

的预防方法有多种,如物理方法(减少损伤、冲洗、预防感染等、隔离肠管)、非甾体类抗炎药物、血栓素合成酶抑制药、促进纤维蛋白溶解、基因疗法抑制成纤维细胞生长繁殖等,但临床应用却难以达到实验显示的效果^[9]。

PNS 具有减少炎症因子分泌、增强吞噬活性、提高纤维蛋白溶解等多方面的作用。本研究发现,应用 PNS 后局部炎症反应减轻,胶原纤维合成明显减少,术后腹膜粘连显著改善。局部应用 PNS 可减少炎症渗出,减少凝血因子 I 和纤维蛋白析出,防止成纤维母细胞大量增殖,减轻肠管水肿,使腹膜上皮迅速修复;同时,PNS 通过增强纤溶活性使病理性胶原沉积和纤维形成减少。病理组织学检查可以看出,PNS 能较好地恢复间皮的连续性和完整性,有利于间皮细胞的覆盖,达到生理性修复。综合评价,PNS 3.0 mg 的疗效与传统纤维蛋白溶解药尿激酶 80 U 相当,PNS 6.0 mg 疗效明显优于尿激酶。

PNS 作为三七的主要活性成分,水溶性好,用于术后预防腹膜粘连的发生,使用方便,效果确切,具有良好的临床应用前景,值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] LIAKAKOS T, THOMAKOS N, FINE P M, *et al.* Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. recent advances in prevention and management

[J]. *Dig Surg*, 2001,18(4):260-273.

[2] 曾健,李晓辉,黄钺华,等.壳聚糖 DCX-16 对术后腹膜粘连的防治作用[J].中国新药与临床杂志,2006,25(3):193-195.

[3] MATSUDA S, SE N, IWATA H, *et al.* Evaluation of the antiadhesion potential of UV cross-linked gelatin films in a rat abdominal model [J]. *Biomaterials*, 2002,23(14):2901-2908.

[4] 王德娟,莫家聪,谢家伦.剖腹术后腹膜粘连发生机制和预防的研究现状及进展[J].中华小儿外科杂志,2005,26(5):273-276.

[5] 张剑峰,张丹参.三七总皂苷药理作用研究进展[J].医学综述,2007,13(6):472-474.

[6] LI S H, CHU Y. Anti-inflammatory effects of total saponins of panax notoginseng [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1999,20(6):551-554.

[7] 陈江斌,许家刚,江洪,等.三七总皂苷对冠心病患者过氧化脂质及纤维蛋白溶酶原激活物的影响[J].中国新药杂志,2000,9(11):781-782.

[8] 凌立君,易洪刚,曾莉,等.小鼠术后腹膜粘连模型腹膜粘连评价方法的实验研究[J].中华实用中西医杂志,2005,18(15):473-476.

[9] RASA K, ERVERDI N, KARABULUT Z, *et al.* The effect of methylene blue on peritoneal adhesion formation [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2002,13(2):108-111.

⁹⁹锝 [⁹⁹Tc] 亚甲基二膦酸盐 对胶原诱导性关节炎大鼠的疗效观察*

孔芳,柯丹,胡绍先,秦瑞芳,苏敏,雷小妹,涂巍,沈桂芬,何培根
(华中科技大学同济医学院附属同济医院风湿免疫科,武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨⁹⁹锝 [⁹⁹Tc] 亚甲基二膦酸盐(⁹⁹Tc-MDP)对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠的治疗作用。方法 设立正常组大鼠 10 只,建立 CIA 大鼠模型 18 只,分为模型组和⁹⁹Tc-MDP 组各 9 只。⁹⁹Tc-MDP 组 CIA 大鼠予以尾静脉注射⁹⁹Tc-MDP,相当于⁹⁹Tc 0.04 μg·kg⁻¹·d⁻¹共 21 d。测量各组大鼠体重、关节肿胀程度和关节炎指数(AI),观察滑膜病理组织形态学变化,并用 ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子(TNF-α)水平。结果 ①与正常组大鼠比较,模型组 CIA 大鼠体重明显减轻,关节肿胀程度严重,AI 评分明显升高,滑膜组织病理评分也明显升高(均 P<0.01);②⁹⁹Tc-MDP 干预治疗可明显缓解 CIA 大鼠体重下降,改善关节肿胀程度,降低 AI 评分和滑膜组织病理评分;③正常对照组和⁹⁹Tc-MDP 组大鼠血清 TNF-α 水平显著性低于模型组大鼠(均 P<0.01)。结论 CIA 大鼠关节炎症状明显,⁹⁹Tc-MDP 可明显改善 CIA 大鼠一般状况,减轻关节炎症状及滑膜组织的病理评分,降低血清 TNF-α 水平,对 CIA 有显著治疗效果。

