

· 基础研究 ·

RANKL在佐剂性关节炎大鼠滑膜中的表达及亚砷酸对其影响

李龙¹, 周忠启², 曾家顺¹

(1. 贵阳医学院附属医院肾内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 临沂市人民医院)

【摘要】 目的: 研究细胞核因子- κ B受体活化因子配基 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)在佐剂性关节炎大鼠发病中的作用, 探讨亚砷酸对 RANKL的影响及其对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用。方法: 40只大鼠随机分成 4组: 正常对照组、模型组、低剂量亚砷酸组 (LSA, $1.5 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、高剂量亚砷酸组 (HSA, $3.0 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 正常对照组与模型组给予生理盐水 2 ml/d 。免疫组化、原位杂交方法检测各组 RANKL蛋白及其 mRNA 的表达; HE染色观察各组滑膜组织形态变化。结果: 与正常对照组比较, 模型组 RANKL蛋白及其 mRNA 大量表达 ($P < 0.01$); 与模型组比较, LSA组及 HSA组 RANKL蛋白及其 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), 且 HSA组更明显。结论: RANKL在大鼠佐剂性关节炎发生发展中具有重要作用; 亚砷酸能下调 RANKL蛋白及其 mRNA 的表达, 提示亚砷酸对 RA有一定的治疗作用。

【关键词】 核因子 κ B受体活化因子配基; 亚砷酸盐类; 关节炎, 类风湿; 大鼠

Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) of synovium in adjuvant arthritis rats and effects of sodium arsenite on them LI Long*, ZHOU Zhong-qi, ZENG Jia-shun* Department of Nephrology, the Affiliated of Guiyang Medical College, Guiyang 550004 Guizhou, China

ABSTRACT **Objective** To study the expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in synovium of adjuvant arthritis rats and effects of sodium arsenite (SA) on RANKL. **Methods** Forty Wistar female rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, model group, low concentration sodium arsenite group (LSA) and high concentration sodium arsenite group (HSA). LSA group and HAS group were treated with SA ($1.5 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $3 \text{ mg kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) through abdominal injection, the normal control group and the model group were treated with saline (1 ml/d). The expressions of RANKL protein and mRNA of synovium by immunohistochemistry and by in situ hybridization. Light microscope was used to observe the synovium by HE. **Results** Compared with normal control group, the expressions of RANKL protein and mRNA in the synovium were up-regulated in the model group ($P < 0.01$) and were inhibited by sodium arsenite ($P < 0.01$), especially in the HAS group. **Conclusion:** RANKL may play an important role in the development adjuvant arthritis. Sodium arsenite can down-regulate the expressions of RANKL protein and mRNA and may have some therapeutic effects in rheumatoid arthritis.

Key words Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL; Arsenites; Arthritis rheumatoid; Rats

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(5): 292-294 www.zggssz.com

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种具有较大危害性和致残性的系统性自身免疫性疾病, 病因及发病机制仍不十分清楚。细胞核因子- κ B受体活化因子配基 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 是肿瘤坏死因子 (TNF) 受体超家族成员, 是介导破骨细胞分化、成熟的重要细胞因子, 而破骨细胞在 RA 骨质破坏或丢失中起关键作用, 因此, RANKL 在 RA 关节滑膜中的表达与关节破坏密切相关。砷剂作为治疗急性早幼粒细胞白血病的药物, 其机制主要是诱导细胞凋亡^[1], 但有研究^[2]表明, 它能抑制人及鼠的

免疫功能, 具体机制不明。本实验探讨 RANKL 在佐剂性关节炎大鼠滑膜中的表达, 并了解亚砷酸对 RANKL 表达的影响及对 RA 的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 动物 健康纯种雌性 Wistar 大鼠共 40 只, 体质量 (200 ± 10.5) g 贵州省动物中心提供。

