

膝关节炎家兔外周血 BTLA、IL-1、TNF- α 、IL-10 及部分血小板参数的变化

张可训, 张建鹏, 兰亚娟

(三原县医院, 陕西 三原 713800)

[摘要] 目的: 探讨 B、T 淋巴细胞衰减因子(BTLA)、血清白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-10(IL-10)及部分血小板指标在膝关节炎(OA)新西兰家兔外周血中的变化。方法: 30 只新西兰家兔均分为模型组、治疗组和假手术组, 切断模型组和治疗组新西兰家兔前交叉韧带、剪除内侧半月板、建立兔膝 OA 模型, 假手术组仅打开关节腔; 手术结束 3 周时流式细胞技术检测 3 组大鼠外周血 CD3⁺BTLA⁺T 细胞、CD4⁺BTLA⁺T 细胞、CD8⁺BTLA⁺T 细胞及调节性 T 细胞(Treg), ELISA 法检测血清 IL-1、TNF- α 、IL-10 水平, 全自动生化分析仪检测血小板计数(PLT)、血小板压积(PCT)、血小板分布宽度(PDW)及血小板平均体积(MPV)。结果: 造模成功后 3 周时模型组家兔外周血 IL-1、TNF- α 、IL-10 水平高于另外两组($P < 0.05$), CD3⁺BTLA⁺T 细胞、CD4⁺BTLA⁺T 细胞、CD8⁺BTLA⁺T 细胞及 Treg 百分比均明显低于另外两组($P < 0.05$), PLT 及 PCT 均明显低于另外两组($P < 0.05$); 模型组家兔外周血 PLT 与 CD3⁺BTLA⁺T 细胞、CD4⁺BTLA⁺T 细胞及 Treg 水平成正相关; PCT、PDW 与 CD8⁺BTLA⁺T 细胞水平成正相关, MPV 与 CD4⁺BTLA⁺T 细胞水平成正相关($P < 0.05$)。结论: BTLA 阳性 T 淋巴细胞水平、IL-1、TNF- α 、IL-10 以及部分血小板参数可能参与了 OA 的发生发展。

[关键词] 骨关节炎; B、T 淋巴细胞衰减因子; 白介素-1; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-10; 血小板; 兔

[中图分类号] R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)07-0794-04

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.07.011

Changes of BTLA, IL-1, TNF- α , IL-10, and Some Thrombocyte Parameters in Peripheral Blood of Knee Osteoarthritis Model Rabbits

ZHANG Kexun, ZHANG Jianpeng, LAN Yajuan

(Sanyuan County Hospital, Xianyang 713800, Shanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the changes of B-lymphocyte and T-lymphocyte attenuation factors (BTLA), serum interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-10 (IL-10) and some thrombocyte parameters in New Zealand rabbit knee osteoarthritis (OA) model. **Methods:** Thirty New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: sham operation (group S), treatment group (group T), and model group (group M). Rabbit knee OA model was established by cut anterior cruciate ligament and medial meniscus in groups T and M, while rabbits in group S only received operation of opening knee articular cavity. In 3 months after the operations, CD3⁺BTLA⁺T cells, CD4⁺BTLA⁺T cells, CD8⁺BTLA⁺T cells and Treg cells were detected by flow cytometry, levels of IL-1, TNF- α and IL-10 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and platelet count (PLT), platelet cubic measure (PCT), platelet distribution width (PDW), and platelet mean volume (MPV) were measured by automatic biochemical analyzer. **Results:** In 3 weeks after the model was successfully established, the levels of IL-1, TNF- α , and IL-10 in group M were higher than

those in groups S and T ($P < 0.05$), while cell counts of CD3⁺BTLA⁺T, CD4⁺BTLA⁺T, CD8⁺BT-
LA⁺T, and Treg percentage in group M were significantly lower than those in groups S and T ($P < 0.05$). PLT and PCT of group M were lower than those of groups S and T ($P < 0.05$). In peripheral
blood of rabbits in group M, PLT was positively correlated with CD3⁺BTLA⁺T cells, CD4⁺BTLA⁺T
cells and Treg level ($P < 0.05$), PCT and PDW were positively correlated with CD8⁺BTLA⁺T cells
($P < 0.05$), and MPV was positively correlated with CD4⁺BTLA⁺T cells ($P < 0.05$). **Conclusion:**
BTLA, T-lymphocyte levels, IL-1, TNF- α , IL-10 and some platelet parameters might participate the oc-
cur and development of OA.

