

鼠源 T 细胞受体单克隆抗体对 II 型胶原诱导 DBA/1 小鼠关节炎的治疗作用

韩春光¹, 黄火高², 王 琼¹, 高志清¹, 彭明丽¹, 承京霞¹, 刘永学¹

(1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所药理学与毒理学研究室, 北京 100850; 2. 中国人民解放军海军总医院干部保健科, 北京 100037)

摘要:目的 观察鼠源 T 细胞受体(mTCR)单抗对类风湿性关节炎的治疗作用。方法 将 DBA/1 小鼠随机分为正常对照、模型对照、地塞米松 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 mTCR 单抗 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组, 每组 6 只。除正常对照组外, 其余各组小鼠分别在第 1 天和第 22 天皮内注射牛 II 型胶原与完全弗氏佐剂的乳化剂, 制备 II 型胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠模型。地塞米松治疗组于第 29~41 天皮下注射地塞米松磷酸钠注射液, 隔日一次; mTCR 单抗组分别在第 0 天和第 21 天皮下注射 mTCR 单抗各 1 次; 正常和模型对照组皮下注射等体积生理盐水。动态观察小鼠体质量、足掌厚度和关节炎指数的变化, 并计算 CIA 的发生率。给药后第 60 天实验结束, 处死小鼠, HE 染色观察踝关节组织病理变化, 多功能流式液相芯片分析仪测定小鼠血清 γ 干扰素(IFN- γ), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 4(IL-4) 的含量。结果 在第 42 天, 模型组小鼠 CIA 发生率为 6/6, 地塞米松和 mTCR 单抗治疗组分别为 2/6 和 1/6; 第 49 天, 模型组和地塞米松治疗组 CIA 的发生率仍分别为 6/6 和 2/6, mTCR 单抗治疗组升高为 5/6。在整个发病过程中, 地塞米松和 mTCR 单抗治疗组小鼠的足掌厚度和关节炎指数较模型组降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中第 38 天时, 正常对照组、模型组、地塞米松和 mTCR 单抗治疗组小鼠足掌厚度分别为 2.34 ± 0.06 , 2.96 ± 0.49 , 2.61 ± 0.44 和 $(2.29 \pm 0.13) \text{ mm}$; 关节炎指数分别为 0.0 ± 0.0 , 4.0 ± 2.6 , 0.7 ± 1.0 和 0.3 ± 0.8 。实验结束时, 地塞米松和 mTCR 单抗治疗组血清 IL-4 含量分别为 94 ± 12 和 $(105 \pm 38) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 与模型组 $(67 \pm 8) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较明显升高($P < 0.05$); TNF- α 含量分别为 4.8 ± 0.7 和 $(3.8 \pm 0.8) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 与模型组 $(6.7 \pm 1.5) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较明显降低($P < 0.05$); 各组 IFN- γ 含量无明显变化。组织病理观察结果显示, 与模型组相比, 地塞米松和 mTCR 单抗治疗组小鼠踝关节炎症细胞浸润明显减轻, 骨破坏减弱。结论 mTCR 单抗对类风湿性关节炎可能具有治疗作用。

关键词: 受体, 抗原, T 细胞; 抗体, 单克隆; 关节炎, 类风湿

中图分类号: R967 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)01-0091-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.01.017

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性进行性的自身免疫性疾病,以关节滑膜炎和对称性、破坏性的关节病变为主要特征。近年来,免疫分子在 RA 发病中的作用越来越受到人们重视。抗原提呈细胞通过 T 细胞受体(T cell receptors, TCR)与 T 细胞识别,后者在 B7 共刺激因子的作用下被活化,活化的 T 细胞再激活巨噬细胞,由巨噬细胞产生多种炎性细胞因子,这些炎性细胞因子进一步作用于巨噬细胞、成纤维细胞、T 细胞和成骨细胞,通过细胞基质金属蛋白酶和 NF- κ B

