

抗 TNF α 单克隆抗体在 II 型胶原诱导的关节炎模型中的应用

虎松艳¹ 唐璐² 冯雯雯³ 李青南⁴ 王晓东^{3*}

1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520
2. 广东省食品药品职业技术学校, 广州 510520
3. 广东药科大学附属第一医院, 广州 523808
4. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广州 510006

中图分类号: R452 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 08-1077-06

摘要: **目的** 制备胶原诱导的关节炎(collagen induced arthritis, CIA)模型,对 AT132 进行药效评价。**方法** 制备 II 型胶原诱导的 CIA 模型,且对新药 AT132 进行药效评价。HE 染色观察膝关节和踝关节的病理变化。ELISA 法检测血清中 C II、TNF α 的表达。流式细胞仪检测小鼠关节滑膜中 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-10 的表达。**结果** (1)模型组小鼠关节表现为小指关节、足爪、足趾肿胀以及变形,AT132 组小鼠关节则表现为轻微的红肿。(2)模型组小鼠膝关节和踝关节病理结果表现为炎症细胞的浸润、滑膜增生、血管翳和破骨细胞的出现,软骨和骨的破坏。AT132 组病理结果表现为轻微炎症细胞的浸润和滑膜增生。(3)ELISA 法检测结果发现:模型组中 C II 的表达明显上升,AT132 给药组中 C II 的表达明显下降($P < 0.01$)。(4)流式细胞仪检测结果发现:模型组小鼠关节滑膜中 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-10 的表达明显增加,AT132 组小鼠关节滑膜中 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-10 的表达明显降低($P < 0.01$)。**结论** CIA 模型造模成功率为 100%,AT132 能够有效地治疗关节炎小鼠。

关键词: 胶原诱导的关节炎;类风湿关节炎;TNF α ;细胞因子

Application of anti TNF alpha monoclonal antibody in type II collagen induced arthritis model

HU Songyan¹, TANG Lu², FENG Wenwen³, LI Qingnan⁴, WANG Xiaodong^{3*}

1. Guangdong Province Food and Drug Vocational Technical School, Guangzhou 510520
2. Guangdong Province Food and Drug Vocational Technical School, Guangzhou 510520
3. Guangdong Pharmacy University First Affiliated Hospital, Guangzhou 523808
4. Laboratory of Physiological Science, Guangdong Pharmacy University, Guangzhou 510006, China

Corresponding author: WANG Xiaodong, Email: wangxd0310@163.com

Abstract: **Objective** To prepare CIA model and to evaluate the effect of AT132. **Methods** CIA model was induced by type II collagen, and the effect of the new drug AT132 was evaluated. The pathological changes of knee and ankle joint were assessed using HE staining. The expression of C II and TNF alpha was detected by ELISA. The expression of TNF alpha, IL-1, IL-6, IL-10 in mice's synovial was detected using flow cytometry. **Results** (1) The CIA mice model group showed swelling and deformation of the little finger joints, feet and toes. Mice treated with AT132 showed a slight swelling of joints. (2) The pathology of knee and ankle joints of CIA model mice showed infiltration of inflammatory cells, synovial hyperplasia, appearance of pannus, emergence of osteoclasts, and cartilage and bone destruction. The pathological results of the AT132 group showed a slight inflammatory cell infiltration and synovial hyperplasia. (3) The ELISA results showed that the expression of C II and TNF alpha in the CIA model group increased significantly, whereas the expression of C II and TNF alpha in the AT132 treated group decreased significantly. (4) Flow cytometry results showed that the expression of TNF alpha, IL-1, IL-6 and IL-10 at the CIA model mice's synovial increased significantly, whereas the expression of TNF alpha, IL-1, IL-6 and IL-10 of the AT132 treated mice's synovial decreased significantly. **Conclusion** The successful rate of the CIA model was 100%. AT132 is effective in the treatment of arthritis in mice.

