

氨甲喋呤 (MTX) 治疗类风湿性关节炎的免疫调节机制

陆 意 邵传森¹ 沈建根 鲍建芳 (舟山 316004 浙江海洋学院医学院免疫学教研室;¹ 浙江大学医学院免疫学教研室)

摘要 目的:探讨 MTX 治疗类风湿性关节炎(RA)的免疫学机制,为临床 MTX 治疗 RA 提供理论依据。方法:在建立佐剂型关节炎(AA)动物模型基础上,通过关节炎指数评价,血清中细胞因子测定和关节切片的病理学检查,观察 MTX 对促炎症细胞因子如 IL-1 β 、TNF- α 和抗炎细胞因子 IL-4、IL-10 的调控作用。结果:MTX 预防组和对照组关节炎指数和发病率的变化均无显著差异($P>0.05$)。MTX 肌肉注射治疗或外用治疗后,关节炎指数发生较显著的变化与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。对照组与 MTX 预防组、MTX 肌肉注射组、MTX 外用组血清中细胞因子水平相比,对照组与各组 TNF- α 和 IL-10 的水平有明显差异, $P<0.05$,MTX 肌肉注射组与 MTX 外用组的 TNF- α 水平相差很大, $P<0.05$ 。而 IL-1 β 、IL-4 的水平各组之间没有明显差异, $P>0.05$ 。病理组织学变化中炎症程度:对照组>MTX 预防组>MTX 肌肉注射组>MTX 外用组。结论:本研究结果表明,MTX 治疗(肌肉注射和外用)可以降低 AA 大鼠血清中 TNF- α 浓度,提高 IL-10 的浓度,从而抑制或控制 RA 的发生发展。但 MTX 治疗对 IL-1 β 和 IL-4 没有明显作用,这方面的机制尚需进一步研究。

关键词 MTX; IL-1; IL-4; IL-10; TNF; 类风湿性关节炎

The immune regulation mechanism of treatment rheumatoid arthritis with methotrexate

Lu yi, Shao chuansen, Shen jiangen, Bao jianfang (Medical College of Zhejiang Ocean university, Zhoushan 316004)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** In this study, we will explore the immune mechanism of treatment rheumatoid arthritis with methotrexate and provide the experimental basis for clinical therapy. **METHOD:** We established an experimental adjuvant arthritis, arthritis assessment, serum cytokine measurement and histologic analyses were performed, observe MTX regulative effect on proinflammation cytokine such as IL-1 β , TNF- α and anti-inflammation cytokine such as IL-4 and IL-10. **RESULTS:** arthritis assessment and the incidence of the arthritis in Rats treated with MTX was comparable with that in controls. Rats treated with MTX (muscle injection or external use MTX) had a significantly lower arthritis assessment compared with untreated control. The result showed that the level of TNF- α and IL-10 in control group was significantly lower than these groups of that MTX prevention, MTX treatment (muscle injection and external use) ($P<0.05$). The level of TNF- α in MTX muscle injection group has a significantly lower compared with that in MTX external use group ($P<0.05$). There was no significant difference between MTX treatment group and control group in the level of IL-1 β and IL-4 ($P>0.05$). The severity of inflammation is control > MTX prevention > MTX muscle injection > MTX external use in the change of histologic finding. **CONCLUSION:** This study showed that MTX treatment (muscle injection and external use) can reduce the concentration of TNF- α and increase the concentration of IL-10 in serum of AA rats, and inhibit or control occurrence and progress of RA. But MTX treatment had no significant influence on the level of IL-1 β and IL-4, the mechanism should be further studied.

KEY WORDS IL-1, IL-4, IL-10, TNF, rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种慢性、系统性疾病,以对称性多关节炎,最终导致进行性关节破坏为特征^[1]。RA的基本组织学变化是关节炎症、滑膜增生、滑膜纤维侵入到邻近的软骨和骨中^[2],这是由基质降解酶持续释放而引起。虽然RA的病原学还不清楚,但大量资料表明T淋巴细胞、巨噬细胞和增生的滑膜细胞很可能在这种疾病的发病机制中起主要作用,特别是这些细胞产生的细胞因子在RA的发生和发展中具有极其重要的作用^[3]。在RA的滑膜液中和滑膜上,已发现巨噬细胞和成纤维细胞释放的白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可通过调节细胞迁移,活化T、B淋巴细胞,造成软骨破坏和滑膜增生^[4],因而在RA发病机制中发挥重要作用。

