

•基础研究•

关节内注射不同浓度臭氧对类风湿关节炎大鼠TNF- α 、TNFR I和TNFR II的影响

余 斌,陈辉强,卢昌怀,林庆荣,王博炜,覃承诃
南方医科大学南方医院创伤骨科,广东 广州 510515

摘要:目的 观察不同浓度臭氧(O₃)对类风湿关节炎(RA)大鼠体内TNF- α 、TNFR I和TNFR II的影响,阐述O₃治疗类风湿关节炎的机理。方法 健康雄性Wistar大鼠48只,采用随机数字表法分为CON组、RA组、O₂组、O₃-10组、O₃-20组、O₃-30组、O₃-40组、O₃-50组,每组6只。除空白对照组外,采用注射弗氏完全佐剂乳化的牛Ⅱ型胶原蛋白的方法建立大鼠RA模型。造模后21 d,根据分组关节内注射纯氧和浓度分别为10、20、30、40、50 $\mu\text{g/ml}$ 的O₃各1 ml,每周1次,共注射3周。治疗前后测量双后肢足爪厚度。治疗结束后1周,检测大鼠血清和滑膜TNF- α 、TNFR I和TNFR II的含量。结果 治疗结束后,O₃-40组大鼠足爪厚度减小,与RA组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。RA组、O₂组、及O₃治疗各组血清中TNF- α 、TNFR I、TNFR II含量差异无统计学意义($P>0.05$)。与RA组相比,O₃-40组、O₃-50组大鼠滑膜TNF- α 、TNF II含量降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与RA组相比,O₃-40组大鼠滑膜TNFR I含量升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 关节内注射O₃可减轻RA大鼠的关节肿胀,浓度为40 $\mu\text{g/ml}$ 的O₃最为明显,作用机制和O₃可以降低滑膜内TNF- α 、TNFR II的活性,上调TNFR I的表达有关。

关键词:肿瘤坏死因子- α ;肿瘤坏死因子受体;类风湿关节炎;臭氧

中图分类号:R593.22 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2011)06-1055-04

Effect of intra-articular ozone injection on serum and synovial TNF- α , TNFR I, and TNFR II contents in rats with rheumatoid arthritis

YU Bin, CHEN Hui-qiang, LU Chang-huai, LIN Qing-rong, WANG Bo-wei, QIN Cheng-he

Department of Orthopedics and Traumatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of intra-articular ozone injection at different concentrations on the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), TNF receptor I (TNFR I), and TNFR II in the serum and synovium of rats with rheumatoid arthritis (RA) and explore the therapeutic mechanism of ozone in RA treatment. **Methods** Forty-eight Wistar rats were randomized into 8 groups, including 5 ozone groups receiving intra-articular injection of 10, 20, 30, 40 or 50 $\mu\text{g/ml}$ ozone, a blank control group, an oxygen group and a RA model group. All the rats, except for those in the blank control group, were subjected to hypodermic injection of bovine collagen II and complete Freund's adjuvant to induce RA. Ozone treatment was administered once weekly for 3 weeks starting at 21 days after the modeling. The swelling and thickness of the hind paws were observed, and the serum and synovial contents of TNF- α , TNFR I, and TNFR II were detected. **Results** At the end of treatment, the paw thickness was reduced significantly in rats with 40 $\mu\text{g/ml}$ ozone injection compared with that in the model RA group ($P<0.01$). The serum contents of TNF- α , TNFR I and TNFR II showed no significant difference between the RA model group, oxygen group and the ozone groups, but their synovial contents showed significant reductions in rats with 40 and 50 $\mu\text{g/ml}$ ozone injection ($P<0.01$); the synovial TNFR I was significantly higher in 40 $\mu\text{g/ml}$ ozone group than in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Intra-articular injection of 40 $\mu\text{g/ml}$ ozone can attenuate synovitis in rats with RA, the mechanism of which may involve the inhibition of TNF- α and TNFR II activity and enhancement of TNFR I activity in the synovium.

