

• 论 著 •

糖皮质激素对类风湿关节炎患者血清中 B、T 淋巴细胞 弱化因子表达的影响^{*}

邱群芳[△], 罗裕旋, 魏建伟

(广东省深圳市宝安区龙华人民医院 518109)

摘要:目的 探讨 B、T 淋巴细胞弱化因子(BTLA)在类风湿关节炎患者血清中的水平及其在发病机制中的作用和糖皮质激素对其表达的调节。方法 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测患者血清中 BTLA 的水平。采用免疫印迹法检测抗核抗体(ANA)谱, ELISA 法检测抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体, 免疫比浊法检测类风湿因子(RF)。结果 对照组治疗有效例数为 9 例, 无效为 11 例; 观察组有效例数为 15 例, 无效为 12 例。观察组临床治疗总有效率(75%)明显高于对照组(53%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组治疗前血清中 BTLA 为 $(89 \pm 13) \mu\text{g/L}$, 治疗后为稍微升高, 为 $(110 \pm 11) \mu\text{g/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而观察组治疗前血清中 BTLA 为 $(78 \pm 11) \mu\text{g/L}$, 治疗后为 $(140 \pm 13) \mu\text{g/L}$, 明显升高。结论 BTLA 在类风湿关节炎患者的血清中水平降低, 糖皮质激素可上调其表达, BTLA 的升高影响类风湿关节炎病情的转归, 可作为治疗的新靶点。

关键词:糖皮质激素类; 关节炎, 类风湿; B、T 淋巴细胞弱化因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)06-0625-02

Effect of glucocorticoids on the expression of BTLA in rheumatoid arthritis patients^{*}

Qiu Qunfang[△], Luo Yuxuan, Wei Jianwei

(The Bao'an Long Hua People Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518109, China)

Abstract: Objective To investigate the BTLA in the serum level of patients with rheumatoid arthritis in the pathogenesis of the role and regulation of glucocorticoids. **Methods** ELISA was used to detect the serum levels of BTLA. Western blotting with anti-nuclear antibody (ANA) spectroscopy, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies, detected by turbidimetry of rheumatoid factor (RF). **Results** In the control group, effective cases in 9 cases, 11 cases ineffective; effective cases in the observation group of 15 patients, 12 cases ineffective. The clinical observation of 75% of the total effective rate was higher than 53% ($P < 0.05$). The control group before treatment serum BTLA $(89 \pm 13) \mu\text{g/L}$, after treatment, slightly elevated serum BTLA $(110 \pm 11) \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$); the observation group before treatment serum BTLA $(78 \pm 11) \mu\text{g/L}$, the serum of BTLA $(140 \pm 13) \mu\text{g/L}$ significantly increased. **Conclusion** BTLA in rheumatoid arthritis patients with lower levels of serum, glucocorticoids can upregulate the expression, BTLA increase of the disease can affect the outcome of rheumatoid arthritis, can be used as a new therapeutic target.

Key words: glucocorticoids; arthritis, rheumatoid; B and T lymphocyte attenuator

类风湿关节炎简称类风湿,是以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变,以皮下结节、心包炎、胸膜炎、肺炎、周围神经炎等为主要临床表现的,尚无特异性诊断指标的自身免疫炎性疾病^[1]。对类风湿关节炎的关节损伤的病理研究发现,持续性活化的自身反应性 T 细胞在其病程中有重要作用。而对 T 细胞活化机制方面的研究表明, T 细胞的有效活化和效应发挥,产生共刺激信号 B、T 淋巴细胞弱化因子(B and T lymphocyte attenuator, BTLA),具有负性调节 T、B 细胞的激活与增殖,维持树突状细胞在内环境中的稳定,抑制记忆性 CD8⁺ T 细胞的分化等作用^[2-4]。糖皮质激素用于类风湿关节炎患者,能迅速减轻其关节疼痛、肿胀,在关节炎急性发作,或伴有心、肺、眼和神经等器官受累的重症患者,可给予短期疗效激素,其剂量根据病情严重程度而调整^[5]。目前,关于糖皮质激素对患者血清中 BTLA 的表达的影响及临床意义尚未明确,现就此进行初步探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 3 月至 2010 年 5 月在本院住院及门诊的 66 例类风湿关节炎患者为研究对象,患者均具备以下条

件:(1)符合美国风湿病学会 1987 年修订诊断标准,且排除伴有严重肝肾疾病、血液病、心血管系统疾病及其他骨关节疾病者。(2)肝肾功能、血脂、血常规、尿常规、影像学检查均正常,特别排除有自身免疫性病史、心血管病史及近期感染史者。按年龄、病程将临床状况基本相同的患者随机分为两组:对照组 31 例;观察组(糖皮质激素)35 例。两组性别、年龄、体质指数等一般情况差异均无统计学意义($P < 0.05$)。

