

类风湿关节炎患者 B 细胞上 Fas 受体表达与疾病活动度相关性研究

王 鑫 魏 平

摘 要 **目的** 测定类风湿关节炎(RA)患者 B 淋巴细胞表面 Fas 及可溶性 Fas/FasL(sFas/sFasL)的表达,研究 B 淋巴细胞 Fas 受体在 RA 发病中的作用。**方法** 流式细胞术检测 CD20⁺ 标记的 B 淋巴细胞及 Fas 的表达,酶联免疫吸附试验检测 sFas/sFasL 的水平。**结果** RA 组血清及关节液 sFas/sFasL 水平均高于对照组($P < 0.01$),RA 组外周血 Fas 表达率高于对照组($P < 0.01$),CD20⁺ B 淋巴细胞表面受体 Fas 表达率低于对照组($P < 0.01$)。**结论** RA 中 sFas、sFasL 表达升高,可能通过抑制致病淋巴细胞凋亡,促进 RA 发病;RA 发病中 T/B 淋巴细胞比例紊乱,外周血淋巴细胞 Fas 升高而 B 淋巴细胞 Fas 表达降低,可能是由 sFas/sFasL 升高引起。

关键词 类风湿关节炎 凋亡 CD20 CD95 B 淋巴细胞

中图分类号 R593.22

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.036

Correlation Between Expression of Fas Receptor Molecules on B Lymphocyte and Disease Activity of Rheumatoid Arthritis. Wang Xin, Wei Ping. Shaoxing People's Hospital, Endocrine Rheumatology, Zhejiang 312000, China

Abstract **Objective** To investigate the role of B lymphocyte and Fas receptor mediated apoptosis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis(RA) through detecting the count of peripheral B lymphocytes, apoptosis factor of Fas expression and the level of soluble Fas/FasL(sFas/sFasL) in serum and synovial fluid apoptosis index. **Methods** The percentage of CD20⁺ in B lymphocytes and apoptosis factor of Fas in peripheral blood were detected with flow cytometry(FCM) their correlation with clinical index was and analyzed. Serum and synovial fluid levels of sFas/sFasL were determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and their correlation with clinical index was analyzed. **Results** The level of sFas/sFasL in the serum and synovial fluid in RA patients were higher than that in normal controls($P < 0.01$). The prevalence of Fas cell in peripheral blood of RA patients was significantly higher than normal controls($P < 0.01$). The prevalence of CD20⁺ in B lymphocytes and Fas receptors of B lymphocyte surface in peripheral blood of RA patients was significantly lower than normal controls($P < 0.01$). **Conclusion** Increasing expression of sFas and sFasL in RA may be promote RA disease by inhibiting pathogenic lymphatic cell apoptosis. B lymphocytes were reduced in RA lead to T/B lymphocytes dysfunction and breaking the mechanisms of immune system. Fas rose in peripheral blood lymphocyte and the B lymphocytes of Fas is reduced, which may be caused by the hoist of sFas/sFasL.

Key words Rheumatoid arthritis; Apoptosis; CD20; CD95; B lymphocytes

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节炎和血管翳为主要表现的自身免疫性疾病,B 淋巴细胞可产生大量自身抗体并可作为抗原递呈细胞使 T 淋巴细胞活化,进而生成大量细胞因子导致关节破坏等多种途径在 RA 病变过程中起重要作用^[1]。另外,细胞凋亡在 RA 的发病机制中亦发挥重要作用,在动物模型中,淋巴细胞凋亡异常,是引起免疫反应亢进,造成 RA 发病的主要原因之一^[2]。Fas/FasL

是介导凋亡过程的重要因子,除了在 RA 患者外周血、滑膜甚至软骨存在异常,还有报道显示 Fas 基因多态性可调节抗 CCP 抗体,影响 RA 发病。本实验拟通过流式细胞术检测外周血 CD20⁺ (B 淋巴细胞)和凋亡因子 CD95⁺ (FAS)的表达率,并利用 ELISA 法测定 30 例 RA 患者血清及关节液 sFas/sFasL 水平,探讨 Fas/FasL 对 B 淋巴细胞的影响^[3]。

