

吴玉娥,曾业文,罗挺,等. 骨髓间充质干细胞对类风湿关节炎小鼠干预效果研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 27-34.

Wu YE, Zeng YW, Luo T, et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 27-34.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.004

骨髓间充质干细胞对类风湿关节炎小鼠 干预效果研究

吴玉娥,曾业文,罗挺,凌雪荧,梁十,李航,贾欢欢*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 目的 利用自发类风湿关节炎小鼠模型(Tg-huTNF α 小鼠),探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)对类风湿关节炎及其继发骨量丢失的影响。**方法** 3周龄Tg-huTNF α 小鼠分为3组:(1)模型组(Model),每周腹腔注射1次0.1 mL/10 g的生理盐水;(2)huTNF α 抗体干预组(Anti-huTNF α),每周腹腔注射1次10 mg/kg的huTNF α 抗体;(3)BMSCs干预组(BMSCs),每周双侧膝关节腔各注射1次 5×10^6 Cells的BMSCs。干预期间每周称量1次动物体重,同时对踝关节进行临床评分,各组动物干预10周后处死取材。利用流式细胞仪分析外周血T细胞、B细胞、CD4⁺/CD8⁺T细胞比例,液相芯片法检测血清中huTNF α 、IL-4及IL-1 β 含量,HE染色后评价左侧膝关节和踝关节病理改变,骨形态计量学方法分析右侧股骨骨结构变化。**结果** 与模型组比较,BMSCs和Anti-huTNF α 干预均可缓解Tg-huTNF α 小鼠体重的下降,抑制小鼠关节肿大变形,下调外周血huTNF α 含量,降低Tg-huTNF α 小鼠的关节病理评分,减少关节滑膜和软骨损伤面积。此外,骨形态计量学分析发现,BMSCs干预可提高骨小梁数量和骨小梁面积百分数等,改善Tg-huTNF α 小鼠股骨骨结构。**结论** 关节腔注射BMSCs可以显著缓解Tg-huTNF α 小鼠类风湿关节炎症状,改善股骨骨结构,缓解RA继发的骨量丢失。

【关键词】 类风湿关节炎;骨髓间充质干细胞;Tg-huTNF α 小鼠;骨量丢失

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0027-08

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice

WU Yue, ZENG Yewen, LUO Ting, LING Xueying, LIANG Shi, LI Hang, JIA Huanhuan*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of
Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Corresponding author: JIA Huanhuan. E-mail:245089270@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on rheumatoid arthritis and secondary bone loss in a spontaneous rheumatoid arthritis mouse model (Tg-huTNF α mice). **Methods** 3-week-old Tg-huTNF α mice were divided into three groups: (1) Model group: 0.1 mL/10 g normal saline was intraperitoneally injected once a week; (2) huTNF α antibody intervention group (Anti-huTNF α): 10 mg/kg Anti-huTNF α

【基金项目】广东省平台基地及科技基础条件建设项目(2021B1212060002),广东省科技计划项目(2016A030303022)。

Funded by the Guangdong Provincial Platform Base and Science and Technology Infrastructure Construction Project (2021B1212060002), the Planned Science and Technology Project of Guangdong Province (2016A030303022).

【作者简介】吴玉娥(1978—),女,副主任药师,研究方向:疾病动物模型构建,药物非临床评价。Email:38936933@qq.com

【通信作者】贾欢欢(1984—),男,副研究员,研究方向:疾病动物模型构建,药物非临床评价。Email:245089270@qq.com

was intraperitoneally injected once a week; (3) BMSC intervention group (BMSCs): 5×10^6 BMSCs were injected into both knee joint cavities once a week. During the intervention period, the animals were weighed once a week, and ankle joint health was scored clinically. The animals were killed after 10 weeks of intervention. The percentages of T cells, B cells and $CD4^+/CD8^+$ T cells in the peripheral blood were analyzed by flow cytometry. The amounts of huTNF α , IL-4 and IL-1 β in peripheral blood serum were detected by liquid chip technique. Pathological changes to the left knee joint and ankle joint were evaluated by HE staining, and the right femur bone structure was analyzed by bone histomorphometry.

Results BMSCs and Anti-huTNF α provided relief from weight loss in Tg-huTNF α mice; inhibited joint swelling and deformation; and reduced the peripheral blood huTNF α content, joint pathology score, and extent of joint synovium and cartilage damage. Additionally, BMSCs improved the trabecular bone number and percentage trabecular bone area to different degrees and improved the femur bone structure in Tg-huTNF α mice. **Conclusions** Injection of BMSCs into the joint cavity significantly alleviated symptoms of rheumatoid arthritis in Tg-huTNF α mice, improved femur bone structure, and alleviated bone loss secondary to RA.

