

· 短篇论著 ·

类风湿性关节炎患者 CTL 和 NK 细胞颗粒酶素 B 和穿孔素的表达及临床意义

Expression of granzyme B and perforin in cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells of rheumatoid arthritis patients and its clinical significance

刘曼娇, 吴玲* (解放军第 85 医院 411 临床部检验科, 上海 200081)

[摘要] **目的:**检测类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者外周血 T 杀伤细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)和自然杀伤细胞(NK)中颗粒酶素 B 和穿孔素的表达,探讨其可能的临床意义。**方法:**取 25 例健康者、43 例 RA 患者(31 例活动期、12 例稳定期;初发 16 例、复发 27 例)外周血及其中 15 例患者(初发 8 例、复发 7 例)关节液标本。采用三色流式细胞术胞内检测外周血及关节液标本中 CTL、NK 细胞颗粒酶素 B 和穿孔素的表达。**结果:**RA 患者关节滑膜液中 CTL 和 NK 细胞颗粒酶素 B 及穿孔素的表达显著高于 RA 患者健康者外周血($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。活动期 RA 患者外周血 CTL 和 NK 细胞表达颗粒酶素 B、穿孔素明显高于稳定期 RA 患者($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。初发和复发患者关节液及外周血中二者表达无显著差异。**结论:**RA 患者外周血及关节液中 CTL 和 NK 细胞颗粒酶素 B 及穿孔素的表达显著高于正常人外周血,对其水平的检测利于判断疾病活动程度,但对判断疾病初发、复发的意义不大。

[关键词] 关节炎;类风湿;颗粒酶素 B;穿孔素;流式细胞术

[中图分类号] R 593.21 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0740-03

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的累及滑膜和关节的慢性自身免疫性疾病。其关节液中浸润较多的炎症细胞,如:T 淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞和 NK 细胞,这些细胞引起免疫炎症反应,导致关节和滑膜的破坏。细胞毒淋巴细胞是参与机体免疫病理损伤的重要细胞,主要包括杀伤性 T(cytotoxic T lymphocyte, CTL)细胞($CD3^+/CD8^+$)和 NK 细胞($CD3^-/CD16^+56^+$),均依赖穿孔素(perforin, Pf)和颗粒酶素 B(granzyme B, Gz-B)发挥细胞毒性作用。穿孔素可以在靶细胞的胞膜上形成许多贯穿细胞内外的圆柱形孔,利用胞内外渗透压的差异使细胞裂解。颗粒酶素 B 属于 serine 蛋白酶家族,在 CTL 及 NK 细胞的胞质颗粒中与穿孔素共分泌,经过穿孔素形成的小孔进入靶细胞内,导致细胞死亡。为了探讨 RA 患者 CTL、NK 细胞穿孔素和颗粒酶素 B 表达的变化及其临床意义,本研究采用三色流式细胞术对 RA 患者外周血及关节液中穿孔素和颗粒酶素 B 的表达进行检测。

1 材料和方法

1.1 临床资料 RA 患者 43 例,年龄 24~60(44.6±9.3)岁,病程 1~10 年。诊断依据参照 1987 年美国风湿病学会修订的 RA 诊断标准。共检测 43 例 RA 患者外周血和 15 例患者关节滑膜液。根据病史将患者分为初发和复发,其中初发病例外周血 16 例,复发病例 27 例;初发患者关节液 8 例,复发患者 7 例。根据患者的病情分为活动期和非活动期,其中活动期患者 31 例,非活动期 12 例。具体的活动性标准依据如下:(1)关节晨僵时间 ≥ 60 min;(2)关节疼痛 ≥ 5 个;(3)关节肿胀 ≥ 3 个;(4)红细胞沉降率(ESR) ≥ 30 mm/1 h;(5)C 反应蛋白(CRP) \geq 正常上限 1.5 倍。符合(2)、(3)并有(1)、(4)、(5)其中一项即判定为活动期。对照组为年龄和性

别相匹配的健康体检者,共 25 例。所有受试者均签署知情同意书。

1.2 试剂 抗人 CD3-PE-CY5、CD8-PE、Gz-B-FITC 抗体; IC Fixation Buffer, 10× Permeabilization Buffer 购自美国 eBioscience。抗人 CD16、CD56-PE、Pf-FITC、红细胞裂解液购自美国 BD Biosciences。同型对照抗体分别购自相应的公司。