Key words: tumor necrosis factor- α ; tumor necrosis factor receptors; rheumatoid arthritis; ozone

类风湿关节炎(RA)是一种病因不明的自身免疫性疾病,其侵犯的靶器官主要是关节滑膜。主要病理特征为关节滑膜的炎性细胞浸润,滑膜组织增生,血管翳形成,最终侵蚀软骨及软骨下骨,造成关节破坏和畸形。在RA的病理变化中,滑膜细胞的增生起着关键的作用。

在我们的前期研究中,发现臭氧(O₃)可以显著抑制大鼠滑膜炎,减少滑膜细胞的增生^[1],而且O₃可以降低炎性部位TNF- α 的含量和活性^[2-5]。在此基础上,我们尝试采用O₃关节内注射的方法,来治疗Ⅱ型胶原诱导的RA大鼠,评估其治疗效果;并采用ELLISA法测定大鼠血清和关节滑膜液中TNF- α 及其受体TNFR I、TNFR II的活性,观察O₃对其影响,以探讨O₃抑制RA大鼠滑膜炎的机制。

收稿日期:2011-01-03

基金项目:广东省自然科学基金(8151051501000079)

作者简介:余 斌,主任医师,教授,博士生导师,E-mail: yubinol@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康雄性Wistar大鼠48只(南方医科大学动物实验中心提供),鼠龄8~12周,体质量160~180 g。将大鼠适应性喂养1周后,称质量标记,采用随机数字表法将大鼠随机分为正常对照(CON组, $n=6$)、类风湿关节炎组(RA组, $n=6$)、纯氧注射组(O_2 组, $n=6$)和 O_3 治疗组(O_3 组, $n=30$)。 O_3 组根据关节腔注射 O_3 的不同浓度($\mu\text{g/ml}$)分为5个亚组:① O_3 -10组、② O_3 -20组、③ O_3 -30组、④ O_3 -40组、⑤ O_3 -50组,每亚组 $n=6$ 。实验中,各组均分笼饲养,自由摄食,自然光照,并定期清洁、消毒。

1.1.2 试剂 牛Ⅱ型胶原、完全弗氏佐剂(Sigma,美国),大鼠肿瘤坏死因子(TNF- α)定量检测试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子受体相关因子Ⅰ(TNFRⅠ)定量检测试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子受体相关因子Ⅱ(TNFRⅡ)定量检测试剂盒(凯基生物科技发展有限公司,南京)。

1.1.3 仪器 医用臭氧发生器(Hermann,德国),电子游标卡尺,(诺克,深圳),酶标仪(Bio-RAD,美国),磁力搅拌器,(Coleparmer,美国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠RA动物模型的制备 本研究采用注射用弗氏完全佐剂乳化的牛Ⅱ型胶原,于适应性饲养3 d后诱导大鼠RA模型,具体方法如下:取一定量的牛Ⅱ型胶原蛋白溶于0.1 mol/L冰醋酸溶液中,配制质量浓度为2 mg/ml溶液,置4℃冰箱中过夜。冰浴下将含有牛Ⅱ型胶原蛋白的冰醋酸与完全弗氏佐剂等体积混合,用研钵磨至乳白色粘稠液体状,置乳化器中反复抽推,直至完全乳化,胶原浓度为1 mg/ml。将RA组、 O_2 组和 O_3 组大鼠在戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下,用75%酒精消毒,用微量注射器取制备好的牛Ⅱ型胶原蛋白溶液1 ml于大鼠背部脊柱两侧及尾部皮下分点注射,1周后注射0.5 ml加强免疫1次,诱导CIA模型。CON组不作任何特殊处理。

1.2.2 给药 造模成功后, O_2 组大鼠注射纯氧1 ml,1周注射1次,共注射3周; O_3 组的5个亚组根据分组情况分别注射浓度为10、20、30、40、50 $\mu\text{g/ml}$ 的 O_3 1 ml,1周注射1次,共注射3周。CON组和RA组不予以任何治疗。

1.2.3 测量各组大鼠足爪厚度 于治疗前、后,用电子游标卡尺测量小鼠双足后肢足掌厚度,分别测量3次,取平均值。

1.2.4 RA大鼠血清和关节滑膜TNF- α 、TNFRⅠ、TNFⅡ含量的检测 治疗结束后1周,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下,用75%酒精消毒,断尾取血,离心机离心,取上清液,行血清TNF- α 、TNFRⅠ、TNFⅡ的ELISA检测。取血结束后,处死大鼠,沿大鼠膝关节正中纵行切开皮

肤,暴露膝关节,完整剥离滑膜组织,行大鼠滑膜TNF- α 、TNFRⅠ、TNFⅡ含量的检测。

1.3 统计学处理

采用SPSS13.0统计分析软件进行数据分析,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析的方法, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后各组大鼠足爪厚度的变化

实验前各组大鼠之间足爪厚度无显著差异($P>0.05$)。治疗结束后, O_3 -40组大鼠足爪厚度与CON组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。与RA组相比, O_3 -40组大鼠足爪厚度减小,差异有统计学意义($P<0.01$)。与CON组相比,RA组、 O_2 组、 O_3 -10组、 O_3 -20组、 O_3 -30组大鼠足爪厚度增大,差异有统计学意义($P<0.05$)。 O_3 -50组大鼠足爪厚度CON组相比,明显增大,差异有统计学意义($P<0.01$,图1)。

