

血清 IL-2、TNF- α 及 IL-13 在类风湿关节炎诊断与治疗中的临床意义

杨荣敏¹, 段相国², 陈建³, 刘河涛¹, 崔建健², 苏春霞¹

(1. 宁夏医科大学 基础医学院病原生物学与免疫学系, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学 临床医学院医学检验系, 银川 750004; 3. 银川国龙医院, 银川 750004)

摘要: 为探讨血清 IL-2、TNF- α 及 IL-13 在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)诊断与治疗中的临床意义, 收集了 30 例 RA 患者外周血, 其中经过常规治疗的患者 27 例, 常规治疗合并生物制剂治疗的患者 3 例, 以 30 例健康体检者为正常对照, 采用酶联免疫吸附试验双抗体夹心法检测 RA 患者治疗前后血清中 IL-2、TNF- α 及 IL-13 的表达水平, 并分析 IL-2、TNF- α 及 IL-13 与临床指标 RF、CRP、ESR 的相关性。结果发现 RA 患者治疗前血清 IL-2、TNF- α 及 IL-13 表达水平明显高于健康对照组($P < 0.05$), 常规治疗后 IL-2 表达水平降低($P < 0.05$), 常规治疗合并生物制剂治疗后 IL-2、IL-13 表达水平明显降低($P < 0.05$); RA 患者发病期血清 IL-2、TNF- α 及 IL-13 与 RF、CRP、ESR 呈正相关($P < 0.05$)。该研究提示 RA 患者血清中 IL-2、TNF- α 及 IL-13 的表达在 RA 的诊断与治疗中有一定的临床意义。

关键词: RA; IL-2; TNF- α ; IL-13; 常规治疗与生物制剂治疗

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2017)01-0044-06

RA 是一种以持续滑膜炎和多关节进行性骨破坏为特点的自身免疫性疾病^[1], 多发于中年女性^[2]。临床上主要以类风湿因子(rheumatoid factor, RF)作为 RA 辅助诊断的常规指标。C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)为炎症急性反应期的诊断指标, 研究证实可以将 CRP 作为临床评价炎症活动的指标, 它被广泛用于风湿性疾病及自身免疫性疾病的临床诊断及疗效判定中^[3]。血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)则是 RA 疾病活动评分(disease activity score, DAS)标准的一项检测内容。近年来, 临床上对 RA 的治疗主要采用常规治疗与生物制剂治疗。常规治疗包括非甾体类抗炎药(双氯芬酸、美洛昔康等)、慢作用抗风湿药(甲氨蝶呤、来氟米特等)以及植物药(雷公藤、白芍总苷等)。生物制剂应用较广泛的是益赛普、阿达木单抗等抗人肿瘤坏死因子单克隆抗体^[4]。临床采用常规治疗合并生物制剂治疗难治性 RA 已经取

得了很好的效果。目前, RA 的发病机制尚不清楚, 普遍认为 RA 患者体内存在自身抗体和细胞因子的分泌失调^[5]。白细胞介素 2(interleukin 2, IL-2)由 Th1 细胞分泌, 是激活 T 细胞、维持 T 细胞分化和增殖的细胞因子。虽然 IL-2 在提升免疫反应中的作用已获得肯定, 但由于 IL-2 及其受体介导的信号途径的多样性, 使得对 IL-2 的认识在不断更新。同样作为 Th1 细胞分泌的 TNF- α , 不仅是一种有效的肿瘤细胞杀伤因子, 而且是 RA 发病机制中居中心地位的促炎细胞因子。抑制炎症细胞分泌 TNF- α 已经是目前国内外研究治疗的重点。IL-13 由活化的 Th2 细胞产生, 已有研究报道 IL-13 是哮喘气道炎症反应中的重要抑炎因子, 而对 IL-13 在 RA 发病机制中的研究甚少。在 RA 发病中有多种促炎因子的参与, 因此抑制促炎性细胞因子的产生或阻断其作用, 有望改善关节炎症反应。本研究通过检测 RA 患者常规治疗与合并生物制剂治疗前后血清中 IL-2、TNF- α 及 IL-13 的表达, 并与临床诊断指标 RF、CRP、ESR 进行相关性分析, 来探讨 IL-2、TNF- α 及 IL-13 在 RA 诊断与治疗中的临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 宁夏医科大学总医院风湿免疫科

