

瘤坏死因子拮抗剂皮下注射 25 mg, 2 次/周, 甲氨蝶呤 10 mg 口服, 每周 1 次^[12]。眼科以局部用药为主。其疗效显著, 能缩短葡萄膜炎病程, 耐受性和安全性良好。不同的治疗方法有各自的优缺点, 可以根据患者的病情及经济基础, 选择适合患者的治疗方案。

4 小 结

HLA-B27 阳性的患者中, 以强直性脊柱炎为最常见的脊柱关节病。作为强直性脊柱炎在关节外症状的一种表现, 葡萄膜炎的出现不能忽视。由于有 41% 的患者以葡萄膜炎为首发症状就诊眼科, 为了避免漏诊, 眼科医生除了询问患者的骶髂关节病史外, HLA-B27 应作为一项重要的实验室检查, 帮助医生更加准确地辨别患者的眼部病变是否为强直性脊柱炎伴发的一种症状, 找到疾病的根源所在, 才能够更好地减轻患者的痛苦。

参考文献

- [1] Bloch-Michel E, Nussenblatt RB, International uveitis study group recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease[J]. Am J Ophthalmol, 1987, 103(2): 234-235.
- [2] 杨培增, 张震, 王红, 等. 葡萄膜炎的临床类型及病因探讨[J]. 中华眼底病杂志, 2002, 18(4): 253-255.
- [3] 李静, 李跃蒙. 以前葡萄膜炎首诊的强直性脊柱炎 11 例[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2008, 11(3): 389.
- [4] Fernández-Melón J, Muñoz-Fernández S, Hidalgo V, et al. Uveitis

as the initial clinical manifestation in patients with spondyloarthropathies[J]. J Rheumatol, 2004, 31(3): 524-527.

- [5] 杨培增. 临床葡萄膜炎[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 311-318.
- [6] 王大选, 陈鹏飞, 顾云峰, 等. 急性前葡萄膜炎 HLA-B27 检测及其临床意义[J]. 现代实用医学, 2015, 27(4): 506-508.
- [7] Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, et al. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis[J]. Rheumatol Int, 2003, 23(2): 61-66.
- [8] 杨培增. 葡萄膜炎的诊断及相关问题[J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(4): 250-253.
- [9] 滕克禹. 强直性脊柱炎伴发葡萄膜炎的临床特点和中西医结合治疗[J]. 中国中医眼科杂志, 2012, 22(1): 49-51.
- [10] Rothova A, van Veenendaal WG, Linssen A, et al. Clinical features of acute anterior uveitis[J]. Am J Ophthalmol, 1987, 103(2): 137-145.
- [11] 张中宇, 何欣, 王秀云, 等. 强直性脊柱炎伴发葡萄膜炎的临床治疗与分析[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(5): 481-483.
- [12] 宋国祥, 黄进贤, 尹志华, 等. 肿瘤坏死因子拮抗剂治疗强直性脊柱炎伴发葡萄膜炎的临床疗效评价[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(4): 661-663.

(收稿日期: 2015-11-12)

• 综 述 •

PCR 技术在类风湿性关节炎中的应用及其研究进展

赵海歌¹, 丑广程², 陈占良², 王建国², 段 琳²综述, 王淑仙^{2△}审校

(1. 河北大学临床医学院研究生院, 河北保定 071000; 2. 河北大学附属医院检验科, 河北保定 071000)

关键词: 类风湿性关节炎; 聚合酶链式反应; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 05. 027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)05-0643-04

类风湿性关节炎(RA)是一种常见的自身免疫性疾病, 据不完全统计, 我国有 300 万人以上患有 RA, 其发病率为 0.3%~0.6%。RA 发病原因尚不清楚, 现认为其发病原因有感染因素、遗传因素和免疫因素, 以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变为主要临床表现。RA 诊断主要依靠临床表现、X 射线检查及类风湿因子(RF)检测。随着免疫技术的不断发展, 许多自身抗体广泛应用于 RA 的诊断, 主要应用酶联免疫法检测抗核周因子(APF)、抗角蛋白抗体(AKP)、抗环瓜氨酸抗体(抗 CCP 抗体), 以及其 RF 分型(IgG、IgM、IgA)。这些检查可以提供早期诊断依据, 提高患者疾病的治愈率。近年来随着分子生物学技术的发展, 可以直接从基因水平检测疾病, 提供更可靠的特异性的临床诊断依据。