[**Key words**] osteoarthritis; B, T-lymphocyte attenuation factors; interleukin-1; tumor necrosis factor-
 α ; interleukin-10; platelets; rabbits

骨关节炎(osteoarthritis, OA)又名骨关节病,在临床上很常见,是由于年龄、肥胖、劳损、创伤、关节先天性异常及关节畸形等诸多因素引起的关节软骨退化损伤、关节边缘和软骨下骨反应性增生,临床表现为缓慢发展的关节疼痛、压痛、僵硬、肿胀、活动受限和畸形等^[1]。依据有无局部和全身致病因素可将 OA 分为原发性 OA 和继发性 OA,早期研究者多认为 OA 属于非炎症性疾病,但近些年的研究揭示 OA 患者的滑膜组织中有炎症反应^[2-3]。本研究通过观察膝 OA 模型兔外周血中 B、T 淋巴细胞衰减因子(BTLA)、调节性 T 细胞(Treg)、白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-10(IL-10)以及血小板参数的变化,探讨 OA 的发病机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

选取健康 4~6 个月龄新西兰兔 30 只,体质量(2.65 \pm 0.28)kg,雌雄不拘,混合饲料、分笼喂养,适应性饲养 1 周后开始实验。采取随机数字法将新西兰兔分为假手术组、模型组和治疗组 3 组,每组 10 只。

1.2 建立兔膝 OA 模型

3 组新西兰兔用 30 g/L 的戊巴比妥钠按照 30 mg/kg 于兔耳缘静脉注射麻醉,同时经耳缘静脉注射 1% 的肝素溶液 0.2 mL 抗凝。模型组及治疗组兔按改良的 Hulth 法^[4]制备膝 OA 模型:取后肢左膝关节内侧纵切口,开放关节囊,掀开髌骨,切开关节腔,尽可能屈曲膝关节以暴露前交叉韧带及半月板,切断前交叉韧带,剪除内侧半月板,肌注青霉素 40 万单位 3 次;假手术组仅切开关节腔,不损伤膝关节软骨面;治疗组建模术毕及术后每隔 1 周予

关节内注射 1% 透明质酸钠 1 mL、连续 3 周;假手术组和模型组不注射药物。

1.3 观察指标

1.3.1 外周血 BTLA 及 Treg 水平 各组新西兰兔手术结束 3 周时,经耳缘静脉取外周血 3 mL,于 25℃ 避光条件下应用荧光标记的单抗进行染色,30 min 后加入溶血素 3 mL,静置 10 min 后 1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入 PBS 溶液洗涤 2 次,加入含 1% 多聚甲醛的 PBS 重新悬浮,采用 Thermo Scientific 流式细胞仪测定外周血 BTLA 及 Treg 水平。

1.3.2 血清 IL-1、TNF- α 、IL-10 水平 各组新西兰兔手术结束 3 周时,经耳缘静脉取外周血 3 mL,4 500 r/min 离心 5 min,取上层血清置于 -70℃ 冰箱存放备用,采用 ELISA 分别检测血清 IL-1、TNF- α 、IL-10 水平。

1.3.3 血小板参数 各组新西兰兔手术结束 3 周时,采用日立 7020 型全自动生化分析仪检测血小板参数,包括血小板计数(PLT)、血小板压积(PCT)、血小板分布宽度(PDW)及血小板平均体积(MPG)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计分析软件(美国 IBM 公司)进行数据处理,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,计数资料采用百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用 Pearson 分析血小板参数与 BTLA、Treg 的相关性之间的相关性; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 IL-1、TNF- α 、IL-10 水平

手术结束 3 周时,模型组 IL-1、TNF- α 、IL-10

水平均明显高于治疗组和假手术组($P < 0.05$),而治疗组和假手术组 IL-1、TNF- α 、IL-10 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 术后 3 周时 3 组新西兰兔血清 IL-1、TNF- α 及 IL-10 水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Serum levels of IL-1, TNF- α , and IL-10 in rabbits of the 3 groups in 3 weeks after the operations

组别	<i>n</i>	IL-1 (ng/L)	IL-10(μ g/L)	TNF- α (pg/L)
模型组	10	43.5 \pm 6.2	103.2 \pm 11.3	121.4 \pm 13.5
治疗组	10	22.7 \pm 3.7 ⁽¹⁾	77.4 \pm 8.3 ⁽¹⁾	78.2 \pm 9.1 ⁽¹⁾
假手术组	10	28.5 \pm 2.3 ⁽¹⁾	84.3 \pm 7.9 ⁽¹⁾	88.1 \pm 10.5 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与模型组比较, $P < 0.05$

表 2 术后 3 周时 3 组新西兰兔 BTLA 阳性细胞及 Treg($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 2 BTLA positive cells and Treg in rabbits of the 3 groups in 3 weeks after the operations

