

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00098

类风湿关节炎患者外周血和关节液中 T 淋巴细胞亚型和 T 细胞共刺激分子 CD28 的表达和临床意义

Expression of CD28 and T lymphocyte subgroup in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis

李晓宇¹, 蔡青^{1*}, 张军², 沈茜²

1. 第二军医大学长海医院风湿免疫科, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨 T 细胞共刺激分子 CD28 在类风湿关节炎(RA)患者外周血和关节液中的表达和意义,同时比较 T 淋巴细胞亚群 CD4、CD8 在类风湿关节炎患者外周血和关节液中的表达和意义。**方法:**选取 RA 患者 45 例,平均年龄(47.57±16.43)岁,平均病程(5.84±7.19)年,男性 9 例,女性 36 例。取新鲜抗凝外周血细胞(PBMC)应用流式细胞仪进行检测。其中 15 例有膝关节液者同时抽取关节液单个核细胞(SFMC)行同样检测。与 RA 年龄和性别匹配的正常体检者 54 例作为对照。检测 CD4、CD8、CD28、CD19(B 淋巴细胞)的百分比以及 CD4⁺和 CD8⁺细胞分别表达 CD28⁺的百分比。**结果:**类风湿关节炎外周血 CD4⁺百分率较正常对照明显升高($P < 0.01$),但较关节液均明显降低($P < 0.05$);外周血 CD8⁺百分率与正常对照无显著差别,而关节液细胞中 CD8⁺百分率较外周血显著升高($P < 0.01$)。CD28⁺百分比在关节滑液细胞中较血细胞中有明显增高($P < 0.01$)。CD4⁺CD28⁺/CD4⁺百分比在类风湿关节炎患者血细胞、关节液细胞与正常对照组均无差别。CD8⁺CD28⁺/CD8⁺百分比在类风湿关节炎关节滑液中较血细胞中有明显增高,二者相差非常显著($P < 0.01$)。**结论:**类风湿关节炎患者外周血和关节液中 T 淋巴细胞亚型和 T 细胞共刺激分子 CD28 的表达异常,可能是参与 RA 发病和病情发展的重要机制之一。

[关键词] CD28; T 淋巴细胞亚群; 流式细胞术; 类风湿关节炎

[中图分类号] R 593.22 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0098-03

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜炎、软骨和骨进行性破坏为特征的自身免疫性疾病,其病变特点为周围关节呈非特异性的对称性炎症,病程迁延,致残率高。疾病的确切发病机制仍不完全清楚,但与细胞免疫功能紊乱、T 细胞异常活化和 T 细胞亚群的失衡等因素有关。RA 的发生与特定的 MHC II 类抗原的多态性相关^[1-2],以及 CD4⁺T 细胞在 RA 早期滑膜毛细血管聚集的事实^[3]提示我们,T 淋巴细胞在 RA 的发生和发展中占重要的地位。本研究采用流式细胞仪技术检测类风湿关节炎患者外周血与关节液 T 淋巴细胞亚群 CD4 和 CD8 的分布及其表达 CD28⁺的百分率,旨在探讨 T 淋巴细胞在 RA 的发生发展过程中的意义,同时报道 B 淋巴细胞(CD19)在 RA 外周血与关节液中的表达。

1 对象和方法

1.1 对象 选择自 2004 年 9 月至 2005 年 11 月在我院风湿

免疫科门诊和(或)住院的 RA 患者 45 例,全部诊断均符合 1987 年美国风湿病协会的分类标准^[4]。平均年龄(47.57±16.43)岁,平均病程(5.84±7.19)年,男性 9 例,女性 36 例。其中 15 例有膝关节液者同时留膝关节液检查。所有血液和关节液以肝素抗凝管抗凝后,摇匀,2 h 以内分离细胞并行流式细胞仪检查。54 例正常体检者作为对照,平均年龄(38.65±12.34)岁,男性 20 例,女性 36 例。两组对象的年龄和性别比较无统计学差异。

