肾虚型类风湿关节炎与 B 淋巴细胞人免疫球蛋白 GFc 段受体Ⅱ b 的相关性研究

廖黔华　郭林凯　罗十之　赖若谷　刘晓玲　陈光星

摘要　目的　探索 B 淋巴细胞(B 细胞)人免疫球蛋白 G Fc 段受体Ⅱb(Fcgamma receptor Ⅱb, FcγR Ⅱb)的表达与肾虚型类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)的相关性。**方法**　RA 患者 43 例,其中肾虚型 26 例,非肾虚型 17 例,采用流式细胞术检测外周血幼稚 B 细胞、记忆 B 细胞和前浆细胞表达 FcγR Ⅱb 的水平,分析压痛关节数、肿胀关节数、血沉(ESR)、类风湿因子(RF)和病情活动指数评分(DAS28)与 B 细胞分布及 FcγR Ⅱb 表达水平的相关性;另设健康志愿者对照 21 名。**结果**　肾虚型 RA 外周血记忆 B 细胞及前浆细胞 FcγR Ⅱb 表达分别为(49.65% ±15.86%)及(43.69% ±22.57%),比健康对照组[(64.03% ±6.01%)及(66.59% ±10.18%)]显著下调(P <0.01);非肾虚型 RA 记忆 B 细胞 FcγR Ⅱb 表达[(52.70% ±9.52%)]比健康对照组明显下调(P <0.01);肾虚型 RA 前浆细胞 FcγR Ⅱb 表达明显低于非肾虚组[(56.10% ±17.05%)],差异有统计学意义(P <0.05);B 细胞亚群 FcγRⅡb 表达与压痛关节数、肿胀关节数、ESR、RF 和 DAS28 评分无相关性。**结论**　肾虚型 RA 患者 B 细胞免疫失耐受可能与记忆 B 细胞及前浆细胞表达 FcγRⅡb 下调密切相关,肾虚型 RA 可能存在 FcγRⅡb 基因的异常从而导致自身免疫失耐受。

关键词　类风湿关节炎;肾虚型;B 淋巴细胞;Fc 段受体Ⅱ b

Correlation Research on the Expression of FcγR Ⅱb on B Cells and Rheumatoid Arthritis Patients of Shen Deficiency Syndrome

LIAO Qian-hua, GUO Lin-kai, LUO Shi-zhi, LAI Ruo-gu, LIU Xiao-ling, and CHEN Guang-xing　*Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405), China*

ABSTRACT　**Objective**　To study the correlation between the expression of Fcgamma receptor Ⅱb (FcγRⅡb) on B cells and rheumatoid arthritis (RA) patients of Shen deficiency syndrome (SDS). **Methods**　There were 43 RA patients, including 26 of SDS and 17 of non-SDS. The expression levels of FcγRⅡb on naive B cells, memory B cells, and plasma blasts in the peripheral blood were detected by flow cytometry. The numbers of tender joints, numbers of swollen joints, erythrocyte sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor (RF), and disease activity score (DAS28), the correlation between the distribution of B cells and the expression level of FcγRⅡb in RA patients were analyzed. Besides, another 21 healthy volunteers were recruited as the control group. **Results**　The expression level of FcγRⅡb was 49.65% ±15.86% on memory B cells and 43.69% ±22.57% on plasma blasts in RA patients of SDS, significantly down-regulated when compared with those of the control group (64.03% ±6.01%, 66.59% ±10.18%, P <0.01). The expression level of FcγRⅡb on memory B cells of RA patients of non-SDS was down-regulated more obviously when compared with that of the control group (52.70% ±9.52% versus 64.03% ±6.01%, P <0.01). The expression level of FcγRⅡb on plasma blasts was obviously lower in RA patients of SDS than in RA patients of non-SDS (56.10% ±17.05%, P <0.05). The expression level of FcγRⅡb on memory B cells was not correlated with numbers of tender joints, numbers of swollen joints, ESR, RF, or DAS28. **Conclusions**　The defective immunological tolerance of B cells in RA patients of SDS might be closely correlated with

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30873243);教育部新世纪优秀人才资助项目(No.NCET-08-0642)
作者单位:广州中医药大学第一附属医院风湿病科(广州 510405)
通讯作者:陈光星,Tel:13711602757,E-mail:cgx02@hotmail.com
DOI: 10.7661/CJIM.2013.09.1203

中国中西医结合杂志

down-regulation of FcγRⅡb on memory B cells and plasma blasts. There might exist genetic abnormality of FcγRⅡb gene in RA patients of SDS, thus inducing loss of autoimmunity tolerance.

