

论著·基础研究

类风湿关节炎患者 B 细胞亚群分析及表没食子儿茶素没食子酸酯对 B 细胞亚群的影响

陈芳倩¹, 阎羽欣¹, 毛梦寒¹, 彭昊¹, 金书欣¹, 蔡强², 杨阳², 岳涛², 朱琦², 席晔斌¹, 陈广洁¹

1. 上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025; 2. 上海中医药大学附属光华医院关节内科, 上海 200052

[摘要] **目的**·探讨类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 患者 B 细胞亚群特点及表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechingallate, EGCG) 对 RA 患者 B 细胞亚群的调节作用。**方法**·纳入年龄、性别匹配的 RA 患者和健康对照各 29 例, 运用配对 *t* 检验分析 2 组外周血中 B 细胞亚群的差异; 根据 28 关节疾病活动评分 (disease activity score in 28 joints, DAS28) 的值将 RA 患者分为活动组 ($2.6 \leq \text{DAS28} < 5.1$) 和高度活动组 ($\text{DAS28} \geq 5.1$), 运用 *t* 检验分析 2 组外周血中 B 细胞亚群的差异。在 0、10、100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 和 2.5 $\mu\text{g/L}$ 葡萄球菌 A 蛋白共刺激条件下, 体外培养 RA 患者外周血单个核细胞, 24 h 后应用实时聚合酶链反应检测 B 细胞活化因子受体 (B-cell-activating factor receptor, *BAFF-R*) 的表达水平, 48 h 后用流式细胞术检测 B 细胞亚群。**结果**·RA 患者的总 B 细胞、未分化 B 细胞、记忆 B 细胞和浆母细胞占淋巴细胞比例和数量均高于健康对照 ($P < 0.05$), 而 $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ 调节性 B 细胞 (regulatory B cell, Breg) 占淋巴细胞比例和数量与健康对照相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。10 例活动组与 19 例高度活动组 RA 患者的总 B 细胞及各 B 细胞亚群 (除 $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ Breg 外) 占淋巴细胞比例和数量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 6 例活动组与 12 例高度活动组 RA 患者 $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ Breg 占淋巴细胞比例和数量的差异也无统计学意义 ($P > 0.05$)。RA 患者外周血总 B 细胞所占比例与 IgG 型类风湿因子呈弱正相关 ($r=0.308$)。EGCG 能显著提高 $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ Breg 占淋巴细胞比例 ($P < 0.05$), 且 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 能显著降低总 B 细胞中 *BAFF-R* mRNA 的表达水平 ($P=0.000$); 但其对未分化 B 细胞、记忆 B 细胞和浆母细胞占淋巴细胞比例无显著影响 ($P > 0.05$)。**结论**·B 细胞可能在 RA 发病中发挥辅助作用, RA 患者 $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ Breg 数量反馈性增加, EGCG 可促进 Breg 增殖, 降低 *BAFF-R* mRNA 表达水平。

[关键词] 类风湿关节炎; 表没食子儿茶素没食子酸酯; B 细胞亚群; 调节性 B 细胞; B 细胞活化因子受体

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.08.011 **[中图分类号]** R392.11 **[文献标志码]** A

Analysis of B cell subsets in rheumatoid arthritis patients and the effect of epigallocatechingallate on B cell subsets

CHEN Fang-qian¹, YAN Yu-xin¹, MAO Meng-han¹, PENG Hao¹, JIN Shu-xin¹, CAI Qiang², YANG Yang², YUE Tao², ZHU Qi², XI Ye-bin¹, CHEN Guang-jie¹

1. Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Department of Arthrology, Guanghua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200052, China

[Abstract] **Objective**·To explore the characteristics of B cell subsets in rheumatoid arthritis (RA) patients and the regulation of epigallocatechingallate (EGCG) on B cell subsets in RA patients. **Methods**·Twenty-nine age- and sex-matched RA patients and 29 healthy controls were selected, and the difference of B cell subsets in peripheral blood between the two groups was analyzed by paired *t*-test. According to the value of disease activity score in 28 joints (DAS28), RA patients were divided into active group ($2.6 \leq \text{DAS28} < 5.1$) and highly active group ($\text{DAS28} \geq 5.1$). The differences of B cell subsets in peripheral blood between the two groups were analyzed by *t* test. Peripheral blood mononuclear cells were cultured *in vitro* under co-stimulation of 0, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG and 2.5 $\mu\text{g/L}$ staphylococcal protein A. The expression level of B-cell-activating factor receptor (*BAFF-R*) mRNA was detected by real-time PCR after 24 h, and B cell subsets were detected by flow cytometry after 48 h. **Results**·The numbers and the proportions of total B cells, undifferentiated B cells, memory B cells and plasmablasts in lymphocytes of RA patients were significantly higher than those of healthy controls ($P < 0.05$), which of $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ regulatory B cells (Breg) of RA patients were not significantly different from those of healthy controls ($P > 0.05$). There was no significant difference in the numbers and the proportions of total B cells and B cell subsets (except $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ Breg) between 10 RA patients of active group and 19 RA patients of highly active group ($P > 0.05$). There was no significant difference in the number and the proportion of $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ Breg in lymphocytes between 6 RA patients of active group and 12 RA patients of highly active group ($P > 0.05$). The proportion of total B cells was weakly positively correlated with IgG type rheumatoid factor ($r=0.308$). EGCG could significantly increase the proportion of $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ Breg ($P < 0.05$) and 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG could significantly suppress the expression of *BAFF-R* mRNA in B cells ($P=0.000$). However, it had no significant effect on the proportions of undifferentiated B cells, memory B cells and plasmablasts in lymphocytes ($P > 0.05$). **Conclusion**·B cells may play an auxiliary role in the development of RA. The number of $\text{CD19}^+ \text{IL-10}^+$ Breg in RA patients increases as a feedback. EGCG can promote Breg proliferation and suppress *BAFF-R* mRNA expression.