最近研究证明,通过调节RA病人体内细胞因子水平可达到治疗这些疾病的目的^[5]。佐剂型关节炎(Adjuvant Arthritis, AA)是研究RA及评价防治RA药物的常用动物模型,其病理表现与RA基本相似,故本研究以AA为模型,观察MTX对参与炎症细胞因子IL-1 β 、TNF- α 和抗炎细胞因子IL-4、IL-10的调控作用,探讨MTX治疗RA的免疫学机制,为临床MTX治疗RA提供理论依据。现将实验结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性SD大鼠,体重为 100 ± 10 g,由浙大医学院实验动

物中心提供,二级动物房饲养。

1.1.2 主要试剂

- (1) 弗氏完全佐剂(CFA)^[10]:制备方法参见文献^[10]
- (2) MTX :上海华联制药有限公司产品(5 mg/支)。
- (3) MTX外用制剂:取单硬脂酸甘油酯、硬脂酸、白凡士林、羊毛脂与液体石蜡,置容器中加热熔化,并保持 80℃;另取三乙醇胺溶于蒸馏水中,加热至 80℃,缓缓加入上述油相中按同一方向搅拌至呈白色膏状,冷凝后,取 20 ml 加入 5 mg MTX,搅拌均匀即成。
- (4) 细胞因子测定试剂盒:TNF、IL-1 β 、IL-4 为 ENDOGEN 公司产品,IL-10 为 R&D SYSTEMS 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组、给药及血清的收集 作预防性用药和治疗性用药效果观察。

预防性用药 将大鼠随机分成 2 组:MTX 预防组和空白对照组。在诱导 AA 模型的同一天,MTX 预防组大鼠肌肉注射 0.75 mg/kg MTX 1 次,以后每周重复注射 1 次,持续四周。空白对照组大鼠注射等量生理盐水。在致炎后第 28 天记录各组大鼠 AA 的发病率,按文献^[7]进行关节炎指数评估,采集动物血液,分离血清,低温保存待检。

治疗性用药 大鼠用 CFA 诱导 AA,第 18 天将诱导成功的大鼠随机分成 3 组(每组 7 只),即:MTX 肌注治疗组、MTX 外用治疗组和空白对照组。MTX 肌注治疗组:每周肌肉注射一次,剂量为 0.75 mg/kg 持续四周。MTX 外用治疗组:每周关节局部外用膏一次,持续四周。第 4 周按上法进行关节炎指数评估,采集血清,保存待检。

1.2.2 大鼠 AA 模型的诱导及关节炎评估:按文献^[8]加以改良。于 SD 大鼠尾根部和足垫皮内分别注射 CFA0.05 ml,致炎后 15 天大鼠后足相继出现关节炎症状。

1.2.3 细胞因子测定:IL-1 β 、IL-4、IL-10 及 TNF- α 的测定均采用进口 ELISA 试剂盒进行。

1.2.4 病理学检查:将对照组、预防组、治疗组(包括肌肉注射组和外用组)的关节,用甲醛固定、石蜡包埋,切片以苏木素和曙红染色,光镜下观察关节损坏程度。

1.2.5 统计学处理:实验数据经 SPSS 7.0 FOR WIN 软件处理,统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用 ANOVA 和 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 MTX 对 AA 的预防作用

2.1.1 MTX 预防组和对照组关节炎指数和发病率的比较

在 CFA 注射后 14 天,MTX 预防组 7 只 SD 大鼠中有 6 只发病,发病率为 85%。关节炎指数为 2.8 ± 0.74 。对照组,共 10 只大鼠,其中 9 只大鼠发病,发病率为 90%。关节炎指数为 3.4 ± 0.90 。两组的发病率和关节炎指数均无显著差异($P > 0.05$)。(见表-1)

2.1.2 MTX 预防组和对照组血清细胞因子含量比较

用酶标法测定 MTX 预防组和对照组血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 和 IL-4 的含量,结果见表 2。经统计学处理,预防组血清中 TNF- α 和 IL-10 含量与对照组相比 $P < 0.05$,具有

显著的统计学意义。

表-1 MTX 预防组和对照组血清细胞因子含量比较($n = 7$)

组 别	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
对照组	246.1 $\pm$ 29.3	4.6 $\pm$ 6.0	38.5 $\pm$ 7.4	27.8 $\pm$ 1.2
预防组	29.3 $\pm$ 24.4 ★	39.7 $\pm$ 6.7 ★	50.5 $\pm$ 10.3	26.4 $\pm$ 1.3

★ 与对照组相比 $P < 0.05$ 。

2.1.3 MTX 预防组和对照组病理变化的比较

两组病例均可见滑膜及皮下组织血管扩张、充血、水肿,滑膜表层的细胞增生、肥大,以对照组较明显,间质可见大量巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞及少量中性粒细胞浸润,还可见脓肿形成,炎症程度:对照组 > 预防组。

