

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.04.06

活动性类风湿关节炎患者单核细胞 Toll 样受体 9 表达及其临床意义

王绪山, 王敏, 李静, 陈开勇(灌云县人民医院检验科, 江苏灌云 222200)

摘要:目的 分析活动性类风湿关节炎(RA)患者 Toll 样受体 9(TLR9)在单核细胞亚群中的表达及单核细胞经配体活化后分泌细胞因子的功能,初步探讨外周血单核细胞 TLR9 在 RA 疾病中的作用。方法 收集 32 例活动性 RA 患者(RA 组)和 32 例健康人对照(HC 组)外周血,流式细胞术分析单核细胞亚群 TLR9 表达;体外培养单核细胞,经 TLR9 配体 CpG-2006 活化培养 48 h, Luminex 200 液相芯片技术检测培养上清液白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和单核细胞趋化蛋白(MCP)-1 浓度。结果 与 HC 组相比,RA 患者外周血 3 个单核亚群 TLR9 平均荧光强度(MFI)均显著上升(CD14⁺⁺CD16⁻:211.4 \pm 35.3 vs 73.4 \pm 11.3;CD14⁺CD16⁺:214.9 \pm 32.6 vs 69.3 \pm 14.1;CD14^{low}CD16⁺:141.8 \pm 22.6 vs 12.8 \pm 4.8),差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 HC 组活化后相比,RA 组活化后上清液细胞因子 IL-6[(209.8 \pm 32.9) pg/mL vs (71.1 \pm 12.6) pg/mL]、TNF- α [(264.3 \pm 35.4) pg/mL vs (76.2 \pm 18.7) pg/mL]、MCP-1[(167.6 \pm 19.2) pg/mL vs (23.3 \pm 7.4) pg/mL]浓度均显著上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 活动性 RA 患者外周血单核细胞亚群高表达 TLR9,促进炎性细胞因子的分泌,在 RA 疾病过程中发挥重要的作用。

关键词:类风湿关节炎;Toll 样受体 9;单核细胞;流式细胞术

中图分类号:R446.6;R392-3

文献标志码:A

Expression and clinical significance of Toll-like receptor 9 on monocytes from patients with active rheumatoid arthritis

WANG Xushan, WANG Min, LI Jing, CHEN Kaiyong(Department of Clinical Laboratory, Guanyun County People's Hospital, Guanyun 222200, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To explore the role of Toll-like receptor 9 (TLR9) on peripheral monocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) by assessing the expression levels of TLR9 on different monocyte subsets of active RA patients and their cytokines secretion in the monocytes with response to TLR9 agonists. **Methods** A total of 32 active RA patients and 32 healthy controls were enrolled in this study. The levels of TLR9 on different subsets of monocyte in peripheral blood were evaluated by flow cytometry. The enriched monocytes were cultured in vitro and stimulated with TLR9 agonists CpG-2006 for 48 h. The concentrations of cytokines IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) in the supernatant were determined by Luminex 200 liquid chip. **Results** Compared with the healthy controls, the mean fluorescence intensity (MFI) of TLR9 were significantly increased on all the three subsets of monocytes (211.4 \pm 35.3 vs 73.4 \pm 11.3 in CD14⁺⁺CD16⁻ subset; 214.9 \pm 32.6 vs 69.3 \pm 14.1 in CD14⁺CD16⁺ subset and 141.8 \pm 22.6 vs 12.8 \pm 4.8 in CD14^{low}CD16⁺ subset) and there were significantly difference ($P<0.05$). Compared with the healthy controls, the concentrations of cytokines IL-6, TNF- α and MCP-1 in the supernatant of RA patients were significantly increased after stimulation with TLR9 agonists [(209.8 \pm 32.9) pg/mL vs (71.1 \pm 12.6) pg/mL, (264.3 \pm 35.4) pg/mL vs (76.2 \pm 18.7) pg/mL, (167.6 \pm 19.2) pg/mL vs (23.3 \pm 7.4) pg/mL], and there were significantly difference ($P<0.05$). **Conclusion** The different subsets of peripheral blood monocyte from the patients with active RA showed increased TLR9 expression which may promote higher production of inflammatory cytokines and play important roles in the pathogenesis of RA.

