

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.010

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.010

受体相互作用蛋白激酶与成人斯蒂尔病病情活动的相关性

林镇¹, 郭茹茹¹, 陈晓翔¹, 余跃天^{1,2}, 吕良敬¹

(上海交通大学医学院附属仁济医院 1. 风湿科; 2. 重症医学科, 上海 200001)

[摘要] 目的: 研究成人斯蒂尔病(adult-onset Still's disease, AOSD)患者外周血细胞内受体相互作用蛋白激酶-1/3(receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3, RIPK1/3)的表达水平, 分析RIPK1/3与AOSD病情活动的相关性, 并初步探讨其在疾病中的作用机制。方法: 回顾性分析2010年6月至2015年6月就诊于我院风湿科58例AOSD患者的病史信息, 明确与疾病活动相关的临床指标。为初步探讨其中潜在的机制, 采用流式细胞术检测2016年9月至2017年12月17例AOSD住院患者及35例健康对照外周血中性粒细胞和单核细胞内RIPK1/3的表达水平。结果: 58例AOSD患者中性粒细胞绝对值和单核细胞绝对值与病情严重程度(系统评分)显著相关($r=0.6157$, $r=0.4278$, $P<0.001$)。初步机制探讨中发现17例患者外周血中性粒细胞和单核细胞IPK1/3的表达水平显著低于健康对照($P<0.0001$), 且患者外周血单核细胞中高表达RIPK1和RIPK3的单核细胞比例与血沉呈负相关($r=-0.5332$, $P<0.05$; $r=-0.5098$, $P<0.05$)。结论: 中性粒细胞及单核细胞绝对计数可作为AOSD病情活动性良好的监测指标, 且RIPK1/3在单核细胞中的表达情况可能在致病中发挥重要作用。

[关键词] 成人Still病; 受体相互作用蛋白激酶-1/3; 疾病活动性

Association of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3 with disease activity of adult-onset Still's disease

LIN Zhen¹, GUO Ruru¹, CHEN Xiaoxiang¹, YU Yuetian^{1,2}, LÜ Liangjing¹

(1. Department of Rheumatology; 2. Department of Critical Care Medicine, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China)

Abstract **Objective:** To investigate the receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3 (RIPK1/3) levels in peripheral blood cells of patients with adult-onset Still's disease (AOSD), and analyze its relationship with the disease activity. The role of RIPK1/3 in the pathogenesis of AOSD was also explored. **Methods:** Patients diagnosed with AOSD between June 2010 and June 2015 in Renji Hospital were screened and analyzed in this

收稿日期 (Date of reception): 2018-01-03

通信作者 (Corresponding author): 吕良敬, Email: lu_liangjing@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家重点研发计划 (2017YFC0909000); 国家自然科学基金 (81373209); 上海市教育委员会高峰高原学科建设项目 (20152214)。This work was supported by the National Key Research and Development Program (2017YFC0909000), the National Natural Science Foundation (81373209) and Shanghai Municipal Education Commission-Gaofeng Clinical Medicine Grant Support (20152214), China.

retrospective cohort study, potential markers which might relate to the activity of the disease were also tested. To explore and confirm the mechanism underlying the markers, intercellular RIPK1/3 productions by peripheral blood cells were detected by flow cytometry between September 2016 and December 2017. **Results:** The absolute counts of neutrophils and monocytes in patients were correlated with disease severity ($r=0.6157$, $r=0.4278$, $P<0.001$). Intercellular RIPK1/3 levels by neutrophils and monocytes were significantly lower in AOSD than those in healthy controls ($P<0.0001$). The percentage of monocytes with low RIPK1/3 in patients were correlated with disease severity ($P<0.05$). **Conclusion:** The absolute counts of neutrophils and monocytes in AOSD can be good markers to reflect the disease activity and RIPK1/3 levels in monocytes may possibly play an important role in the pathogenesis of AOSD.