2.2 MTX 对大鼠 AA 的治疗作用

2.2.1 MTX 治疗组与对照组关节炎指数的比较

关节炎大鼠经 MTX 肌肉注射治疗或外用治疗后,关节炎指数发生较显著的变化,肌肉注射组关节炎指数为 1.0 ± 0.63 ,外用组关节炎指数为 1.4 ± 0.49 ,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。而肌注组与外用组在关节炎指数没有明显差异($P > 0.05$)(见表-3)。

表-2 MTX 治疗对大鼠 AA 关节炎指数的影响($n = 7$)

组 别	剂量 (MTX 含量 mg/kg)	发病大鼠关节炎指数
对照组	0.00	3.4 $\pm$ 0.90
MTX 肌注组	0.75	1.0 $\pm$ 0.63 ★
MTX 外用组	/	1.4 $\pm$ 0.49 ★

★ 与对照组相比 $P < 0.05$

2.2.2 MTX 治疗组与对照组细胞因子水平的比较

用酶标法测定 MTX 肌注治疗组、外用治疗组和对照组血清中 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 、IL-4 的含量,结果显示肌注治疗组和外用治疗组血清中的 TNF- α 含量明显低于对照组($P < 0.05$);肌注治疗组和外用治疗组血清中的 IL-10 含量明显高于对照组($P < 0.05$)。三组中的 IL-1 β 和 IL-4 含量无明显变化($P > 0.05$),见表-4。

表-4 MTX 治疗组与对照组细胞因子的比较($n = 7$)

组 别	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
对照组	246.1 $\pm$ 29.3	4.6 $\pm$ 6.0	38.5 $\pm$ 7.4	27.8 $\pm$ 1.2
MTX 肌注组	3.4 $\pm$ 21.0 *	33.4 $\pm$ 12.0 *	28.6 $\pm$ 5.9	24.7 $\pm$ 1.2
MTX 外用组	62.5 $\pm$ 19.3 *	39.1 $\pm$ 3.8 *	37.6 $\pm$ 4.9	25.2 $\pm$ 1.2

* 与对照组相比 $P < 0.05$ 。

2.2.3 MTX 治疗组与对照组病理变化的比较

对照组可见滑膜及皮下组织血管扩张、充血、水肿,滑膜表层的细胞有明显增生、肥大,间质可见大量巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞及少量中性粒细胞浸润,还可见脓肿形成,而 MTX 治疗组有轻微的滑膜及皮下组织血管扩张、充血、水肿,滑膜表层的细胞增生、肥大,间质可见少量巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞及少量中性粒细胞浸润,未见脓肿形成,炎症严重程度为对照组 > 治疗组。

3 讨论

MTX 是一种用于 RA 病人治疗的有效药物,可选择性地调节 T 细胞和巨噬细胞的细胞因子产生。Marriten C^[9]等

研究表明,MTX可以减少 RA 病人滑膜组织中细胞浸润,主要是巨噬细胞和 T 细胞,MTX 治疗 4 个月后 RA 病人滑膜组织中 TNF- α 和 IL-1 β 含量下降。本实验采用大鼠 AA 模型,分别通过 MTX 预防、肌肉注射治疗和外用治疗三种方法,来探讨 MTX 的作用机制。

在诱导 AA 的同时,用 MTX 进行预防性保护,结果显示 MTX 与 CFA 同时注射,不能明显降低关节炎的发病率和关节炎指数,提示 MTX 对关节炎的发病无有效的抑制作用,抑或本实验组动物数较少,未显示统计学差异。而用 MTX 治疗(肌肉注射和外用)后,关节炎指数下降明显,说明 MTX 治疗对于改善关节局部肿胀等症状,减轻关节炎病变具有一定的作用。