Key words: rheumatoid arthritis; Toll-like receptor 9; monocyte; flow cytometry

慢性炎症是类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)重要的发病机制,关节腔中浸润大量单核细胞等炎性细胞,导致患者关节腔滑膜异常增生、软骨和骨质破坏^[1]。基于细胞表面 CD14 和 CD16 的表达情况,人类单核细胞可分为 CD14⁺⁺CD16⁻经典型、CD14⁺CD16⁺中间型和 CD14^{low}CD16⁺⁺非经典型,中间型和非经典型亚群被认为在 RA 等多种炎症、自身免疫病中发挥重要作用^[2-3]。单核细胞表面表达 Toll 样受体 9(Toll like receptor-9, TLR9),通过识别

细菌/病毒等 DNA 的非甲基化胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CPG)、真核细胞线粒体 DNA 等配体,诱导单核细胞分泌炎性因子和趋化因子,发挥固有免疫应答的作用^[4]。但 TLR9 在单核细胞亚群中的表达及其在 RA 疾病中的作用目前尚不明确。本研究通过流式细胞术检测 RA 患者外周血单核细胞 TLR9 表达,并通过非甲基化 CPG 活化 TLR9,分析单核细胞分泌炎性细胞因子的变化,探讨单核细胞 TLR9 在 RA 疾病中的作用。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 选择 2018 年 1 月—2019 年 2 月在灌云县人民医院骨科就诊的活动性中重度 RA 患者 32 例,作为 RA 组,年龄(48.7±12.5)岁,男 6 例,女 26 例;纳入标准:符合 2010 年美国风湿病学会/欧洲风湿病联盟分类标准,未接受甲氨蝶呤或生物制剂治疗,DAS28-ESR 疾病活动评分≥3.2 分,3.2 分<DAS28<5.1 分为中疾病活动度;DAS28≥5.1 分为高疾病活动度^[5]。同时招募健康人对照者 32 例,作为 HC 组,年龄(46.3±11.3)岁,男 5 例,女 27 例;排除标准:血液病、感染性疾病、恶性肿瘤或自身免疫病。两组年龄、性别差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准(批准号 2017-04),参加者知情同意。

1.2 仪器和试剂 Calibur 流式细胞分析仪(美国 BD 公司),Luminex 200 液相芯片检测系统(R&D 公司),特定蛋白仪(德灵公司);异硫氰酸荧光素(FITC)-鼠抗人 CD14 单克隆抗体(mAb)、别藻青蛋白(APC)-鼠抗人 TLR9 mAb、percp5.5-鼠抗人 CD16 mAb 及同型对照和红细胞裂解液(BD Biosciences 公司),Ficoll-HyPaque 分离液(上海西糖生物公司),RPMI-1640 完全培养液(美国 Gibco 公司),非甲基化全链硫代修饰 CpG-ODN 2006(上海生工公司),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1 和白细胞介素(IL)-6 检测试剂(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 在空腹状态下抽取健康人对照者和 RA 患者静脉血 6 mL 置于肝素钠抗凝管中,其中 1 mL 用于流式细胞检测,其余 5 mL 用于分离单核细胞。RA 患者有 9 例有关节腔积液,治疗前抽取积液 4 mL,采用 Ficoll 密度梯度法分离积液单个核细胞,并用 500 μ L PBS 重悬,用于流式细胞分析。

1.3.2 流式细胞术检测单核细胞亚群及其表面 TLR9 取肝素抗凝静脉血 100 μ L 或 PBS 重悬的关节腔积液单个核细胞 100 μ L,加入 10 μ L FITC-鼠抗人 CD14 mAb、10 μ L percp5.5-鼠抗人 CD16 mAb,避光反应 30 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 0.1% 皂素 500 μ L 破膜 20 min。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 10 μ L APC-鼠抗人 TLR9 mAb,避光反应 30 min,然后加入 500 μ L 红细胞裂解液,避光反应 8 min,PBS 洗涤后用 400 μ L PBS 重悬,上流式分析仪检测。根据前向散射光和

侧向散射光,外周血以单核细胞设门(关节液中细胞分散,以所有的细胞设门),检测 CD14⁺⁺CD16⁻经典型、CD14⁺CD16⁺中间型和 CD14^{low}CD16⁺⁺非经典型细胞比例,并检测各亚群细胞表面 TLR9 平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)。