聚合酶链式反应(PCR)是体外扩增 DNA 的技术, 它的研究已经有很长的发展历史, 1985 年美国科学家申请了有关 PCR 的第一个专利, 在 science 杂志上发表了第一篇 PCR 的学术论文, 从此 PCR 技术得到了生命科学界的普遍认同。但是最初使用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌的 DNA 聚合酶 I 的 Kle-

now 片段, 但是 Klenow 酶不耐热, 在 DNA 模板进行热变形时会导致此酶钝化, 每加入一次酶只能完成一个扩增反应周期, 这使操作程序更加复杂化。1988 年初, 有研究者改用 T4 DNA 聚合酶进行扩增, 其扩增的产物具有均一性, 但是每循环一次也需要重新加入酶。1988 年有研究者提取出了 TaqDNA 酶, 此酶耐高温在热变性时不会被钝化, 不必在每次扩增反应后再加入新酶, 从而极大地提高了 PCR 扩增效率。在此之后, PCR 方法不断被改进, 很多新技术不断发展, 比如具有 3'→5'修复活性的热稳定 DNA 聚合酶代替之前不具有 3'→5'修复活性的 DNA 聚合酶。此外, 在基础原理上发展了新的技术, 比如后来的反转录 PCR、定量 PCR 及芯片 PCR 等新技术。本文就 PCR 技术在 RA 中的应用与发展做一简单综述。

1 PCR-SSO 反向杂交法和 PCR-SSP 法在 RA 中的应用

PCR-SSO 即 PCR 序列特异性寡核苷酸扩增分析, 其基本检测原理是顺序特异性寡核苷酸作为探针, 用同位素或者是非放射性核素标记, 然后与 PCR 扩增的目标产物片段杂交, 根据阳性斑点判断基因型。此种方法如果在基因型较多时需要数

量较多的探针每个 DNA 进行多次杂交,操作繁琐,所以后来在此基础上形成了 PCR-SSO 反向杂交技术,即将各种不同的探针固定于同一张膜上,再将 PCR 产物标记,以 PCR 产物(待测基因 DNA)反过来与探针杂交。这样一次即可完成多个等位基因分析,此种方法灵敏度高、特异性强、需要样本量少。

PCR-SSP 即 PCR 序列特异性引物,其基本检测原理是设计出特异性引物,借助 PCR 获得的特异性产物,可通过电泳分析带型决定基因的类型,这极大地简化了实验操作步骤,简单易行。PCR-SSO 和 PCR-SSP 主要用于基因分型的研究,下面介绍这两种方法在 RA 患者中的应用。

人类白细胞分化抗原(HLA)-DR4 为 RA 的易感因素^[1], HLA-DR4 携带者在一些细小病毒等病原体感染时,可在短期内发展成 RA,这较 HLA-DR 阴性者时间短,朱乃硕等^[2]用 PCR-SSO 法研究发现 RA 患者 HLA-DR4 表达率要高于健康对照组。后来研究发现 CD25 和 CD28 等共刺激分子也可能与 RA 的发生、发展相关^[3-4]。顾国浩等^[5]用 PCR-SSP 研究发现 HLA-DR4 阳性的活动性 RA 患者的活动度明显高于 HLA-DR4 阴性者,表现为 C 反应蛋白(CRP)显著增高者高达 78.6%,另外 HLA-DR4 阳性 RA 患者以 IgG、IgA 增高为主,而 HLA-DR4 阴性者则以 IgM 增高为主,提示 HLA-DR4 基因与 RA 发生、发展密切相关,这与朱乃硕等^[2]的研究结果相似。活性 T 细胞,尤其是细胞毒性 T 细胞在 RA 的病理损伤中起重要作用,而共刺激分子 CD28 在 T 细胞特异性激活中是不可缺少的^[6-7],CD25 是白细胞介素 2 受体 α (IL-2R α)分子,主要分布于活化 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞上,白细胞介素-2(IL-2)与之结合后发挥生物学活性。顾国浩等^[5]研究发现活动性 RA 患者 CD28⁺细胞百分比明显低于健康对照组,提示 CD28 分子在 RA 的免疫失调和关节炎炎症中起重要作用,活动性 RA 患者 CD25⁺淋巴细胞明显增高,表明患者淋巴细胞处于高度活化状态^[3],活动性 RA 患者 CD25 表达上升而 CD28 表达下降^[4]。

