色技术,检测$CD3^+CD28^+$和$CD3^+CTLA\text{-}4^+$在淋巴细胞上的表达,通过Spearman相关进行统计分析,评价其与疾病活动的相关性。结果 ①RA患者外周血单个核细胞(PBMC)$CD3^+CD28^+$的表达显著低于正常对照组和RA患者关节积液(SFMC)组($P<0.01$);②RA患者PBMC上$CD3^+CTLA\text{-}4^+$的表达与正常组无差异,但显著低于SFMC组($P<0.05$)。③SFMC组$CD3^+CD28^+$的表达与正常组无显著性差异,但$CD3^+CTLA\text{-}4^+$的表达显著高于正常组($P<0.01$)④PBMC组、SFMC组$CD3^+CD28^+$和$CD3^+CTLA\text{-}4^+$的表达与反映疾病活动性的指标RF、抗CCP抗体存在相关关系。结论 RA患者外周血和关节积液中$CD28^+$和CTLA4的表达异常是参与RA发病和病情进展的重要机制之一。但其在病程进展中的具体作用尚不明确。

关键词:类风湿关节炎;T细胞活化;辅助刺激信号,CD28,CTLA-4
中图法分类号:R392.11;R593.220.2 文献标识码:A

Expressions of CD28 and CTLA-4 in peripheral blood and synovial fluid lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis and the significance

LI Jing-yi[1], WU Yu-zhang[1], FANG Yong-fei[2], WANG Yong[2], ZHANG Jing-bo[1], LI Yang[1] ([1]Institute of Immunology, College of Medicine; [2]Department of Traditional Chinese Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the expressions of co-stimulatory factors CD28 and CTLA-4 on $CD3^+$ T cells in peripheral blood lymphocytes (PBMC) and synovial fluid lymphocytes (SFMC) in patients with rheumatoid arthritis (RA) and the relationship of these molecules with the activity of RA. **Methods** The lymphocytes were collected from the peripheral blood and synovial fluid in RA patients. The $CD3^+CD28^+$ and $CD3^+CTLA\text{-}4^+$ molecules on these cells were measured by dual-color-fluorescence cytometry. The correlation of the expressions of CD3+CD28+ and $CD3^+CTLA\text{-}4^+$ molecules with the activity of RA was statistically analyzed by Spearman. **Results** ① The level of $CD3^+CD28^+$ in PBMC of RA patients was significantly lower than that of the control group and SFMC ($P<0.01$). ② The expression of $CD3^+CTLA\text{-}4^+$ in PBMC was not significantly different from that of the control group, but lower than that of SFMC ($P<0.05$). ③ The expression of $CD3^+CD28^+$ in SFMC of RA patients was not significantly different from that of control group, but the expression of $CD3^+CTLA\text{-}4^+$ was significantly higher than that of the control group ($P<0.01$). ④ The expressions of CD28 and CTLA-4 were partly associated with the activity of RA. **Conclusion** The abnormal expression of CD28 and CTLA-4 molecules in peripheral blood lymphocytes and synovial fluid lymphocytes is one of the important mechanisms involved in the genesis and progression of RA, but the definite roles in the process of the disease are not clear.

Key words: rheumatoid arthritis; activation of T cell; co-stimulatory signal; CD28; CTLA-4

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以对称性多关节滑膜炎为主要临床表现的自身免疫性疾病,病程迁延,致残率高。目前认为RA可能是由未知的某种抗原,对某些具有敏感性的遗传背景的人刺激产生免疫反应后发生的,该免疫反应过程涉及到抗原提呈细胞对自身抗原的提呈和自身反应性T细胞的活

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300452)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300452)
作者简介:李景怡(1974-),女,河北省唐山市人,硕士研究生,医师,主要从事自身免疫性疾病的临床和机制方面的研究。电话:(023)68752234
通信作者:吴玉章,E-mail:wuyuzhang@yahoo.com
收稿日期:2003-12-15;修回日期:2004-01-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化。在 RA 的病程中, T 细胞被认为扮演了重要的角色[1]。T 细胞被诱导增殖分化成效应细胞时, 需要双信号的作用, 即第一信号-抗原识别, 第二信号来自辅助刺激分子(co-stimulatory molecule)。第二信号在 T 细胞活化上的重要作用, 表现在两个方面: ①如果 T 细胞识别抗原时没有辅助刺激分子提供第二信号, 则 T 细胞不能充分活化, 不能表现效应功能。②抗原识别时没有辅助刺激信号, 则使识别抗原的 T 细胞凋亡, 或被诱导呈无能状态(anergy)。已有的研究表明, RA 患者的关节滑膜树突状细胞将外来抗原或自身抗原提呈给 T 细胞, CD28/CTLA-4$^-$ CD80/CD86 信号通路是初始 T 细胞活化的基本条件[2]。

