

类风湿关节炎外周 Foxp3、TGF- β 1 与动脉粥样硬化的关系

牟晓月 张幽幽 陶海英 金都

摘要 目的 探讨类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者外周血叉头转录因子3(forkhead transcription factor 3, Foxp3)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)表达与动脉粥样硬化的相关性。方法 选取2016年1月~2018年5月在笔者医院收治确诊为RA的患者126例作为RA组,将RA组分为RA有斑块组62例和RA无斑块组64例。同时选择笔者医院健康体检志愿者62例作为正常对照组,检测外周血Foxp3、TGF- β 1表达水平和颈动脉内膜中层厚度(intima-media thickness, IMT),采用回归分析筛选类风湿关节炎患者动脉粥样硬化的影响因素。结果 RA无斑块组和RA有斑块组研究对象的TC、TG和LDL高于正常对照组,HDL、TGF- β 1水平和Foxp3 mRNA的相对表达量低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);RA有斑块组研究对象的TC、TG和LDL高于RA无斑块组,HDL、TGF- β 1水平和Foxp3 mRNA的相对表达量低于RA无斑块组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。回归方程显示TC、LDL、Foxp3和TGF- β 1为动脉粥样硬化的危险因素($P < 0.05$),HDL为动脉粥样硬化的保护因素($P < 0.05$)。结论 类风湿关节炎患者外周血中Foxp3、TGF- β 1表达明显受到抑制,是动脉粥样硬化的危险因素,可能参与动脉粥样硬化的发生、发展。

关键词 类风湿关节炎 叉头转录因子3 转化生长因子- β 1 动脉粥样硬化

中图分类号 R593.22

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.024

Relationship between Foxp3 and TGF- β 1 and Atherosclerosis in Patients with Rheumatoid Arthritis. Mou Xiaoyue, Zhang Youyou, Tao Haiying, et al. Department of Rheumatology and Immunology, Taizhou First People's Hospital, Zhejiang 318020, China

Abstract Objective To investigate the relationship between expression of forkhead transcription factor 3 (Foxp3), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** 126 RA patients treated in our hospital from January 2016 to May 2018 were selected and set as RA group, which was further divided into two subgroups, namely RA plaque group ($n = 62$) and RA plaque-free group ($n = 64$). Another 62 health individuals were set as control group. Then the peripheral blood Foxp3, TGF- β 1 expression levels and carotid intima-media thickness (IMT) were detected. The influencing factors of inflammatory atherosclerosis were screened by regression analysis. **Results** The TC, TG, LDL, and IMT among three groups in a descending order was RA plaque group, RA plaque-free group and control group ($P < 0.05$). The expression of HDL, TGF- β 1 and Foxp3 mRNA among three groups in an ascending order was RA plaque group, RA plaque-free group and control group ($P < 0.05$). Regression analysis showed that TC, LDL, Foxp3, and TGF- β 1 were risk factors for atherosclerosis ($P < 0.05$), while HDL was a protective factor for atherosclerosis ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Foxp3 and TGF- β 1 in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis is significantly inhibited. The two indicators are risk factor for atherosclerosis and may participate in the development of atherosclerosis.

Key words Rheumatoid arthritis; Forkhead transcription factor 3; Transforming growth factor- β 1; Atherosclerosis

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)一种慢性、进行性、对称性多关节破坏为特征的全身性自身免疫病,以滑膜炎为主要病理改变,其发病机制尚不清楚,我国的发生率约为0.34%~0.36%,中年女性是高危人群^[1]。早期主要表现为关节红肿及功能障碍,如果不能及时和正规治疗,发病2年左右后约有

一半患者发生关节畸形,甚至随着病情的进展可以致残^[2]。RA患者的平均寿命可以减少5~10年,其死亡的首要原因是心血管疾病,有将近50%的RA患者死于心血管疾病^[3,4]。国外研究发现,RA患者患动脉粥样硬化的风险高于正常人群,症状较为隐匿,常无心绞痛症状^[5]。目前国内对这一病变研究还相对较少。RA以局限性或系统性慢性炎症为特点,而动脉粥样硬化的病理基础也是动脉内膜的慢性炎症,RA和动脉粥样硬化之间可能存在密切联系。因此,

