

来氟米特及其活性代谢物对关节炎模型大鼠 TNF- α 分泌及 mRNA 表达的影响

李卫东*, 林志彬

(北京大学基础医学院药理学系, 北京 100083)

摘要: 目的 观察免疫抑制剂来氟米特(leflunomide, LEF) 及其活性代谢产物 A771726(A77) 对佐剂性关节炎(AA) 模型大鼠 TNF- α 分泌活性及 mRNA 表达的影响。方法 TNF- α 活性及 mRNA 表达用 ELISA 法和 RT-PCR 方法。结果 AA 大鼠腹腔巨噬细胞(PM ϕ) 呈高度活化状态, TNF- α 分泌水平明显升高。LEF 明显抑制 LPS 诱导的大鼠 PM ϕ TNF- α 释放且呈剂量依赖关系。体外用 A77 后 TNF- α mRNA 表达量降低。结论 LEF 和 A77 对 AA 模型大鼠 TNF- α 分泌活性及 mRNA 表达有抑制作用, 此可能为其抗炎和免疫抑制作用的机制之一。

关键词: 来氟米特; 活性代谢物; TNF- α ; mRNA 表达; 佐剂性关节炎大鼠

中图分类号: R965; R969.1; Q344.13 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)10 - 0767 - 04

来氟米特是近年新合成的异恶唑类衍生物, 已用于临床治疗类风湿性关节炎和强直性脊柱炎。据报道该药及其活性代谢产物 A771726 通过抑制酪氨酸激酶和二氢乳清酸盐脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase, DHODase) 的活性从而抑制细胞增殖, 即通过影响嘧啶的生物合成发挥作用^[1,2]。但关于 LEF 及 A771726 对与 RA 有关的细胞因子的影响报道较少。为此, 我们以 AA 大鼠为研究对象, 探讨 LEF 在体给药及 A771726 离体给药对与 RA 发病及病情迁延相关的细胞因子 TNF- α 生物活性水平及 mRNA 表达改变的影响, 以期部分阐明 LEF 治疗类风湿性关节炎的作用机制。

材 料 与 方 法

药品及主要试剂 来氟米特, 由上海第二军医大学药理学系提供。A771726, 德国 Hoechst 药厂产品, 由上海第二军医大学药理学系惠赠; 强的松(prednisone, pren), 北京第四制药厂生产; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS 大肠杆菌来源), 四氮唑蓝(MTT): 美国 Sigma Co. 产品; 完全福氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA): 美国 Difco Lab. 产品; TRIZOL 试剂: Gibco BRL 公司产品; RT-PCR 通用型试剂盒: 鼎国生物公司产品。

实验动物 Wistar 大鼠, 8~12 周龄, 体重 150~200 g, ϕ 兼用。购自北京大学实验动物部。

主要仪器设备 低温低速离心机, Beckman CPKR Centrifuge。CO₂ 培养箱, IP-41 型, Yamato 科学株式会社; 酶标仪, 550 型, 美国 BIO-RAD 公司; PCR 扩增仪, FPROG 05D, 英国 TECHNE LTD, DUXFORD; 凝胶图象分析仪, 美国 Bio-Rad 公司; UVIKON490 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司。

大鼠腹腔巨噬细胞(PM ϕ) 制备 脱臼处死动物, 以 D-Hanks 液灌洗获得富含 M ϕ 的腹腔细胞, 调细胞浓度至 $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 96 孔培养板每孔加入细胞悬液 100 μL , 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养箱培养 2 h, 弃上清液, 以 Hanks 液洗涤, 弃除不贴壁细胞, 余下为 PM ϕ 。

大鼠滑膜细胞的制备和培养^[3,4] 取滑膜组织, 以 D-Hanks 液冲洗, 剪碎, 置于含 10% 小牛血清-DMEM 培养液 2 mL 和 0.8% II 型胶原酶(终浓度 0.4%) 2 mL 培养瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱消化 2 h。未黏附细胞 $300 \times g$ 离心, 10 min, 弃上清液, 置于含 0.25% 胰蛋白酶培养瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂, 30 min, 200 目尼龙网过滤, $300 \times g$ 离心 10 min, 计数, 分离出单个滑膜细胞。用含 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 的 DMEM 培养液(含 L-glutamine, penicillin, streptomycin 和 10% Fetal calf serum (FCS)) 制备滑膜细胞悬液($5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)。加入 24 孔板中, 每孔 1 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 中培养 48 h。

AA 模型大鼠 PM ϕ 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 活

收稿日期: 2001-11-27.

