

• 论 著 •

类风湿关节炎患者血清白细胞介素及肿瘤坏死因子表达的研究

施利青^{1,2}, 董 婷¹, 向自金¹, 欧阳红梅^{1△}

(1. 云南省第一人民医院检验科, 云南昆明 650034; 2. 大理州永平县人民医院检验科, 云南大理 672600)

摘 要:目的 探讨不同时期类风湿关节炎(RA)患者体内炎性细胞因子的变化, 研究 RA 患者随病程进展机体内部免疫微环境的改变。方法 采用流式细胞术微球阵列法检测活动期(36 例)、缓解期(23 例)RA 患者及体检健康者(对照组, 30 例)血清白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及肿瘤坏死因子(TNF)的表达水平。结果 活动期 RA 患者 IL-6、IL-1 β 及 TNF 水平高于对照组和缓解期组, IL-4 和 IL-10 水平低于对照组和缓解期组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 缓解期 RA 患者 IL-6 和 IL-1 β 水平高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 而 IL-4、IL-10 和 TNF 与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。除 IL-6 随病程发展在后期趋于稳定外, 其他 4 类炎性细胞因子中, IL-4、IL-10 有上升趋势, IL-1 β 和 TNF 有下降趋势。结论 活动期 RA 患者血清 Th1 及 Th2 型细胞因子存在失衡状态, 以向 Th1 型因子偏移为主; 将 RA 按病程划分定期检测炎性细胞因子水平, 可为评价病情活动度提供可靠的依据。

关键词: 类风湿关节炎; 流式细胞术; 流式细胞术微球阵列法; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.022

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)23-3416-03

Study on the expression of interleukins and tumor necrosis factor in serum of patients with rheumatoid arthritis

Shi Liqing^{1,2}, Dong Ting¹, Dian Zijin¹, Ouyang Hongmei^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650034, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Yongping County People's Hospital of Dali Autonomous, Dali, Yunnan 672600, China)

Abstract: **Objective** To explore the changes of inflammatory factors in patients with different stage of rheumatoid arthritis (RA), and to study the changes of immune microenvironment in patients with RA. **Methods** The serum levels of tumor necrosis factor (TNF), interleukin-10 (IL-10), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-4 (IL-4) in patients with RA on active stage (36 cases), patients with RA on remitting stage and healthy individuals (30 cases) were detected by using cytometric bead array. **Results** The serum levels of IL-6, IL-1 β and TNF in active stage RA group were higher than those in control group and remitting stage RA group, while serum levels of IL-4 and IL-10 were lower than those in control group and remitting stage RA group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The serum levels of IL-6 and IL-1 β in remitting stage RA group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). There were no significant differences in levels of IL-4, IL-10 and TNF between remitting stage RA group and control group ($P > 0.05$). As the disease develops, except for IL-6 which tended to be stable, the serum levels of IL-4 and IL-10 had a rising trend, while serum levels of IL-1 β and TNF had a downward trend with the progression of RA. **Conclusion** There is an imbalance between Th1 and Th2 cytokines in patients with RA on active stage, in which Th1 cytokines are dominantly expressed. Periodic detection of inflammatory factors according to the course of RA could provide a reliable basis for the assessment of disease activity.

Key words: rheumatoid arthritis; flow cytometry; cytometric bead array; interleukin; tumor necrosis factor

类风湿关节炎(RA)是一种关节及周围关节组织病变, 全身多系统受累且高度致残的慢性炎性疾病, 多发于中年女性, 是临床多发病之一, 也是困扰临床医师的一大难题。近年来, RA 的诊治水平发展迅速, 自 2009 年应用白细胞介素-6(IL-6)受体单抗及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抑制剂等生物制剂治疗 RA 的方法问世以来, 细胞因子在参与 RA 发病过程中的作用更是备受关注^[1]。已有研究显示, 在 RA 患者的滑膜组织中存在大量的白细胞介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、白细胞介素-8(IL-8)等因子^[2]。本研究以 RA 不同时期免疫微环境改变为契机, 利用流式细胞术微球阵列法(CBA)检测 RA 患者血清中几类重要的 Th1 及 Th2 型细胞因子的活性水平, 探讨各类细胞因子在 RA 病程中的变化, 为评估 RA 病情进展及治疗寻找新

靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 7 月至 2015 年 4 月云南省第一人民医院风湿免疫科收治的 RA 住院患者 59 例, 男 32 例, 女 27 例; 年龄 16~72 岁, 中位年龄 45 岁; 所有患者均符合 1987 年美国风湿病协会修订的 RA 诊断标准并完善相关检查确诊。参照《新编风湿病学》标准, 将其中处于活动期的 36 例患者纳入活动期组, 处于缓解期的 23 例患者纳入缓解期组; 同时按照病程长短将所有患者分为病程小于 2 年者(12 例)、2~<5 年者(15 例)、5~<10 年者(14 例)、 ≥ 10 年者(18 例)4 个组。另选取 30 例体检健康者纳入对照组, 男 15 例, 女 15 例, 年龄 25~40 岁, 中位年龄 37 岁。

1.2 仪器与试剂 Human TH1/TH2 Cytokine Kit II CBA

试剂盒(美国 BD Biosciences 公司);FC500 MPL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 方法 采集患者乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝外周血标本 2~3 mL,离心机离心取血清待测。采用 CBA 技术检测 IL-4、IL-6、IL-10、IL-1β 及 TNF 水平,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 不同时期细胞因子表达水平比较($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

组别	<i>n</i>	TNF	IL-1β	IL-6	IL-4	IL-10
对照组	30	3.90±0.69	4.33±0.81	4.14±0.66	3.34±0.53	4.39±0.53
活动期组	36	10.33±3.65*#	17.38±4.75*#	51.92±11.97*#	2.68±1.06*#	3.28±0.99*#
缓解期组	23	4.58±1.57	5.50±1.16*	19.19±6.01*	3.23±0.79	4.04±1.37

*: $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与缓解期组比较。

2.2 RA 患者血清细胞因子随病程的变化 按病程长短来分析各细胞因子表达水平的变化,结果显示 IL-1β 和 TNF 的活性水平随病程的发展有逐渐下降趋势,而 IL-4 和 IL-10 有稍平稳的上升趋势,IL-6 的活性水平前期有明显上升趋势后逐渐趋于平稳。见图 1。

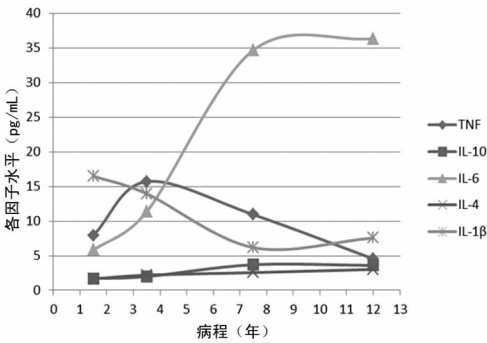


图 1 各细胞因子随 RA 病程变化的表达情况

3 讨 论

细胞因子是一类免疫细胞和某些非免疫细胞分泌的对细胞生长及分化具有调节作用的小分子多肽。正常机体内 CD4⁺T 淋巴细胞分泌 Th1 和 Th2 两类细胞因子[3]。现研究较多的 Th1 型细胞因子有 IFN-γ、IL-2 和 TNF 等,主要介导细胞的免疫应答,与抗肿瘤、抗病毒作用相关;Th2 细胞因子有 IL-4、白细胞介素-5(IL-5)、IL-6、IL-10 等,主要介导体液免疫应答,与移植物耐受、抑制自身免疫相关。健康人体内 Th1 和 Th2 在功能上相互拮抗,通过保持相互的动态平衡保证机体产生正常的免疫应答。

IL-1 和 TNF 作为炎症因子的代表,在 RA 发病中也备受关注。Strand 等[4]和 Zwerina 等[5]均提出在活动期 RA 患者体内 IL-1 和 TNF 能够诱导血液中白细胞汇集到关节腔,刺激骨膜和软骨细胞分泌炎症介质,抑制软骨的有丝分裂作用,进而损坏骨及软骨。岳涛等[6]研究发现,用 TNF-α 单克隆抗体能抑制 RA 患者体内骨质破坏,缓解病情。IL-6 是一种调节急性应答、参与炎症反应及造血作用的多功能细胞因子,在 RA 活动期,患者 IL-6 活性水平明显增高,且与病情严重程度呈一

2 结 果

2.1 各组血清细胞因子表达水平比较 活动期组患者血清 IL-6、IL-1β 及 TNF 水平高于对照组,IL-4、IL-10 水平低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);缓解期组患者血清 IL-6 和 IL-1β 水平高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),IL-4、IL-10 和 TNF 水平与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。活动期组患者血清 IL-6、IL-1β 及 TNF 水平高于缓解期组,IL-4、IL-10 水平低于缓解期组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

定的相关性[7]。本研究中活动期 RA 患者 IL-1β、IL-6 和 TNF 水平明显高于对照组及缓解期组,推测这 3 种因子的活性水平升高可能是致使 RA 病情恶化的重要因素之一。