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY16H120029)

作者单位:318020 台州市第一人民医院风湿免疫科

通讯作者:金都,电子邮箱:musule@163.com

借助慢性炎症这一共同桥梁,研究 RA 患者中动脉粥样硬化的发生炎症机制,对 RA 患者动脉粥样硬化预防和治理具有重要意义。叉头转录因子 3 (forkhead transcription factor 3, Foxp3) 是特异性表达于调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 内的标志性分子,在免疫耐受和免疫抑制效应中发挥决定性作用^[6]。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 在炎症的发生、发展过程中发挥重要意义,参与了组织修复、细胞周期调节,同时也具有免疫抑制的作用^[7]。因此,本研究通过探讨 RA 患者外周血 Foxp3 和 TGF- β 1 表达及与动脉粥样硬化关系,为 RA 患者动脉粥样硬化预防和治理提供一个新思路。

资料与方法

1. 一般资料:选取 2016 年 1 月~2018 年 5 月在笔者医院收治确诊为 RA 的患者 126 例作为 RA 组,其中男性 20 例,女性 106 例,患者年龄 26~64 岁,平均年龄 48.07 ± 16.31 岁。根据超声检查颈动脉内膜中层厚度 (intima-media thickness, IMT), $IMT < 0.9\text{mm}$ 表示正常, $0.9\text{mm} \leq IMT \leq 1.3\text{mm}$ 提示内膜增厚, $IMT > 1.3\text{mm}$ 表示有动脉斑块,以此为标准,将 RA 组分为 RA 有斑块组 62 例和 RA 无斑块组 64 例。纳入标准:①所有患者均符合美国风湿协会 (American Rheumatism Association, ARA) 1987 年修订的关于 RA 的诊断标准^[8];②本研究征得研究对象及家属知情同意,并签署知情同意书。排除标准:①合并其他自身免疫性疾病患者;②半年内使用激素或免疫抑制剂治疗患者;③明确有心血管疾病患者;④严重肝脏、肾脏疾病和肿瘤患者。同时选择笔者医院健康体检志愿者 62 例作为正常对照组,其中男性 8 例,女性 54 例,年龄 22~60 岁,平均年龄 45.57 ± 19.18 岁。本研究获得台州市第一人民医院伦理学委员会批准。

2. 病史及标本采集:收集所有研究对象的身高、体重,计算体重指数 (body mass index, BMI),记录 RA 组患者的病程、既往史,进行全身体格检查,用 2 处关节炎疾病活动分数 (disease activity score 28, DAS28) 计算器计算 DAS28 评分。采集清晨空腹静脉血 8ml,分两管,第 1 管加入 TRIzol 1ml 后 -80°C 保存备用;第 2 管分离血清后 -80°C 保存备用。

3. 生化指标的检测:取出 -80°C 保存的血清,用全自动生化分析仪测定总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白

(highdensity lipoprotein, HDL) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 水平。

4. 用酶联吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测血清中 TGF- β 1 水平:将一抗稀释至 $10\mu\text{g/ml}$,加入到 96 孔板中,0.1 毫升/孔, 4°C 过夜,洗涤 3 次,加血清 0.1ml 于上述反应孔中, 37°C 孵育 1h;加入 0.1ml 二抗,孵育 1h;加入显色液 0.1ml,显色 20min;加入 0.05ml 浓度为 2mol/L 的硫酸终止反应,在 450nm 处测各孔吸光度 (A) 值。TGF- β 1 试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司。

5. 用实时荧光 RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) 检测外周血 Foxp3 mRNA 的表达:取处 -80°C 保存的加 TRIzol 全血,根据 RNA 提取试剂盒操作说明书提取 RNA,根据反转录试剂盒说明合成 cDNA,根据 SYBR Premix Ex Taq TM II 荧光定量 PCR 试剂盒说明进行 PCR 扩增。条件为 95°C 30s 预变性, 95°C 5s 变性, 60°C 44s, 40 个循环, 61°C 时采集荧光,用实时荧光定量 PCR 仪检测对其表达量进行结果分析,以 GAPDH 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