通过以上几种指标可以看出用这两种方法可以从基因水平检测与 RA 相关的因素但是这两种方法各有优缺点。PCR-SSP 和 PCR-SSO 在操作时标本需要量不多,但是需要大量的试剂,PCR-SSO 在分析时检测成本高,PCR-SSP 在检测时不易自动化,重复实验需要重提 DNA 且必须使用紫外凝胶成像仪保留原始资料极大地增加了实验成本。并且两者在 HLA 基因分型时不能识别非经典的 HLA,所以这些基因是否与 RA 有关需要进一步研究。

2 差异显示 PCR 在 RA 患者中的应用

高等动物在生命活动过程中,由于基因的选择性表达、各种物理化学因素导致的突变及生理因素等会导致基因表达图谱的差异。分析比较不同条件下基因表达差异能够帮助了解组织分化发育及疾病的发生机制。

差异显示 PCR 技术是将随机引物和锚定 cDNA 的引物结合使用,利用一系列的 oligo(dT)引物,逆转录真核生物细胞中全部表达的 mRNA,通过 PCR 扩增的方法,转换成 cDNA 双链,再利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,将有差异的片段分开,筛选出目的基因。

基因在不同组织细胞中的表达有差异,在细胞的不同阶段和状态中的表达也有差异,研究基因表达谱的变化有助于理解细胞分化、增生、细胞周期的调节和细胞衰老凋亡的过程。差异显示 PCR(DD-PCR)是一种以反转录 PCR 为基础的研究基因表达差异的技术,可用于肿瘤和多种疾病的分子遗传学研

究,是筛选差异表达基因的有效方法。DD-PCR 基本原理是取两种从不同组织或细胞中分离出来的细胞质 RNA 或 mRNA 做为模板,利用可能的 12 种不同序列的寡核苷酸作为引物 oligo(dT)进行逆转录,逆转录合成的 12 种互补 DNA(cDNA)几乎代表真核生物某一特定细胞中所有 mRNA,通过 PCR 扩增的方法,转换成 cDNA 双链,再利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,将有差异的片段分开,筛选出目的基因。DD-PCR 是筛选差异表达基因比较有效的方法之一。有研究者设计的第三代 DD-PCR 引物中,5'端引物为 8 种,3'引物仍为 3 种,它们的组合(共 24 组)将覆盖所有的 mRNA 序列^[8-9],利用 DD-PCR 对 RA 患者滑膜细胞基因进行分析。

王吉村等^[10]用差示 PCR 技术检测 RA 患者滑膜细胞中高表达基因发现,RA 患者滑膜细胞高表达 HSP70,并且这与 Schett 等^[11]用免疫组化研究的结果一致,他们认为,这是由于在炎症因子或切力作用下,滑膜细胞细胞内热休克蛋白因子-1 的转录活性增高所致。王夏^[12]用实时荧光定量 PCR 在研究内质网基因表达时发现非结构蛋白(UPR)通路基因 ATF6, IRE1 表达水平与病程呈正相关。之前也有研究表明蛋白热休克蛋白(HSPs)和 ER 伴侣分子如免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP)被证明能激发 B 和 T 细胞免疫活性。在 RA 患者,滑膜组织内过度表达的 BIP 对滑膜 T 细胞有高度的选择性^[13-14]。同时研究者还用差示 PCR 技术检测了 RA 患者体内的蛋白酶 B 基因,发现 RA 患者滑膜细胞高表达组织蛋白酶 B 的基因^[10]。这些研究结果都表明 DD-PCR 是筛选差异表达基因比较有效的方法之一。

3 反转录 PCR 在 RA 患者中的应用

反转录 PCR(RT-PCR)是一种以细胞内总 RNA 或者 mRNA 为材料进行体外扩增的技术。由于 PCR 中的耐热的 DNA 酶(Taq 酶)不能以 RNA 或 mRNA 为模板,所以首先要对 RNA 或 mRNA 进行反转录生成与之互补的 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行扩增。RNA、DNA 印迹杂交技术、原位杂交组化的进行,提取 RNA 需标本剂量大、细胞数多,一般外周血需 50 mL 分离淋巴细胞方可提取 RNA,进行 RNA 电泳后转膜杂交。有研究者应用经典的 RNA 印迹杂交和 RT-PCR 两种技术进行实验,表明 RT-PCR 与 RNA 印迹方法完全具有可比性、相似性,认为 RT-PCR 是研究基因表达高效、敏感的方法,且所需 RNA 量极少。