与 IL-1 和 TNF 相对,IL-4 和 IL-10 作为抑炎因子具有多种生物学作用,有研究显示 IL-10 和 IL-4 均能抑制 TNF-α、IL-6 及 IL-8 的活性,控制炎症的发生,保护关节组织的完整,还能抑制 IL-1 和 TNF 在软骨细胞和滑膜成纤维细胞中的表达[8]。同时 IL-10 和 IL-4 相互协同作用能够抑制 Th1 细胞,进而抑制炎症反应[9-10]。

在本试验中,5 类细胞因子根据活动期表达水平的变化可分为两类:在活动期 RA 患者血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF 水平明显升高;而 IL-10 和 IL-4 的水平降低,这表明在活动期 RA 患者体内细胞因子表达紊乱,其中以 Th1 型细胞因子表达亢进,而 Th2 型细胞因子表达减弱为主,导致机体免疫系统失衡,与 Boissier 等[11]的研究结果相一致。

检测不同病程下各细胞因子的活性水平能够较客观地反映疾病进展,各类细胞因子随病程进展体现出不同的浓度趋势,然而并无明显的临界值,因此,细胞因子还不能作为 RA 病情分期的判断指标,但可作为 RA 患者评价病情活动度的监测指标。笔者深入分析呈现这种现象的原因,可能是由于外周血分泌因子的细胞选择性游走能力强弱不同,机体随病程进展还需要逐渐调整,且各型因子之间还有相互协同或抑制作用。

RA 患者活动期以 Th1 型细胞因子亢进,Th2 型细胞因子减弱为主,据此提示参与机体免疫微环境的调控是治疗 RA 的重要手段之一。同时定期检测不同病程下患者体内细胞因子水平,可为临床评价病情活动度提供可靠的依据。

参考文献

[1] 丁立珉,孙万邦.细胞因子在类风湿关节炎发病机制中作用的研究进展[J].中国当代医药,2012,19(7):12-14.
[2] Haseeb A,Haqqi TM.Immunopathogenesis of osteoarthritis[J].Clin Immunol,2013,146(3):185-196.
[3] 姜焕好,曾东良,吴春风,等.急性白血病患者治疗前后血清 IFN-γ、VEGF、IL-10 及 IL-12 水平的变化及意义[J].医学综述,2012,18(2):299-300.
(下转第 3420 页)

型、前期速降型、后期速降型、前期停滞型、后期停滞型和阶梯型^[6]。影响 ESR 的因素很多,其中最重要的因素是红细胞缗钱状的形成。因为红细胞形成缗钱状或凝集成团后总面积减少,所承受的血浆阻力也减少,下降的速度要比单个分散的红细胞快得多。影响缗钱状形成的主要因素包括:(1)血浆中各种蛋白的比例。一般认为,ESR 加快主要是血浆中各种蛋白成分比例的改变,血浆中带有正电荷的不对称大分子物质纤维蛋白原是最强有力的促缗钱状聚集的物质,其次为球蛋白,再次为 α 、 β 球蛋白,此外胆固醇、三酰甘油也有促进红细胞形成缗钱状的作用。而清蛋白及卵磷脂有抑制的作用。(2)红细胞的数量和形状。正常情况下,ESR 和血浆回流阻力保持一定的平衡状态,如红细胞数量减少,会造成总面积减少,所承受的血浆逆阻力也减少,进而 ESR 加快,反之红细胞增多时 ESR 减慢^[7]。但红细胞数量太少反而影响聚集成缗钱状,使 ESR 的加快与红细胞减少程度不成比例。

经典魏氏法要求血沉管与血沉架需要符合标准,血液与抗凝剂的比例(4:1)要准确,抗凝剂浓度增加会使 ESR 减慢;抽血后应尽快检验,最长不超过 2 h;血沉管应完全直立,倾斜会加速 ESR,研究显示血沉管倾斜 3°,沉降率可增加 30%;温度可影响 ESR,温度高则沉降快,反之则慢,要求室温在 15~25℃进行检验。魏氏法为手工测定,人为判读结果,测定时间需 60 min,影响因素多,而如今临床标本量越来越大,使得魏氏法在临床的应用受到限制,自动化血沉仪应运而生。不同的仪器使用不同的抗凝剂,其结果同魏氏法比较,有的一致性好的,有的差异较大^[8-9]。

