

来氟米特联合依那西普对佐剂性关节炎大鼠免疫功能的影响

陈晓明¹ 游运辉² 罗 卉² 贺立新^{3,4△}

(1 湖南省邵阳市中心医院 422400 2 中南大学湘雅医院风湿免疫科 湖南 长沙 410011 ;

3 湘潭职业技术学院护理系解剖学教研室 湖南 湘潭 411102 4 中南大学基础医学院人体解剖学与神经生物学系 湖南 长沙 410013)

摘要 目的:研究来氟米特和依那西普联合使用对佐剂性关节炎(AA)大鼠的治疗作用及其可能的作用机制。方法:建立 AA 大鼠关节炎模型,分为正常对照组、模型组、来氟米特组、依那西普组、来氟米特联合依那西普配伍组;采用关节炎指数评分法评价大鼠关节炎程度,半定量 RT-PCR 和放射免疫法检测滑膜组织及血清中 IL-1 β 、TNF- α 表达水平,免疫组化方法检测滑膜组织中 MMP-3 含量。结果:①相较于 AA 模型组,来氟米特组、依那西普组和配伍组中大鼠的 AI 评分均显著下降($P<0.01$),其中以配伍组关节炎指数为最低($P<0.05$)。②模型组大鼠血清及滑膜组织的 IL-1 β 和 TNF- α 水平明显高于正常对照组($P<0.01$),用药后各组的 IL-1 β 和 TNF- α 水平均有所下降,并以配伍组降低最为明显($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。③模型组大鼠滑膜组织 MMP-3 表达阳性密度显著高于正常对照组($P<0.01$),用药后各组的 MMP-3 阳性密度降低($P<0.01$),其中配伍组下降程度明显高于来氟米特组和依那西普组 ($P<0.01$)。结论:来氟米特和依那西普联合使用可明显减轻 AA 大鼠的关节炎症,降低血清和滑膜组织中 IL-1 β 和 TNF- α 水平,减少滑膜中 MMP-3 的表达,疗效优于单独使用来氟米特或依那西普。

关键词 类风湿关节炎;来氟米特;依那西普;白细胞介素-1;肿瘤坏死因子;基质金属蛋白酶-3

中图分类号 R593.22 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)17-3266-04

Effects of the Combined Use of Leflunomide with Etanercept on Immune Function in Rat Adjuvant Arthritis

CHEN Xiao-ming¹, YOU Yun-hui², LUO Hui², HE Li-xin^{3,4△}

(1 Shaoyang Central Hospital, Hunan Province, 422400, P.R.China; 2 Department of Rheumatology Immunology, Xiangya hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410011, P.R.China; 3 Teaching and research section of anatomy in nursing department, Xiangtan Vocational and Technical College, Xiangtan, Hunan, 411102, P.R.China;

4 Neuroanatomy and neurobiology department in basic medical college, Central South university, Changsha, Hunan, 410013, P.R.China)

ABSTRACT Objective: To study the therapeutic effects of Leflunomide (LEF) combined with Etanercept on rat adjuvant arthritis (AA), as well as the possible mechanism. **Methods:** Established the rat model of collagen-induced arthritis, and the rats were divided into control group, AA model group, LEF group, Etanercept group and LEF+Etanercept group; Arthritis were evaluated by arthritis index, and semi-quantitative RT-PCR, radioimmunoassay and immunohistochemistry were respectively used to detect the levels of IL-1 β , TNF- α and MMP-3 in synovium and serum. **Results:** ① The arthritis index of AA model group was significantly higher than those of LEF group, Etanercept group and LEF+Etanercept group ($P<0.01$), and the arthritis index was significantly lowest in LEF+Etanercept group ($P<0.05$). ② The levels of IL-1 β and TNF- α in synovium and serum were notably higher in AA model group than those in control group ($P<0.01$). After administration, the levels significantly decreased in the three groups ($P<0.01$), especially in LEF+Etanercept group ($P<0.05$). ③ The positive expression of MMP-3 in synovium of model group was significantly higher than that of control group. ($P<0.01$). The positive expression of MMP-3 in each group was lowered after administration. Compared with LEF group and Etanercept group, the positive expression of MMP-3 was significantly lower in LEF+Etanercept group ($P<0.01$). **Conclusions:** The combined use of LEF and Etanercept can significantly relieve the arthritis syndrome in AA rats by decreasing the expression of IL-1 β and TNF- α in synovium and serum, as well as that of MMP-3 in synovium, which is better than LEF or Etanercept used separately.

