

超声引导下腔内注射雷公藤甲素纳米粒治疗兔类风湿关节炎的实验研究

林娇娇 苏立阳 曾雅婷 罗玮雯 李拾林

摘要 **目的** 应用超声引导下关节腔内注射雷公藤甲素纳米粒(TPN)治疗兔类风湿关节炎,探讨超声评估兔关节炎疗效的应用价值。**方法** 选取27只健康新西兰大白兔,建立诱导类风湿关节炎模型后随机分为4组:对照组(6只)仅穿刺但不注射药物;TPN组、雷公藤甲素(TP)组和倍他米松(BS)组(每组各7只)分别于超声引导下兔膝关节腔内注射TPN、TP、BS,观察兔膝关节肿胀程度,应用超声评估兔膝关节滑膜增生、滑膜血流信号及骨侵蚀情况;分析超声指标与病理结果的相关性。**结果** 与对照组比较,TP组、BS组和TPN组滑膜血流的超声评分均降低,骨侵蚀的超声评分和病理评分也均降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与TP组比较,BS组和TPN组滑膜增生的超声评分和病理评分均降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);TP组、BS组和TPN组滑膜血流的超声评分和骨侵蚀的超声评分比较,差异均无统计学意义。相关性分析显示,滑膜和骨侵蚀的超声评分与其病理评分均呈正相关($r=0.832, 0.859$, 均 $P<0.001$)。**结论** 超声引导下关节腔内注射TPN治疗类风湿关节炎疗效好且副作用小,超声在评估治疗兔关节炎疗效中具有重要的价值。

关键词 超声;纳米粒;雷公藤甲素;关节腔注射;类风湿关节炎

[中图法分类号]R445.1;R593.22

[文献标识码]A

Experimental study of ultrasound-guided intra-articular injection of triptolide nanoparticle on rabbit rheumatoid arthritis

LIN Jiaojiao, SU Liyang, ZENG Yating, LUO Weiwen, LI Shilin

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

ABSTRACT **Objective** To explore the curative effect of ultrasound-guided intra-articular injection of triptolide nanoparticle (TPN) on rabbit rheumatoid arthritis, and the value of ultrasound in evaluating the curative effect of rabbit arthritis. **Methods** Twenty-seven New Zealand white rabbits were randomly divided into 4 groups after antigen-induced arthritis model were induced. The knee joints of TPN group, TP group and BS group were injected intra-articular with TPN, triptolide (TP) and betamethasone (BS) respectively guided by ultrasound, 7 rabbits in each group. The control group (6 rabbits) were punctured but not injected with any drugs. The swelling degrees of knee joints were observed. The ultrasonic scores and pathological changes of joint were assessed in synovitis, synovial blood flow and the bone erosion. The correlation between ultrasonic scores and pathological scores was tested. **Results** Compared with the control group, the ultrasonic scores of synovial blood flow in TP group, BS group and TPN group were decreased. The ultrasonic scores and pathological scores of bone erosion were decreased. The differences were statistically significant (all $P<0.05$). Compared with TP group, the ultrasonic score and pathological score of synovium in BS group and TPN group were decreased, and the differences were statistically significant (all $P<0.05$). There were no significant difference in the ultrasonic score of synovial blood flow and bone erosion among TP group, BS group and TPN group. The ultrasonic scores of synovium and bone erosion were positively correlated with pathological scores ($r=0.832, 0.859$,

基金项目:福建省自然科学基金项目(2018J01283);泉州市科技计划项目(2018Z102);福建省临床重点专科建设项目([2017]739号)

作者单位:362000 福建省泉州市,福建医科大学附属第二医院超声科(林娇娇、曾雅婷、罗玮雯、李拾林);福建医科大学附属泉州市第一医院超声科(苏立阳)

通讯作者:李拾林, Email: lslqz@fjmu.edu.cn

both $P < 0.001$). **Conclusion** Ultrasound-guided intra-articular injection of TPN can relieve joint synovitis and delay the bone erosion, with slight side effect. Ultrasound plays an important role in evaluating the therapeutic effect of arthritis in rabbits.

