

[文章编号] 1000-8861(2008)01-0023-06

诱骗受体 DcR3 对佐剂型关节炎大鼠模型的作用分析

李文珠^{1a,1b}, 李迎², 罗芳洪^{1a}, 胡庆中^{1a}, 陶惠然^{1a}, 王生育^{1a}, 陈彩霞^{1b}, 庄国洪^{1a*} (1. 厦门大学 a. 医学院抗癌研究中心, b. 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 北华大学附属医院细胞周期实验室, 吉林 吉林 132011)

[摘要] 目的 研究诱骗受体 DcR3 对佐剂型关节炎(AA)大鼠模型的作用及其机理。方法 注射弗式完全佐剂建立大鼠佐剂型关节炎(AA)模型,尾静脉注射 DcR3 蛋白,观察大鼠关节肿胀度,间接 ELISA 检测血清和滑膜液中细胞因子 IL-1、TNF、IFN 的变化。RT-PCR 检测滑膜和淋巴细胞中 DcR3、Fas、FasL mRNA 的表达以及脾脏中 TGF、IFN、TNF、IL-4、IL-10 mRNA 的表达。Western blot 分析滑膜细胞中 Caspase-8、Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2 蛋白的表达。结果 DcR3 治疗 AA 大鼠后,足肿胀度降低;血液和滑膜液的 IL-1、TNF、IFN 水平下降;脾脏中 TGF、IFN、TNF mRNA 表达下调,IL-4、IL-10 mRNA 表达上调;滑膜细胞中 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达上调,Bcl-2 蛋白表达下调。结论 DcR3 可以用于实验性大鼠 AA 的治疗,其治疗机制与调节滑膜细胞 FasL、Fas mRNA 的表达和血液淋巴细胞中 Fas mRNA 的表达,促进滑膜细胞和自身反应性淋巴细胞的凋亡;调节脾脏细胞 Th1/Th2 细胞因子平衡相关。本研究为进一步阐明 RA 的发病机理奠定了重要基础,为有效治疗 RA 提供了新思路。

[关键词] DcR3; 佐剂型关节炎; 细胞凋亡

[中图分类号] R392 **[文献标识码]** A

Analysis of DcR3 in rat model of adjuvant arthritis

LI Wen-zhu, LI Ying, LUO Fanghong, HU Qing-zhong, TAO Huiran, WANG Sheng-yu, CHEN Cai-xia, ZHUANG Guo-hong (Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

[Abstract] **Objective** To study the immunoregulatory mechanisms of DcR3 on rats adjuvant arthritis (AA). **Methods** AA was induced by complete Freund's adjuvant (CFA) in rats, and the rats were injected subcutaneously with DcR3. The perimeters of rat hind soles were measured before and after the injection of CFA. The pathological changes of inflammatory knee joints were observed under optical microscope. The changes of IL-1, TNF, and IFN in serum and synovial liquid were detected by indirect ELISA, respectively. The DcR3, Fas, and FasL mRNA in lymphocytes and synovial cells, as well as the TGF, IFN, TNF, IL-4, and IL-10 mRNA in synovial cells were detected by RT-PCR. Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, and Bcl-2 expression were analyzed by Western blotting, respectively. **Results** DcR3 could ameliorate arthritic symptoms and decrease the levels of IL-1, TNF, and IFN in serum and synovial liquid. DcR3 also could stimulate synovial cells and lymphocytes apoptosis, and decrease the expression of TGF, IFN, TNF mRNA. DcR3 could increase the expressions of mRNA of IL-4 and IL-10, as well as increase the expression of Caspase-8 and Caspase-3 in synovial cells, but decrease the expression of Bcl-2. **Conclusion** DcR3 exerts anti-inflammatory role by suppressing the inflammatory cytokine production, stimulating the synovial cells and T cells apoptosis, and regulating the expressions of FasL and Fas mRNA in synovial cells, Fas mRNA in lymphocytes, and Th1/Th2 cell balance. The research provides valuable theoretical and experimental evidence for treating complicated inflammatory diseases.

[Key words] DcR3; Adjuvant arthritis; Cell apoptosis

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性炎症性多关节炎为主要表现的全身性疾病,其特征为慢性滑膜炎、滑膜增生和纤维化,滑液中有

大量单核细胞、淋巴细胞及浆细胞浸润。研究表明^[1], RA 患者的滑膜中 Th1/Th0 型细胞及促炎性 Th1/Th0 型细胞因子显著增多,产生滑膜、软骨破坏;相反, Th2 型细胞及具有抗炎、缓解病情作用的 Th2 型细胞因子水平较低,即存在 Th1/Th2 的极化失衡。RA 患者滑膜组织中凋亡的细胞频率较低,衬里下层成纤维细胞的凋亡率为 3%,衬里层细胞几乎无凋亡迹象,这些异常与凋亡相关基因表达异常有关,如 Fas 基因、Bcl-2 基因和某些癌基因^[2]。诱骗受体 3 (decoy receptor 3, DcR3) 是 1998 年 Pitti 等^[3]发现的