1.3 标记步骤 采用肝素抗凝采集外周血和关节液。每个样品检测 4 管,分别是:CD3-PE-CY5、CD8-PE、Gz-B-FITC; CD3-PE-CY5、CD8-PE、Pf-FITC; CD3-PE-CY5、CD16CD56-PE、Gz-B-FITC; CD3-PE-CY5、CD16CD56-PE、Pf-FITC。取 100 μ l 样品加入两试管中,第 1 管加入 CD3-PE-CY5、CD8-PE 抗体各 5 μ l,第 2 管加入 CD3-PE-CY5、CD16CD56-PE 抗体各 5 μ l。室温、避光、静置 20 min。每管中各加入红细胞裂解液 1 ml,混匀,室温、避光、静置 10 min。1 200 r/min 离心 5 min,去除上清液;各加入 1 ml PBS,摇匀后 1 200 r/min 离心 5 min,去除上清液。每管加入固定液(IC Fixation Buffer)100 μ l,室温、避光、静置 20 min;每管各加入 1 ml 穿孔液(Permeabilization Buffer),混匀,1 200 r/min 离心 5 min,吸上清弃去;每管加入 200 μ l 穿孔液。将 1、2 号管混匀,各管均分为 2 管,分别加入 Gz-B-FITC、Pf-FITC 抗体各 5 μ l。涡旋混匀,室温、避光、静置 20 min。各加入 1 ml 穿孔液洗涤,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清。将细胞溶至 400 μ l 含 0.5% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液。同型对照抗体处理步骤和检测样本相同,仅将检测抗体换为同型对照抗体。

1.4 检测 采用美国 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪

[作者简介] 刘曼娇,主管技师。E-mail:lmj.411@163.com

* Corresponding author. E-mail:liuqi-6767@hotmail.com

进行检测,上样检测前用 BD 公司的标准校准微球进行仪器的校准,并用单标和双标的抗体进行颜色补偿调节。每个样品收集 8 000~15 000 个细胞。分别分析 CD3⁺ CD8⁺ 细胞及 CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ 细胞表达穿孔素及颗粒酶素 B 的阳性百分率和平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)。

1.5 统计学处理 采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析。

表 1 健康者、RA 患者外周血及关节液中 CTL、NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素的表达

组别	<i>n</i>	CTL-Gz-B		NK-Gz-B		CTL-Pf		NK-Pf	
		阳性率(%)		MFI		阳性率(%)		MFI	
RA-SF	15	40.11±13.39*	△34.66±14.05*△	46.76±10.56**	△71.56±15.52**△	45.96±11.62*	△54.15±15.58*△	65.60±14.12*	△177.56±32.10**△
RA-PB	43	29.38±12.48△	26.29±10.68△	34.84±10.72△	53.96±13.06△	34.83±13.02△	41.51±16.12△	52.76±15.58△	140.22±29.21△
Con-PB	25	21.00±9.28	19.46±9.12	28.25±8.93	45.44±10.48	26.73±12.43	31.58±14.43	43.07±13.84	119.37±34.36

RA: 类风湿性关节炎; SF: 关节液; PB: 外周血; Con: 对照。* *P*<0.05, ** *P*<0.01 与 RA-PB 组相比; △*P*<0.05 与 Con-PB 组相比

2.2 活动期、非活动期 RA 患者外周血 CTL、NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素的表达 CTL、NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素的

2 结果

2.1 外周血及关节液中 CTL、NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素的表达 CTL 细胞和 NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素表达在 RA 患者关节液中最高,其次是 RA 患者的血液,表达最低的是健康者外周血,各组之间均有明显的统计学差异 (*P*<0.01 或 *P*<0.05, 表 1)。

表达在活动期 RA 患者外周血显著高于非活动期患者 (*P*<0.01 或 *P*<0.05, 表 2)。

表 2 活动期、非活动期 RA 患者外周血 CTL、NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素的表达

组别	<i>n</i>	CTL-Gz-B		NK-Gz-B		CTL-Pf		NK-Pf	
		阳性率(%)		MFI		阳性率(%)		MFI	
活动期	31	32.79±11.94**	* 28.41±10.36*	37.01±10.75*	56.94±13.29*	37.83±12.27*	44.57±16.22*	56.07±15.21*	146.21±27.20*
非活动期	12	20.57±9.39	20.81±9.88	29.81±9.16	47.09±9.86	27.07±12.08	33.61±13.44	44.22±13.62	124.72±29.60

