

# 柳氮磺吡啶对类风湿关节炎患者外周血来源的树突状细胞免疫活性的影响

韩捷\* 陈海燕 周洁如 王维东 沈培辰

(上海市东方医院免疫科, 上海 200120)

**摘要** 研究柳氮磺吡啶(salicylazosulfapyridine, SASP)对类风湿关节炎患者外周血来源的树突状细胞(dendritic cell, DC)免疫活性的影响, 探讨 SASP 治疗类风湿关节炎的作用机制。分离 18 例类风湿关节炎病人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 分别在 DC 分化成熟的不同阶段加入 SASP, 流式细胞仪检测 DC 表型的改变; 混合淋巴细胞反应检测 DC 对同种异体 T 细胞的刺激作用; 酶联免疫吸附实验检测 IL-12 的表达。实验发现 SASP 不影响 PBMC 经 GM-CSF 和 IL-4 诱导向未成熟 DC 的分化; 但影响未成熟 DC 在 TNF- $\alpha$  刺激下的成熟; 抑制 DC 刺激同种异体 T 细胞增殖和分泌 IL-12 的能力。结果提示 SASP 的抗风湿作用可能与其抑制 DC 成熟及 IL-12 分泌有关。

**关键词** 柳氮磺吡啶; 类风湿关节炎; 树突状细胞

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变为主要临床表现的自身免疫炎性疾病, 其病因尚未明了。一般认为 RA 的发生涉及抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)对自身抗原的异常呈递, 导致自身反应性 T 细胞的激活。树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内最强的专职性 APC, 在诱发免疫反应以及免疫耐受的形成中起到重要的作用<sup>[1, 2]</sup>。柳氮磺吡啶(salicylazosulfapyridine, SASP)作为慢作用抗风湿药, 能起抗菌、消炎和免疫抑制作用, 用于 RA 治疗, 已有确定疗效<sup>[3]</sup>, 但其作用机制并不十分清楚。本实验拟从 SASP 对 DC 免疫活性的影响着手, 探讨其抗风湿作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

18 例 RA 患者来自同济大学附属东方医院, 诊断均符合 1987 年美国风湿病学会(ARA)修订的 RA 诊断标准。年龄 31~63 岁, 平均 45.1 岁, 病程 2~12 年, 平均 5.2 年。

### 1.2 主要试剂和仪器

SASP (Sigma 公司), RPMI1640 培养基(Gibco 公司), 胎牛血清(Hyclone 公司), 淋巴细胞分离液(Axis-shield 公司), rhIL-4、rhGM-CSF、hTNF- $\alpha$  (Peprotech 公司), PE-CD83、PE-CD86、APC-HLR-

DR(eBioscience 公司), FACS Aria Cell Sorter 流式细胞仪(BD 公司), Human IL-12 ELISA Development Kit (Biovision 公司), CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II、MiniMACS 免疫磁珠分离器(Miltenyi Biotec 公司)。

### 1.3 外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离

抽取 20 ml RA 患者静脉新鲜抗凝血, 加入等量 PBS 混匀稀释, 以淋巴细胞分离液作密度梯度离心(20 °C, 1 800 r/min, 20 min), 取白色雾状细胞层, PBS 液洗涤 2 次(4 °C, 1 500 r/min, 5 min 离心), 得到 PBMC。

### 1.4 DC 的体外诱导培养及药物干预

用 RPMI1640 重悬细胞, 调节细胞密度为  $2 \times 10^6$  个/ml, 在培养板中 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 2 h。弃培养上清液, 获得贴壁的单核细胞。对照组每孔再加入含有 100 ng/ml rhGM-CSF、50 ng/ml rhIL-4 的 RPMI1640 培养基。培养第 5~7 天, 获得未成熟 DC。再加入 25 ng/ml hTNF- $\alpha$ , 培养 2~3 天刺激其成为成熟 DC。实验组在加入与对照组同剂量 rhGM-CSF、rhIL-4 的同时, 加入 SASP 一起培养 5~7 天, 洗去 SASP 后, 加入与对照组同剂量 hTNF- $\alpha$  培养 2~3 天刺激 DC 成熟。另一实验组加入与对照组同剂量 rhGM-

收稿日期: 2008-05-13 接受日期: 2008-07-11

上海市卫生局科技发展基金资助项目(No.054005)