[收稿日期] 2007-05-16; [修回日期] 2007-08-30

[基金项目] 厦门大学科研启动基金 (Z03103)

[作者简介] 李文珠(1983-),女,浙江温州市人,博士生,主要从事细胞生物学方面的研究。(Tel) 0592-2180587; (E-mail) zhuanguohong@yahoo.com.cn

*通讯作者

与第一作者同等贡献

一个新的肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族成员。DcR3 能竞争性地与 FasL、LIGHT (lymph toxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D (gD) for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes) 及 TL1A (tumor necrosis factor ligand-related molecule-1A) 结合并抑制其介导的信号通路^[4]。Shi G 等^[5] 研究结果表明, DcR3 通过调节树突状细胞的分化和成熟, 从而抑制 CD4⁺ T 细胞在异源混合细胞反应中的增殖并增加 CD4⁺ CD45 RA⁺ T 细胞分泌 IL-4, 提示 DcR3 可能是 T 细胞对 Th2 细胞异常反应的效应分子。Chang YC 等^[6] 报道, DcR3 可调节 CD14⁺ 单核细胞分化成巨噬细胞, 经 DcR3 处理过的巨噬细胞不仅 CD14、CD16、CD36、CD64 的表达下调, 而且吞噬免疫复合物和凋亡小体的活性下降, 内毒素刺激后释放炎症介质 TNF- α 、IL-6、IL-1 的能力受损。目前尚未见 DcR3 作用 RA 的报道, 我们利用佐剂型关节炎 (AA) 动物模型, 研究了 DcR3 对 AA 大鼠模型的治疗作用及其机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只, 体质量 (200 \pm 2) g, 2~3 个月龄, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。随机分为 6 组, 即正常对照组; AA 对照组; DcR3 阴性对照组; 雷公藤对照组; 甲氨蝶呤对照组; DcR3 治疗组; 每组 8 只大鼠。

1.2 主要试剂 弗式完全佐剂 (FCA)、 α -型胶原酶为 Sigma 公司生产, 大鼠肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 IL-1 和干扰素 IFN- γ ELISA 检测试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司, Trizol 试剂购自上海生工生物工程有限公司, AMV 一步法 RT-PCR 扩增试剂盒购自上海生工公司。兔抗 Caspase-3 mAb、Caspase-8 mAb、Caspase-9 mAb、Bcl-2 mAb 和 HRP 标记的大鼠抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司。DcR3 蛋白由本实验室制备提供 (纯度 98%)。

1.3 大鼠 AA 模型的建立及分组 于大鼠右后足垫皮内注射 0.1 mL 弗式完全佐剂 (FCA) 致炎。致炎后第 15 天起进行药物治疗。每天 1 次, 每日上午给药, 连续 40 d, 每隔 4 d 称量体重和双足关节周长。双足关节肿胀率 = (致模后关节周长值 - 致模前关节周长值) / 致模前关节周长值 \times 100%。DcR3 治疗组: 对 AA 模型大鼠尾部静脉注射 DcR3 (0.8 mg/mL), 按每只鼠 800 μ g 鼠的剂量, 每天 1 次。MTX 对照组: 将 MTX 粉剂加生理盐水制成混悬液 (0.18 mg/mL), 按每只鼠 2 mL 的剂量灌胃, 每周一次。未给药的日子, 给予生理盐水灌胃, 1 mL/100 g,

每天 1 次。TPT 对照组: 将雷公藤药片加生理盐水制成混悬液 (1 mg/mL), 按每只鼠 1 mL 的剂量灌胃, 每天 1 次。DcR3 阴性对照组: 对正常大鼠尾部静脉注射 DcR3 (0.8 mg/mL), 按每只鼠 800 μ g 的剂量, 每天 1 次。AA 阴性对照组和正常对照组: 生理盐水灌胃每只鼠 1 mL 每天 1 次。

1.4 滑膜细胞 (synovial membrane cells, SMCs) 的分离和培养 致炎后 40 d, 处死 AA 大鼠, 无菌取下滑膜组织; 用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 含青霉素 200 kU/L、链霉素 200 mg/L 的 D-Hanks 液漂洗 3 次, 剪成约 1 mm³ 小块, 先离心洗涤 2 次, 去除脂肪组织, 加 2 mL 含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液和 2 mL 2 g/L 型胶原酶到培养瓶中, 于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 培养箱消化 4 h; 将未黏附细胞移入离心管, 1 000 r/min, 离心 10 min; 弃上清液, 再加入适量 2.5 g/L 胰蛋白酶 4 mL 消化 30 min。200 目尼龙网过滤, 去除结缔组织, 洗涤, 2 000 r/min、离心 10 min。镜下计数, 在 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 培养箱培养 24 h, 弃去未黏附细胞, 此时的贴壁细胞为原代滑膜细胞。原代细胞主要为巨噬细胞样细胞。继续培养 7 d 后, 用 0.5 g/L 胰蛋白酶 - 0.2 g/L EDTA 使细胞游离, 进行传代培养。