组别	<i>n</i>	BTLA ⁺ T 细胞			Treg
		CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	
模型组	10	28.5 \pm 6.5	43.1 \pm 6.8	47.3 \pm 8.1	5.5 \pm 1.1
治疗组	10	42.1 \pm 8.3 ⁽¹⁾	87.6 \pm 8.8 ⁽¹⁾	71.6 \pm 9.8 ⁽¹⁾	6.6 \pm 1.3 ⁽¹⁾
假手术组	10	44.8 \pm 9.1 ⁽¹⁾	94.7 \pm 7.4 ⁽¹⁾	75.3 \pm 11.2 ⁽¹⁾	6.8 \pm 1.4 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与模型组比较, $P < 0.05$

表 3 术后 3 周时 3 组新西兰兔血小板参数水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Platelet parameters in rabbits of the 3 groups in 3 weeks after the operations

组别	<i>n</i>	PLT($\times 10^9/L$)	PCT(%)	PDW(fL)	MPV(fL)
模型组	10	128.5 \pm 29.5	24.1 \pm 3.3	13.3 \pm 2.6	11.3 \pm 1.3
治疗组	10	215.1 \pm 38.2 ⁽¹⁾	27.6 \pm 3.8 ⁽¹⁾	13.6 \pm 2.8	11.6 \pm 1.4
假手术组	10	243.6 \pm 49.4 ⁽¹⁾	39.7 \pm 7.4 ⁽¹⁾	13.2 \pm 3.1	11.4 \pm 1.2

⁽¹⁾与模型组比较, $P < 0.05$

2.4 模型组血小板参数与 BTLA、Treg 的相关性

模型组新西兰兔 PLT 与 CD3⁺BTLA⁺T 细胞、CD4⁺BTLA⁺T 细胞及 Treg 水平成正相关,PCT、PDW 与 CD8⁺BTLA⁺T 细胞水平成正相关,MPV 与 CD4⁺BTLA⁺T 细胞水平成正相关,见表 4。

表 4 模型组新西兰兔血小板参数与 BTLA、Treg 的相关性

Tab. 4 The correlation of platelet parameters with BTLA and Treg in New Zealand rabbits of group M

项目	相关系数(<i>r</i>)			
	PLT	PCT	PDW	MPV
CD3 ⁺ BTLA ⁺ T 细胞	0.354 ⁽¹⁾	0.154	0.242	0.086
CD4 ⁺ BTLA ⁺ T 细胞	0.411 ⁽¹⁾	0.237	0.268	0.286 ⁽¹⁾
CD8 ⁺ BTLA ⁺ T 细胞	0.231	0.358 ⁽¹⁾	0.301 ⁽¹⁾	0.256
Treg	0.389 ⁽¹⁾	0.241	0.144	0.078

⁽¹⁾ $P < 0.05$

2.2 外周血 BTLA 及 Treg

手术结束 3 周时,模型组兔 BTLA⁺T 细胞及 Treg 均明显低于治疗组和假手术组($P < 0.05$),而治疗组和假手术组 BTLA 及 Treg 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 血小板参数

手术结束 3 周时,模型组兔 PLT 和 PCT 水平均明显低于治疗组和假手术组($P < 0.05$),模型组 PDW 和 MPV 与治疗组和假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而治疗组和假手术组血小板参数比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

3 讨论

膝 OA 是造成中老年人残疾的主要病因,其最终致残率高达半数以上,严重降低患者的生活质量,在美国该病的致残率仅次于心血管疾病^[5-7]。初步估算,我国膝 OA 患病人数在千万以上,OA 对健康的威胁问题正日渐凸显^[8]。OA 患者的滑膜组织有炎症存在^[9-10],炎性滑膜与 OA 软骨损伤加重和疼痛的发生密切相关^[11-12]。在 OA 患者的滑膜组织中检测到免疫细胞的浸润,包括 T 细胞,B 细胞和巨噬细胞等^[13]。滑膜炎症可以作为骨关节病的特征性表现,甚至在疾病的早期阶段即可发生。炎性滑膜组织中有多种可溶性因子,其中的细胞因子和趋化因子等导致骨关节病症状的进一步加重。

本研究发现,OA 兔 IL-1、TNF- α 、IL-10 水平升

高,BTLA、血小板计数和血小板压积水平亦明显降低。分析其机理发现,IL-1 β 和 TNF- α 被认为是 OA 形成的病理生理过程中的关键炎性细胞因子,TNF- α 和 IL-1 β 可显著抑制呼吸链效率,导致软骨细胞中的线粒体产生的 ATP 减少、线粒体膜的电位降低,二者协同作用下打破软骨稳态平衡,使得软骨的分解代谢加剧、软骨发生退化^[14]。本研究在造模后模型动物外周血中 IL-1、TNF- α 、IL-10 呈现明显升高趋势,与此阶段关节软骨发生炎性变化过程相一致,在治疗组中 IL-1、TNF- α 、IL-10 未见显著上升趋势,提示透明质酸钠治疗后关节内炎症反应减轻。

