

[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(18): 1373-1375.

[12] 赵丹彤, 郭昌龙, 闫惠平, 等. 高通量测序对原发性胆汁性胆管炎患者个体水平外周血 B 细胞受体免疫球蛋白重链互补决定区 3 免疫组库特征的初步研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(11): 851-852.

[13] 牟君成, 赵昕, 王文昕. 肝抗原自身抗体检测对自身免疫 · 短篇论著 ·

性肝病的诊断价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 451-452.

[14] 施漪雯, 马红. 预后不佳的原发性胆汁性胆管炎相关因素及治疗策略[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(25): 873-875.

(收稿日期: 2019-06-16 修回日期: 2019-11-02)

白细胞介素-37 在类风湿关节炎患者外周血单个核细胞中的表达及意义*

柯庆喜¹, 黄震^{2#}, 余红岚², 陈思达², 束振华², 武红梅^{3△}

(1. 贵阳市第一人民医院检验科, 贵州贵阳 550001; 深圳市龙岗中心医院:

2. 检验科; 3. 内分泌科, 广东深圳 518116)

摘要:目的 探讨类风湿关节炎(RA)患者外周血单个核细胞(PBMC)中白细胞介素(IL)-37 的表达水平及意义。方法 选取 RA 患者 60 例, 其中活动期和稳定期各 30 例纳入研究。另外, 以健康体检者 30 例作为对照组。收集上述人群外周血标本, 分离外周血中的血清和 PBMC, 用实时荧光定量 PCR 检测 PBMC 中 IL-37 mRNA 的表达水平; 用 ELISA 法检测血清中 IL-37 的水平, 同时检测血清中类风湿因子(RF)和抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体水平, 并对其进行比较分析。结果 RA 患者 PBMC 中 IL-37 mRNA 及血清 IL-37 表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$), 而 RA 活动期患者 PBMC IL-37 mRNA 和血清 IL-37 表达水平均显著高于稳定期患者($P < 0.05$)。RA 患者血清中 IL-37 的水平与 RF 及抗 CCP 水平均呈正相关(r 分别为 0.384、0.468, $P < 0.05$)。RA 活动期与稳定期患者血清 IL-37 水平与 RA 患者病情诊断评分均呈正相关(r 分别为 0.792、0.563, $P < 0.05$)。结论 抑炎性因子 IL-37 在 RA 患者中呈高表达, 在 RA 的疾病发展进程中可能起着负向调节作用。

关键词: 类风湿关节炎; 细胞因子; IL-37

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.06.031

文章编号: 1673-4130(2020)06-0754-04

中图法分类号: R446.6

文献标识码: B

类风湿关节炎(RA)是以累积周围关节为主的慢性炎症性自身免疫病, 表现为滑膜衬里细胞增生、间质大量炎性细胞浸润, 以及血管翳的形成及软骨和骨组织的破坏等^[1]。RA 的发病机制尚不完全清楚, 现有的研究证实炎性细胞因子网络在 RA 的滑膜炎中起着关键作用, RA 滑膜组织产生的细胞因子网络, 是引起炎症反应、蛋白水解、细胞募集和增殖的重要介质。白细胞介素(IL)-37 是一种抗炎细胞因子, 目前研究发现 IL-37 在多种疾病中起到保护作用, 特别是对系统性红斑狼疮^[2]、克罗恩病^[3]、病态肥胖^[3]等自身免疫性疾病以及脂多糖(LPS)诱导的感染性休克方面具有明显的抗炎保护作用。活动性 RA 患者滑膜内层高表达 IL-37, 而在健康人群中却不表达^[4]。IL-37 作为抑炎性因子, 可能通过介导一种负反馈机

制来抑制炎症, 这提示 IL-37 参与了 RA 的发病进程。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 对照组 收集 2018 年 1—8 月在贵阳市第一人民医院体检中心体检的 30 例健康标本, 其中男 13 例, 女 17 例, 年龄 23~68 岁, 平均(34.4±6.2)岁, 经检查无急慢性病史、无遗传病家族史、无自身免疫性疾病。