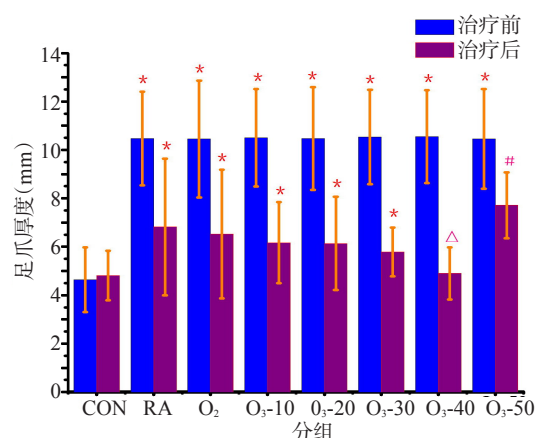


图1 治疗前后各组大鼠足爪厚度的变化

*与CON组比较, $P<0.05$;#与CON组比较, $P<0.01$;□与RA组比较, $P<0.01$

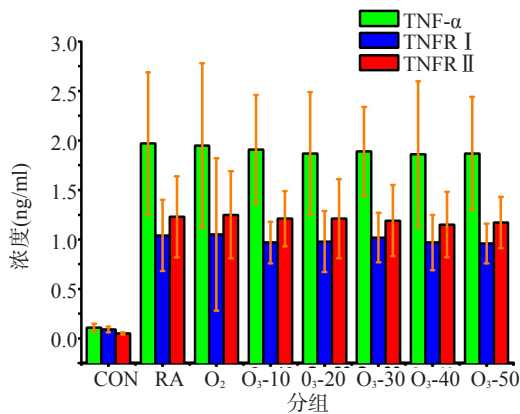
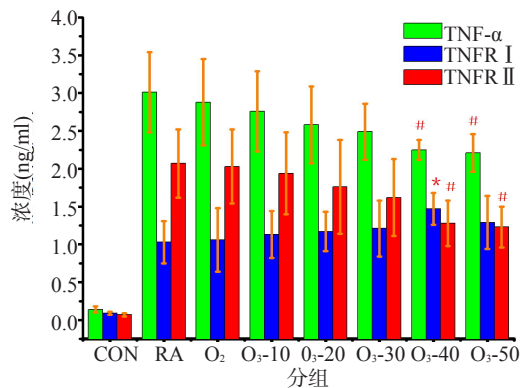
Fig.1 Hind paw thickness before and after treatment.

2.2 各组大鼠血清中TNF- α 、TNFRⅠ、TNFⅡ含量的变化

与CON组相比较,RA组、 O_2 组、及 O_3 治疗各组大鼠血清中TNF- α 、TNFⅡ含量升高,TNFRⅠ含量降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。RA组、 O_2 组、及 O_3 治疗各组血清中TNF- α 、TNFRⅠ、TNFⅡ含量差异无统计学意义($P>0.05$,图2)。

2.3 各组大鼠滑膜中TNF- α 、TNFRⅠ、TNFⅡ含量的变化

与CON组相比较,RA组、 O_2 组、及 O_3 治疗各组大鼠滑膜中TNF- α 、TNFⅡ含量升高,TNFRⅠ含量降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与RA组相比, O_3 -40组、 O_3 -50组大鼠滑膜TNF- α 、TNFⅡ含量降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与RA组相比, O_3 -40组大鼠滑膜TNFRⅠ含量升高,差异有统计学意义($P<0.05$,图3)。

图2 各组大鼠血清中TNF- α 、TNFR I、TNFR II含量Fig.2 Serum contents of TNF- α , TNFR I, and TNFR II in each group.图3 各组大鼠滑膜中TNF- α 、TNFR I、TNFR II含量*与RA组相比 $P<0.05$; #与RA组相比 $P<0.01$ Fig.3 Synovial contents of TNF- α , TNFR I, and TNFR II in each group.