1.5 血液淋巴细胞分离 致炎后 40 d, 处死 AA 大鼠, 取抗凝血, 抗凝血 1 mL 与生理盐水 1 mL 混匀后, 小心加于 2 mL 的淋巴细胞分离液之液面上, 以 3 000 r/min 离心 30 min, 收集界面上的细胞, 放入含有生理盐水 4~5 mL 的试管中, 充分混匀后, 以 2 000 r/min 离心 15 min。收集沉淀冻存于 -20 $^{\circ}$ C, 备用。

1.6 滑膜、淋巴细胞总蛋白的提取 致炎后 40 d, 处死 AA 大鼠, 收集滑膜细胞与血液淋巴细胞放入 1.5 mL EP 管中。加入 5 倍 (v/v) 体积的缓冲液, 小号 Dounce 氏玻璃匀浆器中用 A 杵抽研 15 次, 匀浆组织和细胞。4 $^{\circ}$ C、600 r/min 离心 10 min。上清液含细胞膜、线粒体和细胞溶胶, 沉淀中有未破碎的细胞及细胞核。弃沉淀。上清液 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 沉淀线粒体。弃沉淀。上清液用角转头离心, 4 $^{\circ}$ C、100 000 r/min 离心 20 min。弃上清液。用匀浆缓冲液重悬沉淀。在小号 Dounce 氏玻璃匀浆器中匀浆, 再次 4 $^{\circ}$ C、100 000 r/min 离心 20 min。弃上清液。用小体积的适宜缓冲液重新彻底匀浆沉淀。取一小份等分试样作蛋白量测定。

1.7 关节滑膜液的获取 致炎后 40 d, 处死 AA 大鼠, 在非注射侧踝关节上方 0.5 cm 处剪下肿胀足爪, 剥去皮肤, 纵向切开, 放入 5 mL 生理盐水中, 4 $^{\circ}$ C 浸泡过夜, 离心取上清液, 用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 保存待测。

1.8 滑膜细胞膜蛋白的提取 取细胞,加入 10 mL 匀浆缓冲液于冰上充分匀浆。800 r/min,4 离心 10 min 后,所得上清液转入超速离心管。20 000 r/min,4 离心 1 h。弃上清液,沉淀用适量的匀浆缓冲液重悬,冰上孵育 2 h 后分装至 EP 管,10 000 r/min,4 离心 30 min。收集所得上清液即为膜组份,提取后测蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,分装后 -20 保存备用。

1.9 细胞因子的检测 采用双抗夹心 ELISA 检测大鼠血清和关节滑膜液中 IL-1、TNF- α 、IFN- γ 的含量。

1.10 RT-PCR 分析 DcR3、Fas、FasL mRNA、TGF- β 、IL-10、IL-4、TNF- α 和 IFN- γ mRNA 的表达 参照文献[7,8]。

1.11 Western blot 检测 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2 的蛋白表达 SDS-PAGE:将研磨后的蛋白进行 SDS-PAGE,分离蛋白质。转膜:把

分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜。Ag-Ab 反应:加入一抗,反应 1 h,洗涤液洗涤 3 次;加入 HRP 标记的二抗,反应 1 h,洗涤。显色:DAB 显色。结果判定和数据处理:胶片或考马斯亮蓝干胶后采用 Gel-doc 2000 扫描,采用 Quantity one 软件进行条带分析。

1.12 数据处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的组间显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 DcR3 对 AA 大鼠足爪炎症的影响 于致炎后 15 d(继发性炎症已出现),给予 DcR3 连续 25 d。结果发现,与 AA 对照组比较,AA 大鼠经 DcR3 治疗第 4 d 开始,足肿胀度降低,停药 5 d 后,抑制作用仍存在,且具有显著性($P < 0.01$)。而正常组大鼠在接受 DcR3 0.8 mg/鼠处理后,与正常组大鼠相比,无较大的差异,说明 DcR3 蛋白无毒副作用(表 1)。