1.1.2 疾病组 收集 2018 年 1—8 月在贵阳市第一人民医院就诊的 RA 患者 60 例。诊断符合 2010 年美国风湿病学会(ACR)/欧洲抗风湿病联盟(EULAR) RA 评分标准^[5]。排除重度感染、严重心脑血管病、肝肾疾病、恶性肿瘤、活动性结核病。并根据临床资料计算类风湿性关节炎疾病活动性评分(DAS), 将其分

* 基金项目: 深圳市龙岗区经济与科技发展专项项目(20160606173055384, 20160606173542416)。

共同第一作者。 △ 通信作者, E-mail: wuhongmei-62@163.com。

为活动期 RA 患者 30 例,其中男 8 例,女 22 例,年龄 20~72 岁,平均(47.32±13.21)岁,稳定期 RA 患者 30 例,其中男 12 例,女 18 例,年龄 26~76 岁,平均(48.41±14.68)岁。本研究经贵阳市第一人民医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 IL-37 水平 采集患者清晨空腹静脉血 3 mL。离心后取上清,置于-20℃保存待测。全部标本一次性检测。血清 IL-37 测定采用 ELISA,试剂盒购自武汉华美生物公司。操作严格按照说明书进行。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 提取患者外周血单个核细胞(PBMC),采用 Trizol 法提取总 RNA。按宝生物 Prime Script RT Master Mix 试剂盒说明进行 cDNA 合成。IL-37 基因特异性引物(根据 GENBank 登录号 NM_014439 的 IL-37 的基因序列设计)及看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物均由广州英骏公司合成,引物序列见表 1。采用 SYBR Green 实时荧光定量检测技术进行目的基因的检测,按照宝生物公司 SYBRRPremix Ex Taq™ II 试剂盒说明在 ABI Prism 7500 型荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)进行定量检测。反应体系为 20 μL。取样本总 cDNA 总量 2 μL,10 μmol/L。上下游引物各 0.8 μL,加入试剂盒其他成分。PCR 反应条件:预变性 95℃ 30 s 后,95℃ 5 s,60℃ 34 s,共 40 个循环。每组实验重复 3 次。根据熔解曲线控制每个样品的扩增特异性。每一个样品目的基因扩增的循环数(Ct)都依据 GAPDH 进行校正,得出 ΔCt(Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH})。目标基因表达差异以疾病组相对于对照组的倍数表示,即检测基因的差异为 2^{-ΔΔCt}(ΔΔCt = ΔCt_{疾病组} - ΔCt_{对照组})。

1.2.3 类风湿因子(RF)和抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体检测 血清 RF 的检测,采用日立 7600 全自动生化仪及配套试剂,运用免疫透射比浊法,严格按照仪器操作手册测定,血清中抗 CCP 抗体采用罗氏电化学发光免疫分析仪及配套试剂测定。

1.3 统计学处理 所有数据均采用 SPSS16.0 软件分析,数据符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用两样本 t 检验,两变量间的相关性分析采用 Pearson 直线相关性分析方法。P<0.05 表示差异有统计学意义。

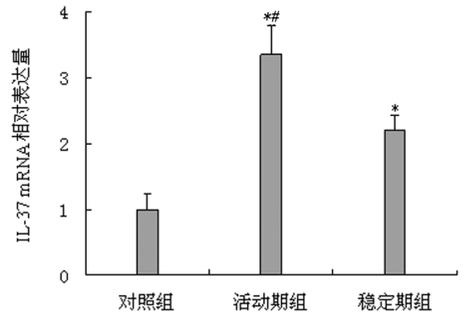
2 结果

2.1 RA 患者 PBMC 中 IL-37 mRNA 的表达检测 以对照组细胞作为空白组样品,计算出各个实验组样品相对于空白组样品的基因相对表达量

(2^{-ΔΔCt})。活动期 RA 患者组 PBMC IL-37 mRNA 的相对表达量与稳定期 RA 患者组 PBMC IL-37 mRNA 的相对表达量分别是对照组的 3.35 倍和 2.19 倍,差异有统计学意义(P<0.05)。而活动期 RA 患者组 IL-37 mRNA 相对表达量与稳定期 RA 患者组比较,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 1。

