

丁子桐,熊海霞,高琴琴,等. 胶原诱导性关节炎/证模型大鼠血清细胞因子表达谱的初步研究[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 28 - 33.

Ding ZT, Xiong HX, Gao QQ, et al. Preliminary study on serum cytokine expression profiles in rats with collagen-induced arthritis, cold-damp arthralgia, or damp-heat arthralgia [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 28 - 33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.005

胶原诱导性关节炎病/证模型大鼠血清细胞因子表达谱的初步研究

丁子桐^{1#},熊海霞^{1#},高琴琴¹,靖卫霞²,袁芳²,侯秀娟²,朱跃兰²,孙文燕^{1*}

(1.北京中医药大学中药学院,北京 102488; 2.北京中医药大学东方医院,北京 100078)

【摘要】 目的 研究胶原诱导性类风湿关节炎、寒湿痹和湿热痹病/证模型大鼠血清细胞因子的表达。方法 采用牛Ⅱ型胶原与弗氏完全佐剂复制类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)模型,在此基础上复加寒湿、湿热刺激建立寒湿痹及湿热痹病证结合模型,用微阵列抗体芯片检测血清细胞因子的表达。结果 与正常组比较,RA组activin A、CNTF、IFN- γ 、TNF- α 上调,MIP-3 α 、MMP-8下调;寒湿痹组CINC-2 α 、GM-CSF、IFN- γ 上调,MIP-3 α 下调;湿热痹组ICAM-1上调,IFN- γ 、MIP-3 α 、RAGE下调。与RA组比较,寒湿痹组 β -NGF、CINC-2 α 、MMP-8、PDGF-AA上调,activin、TNF- α 下调;湿热痹组MMP-8上调,activin、CNTF、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-6、MIP-3 α 、RAGE、TNF- α 下调。寒湿痹组较与RA热痹湿热痹组比较,CINC-2 α 、IFN- γ 、IL-1 α 、MIP-3 α 、PDGF-AA、RAGE均上调。与正常组比较,RA组及寒湿痹组IFN- γ /IL-4比值升高,湿热痹组比值明显降低;与RA组比较,寒湿痹组比值升高,湿热痹组比值明显下降。结论 病/证因素对大鼠血清细胞因子表达谱有明显影响,且各模型间存在明显差异。

【关键词】 类风湿关节炎;病证结合动物模型;寒湿痹;湿热痹;微阵列抗体芯片;细胞因子;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)04-0028-06

Preliminary study on serum cytokine expression profiles in rats with collagen-induced arthritis, cold-damp arthralgia or damp-heat arthralgia

DING Zitong^{1#}, XIONG Haixia^{1#}, GAO Qinqin¹, JING Weixia², YUAN Fang², HOU Xiujuan², ZHU Yuelan², SUN Wenyan^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China.

2. Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078)

【Abstract】 Objective To determine the serum cytokine levels in collagen-induced rheumatoid arthritis (RA) rats, cold-damp arthralgia rats, and damp-heat arthralgia rats by using antibody arrays. **Methods** A rheumatoid arthritis model was established by intracutaneous injection of type II collagen and complete Freund's adjuvant (CFA). On this basis, cold-damp or damp-heat stimulation was applied to the RA rats in order to replicate cold-damp arthralgia or damp-heat damp-heat arthralgia. Serum cytokine levels in the rats were determined using antibody arrays. **Results** Compared with the normal group, the activin, CNTF, IFN- γ , and TNF- α levels were upregulated, while MIP-3 α and MMP-8 were downregulated in the RA group. The CINC-2 α , GM-CSF, and IFN- γ levels were upregulated and MIP-3 α was downregulated in the cold-damp arthralgia group. ICAM-1 was upregulated, while IFN- γ , MIP-3 α , and RAGE were

