

· 基础研究 ·

类风湿关节炎患者 CD4⁺CD25⁺CD127⁻调节性 T 细胞 CXCR4 的研究

蒋宇¹, 汤郁^{1*}, 陈颀¹, 史伟¹, 龚勋¹, 费小明²

¹江苏大学附属医院风湿免疫科, ²血液科, 江苏 镇江 212001

[摘要] 目的:研究类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者外周血(peripheral blood, PB)及关节滑液(synovial fluid, SF)中调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)表达CXC趋化因子受体4(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)的水平以及与疾病活动标志物的相关性,探讨CXCR4⁺Treg参与RA的发病机制。方法:①收集51例RA患者及40例健康人外周血,常规关节穿刺术抽取10例RA患者和8例骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者膝关节滑液,流式细胞术检测外周血及关节液中CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg及CXCR4⁺Treg细胞比例。收集RA患者临床资料,与外周血Treg及CXCR4⁺Treg比例进行相关性分析。②Ficoll密度梯度离心法分离RA患者和健康人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),免疫磁珠正选试剂盒分选CD4⁺T细胞置于Transwell上室,下室加入趋化因子配体12(C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12),24 h后收集下室细胞,流式细胞术检测迁移到下室的CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg。结果:①与健康对照相比,RA患者外周血Treg及CXCR4⁺Treg比例均降低;其中高疾病活动度组和中疾病活动度组比例均低于缓解组($P < 0.05$);RA患者外周血CXCR4⁺Treg细胞比例与血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)水平及28个关节疾病活动度评分(DAS28)呈负相关。②RA患者关节液Treg及CXCR4⁺Treg比例较OA患者关节液增高。③RA患者关节液中Treg及CXCR4⁺Treg细胞比例较外周血增高。④与健康对照相比,RA患者外周血CXCR4⁺Treg迁移率增加。结论:类风湿关节炎患者外周血Treg、CXCR4⁺Treg比例下降,并与病情活动度相关;炎症关节滑液中Treg及CXCR4⁺Treg高于外周血及OA患者。RA患者关节液增多的Treg细胞可能是由外周血通过CXCR4迁移而来。

[关键词] 类风湿关节炎;调节性T细胞;CXCR4;滑液

[中图分类号] R593.22

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)04-459-09

doi:10.7655/NYDXBNS20230403

Study on CXCR4 of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis

JIANG Yu¹, TANG Yu^{1*}, CHEN Di¹, SHI Wei¹, GONG Xun¹, FEI Xiaoming²

¹Department of Rheumatology and Immunology, ²Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

[Abstract] **Objective:** To study the expression of C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) on regulatory T cells (Tregs) in peripheral blood (PB) and synovial fluid (SF) of rheumatoid arthritis (RA) and its correlation with clinical characteristics; so as to explore the pathogenesis of RA involving CXCR4⁺Tregs. **Methods:** ①The PB samples of 51 RA patients and 40 healthy volunteers were collected, and the knee SF samples of 10 patients with RA and 8 patients with osteoarthritis (OA) were collected by puncture of joint cavity. Then the ratio of CD4⁺CD25⁺CD127⁻Tregs and CXCR4⁺Tregs in PB and SF was detected by flow cytometry. Clinical data of RA were collected, and the correlation analysis was made with Tregs and CXCR4⁺Tregs ratio in PB. ②The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of RA and healthy volunteers were separated by Ficoll density gradient centrifugation method. CD4⁺T cells were sorted by immunomagnetic positive selection kit and placed in the upper chamber of Transwell. C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12) was added to the lower chamber. After 24 hours, the cells of the lower chamber were collected, and the CD4⁺CD25⁺CD127⁻Tregs migrated to the lower chamber were detected by flow cytometry. **Results:** ①Compared with healthy controls, the ratios of

[基金项目] 国家自然科学基金(81571582);江苏省社会发展重点项目-临床先进技术(BE2020681)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: tangtang@ujs.edu.cn

Tregs and CXCR4⁺ Tregs in PB of RA decreased, and the ratios in the high disease activity group and the middle disease activity group were lower than those in the remission group ($P < 0.05$). The ratio of CXCR4⁺ Tregs in PB of RA was negatively correlated with the level of erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) levels and DAS28 score. ②The ratios of Tregs and CXCR4⁺ Tregs in SF of RA were significantly higher than those in SF of OA. ③The ratios of Tregs and CXCR4⁺ Tregs in SF of RA were higher than those in PB. ④Compared with healthy controls, the mobility of Tregs in PB of RA increased significantly. **Conclusion:** The ratios of Tregs and CXCR4⁺ Tregs in PB of RA decreased, which are related to disease activity. Tregs and CXCR4⁺ Tregs in SF of joint inflammation are higher than those in PB and SF of OA. Tregs increased in SF of RA may be migrated from PB through CXCR4.