Key words: Rheumatoid arthritis; Leflunomide; Etanercept; IL-1; TNF; MMP-3

Chinese Library Classification: R593.22 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3266-04

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)为一种常见的慢性自身免疫性关节疾病,主要表现为全身多个关节进行性受累。目前 RA 治疗中仍然缺少效果满意的方法,且反复发作可导致关节结构的破坏,增加患者致残率,因此如何寻找更为有效、安

全的方法成为 RA 治疗的主要目标。来氟米特(leflunomide, LEF)为新一代的免疫调节剂,研究表明 LEF 治疗类风湿关节炎疗效较好。但是来氟米特起效慢,接受其治疗的 RA 患者多在 2 个多月后才会出现较明显的症状缓解^[1]。依那西普,为重组的可溶性 TNF- α 受体蛋白,起效快,在治疗后 2 周即开始见效,且疗效优于传统 DMARD 药物^[2]。因此本研究以佐剂性关节炎大鼠模型为基础,研究来氟米特、依那西普联合用药治疗类风湿关节炎的效果及其对大鼠体内 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 表达的影响,从细胞因子的角度探讨其可能的作用机

作者简介 陈晓明,副主任医师,风湿免疫科研究方向:风湿免疫,联系电话:13087398285

△通讯作者 贺立新, Tel: 13975286204,

E-mail: hlx20080828@tom.com

(收稿日期 2011-05-02 接受日期 2011-05-28)

制,为临床上采用来氟米特配伍依那西普治疗 RA 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

50 只成年雄性 Wistar 大鼠由江西中医学院实验动物中心提供,体重 180~200g,完全弗氏佐剂购自 SIGMA 公司,来氟米特购自苏州长征欣凯制药有限公司;依那西普购自美国 Wyeth 公司,IL-1 β 、TNF- α 试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放射免疫所,Trizol 试剂和 RT-PCR 试剂盒购自上海生物工程技术有限公司;基质金属蛋白酶 3(MMP-3)ELISA 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 大鼠佐剂性关节炎模型的建立 40 只 Wistar 大鼠左后足跖皮下注射 100 μ l 完全弗氏佐剂,注射后第 1d 大鼠足跖局部即可出现轻微肿胀等炎症反应,随时间延长大鼠关节炎症反应呈进行性加重,局部皮肤出现充血肿胀,皮温升高,足垫增厚,严重时关节无法负重,活动受限。另取 10 只正常对照组大鼠于相同部位,采用相同手法注射 100 μ l 生理盐水。从用药后第 1d 起,观察双后肢踝关节肿胀程度并进行 AI 评分,每 4 天 1 次,记分标准为 0 分无关节炎,1 分发红或轻微肿胀,2 分中度肿胀,3 分严重肿胀,4 分严重肿胀且不能负重。

1.2.2 实验分组 40 只模型鼠随机分为 4 组(10 只/组)。来氟米特组:于造模后第 12d 开始,来氟米特 10mg/kg 灌胃,一天一次,依那西普组:造模后第 12d 开始,采用 100 μ g/kg 依那西普腹腔注射,一周两次,依那西普联合来氟米特配伍组:灌胃给予来氟米特 10mg/kg(1 次/天),并腹腔注射依那西普 100 μ g/kg(2 次/周),模型组:不用药,正常饲料喂养。给药后 28d 处死所有大鼠。