对象与方法

1. 研究对象:2009 年 3 月~2010 年 12 月河北医科大学第三医院免疫风湿科住院 RA 患者 30 例,均符合 2009 年美国风湿病学院(ACR)和欧洲风湿病防治联合会(EULAR)制定新的 RA 分类标准,均未曾

作者单位:312000 绍兴市人民医院内分泌代谢免疫风湿科(王鑫);050000 石家庄,河北医科大学第三附属医院免疫风湿科(魏平)
通讯作者:魏平,电子信箱:w_pwp@126.com

应用或最近 6 个月内未曾应用过糖皮质激素、改变病情抗风湿药物或生物制剂,男性 6 例,女性 24 例,患者平均年龄 48.73 ± 14.86 岁,平均病程 32.87 ± 30.60 个月,其中伴有膝关节积液患者 20 例,男性 3 例,女性 17 例;选取 20 例年龄匹配的健康查体者为对照组,男性 5 例,女性 15 例,平均年龄 45.00 ± 11.08 岁。经询问既往史、体检及常规化验检查,除外风湿病及其他自身免疫性疾病、心内血管疾病、恶性肿瘤、肝、肾功能障碍、糖尿病或其他代谢异常疾病及传染、急性感染性疾病。本研究符合负责人体试验委员会所制定的伦理学标准并得到该委员会的批准,已取得受试对象的知情同意。

2. 主要仪器和试剂: FACScalibur 流式细胞仪 (Bekman Coulter Epics - XL IV),台式离心机 (北京医用离心机厂 LDZ5 - 2),全自动型定量酶标仪 (奥地利 AUSTRIA HT - 2),双光径免疫浊度分析仪 (Bekman Coulter - IMAGE 800)。人 sFas/sFasL 的 ELISA 试剂盒 (美国 RD 公司)。小鼠抗人 CD20 - PE 单克隆抗体、小鼠 IgG1 - PE 及 IgG2a - FITC 同种型对照 (Beckman Coulter 公司)。小鼠抗人 CD95 - FITC 单克隆抗体 (美国 eBioscience 公司)。红细胞裂解液 (Beckman Coulter 公司)。

3. 方法: (1) 酶联免疫吸附试验: 清晨空腹抽取肘静脉血 5ml,室温静置 1h,离心后取上清液置于 -20°C 冰箱冻存待测。血清 sFas、sFasL 水平测定均按照试剂盒说明书进行操作。 (2) 流式细胞术: 选取 30 例 RA 患者与 20 例对照组行流式细胞术检测。具体方法: ① 清晨采取肘静脉血 2ml,依地酸抗凝; ② 取 $50\mu\text{l}$ 全血 3 管,管 1 加入 CD20 - PE $10\mu\text{l}$ 和 CD95 - FITC $20\mu\text{l}$,管 2 加入小鼠 IgG1 - PE 及 IgG2a - FITC 各 $10\mu\text{l}$,混匀室温避光孵育 20min; ③ 各加入红细胞裂解液 $500\mu\text{l}$, 37°C 溶血 40min, $500\mu\text{l}$ 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 液洗 2 次, $1200\text{r}/\text{min}$ 离心 5min, $500\mu\text{l}$ 多聚甲醛 PBS 重悬,上机; ④ 流式细胞仪检测结果,以 Cellquest 软件获取细胞,管 2 作为同型对照,调整电压,设立淋巴细胞门,计数 10000 个细胞。 (3) ESR、CRP、RF、CCP、免疫 5 项的测定: ESR 采用魏氏法检测,CRP 的检测采用免疫比浊法,RF 及免疫 5 项采用速率散射法,CCP 抗体采用酶联免疫吸附试验检测。

