

TNF 受体封闭肽对大鼠佐剂性关节炎的影响

何亚萍, 李卓娅*, 姜晓丹, 冯 玮, 徐 勇, 熊 平

(华中科技大学 同济医学院 免疫系, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 观察肿瘤坏死因子(TNF)受体封闭肽对大鼠佐剂性关节炎的影响。方法 注射弗氏完全佐剂建立大鼠佐剂性关节炎模型,在关节局部注射 TNF 受体封闭肽,观察对大鼠关节肿胀度、关节组织病理改变及腹腔巨噬细胞表达 IL-1 β mRNA 和 TNF- α mRNA(RT-PCR)的影响。结果 建立了与人类类风湿性关节炎极其相似的大鼠佐剂性关节炎模型;TNF 受体封闭肽治疗 10 d 后,大鼠踝关节肿胀完全受到抑制;关节组织内炎症细胞浸润减少,炎性病理损伤明显减轻;大鼠腹腔巨噬细胞表达的 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 明显减低。结论 TNF 受体封闭肽通过抑制佐剂性关节炎 TNF- α 和 IL-1 的产生,而发挥抗炎作用,明显减轻关节的病理性损伤,有效抑制关节炎的临床进程。

关键词: 肿瘤坏死因子- α ; TNF 受体封闭肽; 佐剂性关节炎; 类风湿性关节炎

中图分类号: R967; R684.3 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)12-0889-04

Effects of TNF- α receptor blocking peptide on adjuvant arthritis in rats

HE Ya-ping, LI Zhuo-ya*, JIANG Xiao-dan, FENG Wei, XU Yong, XIONG Ping

(Department of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Aim** To study the effects of TNF receptor blocking peptide on adjuvant arthritis in rats. **Methods** The model of rat adjuvant arthritis was induced by injection of complete Freund's adjuvant. The TNF receptor blocking peptide was injected locally in the ankle. The ankle swelling, the pathologic changes in the ankle joint and the expression of IL-1 β mRNA and TNF- α mRNA by peritoneal macrophages (RT-PCR) were observed. **Results** The model of rat adjuvant arthritis induced by injection of complete Freund's adjuvant was similar to human rheumatoid arthritis. The treatment with TNF receptor blocking peptide for 10 days resulted in complete inhibition of joint swelling, a decrease in infiltration of inflammatory cell into joint tissue, an obvious alleviation of inflammatory pathological damages and an apparent decline of TNF- α mRNA and IL-1 β mRNA of peritoneal macrophages of rats. **Conclusion** The TNF receptor blocking peptide can protect the joint from inflammatory damage induced by adjuvant arthritis by suppression of TNF- α and IL-1 production, thereby alleviating the pathological injury of joint and controlling effectively the clinic course of arthritis.

Key words: TNF- α ; TNF receptor blocking peptide; adjuvant arthritis; rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的自身免疫性疾病,主要表现为慢性滑膜炎、滑膜增生和纤维化,滑液中有单核细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及浆细胞浸润,并伴胶原酶增多;炎症渗入到关节腔,导致软骨和骨的破坏。在 RA 病情进展中,细胞因子起重要作用^[1-5],其中 TNF- α 在 RA 滑膜炎症的不同时期及关节基质退化发展过程中的作用尤为重要^[6,7]。此外,TNF- α 还被认为是

RA 病程中调节其他促炎细胞因子表达的关键细胞因子。因为用抗 TNF- α 抗体可同时抑制滑膜细胞产生 IL-1, IL-6, GM-CSF 及它们所导致的病理作用。

本室借助噬菌体展示技术,用重组 TNF 受体在肽库中筛选出 TNF 受体封闭肽,该肽可竞争性抑制 TNF- α 与 TNF 受体的结合,从而拮抗 TNF- α 对巨噬细胞的激活效应(待发表)。本研究进一步观察 TNF 受体封闭肽在体内对大鼠佐剂性关节炎发生、发展的影响,为临床有效治疗和控制类风湿性关节炎提供实验依据。

收稿日期: 2002-12-16.

基金项目: 863 计划资助项目(2001 AA215431).