6. IMT 超声检查:用多普勒彩色超声显像仪对所有研究对象进行 IMT 检测,分别测量左右两测颈总动脉、颈内动脉和颈动脉分叉部的 IMT,取平均值。IMT 测量与资料采集的同一天完成。采用双盲法,由经验丰富的超声医生进行检测。

7. 统计学方法:采用 IBM SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析。实验结果采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$),分析前进行正态检验,若满足正态性,用单因素方差分析进行判断;若不满足正态性,数据转换后再进行分析,以 IMT 为应变变量 (Y),病程、TC、TG、HDL、LDL、DAS28、TGF- β 1 和 Foxp3 为自变量 (x) 进行回归分析,筛选出动脉粥样硬化的影响因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.3 组研究对象基本资料的比较:3 组研究对象的年龄、BMI 与正常对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);RA 无斑块组和 RA 有斑块组研究对象的 TC、TG、LDL 高于正常对照组, HDL 低于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);RA 有斑块组研究对象的 TC、TG、LDL 高于 RA 无斑块组, HDL 低于 RA 无斑块组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 3组研究对象基本资料的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	正常对照组	RA 无斑块组	RA 有斑块组	F/t	P
例数(n)	62	64	62	-	-
年龄(岁)	45.57 ± 19.18	47.24 ± 11.64	49.57 ± 16.31	0.964	0.336
病程(年)	-	2.51 ± 1.00	3.66 ± 1.85 [#]	2.541	0.015
BMI(kg/m ²)	23.58 ± 2.70	23.94 ± 5.13	24.52 ± 4.47	1.736	0.084
TC(mmol/L)	5.15 ± 0.23	5.37 ± 0.92 [*]	5.72 ± 1.58 ^{*#}	2.917	0.004
TG(mmol/L)	1.02 ± 0.24	1.23 ± 0.19 [*]	1.46 ± 0.35 ^{*#}	10.011	0.000
HDL(mmol/L)	1.36 ± 0.20	1.13 ± 0.12 [*]	0.98 ± 0.11 ^{*#}	16.231	0.000
LDL(mmol/L)	2.99 ± 0.24	3.22 ± 0.82 [*]	3.76 ± 0.61 ^{*#}	11.298	0.000
DAS28	-	4.01 ± 1.41	4.21 ± 1.68	0.725	0.470

与正常对照组比较, * P < 0.05; 与 RA 无斑块组比较, [#]P < 0.05

2.3 组研究对象 TGF-β1 和 Foxp3 水平的比较: RA 无斑块组和 RA 有斑块组研究对象血清中 TGF-β1 水平和 Foxp3 mRNA 的相对表达量低于正常对照, 差异有统计学意义(P < 0.05); RA 有斑块组研究对象血清中 TGF-β1 水平和 Foxp3 mRNA 的相对表达量低于 RA 无斑块组, 差异有统计学意义(P < 0.05, 表 2)。

表 2 3组研究对象 IMT、TGF-β1 和 Foxp3 水平的比较

指标	n	TGF-β1 (pg/ml)	Foxp3
正常对照组	62	420.74 ± 75.67	1.00 ± 0.09
RA 无斑块组	64	318.57 ± 38.99 [*]	0.68 ± 0.12 [*]
RA 有斑块组	62	205.04 ± 17.95 ^{*#}	0.19 ± 0.03 ^{*#}
F		27.147	161.164
P		0.000	0.000

与正常对照组比较, * P < 0.05; 与 RA 无斑块组比较, [#]P < 0.05

3. 回归模型分析: 以 IMT 为应变量(Y), 病程、TC、TG、HDL、LDL、DAS28、TGF-β1 和 Foxp3 为自变量(x)进行回归分析, 筛选出动脉粥样硬化的影响因素。结果显示回归方程差异有统计学意义(P < 0.05), TC、LDL、Foxp3 和 TGF-β1 为动脉粥样硬化的危险因素(P < 0.05), HDL 为动脉粥样硬化的保护因素(P < 0.05, 表 3)。

表 3 动脉粥样硬化影响因素的回归分析(n = 96)

自变量	β	标准误	Wald	P	OR	95% CI
TC	0.230	0.103	11.859	0.000	1.259	1.029 ~ 1.540
HDL	-0.388	0.133	10.520	0.000	0.713	0.550 ~ 0.926
TGF-β1	0.534	0.136	4.431	0.035	1.706	1.307 ~ 2.227
Foxp3	0.342	0.121	8.552	0.003	1.408	1.111 ~ 1.785