【基金项目】 科学技术部国家重点基础研究发展计划(973计划)课题(2009CB522803)。

【作者简介】 丁子桐(1994—),女,硕士研究生,研究方向:中药抗炎与免疫药理,E-mail: 1881082156@163.com。

熊海霞(1990—),女,硕士,研究方向:中药抗炎与免疫药理,E-mail: hx0841@163.com。#共同第一作者

【通信作者】 孙文燕(1970—),男,副教授,博士,研究方向:中药抗炎与免疫药理,E-mail: sunwy@bucm.edu.cn

downregulated in the damp-heat arthralgia group. Compared with those in the RA group, β -NGF, CINC-2 α , MMP-8, and PDGF-AA were upregulated, while activin A and TNF- α were downregulated in the cold-damp arthralgia group. MMP-8 was upregulated, and activin A, CNTF, IFN- γ , IL-1 α , IL-6, MIP-3 α , RAGE, and TNF- α were downregulated in the damp-heat arthralgia group. Compared with the damp-heat arthralgia group, CINC-2 α , IFN- γ , IL-1 α , MIP-3 α , PDGF-AA, and RAGE were upregulated in the cold-damp arthralgia group. Compared with that in the normal group, the ratio of IFN- γ /IL-4 was increased in the RA group and cold-damp arthralgia group, but was decreased significantly in the damp-heat arthralgia group. Compared with that in the RA group, the ratio increased in the cold-damp arthralgia group, and decreased significantly in the damp-heat arthralgia group. **Conclusions** Diseases (RA) and syndromes (cold-damp or damp-heat) have a significant influence on serum cytokine expression profiles in rats, and there are clear differences among different models.

[Keywords] rheumatoid arthritis; animal model of combination of diseases and syndromes; cold-damp arthralgia; damp-heat arthralgia; microarray antibody chip; cytokine; rat

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫性疾病,常表现为持久反复的关节滑膜炎,导致软骨及骨质破坏,最终造成关节畸形和功能障碍^[1]。该病在世界范围普遍存在,严重危害人们的健康,而女性的发病率约为男性的 2.5 倍。RA 的病因及发病机制尚未完全明确,目前尚无根治药物。大量研究证实,RA 是一种主要由细胞因子参与介导的慢性炎症性疾病。以炎症细胞因子为靶标的生物治疗方法已成为 RA 研究中的热点。RA 属中医“痹证”范畴。痹证病因多为风、寒、湿、热之邪外袭,以致诸邪夹杂痹阻为患^[2],寒湿痹、湿热痹是其主要证候类型。抗体芯片技术是通过阵列上的抗体识别样品中的蛋白和其他分子,可以在微小样品中筛查多项指标,具有高度特异性及多样本平行性检测等优势,在疾病诊断和个性化医疗方面已成为可靠的研究手段^[3]。本研究应用微阵列抗体芯片检测 RA 大鼠、寒湿痹大鼠及湿热痹大鼠血清相关炎症细胞因子,分析其细胞因子表达谱的差异。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,体重 160~180 g,左右,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK(京)2012-0001]。动物饲养于北京中医药大学屏障环境内 [SYXK(京)2016-0038],温度 21℃~23℃,湿度 60%~70%。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

牛 II 型胶原,美国 Chondrex 公司,批号 130435;弗氏完全佐剂 (CFA),美国 Sigma 公司,批号 SLBD8147 V;大鼠 RayBio AAR-CYT-G2 炎症因子抗

体芯片,美国 RayBiotech 公司。

SHH-500ZSD 动物实验箱,重庆市永生实验仪器厂;S10 手提式高速分散器,宁波新芝生物科技股份有限公司;Labofuge 400R 低温离心机,德国 Heraeus 公司;电子分析天平,美国 Ohaus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 RA 病/证模型的复制

动物随机分为 4 组,即正常组、RA 组、寒湿痹组、湿热痹组,每组 15 只。将牛 II 型胶原 (type II collagen, C II) 与等体积的弗氏完全佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 充分乳化,制成含 C II 1 mg/mL 的乳剂。除正常组外,各组大鼠在无菌条件下,每只左后足底皮内注射 100 μ L 乳剂,7 d 后以同种乳剂尾根部 100 μ L 再次免疫,正常组注射生理盐水。

首次免疫第二天,将寒湿痹组和湿热痹组大鼠置于动物实验箱中。其中寒湿痹组设定温度 5℃,湿度 95%,模拟寒湿外邪;湿热痹组设定温度 35℃,湿度 80%,模拟湿热外邪。两组均每天刺激 4~6 h,连续 42 d。

