

# 关节腔内注射雷公藤甲素治疗胶原诱导关节炎大鼠的实验研究

陈少华, 李拾林

(福建医科大学附属第二医院超声科, 福建 泉州 362000)

**【摘要】目的:** 探讨关节腔内注射雷公藤甲素治疗胶原诱导关节炎(CIA)大鼠的疗效。**方法:** 采用牛Ⅱ型胶原尾根皮下2次免疫诱导SD大鼠建立CIA模型。完全随机法将CIA大鼠分成4组, 分别于二次免疫1周后在大鼠关节腔内分别注射雷公藤甲素(TP)、复方倍他米松、依那西普及0.9% NaCl溶液(阳性对照组), 每周1次, 连续注射4周, 注射完毕后1周处死动物, 取其足部制作病理切片, 观察各组之间关节滑膜的病理变化, 并与正常对照组SD大鼠的关节滑膜进行比较。**结果:** 制作CIA大鼠模型的成功率为88.9%。TP组、复方倍他米松组、依那西普组及阳性对照组大鼠中滑膜炎的病理评分明显高于正常对照组。TP组、复方倍他米松组及依那西普组大鼠中滑膜炎的病理评分明显低于阳性对照组( $P < 0.05$ )。TP组与复方倍他米松组大鼠中滑膜炎的病理评分明显低于依那西普组( $P < 0.05$ ), 而TP组中滑膜炎的病理评分与复方倍他米松组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论:** TP与糖皮质激素在关节腔内注射均可以有效地治疗CIA大鼠的关节炎, TP可能成为类风湿关节炎的备选药物。

**【关键词】** 胶原诱导关节炎; 大鼠; 雷公藤甲素; 关节腔内注射; 病理评分

**【中图分类号】** R684.3 **【文献标志码】** A

## Experimental study on the treatment of osteoarthritis induced by collagen induced by intra-articular injection of triptolide

CHEN Shao-hua, LI Shi-lin

(Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

**【Abstract】 Objective:** To investigate the effect of intra-articular injection of triptolide on rat collagen-induced arthritis (CIA). **Methods:** Collagen-induced arthritis model in rats was established. CIA rats were randomly divided into 4 groups, and ankle joints of rats each group was injected intra-articular separately with triptolide (TP), betamethasone (BM), etanercept (EC), 0.9% NaCl (positive control group) once a week for 4 weeks. Rats were sacrificed one week later and their ankle joints were obtained and examined pathologically, compared with that of SD rats in normal group. **Results:** The success rate of the CIA rat model was 88.9%. The pathological score of synovitis was significantly higher in triptolide (TP) groups, betamethasone (BM) groups, etanercept (EC) groups, positive control group compared with normal control (NC) groups. The pathological score of synovitis in TP, BM and EC groups were significantly lower than that of the positive control group ( $P < 0.05$ ). The pathological score of synovitis in TP and BM groups were significantly lower than that of EC groups ( $P < 0.05$ ), however, the pathological score of synovitis in the TP group was not significantly different from that of BM group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** TP and glucocorticoid in intra-cavitary injection can be effective in the treatment of arthritis in CIA rats. TP can be used for joint cavity injection for RA treatment of alternative drugs.

**【Key words】** Collagen-induced arthritis; Rat; Triptolide; Intra-articular injection; Pathological score

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种病因未明的以关节滑膜炎为主要表现的慢性全身性自身免疫性疾病。本病呈全球性分布,是造成人类丧失劳动力和致残的主要原因之一。RA患者往往需要长期用药,多数药物对肝、肾、心血管等器官会造成不

同程度的损害。超声引导下关节腔内注射药物治疗,不但能在局部达到有效药物浓度,同时可减少药物的用量,继而避免全身给药的副作用。目前最常用的是在关节腔内注射糖皮质激素(如复方倍他米松),可以达到迅速缓解症状,减轻炎症的效果。但该方法复发

基金项目:福建省卫生厅青年课题(2014-2-22);福建省泉州市科技计划项目(2018Z102)