[Keywords] rheumatoid arthritis; bone marrow mesenchymal stem cells; Tg-huTNF α mice; bone loss

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病因未明的慢性自身免疫性疾病, 以炎性滑膜炎为主。RA 多发于对称性的手足小关节, 表现为关节的红肿和疼痛, 严重者可致关节畸形和功能丧失^[1-3]。根据世界卫生组织统计, 全球 RA 发病率为 0.5% ~ 1%, 患病 15 年的残疾率为 61.3%^[4]。RA 不仅严重影响患者的生活质量, 也给患者家庭和社会带来了巨大的经济负担。传统的 RA 治疗药物包括非甾体抗炎药、抗风湿药及糖皮质激素等, 长期使用会引起严重的胃肠道副作用、肾损伤及骨质疏松等^[5]。随着生物技术和 RA 发病机制的不断提出, 多种细胞因子阻断剂已被报道或应用于临床, 如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 拮抗剂 (阿达木单抗、英夫利昔单抗、依那西普)、IL-1 拮抗剂 (阿那白滞素) 和 IL-6 拮抗剂等。这些药物的出现使许多难治性 RA 患者受益, 然而这些药物价格昂贵, 停药后容易复发, 且有约 30% 的患者对这类药物无效^[6-7]。近年来, 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 基于其强大的免疫调节和抗炎作用, 可通过细胞相互作用和分泌多种因子来调节局部环境, 修复受损组织, 这些特征使 BMSCs 成为治疗 RA 的理想工具^[8-9]。

目前研究认为 TNF α 在 RA 的发病过程中起着关键作用, 其作为一种主要的免疫调节因子和前炎性因子, 广泛存在于 RA 患者的血清和关节滑膜中, 可刺激纤维母细胞增殖, 激活淋巴细胞活性, 诱导 IL-1 β 、趋化因子和金属蛋白酶的释放, 这些直接导致了关节炎病理症状的发生^[10-11]。此外, TNF α 可通过诱导骨髓基质细胞产生核因子 κ B 受体活化因

子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-stimulating factor, M-CSF) 和 IL-6 等, 这些因子在促进破骨细胞形成和活化的同时, 也抑制了破骨细胞的凋亡, 使机体骨吸收大于骨形成, 破坏了骨组织的偶联平衡, 最终导致 RA 患者关节局部和全身性骨量的丢失^[12-14]。目前对 RA 治疗的研究, 主要集中在对炎症的抑制以及对关节软骨和骨侵蚀的修复, 较少关注对 RA 继发骨量丢失的影响。

课题组前期成功构建了国内首个高表达人 TNF α 的转基因小鼠模型 (Tg-huTNF α 小鼠, FVB 背景), 该模型可稳定地表现出典型的 RA 临床症状和病理特征, 如踝关节、脚趾关节及指关节对称性肿大和畸形, 关节滑膜增生, 炎性细胞浸润, 血管翳, 关节软骨及软骨下骨的侵蚀等^[15]。本文拟利用 Tg-huTNF α 小鼠模型, 探讨 BMSCs 对 RA 的治疗效果, 同时考察其对 RA 继发骨量丢失的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 3 周龄雌性 Tg-huTNF α 小鼠 20 只, 体重 (11.0 ± 0.9) g, SPF 级 6 ~ 8 周龄 FVB 小鼠 30 只 (作为 BMSCs 供体, Tg-huTNF α 小鼠的背景鼠), 体重 (22.7 ± 2.4) g, 均由广东省实验动物监测所【SCXK(粤)2018-0044】提供, 动物饲养于广东省实验动物监测所屏障环境动物房【SYXK(粤)2021-0122】。饲养期间各组小鼠自由饮食饮水, 12 h/12 h 明暗交替, 相对湿度 40% ~ 70%, 温度 22 ~ 26℃。所有操作均符合广东省实验动物监测所

IACUC 伦理委员会要求 (IACUC 2017020)。

1.1.2 主要试剂与仪器

阿达木单抗注射液 (重组全人源化 TNF α 单克隆抗体, 艾伯维, 40 mg/0.8 mL, 批号 70228XH01), 蛋白酶 K (Merck, LZR3365), PrimeSTARTM HS DNA Polymerase (TaKaRa, R045A), 低糖 DMEM 培养基 (Thermo Fisher, 32561037), Fetal bovine serum (gidco, 16000-044), 苏木精 (Sigma, H3136), 伊红 Y (Sigma, 15086-94-9), Penicillin-streptomycin solution (HyClone, SV30010), 红细胞裂解液 (BD, 555899), Anti Mouse CD34 FITC (eBioscience, 11-0341-82), Anti Mouse CD29 PE (eBioscience, 12-0291-82), Anti Mouse CD44 APC (eBioscience, 17-0441-81), FITC Hamster Anti-Mouse CD3e (BD, 561827), APC Rat Anti-Mouse CD4 (BD, 561091), PerCP-CyTM 5.5 Rat Anti-Mouse CD8a (BD, 561109), PE-CyTM 7 Rat Anti-Mouse CD19 (BD, 561739), Luminex Mouse Magnetic Assay 试剂盒 (RND, LXSAMSM-06), Luminex Human Magnetic Assay 试剂盒 (RND, LXSAHM-01)。

CO₂ 恒温培养箱 (Thermo Scientific, Forma series II, 美国), 流式细胞仪 (BD, FACS Canto II, 美国), PCR 仪 (Bio-Rad, T100TM thermal cycler, 美国), 全自动组织脱水机 (Leica, TP1020, 德国), 石蜡包埋机 (Leica, EG1150H + C, 德国), 全自动轮转切片机 (Leica, RM2255, 德国), MAGPIX 液相芯片分析系统 (Luminex, 美国), 正置半自动显微镜 (Leica, DM3000LED, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 BMSCs 体外培养