* 通讯作者 Tel: (010) 62091421, Fax: (010) 62091686,

E-mail: wdlee@btamail.net.cn

性测定 (1) 大鼠佐剂性关节炎(AA)模型的建立, 参见文献进行^[5]。(2) 含 TNF-α PMφ 上清的获得, 参见文献方法^[6]。(3) TNF-α 的活性检测:用 ELISA 法(按说明书进行)。

RT-PCR 检测细胞内 TNF-α mRNA^[7] (1) 细胞的分离与培养:常规制备大鼠 PMφ 和滑膜细胞, 调整细胞浓度分别为 $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Mφ 和滑膜细胞培养瓶中加入不同浓度的 A771726 及 LPS(终浓度 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱中孵育 48 h。(2) 细胞总 RNA 的提取及鉴定, 依常规方法进行。(3) RT-PCR: 1) 引物根据文献资料设计^[8], 由鼎国生物公司合成。

引物序列为: TNF-alpha (468 bp): Forward primer: 5' TCTCAA AACTCGAGTGACAAG 3'; Reverse primer: 5' AGTTGGTTGCTTTGAGATCC 3'; β-actin (391 bp): Forward primer: 5' TGTTTGAGACCTTCAAC ACC 3'; Reverse primer: 5' CGCTCATTGCCGATAGTG AT 3'。RT-PCR 扩增反应条件参照“通用型 RT-PCR 试剂盒”操作说明进行。(4) 常规琼脂糖电泳法检测 RT-PCR 产物。(5) RT-PCR 结果以光密度扫描定量:用图象分析仪的图象分析系统对凝胶上每一泳带进行灰度分析, 测定 Adj Volume A(AVA) 值, 结果以各组的 AVA 值与 β-actin 的 AVA 之比表示。RT-PCR 结果以 3 次以上实验测定值与相应对照的比值

的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

统计学处理 计量资料的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果的显著性检验用成组资料的显著性分析, Duncan's test, ANOVA, SAS 6.04。

结 果

1 LEF 对佐剂性关节炎(AA)大鼠 PMφ 内、外 TNF-α 分泌活性的动态影响

按常规制备 AA 大鼠模型, 于制模 d 7 始 ig 给药, 每天 1 次共 21 d。于 d 14, d 21 及 d 28 分批处死动物, 培养 PMφ 并获得培养上清液, 测定 TNF-α 水平的动态变化。

表 1 可见, AA 模型大鼠其 TNF-α 的分泌水平在 d 14 已明显高于正常对照, 且持续到 d 28。而 LEF 对 AA 模型大鼠 PMφ TNF-α 的分泌水平有明显的抑制作用, 以中剂量组及大剂量组作用强。从动态结果看, d 14 时, AA 模型组 TNF-α 的分泌水平已达到较高水平, LEF 各剂量组均有抑制作用, 随着 LEF 给药时间的延长, 其对 TNF-α 的抑制作用仍然存在, 但仍以中剂量组及大剂量组作用较强; 从对细胞内外 TNF-α 水平的影响的观察发现, LEF 对细胞内、外 TNF-α 分泌水平的影响无明显差异。

Table 1 Dynamics of leflunomide on TNF-α production by peritoneal macrophages in adjuvant arthritis rats