表 1 DcR3 对 AA 大鼠足爪炎症的作用

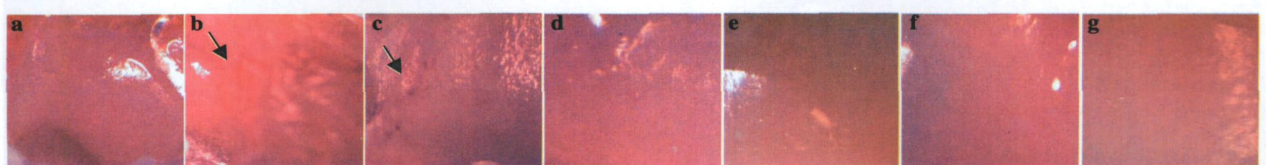
Tab 1 Therapeutic effect of DcR3 on secondary inflammatory reaction in adjuvant arthritis rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose /mg rat ⁻¹ d ⁻¹	Paw swelling						
		d 15	d 19	d 23	d 27	d 31	d 35	d 40
Normal	-	0.095 \pm 0.06	0.13 \pm 0.05	0.20 \pm 0.09	0.30 \pm 0.14	0.34 \pm 0.13	0.34 \pm 0.18	0.34 \pm 0.15
Model	-	0.47 \pm 0.17 ^a	0.77 \pm 0.28 ^a	1.01 \pm 0.39 ^a	1.43 \pm 0.79 ^a	1.65 \pm 0.68 ^a	1.46 \pm 0.66 ^a	0.91 \pm 0.20 ^a
DcR3 + Normal	0.8	0.09 \pm 0.05	0.15 \pm 0.04	0.19 \pm 0.08	0.25 \pm 0.09	0.30 \pm 0.11	0.35 \pm 0.12	0.34 \pm 0.05
MTX	0.36	0.47 \pm 0.14 ^b	0.53 \pm 0.10 ^b	0.45 \pm 0.08 ^b	0.35 \pm 0.05 ^b	0.31 \pm 0.04 ^b	0.29 \pm 0.06 ^b	0.21 \pm 0.03 ^b
TPT	1.0	0.47 \pm 0.14 ^b	0.50 \pm 0.10 ^b	0.43 \pm 0.08 ^b	0.37 \pm 0.05 ^b	0.33 \pm 0.04 ^b	0.32 \pm 0.06 ^b	0.31 \pm 0.03 ^b
DcR3	0.8	0.55 \pm 0.12 ^b	0.51 \pm 0.06 ^b	0.47 \pm 0.09 ^b	0.40 \pm 0.05 ^b	0.36 \pm 0.04 ^b	0.32 \pm 0.02 ^b	0.28 \pm 0.05 ^b

a) $P < 0.01$, vs normal; b) $P < 0.01$, vs model

2.2 DcR3 对 AA 大鼠关节病理改变的影响 致炎后 40 d 病理检查显示:AA 大鼠的关节内滑膜增厚,滑膜细胞有不同程度的脂肪变性,滑膜衬里层细胞增生并伴有新生血管形成(图 1b);软骨及骨遭到破坏,且透明软骨内基质降解及新生血管形成(图 1c)。与正常组相比(图 1a),给予 TPT 1.0mg/鼠和 MTX 0.36 mg/鼠对 AA 大鼠关节组织的病理损伤有完全

的抑制作用(图 1e、f),同时可见滑膜组织内大量胶原沉积和滑膜细胞的脂肪变性。与正常组相比,给予 DcR3(0.8mg/鼠)对 AA 大鼠关节组织的上述病理改变有不同程度的改善作用(图 1g),而正常组大鼠在直接接受 DcR3 0.8mg/鼠处理后,关节组织无任何病理上的改变(图 1d),说明我们通过基因工程制备的 DcR3 蛋白无毒副作用,且对 AA 大鼠有一定的治疗作用。



a) Control (rats injected with 0.1 mL of 8.5 g/L NaCl); b, c) Adjuvant arthritis (rats received a single injection of 0.1 mL of Freund's complete adjuvant); d) DcR3 treatment on normal rats (normal rats injection with DcR3 0.8 mg rat⁻¹ per day for 40 days); e) MTX treatment (AA rats injection with MTX 0.36 mg rat⁻¹ per week for 40 days); f) TPT treatment (AA rats injection with TPT 1.0 mg rat⁻¹ per day for 40 days); g) DcR3 treatment (AA rats injection with DcR3 0.8 mg rat⁻¹ per day for 40 days). Arrows for positive changes

图 1 DcR3 对 AA 大鼠滑膜、关节软骨面病理改变的影响

Fig 1 Effects of DcR3 on the pathological changes in ankle of rat adjuvant arthritis ($\times 200$)

2.3 DcR3 作用后降低了血清和滑液中 IL-1、TNF- α 、IFN- γ 水平 造模后第 40 天,与正常组相比,阴性对照组(AA)的 IL-1 显著增加($P < 0.01$);与阴性对照组(AA)相比,给药组的 IL-1 显著降低。血清和滑液 TNF- α 的含量,给药组与阴性对照组(AA)相比,没有显著性差异。血清和滑液 IFN- γ 的含量,与正常组相比,阴性对照组(AA)的 IL-1 显著增加($P < 0.01$);与阴性对照组(AA)相比,给药组的 IFN- γ 显著降低(表 2,表 3)。