[Key words] rheumatoid arthritis; regulatory T cell; CXCR4; synovial fluid

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(04): 459-467]

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以多关节炎为主要表现的自身免疫性疾病, 其特征是慢性滑膜炎, 随着疾病的进展, 对关节组织造成破坏, 导致关节畸形, 影响日常活动^[1-2]。调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是一群高表达 CD25 分子的 CD4⁺ T 细胞, 研究表明 CD127 在大多数 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞上以低水平表达, CD4、CD25 和 CD127 可以作为筛选高度纯化的 Treg 细胞群的表面标志^[3-4]。既往研究显示, RA 受累关节滑液中存在大量 Treg 聚集, Treg 通过抑制自身反应性效应 T 细胞来控制自身免疫的发生和发展, 其功能活性受损导致的免疫紊乱可能是 RA 的发病机制^[5-6]。CXC 趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 是趋化因子配体 12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) 的受体, Treg 表达 CXCR4, 并在体外响应其配体迁移。研究表明 CXCR4/CXCL12 信号在调节 Treg 向组织迁移和维持外周 Treg 的稳态中起重要作用^[7]。本研究拟探讨 CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Treg 及 CXCR4⁺ Treg 在 RA 患者外周血及关节滑液中的比例变化, 分析 Treg 细胞和 CXCR4 的水平与疾病活动度和炎性指标的关系, 现总结报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

RA 组 51 例, 为 2021 年 10 月—2022 年 7 月在江苏大学附属医院风湿免疫科住院的 RA 患者, 其中, 男 13 例、女 38 例, 年龄 (60.78±10.29) 岁, 病程 0.5~46 年, 中位病程 10 (2, 17) 年, 均符合 2010 年美国风湿病学会/欧洲抗风湿病联盟 (ACR/EULAR) 的 RA 诊断标准^[8]。骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 组 8 例, 为同期来本院就诊的原发性膝骨关节炎患者,

其中, 男 3 例, 女 5 例, 年龄 (57.89±11.41) 岁, 均符合中国骨关节炎诊疗指南 (2021 年版) 中的 OA 诊断标准^[9]。健康对照 (healthy control, HC) 组 40 例, 为同期本院健康体检者, 其中, 男 11 例, 女 29 例, 年龄 (56.53±10.86) 岁, 均无相关免疫性疾病和近期感染史。本研究经江苏大学附属医院伦理委员会审核批准 (伦理审查号 KY2022K1009), 且所有研究对象进入研究前签署书面知情同意书。

红细胞裂解液、荧光抗体试剂 CD4-PerCP、CD25-APC 和 CD127-PE (BD Pharmingen 公司, 美国); CXCR4-FITC (Abcam 公司, 英国); 淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物); EasySep™ CD4 正选试剂盒及磁珠分选器 (STEMCELL 公司, 加拿大); CXCL12 蛋白 (MedChemExpress 公司, 美国); RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国); Transwell 趋化小室 (北京兰杰柯); 流式细胞仪 CANTO10C (BD Pharmingen 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 患者资料收集和分组

收集患者资料, 包括临床资料: 性别、年龄、病程、28 关节疾病活动度评分 (disease activity score in 28 joints, DAS28); 实验室资料: 血沉 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)、抗环瓜氨酸肽 (cyclic citrullinated peptide, CCP) 抗体。按照 DAS28 评分将 RA 患者分为缓解组 (DAS28 < 2.6)、低疾病活动度组 (2.6 ≤ DAS28 ≤ 3.2)、中疾病活动度组 (3.2 < DAS28 ≤ 5.1) 和高疾病活动度组 (DAS28 > 5.1); 按照 RF 水平将 RA 患者分为 RF 阴性组 (RF < 20 U/mL) 和 RF 阳性组 (RF ≥ 20 U/mL), 按照抗 CCP 抗体水平将 RA 患者分为抗 CCP 抗体阴性组 (抗 CCP 抗

体 < 5 U/mL)、5 U/mL ≤ 抗 CCP 抗体 < 200 U/mL 组和抗 CCP 抗体 ≥ 200 U/mL 组。

1.2.2 外周血 CXCR4⁺ Treg 的检测

用肝素抗凝负压采血管分别抽取 RA 组及 HC 组静脉外周血,取 80 μL 全血加入流式上样管,分别加入 5 μL CD4 抗体、20 μL CD25 抗体、5 μL CD127 抗体及 2 μL CXCR4 一抗混匀,并于 4 °C、避光条件下孵育 30 min;加入 1 mL 红细胞裂解液混合均匀,常温避光放置 10 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,随后 PBS 缓冲液洗涤 1 次,加入 100 μL Buffer 缓冲液重悬细胞;加入 0.5 μL CXCR4 二抗混匀,4 °C 避光孵育 20 min;PBS 缓冲液洗涤 2 次,200 μL Buffer 缓冲液重悬并上机检测,每个样本收集 5 000~10 000 个细胞,采用 FlowJo10.0 分析检测数据,记录 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 及 CXCR4⁺ Treg 的百分比。

1.2.3 关节滑液 CXCR4⁺ Treg 的检测

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离关节液单个核细胞(synovial fluid mononuclear cell, SFMC)。具体方法如下:关节穿刺术抽取 RA 和 OA 组膝关节腔积液 5~10 mL,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1~2 mL PBS 重悬,缓慢加至 4 mL 淋巴细胞分离液上层,2 500 r/min 离心 20 min,吸取中间白膜层单个核细胞,PBS 洗涤 2 次(1 500 r/min 离心 5 min),Buffer 缓冲液重悬细胞,调节 SFMC 浓度为 1×10⁷个/mL,随后按上述步骤标记细胞表面 CD4、CD25、CD127 及 CXCR4 分子,并上机检测 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 及 CXCR4⁺ Treg 的比例。

1.2.4 磁珠分选

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离 RA 患者和健康人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),按 EasySep™ 说明书使用 CD4 免疫磁珠正选试剂盒分选 CD4⁺ T 细胞,流式检测 CD4⁺ T 细胞纯度大于 95%,用于后续实验。

1.2.5 Treg 迁移测定

使用 CXCL12 作为趋化介质,对纯化的外周血 CD4⁺ T 细胞进行迁移测定。用含有 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 重悬 CD4⁺ T 细胞,将含 2×10⁵ 个 CD4⁺ T 细胞的 100 μL 细胞悬液置于 Transwell 上室,下室加入 600 μL 含 0.1 μg/mL CXCL12 的 RPMI 1640+10% FBS 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h 后收集下室细胞,用 CD4、CD25 和 CD127 抗体染色,并通过流式细胞术检测迁移到下室的 Treg 细胞数。流式细胞术检测纯化的外周血

