

大鼠类风湿性关节炎药效学指标及检测方法

孙玉亮, 池建淮, 万毅, 余炜, 孙世红, 侯杰

安徽中医学院, 安徽 合肥 230038

摘要: 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎、破坏性关节病变为主要特征的慢性、进行性、侵袭性自身免疫性疾病, 致畸、致残率极高且大多数患者反复发作。目前, 改善临床症状的抗风湿药是治疗 RA 的主要手段, 但由于传统抗风湿药的不良反应较大, 而生物制剂价格昂贵, 因而患者长期服用依从性差, 不利于疾病控制。因此研制开发有效、不良反应小的抗风湿药物势在必行。研究并建立合理有效的 RA 动物模型是研制开发有效治疗药物和制订有效治疗措施的关键, 而正确的检测也能准确地反映出药物的疗效。因此以 Wistar 大鼠为试验动物, 对其进行免疫, 从关节炎指数评定、血清学、病理学和影像学检测等方面进行综合评价, 从而测评抗风湿药物药效。

关键词: 类风湿性关节炎; 一般状态观察; 关节肿胀程度; 免疫学检测; 病理学检测; 影像学检测

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2012)02-0136-04

Testing indexes and methods in pharmacodynamics experiment of rheumatoid arthritis with rats

SUN Yu-liang, CHI Jian-huai, WAN Yi, YU Wei, SUN Shi-hong, HOU Jie

Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, progressive, and aggressive autoimmune disease, the main characters of which include joint synovial inflammation and destructive arthropathy. RA is teratogenic and most of the patients are with high morbidity repeated attacks in the duration of symptoms. At present, medicine to improve the clinical symptoms of rheumatism is the main treatment for RA. But because of the side effects of traditional medicine and the cost of biological agents, patients have poor compliance in long-term use and there are difficulties in disease control. Therefore it is imperative to develop effective antirheumatic agents, with small side effects. To study and establish an effective rheumatoid arthritis animal model is the key to develop effective drugs and make effective treatment measures. Appropriate testing also could reflect the therapeutic efficacy of drugs accurately. So Wistar rats on the immune were used as test animals, and arthritis index evaluation, serologic, pathologic, and iconographic detection were carried out so as to evaluate the potency of antirheumatic agents.

Key words: rheumatoid arthritis (RA); general state observation; joint swelling degree; immunological characteristics; pathology testing; Imaging detection

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎为特征, 以慢性多发性关节炎为主要临床表现的全身免疫性疾病, 能导致晚期关节畸形、功能活动障碍, 最终导致不同程度的残疾, 甚至影响心、肾、脊椎功能, 是主要的致残性疾病之一, 严重影响人类健康^[1-2]。因此, 研制有效、不良反应小的药物刻不容缓。而正确的检测指标及方法对评定药物的疗效有着举足轻重的作用。

1 一般状态观察

正常大鼠精神状态良好, 能正常觅食、饮水,

体质量稳定, 被毛光泽, 行为活跃。而免疫后的大鼠精神萎靡、倦怠, 进食减少, 体质量减轻, 毛发失去光泽, 活跃度降低。因此, 在进行药物治疗后, 可以通过对大鼠状态的观察, 对药物的作用效果进行初步判断。

2 关节肿胀程度的评价

免疫后的大鼠因病情的不同变化, 会出现足跖部的肿胀。根据有关关节炎实验动物研究的文献报道^[3], 多数采用关节炎指数评定或用游标卡尺测量足跖部肿胀度作为评价关节炎肿胀程度的依据。前

收稿日期: 2012-01-11

基金项目: 安徽省教育厅自然科学自筹重点项目 (100408)

作者简介: 孙玉亮, 硕士研究生。Tel: 13856029425 E-mail: sunyuliang2004@sina.com

者的评价标准为5级评分法:0分,无关节炎;1分,个别足趾发红、肿胀;2分,大部分足趾及足底肿胀;3分,踝关节及以下肿胀;4分,肿胀累及踝关节以上且不能负重。后者用游标卡尺测量实验动物足跖部肿胀度,分别测量3次,取平均值。因此,可以通过对大鼠进行关节肿胀程度的评定,来判断大鼠的预后状况,进而进行药效评定。