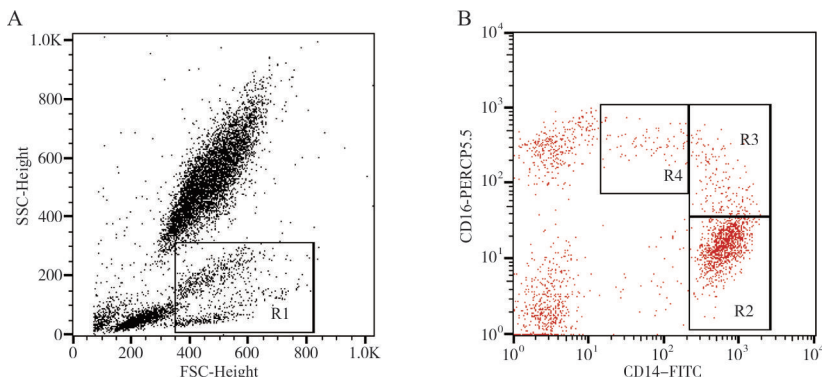
1.3.3 单核细胞分离和培养 采用 Ficoll 密度梯度法分离来自健康人志愿者和 RA 患者的外周血单个核细胞,用 RPMI-1640 完全培养液(含 10% 小牛血清、100 U/L 链霉素、100 U/L 青霉素)重悬,在 24 孔细胞培养板中贴壁 2 h 后,去除非贴壁细胞,加入 RPMI-1640 培养液继续培养 4 h,收集单核细胞,取 100 μ L 单核细胞,加入 10 μ L FITC-鼠抗人 CD14 mAb,避光反应 20 min,PBS 洗涤后用 400 μ L PBS 重悬,流式分析仪检测 CD14 阳性细胞比例,结果显示纯度>95%。

1.3.4 细胞因子 IL-6、TNF- α 、MCP-1 浓度检测 上述单核细胞经 RPMI-1640 培养液重悬,调整细胞浓度为 1×10^4 cells/mL,培养于 24 孔板,分 2 孔,其中 1 孔加入 40 μ g/mL CpG-ODN 2006,另 1 孔为空白对照,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h,收集上清液,储存于-80 $^{\circ}$ C。用 Luminex 200 液相芯片检测上清液细胞因子 IL-6、TNF- α 、MCP-1 浓度:取 96 孔板,每孔加 50 μ L 交联待检细胞因子 mAb 的磁球,平放在磁铁板上 5 min 后弃上清液,然后每孔加 50 μ L 样本和标准品,室温下振荡反应 30 min,弃上清液,每孔加入亲和素标记的二抗 25 μ L,室温反应 30 min,最后每孔加入 50 μ L PE 标记的生物素,室温静置 10 min 后洗涤,Luminex 200 检测系统检测样本的荧光强度,根据标准品的荧光强度计算各样本细胞因子浓度。每个样本检测 3 次,取均值。IL-6、TNF- α 、MCP-1 检测限分别为 1.5 pg/mL、1.8 pg/mL 和 2.0 pg/mL。

1.4 统计学分析 用 Stata 7.0 软件进行。资料为正态分布,用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间差异比较采用 Student's *t* 检验。以双侧 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RA 患者外周血单核细胞亚群比例 以单核细胞设门(见图 1A),根据 CD14 和 CD16 表达检测单核细胞亚群(见图 1B)。与 HC 组相比,RA 患者经典型单核细胞比例显著降低,中间型和非经典型单核细胞比例均显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$),结果见表 1。



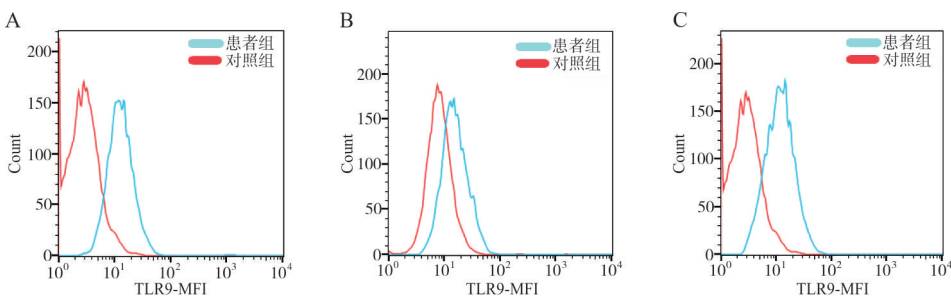
注:A,分选单核细胞;B,单核细胞亚群分析。R1,以单核细胞设门;R2,CD14⁺⁺CD16⁻经典型单核细胞;R3,CD14⁺CD16⁺中间型;R4,CD14^{low}CD16⁺⁺非经典型单核细胞。