CD4⁺ T 细胞中 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 的比例,计算 Treg 细胞迁移率:迁移率(%)=迁移到下室的 Treg 的细胞数/(加入上室的 CD4⁺ T 细胞中 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 的比例×2×10⁵)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件分析数据,计量资料满足正态分布时以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验或配对 *t* 检验;不符合正态分布时以中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,两组间比较采用非参数秩和检验。多组间比较,符合正态分布时采用 *F* 检验、组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,不符合正态分布或方差不齐时采用 Kruskal-Wallis *H* 检验、组间两两比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;相关性分析正态分布资料采用 Pearson 相关,不符合正态分布的资料用 Spearman 等级相关, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

共纳入 RA 患者 51 例,其中,女 38 例,男 13 例,年龄(60.78 ± 10.29)岁,病程 0.5~46 年,中位病程 10(2,17)年。OA 患者 8 例,其中,男 3 例,女 5 例,平均年龄(57.89 ± 11.41)岁。HC 组 40 例,其中,男 11 例,女 29 例,平均年龄(56.53 ± 10.86)岁,RA 组与 HC 组年龄及性别分布无统计学差异($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 RA 患者临床资料

Table 1 Clinical characteristic of RA patients

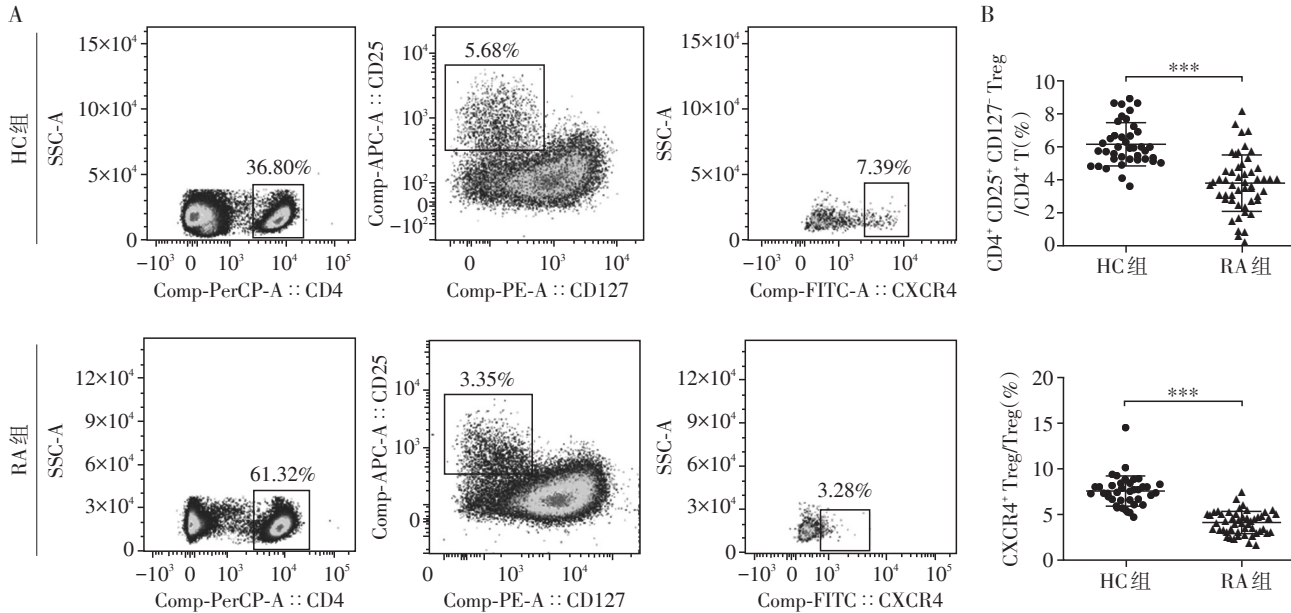
临床资料	数值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	60.78 ± 10.29
性别(女/男, <i>n</i>)	38/13
病程[年, $M(P_{25}, P_{75})$]	10(2, 17)
DAS28 评分(分, $\bar{x} \pm s$)	4.37 ± 1.53
RF 阳性率[<i>n</i> (%)]	33(64.71)
抗 CCP 抗体阳性率[<i>n</i> (%)]	38(74.51)
5~ < 200 U/mL	15(29.41)
≥ 200 U/mL	23(45.10)
ESR[mm/h, $M(P_{25}, P_{75})$]	28(14, 57)
CRP[mg/L, $M(P_{25}, P_{75})$]	9.2(3.2, 22.7)
IL-6[pg/mL, $M(P_{25}, P_{75})$]	20.62(5.92, 44.49)

2.2 RA 患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 及 CXCR4⁺ Treg 比例

RA 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg 占 CD4⁺ T 细胞比例为(3.79 ± 1.72)%, 低于 HC 组

(6.16 ± 1.31)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); RA 组外周血表达 CXCR4⁺ Treg 占 Treg 细胞比例为

(4.08 ± 1.26)%, 低于 HC 组 (7.54 ± 1.67)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 1)。



A: HC组和RA组外周血CXCR4⁺Treg比例的代表性流式结果; B: HC组($n=40$)和RA组($n=51$)外周血Treg和CXCR4⁺Treg的比例。两组比较, *** $P < 0.001$ 。

图1 RA患者与HC组外周血Treg及CXCR4⁺Treg的比例

Figure 1 The ratio of Treg and CXCR4⁺Treg in peripheral blood between RA and healthy control