3 免疫学检测

随机选取大鼠,ip给予10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,断颈处死,迅速腹股沟动脉取血,于3 000 r/min离心15 min后,取上清液,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测抗体^[4]。

3.1 自身抗体

RA患者血清中可出现多种自身抗体。除传统的类风湿因子外,近年来又发现了对RA诊断及研究均有意义的多种自身抗体^[5],包括抗核周因子、抗角蛋白抗体及抗RA33/36抗体等。对这些抗体的检测可以更好地反映大鼠的预后情况及药物的疗效。

3.1.1 类风湿因子(RF) 1912年发现RA患者血清中含有RF,这对该病的诊断和发病机制的研究具有重要意义,但RF并不是一项足以令人满意的诊断指标,因为RF在RA患者中的检出率不高,特异性较低,在早期往往呈阴性,RF阳性也可见于慢性感染、其他结缔组织疾病和正常的老年人。近年来随着各种新的检测方法相继出现,检出率不断提高。RF可分为IgM、IgA、IgG及IgE 4种类型,其中IgM、IgA易于检测,对RA诊断有较好的参考价值^[6]。

3.1.2 抗核周因子(APF) RA患者中APF阳性率为48.6%~86.0%,血清滴度亦远高于其他结缔组织病。该抗体诊断RA的特异性为72.7%~90%。文献中该抗体阳性率的差异可能与底物制作技术、保存条件及阳性标准的设定有关。APF的阳性率可高于RF。大约1/3的RF阴性的RA患者可检出APF。因此,APF测定在一定的程度上可弥补RF的不足。研究证明,APF可出现于RA的早期阶段,而HLA-DR4/DRI阳性的RA患者有较高的APF阳性率。

3.1.3 抗角蛋白抗体(AKA) 在RA患者中,AKA的阳性率为60%~73%。其特异性达87%~95%^[7]。AKA可见于早期RA患者,发病1年内,38%的患者该抗体为阳性。多数研究认为,同时检查AKA与APF可提高对RA的诊断水平。近几年国内已有

不少单位开展了这项工作。

3.1.4 抗SA抗体 抗SA抗体阳性率达68.4%^[8]。SA抗体对RA诊断的特异性为78%~97%。在发病1年内的早期RA患者,抗SA抗体的阳性率达29%。在血清RF阴性的RA患者中,抗SA抗体阳性率为27%。

3.1.5 抗II型胶原抗体(anti collagen type II) II型胶原是关节软骨的主要成分,63%的RA患者的天然II型胶原抗体以IgG型抗体为主^[9]。II型胶原抗体对于RA的诊断特异性可达97%,且在早期类风湿患者中的阳性率高于晚期RA患者,而且有助于RA的早期诊断。

3.2 急性时相反应物指标

3.2.1 C-反应蛋白 C-反应蛋白是一种能很好反映RA病情的指标。C-反应蛋白与病情活动指数、晨僵时间、握力、关节疼痛及肿胀指数、血沉和血红蛋白水平密切相关。病情缓解时C-反应蛋白下降、反之则上升。

3.2.2 血沉 是一种操作简便、重复性好的急性时相反应指标。一般说来,血沉与RA的活动性有关。病情加重则血沉增快,而病情缓解时血沉可恢复至正常。应当指出,血沉只是反映病情的指标之一,并受到多种因素的影响。而且,约有5%的RA患者在病情活动时血沉并不增快。

因此,判断RA活动程度应以临床症状和体征为主,血沉及C-反应蛋白等作为参考指标^[10]。

3.3 细胞免疫功能的检测

3.3.1 淋巴细胞亚群 近些年研究结果表明,RA除了体液免疫异常外,还有明显的细胞免疫异常,细胞免疫的调节异常是本病的关键,也已成为RA发病机制研究的重点。CD3⁺即为总T淋巴细胞,可分为两个主要亚群:CD4⁺和CD8⁺细胞。CD4⁺为辅助/诱导细胞(Th/Ti),具有辅助T细胞转变为效应细胞,B细胞生成抗体和巨噬细胞活化等功能,起辅助、诱导细胞及体液免疫的作用;CD8⁺为抑制/杀伤细胞(Ts/CTL),具有抑制T细胞活化,抑制B细胞产生抗体和产生细胞毒作用,起抑制细胞及体液免疫的作用。RA患者与正常人比较,CD3⁺、CD4⁺无变化,而CD8⁺明显减少,CD4⁺/CD8⁺值明显升高。RA滑膜CD4⁺/CD8⁺值在一定程度上反映其疾病的病期、活动性和严重性,对早期RA的诊断可能提供一定的帮助。