受体激活物的配基等导致软骨和骨破坏^[1]。由此提示,TCR 抗体对 RA 可能具有一定的治疗作用。本研究制备 DBA/1 小鼠 II 型胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)小鼠模型,观察鼠源 TCR (mouse TCR, mTCR)单抗对 RA 的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 动物、药物、试剂和仪器

DBA/1 小鼠,体质量 20~24 g,18 周龄,雄性,购自上海药物研究所,SPF 级饲养,动物合格证号: 中科动管会第 001 号。地塞米松磷酸钠注射液,天津金耀氨基酸有限公司; mTCR 单抗,美国 Gene Tex 公司。牛 II 型胶原和完全弗氏佐剂,美国 Chondrex 公司。Luminex200 型多功能流式液相芯片分析仪,美国 Millipore 公司。

基金项目: 国家自然科学基金(81000784)

作者简介: 韩春光(1979-),女,助理研究员,主要从事受体药理学研究。

通讯作者: 刘永学, E-mail: liuyx@bmi.ac.cn, Tel: (010)66932252

1.2 动物分组、模型制备和给药

将 DBA/1 小鼠随机分为正常对照、模型、地塞米松 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 mTCR 单抗 $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 治疗组, 每组 6 只。CIA 小鼠模型的制备按照文献[2]进行。除正常对照组外, 将牛 II 型胶原和完全弗氏佐剂充分混合, 制成胶原乳剂, 含 II 型胶原 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 每只小鼠尾根部皮内 1 次注射 $100 \mu\text{l}$, 将注射当日记为第 1 天, 于第 21 天加强诱导 1 次。地塞米松治疗组于第 29 ~ 41 天皮下注射地塞米松磷酸钠注射液, 隔日一次; mTCR 单抗治疗组分别于第 0 和第 21 天皮下注射给药 1 次; 正常对照和模型对照组皮下注射等体积生理盐水。

1.3 体质量和足掌厚度测量、关节炎评分及 CIA 发生率计算

以电子天平动态称量小鼠体质量, 每周 2 次。以游标卡尺测量小鼠足掌厚度。关节炎炎症指数评分标准: 0 分, 关节正常; 1 分, 关节轻微红肿; 2 分, 关节红肿严重, 累及整个关节; 3 分, 足爪或关节功能障碍, 关节僵硬。每只小鼠的关节炎的总评分为四肢评分的总和, 每只小鼠的最高分值为 12 分, 关节总评分大于 1 的小鼠为建模成功小鼠^[3]。

1.4 踝关节组织病理变化观察

连续观察到给药后第 60 天实验结束, 处死小鼠, 取踝关节进行组织切片, HE 染色, 镜下观察组织病理改变, 包括关节组织炎症细胞浸润和骨骼破坏。

1.5 血清细胞因子测定

连续观察到给药后第 60 天实验结束, 取血清, 通过 Luminex200 液晶芯片分析平台, 测定小鼠血清 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4) 的含量。

1.6 统计学分析

计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 SPSS 软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 mTCR 单抗对 CIA 模型小鼠体质量和足肿胀度的影响

实验过程中, 各组小鼠体质量无明显变化。CIA 发生发展过程中, 小鼠的受累关节首先表现为肿胀, 足掌厚度明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 第 31 ~ 59 天, 地塞米松和 mTCR 单抗治疗组足掌厚度明显降低 ($P < 0.01$) (图 1)。