5. 统计学方法: 应用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用成组设计的 t 检验。计数资料组间比较采用 χ^2 检验。两个变量相关性采用直线相关分析。以 $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

结 果

1. sFas/sFasL 水平: RA 患者血清组高于血清对照组,RA 关节液组 sFas/sFasL 水平高于 RA 血清组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,表 1),说明 RA 患者中 Fas 介导的凋亡存在异常。

表 1 RA 组血清、关节液与血清对照组 sFas/sFasL 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	sFas ($\mu\text{g}/\text{L}$)	sFasL ($\mu\text{g}/\text{L}$)
血清对照组	20	2.68 ± 0.81	0.36 ± 0.21
RA 血清组	30	$3.78 \pm 1.02^*$	$0.77 \pm 0.41^*$
RA 关节液组	20	$5.62 \pm 1.50^*$	$1.19 \pm 0.42^*$

与 RA 血清组比较, $^* P < 0.01$

2. RA 血清 sFas/sFasL 与疾病活动指标间的相关性,RA 血清组 sFas 与 ESR、CRP 水平呈显著正相关 ($r = 0.76, P = 0.000; r = 0.81, P = 0.000$),RA 血清组 sFasL 水平与 ESR、CRP 呈显著正相关 ($r = 0.84, P = 0.000; r = 0.54, P = 0.002$,表 2)。

表 2 RA 血清中 sFas/sFasL 水平与临床指标间的相关性

指标	sFas		sFasL	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
ESR	0.760	0.000	0.840	0.000
CRP	0.810	0.000	0.540	0.002
RF	0.224	0.233	-0.058	0.759
CCP	0.113	0.552	0.120	0.528
IgA	0.088	0.644	0.075	0.693
IgM	0.092	0.629	0.103	0.588
IgG	-0.068	0.722	-0.072	0.704
C3	0.129	0.498	0.073	0.700
C4	-0.292	0.117	-0.176	0.353
PLT	0.164	0.385	-0.201	0.288
DAS28	0.338	0.067	0.349	0.059

3. CD20⁺、CD95⁺ 及 CD20⁺CD95⁺ 细胞的表达: RA 组外周血 CD20⁺ 细胞表达率低于对照组;外周血 CD95⁺ 细胞表达率高于对照组,RA 组外周血 CD20⁺CD95⁺ 细胞表达率低于对照组 ($P < 0.01$,表 3,图 1)。说明 RA 患者中 Fas 介导的凋亡对 RA 患者 B 淋巴细胞调节产生影响。

表 3 外周血 CD20⁺、CD95⁺ 及 CD20⁺CD95⁺ 细胞的表达率 (%)

组别	CD20 ⁺	CD95 ⁺	CD20 ⁺ CD95 ⁺
对照组	12.28 ± 2.55	29.20 ± 8.21	2.43 ± 1.11
RA 组	$10.09 \pm 2.49^*$	$41.35 \pm 7.63^*$	$1.80 \pm 1.02^*$

