血小板通过激活B细胞促进类风湿关节炎滑膜异位生发中心形成的作用机制研究

赵琳

四川大学华西医院输血科

摘 要

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis，RA)是一种慢性全身性自身免疫性疾病，其主要病理表现为侵袭性血管翳的形成，导致滑膜固有细胞的激活和外周池免疫细胞的浸润。局部的炎症微环境促进浸润的淋巴细胞高度组织化，形成异位生发中心（Ectopic lymphoid structures，ELS）。ELS 的形成促进 T 细胞、B 细胞等免疫细胞与滑膜固有细胞相互作用、自身反应性 B 细胞生成和自身抗体的产生，从而推动疾病的全身性发展。

血小板（Platelet，PLT）是一种由成熟巨核细胞产生的无核血细胞，以其经典的凝血功能，在维持血管完整性中具有重要作用。越来越多的研究表明，血小板可作为一线感应细胞，参与免疫过程和炎症反应，在类风湿性关节炎疾病发生发展中具复杂的效应功能。

**目的**：探讨类风湿性关节炎中的血小板在疾病发生发展中的具体作用机制。

**方法**：（1）收集 RA 患者病例信息及临床样本。（2）电镜观察活动期 RA 患者与健康对照血小板形态差异。（3）流式细胞术检测血小板活化指标 P 选择素（CD62P）表达差异。（4）免疫荧光检测 RA 及对照滑膜中血小板分布以及活化程度。（5）构建 AIA 大鼠模型。（6）对受体大鼠右后腿踝关节进行富含血小板血浆（PRP）、血小板（PLT）或贫血小板血浆（PPP）输注，对受体鼠进行系统的关节炎评分。（7）Label Free 相对定量蛋白质组学检测 RA 患者和健康对照血小板蛋白质（8）流式细胞术检测 RA 患者及健康对照血小板表面 FcγRIIa 受体表达、 IgG 结合以及FITC-IgG的吞噬。（9）透射电镜检测血小板吞噬胶体金-IgG。（10）ELISA 检测 RA 患者及健康对照血小板培养上清液中 CCL5和可溶性CD40L（sCD40L）的量。（11）Transwell细胞迁移实验检测血小板对 Raji B 细胞的趋化及活化作用。（12）流式细胞术检测 Raji B 细胞与血小板共培养后CD86、CD69的表达以及 CFSE 荧光强度变化。（13）转录组学明确健康人外周血 B 细胞与 RA 患者或健康对照血小板共培养后差异基因表达及生物信息学分析。（14）免疫荧光检测血小板与异位生发中心的共定位。

**结果：**

1. 实验室检查数据统计结果及透射电镜结果显示活动期 RA 患者血小板体积更小且更加均一。
2. RA 患者外周血血小板活化程度更高，且其滑膜存在活化的血小板富集。
3. AIA 组富含血小板血浆促进炎症，对照组富含血小板血浆缓解炎症
4. 血小板主导富含血小板血浆的致炎及抑炎效应
5. RA 患者和健康对照血小板蛋白质组学共鉴定出62种差异蛋白，显著性差异蛋白的 GO 功能主要在吞噬识别、B 细胞激活等功能富集；KEGG 通路主要富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路。
6. 蛋白质网络互作分析发现 FCGR2A、CCL5、SORT1 等差异表达蛋白质之间存在潜在联系。
7. RA 患者血小板 FcγRIIa 受体表达更高、表面结合IgG 更多、吞噬 IgG 能力更强、释放 CCL5 和 sCD40L 的能力更强
8. Transwell 实验结果显示 RA 患者血小板能有效趋化并活化B细胞。
9. RA 患者血小板能促进共培养 RajiB 细胞的活化及增殖。
10. 转录组学结果进一步明确 RA 血小板与B细胞共培养后，显著性差异基因功能主要富集在与B细胞活化相关过程。
11. 免疫荧光结果显示 RA 滑膜中血小板与滑膜异位生发中心存在共定位。

**结论：**

1. RA患者外周血及滑膜中血小板活化程度高，且与疾病活动度相关；
2. RA患者血小板结合及吞噬IgG能力更强；
3. RA患者血小板通过趋化并活化 B 细胞促进滑膜异位生发中心形成，从而参与RA疾病进程。