

· 临床研究 ·

IL-12 诱导类风湿关节炎和骨关节炎外周血 T 淋巴细胞 STAT4 活化状态的比较

孙振杰¹, 张育军², 孙铁铮³, 熊粟⁴, 刘瑞波¹, 吕厚山³

(1.北京市第六医院骨科,北京 100007;2.北京大学人民医院中心实验室;3.北京大学人民医院关节病诊疗研究中心,北京 100035;4.深圳市北京大学深圳医院骨科)

【摘要】 目的: 比较类风湿关节炎和骨关节炎外周血 T 淋巴细胞在 IL-12 作用下诱导 STAT4 酪氨酸磷酸化水平的差异。**方法:** 2007 年 5 月至 2009 年 8 月分离提纯 20 例类风湿关节炎患者[均为女性;年龄 28~55 岁,平均(45.0±13.0)岁]和 20 例骨关节炎患者[均为女性;年龄 55~75 岁,平均(67.0±9.6)岁]的外周血 T 淋巴细胞,流式细胞仪进行 T 淋巴细胞纯度鉴定。用 50 ng/ml IL-12 分别作用 0、10、30、60 min 后,提取蛋白进行浓度测量,然后进行 Western Blot 检测,经蛋白条带灰度扫描,比较 IL-12 作用各时间点类风湿关节炎和骨关节炎 T 淋巴细胞 STAT4 酪氨酸磷酸化水平的差异。**结果:** 经过对外周血单核细胞的分离纯化,T 细胞纯度达到 91%以上;IL-12 在对骨关节炎和类风湿关节炎 T 细胞作用 30 min 后达到活化峰值,在各个时间点(10、30、60 min)类风湿关节炎外周血 T 淋巴细胞活化水平平均高于骨关节炎。**结论:** 类风湿关节炎外周血 T 淋巴细胞在 IL-12 作用下 STAT4 异常活化。

【关键词】 关节炎,类风湿; 淋巴细胞; 白细胞介素-12

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2011.04.008

Comparison of the status of STAT4 tyrosine phosphorylation in peripheral T-lymphocytes induced by IL-12 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis SUN Zhen-jie, ZHANG Yu-jun, SUN Tie-zheng*, XIONG Ao, LIU Rui-bo, LÜ Hou-shan. *Arthritis Clinic and Research Center, People's Hospital of Peking University, Beijing 100035, China

ABSTRACT Objective: To compare the levels of STAT4 tyrosine phosphorylation in peripheral T-lymphocytes induced by IL-12 in rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). **Methods:** From May 2007 to August 2009, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from RA patients [RA group, all the cases were female, the age was from 28 to 55 years with an average of (45.0±13.0) years] and OA patients [OA group, all the cases also were female; the age was from 55 to 75 years with an average of (67.0±9.6) years]. The purity of T-lymphocytes from PBMCs was accredited by flow cytometry. The IL-12 of 50 ng/ml added in T-lymphocytes, the levels of STAT4 tyrosine phosphorylation were detected by western blot after different time intervals (0, 10, 30, 60 min). **Results:** The purity of T-lymphocytes were above 91% through diremption and depuration for peripheral blood mononuclear cells. The levels of STAT4 tyrosine phosphorylation in T-lymphocytes from RA induced by IL-12 were higher than that from OA in the different times (10, 30, 60 min); after 30 min, its levels from RA and OA achieved to crest value. **Conclusion:** STAT4 in peripheral T-lymphocytes of rheumatoid arthritis was more easily to be activated than osteoarthritis.

KEYWORDS Arthritis, rheumatoid; Lymphocytes; Interleukin-12

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(4): 295-298 www.zggszz.com

类风湿关节炎是一种由不同的细胞亚群活化诱导产生的系统性自身免疫性疾病,包括 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和成纤维样滑膜细胞,导致受累关节的进行性破坏。IL-12 是调节 Th1 和 Th2 细胞分化平衡的关键细胞因子,促进细胞毒性 T 细胞介导的细胞裂解,增强自然杀伤细胞(NK 细胞)活性^[1]。在关节炎动物模型中,Th1 淋巴细胞诱导病理性反应,而

