

• 论 著 •

## 第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎模型大鼠的干预效果及作用机制研究

王 平,王华勇,王 浩

枣阳市第一人民医院康复科,湖北枣阳 441200

**摘 要:****目的** 探究第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎模型大鼠的干预效果及作用机制。**方法** 选取 30 只健康 SD 大鼠,正常组 10 只 SD 大鼠不予处理,对剩余 20 只大鼠进行建模,按照随机数字表法分为模型组和抑制剂组,各 10 只。在建模成功第 1 天起每隔 2 天对抑制剂组 SD 大鼠腹腔内注射第二代蛋白酶体抑制剂。比较模型组和抑制剂组大鼠建模后不同时间点关节炎评分,采用透射比浊法检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6、IL-10、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平,采用 Western blot 法检测核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)/p65、核因子- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )表达情况,采用酶联免疫吸附试验检测 IgA、IgM 水平。**结果** 与正常组相比,模型组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ALT、AST、NF- $\kappa$ B/p65、IgA、IgM 水平上升,IL-10、I $\kappa$ B $\alpha$  水平下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组相比,抑制剂组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ALT、AST、NF- $\kappa$ B/p65、IgA、IgM 下降,IL-10、I $\kappa$ B $\alpha$  水平上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 使用第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎模型大鼠进行治疗,能够通过激活 I $\kappa$ B $\alpha$ ,抑制 NF- $\kappa$ B/p65 通路,调节大鼠体内的炎症因子,降低关节炎的严重程度,效果显著。

**关键词:**第二代蛋白酶体抑制剂; 类风湿性关节炎; 肿瘤坏死因子; 免疫球蛋白

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.13.017 **中图法分类号:**R593.22

**文章编号:**1673-4130(2021)13-1606-04 **文献标志码:**A

### Intervention effect and mechanism of second generation proteasome inhibitor on rheumatoid arthritis model rats

WANG Ping, WANG Huayong, WANG Hao

Department of Rehabilitation, the First People's Hospital of Zaoyang, Zaoyang, Hubei 441200, China

**Abstract:****Objective** To explore the intervention effect and mechanism of the second generation proteasome inhibitor on rheumatoid arthritis model rats. **Methods** Thirty healthy SD rats were selected, and 10 SD rats in the normal group were not treated, while the remaining 20 rats were modeled and divided into model group and inhibitor group with 10 rats in each group according to random number table method. SD rats in the inhibitor group were intraperitoneally injected with the second generation proteasome inhibitor every 2 days from the first day of successful modeling. Arthritis score of model group and inhibitor group were compared at different time. Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, IL-10, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) levels were detected by transmission turbidimetric method. The expressions of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  were detected by Western blot. The levels of IgA and IgM were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the normal group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, ALT, AST, NF- $\kappa$ B/p65, IgA and IgM in model group were increased, while the levels of IL-10 and I $\kappa$ B $\alpha$  were decreased, with statistical significance ( $P<0.05$ ). Compared with model group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, ALT, AST, NF- $\kappa$ B/p65, IgA and IgM in inhibitor group were decreased, while the levels of IL-10 and I $\kappa$ B $\alpha$  were increased, with statistical significance ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The treatment of rheumatoid arthritis model rats with second-generation proteasome inhibitors can regulate inflammatory factors in rats and reduce the severity of arthritis by activating I $\kappa$ B $\alpha$  and inhibiting NF- $\kappa$ B/p65 pathway.

**Key words:** second generation proteasome inhibitor; rheumatoid arthritis; tumor necrosis factor; immunoglobulin

类风湿性关节炎作为一种自身免疫性疾病,主要 临床表现为关节晨僵、肿胀、疼痛等,如果得不到及时

**作者简介:**王平,男,主治医师,主要从事骨科、康复科临床研究。  
**本文引用格式:**王平,王华勇,王浩. 第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎模型大鼠的干预效果及作用机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(13): 1606-1609.

