

类风湿性关节炎患者外周血 NKG2D、NKG2A 及颗粒酶 B 表达的研究

张莉莉 沈 波 陈葆国 朱 敏 杜菊萍 陈帅帅 施剑峰

摘 要 **目的** 本研究旨在探讨类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者外周血中 NK 细胞表达 NKG2D、NKG2A 及胞内颗粒酶 B 的水平,并且分析它们与疾病活动度(DAS28)的相关性。**方法** 流式细胞术检测 41 例 RA 患者和 35 例健康对照者外周血中 NK 细胞、NKG2D⁺NK 细胞、NKG2A⁺NK 细胞以及颗粒酶 B⁺NK 的表达水平;采用 Spearman 秩相关分析法分析它们与 DAS28 的相关性。**结果** RA 患者外周血中, NK 细胞表达水平显著低于健康对照组($P=0.016$); NKG2D 的表达水平显著低于健康对照组($P=0.002$), 且 NKG2D 的表达水平与 DAS28 评分呈负相关($P<0.05$); NKG2A 的表达水平与健康对照组之间比较差异无统计学意义($P=0.547$), 且与 DAS28 评分不存在显著相关性($P>0.05$); 颗粒酶 B 的表达水平有所降低($P=0.034$), 但与 DAS28 评分不存在显著相关性($P>0.05$)。**结论** 活化性受体 NKG2D 以及胞内颗粒酶 B 表达的异常降低可能导致 NK 细胞杀伤活性的损伤, 不能有效杀伤免疫效应细胞, 从而促进了 RA 的发生、发展。

关键词 类风湿性关节炎 NKG2D NKG2A 颗粒酶 B NK 细胞

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.029

Investigation on the Peripheral Blood Expressing NKG2D, NKG2A, Granzyme B of Patients with Rheumatoid Arthritis. Zhang Lili, Shen Bo, Chen Baoguo, et al. School of Medical Lab Science, School of Life Sciences, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To investigate the expression of NKG2D, NKG2A, intracellular granzyme B in NK cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) and their associations with the disease activity. **Methods** We studied 41 RA patients as well as 35 healthy controls. NK, NKG2D, NKG2A, granzyme B expression were analyzed by flow cytometry in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Results** We found that NK cells from RA patients as well as NKG2D and granzyme B showed a diminished expression compared with healthy controls ($P<0.05$); but NKG2A had no significant difference between RA and healthy controls ($P=0.547$). Spearman analysis showed that the levels of NKG2D was negatively associated with DAS 28 score ($P<0.05$), but no significant correlation were detected between the levels of NKG2A and DAS 28 score as well as granzyme B ($P>0.05$). **Conclusion** The lower expression of activating receptor NKG2D and intracellular granzyme B may lead to the killing activity damage of NK cells, can not effectively killing immune effector cells, thus contributing to the development of RA.

Key words Rheumatoid arthritis; NKG2D; NKG2A; Granzyme B; NK cell

RA 是一种以关节滑膜炎以及骨侵蚀等为特征的自身免疫性疾病, 其发病机制尚未完全阐明^[1-3]。研究显示, RA 的发生、发展与免疫细胞亚群的分布失衡、免疫细胞的异常活化及细胞免疫功能紊乱密切相关。自然杀伤(NK)细胞, 为继 T、B 细胞的第 3 类淋巴细胞, 在机体免疫系统中发挥重要作用, 凭借其表面抑制性受体 NKG2A 和活化性受体

NKG2D 的相互协调作用, 维持自身免疫耐受的平衡, 其表达平衡的破坏将引起自身免疫性疾病的发生发展, 抑制“亢进”的免疫反应^[4-6]。然而 RA 患者外周血 NK 细胞上 NKG2A、NKG2D 和颗粒酶 B 表达水平的变化及其在 RA 发病中的作用机制仍不清楚, 本研究通过检测 RA 患者外周血 NK 细胞、NK 细胞上 NKG2A、NKG2D 受体及胞内颗粒酶 B 的表达水平, 分析其各自的表达变化, 以及它们与 RA 疾病活动度的相关性, 旨在探讨 RA 患者 NK 细胞功能紊乱的机制, 有助于进一步阐明 RA 的发病机制, 为寻找 RA 新的治疗靶点提供理论依据。

材料与方法

1. 标本来源: 41 例 RA 患者均系浙江省台州医

基金项目: 浙江省台州科技计划项目(1401ky05); 恩泽集团基金资助项目(15EZC2)