3.3.2 白细胞介素 RA是免疫介导的慢性炎症性

疾病,因此多种细胞因子直接或间接介导炎症和组织损伤。目前比较有诊断价值的细胞因子有白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 2 及其可溶性受体(IL-2、sIL-2R)、白细胞介素 6(IL-6)和白细胞介素 8(IL-8)等。IL-1 主要由活化的单核巨噬细胞产生,RA 患者单核细胞分泌 IL-1 明显增高,血中 IL-1 浓度升高,而且与 RA 活动度(如贫血)相关。IL-1 既是免疫调节因子,又是炎症介质,在 RA 发病过程中起重要作用。IL-2 主要由成熟的 T 淋巴细胞(CD4 细胞为主)产生,RA 患者无论在血液还是在关节液中 IL-2 量均明显减少,导致了免疫调节功能紊乱,因此 IL-2 在 RA 致病过程的异常免疫应答中起关键性作用。sIL-2R 是 T 淋巴细胞活化后,膜 IL-2Ra 链,即 Tac 抗原脱落所致。RA 患者血清 sIL-2R 水平显著高于对照组,且浓度变化与 RF 阳性检出率相平行,在 RF 阴、阳性两组中有显著差异。在 RA 活动期水平明显高于非活动期,提示 RA 患者有异常增多的激活免疫细胞。另外血清 sIL-2R 水平还与 RA 患者的关节僵硬、肿痛等症状及血沉、C 反应蛋白等明显相关,所以测定 sIL-2R 对于 RA 患者的早期诊断或鉴别诊断很有意义。IL-6 是一种具有重要生物学活性的细胞因子,它由多种淋巴及非淋巴类免疫细胞(T、B 细胞、单核巨噬细胞、成纤维细胞等)产生,对机体多种组织及细胞均有不同程度的作用。RA 患者血清中 IL-6 水平明显高于正常人和骨性关节炎对照组,在活动期 RA 患者的滑膜液内也检测到异常升高的 IL-6。IL-6 水平还与 RA 病变程度有关,病情好转后,血清中增高的 IL-6 水平迅速下降,IL-6 是 RA 病程进展的一个重要病理因子。IL-8 是多种细胞产生的具有趋化中性粒细胞、T 淋巴细胞、参与炎症反应的细胞因子,RA 患者血清 IL-8 水平明显升高。有人在 RA 患者关节滑液中检出高水平的 IL-8,IL-8 在 IL-1 存在条件下,可破坏软骨酶。因此推测 IL-8 是致关节损伤的炎症因子之一。

3.3.3 肿瘤坏死因子(TNF- α) RA 是活性 T 细胞浸润引起滑膜血管增殖及血管翳形成,导致关节软骨和骨质破坏。TNF- α 是一种促炎性细胞因子,在免疫反应、炎症和对损伤的反应中起重要作用,主要影响细胞增殖和细胞凋亡的调节,并与其他细胞因子一起形成复杂的免疫网络。在 RA 炎症局部细胞因子相互作用网络中,TNF 起着很关键的作用^[11]。

在 RA 患者体内中,TNF- α 主要由外周血单核

细胞和关节滑膜的巨噬细胞分泌,其他类型的细胞如淋巴细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等在一定条件下也具有产生和释放 TNF- α 的能力。关节病变组织中检测的多是 TNF- α ,在 RA 患者的血清、关节滑膜和关节液中,TNF- α 均有很高的表达。在疾病活动期或进展期,TNF 呈高水平分泌,导致一系列临床症状及局部关节组织的破坏,慢性期 TNF 水平相对较低且稳定,其浓度的高低与 RA 患者的严重程度一致^[12]。动物实验证明,中和 TNF- α 能降低关节炎的严重程度^[13]。RA 患者治疗后,血清 TNF- α 水平随同期关节炎活动指数的改善而显著下降,提示 RA 疗效可表现在细胞因子水平的下降。因此 TNF- α 水平检测可作为判断 RA 临床疾病活动指标之一。