Key words: Collagen induced arthritis; Rheumatoid arthritis; TNF alpha; Cytokines

*通讯作者: 王晓东, Email: wangxd0310@163.com

1 前言

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是自身免疫病,其主要症状为对称性,周围性多个关节慢性炎性疾病,其病理为慢性滑膜炎,侵及软骨及骨组织,导致关节破坏,60%~70% 的患者在活动期血清中出现类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)^[1-3]。目前已建立了不少 RA 动物模型,应用较为广泛且较为成熟的 RA 动物模型是胶原诱导性关节炎 (collagen induced arthritis, CIA) 和佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA)。Trentham 等^[4]于 1977 年首次建立了 II 型胶原诱导关节炎大鼠模型,而且发现 50% 的 RA 患者血中存在抗 II 型胶原的自身抗体,这表明 II 型胶原可诱导 RA 的产生,该模型的病理表现与人类临床表现相似,为较理想的模型^[5]。AT132 是一种新型抗 TNF α 的单抗药,本文通过制备 CIA 模型以及对 AT132 药物治疗,主要观察 CIA 小鼠病理变化以及滑膜中 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-10 的表达水平的影响,进而对其药效进行评价,以及其治疗 RA 的可能机制,为关节炎的治疗提供新的方法和思路。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 主要实验仪器:光学显微镜 (Leica 公司); Leica HI1220 烘片机 (Leica 公司); Leica HI1210 摊片机 (Leica 公司); Leica TP1020 自动脱水机 (Leica 公司); Leica EG1150 组织包埋机 (Leica 公司); RM2255 旋转切片机 (Leica 公司); 电热恒温隔水式培养箱 (黄石恒丰医疗器械有限公司); 流式细胞仪 (BD FACSCanto™ II); 冷冻高速离心机 (Sigma 公司); 全自动酶标仪 (Thermo 公司)。

2.1.2 主要试剂:鸡 II 型胶原蛋白 (Chondrex 公司); 弗氏完全佐剂 (Chondrex 公司); Cytomix 试剂盒 (Ebioscience 公司); 灭菌注射用水 (广州白云山天心制药); h TNF α 单克隆抗体 AT132 (丽珠单抗生物技术有限公司)。

2.1.3 实验动物以及饲养情况:SPF 级 DBA/1J 小鼠,雄性,8~10w。动物饲养在屏障动物实验设施,饲养条件:饲养于室温 24~28℃。相对湿度 50%~70% 的 SPF 级环境,自由摄食和饮水。

2.1.4 实验分组:实验分为对照组、模型组和给药组。

2.2 实验方法

2.2.1 CIA 模型的构建:制备乳剂:将 II 型胶原蛋白与完全佐剂等体积混合 (鸡 II 型胶原蛋白浓度为 2 mg/ml),使用改良的乳化器在冰上搅拌乳化。其次,用麻醉剂麻醉小鼠后,使用电推剪,小心剃除小鼠尾巴根部区域的毛。最后,使用不含乳胶的 1 ml 注射器,在尾巴根部分两点皮内注入乳剂,总共注入乳剂 0.1 ml (0.2 mg)。初次免疫后 D21 使用相同的方法进行第二次免疫。

2.2.2 实验分组以及给药方法:随机选取 DBA/1J 小鼠,雄性,8~10 w,随机分为对照组、模型组、给药组,每组 8 只。模型组和给药组用 II 型胶原蛋白与完全佐剂制备 CIA 模型,对照组用等体积的注射用水代替。自造模开始,给药组腹腔注射 AT132 (30 mg/kg),每周 2 次,对照组和模型组腹腔注射注射用水。

2.2.3 小鼠日常状态的观察及关节炎指数评定:每天观察小鼠的状态以及关节炎症状,每周称量小鼠体重并记录关节炎临床评分。关节炎评分在参考文献^[6]基础上进行修订,具体评分标准如下:1 分:小指关节轻度肿胀;2 分:小指关节和足趾中度肿胀;3 分:踝关节以下的足爪重度肿胀。