6 ~ 8 周龄 FVB 小鼠颈椎脱臼法处死, 置于 75% 乙醇中浸泡 5 min, 无菌条件下分离双侧股骨和胫骨, 置于无菌 PBS 中, 剪开干骺端暴露骨髓腔, 用 1 mL 注射器吸取 PBS 冲洗骨髓至骨发白, 移液器吹打成单细胞悬液, 800 r/min 离心 5 min 弃上清, 用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基重悬细胞, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 ~ 3 d 换液 1 次。当细胞生长接近培养瓶底 80% 时, 胰酶消化传代, 直至第 3 代备用。

1.2.2 小鼠 BMSCs 鉴定

取第 3 代生长良好的 BMSCs, 胰酶消化, 制备成单细胞悬液, 800 r/min 离心 5 min, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 取 5×10^5 个细胞于流式管中, 依次加入 CD34、CD29 和 CD44 荧光抗体, 同时设阴性对照, 避

光孵育 30 min, 800 r/min 离心 5 min, 重复 3 次, PBS 洗去未标记抗体。0.2 mL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测细胞表面标记物。

1.2.3 Tg-huTNF α 小鼠基因型 PCR 鉴定

剪 2 mm 小鼠尾巴, 加 0.1 mL lysis buffer 和 2 μ L 蛋白酶 K, 55℃ 消化 2 h, 95℃ 5 min 灭活蛋白酶 K, 12 000 r/min 离心 5 min, 加适量 DNA 稀释液。根据 PrimeSTARTM HS DNA Polymerase 说明书配制 PCR 反应体系, PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 以上循环 35 次; 72℃ 彻底延伸 10 min; 4℃ 保存。PCR 引物序列为 F: 5' -GAACTCCCTCGATGTTAACC A-3', R: 5' -GAACTCCCTCGATGTTAACCA-3'。制备 1.5% 琼脂糖凝胶, 设定 50 V, 35 min 电泳跑胶, 拍照。目标条带在 375 bp 可判定为阳性 Tg-huTNF α 小鼠。

1.2.4 动物分组及实验干预

SPF 级 3 周龄雌性 Tg-huTNF α 小鼠分为 3 组: (1) 模型组 (Model), 每周腹腔注射 1 次 0.1 mL/10 g 的生理盐水, 5 只; (2) huTNF α 抗体干预组 (Anti-huTNF α), 每周腹腔注射 1 次 10 mg/kg 的 huTNF α 抗体, 5 只; (3) BMSCs 干预组 (BMSCs), 每周双侧膝关节腔各注射 1 次共 5×10^5 个 BMSCs, 10 只。所有组别均干预 10 周。

1.2.5 动物称重及关节临床评分

给药期每周称量动物体重, 同时对踝关节进行临床评分。评分标准^[15]如下: 0 分, 无关节炎症 (外观正常, 关节无肿胀); 1 分, 轻度关节炎 (关节轻微发红、肿胀); 2 分, 中度关节炎 (关节明显发红、肿胀); 3 分, 重度关节炎 (关节严重发红、肿胀、变形)。当表现倾向于下一个严重表型时可在当前表型评分基础上增加 0.5 分。

1.2.6 外周血免疫细胞及细胞因子检测

干预 10 周后, 动物异氟烷麻醉后腹主动脉采血, 取 0.2 mL 全血, 加入 2 mL $1 \times$ 红细胞裂解液, 裂解 10 min, 800 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤 3 次。加 0.1 mL PBS 重悬细胞, 之后加入 CD3、CD4、CD8、CD19 抗体避光孵育 20 min, 800 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤 3 次, 最后加 0.1 mL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测外周血 T 细胞 (CD3)、B 细胞 (CD19)、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的变化。外周血 4500 r/min 离心 10 min, 取血清, 液相芯片法检测血清中 huTNF α 、IL-4 及 IL-1 β 含量。

1.2.7 关节病理学分析

取小鼠左侧膝关节和踝关节中性福尔马林溶液固定 48 h 后,5%硝酸溶液脱钙,经常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片后,镜下进行病理评价并测量关节腔(固定测量位置,测量范围 2.60 mm × 1.25 mm)滑膜面积和侵蚀面积。评分标准^[16]如下:0 分,无可检测的病理;1 分,滑膜增生,淋巴细胞浸润;2 分,血管翳,纤维组织形成并覆盖于软骨表面;3 分,软骨破坏和骨质侵蚀;4 分,扩大的软骨破坏和骨质侵蚀。

1.2.8 骨形态计量学方法分析右侧股骨骨结构的变化

取小鼠右侧股骨,中性福尔马林溶液固定 48 h 后,5%的硝酸溶液脱钙,经常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片。选择生长板下 2 mm² 面积进行骨形态计量学测量^[17],测量参数包括骨小梁面积百分数、骨小梁宽度、骨小梁数量、骨小梁分离度和单位骨小梁周长破骨细胞数量。