\* 通讯作者。Tel: 021-38804518-8364, E-mail: hjgj85528@yahoo.com.cn

CSF、rhIL-4 培养 5 天后, 加入 hTNF- $\alpha$  的同时加入 SASP 再培养 2~3 天。

### 1.5 细胞表面标志测定

收集  $1 \times 10^6$  个/样本的培养细胞并用 PBS 洗涤 2 次, 分别加入 20  $\mu$ l PE 或 APC 标记的相关单抗, 混匀后放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱中温育 30 min, PBS 洗涤 2 次, 流式细胞仪进行检测分析。

### 1.6 细胞周期测定实验

收集细胞  $2 \times 10^6$  个, PBS 洗涤 2 次, 加入冰预冷的 70% 乙醇固定, 4  $^{\circ}$ C, 过夜。离心弃去固定液, 3 ml PBS 重悬 5 min。400 目的筛网过滤 1 次, 离心弃去上清液。用 PI 染液 1 ml 染色, 4  $^{\circ}$ C 避光 30 min。流式细胞仪进行检测, 实验结果用随机软件 Modifit 分析。

### 1.7 混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)

用免疫磁珠法获取 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞  $1 \times 10^6$  个/孔作为反应细胞, 诱导成熟的 DC 作为刺激细胞, 以不同比例混合, 加于 96 孔板。以与 DC 供体同来源的 PBMC 作为比较基数。5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 培养 72 h, 加入 10  $\mu$ l 5 mg/ml MTT 继续培养 4 h, 弃培养上清液, 加 DMSO 震荡后放置 10 min, 测定 570 nm 波长的 A 值。

### 1.8 酶联免疫吸附实验

取细胞培养上清液, 按照试剂盒说明书操作检测 IL-12p70 含量, 结果以 pg/ml 表示。

### 1.9 统计分析

用 SPSS10.0 统计软件进行数据分析, 结果  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间计量资料比较采用随机分组的方差分析,

$P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 DC 的诱导

分离 RA 患者 PBMC, 利用 rhGM-CSF、rhIL-4 培养 5~7 天。此时, CD83、CD86、HLA-DR 呈低表达。此后加入 hTNF- $\alpha$  刺激, CD83、CD86、HLA-DR 则明显上调(图 1)。

### 2.2 SASP 不影响 PBMC 向未成熟 DC 的分化, 但影响 DC 成熟

在加入 rhGM-CSF、rhIL-4、hTNF- $\alpha$  刺激 PBMC 向 DC 分化成熟的过程中的不同阶段加入 SASP。即在 PBMC 加入 rhGM-CSF、rhIL-4 时加入 SASP 培养 5~7 天, 洗去 SASP 后再加入 hTNF- $\alpha$  刺激, 与未加入 SASP 组相比无显著性差异。说明 SASP 不影响 PBMC 向未成熟 DC 分化。在 PBMC 用 rhGM-CSF、rhIL-4 培养 5~7 天后, 以 hTNF- $\alpha$  刺激的同时加入 SASP 培养 2~3 天, 发现 DC 的 CD86 和 HLA-DR 共表达比对照组显著降低( $P < 0.05$ , 图 2A), 且混合淋巴细胞反应证明这些 DC 刺激同种异体 T 细胞增殖的功能受到抑制( $P < 0.05$ , 图 2B)。说明 SASP 影响了 DC 的成熟过程。

### 2.3 SASP 可有效抑制成熟 DC 对同种异体 T 细胞的刺激

将经 rhGM-CSF、rhIL-4、hTNF- $\alpha$  刺激成熟的 DC 与同种异体 T 细胞在不同比例下混合, 同时加入 SASP 共培养 72 h, 淋巴细胞反应实验显示与对照组相比加入 SASP 组 DC 刺激 T 细胞增殖的能力显著降低( $P < 0.05$ , 图 3)。表明 SASP 能有效的抑制成熟