* 通讯作者 Tel: 86-27-83692611

材料和方法

实验动物 Wistar 大鼠, ♂, 体重 150 ~ 200 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

主要试剂 TNF 受体封闭肽粉剂, 由第三军医大学合成; 弗氏完全佐剂(F5881) 购自美国 Sigma 公司。

实验分组 对照组: 注射生理盐水 0.1 mL/只; 模型组: 在大鼠右足垫部皮内注射弗氏完全佐剂 0.1 mL/只; 治疗 1 组: 注射佐剂后, 立即注射 TNF 受体封闭肽 0.1 mL/只, 剂量分别为 0.5 和 1 mg·kg⁻¹, qd, 每个剂量 4 只, 连续治疗 10 d; 治疗 2 组: 方法与剂量同治疗组 1, 连续治疗 20 d。

检测踝关节肿胀度 用游标卡尺测量大鼠踝关节肿胀度(cm)。

病理学检查 按常规做组织切片, HE 染色。

用 RT-PCR 检测大鼠腹腔巨噬细胞 IL-1 β mRNA 和 TNF α mRNA 的表达 取大鼠腹腔巨噬细胞, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次, 重悬于 DMEM 培养液中, 调细胞至 $(2 \sim 4) \times 10^{13} \cdot L^{-1}$, 37 °C 贴壁 30 min, 去掉非粘附细胞。细胞总 RNA 提取参见 TRIzol RNA 分离试剂产品说明书, 所用巨噬细胞数为 $5 \times 10^9 \cdot L^{-1}$; 逆转录按照 Boehringer Mannheim 公司逆转录试剂盒说明书进行。取逆转录产物 2 μ L 作模板, 分别用 IL-1 特异性引物(P1- GATAACCTGCTGGTGTGTGA; P2- CTTGTGAGGTGCTGATGTAC)、TNF α 特异性引物(P1- GCGGATCATGGTCAGATCATCTTCTC

GAA; P2- CCCAAGCTTCAGGGCAATGATCCCAAAGTA)、 β -actin 特异性引物(P1- AACGGCTCCGGCATGTGCAA; P2- CTTCTGACCCATGCCACCA) 进行 PCR 扩增, IL-1 的 PCR 循环为: 94 °C 30 s, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 26 个循环, 74 °C 10 min; TNF α 的 PCR 循环如下: 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 28 个循环, 74 °C 10 min。取 PCR 产物 5 μ L 于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 长波紫外灯下观察结果。

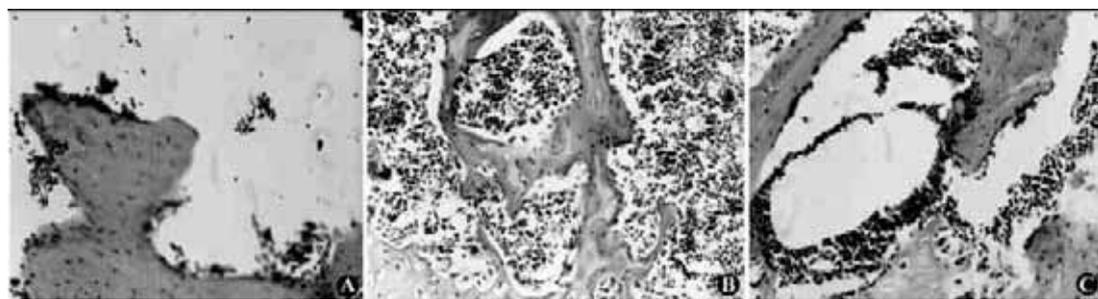
统计学处理 各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 组间分析用 *t* 检验。

结果

1 大鼠佐剂性关节炎的建立

注射佐剂后, 大鼠烦躁不安, 右脚不敢着地行走, 18 h 后出现右后肢踝关节明显红肿, 走路缓慢, 进食减少等临床表现; d 3 右后肢踝关节肿胀减轻, 但 d 8 红肿再度加重(表 1); 在接种 10 ~ 18 d 后, 形成多发性关节炎, 表现为未注射佐剂一侧(左后肢)的踝关节轻度红肿(结果未显示), 与人类 RA 的发病过程极为相似。而注射 TNF 受体封闭肽后数天, 大鼠情绪稳定, 行走基本自如, 踝关节肿胀有所减轻等。