1.3 统计学分析

结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据均用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理,多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。如果数据不符合正态分布或方差不齐,则选择非参数统计方法。

2 结果

2.1 小鼠 BMSCs 体外培养及鉴定

原代培养 FVB 小鼠来源的 BMSCs,12 h 细胞开始贴壁,48 h 首次换液后有大量细胞贴壁。培养初期 BMSCs 呈短棒状,其后逐渐呈长梭形,3 ~ 5 d 开始出现集落样生长。传代 24 h 后细胞快速贴壁,至

第 3 代细胞形态单一,呈梭形,有较多的突起或丝突和颗粒物(图 1A)。流式细胞仪对细胞表面标记物检测结果显示,第三代小鼠 BMSCs 均一性较好,CD34 阴性细胞比例为 99.9%(图 1B),CD29 和 CD44 阳性细胞比例分别为 95.3%和 99.7%(图 1C,1D),综上,认为所培养的为 BMSCs。

2.2 BMSCs 对 Tg-huTNF α 小鼠体重和关节临床评分的影响

经 PCR 方法鉴定,所选择的 20 只 3 周龄小鼠均为 Tg-huTNF α 阳性小鼠,见图 2A。干预期间,huTNF α 抗体干预组和 BMSCs 组动物体重自第 7 周开始高于模型组,但组间比较无显著性差异,见图 2B。模型组临床评分自给药第 1 周开始逐步增加,第 6 周进展到中度关节炎,第 10 周维持在中度关节炎(2.3 分左右)。huTNF α 抗体干预组和 BMSCs 干预组从轻度关节炎(1 分左右)开始治疗用药,期间关节炎症状未见明显加重,第 10 周时仍维持在轻度关节炎,临床评分均显著低于模型组($P < 0.05$)。此外,第 5~10 周 huTNF α 抗体干预组临床评分显著低于 BMSCs 组,差异具有显著性($P < 0.05$)。结果见图 2C,2D。

2.3 BMSCs 对 Tg-huTNF α 小鼠外周血淋巴细胞及细胞因子的影响

流式细胞术检测发现,B 细胞百分比 BMSCs 组(41.0% ± 26.6%)显著低于模型组(96.9% ± 2.8%),差异具有显著性($P < 0.05$);外周血细胞因子检测发现,外周血 huTNF α 含量 BMSCs 组(1.42 pg/mL ± 0.59 pg/mL)和 huTNF α 抗体干预组(1.05 pg/mL ± 0.17 pg/mL)均显著低于模型组(2.25 pg/mL ± 1.44 pg/mL),差异具有显著性($P < 0.05$),其他细胞因子和外周血免疫细胞未见明显变化。结果见图 3A,3B。

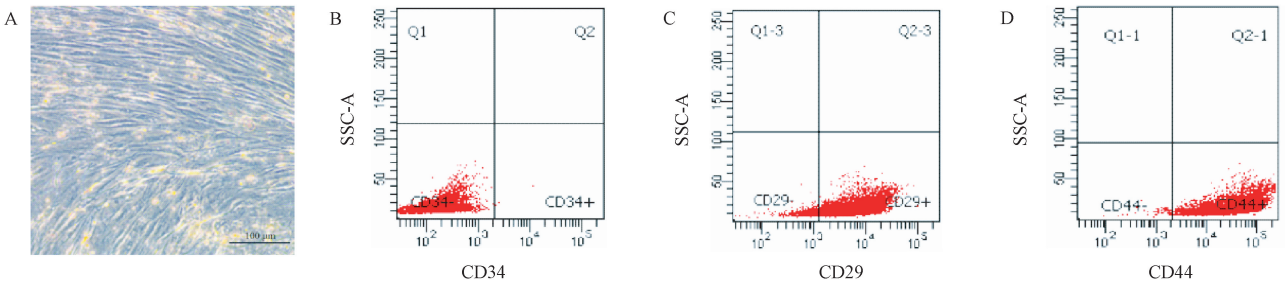


图 1 流式细胞仪鉴定第三代 BMSCs 细胞表面标记物

Figure 1 P3 BMSCs were identified by flow cytometry analysis of cell surface markers