1.2.3 滑膜组织 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 检测 分离大鼠双侧膝关节滑膜组织,Trizol 提取组织总 RNA 后,半定量逆转录-聚合酶链反应检测组织中 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 表达水平,采用引物如下:①IL-1 β :上游引物 5'-TTGTGGCTGTG-GAGAAGCTG-3',下游引物 5'-GCCGTCTTTCATACACAGG-3',产物大小为 377bp。②TNF- α :上游引物 5'-CTGGGCAGCGTTTATTCT-3',下游引物 5'-TTGCTTCCCT-GTTCC-3',产物大小为 249bp。③内参照 β -actin:上游引物 5'-CACCCTGTGCTGCTACCGAGGCC-3',下游引物 5'-CCACACAGATGACTTGCCTCAGG-3',产物大小为 147bp。PCR 结束后,2%琼脂糖凝胶电泳,拍照后,凝胶图像分析软件得出各目的条带与内参照 β -actin 的灰度比值。

1.2.4 血清 IL-1、TNF- α 测定 给药后 28d 眼球取血处死大鼠,3500rpm 离心 20min,分离上层血清,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。以放射免疫法(RIA)进行测定,分别将 0.1ml 的缓冲液、标准液、血清样品、125I-IL-1 β 、125I-TNF 和 IL-1 β 、TNF- α 的抗血清加入编号为总计数管(T)、非特异性结合管(NSB)、零标准管(S0)、标准管(S1-5)、样品管(U)的聚丙烯试管中,充分混匀,4 $^{\circ}$ C 温育 24h 后,加入 0.5ml 免疫分离剂,充分混匀,室温放置 20min,3500rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 25min,弃尽上清,通过检测各管沉淀部分的放射性计数,得到各血清样品的浓度。

1.2.5 滑膜组织 MMP-3 免疫组化检测 分离大鼠双侧踝关节组织,4%多聚甲醛固定后,石蜡包埋连续切片,厚度为 4 μ m,进行免疫组化染色,实验按试剂盒说明书操作。随机检测 5 个 400 倍视野下阳性面积比,为每个视野中阳性细胞面积占整个视野面积的百分率,取其平均值,以作为 MMP-3 阳性密度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件处理数据,所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,两组间均数比较用 t 检验。以 $p < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠关节炎指数评分

从给药当天开始观察大鼠双后肢踝关节肿胀程度,发现随着免疫时间延长各组大鼠的 AI 评分均呈明显的下降趋势,至给药后 28d,来氟米特组、依那西普组和配伍组大鼠关节肿胀程度均显著低于模型组($P < 0.01$),三组间比较以配伍组 AI 评分下降最为显著($P < 0.05$),而来氟米特组和依那西普组间无明显差异($P > 0.05$)(Fig 1)。

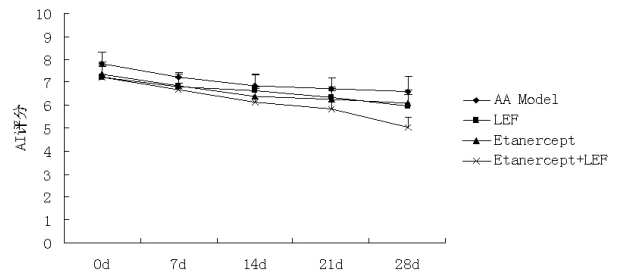


Fig 1 Comparison of arthritis scoring data between groups

2.2 大鼠滑膜细胞 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 表达水平

以佐剂性关节炎模型大鼠为研究对象,以半定量 RT-PCR 方法观察来氟米特、依那西普单独用药和两者配伍用药对大鼠滑膜细胞中 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 表达水平的影响。结果佐剂处理可显著增加 AA 模型组大鼠滑膜细胞中 IL-1 (377bp) 和 TNF- α (249bp) 的表达,组间差异有统计学意义($P < 0.01$),而经过来氟米特、依那西普单独或两者联合用药处理后,大鼠 IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$),其中均以配伍组下降程度最为明显,但仍明显高于正常对照组大鼠中表达水平($P < 0.05$)(Fig 2, Tab 1)。