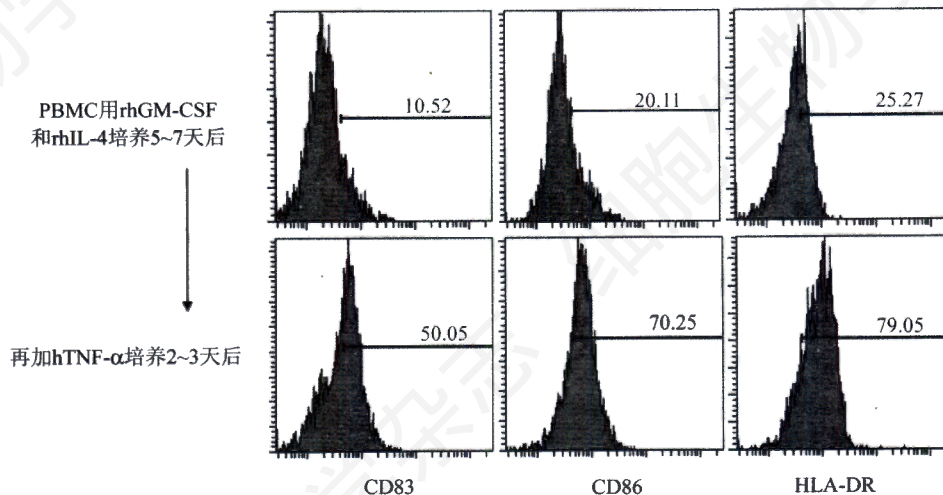


图 1 PBMC 诱导的 DC 的表型测定



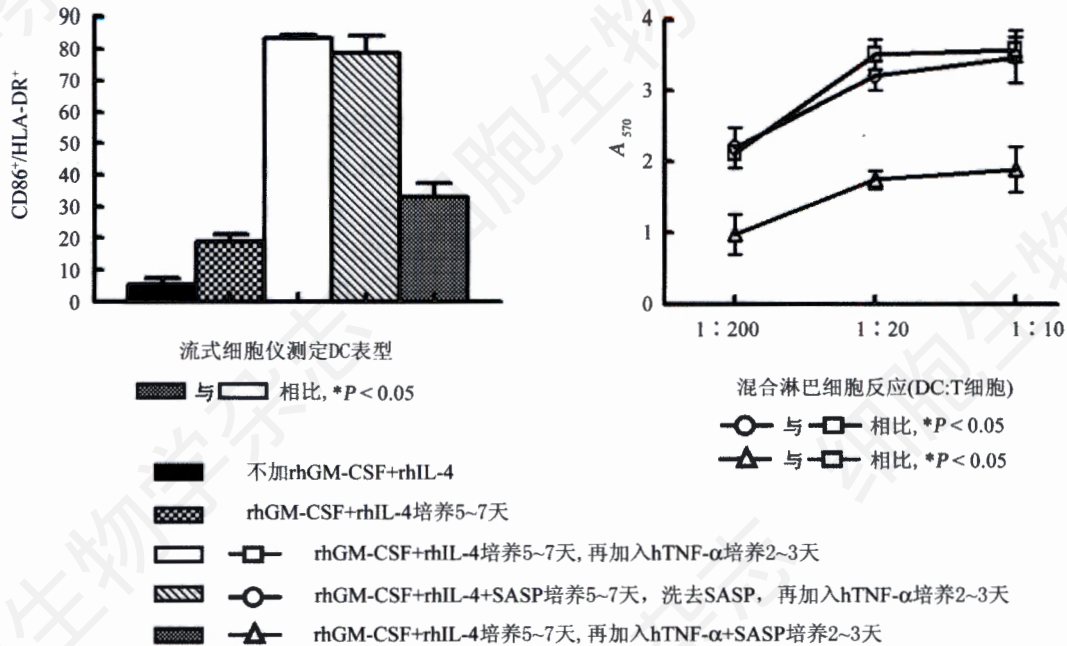


图2 SASP影响DC成熟

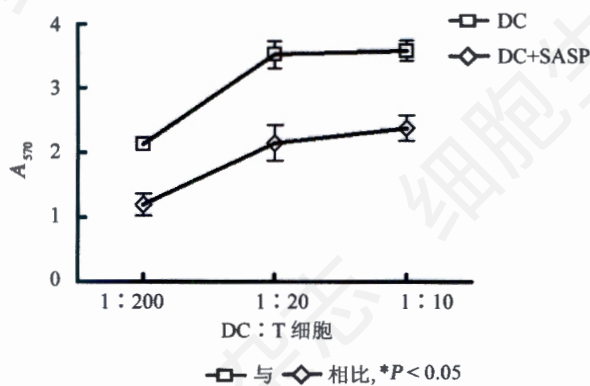


图3 SASP影响成熟DC刺激T细胞增殖

表1 SASP影响成熟DC分泌IL-12

	IL-12p70 (pg/ml)
对照	472.18 $\pm$ 6.87
SASP	347.94 $\pm$ 8.98*

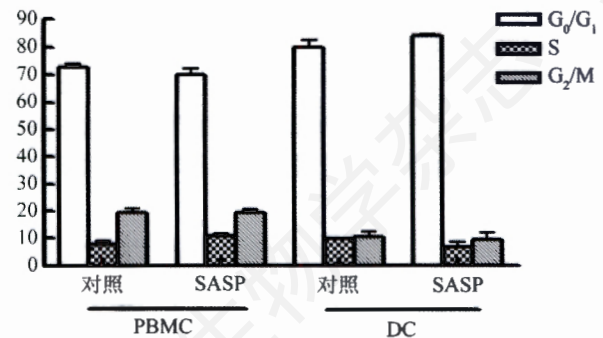
与对照组相比, \* $P < 0.05$ 。

图4 SASP对PBMC和DC细胞周期的影响

DC对同种异体T细胞刺激的作用。

#### 2.4 SASP可抑制DC分泌IL-12

将rhGM-CSF、rhIL-4、hTNF- $\alpha$ 刺激成熟的DC中加入SASP培养24h,收集培养上清液。酶联免疫吸附实验测定IL-12p70的表达显示加入SASP组比对照组低( $P < 0.05$ ,表1)。表明SASP能抑制DC分泌IL-12。

#### 2.5 SASP不影响PBMC和DC的细胞周期

在诱导PBMC形成DC过程中,加入SASP研究SASP对细胞周期的影响。实验发现加入SASP培养的PBMC和成熟DC与未加SASP的对照组相比细胞周期 $G_0/G_1$ 、S、 $G_2/M$ 无统计学差异(图4)。证明

SASP并不影响PBMC和DC的增殖。

### 3 讨论

DC是目前所知的机体内功能最强的APC,它可通过MHC和共刺激分子提呈抗原给T淋巴细胞,并通过产生细胞因子(如IL-12等)调节Th1/Th2型免疫,在活化外周T细胞、B细胞、维持机体自身免疫耐受中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。近年来的研究发现DC与自身