表 2 DcR3 对 AA 大鼠血清 IL-1、TNF- α 和 IFN- γ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 2 Effects of DcR3 on Levels of IL-1, TNF- α , and IFN- γ in AA rat serums ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose/ mg rat ⁻¹ d ⁻¹	TNF- α / (pg mL ⁻¹)	IL-1 / (pg mL ⁻¹)	IFN- γ / (pg mL ⁻¹)
Normal	-	24.61 \pm 0.30	65.80 \pm 12.48	0.088 \pm 0.01
AA	-	33.88 \pm 0.32 ^b	163.85 \pm 10.24 ^a	0.115 \pm 0.03 ^a
DcR3 + Normal	0.8	23.59 \pm 0.20	70.52 \pm 9.52	0.082 \pm 0.02
MTX	0.36	23.77 \pm 0.29 ^c	85.28 \pm 11.03 ^d	0.091 \pm 0.02 ^c
TPT	1.0	25.15 \pm 0.32 ^c	68.91 \pm 10.24 ^c	0.107 \pm 0.03 ^d
DcR3	0.8	28.55 \pm 0.30 ^d	86.19 \pm 12.14 ^c	0.097 \pm 0.01 ^d

a) $P < 0.01$, vs normal; b, c) $P < 0.05$; d) $P < 0.01$, vs group AA

表 3 DcR3 对 AA 大鼠滑膜液 IL-1、TNF- α 和 IFN- γ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

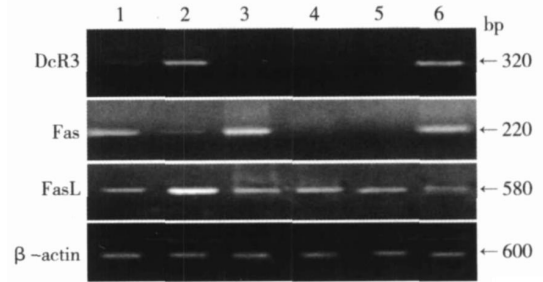
Tab 3 Effects of DcR3 on IL-1, TNF- α , and IFN- γ in synovial liquid of AA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose/ mg rat ⁻¹ d ⁻¹	TNF- α / (pg mL ⁻¹)	IL-1 / (pg mL ⁻¹)	IFN- γ / (pg mL ⁻¹)
Normal	-	41.09 \pm 0.22	168.89 \pm 12.13	0.59 \pm 0.04 ^d
AA	-	96.82 \pm 0.45	242.58 \pm 9.42 ^a	1.05 \pm 0.03 ^a
DcR3 + Normal	0.8	43.59 \pm 0.20	170.52 \pm 9.52	0.582 \pm 0.02
MTX	0.36	43.77 \pm 0.29 ^c	185.28 \pm 11.03 ^d	0.591 \pm 0.02 ^c
TPT	1.0	42.15 \pm 0.32 ^c	173.19 \pm 10.00 ^c	0.61 \pm 0.02 ^d
DcR3	0.8	40.74 \pm 0.30 ^c	195.58 \pm 12.02 ^d	0.60 \pm 0.05 ^d

a) $P < 0.01$ vs normal, b) $P < 0.05$; c) $P < 0.05$, d) $P < 0.01$ vs group AA

2.4 RT-PCR 分析 DcR3、Fas、FasL mRNA 的表达

2.4.1 滑膜细胞中 DcR3、FasL mRNA 的表达降低 通过 RT-PCR 检测各组大鼠滑膜细胞中 DcR3、Fas、FasL mRNA 的表达,通过灰度分析结果表明其在不同组间的表达情况不相同(图 2)。滑膜细胞中 DcR3 和 FasL mRNA 在 AA 组有较强的表达, Fas mRNA 在正常组、DcR3 阴性对照组有较强的表达, AA 组和 DcR3 治疗组表达较弱,在 MTX 组和 TPT 组中无可见表达。DcR3、Fas、FasL mRNA 的 PCR 扩增产物大小分别为 320, 220 及 580 bp,电泳结果与理论计算值相符。



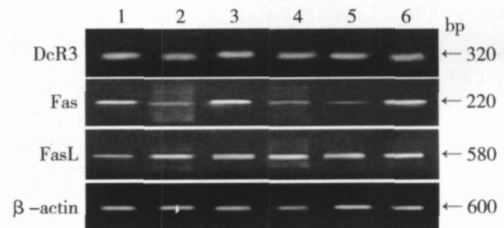
1) Normal; 2) AA rat; 3) Normal rats treated with DcR3; 4) MTX; 5) TPT; 6) DcR3