KEYWORDS　rheumatoid arthritis; Shen deficiency; B cell; FcγRⅡb

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种原因不明的自身免疫性疾病,以慢性、对称性、进行性多关节炎为主要特点。关节滑膜的慢性炎症、增生,形成血管翳,侵犯关节软骨、软骨下骨、韧带和肌腱等,造成关节软骨、骨和关节囊破坏,最终导致关节畸形和功能丧失[1],是造成人类丧失劳动力和致残的主要疾病之一。

随着 B 淋巴细胞(B 细胞)清除疗法在 RA 的治疗中取得成功[2],B 细胞自身免疫失耐受在 RA 的发病机制中的作用越来越受到关注。B 细胞是由骨髓内多能造血干细胞分化而来,其分化及发育过程主要在骨髓中完成。"肾主骨生髓"是中医藏象学说的重要理论,历代医家认为肾虚是 RA 发病的重要原因,因此我们推测 RA 患者 B 细胞免疫失耐受可能与肾虚相关,但其机制仍不清楚。

人免疫球蛋白 G Fc 段受体Ⅱb(FcγRⅡb)是表达于 B 细胞表面的抑制性受体,其胞内区免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif,ITIM)磷酸化,可诱导产生 B 细胞活化抑制信号,限制 B 细胞的活化及增殖[3]。近年来,研究表明 RA 患者 B 细胞功能障碍与 FcγRⅡb 低表达密切相关[4],而且 FcγRⅡb 695T > C 基因的变化是 RA 关节破坏重要的因素[5]。

基于以上背景,本研究拟探索 B 细胞 FcγRⅡb 的表达与肾虚型 RA 的相关性及其可能的机制,为进一步阐明肾虚型 RA 的免疫学机制提供临床依据。

资料与方法

1　诊断标准　所有患者均符合美国风湿病协会(ARA)2010 年 RA 分类标准[6];肾虚参考全国中西医结合虚证与老年病研究专业委员会 1986 年制订的中医虚证辨证[7]参考标准:(1)腰脊酸痛,外伤性除外;(2)胫酸膝软或足跟痛;(3)耳鸣耳聋;(4)发脱或齿摇;(5)尿后有余沥或失禁;(6)性功能减退、不孕、不育。上述 6 项具备 3 项即诊断为肾虚证。

2　临床资料　43 例 RA 患者来自 2011 年 7 月—2012 年 4 月广州中医药大学第一附属医院风湿病科门诊及病房,男性 7 例,女性 36 例,平均年龄(44.88 ±10.36)岁;21 名健康对照者来自同期广州中医药大学第一附属医院健康体检志愿者,男性 11 名,女性 10 名,平均年龄(31.71 ±11.04)岁。

纳入研究的 43 例 RA 患者中按中医辨证,17 例为非肾虚组,26 例为肾虚组,两组年龄比较差异有统计学意义(P <0.05)。两组在病程、压痛关节数、肿胀关节数、血沉(ESR)、类风湿因子(RF)和病情活动指数评分(DAS28)方面比较差异无统计学意义(P > 0.05),见表 1。

表 1　非肾虚组及肾虚组 RA 患者临床资料比较　($\bar{x} \pm s$)

项目	非肾虚型 RA 组(17 例)	肾虚型 RA 组(26 例)
年龄(岁)	40.50 ±8.54	48.25 ±9.52*
病程(年)	5.32 ±3.10	6.84 ±5.84
压痛关节数(个)	10.79 ±9.49	11.67 ±10.65
肿胀关节数(个)	5.07 ±5.37	7.04 ±6.89
ESR(mm/h)	40.29 ±29.38	43.53 ±33.22
RF(IU/mL)	311.12 ±579.33	232.30 ±281.34
DAS28 评分(分)	5.82 ±1.82	6.18 ±1.68