3 讨论

与RA病变有关的细胞因子主要包括:前炎症因子TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8等;免疫调节因子IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-23、IL-27等;生长分化因子FGF、PGF等;集落刺激因子GM-CSF、G-CSF、M-CSF等。其中,TNF- α 作为一个重要的促炎性细胞因子,在RA的发生、发展中扮演了一个关键的角色^[6-7]。

TNF- α 是一种多效性细胞因子,由活化的单核巨噬细胞产生,它可因作用的细胞类型不同,而表现为不同的生物学活性,如细胞的生存、增殖或凋亡。在RA的关节病理变化中,TNF- α 可促进滑膜细胞的增生,加重滑膜炎水平,且浓度在10 ng/ml时,增殖作用达高峰;TNF- α 可增加滑膜及内皮细胞成纤维细胞生长因子的释放而促使血管翳的形成;TNF- α 还可促使滑膜细胞、巨噬细胞、纤维母细胞和软骨细胞产生IL-1、IL-8及TNF- α 本身而加重组织损伤;TNF- α 也能促进人软骨细胞分泌纤维蛋白溶酶激活剂,使纤维蛋白溶酶原变成纤维蛋白溶酶而降解纤维蛋白,加速胶原的分解代谢,造

成RA患者软骨损伤。

有研究显示,50%的RA患者血清和关节液TNF- α 水平升高,且TNF- α 升高的患者血沉快,关节液的细胞数较高。RA病人的血浆中TNF- α 浓度为骨关节炎和正常人的10~20倍,滑液中TNF- α 的浓度约为骨关节炎病人的2倍;通过对RA滑膜的免疫组化分析提示TNF- α 存在于滑膜衬里细胞层,尤其是血管翳与软骨交界处。这些结果说明RA患者暴露在高水平TNF- α 环境下,其关节损伤和TNF- α 介导的损伤相关^[8]。同时,TNF- α 可以诱导大鼠的RA症状,导致多关节的滑膜炎和明显的滑膜组织的增生;过度表达TNF- α 转基因小鼠会发生侵蚀性、炎症性关节炎,并且在用TNF- α 阻滞剂治疗后病情好转,而且在RA的不同动物模型中,用TNF- α 阻滞剂治疗后可以明显减轻炎症与关节破坏,这也从另一方面证明了TNF- α 在RA中所起的重要作用。TNF- α 在RA的发病机制中扮演了一个重要的角色,与RA的滑膜增生、滑膜慢性炎症等多种病理改变密切相关。近年来临床应用TNF- α 抑制剂治疗RA取得的良好疗效进一步证明了TNF- α 介导的损伤在RA病变中的重要作用^[9-13]。

TNF- α 的生物学效应,主要是通过它的两个受体TNFR I (p55)和TNFR II (P75)介导的,TNFR I和TNFR II属于肿瘤坏死因子受体家族(TNFR-F),二者的胞外结构域有28%的同源性,但胞内结构域存在明显不同。TNFR I在几乎在所有的细胞上都有表达,胞内具有死亡结构域,而TNFR II只在免疫系统的细胞及内皮细胞上表达,胞内无死亡结构域^[14]。TNF- α 与TNFR I胞内区的DD与FADD结合并激活FADD,继而活化FLICE,再通过Caspase9和Caspase3次第活化,导致细胞凋亡^[15-17]。TNF- α 与TNFR II胞内相关区域相结合,成复合体激活NF- κ B和JNK激酶,诱导基因转录,促进细胞存活、增殖和分化。这两种相反的信号途径在一定程度上解释了TNFR会产生矛盾的生物学功能的原因^[17-19]。

本研究中,模型组RA大鼠的血清和关节滑膜TNF- α 、TNFR II较CON明显升高,TNFR I活性明显降低,这说明TNF- α 及其受体TNFR I、TNFR II介导的损伤参与了CIA大鼠的全身和关节局部的病理变化,同时也在一定程度上解释了RA大鼠滑膜增生的原因。这些与文献报道相一致^[20],也进一步说明本研究模型的可靠性。

O₃治疗各组中,O₃-40组大鼠肿胀程度最低,提示在治疗RA时的最佳O₃浓度为40 μ g/ml。O₃-50组大鼠肿胀度较O₃-40组升高,可能是由于50 μ g/ml O₃关节内注射浓度过高,直接导致组织损伤所致,提示浓度50 μ g/ml的O₃不适宜于采用关节内注射的方式治疗RA。与RA组相比较,O₃治疗组RA大鼠关节滑膜TNF- α 、TNFR II浓度有不同程度的降低而TNFR I含量升高,

说明O₃可以减轻RA大鼠关节滑膜内TNF- α 介导的损伤,可能的机制为下调RA大鼠滑膜的TNF- α 、TNFR II的活性,而增加TNFR I的活性,从而达到抑制滑膜细胞增生,增加滑膜细胞的凋亡作用。

