

· 论 著 ·

# 类风湿关节炎患者急性活动期关节滑膜液 CCL2 和 CCR2 的表达水平及意义

柳毓文, 刘萍, 胡娜

萍乡市人民医院风湿免疫科, 江西 萍乡 337000

**摘要:** **目的** 探究类风湿关节炎患者急性活动期关节滑膜液趋化因子 2(CCL2)、趋化因子受体 2(CCR2) 的表达水平及意义。**方法** 选取 2016 年 1 月至 2017 年 1 月类风湿性关节炎急性活动期患者 49 例(急性活动期组)和稳定期患者 46 例(稳定期组),另选膝关节外伤患者 41 例作为对照组,应用酶联免疫吸附法检测关节滑膜液中 CCL2 含量,应用流式细胞术检测关节滑膜液 CCR2 的表达水平(以 CCR2<sup>+</sup>T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比例表示 CCR2 的表达水平)。**结果** 与对照组和稳定期组相比,急性活动期组关节滑膜液中 CCL2 及 CCR2 水平均显著增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。对照组与稳定期组相比,关节滑膜液 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 CCR2 比例差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。急性活动期患者滑膜液 CCL2 水平与滑膜液 CD4<sup>+</sup>T 细胞 CCR2 表达呈明显正相关( $r = 0.547$ ,  $P < 0.05$ )。急性活动期患者 CCL2 水平和 CD4<sup>+</sup>T 细胞 CCR2 表达水平均与 Lansbury 指数、C 反应蛋白、类风湿因子、红细胞沉降率、28 个关节疾病活动度评分等临床活动指标呈明显正相关( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** 类风湿关节炎患者关节滑膜液中 CCL2 水平增加,CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 CCR2 表达水平增加,二者呈明显正相关,且 CCL2 水平和 CCR2 表达水平与急性活动期临床活动指标呈明显正相关,可作为评估类风湿关节炎活动性的参考指标。

**关键词:** 类风湿性关节炎; 急性活动期; 关节滑膜液; CC 型趋化因子 2; CCR 型趋化因子受体 2

中图分类号: R 593.22 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2018)03-0355-04

## Expressions and significance of CCL2 and CCR2 in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis at acute active stage

LIU Yu-wen, LIU Ping, HU Na

Department of Rheumatology and Immunology, Pingxiang People's Hospital, Pingxiang, Jiangxi 337000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression levels of chemokine 2 (CCL2) and chemokine receptor 2 (CCR2) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA) at acute active stage and their significance. **Methods** From January 2016 to January 2017, 49 RA patients were selected as acute active group (at acute active stage of RA), and 46 RA patients were selected as stable group (at stable stage of RA). At the same time, 41 patients with knee joint injury were served as control group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the level of CCL2 in synovial fluid, and flow cytometry was used to measure the expression level of CCR2 which was presented by the proportion of CCR2<sup>+</sup>T cells in CD4<sup>+</sup>T cells. **Results** Compared with control group and stable group, the level of CCL2 and the percentage of CCR2 in CD4<sup>+</sup>T cells significantly increased in acute active group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). There was no significant difference in CCR2 expression on CD4<sup>+</sup>T cells between control group and stable group ( $P > 0.05$ ). In acute active group, the level of CCL2 was significant positive correlation with the expression of CCR2 ( $r = 0.547$ ,  $P < 0.05$ ); the level of CCL2 and CCR2 expression level on CD4<sup>+</sup>T cells were significant positive correlation with Lansbury index, C reactive protein, rheumatoid factor, erythrocyte sedimentation rate, and disease activity score with 28 joint (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Level of CCL2 and expression of CCR2 on CD4<sup>+</sup>T cells increase significantly in RA patients and is positively correlated between them. They are also positively correlated with the clinical activity indexes of acute active period, which could be used as a reference index to evaluate the activity of rheumatoid arthritis.

