

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.02.001

文章编号: 1005-8982(2016)02-0001-05

论著

Th22 细胞和血清白细胞介素 -22 在胶原诱导的 关节炎大鼠模型外周血的表达水平及其机制

张保龙, 尤笑迎, 尹万乐, 田明波, 李达, 马利阁
(郑州人民医院 骨三科, 河南 郑州 450000)

摘要:目的 探讨胶原诱导的大鼠类风湿性关节炎(RA)模型中,Th22 和白细胞介素 -22(IL-22)的水平及其可能的机制。**方法** 构建胶原诱导的大鼠 RA 模型后,流式细胞术检测 Th22 细胞,Real-time PCR 检测 IL-22 mRNA 表达水平,ELISA 检测 IL-22 蛋白表达水平;用 IL-22 封闭抗体中和 RA 大鼠体内 IL-22 后,CCK-8 实验检测 RAFLS 细胞增殖,Real-time PCR 检测 IL-22 和 STAT3 mRNA 表达水平,Western blot 检测 STAT3 蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,RA 大鼠全血中的 Th22 细胞和血清 IL-22 的表达显著增加($P < 0.01$);用 IL-22 封闭抗体中和 RA 大鼠体内 IL-22 后,与对照组比较,RA 大鼠血清 IL-22 显著下降 ($P < 0.01$),RAFLS 细胞增殖能力下降($P < 0.01$),RAFLS 细胞中 STAT3 基因和蛋白水平的表达显著较少($P < 0.01$)。**结论** RA 大鼠模型中,Th22 细胞通过分泌过多的 IL-22 刺激 STAT3 信号途径,从而提升 RAFLS 细胞的增殖能力,参与大鼠 RA 的发病。

关键词: Th22 细胞;IL-22;关节炎;STAT3

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Percentage of Th22 cell and serum IL22 level in peripheral blood: mechanism of collagen-induced arthritis in rat model

Bao-long Zhang, Xiao-ying You, Wan-le Yin, Ming-bo Tian, Da Li, Li-ge Ma
(The Third Department of Orthopedics, Zhengzhou People's Hospital,
Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: Objective To investigate the percentage of Th22 cells and the serum IL22 level in the rat model of collagen-induced rheumatoid arthritis (RA), and to study the mechanism of IL22 on RA. **Methods** After the model of collagen-induced RA was built, Th22 cells were detected by flow cytometry, the mRNA level of *IL22* was detected by real-time PCR, and IL22 protein level was detected by ELISA. After the RA rats were injected with IL22 blocking antibody, the proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synovio-cytes (RAFLS) was observed by CCK-8, the mRNA levels of *IL22* and *Stat3* were detected by real-time PCR, the level of STAT3 protein was observed by Western blot. **Results** The percentage of Th22 cells and the serum IL22 in the peripheral blood of RA rats were significantly higher than those in the control rats ($P < 0.01$). After the RA rats were injected with IL22 blocking antibody, the expression of serum IL22 decreased ($P < 0.01$) and the proliferation of RAFLS decreased ($P < 0.01$), the levels of *Stat3* mRNA and STAT3 protein also significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusions** Th22 cells are involved in the pathogenesis of RA in the rat model by stimulating STAT3 signaling pathway through IL22 secretion, which in turn promotes RAFLS proliferation.

Keywords: Th22 cell; IL22; arthritis; STAT3

收稿日期:2015-10-16

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性进行性自身免疫性疾病,以关节滑膜炎及对称性关节软骨破坏为主要特征,临床表现为关节间隙变窄,晚期可出现关节畸形,致残率很高,是造成我国人群丧失劳动能力和残疾的主要疾病之一,给社会和家庭造成了很大的经济负担。类风湿性关节炎的病因尚不清楚,多项研究^[1]表明与机体免疫异常有关,CD4⁺T 细胞免疫功能紊乱是其发病的关键环节。Th22 细胞是新近发现的 CD4⁺T 细胞功能亚群,以分泌细胞因子白细胞介素 -22(IL-22)为特征。研究表明,Th22 细胞及其效应因子 IL-22 在自身免疫介导的组织损伤,包括器官特异性自身免疫反应中起着关键作用^[2]。在自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、银屑病及溃疡性结肠炎等^[3-4]中,IL-22 的表达是上调的。但目前为止,Th22 和 IL-22 在类风湿性关节炎发病机制中的作用报道尚少,本文旨在运用胶原诱导的大鼠类风湿性关节炎模型,分析大鼠体内 Th22 和血清中 IL-22 的水平,探讨 Th22 和 IL-22 在类风湿性关节炎发病机制中的作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与主要试剂