作者单位: 325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院(张莉莉、施剑峰); 317000 临海, 温州医科大学附属台州医院(沈波、陈葆国、朱敏、杜菊萍、陈帅帅)

通讯作者: 沈波, 电子信箱: shenbkz@aliyun.com

院 2015 年 7 ~ 10 月前来就诊的患者, 诊断均符合 ACR 2010 年修订的 RA 分类诊断标准, 且无肝炎、结核及其他免疫相关性疾病, 其中男性 13 例, 女性 28 例, 患者年龄 28 ~ 73 岁, 平均年龄 50 ± 8 岁。健康对照组: 35 例健康对照者均为台州医院的健康体检者, 其中男性 17 例, 女性 18 例, 年龄 26 ~ 79 岁, 平均年龄 53 ± 11 岁。RA 患者组与健康对照组年龄及性别均无差异。该课题经浙江省台州医院伦理委员会批准, 并取得受试对象的同意。

2. DAS28 评分: DAS28 评分参照 Prevoo 等的计算方法, 通过检查 28 个关节的肿胀和触痛关节数, 包括双肩、双肘、双腕、双手掌指关节、双手近端指间关节和双膝关节, 按照以下公式计算: $\text{DAS28} = 0.56 \times \text{压痛关节数} + 0.28 \times \text{肿胀关节数} + 0.7 \times \ln(\text{红细胞沉降率, ESR}) \times 1.08 + 0.16$ 。得分越高提示病情活动度越高。根据 DAS28 评分将 RA 患者分为高活动度组 ($\text{DAS28} > 5.1$)、中活动度组 ($3.2 < \text{DAS28} < 5.1$) 及低活动度组 ($\text{DAS28} < 3.2$)。

3. 标本采集: 确定研究对象后, 采集 EDTA 抗凝的新鲜外周血 2ml, 流式细胞术检测 NK 细胞上 NKG2D、NKG2A 及胞内颗粒酶 B 的表达。

4. 主要试剂和仪器: NKG2A - APC - Cy7、NKG2D - PE - Cy7、GrB - PE、CD56 - FITC 抗体及其同型对照抗体以及 FACS Calibur 流式细胞仪均为美国 BD 公司生产。

5. 流式细胞术检测: 每份标本分别检测外周血中 NK 细胞上 NKG2A、NKG2D 及胞内颗粒酶 B 的表达水平。每管加入 $10 \mu\text{l}$ CD56 - FITC 抗体和 $5 \mu\text{l}$ NKG2A - APC - Cy7、NKG2D - PE - Cy7 抗体, 对照管

加入 $10 \mu\text{l}$ CD56 - FITC 抗体和 $5 \mu\text{l}$ 同型对照抗体, 均加入 EDTA 抗凝血 $50 \mu\text{l}$, 充分混匀后室温避光孵育 15min, 加溶血素 1ml, 混匀后室温避光 10min, 1000r/min 离心 6min 后弃上清, PBS 洗涤 2 次, 加入 0.5ml 多聚甲醛重悬细胞, 上机检测。颗粒酶 B 的检测需先充分破膜再进行相应抗体的标记。

6. 统计学方法: 正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验; 非正态分布的计量资料用中位数 (M) 和四分位数间距 (Q25, Q75) 表示, 组间比较采用非参数 Mann - Whitney U 检验; 指标间的相关性采用 Spearman 秩相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. RA 患者组与健康对照组外周血中 NK 细胞、NKG2D、NKG2A 以及颗粒酶 B 的比率分析: RA 患者外周血中 NK 细胞占淋巴细胞的比率 $17.99 \pm 8.03\%$ 低于健康对照组 $21.93 \pm 6.39\%$, 差异有统计学意义 ($P = 0.016$)。RA 患者组外周血中 CD56^+ NK 细胞表面活化性受体 NKG2D 的表达比率 [88.98% (81.69%, 91.00%)] 明显低于健康对照组 [99.19% (98.46%, 99.48%)] , 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。而 CD56^+ NK 细胞表面抑制性受体 NKG2A 表达率在 RA 组和健康对照组中分别为 [9.01% (5.56%, 17.05%)] 和 [9.51% (7.14%, 12.76%)] , 差异无统计学意义 ($P = 0.985$)。RA 组外周血 CD56^+ NK 细胞胞内颗粒酶 B 的表达率 [83.25% (79.49%, 89.73%)] 明显低于对照组 [88.89% (82.75%, 93.04%)] , 差异有统计学意义 ($P = 0.024$, 表 1、图 1)。