Keywords adult-onset Still's disease; receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3; disease activity

成人斯蒂尔病(adult-onset Still's disease, AOSD)为免疫介导的系统性炎症性疾病,以持续或间断性高热、易消退皮疹、关节炎以及不同程度多器官受累为特点^[1-2]。然而,AOSD的病因至今仍未阐明,研究^[3-4]发现AOSD的免疫特点是网状内皮系统的过度活化和增殖,并合成大量炎症因子,如IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-18等在患者中显著增高,形成炎症风暴,而自身抗体的水平并没有出现明显异常,提示系统性炎症反应在AOSD的发病中起重要作用。而其中炎症风暴的持续存在及免疫细胞过度活化是机体处于慢性疾病状态的主要原因,只有细胞因子水平恢复正常,活化和扩增的免疫细胞凋亡以后,才可重建免疫平衡。

受体相互作用蛋白激酶-1/3(receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3, RIPK1/3)是同源的两类丝氨酸/苏氨酸激酶,它们是调节免疫细胞增殖、活化、凋亡及坏死的中心环节^[5-6]。而处于免疫调节及细胞死亡调节中心点的RIPK1/3异常表达可能导致机体致炎和抗炎平衡的失调。目前有一些研究^[3]表明RIPK1和RIPK3能够调节死亡配体[比如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF), 肿瘤坏死因子配体超家族成员6],进而通过激活Caspase 8来诱导免疫细胞凋亡,并减轻炎症反应。另外,在系统性红斑狼疮中的研究^[7]发现:RIPK1在活动期的系统性红斑狼疮患者外周单个核细胞中的表达明显降低,这提示RIPK1的异常表达参与免疫损伤的调节。而AOSD患者疾病活动期时存在明显的中性粒细胞增多、网状内皮系统的增殖,其潜在的机制仍未明。

因此,笔者推测RIPK1, RIPK3促进细胞凋亡的作用可能参与AOSD的发生发展。本研究拟检测AOSD患者外周血中性粒细胞及单核细胞中RIPK1, RIPK3表达水平及其与临床疾病活动度的相关性,初步探讨RIPK1, RIPK3在AOSD中的作用。

1 对象与方法

1.1 对象

本研究收集2010年6月至2015年6月风湿科确诊的58例AOSD患者(均未并发嗜血综合征)的临床资料,诊断均符合美国Cush分类标准。必备条件:发热 $\geq 39\text{ }^{\circ}\text{C}$,关节痛或关节炎,类风湿因子 $<1:80$,抗核抗体 $<1:100$;另需具备以下任何两项:血白细胞 $\geq 15\times 10^9$ 个/L,皮疹、胸膜炎或心包炎、肝大或脾大或淋巴结肿大。其中男14例(24.1%),女44例(75.9%);年龄16~80(38.5 \pm 14.2)岁。并收集2016年9月至2017年12月本院风湿科住院并确诊的17例AOSD患者的血液标本,其中男4例(23.5%),女13例(74.5%);年龄27~66(40.1 \pm 12.9)岁。从本院体检中心收集35名健康者做对照,男15例(42.9%),女20例(57.1%),年龄20~57(37.5 \pm 10.3)岁。本研究已获得上海交通大学医学院附属仁济医院伦理委员会批准。

收集上述患者的临床资料,并对收集标本时的病情进行系统评分,评价AOSD病情的严重程度。计分法^[4]为获取血清标本时出现以下1项加1分。最高为12分。评分项为:发热、皮疹、胸膜炎、肺炎、心包炎、肝肿大或肝功能异常、脾大、淋巴结肿大、白细胞计数 $\geq 15\times 10^9$ 个/L、咽痛、肌痛、腹痛。