[Key words] rheumatoid arthritis (RA); epigallocatechingallate (EGCG); B cell subsets; regulatory B cell (Breg); B-cell-activating factor receptor (BAFF-R)

[基金项目] 国家自然科学基金 (81373208, 81771731); 上海交通大学医学院 2015 级以研究为基础的学习项目; 上海市大学生创新训练计划 (1117008) [National Natural Science Foundation of China, 81373208, 81771731; Shanghai Jiao Tong University School of Medicine Research-based Learning (RBL) Project for Grade 2015; Shanghai University Student Innovation Training Program, 1117008].

[作者简介] 陈芳倩 (1996—), 女, 本科生; 电子信箱: fq_chen@foxmail.com。

[通信作者] 陈广洁, 电子信箱: guangjie_chen@163.com。

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种系统性自身免疫性疾病,以滑膜增生、炎症细胞浸润、血管翳形成及关节软骨和骨基质破坏为主要特征。RA的慢性炎症过程造成的关节功能障碍可致永久性残疾。超过50%的RA患者在25~55岁之间发病,其中女性发病率比男性高2~3倍。目前RA的病因学及发病机制仍未完全阐明。一般认为,RA由遗传因素和环境因素等共同作用诱发。

固有免疫及适应性免疫与RA的发病均有关联,其中适应性免疫尤为重要。传统观点重视T细胞在RA中的作用,认为辅助性T细胞(helper T cell, Th) Th1/Th2的失衡在RA的发病中发挥重要的作用^[1]。后续发现的Th17细胞与滤泡辅助性T(follicular helper T, Tfh)细胞异常增高是对传统理论的重要补充^[2]。此外,研究^[3]发现RA患者体内存在活性异常的B细胞和高表达的自身抗体谱,证明B细胞同样参与了RA的自身免疫过程。以B细胞为靶点,如抗CD20单克隆抗体的临床治疗已取得一定成效^[4]。因而推测,B细胞亚群在RA的发病过程中起着重要作用。国内外已有一些研究^[5-7]表明,RA患者体内的B细胞亚群与健康对照组存在差异,但不同研究对于两者B细胞亚群比较的结果也存在差异,此差异可能与B细胞表面分化抗原标记方法和实验选取的人种不同有关。绿茶多酚中的重要组分表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechingallate, EGCG)具有免疫调节活性,对包括RA在内的多种自身免疫性疾病有潜在的治疗作用^[8]。EGCG对于B细胞的免疫调节作用也得到了实验^[9-10]的支持。

近年来,随着调节性T细胞的功能不断被发现,调节性B细胞(regulatory B cell, Breg)也受到越来越多的关注。实验^[11]表明,Breg在RA中有负调节作用,与疾病活动呈负相关。然而,Breg在RA中的研究相对缓慢,且关于EGCG对RA患者体内Breg影响的研究仍是空白。

本研究采用流式细胞术及实时聚合酶链反应(real-time PCR)比较RA患者与健康对照组中B细胞亚群的差异,分析B细胞各亚群与RA严重度的关系;并研究不同浓度EGCG对RA患者外周血B细胞比例及功能的影响,以此探究EGCG在RA治疗方面的潜在作用。

1 资料与方法

1.1 临床样本

选择2015年10月至2018年9月在上海中医药大学附属光华医院风湿内科门诊就诊或住院的RA患者作为研究对象。诊断标准参照2010年美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)与欧洲抗风湿

病联盟(European League Against Rheumatism, EULAR)发布的RA最新分类标准与评分系统。纳入标准:①符合上述诊断标准的RA患者。②年龄27~85岁。③未经免疫抑制剂治疗。排除标准:①关节严重畸形的晚期患者或关节功能IV级者。②合并重要器官的严重疾病,如心、肺、肝、肾或多系统疾病等。③并发其他自身免疫性疾病,如严重的膝骨关节炎、强直性脊柱炎、干燥综合征、系统性红斑狼疮等。④过敏体质或对中药难以耐受者。⑤消化道溃疡、出血活动期的患者。纳入的健康对照为同一时期的健康体检者,无自身免疫性疾病,年龄30~82岁。纳入者均详细了解试验内容并自愿签署知情同意书。本研究已通过上海中医药大学附属光华医院伦理委员会批准。

1.2 实验试剂及仪器

葡萄球菌A蛋白(staphylococcal protein A, SPA)、EGCG、佛波醇酯(phorbol myristate acetate, PMA)、离子霉素(ionomycin, ion)均购自美国Sigma公司,FITC标记的抗人CD19抗体、PE标记的抗人CD27抗体、PE标记的抗人白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)抗体、胞膜破膜固定液、胞膜破膜洗液购自美国eBioscience公司,蛋白转运抑制剂(Brefeldin A, BFA)购自美国Biolegend公司,TRIzol裂解液购自美国Life Technologies公司,RPMI1640培养基购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,real-time PCR引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。CA-1390-1循环气流垂直洁净工作台购自上海上净净化设备有限公司,HERAcell 150i细胞培养箱购自美国Thermo公司,FACSCalibur流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血单个核细胞的分离 抽取3 mL静脉血加到乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,加入PBS稀释,轻轻吹打,混匀;吸取淋巴细胞分离液Ficoll至离心管,将稀释后血液在液面上方约1 cm处沿管壁缓慢加入。离心后小心吸出云雾层,PBS洗涤2次后进行外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)计数。