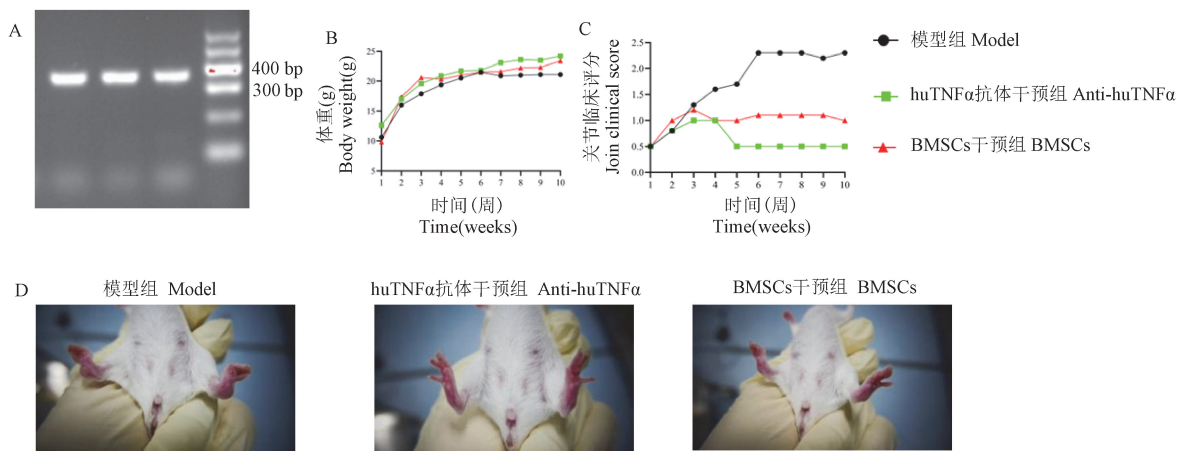
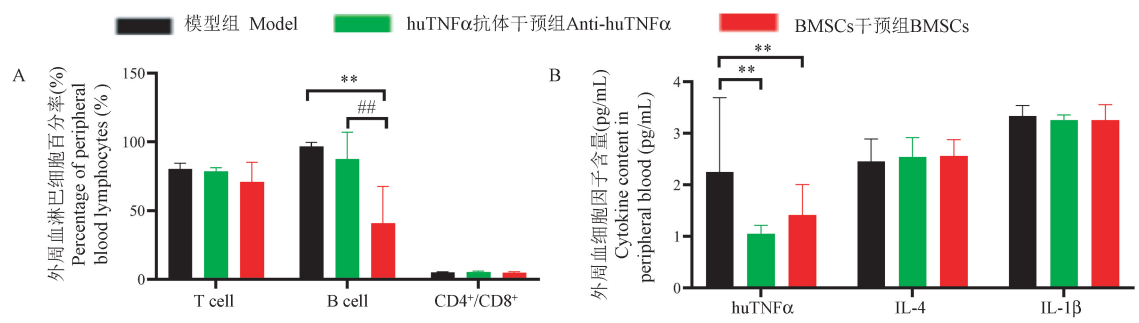


图 2 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠体重及关节临床评分的影响
Figure 2 Effects of BMSCs on body weight and join clinical score of Tg-huTNFα mice



注:与模型组比较, ***P* < 0.01;与 huTNFα 抗体干预组比较, ##*P* < 0.01。
图 3 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠外周血淋巴细胞及细胞因子的影响

Note. Compared with Model, ***P* < 0.01. Compared with Anti-huTNFα, ##*P* < 0.01.

Figure 3 Effects of BMSCs on peripheral blood lymphocytes and cytokines in Tg-huTNFα mice

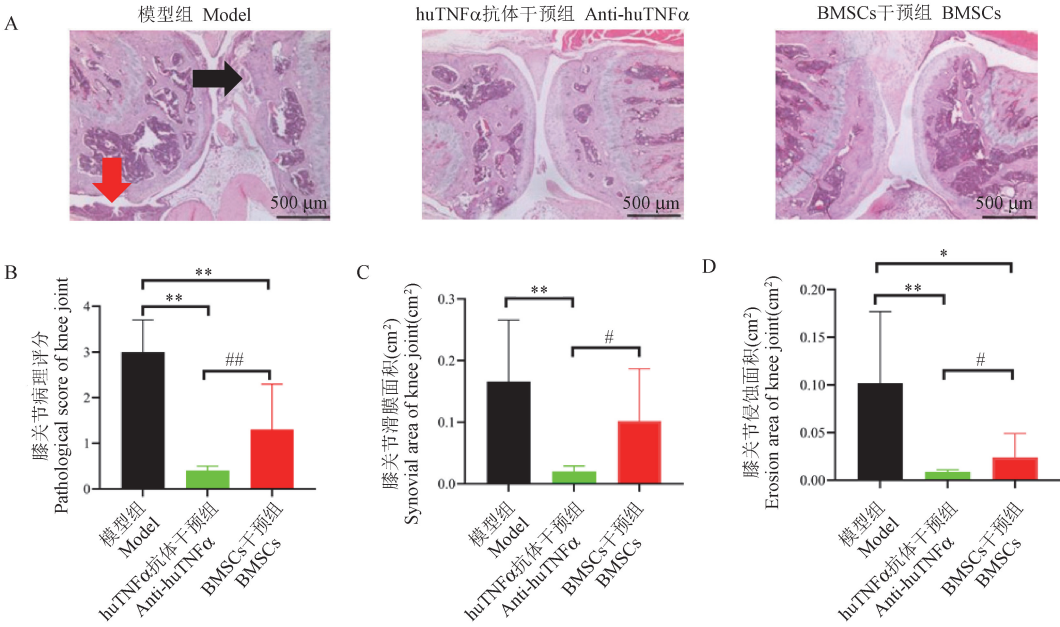
2.4 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠关节病理的影响