2.3 大鼠血清中细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 含量

放射免疫法检测各组大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 含量,结果 AA 模型组大鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著高于正常组($P < 0.01$),来氟米特组、依那西普组及配伍组的 IL-1 β 和 TNF- α 水平均较模型组减少($P < 0.01$),其中以来氟米特组和依那西普联合配伍组差异最为显著,与对照组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(Tab 2)。

2.4 大鼠滑膜组织中 MMP-3 表达

免疫组化结果显示,模型组大鼠滑膜细胞层及滑膜下层的 MMP-3 阳性密度显著高于正常滑膜组织,组间差异有统计学意义($P < 0.01$),来氟米特、依那西普单独用药及两者配伍用药 MMP-3 阳性密度可明显减少,与模型组比较,差异均有显著性

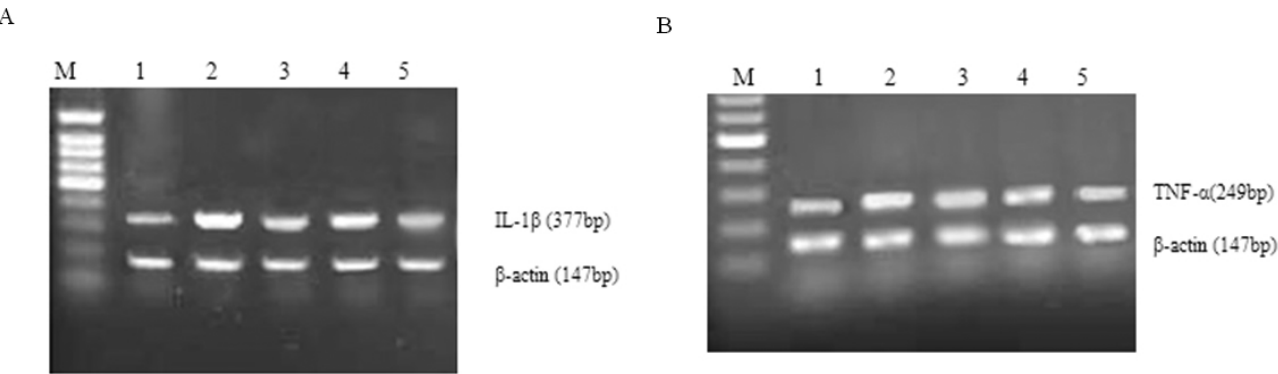


Fig 2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of IL-1β mRNA and TNF-α mRNA in synovial cells (A): IL-1β mRNA; (B): TNF-α mRNA; 1: Normal group 2: AA model group 3: LEF group 4: Etanercept group 5: The combination of LEF and Etanercept

Tab 1 The changes of expression levels of IL-1β mRNA and TNF-α mRNA between groups($\bar{x} \pm s$)

Group	Number	IL-1β /β -actin	TNF-α /β -actin
Normal	10	0.58± 0.12	0.59± 0.11
AA Model	10	2.44± 0.36●	1.46± 0.13●
LEF	10	1.79± 0.05●※	1.15± 0.20●※
Etanercept	10	2.13± 0.18●※	0.84± 0.07▲※
Etanercept+LEF	10	1.24± 0.63▲※#	0.67± 0.08▲※#

▲P<0.05 , ● P<0.01 vs control; ※P<0.01 vs model ;#P<0.05 vs LEF or Etanercept

Tab 2 The comparison of IL-1β and TNF-α between groups($\bar{x} \pm s$)

Group	Number	IL-1β /β -actin	TNF-α /β -actin
Normal	10	0.56± 0.15	0.96± 0.19
AA Model	10	1.32± 0.17●	1.84± 0.15●
LEF	10	0.73± 0.15●※	1.32± 0.21●※
Etanercept	10	0.88± 0.20●※	1.16± 0.18▲※
Etanercept+LEF	10	0.51± 0.18※#	0.98± 0.14※#

