

老年类风湿性关节炎患者血清 ECE-1、ET-1、TNF- α 和 PBMC 中 Pgp 表达增强

李小氏(邵阳医学高等专科学校附属医院检验科, 湖南 邵阳 422000)

[关键词] 类风湿性关节炎; 内皮素转换酶 1; TNF- α ; P-糖蛋白

[中图分类号] R554.6, R392.11

[文献标志码] B

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以对称性、多关节、小关节为主的慢性全身性自身免疫性疾病,其主要病理变化为巨噬细胞和T淋巴细胞等慢性炎症细胞浸润及大量多种细胞因子的分泌,最终促使关节骨质破坏、滑膜组织渐进性损伤^[1-2]。内皮素转换酶(endothelin-converting enzyme-1, ECE-1)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)以及TNF- α 、P-糖蛋白(P-glycoprotein, Pgp)与RA的发生、发展有重要关系。本研究通过ELISA检测了老年类风湿性关节炎患者血清中ECE-1、ET-1、TNF- α 、Pgp水平,初步探讨老年类风湿性关节炎血清ECE-1、ET-1、TNF- α 、Pgp表达变化及其临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象 收集2010-01/2012-06在邵阳医学高等专科学校附属医院风湿免疫科门诊和住院的RA患者73例,男22例,女51例,年龄60~76岁,平均(67.2 \pm 6.8)岁。RA病例符合1987年美国风湿病学会修订后的诊断标准,并排除糖尿病、高血压、肿瘤、肝肾疾病、急性感染和其他自身免疫性疾病等。根据中华医学会风湿病学分会制定的RA活动期判定标准(血沉 \geq 30 mm/h,晨僵 \geq 1 h,关节肿痛数 \geq 3个,类风湿皮下结节,类风湿因子高于正常水平;5项中符合3项以上者即为活动期RA)^[3]。将上述73例患者分为2组:活动期RA组37例,非活动期RA组36例。另选择我院体检中心经健康体检合格的健康人为正常对照组35例,男17例,女18例,年龄60~78岁,平均(69.2 \pm 6.7)岁。均无心、肺、肝、肾等重要脏器疾患,既往自身免疫性疾病等。所有患者均是知情同意,该研究得到医院伦理学委员会批准。PE标记的小鼠抗人Pgp单克隆抗体(mAb)购自Sigma公司。ECE-1、ET-1、TNF- α ELISA检测试剂盒购自武汉博士德公司。EPICS XL型流式细胞仪为Beckman-Coulter公司产品。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测Pgp表达 所有人选患者及正常体检者,抽取肝素抗凝血20 mL。肝素抗凝血采用梯度密度离心

法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), PBS洗2次, PBS重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,取细胞悬液100 μ L,加入PE标记的小鼠抗人Pgp mAb 20 μ L,室温避光反应30 min, PBS洗2次,上流式细胞仪检测PBMC上表达的Pgp。

1.2.2 血清ECE-1、ET-1、TNF- α 水平测定 所有人选患者及正常体检者,清晨空腹采取肘静脉血5 mL,促凝血2 mL。促凝血3 000 r/min离心10 min分离血清,置于无菌EP管-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。剩余血液,常温自然凝固1 h后,3 000 r/min离心10 min,分离血清,-20 $^{\circ}$ C保存,用ECE-1、ET-1、TNF- α ELISA检测试剂盒检测血清中的表达水平。操作程序严格按照各试剂盒中的说明书进行。

1.2.3 统计学分析 实验数据采用SPSS 17.0软件分析,计数资料应用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。定量指标的相关性采用Pearson直线相关分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBMC中Pgp水平 老年RA患者PBMC中Pgp的含量明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而且RA活动期组患者Pgp表达水平明显高于RA非活动期组患者的表达水平,差异有统计学意义($P < 0.05$,图1)。

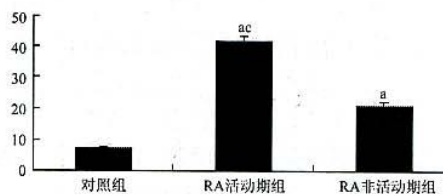
* $P < 0.05$ vs 对照组; $^{\circ}P < 0.05$ vs 非活动期组。

图1 PBMC中Pgp表达水平

2.2 血清ECE-1、ET-1、TNF- α 水平 老年RA患者ECE-1、ET-1、TNF- α 的含量明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步分析,发现老年

收稿日期: 2012-11-05; 接受日期: 2012-12-01

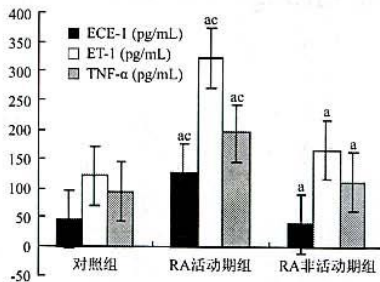
基金项目: 湖南省教育厅科研资助项目(09C045)