首次免疫后 16 d,除正常组外,各组大鼠进行关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分:0 分,正常;1 分,踝关节出现红斑和轻微肿胀;2 分,踝关节到跖关节或掌关节出现红斑和轻微肿胀;3 分,踝关节到跖趾关节或掌关节出现红斑和中度肿胀;4 分,踝关节到趾关节出现红斑和重度肿胀^[4]。每鼠最大评分 16 分,大于 4 分者为模型复制成功。RA 组造模成功率约 80%,寒湿痹组约 73%,湿热痹组约 67%。各组造模成功率及 AI 评分均未见统计学差异。

1.3.2 微阵列抗体芯片检测血清细胞因子表达谱

正常组大鼠及造模后大鼠于首次免疫后第 44 天,禁食不禁水 12 h,腹主动脉采血,3500 r/min 离

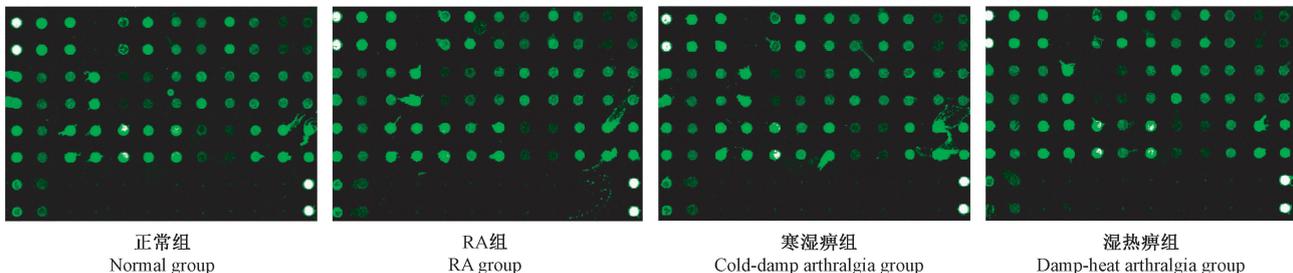


图 1 各组抗体芯片扫描结果

Figure 1 Results of antibody chip scanning of each group

2.2.2 RA 病/证大鼠各组间比较

由表 3 可见,与 RA 组比较,寒湿痹组 β -NGF、CINC-2 α 、MMP-8、PDGF-AA 上调,Activin A、TNF- α 下调;湿热痹组 MMP-8 上调,Activin A、CNTF、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-6、MIP-3 α 、RAGE、TNF- α 下调。寒湿痹组与湿热痹组比较,CINC-2 α 、IFN- γ 、IL-1 α 、MIP-3 α 、PDGF-AA、RAGE 蛋白均上调,无明显下调蛋白。

2.3 RA 病/证大鼠血清 IFN- γ /IL-4 比值变化

与正常组相比,RA 组及寒湿痹组的 IFN- γ /IL-4 比值升高,湿热痹组比值明显降低;与 RA 组比较,寒湿痹组比值升高,湿热痹组比值明显下降。见图 2。

表 2 RA 病/证大鼠与正常组大鼠的差异表达蛋白

Table 2 Differentially expressed proteins between the RA model rats of combinations of diseases and syndromes and normal group rats

细胞因子 Cytokine	RA/正常 RA/Normal	寒湿痹/正常 Cold-damp arthralgia/ Normal	湿热痹/正常 Damp-heat arthralgia/ Normal
Activin A	2.396	1.347	1.207
β -NGF	0.839	1.341	0.997
CINC-2 α	1.108	1.737	0.971
CNTF	1.680	1.463	1.054
GM-CSF	1.436	1.576	1.080
IFN- γ	1.531	1.614	0.515
IL-1 α	1.484	1.430	0.734
ICAM-1	1.458	1.458	1.545
IL-6	1.274	1.134	0.763
MIP-3 α	0.458	0.459	0.282
MMP-8	0.491	0.809	0.967
PDGF-AA	0.820	1.250	0.828
RAGE	1.032	1.243	0.644
TNF- α	1.544	0.937	0.747

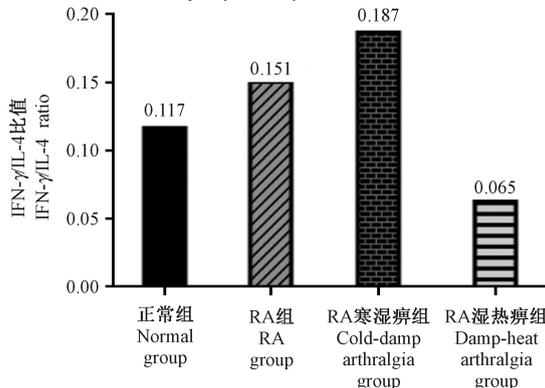
注: Fold change 阈值大于 1.5, 小于 0.66 者为差异表达蛋白。
Note. Fold change of greater than 1.5 or less than 0.66 represents a differentially expressed protein.

