

胶原诱导性关节炎大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 及 IL-10 水平变化*

谭艳¹, 宁丽常², 蹇孝丽³, 蒋红梅^{1**}

(1. 贵州医科大学 医学检验学院 临床微生物免疫教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 长沙医学院 医学检验学院 临床微生物免疫教研室, 湖南长沙 410219; 3. 贵州中医学院第一附属医院 检验科, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 探讨胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、干扰素- γ (IFN- γ)和IL-10水平。方法: 取Sprague Dawley(SD)雌性大鼠16只,随机均分为CIA组和对照组,CIA组大鼠以牛Ⅱ型胶原(BⅡC)行左足踝部注射,对照组同法注射生理盐水;造模后第7、14、21、28、35及42天观察大鼠足趾关节炎症症状并评定关节炎指数,第42天处死大鼠后取左后足踝关节进行苏木精-伊红(HE)染色组织学观察,同时取血采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清TNF- α 、IL-6、IFN- γ 及IL-10表达水平。结果: 与对照组相比,CIA组大鼠踝关节以下肿胀非常明显并伴有畸形,关节炎指数升高但随时间延长呈先高后低趋势($P < 0.05$),HE染色见关节处炎症病理病变明显;造模第42天时,CIA组大鼠血清IL-10水平较对照组降低,TNF- α 、IL-6及IFN- γ 水平较对照组升高($P < 0.05$)。结论: CIA大鼠血清TNF- α 、IL-6及IFN- γ 水平的升高,IL-10水平的降低可能与RA的发生发展密切相关。

[关键词] 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6; 干扰素- γ ; 白细胞介素-10; 胶原诱导性关节炎; 牛Ⅱ型胶原

[中图分类号] R593.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)01-0018-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.01.004

Changes of Serum TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-10 in Collagen-induced Arthritis Rats

TAN Yan¹, NING Lichang², JIAN Xiaoli³, JIANG Hongmei¹

(1. Department of Microbial Immunology, School of Medical Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Department of Microbial Immunology, School of Medical Laboratory, Changsha Medical College, Changsha 410219, Hunan, China; 3. Laboratory Department, the Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), interferon γ (IFN- γ) and IL-10 in the serum of collagen-induced arthritis (CIA) rats. **Methods:** 16 SD female rats were randomly divided into two groups (8 in each group) as CIA and control group. The rats in the CIA group received injection of bovine type II collagen (BIIIC) on the sole of their left paw, control group received saline injection; observing rats' toe joint arthritis on 7, 14, 21, 28, 35 and 42 day after modeling, then evaluating the index of arthritis. On the 42nd day, the rats were sacrificed. HE staining was performed on the posterior ankle joint of their left foot. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression levels of TNF- α , IL-6, IL-10 and IFN- γ . **Result:** Compared with the control group, swelling of the ankle joints in the CIA group was obvious and accompanied by malformation, the arthritis index increased ($P < 0.05$), and HE staining

*[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金(81660361, 81960393)

**通信作者 E-mail: 646117948@qq.com

网络出版时间: 2020-01-09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20200109.2011.004.html>

showed pathological lesions of the joints. Serum IL-10 levels were decreased in the CIA group, and TNF- α , IL-6 and IFN- γ levels were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The increased levels of serum TNF- α , IL-6 and IFN- γ , together with decreased IL-10 level are closely correlated to the occurrence and development of RA.

[**Key words**] tumor necrosis factor- α ; interleukin-6; Interferon-gamma; interleukin-10; collagen-induced arthritis; bovine type II collagen

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的自身免疫性疾病,主要累及患者多个关节,引起关节炎症及关节畸形,从而影响患者生活质量^[1]。RA 患者约占世界人口的 0.5%^[2],目前国内外对 RA 进行了大量研究,但其发病机制仍不完全清楚^[3]。胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠是一种理想的、常用的 RA 动物模型,具有与临床 RA 患者相似的关节炎症和病理改变^[4]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、干扰素- γ (interferon-gamma, IFN- γ) 和 IL-10 是常见的炎症细胞因子^[5-6],本研究通过检测 CIA 大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 和 IL-10 探讨 RA 的发病机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