表 1 RA 患者与健康对照组 NK、NKG2D、NKG2A 与 GrB 表达率的差异比较 [M (Q25, Q75), %]

组别	n	NK	NKG2D	NKG2A	GrB
对照组	27	21.93 ± 6.39	99.19 (98.46, 99.48)	9.51 (7.14, 12.76)	88.89 (82.75, 93.04)
患者组	41	$17.99 \pm 8.03^*$	88.98 (81.69, 91.00) **	9.01 (5.56, 17.05)	83.25 (79.49, 89.73) *

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P = 0.000$

2. RA 患者各疾病活动度组 CD56^+ NK 细胞表达 NKG2A、NKG2D 和颗粒酶 B 的比较: 笔者分析了 RA 患者各组间外周血 NK 细胞上 NKG2A、NKG2D 及胞内颗粒酶 B 表达水平的差异。RA 患者外周血中 NKG2A 与颗粒酶 B 的表达水平在各组间均无显著相关性 (P 均 > 0.05)。然而, RA 患者外周血中 NK 细胞上 NKG2D 表达水平在高、中疾病活动度组与低活

动度组之间比较差异有统计学意义, NKG2D 阳性表达的 NK 细胞 (%) 随着疾病活动度的增加而降低 ($P < 0.05$), 其中高疾病活动度组 NKG2D 的表达百分比 [81.35% (77.53%, 81.87%)] 明显低于中活动组 [90.02% (88.10%, 90.96%)] 和低活动组 [97.06% (90.15%, 98.40%)] , 见表 2。