KEY WORDS Ultrasound; Nanoparticles; Triptolide nanomaterials; Intra-articular injection; Rheumatoid arthritis

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以侵蚀性关节炎为主要临床表现的慢性自身免疫性疾病, 部分患者以寡关节受累为主, 全身用药效果欠佳, 关节腔内注射给药是常用的临床治疗手段, 在减轻全身副作用的同时又能保证局部达到有效药物浓度。雷公藤甲素 (triptolide, TP) 是雷公藤木质部提取的二萜类脂溶性化合物, 具有抗炎、抗肿瘤及免疫调节等作用, 可用于 RA 的治疗^[1]。但 TP 治疗 RA 的生物利用度低, 为达到疗效临床常增加剂量, 致伴随的副作用风险也增加^[2]。纳米粒在实现药物靶向递送的同时, 还可以提高药物的生物利用度。本研究以固体脂质纳米粒作为载药工具制成 TP 纳米粒 (triptolide nanoparticle, TPN), 于超声引导下兔膝关节腔内注射 TPN 治疗兔抗原诱导关节炎 (antigen-induced arthritis, AIA), 并评估其疗效, 旨在探讨其临床价值。

材料与方 法

一、实验动物

选取成年健康新西兰大白兔 27 只, 体质量 2.3~2.7 kg, 购自福建省连江玉华山自然生态农业试验场, 许可证号: SCXK(闽)2014-0001, 分笼饲养于泉州医学高等专科学校动物房恒温 (24~26℃) 环境中。

二、主要实验试剂及仪器

1. 主要试剂: TP (纯度 >99%, 北京百灵威科技有限公司); 倍他米松 (BS, 瑞士 Mreck Sharp & Dohme AG 公司); 完全弗氏佐剂、卵蛋白 (美国 Sigma 公司); 山嵛酸甘油酯、甘油棕榈酸硬脂酸酯 (国药集团化学试剂有限公司); 单硬脂酸甘油酯、聚氧乙烯 40 醚氢化蓖麻油 (山东优索化工科技有限公司); 棕榈酸 (青岛优索化工科技有限公司)。

2. 主要仪器: 日立 Preirus 彩色多普勒超声诊断仪, 线阵探头, 频率为 18 MHz; Nano-ZS90 Zetasizer 激光粒度仪 (英国 Malvern 公司); DF-101S 恒温加热磁力搅拌器 (河南省巩义市予华仪器有限责任公司); 全自动生化分析仪 (德国 Beckman 公司)。

三、实验方法

1. 制备 TPN: 参考文献 [3], 采用微乳法将 TP、酯类等原材料放在集热式恒温加热磁力搅拌器中加热熔融并磁力搅拌, 然后缓慢滴加超纯水, 待形成有淡

蓝色乳光的微乳后, 继续磁力搅拌, 迅速用 4℃ 冰水冷却固化, 磁力搅拌 100 min, 样品置于冰箱 4℃ 保存。

2. 建立 AIA 兔动物模型: 分为基础致敏和末次免疫两个环节。基础致敏: 先将 20 mg/ml 卵蛋白生理盐水与等量完全弗氏佐剂混匀, 现配现用, 每只兔每周于肩胛区皮下注射混合液 1.0 ml, 连续注射 3 周; 末次免疫: 于第 4 周向兔膝关节腔内注射 0.2 ml 卵蛋白溶液^[4]。末次免疫 1 周后行超声检查提示膝关节滑膜组织增生明显及滑膜血流信号较丰富, 即为模型建立成功。

3. 分组及超声引导下腔内注射: 27 只兔随机分成 4 组, 在末次免疫 1 周后, 取 2% 戊巴比妥钠 (1.25 ml/kg) 注入兔耳缘静脉麻醉后, 90° 屈曲兔膝关节, TPN 组、TP 组和 BS 组 (各 7 只) 分别于超声引导下使用 1.0 ml 注射器向兔膝关节腔内注射 TPN、TP、BS 溶液各 0.2 ml, 其中 TP 溶液和 TPN 溶液中 TP 含量均为 0.1 mg/ml, 连续给药 4 周, 每周 1 次。对照组 (6 只) 仅行关节腔穿刺而不注射任何药物。