2.2.4 膝、踝关节病理检测:连续给药 9 周后,处死动物。取膝关节、踝关节于中性甲醛固定 48 h 后,纯水冲洗 12 h,硝酸脱钙 3 d,再次纯水冲洗 5 h。冲水过夜后按常规方法脱水、透明、渗透、包埋、切片、HE 染色。光镜下观察关节,并且进行评分。参照文献进行评分^[7],评分标准如下:0 分:关节正常;1 分:滑膜增生、炎性细胞浸润;2 分:血管翳形成;3 分:软骨破坏;4 分:软骨破坏和骨质侵蚀。

2.2.5 血清中 C II、TNF α 的表达:连续给药 9 w 后,摘眼球取血,小鼠血清静置 2 h 后,于低温离心机 10000 r/min,4℃ 离心 2 min,吸取上清液,利用抗体夹心 ELISA 法测定血清中总 IgG,结果以 D490 表示。

2.2.6 关节滑膜中 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-10 的表达:–80℃ 冻存的小鼠关节滑膜置于无菌离心管中,加入 50 μ l PBS,用超声粉碎机粉碎,低温离心机 1000 r/min,离心 10 min。吸取上清液用于流式细胞仪检测。具体方法照 Mouse Th1/Th2 10plex Kit Flow Cytomix 试剂盒。(1)带滤膜的微孔板检测:用真空抽滤装置设置两条标准曲线。(2)每孔加 50 μ l 的检测缓冲液 (1 $\times$) 到检测酶标板中,取 25 μ l 的各浓度标准品混合液加入设定孔中。(3)加 25 μ l 的检测缓冲液 (1 $\times$) 到空白孔中,加 25 μ l 的标准品混合

稀释液到指定孔中,加 25 ul 样本到指定孔中。(4)取 25 ul 的荧光微球混合物加到所有孔中,包括空白孔。(5)取 50 ul 生物素共轭混合物加到所有孔中,包括空白孔。用封板膜封板,用铝箔避光,室温(18℃~25℃)下在 500 r/min 的振荡器中孵育 2 h。(6)准备链霉亲和素标记的藻红蛋白溶液。去掉封板膜,用真空过滤器抽掉孔中液体,加 100 ul 检测缓冲液(1×)到酶标孔中,再次用真空超滤器抽干。重复该步骤一次,用毛巾吸走板底的液体。(7)在所有孔中加入 100 ul 的检测缓冲液(1×)。在所有孔中包括空白孔中加 50 ul 链霉亲和素标记的藻红蛋白溶液。(8)用封板膜封板,用铝箔避光,室温(18℃~25℃)下在 500 r/min 的振荡器中培育 1 h。去掉封板膜,用真空过滤器抽掉孔中液体,加 100 ul 检测缓冲液(1×)到酶标孔中,再次用真空超滤器抽干。重复该步骤一次,用毛巾吸走板底的液体。(9)在所有孔中加入 200 ul 的检测缓冲液(1×)。反复吹吸混匀孔中液体,将此 200 ul 液体转移到流式管中,加检测缓冲液(1×)300 ul 使总量达到 500ul。避光,立即上流式细胞仪进行检测。(10)设置流式细胞仪检测程序后上机检测。

2.2.7 统计学处理:采用 SPSS 17.0 软件进行统计,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,选择配对 *t* 检验进行处理前后的比较,完全随机设计的方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

3 实验结果

3.1 小鼠日常状态的观察及关节炎指数评定

首次免疫注射后,模型组小鼠和 AT132 组小鼠皮内注射部位形成多处小的溃疡灶。与对照组相比,模型组和 AT132 组小鼠的体重在给药 14 天后有所下降,但在 28 日后逐渐上升(见图 1)。模型组小鼠在 24~26d 开始出现典型的关节炎症状,表现为小指关节、足爪、足趾肿胀以及变形(见图 2、3)。与模型组相比,AT132 组小鼠则表现为轻微的关节红肿(见图 2、3)。与模型组相比,AT132 组小鼠在给药期间其关节炎评分显著降低($P < 0.05$)。