1.2 方法 两组患者均进行类风湿关节炎知识宣传教育,观察组采用糖皮质激素进行治疗,而对照组在对症治疗的同时,服用安慰剂。对两组同时辅以心理辅导。分别抽取两组患者清晨空腹静脉血 5 mL,均于低温离心机上以 3 000 r/min 离心 15 min,离心半径 8 cm,分离血清后置于 -70 ℃ 冰箱保存,于半年内进行检测。采用免疫印迹法检测抗核抗体(ANA)谱,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体,免疫比浊法检测类风湿因子(RF)。用 ELISA 法检测患者血清中 BTLA 水平。

1.3 临床疗效评价 (1)晨僵时间小于 15 min;(2)无乏力;(3)无关节疼痛(通过询问病史得知);(4)活动时无关节压痛或

^{*} 基金项目:深圳市宝安区科技计划项目(2010647)。[△] 通讯作者, E-mail: qf-200106@163.com。

疼痛；(5)关节或腱鞘无软组织肿胀；(6)红细胞沉降率：女性小于 30 mm/h,男性小于 20 mm/h。上述 6 条标准中有 5 条以上且至少持续 2 个月,达到临床缓解。有活动性血管炎、心包炎、胸膜炎、肌炎和(或)近期无原因的体质量下降或发热者,不能认为缓解。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间数据采用独立样本 *t* 检验,对计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者血清多种自身抗体的比较 将 ANA 谱中 15 种抗体有一项或多于一项为阳性的认为 ANA 谱结果异常,作为阳性计算,两组患者 ANA 谱、抗 CCP 抗体和 RF 阳性表达情况见表 1。

表 1 两组患者自身抗体表达情况的比较

组别	例数(<i>n</i>)	ANA 谱	RF	抗 CCP 抗体
对照组	31	5	16	10
观察组	35	8	19	8

2.2 对照组和观察组临床治疗效果的比较 对照组治疗有效为 9 例,无效为 11 例;观察组有效为 15 例,无效为 12 例。观察组临床治疗总有效率(75%)明显高于对照组(53%),差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 对照组和观察组临床治疗效果的比较

组别	总例数(<i>n</i>)	有效(<i>n</i>)	无效(<i>n</i>)	有效率(%)
对照组	31	9	11	53
治疗组	35	15	12	75

2.3 对照组和观察组治疗前、后 BTLA 的变化 对照组治疗前血清中 BTLA 为(89 ± 13) $\mu\text{g/L}$,治疗后 BTLA 稍微升高,为(110 ± 11) $\mu\text{g/L}$ ($P<0.05$);而观察组治疗前血清中 BTLA 为(78 ± 11) $\mu\text{g/L}$,治疗后血清中 BTLA 为(140 ± 13) $\mu\text{g/L}$,明显升高($P<0.05$),见图 1。

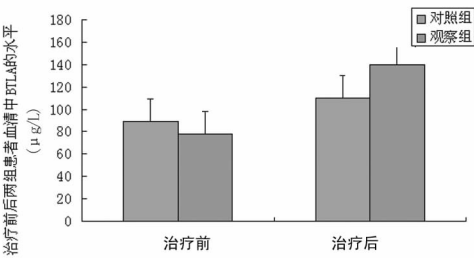


图 1 对照组和观察组治疗前、后血清中 BTLA 的变化

3 讨 论

BTLA 是 2003 年鉴定的胞内具有两个免疫受体酪氨酸抑制性基序共刺激分子受体,其结构和功能类似于细胞毒性 T 细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 及 T 细胞程序性死亡受体 (programmed cell death 1, PD-1)。在 T 细胞极化条件下,BTLA 可持续性表达于 Th1 细胞而在 Th2 细胞中丧失^[6-8]。T 细胞活化后,BTLA 配体的表达下调,直至 T 细胞恢复静止状态时,其表达上调。BTLA 与其配体结合后,产生负性共刺激信号,可抑制 Th1 细胞的活化,下调 IL-2、IFN- γ 等细胞因子的产生,也可通过影响 T 细胞和 B 细胞的相互作用而下调 B 细胞产生抗体的功能^[9-11]。已有学者提出 BTLA 在自身免疫性疾病中有重要作用,但其与类风湿关节炎的关系及其在发病过程中的作用尚未明确^[12]。