图 2 RT-PCR 检测各组大鼠滑膜细胞中 DcR3、Fas 和 FasL mRNA 的表达

Fig 2 mRNA expression of DcR3, Fas, and FasL measured by RT-PCR

2.4.2 淋巴细胞中 Fas mRNA 的表达增强 通过

RT-PCR 检测各组大鼠淋巴细胞中 DcR3、Fas、FasL mRNA 的表达,通过灰度分析结果表明其在不同组间的表达情况也不相同(图 3)。淋巴细胞中 DcR3 mRNA 和 FasL mRNA 在各组均有表达,其表达强度无明显的差异; Fas mRNA 在正常组、DcR3 阴性对照组和 DcR3 治疗组有较强的表达,其它组表达较弱。DcR3、Fas、FasL mRNA 的 PCR 扩增产物大小分别为 320 bp, 220 bp, 580 bp,电泳结果与理论计算值相符。



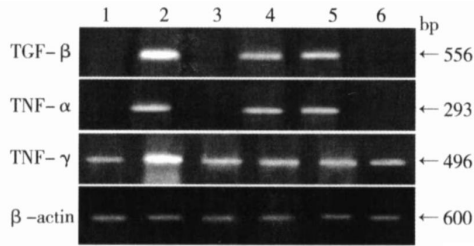
1) Normal; 2) AA rat; 3) Normal rats treated with DcR3; 4) MTX; 5) TPT; 6) DcR3

图 3 RT-PCR 检测各组大鼠淋巴细胞中 DcR3、Fas 和 FasL mRNA 的表达

Fig 3 mRNA expression of DcR3, Fas, and FasL measured by RT-PCR

2.5 RT-PCR 分析脾脏 TGF- β 、TNF- α 、IFN- γ 和 IL-10、IL-4 mRNA 的表达

2.5.1 脾脏中 TGF- β 、TNF- α 、IFN- γ mRNA 的表达降低 通过 RT-PCR 检测各组实验大鼠脾脏中 TGF- β 、TNF- α 、IFN- γ mRNA 的表达,结果表明其在不同组间有不同程度的表达(图 4)。正常组、DcR3 阴性对照组和 DcR3 治疗组大鼠中 TGF- β 、TNF- α 和 IFN- γ mRNA 的表达较弱; AA 组中 TGF- β 、IFN- γ mRNA 的表达强于 TNF- α mRNA 的表达; MTX 组和 TPT 组中 TGF- β 、TNF- α 、IFN- γ mRNA 的表达基本相当。TGF- β 、TNF- α 、IFN- γ mRNA 的 PCR 扩增产物大小分别为 556, 293 及 496 bp,电泳结果与理论计算值相符。

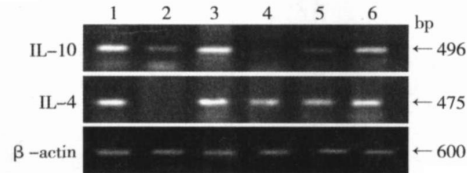


1) Normal; 2) AA rat; 3) Normal rats treated with DcR3;
4) MTX; 5) TPT; 6) DcR3

图 4 RT-PCR 检测各组大鼠脾脏组织中 TGF- β 、TNF- α 、IFN- γ mRNA 的表达

Fig 4 mRNA expression of TGF- β , TNF- α , and IFN- γ measured by RT-PCR

2.5.2 脾脏 IL-10、IL-4 mRNA 的表达增强 通过 RT-PCR 检测各组实验大鼠脾脏中 IL-10、IL-4 mRNA 的表达,结果表明其在不同组间有不同程度的表达(图 5)。正常组、DcR3 阴性对照组和 DcR3 治疗组大鼠中 IL-10 和 IL-4 mRNA 的表达较强;AA 组中 IL-10 mRNA 有表达,而 IL-4 mRNA 无可见表达;MTX 组和 TPT 组中 IL-10、IL-4 mRNA 的表达基本相当。IL-10、IL-4 mRNA 的 PCR 扩增产物大小分别为 496 和 475 bp,电泳结果与理论计算值相符。



1) Normal; 2) AA rat; 3) Normal rats treated with DcR3;
4) MTX; 5) TPT; 6) DcR3

图 5 RT-PCR 检测各组大鼠脾脏组织中 IL-10、IL-4 mRNA 的表达

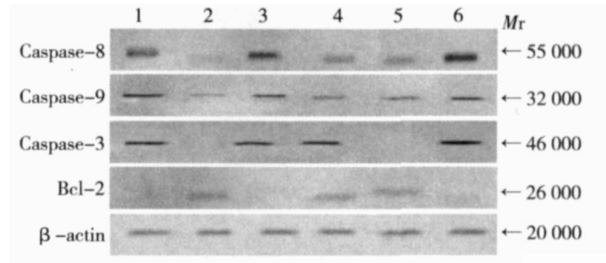
Fig 5 mRNA expression of IL-10 and IL-4 measured by RT-PCR

