

全反式视黄酸对 CIA 大鼠血清炎性细胞因子及软骨损伤相关蛋白表达的影响*

谢雪健¹, 申雨燕¹, 宋杰¹, 钟灵毓^{1,2}, 宁艳花¹, 曾香¹,
单靖焱¹, 刘杨¹, 朱彦锋³, 李云^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 营养食品卫生与毒理学系(成都 610041);

2. 西藏自治区人民政府驻成都办事处医院 营养科(成都 610041); 3. 成都医学院 公共卫生系(成都 610500)

【摘要】 目的 探讨全反式视黄酸(ATRA)对胶原诱导的类风湿关节炎模型大鼠(CIA 大鼠)关节炎症反应、炎性相关细胞因子及软骨损伤相关蛋白表达的影响。**方法** 将雌性 Wistar 大鼠随机分为空白对照组和造模组,造模组采用牛 CⅡ 型胶原和不完全弗氏佐剂诱导关节炎。造模成功后,将模型鼠随机分为 CIA 模型组和 ATRA 治疗组。ATRA 治疗组给予不同剂量(0.50 mg/kg, 1.00 mg/kg)的 ATRA 腹腔注射,3 次/周,连续治疗 6 周。空白对照组给予等体积的生理盐水, CIA 模型组给予等体积玉米油。观察 CIA 大鼠关节炎指数(AI)评分、血清炎性相关细胞因子的水平、膝和踝关节组织病理形态学改变及软骨损伤相关蛋白的表达。**结果** ATRA 干预 6 周后,不同剂量 ATRA 治疗组 AI 评分与 CIA 模型组相比,差异均无统计学意义($P>0.05$);HE 染色示, CIA 模型组和 ATRA 1.00 mg/kg 剂量组膝、踝关节结构紊乱, ATRA 0.50 mg/kg 剂量组膝关节结构有所改善。此外,与 CIA 模型组相比, ATRA 可抑制促炎细胞因子干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 、白介素-17A 的分泌($P<0.05$),促进白介素-4 的分泌($P<0.05$);下调调整链蛋白金属蛋白酶(ADAMTS)-4、基质金属蛋白酶(MMP)3、MMP1 的表达($P<0.05$)。**结论** ATRA 可在一定程度上抑制促炎因子分泌,纠正 Th1/Th2 及 Th17/Treg 失衡,并抑制软骨损伤相关酶类的蛋白表达,对类风湿关节炎有潜在的有利影响。

【关键词】 类风湿关节炎 CIA 模型 全反式视黄酸

The Effects of All-trans Retinoic Acid on the Expression of Inflammatory Cytokines and Cartilage Damage Related Protease in Rats with Collagen Induced Arthritis XIE Xue-jian¹, SHEN Yu-yan¹, SONG Jie¹, ZHONG Ling-yu^{1,2}, NING Yan-hua¹, ZENG Xiang¹, SHAN Jing-yan¹, LIU Yang¹, ZHU Yan-feng³, LI Yun^{1△}. 1. Department of Nutrition and Food Hygiene, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Nutrition, Hospital of Chengdu Office of People's Government of Tibet Autonomous Region, Chengdu 610041, China; 3. Department of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

△ Corresponding author, E-mail: liyun_611@163. Com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on arthritis and the expressions of inflammatory cytokines and cartilage damage related proteases of the collagen-induced arthritis model (CIA) rats *in vivo*. **Methods** The CIA model of rheumatoid arthritis was induced with CⅡ and incomplete Freund's adjuvant. The rats were randomly divided into control group, CIA model group and two ATRA dose groups (ATRA 0.50 mg/kg group and ATRA 1.00 mg/kg group). ATRA were given three times per week for six weeks in ATRA groups. Morphological changes, arthritis index (AI) scores, the semi-quantitative scores of pathology damage, the protein expressions of cartilage damage related proteases and the serum levels of TNF- α , IL-17A, IFN- γ , IL-4, IL-10 were observed. **Results** The AI scores of ATRA groups were similar to CIA model group ($P<0.05$). Apparent morphological disorders in knee and ankle joints were observed in the CIA model group and ATRA 1.00 mg/kg group. The structure of knee joint was improved slightly in ATRA 0.50 mg/kg group. The serum levels of TNF- α , IFN- γ and IL-17A were decreased in both ATRA groups; ATRA also can increase the serum level of IL-4. Compared to CIA model group, the protein expressions of ADAMTS-4, MMP3, MMP1 were decreased in both ATRA groups ($P<0.05$). **Conclusion** ATRA, which was able to inhibit pro-inflammatory cytokines secretion, could correct the imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg. ATRA also can reduce the expressions of cartilage damage related proteases, which proved that ATRA may have a beneficial effect on rheumatoid arthritis.