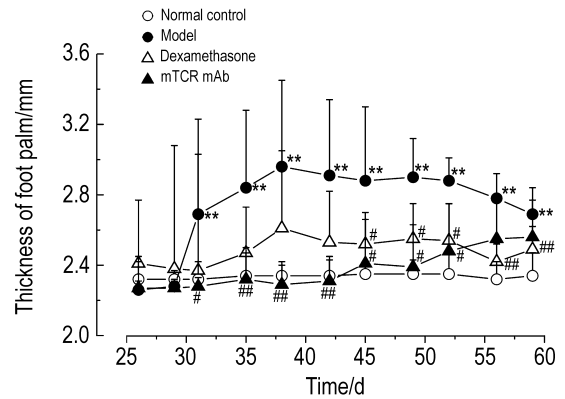


Fig. 1 Effect of mouse monoclonal antibody of T cell receptors (mTCR mAb) on thickness of foot palm of collagen type II induced arthritis (CIA) model mice. On the 1st and 22nd day, bovine type II collagen and complete Freund adjuvant emulsion was injected intradermally in order to prepare the CIA mouse model. From the 29th to 41st day, dexamethasone sodium phosphate injection $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ was sc given to the mice of dexamethasone treatment group every other day. The mice of mTCR mAb group were sc injected mTCR mAb $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ on the 0 (before model preparation) and 21st day, respectively. After administration for 60 d, the thickness of foot palm was measured. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with model group.

2.2 mTCR 单抗对 CIA 模型小鼠关节炎指数的影响

如图 2 所示, 自第 28 天发病开始, CIA 模型组小鼠关节炎指数逐渐增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 地塞米松和 mTCR 单抗治疗组小鼠的炎症指数明显减小 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

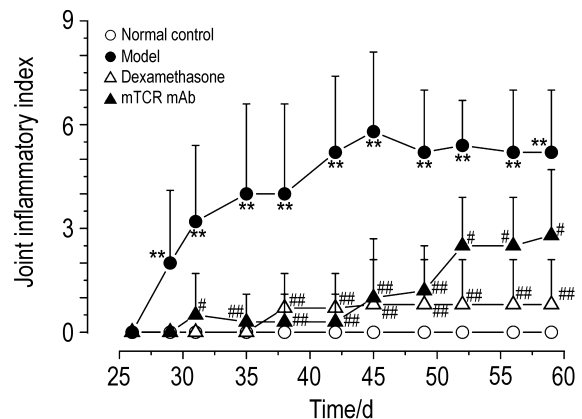


Fig. 2 Effect of mTCR mAb on joint inflammatory index in CIA model mice. See Fig. 1 for the mouse treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with model group.

2.3 mTCR 单抗对 CIA 模型小鼠 CIA 发生率的影响

从第 29 天开始, 模型组小鼠逐渐出现关节红肿和关节活动受限等典型的 CIA 病变。第 42 天, 模型组 CIA 发生率已达 6/6, 地塞米松和 mTCR 单抗治疗组分别为 2/6 和 1/6; 第 49 天, 模型组和地塞米松治疗组 CIA 发生率维持不变, mTCR 单抗治疗组升高为 5/6 (表 1)。

Tab. 1 Effect of mTCR mAb on incidence of CIA in DBA/1 mice

Group	Rate of CIA										
	1	29	31	35	38	42	45	49	52	56	59 (d)
Normal control	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Model	0/6	4/6	5/6	5/6	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Dexamethasone	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6
mTCR mAb	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	2/6	5/6	5/6	5/6	5/6

See Fig. 1 for the mouse treatment.

2.4 mTCR 单抗对 CIA 模型小鼠踝关节组织病理变化的影响

与正常组(图 3A)相比,模型组小鼠踝关节表现为大量炎症细胞浸润,骨侵蚀明显(图 3B);与模型组比较,地塞米松和 mTCR 单抗治疗组小鼠仅有少量炎症细胞浸润,而且骨侵蚀不明显(图 3C,D)。

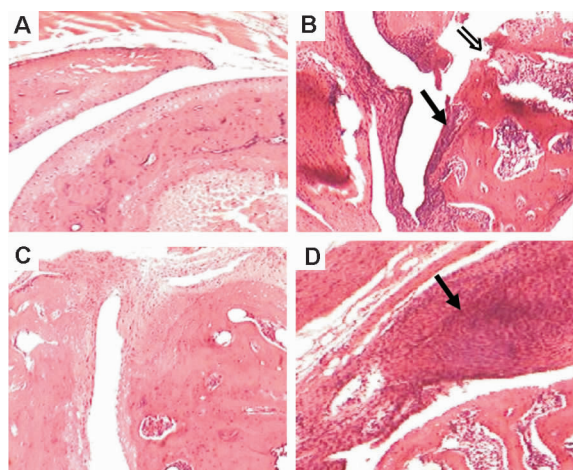


Fig. 3 Effect of mTCR mAb on pathological changes of ankle joints in CIA model mice (200 ×). See Fig. 1 for the mouse treatment. A: normal control; B: model; C: dexamethasone; D: mTCR mAb. ↑: bony erosion; ↓: inflammatory cells infiltrate.