与对照组比较, $^* P < 0.01$

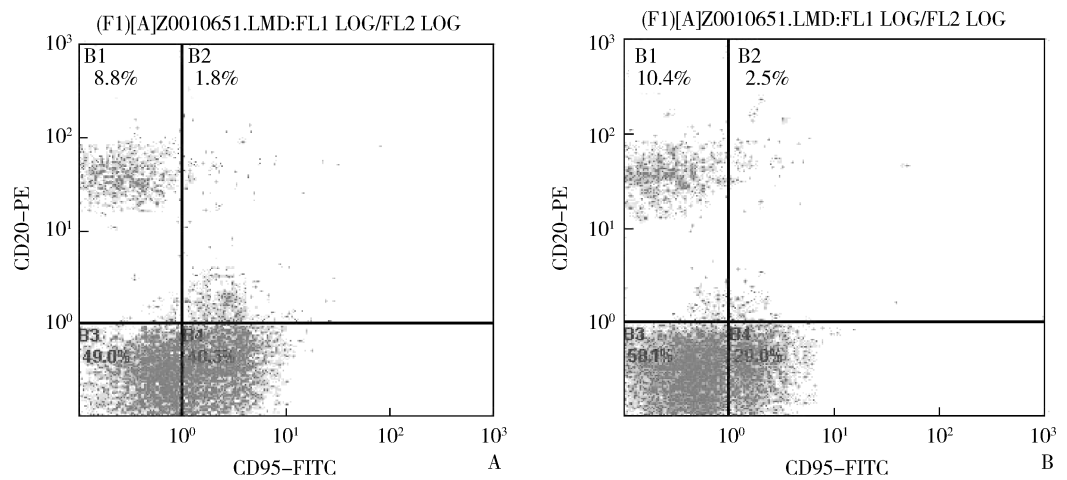


图 1 RA 患者外周血、健康对照外周血 CD20⁺ CD95⁺ 细胞 FCM 检测结果
A. RA 组; B. 对照组

4. RA 外周血 CD20⁺、CD95⁺ 及 CD20⁺ CD95⁺ 表达水平与 RA 临床指标间的相关性:CD20⁺、CD95⁺、CD20⁺ CD95⁺ 表达水平与 ESR、CRP、RF、CCP、IgG、IgA、IgM、C3、C4、PLT、DAS28 临床指标均为连续变量,以 FCM 检测 CD20⁺、CD95⁺、CD20⁺ CD95⁺ 表达水平为自变量,采用 *Pearson* 及 *Spearman* 做相关分析,各组研究对象与 CD20⁺、CD95⁺ 及 CD20⁺ CD95⁺ 无显著相关性(表 4)。

表 4 RA 血清中 CD20⁺、CD95⁺ 及 CD20⁺ CD95⁺ 细胞水平与临床指标间的相关性

指标	CD20		CD95		CD20CD95	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
ESR	-0.113	0.553	0.043	0.820	-0.105	0.581
CRP	0.075	0.693	-0.163	0.391	-0.080	0.675
RF	0.299	0.108	0.153	0.420	0.046	0.811
CCP	0.126	0.507	-0.004	0.982	0.069	0.717
IgG	0.045	0.815	0.234	0.213	0.275	0.141
IgA	0.011	0.954	-0.133	0.483	0.081	0.669
IgM	0.152	0.312	0.100	0.601	0.103	0.587
C3	0.164	0.386	0.354	0.055	0.251	0.180
C4	0.141	0.458	0.142	0.455	0.011	0.953
PLT	-0.201	0.287	-0.083	0.664	-0.203	0.227
DAS28	0.005	0.978	-0.228	0.225	-0.007	0.971

讨 论

Fas(CD95)是 I 型跨膜蛋白分子,属于肿瘤坏死因子(TNF)受体中死亡受体家族成员之一,在活化 T、B 淋巴细胞中 Fas 表达相对较多。FasL(CD178)属于神经生长因子(NGF)超家族成员,是 Fas 的配

体,多表达在活化 T 细胞和 NK 细胞上。目前很多研究已证实,FasL 能作用于含有 Fas 的活化淋巴细胞,激活淋巴细胞介导的 Fas/FasL 系统,清除部分活化淋巴细胞,防止活化淋巴细胞过度增殖,达到免疫下调的作用^[4]。而 Fas 介导凋亡功能减弱,则可引起自身免疫类疾病,有报道研究 RA 患者中 Fas/FasL 系统凋亡障碍产生大量自身抗体,使滑膜成纤维细胞过度增殖,诱发 RA 病情活动^[5]。