1.3.2 流式细胞术 取 0.7×10^6 个分离后的PBMC,加入FITC标记的抗人CD19抗体和PE标记的抗人CD27抗体,室温避光孵育3 min。2%多聚甲醛固定,混匀后流式细胞仪检测。总B细胞、未分化B细胞、记忆B细胞、浆母细胞的表面标记分别为CD19⁺、CD19⁺CD27⁻、CD19⁺CD27⁺、CD19⁺CD27^{hi}。

取 1×10^6 个分离后的PBMC,加入SPA、PMA、ion

和 BFA, 刺激 5 h 后, 加入 FITC 标记的抗人 CD19 抗体, 室温避光孵育 30 min; 流式细胞仪上机缓冲液洗涤后, 加入胞膜破膜固定液, 室温孵育 20 min。胞膜破膜洗液洗涤后, 加入 PE 标记的抗人 IL-10 抗体, 室温避光孵育 30 min。胞膜破膜洗液洗涤后, 2% 多聚甲醛固定, 混匀后流式细胞仪检测。Breg 亚群的表面标记为 CD19⁺ IL-10⁺。

1.3.3 PBMC 与 EGCG 共培养 将 RA 患者的 PBMC 与 EGCG 在 96 孔板中共培养, 每孔 5×10^5 个细胞, 加入 2.5 $\mu\text{g/L}$ SPA (储存浓度 1 mg/mL, 溶于 ddH₂O); EGCG 以二甲基亚砜配制成 10 mmol/L 储存液, 对照组、低浓度组、高浓度组的 EGCG 浓度分别为 0、10、100 $\mu\text{mol/L}$; 每孔 200 μL 体系, 余量用 RPMI 1640 完全培养液补足。在 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中, 细胞与不同浓度的 EGCG 共培养 48 h。

1.3.4 Real-time PCR 血液样本经乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K2) 抗凝, 常规分离 PBMC, 与不同浓度 EGCG 共培养 48 h。将细胞悬液离心, 弃上清, 加入 TRIzol 裂解液反复吹打。在 PubMed 数据库上查询 B 细胞活化因子受体 (B-cell-activating factor receptor, *BAFF-R*) 的基因 ID, 输入到 PrimerBank 数据库, 获得引物序列。其中, 上游引物 5'-TGGGTCTGGTGAAGCTGGA-3', 下游引物 5'-CCGGAGACAGAATGATGACCTT-3'。PCR 条件: 反转录 37℃ 15 min; 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环。紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度。

1.3.5 28 关节疾病活动评分的计算 28 关节疾病活动评分 (disease activity score in 28 joints, DAS28) 是 RA 患者疾病活动度的一个评估指标, DAS28 的值越高, 表明临床上患者疾病活动度越高、病情越严重。临床常用压痛关节数 (tender 28, T28)、肿胀关节数 (swollen 28, SW28)、红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR) 数值计算 DAS28。T28、SW28 由上海中医药大学附属光华医院关节内科医师评估得出; 检查双侧近端指间关节、掌指关节、腕关节、肘关节、肩关节及膝关节共 28 个关节, 得出关节压痛或被动活动时的 T28; 检查上述 28 个关节肿胀与否, 得出 SW28。ESR 在临床上主要用于对患者病情变化的辅助观察, 与病情轻重程度呈正相关, ESR 由上海中医药大学附属光华医院检验科进行检测。根据以下公

式计算出 DAS28: $\text{DAS28} = [0.56 \times \sqrt{\text{T28}} + 0.28 \times \sqrt{\text{SW28}} + 0.70 \times \ln(\text{ESR})] \times 1.08 + 1.06$ 。根据 DAS28 的值, 将患者样本分为活动组 ($2.6 \leq \text{DAS28} < 5.1$) 和高度活动组 ($\text{DAS28} \geq 5.1$)。

1.3.6 其他临床指标分析 C 反应蛋白 (C reactive protein, CRP) 是一种敏感的炎症标志物, 其浓度会于急性创伤或感染时急剧升高, 可作为 RA 活动判断的重要指标。CRP 值采用散射比浊法测定。

类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) 是确诊 RA 的重要实验室指标, 其中血清 IgG 型 RF (RF-IgG) 体现患者滑膜炎、血管炎和关节症状的严重程度, 特异度较高。RF-IgG 采用酶联免疫法测定。

由上海中医药大学附属光华医院关节内科医生采用视觉模拟评分法 (Visual Analogue Scale, VAS) 对疼痛进行评估。使用 0 ~ 100 mm 代表无疾病活动度到最大疾病活动度, 来评价患者在过去 1 周的总体疾病活动情况。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件对数据进行分析处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。RA 患者与健康对照组间比较用配对 *t* 检验, RA 患者活动组与高度活动组间比较用非配对 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。相关性研究采用直线相关分析。*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

因研究所能获得 RA 患者和健康对照的临床标本量及血样量有限, 故每一部分实验的样本数量不相同。在比较 RA 患者与健康对照组总 B 细胞及其亚群比例时, 各纳入 29 例 (实验 A); 在比较 RA 患者与健康对照组 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 比例时, 各纳入 18 例 (实验 B); 在 EGCG、SPA 体外共刺激 PBMC 后, 分析 B 细胞亚群及 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 比例时, 纳入 6 例 RA 患者 (实验 C); 在 EGCG 刺激后, 通过 real-time PCR 检测 *BAFF-R* 表达水平时, 纳入 7 例 RA 患者 (实验 D)。各实验纳入的 RA 患者与健康对照的临床资料见表 1。

表 1 各组实验 RA 患者基线资料及临床指标
Tab 1 Baseline data and clinical indicators of RA patients of all experiments

实验	组别	N	年龄 / 岁	性别 / n		SW28 / 个	T28 / 个	ESR / (mm/h)	CRP / (mg/L)	DAS28	VAS/mm
				男	女						
A	RA 患者	29	61 ± 11 ^①	9	20	6 ± 7	8 ± 9	38.24 ± 25.47	21.61 ± 32.80	5.7 ± 1.6	53 ± 18
	健康对照	29	60 ± 11	9	20	—	—	—	—	—	—