**Key words:** Rheumatoid arthritis; Acute active stage; Synovial fluid; Chemokine 2; Chemokine receptor 2

类风湿关节炎是一种慢性炎症性疾病,其特征在 于巨噬细胞和淋巴细胞浸润到关节中引起关节炎,

且这一作用部分由趋化因子介导<sup>[1]</sup>。已证实在类风湿性关节炎的关节滑膜细胞和关节液中巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白 (MCP-2) (又名 CCL-2)、白细胞介素 8 (IL-8)、生长因子相关基因 (GRO) 等趋化因子的表达显著上调,且组织学水平研究也证实上述趋化因子主要由滑膜细胞、巨噬细胞、T 细胞等产生,存在于类风湿性关节炎的关节局部<sup>[2]</sup>。另有报道,当趋化因子的表达被抑制时,可改善关节炎<sup>[3]</sup>。这些研究证实趋化因子在类风湿性关节炎中起重要作用。另外,趋化因子的趋化功能主要通过与其受体的相互作用来实现<sup>[4]</sup>。CCL2 属于 CC 趋化因子家族中的一员,与其 CCR 家族受体 CCR2 结合后启动下游信号通路,产生促炎性细胞趋化、促血管生成等作用。过往研究多集中于类风湿性关节炎患者外周血中趋化因子的研究,而在关节滑膜液中 CCL2 水平及其受体 CCR2 表达的研究较少,且二者在类风湿性关节炎急性活动期的相关临床意义尚未见报道。本研究旨在评估类风湿性关节炎患者急性活动期关节滑膜液 CCL2 含量、CCR2 的表达水平及意义,以期对疾病的诊治提供一定参考。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2017 年 1 月于本院就诊的类风湿性关节炎患者 95 例,所有患者均符合美国风湿病协会 (ACR) 修订的类风湿性关节炎诊断标准,根据 28 个关节疾病活动度评分 (DAS28 评分)<sup>[5]</sup>,将患者分为急性活动期组和稳定期组。其中急性活动期组 DAS28  $\geq 3.2$ ,稳定期组 DAS28  $\leq 2.6$ 。急性活动期患者 49 例,男性 27 例,女性 22 例,年龄 25 ~ 73 (46.79  $\pm$  11.43) 岁,病程 2 个月 ~ 20 年,平均 (7.33  $\pm$  4.21) 年。稳定期患者 46 例,男性 24 例,女性 22 例,年龄 25 ~ 72 (46.18  $\pm$  11.64) 岁,病程 2 个月 ~ 20 年,平均 (7.36  $\pm$  5.01) 年。另以无类风湿性关节炎及骨关节炎的膝关节外伤患者 41 例作为对照组,男性 27 例,女性 24 例,年龄 24 ~ 72 (45.28  $\pm$  12.05) 岁。三组受试者年龄、性别、病程比较差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测关节滑膜液中 CCL2 浓度 常规消毒穿刺后,收集所有受试者关节滑膜液 1  $\mu$ l, 1 000 rpm 离心 10 min 后,取上清液。ELISA 检测试剂盒购自云南精赛顿生物制剂公司。所有操作严格按照试剂盒说明书进行。详细步骤如下:首先从平衡至室温的盒子中取出样品,其余部分置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中。除空白孔外,将样品 (100  $\mu$ l/孔)

以及不同浓度的标准物质 (100  $\mu$ l/孔) 分别加入孔中,反应孔用胶纸密封。37  $^{\circ}$ C 温育浴 90 min 后,将板洗涤 4 ~ 6 次。之后将板干燥。除空白孔外,所有其他孔与生物素抗体 (100  $\mu$ l/孔) 混合,37  $^{\circ}$ C 反应 30 min。将板洗涤 4 次后,进行避光孵育 20 min。之后,每个孔依次加入 100  $\mu$ l 终止反应液混合以结束反应。将反应板放入酶标仪 (BioTek Instruments, Burlington, VT) 中,测量 OD 450 值。根据样品的 OD 值对 CCL2 水平进行计算,然后乘以样品的稀释比,获得样品中蛋白质的实际含量。将平均值作为相对数量。

1.3 流式细胞仪检测滑膜液 CCR2 的表达 常规消毒穿刺后,收集所有受试者关节滑膜液,经乙二胺四乙酸抗凝后,加入 10 U/ $\mu$ l 透明质酸酶,于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,经等量生理盐水稀释后,根据密度梯度离心法采用淋巴细胞分离液分离滑液单个核细胞 (SFMC)。将 SFMC 以  $2 \times 10^9$ /L 悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPI-1640 培养液中,以每孔 1  $\mu$ l 悬液滴加入含 20  $\mu$ g/L 佛波酯、1  $\mu$ mol/L 离子霉素、2  $\mu$ mol/L 莫能菌素的 24 孔培养板中,37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 6 h。收集细胞,经 PBS 洗涤后,于测定管和对照管中分别加入 50  $\mu$ l SFMC 悬液,加入 100  $\mu$ l 固定液,混匀,室温孵育 15 min,弃上清,加入 100  $\mu$ l 通透液,室温孵育 5 min,先后加入异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的小鼠抗人 CD4 抗体和藻红蛋白 (PE) 标记的小鼠抗人 CCR2 抗体,室温避光孵育 20 min,加入 PBS, 1 500 rpm 离心 5 min,去上清,细胞重悬于 0.5  $\mu$ l PBS 中,上流式细胞仪进行检测分析,以 CCR2 + T 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞的比例表示 CCR2 的表达水平。FITC 及 PE 标记的小鼠抗人 IgG1 作为对照抗体。