2.3 不同疾病活动度RA患者外周血Treg及CXCR4⁺Treg比例

将RA患者根据DAS28评分分为缓解、低疾病活动度、中疾病活动度和高疾病活动度4组, 比较不同疾病活动度患者外周血中Treg比例有无差异, 结果显示RA高疾病活动度组外周血Treg比例低于缓解组 [$(3.01 \pm 1.72)\%$ vs. $(5.25 \pm 2.28)\%$, $P < 0.05$], 其他组别之间比较无明显差异(图2A)。随后比较4组患者外周血中CXCR4⁺Treg比例有无差异, 结果显示高疾病活动度组外周血CXCR4⁺Treg比例显著低于缓解组 [$(3.15 \pm 0.96)\%$ vs. $(5.45 \pm 0.77)\%$, $P < 0.001$] 和低疾病活动度组 [$(3.15 \pm 0.96)\%$ vs. $(5.39 \pm 1.21)\%$, $P < 0.001$]。此外, 中疾病活动度组CXCR4⁺Treg比例低于缓解组 [$(4.17 \pm 0.91)\%$ vs. $(5.45 \pm 0.77)\%$, $P < 0.05$], 其他组别之间比较无明显差异(图2D)。

将RA患者分成RF阳性、RF阴性、抗CCP抗体阴性、 $5 \leq$ 抗CCP抗体 < 200 、抗CCP抗体 ≥ 200 组进行外周血检测, 结果显示各组间RA患者外周血Treg以及CXCR4⁺Treg比例均无明显差异(图2B、C、E、F)。

相关性分析结果显示RA患者外周血Treg比例以及CXCR4⁺Treg比例与DAS28评分、CRP、ESR及IL-6水平呈负相关, 与病程无明显相关性(图3、4)。

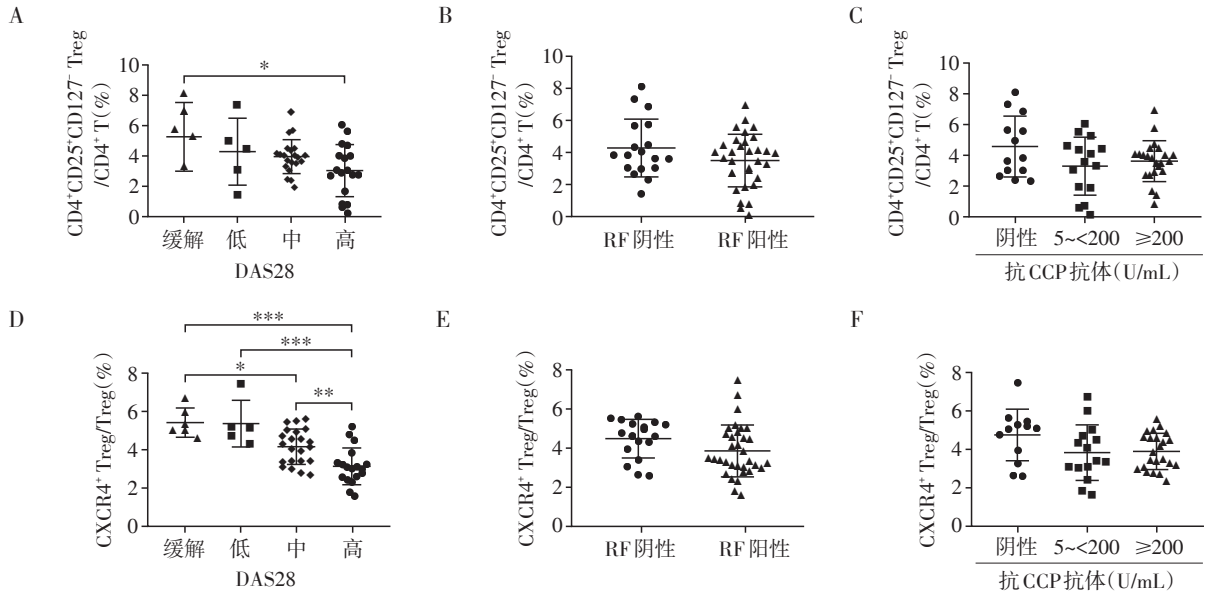
2.4 RA患者关节滑液CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg及CXCR4⁺Treg比例

RA患者关节液中CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg占CD4⁺T细胞比例高于OA患者 [$(11.09 \pm 1.54)\%$ vs. $(6.22 \pm 1.11)\%$, $P < 0.001$, 图5], RA患者关节液中CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg占CD4⁺T细胞比例高于OA患者 [$(11.09 \pm 1.54)\%$ vs. $(3.31 \pm 1.20)\%$, $P < 0.001$, 图6]。

RA患者关节液中CXCR4⁺Treg比例 (12.93 ± 2.65)%较RA患者外周血 (4.29 ± 1.07)%及OA患者关节液 (6.18 ± 0.98)%均显著增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$, 图5、6)。