免疫性疾病关系密切,在多种自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、特发性血小板减少性紫癜的发生发展中起重要作用<sup>[5]</sup>。

RA是一种自身免疫性疾病。充足的APC将抗原被递呈给T辅助细胞和共刺激信号的增强是其中的重要环节<sup>[6]</sup>。国外的研究表明,RA的滑膜组织和滑液、外周血中均存在DC<sup>[7,8]</sup>,甚至在类风湿结节中也发现有大量DC<sup>[9]</sup>。Balanescu等<sup>[10]</sup>采用流式细胞仪检查RA患者DC表型的变化,发现活动期RA患者滑膜液及滑膜周围组织DC分化比例明显增多。RA的临床活动度与滑膜液及滑膜组织中表达黏附分子和共刺激分子的DC数量增多有关。从RA或正常人外周血新分离的DC很少或几乎不表达细胞表面分子CD80或CD86,而经体外培养分化后,外周血DC的CD86表达量明显高于滑液DC<sup>[11,12]</sup>。

SASP是由5-氨基水杨酸与磺胺吡啶通过偶氮键结合而成,开始作为抗菌药物用于临床,后发现在RA等风湿性疾病的的治疗上具有良好效果,可以减缓RA骨质破坏,1980年,McConkey等<sup>[3]</sup>报道74例RA经SASP治疗4周后,临床症状明显改善,血沉、C反应蛋白明显下降,并且这种改善一直持续34周。目前已是RA的常用药物,其抗风湿机制尚不十分清楚。研究发现SASP具有抑制前列腺素合成、脂氧化酶代谢物的形成、白细胞趋化和淋巴细胞转化的作用<sup>[13]</sup>。另有人认为SASP可抑制DC对同种异体T细胞的刺激作用,提示SASP有抑制DC免疫活性的功能<sup>[14]</sup>。本研究也证实了DC可抑制同种异体T细胞的刺激,还通过对细胞表面分子测定发现SASP可减少DC表面协同刺激分子CD83、CD86和MHC II类分子HLA-DR的表达,影响未成熟DC在TNF- $\alpha$ 刺激后转化为成熟的DC,抑制DC对同种异体T细胞

