

· 论 著 ·

类风湿性关节炎患者血清、关节液 IL-35 水平的变化及意义

王磊¹, 董红², 孔继昌³, 杨继宏⁴

1. 河北省承德市中医院外一科, 河北 承德 067000; 2. 华北石油总医院骨一科, 河北 任丘 062552;
3. 华北石油总医院内科, 河北 任丘 062552; 4. 华北石油总医院泌尿外科, 河北 任丘 062552

摘要: **目的** 探讨类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者血清、关节液白介素-35(interleukin-35, IL-35)水平变化及其与疾病的相关性。**方法** 选取2013年3月至2015年12月间门诊及住院部诊治的RA发病初期患者74例、RA快速发展期患者98例以及骨关节炎(Osteoarthritis, OA)患者58例为研究对象。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定研究对象的血清和关节液中IL-35水平,免疫比浊法测定血清C反应蛋白(CRP)水平。RA患者的疾病程度通过28个关节活动指数(28-Joint Count Disease Activity Score, DAS28)进行评估。**结果** 与OA患者比较,RA发病初期与RA快速发展期患者实验开始时血清IL-35水平显著升高($P < 0.01$),但应用抗风湿药物治疗12周后,两期患者IL-35水平均下降($P < 0.01$)。与OA患者比较,RA快速发展期患者关节液IL-35水平明显升高,且高于三组患者各时点的血清IL-35水平,差异均有统计学意义($P < 0.01$);治疗12周后降低,接近OA患者关节液IL-35水平。快速发展期RA患者中,关节液IL-35水平与CRP水平($r = 0.327, P < 0.05$)及DAS28值($r = 0.425, P < 0.05$)分别呈现中等相关。**结论** 血清IL-35水平在RA发病初期和快速发展期均升高,且随治疗控制而下降;RA快速发展期关节液IL-35水平与炎症指标和疾病活动度指标相关;提示血清、关节液中的IL-35在RA疾病的进展和控制中发挥着重要作用。

关键词: 类风湿性关节炎; 骨关节炎; 白细胞介素-35; 血清; 关节液; 28个关节活动指数

中图分类号: R 593.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)04-0463-04

Changes and significance of interleukin-35 levels in serum and synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis

WANG Lei*, DONG Hong, KONG Ji-chang, YANG Ji-hong

*First Division of Surgical Department, The Traditional Chinese Medicine Hospitals of Chengde, Chengde, Hebei 067000, China

Abstract: Objectives To study the association of changes of interleukin-35 (IL-35) levels in serum and synovial fluid with the state of illness in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** A total of 172 patients with RA including 74 cases at the early stage of the onset and 98 cases at rapid development stage and 58 patients with osteoarthritis (OA) diagnosed and treated in outpatient and inpatient department between March 2013 and December 2015 were selected as research objects. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect IL-35 levels in serum and synovial fluid. Immunoturbidimetry was used to detect level of serum C-reactive protein. The 28-Joint Count Disease Activity Score (DAS28) was used to assess the disease severity of RA patients. **Results** Compared with OA patients, serum IL-35 levels in RA patients at the early stage of the onset and at rapid development stage increased significantly (all $P < 0.01$), but their levels decreased after therapy of antirheumatic drugs for 12 weeks (all $P < 0.01$). IL-35 level in synovial fluid of RA patients at rapid development stage significantly increased compared with OA patients ($P < 0.01$) and was significantly higher than those in serum levels at each time points in three groups, but it decreased to near the level in synovial fluid of OA patient after treatment for 12 weeks. IL-35 level in synovial fluid in RA patients at rapid development stage was moderately correlated with CRP level ($r = 0.327, P < 0.05$) and DAS28 value ($r = 0.425, P < 0.05$), respectively. **Conclusions**

Serum IL-35 levels increase at the early stage of the onset and at rapid development period, and decrease with disease control after therapy. IL-35 level in synovial fluid at rapid development stage is associated with inflammatory marker and disease activity index. Therefore, IL-35 in serum and synovial fluid play an important role in the progression and control of

disease in RA patients.