3.2 关节炎小鼠的病理表现

病理结果发现:与正常对照组相比,模型组和 AT132 组小鼠表现为典型的关节炎病理症状,包括炎性细胞的浸润,滑膜增生,血管翳的形成,软骨和骨的破坏(图 4、5)。与正常对照组相比,模型组小鼠的病理评分显著上升,具有统计学差异($P < 0.01$)。与模型组相比,AT132 给药组小鼠的病理评

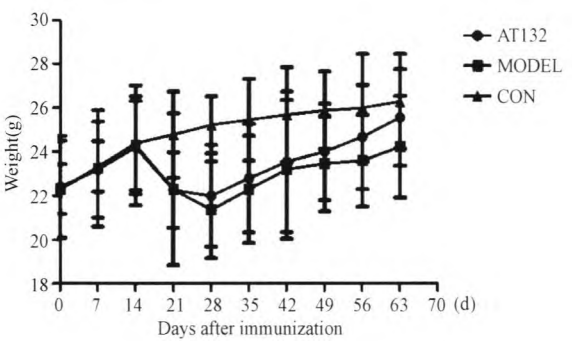


图 1 各组小鼠体重变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig.1 The weight changes in mice of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

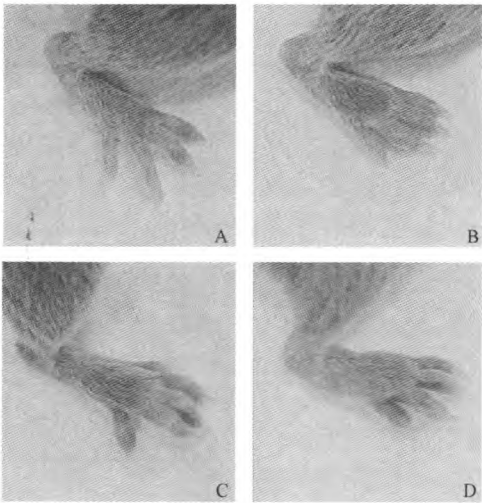


图 2 各组小鼠临床评分标准(A:关节炎评分 0 分;B:关节炎评分 1 分;C:关节炎评分 2 分;D:关节炎评分 3 分)

Fig.2 The standard clinical scoring in mice (A: Arthritis score 0 point; B: Arthritis score 1 point; C: Arthritis score 2 points; D: Arthritis score 3 points)

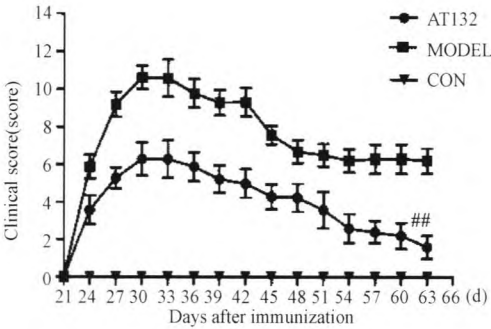


图 3 各组小鼠临床评分变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.3 The changes of clinical scores in mice of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注:##表示与对照组比较, $P < 0.01$ 。

分显著降低,具有统计学差异($P < 0.01$)。病理结果发现:与正常对照组相比,模型组小鼠膝关节、踝关节等多个关节出现滑膜增生,血管翳形成,软骨破坏化及骨的破坏;与 AT132 组小鼠膝关节和踝关节