注:与非肾虚型 RA 组比较,*P <0.05

3　主要试剂与仪器　鼠抗人 CD19 PE-Cy5(CD19 单克隆抗体,美国 BD 公司)、FcγRⅡb 二抗(美国 eBioscience 公司),FITC 鼠抗人 CD27(美国 BD 公司),FcγRⅡb 一抗(美国 GeneTex 公司),红细胞裂解液(美国 Beckman Coulter 公司),4%多聚甲醛(联科生物技术有限公司)。FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司),L-550 台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

4　观察指标　观察各组外周血 B 细胞亚群比例,各亚群 B 细胞表达 FcγRⅡb 水平,一般资料如性别、年龄、病程,DAS28 评分[包括压痛关节数(28T)、肿胀关节数(28S)、ESR、类风湿因子(FR)和最近一周患者对疾病活动性的综合评价(VAS 评分)]。

5　流式细胞术检测方法　参考文献[8]。取 EDTA 抗凝全血 100 μL,分别加入 CD19 抗体、CD27 抗体、FcγRⅡb 一抗,混匀,室温下避光反应20 min;加入 0.5 mL 红细胞裂解液,混匀,避光反应 15 min;PBS 洗涤后,加入 FcγRⅡb 二抗,混匀,避光反应 20 min;PBS 洗涤后,加入 0.5 mL PBS,上流式细胞仪分析。

6　统计学方法　采用 SPSS 12.0 统计软件包进行数据分析:定量资料均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对各组数据进行正态分布检验和方差齐性检验。3 组间的均数差异采用单因素方差分析法进行比较,方差齐性检验

中国中西医结合杂志

示数据方差齐性时以 *LSD* 方法检验;方差不齐时以 *Dunnett T3* 方法检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。频数资料采用非参数检验进行比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析采用线性回归逐步回归法分析,以 *Pearson* 相关系数(r)度量变量之间的相关性。当 $0.3\leqslant r\leqslant 1.0$,认为两个变量正相关;当 $-1.0\leqslant r\leqslant -0.3$,认为两个变量负相关;且 $P<0.05$ 时 r 值有统计学意义。最后以逐步回归法检验自变量对因变量有无显著性影响。文中示意图使用 GraphPad Prism 5 制作。

结　果

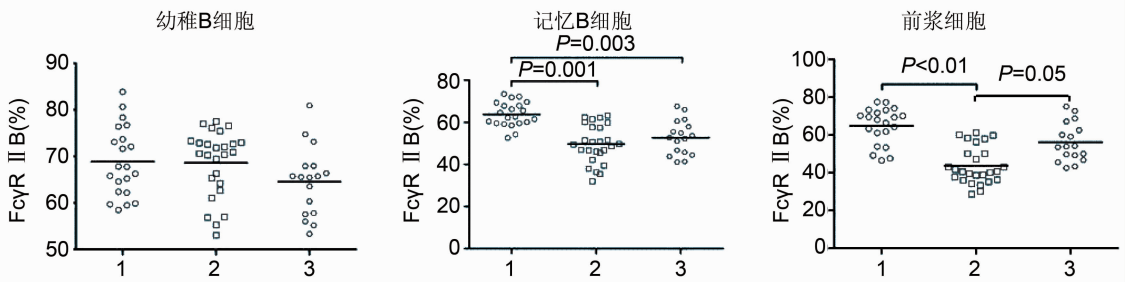
1　3 组外周血 B 细胞亚群比例及各亚群 B 细胞表达 FcγRⅡb 水平比较(图 1)　肾虚型 RA 患者外周血幼稚 B 细胞 FcγRⅡb 表达为 68.60% ± 16.97%,非肾虚型组为 64.53% ± 14.16%,健康对照组为 68.08% ± 9.56%,3 组间均数比较,差异无统计学意义($P>0.05$);肾虚型 RA 患者外周血记忆 B 细胞 FcγRⅡb 表达为 49.65% ± 15.86%,非肾虚型组为 52.70% ± 9.52%,健康对照组为 64.03% ± 6.01%,肾虚型 RA 组、非肾虚型 RA 组与健康对照组比较,差异均有统计学意义($P=0.001$,$P=0.003$),肾虚型 RA 组及非肾虚型 RA 组比较差异无统计学意义($P=0.842$);肾虚型 RA 患者外周血前浆细胞 FcγRⅡb 表达为 43.69% ± 22.57%,非肾虚型组为 56.10% ± 17.05%,健康对照组为 66.59% ± 10.18%,肾虚型 RA 较健康对照组表达明显减少($P<0.01$),肾虚型 RA 组及非肾虚型 RA 组比较差异无统计学意义($P=0.05$)。