【Key words】 Rheumatoid arthritis CIA model ATRA

* 国家自然科学基金(No. 81372983)和四川省教育厅自然科学基金项目(No. 14ZB235)资助

△ 通信作者, E-mail: liyun_611@163. com

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的自身免疫性疾病,其病因及发病机制尚未明确。据报道,RA 患者血清中的视黄醇含量较低^[1],而全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA)干预对 CIA 小鼠关节炎有一定的缓解作用^[2]。研究发现,ATRA 通过下调 T 细胞转录因子 T-bet(T-box expressed in T cells)的表达抑制 Th1 细胞的分化,上调 GATA 连接蛋白-3(GATA-binding protein-3, GATA3)和巨噬细胞激活因子(macrophage activating factor, MAF)的表达促进 Th2 细胞的分化^[3];通过下调维甲酸相关孤儿受体 γ t (RAR-related orphan receptor gamma t, ROR γ t)的表达抑制 Th17 细胞的分化,上调叉状头/翅膀状螺旋转录因子(forkhead box P3, FOXP3)的表达促进 FOXP3-Treg 细胞表达^[4]。据此,本研究给予 CIA 大鼠不同剂量的 ATRA 处理,观察 ATRA 对 Th1/Th2 和 Th17/Treg 平衡的影响,探讨 ATRA 对 RA 影响的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康 Wistar 雌性大鼠,7~8 周龄,体重(220±20) g,由达硕实验动物中心供给,动物合格证号为 SCXK(川)2013-24。

1.2 主要试剂

牛 CⅡ 型胶原(CⅡ)和不完全弗氏佐剂(IFA)(美国 Chondrex);Aladdin 玉米油(上海晶纯生化);ATRA(美国 Sigma);干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-4(IL-4)、白介素-10(IL-10)、白介素-17A(IL-17A)的 5 种 ELISA 试剂盒均购自美国 eBioscience 公司;抗解整链蛋白金属蛋白酶(ADAMTS)-4 抗体(武汉博士德);抗基质金属蛋白酶(MMP)3 抗体(Abcam);抗 MMP-1 抗体(Abnova);抗金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)-1 抗体(Biorbyt);胃蛋白酶(Invitrogen);PV-9001 超敏二步法免疫组化检测试剂盒、SP-9001 生物素-链霉卵白素免疫组化试剂盒和 ZLI-9033 浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中杉金桥;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

手持匀浆器(德国 IKA);ICC50 HD 显微镜(德国 Leica);低温冷冻离心机(美国 ThermoFisher);酶标仪(美国 BIO-RAD)。

1.4 方法

1.4.1 CIA 大鼠造模 将大鼠按体质量随机分两组,即空白对照组(8 只)和造模组(36 只)。参考赵宏艳等^[5]的造模方法,将等体积的牛 CⅡ 溶液(5 mL)和等体积的 IFA(5 mL)充分混匀制成造模乳剂,并置于冰盒中低温暂存。造模组大鼠尾根部皮下注射造模乳剂,每只 200 μ L。将初次免疫记为第 1 天。加强免疫在第 8 天进行,在距尾根部 3 cm 处进行皮下注射,每只大鼠注射造模乳剂 100 μ L。空白对照组采用相同方法注射等量的生理盐水。在初次免疫的第 14 天对大鼠进行关节炎指数(AI)评分,AI 评分>4 分即为造模成功。

1.4.2 实验分组 将造模成功的大鼠按症状严重程度排序,随机分为 CIA 模型组和 2 个 ATRA 组(0.50 mg/kg、1.00 mg/kg),每组 8 只。将 ATRA 溶于玉米油,配置成 0.625 mg/mL 以及 1.25 mg/mL 的工作油剂,于初次免疫后第 22 天,ATRA 组分别给予 ATRA 0.50 mg/kg 和 1.00 mg/kg 腹腔注射^[6],3 次/周,连续 6 周。空白对照组给予等体积生理盐水,CIA 模型组给予等体积玉米油。