表面光滑,仅见轻度滑膜增生。与模型组相比,给药组小鼠膝关节和踝关节病理评分明显降低,两组比较据有统计学差异($P < 0.01$)。

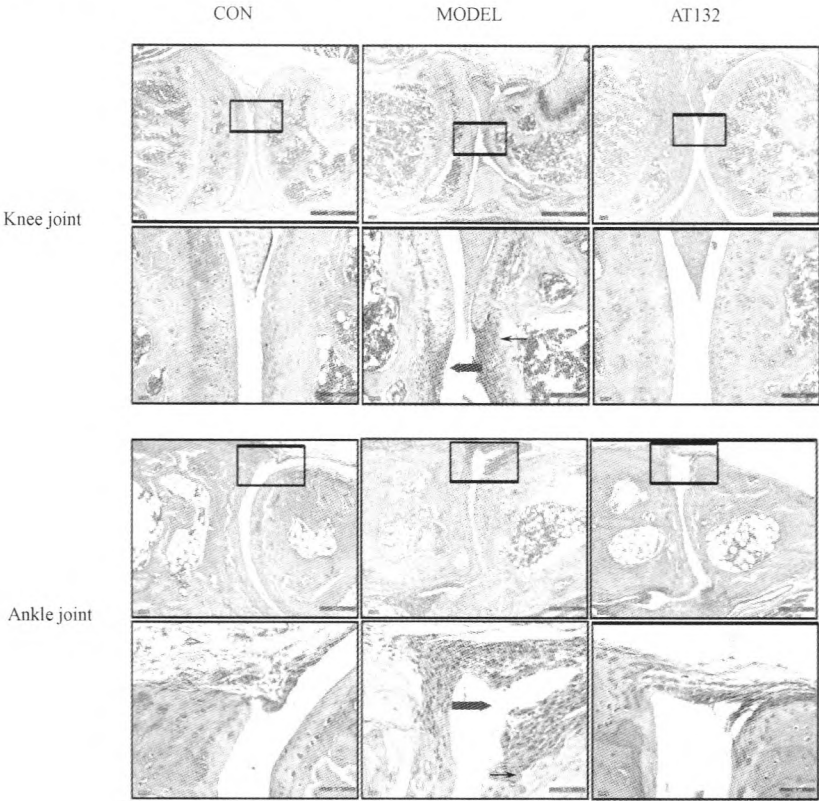


图 4 各组小鼠膝关节和踝关节病理变化

Fig. 4 The pathological changes in the knee and ankle joints in mice of different groups

注:粗箭表示滑膜增生,细箭表示软骨和骨的破坏

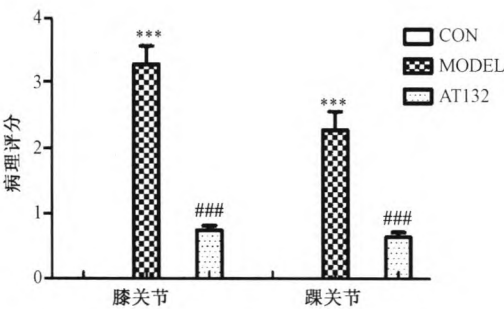


图 5 各组小鼠膝关节和踝关节病理评分变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 The pathological scores changes in the knee and ankle joints in mice of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注:***、###表示与对照组比较, $P < 0.001$ 。

3.3 关节炎小鼠细胞因子的表达

ELISA 法检测结果发现:与对照组相比,模型组中 C II、TNF α 的表达显著上升。与模型组相比,给

药组中 C II、TNF α 的表达明显下降,具有统计学差异($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 各组小鼠血清 C II 和 TNF α 的表达($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 The expression level of C II and TNF alpha in mice of difference groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	C II OD	TNF α OD
CON	5.08 $\pm$ 0.09	4.56 $\pm$ 0.11
MODEL	9.18 $\pm$ 0.05 ***	17.26 $\pm$ 0.25 ***
AT132	5.28 $\pm$ 0.18 **	7.18 $\pm$ 0.26 **