类风湿关节炎是一种致残性较强的自身免疫性疾病,通常可导致不可逆的关节破坏、畸形,甚至残疾^[13]。类风湿关节炎的治疗主要采用非甾体类抗炎镇痛药物,包括水杨酸类及选择性环氧化酶抑制剂。此外,还有改变病程药物及糖皮质激素。糖皮质激素在类风湿关节炎的治疗中具有缓解病情的潜能。本实验观察到应用糖皮质激素治疗的患者,对照组治疗有效为 9 例,无效为 11 例;观察组有效为 15 例,无效为 12 例。观察组临床治疗总有效率(75%)明显高于对照组(53%),而对照组治疗前血清中 BTLA 为(89 ± 13) $\mu\text{g/L}$,治疗后 BTLA 稍微升高,为(110 ± 11) $\mu\text{g/L}$,观察组治疗前血清中 BTLA 为(78 ± 11) $\mu\text{g/L}$,治疗后 BTLA 为(140 ± 13) $\mu\text{g/L}$,明显升高。提示 BTLA 与类风湿关节炎患者的发病密切相关,且糖皮质激素对 BTLA 的影响非常显著,表明 BTLA 参与类风湿关节炎的发病进程,将 BTLA 作为治疗类风湿关节炎的靶点,可能是一个新的治疗途径。

BTLA 的功能提示其在 Th1 介导的类风湿关节炎病程中可能有重要作用,使用 HVEM-Ig 融合蛋白增强 BTLA 信号或许可以特异性下调 Th1 免疫应答而缓解疾病的进程。最近的研究发现,在类风湿关节炎患者关节积液中 T 细胞 BTLA 的表达显著高于健康者,初步推测 BTLA 可能参与了类风湿关节炎的调节。因此,阐明 BTLA 途径在类风湿关节炎病理进程中的作用并利用 HVEM-Ig 融合蛋白下调 Th1 活化,进而调节类风湿关节炎患者炎症进程是有意义的。

在控制疾病的发病率及疾病的进展及改善预后方面 BTLA 起着重大作用,已被认为是治疗疾病的新靶点。随着 BTLA 与类风湿关节炎疾病关系研究的不断深入,以及糖皮质激素调节 BTLA 表达的机制进一步研究,提示可以通过调节 BTLA 的表达来预防类风湿关节炎疾病的发生并控制病情的发展。

参考文献

[1] 吴东海. 类风湿关节炎[J]. 中华风湿病学杂志, 2004, 3(34): 57-59.

[2] Han P, Goularte OD, Rufner K, et al. An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection[J]. J Immunol, 2004, 173(5): 5931-5939.

[3] Trez C, Schneider K, Potter K, et al. The inhibitory HVEM-BTLA pathway counter regulates lymphotoxin receptor signaling to achieve homeostasis of dendritic cells[J]. J Immunol, 2008, 180(1): 238-248.

[4] Krieg C, Boyman O, Fu YX, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates CD8⁺ T cell intrinsic homeostasis and memory cell generation[J]. Nat Immunol, 2007, 8(2): 162-171.

[5] 唐福林. 类风湿关节炎的诊治和预后[J]. 临床内科杂志, 2004, 21(3): 148-151.

[6] 王月颖, 张世杰, 邵毅, 等. BTLA 信号对 T 细胞活化的起始和早期阶段的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(4): 304-308.

[7] Compaan DM, Gonzalez LC, Tom I, et al. Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex[J]. J Biol Chem, 2005, 280(47): 39553-39561.

[8] Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator[J]. Nat Immunol, 2005, 6(2): 90-98.

[9] Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA-4 Ig[J]. N Engl J Med, 2003, 349(20): 1907-1915.

[10] Iwai H, Kozono Y, Hirose S, et al. Amelioration(下转第 628 页)

2 结 果

2.1 1 例临床样本经特异性引物扩增后, InfA、swInfA、swH1、RnaseP 结果显示均为阳性, 各引物的阴性对照均为阴性。

2.2 共检测有流感样症状的患者 2 156 例, 3 361 例咽拭子样本中, 甲型流感病毒核酸阳性 1 176 例, 阳性率 35.0%, 其中甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 599 例, 阳性率 17.8%。14 岁以下儿童甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 283 例, 占阳性总数的 47.2%。见表 2。

表 2 该院 2009 年 5~12 月流感疫情实时 荧光 PCR 检测结果比较					
月份	例数 (n)	甲型流感 阳性	H1N1 流感 阳性	甲型流感 阳性率(%)	H1N1 阳性率(%)
5 月	32	0	0	0.0	0.0
6 月	280	1	0	0.4	0.0
7 月	476	14	0	2.9	0.0
8 月	668	137	6	20.5	0.9
9 月	730	262	74	35.9	10.1
10 月	840	571	395	68.0	47.0
11 月	204	132	94	64.7	46.1
12 月	131	59	30	45.0	22.9
合计	3 361	1 176	599	35.0	17.8