1.2 方法

采用流式细胞术检测17例AOSD患者及35例健康对照的外周血单核细胞和中性粒细胞中RIPK1以及RIPK3的表达水平。0.2 mL外周血加入单核细胞标记抗体CD14(美国BD公司),于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育15 min,经红细胞裂解液裂解,细胞用PBS(含1%牛血清白蛋白)洗涤2次,每次1 500 r/min离心5 min,再用4%多聚甲醛固定20 min。以破膜

试剂(美国BD公司)破膜10 min。充分洗涤后,加鼠抗人RIPK1/3单抗IgG1或同型对照鼠IgG1抗体,孵育30 min,洗涤2次,然后加藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)标记的抗鼠单克隆抗体,避光染色30 min。洗涤后,加500 μ L PBS重悬细胞,在流式细胞分析仪上进行分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 11.5统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并采用卡方检验或连续性校正检验;中性粒细胞绝对计数、单核细胞绝对计数以及RIPK1/3比例与系统评分的相关性采用Pearson相关分析。所有检验均为双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基线情况

研究纳入58例明确诊断为AOSD的患者,所有纳入对象均不合并嗜血综合征,并对其病史进行总结分析。结果表明:纳入患者中有高达94.8%的患者存在发热症状,而皮疹、关节痛/关节炎及咽痛等症状所致比例也高于50%。相对而言,肝肿大及腹痛症状较少见($<5\%$,表1)。

表1 纳入58名AOSD患者临床特征

Table 1 Clinical characteristics of 58 patients with adult-onset Still's disease

临床表现	例(%)
发热	55 (94.8)
皮疹	40 (69.0)
关节痛/关节炎	32 (55.2)
咽痛	30 (51.7)
肌痛	16 (27.6)
肝肿大	1 (1.7)
脾肿大	15 (25.9)
淋巴结肿大	22 (37.9)
浆膜炎	12 (20.7)
肺炎	7 (12.1)
腹痛	2 (3.4)

2.2 中性粒细胞绝对计数以及单核细胞绝对计数与疾病活动的相关性

中性粒细胞绝对计数与系统评分显著相关($r=0.6157$, $P<0.001$)。同时,单核细胞绝对计数与系统评分也显著相关($r=0.4278$, $P<0.001$,图1)。提示在没有合并嗜血综合征的AOSD患者中,中性粒细胞及单核细胞的绝对计数可以作为疾病活动情况的参考指标。

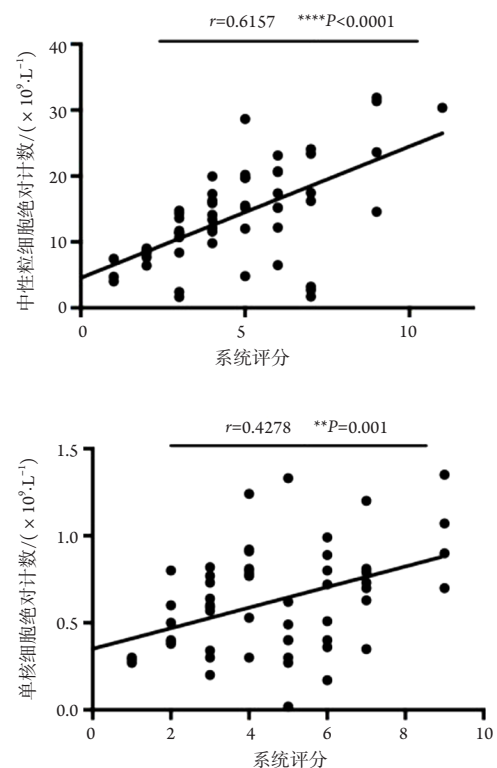


图1 中性粒细胞绝对计数和单核细胞绝对计数与系统评分的相关性

Figure 1 Correlation between the absolute counts of neutrophils, monocytes and the disease severity