购自贵州医科大学动物实验中心清洁级雌性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 16 只,体质量 250 ~ 320 g,恒温恒湿环境中适应性饲养 1 周后进行实验。牛 II 型胶原 (Bovine Type II Collagen, B II C, 批号 C7806) 和福氏完全佐剂 (F5881) 购自美国 sigma 公司,乙二胺四乙酸二钠 (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA- Na_2 , 批号 E8030) 购自北京索莱宝公司, TNF- α 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 96T (批号 ERC102a) 购自欣博盛生物科技有限公司, IL-6 ELISA 检测试剂盒 96T (批号 JER-04) 购自安徽巧伊生物科技有限公司, IL-10 ELISA 检测试剂盒 96T (批号 BMS629) 购自美国 eBioscience 公司, IFN- γ ELISA 检测试剂盒 96T (批号 EK380HS) 购自杭州联科生物公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及处理 16 只 SD 大鼠随机分为 CIA 组和对照组,每组 8 只。CIA 组大鼠予左足跖部皮内注射乳化(冰上将 B II C 与 CFA 按 1:1 混匀达浓

度为 1 g/L,以乳剂滴于清水中不散开为完全乳化的 B II C 乳剂 200 μL (初次免疫),第 14 天尾根部皮内多点注射相同剂量乳化的胶原(加强免疫);对照组大鼠予以同剂量生理盐水同法注射。

1.2.2 关节炎指数评分 分别在初次免疫后第 7、14、21、28、35 及 42 天观察 2 组大鼠的关节炎症状,并进行关节炎指数评分。关节炎指数评分是将无关节红肿、趾关节出现轻微的红肿、足趾关节以下部位出现肿胀、踝关节以下部位均出现肿胀和整个足爪均出现肿胀,依次评为 0、1、2、3 及 4 分,四肢得分累计为总分,总分 0 ~ 16 分^[5]。

1.2.3 苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色 初次免疫后第 42 天处死 2 组大鼠,取后左足踝关节去除皮肤和肌肉,10% 中性甲醛溶液固定 24 h,12.5% EDTA- Na_2 室温中脱钙,每 2 天换 1 次脱钙液,30 d 关节基本软化后切片、HE 染色,干燥并封片,显微镜下观察脱钙后关节滑膜组织病理变化。

1.2.4 血清 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 及 IL-10 检测 初次免疫后第 42 天时麻醉状态下大鼠股动脉取血,2 000 r/min,离心 10 min 分离血清,按 ELISA 试剂盒说明书,双抗体夹心法检测各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IFN- γ 及 IL-10 的含量。检测步骤为 2 倍倍比稀释标准品、加标准品、加样本和二抗、加酶温育 30 min,配洗液并洗板,避光显色 10 min,加终止液。所有检测因子在加入终止液的 5 ~ 30 min 内均在 450 nm 处检测 OD 值,最后根据标准曲线计算血清中细胞因子的含量。