XC 血沉仪法每 3 分钟采集 1 次数据,需要专用配套的血沉管,对标本量要求高,低于或高于刻度线均不能检出结果,且专用的测试管不能贴条形码,所以不能和实验室信息系统(LIS)连接,不能自动传输结果。本研究结果显示 XC 血沉仪法和魏氏法 ESR 检测结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$),原因可能为该仪器数据采集间隔时间较长或标本采集量不一致(配套血沉管有上、下两个刻度线,在此之间的标本量均可上机检测)。研究资料表明,不同厂家、型号的血沉仪在使用前均需进行准确性评价及校正^[10]。

VISION 血沉仪法主要由混匀摇盘、试管架、数据采集模块组成,数据采集模块沿着试管上下运行,通过红外感应器 10 s 采集 1 次数据,每 0.25 毫米 1 个采集点,沉降曲线可见,实现真正意义的自动动态 ESR 检测。该仪器 20 min 检测结果相

应于魏氏法 60 min 检测结果,测试结果重复性好,与魏氏法有较好的相关性。仪器具有批量标本自动混匀模式和手动混匀即插即用两种模式,可直接使用血常规检测结束后剩余的标本进行测试,标本量大于 1.5 mL 即可,减轻了患者及标本采集人员的负担,无需再增加血沉管耗材支出,全封闭式检测,安全性高。据研究报道,不同性别、年龄的人群,其参考区间存在差异,VISION 血沉仪法参考区间的验证需收集更多的标本以进行后续研究。红细胞压积对 VISION 血沉仪法检测结果的影响也需要进一步研究^[11]。

综上所述,VISION 血沉仪法操作简便、结果快速可靠、无其他耗材、无需转移标本,保证操作的生物安全性,适合临床推广应用。

参考文献

[1] 马艳侠.实用临床检验项目及技术[M].天津:天津科学技术出版社,2014:56-58.

[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:143-144.

[3] 张从利,胡爱玲.SD-100 自动血沉分析仪与魏氏法血沉测定结果比较分析[J].现代检验医学杂志,2009,24(6):120-121.

[4] 陈平,赵晓华.红细胞沉降率在临床检验工作中的应用与进展[J].检验医学与临床,2008,5(3):163-164.

[5] 朱喜丹,田刚,王南华.ROC 曲线评价红细胞沉降率在 14 种疾病中的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2013,34(3):276-277.

[6] 李明勇,梁敏,熊志刚.红细胞沉降率测定的方法学探讨[J].检验医学与临床,2009,6(5):350-351.

[7] 丛玉隆,尹一兵,陈瑜.检验医学高等教程[M].北京:人民军医出版社,2012:110-112.

[8] 李若倩,丁爽.自动红细胞沉降仪与经典魏氏法测定红细胞沉降率结果比较[J].检验医学与临床,2011,8(23):2856-2857.

[9] 陈林,张莉滢,万泽明,等.红细胞沉降率参考方法、魏氏法和仪器法的应用比较[J].检验医学,2010,25(5):376-378.

[10] 傅金可,冯康乐,王清平,等.TEST1 自动血沉仪的准确性评价及校正[J].中国卫生检验杂志,2015,25(7):1015-1016,1019.

[11] 张云,杨明,高兴,等.Microtest 1 自动血沉仪性能评价及生物参考区间调查[J].检验医学与临床,2014,11(21):3034-3035.

(收稿日期:2015-08-18)

(上接第 3417 页)

[4] Strand V,Kavanaugh AF.The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis[J].Rheumatology (Oxford),2004,43(Suppl 3):iii10-iii16.

[5] Zwerina J,Hayer S,Tohidast-Akrad M,et al.Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction[J].Arthritis Rheum,2004,50(1):277-290.

[6] 岳涛,范晓蕾,肖涟波,等.重组抗肿瘤坏死因子- α 人鼠嵌合单克隆抗体对类风湿关节炎患者 RANK/RANKL/骨保护素系统的影响[J].中华风湿病学杂志,2011,15(8):531-536.

[7] 李巧林,樊斗霜,牛彦红.细胞因子在类风湿性关节炎中的作用[J].甘肃医药,2014,33(11):847-849.

[8] Van Roon JA,Lafeber FP,Bijlsma JW.Synergistic activity of in-

terleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis[J].Arthritis Rheum,2001,44(1):3-12.

[9] Fernandes JC,Martel-Pelletier J,Pelletier JP.The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology[J].Biorheology,2002,39(12):237-246.

[10] 陈富超,孙万邦,封建凯,等.重组人 IL-10 在毕赤酵母菌 X-33 的表达及其生物活性鉴定[J].中国免疫学杂志,2011,27(8):691-695.

[11] Boissier MC,Assier E,Falgarone G,et al.Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm[J].Joint Bone Spine,2008,75(4):373-375.

(收稿日期:2015-07-23)