1.2 试剂 抗人 CD4 藻红蛋白-花青素(CD4PE-CY5),抗人 CD8 藻红蛋白-花青素(CD8PE-CY5),异硫氰酸荧光素(FITC)-抗 CD28 和 FITC-抗 CD19 抗体,均购自 BD Bioscience 公司。溶血素是美国 BD 公司产品,所有试剂 4℃ 避光保存。

1.3 方法 采集 RA 患者外周血和膝关节液,经肝素无菌抗凝,2 h 内进行流式细胞检测。

流式细胞术(flowcytometry, FCM)检测细胞表面分子:

[收稿日期] 2008-05-12 **[接受日期]** 2008-05-28

[基金项目] 上海市卫生局科研课题(2006071),国家“863”高技术研究发展计划(2002AA214091),上海市科委自然科学基金(03ZR14026)。Supported by Shanghai Municipal Health Bureau(2006071), National High Technology Research and Development Program of China(“863” Program)(2002AA214091), and Natural Science Foundation of Shanghai(03ZR14026)。

[作者简介] 李晓宇,硕士生,住院医师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81874698, E-mail:caiqing622@yahoo.com.cn

免疫分子在外周血 T 细胞亚群的表达水平采用美国 BD 公司 FACSCalibur 型流式细胞仪进行分析。首先,取 10 μ l 全血或关节液与适当体积的相应抗体及同型对照抗体在室温避光孵育 30 min,加入 2 ml 流式细胞仪专用红细胞裂解液 (BD Bioscience, San Diego, CA) 室温避光孵育 10 min,加入 5 ml PBS 以 $833\times g$ 离心 10 min,弃上清,同法洗涤 3 次后,立即进行双色流式细胞仪检测。每个标本收集 10 000 ~ 20 000 个细胞,采用 Cellquest 软件进行分析。以淋巴细胞设门,在 FL1 和 FL3 散点图上分析 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞分别表达 CD28 的百分比。

1.4 统计学处理 所有表面分子百分率均以 $\bar{x}\pm s$ 表达。采用 *t* 检验比较各组数据,用 SAS 9.1.3 统计软件进行分析。

表 1 在类风湿关节炎血液/关节液与正常血液中各类细胞百分率比较

样品	<i>n</i>	CD4	CD8	CD28	CD19
正常对照 PBMC	54	31.71 \pm 7.59	25.23 \pm 8.39	45.17 \pm 10.28	8.59 \pm 4.24
类风湿关节炎 PBMC	45	37.48 \pm 9.21**	23.19 \pm 7.58	47.86 \pm 12.89	10.60 \pm 6.14*
类风湿关节炎 SFMC	15	43.27 \pm 11.29 Δ	37.80 \pm 12.71 $\Delta\Delta$	68.07 \pm 12.09 $\Delta\Delta$	4.57 \pm 4.55 $\Delta\Delta$

PBMC:外周血单个核细胞;SFMC:关节滑液单个核细胞;* $P<0.05$,** $P<0.01$ 与正常对照 PBMC 比较; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 与类风湿关节炎 PBMC 比较

2.2 CD28 在不同 T 淋巴细胞亚群中表达的百分比比较 CD4⁺CD28⁺/CD4⁺ 百分比在类风湿关节炎 PBMC、SFMC 与正常对照组 PBMC 均无差别。

CD8⁺CD28⁺/CD8⁺ 百分比在类风湿关节炎患者 PBMC 中较正常对照组稍降低,但相差无统计学意义;SFMC 中较 PBMC 中有明显增高 ($P<0.01$),见表 2、图 1。