Th2 淋巴细胞参与保护性反应^[2]。IL-12 与 II 型胶原联合使用在 DBA/L 小鼠中诱导严重的关节炎反应^[3]。在胶原诱导的关节炎模型中阻断 IL-12 的作用明显减轻关节炎的严重性。近来的遗传学研究表明,STAT4 的单倍体基因与自身免疫性疾病,如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮以及原发性干燥综合征的发生密切相关^[4]。STAT4 是 IL-12、IL-23 和 I 型干扰素在 T 细胞与单核细胞中的主要信号转导分子,导致辅助性 Th1 和 Th17 的分化,诱导单核细胞活化以及 γ -IFN 干扰素的产生^[5]。尽管遗传学上这种关联性很强,但是确切机制目前尚不十分清楚。因此,揭

基金项目:首都医学发展基金资助课题(编号:TS199923)

Fund programs: Supported by Health Bureau of Beijing for Capital Medical Science Development(No: TS199923)

通讯作者:孙铁铮 E-mail: suntiezheng1973@yahoo.com.cn

示 STAT4 如何调节免疫功能有利于进一步阐明自身免疫性疾病的发生机制。本文拟通过分离纯化类风湿关节炎和骨关节炎患者外周血 T 淋巴细胞,采用 IL-12 作用后观察并比较 STAT4 酪氨酸磷酸化状态的差异,以分析 STAT4 在类风湿关节炎病理发生过程中可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料 外周血均取自 2007 年 5 月至 2009 年 8 月在北京大学人民医院关节病诊疗中心行人工膝关节置换术的患者, 类风湿关节炎 20 例(RA 组), 均为女性, 平均年龄(45.0±13.0)岁(28~55 岁); 骨关节炎 20 例(OA 组), 均为女性, 平均年龄(67.0±9.6)岁(55~75 岁), 两组患者平均年龄差异有统计学意义(P=0.023)。

1.2 诊断标准 所有患者按国际诊断标准^[6]确诊, 均属于疾病晚期, 合并膝关节内翻, 或外翻畸形, 或屈膝挛缩畸形, 具有明确的人工膝关节置换适应证, 所有患者无手术禁忌的合并症。类风湿关节炎患者停用改善病情类药物 1 周, 正在服用激素者被排除。在 2 年之内服用过激素的患者(共 6 例)于术前、术中和术后给予激素保护, 外周血分离在使用激素保护前进行。10 例骨关节炎患者合并高血压和(或)冠心病, 术前和术后继续服用降压药物, (术前 10 d 停用阿司匹林)。试验方案经由北京大学人民医院伦理委员会批准, 并获取患者知情同意书。

1.3 试验方法

1.3.1 外周血单个核细胞的分离培养 在无菌操作下, 术前取每位患者外周静脉血 20 ml, 以肝素钠 5 IU/ml 抗凝, 并用等量磷酸盐缓冲液(PBS)稀释。在 50 ml 离心管中, 将稀释后的血液每 20 ml 小心加于 15 ml Ficoll-Paque Plus 液(Amersham)的表面上, 室温下水平离心 400 g 30 min 分层, 小 A 倍体积的 PBS 液洗涤细胞 2 次, 每次离心 100 g 10 min, 以去除残存的血小板和 Ficoll-Paque Plus 液。细胞计数后, 将单个核细胞按 1×10⁶/ml 悬浮于含 10% 新生小牛血清(鼎国生物)的 RPMI-1640 培养基(Invitrogen)中, 并加入植物血凝素 PHA-P(Sigma) 5 μg/ml, 置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 48~72 h, 使 T 淋巴细胞增殖。

1.3.2 分离 T 淋巴细胞并鉴定 将经过 PHA-P 刺激增殖后的单个核细胞离心 250 g 5 min 收集, 室温下悬浮于 1 ml 的洗柱缓冲液中, 并将细胞悬液加至人 T 细胞富集柱(R&D)上。室温孵育 10 min 后, 用洗柱缓冲液 8 ml 洗柱, 洗脱液收集于无菌离心管中, 离心 250 g 5 min, 弃上清, 并用不含血清的 RPMI-1640 培养基洗涤 2 次后, 将细胞按 1×10⁶/ml 再

悬浮于无血清的 RPMI-1640 培养基中, 按每孔 1 ml 置于 24 孔板中, 在 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中进行静息培养。同时取 1 ml T 细胞悬液, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 FITC 标记的小鼠抗人 CD45 抗体与 PE 标记的小鼠抗人 CD3 抗体, 4℃作用 45 min 后, 用流式细胞仪测定相对荧光强度及表面标记阳性细胞比例。