1.3 统计学分析

数据用 SPSS 13.0 统计软件分析,计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模情况

对照组大鼠的关节在 2 次生理盐水处理后均

无明显肿胀,CIA 组大鼠在初次免疫后注射足第 1 天出现红肿,第 7 天注射足肿胀明显,第 14 天加强免疫后随着时间的延长关节炎症状加重、关节指数

升高,第 21 天大鼠关节炎指数达到高峰、双足红肿现象越加明显、随着时间的延长关节肿胀减退不明显。见图 1。

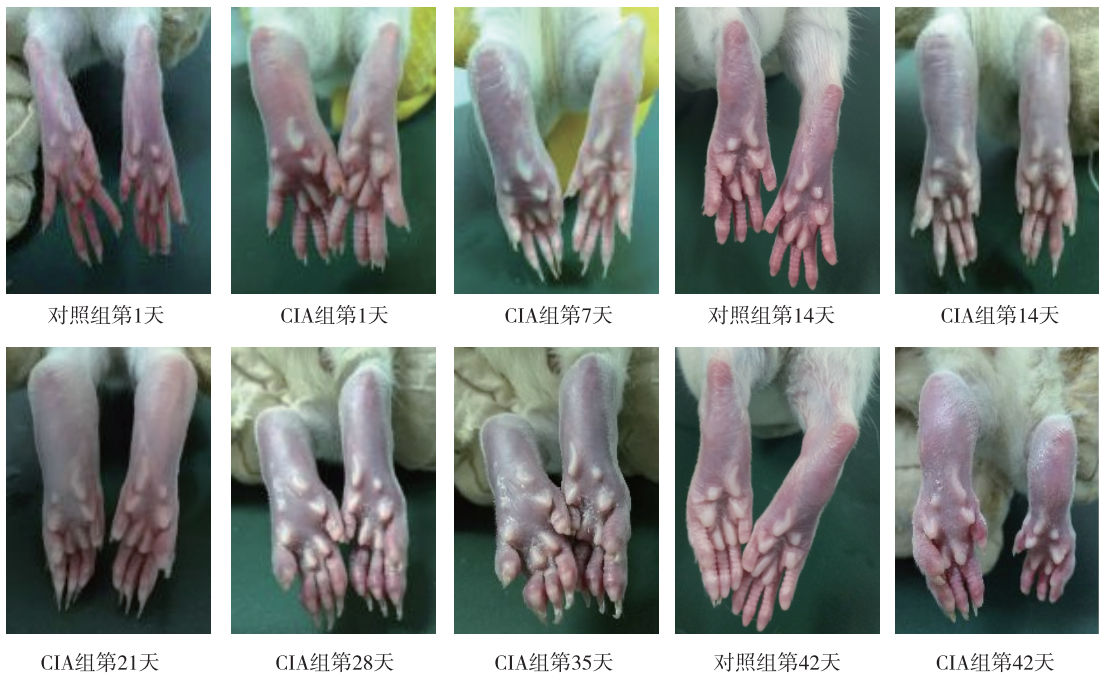


图 1 两组大鼠足趾关节肉眼观

Fig. 1 swelling joints of rats from both groups

2.2 关节炎指数评分

与对照组相比,CIA 组大鼠关节炎指数升高; CIA 组大鼠随着时间的延长,关节炎指数升高,第 21 天达到高峰,第 28、35 及 42 天关节炎指数下降不明显,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 HE 染色

实验第 42 天足趾组织切片结果显示,对照组大鼠踝关节滑膜组织可观察到由排列整齐的滑膜细胞和滑膜下组织构成,未看到破坏的关节面、炎症细胞浸润的关节腔和新生的毛细血管(箭头所示);CIA 组大鼠踝关节滑膜组织出现典型的关节炎症状,即滑膜细胞明显增生,层数明显增多且排

列紊乱,关节炎性细胞广泛浸润,新生血管和血管翳的明显形成,软骨表面有滑膜侵入,并破坏骨和软骨组织(箭头所示)。见图 2。

表 1 大鼠关节炎指数评分($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Arthritis index scores of each group($\bar{x} \pm s$)

时间	关节炎指数评分/分	
	对照组	CIA 组
第 7 天	0	3.50 ± 0.93 ⁽¹⁾
第 14 天	0	6.25 ± 1.04 ⁽¹⁾
第 21 天	0	11.88 ± 1.25 ⁽¹⁾
第 28 天	0	10.88 ± 0.64 ⁽¹⁾
第 35 天	0	10.00 ± 0.76 ⁽¹⁾
第 42 天	0	9.25 ± 0.71 ⁽¹⁾

注:⁽¹⁾与对照组相比, $P < 0.05$ 。

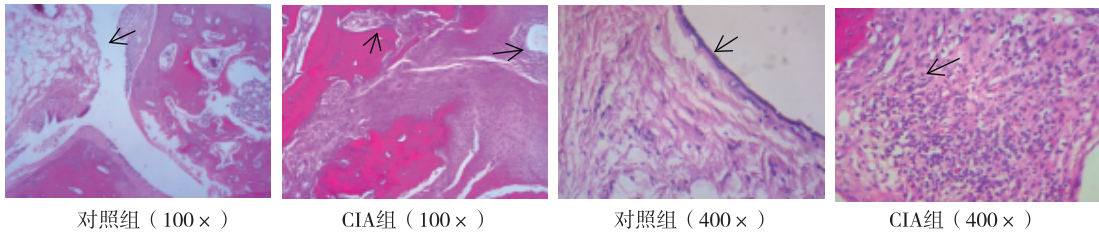


图 2 两组大鼠踝关节滑膜组织学观察(42 d,HE)

Fig. 2 Histological characteristics of ankle joints of rats

2.4 血清 TNF-α、IL-6、IFN-γ 及 IL-10 水平

与对照组相比,CIA 组大鼠血清 TNF-α、IL-6 及 IFN-γ 水平增高,IL-10 水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 造模第 42 天时 2 组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IFN-γ 及 IL-10 水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Levels of TNF-α、IL-6、IFN-γ and IL-10 in rat serum($\bar{x} \pm s$)

指标	血清因子水平/(ng/L)	
	对照组($n=8$)	CIA 组($n=8$)
TNF-α	56.24 ± 10.27	86.48 ± 24.80 ⁽¹⁾
IL-6	53.69 ± 10.05	138.72 ± 62.57 ⁽¹⁾
IL-10	123.28 ± 42.50	76.49 ± 29.81 ⁽¹⁾
IFN-γ	29.63 ± 9.98	51.81 ± 4.66 ⁽¹⁾