注:**表示与对照组比较, $P < 0.01$; ***表示与对照组比较, $P < 0.001$ 。

3.4 关节炎小鼠细胞因子的表达

本实验通过流式细胞仪检测结果发现:与对照组相比,模型组小鼠滑膜中 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-10 的表达明显增加,具有统计学意义。而与模型组小鼠相比,给药组小鼠滑膜中 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-10 的表达明显降低,具有统计学意义。

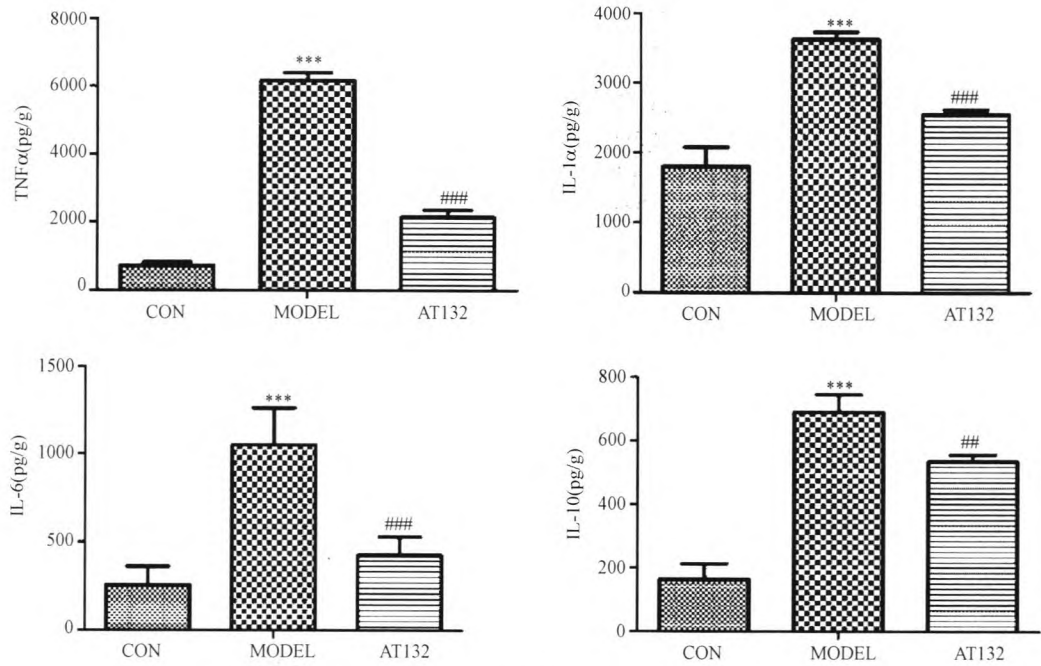


图 6 各组小鼠滑膜 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-10 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 The expression of IL-1, IL-10, IL-6 and TNF in mouse synovial membrane in mice of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注：#表示与对照组比较， $P < 0.01$ ；***、###表示与对照组比较， $P < 0.001$ 。

4 讨论

在我国,类风湿性关节炎发病率较高,尽管其发病机制尚不清楚,但与疾病发生发展相关的炎症因子已引起人们的关注。研究表明,RA 患者关节滑膜中 TNF-α 表达水平明显上升^[8-9]。Schuerwegh 等^[10]发现用 TNF-α 单抗药物治疗 RA 患者,能够有效抑制 TNF-α 的表达,从而改善 RA 患者的病情,且 IL-1、IL-6、IL-8、IL-10 等炎症因子水平在一定程度上降低。Abramson^[11]等研究证实,阻断 IL-1 能够抑制软骨和骨的破坏,可用于 RA 的治疗,是一种安全有效的 RA 治疗药物。细胞因子 IL-6 主要是由 IL-1 和 TNF-α 诱导合成,IL-6 又能够进一步增强 IL-1 和 TNF-α 破坏关节滑膜和关节软骨的作用,从而加速关节炎的进程^[12-13]。研究者发现 RA 患者中 IL-10 含量相对普通人较高,由于 IL-10 相关研究较少,IL-10 具体如何影响 RA 暂未明确^[14-15]。