Key words: Rheumatoid arthritis; Osteoarthritis; Interleukin-35; Serum; Synovial fluid; 28-Joint Count Disease Activity Score

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性的自身免疫性疾病。患者常常因局部关节或者全身炎症反应造成关节损伤、残疾,使得发病率与死亡率逐渐增高^[1-2]。活化的免疫细胞与滑膜成纤维细胞在 RA 早期产生大量的细胞因子,加重 RA 疾病进程^[3-5]。虽然目前关于 RA 病理机制研究较多,但仍然不十分清楚。白细胞介素(Interleukin, IL)-35 是一种由新近发现的 IL-12 家族成员 EB13 与 p35 亚基共同构成的异二聚体细胞因子^[6-7]。小鼠实验表明,IL-35 能够有效地减弱胶原诱导性关节炎与实验性结肠炎的发生,可能的机制是通过衰减辅助 T 淋巴细胞(Th)1 与 Th17 细胞功能实现的^[8-9]。近期研究表明,IL-35 在人 RA 滑膜组织中表达上调及表现出前致炎性特征^[10]。本研究通过评估 RA 发病初期、快速发展期患者的血清 IL-35 水平及快速发展期患者的关节液 IL-35 水平的变化,探讨其在疾病进程中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2013 年 3 月至 2015 年 12 月间我院门诊及住院部诊治的 RA 患者 172 例为研究对象,并以骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者 58 例为对照组。RA 患者又根据美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)标准^[11]进行快速发展期患者的诊断,依据 ACR/欧洲风湿病防治联合会(European League Against Rheumatism, EULAR)2010 版标准^[12]进行 RA 发病初期患者的诊断,将 172 例 RA 患者分为发病初期组 74 例、RA 快速发展期组 98 例。所有受试对象均签署知情同意书,且经医院伦理委员会批准实施。

1.2 治疗方法 对 RA 发病初期组患者,在研究期间,有 62 例患者接受糖皮质激素(GCS)口服治疗,泼尼松 3 ~ 5 mg, 3 次/d(每日剂量范围 1.25 ~ 15.0 mg);54 例接受氨甲喋呤口服治疗,15 mg,1 次/周(每周剂量范围 10 ~ 20 mg);12 例接受柳氮磺胺吡啶口服治疗(平均每日剂量 2 g);12 例接受来氟米特口服治疗(平均每日剂量 2 mg)。对于快速发展期 RA 患者,采用传统合成的疾病修饰型抗风湿病药物(氨甲喋呤)或者生物治疗(利妥昔单抗)或者两者联合治疗(氨甲喋呤 + 大部分生物制剂和氨甲喋呤 + 托法替尼)进行治疗。RA 发病初期组及快速发展期

RA 患者的疗程均为 12 周。

1.3 RA 患者的疾病程度评估 通过 28 个关节活动指数(28-Joint Count Disease Activity Score, DAS28)进行 RA 患者的疾病程度评估。

1.4 标本采集及指标检测 所有受试对象均于清晨空腹采集肘部静脉血 5 ml,同时实施关节穿刺术,收集关节液。关节液及血液标本进行离心处理(3 000 r/min, 15 min),吸取上清,储存于 -80 °C,备用待测。关节液标本测定之前,需经过 37 °C 水浴孵育解冻。血液标本则在 RA 发病初期、快速发展期及药物治疗 12 周后分别进行采集。采用酶联免疫吸附法(ELISA)对受试对象的血清、关节液中 IL-35、血清抗环瓜氨酸肽(anti-cyclic citrullinated peptide, anti-CCP)抗体及 IgM 类风湿因子(IgM rheumatoid factors, IgM-RF)水平进行测定,在 450 nm 波长处读取吸光度值。采用 Rayto 公司 RT-2100 型酶标仪,严格遵照试剂盒(CUSABIO 中国)说明书进行(USCN Life Science, Wuhan, China)。免疫比浊法测定血清 C 反应蛋白(CRP)水平(AU 400 Olympus 生化分析仪, Japan)。所有因子水平的测定均按照厂家提供的说明书进行操作。IgM-RF 检测结果 > 20 IU/ml 为阳性,抗 CCP 抗体检测结果 > 15 IU/ml 为阳性。

1.5 统计学分析 实验数据采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。正态性分析采用 Kolmogorov-Smirnov 检验,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较采用重复测量多元方差分析及两两比较的 LSD-*t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验。相关性采用 Pearson's 积差相关分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料 RA 发病初期组、RA 快速发展期组及 OA 患者在年龄、性别、抗-CCP 阳性构成方面差异无统计学意义(P 均 > 0.05);而 OA 患者的 BMI 较 RA 发病初期、RA 快速发展期患者增高(P 均 < 0.05)。实验开始时,CRP 水平按 RA 快速发展期组、发病初期组、OA 组之序依次递降,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);OA 患者 CRP 水平较 RA 发病初期及 RA 快速发展期实验开始时均明显降低(P 均 < 0.01)。RA 发病初期及快速发展期患者经治疗 12 周后,DAS28 值、CRP 水平较实验开始时均降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1、表 2。