2　各组 FcγRⅡb 在外周血 B 细胞 3 个亚群表达水平比较(图 2)　健康对照组及非肾虚型 RA 组外周血中 B 细胞 3 亚群的 FcγRⅡb 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。FcγRⅡb 在肾虚型 RA 患者记忆 B 细胞及前浆细胞的表达水平均较幼稚 B 细胞显著下调($P<0.01$)。

3　RA 患者外周血 B 细胞亚群比例及其 FcγRⅡb 表达水平与临床资料的线性回归分析(表 2)　压痛关节数、肿胀关节数、ESR、RF、DAS28 评分与 B 细胞亚群比例及 FcγRⅡb 表达水平之间均无相关性。

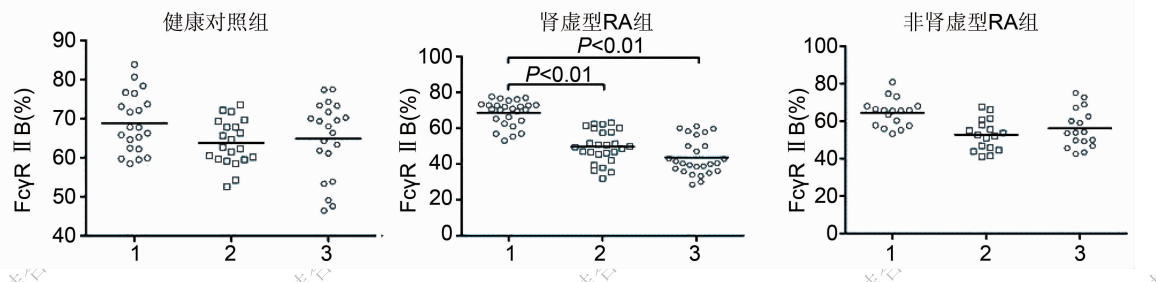
讨　论

RA 属中医学"痹证"范畴,其临床表现与中医古籍所记载的"历节病"、"白虎历节"、"骨痹"等相似。中医学认为"肾为先天之本,主骨生髓",中医经典理论和历代医家认为肾虚是引起 RA 的主要内因,《金匮要略·中风历节病》篇曰:"寸口脉沉而弱,沉即主骨,弱即主筋,沉即为肾,弱即为肝。"明确指出肝肾不足是



