

类风湿关节炎患者血清趋化因子 MCP-1、MIP-1 的表达

包 军,陆慧琦,徐沪济* (第二军医大学长征医院风湿免疫科,上海 200003)

[摘要] 目的:探讨单核细胞化学趋化蛋白 1(MCP-1)、巨噬细胞炎症蛋白 1(MIP-1)在类风湿关节炎(RA)发病中的可能机制。方法:收集年龄为 18~79 岁的早期 RA 活动期患者 17 例,非早期 RA 活动期患者 18 例,以及正常健康者 15 例,评估握力、关节疼痛指数和肿胀指数等临床活动指数,测定红细胞沉降率、C 反应蛋白、类风湿因子等血清学指标,应用 ELISA 法测定各自血清 MCP-1、MIP-1 水平。Kruskal-Wallis 法比较各组间 MCP-1、MIP-1 水平的差异;应用直线相关分析法对血清 MCP-1、MIP-1 水平与临床活动指数及血清学指标作相关性分析。结果:早期 RA、非早期 RA 血清 MCP-1 表达均较正常对照组明显升高(P 均 <0.01),早期组与非早期组间无明显差异。早期 RA 的血清 MIP-1 表达较非早期 RA、正常对照组明显升高($P<0.01$),非早期组与对照组间无明显差异。RA 患者的血清 MCP-1、MIP-1 水平以及早期 RA 患者的血清 MIP-1 水平与疾病临床活动指数以及血清学指标均无明显相关。结论:MCP-1、MIP-1 与 RA 的发生、发展有关;MIP-1 可能在 RA 早期滑膜炎的发生机制中起了重要作用;未发现 RA 患者的血清 MCP-1、MIP-1 表达与炎症活动相关。

[关键词] 关节炎, 类风湿;单核细胞化学趋化蛋白 1;巨噬细胞炎症蛋白 1

[中图分类号] R 593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1226-03

Serum expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inhibitory protein-1 in patients with rheumatoid arthritis

BAO Jun, LU Hui-qi, XU Hu-ji* (Department of Rheumatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the possible role of chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inhibitory protein-1 (MIP-1) in pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). **Methods:** Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the serum expression of MCP-1 and MIP-1 in 17 patients with early active RA, 18 with advanced active RA, and 15 healthy controls (all aged 18-79 years). Clinical activity indices such as the strength of grip, joint pain index, and joint swelling index were assessed in all subjects; and the serological indices such as erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), and rheumatoid factors were also determined. The relationships between serum levels of MCP-1, MIP-1 with the clinical activity indices and serological indices were analyzed. **Results:** The serum levels of MCP-1 in patients with early and advanced RA were higher than that in the controls ($P<0.01$), while there was no significant difference between the 2 RA groups. The serum level of MIP-1 in patients with early RA was significant higher than in those with advanced RA and healthy controls ($P<0.01$), and there was no significant difference between the latter 2 groups. It was found that the serum levels of MCP-1 and MIP-1 in RA patients had no correlations with clinical activity indices and serological indices. **Conclusion:** It is confirmed that MCP-1 and MIP-1 participate in the pathogenesis of RA. MIP-1 may play a pivotal role in the pathogenesis of synovitis during early stage of RA. It has not been indicated that MCP-1 and MIP-1 participate in inflammations.

[KEY WORDS] arthritis, rheumatoid; monocyte chemoattractant protein 1; macrophage inhibitory protein-1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11):1226-1228]

目前很多风湿病学家正致力于类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的发生和发展机制的研究,发现趋化因子(chemokines)在慢性滑膜炎中起着重要的介导作用^[1]。动物研究^[2]表明,巨噬细胞炎症蛋白 1 (macrophage inhibitory protein-1, MIP-1)在早期关节炎的滑膜液中表达较强,单核细胞化学趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)则在关节炎的非早期阶段表达较强,提示不同种类的趋化因子在 RA 发生、发展机制中可能起着不同的作用,但目前尚无临床研究证

实。本研究测定了 35 例不同病程 RA 患者血清 MCP-1、MIP-1 水平,旨在分析不同病程的 RA 中血清趋化因子表达的差异,以及趋化因子表达与临床活动程度以及其他血清学指标的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象 2004 年 9 月至 2005 年 10 月在本

[作者简介] 包 军,博士,主治医师。

E-mail: janebaosun@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: hujiX@qimr.edu.au

院风湿免疫科门诊、病房确诊的 RA 患者(按照 1987 年美国风湿病学会制订的分类标准^[3])共 35 例。

入组标准:(1)年龄在 18~79 岁,患有按美国风湿病学会标准诊断的 17 岁以后发病的 RA。(2)病程 1 年影像学检查无关节破坏征象(0 级),或病程 5 年影像学检查有关节破坏征象(1 级以上)。(3)全部病例均有活动性疾病,其指标是存在以下体征或症状中的至少 3 种:6 个或更多的关节有压痛,3 个或更多关节有肿胀,晨僵至少持续 1 h,红细胞沉降率 ≥ 28 mm/1 h,并且在清洗期之末有疾病反复的证据。(4)排除标准:同时有临床显著的疾病病史(特别是肝肾功能紊乱、消化性溃疡、糖尿病、1 期以上高血压病、精神病、结核或败血症等严重感染性疾病、骨质疏松症等),在过去 3 个月内使用过激素及慢作用药物。正常对照组 15 例,年龄在 18~79 岁,均为健康体检者。