1.1.1 实验动物与分组 健康清洁级 Wistar 雄性大鼠 60 只,体重(120 ± 15)g,由南京医科大学动物实验中心提供。实验过程中对动物的处置遵循中华人民共和国科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。动物在实验前适应性喂养 1 周,每笼 3 只,动物房温度在 23 ~ 25℃,湿度在 40% ~ 60%,12 h 明暗交替。采用完全随机法,随机取 16 只分为正常组,anti-IL-22- 对照组,其余大鼠采用 II 型胶原和弗氏不完全佐剂制备 RA 模型,将造模成功的 16 只大鼠随机分为 RA 组,anti-IL-22-RA 组。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基及胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)购自 Gibco 公司,ELISA 试剂盒(R&D 公司),流式抗体 CD4PECy5、IFN- γ FITC、IL-17PE 及 IL-22APC (BD 公司),IL-22、U6、GAPDH 及 STAT3 引物购自上海吉玛生物技术有限公司,Trizol (Invotrogen 公司),Real-time PCR 试剂盒(ROCHE 公司),anti IL-22 封闭抗体、抗 IL-22 抗体及抗 STAT3 抗体(Abcam 公司),抗 β -actin 抗体(Santa Cruz 公司),羊抗兔二抗(Santa Cruz 公司),CCK-8 购自上海博谷生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 取适量 II 型胶原溶于 0.1 mol/L 的乙酸溶液中,使其最终浓度为 2 mg/ml,放置于 4℃ 冰箱中摇晃过夜,次日与等量的弗氏不完全佐剂于冰上充分乳化,达到油包水状态则为乳化完全。于大鼠左后跖底部注射 0.2 ml/ 只的乳剂,7 d 之后在尾根追 0.2 ml/ 只,进而诱发类风湿性关节炎模型^[5]。模型成功的标准为大鼠食量减少,毛色略黄无光泽,行动迟缓,体重减轻,足爪红肿,足垫增厚,不能负重,甚至出现跛行。

1.2.2 大鼠滑膜 RAFLS 细胞培养 引颈处死大鼠,无菌条件下取滑膜组织,采用 HBSS 液反复漂洗组织块 3 次后剪成约 1 ~ 2 mm³ 小块。组织块贴壁培养,待滑膜 FLS 长出后,胰蛋白酶消化细胞传代培养。采用生长状态良好的第 3 ~ 5 代细胞进行实验。

1.2.3 流式细胞术检测大鼠全血中 Th22 细胞 取新鲜采集的大鼠肝素抗凝的外周血 5 ml,制备成单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),将 PBMC 分别用 PBS 缓冲液洗 1 遍并重悬于 100 μ l PBS 缓冲液中,加入 CD4-PECY5 (0.2 mg/ml)、IL-17-PE (0.2 mg/ml) 和 IL-22-APC (0.25 mg/ml) 抗体,4 度避光孵育 30 min, PBS 洗 2 遍以及,上机检测(BD FACS Calibur),Th22 细胞表现为 CD4⁺IL-17-IL-22⁺ 细胞群。

1.2.4 Real-time PCR 检测 IL-22 mRNA 表达水平 新鲜采集的大鼠外周血 2 ml,静置 6 h 后,离心取上清,依照产品说明书,以 U6 作为内参,检测 IL-22 mRNA 的表达水平。IL-22 引物:正向 5'-CGAT TGGGGAAGCTGGACCTG-3',反向 5'-GGACGTTAGC TTCTCACTTT-3'。

1.2.5 ELISA 检测 IL-22 蛋白表达水平 取新鲜采集的大鼠外周血 2 ml,静置 6 h 后,离心提取上清液,依照产品说明书,ELISA 试剂检测 IL-22 蛋白表达水平。

1.2.6 CCK-8 实验检测 RAFLS 细胞增殖 将对数生长期的 RAFLS 细胞以 50% 的融合率接种至 96 孔板,每组设置 3 个复孔,同时设置不含细胞的空白培养基作为对照组,37℃,5% 二氧化碳 CO₂,95% 湿度下培养 24 h 后,分别在培养孔加入 10 μ l CCK-8 溶液;孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm 的吸光值,每孔实测光密度(optical density, OD)值需减去空白对照组 OD 值,取 3 复孔平均值,记录 OD 值。