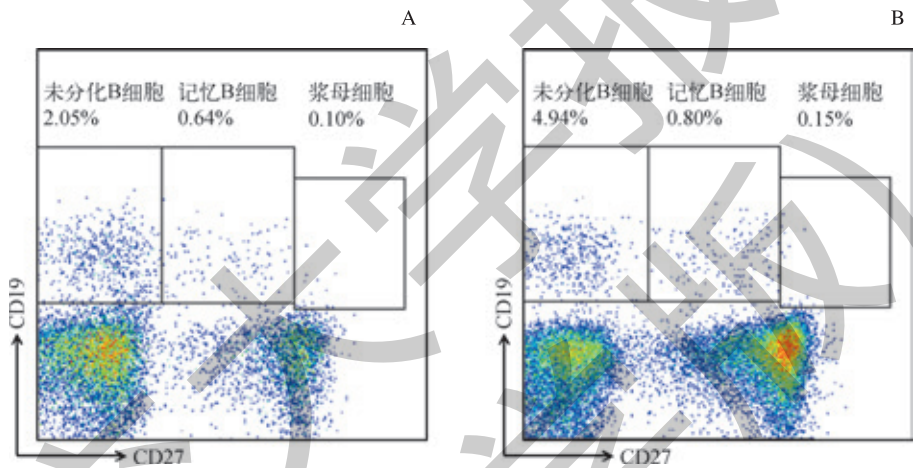
(续表 1)

实验	组别	N	年龄 / 岁	性别 / n		SW28/ 个	T28/ 个	ESR/ (mm/h)	CRP/ (mg/L)	DAS28	VAS/mm
				男	女						
B	RA 患者	18	65±8 ^②	7	11	7±7	10±10	39.06±27.54	20.88±22.40	6.0±1.6	51±24
	健康对照	18	64±7	7	11	—	—	—	—	—	—
C	RA 患者	6	65±6	2	4	5±3	10±6	46.83±31.76	46.97±60.73	6.3±0.8	67±8
D	RA 患者	7	64±7	2	5	6±5	12±9	59.43±40.97	41.56±58.39	6.7±1.4	59±25

注：^① $P=0.263$ ，^② $P=0.288$ ，与健康对照比较

2.2 RA 患者与健康对照外周血总 B 细胞及其亚群比较

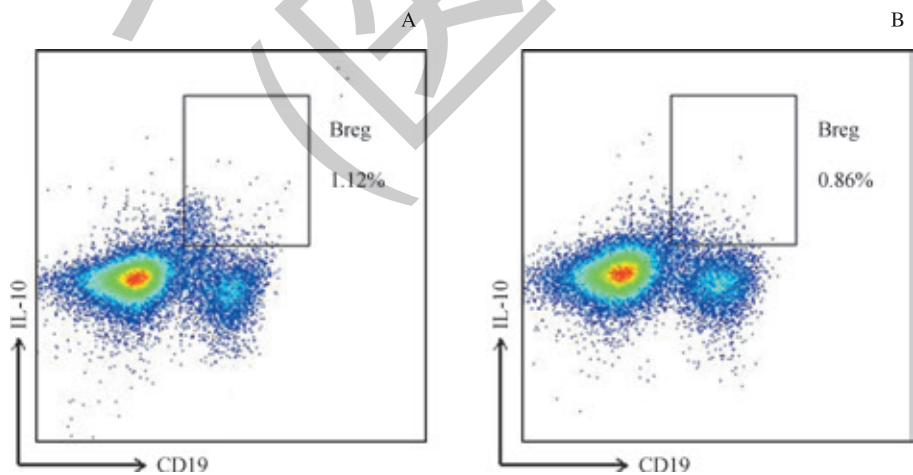
29 例 RA 患者与年龄、性别匹配的健康对照相比较，RA 组总 B 细胞、未分化 B 细胞、记忆 B 细胞和浆母细胞占淋巴细胞比例和数量均高于健康对照（均 $P<0.05$ ）（图 1，表 2）。RA 患者 $CD19^+ IL-10^+ Breg$ 占淋巴细胞比例和数量与健康对照比较差异无统计学意义（均 $P>0.05$ ）（图 2，表 2）。



注：A. 健康对照 B 细胞亚群流式细胞术代表图；B. RA 患者 B 细胞亚群流式细胞术代表图

图 1 健康对照与 RA 患者外周血中 B 细胞亚群（除 $CD19^+ IL-10^+ Breg$ ）的流式细胞术检测

Fig 1 Fluorescence activated cell detection of B cell subsets (except $CD19^+ IL-10^+ Breg$) in peripheral blood of healthy controls and RA patients



注：A. 健康对照 $CD19^+ IL-10^+ Breg$ 流式细胞术代表图；B. RA 患者 $CD19^+ IL-10^+ Breg$ 流式细胞术代表图

图 2 健康对照与 RA 患者外周血中 $CD19^+ IL-10^+ Breg$ 的流式细胞术检测

Fig 2 Fluorescence activated cell detection of $CD19^+ IL-10^+ Breg$ in peripheral blood of healthy controls and RA patients

表 2 健康对照与 RA 患者 B 细胞亚群比较
Tab 2 B cell subsets in healthy controls and RA patients