作者简介:陈少华(1987-),男,硕士,主治医师。E-mail:535690717@qq.com

通讯作者:李拾林,主任医师。E-mail:lsqz@139.com

率高、易引起骨质疏松、感染等并发症。关节腔内注射生物制剂依那西普近年来也有报道,可以达到较长时间的临床缓解<sup>[1]</sup>,具有一定的应用前景。雷公藤甲素(triptolide, TP)可以促进滑膜炎细胞凋亡,抑制成纤维细胞增殖,有望成为治疗 RA 的有效药物<sup>[2]</sup>。本研究通过建立胶原诱导关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型,评价在关节腔内注射 TP 对治疗 CIA 大鼠关节炎的疗效。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

清洁级 SD 大鼠 55 只,4~6 周龄,体重(200±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005]。标准条件饲养,自由进食、饮水,适宜温度、湿度,人工黑暗和光照交替。

牛 II 型胶原,完全弗氏佐剂购自 Sigma 公司,雷公藤甲素(纯度>99%)购自北京百灵威科技有限公司,复方倍他米松购自 MSD Mreck Sharp & Dohme AG 公司,依那西普购自德国辉瑞制药有限公司。

### 1.2 CIA 大鼠动物模型的建立<sup>[3]</sup>

牛 II 型胶原蛋白溶于冰醋酸溶液(4℃)中,使其充分溶解,然后缓慢加入等体积的完全氟氏佐剂中,将其充分混匀乳化配成浓度为 1 mg/mL 的乳剂,于大鼠尾根皮下多点注射,初次免疫后第 7 天以同样方法加强免疫 1 次。用 Baharav 的评分方法对关节炎进行评分<sup>[4]</sup>:根据大鼠踝关节、跖趾关节、趾关节红肿程度进行评分,0 分为对照;1 分示 1 个关节红肿;2 分示 2 个或 2 个以上关节红肿;3 分示踝关节以下足掌红肿;4 分示全部足爪红肿且不能负重。四肢分别进行评分,累计总和 5 分以上为造模成功,本研究造模成功率为 88.9%(40/45)。

### 1.3 分组及干预方法

选取 10 只清洁级 SD 大鼠为正常对照组。CIA 大鼠于二次免疫 1 周后进行干预。将 CIA 大鼠随机平均分成 4 组,采用 10% 的水合氯醛 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉,22G 穿 PTC 针行踝关节腔穿刺,分别在各组大鼠踝关节腔内注射 TP(0.5 mg/kg)、依那西普(0.5 mg/kg)、复方倍他米松(0.5 mg/kg)及 0.9% NaCl(0.5 mg/kg),每周 1 次,连续注射 4 周。

### 1.4 制作病理切片及评分

在最后一次注射药物后一周处死动物,取其足部固定于 10% 中性福尔马林溶液内 24 h,EDTA 脱钙后常规石蜡包埋,5 μm 厚切片,HE 染色,对关节滑膜被覆上皮细胞(滑膜细胞)有无充血水肿、炎细胞浸润、细胞变性、滑膜增生这四个指标分别进行评分,根据

病变轻重程度,依次定量为“1 分(少量或轻度)”,“2 分(中等量或中度)”,“3 分(大量或重度)”,“4 分(极重度)”,极轻度病变计为“0.5 分”,无病变组织计为“0 分”;累加所有分数,得出总分,计算出每组每只动物的分值越低提示病变程度越轻。实验组及对照组的每个病理标本切片由观察者采用随机单盲法进行多次评分,最后取平均值。

### 1.5 统计学分析

研究数据用 SPSS 21.0 软件进行分析,计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间的比较采用秩和检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况比较

在治疗过程中各实验组大鼠饮食、活动均无明显改变。TP 组、倍他米松组及依那西普组可见关节肿胀稍减轻,表面颜色变浅(图 1)。各实验组治疗前的 Baharav 评分差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。



图 1 实验大鼠足爪体征

A. CIA 诱导后大鼠足爪肿胀明显;B-D. 经过 1 个月的治疗,TP 组、复方倍他米松组、依那西普组大鼠的爪肿胀明显减轻。

表 1 各实验组大鼠治疗前 Baharav 评分比较

组别	n	Baharav 评分(分)
0.9% NaCl 组	10	7.0 ± 1.4
TP 组	10	6.8 ± 1.3
倍他米松组	10	6.7 ± 1.1
依那西普组	10	6.9 ± 1.3