[关键词] ⁹⁹锝 [⁹⁹Tc] 亚甲基二膦酸盐;关节炎,实验性;滑膜组织病理评分;肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R976;R965;R684.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)10-1149-04

Therapeutic Effect of ⁹⁹Tc - MDP on Collagen-induced Arthritis in Rats

KONG Fang, KE Dan, HU Shao-xian, QIN Rui-fang, SU Min, LEI Xiao-mei, TU Wei, SHEN Gui-fen, HE

Pei-gen (Department of Rheumatology, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate the therapeutic effect of $^{99}\text{Tc-MDP}$ on collagen-induced arthritis (CIA) in rats.

Methods CIA was established by subcutaneous injection with type II collagen and incomplete Freund's adjuvant in rats. Three groups were designed including the control group, CIA model group and $^{99}\text{Tc-MDP}$ treatment group. Rats of the treatment group were given $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^{99}Tc of $^{99}\text{Tc-MDP}$ by caudal vein injection for 21 days. Arthritis were evaluated by measuring the body weight, joint swelling degree, arthritis index (AI) and synovium histopathologic index. ELISA was used to assay the $\text{TNF-}\alpha$ level in serum. **Results** ①The degree of weight loss, joint swelling, AI and synovium histopathologic index in the rats of CIA model group were significantly higher than those of $^{99}\text{Tc-MDP}$ treatment group and the control group ($P < 0.01$); ②Post-treatment with $^{99}\text{Tc-MDP}$ obviously attenuated the weight lost, inhibited the degree of joint swelling, AI and synovium histopathologic index; ③Compared with the CIA model group, the level of $\text{TNF-}\alpha$ was significant decreased in control group and $^{99}\text{Tc-MDP}$ treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion** The CIA rats suffered serious polyarthritis, however the clinical symptoms and the synovium histopathologic index were markedly improved and the level of $\text{TNF-}\alpha$ in serum was reduced after treated with $^{99}\text{Tc-MDP}$. $^{99}\text{Tc-MDP}$ could inhibit the progress of CIA.

KEY WORDS $^{99}\text{Tc-MDP}$; Arthritis, experimental; Synovium histopathological index; $\text{TNF-}\alpha$

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节炎为主要表现的自身免疫疾病,迄今仍然缺乏有效控制 RA 的药物。 ^{99}Tc [^{99}Tc] 亚甲基二膦酸盐 ($^{99}\text{Tc-MDP}$, 商品名:云克)是我国自主开发研制的一种新药,研究显示, $^{99}\text{Tc-MDP}$ 能多途径抑制自身免疫反应,如降低基质金属蛋白酶的活性、抑制炎症细胞因子的生成、抑制前列腺素的生成、抑制破骨细胞的活性及抑制骨吸收等。笔者在成功建立胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型的基础上,观察 $^{99}\text{Tc-MDP}$ 对 CIA 大鼠的疗效和对炎症细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品 牛 II 型胶原(每支 10 mg),不完全弗氏佐剂(每支 5 mL),均购于 Chondrex 公司; $^{99}\text{Tc-MDP}$ 注射液(每支 ^{99}Tc 0.05 μg , MDP 5 mg),由成都云克药业有限责任公司提供;肿瘤坏死因子(TNF)- α ELISA 试剂盒购于深圳晶美生物有限公司。

1.2 CIA 大鼠模型的建立及评价 健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 40 只,6~8 周龄,体重(200 ± 20)g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。正常饮食饲养 1 周后,按体重匹配随机选取 10 只作为正常对照组,其余 30 只用于 CIA 造模。参照文献方法^[1],将牛 II 型胶原 10 mg 与等体积的不完全弗氏佐剂 5 mL 充分乳化,制成 II 型胶原乳剂;无菌条件下在大鼠尾根及

背上多点皮内注射,初次免疫共注射乳剂 0.2 mL,2 周后予以加强免疫,同法再注射乳剂 0.2 mL。

初次免疫后第 1 天起,测量大鼠体重及关节肿胀程度,后者以游标卡尺测量双后肢踝关节下缘左后径和前后径,以左右径和前后径的乘积表示,每周 1 次。于初次免疫后第 28 天起同时记录全身关节病变程度,进行关节炎指数(arthritis index, AI)^[2]评分,每 4 天 1 次;评定依据为关节红肿程度、范围及畸形情况 0 分:无红肿;1 分:趾关节稍红肿,足爪或足垫单个区域炎症;2 分:关节轻度红肿,足爪或足垫或踝关节两个区域以上的炎症;3 分:关节中度红肿,轻度功能障碍;4 分:关节严重红肿,僵直甚至畸形,严重功能障碍。