讨 论

RA 是一种由自身免疫性 T 细胞对自身抗原产

生特异性免疫应答而引起的自身免疫性疾病, T 细胞及其亚群的功能紊乱和分泌细胞因子异常在 RA 的启动过程中发挥了关键性作用。CD4⁺ CD25⁺ Treg (regulatory T cell, Treg) 细胞是一种具有免疫抑制功能的 T 细胞亚群, 可以抑制 T 细胞的活性和功能, 维持机体的免疫耐受^[9]。研究表明, Treg 细胞可以通过抑制性细胞因子依赖机制和细胞接触性依赖机制抑制自身免疫 T 细胞的活化, 显著抑制其他 T 细胞亚群的增殖^[10]。Foxp3 是 Treg 细胞内的一种转录因子, 在 Treg 细胞细胞特异性表达是 Treg 细胞发挥生物学活性的关键因素, 在免疫抑制和免疫耐受中发挥决定性地位^[11]。Foxp3 基因突变与免疫失调性疾病、X-相关综合征、多发性内分泌腺体病等多种自身免疫性疾病密切相关, Foxp3 表达降低或功能缺陷可以引起自身免疫性胃炎、特发性关节炎和多发性硬化症等, Foxp3 的高表达可以使 Treg 细胞产生大量免疫抑制因子(如白细胞介素-10), 如白细胞介素-10 通过 TGF-β 依赖性和细胞接触方式对致病性 T 细胞发挥直接作用, 产生促炎因子减少^[12,13]。

有研究显示, TGF-β1 能调节 Foxp3 的表达^[14]。TGF-β1 参与胚胎发育、免疫抑制、组织修复等多种生物学功能, 但其生物学效应依赖于 Smads 蛋白的信号转导及调控, TGF-β1 信号从细胞表面转导至细胞核的过程中依赖于 Smads 家族蛋白^[15]。Smads 蛋白共有 3 类: 受体活化型 Smad (R-Smads)、抑制型 Smad (I-Smads) 和共同通路型 Smad (Co-Smad), 不同 Smads 蛋白介导不同的 TGF-β 信号转导^[16]。TGF-β1 作为受体复合物, 通过 TGF-β1/Samds 信号转导通路, 诱导 Smads 蛋白进入细胞核内, 抑制其靶基因 (Foxp3) 的转录, 使 Foxp3 表达下调^[14]。这些研究表明, 当 Foxp3 和 TGF-β1 表达降低时, 它们对自身免疫 T 细胞的抑制作用减弱, 导致自身免疫性 T

细胞对自身抗原产生特异性免疫应答,引起终生免疫性疾病。本研究结果显示,在 RA 组研究对象外周血 Foxp3 和 TGF- β 1 的表达降低。

RA 患者发生心肌梗死的风险是正常人群的 2~3 倍,脑卒中的风险上升 1.7 倍^[17]。动脉粥样硬化是心血管疾病发生的基础,其发生、发展过程是脂质与纤维成分在大动脉沉积,目前认为动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病。RA 的病理基础是关节滑膜组织的炎症,导致如白细胞介素-16、 α -肿瘤坏死因子等炎症因子释放入血。这些炎症因子不仅调节机体免疫反应,而且能作用于脂肪组织和血管内皮等组织,使机体出现胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱和内皮功能障碍等,导致促使 RA 患者动脉粥样硬化加速进展^[18]。近年来研究提示,脂肪因子可能成为 RA 疾病发生、发展的生物标记,其不仅与健康人群有差异,还与病情和病程密切相关,而且脂肪因子在动脉粥样硬化发病过程中的作用也得到证实^[2]。RA 患者在炎症因子的作用下,导致 HDL 降低,LDH 表达增加,这与本研究结果一致。本研究结果显示,TC、Foxp3 和 TGF- β 1 为炎性动脉粥样硬化复发的独立危险因素,HDL 为炎性动脉粥样硬化的独立保护因素,笔者推测,RA 患者发生动脉粥样硬化的作用过程是 Foxp3 和 TGF- β 1 表达受到抑制,导致炎症因子释放增加引起脂肪代谢紊乱,促使动脉粥样硬化的发生。