收稿日期: 2016-08-09

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(NZ15060; NZ15245; NZ16069); 宁夏回族自治区卫生计生重点课题(2015-NW-038); 宁夏高等教育科学研究项目(NGY2015073); 宁夏医科大学科学研究基金(NZ16069)

作者简介: 杨荣敏(1989-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事自身免疫性疾病研究

通信作者: 苏春霞(E-mail: chunxiasu@aliyun.com)

初诊的 RA 患者 30 例,其中女性 17 例,男性 13 例,年龄(28~74)岁。其诊断标准符合 1987 年美国风湿病学会修订的 RA 诊断标准,无其他合并症,未曾接受免疫抑制剂、非甾体类抗炎药、生物制剂等治疗。30 例患者都经过宁夏医科大学总医院风湿免疫科住院治疗,其中 27 例患者接受常规治疗、3 例患者接受常规治疗和生物制剂(1 位患者采用阿达木单抗注射液治疗,2 位患者采用重组人 II 型抗肿瘤坏死因子注射液治疗)治疗后,症状得到缓解。30 例健康对照来自于宁夏医科大学总医院门诊体检中心体检合格的健康人,女性 15 例,男性 15 例,年龄(30~72)岁。RA 组与健康对照组年龄、性别构成差异无统计学意义。本研究所有临床样本,均对患者进行知情告知并经本院伦理委员会通过。

1.2 主要试剂与仪器 IL-2 ELISA 试剂盒、TNF- α ELISA 试剂盒和 IL-13 ELISA 试剂盒,购自美国 RayBio 生物公司。主要仪器为生物安全柜、酶标仪、水平离心机。

1.3 检测方法 RA 治疗前患者组:采集 RA 病人确诊后次日清晨空腹静脉血 4 mL,离心 1 500 r/min 15 min,收集血清,置于 EP 管中, -20 °C 冰箱保存。RA 治疗后患者组:经住院常规治疗或合并生物制剂治疗后症状缓解的病人,出院前采集静脉血 4 mL,1 500 r/min 15 min 离心,收集血清,置于 EP 管中, -20 °C 冰箱保存。健康对照组血清按相同方法收集。采用双抗体夹心 ELISA 法,操作严格按照试剂盒说明书的步骤进行。用酶标仪检测波长 450 nm 处的 A 值,之后绘制标准曲线,分别计算 IL-2、TNF- α 及 IL-13 在血清中的浓度。

1.4 临床检测指标的采集 采集宁夏医科大学总医院风湿免疫科病人的病历资料,获得 RF、CRP 和 ESR 的临床数据,应用统计学软件分析 IL-2、TNF- α 及 IL-13 的表达水平与 RF、CRP 和 ESR 的相关性。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 17.0 进行统计学分析,数据呈偏态分布,采用 $M \pm Q$ 表示,各组间比较用多个样本的非参数检验,治疗前与治疗后采用配对设计 t 检验。相关性分析采用 Spearman 方法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 常规治疗与合并生物制剂治疗血清 IL-2 浓度的比较 两者的比较见图 1。

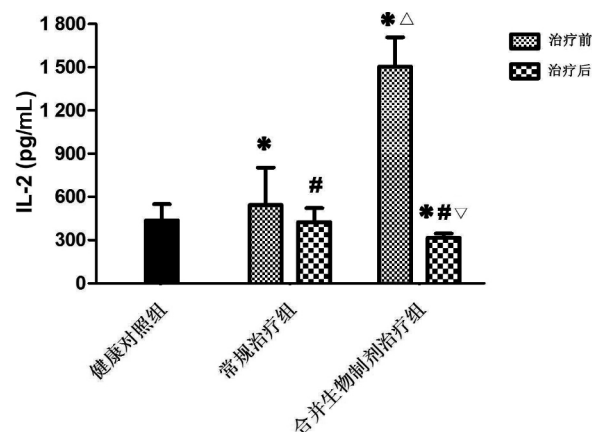


图1 常规治疗与合并生物制剂治疗血清 IL-2 的表达

注: * 各组与健康对照组比较,有统计学差异($P < 0.05$); # 治疗后与治疗前比较,有统计学差异($P < 0.05$); Δ 合并生物制剂治疗前与常规治疗前比较,有统计学差异($P < 0.05$); ∇ 合并生物制剂治疗后与常规治疗后比较,有统计学差异($P < 0.05$)