* *P*<0.05, ** *P*<0.01 与非活动期比较

2.3 初发、复发 RA 患者关节液、外周血 CTL、NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素的表达 初发 RA 患者外周血、关节液 CTL、

NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素的表达和复发患者没有显著差异 (表 3)。

表 3 初发、复发 RA 患者关节液、外周血 CTL、NK 细胞颗粒酶素 B、穿孔素的表达

组别	<i>n</i>	CTL-Gz-B		NK-Gz-B		CTL-Pf		NK-Pf	
		阳性率(%)		MFI		阳性率(%)		MFI	
I-SF	8	38.11±13.71	32.38±13.64	47.32±9.90	72.36±15.51	47.02±12.22	55.75±15.70	62.68±14.55	182.63±22.97
R-SF	7	42.39±13.70	37.28±15.12	46.13±12.04	70.64±16.72	44.74±11.73	52.32±16.49	68.95±13.92	171.77±41.42
I-PB	16	30.30±14.20	27.13±11.18	36.70±10.68	56.50±13.96	34.85±13.89	42.45±18.71	51.74±16.38	137.80±29.75
R-PB	27	28.83±11.59	25.79±10.56	33.73±10.80	52.46±12.52	34.82±12.76	40.95±14.74	53.37±15.38	141.65±29.36

I: 初发; R: 复发; SF: 关节液; PB: 外周血

3 讨论

穿孔素和颗粒酶素 B 主要表达于 CTL 和 NK 细胞,参与细胞免疫反应。穿孔素和颗粒酶素 B 在 CTL 的表达水平与细胞的杀伤能力呈正相关^[1]。局部浸润的淋巴细胞穿孔素和颗粒酶素 B 的表达水平更是与其细胞毒活性相关。研究^[2]发现 CTL 细胞表达的穿孔素和颗粒酶素 B 可以降解基底膜的 IV 型胶原,使得血液循环中的炎症细胞易于通过血管基底膜进入局部炎症部位。穿孔素和颗粒酶素 B 在自身免疫反应中的作用得到了越来越多的关注,有报道颗粒酶素 B 和穿孔素在活化的 CD8⁺ T 淋巴细胞上的表达与系统性红斑

狼疮的疾病活动有关^[3]。在扁平苔癣患者血液和局部病变部位 CD8⁺ 淋巴细胞高表达^[4]。在哮喘患者外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 和 CD56⁺ 细胞表达穿孔素的水平高于健康人^[5]。

对于穿孔素和颗粒酶素 B 在 RA 中的作用目前研究还较少。早期的研究采用酶联免疫技术检测血液和关节液中的颗粒酶素 A 和 B 水平,发现 RA 患者血液和关节液中游离的颗粒酶素 A 和 B 水平较高,推测颗粒酶素 A 和 B 可能在 RA 发病中起一定的作用^[6-7]。近来的研究^[8]采用流式细胞术检测发现穿孔素在 RA 患者的血液和关节液中 CD8⁺ 和 NK 细胞均存在较高的表达,推测穿孔素可能参与 RA 的发

病。颗粒酶素 B 的高表达与关节炎的加重相关^[9-10]。亦有研究^[11]发现,在穿孔素基因缺陷的小鼠中,胶原诱导的关节炎程度明显减轻。

本研究应用流式细胞技术系统地观察了颗粒酶素 B 和穿孔素在 RA 患者关节液、外周血的表达,结果发现穿孔素和颗粒酶素 B 在 RA 患者的外周血和关节液中均明显的高表达,与前人研究报道结果类似。这提示颗粒酶素 B 和穿孔素的高表达是参与 RA 发病的两个重要因素。为了更详细的观察穿孔素和颗粒酶素 B 在 RA 发病中的作用,本研究将患者分为活动期和非活动期,结果发现活动期 RA 患者外周血淋巴细胞表达穿孔素和颗粒酶素 B 要高于非活动期 RA 患者,这也说明穿孔素和颗粒酶素 B 参与疾病的进展。在初发和复发 RA 患者,外周血和关节液的淋巴细胞穿孔素和颗粒酶素 B 表达并没有显著的变化,提示淋巴细胞表达穿孔素和颗粒酶素 B 的变化和疾病是否复发可能没有直接的联系。

总之,RA 患者外周血及关节液中 CTL 细胞和 NK 细胞中穿孔素和颗粒酶素 B 呈高表达,提示其可能是参与 RA 发病和疾病进展的重要分子。

[参考文献]

[1] Rukavina D, Laskarin G, Rubesa G, et al. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells[J]. *Blood*, 1998, 92: 2410-2420.