治疗,则会导致关节畸形,使关节丧失正常功能<sup>[1-2]</sup>。类风湿性关节炎主要以关节病变为主,有着较高的发病率和致残率,是一种全身性的疾病,严重影响患者的生活质量<sup>[3-4]</sup>。该病的发病较为隐匿,通常是从手指的近端关节、手掌关节最先起病,逐渐变为对称性的关节受累。类风湿性关节炎的病因仍未完全明确,目前该病仍未找到治疗的理想药物<sup>[5]</sup>。卡非佐米作为第二代蛋白酶抑制剂,相较于第一代蛋白酶抑制剂,具有抗多发性骨髓瘤的高效性及低毒性,且能够一定程度地破坏类风湿性关节炎诱导的核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)活化,抑制破骨细胞的分化和形成,但第二代蛋白酶抑制剂能否用于临床治疗类风湿性关节炎目前尚不清楚。所以,本研究使用第二代蛋白酶抑制剂对类风湿性关节炎模型大鼠进行治疗,旨在探讨第二代蛋白酶抑制剂对类风湿性关节炎模型大鼠的干预效果及作用机制。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取健康 SD 雄性大鼠(上海杰思捷公司) 30 只,体质量 165~190 g,平均(177.5 $\pm$ 11.87)g,按照随机数字法分为正常组、模型组、抑制剂组,各 10 只,于 23 $^{\circ}$ C、45%~55%湿度环境下喂养,饮用水与饲料均进行消毒后供实验大鼠自由进食。

**1.2 主要试剂** 兔源组织 NF- $\kappa$ B/p65 单克隆抗体(CST 公司);兔源核因子- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )单克隆抗体(Abcam 公司);卡非佐米(艾酶捷科技有限公司);完全弗氏佐剂(北京博雷德生物科技有限公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 类风湿性关节炎建模及给药** 建模:参照陈璐璐等<sup>[6]</sup>研究中的方法造模,30 只大鼠正常喂养 1 周后,正常组 10 只 SD 大鼠不予处理,对剩余 20 只大鼠进行建模。对模型组大鼠及抑制剂组大鼠右后足进行消毒后注射完全弗氏佐剂,每只 0.1 mL,1 周后在模型组、抑制剂组大鼠右后足进行消毒,消毒后注射不完全弗氏佐剂进行强化免疫,造模 11 d 后,当各组造模大鼠耳部、尾部结节等部位出现全身炎性反应

时,视为造模成功。最终建模成功 18 只,随机分为模型组 9 只,抑制剂组 9 只。给药:抑制剂组 SD 大鼠在建模成功第 1 天起每隔 2 天对大鼠腹腔内注射第二代蛋白酶抑制剂(溶解于 0.5 mL DMSO 溶剂中的 1.5 mL 卡非佐米)。

**1.3.2 关节炎评分标准**<sup>[7]</sup> 评分标准:无红肿为 0 分,小趾关节轻度红肿为 1 分,小趾关节和足跖肿胀为 2 分,踝关节下指甲肿胀为 3 分,所有指甲、关节肿胀为 4 分。按此标准对大鼠四肢病变程度进行评价并积分,计算关节炎评分。