作者简介: 李小氏(1956-), 湖南邵阳人, 副教授, 学士

Tel: 18774892738; E-mail: 307436347@qq.com

RA 活动期组患者 ECE-1、ET-1、TNF- α 的水平明显高于非活动期组患者的水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 RA 患者血清各检测指标的相关性分析 RA 患者血清 ET-1、TNF- α 检测指标的相关性回归分析表明, ET-1、TNF- α 呈正性显著相关 ($r = 0.6256$, $P < 0.01$)。血清 ECE-1、ET-1 检测指标的相关性回归分析表明, ECE-1、ET-1 呈正性显著相关 ($r = 0.6377$, $P < 0.01$)。血清 Pgp、TNF- α 检测指标的相关性回归分析表明, Pgp、TNF- α 呈正性显著相关 ($r = 0.5823$, $P < 0.01$)。



* $P < 0.05$ vs 对照组; * $P < 0.05$ vs 非活动期组。

图 2 各组血清 ECE-1、ET-1、TNF- α 水平比较

3 讨论

RA 是以进行性关节破坏和滑膜炎为主要临床症状的一种全身性自身免疫性疾病。RA 的发生、发展与细胞因子、T 细胞异常活动以及自身的免疫功能紊乱有密切相关^[4-6]。研究表明新生微血管内皮细胞可高度表达多种细胞因子和黏附蛋白, 导致多种炎症细胞不断向病变部位浸润和聚集, 导致形成滑膜炎^[7]。

血清内皮素-1 (ET-1) 具有促进平滑肌细胞、内皮细胞及成纤维样细胞增殖的作用。促使血管翳形成而加重关节的损伤。TNF- α 是单核-巨噬细胞分泌的内源性细胞因子。具有促进细胞生长、调节免疫应答等多种功能, 与机体的免疫反应和炎症反应有十分密切的关系。

老年 RA 活动期患者 ECE-1/ET-1、TNF- α /Pgp 检测指标水平明显高于非活动期患者的水平, 老年 RA 患者血清 ECE-1/ET-1、TNF- α /Pgp、ET-1/TNF- α 水平与病情呈显著正相关。在 RA 患者中,

Pgp 表达和活性的增加可能与内环境调控和原发耐药密切相关, 炎性因子 TNF- α , 其水平与 Pgp 表达及功能相关, 高水平的 TNF- α 上调 RA 患者的 PBMC Pgp 的表达和活性, Pgp 的表达增加使细胞内药物被转运出来, 细胞内药物浓度降低, 难以控制疾病, 疾病持续活动, 促使 TNF- α 产生进一步增加, 形成恶性循环^[8]。

ECE-1 是一种膜结合 II 型金属蛋白酶, 其异构体 ECE-1b 在 ECE-1 的作用中处于重要位置, 在由 big ET 剪切成具有生物活性的 ET-1 中 ECE-1b 也可能起关键作用。ET-1 通过与相应的受体结合而起作用, 加速血管痉挛的病理进程。随病情的加重, 血清 ET-1、TNF- α 表达也增加, 抑制 IgG 和 IgM 的产生, 而且影响某些克隆细胞的分化, 使 T 细胞不能发挥正常免疫反应。

参考文献:

- [1] Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production[J]. *Science*, 2010, 327(5965): 580-583.
- [2] 吕昌哲, 林涛, 朱向阳, 等. TNF- α 单核苷酸多态性与中国北方汉族人类风湿关节炎的相关性研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(8): 906-908.
- [3] 龙武彬, 刘建, 董巍. 血清新蝶呤、IL-1、TNF- α 联合检测对类风湿关节炎活动性诊断价值的探讨[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(13): 2590-2592.
- [4] Dasgupta B, Chew T, deRoche A, et al. Blocking platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM) inhibits disease progression and prevents joint erosion in established collagen antibody-induced arthritis[J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 88(1): 210-215.
- [5] Shimane K, Kochi Y, Horita T, et al. The association of anonymous single nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(2): 574-579.
- [6] Gasparyan AY, Stavropoulos-Kalinoglou A, Mikhailidis DP, et al. Platelet function in rheumatoid arthritis: arthritic and cardiovascular implications[J]. *Rheumatol Int*, 2011, 31(2): 153-164.
- [7] 张国华, 吕智. 类风湿关节炎患者外周血白细胞介素-23 和类风湿因子的表达研究[J]. *中国医药导报*, 2011, 8(18): 23-25.
- [8] Petropoulos S, Gibb W, Matthews SG. Effect of glucocorticoids on regulation of placental multidrug resistance phosphoglycoprotein (P-gp) in the mouse[J]. *Placenta*, 2010, 31(9): 803-810.