1.4.3 AI 评分 加强免疫后每日观察并记录大鼠四肢的关节病变情况,在初次免疫后第 14 天,参照 AI 5 级积分法^[7]对大鼠进行 AI 评分,之后在 ATRA 开始治疗(初次免疫后第 22 天)和治疗结束(初次免疫后第 63 天)分别进行 AI 评分,采用双人单独评分,并取平均值进行统计分析^[2]。

1.4.4 ELISA 法测定炎症相关细胞因子水平 收集的血液于室温放置 2~3 h,随后放入低温离心机,3 000 r/min 离心 10 min 后取上层血清,分装后于-20 $^{\circ}$ C 冻存储备用。采用 ELISA 法(按试剂盒说明书操作)测定炎症相关细胞因子即 IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A 的表达水平。

1.4.5 组织形态学观察 于初次免疫后第 65 天,用 30 g/L 戊巴比妥钠,按照 40 mg/kg 进行腹腔麻醉,取血后处死。取双侧膝、踝关节,去除皮肤及肌肉组织后置于体积分数为 10%的甲醛中固定。常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下观察关节滑膜、软骨、骨的改变。

1.4.6 关节炎病理损伤半定量评分 光镜下观察 HE 染色切片,同一个样本在多个视野及不同倍数下,按照 Masakazu 分级法(5 级)^[7]对膝关节和踝关节病理损伤进行总体半定量评分,并参照关节滑膜炎评分标准^[8]对大鼠滑膜炎进行半定量评分。评分均采用双人单独评分,取平均值进行统计分析。

1.4.7 免疫组化法测定滑膜炎、软骨破坏相关蛋白的表达水平 采用 SP 二步法测定 ADAMTS-4 蛋白的表达,采用 PV 二步法测定 MMP3、MMP1、TIMP-1 蛋白的表达,操作过程参照试剂盒说明书。用 PBS 将一抗稀释至需要的浓度,4 种抗体稀释倍数分别为:ADAMTS-4,1 : 400;MMP3,1 : 200;MMP1,1 : 100;TIMP-1,1 : 200。免疫组化实验结束后,使用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件进行染色区域光密度分析,将染色强度和面积转化成积分光密度(IOD)值。以 IOD 值反映蛋白的表达水平。

1.4.8 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐时用 Games-Howell 校正;重复测量的数据采用重复测量资料的方差分析,组间两两比较用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模情况

造模组大鼠在第 10 天开始出现踝关节或趾关节红肿。于第 14 天左右开始进入出模高峰期,症状表现为关节红肿,后足踝受累严重(图 1)、部分大鼠前爪受累,出模大鼠行走不便、活动受限。与空白对照组大鼠相比,造模组大鼠体质量增长缓慢,毛发光泽度减弱,情绪易暴躁、攻击性增强。36 只造模组大鼠中,共成模 25 只,成模率约 70%,取其中 24 只大鼠进行后续实验。

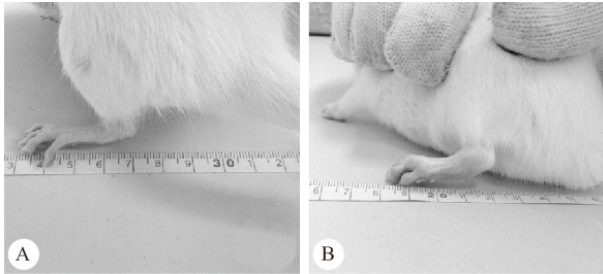


图 1 正常大鼠和 CIA 大鼠
Fig 1 Normal and CIA rats

2.2 ATRA 对 AI 评分的影响

由表 1 可见,治疗前后,CIA 模型组和两个 ATRA 组 AI 评分均高于空白对照组($P < 0.05$); ATRA 0.50 mg/kg 组、ATRA 1.00 mg/kg 组 AI 评分与 CIA 模型组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 ATRA 对炎性相关细胞因子水平的影响