1.2.7 Real-time PCR 检测 STAT3 mRNA 表达水平

将培养至对数生长期的大鼠 RAFLS 细胞,用 Trizol 提取各组总 RNA,反转录为 cDNA,依照产品说明书,以 U6 作为内参,检测 STAT3 mRNA 的表达水平。Stat3 引物:正向 5'-GGAGGAGGCATTCGGAA AGTA-3',反向 5'-CTGCAGGTCGTTGGTGTCAC-3'。

1.2.8 Western blot 检测 STAT3 蛋白表达水平

大鼠 RAFLS 细胞培养至对数生长期,按照蛋白抽提步骤,提取总蛋白;采用 BCA 法测定总蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳后转移到 NC 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1.5 h, TBST 洗涤后,分别加入 1 : 1 000 抗 STAT3 抗体、1 : 500 抗 β -actin 抗体,4℃孵育过夜, TBST 洗涤后加入 1 : 5 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,37℃孵育 1 h,再用 TBST 洗涤,化学发光并曝光成像。Western blot 检测以 β -actin 条带作为内参,STAT3 条带与其比较,观察 STAT3 蛋白表达变化。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异比较用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术检测大鼠全血中 Th22 细胞

Th22 细胞在 RA 大鼠全血中表达显著高于正常大鼠,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

2.2 检测血清中 IL-22 mRNA 和蛋白表达水平

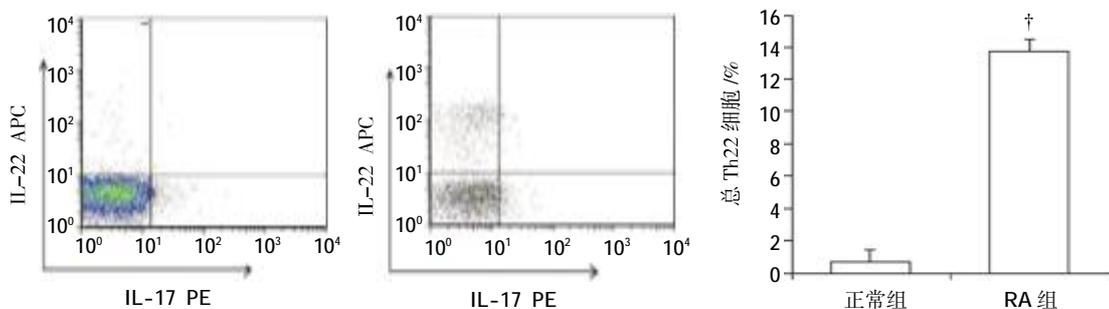
IL-22 mRNA 细胞在 RA 大鼠血清中表达显著高于正常大鼠,具有统计学意义($P < 0.01$);蛋白水平表达同样显著高于正常大鼠,具有统计学意义($P < 0.01$)。此外,与 RA 组比较,IL-22 的中和抗体后能够显著抑制 RA 小鼠体内 IL-22 的蛋白水平。同时注射 IL-22 的中和抗体亦减低 RA 小鼠的 IL-22 mRNA 水平,可能是体内注射 IL-22 中和抗体后可以通过影响其他一系列的复杂机制来调节的 IL-22 的 mRNA 表达情况。见图 2。

2.3 RAFLS 细胞增殖实验

RA 大鼠注射 IL-22 封闭抗体后,与未注射封闭抗体的 RA 大鼠比较,RAFLS 细胞的增殖能力明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