1.3.3 IL-12 作用于 T 淋巴细胞时的蛋白质提取与浓度测定 每位患者的 T 淋巴细胞经过 6 h 静息培养后, 在 24 孔板各孔中加入重组人 IL-12(50 ng/ml), 分别于 0、10、30、60 min 各时间点, 吸取 1 ml 细胞悬液立刻加入 4 倍体积的冰冷 PBS 缓冲液中, 于 4℃离心 250 g 5 min, 弃上清后, 再换 5 ml PBS 缓冲液于 4℃离心 250 g 5 min, 洗涤细胞。弃上清, 加入 150 μl 细胞裂解液 [20 mmol/L Tris-Cl(pH:8.0), 1%(v/v) NP-40, 150 mmol/L NaCl, 0.1%(v/w)NaN₃, 5 μg/ml Aprotinin, 1 mmol/L PMSF], 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 1 mmol/L Na₃VO₄, 25 μmol/L PNP', 1 μmol/L Pepstatin A, 1 μmol/L Leupeptin], 冰上裂解 30 min 后, 4℃离心 12 000 g 15 min, 取上清, 置于-70℃冻存。采用 Bio-Rad DC Protein Assay 测量不同浓度的标准蛋白吸光度值(表 1), 绘出蛋白浓度标准工作曲线。然后, 分别检测每份细胞裂解提取物在 750 nm 紫外光处的吸光度值, 继而得出每份细胞裂解提取物的总蛋白浓度。

表 1 不同浓度的标准蛋白吸光度值

Tab.1 The OD value of standard protein with difference concentration

浓度(mg/ml)	蛋白吸光度值
0.25	103.686
0.5	132.756
1.0	190.895
1.5	249.035
2.0	307.174

1.3.4 SDS-PAGE 电泳和 Western 印迹杂交 将等量 30 μg 总蛋白的细胞裂解提取物, 加入 5×上样缓冲液[250 mmol/L Tris-Cl(pH6.8), 500 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 100 mg/ml 十二烷基磺酸钠(SDS), 20%(v/v)甘油, 少量溴酚兰], 进行 8%SDS-PAGE 电泳, 之后半干法电转移至硝基纤维素膜(Amersham)上, 5%脱脂奶粉封闭过夜。分别加入按 1:500 稀释的兔抗磷酸化 STAT4(Y693) 多克隆抗体, 室温杂交 3 h, PBS-Tween 20 洗膜 5 min×3 次后, 以 HRP 标记的鼠抗兔 IgG 抗体作用 1 h, 再次洗膜 5 min×3 次后, ECL 化学发光试剂盒(Amersham)进行化学发光, 用 Kodak X 线片在暗室曝光 4 min, 显像。将膜洗

脱处理后,以抗 Actin 抗体和 HRP 标记的鼠抗兔 IgG 抗体再次进行杂交,进行化学发光显影,以其作为内参对照。以上试验反复进行 3 次。

1.4 图像灰度扫描及统计学处理 将上述发光显影的 X 线片应用 Bio-Rad Quantity one 软件作图像灰度扫描后,测量 OA 组与 RA 组分别在 0、10、30、60 min 各时间点的灰度值,根据 3 次重复试验测得的灰度值用均值±标准差来表示,利用统计学软件 SPSS 11.0 进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术测定 T 细胞纯度 流式细胞仪测定相对荧光强度后,提示 CD45/CD3 双阳性细胞(即 T 淋巴细胞)均达 91% 以上(图 1)。

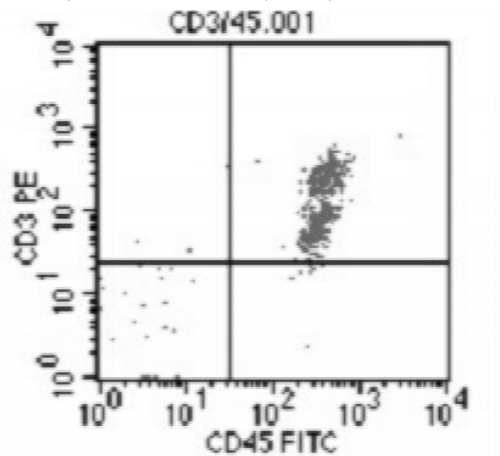


图 1 CD45/CD3 双阳性细胞表达
Fig.1 Expression of CD45/CD3 double positive

2.2 蛋白质定量工作曲线 吸光度(x)值与蛋白质浓度 Y 呈直线相关。直线方程: $Y = 0.0086x - 0.6417$, 相关系数为 0.9995。因此认为该测定方法较为可靠。可通过测定细胞裂解提取物的吸光度值,计算得到相应蛋白浓度 Y(图 2)。