2.3 中性粒细胞及单核细胞内RIPK1和RIPK3的水平

图2显示样本圈门的流式逻辑图,参照同型对照(Isotype)十字画门。结果提示AOSD患者外周血中性粒细胞和单核细胞内RIPK1和RIPK3的水平显著低于健康者(图3, $P<0.0001$)。表2总结了17例AOSD患者的临床特征,这批前瞻性研究中患者的疾病系统评分为 7.5 ± 1.7 。

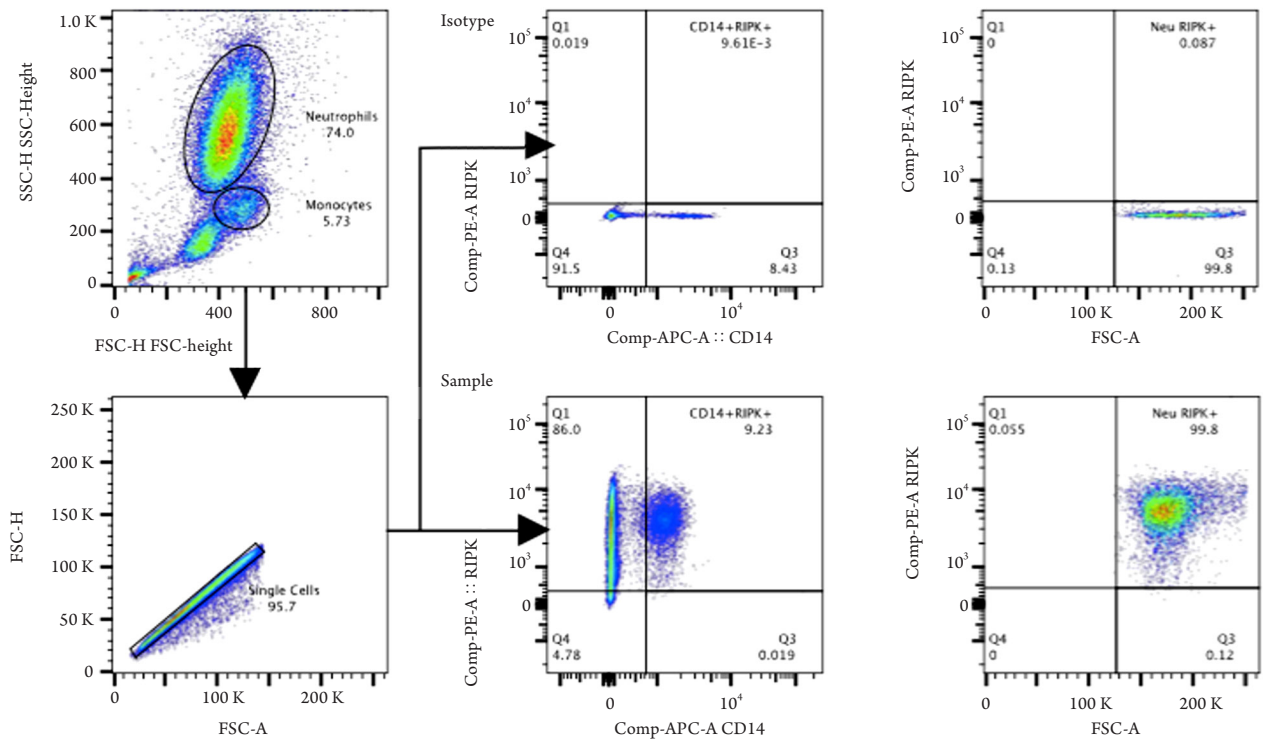


图2 流式圈门逻辑图

Figure 2 Flow cytometer

Isotype, 同型对照; sample, 外周血样本。

Isotype, isotype control; sample, peripheral blood.