四、观测指标

关节腔内连续给药 4 周, 观察各组兔一般情况, 测量其膝关节直径。每周行膝关节超声检查, 根据 Szkudlarek 超声评分系统^[5] 对各组兔膝关节的滑膜增生、滑膜血流信号及骨侵蚀情况进行评分, 评分标准见表 1。在末次给药的 1 周后取耳缘静脉血, 行生化全套检测, 测量指标包括: 总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、间接胆红素 (IBIL)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、血清尿素氮 (BUN) 及血清肌酐 (Scr), 比较各组兔肝、肾功能的差异。然后经耳缘静脉使用空气栓塞法处死兔, 取兔膝关节制作病理切片并行 HE 染色, 观察滑膜增生和骨侵蚀情况并进行病理评分, 滑膜增生 (滑膜炎) 的病理评分根据 Krenn 评分标准^[6], 以滑膜衬里层、滑膜细胞的数量、炎症浸润程度 3 个指标分为无、轻度、重度滑膜炎; 同时取所有兔的肝、肾进行病理检查。

五、统计学处理

应用 SPSS 21.0 统计软件, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两组间和多组间等级资料比较分别行 Mann-Whitney U 检验和 Kruskal-Wallis 检验; 计数资料以频数或率表示, 行 χ^2 检验。相关性分析采用 Spearman 相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 Szkudlarek 超声评分标准

评分	滑膜增生(滑膜炎)	滑膜血流	骨侵蚀
0分	无异常	无血流信号	骨表面光滑
1分	轻度增生,不超过骨面最高点连线	1~2处点状血流	骨表面不光滑,但无骨质缺损
2分	中度增生,超过骨面最高点连线,但不超过骨干	血流信号分布<1/2滑膜面积	骨面有轻度骨质缺损
3分	重度增生,超过骨面最高点连线,并延伸超过一侧骨干	树枝状、网状血流且分布>1/2滑膜面积	骨表面广泛骨破坏

结 果

一、各组兔总体情况

所有兔在末次免疫后的第2天均出现膝关节肿胀皮温升高,行走受限;在注射给药1周后,TPN组、BS组和TP组兔膝关节直径均明显减小。所有兔一般情况可,体质量均未见明显减轻,末次给药1周后血生化检查提示各组TBIL、IBIL、DBIL、AST、ALT、BUN及Ser均无明显异常。所有兔肝、肾病理检查均提示肝、肾细胞形态正常,排列良好,未发现异常改变。