1.2 试剂 福氏完全佐剂 (CFA, 加拿大 Bio Basic Inc 公司); 亚砷酸注射液 (哈尔滨伊达药业有限公司); RANKL 鼠型抗体、SABC 即用型试剂盒、DAB 显色剂及 RANKL 原位杂交试剂盒 (武汉博士德公司)。

1.3 RA 大鼠模型建立 动物适应性喂养 1 周, 采用随机表

法取 30只大鼠,分别于每只鼠左后足垫内注入 CFA 0.1 ml。注射次日每只大鼠均于注射侧足爪出现红肿、热、功能障碍等急性炎症表现,约持续 3 d后逐渐缓解。10 d后大鼠出现多发性关节炎,累及范围扩大至未注射侧的足爪,表现为关节局部不同的红肿、热、功能障碍,此时确定模型成功。

1.4 动物分组及给药:造模时余下 10只大鼠作为正常对照组,30只造模成功大鼠按随机表法分为 3组:模型组、低剂量亚砷酸组(LSA)、高剂量亚砷酸组(HSA),每组 10只。LSA组腹腔注射亚砷酸 1.5 mg kg⁻¹·d⁻¹ × 14 d HSA组腹腔注射亚砷酸 3.0 mg kg⁻¹·d⁻¹ × 14 d 14 d后改为隔日注射 × 14 d 正常对照组和模型组处理相同,都同时予腹腔注射生理盐水 1 ml/d × 14 d 后改为隔日注射 × 14 d

1.5 标本的收集及处理 用药 28 d后以 10%水合氯醛 3.5 ml/kg的剂量腹腔注射麻醉大鼠。剖开双膝关节,取出滑膜置 10% 甲醛缓冲液中固定,然后腹股沟动脉放血 5 ml 离心吸出血清置 -20℃冰箱。

1.6 SABC测定滑膜组织 RANKL蛋白的表达 10% 甲醛固定滑膜 24 h后,常规脱水、浸蜡、包埋制成蜡块,切片(厚度 3 μm)。切片常规脱蜡至水,置新鲜配制 3% H₂O₂ 室温 10 min 蒸馏水洗 3次,微波修复抗原(切片置 0.01 mmol/L 枸橼酸缓冲液, pH 6.0 煮沸断电, 10 min 后重复 1次), PBS (pH 7.4)洗 2次,滴加正常山羊封闭血清,室温 20 min 甩去多余山羊血清,加 1:100 稀释 RANKL 抗体, 37℃ 1 h, PBS 洗 2 min × 3次,滴加生物素化羊抗兔 IgG 抗体,室温 20 min, PBS 洗 5 min × 4次,加 DAB 显色剂室温显色,镜下控制显色时间(5 min 左右),棕褐色为阳性,蒸馏水冲洗,苏木素复染,脱水,透明,树脂封片。

1.7 原位杂交检测 RANKLmRNA 的表达 切片脱蜡至水,置 3% H₂O₂ 室温 10 min 灭活内源性酶,蒸馏水冲洗 4 min × 3次,切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶 20 μl 37℃ 消化 30 min,用 PBS 洗 5 min × 3次。1% 多聚甲醛 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 室温固定 10 min,双蒸水冲洗 3次,切片滴加 20 μl 杂交液,置 20% 甘油保湿的预杂交湿盒, 38℃ 杂交过夜。次日用 37℃ 水温的 2 × SSC 洗涤 5 min × 2次, 37℃ 水温 0.5 × SSC 洗涤 15 min × 1次, 37℃ 水温 0.2 × SSC 洗涤 15 min × 1次。切片滴加封闭液 25 μl 37℃ 水温 30 min 后甩去多余液体,然后滴加生物素化鼠抗地高辛 25 μl 37℃ 水温 60 min, PBS 洗 5 min × 4次,再滴加 SABC, 37℃ 水温 20 min, PBS 洗 5 min × 3次,继之滴加生物素过氧化酶, 37℃ 水温 20 min, PBS 洗 5 min × 4次,最后加 DAB 显色剂室温显色,镜下控制显色时间(约 5 min),棕褐色为阳性,蒸馏水冲洗,苏木素复染,脱水,透明,树脂封片。