综上所述,类风湿关节炎患者外周血中 Foxp3、TGF- β 1 表达明显受到抑制,参与动脉粥样硬化的发生、发展。但由于本研究属于横断面的调查,结果的说服力欠佳,后续将对 RA 患者进行随访,动态检测 Foxp3、TGF- β 1 水平,进一步探讨 Foxp3、TGF- β 1 与动脉粥样硬化的关系,为 RA 患者合并动脉粥样硬化的早期诊断和治疗提供一个新思路。

参考文献

- 1 施剑峰,沈波. NLRP3 炎性小体在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(4):11-13
- 2 俞颖,朱琳超,徐淑贞,等. 类风湿性关节炎患者外周血白细胞 VCS 参数变化与病情活动相关性的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(1):50-52
- 3 罗静,王妍华,俱博苗,等. 西部地区血清阴性类风湿关节炎临床特点及传统抗风湿药治疗 1 年的转归分析[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2017, 38(1):88-91
- 4 Myasoedova E, Chandran A, Ilhan B, et al. The role of rheumatoid arthritis(RA) flare and cumulative burden of RA severity in the risk of cardiovascular disease[J]. Ann Rheumat Dis, 2016, 75(3):

- 560-565
- 5 Spinelli FR, Pecani A, Conti F, et al. Post-translational modifications in rheumatoid arthritis and atherosclerosis: focus on citrullination and carbamylation[J]. J Int Med Res, 2016, 44(1):81-89
- 6 陈英,张文玲,黄涛,等. 炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-17 与类风湿关节炎并发动脉粥样硬化的关系[J]. 免疫学杂志, 2017, 12(3):268-272
- 7 Cheng K, Min H. Mammalian target of rapamycin(mTOR) regulates transforming growth factor- β 1(TGF- β 1)-induced epithelial-mesenchymal transition via decreased pyruvate kinase M2(PKM2) expression in cervical Cancer Cells[J]. Medi Sci Monit Int Med J Exp Clin Res, 2017, 23(12):2017-2028
- 8 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. Arthrit Rheum, 1988, 31(3):315-324
- 9 董令,张爱华,朱凯,等. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞在神暴露大鼠肝脏中的表达差异及意义[J]. 中华地方病学杂志, 2018, 37(2):96-101
- 10 Xia G, He J, Zhang Z, et al. Targeting acute allograft rejection by immunotherapy with ex vivo-expanded natural CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. Transplantation, 2016, 82(12):1749-1755
- 11 梁毅,周广,张龙举,等. 香烟烟雾提取物抑制树突状细胞诱导 CD4⁺T 细胞分化为 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(1):15-19
- 12 Angelin A, Gil-De-Ga3Mez L, Dahiya S, et al. Foxp3 reprograms T cell metabolism to function in low-glucose, high-lactate environments[J]. Cell Metab, 2017, 25(6):1282-1293
- 13 史国星,曾强,李伟,等. CD4⁺C25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞在自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2016, 12(12):1092-1095
- 14 Ma S, Wang Q, Ma X, et al. FoxP3 in papillary thyroid carcinoma induces NIS repression through activation of the TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. Tumor Biol, 2016, 37(1):989-998
- 15 Yan XH, Liao HW, Cheng MZ, et al. Smad7 protein interacts with receptor-regulated Smads(R-Smads) to inhibit transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad signaling[J]. J Biol Chem, 2016, 291(1):382-392
- 16 周敏,冯强,黄丽波,等. 转化生长因子 β 1/Smads 信号传导通路在哺乳动物卵巢发育中的调控作用及其作用机制[J]. 动物营养学报, 2017, 29(7):2283-2288
- 17 武志强,杨滨,罗通行,等. 类风湿性关节炎患者的心血管疾病相关危险因素分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(9):1716-1718
- 18 查晴,曹丽娟,王燕萍,等. oxLDL 通过 TLR4 诱导脂质累积和炎症反应促进动脉粥样硬化的分子机制[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2017, 37(5):611-615

(收稿日期:2018-09-04)

(修回日期:2018-09-19)