项目	细胞亚群	健康对照	RA 患者	P 值
占淋巴细胞比例 /%	总 B 细胞	3.50 ± 1.91	7.74 ± 3.93	0.000
	未分化 B 细胞	2.50 ± 1.61	6.26 ± 3.55	0.000
	记忆 B 细胞	0.81 ± 0.37	1.30 ± 0.97	0.009
	浆母细胞	0.11 ± 0.05	0.18 ± 0.17	0.025
	CD19 ⁺ IL-10 ⁺ Breg	0.86 ± 0.49	0.94 ± 0.45	0.685
数量 / 个	总 B 细胞	22 793.77 ± 22 244.79	58 942.75 ± 57 557.29	0.003
	未分化 B 细胞	16 619.26 ± 16 746.97	48 189.13 ± 52 815.57	0.005
	记忆 B 细胞	5 413.74 ± 5 137.44	9 329.25 ± 8 172.69	0.006
	浆母细胞	760.77 ± 675.81	1 424.37 ± 1 812.26	0.037
	CD19 ⁺ IL-10 ⁺ Breg	6 151.95 ± 6 054.41	7 606.58 ± 5 874.83	0.462

注: 各细胞亚群的数量均为每 mL 外周血中的细胞个数

2.3 不同疾病严重度 RA 患者的 B 细胞亚群比较

进一步比较不同疾病严重度 RA 患者的总 B 细胞、未分化 B 细胞、记忆 B 细胞、浆母细胞和 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 的情况 (表 3), 发现活动组 (n=10) 与高度活动组 (n=19) RA 患者总 B 细胞、未分化细胞、记忆 B 细胞和浆母细胞占淋巴细胞比例及数量差异无统计学意义 (均 P>0.05)。此外, 活动组 (n=6) 与高度活动组 (n=12) RA 患者 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 占淋巴细胞比例及数量差异也无统计学意义 (均 P>0.05)。

表 3 不同严重度 RA 患者 B 细胞亚群的比较
Tab 3 B cell subsets in RA patients with different severity

项目	细胞亚群	活动组	高度活动组	P 值
占淋巴细胞比例 /%	总 B 细胞	8.08 ± 4.24	7.57 ± 3.87	0.746
	未分化 B 细胞	6.38 ± 3.79	6.20 ± 3.52	0.899
	记忆 B 细胞	1.49 ± 1.43	1.20 ± 0.64	0.452
	浆母细胞	0.21 ± 0.18	0.17 ± 0.17	0.581
	CD19 ⁺ IL-10 ⁺ Breg	0.86 ± 0.34	1.01 ± 0.53	0.560
数量 / 个	总 B 细胞	72 955.93 ± 90 115.24	51 567.39 ± 30 437.14	0.351
	未分化 B 细胞	59 999.06 ± 84 359.59	41 973.37 ± 25 742.16	0.392
	记忆 B 细胞	10 733.08 ± 9 515.34	8 590.40 ± 7 547.06	0.512
	浆母细胞	2 223.78 ± 2 837.28	1 003.63 ± 736.14	0.085
	CD19 ⁺ IL-10 ⁺ Breg	9 990.56 ± 9 011.25	6 414.60 ± 3 432.00	0.234

2.4 总 B 细胞与患者血清中 RF-IgG 的相关性分析

对 29 例 RA 患者总 B 细胞与血清中 RF-IgG 水平进行线性分析, 发现总 B 细胞占淋巴细胞的比例与 RF-IgG 水平呈弱正相关 (r=0.308, P=0.027) (图 3)。

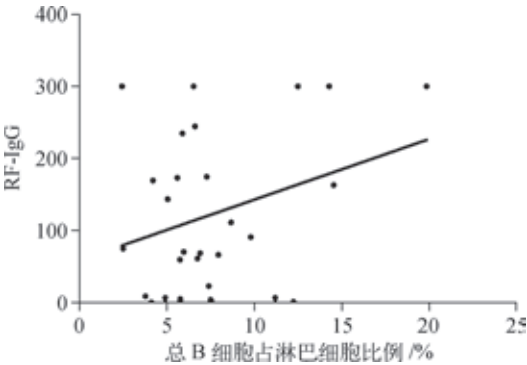


图 3 总 B 细胞占淋巴细胞比例与 RF-IgG 的相关性分析
Fig 3 Correlation analysis of the proportion of total B cells in lymphocytes and RF-IgG

2.5 EGCG 对 RA 患者 B 细胞亚群比例的影响

流式细胞术对体外实验中不同浓度 EGCG 刺激后, 6 例 RA 患者的未分化 B 细胞、记忆 B 细胞、浆母细胞和 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 进行检测, 发现 EGCG 对未分化 B 细

胞、记忆 B 细胞和浆母细胞的总和占淋巴细胞的比例无显著影响 (图 4, 表 4)。此外, EGCG 能显著提高 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 在淋巴细胞中所占比例及 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 与记忆 B 细胞和浆母细胞总和的比值 (图 5, 表 4)。

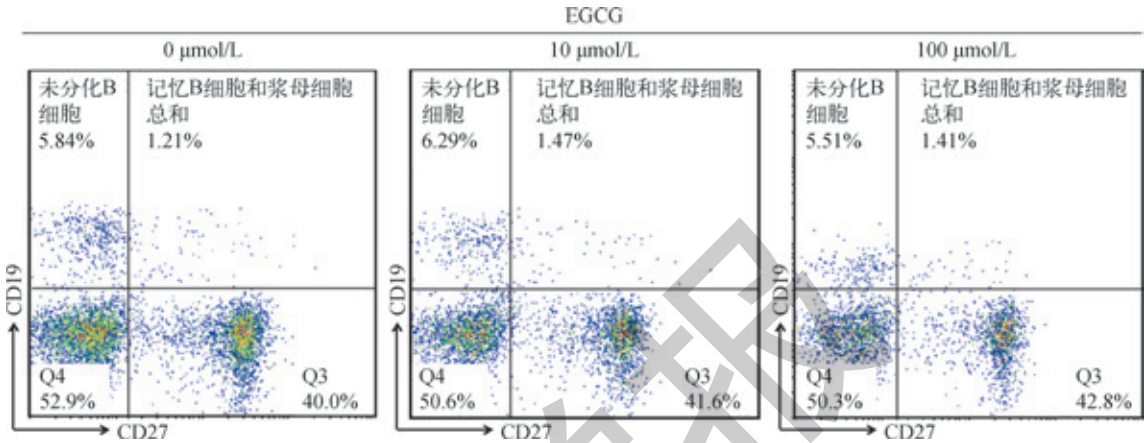


图 4 体外实验中不同浓度 EGCG 刺激下 B 细胞亚群 (除 CD19⁺ IL-10⁺ Breg) 的流式细胞术检测
Fig 4 Fluorescence activated cell detection of B cell subsets (except CD19⁺ IL-10⁺ Breg) after different concentrations of EGCG stimulation *in vitro*