健康对照组血清中 IL-2 的表达水平为(437.04 \pm 112.04) pg/mL。常规治疗前 RA 组血清 IL-2 的表达水平为(544.44 \pm 259.26) pg/mL,常规治疗后 RA 组血清 IL-2 的表达水平为(425.93 \pm 97.22) pg/mL。合并生物制剂治疗前 RA 组血清 IL-2 的表达水平为(1 503.70 \pm 204.51) pg/mL,合并生物制剂治疗后 RA 组血清 IL-2 的表达水平为(316.05 \pm 29.94) pg/mL。常规治疗前 RA 组($P=0.032$)、合并生物制剂治疗前 RA 组($P=0.005$)较健康对照组血清 IL-2 的表达明显增高,有统计学差异;常规治疗后 RA 组与健康对照组血清 IL-2 的表达无统计学差异($P=0.197$);合并生物制剂治疗后 RA 组较健康对照组血清 IL-2 的表达明显降低,有统计学差异($P=0.008$);合并生物制剂治疗前较常规治疗前血清 IL-2 的表达明显增高,有统计学差异($P=0.016$);常规治疗后 RA 组较常规治疗前 RA 组血清 IL-2 的表达明显降低,有统计学差异($P=0.007$);合并生物制剂治疗后 RA 组较合并生物制剂治疗前 RA 组血清 IL-2 的表达明显降低,有统计学差异($P=0.008$);合并生物制剂治疗后较常规治疗后血清 IL-2 的表达明显增高,有统计学差异($P=0.01$)。

2.2 常规治疗与合并生物制剂治疗血清 TNF- α 浓度的比较 两者的比较。见图 2。

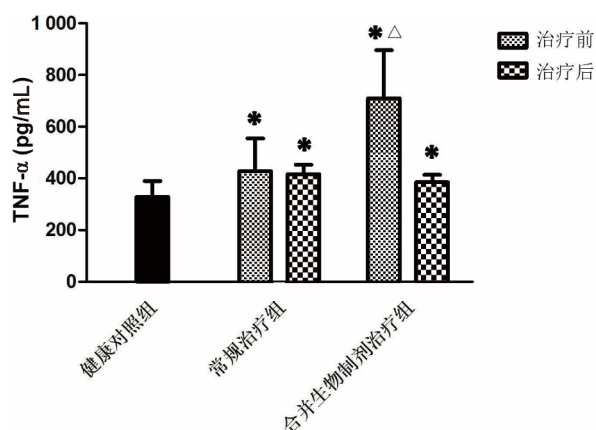


图 2 常规治疗与合并生物制剂治疗血清 TNF- α 的表达

注: * 各组与健康对照组比较, 有统计学差异 ($P < 0.05$); Δ 合并生物制剂治疗前与常规治疗前比较, 有统计学差异 ($P < 0.05$)

健康对照组血清中 TNF- α 的表达水平为 (382.13 ± 61.72) pg/mL。常规治疗前 RA 组血清 TNF- α 的表达水平为 (428.13 ± 126.56) pg/mL, 常规治疗后 RA 组血清 TNF- α 的表达水平为 (415.63 ± 37.50) pg/mL。合并生物制剂治疗前 RA 组血清 TNF- α 的表达水平为 (709.38 ± 187.06) pg/mL, 合并生物制剂治疗后 RA 组血清 TNF- α 的表达水平为 (385.42 ± 28.36) pg/mL。常规治疗前 RA 组 ($P=0.000$)、常规治疗后 RA 组 ($P=0.000$)、合并生物制剂治疗前 RA 组 ($P=0.005$)、合并生物制剂治疗后 RA 组 ($P=0.022$) 较健康对照组血清 TNF- α 的表达明显增高, 有统计学差异; 合并生物制剂治疗前较常规治疗前血清 TNF- α 的表达明显增高, 有统计学差异 ($P=0.013$); 常规治疗后 RA 组与常规治疗前 RA 组血清 TNF- α 的表达无统计学差异 ($P=0.133$); 合并生物制剂治疗后 RA 组与合并生物制剂治疗前 RA 组血清 TNF- α 的表达无统计学差异 ($P=0.116$); 合并生物制剂治疗后与常规治疗后 TNF- α 的表达无统计学差异 ($P=0.153$)。