研究显示 BTLA mRNA 转录过程同时存在于淋巴组织和非淋巴组织内,但其表达产物主要存在于活化的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞以及单核细胞中。类风湿性关节炎易感性相关研究提示,BTLA 信号参与了关节炎的发生发展,在类风湿性关节炎中 BTLA 的表达率显著低于健康人群。本研究中模型组 BTLA 阳性 T 细胞(CD3⁺BTLA⁺T 细胞、CD4⁺BTLA⁺T 细胞)及 Treg 水平均明显低于治疗组和假手术组。

类风湿性关节炎患者的 PLT 和 PCT 水平在一定程度上可以反映出关节滑膜侵蚀性炎症的活动程度^[15],即 T 淋巴细胞免疫功能失衡可能参与了关节腔内 PLT 和 PCT 的异常增高,由此活化生成大量趋化因子、血小板活化因子及 C-反应蛋白,诱导单核细胞、嗜酸性粒细胞等与血小板相互聚集、黏附^[16],引发关节内肌腱和韧带发生纤维化和软骨退行性变等,最终导致 OA。本研究发现,造模成功后模型动物外周血中 PLT 和 PCT 均明显低于治疗组和假手术组,模型组 PLT 与 CD3⁺BTLA⁺T 细胞、CD4⁺BTLA⁺T 细胞及 Treg 成正相关。

综上所述,BTLA、IL-1、TNF- α 、IL-10 及血小板参数与 OA 的发生及发展关系密切。

4 参考文献

[1] SCANZELLO C R, GOLDRING S R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis [J]. Bone, 2012, 51 (2): 249 - 257.

[2] DE LANGE-BROKAAR B J E, IOAN-FACSINAY A, VAN OSCH G, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: A review [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2012, 20 (12): 1484 - 1499.

[3] MABEY T, HONSAWEK S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis [J]. World J Orthop,

2015, 6(1): 95 - 105.

[4] LAMPROPOULOU-ADAMIDOU K, LELOVAS P, KARADIMAS E V, et al. Useful animal models for the research of osteoarthritis [J]. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology, 2014, 24 (3): 263 - 271.

[5] ZHANG J, SONG L, LIU G, et al. Risk factors for and prevalence of knee osteoarthritis in the rural areas of Shanxi Province, North China: A COPCORD study [J]. Rheumatology International, 2013, 33 (11): 2783 - 2788.

[6] COOPER C, JAVAID M K, Arden N. Epidemiology of osteoarthritis [M]. Atlas of Osteoarthritis, 2014(1): 21 - 36.

[7] JOHNSON V L, HUNTER D J. The epidemiology of osteoarthritis [J]. Best practice & research Clinical rheumatology, 2014, 28(1): 5 - 15.

[8] TANG X, WANG S, ZHAN S, et al. The Prevalence of symptomatic knee osteoarthritis in China: Results from the China health and retirement longitudinal study [J]. Arthritis & Rheumatology, 2016, 68(3): 648 - 653.

[9] LURATI A, LARIA A, MAZZOCCHI D, et al. Effects of hyaluronic acid (HA) viscosupplementation on peripheral Th cells in knee and hip osteoarthritis [J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2015, 23(1): 88 - 93.

[10] HASEEB A, HAQQI T M. Immunopathogenesis of osteoarthritis [J]. Clinical Immunology, 2013, 146(3): 185 - 196.

[11] LUBBERTS E. Role of T lymphocytes in the development of rheumatoid arthritis: Implications for treatment [J]. Current Pharmaceutical Design, 2015, 21 (2): 142 - 146.

[12] ATUKORALA I, KWONG C K, Guermazi A, et al. Synovitis in knee osteoarthritis: A precursor of disease [J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2016, 75(2): 390 - 395.

[13] HOUARD X, GOLDRING M B, Berenbaum F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis [J]. Current Rheumatology Reports, 2013, 15(11): 1 - 10.

[14] WOJDASIEWICZ P, PONIATOWSKI Ł A, SZUKIEWICZ D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Mediators of Inflammation, 2014, 2014: 561459.

[15] KRIEG C, HAN P, STONE R, et al. Functional analysis of B and T lymphocyte attenuator engagement on CD4⁺ and CD8⁺ T cells [J]. The Journal of Immunology, 2005, 175(10): 6420 - 6427.

[16] SUNDMAN E A, COLE B J, KARAS V, et al. The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis [J]. The American Journal of Sports Medicine, 2014, 42(1): 35 - 41.

(2018-04-22 收稿,2018-06-11 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 苏晓庆