由表 2 可见:与空白对照组相比,CIA 模型组 TNF- α 、IFN- γ 、IL-17A 水平增高($P < 0.05$),而 IL-4 水平降低($P < 0.05$)。与 CIA 模型组相比, TNF- α 、IFN- γ 水平在两个 ATRA 组均降低($P < 0.05$), IL-17A 水平仅在 ATRA 1.00 mg/kg 组下调($P < 0.05$), IL-4 水平在两个 ATRA 组均升高($P < 0.05$),且 ATRA 1.00 mg/kg 组的回升效果优于 ATRA 0.50 mg/kg 组($P < 0.05$)。IL-10 表现出与 IL-4 相似的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 ATRA 治疗前后大鼠的关节炎指数($n=8$)
Table 1 AI scores of rats before and after treatments ($n=8$)

Group	Before treatment	After treatment
Control	0	0
CIA	8.3 $\pm$ 1.2*	5.3 $\pm$ 2.0*
ATRA 0.50 mg/kg	9.2 $\pm$ 2.4*	5.7 $\pm$ 1.1*
ATRA 1.00 mg/kg	9.6 $\pm$ 1.5*	6.1 $\pm$ 0.7*

* $P < 0.05$, vs. control group

2.4 组织形态学观察结果

光镜下观察实验大鼠膝关节、踝关节 HE 染色切片结果见图 2。空白对照组:膝、踝关节和滑膜组织结构正常,无血管翳形成,关节软骨面光滑完整,关节腔间隙正常。CIA 模型组:膝、踝关节结构严重紊乱,滑膜组织增生明显,可见大量的炎性细胞浸润,增生的滑膜组织向软骨面爬行形成血管翳,骨侵蚀情况严重。关节软骨面结构被破坏,表面剥脱,关节腔间隙缩小。ATRA 0.50 mg/kg 组:膝关节结构基本正常,滑膜组织可见炎性细胞浸润,纤维组织增生形成血管翳,可见骨侵蚀情况。软骨细胞排列失序,软骨下骨小梁结构疏松,关节腔内可见剥脱的软骨及滑膜组织。ATRA 1.00 mg/kg 组:膝关节结构紊乱,增生的滑膜组织形成血管翳,血管翳覆盖下的软骨组织结构消失,可见骨侵蚀情况,关节腔间隙缩小。

2.5 ATRA 对关节病理损伤的影响

由表 3 可见,与空白对照组相比, CIA 模型组膝、踝关节的滑膜炎评分和 Masakazu 评分均增加($P < 0.05$);与 CIA 模型组相比, ATRA 0.50 mg/kg 组的膝关节滑膜炎评分和 Masakazu 评分均降低($P < 0.05$), ATRA 两剂量组间的差异则无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 ATRA 对软骨破坏相关蛋白表达水平的影响

由表 4 和图 3 可见, ADAMTS-4、MMP3、MMP1 及 TIMP-1 在空白对照组的软骨细胞层及滑膜组织中表达水平很低,偶见弱阳性染色,而在 CIA 模型组和两个 ATRA 组的表达水平较高,阳

表 2 ATRA 对细胞因子水平的影响/(pg/mL)
Table 2 The effect of ATRA on cytokine levels/(pg/mL)

Group	n	IL-4	IFN- γ	IL-10	TNF- α	IL-17A
Control	8	3.51 $\pm$ 0.26	21.95 $\pm$ 1.94	57.01 $\pm$ 20.48	20.96 $\pm$ 1.15	3.99 $\pm$ 1.29
CIA	8	3.16 $\pm$ 0.16*	27.27 $\pm$ 3.63*	38.23 $\pm$ 9.18	23.80 $\pm$ 1.75*	7.00 $\pm$ 2.93*
ATRA 0.50 mg/kg	8	3.42 $\pm$ 0.13#	20.78 $\pm$ 2.31#	45.33 $\pm$ 24.29	22.10 $\pm$ 1.92#	4.56 $\pm$ 0.60
ATRA 1.00 mg/kg	8	3.68 $\pm$ 0.18# $\blacktriangle$	22.19 $\pm$ 1.90#	49.67 $\pm$ 17.80	21.41 $\pm$ 1.27#	4.07 $\pm$ 2.73#

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. CIA group; $\blacktriangle P<0.05$, vs. ATRA 0.50 mg/kg group