表 3 RA 病/证组间差异表达蛋白

Table 3 Differentially expressed proteins between the RA models of combination of diseases and syndromes

细胞因子 Cytokine	寒湿痹/RA Cold-damp arthralgia /RA	湿热痹/RA Damp-heat arthralgia /RA	寒湿痹/湿热痹 Cold-damp arthralgia/ Damp-heat arthralgia
Activin A	0.562	0.504	1.117
β -NGF	1.599	1.189	1.345
CINC-2 α	1.567	0.876	1.788
CNTF	0.871	0.627	1.388
GM-CSF	1.097	0.752	1.459
IFN- γ	1.054	0.337	3.132
IL-1 α	0.964	0.495	1.949
ICAM-1	1.000	1.060	0.944
IL-6	0.890	0.599	1.485
MIP-3 α	1.003	0.615	1.629
MMP-8	1.648	1.970	0.837
PDGF-AA	1.525	1.011	1.509
RAGE	1.205	0.624	1.931
TNF- α	0.607	0.484	1.254

注: Fold change 阈值大于 1.5 和小于 0.66 者为差异表达蛋白。
Note. The fold change threshold greater than 1.5 or less than 0.66 is considered as differentially expressed protein.



注: 各组 IFN- γ /IL-4 比值为标准化后灰度值的比值。

图 2 RA 病/证大鼠 IFN- γ /IL-4 比值的变化

Note. The ratio of IFN- γ /IL-4 of each group is the ratio of the normalized gray value.

Figure 2 Changes in the IFN- γ /IL-4 ratios of the rats in each group

3 讨论

抗体芯片是蛋白质芯片的一种,其技术原理是有序的将各种抗体固定在滤膜、载玻片等载体上,利用抗原-抗体特异性结合反应来捕捉样本中待检测的抗原,然后用标记的有特定荧光物质的抗体与芯片上对应的蛋白质结合,抗体上的荧光将指示对应蛋白质的表达情况。该技术利用少量样本可筛选多项指标,具有高灵敏性、高特异性、高通量性的优点,临床上在疾病诊断、发现疾病标志物和评价治疗效果等多方面有着广泛的应用。

Ⅱ型胶原诱导性关节炎(CIA)和佐剂性关节炎(AA)是目前最常用的类风湿关节炎动物模型。CIA建立较早,也较为成熟,且与人类RA有很多的相似性,是目前比较公认的研究RA的理想模型^[5]。单纯的CIA模型证候特征不明确,难以模拟“风寒湿三气杂至,合而为痹”的证候特点,而单纯的风寒湿和风湿热环境因素并不能引起RA的病理学改变。然而,CIA动物模型在某些证候干预因素作用下,具备证候的潜质,随复加于CIA大鼠干预措施的不同,可将单纯CIA模型转化为肾虚、风寒湿、风湿热等多种证候^[6]。因此本实验采用牛Ⅱ型胶原与弗氏完全佐剂皮内注射复制大鼠类风湿关节炎模型,在RA模型基础上采用条件可控的动物实验箱模拟寒湿、湿热环境因素,建立寒湿痹、湿热痹病证结合模型。