1.4 与疾病活动相关指标检测及收集 清晨采集急性活动期患者空腹静脉血 5  $\mu$ l, 2 000 rpm 离心 10 min 后,分离血清,置于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。采用全自动免疫散射比浊仪,应用免疫速率散射比浊法检测类风湿性关节炎患者急性活动期血清中 C 反应蛋白 (CRP)、类风湿因子 (RF)、红细胞沉降率 (ESR)。收集所有患者 Lunshury 关节指数。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,行  $t$  检验;计数资料采用率 (%) 表示,行  $\chi^2$  检验;Pearson 回归分析计算蛋白表达与各种临床病理参数的相关性。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 三组受试者关节滑膜液中 CCL2 表达水平比较

与对照组和稳定期组相比,急性活动期组关节滑膜液中 CCL2 水平显著增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与对照组相比,稳定期组关节滑膜液中 CCL2 水平显著增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.2 三组受试者关节滑膜液 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 CCR2 的表达水平比较 与对照组和稳定期组相比,急性活动期组关节滑膜液 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 CCR2 表达水平显著增加,差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 对照组与稳定期组相比,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

2.3 急性活动期组滑膜液 CCL2 与 CCR2 的表达水平的相关性分析 急性活动期患者滑膜液中 CCL2 与 CCR2 的表达水平呈明显正相关 ( $r = 0.547, P < 0.05$ )。见图 1。

2.4 急性活动期组滑膜液 CCL2 水平与 Lunsbury 关节指数、CRP、RF、ESR、DAS28 相关性分析 急性活动期患者 CCL2 水平与 Lunsbury 关节指数、CRP、RF、ESR、DAS28 等临床活动指标均呈正相关 ( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 2。

2.5 急性活动期组滑膜液 CCR2 水平与 Lunsbury 关节指数、CRP、RF、ESR、DAS28 相关性分析 急性活动期患者 CCR2 水平与 Lunsbury 关节指数、CRP、RF、ESR、DAS28 等临床活动指标呈正相关 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

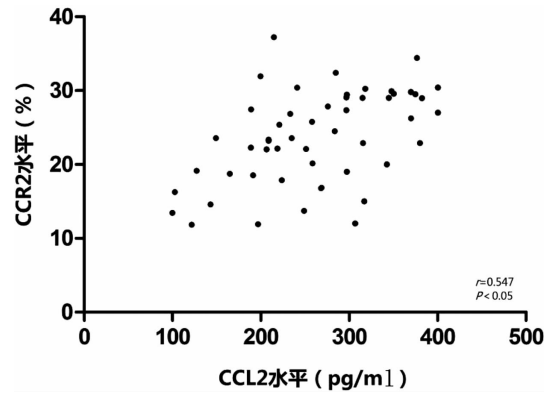


图 1 急性活动期组滑膜液 CCL2 与 CCR2 表达水平的相关性

表 1 三组受试者关节滑膜液中 CCL2 水平、CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 CCR2 的表达水平比较

组别	例数	CCL2 (pg/ $\mu$ l, $\bar{x} \pm s$ )	CCR2 (% , $\bar{x} \pm s$ )
急性活动期组	49	313.63 $\pm$ 101.94	32.51 $\pm$ 3.74
稳定期组	46	266.96 $\pm$ 87.22	21.18 $\pm$ 3.06
对照组	41	138.59 $\pm$ 31.47	20.96 $\pm$ 4.01
$t_1/P_1$		2.390/0.019	16.100/0.000
$t_2/P_2$		10.573/0.000	14.119/0.000
$t_3/P_3$		8.916/0.000	0.289/0.773

注:1,急性活动期组与稳定期组比较;2,急性活动期组与对照组比较;3,稳定期组与对照组比较。

表 2 CCL2 水平与急性活动期临床活动指标的相关性

CCL2	Lunsbury 关节指数	CRP (mg/L)	RF (U/ $\mu$ l)	ESR (mm/1h)	DAS28
$r$ 值	0.473	0.406	0.512	0.468	0.591
$P$ 值	$< 0.05$	$< 0.05$	$< 0.05$	$< 0.05$	$< 0.05$