注:⁽¹⁾与对照组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

因 RA 的发病机制仍不完全清楚,因此对其机制的探讨成为了国内外研究热点^[7-8]。临床资料表明,RA 患者绝大多数为女性^[9],故本研究选择 SD 雌性大鼠做为实验动物。CIA 大鼠无论症状、病理学变化、免疫学改变及发病机制等方面和人类 RA 患者的表现有许多相似的特征^[10-12],因而在实验中常用来作为研究 RA 的动物模型^[13]。RA 是一种慢性全身性自身免疫性疾病,病变累及全身各个脏器,但以关节受累最为严重^[14]。本研究在 CIA 组大鼠足跟注射胶原,并于第 14 天尾根部注射同样剂量的胶原后,第 21 天可见关节明显肿胀畸形,直到第 42 天关节症状仍然明显;对照组大鼠在 2 次生理盐水处理后均未见关节肿胀。因此可以提示 CIA 组大鼠关节的肿胀畸形是由胶原所诱导的,且踝关节 HE 出现明显的炎症症状,可见该胶原已经诱导了关节炎的产生,因此本研究成功复制了 CIA 模型。

TNF-α 是由激活的单核巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞产生的一种炎症因子,它可引起组织损伤并调节免疫反应^[15]。在免疫反应中,TNF-α 可激活参与细胞生长、增殖和炎症反应的核转录因子 kB,研究表明 TNF-α 在炎症患者机体的血清中含量明显升高^[16]。IL-6 是由巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等细胞分泌的一种炎症因子,参与炎症反应、调节免疫应答和自身免疫病^[17]。在本研究中,CIA 组大鼠血清 TNF-α 和 IL-6 水平明显升高,可推测

CIA 大鼠关节的炎症变化可能与炎症细胞因子 TNF-α 和 IL-6 改变有关。在辅助性 T 细胞(Helper T cell,Th)中,Th1 细胞分泌 IFN-γ 等细胞因子,主要介导机体细胞免疫应答^[18-19];Th2 细胞分泌 IL-10 等细胞因子,主要介导机体炎症并引起体液免疫应答,参与抗体生成^[20-21]。Th1 细胞分泌的细胞因子 IFN-γ 可以促进自身分化成熟,同时还抑制 Th0 向 Th2 分化,Th2 细胞分泌的细胞因子 IL-10 可促进自身的分化成熟并增强 Th2 细胞而抑制 Th1 细胞的生成,同时与其他各种因素相互调节^[22]。在正常机体中,Th1 和 Th2 的细胞因子处于一种平衡状态,当机体存在炎症反应时,这种平衡将会被打破^[23]。RA 是一种常见的慢性自身免疫性疾病,分泌 IFN-γ 的促炎性 Th1 细胞和分泌 IL-10 的抗炎性 Th2 细胞在体内失衡,在 RA 的发病机制中具有重要作用^[24]。研究发现,RA 模型小鼠中出现 Th1/Th2 的比值明显升高的现象^[25],提示该模型小鼠中 Th1 细胞及其分泌的细胞因子明显升高,从而引起炎症反应。同时有报道认为,Th1 细胞可促进 RA 病情的发展,而 Th2 细胞起到抑制炎症的作用^[26]。本研究结果显示,与 Th1 有关的细胞因子 IFN-γ 表达水平增高,但与 Th2 有关的细胞因子 IL-10 表达水平降低,大鼠体内 Th1/Th2 细胞因子比例失衡,Th1 分泌的细胞因子占优势,也论证了 CIA 的发生与 Th1/Th2 比例失衡有关。

综上所述,CIA 大鼠血清 TNF-α、IL-6 及 IFN-γ 水平的升高,IL-10 水平的降低与 RA 的发生发展密切相关。

4 参考文献

[1] 陆光辉,褚志华,曾守逵,等. 类风湿性关节炎患者外周血 Nod 样受体蛋白 3 炎症小体和白细胞介素 1β 表达[J]. 贵州医科大学学报, 2019,44(6):1-5.

[2] CAROLYN J A, BURURKHARD M, NIKHIL Y. Skin manifestations of rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis and spondyloarthritis[J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2017, 53 (3) : 371-393.

[3] VEALE D J, ORR C, FEARON U, et al. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis[J]. Seminars in Immunopathology, 2017, 39(4):343-354.

[4] EVELIEN S, ALFONS B, PATRICK M. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis:focus on interferon-γ[J]. Interferon & Cytokine Research, 2011, 31(12):917-926.