的刺激,从而发挥其免疫调节作用。

IL-12以p70和p40两个亚基组成,主要由DC、巨噬细胞和B细胞产生,是DC参与机体免疫应答的关键细胞因子<sup>[15]</sup>。目前已发现IL-12可促进Th1的增殖和分化,在调节Th1/Th2平衡中发挥重要作用。IL-12还可促进IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 等细胞因子的分泌<sup>[16,17]</sup>,引起炎症反应。RA是一种Th1细胞功能占主导地位的疾,我们以前的研究也证实了这点<sup>[18]</sup>。本研究发现SASP可以抑制DC分泌IL-12,提示了SASP抑制免疫反应、减轻炎症的作用可能与其抑制IL-12分泌有关。

综上所述,SASP可能通过抑制DC的成熟、对T效应细胞的刺激作用及IL-12分泌,从而起到调节亢强的免疫应答,减轻免疫损伤,缓解RA病情的作用。

#### 参考文献(References)

- [1] Thomas R et al. *J Leukoc Biol*, 1999, **66**: 286
- [2] Bergroth V et al. *Arthritis Rheum*, 1989, **32**: 1381
- [3] McConkey B. *Br Med J*, 1980, **281**: 681
- [4] Hart DN. *Blood*, 1997, **90**: 3245
- [5] Cederblad B et al. *J Autoimmun*, 1998, **11**: 465
- [6] Bresnihan B. *J Rheumatol*, 1999, **26**: 717
- [7] Sarkar S et al. *Front Biosci*, 2005, **10**: 656
- [8] Thomas R et al. *J Immunol*, 1996, **156**: 3074
- [9] Highton J et al. *J Rheumatol*, 2000, **27**: 339
- [10] Balanescu A et al. *J Cell Mol Med*, 2002, **6**: 415
- [11] Hock BD et al. *Tissue Antigens*, 2006, **67**: 57
- [12] Summers KL et al. *Arthritis Rheum*, 1996, **39**: 1287
- [13] Volin MV et al. *Exp Mol Pathol*, 2002, **73**: 84
- [14] Wahl C et al. *J Clin Invest*, 1998, **101**: 1163
- [15] Mandrekar P et al. *J Immunol*, 2004, **173**: 3398
- [16] Clerici M et al. *J Neuroimmunol*, 2001, **121**: 88
- [17] Matsuzaki J et al. *Autoimmunity*, 2005, **38**: 369
- [18] 陈海燕等. *中国误诊学杂志*, 2008, **8**: 1272

## Salicylazosulfapyridine Inhibits Maturation and Function of Dendritic Cell Derived from Peripheral Blood Mononuclear Cell of Patients with Rheumatoid Arthritis

Jie Han\* , Hai-Yan Chen, Jie-Ru Zhou, Wei-Dong Wang, Pei-Chen Shen  
(Department of Immunology, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China)

**Abstract** Dendritic cell (DC) play a pivotal role in RA pathogenesis. To understand therapeutic mechanism of salicylazosulfapyridine (SASP) in rheumatoid arthritis (RA), the affect of SASP on DC was investigated. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from 18 patients with RA were stimulated by GM-CSF, IL-4 to develop into immature DC. They can finally differentiate into mature DC in the presence of TNF- $\alpha$ . Compared with these DC, SASP-treated DC showed lower levels of CD86 and HLA-DR expression and less capacity of stimulating T cell proliferation. We found that SASP could inhibit DC maturation, but not development of DC precursor from PBMC. Moreover, the abilities of mature DC to stimulate T cell proliferation and produce IL-12 could also be restricted by SASP. This suggests that the therapeutic effect of SASP on RA maybe associated with its ability of inhibiting DC maturation, immune activity and IL-12 secretion.

**Key words** salicylazosulfapyridine; rheumatoid arthritis; dendritic cell

Received: May 13, 2008 Accepted: July 11, 2008

This work was supported by the Scientific Research Program of Shanghai Municipal Health Bureau (No.054005)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-38804518-8364, E-mail: hjgj85528@yahoo.com.cn