林琳^[15]用 RT-PCR 检测 RA 患者外周血单个核细胞(PBMC)中白细胞介素-17A(IL-17A)mRNA 的表达水平发现在 RA 患者 PBMC 中 IL-17AmRNA 的表达水平明显增高并与疾病活动程度呈正相关。有研究者在实验中发现 RA 患者关节滑液中白细胞介素-17(IL-17)水平明显高于骨性关节炎患者滑液中水平^[16]。通过一系列细胞因子的作用,IL-17 上调了 Cyr61 表达,参与慢性炎症反应^[17-18],增强了 RA 关节的胶原破坏和重新合成、骨质的破坏及关节软骨的破坏^[19]。孟明等^[20]研究表明 RA 患者外周血中 iNKT 细胞频率与干扰素- γ (IFN- γ)/白细胞介素-4(IL-4)比值呈负相关。裴明等^[21]用 RT-PCR 研究发现 RA 患者的滑膜中高度表达白细胞介素 1 受体拮抗剂(IL-1Ra)。这表明细胞因子在 RA 患者发病中起着重要作用,可以用 RT-PCR 准确高效地检测出过度表达的异常相关基因,可分析 mRNA 是否异常及是否由其导致基因表达异常,可直接从基因水平显示与 RA 的相关因素。

基于 RT-PCR 技术的原理,Yamamoto 等^[22]建立了一种分析 T 细胞克隆型的方法,即 RT-PCR/单链构象多态性分析

(SSCP)。SSCP 可以检测 DNA 序列之间的不同,进行 DNA 序列差异分析,在非变性条件下,单链 DNA 可自身折叠呈现一种由内部分子相互作用形成的三维构象,这种构象由单链 DNA 分子内的碱基顺序决定,它影响了 DNA 在非变性凝胶中的迁移率。相同长度但不同核苷酸序列的 DNA 由于在凝胶中的不同迁移率而被分离。迁移率不同的条带可被银染或者荧光标记引物检测,然后用 DNA 自动测序进行分析。RT-PCR/SSCP 法是根据不同 T 细胞受体 (TCR) β 链 V 区中 CDR3 碱基序列的不同,来分析 T 细胞克隆型。其不同于常用的在体外建立抗原特异性 T 细胞克隆后,再分析 T 细胞克隆型方法的优点是,即使在特异性抗原不明的情况下,也能直接分析体内聚集的 T 细胞克隆型。赵文明等^[23]采用 RT-PCR/SSCP 法,比较分析一种自发性 RA 小鼠模型-SKG 小鼠(发病初期与后期关节内聚集的 T 细胞克隆型的变化,结果显示 SKG 小鼠自发性关节炎动物模型与 TCR $V\beta_2$ 和 $V\beta_8.2$ 的 T 细胞克隆型关系密切。此前有研究报道人的 RA 与 TCR $V\beta_3$ 、 $V\beta_4$ 、 $V\beta_{17}$, II 型胶原蛋白诱导的大鼠 RA 模型与 TCR $V\beta_{8.2}$ 、 $V\beta_4$ 、 $V\beta_{17}$, II 型胶原蛋白诱导的小鼠 RA 模型与 TCR $V\beta_2$ 、 $V\beta_5$ 、 $V\beta_8$ T 细胞克隆型关系密切^[24-25]。这些研究结果均显示某些 TCR $V\beta$ 型的 T 细胞与 RA 的发展密切相关。RA 的自身抗原不明确,而 RT-PCR/SSCP 的主要优点就是在特异性抗原不明的情况下,也能直接分析体内聚集的 T 细胞克隆型,所以 RT-PCR/SSCP 很适合用于对 RA 患者的 T 细胞克隆分型分析。

4 定量 PCR 在 RA 中的检测应用

近年来定量 PCR 广泛用于检测 RA 患者中基因水平的异常。定量 PCR 有荧光定量 PCR (FQ-PCR) 又称为实时 PCR,还包括水解探针 (TaqMan probe) 技术、杂交探针技术、分子信标技术。