病理切片显示, 大鼠佐剂性关节炎的踝关节滑膜组织中有大量的炎性细胞、浆细胞的浸润, 血管翳形成并伸向关节表面, 关节腔隙缩小, 关节软骨发生破坏(图 1)。



A (control): Rats injected with 0.1 mL of 0.85% NaCl; B (adjuvant arthritis): Rats received a single injection of 0.1 mL of Freund's complete adjuvant; C (treatment): Rats received a single injection with Freund's complete adjuvant, followed by injection with TNF receptor blocking peptide 1 mg·kg⁻¹ per day for 20 days

Figure 1 Effect of the TNF α receptor blocking peptide on the pathologic changes in ankle of rat adjuvant arthritis ($\times 200$)

2 TNF 受体封闭肽对大鼠佐剂性关节炎关节肿胀的影响

表 1 显示大鼠踝关节注射佐剂后 18 h 明显肿胀, 但 d 3 则有所减轻, d 10 肿胀再度明显, 此后肿胀程度随时间延长而加重; 用 TNF 受体封闭肽(1

mg·kg⁻¹) 后, 前 3 d 无明显疗效, 但 10 d 后, 治疗组踝关节肿胀基本消退, 与未注射佐剂对照组相似。所用两种药物剂量组之间的疗效无显著性差异。

3 TNF 受体封闭肽对佐剂性关节炎病理变化的影响

经每日 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TNF 受体封闭肽持续治疗 20 d 后,与未用药的佐剂性关节炎大鼠相比,其踝关节滑膜细胞层增生程度减小,滑膜组织充血、水肿好

转,关节腔内炎性细胞浸润明显减少以及关节软骨破坏程度减轻等。但与正常大鼠的踝关节切片相比,治疗组尚未完全恢复正常。

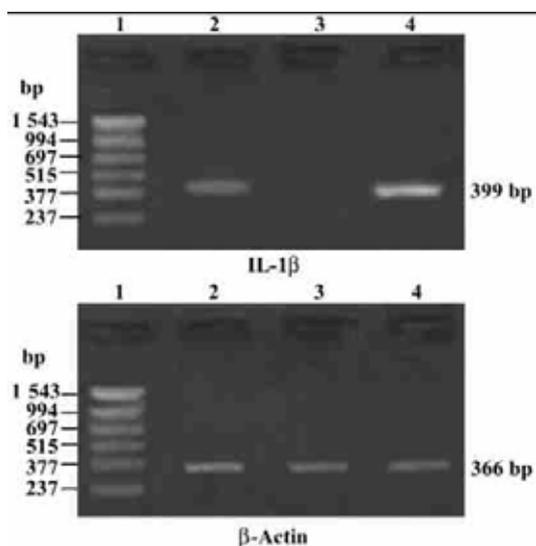
Table 1 Effect of TNF- α receptor blocking peptide on the swelling ankle of rat adjuvant arthritis

Group	Dose / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	Time after treatment/d	n	Degree of swelling / cm					
				0 d	18 h	3 d	10 d	20 d	30 d
Control	-	-	6	1.60 \pm 0.05	1.60 \pm 0.05	1.65 \pm 0.05	1.83 \pm 0.05	1.92 \pm 0.06	2.08 \pm 0.08
Model	-	-	7	1.63 \pm 0.10	1.86 \pm 0.11	1.74 \pm 0.10	2.33 \pm 0.11***	2.59 \pm 0.11***	2.74 \pm 0.08***
Treatment 1	0.5	1 - 10	4	1.60 \pm 0.08	1.87 \pm 0.10	1.78 \pm 0.10	1.75 \pm 0.06 ^{△△△}	-	-
	1.0	1 - 10	4	1.63 \pm 0.05	1.83 \pm 0.05	1.73 \pm 0.10	1.70 \pm 0.00 ^{△△△}	-	-
Treatment 2	0.5	1 - 20	4	1.63 \pm 0.05	1.88 \pm 0.10	1.78 \pm 0.10	1.75 \pm 0.06	1.73 \pm 0.10 ^{△△△}	-
	1.0	1 - 20	4	1.63 \pm 0.05	1.85 \pm 0.06	1.75 \pm 0.06	1.70 \pm 0.00	1.65 \pm 0.06 ^{△△△}	-

Control: Rats injected with 0.1 mL of 0.85 % NaCl; Model: Rats injected with 0.1 mL of Freund's complete adjuvant; Treatment 1: Rats injected with Freund's complete adjuvant, followed by treatment with a single injection of TNF receptor blocking peptide 0.5 or 1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per day for 10 days; Treatment 2: Rats treated by a single injection of TNF receptor blocking peptide 0.5 or 1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per day for 20 days. $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ^{△△△} $P < 0.001$ vs model group