2.3 常规治疗与合并生物制剂治疗血清 IL-13 浓度的比较 两者的比较见图 3。

健康对照组血清中 IL-13 的表达水平为 (3.23 ± 0.96) pg/mL。常规治疗前 RA 组血清 IL-13 的

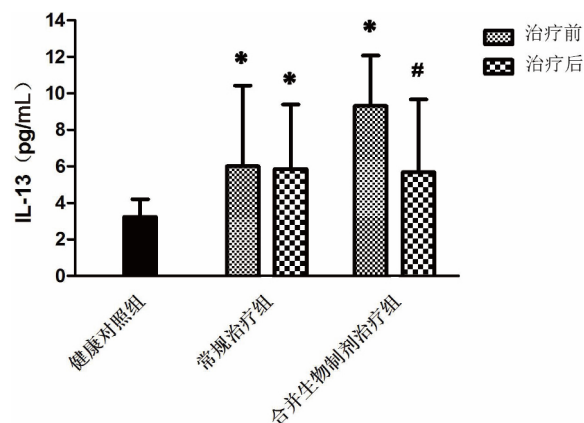


图 3 常规治疗与合并生物制剂治疗血清 IL-13 的表达

注: * 各组与健康对照组比较, 有统计学差异 ($P < 0.05$); # 治疗后与治疗前比较, 有统计学差异 ($P < 0.05$)

表达水平为 (5.40 ± 4.42) pg/mL, 常规治疗后 RA 组血清 IL-13 的表达水平为 (5.85 ± 3.53) pg/mL。合并生物制剂治疗前 RA 组血清 IL-13 的表达水平为 (9.31 ± 2.76) pg/mL, 合并生物制剂治疗后 RA 组血清 IL-13 的表达水平为 (5.68 ± 3.99) pg/mL。常规治疗前 RA 组 ($P=0.000$)、常规治疗后 RA 组 ($P=0.000$)、合并生物制剂治疗前 RA 组 ($P=0.006$) 较健康对照组血清 IL-13 的表达明显增高, 有统计学差异; 常规治疗后 RA 组与健康对照组血清 IL-13 的表达无统计学差异 ($P=0.383$); 合并生物制剂治疗前与常规治疗前 IL-13 的表达无统计学差异 ($P=0.064$); 常规治疗后 RA 组与常规治疗前 RA 组血清 IL-13 的表达无统计学差异 ($P=0.531$); 合并生物制剂治疗后 RA 组较合并生物制剂治疗前 RA 组血清 IL-13 的表达明显降低, 有统计学差异 ($P=0.015$); 合并生物制剂治疗后与常规治疗后 IL-13 的表达无统计学差异 ($P=0.866$)。