图像分析:用 Bimaxia 99 彩色图像分析系统(四川大学图像图形研究所)分析每张切片 5 个现场的光密度值(×400),取每张及每组的平均光密度值。

1.8 滑膜病理学观察 苏木素-伊红染色(HE):切片常规脱蜡,自来水洗 2 min,苏木素染 2 min,自来水洗 1 min, 1% 盐酸乙醇分化 20 s 自来水洗 1 min, 1% 氨水返蓝 30 s 自来水洗 1 min,伊红染 1 min,自来水洗 30 s 脱水,透明,封片。细

胞核呈蓝色,细胞浆呈红色。苏木素-伊红染色片病理分级标准^[3]:①炎症细胞浸润:无炎症细胞(-),记 0分;稀疏散在(+),记 1分;较密集(++),记 2分;大量(+++),记 3分。②巨噬样 A 型细胞增生:无巨噬样 A 型细胞增生(-),记 0分;稀疏散在(+),记 1分;较密集(++),记 2分;大量(+++),记 3分。③滑膜细胞增生:无滑膜细胞增生(-),记 0分;单层细胞肿胀密集(+),记 1分;二层细胞肿胀密集(++),记 2分;三层细胞肿胀密集(+++),记 3分。④纤维组织增生:无纤维组织增生(-),记 0分;少量增生(+),记 1分;中等(++),记 2分;大量(+++),记 3分。

1.9 统计学分析 用 SPSS11.5 软件处理,实验数据为计量资料,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验或 *q* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学差异性。

2 结果

2.1 各组大鼠滑膜 RANKL 蛋白及其 mRNA 的表达 正常对照组与模型组比较:模型组 RANKL 蛋白及其 mRNA 大量表达(*t* 值分别为 35.1, 48.0 *P* < 0.01); LSA、HSA 与模型组比较:LSA 组及 HSA 组 RANKL 蛋白及其 mRNA 表达降低(*q* 值分别为 63.1, 26.2 *P* < 0.01),且 HSA 组更明显(*t* 值分别为 25.2, 17.4 *P* < 0.05)(见表 1 图 1~8)。

表 1 各组大鼠滑膜 RANKL 蛋白及 RANKLmRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$ *n* = 10)

Tab 1 RANKL protein and mRNA expressions in each group ($\bar{x} \pm s$ *n* = 10)

组别 Groups	RANKL protein	RANKL mRNA
正常对照组	88.9 ± 4.5	70.1 ± 6.8
模型组	192.6 ± 8.2 [‡]	198.31 ± 5.0 [‡]
低剂量亚砷酸组(LSA)	161.7 ± 6.7 [#]	138.6 ± 8.6 [#]
高剂量亚砷酸组(HSA)	89.0 ± 6.2 ^{##}	74.5 ± 7.9 ^{##}

注:与正常对照组相比,[#]*P* < 0.05;与模型组相比,^{##}*P* < 0.01;与 LSA 组相比,^Δ*P* < 0.05

Note: as compared with normal control group [#]*P* < 0.05; as compared with model group ^{##}*P* < 0.01; as compared with LSA group ^Δ*P* < 0.05

2.2 各组大鼠滑膜病理学观察 与正常对照组比较,模型组病理学积分有显著升高(*t* 值为 6.8 *P* < 0.01);与模型组比较,LSA 及 HSA 组病理学积分明显下降(*q* 值分别为 4.7, 3.3 *P* < 0.01 或 *P* < 0.05),滑膜病理改变减轻。

表 2 各组大鼠滑膜病理学总积分比较 ($\bar{x} \pm s$ *n* = 10)

Tab 2 The pathological cumulative score of synovium of each group ($\bar{x} \pm s$ *n* = 10)