2.5 mTCR 单抗对 CIA 模型小鼠血清 IFN- γ , IL-4 和 TNF- α 含量的影响

表 2 结果显示,与正常组相比,模型组小鼠血清 IL-4 含量明显降低 ($P < 0.05$), TNF- α 含量明显增加 ($P < 0.01$);与模型组相比,地塞米松和 mTCR

Tab. 2 Effect of mTCR mAb on serum concentration of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in CIA model mice

Group	IFN- γ / ng·L ⁻¹	IL-4/ ng·L ⁻¹	TNF- α / ng·L ⁻¹
Normal control	2.0 ± 0.0	106 ± 7	0.8 ± 0.3
Model	2.3 ± 0.6	67 ± 8*	6.7 ± 1.5**
Dexamethasone	2.3 ± 0.6	94 ± 12#	4.8 ± 0.8**
mTCR mAb	2.8 ± 1.9	105 ± 38#	3.8 ± 0.8**

See Fig. 1 for the mouse treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, compared with model group.

单抗治疗组小鼠 IL-4 含量显著增加 ($P < 0.05$), TNF- α 明显降低 ($P < 0.05$);各组小鼠血清 IFN- γ 含量无明显变化。

3 讨论

RA 是一种常见的自身免疫性疾病。T 细胞介导的免疫调节紊乱是其发病机制之一。据报道,RA 受累关节局部 T 细胞数量明显增加,而且病变程度与 T 细胞聚集程度密切相关^[4],提示 T 细胞及其有关的免疫炎症反应参与了 RA 的发生发展过程。因此,免疫反应与炎症细胞、炎症介质和细胞因子等各自作用和相互关系已成为目前治疗 RA 研究的重要内容之一^[5]。

RA 涉及的细胞免疫反应主要与某些特定的 T 细胞亚群有关。TCR 是成熟 T 细胞的特征性标志,与人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 形成 HLA-抗原-TCR 复合物,并激活 T 细胞,是 T 细胞表面特异性识别抗原和介导免疫应答的分子,也是 TCR 单抗有望成为 RA 防治药物的理论基础^[6]。

本研究结果发现,mTCR 单抗可以降低 CIA 的发生率,明显减轻足掌肿胀度,降低关节炎指数,明显降低炎症细胞浸润和骨破坏。由此提示,mTCR 单抗对 CIA 具有一定的治疗作用,也进一步证实 T 细胞参与 RA 的发病过程。但自给药后第 45 天开始,mTCR 单抗治疗组足掌厚度和炎症指数有所升高;第 49 天以后 CIA 发生率升高,接近模型组;上述结果提示本研究 mTCR 单抗的给药方案需进一步改进,如增加给药次数等。

RA 发病过程中 T 辅助细胞 1 (T helper 1, Th1) 和 Th2 平衡失调^[7],它们主要通过分泌不同的细胞因子影响 RA 的发展过程。Th1 细胞产生 IFN- γ , IL-2 和 TNF- α 等,参与细胞免疫反应;Th2 细胞产生 IL-4 和 IL-10 等,参与体液免疫反应。本研究结果表明,模型组小鼠血清 TNF- α 水平显著高于正常对照组,IL-4 水平低于正常对照组;与模型组相比,地塞米松和 mTCR 单抗治疗组血清 TNF- α 含量明显降低,IL-4 含量明显升高,提示 CIA 模型小鼠 Th1/Th2 平衡失调,地塞米松和 mTCR 单抗

均可恢复其平衡, mTCR 单抗对 CIA 的治疗作用可能与调节细胞因子水平、恢复 Th1/Th2 平衡有关。

参考文献:

- [1] Xi ZD, Zhang DQ, Zhang YY, Zang JW. Research advances on collagen-induced arthritis in mice[J]. *Nat Mag* (自然杂志), 2003, **25**(1):46-41.
- [2] Cheng JX, Han CG, Wang Q, Xu JP, Liu YX. Characterization of collagen induced arthritis in DBA/1 mice[J]. *Pharm J Chin PLA*(解放军药学报), 2007, **23**(2):94-96.
- [3] Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis [J]. *Cell Immunol*, 2008, **251**(2):109-115.
- [4] Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2009, **76**(1):10-14.
- [5] Kato I, Endo-Tanaka K, Yokokura T. Suppressive effects of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice [J]. *Life Sci*, 1998, **63**(8):635-644.
- [6] Cush JJ, Lipsky PE. Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1988, **31**(10):1230-1238.
- [7] Raychaudhuri S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2010, **22**(2):109-118.

Effect of mouse monoclonal antibody against T cell receptor on collagen type II-induced arthritis in DBA/1 mice

HAN Chun-guang¹, HUANG Huo-gao², WANG Qiong¹, GAO Zhi-qing¹, PENG Ming-li¹,
CHENG Jing-xia¹, LIU Yong-xue¹

(1. Department of Pharmacology and Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Cadre Health Care Department, Navy General Hospital, Beijing 100037, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the effect of mouse monoclonal antibody against T cell receptor (mTCR mAb) on rheumatoid arthritis. **METHODS** Male DBA/1 mice were randomly divided into normal control, type II collagen-induced arthritis (CIA) model, dexamethasone and mTCR mAb treated groups. To induce the mouse CIA model, 100 μ l of bovine type II collagen and complete Freund adjuvant mixture emulsion was intracutaneously injected into each mouse on the 1st and 22nd day. Dexamethasone 0.5 mg·kg⁻¹ was sc given to CIA mice on the 29th to 41st day, once every two days. mTCR mAb 25 mg·kg⁻¹ was sc given on the 0 (before model preparation) and 21st day. The body mass, foot palm thickness, joint inflammatory index and pathological changes of each mouse were observed. On the 60th day the experiment was finished, and the serum level of interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-4 (IL-4) was measured using Luminex200 LCD chip analysis platform. **RESULTS** On the 42nd day, the incidence of CIA in the model, dexamethasone and mTCR mAb groups was 6/6, 2/6 and 1/6, respectively. On the 49th day, the incidence in mTCR mAb group reached 5/6 but remained unchanged in the other groups. Compared with model group, the mice of dexamethasone and mTCR mAb groups showed improvement of foot palm thickness, joint inflammatory index and pathological changes. On the 38th day, the thickness of paws in normal control, model, dexamethasone and mTCR mAb groups was 2.34 \pm 0.06, 2.96 \pm 0.49, 2.61 \pm 0.44 and (2.29 \pm 0.13) mm, respectively, and the joint inflammatory index was 0.0 \pm 0.0, 4.0 \pm 2.6, 0.7 \pm 1.0 and 0.3 \pm 0.8. At the end of the experiment, the serum level of IL-4 in normal control, model, dexamethasone and mTCR mAb groups was 106 \pm 7, 67 \pm 8, 94 \pm 12 and (105 \pm 38) ng·L⁻¹, TNF- α was 0.8 \pm 0.3, 6.7 \pm 1.5, 4.8 \pm 0.8 and (3.8 \pm 0.8) ng·L⁻¹ and IFN- γ was 2.0 \pm 0.0, 2.3 \pm 0.6, 2.3 \pm 0.6 and (2.8 \pm 1.9) ng·L⁻¹. **CONCLUSION** mTCR mAb exerts therapeutic effect on rheumatoid arthritis.

Key words: receptors, antigen, T cell; antibodies, monoclonal; arthritis, rheumatoid

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(81000784)

Corresponding author: LIU Yong-xue, E-mail: liuyx@bmi.ac.cn, Tel: (010)66932252

(收稿日期: 2012-04-06 接受日期: 2012-10-02)

(本文编辑: 齐春会)