2 结果

2.1 类风湿关节炎外周血单个核细胞 (PBMC) 和关节滑液单个核细胞 (SFMC) CD4、CD8 表达及 CD4/CD8 比值 见表 1。CD4⁺ 细胞的百分比在类风湿关节炎患者 PBMC 中较正常对照组明显增高 ($P<0.01$),SFMC 较 PBMC 中又有较明显增高 ($P<0.05$)。而 CD8⁺ 细胞的百分比在类风湿关节炎患者 PBMC 较正常对照组有降低,但无统计学意义,SFMC 较 PBMC 有明显增高,二者相差显著 ($P<0.001$)。CD28⁺ 细胞百分比在类风湿关节炎患者 PBMC 较正常对照组无明显变化,SFMC 较 PBMC 有明显增高 ($P<0.01$)。CD19⁺ B 淋巴细胞的百分比在类风湿关节炎患者 PBMC 中较正常对照组增高 ($P<0.05$),SFMC 较 PBMC 有明显降低 ($P<0.01$)。

表 2 CD28⁺ 在 T 淋巴细胞亚群中表达的百分率

样品	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD28 ⁺ / CD4 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁺ / CD8 ⁺
正常对照 PBMC	52	93.05 \pm 6.94	50.09 \pm 13.02
类风湿关节炎 PBMC	45	91.04 \pm 9.49	46.95 \pm 18.39
类风湿关节炎 SFMC	15	92.20 \pm 5.95	61.75 \pm 15.47**

** $P<0.01$ 与类风湿关节炎 PBMC 比较

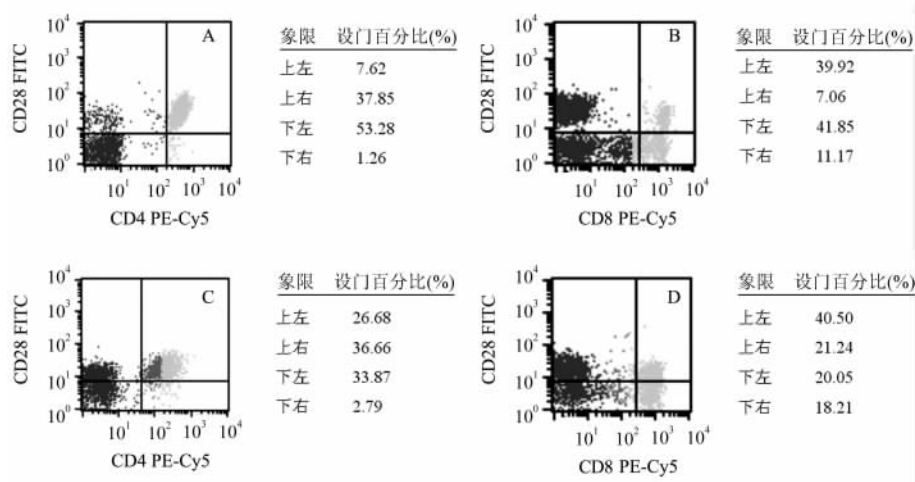


图 1 CD28 在 1 例 RA 患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞上的表达

A, B: 外周血检测结果; C, D: 关节液细胞检测结果

3 讨论

T细胞介导的自身免疫反应被认为在RA的发病机制中有重要作用。T细胞活化需要二个信号:第一信号是T细胞通过T细胞受体(TCR)识别抗原提呈细胞(APC)提呈的抗原肽-MHC复合物,为T细胞活化提供第一信号。T细胞的充分活化尚需另一来自细胞膜的第二信号或称协同刺激信号,第二信号是由共刺激分子介导,由T淋巴细胞表面CD28与抗原提呈细胞(APC)表面的B7-1/2家族共同作用是这些共刺激途径中最重要途径之一。它诱导T细胞活化和克隆扩增,产生白细胞介素-2(IL-2)和干扰素- γ (IFN- γ),并阻止T细胞凋亡。仅有TCR活化而没有CD28的共刺激途径活化并不能诱导T淋巴细胞的活化,反而诱导免疫无能或细胞死亡。除CD28分子外,共刺激分子还包括对T细胞活化起抑制作用的CD152(CTLA-4)分子,介导T、B淋巴细胞之间活化信号转导的CD154(CD40L)和参与维持免疫效应的ICOS等。其中CTLA-4Ig已经作为RA的生物制剂用于治疗^[5]。