2.5 RA患者外周血Treg的迁移能力

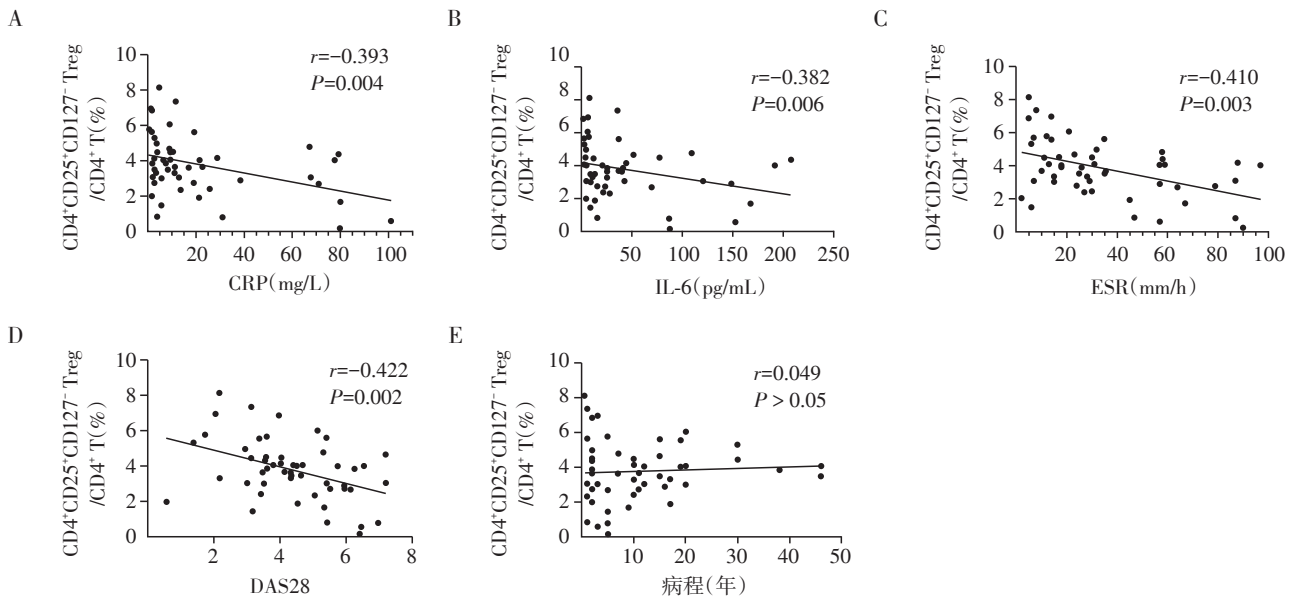
磁珠正选外周血CD4⁺T淋巴细胞后即刻进行流式细胞术检测其纯度, 结果显示, 纯度达99.55% (图7A)。Transwell小室实验结果显示, RA患者外周血Treg细胞迁移率显著高于HC组外周血Treg细胞迁移率 [$(31.26 \pm 8.30)\%$ vs. $(16.84 \pm 5.25)\%$, $P < 0.001$, 图7B、C]。



A: 缓解组(n=6)、低疾病活动度组(n=5)、中疾病活动度组(n=22)和高疾病活动度组(n=18)患者外周血中Treg比例; B: RF阳性组(n=18)、RF阴性组(n=33)患者外周血中Treg的比例; C: 抗CCP抗体阴性(n=13)、5~<200 U/mL(n=15)、≥200 U/mL(n=23)患者外周血中Treg的比例; D: 缓解组(n=6)、低疾病活动度组(n=5)、中疾病活动度组(n=22)和高疾病活动度组(n=18)患者外周血中CXCR4⁺Treg比例; E: RF阳性组(n=18)、RF阴性组(n=33)患者外周血中CXCR4⁺Treg的比例; F: 抗CCP抗体阴性(n=13)、5~<200 U/mL(n=15)、≥200 U/mL组(n=23)患者外周血中CXCR4⁺Treg的比例。多组均数间两两比较,**P*<0.05,***P*<0.01,****P*<0.001。

图2 不同组别RA患者外周血中Treg比例及CXCR4⁺Treg比例的比较

Figure 2 The comparison of Treg and CXCR4⁺Treg in peripheral blood of different groups of RA



A: Treg比例与CRP水平呈负相关; B: Treg比例与IL-6的水平呈负相关; C: Treg比例与ESR水平呈负相关; D: Treg比例与DAS28评分水平呈负相关; E: Treg比例与病程无明显相关性。

图3 RA患者外周血中Treg比例与临床指标的相关性分析

Figure 3 Correlation analysis between Treg ratio in peripheral blood of RA and clinical indexes