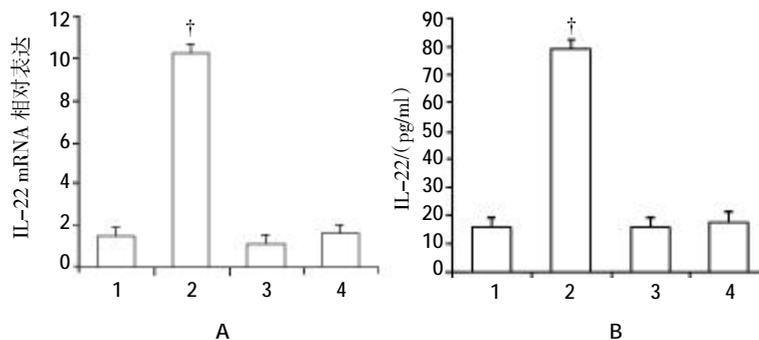
2.4 Real-time PCR 检测 STAT3 mRNA 表达水平

RA 大鼠注射 IL-22 封闭抗体后,与未注射封闭抗体的 RA 大鼠比较,STAT3 mRNA 的表达明显下



† 与正常组比较, $P < 0.01$

图 1 Th22 细胞在正常和 RA 大鼠全血中的表达



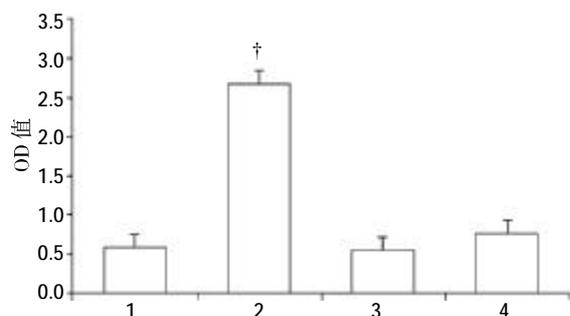
1: 正常组; 2: RA 组; 3: anti-IL-22- 对照组; 4: anti-IL-22- RA 组; A: IL-22 mRNA 表达水平; B: IL-22 蛋白表达水平; † 与其他组比较, $P < 0.01$

图 2 血清 IL-22 在正常和 RA 大鼠中的表达

降,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 4。

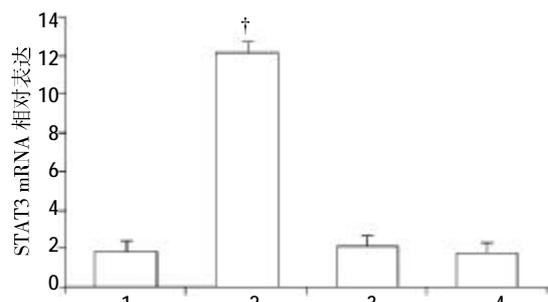
2.5 Western blot 检测 STAT3 蛋白表达水平

RA 大鼠注射 IL-22 封闭抗体后,与未注射封闭抗体的 RA 大鼠比较,STAT3 蛋白表达显著下降(见图 5),差异有统计学意义($P<0.01$)。



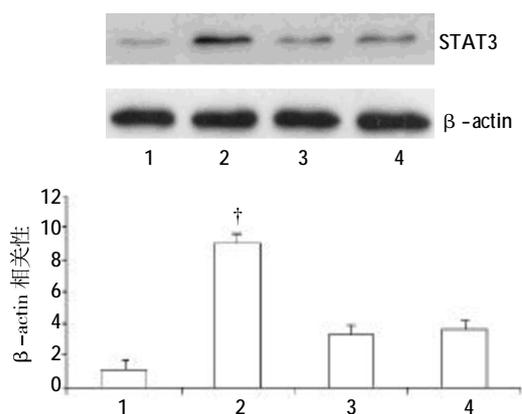
1: 正常组;2:RA 组;3:anti-IL-22- 对照组;4:anti-IL-22- RA 组;† 与其他组比较, $P<0.01$

图 3 血清 IL-22 对 RA 大鼠中 RAFLS 细胞增殖的影响



1: 正常组;2:RA 组;3:anti-IL-22- 对照组;4:anti-IL-22- RA 组;† 与其他组比较, $P<0.01$

图 4 RA 大鼠中 STAT3 mRNA 表达水平



1: 正常组;2:RA 组;3:anti-IL-22- 对照组;4:anti-IL-22- RA 组;† 与其他组比较, $P<0.01$

图 5 RA 大鼠中 STAT3 蛋白表达水平及光密度统计值

3 讨论

类风湿性关节炎(RA)是以对称性多关节滑膜

炎症为主的慢性自身免疫性疾病,能引起软骨破坏,关节间隙变窄,晚期可出现关节畸形,致残率很高。除了关节炎的表现外,RA 还可能出现广泛的全身性病变,如发热、乏力、体重下降、心包炎、胸膜炎及周围神经病变等^[6]。RA 在全球都有发病,发病率平均为 1%,我国的发病率为 1.3%~1.4%,如果不及时诊治,70%的患者 2 年后可能发生不同程度的残疾,平均寿命缩短 10~15 年。目前,RA 的治疗以主要是以甲氨蝶呤为基础的早期联合用药,但这只能缓解 RA 的症状,不能从根本上治愈疾病,且长期使用副作用较大。近年来,临床上应用以 TNF- α 为靶向的生物治疗,但效果一般,且价格昂贵^[7]。RA 发病机制尚未明确,故深入研究 RA 的发病机制对 RA 治疗至关重要。