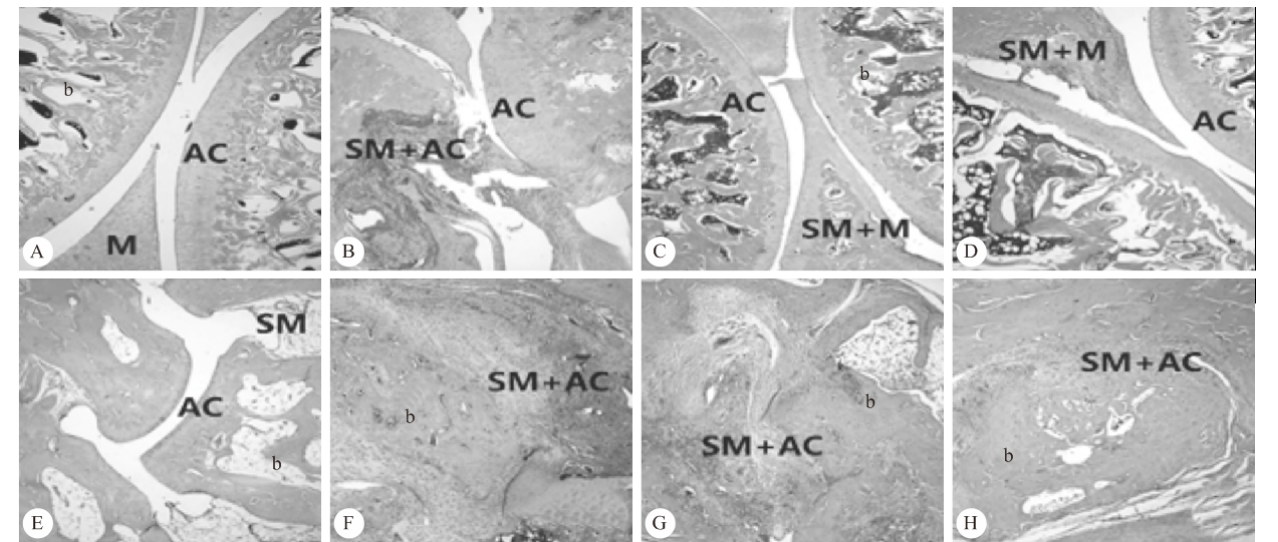


图 2 大鼠膝关节和踝关节 HE 染色。 $\times 40$

Fig 2 Rat knee joints and ankle joints stained with HE. $\times 40$

A-D: Control group, CIA group, ATRA 0.50 mg/kg group and ATRA 1.00 mg/kg group of knee; E-H: Control group, CIA group, ATRA 0.50 mg/kg group and ATRA 1.00 mg/kg group of ankle. b: Bone; M: Meniscus; AC: Articular cartilage; SM: Synovial membrane; SM+AC: Pannus and cartilage binding region; SM+M: Pannus and meniscal cartilage binding region

表 3 ATRA 对关节病理损伤评分的影响
Table 3 The effects of ATRA on joint pathological damage scores

Group	n	Masakazu score of knee	Masakazu score of ankle	Synovitis score of knee	Synovitis score of ankle
Control	8	0	0	0	0
CIA	8	3.3 $\pm$ 0.6*	3.6 $\pm$ 0.4*	2.8 $\pm$ 0.3*	2.9 $\pm$ 0.2*
ATRA 0.50 mg/kg	8	2.4 $\pm$ 0.7#	3.4 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.8#	2.6 $\pm$ 0.4
ATRA 1.00 mg/kg	8	2.8 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.8	2.7 $\pm$ 0.4

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. CIA group

性染色定位于软骨细胞及滑膜组织,呈棕黄色。与空白对照组相比,CIA 模型组 ADAMTS-4、MMP3 及 MMP1 的表达水平增高($P<0.05$),滑膜组织以及滑膜侵蚀软骨界面可见大量阳性染色。与 CIA 模型组相比,ADAMTS-4、MMP3、MMP1 在两个 ATRA 组的表达水平下调($P<0.05$),TIMP-1