目前,有关(风)寒湿痹、(风)湿热痹病证模型的特异性评价指标尚处于探索阶段,缺乏公认的评价标准。有研究发现,单纯Ⅱ型胶原注射或Ⅱ型胶原加风寒湿环境刺激大鼠血清LDH含量较正常组大鼠明显升高,而Ⅱ型胶原加风湿热组低于正常组和Ⅱ型胶原加风寒湿组;Ⅱ型胶原注射加风寒湿环境刺激组血清IgG含量高于正常组,而单纯Ⅱ型胶原注射或Ⅱ型胶原加风湿热组与正常组无明显差异^[7]。CFA复加风寒湿刺激大鼠踝关节PGE₂含量明显高于正常组大鼠^[8],CFA及环瓜氨酸多肽(CCP)足跖注射复加寒湿、湿热环境大鼠血清类风湿因子(RF)、anti-CCP滴度明显高于单纯CFA及CCP足跖注射大鼠,但湿热与寒湿之间比较无统计学差异;单纯造模或造模复加寒湿或湿热环境均能使大鼠血清抗角蛋白抗体(AKA)、抗核周因子(APF)阳性率高于正常对照组,其中造模加湿热环境的阳性率最高,造模加寒湿环境次之,但与单纯

造模无显著性差异^[9]。细胞因子是引起类风湿关节炎炎症及关节损伤的重要介质,故本研究从细胞因子表达谱着手,观察寒湿痹、湿热痹及单纯RA大鼠相关细胞因子表达的情况,对上述模型的特征进行初步探索。结果显示,RA病/证各组大鼠均出现了血清细胞因子表达谱紊乱状态。与正常组比较,RA组及寒湿痹组多数细胞因子上调,如促炎因子IL-6、IFN- γ 及GM-CSF等;湿热痹组ICAM-1上调,IFN- γ 、MIP-3 α 、RAGE下调。GM-CSF可刺激活化巨噬细胞分泌多种促炎性细胞因子如IL-6、TNF- α 等,能促进炎症的发展,加速细胞外基质降解和细胞凋亡,并调节Th1型免疫应答。CINC及MIP-3 α 为趋化因子,是可诱导的、分泌型的前炎症细胞因子^[10],其中CINC与人IL-8有着类似的功能,介导细胞在炎症部位聚集、活化以及组织损伤;但RA病/证模型与正常组相比,MIP-3 α 蛋白表达均下调,与文献存在不一致性,有待进一步研究。CNTF能够微弱抑制外周单核细胞产生IL-8和前列素E₂,可在急性炎症反应中诱导肝细胞表达急性期反应蛋白;ICAM-1对炎症反应的发生起到一定作用,二者皆可反映炎症情况。与RA组比较,寒湿刺激后 β -NGF表达上调。有研究表明 β -NGF被认为是疼痛发生过程中的重要因子,在创伤和炎症部位其表达增加,提示寒湿刺激可增强RA模型的炎症反应^[11]。MMP-8是Ⅱ型胶原降解的关键酶^[12],其在生理状态下分泌很少,当受到炎症因子刺激后会大量产生,最终导致炎症反应。本研究显示,在RA基础上复加寒湿及湿热刺激均可增强该酶的活性。Activin A可活化炎症细胞释放促炎性因子,还可抑制M2型巨噬细胞分泌促炎因子PDGF^[13]。本研究也发现RA复加寒湿模型中activin A和PDGF表达呈负相关。RAGE作为调控炎症因子重要信号通路HMGB1/NF- κ B的关键蛋白^[14],在湿热刺激下表达下调,具体环节还需进一步探究。

类风湿关节炎的病因和发病机制尚未完全明确,但T细胞功能紊乱,尤其是辅助性CD4⁺T细胞异常活化,是RA发病过程中的重要机制^[15]。在不同的特异性转录因子调控下,辅助性T细胞(Th)分化为不同的细胞亚群,Th1/Th2两种细胞亚群之间存在动态平衡及交互抑制,这种动态平衡一旦被打破,机体则处于Th1占优势或Th2占优势的Th1/Th2失衡状态,并由此而发病。许多研究表明,RA属Th1型疾病,Th1/Th2细胞失衡与RA发病机制