类风湿关节炎患者T淋巴细胞亚群存在明显的异常。我们的研究结果显示,CD4⁺细胞在RA患者的外周血中较正常对照组中明显增高,关节液中较外周血细胞中还有明显增高;高度活化的CD4⁺细胞在参与激活T、B淋巴细胞通路,诱导体液免疫功能亢进中扮演重要角色。而CD8⁺细胞在RA患者较正常对照的外周血无统计学意义的下降,但关节液中较血细胞有非常显著的增高。说明CD8⁺细胞在关节局部炎症反应中发挥着更强的作用。相反B淋巴细胞在RA体内被激活后主要作用是产生自身抗体,关节腔内浸润的B淋巴细胞较少。

CD28是T细胞表面分子,约95%CD4⁺T细胞、50%CD8⁺T细胞表面可表达CD28。CD28的生物学活性主要表现在T细胞激活中发挥共刺激作用。RA患者CD28在淋巴细胞中的表达,关节液细胞中较血细胞中有明显增多。RA患者外周血CD4⁺细胞和CD8⁺细胞亚群上CD28分子与正常相比无明显差别,关节液中只有CD8⁺T细胞上CD28表达较血液中明显增高,这与最初国外报道一致^[6]。而对T细胞共刺激起抑制作用的CD152分子高表达^[7],提示CD4⁺细胞和CD8⁺细胞上CD28分子的活化信号途径被明显抑制,CD4⁺细胞上高表达的CD152分子在CD4⁺细胞亚群中可能

参与了这种平衡偏移效应^[8]。CD152分子的负性调节信号的增强可对下调其他活化效应分子CD154,ICOS等的表达有相关作用^[9]。这与我们观察到的ICOS分子在RA外周血和关节液细胞上呈低表达相一致^[10]。针对CD152的免疫融合蛋白(CTLA-4Ig)治疗RA有望纠正这种平衡偏移,恢复CD28对T细胞活化的正向调节作用。

[参考文献]

- [1] Harris E D Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy[J]. N Engl J Med, 1990, 322: 1277-1289.
- [2] Panayi G S, Lanchbury J S, Kingsley G H. The importance of the T cells in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1992, 35: 729-735.
- [3] Kurosaka M, Ziff M. Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium[J]. J Exp Med, 1983, 158: 1191-1210.
- [4] Arnett F C, Edworthy S M, Bloch D A, McShane D J, Fries J F, Cooper N S, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1988, 31: 315-324.
- [5] Hervey P S, Keam S J. Abatacept[J]. BioDrugs, 2006, 20: 53-61.
- [6] Emery P, Kosinski M, Li T, Martin M, Williams G R, Becker J C, et al. Treatment of rheumatoid arthritis patients with abatacept and methotrexate significantly improved health-related quality of life[J]. J Rheumatol, 2006, 33: 681-689.
- [7] Sfrikakis P P, Zografou A, Viglis V, Iniotaki-Theodoraki A, Piskontaki I, Tsokos G C, et al. CD28 expression on T cell subsets *in vivo* and CD28-mediated T cell response *in vitro* in patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38: 649-654.
- [8] 蔡蓓, 王兰兰, 冯伟华, 陈捷, 唐江涛, 武永康. 共刺激信号分子表达异常与自身免疫性疾病的关系[J]. 免疫学杂志, 2006, 22: 65-68.
- [9] Salazar-Fontana L I, Sanz E, Mérida I, Zea A, Sanchez-Atrio A, Villa L, et al. Cell surface CD28 levels define four CD4⁺ T cell subsets: abnormal expression in rheumatoid arthritis[J]. Clin Immunol, 2001, 99: 253-265.
- [10] 蔡青, 张军, 刘彧, 张兰玲, 韩星海, 沈茜. 可诱导共刺激因子在类风湿关节炎外周血和关节滑液细胞的表达[J]. 中华风湿病学杂志, 2006, 10: 650-653.

[本文编辑] 尹茶