除O₃-50组外,其余O₃治疗各组大鼠关节肿胀程度与TNF- α 、TNFR II含量正相关,与TNFR I含量负相关,进一步验证了这种治疗机制的可靠性。O₃-50组大鼠TNF- α 、TNFR II、TNFR I含量均降低,但关节肿胀度高,可能与其直接导致关节滑膜细胞的死亡,导致TNF- α 及其受体分泌的减少,但由于强烈刺激关节周围组织,引起关节肿胀程度加重。与RA组大鼠相比较,O₃治疗各组RA大鼠血清TNF- α 、TNFR I及TNFR II浓度无明显变化,说明小剂量O₃关节内注射,无全身治疗作用。

综上所述,关节内注射浓度为40 $\mu\text{g/ml}$ 的O₃治疗RA大鼠可以取得最佳疗效,O₃治疗RA大鼠滑膜炎的可能机理为:O₃可以降低滑膜内TNF- α 、TNFR II的活性,上调TNFR I的表达,从而抑制滑膜细胞的增生,增加滑膜细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] 余斌,朱权,胡岩君,等.关节内注射医用臭氧对大鼠膝退行性关节炎的影响[J].中国矫形外科杂志,2008,16(11): 852-5.
- [2] 余斌,黄华军,林庆荣,等.臭氧水对感染性创面内源性细胞因子含量的影响[J].实用医学杂志,2010,26(10): 1719-22.
- [3] Cho HY, Morgan DL, Bauer AK, et al. Signal transduction pathways of tumor necrosis factor--mediated lung injury induced by ozone in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(8): 829-39.
- [4] Fakhrzadeh L, Laskin JD, Laskin DL. Ozone-induced production of nitric oxide and TNF-alpha and tissue injury are dependent on NF-kappaB p50[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(2): 279-85.
- [5] Matsubara S, Takeda K, Jin N, et al. Vgamma1+ T cells and tumor necrosis factor-alpha in ozone-induced airway hyperresponsiveness[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 40(4): 454-63.
- [6] Kastelein R, Hunter C, Discovery DC, et al. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation[J]. Immunology, 2007, 25: 221-9.
- [7] Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells[J]. Nat Immunol, 2007, 8(9): 950-7.
- [8] Stanczyk J, Brentano F, Pedrioli DM, et al. Altered expression of microrna in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4): 1001-9.
- [9] Potter C, Bowes JD, Gibbons LJ, et al. Investigation of genetic variants within candidate genes of the tnfrsf1B signalling pathway on the response to anti-TNF agents in a UK cohort of rheumatoid arthritis patients[J]. Pharmacogenet Genomics, 2009, 19(4): 319-23.
- [10] Emery P, Keystone E, Tony HP, et al. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(11): 1516-23.
- [11] Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics[J]. Immunol Rev, 2008, 223: 7-19.
- [12] Tureson C, Jacobsson LT, Nilsson JA, et al. Treatment with TNF blockers and mortality risk in patients with rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(5): 670-5.
- [13] Taylor PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases[J]. Curr Opin Pharmacol, 2010, 10(3): 308-15.
- [14] Dey S, Snow DM. Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons through TNF-alpha-mediated induction of Bax and phosphorylated c-Jun NH(2)-terminal kinase [J]. J Neurochem, 2007, 103(2): 542-56.
- [15] Jain N, Swarup G, Sudhakar C. Tumor necrosis factor-alpha-induced caspase-1 gene expression. role of p73[J]. FEBS J, 2007, 274(17): 4396-407.
- [16] Wang L, Du FH, Wang XD. TNF-[alpha]induces two distinct caspase-8 activation pathways[J]. Cell, 2008, 133(4): 693-703.
- [17] Chlebna DS, Andrzejewska E, Sikora JP, et al. Clinical evaluation of proinflammatory cytokine inhibitors(stnfr I, stnfr II, IL-1 ra), Anti-inflammatory cytokines(IL-10,IL-13)and activation of neutrophils after burn-induced inflammation[J]. Scand J Immunol, 2008, 68(2): 145-52.
- [18] Gupta S, Oliveira JB. Disorders of apoptosis: mechanisms for autoimmunity in primary immunodeficiency diseases [J]. J Clin Immunol, 2008, 28 (Suppl 1): 20-8.
- [19] Pistilli EE, Jackson JR, Alway SE. Death receptor-associated proapoptotic signaling in aged skeletal muscle[J]. Apoptosis, 2006, 11(12): 2115-26.
- [20] Mendes MT, Murari SN, Torriago IR, et al. Basic aminopeptidase activity is an emerging biomarker in collagen-induced rheumatoid arthritis[J]. Regul Pept, 2011, 167(2-3): 215-21.

(编辑:陈望忠)