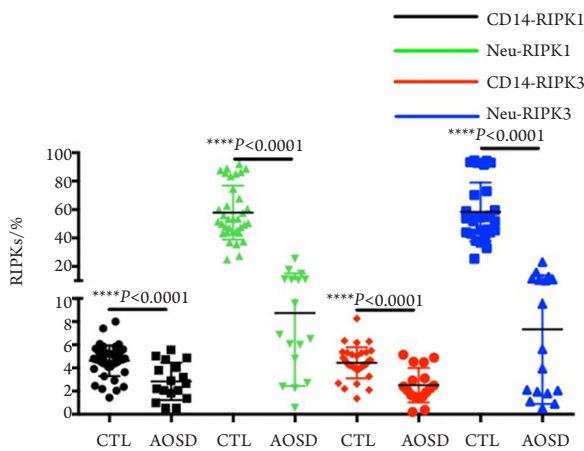


图3 RIPK1/3在中性粒细胞和单核细胞中的表达水平

Figure 3 Concentration of RIPK1/3 in neutrophil and monocyte

CTL, 健康对照。

CTL, control.

表2 纳入17名AOSD患者临床特征

Table 2 Clinical characteristics of 17 patients with adult-onset Still's disease

临床表现	例(%)
发热	16 (94.1)
皮疹	17 (100.0)
关节痛/关节炎	16 (94.1)
咽痛	17 (100.0)
肌痛	15 (88.2)
肝肿大	1 (5.9)
脾肿大	10 (58.8)
淋巴结肿大	10 (58.8)
浆膜炎	7 (41.2)
肺炎	1 (5.9)
腹痛	0 (0.0)

2.4 细胞内 RIPK1 和 RIPK3 表达水平与疾病活动性的相关性

对上述17例住院 AOSD 患者的资料进行分析, 发现高表达RIPK1和RIPK3的单核细胞比例与血沉呈负相关($r=-0.5332$, $P<0.05$; $r=-0.5098$, $P<0.05$)。此结果提示低表达RIPK1和RIPK3的单核细胞比例与病情严重程度呈负相关, 可能参与疾病的发展(图4)。

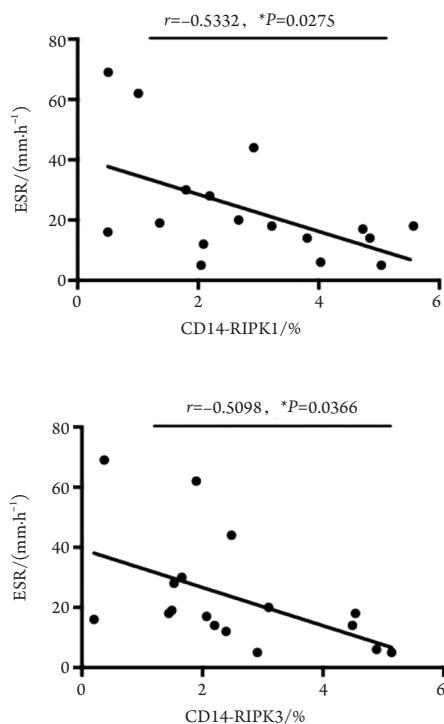


图4 单核细胞 RIPK1/3 与红细胞沉降率的相关性
Figure 4 Correlation between RIPK1/3 and erythrocyte sedimentation rate

3 讨论

AOSD 为一个复杂的系统炎症性疾病, 由于其临床表现个体差异大, 又缺乏特异性诊断指标, 疾病的诊断及鉴别诊断较为困难。诸多资料^[8]证明某些疾病的早期阶段, 如肿瘤、感染性疾病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、皮炎/多肌炎、干燥综合征等风湿性疾病, 酷似 AOSD 样的特征。故需排除肿瘤、感染以及其他结缔组织病后才考虑其诊断。