Treatment/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF-alpha level / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$					
	14 d		21 d		28 d	
	Intracellular	Extracellular	Intracellular	Extracellular	Intracellular	Extracellular
Normal Control	40 ± 7	61 ± 28	64 ± 17	105 ± 7	139 ± 20	97 ± 25
Adjuvant arthritis rat control	1487 ± 8**	630 ± 60**	362 ± 24**	1116 ± 64**	669 ± 34**	926 ± 72**
LEF 5	384 ± 16**	283 ± 5**	264 ± 21	358 ± 10**	345 ± 9*	492 ± 40**
LEF 10	23 ± 5***	18 ± 3***	36 ± 6***	13 ± 8***	26 ± 1***	30 ± 3***
LEF 25	20 ± 5***	10 ± 2***	12 ± 4***	24 ± 5***	12 ± 2***	26 ± 10***
Prednisone 5	740 ± 28*	552 ± 4	924 ± 39**	1005 ± 26	1047 ± 5	1174 ± 69*

Adjuvant arthritis (AA) model rats were treated with leflunomide (LEF) at 5, 10 and 25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 21 days. The rats were sacrificed at 14 d, 21 d and 28 d respectively. Peritoneal macrophages were cultured with LPS ($5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) at 37°C , $5\% \text{CO}_2$, saturation humidity for 24 h. The supernatants were harvested and the concentrations of TNF-alpha were quantitated by ELISA method. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs AA model control group

2 A771726 对 AA 模型大鼠 PMφ TNF-α mRNA 表达的影响

培养瓶中加入一系列浓度的 A771726, 作用后以 RT-PCR 方法检测 TNF-α mRNA 表达水平。结果表明, AA 大鼠 PMφ TNF-α mRNA 表达水平明显高于正常对照组的水平。A771726 体外给药对升高了的

TNF-α mRNA 表达水平有一定的抑制作用, 以浓度较高的 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组作用强, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组也有抑制作用(表 2)。

3 A771726 对 AA 模型大鼠滑膜细胞 TNF-α mRNA 表达的影响

以 AA 模型大鼠滑膜细胞为观察对象, 同上法

观察 A771726 对其滑膜细胞 TNF- α mRNA 表达的影响(表 3)。结果发现,AA 模型组大鼠滑膜细胞 TNF- α mRNA 表达高于对照组,A771726 各浓度组作用 48 h 后除 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组对 TNF- α mRNA 表达有一定的抑制作用,其余剂量组无明显影响。

Table 2 Influence of A771726 on the expression of TNF- α mRNA in PM ϕ of adjuvant arthritis rats (*in vitro*)

Group	mRNA level(TNF alpha/ β actin)	Inhibition rate/ %
1640 treated(normal rats)	0.64 \pm 0.20	-
1640 treated(AA rats)	1.58 \pm 0.19 [*]	-
A771726 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.683 \pm 0.028 ^{**}	56.9
A771726 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.73 \pm 0.08 [*]	50.9
A771726 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.2 \pm 0.5	24.5

Rat PM ϕ were treated with A771726 (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 hours incubation. Total cellular RNA was isolated and RT-PCR was performed. Values represent means ($\bar{x} \pm s$) of triplicate experiments. ^{*} $P < 0.05$ vs normal control; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs AA control

Table 3 Influence of A771726 on the expression of TNF- α mRNA inosynovial cells of adjuvant arthritis (AA) rats (*in vitro*) (n = 4, $\bar{x} \pm s$)

Group	mRNA level (TNF- α / β actin)
1640 treated (normal rats)	0.297 \pm 0.015
1640 treated (AA rats)	0.527 \pm 0.025 ^{**}
A771726 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.336 \pm 0.027 [*]
A771726 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.59 \pm 0.18
A771726 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.44 \pm 0.19

Rat synovial cells were treated with A771726 (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 hours incubation. Total cellular RNA was isolated and RT-PCR was performed. Values represent the means of two experiments. ^{**} $P < 0.01$ vs normal control; ^{*} $P < 0.05$ vs AA control