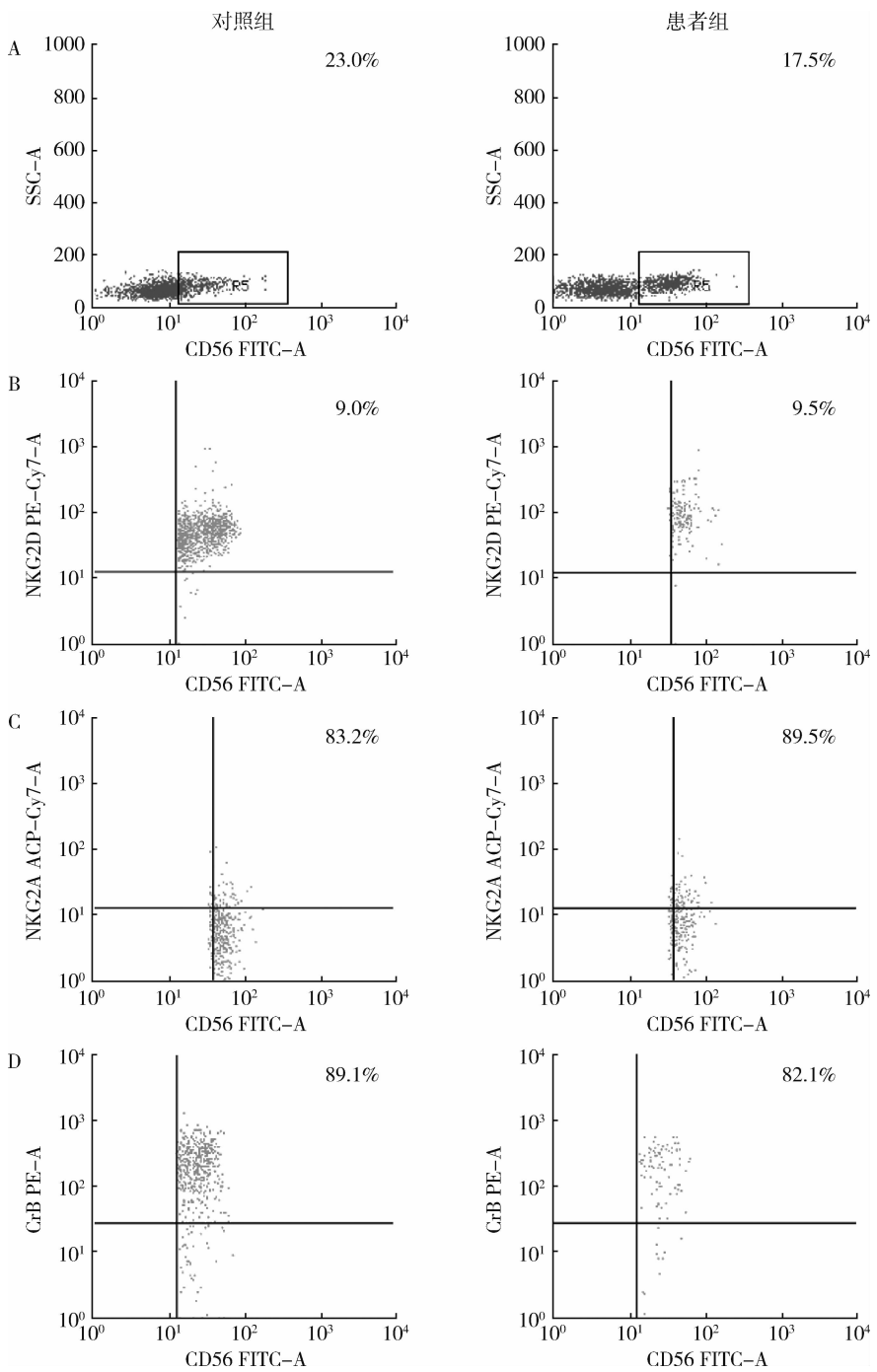


图 1 RA 患者外周血中 NK 细胞上 NKG2A、NKG2D、胞内颗粒酶 B 的表达水平

A. RA 患者与健康对照者 NK 细胞的流式细胞术分析结果;B. RA 患者和健康对照者 NKG2A⁺ NK 细胞流式细胞术分析结果;
C. RA 患者与健康对照者 NKG2D⁺ NK 细胞流式细胞术分析结果;D. RA 患者与健康对照者颗粒酶 B⁺ NK 的流式细胞术分析结果

表 2 RA 不同疾病活动度间 NKG2A、NKG2D 与 GrB 的表达比较 [M (Q25 , Q75) , %]

组别	n	NKG2A	NKG2D	GrB
DAS28 < 3. 2	9	6. 47 (4. 97 , 11. 70)	97. 06 (90. 15 , 98. 40)	80. 44 (78. 55 , 84. 77)
3. 2 < DAS28 < 5. 1	20	11. 17 (7. 60 , 18. 42)	90. 02 (88. 10 , 90. 96) *	85. 48 (78. 13 , 88. 04)
DAS28 > 5. 1	12	7. 37 (3. 49 , 16. 75)	81. 35 (77. 53 , 81. 87) **	87. 50 (79. 52 , 91. 80)

与 DAS28 < 3. 2 组比较 , * P < 0. 05 , ** P < 0. 01

3. RA 患者 CD56⁺ NK 细胞 NKG2A、NKG2D 和颗粒酶 B 的表达与 DAS28 的相关性分析: Spearman 等级相关分析发现, NKG2D 表达阳性的 CD56⁺ NK 细胞百分比与 DAS28 评分呈负相关 ($r = -0.793, P = 0.000$, 图 2); 但 NKG2A 表达阳性的 CD56⁺ NK 细胞

百分比与 DAS28 评分不存在显著相关性 ($r = 0.035, P = 0.829$, 图 2); 颗粒酶 B 表达阳性的 CD56⁺ NK 细胞百分比与 DAS28 评分亦不存在显著相关性 ($r = 0.217, P = 0.17$, 图 2)。