### 2.2 组织学结果比较

组织学观察正常对照组滑膜组织表面覆有 1~4 层滑膜细胞,无变性、坏死。关节表面被覆薄层透明软骨,细胞排列整齐、表面光滑,无坏死。关节周围皮肤为复层鳞状上皮,真皮和皮下组织无炎症(图 2)。其余各组的关节滑膜细胞均有不同程度的充血水肿、变性增生以及炎细胞浸润(图 3)。

### 2.3 病理评分比较

TP 组、复方倍他米松组及依那西普组滑膜组织及皮下组织可见不同程度炎细胞浸润,滑膜轻度增生,软骨及骨组织均对照,病理评分均低于 0.9%

NaCl组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。TP组与复方倍他米松组大鼠中滑膜炎的病理评分明显低于依那西普组( $P < 0.05$ ),而TP组与复方倍他米松组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(表2)。本研究结果表明TP在关节腔内注射治疗CIA大鼠关节炎的疗效与糖皮质激素并相似,可以成为治疗关节炎的备选药物,同时优于生物制剂依那西普。

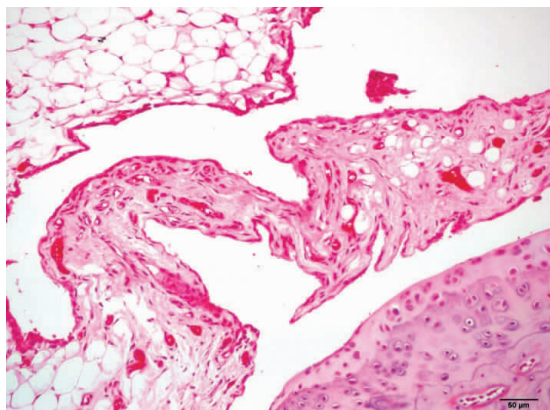


图2 正常对照组大鼠踝关节病理图(HE×100)

滑膜细胞,无变性、坏死。关节表面被覆薄层透明软骨,细胞排列整齐、表面光滑,无坏死。

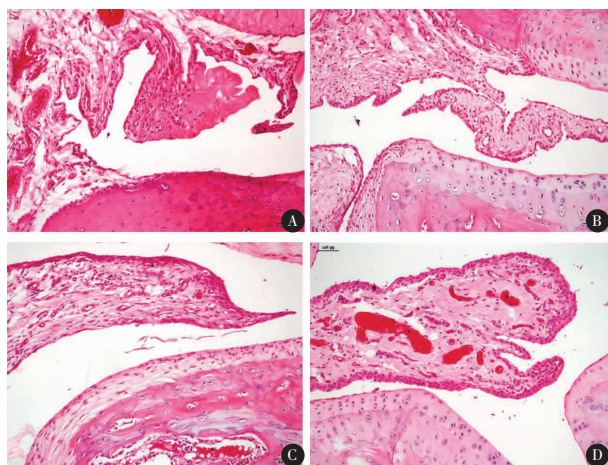


图3 实验组大鼠踝关节病理图(HE×100)

A.0.9% NaCl组,病理切片中显示大量炎性细胞浸润和滑膜增生;B.TP组;C.依那西普组,表现为轻度炎性细胞浸润和滑膜增生;D.倍他米松组,炎性细胞浸润及滑膜增生不明显。

表2 正常对照组及各实验组病理评分比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	评分(分)
正常对照组	10	0.50 ± 0.41
0.9% NaCl组	10	4.60 ± 0.93
TP组	10	1.61 ± 1.02*#
倍他米松组	10	1.56 ± 0.94*#
依那西普组	10	2.35 ± 1.43*