RA 病理特点是关节局部炎性细胞浸润,而肿瘤坏死因子(TNF)及白介素 1(IL-1)为主要的炎性因子,有报道显示,Fas 相关的死亡结构域蛋白可以通过多种途径调节关节局部 IL-1R/TLR4 信号转导,影响 RA 炎性活动。因此,Fas 系统介导的凋亡通路 与 RA 的发病有非常密切的关系^[6]。笔者通过 ELISA 检测血清 sFas/sFasL 水平发现,RA 患者血清 sFas、sFasL 均较正常对照组升高,与 Romano 等^[7] 结果相同。并且在相关性分析中显示血清 sFas、sFasL 均与 ESR、CRP 呈显著正相关,推测其可作为评价病情活动及严重程度指标。在 RA 关节液中 sFas/sFasL 水平较 RA 血清组升高,说明滑膜中细胞过度分泌 sFas/sFasL,导致致病淋巴细胞同样存在凋亡过程受抑,产生更多的炎性因子,引起关节的进行性破坏。Cao 等^[8] 检测了 RA 和正常人外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞的 Fas/FasL 的水平,发现在 RA 患者外周血中 Fas/FasL 的水平较正常对照组降低。Rapetti 等^[9] 研究表明 Fas/FasL 凋亡通路会引起调节性 T 淋巴细胞介导的 B 淋巴细胞异常,是治疗 RA 潜在靶点。Fas/FasL 通路可以引起 T/B 淋巴细胞之间平衡失调,使细胞因子分泌改变,细胞因子通过调节细胞

凋亡又加重自身免疫症状,抑制免疫细胞凋亡,导致 T、B 淋巴细胞等免疫细胞自我耐受破坏和自身抗体大量产生,引起机体损伤,说明 RA 患者中 T 淋巴细胞表面 Fas 存在异常。本研究通过 FCM 测定 RA 患者外周血 Fas 表达,较正常对照升高,结果与 Chou 等研究结果相反,说明 Fas/FasL 凋亡通路受 T/B 淋巴细胞共同影响,单独研究并不能反应 Fas 凋亡对免疫系统的影响。

B 淋巴细胞在 RA 发病中有重要作用,目前对 B 淋巴细胞检测多用特异性抗原 CD19,但在 RA 患者 CD19⁺ 细胞表达率却存在差异。Guo 等^[10] 研究提到,RA 患者外周血 CD19⁺ Fox⁺ 和 CD19⁺ TGFβ⁺ B 淋巴细胞表达率较正常人降低,但国内有发现 RA 患者外周血 CD19⁺ 细胞表达率较正常对照组明显升高^[11]。那么在 RA 患者中 B 淋巴细胞表达如何? Fas/FasL 对 RA 患者 B 淋巴细胞调节作用如何? CD20⁺ 同样作为 B 淋巴细胞特异性表面抗原,在 B 淋巴细胞中在除淋巴干细胞及浆细胞外均有表达,并且利妥昔单抗(rituximab)通过与细胞表面 CD20 分子高亲和力结合,造成被结合 B 淋巴细胞清除,应用于难治性 RA,这种靶向性去除 B 细胞治疗 RA 已受到特别关注,说明 CD20⁺ 细胞作为 B 淋巴细胞特异性抗原在 RA 中有重要作用。本研究通过 FCM 检测 RA 患者外周血 CD20⁺ 细胞表达率,结果表明 RA 患者外周血 CD20⁺ 细胞表达率较正常人降低,与 Guo 等^[10] 测定的 CD19⁺ 细胞减少结果相似。