2.3 甲型 H1N1 流感发病率从 5 月以来呈上升趋势, 10 月下旬至 11 月上旬达到高峰, 10~12 月检测的甲型流感样病例 50% 以上都是甲型 H1N1 流感病毒感染, 儿童流感样病例中 80% 以上都是甲型 H1N1 流感病毒感染。

2.4 对于甲型流感病毒核酸检测阳性的患者给予相应的抗病毒治疗, 1 周后复检, H1N1 核酸检测大部分为阴性, 转阴率为 95.5%。

3 讨 论

根据国家流行性感冒诊断标准及处理原则 (GB15994-1995)^[3], 流行性感冒病原学常规的检测方法是病毒培养法 (细胞培养法与鸡胚培养法)。该方法虽然准确度高, 但培养时间长, 一般要 10~15 d, 而且对实验室和人员素质要求也很高, 不适用于临床常规早期快速诊断。实时荧光定量 PCR 方法从核酸提取到完成检测只需 3~4 h, 且操作方便, 特异性强、灵敏度高, 缩短了检测的时间。

2009 年 3 月暴发于北美的甲型 H1N1 流感疫情, 是由新的流感病毒变异株引起的急性呼吸道传染病, 以前在人和猪身

上均未发现过, 这种新型病毒具有传染性, 包含北美猪流感、禽流感、人流感和欧亚猪流感病毒 4 种不同流感类型的基因片段, 可以在人群之间传播^[4]。5 月份中国内地确诊首例甲型 H1N1 流感病例^[5], 本实验室从 2009 年 5 月 20 日开始采用实时荧光定量 PCR 方法检测发热患者的咽拭子标本, 从 5~12 月共检测了 3 361 例咽拭子样本, 甲型流感病毒核酸阳性 1 176 例, 阳性率 35.0%, 其中甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 599 例, 阳性率 17.8%。6、7、8 月份甲型 H1N1 流感感染阳性率较低, 标本来源于本院发热门诊患者, 主要为医院附近居民。9 月份以后学校开学, 由于此次流感的传染性很强, 出现了多所学校的小范围流行, H1N1 流感阳性率上升至 10.1%。10、11 月随着气温的降低, 流感疫情迅速蔓延, 呈快速上升趋势, 达到 47.0% 左右。尤其是 14 岁以下儿童由于抵抗力差更易感染, 本组检测的病例中, 14 岁以下儿童甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 283 例, 占阳性总数的 47.2%, 而且在儿童流感样病例中 80% 以上都是甲型 H1N1 流感病毒感染。该病毒感染传播迅速但由于能够早期快速诊断, 大部分患儿经过对症治疗和抗病毒治疗后都能很快好转, 1 周后 H1N1 核酸检测转阴率达到 95.5%。12 月中、下旬以后随着 H1N1 疫苗的广泛注射和防护意识的加强, 感染阳性率迅速下降。2010 年以后 H1N1 感染的阳性率也一直持续在很低的水平, 几乎已检测不到阳性病例。

总之, 采用实时荧光定量 PCR 反应监测发热患者甲型 H1N1 病毒感染快速、准确, 适用于 H1N1 流感病毒感染的早期诊断并可作为监测手段在临床广泛开展, 为控制疫情的蔓延发挥了重要作用。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感病毒实验室检测技术方案 (试行)[S]. 2009.

[2] World Health Organization. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1) [EB/OL]. <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html>

[3] 国家技术监督局. GB15994-1995 流行性感冒诊断标准及处理原则[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.

[4] Fatimah S, Dawood MD, Jain MDS, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans[J]. N Engl J Med, 2009, 6(1): 361-370.

[5] 王伟, 潘明, 常国辉, 等. 中国内地首例确诊甲型 H1N1 流感病例的实验室检测[J]. 病毒学报, 2009, 25(ZI): 4-7.

(收稿日期: 2010-09-11)

(上接第 626 页)

of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation[J]. J Immunol, 2002, 169(8): 4332-4339.

[11] Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1[J]. Nat Immunology, 2003, 4(7): 670-679.

[12] Gonzalez LC, Loyet KM, Calemine-Fenaux J, et al. A coreceptor

interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(4): 1116-1121.

[13] 王沛坚, 施旭光. 类风湿关节炎的抗氧化治疗展望[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(3): 39-42.

(收稿日期: 2011-03-15)