组别 Groups	得分 Scores
正常对照组	0.5 ± 0.1
模型组	4.6 ± 2.0 [‡]
低剂量亚砷酸组(LSA)	2.6 ± 1.3 [#]
高剂量亚砷酸组(HSA)	1.2 ± 0.7 ^{##}

注:与正常对照组相比,[#]*P* < 0.01;与模型组相比,^{##}*P* < 0.01;与 LSA 组相比,^Δ*P* < 0.05

Note: as compared with normal control group [#]*P* < 0.01; as compared with model group ^{##}*P* < 0.01; ^Δ*P* < 0.05 as compared with LSA group

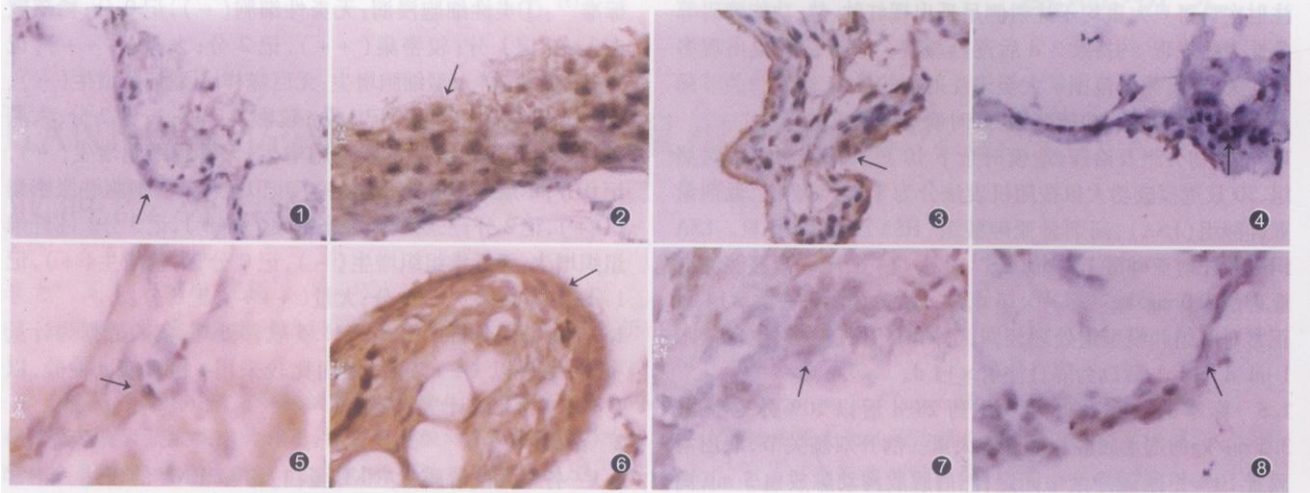


图 1 正常对照组滑膜 RANKL 蛋白表达 HE × 400(箭头所示) 图 2 模型组滑膜 RANKL 蛋白表达 HE × 400(箭头所示) 图 3 LSA 组滑膜 RANKL 蛋白表达 HE × 400(箭头所示) 图 4 HSA 组滑膜 RANKL 蛋白表达 HE × 400(箭头所示) 图 5 正常对照组滑膜 RANKL mRNA 表达 HE × 400(箭头所示) 图 6 模型组滑膜 RANKL mRNA 表达 HE × 400(箭头所示) 图 7 LSA 组滑膜 RANKL mRNA 表达 HE × 400(箭头所示) 图 8 HSA 组滑膜 RANKL mRNA 表达 HE × 400(箭头所示)

Fig. 1 RANKL protein expression in synovium of the normal control group HE × 400 **Fig. 2** RANKL protein expression in synovium of the model group HE × 400 **Fig. 3** RANKL protein expression in synovium of the LSA group HE × 400 **Fig. 4** RANKL protein expression in synovium of the HSA group HE × 400 **Fig. 5** RANKL mRNA expression in synovium of the normal control group HE × 400 **Fig. 6** RANKL mRNA expression in synovium of the model group HE × 400 **Fig. 7** RANKL mRNA expression in synovium of the LSA group HE × 400 **Fig. 8** RANKL mRNA expression in synovium of the HSA group HE × 400