目前,治疗类风湿性关节炎的公认的传统药物主要有甲氨蝶呤,虽然其能缓解类风湿性关节炎的症状,但不能够有效地治愈,而且不良反应多,长期使用会产生药物毒素。而新型的治疗类风湿性关节的生物制剂能够有效改善类风湿性关节炎的症状,不良反应率低,安全性好,并有助于患者回归正常生活,同时显著改善患者生活质量的多项指标。但是,

我国目前治疗类风湿性关节炎的生物制剂主要来源于国外进口,价格非常昂贵,故研发出能够有效治疗类风湿性关节炎的国产抗 TNF-α 单抗药物是当务之急。

本实验通过制备小鼠 CIA 模型,抗 TNF-α 单抗药 AT132 治疗 CIA 小鼠,病理结果发现,AT132 治疗后,能够有效抑制关节滑膜炎性细胞的浸润,滑膜增生,血管翳的形成,软骨和骨的破坏。流式细胞仪检测结果发现 AT132 能够有效抑制关节滑膜和血清中的 TNF-α 表达,同时也降低关节滑膜中 IL-1、IL-6、IL-10 的表达水平。AT132 是一种国产的新型抗 TNF-α 的单抗药物,能有效抑制 TNF-α 的表达,这与本实验结果一样。综上,AT132 明显降低关节炎小鼠滑膜中 TNF-α 的表达水平,同时减轻 IL-1、IL-6、IL-10 的表达水平,进而减轻关节炎小鼠滑膜的慢性炎症、血管翳形成和关节结构的破坏,从而达到治疗效果,但其他细胞因子具体如何调节有待进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36 (3) : 372-378.
[2] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature,

- 2003,423(6937):356-361.
- [3] Deane KD, O'Donnell CI, Hueber W, et al. The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner. *Arthritis and rheumatism*, 2010, 62 (4) : 3161-3172.
- [4] Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, et al. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Science*, 1997, 61 (19) : 1861-1878.
- [5] Hegen M, Keith JC, Collins M, et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67 (11) : 1505-1515.
- [6] Kurt R, Silvia H, Romeo R. Osteoclasts are essential for TNF- α -mediated joint destruction. *J Clin Invest*, 2002, 110 (10) : 1419-1427.
- [7] Michael DH, Beverly KJ, Arman S, et al. An extensive phenotypic characterization of the hTNF transgenic mice. *BMC Physiol*, 2007, 13 (12) : 121-122.
- [8] Chu WM, Cancer L. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*, 2013, 328 (2) : 222-225.
- [9] Zhou X, Fragala MS, Mc Elhaney JE, et al. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2010, 13 (5) : 541-547.
- [10] Schuerwegh AJ, Van Offel WJ, Stevens WJ, et al. Influence of therapy with chimeric monoclonal tumor necrosis factor- α antibodies on intracellular cytokine profiles of T lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology*, 2003, 42 (10) : 541-548.
- [11] Abramson SB, Amin S. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. *Rheumatology*, 2002, 41 (9) : 972-980.
- [12] Chung SJ, Kwon YJ, Park MC, et al. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Yonsei Med J*, 2011, 52 (1) : 113-120.
- [13] Yuji Yoshida, Toshio Tanaka. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int*, 2014, 52 (1) : 113-120.
- [14] Huang QQ, Koessler RE, Robert B, et al. TLR2 deletion promotes arthritis through reduction of IL-10. *J Leukoc Biol*, 2013, 93 (5) : 751-759.
- [15] Rudwaleit M, Yin Z, Siebert S, et al. Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumor necrosis factor alpha, increase of interleukin 10, and predicted by initial concentration of interleukin 4. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59 (4) : 311-314.

(收稿日期: 2016-04-16)