讨 论

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是免疫介导的慢性炎症性疾病。其病理机制尚不清楚,一般认为,RA 起因主要为 T 细胞对未知抗原的反应,T 细胞被激活后,释放淋巴因子(如 IFN- γ),继而激活单核/巨噬细胞释放多种单核因子(IL-1, TNF- α)和其他炎症介质^[9];也与 RA 炎性灶中活化巨噬细胞、淋巴细胞等炎症免疫细胞相互诱导,激活,释放多种细胞因子以及多种蛋白酶和活性氧自由基有关^[10]。TNF- α 主要由巨噬细胞合成,它在 RA 形成中有重要作用,它参与 RA 关节炎,以明显的刺激

增生为特征,可致炎性细胞浸润及新血管形成。在滑膜中,许多细胞是 TNF- α 的作用靶点^[11]。TNF- α 受体(p55 和 p75)已在滑膜衬层的巨噬细胞和成纤维细胞中以及淋巴细胞和滑膜下内皮细胞中检测到^[12]。携带 3'-修饰人 TNF- α 的转基因小鼠表现出 TNF- α 失调和表达的增加,并自发发展为损伤性关节炎^[13],这些均说明 TNF- α 在 RA 形成和发展中的关键作用。

来氟米特(leflunomide, LEF) 是近年新合成的异恶唑类衍生物,据报道有抑制二氢乳清酸盐脱氢酶(DHODase)和抑制酪氨酸蛋白激酶的活性的作用。LEF 的活性代谢产物 A771726 也可通过抑制酪氨酸激酶和 DHODase 的活性,通过影响嘧啶的生物合成发挥作用^[14]。尽管对 LEF 治疗类风湿性关节炎的作用机制有了一定研究,但从 RA 的免疫病理学基础出发,以佐剂性关节炎(AA)大鼠为主要研究对象,探讨 LEF 对 RA 病理改变过程中各种致病因素的影响,尤其是对一些与 RA 发病及病情迁延相关的细胞因子生物活性水平及分子水平改变的影响,还欠深入研究,故我们对其进行了一些探讨。本实验发现,LEF 5, 10 和 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药对 AA 大鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α 的分泌抑制作用较强,10 和 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 两剂量组在 d 14 已显现明显的抑制作用,与 AA 模型组相比,抑制率在 90% 以上,5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组用到 d 28 时作用也十分明显。一般认为,细胞因子的产生过程可分为两个阶段:mRNA 合成和蛋白质的翻译。这两个阶段分别接受不同信号的调节,因此,基因表达的增高,不一定有蛋白质合成的增加。本实验发现,AA 大鼠腹腔巨噬细胞升高了的 TNF- α 的 mRNA 表达与 TNF- α 的合成相一致,且 LEF 对 AA 大鼠腹腔巨噬细胞升高了的 TNF- α 的 mRNA 表达和 TNF- α 的合成均有时间依赖和剂量依赖的抑制作用。发现 LEF 抑制 TNF- α mRNA 表达,表明 LEF 的抑制作用是在基因水平进行的,是发生在转录水平,还是转录后促进基因降解,尚待深入研究。

REFERENCES:

- [1] Xu X, Blinder L, Shen J, *et al.* *In vivo* mechanism by which leflunomide controls lymphoproliferative and autoimmune disease in MRL/MpJ-lpr/lpr mice [J]. *J Immunol*, 1997, **159**(1):167 - 174.
- [2] Elder RT, Xu X, Williams JW, *et al.* The immunosuppressive metabolite of leflunomide, A771726, effects murine T cells through two biochemical mechanisms