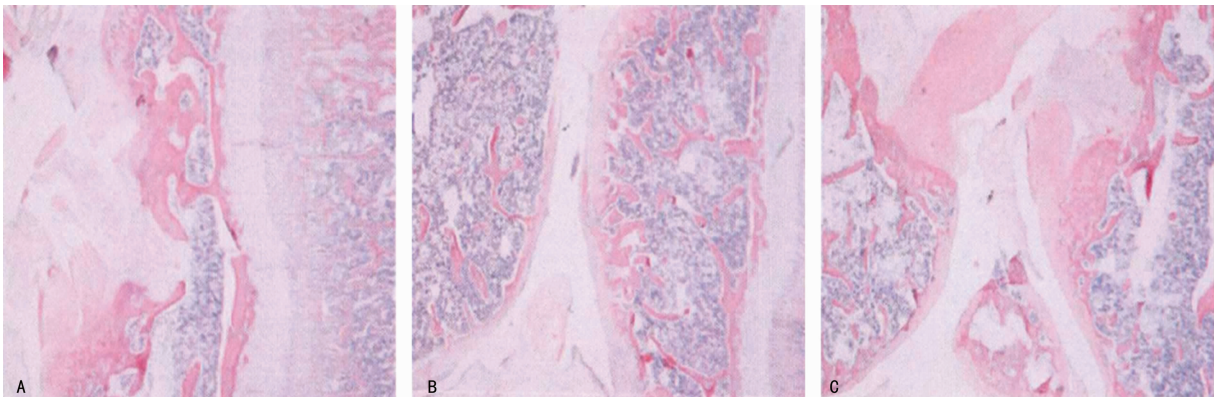
**1.3.3 标本制备及染色** 实验第 28 天时,全身麻醉处死各组大鼠,在大鼠股动脉处取 15 mL 股动脉血,离心取得上清液,于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待检,另取得大鼠踝关节及膝关节滑膜组织,置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待检。取大鼠踝关节液氮冷冻后常规脱水、透明、石蜡包埋,3  $\mu$ m 连续切片,将切片烤干后进行脱蜡处理,之后顺序置入不同浓度的乙醇中。使用苏木精染色 15 min 后清洗 3 次,使用 1% HCL-乙醇分化处理 30 s,清洗之后使用 1%伊红染色,使用乙醇进行脱水处理后进行脱蜡处理,封片后使用显微镜进行观察。

**1.3.4 检测方法** 采用透射比浊法<sup>[8]</sup>检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、ALT、AST 水平,采用 Western blot 法检测 NF- $\kappa$ B/p65、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达情况,采用酶联免疫吸附试验检测 SD 大鼠 IgA、IgM 水平。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS21.0 软件进行数据统计分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK- $q$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠关节滑膜组织病理图** 正常组大鼠关节滑膜组织健全,表面较平整光滑,关节滑膜组织中未见充血、水肿、增生的现象,未见炎症细胞的侵入;模型组大鼠关节滑膜组织厚度增加,滑膜组织绒毛状增生,并伴有大量的炎症细胞入侵;抑制剂组大鼠关节滑膜组织细胞增生减少,有着少量的炎症细胞入侵。见图 1。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为抑制剂组。

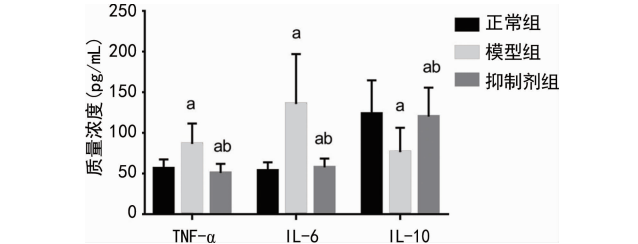
图 1 各组大鼠关节滑膜病理图(HE 染色, $\times 400$ )

**2.2 抑制剂组与模型组大鼠不同时间点关节炎评分比较** 建模后第 7、14、21 天,抑制剂组大鼠的关节炎评分较模型组下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

| 表 1 抑制剂组与模型组大鼠不同时间点关节炎评分 $[(\bar{x}\pm s), \text{分}]$ |          |                        |                        |                        |
|-------------------------------------------------------|----------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 组别                                                    | <i>n</i> | 第 7 天                  | 第 14 天                 | 第 21 天                 |
| 模型组                                                   | 9        | 2.46±0.52              | 6.18±0.88              | 12.09±1.39             |
| 抑制剂组                                                  | 9        | 2.08±0.42 <sup>a</sup> | 4.31±0.61 <sup>a</sup> | 6.52±1.03 <sup>a</sup> |