密切相关。Th1 分泌白介素-2 (IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 等细胞因子。IFN- γ 是 Th1 细胞的特征性细胞因子,具有双向的免疫调节作用,它既是单核巨噬细胞主要活化因子,间接发挥促炎作用,又可抑制滑膜成纤维细胞合成基质金属蛋白酶等减少软骨基质降解发挥保护作用^[16]。Th2 则分泌白介素-4 (IL-4)、IL-6 等细胞因子,其中 IL-4 是 Th2 细胞分泌的特征抗炎症性细胞因子,它有抑制 Th1 合成炎症性细胞因子等功能。因此,通常用 IFN- γ /IL-4 的比值来代表 Th1 和 Th2 的比例。本研究中 RA 组及寒湿痹组促炎因子 IFN- γ 的表达上调,但湿热痹组表达下调;RA 病/证模型组与正常组相比 IFN- γ /IL-4 比值均出现明显变化,RA 组、寒湿痹组大鼠 IFN- γ /IL-4 比值明显升高,湿热痹组大鼠该比值则明显降低。有研究证实, Th1/Th2 细胞及细胞因子在类风湿关节炎不同的发展阶段呈现不同的变化规律,在发病早期阶段 Th1 细胞高于正常水平, Th2 细胞随着 Th1 细胞的升高而升高,随着病程发展 Th1 细胞逐渐下降, Th2 细胞反而升高从而抑制病情的发展^[17]。本研究初步提示 CIA 大鼠寒湿刺激 6 周后 Th1/Th2 失衡加剧,湿热刺激 6 周则可逆转此失衡并向 Th2 型转变。导致该变化的确切机制以及造模不同阶段 Th1/Th2 变化规律尚需探究。

综上,本研究应用微阵列抗体芯片技术检测了胶原诱导性关节炎病/证模型大鼠血清细胞因子表达谱的变化,结果提示病/证因素可影响相关细胞因子的表达,可为深入探讨 RA 病/证特点及干预靶标提供一定参考,而细胞因子表达谱的动态变化规律尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 薛崇祥,韩蕊,何世勇,等. 从中西医结合角度建立类风湿关节炎的细胞和动物模型[J]. 中国中医药现代远程教育,

2018,16(9):152-155.

- [2] 邵淑侠. 痹证治验[J]. 中西医结合与祖国医学,2006,10(12):1099.
- [3] 张爱英,尹成增,赵元顺,等. 蛋白芯片研究进展[J]. 中国医学装备,2014,11(8):150-151.
- [4] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学(第4版)[M]. 北京:人民卫生出版社. 2010,755.
- [5] 于坤,徐枝芳,余楠楠,等. 佐剂性和胶原诱导性关节炎模型比较分析[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(1):106-109.
- [6] 吕爱平,吴萍,鞠大宏,等. 用胶原诱导性关节炎探讨中药治疗类风湿关节炎的方法学研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(6):505-508.
- [7] 罗奎元,强宇靖,刘飞,等. 类风湿性关节炎病证结合大鼠模型的建立及血清免疫球蛋白 G、乳酸脱氢酶水平变化的研究[J]. 甘肃中医药大学学报,2016,33(1):1-5.
- [8] 金祝秋,郭建生,彭芝配,等. 大鼠风寒湿痹证模型的建立与前列腺素 E₂ 的关系[J]. 湖南中医学院学报,1996,16(1):40-42.
- [9] 申洪波,白云静,胡荫奇. 环境因素对痹证大鼠自身抗体表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(9):832-834.
- [10] 王芳,谈文峰,宋蕾. 蛋白质微阵列对胶原诱导性关节炎大鼠血清细胞因子表达谱的初步研究[J]. 中华风湿病学杂志,2006,10(9):538-541.
- [11] 尚修帅,金文杰,陶海荣. 雌激素与神经生长因子在骨关节炎疼痛中的作用机制[J]. 国际骨科学杂志,2017,38(1):38-41.
- [12] 刘珊. MMP-8、CRP、ESR 在慢性牙周炎和类风湿关节炎之间相关性的研究[D]. 天津:天津医科大学,2016.
- [13] 李雪,马清. 巨噬细胞极化在类风湿关节炎中的作用[J]. 生命科学,2018,30(3):261-266.
- [14] 陈文革,杨召回,黄高. 类风湿关节炎滑膜组织 RAGE 的表达及意义[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(9):1256-1258.
- [15] 王建,姜萍. Th 细胞在类风湿关节炎发病作用的研究进展[J]. 临床与病理杂志,2015,35(2):263-266.
- [16] 郭明. 胶原蛋白诱导性关节炎小鼠 Th1/Th2 细胞及其细胞因子的动态研究[D]. 承德:承德医学院,2014.
- [17] 张娜. 黄芪糖蛋白干预胶原诱导性关节炎小鼠 T 细胞免疫应答的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2016.

[收稿日期]2018-09-14