- [J]. *J Immunol*, 1997, **159**(1): 22 - 27.
- [3] Goto M, Sasano M, Yamanaka H. Spontaneous production of an interleukin 1 like factor by cloned rheumatoid synovial cells in long-term culture [J]. *J Clin Invest*, 1987, **80**(3): 786 - 792.
- [4] Wang AZ, Wang JC, Fisher GW. Interleukin 1- β stimulated invasion of articular cartilage by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by antibodies to specific integrin receptors and by collagenase inhibitors [J]. *Arthritis Rheum*, 1997, **40**(9): 1298 - 1307.
- [5] Bendele A, McComb J, Gould T, *et al.* Animal models of arthritis relevance to human disease [J]. *Toxicol Pathol*, 1999, **27**(1): 134 - 142.
- [6] Herrmann DB, Bicker IJ. Drugs in autoimmune diseases [J]. *Klin Wochenschr*, 1990, **68** suppl 21(1): 15 - 25.
- [7] Carding SR, Lu D, Bottomly K. A polymerase chain reaction assay for the detection and quantitation of cytokine gene expression in small numbers of cells [J]. *J Immunol Methods*, 1992, **151**(1): 277 - 287.
- [8] Varton K, McLaughlan MT, Lightman S. The kinetics of cytokine mRNA expression in the retina during experimental autoimmune uveoretinitis [J]. *Cell Immunol*, 1995, **164**(1): 133 - 140.
- [9] Harris ED. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy [J]. *N Engl J Med*, 1990, **322**(3): 1277 - 1289.
- [10] Xu SY, Chen MZ. Advance studies on clinical pharmacology of antiinflammatory drugs [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (in Chinese), 1986, **2**(1): 19 - 22.
- [11] Camussi G, Lapia E. The future role of anti-tumor necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Drugs*, 1998, **55**(4): 613 - 620.
- [12] Deleuran BMW, Chu CQ, Field M, *et al.* Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for local actions of tumor necrosis factor- α [J]. *Arthritis Rheum*, 1992, **35**(10): 1170 - 1178.
- [13] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, *et al.* Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis [J]. *EMBO J*, 1991, **10**(8): 4025 - 4031.
- [14] Morris RE. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs [J]. *Ther Drug Monit*, 1995, **17**(2): 564 - 569.

EFFECTS OF LEFLUNOMIDE AND ITS ACTIVE METABOLITE ON THE PRODUCTION AND mRNA EXPRESSION OF TNF- α IN PERITONEAL MACROPHAGES AND SYNOVIAL CELLS WITH ADJUVANT ARTHRITIS IN RATS

LI Weir-dong, LIN Zhi-bin

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Medical Center of Peking University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: AIM To observe the effects of leflunomide (LEF), an isoxazole immunomodulatory agent and its active metabolite, A771726, on the production and mRNA expression of TNF- α in peritoneal macrophages and synovial cells with adjuvant arthritis rats and to further investigate the immunosuppression effects of leflunomide and its mechanisms. **METHODS** ELISA methods were used for assaying the levels of TNF- α . The RF-PCR methods were used for measuring the expression of TNF- α . **RESULTS** The production of TNF- α was increased in the supernatant of PM ϕ in adjuvant arthritis (AA) model rat. LEF (5, 10, 25 mg·kg⁻¹, ig) was shown to inhibit the release of TNF- α from peritoneal macrophages induced by LPS and the inhibitory effects were in a dose-effect relevance manner. A parallel investigation of cytokine mRNA expression was undertaken using semi-quantitative reverse transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR) to follow the kinetics of cytokine appearance in PM ϕ and synovial membrane tissue cells obtained from AA/normal rats treated with A771726. The results of RT-PCR from macrophages and synovial membrane tissue cells of AA rats at the peak of inflammatory phase showed that TNF- α mRNA expression levels were higher than those of normal rats, while the expression of TNF- α mRNA was reduced by treating with A771726 *in vitro*. On the other hand, the TNF- α mRNA expression showed kinetics very similar to those obtained by ELISA technique which measured protein expression. **CONCLUSION** Leflunomide and its active metabolite, A771726, was found to inhibit the production and mRNA expression of TNF- α in peritoneal macrophages and synovial cells with adjuvant arthritis rats model. It might be involved in the mechanisms of its anti-inflammation and immunosuppression.

KEY WORDS: leflunomide; active metabolite; TNF- α ; mRNA expression; adjuvant arthritis rats