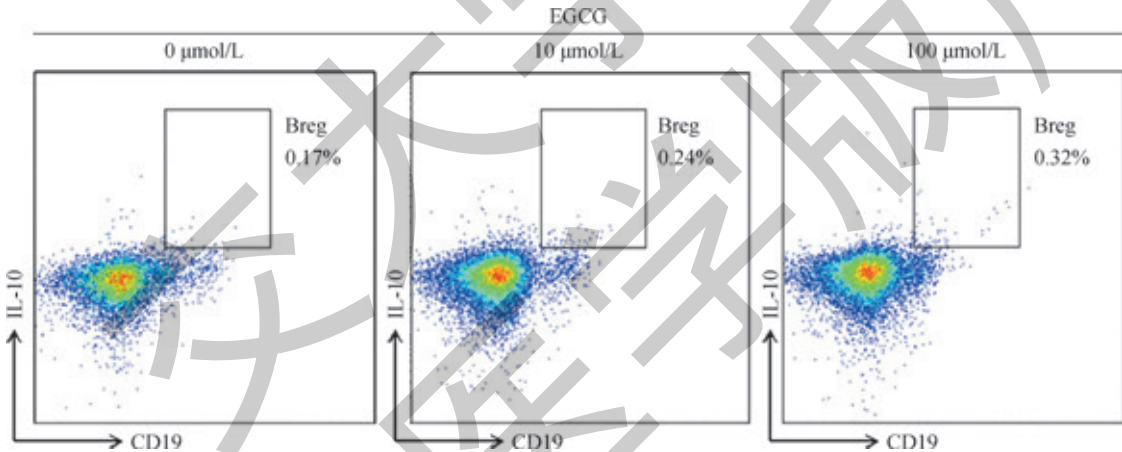


图 5 体外实验中不同浓度 EGCG 刺激下 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 细胞的流式细胞术检测
Fig 5 Fluorescence activated cell detection of CD19⁺ IL-10⁺ Breg after different concentrations of EGCG stimulation *in vitro*

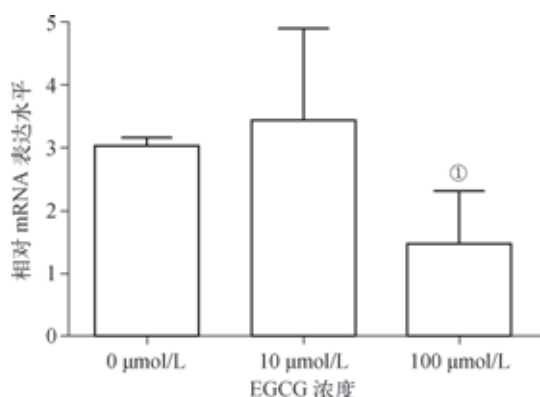
表 4 体外实验不同浓度 EGCG 对 RA 患者 B 细胞亚群的影响
Tab 4 Effects of EGCG on B cell subsets of RA patients *in vitro*

项目	不同浓度 EGCG 处理组之间两两比较的 P 值		
	0 μmol/L vs 10 μmol/L	10 μmol/L vs 100 μmol/L	0 μmol/L vs 100 μmol/L
未分化 B 细胞占淋巴细胞比例	0.221	0.755	0.516
记忆 B 细胞和浆母细胞总和占淋巴细胞的比例	0.240	0.404	0.071
CD19 ⁺ IL-10 ⁺ Breg 占淋巴细胞比例	0.016	0.027	0.042
CD19 ⁺ IL-10 ⁺ Breg 与记忆 B 细胞和浆母细胞总和的比值	0.038	0.435	0.015