2.4 RA 治疗前、后患者血清 IL-2 的表达与临床指标 RF、CRP、ESR 的相关性 相关性分析见图 4。

2.5 RA 治疗前、后患者血清 TNF- α 的表达与临床指标 RF、CRP、ESR 的相关性 相关性比较见图 5。

2.6 RA 治疗前、后患者血清 IL-13 的表达与临床指标 RF、CRP、ESR 的相关性 相关性比较见图 6。

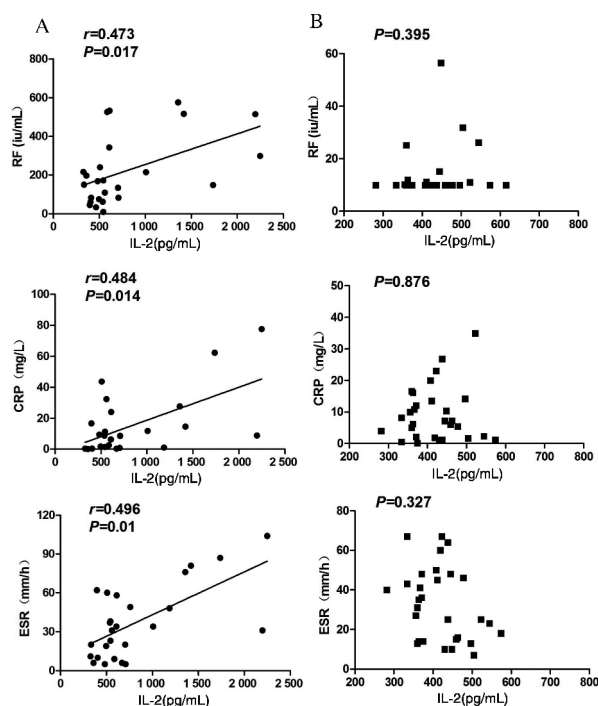


图4 RA患者治疗前后血清 IL-2 的表达与 RF、CRP、ESR 的相关性
注: A: RA 治疗前患者血清 IL-2 与 RF、CRP、ESR 呈正相关;
B: RA 治疗后患者血清 IL-2 与 RF、CRP、ESR 无相关性

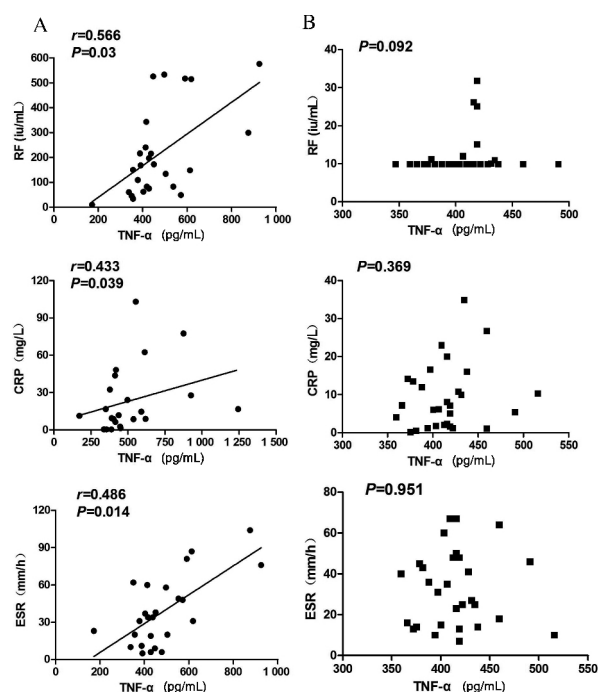


图5 RA患者治疗前后血清 TNF- α 的表达与 RF、CRP、ESR 的相关性
注: A: RA 治疗前患者血清 TNF- α 与 RF、CRP、ESR 呈正相关;
B: RA 治疗后患者血清 TNF- α 与 RF、CRP、ESR 无相关性

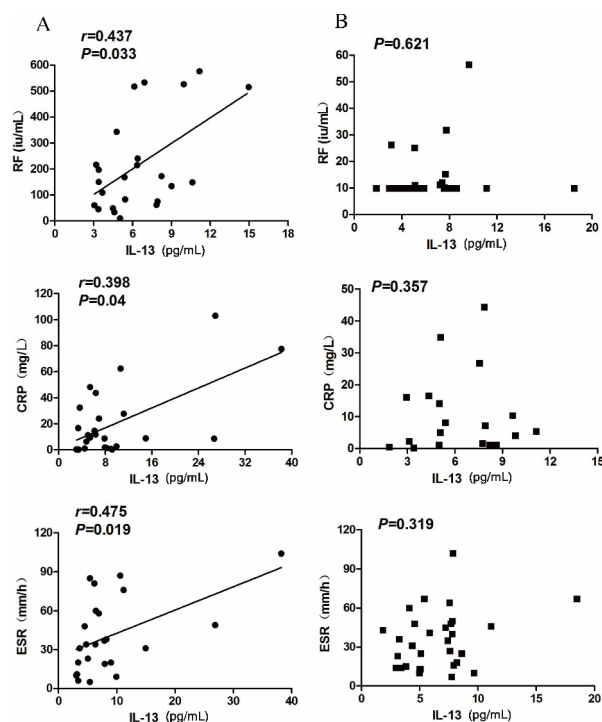


图6 RA患者治疗前后血清 IL-13 的表达与 RF、CRP、ESR 的相关性
注: A: RA 治疗前患者血清 IL-13 与 RF、CRP、ESR 呈正相关;
B: RA 治疗后患者血清 IL-13 与 RF、CRP、ESR 无相关性