表 1 各组患者一般临床资料

组别	例数	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	男/女(例)	BMI($\bar{x} \pm s$)	DAS28($\bar{x} \pm s$)	
RA 发病初期组	实验开始	74	49.51 ± 12.34	14/60	24.71 ± 4.25 ^b	5.62 ± 1.14
	治疗 12 周	74	-	-	24.85 ± 5.02 ^b	3.53 ± 0.98 ^a
RA 快速发展期组	实验开始	98	51.12 ± 13.05	26/72	25.37 ± 3.97 ^b	5.01 ± 1.27
	治疗 12 周	98	-	-	25.81 ± 6.07 ^b	3.42 ± 1.19 ^a
OA 组	58	52.29 ± 11.52	16/42	27.49 ± 4.51	-	

注:与本组实验开始比较,^a $P < 0.05$;与 OA 组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 2 各组患者血清指标

组别	例数	CRP(mg/L, $\bar{x} \pm s$)	IgM-RF 阳性 [例(%)]	抗-CCP [例(%)]	
RA 发病初期组	实验开始	74	14.32 ± 6.46	40(54.00)	41(51.35)
	治疗 12 周	74	4.97 ± 1.59 ^a	-	-
RA 快速发展期组	实验开始	98	25.94 ± 10.36 ^a	61(62.24)	58(59.18)
	治疗 12 周	98	4.24 ± 1.15 ^b	-	-
OA 组	58	4.04 ± 1.28 ^{ab}	-	-	

注:与 RA 发病初期组实验开始时比较,^a $P < 0.01$;与 RA 快速发展期组实验开始时比较,^b $P < 0.01$ 。

表 3 各组患者的血清、关节液 IL-35 水平变化情况

组别	例数	IL-35(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)		
		血清	关节液	
RA 发病初期组	实验开始	74	125.34 ± 37.89 ^{bc}	-
	治疗 12 周	74	45.63 ± 15.57 ^{abc}	-
RA 快速发展期组	实验开始	98	148.72 ± 50.69 ^{bc}	459.78 ± 157.34 ^b
	治疗 12 周	98	23.67 ± 9.14 ^{abc}	139.43 ± 81.59 ^a
OA 组	58	10.36 ± 4.78 ^c	131.09 ± 67.71	

注:与本组实验开始时比较,^a $P < 0.01$;与 OA 组比较,^b $P < 0.01$;与 RA 快速发展期实验开始时关节液比较,^c $P < 0.01$ 。

2.2 各组患者的血清、关节液 IL-35 水平变化情况

OA 患者及药物治疗 12 周后的 RA 发病初期、RA 快速发展期患者其血清 IL-35 水平均明显低于两期实验开始时(P 均 < 0.01)。RA 快速发展期患者实验开始时的关节液 IL-35 水平高于 OA 患者关节液水平($P < 0.01$),且明显高于三组患者各时点的血清 IL-35 水平(P 均 < 0.01);药物治疗 12 周后,RA 快速发展期组关节液 IL-35 水平接近 OA 患者关节液水平。见表 3。

2.3 各组患者的血清、关节液 IL-35 水平与 RA 疾病活动度的相关性

相关性分析结果表明,所有 RA 发病初期、快速发展期及 OA 患者,其血清 IL-35 水平与 CRP 水平($r = 0.071, P > 0.05$)、DAS28 值($r = 0.114, P > 0.05$)均无相关性。快速发展期 RA 患者的关节液 IL-35 水平与 CRP 水平($r = 0.327, P < 0.05$)及 DAS28 值($r = 0.425, P < 0.05$)分别呈现中

等相关。

3 讨论

RA 是一种抗原驱动、遗传和环境多因素参与的多系统炎症性自身免疫性疾病,具有持续性、反复发作等特点。但至今 RA 的具体发病机制尚不完全清楚^[13]。OA 是一种以关节软骨的变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节疾病^[14]。既往研究证实,多种炎症介质和细胞因子水平的异常变化在 RA 进程中可能发挥重要作用^[15]。本研究结果显示,与 RA 发病初期患者(实验开始阶段)相比较,经过抗风湿药物治疗 12 周后,患者的 DAS28、CRP 水平均降低,说明 RA 发病初期炎症反应激烈,经过治疗或者发展到一定程度时,炎症反应趋于平缓,引起其他细胞因子水平异常变化^[16]。而 OA 患者较 RA 发病初期患者实验开始时及 RA 快速发展期的 CRP 水平降低,且 BMI 显著高于 RA 两期组,提示肥胖可能促进 OA 的发展,与文献报道一致^[17-18]。