4 病理学检测

大鼠断颈处死,剪取踝关节,厚度小于 0.5 cm,面积小于 15 cm $\times$ 15 cm,标记近端、远端;迅速置于 10%甲醛固定脱钙液中,脱钙时间以 2~3 d 为标准至针刺组织无抵抗时为止。脱钙时禁盖瓶盖,以使脱钙时产生的气泡逸出。脱钙处理后进行石蜡包埋、切片,最后用苏木精和伊红染色,镜下观察^[14]。

正常大鼠的组织切片,可见清晰的关节腔,滑膜由 1~3 层滑膜细胞组成并有序排列。滑膜组织中无炎性细胞浸润,无纤维组织增生,关节软骨表面光滑,骨纤维整齐排列。而在免疫的大鼠中可见滑膜组织中淋巴细胞浸润,关节腔中可见炎症细胞。同时见到滑膜增生,排列疏散、紊乱,滑膜下纤维素增生,胶原纤维沉着,并可见到滑膜脂肪垫水肿,炎性细胞浸润等现象。比较不同治疗阶段大鼠的病理切片变化,可以清晰地看到药物的作用效果。

5 影像学检测

随机选取大鼠,ip 给予 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,并将其仰位固定于 X 射线操作台上,进行足部及踝关节处的 X 光片照射。观察和比较大鼠足部及踝关节处的组织形态的改变。

正常大鼠踝关节 X 片显示,大鼠软组织无肿胀,关节结构完整,骨质无破坏,足趾小关节间隙清楚^[15]。而免疫后的大鼠,可见骨关节边缘模糊,表面软骨破坏,骨质侵蚀。同时新生骨增生明显,并在趾节间、腕骨等部位出现骨关节僵硬。因此,X 线对于疗效的检测也是一个不错的方法。

6 结语

总之,随着科学技术的不断发展,检测工具的

不断研制和发明,越来越多的针对 RA 检测方法将被发现,实验的结果也将越来越可信。这对于更快研制出新的、疗效好的药物有着重大意义。

参考文献

- [1] 胡长玲,林兵,郑承剑,等. 抗类风湿性关节炎的天然药物及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1435-1440.
- [2] 李霞兰,王少军,杨艳平,等. 中西医结合治疗类风湿性关节炎临床研究概况 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 附 2-附 4.
- [3] 白洪宇. 大鼠类风湿性关节炎实验模型的建立与评价 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [4] 柴铁玲. 类风湿性关节炎动物模型在中医药研究中的进展及思考 [J]. 环球中医药, 2011, 4(3): 215-217.
- [5] 由艳秋. 各种检验指标在类风湿性关节炎诊断中的应用 [J]. 黑龙江医学, 2011, 35(8): 566-569.
- [6] 赵文秀,李妍. 类风湿性关节炎的免疫学诊断研究进展 [J]. 解放军医学高等专科学校学报, 1999, 27(2): 152-154.
- [7] 胡朝英,钱柳,张冬青. 类风湿性关节炎免疫学研究进展 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2011, 31(7): 1035-1040.
- [8] 白洲霞. 类风湿性关节炎实验室检测指标的分析探讨 [J]. 甘肃中医学院学报, 2006, 21(3): 50-52.
- [9] 府伟灵. 临床检验学实用技术与新进展 [M]. 人民军医出版社, 2005.
- [10] 韩冰,张家颖,武广恒,等. 大鼠类风湿性关节炎动物模型制备及血沉和组织学检测 [J]. 吉林医学, 2009, 30(7): 587-588.
- [11] Rangnathan P. Pharmacogenomics of tumor necrosis factor antagonists in rheumatoid arthritis [J]. *Pharmacogenomics*, 2005, 6(5): 481-490.
- [12] Robak T, Gladalska A, Stepień H. The tumor necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9(2): 145-154.
- [13] Baumgartner S W. Tumor necrosis factor inactivation in the management of rheumatoid arthritis [J]. *South Med J*, 2000, 93(8): 753-759.
- [14] Lipsky P E, van der Heijde D M, St Clair E W, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. anti tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study group [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(22): 1594-1602.
- [15] 张声鹏,施旭光,赖天松. 中医药治疗类风湿性关节炎实验研究的动物模型研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(10): 65-67.