3 讨论

RA 是以关节滑膜炎为特征的慢性自身免疫性

疾病,多种免疫细胞参与了RA的发生和发展^[10-11],目前认为炎性细胞聚集在RA受累滑膜组织,产生大量炎性细胞因子及细胞因子受体,导致滑膜增生

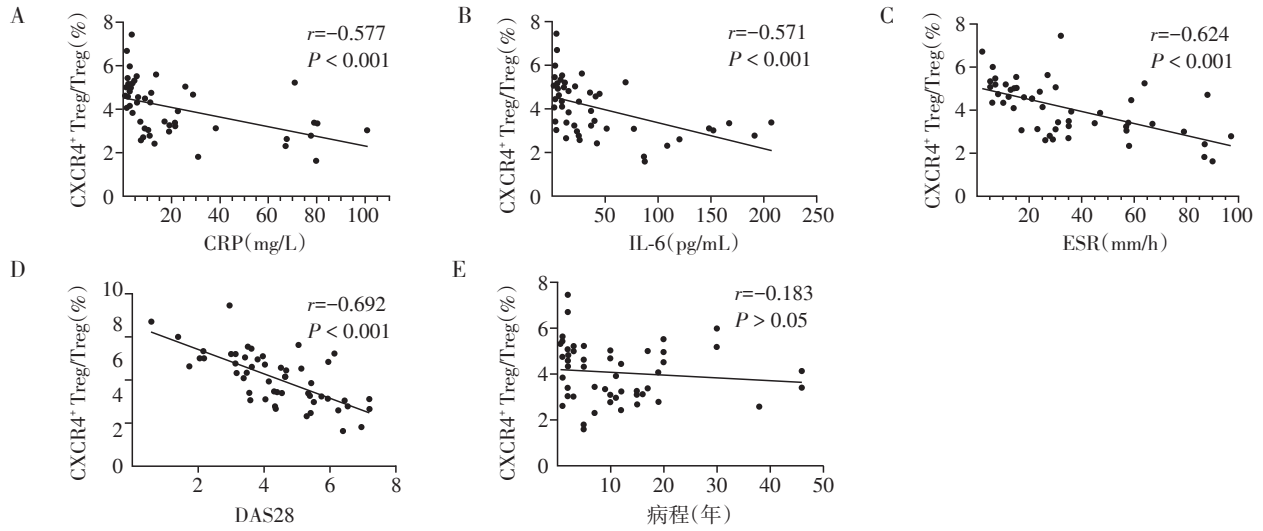
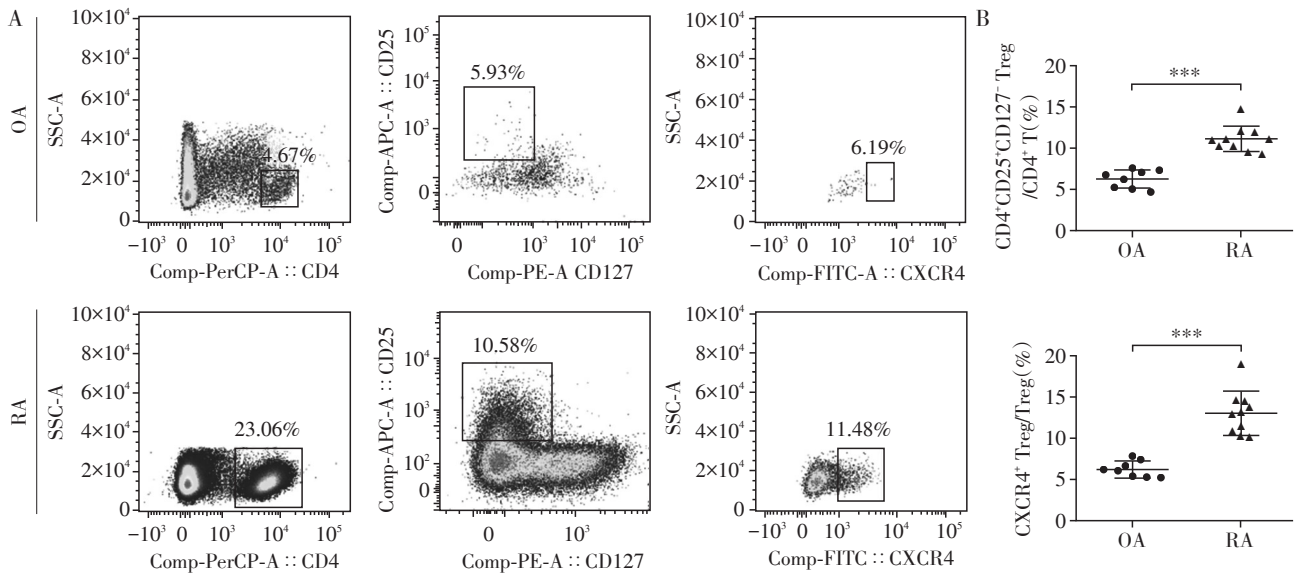


图4 RA患者外周血中CXCR4⁺ Treg比例与临床指标的相关性分析

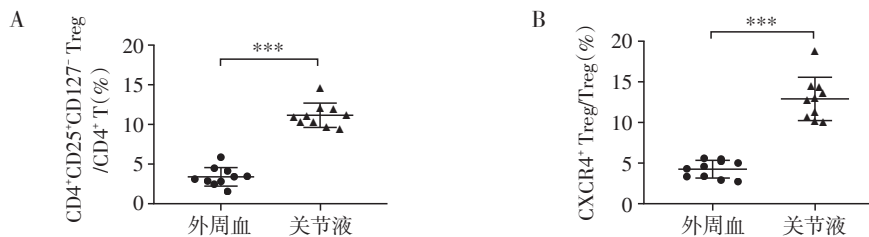
Figure 4 Correlation analysis between CXCR4⁺ Treg ratio in peripheral blood of RA and clinical indexes



A: OA和RA患者关节液CXCR4⁺ Treg比例的代表性流式图; B: OA组(n=8)和RA组(n=10)关节液Treg和CXCR4⁺ Treg的比例。两组比较, ****P* < 0.001。