表 3 CCR2 水平与急性活动期临床活动指标的相关性

CCR2	Lunsbury 关节指数	CRP (mg/L)	RF (U/ $\mu$ l)	ESR (mm/1h)	DAS28
$r$ 值	0.442	0.516	0.473	0.511	0.502
$P$ 值	$< 0.05$	$< 0.05$	$< 0.05$	$< 0.05$	$< 0.05$

### 3 讨论

我国类风湿性关节炎的发病率约为 0.32% ~ 0.36%, 全球为 0.5% ~ 1.0%, 是致残的主要原因之一<sup>[6-7]</sup>。类风湿性关节炎是以慢性关节炎为特征, 其炎症细胞主要是浸润性 T 淋巴细胞、成纤维样滑膜细胞(B 型滑膜细胞)、巨噬样滑膜细胞(A 型滑膜细胞)等, 这些细胞在趋化因子的作用下, 通过炎症局部血管浸润至滑膜组织, 参与类风湿性关节炎病态的形成。趋化因子能通过 G 蛋白受体(趋化因子受体)驱动中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、成纤维细胞等穿过血管壁定向迁移至炎症部位, 在炎症反应和机体防御等方面起重要作用<sup>[8]</sup>。应用免疫组织化学和原位杂交等方法发现, 产生趋化因子的细胞包括受累关节的 B 型滑膜细胞、A 型滑膜细胞等<sup>[9]</sup>。在类风湿性关节炎中, 趋化因子在关节液和滑膜组织中大量堆积, 通过使炎性细胞迁移至类风湿性关节炎患者的关节滑膜而参与类风湿性关节炎的病态形成过程<sup>[10]</sup>。IL-8、GRO 等 CXC 型趋化因子主要与中性粒细胞浸润相关, 而 CCL2、RANTES、MIP-1 $\alpha$  等 CC 型趋化因子主要与 T 细胞、单核细胞浸润相关。在大鼠 II 型胶原诱发性关节炎中, CCL2 和 MIP-1 $\alpha$  的表达随关节炎的进展而诱导, 表明, 类风湿性关节炎时, 炎性细胞浸润与炎症区内产生的趋化因子密切相关<sup>[11]</sup>。

CCL2 是初步鉴定为单核细胞特异性化学诱导物的 CC 型趋化因子, 属于炎症性趋化因子, 已证实可募集活化的 T 细胞、天然杀伤细胞和嗜碱性粒细胞等炎症细胞<sup>[12]</sup>。除此之外, CCL2 在 T 细胞分化和血管生成中起重要作用<sup>[13-14]</sup>, 这些功能可能参与 RA 的发病机制。过往研究发现, 在类风湿性关节炎患者关节滑膜中 CCL2 的水平显著升高, 且在类风湿滑膜中, 巨噬细胞不仅能被 CCL2 活化, 且能够产生趋化因子 CCL2<sup>[15]</sup>。与过往研究一致, 本研究中发现, 在

类风湿关节炎患者的急性活动期与稳定期,关节滑膜液中 CCL2 水平均显著高于对照组。另外,急性活动期关节滑膜液内 CCL2 水平显著高于稳定期。提示,类风湿关节炎时,患者关节滑膜组织内可能产生趋化因子 CCL2,且急性活动期 CCL2 的产生显著增加。

趋化因子受体 CCR2 是 CCL2 受体,主要在单核细胞和 T 细胞亚群中表达<sup>[16]</sup>。已在动物模型中发现,CCR2 在慢性类风湿关节炎的外周血单核细胞表面表达<sup>[17]</sup>。另外,在慢性类风湿关节炎患者的 CD4<sup>+</sup>T 细胞中,CCR2 表达水平显著上调<sup>[18]</sup>。本研究采用流式细胞术分析发现,类风湿关节炎急性活动期患者 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 CCR2 表达水平显著高于稳定期组和对照组,说明 CCR2 定向迁移至病变关节滑膜液 CD4<sup>+</sup>T 细胞这一过程可能在风湿关节炎急性活动期发挥重要作用。

在关节炎动物模型中观察到 CCL2/CCR2 配体/受体对的促炎作用<sup>[19]</sup>。本研究对 CCL2 和 CCR2 进行相关性分析发现,二者呈明显正相关,提示在类风湿性关节炎急性期中,趋化因子在关节液中大量堆积,通过吸引表达 CCR2 的 CD4<sup>+</sup>T 细胞迁移或浸润至关节滑膜中,从而参与类风湿关节炎的病态形成过程。