\* $P < 0.05$ ,与0.9% NaCl组比较;# $P < 0.05$ ,与依那西普组比较。

### 3 讨论

RA的治疗方法很多,均难以获得满意的临床效果,多数患者仍在忍受疾病反复发作及关节功能逐渐丧失带来的痛苦。TP是我国传统中药雷公藤的活性成分,用于治疗肿瘤、肾病、自身免疫疾病等,有抗肿瘤、抗炎及免疫抑制等作用。炎性细胞因子和促血管生成因子在RA进展中发挥至关重要作用,有证据表明,TP可以通过调节miR-155来抑制单核细胞的免疫应答<sup>[5]</sup>以及调节髓系细胞触发受体-1(TREM-1)的信号传导<sup>[6]</sup>,从而达到控制炎症的效果。滑膜成纤维细胞是RA发展的关键细胞,其分泌的多种细胞因子可以导致骨及软骨破坏,TP可以抑制滑膜成纤维细胞增殖及细胞因子的表达,促进其凋亡<sup>[7]</sup>。Gong等<sup>[8]</sup>用TP来治疗大鼠胶原诱导关节炎,发现TP可以通过下调CIA大鼠滑膜细胞中RANKL介导的ERK/AKT信号通路来改善关节炎的严重程度。由于TP口服及静脉给药有很强的毒性,它可以导致消化系统<sup>[9]</sup>、血液系统<sup>[10]</sup>、内分泌系统等的损害,因此限制了临床应用。在关节腔内直接注射治疗关节炎就可以用较少的剂量而达到局部高浓度,在取得较好疗效的同时极大地降低了全身给药的副作用,本研究结果表明关节腔内注射TP后大鼠关节炎较正常对照组减轻,该方法有望用来治疗RA。

在体外对RA滑膜细胞的培养中发现TP可以通过抑制环氧酶(COX2)下调滑膜成纤维细胞(RASFs)分泌前列腺素E2,进而抑制Th17细胞分化<sup>[11]</sup>,Th17细胞是一类新型的T辅助细胞,产生细胞因子如IL-17A、IL-17F和IL-22等,介导组织炎症,在RA疾病中发挥致病的作用。体外研究结果表明TP与滑膜细胞接触可以抑制炎症因子的表达,从而来控制疾病的发生发展,这也为在关节腔内注射TP提供了理论依据。经皮关节腔穿刺将药物注射到关节腔内可以使药物直接作用于滑膜组织,我们的研究结果表明TP组的滑膜增生、炎细胞浸润及皮下组织肿胀程度均得到改善。然而国内外并没有直接在关节腔内注射TP来治疗关节炎的报道,绝大部分采用的是静脉注射的方法<sup>[12-13]</sup>,但若是单个关节受累严重,要局部改善症状,提高患者的生活质量,并且最大化地减低副作用,最好的方法就是直接在关节腔内注射抗风湿类药物。

临床上,对于关节腔内注射治疗RA最常用的药物就是糖皮质激素,但是很难合理有效地针对个体化原则来控制糖皮质激素的用量,过度治疗还能导致骨质疏松、血脂代谢异常、感染和糖代谢异常

等<sup>[14]</sup>。本研究通过对 CIA 大鼠模型分别于关节腔内注射 TP、复方倍他米松、依那西普及 0.9% NaCl, 以及与正常对照组之间的对照关系, 我们发现 TP 与糖皮质激素在关节腔内注射均可以有效地治疗 CIA 大鼠的关节炎, 可以减轻大鼠关节炎的肿胀程度以及可以减轻滑膜细胞变性增生程度和减少炎细胞的浸润, 对于单关节的治疗, TP 可以成为在关节腔内注射治疗 RA 的备选药物。局部用药与全身用药的疗效及对重要脏器的损害是否存在差别尚有待进一步深入研究。

近年来, 生物制剂治疗 RA 获得了巨大的成功, 但由于高昂的费用限制了其广泛应用, 局部用药可以显著降低费用, 但关节腔内注射生物制剂治疗关节炎一直存在争议, 疗效不明确。梁东风等<sup>[15]</sup>比较了关节腔内注射依那西普与复方倍他米松的疗效, 发现依那西普组膝关节炎评分改善率优于倍他米松。Boesen 等<sup>[16]</sup>对 13 名 RA 患者行超声引导腕关节腔注射 25 mg 依那西普, 4 周后观察, 尽管临床表现得以改善, 但 MRI 及彩色多普勒超声的表现却没有明显变化。Aalbers 等<sup>[17]</sup>对 22 位 RA 或强直性脊柱炎患者行膝关节腔注射 25 mg 依那西普治疗, 可以获得短暂疗效, 但 2 周后与安慰剂比较便无明显差别。另外关节腔内注射生物制剂可能导致局部严重感染等并发症。本研究观察到局部注射依那西普并不能很好改善大鼠关节炎病变, 究其原因可能是因为注射入关节腔内的依那西普被过快清除导致难以持续发挥作用, 其应用前景尚有待更多的研究加以证实。