3 讨论

RANKL 为肿瘤坏死因子家族分子, 有与细胞结合的 II 型跨膜蛋白和可溶性变体两种活性形式^[4], 是骨质重塑过程中的关键性调节因子, 在破骨细胞分化、激活过程中必不可少。RANKL 与前体破骨细胞上的受体 RANK 结合, 经 TNF 受体连接因子家族蛋白激活 NF-κB 细胞外信号调节激酶及 c-Jun 氨基末端激酶, 从而诱导转录因子活化蛋白-1(AP-1)、NF-κB 等的活性, 介导骨细胞的分化、活化与分泌活动^[5]。

本实验结果显示正常组大鼠滑膜 RANKL 蛋白及其 mRNA 少量表达, 模型组大鼠滑膜 RANKL 蛋白及其 mRNA 高表达。多数学者认为 RA 滑膜组织中成纤维样滑膜细胞可表达 RANKL。研究结果显示 RA 滑膜成纤维样细胞是骨破坏的主要因素^[6,9]。本实验提示 RANKL 在 RA 滑膜中高表达可能在骨、软骨破坏中发挥重要作用, RANKL 可作为 RA 一个新的治疗靶点。

亚砷酸在临床上主要用于治疗急性早幼粒细胞白血病, 其主要机制是诱导细胞凋亡^[1]。有研究表明^[2], 亚砷酸能抑制人及鼠的免疫功能, 包括细胞及体液免疫, 具体机制不明。朱小春等^[10]报道亚砷酸能抑制 BXSB 自发性狼疮鼠的自身免疫, 并对其狼疮肾炎有治疗作用, 推测与自身反应性淋巴细胞凋亡及免疫抑制有关。本研究显示亚砷酸治疗佐剂性关节炎后可见滑膜 RANKL 蛋白及 mRNA 表达下降, 滑膜病理改变减轻, 病理学积分减少, 且呈剂量依赖性。亚砷酸治疗 RA 的机制可能是亚砷酸首先降低了 RANKL 的表达, 减少了 RANKL 与前体破骨细胞上的受体 RANK 结合, 从而不能使 TNF 受体连接因子家族蛋白、细胞外信号调节激酶及 c-Jun 氨基末端激酶激活, 继而降低了 NF-κB AP-1 的表达。因此, 亚砷酸可通过对 RANKL 的下调作用, 抑制炎症细胞浸润、滑膜细胞增生、

关节软骨及骨的破坏。

参考文献

- 1 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病七年总结 - 附 242 例分析. 中华血液学杂志, 2000, 21(2): 67-70
- 2 成静, 祝寿芬. 三氧化二砷对小鼠免疫系统的影响. 中国地方病学杂志, 2000, 19(1): 16-19
- 3 陈纪藩, 黄清春, 陈光星, 等. 痛痹灵对 CIA 大鼠滑膜组织病理改变的影响. 安徽中医学院学报, 2003, 22(2): 47-49
- 4 Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000, 15: 2-12
- 5 Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002, 296(31): 1634-1635.
- 6 Pettit AR, Jilka R, von Stechow D, et al TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001, 159(5): 1689-1699.
- 7 Takayanagi H, Lizuka H, Jilka R, et al Involvement of receptor activator of nuclear factor-κB ligand osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(2): 259-269
- 8 Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, et al Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(5): 1003-1012
- 9 Campagnuolo G, Bohn B, Feige U, et al Kinetics of bone protection by recombinant osteoprotegerin therapy in Lewis rats with adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(7): 1926-1936.
- 10 朱小春, 吕吟秋, 许菲菲, 等. 亚砷酸对 BXSB 狼疮鼠狼疮性肾炎的治疗作用. 中国中西医结合肾病杂志, 2004, 5(1): 7-10

(收稿日期: 2006-05-19 本文编辑: 王宏)