表 4 ATRA 对软骨损伤相关蛋白 IOD 值的影响

Table 4 Effects of ATRA on IOD values of cartilage damage related proteases

Group	n	ADAMTS-4	MMP3	MMP1	TIMP-1
Control	8	0.053 $\pm$ 0.001	0.045 $\pm$ 0.009	0.067 $\pm$ 0.007	0.066 $\pm$ 0.013
CIA	8	0.081 $\pm$ 0.005*	0.074 $\pm$ 0.007*	0.095 $\pm$ 0.005*	0.076 $\pm$ 0.055
ATRA 0.50 mg/kg	8	0.062 $\pm$ 0.007* $\cdot$ #	0.060 $\pm$ 0.007* $\cdot$ #	0.079 $\pm$ 0.007* $\cdot$ #	0.068 $\pm$ 0.011
ATRA 1.00 mg/kg	8	0.064 $\pm$ 0.004* $\cdot$ #	0.062 $\pm$ 0.009* $\cdot$ #	0.082 $\pm$ 0.011* $\cdot$ #	0.074 $\pm$ 0.007

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. CIA group

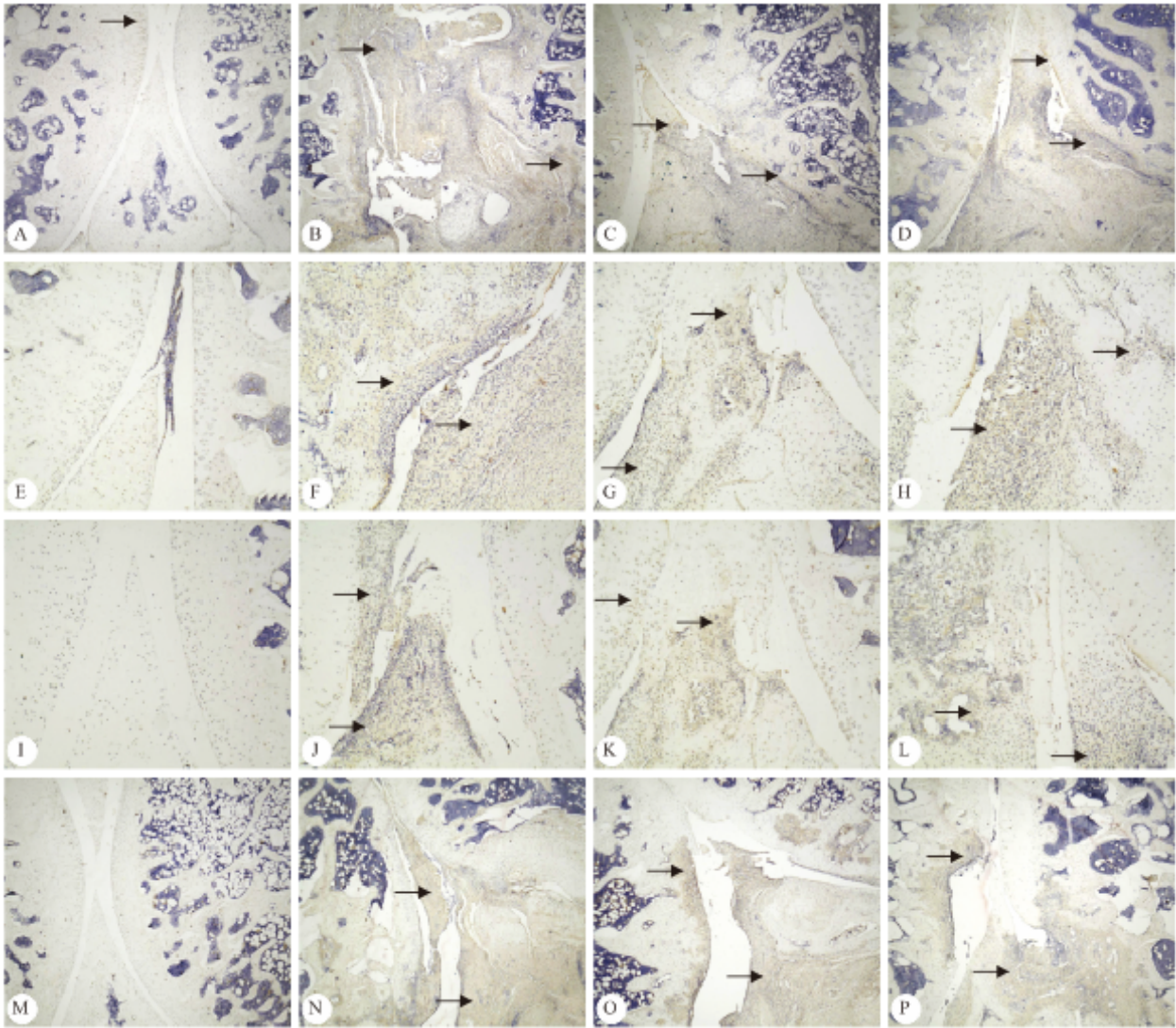


图 3 ATRA 对大鼠蛋白表达的影响。免疫组化染色

Fig 3 The effects of ATRA on protein expressions in rats. Immunohisto chemical staining