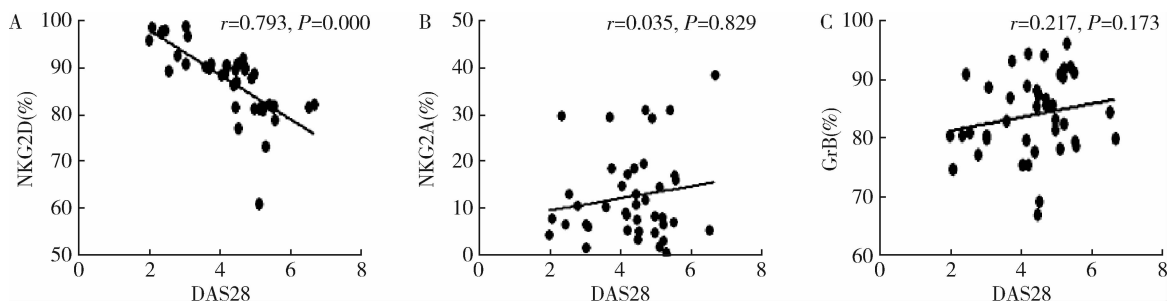


图 2 RA 患者 NKG2D⁺ NK 细胞、NKG2A⁺ NK 细胞、GrB⁺ NK 细胞比率与 DAS28 评分的相关性分析

讨 论

NK 细胞为继 T 细胞、B 细胞的第 3 类淋巴细胞, 在天然免疫和获得性免疫中均发挥重要作用^[5,7,8]。NK 细胞表面受体对于 NK 细胞发挥自身功能活性起到重要作用, 其中 NKG2 家族是近年来研究关注较多及研究较深入的一类受体, 包括 NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2D、NKG2E、NKG2F 和 NKG2H 等^[9]。根据功能可分为抑制性受体和活化性受体 2 大类。其中 NKG2A 是 NKG2 家族中唯一的抑制性受体, 可以识别自身 MHC - I 分子, 进而阻止 NK 细胞的活性^[10]。人 NKG2D 是 NK 细胞表面的活化性受体, 能与 MHC - I 链相关分子 A 和 B 结合, NKG2D 受体通常不表达于正常细胞上, 但是可以在肿瘤细胞或被感染的细胞中过表达。NKG2D 通过 PI₃K 通路, 利用相关 DAP10 多肽活化 NK 细胞的活性^[11]。在正常情况下, NKG2A、NKG2D 的表达水平处于平衡状态, 共同调节 NK 细胞的活性。此效应解释了自身免疫耐受和宿主细胞免受 NK 细胞杀伤的机制。NKG2A 和 NKG2D 通过此协调作用调节 NK 细胞的杀伤毒性和细胞因子的分泌活动。

有关 NK 细胞在肿瘤性疾病中所发挥的作用, 近年来已有较多研究, 比如乳腺癌、肺癌等。然而, NK 细胞在自身免疫性疾病的发生和进展中所发挥的作用尚未完全阐明, 已知 NK 细胞可自发的杀伤自身免疫性疾病的自体反应性 T 细胞、B 细胞, 抑制“亢进”的免疫反应。因此分析 RA 患者中 NK 细胞发挥的具体机制相当重要。RA 患者外周血中 NK 细胞上 NKG2A、NKG2D 及胞内颗粒酶 B 表达水平的变化及

其在 RA 患者发生、发展中的具体作用机制仍不清楚。因此本研究致力于分析它们在 RA 患者中的表达水平及它们与疾病活动度 DAS28 评分等临床资料的相关性研究, 有助于进一步阐明 RA 的发病机制, 以此改善 RA 患者的生活质量。

Ashish 等^[12]研究发现 RA 患者中 NK 细胞数目与疾病活动度呈负相关, 而对于 CIA 小鼠模型的研究发现 NK 细胞对机体具有损伤作用^[13]。笔者的研究表明 RA 患者外周血 NK 细胞表达水平显著低于健康对照组, 这提示 NK 细胞数目的降低可能促进 RA 的发生、发展。NK 细胞的功能状态主要由其表面活化性受体 (NKG2D) 及抑制性受体 (NKG2A) 的平衡状态决定, 关于 RA 患者外周血中 NK 细胞表面受体的表达水平, 研究不一致。Vastert 等^[14]发现 RA 患者外周血中 NKG2A 表达水平低于健康人; 另有研究表明 RA 患者 NKG2A⁺ NK 细胞的表达水平升高, 而 NKG2D 的表达降低^[5]。本研究显示, 表面抑制性受体 NKG2A 的表达与健康对照组差异无统计学意义 ($P = 0.547$), 但其表面活化性受体 NKG2D 的表达是显著降低的 ($P = 0.002$), 与前面的报道不一致, 原因可能是遗传因素和环境因素的不同而导致结论的不同。

NK 细胞通过消除活化的免疫效应细胞执行其免疫调节过程, 关于此机制, Jacobs 等^[15]已有研究证实活化的 NK 细胞可以通过分泌穿孔素, 颗粒酶 B 等参与细胞凋亡通路进一步消除机体活化的效应细胞, 例如 CD4⁺ T 细胞等。1999 年有研究发现, 在 RA 患者血清及关节滑膜液中颗粒酶 B 的表达水平均升

高^[16]。2008 年有研究显示,颗粒酶 B 可能参与 RA 患者关节的破坏^[17]。笔者课题组前期研究发现,RA 患者血清中颗粒酶 B 的表达水平同健康对照组差异无统计学意义^[18]。笔者的研究进一步分析了外周血中 NK 细胞胞内颗粒酶 B 的表达水平以及其与疾病活动度之间的相关性,以进一步阐明 RA 的发病机制。本研究发现,RA 患者外周血 NK 细胞内颗粒酶 B 表达水平是降低的 ($P = 0.034$)。这与 Vastert 等^[14]关于幼年特发性关节炎患者的研究结果一致。然而相反的是,Ashish 等的研究结果显示,RA 患者外周血中 NK 细胞表达的颗粒酶 B 水平是升高的,并且颗粒酶 B 水平的升高同 RA 患者 DAS28 评分呈正相关。因此,颗粒酶 B 对 RA 的发生、发展有何重要作用,以及通过何种机制发挥作用,需要进一步研究。