●P<0.01, ▲P<0.05 vs control ;※P<0.01 vs model ;#P<0.05 vs LEF or Etanercept

(P<0.01), 其中来氟米特组与依那西普组 MMP-3 阳性密度水平相当 ,配伍组阳性密度降低最为明显 ,但仍高于对照组(P<0.01)(Fig 3)。

3 讨论

RA 被认为是一种慢性关节炎性疾病 ,在感染、疲劳等外来因素刺激下 ,滑膜细胞及滑膜组织中浸润的淋巴细胞、单核 /巨噬细胞可通过分泌产生大量细胞因子 ,促进类风湿关节炎的发生与发展 ,因此有效抑制类风湿关节炎患者关节组织内炎症因子的表达是 RA 治疗中的一个重要靶点。细胞因子 IL-1β 和 TNF-α 在 RA 的发病机制中处于中心位置 ,其可能机制如下 :通过活化血管内皮细胞 ,增加内皮粘附分子表达 ,促进血液中白细胞聚集于关节腔内 ,增强破骨细胞活性 ,并表达胶原酶、基质金属酶等 ,导致关节软骨与骨的破坏 ,刺激结缔组织细胞和多形核细胞合成小分子炎症介质^[3,4]。

研究表明来氟米特在体内可以抑制 IL-1β 、TNF-α ,且其

抑制程度与疗效密切相关^[5]。依那西普为重组的可溶性 TNF-α 受体蛋白 ,由 TNF-α 受体的细胞外配体结合部位与人类 IgG Fc 段融合而成 ,可与 TNF-α 直接结合 ,阻断其活性发挥 ,减少

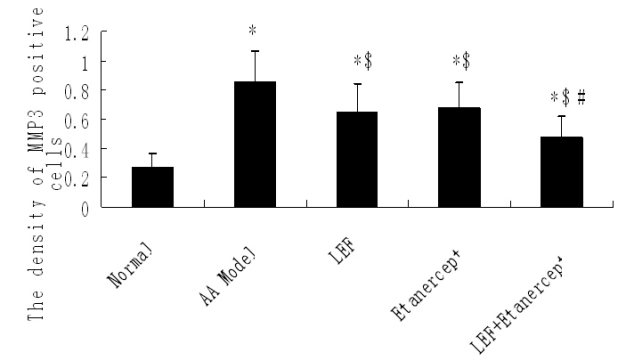


Fig 3 Comparison of the density of MMP-3 positive cells in synovial cells between groups

*P<0.01 vs control \$P<0.01 vs model #P<0.01 vs LEF or Etanercept

滑膜和软骨的破坏,相较于传统 DMARD 药物,依那西普优势在于特定的靶向性减少了产生全身免疫抑制的可能,且起效快,患者耐受性好^[6]。因此本研究中,我们试图证明来氟米特和依那西普联合用药是否可以取长补短,达到更好的治疗效果,并初步探讨了其可能作用机制。

实验中,大鼠经完全弗氏佐剂处理后,关节出现充血肿胀、局部皮温升高等明显的炎症反应,关节炎指数 AI 相应增加,表明我们成功建立了大鼠佐剂炎性关节炎模型,此时分别以 RT-PCR、放射免疫法检测大鼠血清及滑膜组织中 IL-1 β 和 TNF- α 水平,发现相较于正常对照组,模型大鼠血清及滑膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高 ($P<0.01$),再次证明 IL-1 β 和 TNF- α 在 RA 发生发展中起着重要作用;经来氟米特、依那西普单独给药或联合治疗后,三组中 AA 模型大鼠关节肿胀程度均得到缓解, AI 指数得以改善 ($P<0.01$),检测血清与滑膜组织中 IL-1 β 和 TNF- α 水平,均明显低于 AA 模型组 ($P<0.01$),其中以 LEF+ Etanercept 组下降程度最为明显 ($P<0.05$),表明配伍用药组在下调类风湿关节炎免疫应答、减轻炎症反应方面要优于来氟米特或依那西普单独用药。