图5 RA、OA患者关节滑液Treg及CXCR4⁺ Treg比例的比较

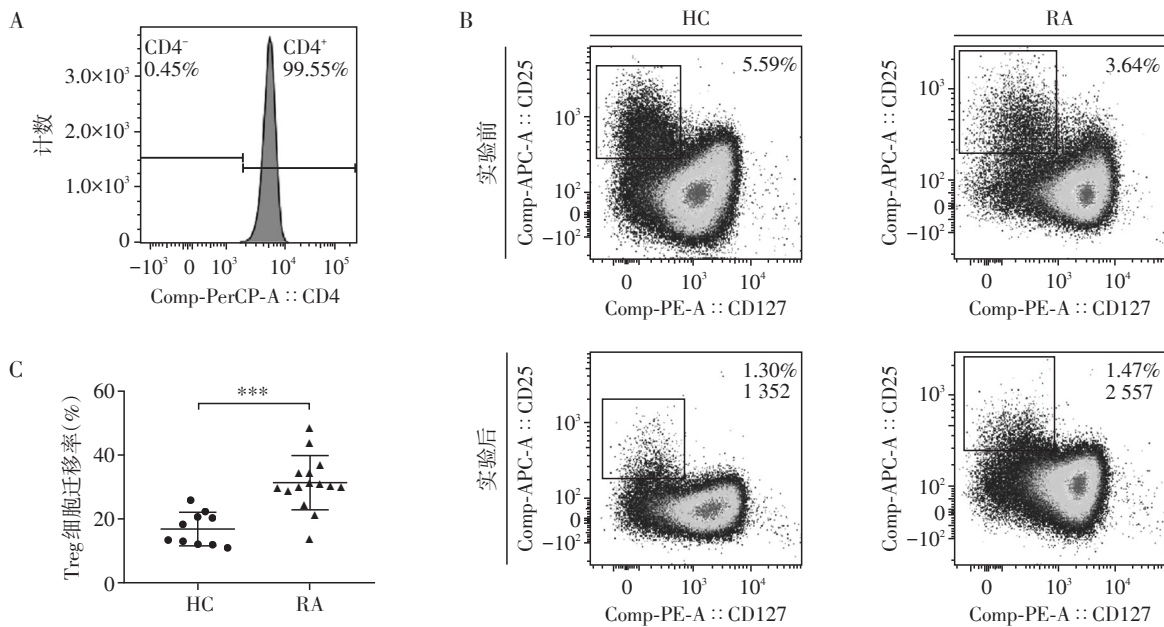
Figure 5 The ratio of Treg and CXCR4⁺ Treg in synovial fluid of RA and OA



A: RA患者外周血和关节液Treg的比例; B: RA患者外周血和关节液CXCR4⁺ Treg的比例。两组比较, ****P* < 0.001, n=10。

图6 RA患者外周血与关节液Treg及CXCR4⁺ Treg的比较

Figure 6 The comparison of Treg and CXCR4⁺ Treg in peripheral blood and synovial fluid of RA



A:磁珠正选外周血CD4⁺T淋巴细胞后进行流式细胞术检测其纯度达99.55%;B:外周血CD4⁺T细胞进行Transwell试验,流式细胞术检测迁移到下室的CD4⁺T细胞中CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg的比例和细胞数的代表性流式结果图;C:RA组(n=15)和HC组(n=10)外周血Treg细胞迁移率的比较。两组比较,***P<0.001。

图7 RA患者与HC组外周血Treg迁移率的比较

Figure 7 The comparison of Treg migration rate in peripheral blood between RA and healthy controls

和软骨破坏^[12-13]。Treg细胞又称调节性T细胞,大量研究表明,Treg细胞在控制自身免疫反应及维持免疫耐受方面起着关键作用^[14-15],在系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)及干燥综合征(Sjogren's syndrome, SS)患者中均发现有Treg细胞的数量及功能的异常,导致机体免疫耐受下降,导致自身免疫反应^[16-17]。既往有研究显示,RA患者外周血中Treg减少^[18-19],受累关节滑液中Treg增加^[20],但也有部分研究发现RA患者外周血Treg比例较健康对照外周血无明显差异^[21-22],可能与标记的Treg细胞表面分子不同有关,也可能与研究所纳入的RA患者治疗方案和疾病活动度不同有关。在本研究中,RA患者外周血CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg细胞比例明显低于健康对照组,且高疾病活动度组低于缓解组,Treg细胞比例与疾病活动指标DAS28评分、CRP、ESR及IL-6水平呈负相关,提示RA患者免疫耐受亦存在缺陷,RA患者外周血Treg细胞比例降低,导致其免疫抑制缺陷,减少对促炎细胞因子的抑制,从而引起关节炎^[23],Treg异常参与了RA的发病机制。课题组进一步研究发现RA患者关节滑液中CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg细胞比例明显高于OA患者关节滑液,提示炎症关节大量Treg聚集。研究显示关节炎环境中的Treg细胞可在IL-6、白

细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等因子的驱动下转化为产生促炎因子的辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)^[24],因此,Treg表达失衡可能参与了RA的发病机制。

为进一步研究RA患者关节液中Treg表达增高的机制,还检测了同一个RA患者关节液与外周血,结果发现关节液中Treg的比例明显高于外周血,因此推测关节液中Treg可能由外周血迁移而来。CXCL12是由骨髓基质细胞分泌的趋化因子,CXCR4是其受体,研究表明CXCL12/CXCR4轴可以介导细胞的定向迁移,Treg细胞在不同自身免疫病的炎症组织中的积聚可能与CXCR4表达上调有关^[13,25-26]。有研究发现RA患者关节液中CXCL12表达显著高于外周血^[11,27],但RA患者炎症关节滑液中Treg细胞CXCR4表达情况的研究较少。Jiao等^[25]发现RA患者和健康对照组间外周血Treg上CXCR4的表达没有明显差异,但关节液中Treg细胞上CXCR4的表达显著增加,与本研究结果相似。本研究中,RA患者关节液中的Treg细胞CXCR4表达水平明显高于RA患者外周血及OA患者关节滑液。鉴于CXCR4可以介导CD4⁺T细胞募集到RA的关节滑膜中^[26],本文推测RA患者关节液中CXCR4⁺

Treg细胞的增加可能是由于这些细胞从外周血迁移到炎症关节中,外周血中Treg细胞上CXCR4低表达可能是迁移后的结果。为了验证以上推测,进一步使用Transwell迁移试验研究RA患者外周血的Treg细胞对CXCL12的迁移反应。由于RA患者外周血Treg细胞比例低于正常对照组,在Transwell体系中上室CD4⁺T细胞数相同的情况下Treg细胞数是减少的,迁移到下室的CXCR4⁺Treg细胞很可能减少,因此用下室CXCR4⁺Treg细胞数来判断RA患者Treg细胞对CXCL12的迁移能力可能存在误判。本研究采用迁移到下室的Treg细胞占上室Treg细胞的比例作为评估RA患者Treg细胞对CXCL12的迁移能力。