4 TNF 受体封闭肽对佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞 IL-1 β mRNA 的影响

取对照组、模型组与治疗 20 d 的大鼠腹腔巨噬细胞 $5 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$,用 RT-PCR 分析 TNF 受体封闭肽对其 IL-1 β mRNA 的影响。结果如图 2,正常大鼠腹腔巨噬细胞没有 IL-1 β mRNA 的转录,因为未检测到 RT-PCR 产物;注射佐剂后的模型组大鼠的腹腔 M Φ 出现一条强的 IL-1 β cDNA 特异性条带(泳道 4),而用 TNF 受体封闭肽治疗后的大鼠腹腔 M Φ 的 IL-1 β cDNA 条带则明显减弱(泳道 2),通过密度扫描进行相对定量,证实 TNF 受体封闭肽的抑制效率为 50 %。

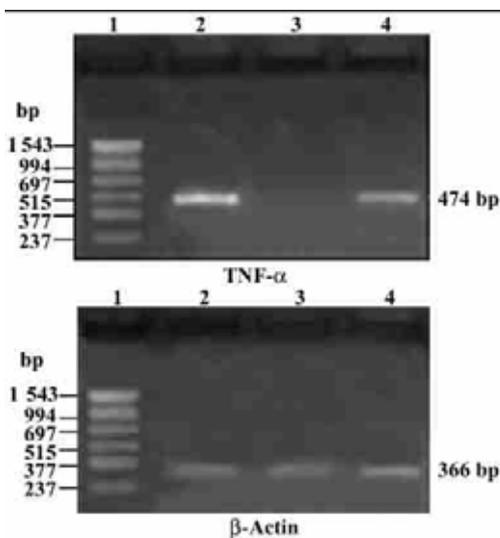


Lane 1: DNA marker; Lane 2: PCR products of treatment by peptide; Lane 3: PCR products of control; Lane 4: PCR products of adjuvant arthritis

Figure 2 Effect of the TNF- α receptor blocking peptide on IL-1 β mRNA level of peritoneal M Φ of rat adjuvant arthritis

5 TNF 受体封闭肽对佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α mRNA 的影响

用 RT-PCR 进一步观察 TNF 受体封闭肽对佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α mRNA 的影响,结果如图 3,正常大鼠腹腔 M Φ 未检测到 TNF- α 的 RT-PCR 产物(泳道 3),佐剂性关节炎组大鼠的腹腔 M Φ 有明显 TNF- α 特异性 RT-PCR 产物条带出现(泳道 2),而经 TNF 受体封闭肽治疗大鼠的腹腔 M Φ 的 TNF- α 条带则明显减弱(泳道 4)。通过密度扫描进行相对定量,证实 TNF 受体封闭肽的抑制率为 30 %。



Lane 1: DNA marker; Lane 2: PCR products of adjuvant arthritis; Lane 3: PCR products of control; Lane 4: PCR products of treatment by peptide

Figure 3 Effect of the TNF- α receptor blocking peptide on TNF- α mRNA level of peritoneal M Φ of rat adjuvant arthritis

讨论

本实验模型与人 RA 的病理损伤十分类似。给大鼠右足垫部注射完全弗氏佐剂 0.1 mL, 18 h 后出现右足红肿, d 3 红肿轻度消退, 是急性炎症反应期高峰已过, 组织渗出的液体开始逐步回吸收。d 10 关节再次肿胀, 并随时间的延长而逐步加重, 这可能由于完全弗氏佐剂中分支杆菌激发了特异性细胞免疫应答, Th1 细胞释放各种细胞因子, 造成迟发型超敏反应的损伤, 其中 IFN γ , TNF- α 和 GM-CSF 等, 进一步激活巨噬细胞, 增强其吞噬、杀伤功能; 此外, 还可激活 CTL 等淋巴细胞、中性粒细胞等, 这些炎症细胞和免疫细胞可释放多种蛋白水解酶、超氧离子、NO 和细胞因子等, 加重关节的炎症, 造成关节滑膜及骨质的损害。本实验结果显示, 4 周后的关节组织学切片能见到典型的炎症病理改变, 如可见大量炎症细胞浸入关节腔, 滑膜细胞层增厚, 由原来的 1~3 层增加到 5~8 层甚至更多, 关节腔隙变小, 关节软骨破坏等。此模型与文献^[8]报道基本一致。上述炎症改变与 RA 类似, 且也可波及全身, 表现为炎症累及到其他关节及腹腔巨噬细胞的激活, 即佐剂性关节炎大鼠腹腔巨噬细胞表达 IL-1 β 和 TNF- α 明显增加。提示炎症反应已不象反应早期局限在注射部位的关节, 而是一种波及全身的病理免疫应答。