注:与模型组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

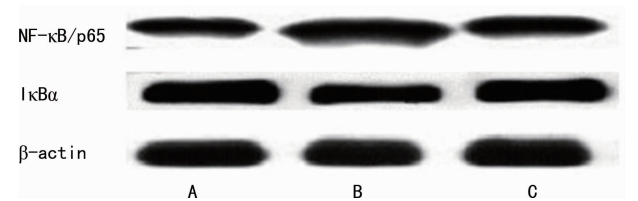
**2.3 各组大鼠体内炎症因子水平比较** 与正常组相比,模型组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平上升,IL-10 水平下降,且抑制剂组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-10 水平下降,IL-6 水平上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组大鼠相比,抑制剂组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平下降,IL-10 水平上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 2。



注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠体内 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 水平比较

**2.4 各组大鼠关节滑膜组织 NF- $\kappa$ B/p65、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平比较** 与正常组相比,模型组大鼠关节滑膜组织 NF- $\kappa$ B/p65 水平上升,I $\kappa$ B $\alpha$  水平下降,且抑制剂组大鼠关节滑膜组织 NF- $\kappa$ B/p65 水平下降,I $\kappa$ B $\alpha$  水平上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组相比,抑制剂组大鼠关节滑膜组织 NF- $\kappa$ B/p65 水平下降,I $\kappa$ B $\alpha$  水平上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 3、4。



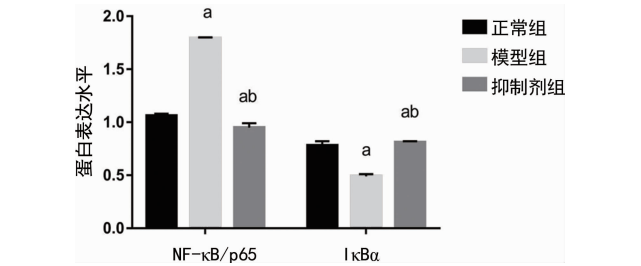
注:A 为正常组;B 为模型组;C 为抑制剂组。

图 3 各组大鼠关节滑膜组织 NF- $\kappa$ B/p65、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达情况

**2.5 各组大鼠 IgA、IgM 水平比较** 与正常组相比,模型组大鼠 IgA、IgM 水平上升,且抑制剂组大鼠 IgA、IgM 水平下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组相比,抑制剂组大鼠 IgA、IgM 水平下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 5。

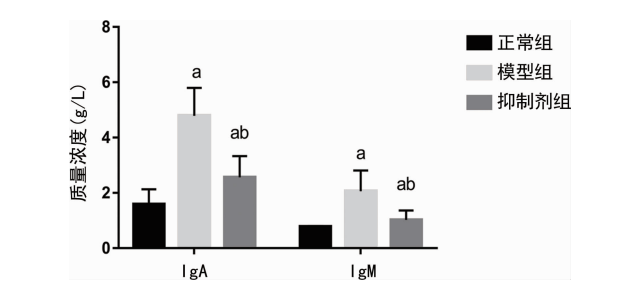
**2.6 各组大鼠 ALT、AST 水平比较** 与正常组相比,模型组大鼠 ALT、AST 水平上升,且抑制剂组大鼠 ALT 水平下降,AST 水平上升,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 6。

与正常组相比,模型组大鼠 ALT、AST 水平下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 6。



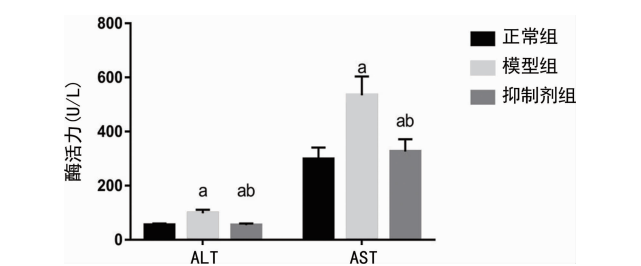
注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠 NF- $\kappa$ B/p65、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达情况比较