3 讨论

RA 是一种自身免疫性疾病, 其病因和发病机制尚不清楚, 判断疾病发展程度对疾病诊断和治疗非常重要。RF 是 RA 血清学诊断分类的重要指标, CRP、ESR 是风湿疾病活动情况的实验室常用诊断项目, 可以作为监控疾病活动、评价治疗稳定性的指标。目前, RA 的诊断依据主要为临床症状及实验室辅助诊断 RF、CRP 和 ESR 的水平, 虽然缺乏特异性, 但能在一定程度上反映患者的炎症程度及病情变化。通过将这些临床指标和 RA 中的炎性细胞因子进行相关性分析, 得出 RF、CRP 和 ESR 与 IL-2、TNF- α 、IL-13 存在正相关, 说明 IL-2、TNF- α 、IL-13 能为 RA 的临床辅助诊断提供依据。

RA 的常规治疗以改善临床症状、缓解关节肿胀疼痛为主, 生物制剂治疗在缓解风湿病情或阻止疾病进展中有重要作用。有临床资料显示^[6], TNF- α 受体对类 RA 的发病具有重要的阻抗作用。然而, 生物制剂仍然存在很多副作用, 生物制剂治疗的合理剂量、疗程、安全性、耐药性以及长期的

临床疗效尚待进一步研究^[7]。而阻碍生物制剂临床研究进展的主要因素在于生物制剂疗法费用昂贵,多数患者经济条件难以负担导致缺少相关研究的病例及临床资料,这是致使本研究收集生物制剂治疗病例较少的重要原因。

细胞因子网络失调与 RA 的发生发展密切相关。多项研究结果得出在 RA 发病期 Th1/Th2 的平衡紊乱,发生 Th1 极化、Th2 分化阻碍的现象^[8]。IL-2 与 TNF- α 是活化的 Th1 细胞分泌的细胞因子,能够诱导淋巴细胞增生及免疫反应,过量的 Th1 细胞因子可引起局部慢性炎症和基质破坏。RA 患者血清中 IL-2 的表达水平,多项研究结果不一致,基于 RA 患者的异质性,选择不同时期的患者作为研究对象可能会得到不同的结果。文献报道^[9], TNF- α 在细胞因子网络中占据中心位置,能诱导其他炎性因子的释放。IL-13 由 Th2 细胞产生,主要介导体液免疫,产生 IgE,激活嗜酸性粒细胞,引起抑炎细胞因子的产生。治疗前活化的 Th1 细胞分泌 IL-2,促进 T 细胞的增殖反应,分泌的 IL-2、TNF- α 、IL-13 明显增高。有趣的是,本实验结果发现 IL-13 在 RA 中的表达较健康对照组明显增高,可能的机制是在 RA 患者中高表达促炎和抗炎因子,尤其在活动期 RA 中^[10],促炎因子 IL-2、TNF- α 很可能刺激了抑炎因子 IL-13 的表达,IL-13 通过介导负反馈机制来抑制过量的促炎因子的产生。已有研究得出,在 RA 患者体内促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-17 以及抑炎性因子 IL-10、IL-4、TGF- β 在机体内分泌异常促使病情发展^[11]。Nguyen 等^[12]的研究证明作为抗-TNF 抗体的阿达木单抗,能够结合 RA 单核细胞膜上的 TNF 受体,通过 TNF-R II 介导的 IL-2/STAT5 信号通路促进 Treg 细胞的增殖。阿达木单抗等药物通过促进 Treg 细胞的增殖,反过来抑制 Th 细胞分泌炎性细胞因子。由于生物制剂价格昂贵,不同经济能力的临床患者治疗周期以及用药量的差异导致炎性细胞因子的降低程度不同。虽然本研究中 RA 患者经过合并生物制剂治疗后炎性因子表达明显降低,但是由于临床选用生物制剂治疗的病例数有限,对于 RA 常规疗法与生物制剂的疗效评估需待进一步研究。