图1 RA患者外周血单核细胞亚群分析

表1 外周血单核细胞亚群比例比较

组别	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ (%)	CD14 ⁺ CD16 ⁺ (%)	CD14 ^{low} CD16 ⁺⁺ (%)
RA组	71.2±9.6	16.4±7.7	8.3±3.2
HC组	85.6±5.1	10.4±4.1	5.4±2.1
t值	7.49	3.89	4.28
P值	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 RA患者外周血单核细胞TLR9 MFI检测 与HC组相比,RA患者外周血3个单核细胞亚群TLR9 MFI均显著上升,差异有统计学意义(P<0.05),结果见图2、表2。



注:A,CD14⁺⁺CD16⁻TLR9;B,CD14⁺CD16⁺TLR9;C,CD14^{low}CD16⁺⁺TLR9。

图2 外周血单核细胞亚群TLR9 MFI

表2 外周血单核细胞亚群中TLR9平均荧光强度比较

组别	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CD14 ⁺ CD16 ⁺	CD14 ^{low} CD16 ⁺⁺
RA组	211.4±35.3	214.9±32.6	141.8±22.6
HC组	73.4±11.3	69.3±14.1	12.8±4.8
t值	21.06	23.19	31.58
P值	<0.001	<0.001	<0.001

(60.6±9.1)%、中间型(31.1±6.4)%、非经典型(8.7±2.3)%;TLR9 MFI分别为:经典型309.6±32.4、中间型461.2±26.5、非经典型288.5±25.4。

2.3 不同活动度RA患者外周血单核细胞亚群TLR9 MFI比较 高疾病活动度组与中疾病活动度组相比,单核细胞亚群TLR9 MFI表达均显著上升,差异有统计学意义(P<0.05)。见表3。

2.5 CPG活化的外周血单核细胞培养上清液细胞因子检测 与HC组活化后相比,RA患者组活化后上清液细胞因子浓度均显著上升,差异有统计学意义(P<0.05);与活化前相比,HC和RA组活化后上清液细胞因子浓度均显著上升,差异有统计学意义(P<0.05)。见表4。

表3 不同活动度RA患者外周血单核细胞亚群TLR9 MFI

组别	n	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CD14 ⁺ CD16 ⁺	CD14 ^{low} CD16 ⁺⁺
中疾病活动度组	13	185.1±30.7	191.5±32.8	125.4±17.8
高疾病活动度组	19	229.5±34.3	226.4±35.9	153.1±25.2
t值		3.75	2.79	3.41
P值		0.001	0.001	0.002

表4 CPG活化的单核细胞培养上清液细胞因子水平(pg/mL)

组别	IL-6	TNF-α	MCP-1
HC组活化前	19.2±9.4	23.4±9.5	11.5±4.5
HC组活化后	71.1±12.6 [#]	76.2±18.7 [#]	23.3±7.4 [#]
RA组活化前	24.5±11.2	32.7±11.6	42.3±11.4
RA组活化后	209.8±32.9 ^{#*}	264.3±35.4 ^{#*}	167.6±19.2 ^{#*}

注:#,与同组活化前比较,P<0.05;*,与HC组活化后比较,P<0.05。

2.4 RA患者关节腔积液单核细胞TLR9检测 RA患者关节腔积液单核细胞亚群比例分别为:经典型

3 讨论

人类单核细胞 CD14⁺⁺CD16⁻ 经典型可产生高水平的活性氧(ROS)、IL-6 和 IL-8, 迅速募集到炎症部位, 吞噬清除病原体^[6]; CD14⁺CD16⁺ 中间型高表达 HLA-DR, 产生更高水平的活性氮物质(RNS)、IL-1 β 和 TNF- α ; 而 CD14^{dim}CD16⁺ 非经典型参与巡逻血管内皮细胞对病毒和免疫复合物的反应^[7]。早期研究表明 RA 患者外周血中 CD14^{dim}CD16⁺ 非经典型单核细胞增加^[8], 而最近研究表明外周血中 CD14⁺CD16⁺ 中间型亚群的频率增加^[9-10], 且与疾病的严重程度显著相关。本研究结果表明 RA 患者外周血经典型亚群显著降低, 中间型和非经典型显著上升。本研究还发现 RA 患者关节腔积液中存在较多的单核细胞, 且中间型亚群比例高于外周血, 表明这些细胞不断向炎症组织募集, 参与参与关节腔炎症反应。