A-D: ADAMTS-4, $\times 40$; E-H: MMP1, $\times 100$; I-L: MMP3, $\times 40$; M-P: TIMP-1, $\times 40$. A, E, I, M: Control group; B, F, J, N: CIA group; C, G, K, O: ATRA 0.50 mg/kg group; D, H, L, P: ATRA 1.00 mg/kg group. Black arrow: Positive staining

的表达水平有类似的趋势,但 4 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。两个 ATRA 组之间各蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

CIA 模型是利用 C II 作为免疫原,依赖 T 细胞和 B 细胞激活,诱导机体产生关节炎自身免疫反应。CIA 病理改变包括滑膜炎、血管翳形成、纤维化、软骨及骨侵蚀等典型的类风湿关节炎病理特征。此外,CIA 大鼠模型还与人 RA 有许多相似之处,如 CIA 雌性个体具有高度易感性,与女性易发病的情况相似;细胞免疫和体液免疫变化明显,可表达

TNF- α 、IL-1 β 等促炎细胞因子,是目前公认的研究 RA 最佳动物模型^[9]。本研究利用 Wistar 雌鼠尾部注射牛 C II 和 IFA 建立 CIA 大鼠模型,第 14 天进入出模高峰期,出模大鼠多为后足红肿、部分大鼠前爪受累,活动受限。HE 染色结果显示,与空白对照组相比,CIA 模型组大鼠的膝、踝关节结构严重紊乱,其膝、踝关节的滑膜炎评分及 Masakazu 评分亦显著增加,进一步说明模型鼠建模成功。

KOWK 等^[2]的研究结果显示 0.50 mg/kg 的 ATRA 对 CIA 小鼠临床症状有明显的改善作用,而本实验中 ATRA 两剂量组在干预结束时(初次免疫后第 63 天)AI 评分与 CIA 模型组相比差异均无统

计学意义,未能改善 RA 的临床症状,与其研究结果不一致,原因可能跟实验动物的种属差异有关。但与 CIA 模型组相比,ATRA 0.50 mg/kg 组膝关节的滑膜炎评分、Masakazu 评分降低($P < 0.05$),提示 ATRA 能减轻 CIA 大鼠膝关节的病理损伤,与 KOWK 等的研究结果类似。

近些年来,T 细胞活化及相关细胞因子的产生逐渐被认为是 RA 的重要发病机制之一^[10]。RA 的特征之一正是 Th1/Th2 平衡向 Th1 方向倾斜,Th1 分泌 IFN- γ 、TNF- α 等 I 型细胞因子,参与机体迟发型超敏反应^[11]。Th2 分泌 IL-4、IL-10 等 II 型细胞因子,参与体液免疫^[12]。Th17/Treg 平衡也与 RA 发病有关,RA 患者的 Th17 水平显著增加,并且与滑膜炎的严重程度直接相关^[13]。RA 患者外周血中,Treg 对于炎性细胞的抑制能力较低^[14]。Th17 分泌 IL-17A 等细胞因子介导组织炎症反应^[15]。Treg 可分泌 IL-10 等细胞因子,并维持外周免疫耐受^[11]。本研究发现 ATRA 可抑制促炎细胞因子 TNF- α 、IL-17A 和 IFN- γ 的分泌($P < 0.05$),并促进 IL-4 表达($P < 0.05$),但上调 IL-10 的作用无统计学意义($P > 0.05$)。这提示在细胞因子水平上,ATRA 有纠正 CIA 大鼠 Th1/Th2 及 Th17/Treg 失衡的作用,与 KOWK 等^[2]的结果类似。