表 1 IL-37 引物序列表

基因	引物序列(5'~3')	扩增片段(bp)
IL-37		
上游引物	5'-TTA GAA GAC CCG GCT GGA AGC C-3'	
下游引物	5'-AGA TCT CTG GGC GTA TGT AGT-3'	196
GAPDH		
上游引物	5'-ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG-3'	
下游引物	5'-TTC TAG ACG GCA GGT CAG GT-3'	204



注:与对照组比较,*P<0.05;与稳定期组比较,**P<0.05。

图 1 不同组别 RA 患者 PBMC IL-37mRNA 相对表达量

2.2 血清 IL-37 ELISA 检测结果 根据直线回归方程式代入各样本吸光度值,计算出所有样本的 IL-37 浓度,结果显示 RA 患者血清 IL-37 水平明显高于对照组[(71.27±23.56)pg/mL vs. (17.13±5.64)pg/mL],差异有统计学意义(t=17.81,P=0.000)。通过临床资料分析,进一步将 RA 患者分为活动期组与稳定期组,结果显示与稳定期 RA 患者[(55.13±13.55)pg/mL]比较,活动期 RA 患者血清 IL-37 的水平[(87.41±19.68)pg/mL]明显增高,差异有统计学意义(t=8.99,P=0.000)。

表 2 不同组别 RA 患者血清 IL-37 水平与病情诊断评分相关性分析

组别	r	P
活动期组	0.792	0.001
稳定期组	0.563	0.004

2.3 RA 患者血清抗 CCP 抗体、RF 水平与 IL-37 水平相关性分析 RA 患者血清 IL-37 水平与抗 CCP 抗体、RF 抗体的水平呈正相关(r=0.468,P=

0.001; $r=0.384, P=0.004$), 见图 2、3。

2.4 IL-37 血清水平与 RA 诊断评分相关性 活动期组与稳定期组血清 IL-37 水平与 RA 患者病情诊断评分均呈正相关($P<0.05$), 见表 2。

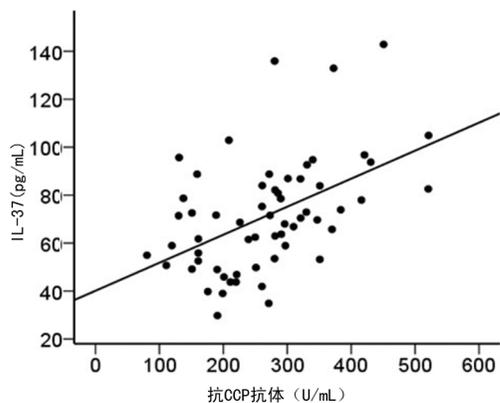


图 2 RA 患者血清 IL-37 水平与抗 CCP 抗体的相关性

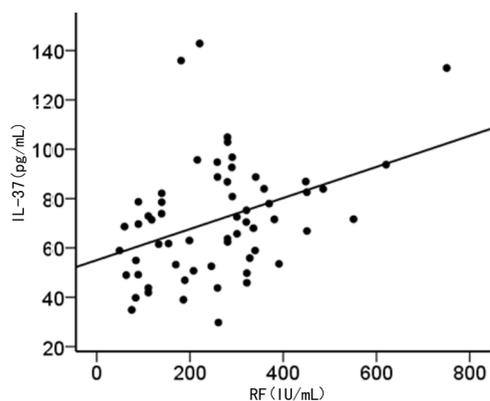


图 3 RA 患者血清 IL-37 水平与 RF 的相关性

3 讨 论

RA 是以累及周围关节为主的多系统炎症性的自身免疫病。RA 的发病机制尚不完全清楚, 现有的研究证实, 炎性细胞因子网络在 RA 的滑膜炎症中起着关键作用, RA 患者滑膜组织中存在着大量 CD4⁺ T 的 Th1 细胞, 它所产生的 IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-18 等细胞因子, 具有很强的促炎作用^[6]。IL-18 能够活化单核/巨噬细胞, 诱导干扰素- γ (IFN- γ) 产生, 导致 RA 炎症反应加重。研究表明 IL-37 能与 IL-18BP 和 IL-18R α 的 Fc 段结合形成三元络合物, 抑制 IL-18 的信号传导通路, 促使细胞核因子 κ B 不发生移位, 减少了 IFN- γ 的合成^[7-8], 提示 IL-37 可通过抑制 IFN- γ 的合成来减轻 RA 炎症反应。IL-37 通过抑制树突状细胞活性来实现其抗炎作用^[9]。DCs 可激活 RA 滑膜的自身反应性 T 细胞, 导致炎症的持续存在。本实验研究表明 RA 患者中 IL-37 水平增加, 使其可以抑制树突状细胞活性, 减轻 DCs 引起的固有免疫应答反应。IL-37 与 Smad3 相结合发挥炎症抑制效应, 研究证实 Smad3 参与了 IL-37 胞内信号转导^[10]。Smad3 可与