二、各组兔膝关节的超声评分比较

1. 各组兔膝关节滑膜增生超声评分比较:末次给药1周后对照组滑膜增生超声评分以2、3分为主,TPN组

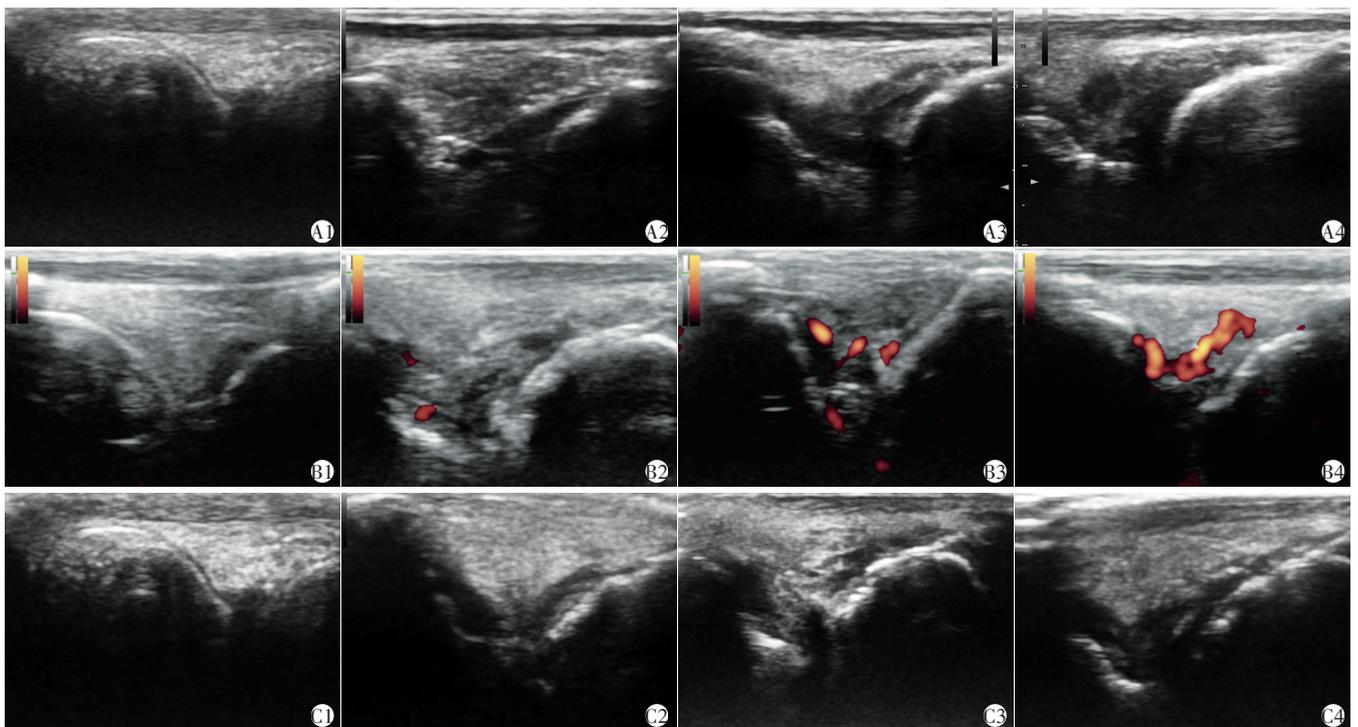
以1、2分为主,BS组和TPN组以0、1分为主,见表2和图1 A1~A4。TP组滑膜增生超声评分低于对照组($Z=-2.726, P<0.05$),BS组和TPN组滑膜增生超声评分均低于TP组,差异均有统计学意义($Z=-2.176、-2.360$,均 $P<0.05$),BS组与TPN组比较差异无统计学意义。

表2 末次给药1周后各组膝关节滑膜增生的超声评分结果

组别	0分	1分	2分	3分
TP组	0	4	3	0
TPN组	3	4	0	0
BS组	2	5	0	0
对照组	0	0	2	4

2. 各组兔膝关节滑膜血流超声评分比较:末次给药1周后TP组、TPN组和BS组滑膜血流超声评分以0分为主,均较对照组低,差异均有统计学意义($Z=-3.033、-2.842、-3.277$,均 $P<0.01$);TP组、TPN组和BS组间比较差异无统计学意义。见表3和图1 B1~B4。

3. 各组兔膝关节骨侵蚀超声评分比较:末次给药1周后TP组、TPN组和BS组的骨侵蚀超声评分以0分和1分为主,均较对照组低,差异均有统计学意义($Z=-2.948、-3.141、-3.210$,均 $P<0.01$);TP组、TPN组和BS组间比较差异无统计学意义。见表4和图1 C1~C4。



A1~A4:分别示TPN组(0分)、BS组(1分)、TP组(2分)和对照组(3分)的滑膜增生情况;B1~B4:分别示TPN组(0分)、TP组(1分)、对照组(2分)和对照组(3分)滑膜血流信号的丰富程度;C1~C4:分别示TPN组(0分)、TP组(1分)、对照组(2分)和对照组(3分)骨破坏情况