病理学研究发现 Tg-huTNFα 小鼠在膝关节和踝关节均表现出类风湿关节炎的典型病理症状,如关节滑膜增生、炎性细胞浸润、血管翳、关节软骨和软骨下骨的破坏等。关节病理学研究发现,膝关节病理评分 BMSCs 干预组 (1.3 ± 1.0) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.4 ± 0.1) 均显著低于模型组 (3.0 ± 1.0),膝关节滑膜面积 BMSCs 干预组 (0.102 ± 0.085 cm²) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.020 ± 0.010 cm²) 均显著低于模型组 (0.166 ± 0.102 cm²),膝关节侵蚀面积 BMSCs 干预组 (0.024 ± 0.025 cm²) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.009 ± 0.002 cm²) 均显著低于模型组 (0.102 ± 0.075 cm²),差异具有显著性 (*P* < 0.05),结果见图 4;踝关节病理评分 BMSCs 组 (2.0 ± 0.4) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.8 ± 1.1) 均显著低于模型组 (3.5 ± 0.6),踝关节滑膜面积 BMSCs 干预组 (0.578 ± 0.128 cm²) 和 huTNFα 抗

体干预组 (0.051 ± 0.012 cm²) 均显著低于模型组 (1.342 ± 0.903 cm²),踝关节侵蚀面积 BMSCs 组 (0.050 ± 0.061 cm²) 和 huTNFα 抗体干预组 (0.014 ± 0.002 cm²) 均显著低于模型组 (0.318 ± 0.146 cm²),差异具有显著性 (*P* < 0.05) (见图 5)。此外病理评价发现,在关节评分、滑膜增生面积及侵蚀面积等方面,huTNFα 抗体干预组明显少于 BMSCs 干预组,差异具有显著性 (*P* < 0.05)。

2.5 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠股骨骨结构的影响

骨形态计量学分析发现,BMSCs 干预 10 周后,提高了 Tg-huTNFα 小鼠股骨骨小梁面积百分数及骨小梁数量等骨形成指标 (*P* < 0.05),同时也降低了骨小梁分离度和单位面积破骨细胞数量等骨吸收指标 (*P* < 0.05)。与 BMSCs 类似,Anti-huTNFα 干预 10 周后,增加了骨小梁宽度,减少了单位面积破骨细胞数量,差异均具有显著性 (*P* < 0.05)。结果见表 1。

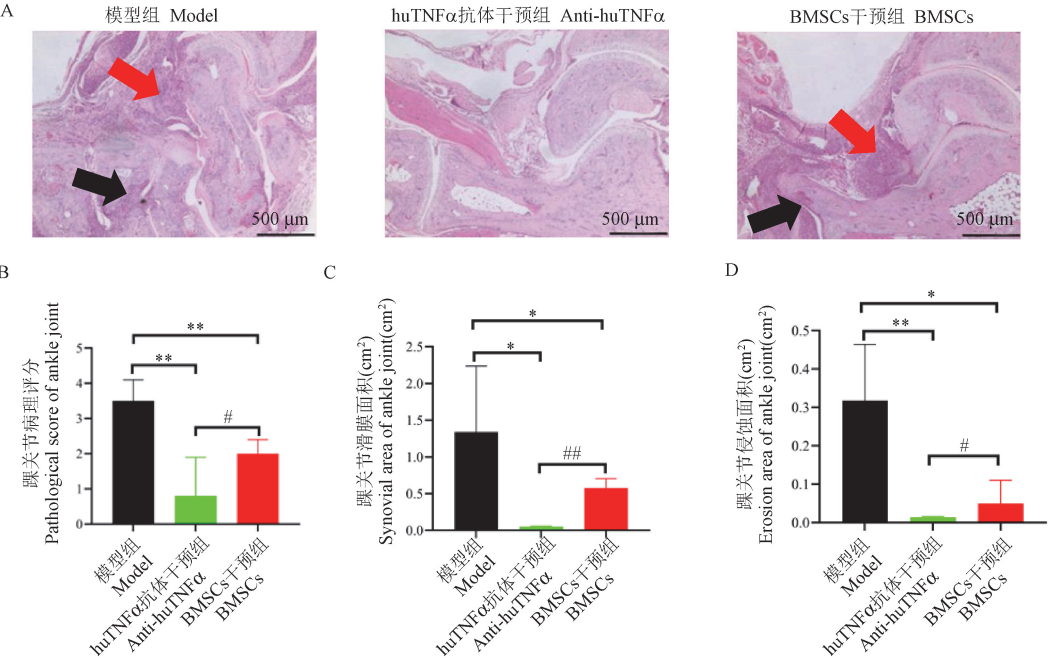


注:红色箭头:滑膜增生;黑色箭头:软骨或软骨下骨侵蚀;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 huTNF α 抗体干
预组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 4 BMSCs 对 Tg-huTNF α 小鼠膝关节病理的影响

Note. Red arrows. Synovial hyperplasia. Black arrows. Cartilage or subchondral bone erosion. Compared with Model, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with Anti-huTNF α , # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 4 Effect of BMSCs on knee joint pathology in Tg-huTNF α mice



注:红色箭头:滑膜增生;黑色箭头:软骨或软骨下骨侵蚀。

图 5 BMSCs 对 Tg-huTNF α 小鼠踝关节病理的影响

Note. Red arrows. Synovial hyperplasia. Black arrows, Cartilage or subchondral bone erosion.