综上所述, 通过本研究的结果表明, TP 与糖皮质激素在关节腔内注射均可以有效地治疗 CIA 大鼠的关节炎, 其效果优于生物制剂依那西普, 因此 TP 可以成为在关节腔内注射治疗 RA 的备选药物。

#### 参考文献

[1] Carubbi F, Zugaro L, Cipriani P, et al. Safety and efficacy of intra-articular anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  agents compared to corticosteroids in a treat-to-target strategy in patients with inflammatory arthritis and monoarthritis flare[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2016, 29(2): 252 - 266.

[2] 叶雷, 贾霜, 潘文萍. 雷公藤甲素对类风湿关节炎患者滑膜成纤维细胞增殖的体外抑制作用研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(31): 4357 - 4359.

[3] Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis; how does it relate to rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8): 2192 - 2205.

[4] Baharav E, Mor F, Halpern M, et al. Lactobacillus GG bacteria a-

meliorate arthritis in Lewis rats[J]. *The Journal of nutrition*, 2004, 134(8): 1964 - 1969.

[5] Peng A, Huang X, Liu R, et al. Triptolide inhibits the inflammatory response of monocytes from rheumatoid arthritis patients by regulating miR-155[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2014, 30(6): 635 - 638.

[6] Fan D, He X, Bian Y, et al. Triptolide Modulates TREM-1 Signal Pathway to Inhibit the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 498.

[7] Su Z, Sun H, Ao M, et al. Atomic Force Microscopy Study of the Anti-inflammatory Effects of Triptolide on Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes[J]. *Microsc Microanal*, 2017, 23(5): 1002 - 1012.

[8] Gong Y, Huang X, Wang D, et al. Triptolide protects bone against destruction by targeting RANKL-mediated ERK/AKT signalling pathway in the collagen-induced rheumatoid arthritis[J]. *Biomedical Research*, 2017, 28(9): 4111 - 4116.

[9] Fu Q, Huang X, Shu B, et al. Inhibition of mitochondrial respiratory chain is involved in triptolide-induced liver injury[J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8): 1241 - 1248.

[10] 李志霞, 马冬梅, 杨兴华, 等. 雷公藤用药者血液系统不良事件发生率 Meta 分析[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(2): 339 - 345.

[11] Peng AP, Wang XY, Zhuang JH. Triptolide inhibites Th17 cell differentiation via regulating cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 axis in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis[J]. *China journal of Chinese materia medica*, 2014, 39(3): 536 - 539.

[12] Yang Y, Ye Y, Qiu Q, et al. Triptolide inhibits the migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes by blocking the activation of the JNK MAPK pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 41: 8 - 16.

[13] Kong X, Zhang Y, Liu C, et al. Anti-angiogenic effect of triptolide in rheumatoid arthritis by targeting angiogenic cascade[J]. *PLoS one*, 2013, 8(10): e77513.

[14] Mouterde G, Demis E, Ruyssens-Witrand A, et al. Indications of glucocorticoids in early arthritis and rheumatoid arthritis: recommendations for clinical practice based on data from the literature and expert opinion[J]. *Joint Bone Spine*, 2010, 77(6): 597 - 603.

[15] 梁东风, 黄烽, 张江林, 等. 单次膝关节腔注射依那西普治疗炎性膝关节炎的随机、单盲、平行、对照临床研究[J]. *中华内科杂志*, 2010, 49(11): 930 - 934.

[16] Boesen M, Boesen L, Jensen KE, et al. Clinical outcome and imaging changes after intraarticular (IA) application of etanercept or methylprednisolone in rheumatoid arthritis; magnetic resonance imaging and ultrasound-Doppler show no effect of IA injections in the wrist after 4 weeks[J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(4): 584 - 591.

[17] Aalbers C, Gerlag D, Vos K, et al. Intra-articular etanercept treatment in inflammatory arthritis: A randomized double-blind placebo-controlled proof of mechanism clinical trial validating TNF as a potential therapeutic target for local treatment[J]. *Joint Bone Spine*, 2015, 82(5): 338 - 344.

(收稿日期: 2019-10-12

学术编辑: 罗蕾)