[2] Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Tschopp J, et al. Demonstration of granzyme A and perforin messenger RNA in the synovium of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38: 477-484.

[3] Blanco P, Pitard V, Viillard J F, et al. Increase in activated CD8⁺ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52: 201-211.

[4] Prpic Massari L, Kastelan M, Gruber F, et al. Perforin expression in peripheral blood lymphocytes and skin-infiltrating cells in patients with lichen planus[J]. *Br J Dermatol*, 2004, 151: 433-439.

[5] Arnold V, Balkow S, Staats R, et al. Increase in perforin-positive peripheral blood lymphocytes in extrinsic and intrinsic asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161: 182-186.

[6] Tak P P, Spaeny-Dekking L, Kraan M C, et al. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA)[J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 116: 366-370.

[7] Spaeny-Dekking E H, Hanna W L, Wolbink A M, et al. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Immunol*, 1998, 160: 3610-3616.

[8] Gulan G, Ravlic-Gulan J, Strbo N, et al. Systemic and local expression of perforin in lymphocyte subsets in acute and chronic rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2003, 30: 660-670.

[9] Kraan M C, Haringman J J, Weedon H, et al. T cells, fibroblast-like synoviocytes, and granzyme B⁺ cytotoxic cells are associated with joint damage in patients with recent onset rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63: 483-488.

[10] Goldbach-Mansky R, Suson S, Wesley R, et al. Raised granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64: 715-721.

[11] Bauer K, Knipper A, Hoang T R, et al. Perforin deficiency attenuates collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7: R877- R884.

[收稿日期] 2007-05-10

[修回日期] 2007-06-06

[本文编辑] 贾泽军

• 研究简报 •

B 型利尿钠肽单克隆抗体的制备

Preparation of monoclonal antibody against B-type natriuretic peptide

游晓华¹, 秦永文¹, 黄盛东², 龚德军², 袁 扬²

(1. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433; 2. 长海医院胸心外科)

[关键词] 利尿钠肽; 单克隆抗体

[中图分类号] R 446.112

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2007)07-0742-02

B 型利尿钠肽(B-type natriuretic peptide, BNP)是一种由 32 个氨基酸构成的多肽类神经激素,主要来自于心室,作为一种心衰标志物在临床逐渐被接受。本研究拟以先前已制备的 TRX-BNP 融合蛋白作抗原,制备 BNP 单克隆抗体,为研制 BNP 单抗试剂盒作准备。

1 材料和方法

1.1 材料 抗原 TRX-BNP 系通过基因重组技术自行制

备^[1], Sp2/0 骨髓瘤细胞由本院胸外科实验室提供, BALB/c 小鼠购自长春生物制品研究所。完全及不完全弗氏佐剂、RPMI 1640 培养基购自 Sigma 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,聚乙二醇(PEG)购自 Merck 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购自 Calbiochem 公司, MABTEST 试剂盒购自

[作者简介] 游晓华, 博士, 讲师、主治医师。

E-mail: youxiaohua@medmail.com.cn

晶美公司。超声粉碎仪由 Sonics&materiqs 公司生产, ELISA 仪由 BioTech 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 杂交瘤细胞株的建立 按照常规操作^[2],选取 7~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠,以 TRX-BNP 作抗原,经背部注射免疫,反复免疫 4 次,末次免疫 4 d 后,拉颈处死免疫小鼠,无菌摘取脾脏,经研磨冲洗,收集脾细胞悬液,锥虫蓝染料排斥法计数活的脾细胞数目。取 1×10^8 脾细胞与 2×10^7 Sp2/0 骨髓瘤细胞混匀,注入 50% 聚乙二醇(PEG),进行细胞融合。终止融合后,接种于含饲养细胞的 96 孔板孵育,至出现小克隆,克隆长至孔底面积的 $1/3 \sim 1/2$ 时取培养上清液,行抗体检测。