本研究对 CCL2 和 CCR2 与急性活动期临床活动指标的相关性分析发现,CCL2 和 CCR2 均与 Lunsbury 关节指数、CRP、RF、ESR、DAS28 等呈正相关。

综上所述,类风湿关节炎患者关节滑膜液中 CCL2 表达水平增加,CD4<sup>+</sup>T 细胞表面 CCR2 百分比增加,二者呈明显正相关,且 CCL2 和 CCR2 与急性活动期临床活动指标呈明显正相关,可以作为评估类风湿关节炎活动性的参考指标。然而,CCL2 和 CCR2 在类风湿关节炎发生发展过程中的作用涉及多种炎症细胞因子的免疫调节过程,在后续实验中应深入探究二者与炎症细胞因子免疫调节的相关性。

#### 参考文献

[1] Aeberli D, Kamgang R, Balani D, et al. Regulation of peripheral classical and non-classical monocytes on infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis [J]. RMD Open, 2016, 2(1): e000079.

[2] 梁柳琴,肖游君,付迪,等. RhoA/ROCK 信号通路对 TLR-2 配体诱导的类风湿关节炎患者成纤维滑膜细胞分泌趋化因子的调

控作用[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(11): 742 - 745.

- [3] 王一凡. 雷公藤内酯醇对佐剂性关节炎大鼠中 CC 趋化因子表达的影响[D]. 上海:中国科学院上海生命科学研究院, 2007.
- [4] Gear A, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense [J]. Microcirculation, 2003, 10(3): 335 - 350.
- [5] 姚血明, 马武开, 唐芳, 等. 类风湿关节炎患者 DAS28 积分与疾病活动指标的相关性分析 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2013, 21(1): 79 - 81.
- [6] 郑双融. 痹祺提取物对 CIA 大鼠滑膜炎症及血管新生相关因子的影响研究[D]. 天津:天津医科大学, 2016.
- [7] 许蕾, 解思涛, 谭磊, 等. 中西医治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(5): 1436 - 1439.
- [8] Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2014, 10(5): 593 - 619.
- [9] 张学增, 张育. A 型滑膜细胞与类风湿关节炎血管新生 [J]. 国际内科学杂志, 2008, 35(11): 680 - 683.
- [10] 孙琳, 刘湘源, 徐宁, 等. 趋化因子 CXCL16/CXCR6 及其在类风湿关节炎发病中的作用及意义 [J]. 中华风湿病学杂志, 2009, 13(11): 786 - 788.
- [11] 郑文新. 骨桥蛋白在类风湿性关节炎中对趋化因子的诱导及其机制 [D]. 上海:中国科学院上海生命科学研究院, 2009.
- [12] Haringman JJ, Ludikhuijsen J, Tak PP. Chemokines in joint disease: the key to inflammation [J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(10): 1186 - 1194.
- [13] Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation [J]. Nat Immunol, 2001, 2(2): 102 - 107.
- [14] McManus CM, Liu JS, Hahn MT, et al. Differential induction of chemokines in human microglia by type I and II interferons [J]. Glia, 2000, 29(3): 273 - 280.
- [15] Brühl H, Cihak J, Schneider MA, et al. Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2 + T cells [J]. J Immunol, 2004, 172(2): 890 - 898.
- [16] 朱翔. 单核细胞趋化因子及受体在大鼠椎间盘突出疼痛模型中的作用及机制 [D]. 南通:南通大学, 2014.
- [17] Jajic Z, Scur A, Kelava T, et al. AB0064 expression of chemokines and chemokine receptors on peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis [J]. Ann the Rheum Dis, 2015, 74(2): 912 - 911.
- [18] Xia L, Lu J, Xiao W. Blockage of TNF- $\alpha$  by infliximab reduces CCL2 and CCR2 levels in patients with rheumatoid arthritis [J]. J Investig Med, 2011, 59(6): 961 - 963.
- [19] Quinones MP, Ahuja SK, Jimenez F, et al. Experimental arthritis in CC chemokine receptor 2-null mice closely mimics severe human rheumatoid arthritis [J]. J Clin Invest, 2004, 113(6): 856 - 866.

收稿日期: 2017 - 09 - 11 修回日期: 2017 - 10 - 17 编辑: 周永彬