免疫功能异常可能是 AOSD 发病机制中的重要因素。表现为内皮系统的活化, 如单核细胞、中性粒细胞增多, 外周血 T 细胞总数减少, 故推测

细胞免疫紊乱在发病中可能起主要作用。近年的研究^[9]提示单核巨噬细胞和中性粒细胞的活化是 AOSD 发病机制的重要环节。AOSD 患者中 IFN- γ 和单核巨噬细胞集落刺激因子均明显增加, 从而促进单核巨噬细胞活化并分化多种细胞因子参与细胞因子的级联反应, 如 IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α 及铁蛋白等^[10]。活化的巨噬细胞还产生巨噬细胞游走抑制因子, 巨噬细胞游走抑制因子通过抑制抑癌基因 p53 的活化所诱导的细胞凋亡延长了巨噬细胞的寿命^[11]。国内也有研究^[9]表明 AOSD 患者中血清及细胞内巨噬细胞游走抑制因子水平显著升高, 并与病情的严重程度及活动性密切相关, 提示巨噬细胞游走抑制因子可能在 AOSD 的发病中发挥重要作用。在纳入 164 例 AOSD 患者的临床回顾性分析^[12]中发现中性粒细胞绝对数增高和中性粒细胞/淋巴细胞比值增高, 受试者工作特征分析提示其比值可以作为一项 AOSD 的诊断指标并预测 AOSD 的复发。

近年细胞程序性坏死的分子机制及生理病理的作用越来越受关注, RIPK1 和 RIPK3 作为介导此通路的关键调控蛋白, 它的异常表达与细胞的凋亡及疾病的转归息息相关^[6], 并参与多种炎症信号的调控。一系列天然免疫受体, 如 TNFR1, IFNR 以及 TLR 等等的激活也会引起 RIPK1 与 RIPK3 的激活。有研究^[6]表明这些刺激能够在体外条件下引起细胞的坏死性凋亡, 而 Caspase 8, 细胞凋亡的关键分子, 能够抑制这一过程的发生。RIPKs 在不同条件下的缺失, 会导致包括成体出生后死亡、造血系统缺陷、免疫细胞发育缺陷、皮肤炎症和肠道炎症等多重组织器官的显著表型^[12-14]。但 RIPKs 在不同条件下如何决定及调控不同的信号机制还不清楚。

流式细胞分析发现 AOSD 患者外周血中性粒细胞和单核细胞中 RIPKs 的水平与系统评分存在显著相关性, RIPKs 水平越低, 病情越严重。而中性粒细胞及单核细胞的比例越高, 提示细胞死亡功能存在异常。RIPKs 可能间接通过调节中性粒细胞和单核细胞的死亡情况, 继而细胞抵抗凋亡、持续分泌炎症因子, 参与 AOSD 炎症反应的发生发展。RIPK1/3 最初被发现是因为能够通过激活混合谱系激酶结构域而介导细胞程序性坏死。如蛙皮素引起的小鼠急性胰腺炎模型中, 胰腺组织细胞发生程序性坏死, 并伴有 RIPK3 的过表达; 敲除 RIPK3 可以显著抑制其坏死, 减少胰腺组织的炎症反应从而抑制急性胰腺炎的发生^[15]。然而研究^[6]发现: RIPK1/3 处于程序性坏死、凋亡、细胞死亡

非依赖性炎症以及机体稳态的调节中心节点上。在 α 神经酰胺诱导的自身免疫性肝炎模型中^[16], 抑制RIPK1的表达将会加剧组织的损伤。RIPK1在风湿病领域的研究甚少, 其中系统性红斑狼疮外周血中RIPK1 mRNA的低表达可能参与了细胞抵抗凋亡及炎症反应^[7]。而在Honarpishenh等^[17]的研究中发现狼疮样小鼠中低表达RIPK1及RIPK3与小鼠狼疮肾炎的进展有关。本研究首次发现在AOSD活动时, 与疾病活动相关的中性粒细胞及单核细胞内表达RIPK1/3出现异常, 其中具体涉及到的通路还需要进一步研究。