综上所述,通过比较常规治疗与联合生物制剂治疗前后 RA 患者血清 IL-2、TNF- α 、IL-13 的变

化,以及与临床指标 RF、CRP、ESR 的相关性分析,提示血清 IL-2、TNF- α 、IL-13 的表达在 RA 疾病的辅助诊断及疗效监测中具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] 陈呢喃,张冬青. JAK-STAT 信号通路在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 现代免疫学, 2013, 33(5): 425-428.
- [2] Pradeep Pradhan AB, VP Venkatachalam. Bilateral cricoarytenoid arthritis;a cause of recurrent upper airway obstruction in rheumatoid arthritis[J]. Malays J Med Sci, 2016, 23(3): 89-91.
- [3] 孙建,陈红莲,李雯. 158 例难治性类风湿关节炎与 C-反应蛋白的关系[J]. 重庆医学, 2013, 42(9): 1056-1057.
- [4] Singh JA, Furst DE, Bharat A, *et al.* 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Arthr Care Res, 2012, 64(5): 625-639.
- [5] Astry B, Venkatesha SH, Moudgil KD. Involvement of the IL-23/IL-17 axis and the Th17/Treg balance in the pathogenesis and control of autoimmune arthritis[J]. Cytokine, 2015, 74(1): 54-61.
- [6] Kopec-Medrek M, Kotulska A, Widuchowska M, *et al.* Plasma leptin and neuropeptide Y concentrations in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab, a TNF-alpha antagonist[J]. Rheumatol Intern, 2012, 32(11): 3383-3389.
- [7] Kiely PD, Deighton C, Dixey J, *et al.* Biologic agents for rheumatoid arthritis—negotiating the NICE technology appraisals[J]. Rheumatology, 2012, 51(1): 24-31.
- [8] Mariaselvam CM, Aoki M, Salah S, *et al.* Cytokine expression and cytokine-based T cell profiling in South Indian rheumatoid arthritis[J]. Immunobiology, 2014, 219(10): 772-777.
- [9] Colmegna I, Ohata BR, Menard HA. Current understanding of rheumatoid arthritis therapy[J]. Clin Pharmacol Therap, 2012, 91(4): 607-620.
- [10] Xia T, Zheng XF, Qian BH, *et al.* Plasma interleukin-37 is elevated in patients with rheumatoid arthritis; its correlation with disease activity and Th1/Th2/Th17-related cytokines[J]. Dis Mark, 2015; 2015: 795043.
- [11] 杨欢,徐云芝,李呈贞,等. MEKK2 在类风湿关节炎患者中的表达及临床意义[J]. 现代免疫学, 2016, 36(3): 177-182.
- [12] Nguyen DX, Ehrenstein MR. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis[J]. J Exp Med, 2016, 213(7): 1241-1253.

Clinical significance of serum IL-2, TNF- α and IL-13 of patients with rheumatoid arthritis in the diagnosis and treatment of the disease

YANG Rong-min¹, DUAN Xiang-guo², CHEN Jian³, LIU He-tao¹, CUI Jian-jian², SU Chun-xia¹ (1. *Department of Pathogen Biology and Immunology, School of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China*; 2. *Department of Laboratory Medicine, School of Clinic Medical Science, Ningxia medical University, Yinchuan 750004, China*; 3. *Guo Long Hospital of Yinchuan, Yinchuan 750004, China*)

Abstract: To investigate the clinical significance of IL-2, TNF- α and IL-13 in the serum of rheumatoid arthritis (RA) patients, the concentrations of these cytokines in the patients' serum were measured from prior and post conventional treatment and or conventional plus biological agent treatment, and to analyze the correlations among IL-2, TNF- α , IL-13 and RA clinical index (RF, CRP, ESR). Thirty cases of RA patients from Ningxia medical university general hospital were enrolled, among them, 27 patients received conventional treatment and the remaining 3 cases received biological treatment in addition to conventional treatment. ELISA method was used to examine the concentrations of IL-2, TNF- α and IL-13. And then to analyze their correlation with RF, CRP and ESR. It was found that the expressions of IL-2, TNF- α and IL-13 in the serum from RA prior treatment group were significantly higher than those of the healthy control group. Post conventional treatment, IL-2 level was decreased. Post combined treatment, IL-2 and IL-13 levels were significantly decreased. During RA period, IL-2, TNF- α and IL-13 had obvious positive correlation with RF, CRP and ESR. Our results suggest that IL-2, TNF- α and IL-13 are not only important diagnosis indexes of RA, but also have clinic values in evaluating efficacy of biological agent treatment.

Key words: rheumatoid arthritis; IL-2; TNF- α ; IL-13; conventional treatment and biological agent treatment