1.3 实验动物分组及处理 初次免疫后 28 d,选取 AI 评分 >6 分的 CIA 大鼠随机分为 2 组:①模型组(9 只),尾静脉注射与 $^{99}\text{Tc-MDP}$ 组同体积 0.9% 氯化钠溶液, qd, 持续 3 周;② $^{99}\text{Tc-MDP}$ 组(9 只),尾静脉注射 $^{99}\text{Tc-MDP}$, 相当于 ^{99}Tc $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 持续 3 周;治疗 21 d 后,处死包括正常组在内的所有大鼠。

1.4 滑膜病理组织学检查 取双侧后肢关节的滑膜组织固定、脱水、透明、包蜡和切片,苏木精-伊红(HE)染色观察病理变化和病理组织学评分。依据滑膜衬里层增生、衬里下层炎症程度及血管生成情况从轻到重分为 4 级^[3]。衬里层增生评分,0 分:少于 3 层;1 分:3 或 4 层;2 分:5 或 6 层;3 分:>6 层。炎症程度评分,0 分:无炎症细胞浸润;1 分:炎症细胞散在分布;2 分:炎症细胞弥漫分布;3 分:炎症细胞形成淋巴滤泡或生发中心。血管生成评分,0 分:无新生血管生;1 分:轻度新生血管生成;2 分:中度新生血管生成;3 分:重度新生血管生成。

1.5 ELISA 方法测定血清 $\text{TNF-}\alpha$ 水平 取腹主动脉血 2 mL, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 分离血清。严格

[收稿日期] 2008-02-10

[基金项目] *湖北省自然科学基金资助项目(基金编号:2007ABA110)

[作者简介] 孔芳(1982-),女,河南济源人,硕士,研究方向:自身免疫疾病。电话:027-83663614, E-mail: kongfang-2005@yahoo.com.cn。

[通讯作者] 胡绍先,女,副教授,硕士生导师,博士。电话:027-83663614, E-mail: sxianhu@yahoo.com.cn。

按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作检测血清 TNF- α 水平,用 PBS 作为阴性对照,每份标本均设有复孔,结果取其均值。

1.6 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, AI 和病理组织学评分比较用 Kruskalwallis 检验,其余各组之间比较用方差分析和 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠大体情况 初次免疫后约 10 d 部分大鼠出现后肢关节红肿,对称性并进行性加重,后肢关节

肿胀出现较早且严重。模型组 CIA 大鼠体重减轻,饮食和活动减少,后期可见毛发干枯,无光泽,精神差。⁹⁹Tc-MDP 干预后关节红肿症状与模型组相比明显减轻,未出现关节功能丧失。

2.2 ⁹⁹Tc-MDP 对 CIA 大鼠体重的影响 与正常组比较, CIA 大鼠食欲下降,明显消瘦,体重减轻 ($P < 0.01$)。与模型组比较,⁹⁹Tc-MDP 组于给药第 14 天后明显缓解大鼠的体重减轻,随着用药时间的延长,⁹⁹Tc-MDP 组大鼠体重逐渐恢复并接近正常。见表 1。

表 1 3 组大鼠给药前后的体重变化

组别	大鼠/只	给药前	给药第 7 天	给药第 14 天	给药第 21 天
⁹⁹ Tc-MDP 组	9	167.20 \pm 4.72 ^{*1}	176.13 \pm 6.40 ^{*1}	187.67 \pm 5.13 ^{*1*2}	203.61 \pm 4.13 ^{*1*3}
模型组	9	166.50 \pm 5.12 ^{*1}	169.82 \pm 4.21 ^{*1}	172.65 \pm 4.29 ^{*1}	176.03 \pm 4.02 ^{*1}
正常组	10	188.03 \pm 4.01	200.63 \pm 3.15	213.35 \pm 4.03	226.86 \pm 4.27

与正常组比较,^{*1} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*2} $P < 0.05$,^{*3} $P < 0.01$

2.3 ⁹⁹Tc-MDP 对 CIA 大鼠关节肿胀程度的影响 CIA 大鼠各组关节肿胀程度均较正常组增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较,⁹⁹Tc-MDP 组于用药第 7 天关