2.6 Western blot 分析凋亡相关蛋白的表达

2.6.1 滑膜细胞中 Caspase-8、Caspase-3 蛋白的表达增强 通过 Western blot 检测各实验大鼠滑膜细胞中 Caspase-8、Caspase-3、Caspase-9 的表达,通过灰度分析发现其在各组大鼠中的表达情况不同(图 6)。Caspase-8、Caspase-9 蛋白在所有实验组中均有表达,但 Caspase-8 蛋白在 AA 组表达相对较弱;正常组、DcR3 阴性对照组、MTX 组、DcR3 治疗组大鼠可见 Caspase-3 蛋白的表达,AA 组、TPT 组中没有可见的蛋白条带。

2.6.2 滑膜细胞中 Bcl-2 蛋白的表达降低 通过 Western blot 检测各实验大鼠滑膜细胞中 Bcl-2 的表达,通过灰度分析发现其在各组大鼠中的表达情况不同(图 6)。AA 组、MTX 组、TPT 组可见明显 Bcl-2 蛋白的表达,正常组、DcR3 阴性对照组、DcR3 治疗组大鼠未见 Bcl-2 蛋白的表达。Caspase-8、Caspase-3、

Caspase-9、Bcl-2 蛋白大小分别为 55 000,32 000,46 000,26 000,电泳结果与理论计算值相符。



1) Normal; 2) AA rat; 3) Normal rats treated with DcR3;
4) MTX; 5) TPT; 6) DcR3

图 6 Western blot 检测滑膜细胞 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3、Bcl-2 的表达

Fig 6 Expressions of Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, and Bcl-2 detected by western blotting

3 讨论

AA 模型大鼠的继发性病变一般出现于致炎后的 10~16 d,表现为持续性软组织炎症,伴有骨质溶解性骨膜炎、骨膜新骨形成、单核细胞浸润、血管翳形成,关节完全粘连等^[9]。本研究发现,致炎后 15 d 继发性关节炎出现,20~24 d 达峰值。致炎后第 40 d,AA 大鼠滑膜增厚、纤维化;滑膜衬里层细胞增生并伴有血管翳形成;软骨及骨遭到破坏,且透明软骨内基质降解及新生血管形成等。这些病理改变与上面的报道一致。

近年研究表明^[10],辅助性 T 细胞(Th1/Th2)在 RA 的发病机制中有重要的作用。正常人的 Th1/Th2 型细胞因子处于平衡状态,而 RA 患者的细胞因子网络则发生偏移。因此有人认为,促炎性 Th1 细胞及其分泌的 IFN- γ 和抗炎性 Th2 细胞及其分泌的 IL-4 的失衡,在 RA 的发病机制中具有重要的作用^[11]。应用胶原性关节炎动物模型表明,IL-4/IL-10(Th2 型细胞因子)联合治疗,能使动物体内的 Th0 细胞向 Th2 细胞转化,并使病情显著好转^[12]。

本文表明,在多发性关节炎形成期使用 DcR3 能显著降低 AA 大鼠血液和淋巴细胞分泌的 IL-1、TNF- α 、IFN- γ 水平。静脉注射 DcR3(0.8 mg \cdot 鼠⁻¹ \cdot d⁻¹)4 d 后足爪肿胀开始减退,停药后仍可维持疗效。DcR3 作用 AA 大鼠后,促进了脾脏中 Th2 型细胞 IL-10、IL-4 mRNA 的表达,降低了 Th1 型细胞 TGF- β 、TNF- α 、IFN- γ mRNA 的表达,使得 Th1/Th2 型细胞趋向平衡,提示 DcR3 可通过调节 Th1/Th2 细胞的平衡,从而来控制 RA 慢性炎症。

RA 患者的发病与细胞凋亡过程异常密切相关。参与的细胞包括滑膜细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、软骨细胞等。在 RA 患者的滑膜中,有大量的单个核细胞浸润,其中 30%~50% 是 T 淋巴细胞,而且这

些 T 淋巴细胞绝大多数都处于被激活状态,活化的 T 淋巴细胞与滑膜巨噬细胞直接作用,分泌细胞因子,刺激滑膜细胞释放胶原酶和蛋白酶,造成软骨和骨损害^[13]。

DcR3 作用 AA 大鼠后,降低了滑膜细胞中 DcR3 (指内源性,下同)、FasL mRNA 的表达,FasL 与滑膜组织当中的效应细胞表面 Fas 结合就减少,可能降低了效应细胞的活化,从而减少其分泌 Th1 型细胞因子;滑膜细胞中 Fas mRNA 的表达不变,则可能继续与效应细胞表面 FasL 正常结合,从而通过 Fas/FasL 途径介导滑膜细胞凋亡。