在外周血淋巴细胞中, 几乎所有的 $CD4^+$ T 细胞和约 50% 的 $CD8^+$ T 细胞上表达 CD28 分子, 其配体是主要表达于 APC 细胞上的 B7 家族, 它们之间的结合和随后介导的信号转导是 T-B 细胞相互协作的分子基础。CTLA-4 在结构上与 CD28 分子高度同源, 短暂地表达于活化的 T 细胞上, 它与 CD80/CD86 的亲和力显著高于 CD28, 目前已经在体内外系统中证明 CTLA-4 对 T 细胞反应起负性调节作用。本研究采用直标双色荧光流式细胞计术检测了 RA 患者外周血和关节积液(synovium fluid, SF)淋巴细胞上 CD28 和 CTLA-4 分子的表达, 并探讨它们在 RA 活动中的作用和意义。

1　资料和方法

1.1　研究对象

1.1.1　病例选择　　RA 患者 28 例, 男性 7 例, 女性 21 例; 年龄 19～63 岁, 平均(47±10.27)岁, 病程 0.5～12 年, 平均(3.4±2.74)年。所有病例均符合 1987 年美国风湿病学会(ACR)诊断标准。病情均处于活动期。其中采集外周血 28 例, 双膝关节积液 14 例。正常对照组 12 名, 均为西南医院健康查体工作人员, 男性 5 名, 女性 7 名, 年龄 22～42 岁, 平均(35.58±7.42)岁, 均采集外周血作为对照阴性。

1.1.2　临床资料采集　　所有病例均按照 ACR 标准, 采集血沉(ESR)、类风湿因子(RF)、抗环瓜酸酶抗体(抗 CCP)作为临床检查指标。

1.2　试剂与器材

鼠-抗人-CD3-FITC 单克隆抗体(mAb)(eBioscence); 鼠-抗人-CD28-PE mAb (eBioscience); 鼠-抗人-CD152-PE mAb (eBioscience); 羊-抗鼠-FITC PE IgG mAb(eBioscience); 红细胞裂解液(BioE), 0.01 mol/L PBS 洗液(BioE), 固定液(BioE), 淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司)。流式细胞仪(BD Biosciences)。

1.3　方法

外周血采用全血直标法: ①肝素抗凝的外周血 300 μl, 分装于 3 个试管, 实验组分别加入 20 μl 鼠-抗人-CD3-FITC mAb+20 μl 鼠-抗人-CD28-PE mAb, 20 μl 鼠-抗人-CD3-FITC mAb+20 μl 鼠-抗人-CD152-PE mAb, 阴性对照组加入 20 μl 羊-抗鼠-FITC PE IgG mAb, 室温混匀并避光静置 30 min。②加 2 ml 红细胞裂解液, 37 ℃水浴 30 min。③2 000× g 离心 4 min, PBS 洗涤 2 次。④各加 1 ml 固定液, 4 ℃保存待测。⑤关节积液用淋巴细胞分离液梯度密度离心法分离出淋巴细胞(SFMC), PBS 洗涤后, 调整细胞浓度为 1×10^6/ml, 其余步骤同前。⑥流式细胞仪设置人淋巴细胞门, 计数 5 000 个以上细胞。测定密度值用% 表示。

1.4　统计学处理

计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 软件进行数据分析。相关分析采用 Spearman 相关, 组间比较用 t 检验。

2　结果

2.1　CD28/CTLA-4 在 RA 病人外周血和关节积液中的表达

RA 患者外周血单个核细胞(peripheral blood monoeuclear cell, PBMC) $CD3^+$ $CD28^+$ 的表达显著低于正常对照组和 RA 患者关节积液(synovium fluid monoeuclear cell, SFMC)组($P<0.01$); RA 患者 PBMC 上 $CD3^+$ $CTLA\text{-}4^+$ 的表达与正常组无显著性差异, 但显著低于 SFMC 组($P<0.05$)。SFMC 组 $CD3^+CD28^+$ 的表达与正常组无显著性差异, 但 $CD3^+$ $CTLA\text{-}4^+$ 的表达显著高于正常组($P<0.01$)(表 1)。