1.2 分组 本研究按对照(配伍)设计进行。将入选的研究对象分成 3 组,早期组(G1):即病程 1 年者,17 例;非早期组(G2):即病程 5 年者,18 例;对照组(C):即正常对照组,15 例。所有患者均签署知情同意书并提供病史,评估临床活动指数,作影像学检查,并测定血清 MCP-1、MIP-1。

1.3 临床活动指数和血清学指标的测定 握力、关节疼痛指数、关节肿胀指数的测定参照文献^[4];血清学指标的测定:红细胞沉降率用魏氏法;C 反应蛋白、类风湿因子用 Array-360 特定蛋白分析仪(美国贝克曼公司)测定。

1.4 血清 MCP-1、MIP-1 的测定

1.4.1 样本采集和试剂来源 严格无菌条件下采集患者空腹静脉血,于当日离心(室温,3 000 r/min × 15 min),留取血清,置 -20℃ 冰箱保存待检。MCP-1、

MIP-1 试剂盒购于美国 R & D System 公司。

1.4.2 ELISA 法^[5]测定血清 MCP-1、MIP-1 在 MCP-1、MIP-1 第一抗体包被好的酶标板上,加入 50 μ l 蛋白缓冲液,然后各孔分别加入 50 μ l 鼠标准品或经 1:4 稀释的待测上清,每个样本设 3 个复孔,混匀后,室温反应 2 h;倒去培养板内液体,用洗涤液洗涤培养孔 3 遍,去除未结合的抗原成分;各孔加入 100 μ l 辣根过氧化物酶标记的第二抗体,室温反应 2 h;倒去培养板内液体,用洗涤液洗 3 遍,去除未结合的酶标抗体;加入底物过氧化氢和四甲基联苯胺,室温反应 30 min,然后加入 100 μ l 盐酸终止液,终止反应;混匀后,30 min 内在 450 nm 处读取光密度值(D_{450}),绘制标准曲线,根据 D_{450} 计算样品中 MCP-1、MIP-1 活性。

1.5 统计学处理 年龄以 $\bar{x} \pm s$ 表示,病程、临床活动指数、血清学指标、MCP-1、MIP-1 水平以中位数表示;应用 Kruskal-Wallis 法比较各组间 MCP-1、MIP-1 水平的差异;若各组间差异显著,则应用 Nemenyi-Wilcoxon-Wilcoxon 秩和检验进一步作两两比较。应用直线相关回归分析法对血清 MCP-1、MIP-1 水平与临床活动指数和血清学指标作相关性分析。

2 结果

2.1 一般资料及血清学检查结果 35 例入组病例中男 9 例,女 26 例。年龄 24~79 岁,平均(56.1 \pm 13.47)岁。病程 1 个月至 15 年。16 例未接受任何药物治疗,另有 19 例在过去 3 个月内均仅用非甾体抗炎药治疗。各组研究对象的一般指标和血清学指标等见表 1,各组研究对象在性别、年龄上具有可比性。

表 1 3 组研究对象的临床资料

Tab 1 Clinical data of 3 groups

Group	G1 (n=17)	G2 (n=18)	C (n=15)
Age (year)	57.5 \pm 12.59	54.8 \pm 14.49	52.2 \pm 14.70
Sex	M5, F12	M4, F14	M6, F9
Course (year)	0.17	7.5	-
Erythrocyte sedimentation rate (mm/1 h)	47.5	70	12
C reaction protein (mg \cdot L ⁻¹)	30	30.8	3.23
Rheumatoid factor (IU \cdot L ⁻¹)	1	80	-

2.2 血清 MCP-1、MIP-1 表达的测定 G1、G2 组的血清 MCP-1 水平均较对照组 C 组明显升高(126.72、110.8 vs 32.95, P 均 $<$ 0.01), G1 组与 G2 组间无明显差异。G1 组的血清 MIP-1 水平较 G2

组、C 组均明显升高(112.68 vs 16.33、18.62, P 均 $<$ 0.01),而 G2 组与 C 组间无明显差异。

2.3 血清 MCP-1、MIP-1 的表达与临床活动程度的相关性 35 例 RA 患者的血清 MCP-1、MIP-1

水平与握力、关节疼痛指数、关节肿胀指数、红细胞沉降率、C反应蛋白和类风湿因子均无显著相关。17例早期RA患者的血清MIP-1水平与其疾病临床活动指数以及血清学指标亦无明显相关。