FQ-PCR 的基本原理是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法,在 PCR 反应体系中加入 SYBR Green I 染料,该染料能选择性地掺入直双连 DNA 分子中,并且产生强烈的荧光,荧光信号的检测在每一个循环的延伸期完成后进行,其结合的荧光信号与 DNA 水平成正比。

焦志军等^[26]用定量 PCR 检测 RA 患者外周血中单个核细胞 Notch 基因表达,结果显示 RA 患者外周血中存在一群高表达 Notch3 的活化 T 细胞。之后焦志军等^[27]用流式细胞术和定量 PCR 技术,分别在蛋白质水平和 mRNA 表达水平检测 FoxP3 表达,其研究结果显示 RA 活动期时 $CD4^+CD25^+$ FoxP3⁺ 调节性 T 细胞明显减少,这群调节性 T 细胞可能参与了 RA 病理进程。曹新国等^[28]用套式实时定量 PCR 技术检测外周血单核细胞中 FOXP3⁺ mRNA 基因表达,发现 $CD4^+CD25^+$ T 细胞数量与 FOXP3⁺ mRNA 基因表达水平呈正相关。与此类似,Zappia 等^[29]在研究幼年型特发性关节炎 (JIA) 时也发现,患者外周血中 $CD4^+CD25^+$ 数量少于健康人,而病情较轻或有自限倾向的患者外周血 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞数相对较高且表达较多的 FoxP3 基因,这些结果表明 T 细胞在 RA 发病过程中具有重要病理作用,研究其具体作用机制对 RA 的病因研究和治疗具有重要作用。荀春华等^[30]用实时荧光定量 PCR 技术检测 miRNA-146a 在 RA 患者外周血单个核细胞表达水平,并且同时用免疫法检测血清 CRP、RF、IL-17、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平,分析 RA 患者外周血单个

核细胞 miRNA-146a 表达水平与血清 CRP、RF、IL-17、TNF- α 水平的相关性,结果显示 RA 患者外周血单个核细胞的 miRNA-146a 高表达,且与血清 CRP、IL-17、TNF- α 水平呈明显正相关。Kong 等^[31]的研究发现 Sirt1 可以抑制核因子 κ B (NF- κ B) 的转录活性,从而抑制炎症细胞因子的产生,如 TNF- α 、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 等,丁永利等^[32]用 FQ-PCR 检测 II 型胶原蛋白诱导的关节炎 (CIA) 小鼠去乙酰化酶 1 (Sirt1)、MMP-13、基质金属蛋白酶组织抑制物 1 (TIMP-1) mRNA 的表达,同时用 ELISA 检测小鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-17、IL-4 和白细胞介素-10 (IL-10) 的水平,结果发现在 CIA 小鼠中 Sirt1 过表达,并且过表达 Sirt1 的小鼠中血清细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-17 水平比对照组明显降低,而 IL-4 水平升高,这与之前的研究相似,因此 Sirt1 可作为新的治疗点,不过这有待于更多的研究。Lin 等^[33]也用 FQ-PCR 检测 RA 患者外周血中单个核细胞诱骗受体 3 (DcR3) mRNA 的水平发现 RA 患者中 DcR3 mRNA 的表达明显高于健康者,DcR3 是一种可溶性肿瘤坏死因子受体超家族成员,可与肿瘤坏死因子配体 LIGHT、FasL 和 TLIA 竞争结合其相应的受体如 HVEM、Fas 和 DcR3。不过由于 DcR3 缺乏胞内区,不会传导凋亡信号^[34]。DcR3 主要表现为抑制细胞凋亡,调节细胞生长、分化及免疫等作用,与多种疾病的发生和发展密切相关^[35],结合研究结果表明 DcR3 在 RA 发生、发展中具有重要作用,可能通过抑制凋亡途径进行,这有待于进一步研究。

FQ-PCR 技术是近年来新发明的定量 PCR 技术,定量更准确并且具有更高的灵敏度和特异性,除此之外还有其他的优点:(1)通过显示系统实时监测 PCR 的扩增过程;(2)反应完成后可直接得到实验结果,无需打开反应管对产物进行电泳检测,从而避免了开盖检测环节形成的气溶胶对实验室造成的污染。