表 1　**RA 病人外周血和积液和单核细胞上 CD3CD28/CD3 CTLA-4 的表达[($\bar{x}\pm s$)%]**

Tab 1　Expression of CD3CD28/CD3CTLA-4 molecules on peripheral blood cells and synovium fluid cells in RA patients [($\bar{x}\pm s$)%]

Group	$CD3^+CD28^+$	$CD3^+CTLA\text{-}4^+$
Control	87.88±3.44	0.39±0.19
RA-PBMC	79.16±8.96△	0.48±0.34
RA-SFMC	89.26±4.83**	1.73±1.37

△: $P<0.01$, *vs* control group; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* RA-PBMC groups

2.2　CD28/CTLA-4 的表达与 ESR、RF、抗 CCP 的相关性

PBMC 组 $CD3^+CD28^+$ 与 RF、抗 CCP 均呈正相关, $CD3^+CTLA\text{-}4^+$ 与 RF 呈负相关, SFMC 组 $CD3^+CD28^+$、$CD3^+CTLA\text{-}4^+$ 与上述指标均无关(表 2)。

表 2　**CD3CD28/CD3CTLA-4 与 ESR、RF、抗 CCP 的相关性**

Tab 2　Correlation of CD3CD28/CD3CTLA-4 molecules with ESR, RF, and CCP in RA patients

	$CD3^+CD28^+$				$CD3^+CTLA\text{-}4^+$			
	PBMC		SFMC		PBMC		SFMC	
	r	P	r	p	r	P	r	P
pESR	−0.183	0.190	0.042	0.444	−0.218	0.147	−0.222	0.223
RF	0.414	0.040	0.066	0.824	−0.390	0.027	−0.038	0.448
Anti-CCP	0.404	0.035	0.395	0.258	−0.080	0.365	−0.012	0.973

3　讨论

CD28/CTLA-4 与 T 细胞和 APC 细胞之间的相互作

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

用是动态的且复杂的免疫调节过程，弄清这个过程，有助于我们更好的理解 RA 的免疫机制。CD28(CTLA-4)/B7 作为 T 细胞与抗原提呈细胞相互作用中最重要的辅助刺激分子之一，其在自身免疫性疾病中的作用是近期国内外研究的热点。对另一自身免疫性疾病——系统性红斑狼疮模型小鼠研究表明，基因敲除 CD28 的小鼠其自身反应性 T 细胞的聚集几乎无改变，而关节症状和自身抗体的产生均明显减轻[3]。证明缺少辅助刺激信号则 T 细胞不能充分表现效应功能。另一分子 CTLA-4 作为负性调节信号也参与了自身免疫性疾病的病程。CTLA-4 的表达水平或功能的降低使自身免疫性 T 细胞克隆增殖并导致自身免疫性疾病的发生。CTLA-4Ig 是一种能阻止 T 细胞活化的重组融合蛋白，Emilia 等[4]研究显示注射 CTLA-4Ig 的 CIA 小鼠，其关节病变指数、爪的肿胀程度均有减轻，Ⅱ型胶原特异性淋巴细胞增殖反应，IFN-γ 和抗Ⅱ型胶原抗体的产生均受到抑制。证实 CTLA-4Ig 可有效的改善 CIA 小鼠的关节症状并抑制其免疫反应。