3 讨论

RA是一种最常见的系统性自身免疫病,临床主要表现为外周关节持续性和进行性的滑膜炎,继而引起软骨破坏和骨侵蚀,造成关节畸形和强直^[4]。研究表明趋化因子在炎性细胞迁移、浸润过程中起了重要作用^[1]。趋化因子是一类具有化学趋化作用的细胞因子。在RA中,趋化因子主要由滑膜的巨噬细胞产生,可对中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等产生趋化作用,并与RA血管炎的发生有关。C-C趋化因子超基因家族在结构上具有2个相邻的保守的半胱氨酸残基,主要对单核细胞产生化学趋化作用,对T细胞、NK细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞等亦具有一定的趋化作用^[1,6,7]。与RA相关的C-C趋化因子主要有MCP-1、MIP-1、MIP-3、RANTES等。

3.1 MCP-1的表达与RA MCP-1是一种常见的趋化因子,主要由滑膜的成纤维细胞在IL-1、TNF-或IFN-的介导下合成。有动物实验表明,将MCP-1注射到兔的关节内,发现滑膜上出现显著的巨噬细胞浸润;从RA患者的滑膜液中可检测到高滴度的MCP-1^[6-8]。本研究采用ELISA法检测RA患者血清MCP-1的表达,并与正常健康者对照,结果表明RA患者的血清MCP-1水平显著高于正常健康者,与既往文献报道一致,进一步证实MCP-1在慢性滑膜炎的发生、发展过程中起着重要的作用。动物研究表明,MCP-1在关节炎的晚期阶段表达增强^[2]。本研究将发病时间<1年而且无X线侵蚀性破坏的RA患者列为早期RA,发现早期RA患者的血清MCP-1表达与非早期RA患者无明显差异;由此推测RA患者出现关节破坏的时间可能更早,临床应选用更为敏感的检查手段(如MRI)以判断骨破坏程度。

3.2 MIP-1的表达与RA 动物研究表明,MIP-1在早期关节炎的滑膜液中表达增强,MCP-1则在关节炎的晚期阶段表达增强^[2],提示不同类型的趋化因子在RA发生、发展机制中起着不同的作用。MIP-1为C-C趋化因子族中重要成员,由滑膜液中的单核细胞和滑膜成纤维细胞合成,对单核细胞、T细胞、B细胞、NK细胞、嗜酸粒细胞和嗜碱粒细胞有趋化作用。从RA患者的滑膜液中可检测到MIP-

1^[6,7]。本研究结果表明,早期RA患者的血清MIP-1表达显著高于非早期RA患者,提示MIP-1参与了早期滑膜炎的发生机制。目前国内外尚无此类临床研究报道。

3.3 血清MCP-1和MIP-1表达与滑膜炎程度相关性 RA的滑膜内有大量炎性细胞浸润,包括巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和树突状细胞等。已证实,RA的关节破坏程度与巨噬细胞对滑膜的浸润有关^[2]。研究表明,MCP-1、MIP-1、RANTES等趋化因子均参与RA的炎症反应,并主要对巨噬细胞产生趋化作用^[1,6]。由此推测,MCP-1、MIP-1的表达与关节破坏程度存在相关性。本研究结果显示,RA患者的血清MCP-1和MIP-1表达增强,但与临床活动性无相关性。对此可有几种解释:(1)本研究观察病例数尚不足;(2)血清趋化因子的表达与滑膜液并不一致,而滑膜液趋化因子的表达可能与滑膜炎程度相关;(3)临床活动性表现与滑膜炎程度不完全一致;(4)MCP-1、MIP-1虽参与慢性滑膜炎及骨关节侵蚀破坏的发生、发展机制,但并不影响炎症活动程度。故有必要开展更大样本的研究作进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Haringman JJ, Ludikhuijze J, Tak PP. Chemokines in joint disease: the key to inflammation[J]? *Ann Rheum Dis*, 2004, 63:1186-1194.
- [2] Katrib A, McNell HP, Youssef PP. What can we learn from the synovium in early rheumatoid arthritis[J]? *Inflamm Res*, 2002, 51:170-175.
- [3] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31: 315-324.
- [4] Korpela M, Laasonen L, Hannonen P, et al. Retardation of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis by initial aggressive treatment with disease-modifying antirheumatic drugs: five-year experience from the FIN-RACo study[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50: 2072-2081.
- [5] Katrib A, Tak PP, Bertouch JV, et al. Expression of chemokines and matrix metalloproteinases in early rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatol*, 2001, 40:988-994.
- [6] Szekanecz Z, Kim J, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis[J]. *Semin Immunol*, 2003, 15: 15-21.
- [7] Rudolph EH, Woods JM. Chemokine expression and regulation of angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11: 613-631.
- [8] Haringman JJ, Tak PP. Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis [J]? *Arthritis Res Ther*, 2004, 6:93-97.

[收稿日期] 2006-04-02 [修回日期] 2006-09-18
[本文编辑] 贾泽军