TGF- β 结合使 Smad3 磷酸化, 并转移至胞核内影响基因转录, IL-37 可部分通过 Smad3 行使其功能, 促进 TGF- β 细胞因子抑制属性, 从而发挥其抗炎功效。

研究对收集的 RA 患者病例, 依据类风湿性关节炎疾病活动性评分标准, 将其分为活动期组和稳定期组。应用实时荧光定量 PCR 检测 RA 患者 PBMC IL-37 mRNA 的表达, 发现 RA 患者组的 IL-37 mRNA 表达量明显高于对照组, 并且活动期组的上调量高于稳定期组, 两组比较差异有统计学意义, 提示 IL-37 在 RA 的发病过程中发挥了作用, 可能参与了 RA 的炎症反应调节。现有的研究证实炎症因子能够上调人滑膜细胞 IL-37 的表达^[11]。本研究应用 ELISA 法检测了 RA 患者血清 IL-37 水平, 结果显示, RA 患者血清 IL-37 水平显著高于对照组。活动期组 IL-37 水平明显高于稳定期组。进一步分析 IL-37 水平与 RA 临床指标相关性, 结果表明 RA 患者 IL-37 水平与 RF、抗 CCP 抗体水平有显著相关性, 患者 RA 疾病诊断评分与血清 IL-37 水平有显著相关性, 提示 IL-37 与 RA 患者严重程度呈正相关。RF 和抗 CCP 抗体作为 RA 特异性诊断和判断预后的重要指标; 其高滴度的抗体水平常提示患者病情较重, 进展快, 骨破坏严重, 这提示 IL-37 水平与 RA 的病情严重程度具有一定相关性, IL-37 可作为评估病情严重程度的指标而进一步指导临床诊治。

综上所述, RA 患者中 IL-37 水平显著增加, 并且活动期患者 IL-37 水平明显高于稳定期患者, 表明 IL-37 参与了 RA 的发病过程。RA 患者血清 IL-37 水平与 RF、抗 CCP 抗体等 RA 自身抗体呈正相关, 提示 IL-37 可作为评估病情严重程度的指标。IL-37 是一种抗炎因子^[12], 在 RA 发病机制中有重要作用, 在 RNA 的病情判断中有潜在应用价值, 但由于本试验样本量较少, 试验人群范围有限, 还需进一步研究与探讨。

参考文献

[1] YE L, JIANG B, DENG J, et al. IL-37 alleviates rheumatoid arthritis by suppressing IL-17 and IL-17-triggering cytokine production and limiting Th17 cell proliferation [J]. J Immunol, 2015, 194(11): 5110-5119.

[2] SONG L, QIU F, FAN Y, et al. Glucocorticoid regulates interleukin-37 in systemic lupus erythematosus [J]. Clin Immunol, 2013, 33(1): 111-117.

[3] JIA H, LIU J, HAN B. Reviews of interleukin-37: functions, receptors, and roles in diseases [J]. BioMed Res Int, 2018, 12(3): 8-11.

[4] ROSS R, GRIMMEL J, GOEDICKE S, et al. Analysis of

nuclear localization of interleukin-1 family cytokines by flow cytometry[J]. Immunol Methods, 2013, 387 (1/2): 219-227.