滑膜炎和骨质破坏是 RA 病程中的中心环节。体外软骨培养实验结果显示,在软骨基质蛋白聚糖丢失过程中,ADAMTS 率先发挥酶解蛋白聚糖的作用,MMPs 则辅助 ADAMTS 的酶解作用^[16]。其中,ADAMTS-4 在软骨受损时开始酶解细胞外基质中的蛋白聚糖,MMPs 发挥作用酶解胶原蛋白,导致软骨破坏。本研究中,ADAMTS-4 的蛋白表达水平在 CIA 模型组上调($P < 0.05$),经 ATRA 干预处理后,其表达水平下调($P < 0.05$)。MMPs 家族中,MMP1 和 MMP3 表达量与 RA 病理损伤程度呈正相关,而 MMPs 对应的负调节剂 TIMP-1 增加甚少,出现 MMPs/TIMPs 的失衡^[15]。本研究结果显示,ATRA 能够下调 CIA 大鼠受累关节软骨中 MMP1 及 MMP3 的表达($P < 0.05$),但对 TIMP-1 表达的影响无统计学意义($P > 0.05$)。这表明 ATRA 对 MMPs/TIMPs 失衡有一定的纠正作用。

综上所述,本研究建立大鼠 CIA 模型,经 ATRA 干预 6 周后,关节炎症未得到明显缓解,但 ATRA 0.50 mg/kg 组膝关节组织的病理损伤有所减轻。ATRA 在血清水平上对 Th1/Th2 及 Th17/Treg 失衡有纠正作用,且能够抑制软骨损伤相关蛋白的表达。ATRA 干预可能成为治疗 RA

或者其他自身免疫性疾病的辅助手段。

参 考 文 献

- [1] DOUGADOS M, LEPORHO MA, ESMILAIRE L, *et al.* Plasma levels of vitamins A and E in hyperostosis, ankylosing spondylarthritis and rheumatoid polyarthritis. *Rev Rhum Mal Osteoartic*,1988,55(4):251.
- [2] KWOK SK, PARK MK, CHO ML, *et al.* Retinoic acid attenuates rheumatoid inflammation in mice. *J Immunol*, 2012,189(2):1062-1071.
- [3] IWATA M, ESHIMA Y, KAGECHIKA H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol*,2003,15(8):1017-1025.
- [4] XIAO S, JIN H, KORN T, *et al.* Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol*, 2008,181(4):2277-2284.
- [5] 赵宏艳,王 燕,肖 诚,等.不同品系、不同性别对大鼠 CIA 发病情况的比较研究. *中国中医基础医学杂志*,2010(9):761-764.
- [6] XIE X, MU L, YAO X, *et al.* ATRA alters humoral responses associated with amelioration of EAMG symptoms by balancing Thh/Tfr helper cell profiles. *Clin Immunol*, 2013,148(2):162-176.
- [7] 王岩艳. II 型胶原诱导的大鼠关节炎动物模型的研究. 成都:四川大学,2006:16-19.
- [8] ROTH A, MOLLENHAUER J, WAGNER A, *et al.* Intra-articular injections of high-molecular-weight hyaluronic acid have biphasic effects on joint inflammation and destruction in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*,2005,7(3):R677-R686.
- [9] 朱 蕾,魏 伟,郑咏秋.白芍总苷对胶原性关节炎大鼠滑膜细胞的作用及机制. *药学报*,2006,41(2):166-170.
- [10] FALGARONE G, SEMERANO L, RULLÉ S, *et al.* Targeting lymphocyte activation to treat rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*,2009,76(4):327-332.
- [11] ZHU J, YAMANE H, PAUL WE. Differentiation of Effector CD4 Cell Populations. *Annu Rev Immunol*, 2010(28):445-489.
- [12] 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. *BMC Immunol*,2006,7(1):1-15.
- [13] HIROTA K, HASHIMOTO M, YOSHITOMI H, *et al.* T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17 + Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med*,2007,204(1):41-47.
- [14] FLORES-BORJA F, JURY EC, MAURI C, *et al.* Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008,105(49):19396-19401.
- [15] HUBER M, HEINK S, GROTHE H, *et al.* A Th17-like developmental process leads to CD8 + Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol*,2009,39(7):1716-1725.
- [16] LITTLE CB, HUGHES CE, CURTIS CL, *et al.* Matrix metalloproteinases are involved in C-terminal and interglobular domain processing of cartilage aggrecan in late stage cartilage degradation. *Matrix Biol*,2002,21(3):271-288.

(2015-12-17 收稿,2016-03-09 修回)

编辑 汤 洁