图1 各组兔膝关节超声表现

表 3 末次给药 1 周后各组膝关节滑膜血流的超声评分结果

组别	0分	1分	2分	3分
TP组	6	1	0	0
TPN组	5	2	0	0
BS组	7	0	0	0
对照组	0	2	2	2

表 4 末次给药 1 周后各组膝关节声骨侵蚀的超声评分结果

组别	0分	1分	2分	3分
TP组	3	3	1	0
TPN组	5	2	0	0
BS组	6	1	0	0
对照组	0	0	2	4

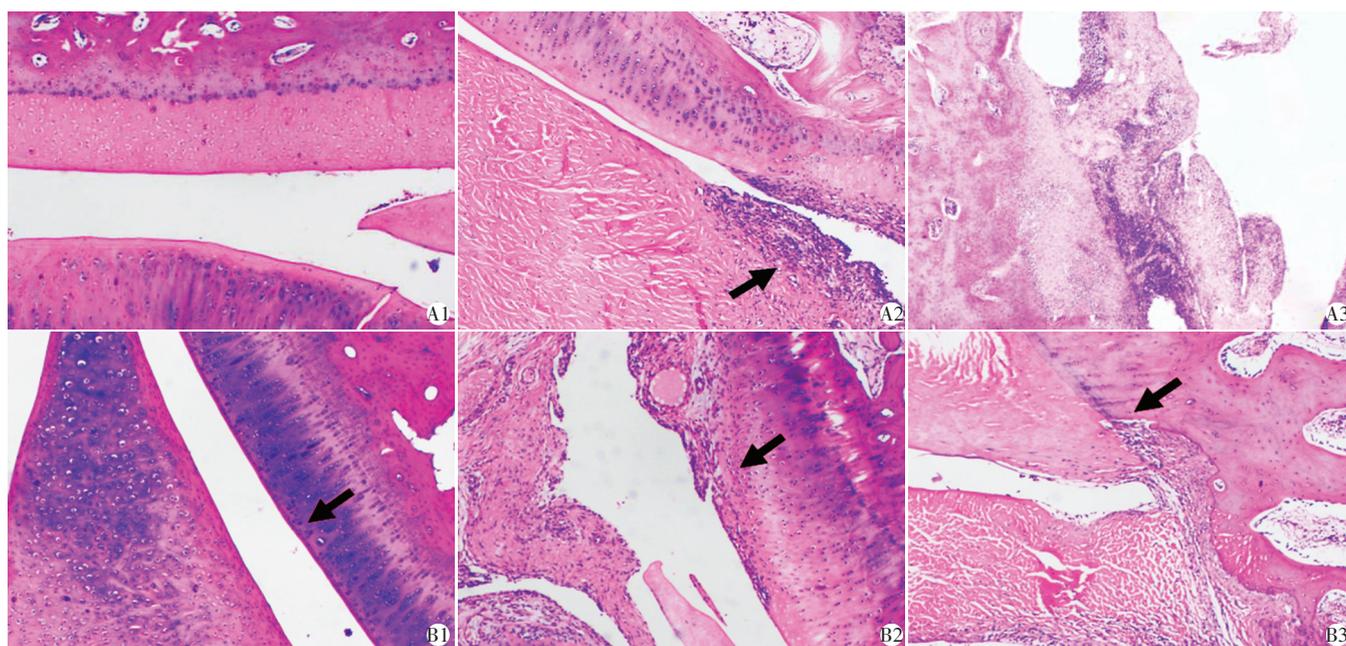
三、各组兔膝关节的病理评分比较

1. 兔膝关节滑膜炎病理评分比较: TP 组滑膜炎病理评分(5分)低于对照组(10分), 差异有统计学意义($Z=-2.530, P<0.05$), 以轻度滑膜炎为主; TPN 组和 BS 组滑膜炎病理评分(1分、0分)均低于 TP 组, 差异均有统计学意义($Z=-2.082, -2.687$, 均 $P<0.05$), TPN 组与 BS 组比较差异无统计学意义。见图 2 A1~A3。