Th22 细胞是新近发现的一类独立于 Th1、Th2 和 Th17 细胞的 CD4⁺T 淋巴细胞亚群,以高水平分泌 IL-22 为特点,是一个终末分化且独立稳定的谱系^[8-9],其功能主要通过 IL-22 来实现。Th22 细胞参与了炎症反应、自身免疫性疾病、肿瘤等的发生发展,在机体免疫调节、宿主防御及组织修复中发挥重要作用。有研究表明,在 RA 患者的外周血中,IL-22 高表达^[10]。本研究运用胶原诱导的大鼠关节炎模型发现,RA 大鼠模型全血中 Th22 细胞的表达明显高于正常大鼠,血清 IL-22 基因和蛋白水平的表达同样明显高于正常大鼠,说明在 Th22 和 IL-22 参与了 RA 大鼠的发病。RA 发病机制中 FLS 起关键作用。增生的 FLS 释放细胞因子和趋化因子,如 IL-6、IL-8、IL-15 及基质细胞起源因子 SDF-1 等,这些小分子进一步促进了滑膜中白细胞由血管内向滑膜的迁入、活化。FLS 增强了针对关节软骨降解生成特异抗原的免疫应答,促进了 SDF-1 和其他内皮细胞生长因子,包括成纤维细胞生长因子介导的血管再生^[11]。当 RA 大鼠体内 IL-22 被封闭抗体中和后,RAFLS 细胞的增殖显著降低,说明 Th22 和 IL-22 通过影响 RAFLS 细胞增殖,参与 RA 的发病。JAK2-Stat3 信号分子是调控细胞增殖分化重要的细胞内信号通路,JAK2 作为上游激酶,其活化后可以募集胞质中无活性的 Stat3 分子,使其酪氨酸磷酸化而形成有活性的二聚体,进而转移入细胞核,结合 DNA,导致特定靶基因的开启^[12-13]。当 RA 大鼠体内 IL-22 被封闭抗体中和后,RAFLS 细胞中 STAT3 不管基因水平还是蛋白水平,表达都是降低的,提示 Th22 和 IL-22 通过 STAT3 信号途径,影响 RAFLS

细胞增殖。这与 Lerman 等人的研究是一致的^[14]。

综上所述, Th22 细胞作为一种以分泌细胞因子 IL-22 为特征的新型辅助性 T 细胞, 在 RA 大鼠模型中, 通过 IL-22 影响 STAT3 信号途径, 从而影响 RAFLS 细胞的增殖, 参与大鼠 RA 的发病。这为 RA 的生物靶点治疗提供了理论参考依据。

参 考 文 献:

- [1] Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade[J]. *Cytokine*, 2012, 60(1): 38-42.
- [2] Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2013, 72(1): 3-8.
- [3] Ma HL, Liang S, Li J, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2): 597-607.
- [4] Broadhurst MJ, Leung JM, Kashyap V, et al. IL-22⁺ CD4⁺T cells are associated with therapeutic trichuris trichiura infection in an ulcerative colitis patient [J]. *Science Translational Medicine*, 2010, 2(60): 60-88.
- [5] Xiao J, Li G, Hu J, et al. Anti-inflammatory effects of recombinant human PDCCD5 (rhPDCCD5) in a rat collagen-induced model of arthritis[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 70-78.
- [6] Hollan I, Dessein PH, Ronda N, et al. Prevention of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis[J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(10): 952-969.
- [7] 刘雪涛, 李庆. 类风湿性关节炎治疗药物进展[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(6): 1171-1173
- [8] Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(8): 864-871.
- [9] Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(12): 3573-3585.
- [10] Zhang L, Li YG, Li YH, et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e31000.
- [11] Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2013, 9(1): 24-33.
- [12] Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, et al. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia [J]. *Blood*, 2012, 120(15): 3048-3057.
- [13] Lee S, Park HY, Kang SY, et al. Genetic alterations of JAK/STAT cascade and histone modification in extranodal NK/T-cell lymphoma nasal type[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(19): 17764-17776.
- [14] Lerman G, Sharon M, Leibowitz-Amit R, et al. The crosstalk between IL-22 signaling and miR-197 in human keratinocytes[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e107467.

(王荣兵 编辑)