为了进一步明确 NKG2A、NKG2D、颗粒酶 B 在 RA 患者疾病进展中的作用,本研究对 RA 患者外周血 NK 细胞上三者的表达水平与 RA 患者 DAS28 评分进行了相关性分析。结果表明,RA 患者 NKG2D⁺ NK 细胞比率与 DAS28 评分呈显著负相关,进一步按 DAS28 分组进行比较发现,高、中疾病活动度组 NKG2D⁺ NK 细胞比率均明显低于低疾病活动度组,提示 NKG2D⁺ NK 细胞的降低可加重患者的病情。但未发现 NKG2A、颗粒酶 B 的比率与 DAS28 评分存在相关性,可能与样本量、目标人群等因素有关。

综上所述,RA 患者外周血 NK 细胞上 NKG2D 分子表达异常降低,且疾病活动度越高的患者,NKG2D 的表达降低越明显,导致 NK 细胞活化功能受到抑制,不能有效发挥对免疫效应细胞的杀伤作用,极大地促进 RA 的发生、发展,并且 NKG2D 的表达水平可以作监测疾病进展的有效指标。

参考文献

- 1 Anusha NS, Claudia M. Role of inflammatory cells and Toll-like receptors in atherosclerosis [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2015, 13(2): 146-160
- 2 Schönfeld C, Pap T, Neumann E, *et al*. Fibroblasts as pathogenic cells in rheumatic inflammation [J]. *J Rheumatol*, 2015, 74(1): 33-38
- 3 Ceara E, Walsh, EElizabeth J. Differential expression of NK receptors CD94 and NKG2A by T cells in rheumatoid arthritis patients in remission compared to active disease [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27182

- 4 Anshu M, Anil S. NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(10): 1143-1166
- 5 Li WX, Panl HF, Hu JL, *et al*. Assay of T- and NK-cell subsets and the expression of NKG2A and NKG2D in patients with new-onset systemic lupus erythematosus [J]. *Clini Rheumatol*, 2010, 29(3): 315-323
- 6 Geiger TL, Sun JC. Development and maturation of natural killer cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2016, 39: 82-89
- 7 Vincent V, Jonesa A, Constantin AD. Immune alterations and immunotherapy prospects in head and neck cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13(9): 1241-1256
- 8 Jayajit D, Salim IK. NK cells: tuned by peptide? [J]. *Immunol Rev*, 2015, 267(1): 214-227
- 9 Ken G. Natural killer cells blaze into immuno-oncology [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 219-220
- 10 Bryceson YT, Chiang SCC, Darmanin S, *et al*. Molecular mechanisms of natural killer cell activation [J]. *J Innate Immun*, 2011, 3(3): 216-226
- 11 Sudhanshu S, Xi Y. Natural killer cells in host defense against veterinary pathogens [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2015, 168(1-2): 30-34
- 12 Ashish A, Aman S, Archana B. Role of cytolytic impairment of natural killer and natural killer T-cell populations in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2014, 33, (8): 1067-1078
- 13 Soderstrom K, Stein E, Colmenero PI, *et al*. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2010, 107(29): 13028-13033
- 14 Vastert, Sebastiaan J. Mutations in the perforin gene can be linked to macrophage activation syndrome in patients with systemic onset juvenile idiopathic arthritis [J]. *Rheumatology*, 2010, 49(3): 441-449
- 15 Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, *et al*. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells [J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(10): 3121-3127
- 16 Tak PP, Spaeny-Dekking L, Kraan MC, *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(2): 366-370
- 17 Saito S, Murakoshi K, Kotake S, *et al*. Granzyme B induces apoptosis of chondrocytes with natural killer cell-like cytotoxicity in rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(10): 1932-1943
- 18 Cui D, Zhang L, Chen J, *et al*. Changes in regulatory B cells and their relationship with rheumatoid arthritis disease activity [J]. *Clini Exp Med*, 2015, 15(3): 285-292

(收稿日期: 2016-03-22)

(修回日期: 2016-03-25)