2. 兔膝关节骨侵蚀病理评分比较: TP 组、TPN 组和 BS 组骨侵蚀病理评分(2分、1分、1分)均较对照组低(10分), 差异均有统计学意义($Z=-2.216, -2.505, -2.505$, 均 $P<0.05$), TP 组、TPN 组和 BS 组间的比较差异无统计学意义。见图 2 B1~B3。

四、相关性分析

兔膝关节滑膜增生超声评分和骨侵蚀超声评分与其病理评分均呈正相关($r=0.832, 0.859$, 均 $P<0.001$)。



A1: TPN 组, 正常滑膜; A2: TP 组, 滑膜轻度增生, 局部少量炎细胞及滑膜细胞增生(箭头示); A3: 对照组, 重度滑膜增生, 大量炎细胞浸润伴衬里层溃疡形成; B1: TPN 组, 骨面光滑, 无骨侵蚀; B2: TP 组, 轻度滑膜炎骨侵蚀情况(箭头示); B3: 对照组, 重度滑膜炎骨侵蚀情况(箭头示)

图 2 各组膝关节滑膜和骨病理图(HE 染色, $\times 40$)

讨 论

目前认为 RA 的免疫发病机制是在基因和环境共同影响下, 自身免疫被激活, 自身反应性 T 细胞分化为致病性 T 细胞亚群, 在一系列免疫调节细胞和细胞因子的共同作用下, 引发炎症级联反应, 最终导致关节炎^[7]。TP 是中药雷公藤的主要活性成分, 其可以通过诱导致病性 T 细胞凋亡、衰减核内转录因子 NF- κ B 活性和降低促炎细胞因子水平等改善滑膜炎、减轻骨

破坏, 同时还可抑制 RA 血管翳生成^[8]。本实验结果发现兔关节腔内注射 TP 后膝关节滑膜炎和骨破坏情况均明显改善, 说明腔内注射 TP 治疗 RA 有一定疗效。

使用中草药治疗疾病最大的挑战是吸收不良、生物利用度低, 常需要增加剂量才能达到理想疗效, 但伴随的副作用风险也随之升高^[2]。随着纳米技术的发展, 纳米粒在提高药物生物利用度的同时还可以实现药物的靶向递送, 被广泛应用于载药系统。研究^[9]指出纳米药物可以选择性地将药物递送并保留在发炎

的滑膜组织中,利于药物吸收,同时减少全身潜在副作用。且脂质纳米粒的生物相容性好,能有效提高TP的生物利用度,实现缓释控释,同时保护TP不被关节腔内的酶类降解,从而减少剂量依赖性毒性^[10]。最近研究^[11]表明,肽修饰的脂质体递送可以调节免疫细胞因子,提高自身免疫性关节炎的治疗指数,增强疗效的同时降低了全身性暴露风险^[12]。目前局部治疗RA最常用的药物是糖皮质激素,其能迅速减轻疼痛,有效控制炎症,但后期复发率高,易导致感染、骨质疏松等并发症。已有研究^[3]证实采用微乳法制备TPN,包封率更高且能有效降低TP的亚急性毒性,具有良好的安全性,给药4周后所有兔均未发现明显肝、肾副作用。本实验结果显示,关节腔内注射TPN治疗RA的效果明显优于TP,效果与BS相当,TPN或可成为局部治疗RA的备选药物。