B 淋巴细胞引起 RA 发病可能机制是由多种因素导致 B 淋巴细胞分化为浆细胞,而 RA 患者外周血 B 淋巴细胞表达存在异常,RA 患者外周血 CD20⁺ 细胞表达降低,可能是造成自身反应性 B 淋巴细胞经历阴性选择,反馈性导致浆细胞增多,RA 的增殖、凋亡、激活通路障碍使受累关节滑膜细胞运输、累计的活化和自体反应性增加,造成关节破坏。本实验通过 FCM 发现,RA 患者外周血 CD20⁺ CD95⁺ 细胞表达率较正常对照降低,说明 RA 患者中 B 淋巴细胞表面 Fas 介导的凋亡存在异常,这与 T 淋巴细胞表面 Fas 表达并不相同。依据实验结果笔者认为,RA 发病中 B 淋巴细胞凋亡亢进,不同于 T 淋巴细胞的凋亡受抑,造成这种原因可能是因为过度增殖的 FasL 作用在 B 淋巴细胞表面 Fas,从而激活 Fas/FasL 介导的凋亡系统,并且这种作用于 B 淋巴细胞的促凋亡作用大于 sFas/sFasL 的抑制凋亡作用,从而引起 B 淋巴细胞凋亡增加,这也许是造成 RA 患者外周血 CD20⁺

细胞表达率降低的原因之一。

综上所述,sFas/sFasL 水平异常可能与 RA 发病有关。血清 sFas/sFasL 表达升高,抑制致病淋巴细胞凋亡,促进 RA 发病;sFas、sFasL 与炎症指标 ESR、CRP 正相关,可作为评价 RA 临床活动指标;Fas/FasL 介导的凋亡在 RA 发病中 B 淋巴细胞降低,导致 T/B 淋巴细胞紊乱,打破机体免疫机制;RA 外周血淋巴细胞 Fas 升高而 B 淋巴细胞 Fas 表达降低,可能是因为 Fas/FasL 在 T、B 淋巴细胞中凋亡的作用程度不同有关。

参考文献

- 1 Modi S,Soejima M,Levesquei MC. The effect of targeted rheumatoid arthritis therapies on anti - citrullinated protein autoantibody levels and B cell responses[J]. Clin Exp Immunol,2013,173(1):8 - 17
- 2 Hanyecz A,Olasz K,Tarjany O,*et al.* Proteoglycan aggrecan conducting T cell activation and apoptosis in a murine model of rheumatoid arthritis[J]. Biomed Res Int,2014,2014:942148
- 3 Kobak S,Berdeli Al. Fas/FasL promoter gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis[J]. Reumatismo,2012,64(6):374 - 379
- 4 Fas SC,Fritzscheing B,Suri - Payer E,*et al.* Death receptor signaling and its function in the immune system[J]. Curr Dir Autoimmun, 2006,9:1 - 17
- 5 Calmon - Hamaty F,Audo R,Combe B,*et al.* Targeting the Fas/FasL system in rheumatoid arthritis therapy: promising or risky? [J]. Cytokine,2015,75(2):228 - 233
- 6 Vilmont V,Tourneur L,Chiocchia G. Fas - associated death domain protein and adenosine partnership: fad in RA. [J]. Rheumatology, 2012,51(6):964 - 975
- 7 Romano E,Terenzi R,Manetti M,*et al.* Disease activity improvement in rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor - alpha inhibitors correlates with increased soluble Fas levels[J]. J Rheumatol, 2014,41(10):1961 - 1965
- 8 Cao Y,Liu J. Impaired apoptosis of peripheral blood CD4⁺ T cells in patients with rheumatoid arthritis [J]. Xibao Yufen Zimian Yixue Zazhi,2015,31(5):5682 - 5688
- 9 Rapetti L,Chavele KM,Evans CM,*et al.* B cell resistance to Fas - mediated apoptosis contributes to their ineffective control by regulatory T cells in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis,2015,74(1):294 - 302
- 10 Guo Y,Zhang X,Qin M,*et al.* Changes in peripheral CD19(+) Foxp3(+) and CD19(+) TGFbeta(+) regulatory B cell populations in rheumatoid arthritis patients with interstitial lung disease[J]. J Thorac Dis,2015,7(3):471 - 477
- 11 王京旭,魏平,王俊祥,等. 类风湿关节炎患者外周血 CD23⁺ CD19⁺ 细胞表达状况的研究[J]. 临床荟萃,2009,23:8 - 9

(收稿日期:2015 - 11 - 05)

(修回日期:2015 - 12 - 01)