关节组织中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 的过表达或活性增加是后期引发 RA 患者关节结构破坏的重要因素,据报道, MMP-3 除可广泛降解基质中的各种成分外,还可通过级联激活反应活化其它类型 MMP,进一步加重 RA 病情^[7]。本研究结果表明,正常对照组很少产生 MMP-3,而 AA 模型组大鼠滑膜组织中 MMP-3 表达水平明显升高 ($P<0.01$),至用药后三组大鼠中 MMP-3 表达均有所减少 ($P<0.01$),其中尤以配伍组下降最明显 ($P<0.01$),推测来氟米特和依那西

普联合使用可发挥协同作用,共同下调大鼠体内细胞因子 IL-1 和 TNF- α 水平,从而减轻对破骨细胞、滑膜细胞的刺激,减少这些细胞中 MMP-3 的合成和分泌,延缓关节损害发生。

总之,来氟米特和依那西普配伍用药可通过下调炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 表达,减轻关节炎症,抑制软骨和骨质破坏,完成对 RA 的治疗,且效果优于两者单独使用,值得进一步推广使用。

参考文献(References)

- [1] 施安国. 类风湿关节炎治疗药物研究 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15 (15):92-95
Shi Anguo. The research on medicine of rheumatoid arthritis [J]. The journal of Chinese New Medicine, 2006, 15(15):92-95
- [2] Strober B E. The treatment of psoriasis with etanercept [J]. Semin Cutan Med Surg, 2005, 24(1):28-36
- [3] Brennan F M, McInnes J B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis [J]. J Clin Invest, 2008, 118:3537-3545
- [4] Cutolo M, Straub R H, Bijlsma J W. Neuroendocrine-immune interactions in synovitis [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3:627-634
- [5] Van Riel P L, Smolen J S, Emery P, et al. Leflunomide: a manageable safety profile [J]. J Rheumatol Suppl, 2004, 71:21-24
- [6] Genovese M C, Bathon J M, Martin R W, et al. Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(6): 1443-1450
- [7] Sugiyama E. Role of matrix metalloproteinase-3 in joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. Clin Calcium, 2007, 17(4):528-534

(上接第 3257 页)

- [3] Zhang YM, Yang Q, Xu CT, et al. Effects of phenytoin on morphology and structure of hippocampal CA1 pyramidal neurons of rats in chronic stress [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(5):403-407
- [4] Xu Chen, histology and embryology. Beijing: Higher Education Press 2009:103-106
- [5] Seress L, Ribak CE. Postnatal development of CA1 pyramidal neurons and their afferents in the Ammon's horn of rhesus monkeys [J]. Hippocampus, 1995, 5(3):217-231
- [6] He Xiao-zhou, Yang Qiu-jia, Dou Qin-hua etc. The ultrastructural changes of pyramidal neurons in old rat hippocampal CA1
- [7] Astur, R.S., Taylor, L.B., Mamelak, A.N., Philpott, L., Sutherland, R.J., 2009. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task
- [8] Kerr, D.S., Campbell, L.W., Applegate, M.D., Brodish, A.Landfield, P. W., 1991. Chronic stress-induced acceleration of electrophysiological

and morphometric biomarkers of hippocampal aging. J. Neurosci. 11, 1316-1324

- [9] Sousa, N., Lukoyanov, N.V., Madeira, M.D., Almeida, O.F., Paula-Barbosa, M.M., 2007. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. Neuroscience 97, 253-266
- [10] Diamond MC, Johnson RE, Young D, Singh SS. Age-related morphological differences in the rat cerebral cortex and hippocampus: Male-female; right-left. Exp Neurol 1983; 8: 1-13
- [11] Flor-Henry P. Lateralized temporal-limbic dysfunction and psychopathology. Ann N Y Acad Sci 1976; 280: 777-91
- [12] Apostolova LG, Dinov ID, Dutton RA, Hayashi KM, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM. 3D comparison of hippocampal atrophy in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Brain 2006; 129:2867-2873