节肿胀程度减轻 ($P > 0.05$),于用药第 14 天始肿胀程度明显减轻 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组大鼠踝关节肿胀程度比较

组别	大鼠/只	给药前	给药第 7 天	给药第 14 天	给药第 21 天
⁹⁹ Tc-MDP 组	9	0.80 \pm 0.01 ^{*1}	0.73 \pm 0.00 ^{*1}	0.69 \pm 0.01 ^{*1*2}	0.69 \pm 0.02 ^{*1*2}
模型组	9	0.80 \pm 0.02 ^{*1}	0.82 \pm 0.02 ^{*1}	0.85 \pm 0.03 ^{*1}	0.93 \pm 0.03 ^{*1}
正常组	10	0.63 \pm 0.02	0.64 \pm 0.02	0.65 \pm 0.03	0.66 \pm 0.03

与正常组比较,^{*1} $P < 0.05$;与模型组比较,^{*2} $P < 0.05$

2.4 ⁹⁹Tc-MDP 对 CIA 大鼠 AI 评分的影响 随着免疫时间延长, CIA 大鼠的 AI 评分逐渐增高,模型组在初次免疫后的 40 d, AI 评分达高峰,高于⁹⁹Tc-MDP 组 ($P < 0.01$);⁹⁹Tc-MDP 组 AI 评分第 32 天达高峰,以后逐渐下降,明显低于模型组 ($P < 0.01$)。见图 1。

程度改善,滑膜组织增生明显减轻,炎性细胞浸润减少但可见滑膜下层毛细血管和少量纤维组织增生。见表 3。

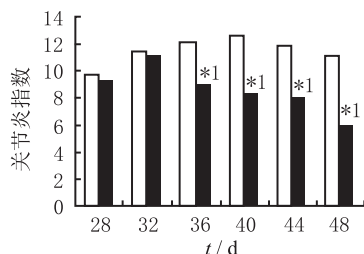


图 1 两组 CIA 大鼠关节炎指数与时间关系柱形图

□ 模型组 ■ ⁹⁹Tc-MDP 组

与模型组比较,^{*1} $P < 0.01$

2.5 ⁹⁹Tc-MDP 对 CIA 大鼠滑膜病理学评分的影响 正常组滑膜细胞呈单层规则排列,未见明显的炎症细胞浸润。模型组滑膜细胞增生明显,层次增多,排列紊乱,可见滑膜细胞的脂肪变性,滑膜下层纤维组织增生,炎性细胞浸润及血管翳形成,评分高于⁹⁹Tc-MDP 组 ($P < 0.05$)。⁹⁹Tc-MDP 组以上滑膜炎病理变化不同

表 3 两组大鼠滑膜组织病理学评分

组别	大鼠/只	衬里层增生	炎性细胞渗出	血管形成
⁹⁹ Tc-MDP 组	9	1.82 \pm 0.41 ^{*1}	1.05 \pm 0.05 ^{*1}	1.88 \pm 0.15 ^{*1}
模型组	9	2.84 \pm 0.30	1.97 \pm 0.19	2.76 \pm 0.26

与模型组比较,^{*1} $P < 0.01$

2.6 血清 TNF- α 水平 CIA 大鼠模型组和⁹⁹Tc-MDP 组血清 TNF- α 水平分别为(65.53 \pm 4.31)和(19.11 \pm 1.78) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,正常组大鼠(1.09 \pm 0.77) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,模型组和⁹⁹Tc-MDP 组比正常组明显增高(均 $P < 0.01$);⁹⁹Tc-MDP 组与模型组比较血清 TNF- α 水平显著减低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

CIA 动物模型是一种由 II 型胶原混合弗氏佐剂诱发的自身免疫性关节炎动物模型^[4],主要表现为多发性关节炎,在发病机制、症状、病理改变及实验室指标方面与人类 RA 相似,是研究 RA 较理想的实验性关节炎动物模型^[5]。

^{99}Tc -MDP 是微量元素 ^{99}Tc 与 MDP 的螯合物。其中化学价态为 +4 价的 ^{99}Tc 通过电子得失,可以清除自由基,保护人体内超氧化物歧化酶(SOD)活力,防止自由基对组织的破坏^[6]。MDP 则通过螯合金属离子可降低若干金属蛋白酶(包括胶原酶等)的活性,阻止胶原酶对关节软骨组织的分解破坏作用;还可抑制前列腺素的产生,抑制组胺释放等,具有较强的抗炎、镇痛作用。同时,MDP 对骨生成区和具有炎症的骨关节部位具有明显的靶向性,能够抑制破骨细胞的活性,抑制骨吸收。 ^{99}Tc 和 MDP 结合后,通过调节人体自身免疫功能,抑制和修复骨组织的某些病理改变,在治疗 RA、强直性脊柱炎、格雷夫斯(Graves)眼病等自身免疫性疾病及骨转移瘤、骨质疏松等疾病方面都取得了不错的临床效果^[7-10]。