2.6 EGCG 对 RA 患者中 BAFF-R 表达水平的影响

在体外实验中, 用 real-time PCR 对不同浓度 EGCG 刺激后的 7 例患者的 B 细胞 BAFF-R 表达水平进行检测,

发现高浓度 EGCG 能显著降低 B 细胞 BAFF-R mRNA 的表达水平 (图 6)。



注: ① $P=0.000$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较

图 6 体外实验中不同浓度 EGCG 刺激下 BAFF-R 表达水平

Fig 6 Expression level of BAFF-R in B cells after EGCG stimulation *in vitro*

3 讨论

王春淮等^[5]研究发现,与健康捐献者(healthy donor, HD)相比,RA 缓解组和难治组的未活化 B 细胞数量显著增多,记忆 B 细胞数量显著下降;RA 活动组和难治组的浆母细胞数量显著增多。Flores-Borja 等^[6]的实验数据则表明,与 HD 比较,活动性 RA 患者外周血中 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} B 细胞数量降低,功能也减退。而 Lindenau 等^[7]发现 RA 患者 B 细胞主体是 CD27⁺ B 细胞,且浆细胞比例升高。以上实验结果的不一致可能是由于对 RA 活动程度的分期标准、选取的患者所属人种及对 B 细胞分群所选取的表面标记不尽相同。因此,RA 患者与健康对照组外周血总 B 细胞及各亚群的比例和相对数量有进一步研究的价值。我们参考国外研究采用的 CD19 和 CD27 双标的方法^[12-13]区分各 B 细胞亚群(除 CD19⁺ IL-10⁺ Breg),选择上海中医药大学附属光华医院风湿内科门诊就诊或住院的 RA 患者作为研究对象,根据 DAS28 的值将患者样本分为活动组($2.6 \leq \text{DAS28} < 5.1$)和高度活动组($\text{DAS28} \geq 5.1$),研究 RA 患者外周血中 B 细胞及其亚群的相对值(占淋巴细胞比例)和绝对值(数量)是否发生变化。结果显示,RA 患者外周血中总 B 细胞、未分化 B 细胞、记忆 B 细胞和浆母细胞占淋巴细胞比例以及 4 群细胞的数量与健康对照相比均显著升高。这提示 B 细胞介导的免疫反应在 RA 的发病中有重要的作用。B 细胞可通过刺激 T 细胞增殖与活化、分泌类风湿因子、分泌炎症因子和趋化因子等机制参与 RA 的发病。近年来,使用单克隆抗体去除 B 细胞以治疗 RA 已得到越来越多的临床研究支持。RA 患者外周血中未分化 B 细胞增多,可能与自身免疫炎症反应中未分化的 B 细胞从骨髓向外周血迁移有关。而记忆 B 细胞与浆母细胞增多,

则反映了 RA 患者体内 B 细胞的异常活化。记忆 B 细胞和浆母细胞均具有分化为浆细胞、分泌自身抗体、参与免疫反应的潜力。不同疾病严重度的 RA 患者之间 B 细胞亚群占淋巴细胞比例的差异无统计学意义,说明虽然 B 细胞参与 RA 的发病但其亚群比例与疾病严重度并不一致,可能表示 B 细胞在 RA 发病中并非发挥主要的致病作用,而是起到促进疾病发生与发展的辅助作用。

Breg 是能够通过产生调节性细胞因子或者直接与病源性 T 细胞相互作用从而抑制免疫反应的一类 B 细胞。Breg 又按照产生细胞因子的不同分为许多功能性亚群。2008 年, Yanaba 等^[14]将小鼠脾脏中能分泌 IL-10 的 CD1d^{hi} CD5⁺ 的 B 细胞亚群定义为 B10 细胞。目前,人类 B10 细胞的特异性表面标记还未完全确定。有研究^[15]表明,CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ IL-10⁺ 和 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 减少可能是导致自身免疫性甲状腺疾病免疫耐受丧失和自身免疫过程发展的原因。目前已有较多文献报道了 IL-10⁺ Breg 与 RA 的关系,然而其结论却并不一致。Zheng 等^[16]发现,活动期 RA 患者($\text{DAS28} \geq 2.6$)的 B10 细胞显著高于健康对照组及缓解期 RA 患者($\text{DAS28} < 2.6$);且从 B10 细胞占 CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} B 细胞比例 $\leq 1\%$ 的 RA 患者体内分离出的 B10 细胞中,其分泌的 IL-10 水平,及其抑制 CD3⁺ T 细胞增殖和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 分泌的作用,均显著低于比例 $> 1\%$ 的 RA 患者的 B10 细胞,体现了 B10 细胞在 RA 发病中作用机制的复杂性。Hu 等^[17]发现高度活动组的 RA 患者($\text{DAS28} \geq 5.1$)的 RANKL⁺ [核因子 κB 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κB ligand)] B10 细胞比例较非高度活动组($\text{DAS28} < 5.1$)显著增加,且 RANKL⁺ B10 细胞可通过旁分泌及直接接触的方式促进破骨效应,揭示了 B10 细胞参与 RA 发病的可能机制。与此两者不同, Bankó 等^[18]则发现,RA 患者的 CD27⁺ IL-10⁺ B10 细胞数量显著低于健康对照,且应用 TNF 拮抗剂治疗后该细胞群数量有所上升。以上诸多实验对于 Breg 与 RA 关系的研究结论并不一致。为研究特定人群中 Breg 与 RA 的关系,我们采用 CD19 及 IL-10 双标的方法标记 Breg,比较 RA 患者与健康对照及不同疾病严重度的 RA 患者外周血中 Breg 的差异。本实验结果显示 RA 患者外周血中 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 数量及占淋巴细胞比例与健康对照相比差异均无统计学意义,此结果与前面提及的实验结果均不相同。可能由多种原因导致:①诸多实验报道中应用的细胞表面标记方法不完全一致,所研究的细胞群不完全等同。② RA 患者病程迁延,体内免疫状态复杂,多种细胞及细胞因子参与 RA 疾病进展,且受多种疾病负性因素的影响,RA 患者体内原本减少的 CD19⁺ IL-10⁺ Breg 数量出

现反馈性增加,最终表现为与健康对照差异无统计学意义。

③本实验仅采集了18例年龄、性别匹配的RA患者与健康对照用于研究CD19⁺IL-10⁺Breg差异,样本数量有限,可能对统计结果产生一定影响。

近年来,国内外学者对EGCG做了大量广泛深入的研究,发现EGCG具有广泛的生物活性,如抗氧化、抗肿瘤、保护神经系统、保护心脑血管、抑菌、干预代谢酶等作用^[19]。此外,已有大量研究证据^[20-23]表明,EGCG在RA的治疗领域具有潜在的应用前景。目前EGCG对适应性免疫细胞影响的研究主要着眼于T淋巴细胞亚群,但EGCG对于RA患者体内B细胞亚群,尤其是Breg的作用研究仍是空白。本实验结果显示,EGCG能显著提高Breg在淋巴细胞中所占比例,且高浓度EGCG较低浓度EGCG的作用更加明显,表明EGCG可以促进Breg的增殖,可能缓解亢进的自身免疫反应。另外,本研究还发现EGCG刺激下,Breg与记忆B细胞和浆母细胞总和的比例显著提高,提示EGCG亦有可能通过影响此比例发挥减轻炎症反应和抑制自身免疫反应的作用。不同浓度EGCG对RA患者未分化B细胞、记忆B细胞和浆母细胞比例无