许多研究证实,RA 患者外周血单核细胞和关节滑膜液的巨噬细胞能分泌 IL-1 和 TNF- α ,使外周血和关节滑液中 IL-1 和 TNF- α 增高^[10]。IL-1 和 TNF- α 是 RA 发病机制中重要的促炎症细胞因子,构成 RA 滑膜病变的病理基础,高表达的 IL-1 和 TNF- α 可刺激滑膜细胞和软骨细胞产生基质金属酶、胶原酶等,导致滑膜炎、软骨破坏,同时可激活破骨细胞,产生骨溶解^[11]。而与之拮抗的抗炎症细胞因子如 IL-10、IL-4 则在 RA 病变局部中明显下降。实验和临床观察证实,纠正 RA 局部的促炎症细胞因子和抗炎症细胞因子的平衡失调状态,可以缓解或阻止滑膜炎的发生和发展^[12]。据文献报导,在鼠关节炎发作前腹腔内注射 MTX 可完全防止胶原诱导的关节炎(CIA)临床和病理上的特征,因为 MTX 治疗后可导致血清和关节滑膜液中 TNF- α 的含量下降^[13]。本实验用 MTX 对大鼠进行治疗,采用肌肉注射和外用两种方式,结果显示 MTX 治疗组(包括肌肉注射组和外用组)血清中 TNF- α 平均值明显低于对照组血清中 TNF- α 平均值($P < 0.05$),说明 MTX 治疗可有效抑制 TNF- α 合成,这也是 MTX 治疗 RA 的机制之一。有些研究结果显示,MTX 治疗可以降低关节炎模型中滑膜液中的 TNF 浓度,而对 MTX 治疗病人外周血中 TNF 浓度没有明显影响^[14]。而 MTX 治疗并不影响血清中 IL-1 的水平,对照组与 MTX 治疗组血清中 IL-1 的含量没有明显差异($P > 0.05$)。这与其他文献报导相似,即用 MTX 治疗病人时,滑膜液中 IL-1 浓度下降,而 IL-1 的血清水平不受影响^[15]。MTX 治疗后血清 IL-10 的水平,对照组与 MTX 治疗组的含量有明显差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在 RA 中 IL-10 的浓度是下降的,经过 MTX 治疗,血清中 IL-10 明显升高,说明 MTX 治疗类风关的机制可能与提高 IL-10 水平有关。而 MTX 治疗对 IL-4 的含量没有影响。IL-4 和 IL-10 是两种抗炎症的 Th2 型细胞因子,可下调抗原提呈细胞(APC)功能,抑制 Th1 增生,抑制 IL-1、TNF- α 和其他一些炎症性细胞因子(如 IL-6、IL-8)的功能和生成,抑制基质金属蛋白酶(MMP)的生成^[16]。IL-4 对于软骨降解有直接的保护作用,动物实验表明:IL-4/IL-10 联合治疗能使 CIA 病情显著好转,用重组 IL-10 和 IL-4 治疗 RA 临床

试验目前也在进行中。本实验中经 MTX 治疗后 IL-10 升高明显,而 IL-4 并没有明显改变,其原因有待进一步探索。

MTX 直接外用治疗,能使关节局部药物浓度提高,具有治疗效果好,而全身毒副作用少的优点,值得进一步深入研究推广。

参考文献

- 1 Kavanagh AF, Lipsky PE. In: Rich RR, ed. Rheumatoid arthritis. 1996:1093.
- 2 Muller-Ladner U. Molecular and cellular interactions in rheumatoid synovium. Curr Opin Rheumatol 1996;8:2110.
- 3 Chen E, Keystone EC, Fish EN. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1993;36:901.
- 4 Moreland LW, Heck LW Jr, Koopman WJ. Biologic agents for treating rheumatoid arthritis: concept and progress. Arthritis Rheum 1997;40:397.
- 5 Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. Arthritis Rheum 1993;36:1681.
- 6 马东来,李俊,陈敏珠等.大鼠佐剂性关节炎的诱导及其免疫异常研究.中国实验临床免疫学杂志,1995;7(3):13.
- 7 M. Carmen M, Joseephine SY, Avani D, et al. Arthritis Rheum 2000;43(3):656.
- 8 Marriten C, Kraan, Richard J. Reece, Ella c. Barg, et al. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000;43(8):1820.
- 9 蔡青. IL-1 和 TNF 与类风湿性关节炎. 上海免疫学杂志, 1998;18:62.
- 10 Breedveld FC. New insights in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. J Rheum 1998;25:3.
- 11 Miossec and Van Den Berg. Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. Arthritis Rheum 1997;40:2105.
- 12 Neurath MF, Hildner K, Becker C, et al. Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. Clin Exp Immunol 1999;115(1):42.
- 13 Bologna C, Edno L, Anaya JM, et al. Methotrexate concentrations in synovial membrane and trabecular and cortical bone in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum 1994;37:1770.
- 14 Thomas R, Carroll GL. Reduction of leucocyte and interleukin-1-beta concentrations in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. Arthritis Rheum 1993;36:1244.
- 15 张浩,朱平.自身免疫病的 Th1/Th2 细胞因子平衡治疗.免疫学杂志,2000;16(2):119.
- 16 Jossten LAB, Lubberts E. Role of IL-4 and IL-10 in murine collagen-induced arthritis: protective effect of IL-4 and IL-10 treatment on cartilage destruction. Arthritis Rheum, 1997;40:249.

收稿日期:2002-01-21