本研究还发现,与健康对照相比,RA患者Treg迁移率显著增加,表明RA患者外周血Treg迁移能力增强,RA患者关节液中CXCR4⁺Treg细胞的增加很可能是由外周血迁移而来。将进一步研究RA患者关节液中Treg细胞的迁移能力,由此深入探讨RA患者Treg在关节和外周血中的迁移机制。

综上所述,类风湿关节炎患者外周血Treg细胞减少导致其负调控作用减弱,促进了疾病的发生和发展,而RA患者关节滑液中Treg及CXCR4⁺Treg增加,可能是由于外周血中的Treg迁移到炎症关节中,关节液中Treg细胞聚集,对控制关节炎发挥了一定作用,Treg靶向疗法可能是控制RA疾病发展的新的治疗策略。

[参考文献]

- [1] MAEDA K, YOSHIDA K, NISHIZAWA T, et al. Inflammation and bone metabolism in rheumatoid arthritis: molecular mechanisms of joint destruction and pharmacological treatments[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2871
- [2] KOMATSU N, TAKAYANAGI H. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis-immune cell-fibroblast-bone interactions[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(7): 415-429
- [3] GIGANTI G, ATIF M, MOHSENI Y, et al. Treg cell therapy: how cell heterogeneity can make the difference [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(1): 39-55
- [4] JIANG Q, YANG G C, LIU Q, et al. Function and role of regulatory T cells in rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 626193
- [5] ROSSETTI M, SPREAFICO R, CONSOLARO A, et al. TCR repertoire sequencing identifies synovial Treg cell clonotypes in the bloodstream during active inflammation in human arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(2): 435-441
- [6] ZHANG R, MIAO J, ZHANG K, et al. Th1-like treg cells are increased but deficient in function in rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 863753
- [7] WANG Y, DEMBOWSKY K, CHEVALIER E, et al. C-X-C motif chemokine receptor 4 blockade promotes tissue repair after myocardial infarction by enhancing regulatory T cell mobilization and immune-regulatory function [J]. *Circulation*, 2019, 139(15): 1798-1812
- [8] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN A J, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(9): 1580-1588
- [9] 中华医学会骨科学分会关节外科学组,中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组,国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院),等.中国骨关节炎诊疗指南(2021年版)[J]. *中华骨科杂志*, 2021, 41(18): 1291-1314
- [10] WEYAND C M, GORONZY J J. The immunology of rheumatoid arthritis[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(1): 10-18
- [11] GUO X, XU T, ZHENG J, et al. Accumulation of synovial fluid CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B cells was associated with bone destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14386
- [12] CHEN Z, BOZEC A, RAMMING A, et al. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(1): 9-17
- [13] MASSALSKA M, RADZIKOWSKA A, KUCA-WARNAWIN E, et al. CD4⁺FOXP3⁺T cells in rheumatoid arthritis bone marrow are partially impaired [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 549
- [14] YAN S F, GOLUMBA-NAGY V, KOTSCHENREUTHER K, et al. Membrane-bound IL-6R is upregulated on Th17 cells and inhibits Treg cell migration by regulating post-translational modification of VASP in autoimmune arthritis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 79(1): 3
- [15] 宋洁,王涛,程晨,等.达格列净治疗早期糖尿病肾病的疗效以及对调节性T细胞的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(10): 1409-1414
- [16] WANG D D, HUANG S S, YUAN X R, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(5): 423-431
- [17] RÍOS-RÍOS W J, SOSA-LUIS S A, TORRES-AGUILAR H. T cells subsets in the immunopathology and treatment of Sjogren's syndrome [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(11): 1539

- [18] ZHANG X, ZHANG X L, ZHUANG L L, et al. Decreased regulatory T-cell frequency and interleukin-35 levels in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 5366-5372
- [19] WANG L P, WANG C Y, JIA X Q, et al. Circulating exosomal miR-17 inhibits the induction of regulatory T cells via suppressing TGFBR II expression in rheumatoid arthritis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1754-1763
- [20] SCHEINECKER C, GÖSCHL L, BONELLI M. Treg cells in health and autoimmune diseases: new insights from single cell analysis [J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102376
- [21] 林辉, 张国栋, 唐鸿鹄, 等. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在类风湿关节炎患者免疫耐受失衡中的变化 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(4): 618-622
- [22] WALTER G J, FLESKENS V, FREDERIKSEN K S, et al. Phenotypic, functional, and gene expression profiling of peripheral CD45RA⁺ and CD45RO⁺ CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg cells in patients with chronic rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(1): 103-116
- [23] KOTSCHENREUTHER K, YAN S, KOFLER D M. Migration and homeostasis of regulatory T cells in rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 947636
- [24] WALTER G J, EVANS H G, MENON B, et al. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4⁺CD45ro⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cells [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(3): 627-638
- [25] JIAO Z, WANG W, JIA R, et al. Accumulation of FoxP3-expressing CD4⁺CD25⁺ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2007, 36(6): 428-433
- [26] MELLADO M, MARTÍNEZ-MUÑOZ L, CASCIO G, et al. T cell migration in rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 384
- [27] 俞正, 赵鹏, 张葵, 等. 循环纤维细胞通过CXCR4介导的趋化作用参与类风湿性关节炎发病 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(3): 264-269

[收稿日期] 2022-09-28

(责任编辑: 蒋莉)

欢迎投稿 欢迎订阅