- [5] MCLNNES I B, BUCKLEY C D, ISAACS J D. Cytokines in rheumatoid arthritis-shaping the immunological landscape[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2015, 12(1): 63–68.
- [6] HIRAHARA K, NAKAYAMA T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm[J]. *International Immunology*, 2016, 28(4): 163–171.
- [7] DOODY K M, BOTTINI N, FIRRESTEIN G S. Epigenetic alterations in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Epigenomics*, 2017, 9(4): 479–492.
- [8] 汪陶荣, 张晔, 曹威, 等. 白藜芦醇通过下调 MnSOD 诱导类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(4): 489–494.
- [9] SRIVASTAVA S, PATEL S, SINGH D, et al. Rationalized insights on causes of rheumatoid arthritis in the elderly and women: Special emphasis on treatment strategies[J]. *Critical ReviewsTM in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2017, 34(2): 97–147.
- [10] WILLIS V C, BANDA N K, CORDOVA K N, et al. Protein arginine deiminase 4 inhibition is sufficient for the amelioration of collagen-induced arthritis[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2017, 188(2): 263–274.
- [11] ZHAO X X, BI Y, YIN X Y, et al. Suppression of collagen-induced arthritis by lipopolysaccharide in DBA/1 mice[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2016, 20(3): 441–446.
- [12] BAO J, XIE Z J, CHEN L M. Effects of agkistrodon in different dosage forms on collagen-induced arthritis in rats[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2016, 22(12): 902–909.
- [13] WANG X, YAN X, WANG F, et al. Role of methotrexate chronotherapy in collagen-induced rheumatoid arthritis in rats[J]. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 2016, 77(3): 249–255.
- [14] VIATTE S, BARTON A. Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response[J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(4): 395–408.
- [15] BATRA R, SUH M K, CARSON J S, et al. IL-1 β (Interleukin-1 β) and TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) impact abdominal aortic aneurysm formation by differential effects on macrophage polarization[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2018, 38(2): 457–463.
- [16] HE Y, XIAO Y, YANG X, et al. SIRT6 inhibits TNF- α -induced inflammation of vascular adventitial fibroblasts through ROS and Akt signaling pathway[J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 357(1): 88–97.
- [17] HUNTER C A, JONES S A. Corrigendum: IL-6 as a keystone cytokine in health and disease[J]. *Nature Immunology*, 2017, 18(11): 1271–1271.
- [18] GONG P, SHI B, WANG J, et al. Association between Th1/Th2 immune imbalance and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome[J]. *Gynecological Endocrinology*, 2018, 34(8): 709–714.
- [19] RIAZ T, SOLLID L M, OLSEN I, et al. Quantitative proteomics of gut-derived Th1 and Th1/Th17 clones reveal the presence of CD28⁺ NKG2D-Th1 cytotoxic CD4⁺ T cells[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, 15(3): 1007–1016.
- [20] WANG J, MA L, YANG S, et al. [J]. *Inflammation*, 2016, 39(3): 1017–1024.
- [21] NIU Y, DONG Q, LI R. Matrine regulates Th1/Th2 cytokine responses in rheumatoid arthritis by attenuating the NF- κ B signaling[J]. *Cell Biology International*, 2017, 41(6): 611–621.
- [22] MOROZ L A, TALAKO T M, POTAPNEV M P, et al. Dichotomy of local Th1- and systemic Th2/Th3-dependent types of immune response in rheumatoid arthritis[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, 167(1): 69–73.
- [23] LIANG P, PENG S, ZHANG M, et al. Huai Qi Huang corrects the balance of Th1/Th2 and Treg / Th17 in an ovalbumin-induced asthma mouse model[J]. *Bioscience Reports*, 2017, 37(6): 135–142.
- [24] WU S, ZHOU Y, LIU S, et al. Regulatory effect of nicotine on the differentiation of Th1, Th2 and Th17 lymphocyte subsets in patients with rheumatoid arthritis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2018, 831(4): 38–45.
- [25] PANDEY A, RIZVI M, SHAH B A, et al. Anti-arthritis effect of Saponin-I by alteration of Th1/Th2 cytokine paradigm in arthritic mice[J]. *Cytokine*, 2016, 79(6): 103–113.
- [26] SUMITOMO S, NAGAFUCHI Y, TSUCHIDA Y, et al. A gene module associated with dysregulated TCR signaling pathways in CD4⁺ T cell subsets in rheumatoid arthritis[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2018, 89(7): 21–29.

(2019-10-25 收稿, 2019-12-27 修回)

中文编辑: 严征; 英文编辑: 赵毅