我们的研究发现在活动期的类风湿关节炎病人的外周血和关节积液中，其 T 细胞上 CD28 和 CTLA4 的表达均与正常人显著不同。在 RA 病人外周血中 CD28 的表达为(79.16±8.96)，显著低于正常人($P<0.01$)；而在关节损伤部位，其表达为(89.26±4.83)，显著 RA 病人外周血中的表达($P<0.01$)，这些提示我们 $CD28^+$ T 细胞可能选择性的迁移到自身免疫损伤部位而发挥作用。另一方面，病人服用的抗风湿药物，主要进入血液循环，其血药浓度远大于关节局部浓度，也会对炎症细胞起到一定的抑制作用。令我们感兴趣的是，为何关节积液中 CD28 的表达较外周血中显著增高，但与正常人外周血中的表达却无差异。可能的解释是与关节局部高分泌的 TNF-α 有关。Ewa 等[5]的研究提供了部分佐证，他们将患者外周血 T 细胞与 RA 病程中最重要的促炎因子 TNF-α 共同孵育 24h 后，发现 CD4 的表达无变化而 CD28 的表达降低了一半以上，表明 TNF-α 可以引起 CD28 分子表达的下调。作为负性调节信号的 CTLA-4 在关节积液中的表达为(1.73±1.37)，显著高于 RA 的 PBMC 组($P<0.05$)和正常人组($P<0.01$)，说明在炎症损伤部位，不但有 CD28 的表达增高来协助 T 细胞的活化，同时也有负性调节信号的增高来抑制 T 细胞的活化，而炎症的发展可能与上述二者的比例失调有关。已有的研究表明当应用抗 CTLA-4 抗体封闭 CTLA-4 分子后，作为主要促炎因子的 TNF-α 和 IL-1β 的分泌增高，并且与抗 CTLA-4 抗体的剂量呈正比。因此，我们推断在类风湿关节炎的炎症过程中，CTLA-4 可能是通过降低 TNF-α 和 IL-1β 的分泌而发挥负性调节作用。在实验性自身免疫性神经炎等其他自身免疫性疾病的研究中，也发现了类似的结果[6]。

通过统计学方法在计量水平上研究辅助刺激分子与临床的关系，文献中报道很少。ESR、RF、抗 CCP 抗体是反映疾病活动性的常用临床指标，本研究进一步对 CD28/CTLA-4 的表达与 ESR、RF、抗 CCP 进行了相关性分析，表明 PBMC 组 CD28/CTLA-4 的表达与上述几个主要反映 RA 临床活动性的指标均存在一定的相关关系。作为有助于 T 细胞活化的 CD28 与反映 RA 疾病活动性的 RF、抗 CCP 呈正相关，而抑制 T 细胞活化的 CTLA-4 与 RF 呈负相关，提示我们辅助刺激分子不仅参与了自身免疫的启动过程，而且是 RA 病情进展的影响因素之一。但上述相关系数均较低，说明这些分子并不是影响病情转归的决定性因素。Andrzej 等[7]曾研究发现 $CD4^+CD28^-$ T 细胞与 RA 病人的关节外表现关系更密切，因此我们推测辅助刺激分子可能影响了炎症不同发展方向，但还需大样本研究来进一步验证。SFMC 组中 CD28/CTLA-4 与 RF、ESR、抗 CCP 均无关，可能的原因是本研究所采集的上述临床指标均来自外周血，更多的反映了全身情况而非局部变化，因此有必要进一步研究关节积液中 RF、抗 CCP 的滴度与辅助刺激分子之间的关系。但辅助刺激分子究竟在炎症过程中处于什么地位还不完全清楚，其表达改变究竟发生在疾病的哪个阶段，以及临床二线药物治疗及免疫治疗是否可改变其表达水平等诸多问题均需要下一步的研究和探讨。

参考文献：

[1] Klimiuk P A, Yang H, Goronzy J J, *et al*. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent[J]. Clin Immunol, 1999, 90(1): 65-78.

[2] Tanja A, Jacob B N. Cell-cell interaction in synovitis antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res, 2001, 3(1): 13-17.

[3] Tada Y, Nagasawa K, Ho A, *et al*. Role of the Costimulatory Molecule CD28 in the Deleopment of Lupus in MRL/lpr Mice[J]. J Immunol, 1999, 163(6): 3153-3159.

[4] Emilia Q, Margaret J D, Marc F. Adenovirus-mediated Gene Transfer of CTLA-4Ig Fusion Protein in Suppression of Experimental Autoimmune Arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(8): 1688-1697.

[5] Ewa B, Abbe N V, Cornelia M, *et al*. Down-Regulation of CD28 Expression by TNF-α[J]. J Immunol, 2001, 167(6): 3231-3238.

[6] Zhu J, Zou L, Zhu S, *et al*. Cytotoxic T Lymphocyte-associated Atigen 4 (CTLA-4) Blockade Enhances Incidence and Senerity of Experimental Autoimmune Neuritis in Resietant Mice[J]. J Neuroimmunol, 2001, 115(1-2): 111-117.

[7] Andrzej P, Lidia O, Lwona B, *et al*. The expansion of $CD4^+CD28^-$ T cells in patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Therapy, 2003, 5(4): R210-R213.

(编辑 栾 嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net