注:点阵中水平线代表平均值;1 为健康对照组,2 为肾虚型 RA 组,3 为非肾虚型 RA 组

图 1　各组 B 细胞亚群的 FcγRⅡb 表达水平



注:点阵中水平线代表平均值;1 为幼稚 B 细胞,2 为记忆 B 细胞,3 为前浆细胞

图 2　各组 FcγRⅡb 在外周血 B 细胞 3 个亚群表达水平比较

中国中西医结合杂志

表 2　RA 患者 B 细胞亚群分布及 FcγRⅡb 表达水平与临床表现相关性分析

临床表现		幼稚 B 细胞	记忆 B 细胞	前浆细胞	幼稚 B 细胞的 FcγRⅡb	记忆 B 细胞的 FcγRⅡb	前浆细胞的 FcγRⅡb
压痛关节数	*r*	0.068	−0.277	0.159	−0.127	−0.011	0.076
	P 值	0.343	0.046	0.173	0.224	0.474	0.326
肿胀关节数	*r*	0.249	−0.215	−0.140	−0.159	−0.140	−0.091
	P 值	0.066	0.097	0.201	0.171	0.200	0.294
ESR	*r*	−0.195	0.015	0.235	0.254	0.230	0.017
	P 值	0.003	0.431	0.000	0.043	0.032	0.448
RF	*r*	−0.002	−0.134	0.130	0.075	0.076	−0.004
	P 值	0.496	0.211	0.218	0.328	0.325	0.490
DAS28 评分	*r*	0.142	−0.237	0.011	−0.014	0.028	0.032
	P 值	0.197	0.076	0.474	0.467	0.433	0.424

注:*r* 为 *Pearson* 相关系数;*P* 为相关系数单侧检验的*P* 值

本病发生的主要内因。王肯堂曰:“痹病有风、有湿、有寒、有热……皆标也;肾虚,其本也”。先天禀赋不足,房事过度,或产后失血而致肾虚,一方面正气不足,不能抵御外邪,风寒湿邪侵入人体,痹阻气血;另一方面肾虚可引起主骨生髓功能的失调,血损津亏,筋骨失养,关节结构破坏而致残[9,10]。既然肾虚是 RA 发生的主要内因,众多研究也表明 RA 等自身免疫性疾病的患者中,前 B 细胞在骨髓的发育过程中就已经存在大量表达自身抗体的情况[11,12]。那么,肾虚与 B 细胞免疫耐受失调是否存在内在联系?理论上,B 细胞来源于骨髓的干细胞,并在骨髓中发育分化,因此与肾的关系密切,肾虚会导致 B 细胞的发育异常。基于此思路,我们对 451 例 RA 患者研究发现,肾虚型 RA 患者(218 例)出现抗核抗体(ANA)阳性和高滴度 RF 的风险分别是非肾虚型的 2.059 倍和 1.574 倍(数据另文发表),提示肾虚与 B 细胞自身免疫耐受缺陷密切相关,印证了我们的假设,但其发生和发展的确切机制仍不明了,有待于进一步研究。

FcγRⅡb 是 B 细胞表面的抑制性受体,可抑制 B 细胞过度活化及增殖。该受体在骨髓中即可通过克隆排除(clonal deletion)或克隆无反应性(clonal anergy)以及通过受体编辑(receptor editing)使自身免疫性 B 细胞恢复正常。此外,在外周淋巴组织,FcγRⅡb 亦可继续通过克隆排除、克隆无反应性及克隆忽视(clonal ignorance),或滤泡排除(follicular exclusion)、诱导凋亡等途径调节 B 细胞功能[3]。近年来,多项研究表明,FcγRⅡb 在 RA 及系统性红斑狼疮等自身免疫疾病表达下调[5,13]。Catalán D 等[8]观察到,RA 患者的外周血中记忆 B 细胞及前浆细胞的 FcγRⅡb 表达水平降低,而且患者血清中抗环瓜氨酸肽抗体(抗-CCP)滴度低的 RA 患者 FcγRⅡb 高表达,提示外周血 B 细胞表达 FcγRⅡb 下调后 B 细胞过度活化,分泌大量的自身抗体(抗-CCP)。因此,作为 B 细胞活化的负向调节分子,FcγRⅡb 在 RA 自身免疫性疾病中的作用越来越受到重视。