由于 TNF- α 在 RA 发病过程中的重要作用, 作者用重组 TNFR 在肽库中筛选到 TNF 受体封闭肽。该肽虽然与 TNF- α 氨基酸序列无同源性, 但是在体外实验证实可竞争性抑制 TNF- α 的细胞毒效应。本实验进一步观察该封闭肽在体内的效应, 结果证实 TNF 受体封闭肽在 1 mg \cdot kg⁻¹ 对炎症急性期无明显治疗作用, 但对迟发型超敏反应造成的炎症损伤却有明显疗效, 经过 10 d 治疗即可完全抑制关节肿胀, 并且关节的炎症病理性损伤明显减轻, 表现为踝关节滑膜组织中浸润的炎症细胞明显减少, 关节腔的破坏面和骨质破坏程度减轻, 滑膜增生细胞层减少等。这可能由于迟发型超敏反应是巨噬细胞依赖性反应, TNF- α 不但是重要的巨噬细胞活化因子, 而且也是重要的参与造成组织损伤的效应细胞因子, 因此 TNFR 封闭肽通过阻断 TNF- α 的效应, 可明显减轻此时的炎症损伤。

此外, TNF 受体封闭肽虽然是局部给药, 但是治疗 20 d 的大鼠腹腔 M Φ IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的水

平却比未治疗组降低。提示药物对局部炎症的缓解, 可使全身病理性变化也得到改善。另外, 在治疗过程中未发现 TNF 受体封闭肽有明显的副作用。

综上所述, 类风湿性关节炎病理过程的发生和发展主要与 TNF- α 及其诱导的其他促炎细胞因子如 IL-1 等有关^[9,10]。作者筛选到的 TNFR 封闭肽可通过竞争性抑制 TNF- α 与 TNF 受体的结合而拮抗 TNF- α 的生物学效应, 从而缓解大鼠佐剂性关节炎的组织损伤。本研究结果不但再次证实 TNF 在 RA 中的关键作用, 而且还为临床治疗 RA 及 TNF 相关性炎症疾病开发新型的肽类药物奠定了基础。

References:

- [1] Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1995, **38**(2): 151 - 160.
- [2] Kahle P, Saal JG, Schaudt K, et al. Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue [J]. *Ann Rheum Dis*, 1992, **51**(6): 731 - 734.
- [3] Firestein GS, Boyle DL, Yu C, et al. Synovial IL-1 receptor antagonist and IL-1 balance in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1994, **37**(5): 644 - 652.
- [4] Arend WP, Dayer JM. Cytokine and cytokine inhibitors or antagonists in RA [J]. *Arthritis Rheum*, 1990, **33**(3): 305 - 315.
- [5] Firestein GS, Berger AE, Tracey DE, et al. IL-1 receptor antagonist protein production and gene expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium [J]. *J Immunol*, 1992, **149**(3): 1054 - 1062.
- [6] Jaochim K. Update on D2E7: a fully human anti-TNF- α monoclonal antibody [J]. *Ann Rheum Dis*, 2000, **59** (Suppl): 144 - 145.
- [7] Fox DA. Cytokine blockade as a new strategy to treat RA: inhibition of TNF [J]. *Arch Intern Med*, 2000, **160**(4): 437 - 444.
- [8] Fang J, Zhang YX, Ru XB, et al. A study of the immune function of adjuvant arthritis rats [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2000, **16**(10): 525 - 528.
- [9] Feige U, Hu YI, Gasser J, et al. Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor- α synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57**(10): 1457 - 1470.
- [10] Harigai M, Hara M, Kitani A, et al. IL-1 and TNF- α synergistically increase the production of IL-6 in human synovial fibroblast [J]. *J Clin Lab Immunol*, 1991, **34**(3): 107 - 113.