显著影响,提示EGCG对未分化B细胞、记忆B细胞和浆母细胞无直接影响,其生物活性作用的发挥可能通过调节其他免疫细胞亚群完成。

B细胞活化因子(B-cell-activating factor, BAFF)是TNF超家族一员,主要由髓细胞产生和分泌。BAFF对于外周B细胞的产生、成熟、免疫球蛋白类别转换都起到重要的调控作用^[24]。BAFF-R是BAFF的3种受体之一,是成熟B细胞在外周淋巴器官内存活和维持稳态的重要受体。BAFF/BAFF-R介导的PI3K/Akt/mTOR通路,可诱导B细胞凋亡^[9]。已有研究^[25]发现在自身免疫性疾病患者如RA患者中BAFF和BAFF-R的表达增高。我们发现高浓度EGCG能显著抑制BAFF-R mRNA的表达水平,提示EGCG可能通过抑制B细胞BAFF-R的表达从而抑制B细胞分化发育为浆母细胞。

EGCG对B细胞亚群的比例及功能的影响对于探索EGCG可能的治疗作用提供了新的途径,提示EGCG可以通过调节免疫细胞特别是B细胞来影响机体的免疫调节,从而在多种疾病中发挥重要作用。EGCG影响B细胞比例及功能的具体作用机制还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, et al. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(3): 617-627.
- [2] Zhang Y, Li Y, Lv TT, et al. Elevated circulating Th17 and follicular helper CD4⁺ T cells in patients with rheumatoid arthritis[J]. *APMIS*, 2015, 123(8): 659-666.
- [3] Kim HJ, Berek C. B cells in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res*, 2000, 2(2): 126-131.
- [4] Edwards JC, Szczepanski LJ, Filipowicz SA, 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.
- [5] 王春淮, 徐建华, 翟志敏. 类风湿关节炎外周血CD19和CD27标记的B淋巴细胞亚群及其相关性研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2006, 10(9): 552-555.
- [6] Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(173): 173ra23.
- [7] Lindenau S, Scholze S, Odendahl M, et al. Aberrant activation of B cells in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 987(1): 246-248.
- [8] 林姝婷, 冯德春, 徐凌云. EGCG的免疫调节作用及其机理的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(10): 954-957.
- [9] Liu D, Li P, Song S, et al. Pro-apoptotic effect of epigallo-catechin-3-gallate on B lymphocytes through regulating BAFF/PI3K/Akt/mTOR signaling in rats with collagen-induced arthritis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 690(1/2/3): 214-225.
- [10] Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, et al. Catechin inhibits adhesion and migration of peripheral blood B cells by blocking CD11b[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011, 33(2): 391-397.
- [11] 吴桂英, 李鸿斌. 调节性B细胞与类风湿关节炎活动相关性[J]. *临床荟萃*, 2014, 29(9): 1072-1075.
- [12] Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 50(6): 1918-1927.
- [13] Potter KN, Mockridge CI, Rahman A, et al. Disturbances in peripheral blood B cell subpopulations in autoimmune patients[J]. *Lupus*, 2002, 11(12): 872-877.
- [14] Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses[J]. *Immunity*, 2008, 28(5): 639-650.
- [15] Bossowski A, Grubczak K, Dąbrowska M, et al. Analysis of B regulatory cells with phenotype CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ and CD19⁺IL-10⁺ in the peripheral blood of children with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis[C]. Barcelona: European Society for Paediatric Endocrinology, 2015.
- [16] Zheng Z, Li X, Li X, et al. Characteristics of regulatory B10 cells in patients with rheumatoid arthritis with different disease status[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4584-4591.
- [17] Hu F, Liu H, Liu X, et al. Pathogenic conversion of regulatory B10 cells into osteoclast-priming cells in rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2016, 76: 53-62.
- [18] Bankó Z, Pozsgay J, Gáti T, et al. Regulatory B cells in rheumatoid arthritis: alterations in patients receiving anti-TNF therapy[J]. *Clin Immunol*, 2017, 184: 63-69.
- [19] 葛建, 林芳, 李明揆, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)生物活性研究进展[J]. *安徽农业大学学报*, 2011, 38(2): 156-163.
- [20] Peairs A, Dai R, Gan L, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates inflammation in MRL/lpr mouse mesangial cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(2): 123-132.
- [21] Hsu SD, Dickinson DP, Qin H, et al. Green tea polyphenols reduce autoimmune symptoms in a murine model for human Sjogren's syndrome and protect human salivary acinar cells from TNF- α -induced cytotoxicity[J]. *Autoimmunity*, 2007, 40(2): 138-147.
- [22] 李静, 陈永顺, 梁建梅, 等. 茶多酚对胶原性关节炎大鼠免疫调节作用研究[J]. *安徽医药*, 2015(3): 439-442.
- [23] 孙权业, 张霞, 郑英霞, 等. EGCG治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎免疫学作用机制研究[J]. *现代免疫学*, 2010, 30(3): 190-194.
- [24] 李丹, 任亚娜, 范华骅. 巨噬细胞的分类及其调节性功能的差异[J]. *生命科学*, 2011, 23(3): 249-254.
- [25] 刘丹丹. EGCG通过BAFF介导的PI3K/Akt/mTOR信号通路调节胶原性关节炎大鼠B淋巴细胞功能[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.

[收稿日期] 2019-03-05

[本文编辑] 崔黎明