综上所述, 中性粒细胞和单核细胞的绝对计数可以作为未合并嗜血综合症的AOSD疾病活动情况的参考指标, 同时中性粒细胞和单核细胞内RIPK1/3水平在AOSD患者中显著降低, 并与病情的严重程度及活动性密切相关, 可能成为一个新的生物标志物来指导AOSD的诊治。

参考文献

- Gerfaud-Valentin M, Jamilloux Y, Iwaz J, et al. Adult-onset Still's disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(7):708-722.
- Bywaters EG. Still's disease in the adult[J]. *Ann Rheum Dis*, 1971, 30(2): 121-133.
- Chen DY, Hsieh TY, Hsieh CW, et al. Increased apoptosis of peripheral blood lymphocytes and its association with interleukin-18 in patients with active untreated adult-onset Still's disease[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 57(8): 1530-1538.
- Hoshino T, Ohta A, Yang D, et al. Elevated serum interleukin 6, interferon-gamma, and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with adult Still's disease[J]. *J Rheumatol*, 1998, 25(2): 396-398.
- Najjar M, Saleh D, Zelic M, et al. RIPK1 and RIPK3 kinases promote cell-death-independent inflammation by toll-like receptor 4[J]. *Immunity*, 2016, 45(1): 46-59.
- Wegner KW, Saleh D, Degtrev A. Complex pathologic roles of ripk1 and ripk3: moving beyond necroptosis[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(3): 202-225.
- Zhu L, Yang X, Chen W, et al. Decreased expressions of the TNF-alpha signaling adapters in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Rheumatol*, 2007, 26(9): 1481-1489.
- 中华医学会儿科学分会. 成人斯蒂尔病诊断及治疗指南[J]. *中华风湿病学杂志*, 2010, 14(7): 487-489. Chinese Rheumatology Association. Guideline for diagnosis and treatment of adult-onset Still's disease[J]. *Chinese Journal of Rheumatology*, 2010, 14(7): 487-489.
- Seo JY, Suh CH, Jung JY, et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio could be a good diagnostic marker and predictor of relapse in patients with adult-onset Still's disease: A STROBE-compliant retrospective observational analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(29): e7546.
- Mitchell RA, Liao H, Chesney J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(1): 345-350.
- 邹玉琼, 吕良敬, 杨程德. 巨噬细胞游走抑制因子在风湿性疾病中的研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(1): 62-64. ZOU Yuqiong, LÜ Liangjing, YANG Chengde. Research advances of macrophage migration inhibitory factor in rheumatic diseases[J]. *National Medical Journal of China*, 2008, 88(1): 62-64.
- Dillon CP, Weinlich R, Rodriguez DA, et al. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3[J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1189-1202.
- Rickard JA, Odonnell JA, Evans JM, et al. RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis[J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1175-1188.
- Takahashi N, Vereecke L, Bertrand MJ, et al. RIPK1 ensures intestinal homeostasis by protecting the epithelium against apoptosis[J]. *Nature*, 2014, 513(7516): 95-99.
- He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1100-1111.
- Suda J, Dara L, Yang L, et al. Knockdown of RIPK1 markedly exacerbates murine immune-mediated liver injury through massive apoptosis of hepatocytes, independent of necroptosis and inhibition of NF-kappaB[J]. *J Immunol*, 2016, 197(8): 3120-3129.
- Honarpisheh M, Desai J, Marschner JA, et al. Regulated necrosis-related molecule mRNA expression in humans and mice and in murine acute tissue injury and systemic autoimmunity leading to progressive organ damage, and progressive fibrosis [J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(6): e00425.

本文引用: 林镇, 郭茹茹, 陈晓翔, 余跃天, 吕良敬. 受体相互作用蛋白激酶与成人斯蒂尔病病情活动的相关性[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(5): 966-971. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.010
Cite this article as: LIN Zhen, GUO Ruru, CHEN Xiaoxiang, YU Yuetian, LÜ Liangjing. Association of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3 with disease activity of adult-onset Still's disease[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(5): 966-971. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.010