Kyburz 等^[11] 研究表明 TLR9 信号传导抑制剂羟氯喹可抑制 RA 炎症的严重程度, 其显著的治疗效果表明 TLR9 参与 RA 疾病过程。本研究在外周血和关节腔积液 3 个单核细胞亚群中均检测到 TLR9 的高表达, 且高疾病活动度患者 TLR9 表达更显著, 突显了单核细胞 TLR9 在 RA 疾病中的潜在作用。

RA 患者血液中死亡细胞释放的含有非甲基化 CpG 重复序列的线粒体 DNA、细菌/病毒等病原体 DNA 的非甲基化的 CpG 寡核苷酸均可作为 TLR9 内源性配体, 活化激活丝裂原活化蛋白激酶 p38 和 NF- κ B 信号通路, 诱导细胞的固有免疫应答^[12]。本研究证实, 单核细胞经 TLR9 配体 CpG-ODN 2006 刺激后可分泌高浓度的 IL-6、TNF- α 和 MCP-1。促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 可刺激软骨细胞、破骨细胞、血管内皮、淋巴细胞、NK 细胞和成纤维细胞的活化, 从而直接介导滑膜增殖和损伤, 并产生降解关节软骨基质的基质金属蛋白酶(MMP), 导致 RA 中的骨吸收^[13]。MCP-1 是一种高效的趋化因子, 参与炎症单核细胞的募集。以上结果表明, RA 患者单核细胞高水平的 TLR9 参与促炎细胞因子或趋化因子 IL-6、TNF- α 和 MCP-1 的产生, 参加 RA 疾病发展。

综上所述, 活动性 RA 患者关节腔积液中存在高比例的中间型和非经典型单核细胞。另外, RA 患者外周血单核细胞 3 个亚群均具有高水平的 TLR9, TLR9 激动剂增加炎症细胞因子和趋化因子的产生。因此, 单核细胞 TLR9 在 RA 患者的疾病过程中发挥重要作用。本研究的局限性是对总体细胞的细胞因子分泌进行检测, 未对单核细胞亚群进行

分选, 分析亚群中的功能。因此, 单核细胞亚群 TLR9 在 RA 疾病中的作用需要进一步深入研究。

4 参考文献

- [1] Yap H, Tee SZ, Wong MM, *et al.* Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: implications in clinical treatment and biomarker development[J]. *Cells*, 2018, 7(10): 161-182.
- [2] Luo Q, Xiao PC, Li X, *et al.* Overexpression of CD64 on CD14⁺⁺CD16⁺ and CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes of rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 2703-2711.
- [3] 钱雷, 蔺昕, 陈玮, 等. 类风湿关节炎患者外周血单核细胞亚群的变化及其意义[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(10): 1519-1524.
- [4] Marongiu L, Gornati L, Artuso I, *et al.* Below the surface: the inner lives of TLR4 and TLR9[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106(1): 147-160.
- [5] Aletaha D, Wand MM, Machold KP, *et al.* Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states[J]. *Arthritis rheum*, 2005, 52(3): 2625-2636.
- [6] Jung H, Mithal DS, Park JE, *et al.* Localized CCR2 activation in the bone marrow niche mobilizes monocytes by desensitizing CXCR4[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128387.
- [7] Liu B, Dhanda A, Hirani S, *et al.* CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes are enriched by glucocorticoid treatment and are functionally attenuated in driving effector t cell responses[J]. *J Immunol*, 2015, 194(3): 5150-5160.
- [8] Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, *et al.* CD14⁺CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(3): 2578-2589.
- [9] Tsukamoto M, Suzuki K, Seta N, *et al.* Increased circulating CD14^{bright}CD16⁺ intermediate monocytes are regulated by TNF- α and IL-6 axis in accordance with disease activity in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(3): 540-551.
- [10] Tsukamoto M, Seta N, Yoshimoto K, *et al.* CD14^{bright}CD16⁺ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(4): 28-39.
- [11] Kyburz D, Brentano F, Gay S. Mode of action of hydroxychloroquine in RA-evidence of an inhibitory effect on toll-like receptor signaling [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006, 2(9): 458-459.
- [12] Veiko NN, Shubaeva NO, Ivanova SM, *et al.* Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2006, 142(8): 313-316.
- [13] Yap HY, Tee S ZY, Wong M MT, *et al.* Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: implications in clinical treatment and biomarker development[J]. *Cells*, 2018, 7(10): 161-178.

(收稿日期: 2019-12-21)

(本文编辑: 刘群)