注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图 5 各组大鼠 IgA、IgM 水平比较



注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图 6 各组大鼠 ALT、AST 水平比较

### 3 讨 论

类风湿性关节炎是一种以关节病变为主的慢性自身免疫性疾病,该病在任何年龄段均可发病,以 20~50 岁为主,女性发病率是男性的 2~3 倍<sup>[9]</sup>。蛋白酶抑制剂在广义上指的是与蛋白酶分子活性中心上的一些基团的结合,使得蛋白酶活力下降,甚至消失,但不使酶蛋白变性的物质<sup>[10]</sup>。第二代蛋白酶抑制剂相较于一代蛋白酶抑制剂而言,具有抗多发性骨髓瘤的高效性和低毒性的特点。卡非佐米作为第二代蛋白酶抑制剂,是一种特异性、不可逆的靶向抑制剂,适用于多发性骨髓瘤患者的治疗<sup>[11]</sup>。

临床研究表明,类风湿性关节炎的发生、发展与机体炎症有着密切关联<sup>[12-13]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 是临床较为常用的炎症因子,通过检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 水平能够较为准确地评价类风湿性关节炎发展情况<sup>[14]</sup>。当关节滑膜周围的巨噬细胞被激活,产生大量的炎性介质,炎性介质配合促炎因子、生长因子、趋化因子等,能够引发炎症,从而导致关节出现损伤。张传英等<sup>[15]</sup>的研究显示,类风湿性关节炎大鼠炎性标

志物水平出现异常,对类风湿性关节炎大鼠进行有效的治疗,能够调控炎症标志物水平,抑制机体炎症反应。本研究结果显示,采用第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎模型大鼠进行治疗后,大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平下降,IL-10 水平上升,说明 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 有着密切关系,对 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 进行检测有助于判断类风湿性关节炎的发生、发展情况。

ALT 存在于各种细胞内,以肝脏、心脏组织细胞为主,当其发生病变时,ALT 水平会急剧增加<sup>[16]</sup>。AST 主要分布在心肌,其次是肝脏、骨骼肌等组织中<sup>[17]</sup>。肖燕等<sup>[18]</sup>的研究显示,类风湿性关节炎大鼠 ALT、AST 水平异常上升,进行有效治疗后,类风湿性关节炎大鼠 ALT、AST 水平降低。本研究结果显示,使用第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎大鼠进行治疗后,大鼠 ALT、AST 水平下降,与上述研究一致,说明使用第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎大鼠的治疗效果较好。

相关资料显示,NF- $\kappa$ B 在众多炎症和免疫反应的调节中具有重要作用,也是炎症反应调控机制中的中心环节<sup>[19]</sup>。NF- $\kappa$ B 参与多种细胞因子表达调控,如抗凋亡蛋白、Toll 受体、细胞因子受体及诱导型氧化氮合酶的表达。有研究表明,NF- $\kappa$ B 的激活、失活与泛素-蛋白酶体通路之间存在密切联系,在免疫细胞炎症反应机制研究中是关注热点<sup>[20]</sup>。泛素系统通过蛋白酶体降解 NF- $\kappa$ B 的抑制蛋白 I $\kappa$ B,参与调节免疫炎症细胞 NF- $\kappa$ B 的激活和再循环。NF- $\kappa$ B 通常以无活性的形式存在于未受刺激的细胞内,其能够调节免疫、炎症反应、细胞增殖及细胞凋亡<sup>[21]</sup>。本研究结果发现,使用第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎大鼠进行治疗,能够激活 I $\kappa$ B $\alpha$ ,抑制 NF- $\kappa$ B/p65 通路。

综上所述,利用第二代蛋白酶体抑制剂对类风湿性关节炎模型大鼠进行治疗,能够通过抑制 NF- $\kappa$ B/p65 通路,调节大鼠体内的炎症因子水平,降低关节炎的严重程度,效果显著。

## 参考文献

- [1] SPARKS J A. Rheumatoid arthritis[J]. Ann Intern Med, 2019,170(1):ITC1-ITC16.
- [2] LITTLEJOHN E A, MONRAD S U. Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. Prim Care, 2018,45(2):237-255.
- [3] MARCUCCI E, BARTOLONI E, ALUNNO A, et al. Extra-articular rheumatoid arthritis[J]. Reumatismo, 2018, 70(4):212-224.
- [4] VAN DER WOUDE D, VAN DER HELM-VAN MIL A H M. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2018,32(2):174-187.
- [5] NEUMANN E, FROMMER K, DILLER M, et al. Rheumatoid arthritis[J]. Z Rheumatol, 2018,77(9):769-775.