5 错配 PCR 技术在 RA 患者中的应用

许多的研究表明 IL-17A 在 RA 的发病中具有重要作用,IL-17 上调了 Cyr61 的表达,参与慢性炎症反应^[15-18]。田辉等^[36]通过错配 PCR 技术提高人源化抗 hIL17A 单链抗体 (scFv) 的亲和力,为进一步开发治疗 RA 的人源化抗体药物奠定基础。错配 PCR 技术是抗体体外亲和力提高的一种可行性方法,在保证与抗原结合能力的基础上提高了其亲和力和中和活性。

细菌感染引起 RA 的原因一直备受关注,近年来检测 RA 患者体内细菌内毒素的研究也越来越多,有研究发现 RA 患者体内存在葡萄球菌肠毒素 e 的基因,检出率为 13.25%^[37]。

上述是 PCR 技术在 RA 中的应用,随着 PCR 技术的不断发展,精密度、特异度、灵敏度不断提高,尤其是近年来广泛应用的实时荧光定量 PCR 技术,可对异常表达基因实时定量检测。通过 PCR 对 RA 患者基因表达的分析可以为 RA 的诊断和治疗提供更可靠的依据,减轻 RA 患者的痛苦,达到早期诊断早期治疗的目的。但是,上述研究只是针对 RA 患者基因方面的检测,至于其具体临床应用及其针对异常基因的药物研制还应继续研究,并且其疗效的好坏需要更多的临床试验证明。PCR 技术不断发展,每种技术具有各自的优缺点,在具体应用时应结合实际情况和目的选择合适的方法。通过更多的研究进一步探讨 RA 的发病机制和早期诊断方法,为 RA 的诊断、治疗、预后提供更多、更可靠的依据。