Figure 5 Effect of BMSCs on ankle joint pathology in Tg-huTNF α mice

表 1 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠股骨骨结构的影响

Table 1 Effect of BMSCs on bone mass of femur in Tg-huTNFα mice

组别 Groups	骨小梁面积百分数(%) Trabecular area percentage(%)	骨小梁宽度(μm) Trabecular width(μm)	骨小梁数量(#/mm) Trabecular number(#/mm)	骨小梁分离度(μm) Trabecular separation(μm)	单位骨小梁周长 破骨细胞数量(#/mm) Unit trabecular circumference osteoclast number(#/mm)
模型组 Model	11.4 ± 3.1	17.3 ± 0.9	6.5 ± 1.7	147.7 ± 52.1	0.9 ± 0.5
huTNFα 抗体干预组 Anti-huTNFα	15.0 ± 5.6	20.1 ± 2.9*	7.3 ± 1.5	120.5 ± 26.2	0.3 ± 0.1*
BMSCs 干预组 BMSCs	15.6 ± 4.6*	17.3 ± 2.7	9.0 ± 1.6**	97.3 ± 20.8*	0.3 ± 0.2**

3 讨论

目前研究认为,细胞因子和趋化因子是维持机体免疫平衡的两类重要物质,机体的免疫失衡直接导致了 RA 的发生^[18]。TNFα 作为一种重要的促炎因子,广泛存在于 RA 患者的血清和关节滑膜中,是 RA 发病机制的关键调控因子^[19]。TNFα 可由炎症关节中的巨噬细胞、滑膜成纤维细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞分泌产生,同时 TNFα 可以再次作用于这些细胞,不断放大和延续炎症过程^[20]。TNFα 功能的发挥与肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)相关, TNFα 与 TNFR1 结合后可通过 NF-κB 信号通路发挥促炎功能,而 TNFα 介导的 T 细胞迁移、增殖、激活和抗原呈递、组织修复和血管生成的调控则依赖于 TNFR2 的信号传导^[21-22]。TNFα 通过激活细胞因子和趋化因子的表达,增加内皮细胞粘附分子的表达,保护滑膜成纤维细胞,促进血管生成,抑制调节性 T 细胞并诱导疼痛,在 RA 的发病过程中起着核心作用^[23-24]。人们普遍认为免疫功能障碍在 RA 的发病机制和发病过程中起着重要的作用,因此常规的 RA 治疗药物多为免疫调节剂,如非甾体类抗炎药、抗风湿药和糖皮质激素等。然而,这些药物长期使用会导致一系列的副作用,如胃肠道副作用、肝肾损伤、骨质疏松及变态反应等^[5]。随着生物技术的不断发展,近年来出现了如 TNFα 和 IL-1 的拮抗剂,这类药物治疗效果明显,但价格昂贵,停药后易复发,且有约 30% 的患者对这类药物无效^[6-7]。因此,开发一种新的、更有效、低副作用的 RA 治疗方法,具有重要意义。近年来,间充质干细胞作为自身免疫性疾病新的治疗方法得到了广泛的研究和应用。特别是 BMSCs,因其具有较强的免疫调节和抗炎作用,可通过细胞相互作用和分泌多种因子来调节整体和局

部微环境,修复受损组织,使其成为治疗 RA 的理想工具^[8-9]。

本研究发现,BMSCs 经关节腔注射 10 周,可显著改善 Tg-huTNFα 小鼠关节炎肿大变形,抑制 RA 关节病理改变,同时下调外周血 huTNFα 含量,延缓小鼠体重的下降。研究也发现,BMSCs 治疗效果弱于 TNFα 拮抗剂(huTNFα 抗体),可能是由于 Tg-huTNFα 小鼠模型为高表达人 TNFα,该小鼠 RA 症状与机体分泌的 TNFα 强相关,因此 TNFα 拮抗剂在靶向性上强于 BMSCs。本研究利用流式细胞技术检测发现,BMSCs 显著下调了 Tg-huTNFα 小鼠外周血 B 细胞百分比。据研究报道,RA 患者的血液和滑膜中 B 细胞均有显著性增加,滑膜和关节内的 B 淋巴细胞来源于外周血,滑膜组织是 B 细胞积累、增殖、浆细胞分化和自身抗体产生的活性部位^[25]。目前研究认为,BMSCs 对 RA 的治疗作用除具有调控细胞因子的功能外,对免疫细胞也有一定的调节作用,BMSCs 通过可分泌细胞因子(旁分泌效应)和细胞-细胞直接接触效应,抑制 B 细胞的增殖和活化^[26]。本研究使用骨形态计量学方法,分析 BMSCs 对 Tg-huTNFα 小鼠继发骨量丢失的影响。研究发现,BMSCs 干预 10 周后,提高了 Tg-huTNFα 小鼠股骨骨小梁面积百分数、骨小梁数量等,同时也降低骨小梁分离度和单位面积破骨细胞数量等,与 model 比较骨量明显增加,说明 BMSCs 对 RA 继发的骨量丢失有一定的减缓作用。在正常的生理条件下,骨形成和骨吸收之间存在着一种偶联平衡。在 RA 患者中这种平衡被破坏,TNFα 刺激内皮细胞产生 IL-1、IL-6 和趋化因子,TNFα 和 IL-1 不仅改变滑膜成纤维细胞的功能,使其分泌各种促进骨吸收的炎症介质(如基质金属蛋白酶、IL-6 和前列腺素 E),而且可以诱导滑膜巨噬细胞分化为破骨细胞,这些原因导致了 RA 患者关节骨侵蚀和继发的整体