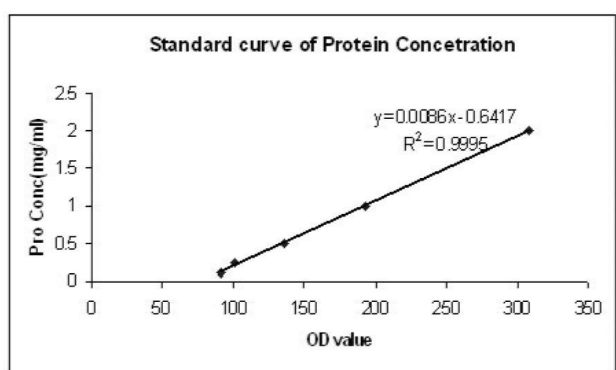


图 2 蛋白浓度标准曲线, $Y = 0.0086x - 0.6417$, $R^2 = 0.9995$
Fig.2 Standard curve of protein concentration, $Y = 0.0086x - 0.6417$, $R^2 = 0.9995$

2.3 IL-12 对类风湿关节炎和骨关节炎 T 细胞 STAT4 酪氨酸磷酸化的作用 50 ng/ml IL-12 对骨

关节炎 T 细胞在 30 min 后引起活化效应最为明显,60 min 时活化状态轻度减弱;同样剂量的 IL-12 对类风湿关节炎 T 细胞在 30 min 后也引起明显活化效应,随后轻度减弱(图 3)。各条蛋白条带中 Actin 的灰度值没有明显差异,说明蛋白上样量基本一致。将上述发光显影的 X 线片应用 Bio-Rad Quantity one 软件作图像灰度扫描后,测量 OA 组与 RA 组分别在 0、10、30、60 min 各时间点的灰度值,数值为和 Actin 的灰度的比值。统计学分析表明,在 IL-12 作用后的 10、30、60 min,类风湿关节炎外周血 T 细胞引起的活化效应明显强于骨关节炎的外周血 T 细胞(表 2)。

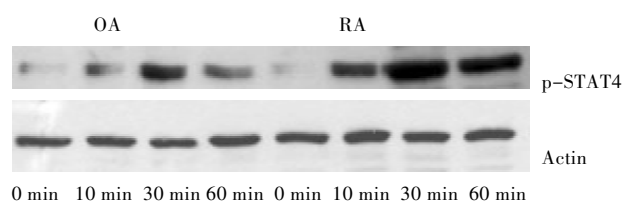


图 3 IL-12 对 OA 和 RA 外周血 T 淋巴细胞 STAT4 酪氨酸磷酸化的作用比较 p-STAT4:STAT4 酪氨酸磷酸化

Fig.2 Comparison of the action of STAT4 tyrosine phosphorylation in peripheral T-lymphocytes induced by IL-12 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. p-STAT4 is STAT4 tyrosine phosphorylation

表 2 IL-12 对骨关节炎和类风湿关节炎外周血 T 淋巴细胞作用下诱导 STAT4 酪氨酸磷酸化水平的改变

Tab.2 Variation of the level of STAT4 tyrosine phosphorylation in peripheral T-lymphocytes induced by IL-12 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis

组别	次数	0 min	10 min	30 min	60 min
OA 组	6	0.032±0.006	0.058±0.004	0.174±0.035	0.094±0.032
RA 组	6	0.023±0.002	0.122±0.022	0.311±0.021	0.239±0.035

IL-12 在对 RA 组 T 细胞作用 30 min 后达到活化峰值,单因素方差分析结果显示,10、30、60 min 和 OA 组相比差异有统计学意义 ($F = 143.923, P < 0.05$); IL-12 在对 OA 组 T 细胞作用 30 min 后达到活化峰值,单因素方差分析结果显示,10、30、60 min 分别和 OA 组相比差异有统计学意义 ($F = 782.095, P < 0.05$); 在各个时间点(10、30、60 min),RA 组外周血 T 淋巴细胞 STAT4 的磷酸化水平均显著高于相应 OA 组 ($P = 0.0004$)。