参考文献

[1] 朱乃硕,王亚新,王福庆,等. 中国人群 HLA-DR4 等位基因结构

- 及其与类风湿关节炎相关性研究[J]. 中华医学杂志, 1994, 74(7):428-430.
- [2] 朱乃硕, 林性玉, 王亚新, 等. 中国人群 MHC-II 类抗原 DR4 基因体外扩增定型分析及其与类风湿关节炎相关性的研究[J]. 中国免疫学杂志, 1992, 8(3):155-160.
 - [3] Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets; doubt no more[J]. J Immunol, 1991, 12(8):256-257.
 - [4] 张红, 高敏, 马东来, 等. 活动性类风湿关节炎患者免疫检测分析[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1997, 21(6):361-362.
 - [5] 顾国浩, 洪宏, 彭群新, 等. HLA-DR4、CD25 和 CD28 在类风湿性关节炎致病中的作用[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(6):361-362.
 - [6] 李玉杰. 共刺激分子 CD28:CTLA4/B7 及 CD40/CD40L 和 SLE [J]. 国外医学:免疫学分册, 2003, 26(3):116-120.
 - [7] Dutmer EF, Bakker WD, Verhoeven A, et al. Rheumatoid factor measured by fluorimmunoassay: a responsive measure of rheumatoid arthritis disease activity that is associated with joint damage [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(7):603-607.
 - [8] Liang P, Pardee AB. Differential display. A general protocol [J]. Mol Biotechnol, 1998, 10(3):261-267.
 - [9] 龙华, 范清宇. 改良差示 PCR 技术分离人成骨肉瘤转移基因片段 [J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(12):1038-1041.
 - [10] 王吉村, 药立波, 吕厚山, 等. 用差示 PCR 法筛选类风湿性关节炎滑膜细胞中的高表达基因 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(4):289-292.
 - [11] Schett G, Redlich K, Xu Q, et al. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs [J]. J Clin Invest, 1998, 102(2):302-311.
 - [12] 王夏. 内质网应激相关基因在自身免疫性疾病中的表达 [D]. 合肥:安徽医科大学, 2012.
 - [13] Shoda H, Fujio K, Shibuya M, et al. Detection of autoantibodies to citrullinated BiP in rheumatoid arthritis patients and pro-inflammatory role of citrullinated BiP in collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(6):191.
 - [14] Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease [J]. Cell, 2008, 134(5):743-756.
 - [15] 林琳. 类风湿关节炎患者 TH17 细胞及其相关细胞因子的表达及临床意义 [D]. 大连:大连医科大学, 2011.
 - [16] Rho J, Takami M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems [J]. Mol Cells, 2004, 17(1):1-9.
 - [17] Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, et al. The CCN family: a new class of inflammation modulators [J]. Biochimie, 2011, 93(1):377-388.
 - [18] 李会丹, 孙悦, 火蓉芬, 等. 组蛋白去乙酰化酶 1 通过 NF- κ B 调控炎症性滑膜细胞表达 Cyr61 [J]. 现代免疫学, 2014, 34(1):1-6.
 - [19] Van Bezooijen RL, Van Der Wee-Pals L, Papapoulos SE, et al. Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction in vitro [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(10):870-876.
 - [20] 孟明, 陈丹, 许鸣华, 等. 类风湿关节炎患者 iNKT 细胞频率与 IFN- γ /IL-4 的相关性研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, 35(3):213-218.
 - [21] 裴明, 于长隆, 曲绵域. 骨关节炎和类风湿性关节炎滑膜中 IL-1 受体拮抗剂三种同工型的表达及其生物学意义 [J]. 中国运动医学杂志, 2000, 19(4):368.
 - [22] Yamamoto K, Sakoda H, Nakajima T, et al. Accumulation of multiple T cell clonotypes in the synovial lesions of patients with rheumatoid arthritis revealed by a novel clonality analysis [J]. Int Immunol, 1992, 4(11):1219-1223.
 - [23] 赵文明, 山本一彦. 类风湿关节炎小鼠关节聚集的 T 细胞克隆型变化的分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(1):70-72.
 - [24] Ye XJ, Aelion J, Endres RO, et al. Evidence for preferential T cell receptor V β gene usage and T cell clonal expansion in the synovium of BB rats with early-onset collagen-induced arthritis [J]. Cell Immunol, 1998, 183(2):81-89.
 - [25] Bridges SL, Moreland LW. T-cell receptor peptide vaccination in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 1998, 24(3):641-650.
 - [26] 焦志军, 王文红, 陈蕾, 等. 定量 PCR 检测类风湿关节炎患者外周血单个核细胞 Notch 基因表达 [J]. 江苏大学学报:医学版, 2007, 17(6):534-536.
 - [27] 焦志军, 尤海燕, 陈蕾, 等. 类风湿性关节炎患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞检测及意义 [J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(10):936-938.
 - [28] 曹新国, 王礼文. 套式实时荧光定量 PCR 检测人外周血单个核细胞中 FOXP3 mRNA [J]. 临床检验杂志, 2006, 24(4):289-291.
 - [29] Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy [J]. Blood, 2005, 106(5):1755-1761.
 - [30] 荀春华, 胡志坚, 韩峰, 等. 类风湿性关节炎患者 microRNA-146a 的表达及与血清学指标的相关性 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(5):529-530.
 - [31] Kong S, Yeung P, Fang D. The class III histone deacetylase sirutin 1 in immune suppression and its therapeutic potential in rheumatoid arthritis [J]. J Genet Genomics, 2013, 40(7):347-354.
 - [32] 丁永利, 陈星, 蔡一强, 等. 过表达 Sirt1 调节胶原蛋白诱导的关节炎细胞因子平衡 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(10):1034-1038.
 - [33] Lin WW, Hsieh SL. Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and Cancer [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(7):838-847.
 - [34] Xiong G, Guo H, Ge X, et al. Decoy receptor 3 expression in esophageal squamous cell carcinoma: correlation with tumour invasion and metastasis [J]. Biomarkers, 2011, 16(2):155-160.
 - [35] Huang ZM, Kang JK, Chen CY, et al. Decoy receptor 3 suppresses TLR2-mediated B cell activation by targeting NF- κ B [J]. J Immunol, 2012, 188(12):5867-5876.
 - [36] 田辉, 白福良, 徐黎明, 等. 错配 PCR 技术提高抗 hIL17A 单链抗体亲和力的研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(7):722-725.
 - [37] Zahiri Yeganeh S, Ataee RA, Alishiri GH, et al. Bacteriological and molecular assessment of staphylococcal enterotoxin e in the blood of patients with rheumatoid arthritis [J]. Jundishapur J Microbiol, 2015, 8(2):16621.

(收稿日期:2015-10-18)