骨量下降^[18,27]。抑制细胞因子是抑制骨侵蚀和防止全身骨丢失的最有效方法之一,阻断 TNF α 在 RA 发病过程中的作用,可显著下调破骨细胞的活性,抑制骨吸收,缓解 RA 继发的全身骨量丢失。

本研究中,在自发 RA 的 Tg-huTNF α 小鼠双侧膝关节腔注射给予 5×10^5 个 BMSCs,可显著缓解该小鼠 RA 临床症状和病理特征,并改善其股骨骨结构,缓解 RA 继发的骨量丢失,这些改变与 BMSCs 的免疫调节作用密切相关,通过本研究可以为临床 BMSCs 治疗 RA 提供一定的研究基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Sparks JA. Rheumatoid arthritis [J]. Ann Intern Med, 2019, 170(1): ITC1-ITC16.
- [2] Zhang Q, Li Q, Zhu J, et al. Comparison of therapeutic effects of different mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice [J]. Peer J, 2019, 7: e7023.
- [3] Radu AF, Bungau SG. Management of rheumatoid arthritis: an overview [J]. Cells, 2021, 10(11): 2857.
- [4] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [5] Gao J, Zhang G, Xu K, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells improve bone erosion in collagen-induced arthritis by inhibiting osteoclast-related factors and differentiating into chondrocytes [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 171.
- [6] Tamaddon M, Burrows M, Ferreira SA, et al. Monomeric, porous type II collagen scaffolds promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Sci Rep, 2017, 7: 43519.
- [7] Favalli EG, Raimondo MG, Becciolini A, et al. The management of first-line biologic therapy failures in rheumatoid arthritis: current practice and future perspectives [J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(12): 1185-1195.
- [8] Liu H, Li R, Liu T, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1912.
- [9] Hwang JJ, Rim YA, Nam Y, et al. Recent developments in clinical applications of mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 631291.
- [10] Yokota K, Sato K, Miyazaki T, et al. Characterization and function of tumor necrosis factor and interleukin-6-induced osteoclasts in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73(7): 1145-1154.
- [11] Zhai Z, Yang F, Xu W, et al. Attenuation of rheumatoid arthritis through the inhibition of tumor necrosis factor-induced caspase 3/gasdermin E-mediated pyroptosis [J]. Arthritis Rheumatol, 2022, 74(3): 427-440.
- [12] Wysham KD, Baker JF, Shoback DM. Osteoporosis and fractures in rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2021, 33(3): 270-276.
- [13] Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(4): 217-233.
- [14] Liu YQ, Liu Y, Chen ZY, et al. Rheumatoid arthritis and osteoporosis: a bi-directional Mendelian randomization study [J]. Aging, 2021, 13(10): 14109-14130.
- [15] Li G, Wu YE, Jia H, et al. Establishment and evaluation of a transgenic mouse model of arthritis induced by overexpressing human tumor necrosis factor alpha [J]. Biol Open, 2016, 5(4): 418-423.
- [16] Douni E, Sfikakis PP, Haralambous S, et al. Attenuation of inflammatory polyarthritis in TNF transgenic mice by diacerein: comparative analysis with dexamethasone, methotrexate and anti-TNF protocols [J]. Arthritis Res Ther, 2004, 6(1): R65-R72.
- [17] Recker RR, Lappe JM, Davies M, et al. Perimenopausal bone histomorphometry before and after menopause [J]. Bone, 2018, 108: 55-61.
- [18] Moelants EA, Mortier A, van Damme J, et al. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis [J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91(6): 393-401.
- [19] Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 10922.
- [20] Callard RE, Gearing AJH. The cytokine factsbook [M]. London: Academic Press; 1994.
- [21] Micheau O, Rizzi M, Smulski CR. Editorial: TNFR superfamily oligomerization and signaling [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 682472.
- [22] Belenguer G, Duart-Abadia P, Jordán-Pla A, et al. Adult neural stem cells are alerted by systemic inflammation through TNF- α receptor signaling [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(2): 285-299.
- [23] Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. Cells, 2020, 9(4): 880.
- [24] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis [J]. EMBO J, 1991, 10(13): 4025-4031.
- [25] Pala O, Diaz A, Blomberg BB, et al. B lymphocytes in rheumatoid arthritis and the effects of anti-TNF- α agents on B lymphocytes: a review of the literature [J]. Clin Ther, 2018, 40(6): 1034-1045.
- [26] Nakken B, Munthe LA, Kontinen YT, et al. B-cells and their targeting in rheumatoid arthritis-current concepts and future perspectives [J]. Autoimmun Rev, 2011, 11(1): 28-34.
- [27] Yi X, Liu X, Kenney HM, et al. TNF-polarized macrophages produce insulin-like 6 peptide to stimulate bone formation in rheumatoid arthritis in mice [J]. J Bone Miner Res, 2021, 36(12): 2426-2439.