传统的腔内注射进针方法主要是靠关节表面的骨性标志结合触诊来定位,具有盲目性。本实验使用超声引导下腔内注射给药,所有兔均未出现穿刺并发症等情况。相比其他影像引导技术,超声引导因无辐射且能够实时调整穿刺路径及走向,使针尖准确位于关节间隙内,从而避开周围血管、肌腱和神经等,减少穿刺损伤,确保药物进入关节腔。研究^[13]认为肌骨超声对RA病理特征的评价效能与MRI相当,且超声观测滑膜血流信号与C反应蛋白、红细胞沉降率、类风湿因子均呈正相关($r=0.623, 0.498, 0.591$, 均 $P<0.05$),有助于评估疾病的活动性。郑擎等^[4]应用高频超声于末次免疫后1周内检测到AIA模型兔关节滑膜增厚,本实验结果与之相符,早于血清中的血管内皮生长因子和TNF- α 明显上升时间(2~6周),可见超声早期诊断RA的敏感性更高。研究^[14]发现超声检查结果较疾病活动的血清学指标与组织学评分相关性更好,尤其是在疾病早期阶段。本实验兔AIA模型在末次免疫后第2天兔膝关节均出现明显肿胀,超声检查下可见滑膜增生并随时间逐渐进展,滑膜血流较丰富,4周后开始出现骨破坏。在注射药物治疗后,除对照组外其他各组兔膝关节滑膜炎及骨侵蚀情况均有明显好转,且滑膜炎和骨侵蚀的超声评分与病理评分均具有良好的相关性($r=0.832, 0.859$, 均 $P<0.001$)。由此可见超声检查评估RA患者关节炎情况准确可靠,可以用于关节炎的早期诊断和疗效监测中。

本实验的局限性:①纳入的兔AIA模型样本量相对较少,后期还需进行更大样本的研究,以及关节腔内药物代谢动力学的研究;②本实验仅观察至给药4周

后,未进行长期疗效对比。

综上所述,对于寡关节受累的兔AIA,超声引导下关节腔内注射TP或可成为治疗关节炎的新方法,尤以TPN疗效更显著;超声在评价滑膜炎与骨侵蚀情况上与病理检查均具有较好的一致性,可作为评估早期关节炎及随访治疗效果可靠的影像学手段。

参考文献

- [1] Danping F, Qingqing G, Jiawen S, et al. The effect of triptolide in rheumatoid arthritis: from basic research towards clinical translation [J]. *Int J Molec Ences*, 2018, 19(2): 376.
- [2] 刘斌,樊丹平,舒海洋,等.雷公藤甲素毒性作用及减毒研究的整合探析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(20): 181-190.
- [3] 张聪.雷公藤甲素脂质纳米粒研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2014.
- [4] 郑擎,陈树强,缪蔚冰,等.早期卵清蛋白诱导的兔类风湿性关节炎模型的建立与评估[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(5): 673-677.
- [5] Szkudlarek M, Court-Payen M, Jacobsen S, et al. Interobserver agreement in ultrasonography of the finger and toe joints in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(4): 955-962.
- [6] Krenn V, Perino G, Rütther W, et al. 15 years of the histopathological synovitis score, further development and review: a diagnostic score for rheumatology and orthopaedics [J]. *Pathol Res Pra*, 2017, 213(8): 874-881.
- [7] Guo Q, Wang Y, Xu D, et al. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies [J]. *Bone Research*, 2018, 6(2): 107-120.
- [8] Dudics S, Langan D, Meka RR, et al. Natural products for the treatment of autoimmune arthritis: their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome [J]. *Int J Molec Sci*, 2018, 19(9): 2508.
- [9] O' Mary H, Del Rincón I, Cui Z. Nanomedicine for intra-articular drug delivery in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(23): 2490-2506.
- [10] Mishra DK, Ruchita S, Mishra PK. Lipid based nanocarriers: a translational perspective [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(7): 2023-2050.
- [11] Meka RR, Venkatesha SH, Moudgil KD. Peptide-directed liposomal delivery improves the therapeutic index of an immunomodulatory cytokine in controlling autoimmune arthritis [J]. *J Control Release*, 2018, 286(9): 279-288.
- [12] Xue M, Zhao Y, Li XJ, et al. Comparison of toxicokinetic and tissue distribution of triptolide-loaded solid lipid nanoparticles vs free triptolide in rats [J]. *Eur J Pharmaceuti Sci*, 2012, 47(4): 713-717.
- [13] 胡小丽,谷颖,蔡燕,等.肌骨超声评价类风湿性指关节炎的病理特征及炎性病变[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(20): 3182-3187.
- [14] Matteo AD, Mankia K, Azukizawa M, et al. The role of musculoskeletal ultrasound in the rheumatoid arthritis continuum [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2020, 22(8): 41.

(收稿日期:2020-09-27)