- [6] 陈璐璐,钟晓岚,朱颖敏,等. 雌性 Lewis 大鼠佐剂诱导关节炎模型的建立与评价[J]. 山西医科大学学报, 2019,50(10):1453-1460.
- [7] 郝锋,吴立斌,刘磊,等. 艾灸对类风湿性关节炎大鼠 IL-23/IL-17 炎症轴及相关血清炎症因子的影响[J]. 上海针灸杂志, 2020,39(12):1491-1498.
- [8] 刘雯,龚玲,曹伟,等. 免疫透射比浊法与散射比浊法检测血清胱抑素 C 的方法学比较[J]. 中国现代医生, 2017,55(21):96-98,102.
- [9] SIGAUX J, BITON J, ANDRÉ E, et al. Air pollution as a determinant of rheumatoid arthritis[J]. Joint Bone Spine, 2019,86(1):37-42.
- [10] GOSSAGE DL, CIESLAROVA B, AP S, et al. Phase 1b study of the safety, pharmacokinetics, and disease-related outcomes of the matrix metalloproteinase-9 inhibitor an-decaliximab in patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Ther, 2018,40(1):156-165.
- [11] CHOUDHARY N, BHATT L K, PRABHAVALKAR K S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2018,40(3):193-200.
- [12] 郭淑芳,姜婷婷. 下调 miR-217 抑制类风湿性关节炎患者外周血单个核细胞炎症反应的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020,36(8):933-938.
- [13] 孙鼎,宋琼,张伟,等. 丙泊酚对类风湿性关节炎大鼠炎症反应及滑膜细胞凋亡影响[J]. 中国公共卫生, 2020,36(4):574-577.
- [14] 锁星星,姜方明,裴影影,等. 治疗前后 RA 患者血清炎症因子水平及单个核细胞、滑膜成纤维细胞炎症因子基因表达观察[J]. 山东医药, 2020,60(3):50-53.
- [15] 张传英,胡玲,吴子建,等. 艾灸对实验性类风湿性关节炎大鼠血清 IL-6、IL-8 及 TNF- $\alpha$  的影响[J]. 针灸推拿医学, 2019,17(5):305-311.
- [16] 乔欢,闫润红. 雷公藤和雷公藤加逍遥散对 CIA 大鼠模型的抗炎作用及肝损伤情况的对比研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2017,12(3):357-360.
- [17] 李涛,王礼,张廷. Foxp3 磷酸化通过调控调节性 T 细胞功能对 类风湿性关节炎大鼠 TNF- $\alpha$  抑制状态影响的分子机制[J]. 临床和实验医学杂志, 2020,19(9):921-924.
- [18] 肖燕,张皓然,陈昊,等. 电针对类风湿性关节炎大鼠口服雷公藤甲素药动学及肝损指标的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017,23(9):1284-1287.
- [19] 蒋耀平,肖敬,赵先锋,等. 壮医药线灸联合甲氨蝶呤对佐剂关节炎大鼠 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. 中医药学报, 2018,46(5):18-24.
- [20] 刘彩丽,王颖瑛. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路在依那西普缓解大鼠类风湿性关节炎中的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2017,33(4):373-376.
- [21] 杨洋,张梦芹,周小小,等. 卡非佐米对大鼠类风湿性关节炎的治疗作用及机制研究[J]. 浙江医学, 2019,41(14):1480-1485.