- [5] 黄嘉,黄慈波. 类风湿关节炎的诊断治疗进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2010, 8(1): 1-3.
- [6] SCHMITZ J, OWYANG A, OLDHAM E, et al. IL-33 an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines[J]. Immunity, 2005, 23(5): 479-490.
- [7] MORETTI S, BOZZA S, OIKONOMOU V, et al. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10 (11): 1-15.
- [8] DINARELLO C A, NOLD-PETRY C, NOLD M, et al. Suppression of innate inflammation and immunity by interleukin-37[J]. Eur J Immunol, 2016, 46(5): 1067-1081.

[9] LUO Y, CAI X, LIU S, et al. Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111 (42): 15178-15183.

- [10] ZHAO M, LI Y, GUO C, et al. IL-37 isoform D downregulates pro-inflammatory cytokines expression in a Smad3-dependent manner[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 582.
- [11] 柯庆喜, 张志伟, 赵付前, 等. 肿瘤坏死因子- α 对人滑膜成纤维细胞白细胞介素-37 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(5): 691-693.
- [12] WANG L, QUAN Y, YUE Y, et al. Interleukin-37: a crucial cytokine with multiple roles in disease and potentially clinical therapy[J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 4711-4719.

(收稿日期: 2019-09-22 修回日期: 2020-01-18)

• 短篇论著 •

银屑病患者趋化素样因子 1、T 淋巴细胞亚群及炎性因子的水平分析

刘容君¹, 徐 森^{2△}, 吕仁杰³

(荆门市第二人民医院: 1. 皮肤科; 2. 中医康复科; 3. 肾内科, 湖北荆门 448000)

摘要:目的 探讨银屑病患者趋化素样因子 1 (CKLF1)、炎性因子及 T 淋巴细胞亚群的水平。方法 选取 2016 年 3 月至 2019 年 2 月于该院门诊确诊的寻常型银屑病患者 34 例为银屑病观察组, 另选取 21 例健康志愿者作为健康对照组; 采集银屑病患者和健康对照组外周静脉血标本, 分离备用。通过免疫标记法检测外周血 T 淋巴细胞亚群; 采用流式细胞仪检测 CKLF1 在外周血细胞中的表达。结果 观察组外周血 CKLF1 表达水平低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。观察组 CD3⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分比低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。观察组的外周血细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。银屑病患者治疗后与治疗前比较, 外周血 T 淋巴细胞、红细胞、中性粒细胞中, CKLF1 的表达水平明显增高 ($P < 0.05$)。结论 本研究表明银屑病患者外周血中的 CKLF1 表达水平与 CD3⁺ T 淋巴细胞百分比均明显下降, 这两个因素在银屑病的缓解中起着重要作用。

关键词: 趋化素样因子 1; 银屑病; T 淋巴细胞; 相关性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.06.032

中图分类号: R446.6

文章编号: 1673-4130(2020)06-0757-03

文献标识码: B

银屑病不但是一种基因遗传疾病, 也是一种慢性炎症性皮肤病。银屑病不及时治疗, 会导致各种疾病的发生, 累及心脏、肝脏、肾脏等器官, 如果患者发生感染还会危及生命。银屑病春夏季发病率较高, 临床以鳞屑和红斑为主, 是在多种环境诱导因素的刺激下发生的免疫异常性、慢性炎症性、增生性皮肤病^[1]。银屑病的诱因较多, 发病机制至今尚未完全阐明, 涉及许多免疫分子和细胞因子^[2]。趋化素样因子 1

(CKLF1) 是影响银屑病的一种因子, 和银屑病有密切关系, 位于染色体 16q22, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成^[3]。CKLF1 是由免疫细胞和非免疫细胞分泌的细小蛋白颗粒^[4], 可对免疫反应和过敏反应进行调节^[5], 在造血和血管生成等一系列生理过程中发挥非常重要的作用^[6]。银屑病的皮肤损害可发生于全身各处, 但多见于头皮、四肢伸侧^[7]。CKLF1 的调控在机体的免疫反应及白细胞的趋化过程中起着重要的作

[△] 通信作者, E-mail: 455043901@qq.com.