TNF- α 是 RA 的重要致炎因子,在 RA 的疾病过程中发挥重要而复杂的作用。研究发现,TNF- α 激活并增强血管内皮细胞对黏附分子的表达,使血液中的白细胞通过与黏附分子相互作用被集中到关节腔;还可以刺激滑膜细胞和软骨细胞,使破骨细胞减少糖蛋白合成,增加糖蛋白降解,并产生胶原酶和其他中性蛋白酶,释放骨钙等,从而导致骨和软骨的破坏^[11];TNF- α 增加滑膜及内皮细胞成纤维生长因子释放,刺激滑膜细胞增生,促进血管翳的形成,并促进滑膜细胞、巨噬细胞、纤维细胞和软骨细胞产生基质金属酶等而加重病情。

本实验采用异源性牛 II 型胶原混合不完全弗氏佐剂诱导 CIA 大鼠模型,致炎后约 10 d 大鼠开始出现关节炎的症状,表现为后肢关节红肿,对称性并进行性加重,继而延及前肢,后肢关节肿胀出现得较早较严重。疾病过程中,CIA 大鼠出现饮食和活动减少,平均体重减轻,毛发干枯,失去光泽,精神差,部分大鼠出现眼炎和耳部红斑。与正常组和 ^{99}Tc -MDP 组大鼠相比,模型组大鼠体重明显减轻,关节肿胀程度较重,AI 评分较高,组织病理学评分亦较高,关节炎症状严重,血清中 TNF- α 水平显著升高。 ^{99}Tc -MDP 可改善 CIA 大鼠上述表现,缓解体重下降,减轻关节肿胀程度,降低 AI 评分和滑膜组织病理学评分,并能将 CIA 大鼠高表达的血清 TNF- α 水平降低。这可能也是 ^{99}Tc -MDP 治疗关节炎的机制之一,从而减轻关节炎,减少血管翳的形成,阻止关节软骨、骨的吸收和破坏。在本实验的用药过程中均未出现明显药物副作用,为其安全性提供了

一定依据。总之, ^{99}Tc -MDP 具有良好的有效性及安全性,为临床治疗 RA 提供了新的方向。

[参考文献]

- [1] NISHIKAWA M, MYOUI A, TOMITA T, *et al.* Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653 [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(9): 2670-2681.
- [2] CUZZOCREA S, MCDONALD M C, MOTA-FILIPPE H, *et al.* Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(2): 320-328.
- [3] TSUBAKI T, ARITA N, KAWAKAMI T, *et al.* Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4): 825-836.
- [4] BAJTNER E, NANDAKUMAR K S, ENGSTR M A, *et al.* Chronic development of collagen-induced arthritis is associated with arthritogenic antibodies against specific epitopes on type II collagen [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(5): 1148-1157.
- [5] ROWLEY M J, NANDAKUMAR K S, HOLMDAHL R. The role of collagen antibodies in mediating arthritis [J]. *Mod Rheumatol*, 2008, 3, [Epub ahead of print].
- [6] HOGG N. Free radical in disease [J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1998, 16(4): 241-248.
- [7] 孙士斌,周慧敏,杨爱格,等. ^{99}Tc -亚甲基二膦酸盐的临床新应用 [J]. *中国药物与临床*, 2003, 3(6): 492-495.
- [8] 张允平,杨维淮,叶新华,等. “云克”与泼尼松治疗 Graves 眼病疗效比较 [J]. *中华核医学杂志*, 2002, 22(4): 204-205.
- [9] 穆荣,陈适,栗占国,等. ^{99}Tc -亚甲基二膦酸盐在类风湿性关节炎的疗效及其对炎性细胞因子的抑制作用 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2004, 8(1): 39-41.
- [10] 谢艳莉,罗卉,左晓霞,等. ^{99}Tc -亚甲基二膦酸盐对胶原诱导性关节炎大鼠的治疗作用及其对滑膜 MMP-3 和 TIMP-1 的影响 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2006, 10(7): 406-409.
- [11] MATSUNO H, YUDOH K, KATAYAMA R, *et al.* The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41(3): 329-337.