1.2.2 抗 BNP 单抗的检测 采用 ELISA 法测定。取对数生长期细胞系,用 0.25% 胰蛋白酶消化分散,制成细胞悬液,接种于 96 孔板,按操作常规,依次每孔加杂交瘤细胞培养上清液,加辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG,加新鲜配置的底物溶液,25℃ 暗处反应,以 H_2SO_4 终止反应,判定结果,阴性对照孔无色,阳性对照孔呈橙黄色。

1.2.3 克隆化培养 将杂交瘤细胞悬浮接种于含饲养细胞的培养板中孵育,10~14 d 取培养上清进行抗体检测,对阳性单克隆再克隆化培养,直到 100% 的克隆分泌特异性抗体。

1.2.4 单克隆抗体的大量制备 选用 BALB/c 雌性小鼠,腹腔接种杂交瘤细胞 7~12 d,可见小鼠腹部明显膨胀,消毒腹部皮肤,收集腹水,离心,-70℃ 保存待用。

1.2.5 BNP 单克隆抗体特异性鉴定 用 MABTEST 试剂盒测定抗体类型。用上述抗 BNP 抗体分泌杂交瘤细胞株的培养上清对表达的重组蛋白进行 Western 印迹检测。对人心肌 BNP 蛋白进行免疫组化鉴定,明确其与人心肌 BNP 蛋白结合的特异性。

2 结果

2.1 抗体效价检测结果 检测 Sp2/0 骨髓瘤细胞培养上清、腹水效价,血清作阴性对照,以 D 值 \geq 阴性对照平均 D 值 $\pm 2s$ 者为阳性标准,出现阳性的最高稀释倍数为该腹水或血清的效价。杂交瘤细胞的培养上清抗体效价为 $1:10^4$ 左右。腹水抗体效价为 $1:(10^7 \sim 10^8)$ 。

2.2 单克隆抗体 Ig 类型检测结果 经 MABTEST 试剂盒测定,杂交瘤细胞培养上清及腹水中的抗体均为 IgG 类。

2.3 单克隆抗体的特异性鉴定结果 Western 印迹结果显示,目的蛋白在相对分子质量为 21 000 处出现特异性显色条带,而对照组未见相应的表达条带(图 1)。

免疫组化结果显示所获目的抗体能特异性结合人心肌细胞中天然 BNP 蛋白,呈棕褐色阳性反应,而对照组阴性。

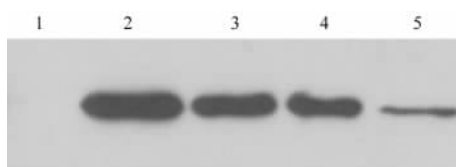


图 1 BNP 单抗 Western 印迹结果

1:细菌总蛋白;2~5:抗体稀释倍数分别为 100、200、400、800

3 讨论

1975 年 Kohler 和 Milstein 在细胞融合技术的基础上,首次成功地制备了能永久分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。目前,单克隆抗体已被广泛应用于各个医学领域^[3]。BNP 是 1988 年由日本学者 Sudoh 等^[4]最初由猪脑分离出来的,主要来自于心室,在心功能衰竭时大量分泌。检测血浆 BNP 浓度有助于对心功能程度的判断^[5]。另外,BNP 在心血管内外科其他疾病中的研究也越来越广泛^[6]。研制开发 BNP 试剂盒是近期的热点。由于目前已有的试剂盒主要依赖进口,检测标准及结果均不同。

为寻找一种快速、有效、经济的检测手段,本研究以先前已制备的 TRX-BNP 融合蛋白作抗原,利用单克隆抗体技术,制备了效价高、特异性好的 BNP 单克隆抗体,为研制 BNP 单抗试剂盒奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 游晓华,秦永文,黄盛东,等.重组 TRX-BNP 融合蛋白的构建和表达[J].第二军医大学学报,2006,27:679-681.
- [2] 孙树汉.核酸疫苗[M].上海:第二军医大学出版社,2000:50-150.
- [3] LaVallie E R, DiBlasio E A, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm[J]. Biotechnology,1993,11:187-193.
- [4] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain[J]. Nature,1988,332:78-81.
- [5] Hobbs R E. Using BNP to diagnose, manage, and treat heart failure[J]. Cleve Clin J Med,2003,70:333-336.
- [6] Ray S G. Natriuretic peptides in heart valve disease[J]. Heart, 2005,92:1194-1197.

[收稿日期] 2007-01-04

[修回日期] 2007-06-04

[本文编辑] 曹静