IL-12 家族成员在 RA 发病过程中扮演重要角色,Melis 等^[19]报道 RA 患者血清 IL-12、IL-27 及 IL-23 水平均较对照组升高,且 IL-23 水平与 RA 疾病活动度强相关。IL-35 是新近发现的 IL-12 细胞因子家族成员,其水平变化与不同类型的肿瘤及肿瘤分期相关^[20],在系统性红斑狼疮及炎性肠病患者中,血清 IL-35 水平较对照组降低,与疾病活动度相关^[21]。本研究中,RA 发病初期患者血清 IL-35 即显著升高,在 RA 发病初期及快速发展期药物治疗 12 周后水平降低;而关节液 IL-35 水平在 RA 快速发展阶段显著升高且与疾病进程指数 DAS28 呈现正相关,提示 RA 快速发展期炎症环境下,局部 IL-35 分泌增加,积极参与 RA 进程。本研究还表明,不论在 RA 发病初期还是快速发展期患者中,未发现血清 IL-35 水平与 RA 活动度相关。此外,本研究未观察到任何生物制剂对血清及关节液 IL-35 水平的影响,提示局部产生 IL-35 水平变化可能反映疾病的活动度而不反映治疗的类型,这对了解 RA 的致病机制具有重要作用。此外,研究结果还表明,RA 快速发展期患者关节液 IL-

35 水平升高,且与 CRP 水平相关,可能是滑膜成纤维细胞及免疫细胞激活的结果。

综上所述,本研究显示,RA 发病早期阶段及快速发展阶段,循环 IL-35 水平显著升高而在治疗后降低,同时快速发展阶段关节液中 IL-35 水平与 RA 疾病活动度 DAS28 指数正相关,提示血清、关节液中的 IL-35 在 RA 疾病的进展和控制中发挥着重要作用。

参考文献

- [1] Assis MR, Serafim PA. Rheumatoid arthritis and metabolic syndrome [J]. *Rev Bras Reumatol*, 2016, 56(2): 93-94.
- [2] Maijer KI, Li W, Sasso EH, et al. Does the multi-biomarker disease activity score have diagnostic value in early rheumatoid arthritis and unclassified arthritis? [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(11): 2097-2099.
- [3] Wang W, Shao S, Jiao Z, et al. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(4): 887-893.
- [4] Halvorsen EH, Strønen E, Hammer HB, et al. Interleukin-15 induces interleukin-17 production by synovial T cell lines from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Scand J Immunol*, 2011, 73(3): 243-249.
- [5] Kato H, Fox DA. Are Th17 cells an appropriate new target in the treatment of rheumatoid arthritis? [J]. *Clin Transl Sci*, 2010, 3(6): 319-326.
- [6] Wu S, Li Y, Li Y, et al. Interleukin-35 attenuates collagen-induced arthritis through suppression of vascular endothelial growth factor and its receptors [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34(2): 71-77.
- [7] Thiolat A, Denys A, Petit M, et al. Interleukin-35 gene therapy exacerbates experimental rheumatoid arthritis in mice [J]. *Cytokine*, 2014, 69(1): 87-93.
- [8] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function [J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 566-569.
- [9] Wirtz S, Billmeier U, Mchedlidze T, et al. Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1875-1886.
- [10] Filková M, Vernerová Z, Hulejová H, et al. Pro-inflammatory effects

of interleukin-35 in rheumatoid arthritis [J]. *Cytokine*, 2015, 73(1): 36-43.

- [11] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, 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.
- [12] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(3): 315-324.
- [13] Bearne LM, Byrne AM, Segrave H, et al. Multidisciplinary team care for people with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Rheumatol Int*, 2016, 36(3): 311-324.
- [14] 宋登新, 曹云, 何小文, 等. 退行性骨关节炎软骨细胞差异表达蛋白及功能的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(8): 1953-1956.
- [15] Pahwa R, Kumar U, Das N. Modulation of PBMC-decay accelerating factor (PBMC-DAF) and cytokines in rheumatoid arthritis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 414(1/2): 85-94.
- [16] Moelants EA, Mortier A, Van Damme J, et al. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(6): 393-401.
- [17] Deveza L, Hunter D. An update on the treatment of osteoarthritis in obese patients [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2016, 17(6): 753-755.
- [18] Germanou EI, Chatzinikolaou A, Malliou P, et al. Oxidative stress and inflammatory responses following an acute bout of isokinetic exercise in obese women with knee osteoarthritis [J]. *Knee*, 2013, 20(6): 581-590.
- [19] Melis L, Vandooren B, Kruithof E, et al. Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(3): 618-623.
- [20] Gu X, Tian T, Zhang B, et al. Elevated plasma interleukin-35 levels predict poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 2651-2656.
- [21] Li Y, Wang Y, Liu Y, et al. The possible role of the novel cytokines IL-35 and IL-37 in inflammatory bowel disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 136329.

收稿日期: 2016-12-07 修回日期: 2016-12-23 编辑: 石嘉莹