DcR3 作用 AA 大鼠后,增强了外周血淋巴细胞中 Fas mRNA 的表达,DcR3、FasL mRNA 表达水平的变化不是很大,表明 DcR3 对 AA 大鼠的作用能力与细胞表面 Fas 表达的差异有相关性,可能通过促进活化的自身反应性 T 细胞的凋亡,从而缓解类风湿关节炎。

细胞凋亡过程中 Bcl-2 家族对细胞凋亡的调控起着重要的作用。由于 Bcl-2 对维持线粒体的完整性具有重要作用^[14],DcR3 作用 AA 大鼠后,滑膜细胞中 Bcl-2 蛋白表达的降低,表明其作用机制可能是通过下调 Bcl-2 蛋白的表达来促进线粒体内细胞色素 c 的释放,从而导致滑膜细胞的凋亡。

凋亡发生机制中最关键的环节之一是半胱氨酸蛋白酶(Caspase)的激活。Caspase-8 与 Caspase-9 分别作为介导死亡受体途径和线粒体途径的启动酶,而 Caspase-3 则作为最后的效应酶来执行最后的凋亡命令^[15]。实验研究表明,DcR3 作用 AA 大鼠后,滑膜细胞中 Caspase-8 与 Caspase-3 蛋白表达的增强,Caspase-9 蛋白表达改变不明显,提示可能通过增强已有的死亡受体介导的凋亡途径,来促进滑膜细胞的凋亡。

综上所述,DcR3 作用 AA 大鼠的免疫机理可能有以下几点:a. 通过调节滑膜细胞中 FasL、Fas mRNA 的表达,促进增生的滑膜细胞的凋亡;b. 通过上调血液淋巴细胞中 Fas mRNA 的表达,促进活化的 T 细胞的凋亡;c. 通过上调滑膜细胞中 Caspase-8、Caspase-3 蛋白的表达,下调 Bcl-2 蛋白的表达,促进滑膜细胞的凋亡;d. 通过调节脾脏细胞分泌的 Th1/Th2 细胞因子平衡,来缓解类风湿关节炎。本文实验结果证明了 DcR3 对 AA 大鼠模型具有缓解关节肿胀作用,并初步阐明其作用机理,为 RA 的治疗方法提供了新的思路。

[参考文献]

[1] Hessian PA, Highton J, Kean A, *et al.* Cytokine profile of

the rheumatoid nodule suggests that it is a Th1 granuloma. [J] *Arthritis Rheum*, 2003, 48(2):334-338.

- [2] Lamhamedi Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, *et al.* Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(3):255-260.
- [3] Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, *et al.* Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer [J]. *Nature*, 1998, 396(6712):699-703.
- [4] Arakawa Y, Tachibana O, Hasegawa M, *et al.* Frequent gene amplification and over expression of decoy receptor 3 in glioblastoma[J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2005, 109(3):294-298.
- [5] Shi G, Wu Y, Zhang J, *et al.* Death decoy receptor TR6/DcR3 inhibits T cell chemo taxis in vitro and in vivo [J]. *J Immunol*, 2003, 171(7):3407-3414.
- [6] Chang YC, Hsu TL, Lin HH, *et al.* Modulation of macrophage differentiation and activation by decoy receptor 3 [J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75(3):486-494.
- [7] Li Wen-zhu, Wang Sheng-yu, Zhuang-guohong, *et al.* Induction of tumor cell apoptosis via Fas/DR5 [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2006, 3(6):467-471.
- [8] 曾东风,孔佩艳,陈幸华,等. 缺氧诱导因子-1 α 和 PTEN、P53 在急性髓性白血病骨髓基质细胞中的表达及意义[J]. *免疫学杂志*, 2007, 23(3):316-326.
- [9] Jacobson PB, Borgan SJ, Wilcox DM, *et al.* A new spin on an old model: In vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat [J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(10):2060-2073.
- [10] Racke MK, Bonomo A, Scott DE, *et al.* Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease [J]. *J Exp Med*, 1994, 180(5):1961-1966.
- [11] Matyniak JE, Reiner SL. T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease [J]. *J Exp Med*, 1995, 181(3):1251-1254.
- [12] Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, *et al.* Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 response and induction of regulatory T cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(2):531-543.
- [13] Dawson HD, Collins G, Pyle R, *et al.* Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes [J]. *BMC Immunol*, 2007, 7:27.
- [14] Shigeomi S, Yutaka E, Wataru, *et al.* Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux [J]. *PNAS*, 1998, 95(4):1455-1459.
- [15] Imler M, Steiner V, Ruegg C. Caspase-induced inactivation of the anti-apoptotic TRAF1 during Fas ligand-mediated apoptosis [J]. *FEBS Letters*, 2000, 468(2):129-133.

(编辑 金晓琳)