3 讨论

在类风湿关节炎的病理过程中,IL-12 主要促进 γ -IFN 的产生和 Th1 介导的自身免疫反应。在 RA 患者的血清和滑液中,IL-12 的水平明显升高,并且与 RA 的疾病活动性密切相关。IL-12 在自身免疫性疾病中发挥重要作用。早期证据表明,IL-12 在 RA 的动物模型,如胶原诱导关节炎模型的发生中发挥重

要作用。在 DBA/1 小鼠中联合应用 IL-12 和 II 型胶原促进了抗胶原的免疫反应,并导致关节局部多核细胞浸润,软骨和骨破坏。

IL-12 是一种异聚体构成的细胞因子,包括 P35 和 P40 两个亚基,中间由 2 个二硫键连接^[7]。IL-12 与 IL-27 同属于 IL-6 相关细胞因子家族。IL-12 由单核细胞、巨噬细胞、树突样细胞核中性粒细胞和 B 细胞产生。TLR 信号诱导非 T 淋巴细胞依赖性 IL-12 的产生。而 T 细胞依赖性 IL-12 的产生由抗原呈递细胞表面的 CD40 和 T 细胞表面的 CD40L 相结合后促进产生。IL-12 还可以诱导 γ -IFN 的产生。IL-12 的受体包括 β 1 和 β 2 两个亚基,与 GPI30 同源,和 IL-12 具有高亲和力。 β 2 亚基作为主要的信号传导分子,募集下游信号分子,如 PTK、JAK₂ 和 TYK₂,以及 STAT3、STAT4 和 STAT5 等。IL-12 的 β 1 亚基不具有信号传递作用,但是可以与细胞因子发生高亲和力的结合。两种亚基在 T 细胞、NK 细胞和 DC 细胞表面表达。它们的表达紧密上调 T 细胞活化。

STAT4 是 STAT 家族中的一员,位于细胞浆中,可由酪氨酸激酶受体磷酸化后形成二聚体,转运到细胞核中,调控基因的表达^[8]。IL-12、IL-23 和 I 型干扰素都可以诱导 STAT4 的产生,进而导致 R-干扰素和 IL-23 的产生。因此 STAT4 是调节辅助性 T 细胞向炎性 Th1 细胞和 Th17 细胞分化的重要分子。

近年来遗传学研究表明 STAT4 的多态性与系统性自身免疫性疾病,包括类风湿关节炎和系统性红斑狼疮的发生密切相关,但是到目前为止还不清楚 STAT4 的 SNP 分子怎样引起免疫紊乱,并导致自身免疫性疾病的发生。在本项研究中采用 IL-12 刺激骨关节炎和类风湿关节炎外周血 T 淋巴细胞,观察到类风湿关节炎的外周血 T 淋巴细胞中 STAT4

的酪氨酸磷酸化水平明显高于骨关节炎,尽管这尚不足以完全揭示 STAT4 分子在类风湿关节炎疾病发生与发展过程中的具体机制,但是说明类风湿关节炎外周血 T 淋巴细胞中 STAT4 分子易于在 IL-12 作用下活化,可能进一步引起下游分子的转录和表达,调节 T 细胞分化状态,参与类风湿关节炎自身免疫病理发生的进程。

参考文献

- [1] Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways; application to autoimmune disease therapy[J]. Cell, 1995, 80 (5): 707-718.
- [2] Germann T, Szeliga J, Hess H, et al. Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(11): 4823-4827.
- [3] Benjamin D, Korman BS, Daniel L, et al. STAT4: Genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity review for current allergy and asthma reports[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2008, 8 (5): 398-403.
- [4] Watford WT, Hissong BD, Bream JH, et al. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4[J]. Immunol Rev, 2004, 202: 139-156.
- [5] Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 251-276.
- [6] 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.
- [7] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(2): 133-146.
- [8] Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals[J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(10): 496-502.

(收稿日期:2010-12-11 本文编辑:连智华)

·读者·作者·编者·

本刊关于“通讯作者”有关事宜的声明

本刊要求集体署名的文章必须明确通讯作者。凡文章内注明通讯作者的稿件,与该稿件相关的一切事宜(包括邮寄稿件、收稿通知单、退稿、退修稿件、校样、版面费、稿费、赠刊等)均与通信作者联系。如文内未注明通讯作者的文章,按国际惯例,有关稿件的一切事宜均与第一作者联系,特此声明!

《中国骨伤》杂志社