本研究参考 Bohnhorst J 等[14]的方法,以 CD27 将外周血 B 细胞(CD 19^+)分为 3 个不同亚群:CD 19^+CD 27^-为幼稚 B 细胞、CD 19^+CD 27^+为记忆 B 细胞、CD 19^+ ± CD 27^{high}为前浆细胞,以流式细胞术分析外周血 B 细胞 3 个亚群的 FcγRⅢb 表达水平。本研究的结果显示,FcγRⅢb 在 RA 患者的记忆 B 细胞的表达水平均显著下调,该结果与相关 RA 文献类似。而与以往报道不同的是,本研究增加了中医肾虚证型研究的内容,FcγRⅢb 在肾虚型 RA 记忆 B 细胞的下调更为明显,同时肾虚型 RA 患者前浆细胞 FcγRⅢb 表达明显低于非肾虚型;在 B 细胞亚群中,肾虚型 RA 记忆 B 细胞及前浆细胞 FcγRⅢb 表达率比幼稚 B 细胞显著下调。由于肾虚型 RA 患者出现 ANA 阳性和高滴度 RF 的机率明显增高,FcγRⅢb 在诱导 B 细胞免疫耐受方面起着重要作用,肾虚型 RA 记忆 B 细胞及前浆细胞 FcγRⅢb 表达率比幼稚 B 细胞显著下调,提示肾虚型 RA B 细胞免疫失耐受可能与记忆 B 细胞及前浆细胞表达FcγRⅢb下调密切相关。

此外,本研究还对 FcγRⅡb 与 RA 病情活动的相关性进行了研究。目前,国内外对 RA 的活动性多采用 DAS28 进行评价,包括 28 个关节压痛及肿胀程度,ESR 以及患者对自己健康程度的评估,可以客观反映患者病情的活动程度。研究中未发现外周血 B 细胞的 FcγRⅡb 表达水平与压痛关节数、肿胀关节数、ESR、RF 以及 DAS28 评分等相关,提示 FcγRⅡb 与 RA 病情的近期活动程度无相关性。

综上所述,我们推测肾虚型 RA B 细胞免疫失耐受可能与记忆 B 细胞及前浆细胞表达 FcγRⅡb 下调密切相关,肾虚型 RA 可能存在 FcγRⅡb 基因的异常从而导致自身免疫失耐受。本研究结果为进一步深入研究肾虚型 RA 发生和发展的免疫学机制提供了新的临床线索。

参 考 文 献

[1] 中华医学会风湿病学分会.类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2012, 16(2): 4-6.

[2] Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, et al. Efficacy of B cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis[J]. N Engl J Med, 2004, 350(25): 2572-2581.

[3] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(1): 34-47.

[4] Prokopec KE, Rhodiner M, Matt P. Down-regulation of Fc and complement receptors on B cells in rheumatoid arthritis[J]. Clin Immunol, 2010, 137(3): 322-329.

[5] Radstake TR, Franke B, Wenink MH, et al. The functional variant of the inhibitory Fcgamma receptor Ⅱb (CD32B) is associated with the rate of radiologic joint damage and dendritic cell function in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(12): 3828-3837.

[6] Neogi T, Aletaha D, Silman AJ, et al, The 2010 American College of Rheumatology/European League against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: phase 2 methodological report[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9): 2582-2591.

[7] 沈自尹, 王文健.中医虚证参考标准[J]. 中西医结合杂志,1986,6(10): 598.

[8] Catalán D, Aravena O, Sabugo F, et al. B cells from rheumatoid arthritis patients show important alterations in the expression of CD86 and FcγRⅡb, which are modulated by anti-tumor necrosis factor therapy[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(2): 68.

[9] 焦树德.类风湿关节炎从尪痹论治[J]. 江苏中医药, 2008, 40(1): 5-6.

[10] 张浩, 吕爱平.试论肾虚痹证(类风湿性关节炎)发育生物学基础[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(2): 8-11.

[11] Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, et al. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Exp Med, 2005, 201(10): 1659-1667.

[12] von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease [J]. Nat Immunol, 2010, 11(1): 14-20.

[13] Isaák A, Gergely P, Szekeres Z, et al. Physiological up-regulation of inhibitory receptors FcrRⅡ and CR1 on memory B cells is lacking in SLE patients [J]. Int Immunol, 2008, 20(2): 185-192.

[14] Bohnhorst J, Bjorgan MB, Thoen JE, et al. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome [J]. J Immunol, 2001, 167(7): 3610-3618.

(收稿:2012-08-27 修回:2012-11-28)

中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志