

A 型肉毒毒素关节腔注射对佐剂性关节炎大鼠的抗炎效果观察

王开乐 初晓 张仲义 王琳 沈娜娜 薛俊强 李铁山

【摘要】 目的 观察 A 型肉毒毒素 (BoNT/A) 踝关节腔注射对佐剂性关节炎大鼠模型的抗炎作用。**方法** 选取 Wistar 大鼠 90 只,于左后足趾皮下注射完全弗氏佐剂 (CFA) 0.1 ml 进行免疫,从而制作大鼠佐剂诱导性关节炎 (AIA) 动物模型。待 AIA 模型成模后,采用随机数字表法将其分为 BoNT 组 (向踝关节腔内注射 BoNT/A)、生理盐水组 (向踝关节腔内注射生理盐水) 和假手术组 (行踝关节腔穿刺但不注射药物);另选取 30 只健康 Wistar 大鼠纳入空白组。大鼠于免疫后每隔 3 d 行踝关节红外热成像拍摄以及踝关节关节炎指数评分;成模后分别于成模当天、成模后 7 d、成模后 14 d 时行红外热成像拍摄、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 蛋白检测以及踝关节 HE 染色、评分。**结果** 大鼠免疫后 3 d 时其关节炎指数开始升高,于免疫 10 d 左右时关节炎指数明显升高,并随疾病进展逐渐增高,至免疫 18~20 d 时达到峰值。红外热成像检查显示,大鼠免疫后出现右侧踝关节区域温度明显升高,随着炎症发展,温度呈逐渐下降趋势,免疫 20 d 时双侧踝关节平均温度维持在 37.5~38.0 $^{\circ}\text{C}$ 。成模后 7 d、14 d 时 BoNT 组可观察到双侧足趾平均温度较成模当时明显下降,与同时间点生理盐水组及假手术组间差异均具有统计学意义 ($P<0.05$);成模后 7 d、14 d 时 BoNT 组踝关节腔滑膜中 IL-1 β 蛋白表达较成模当时明显降低,并且与相同时间点生理盐水组及假手术组间差异亦具有统计学意义 ($P<0.05$)。成模后 7 d、14 d 时除空白组外,其余各组大鼠滑膜组织增生、炎性细胞浸润、软骨破坏及软骨下骨质暴露程度均较成模当时有不同程度加重;并且 BoNT 组在成模后 7 d、14 d 时 HE 评分 [分别为 (3.8 \pm 0.63) 分和 (3.7 \pm 0.86) 分] 均显著低于相同时间点模型组及生理盐水组水平 ($P<0.05$)。**结论** 关节腔内注射 BoNT/A 对佐剂性关节炎大鼠具有抗炎作用。

【关键词】 A 型肉毒毒素; 关节炎; 大鼠; 完全弗氏佐剂

Anti-inflammatory effects of botulinum toxin type A in a rat model of arthritis Wang Kaile*, Chu Xiao, Zhang Zhongyi, Wang Lin, Shen Nana, Xue Junqiang, Li Tieshan. * Department of Rehabilitation Medicine, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, China

Corresponding author: Li Tieshan, Email: tieshanl@126.com

【Abstract】 Objective To verify the anti-inflammatory effects of intra-articular injection of botulinum toxin type A (BoNT/A) on adjuvant-induced arthritis using a rat model. **Methods** A murine model of chronic ankle arthritis was established in 90 Wistar rats by injection of 0.1 ml of complete Freund adjuvant (CFA) into the pads of their left paws. They were then randomly divided into a BoNT group ($n=30$) which received an intra-articular injection of 0.1 ml (20 IU) of BoNT/A, an NS group ($n=30$) which received intra-articular injection of 0.1 ml of normal saline solution and a sham group ($n=30$) which were punctured without any injection. In addition, 30 normal rats formed a control group. Infrared thermal imaging was performed and an index of arthritis was evaluated every three days. The infrared thermal imaging revealed the expression of interleukin-1 β (IL-1 β) through hematoxy-eosin (HE) staining. **Results** The arthritis index began to increase 3 days after the injection of CFA and it had increased significantly after 10 days, reaching a peak value of 18, 24 days after the injection. The infrared thermal imaging showed that the temperature in the right paw increased greatly after the injection. Following the development of arthritis, the temperature declined gradually, arriving at a steady temperature of between 37.5 and 38.0 $^{\circ}\text{C}$ in both ankles 20 days after the injection. The average temperature in both paws of the BoNT group had decreased significantly more by 7 and 14 days after the injection than in the NS and sham groups. The expression of IL-1 β in the synovium of the ankle joint also had decreased significantly more in the BoNT group after 7 and 14 days. HE scoring showed an obvious his-

topathologic change in the hypertrophic synovium, inflammatory cell infiltration, cartilage destruction and exposure of subchondral bone after 7 and 14 days compared with right after the injection in all groups except the control group. Moreover, the average HE scores of the BoNT group rats after 7 and 14 days were significantly lower than those seen in the NS and sham groups at the same time points. **Conclusion** Intra-articular injection of botulinum toxin type A has an anti-inflammatory effect on arthritis induced by complete Freund adjuvant, at least in rats.

【Key words】 Botulinum toxin type A; Arthritis; Rats; Complete Freund adjuvant

A 型肉毒毒素 (Botulinum toxin A, BoNT/A) 能阻断神经肌肉接头处突触前膜乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 释放^[1], 所以在临床上主要被用来治疗各种类型肌肉过度活动^[2]。相关研究发现, 采用 BoNT/A 治疗高肌张力障碍性疾病 (如痉挛性斜颈) 时发现, BoNT/A 的镇痛效果早于其对肌肉的促松弛作用^[1,3-4]。这一发现提示 BoNT/A 除了能抑制神经肌肉接头处 Ach 释放以外, 还可以阻断其他神经递质如 P 物质 (substance p, SP)、钙基因结合肽相关蛋白 (calcitonin gene related peptide, CGRP)、谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 释放, 从而起到抗伤害及镇痛作用, 因此 BoNT/A 也被应用于治疗偏头痛、三叉神经痛以及筋膜疼痛综合征等疾病^[5-8]; 近年来也有报道采用肉毒素关节腔内注射治疗难治性关节疼痛^[9]。

类风湿性关节炎炎症区域受损组织会产生大量化学物质, 包括缓激肽、5-羟色胺、K⁺、H⁺、组胺、前列腺素和三磷酸腺苷 (triphosphadenine, ATP) 等, 这些物质能影响外周神经末梢伤害性感受器并产生伤害性冲动, 上传的神经冲动进而刺激背根神经节细胞产生神经肽类递质, 如 SP、CGRP 和 Gln 等, 这些递质会以囊泡的形式运输到中枢系统脊髓背角或外周伤害性感觉神经末梢中。脊髓背角的传出信号再逆向反射至关节腔组织并刺激外周神经末梢释放更多的 SP、CGRP 和 Gln。这一逆向的传出信号造成了关节腔组织神经源性炎症^[10]。

近年来 BoNT/A 被用于各种关节腔注射无效的难治性关节痛治疗^[11]。关节炎会造成神经递质 (如 SP、CGRP、Gln) 释放到关节腔内, 而 BoNT/A 关节腔内注射能抑制 SP、CGRP 及 Gln 释放, 因此 BoNT/A 能减轻关节炎患者神经源性炎症程度^[11-13]。鉴于目前鲜见在病理组织学以及分子生物学层面关于 BoNT/A 对关节炎神经源性炎症影响的报道, 本研究旨在通过病理组织学以及分子生物学层面观察关节腔内注射 BoNT/A 是否能减轻关节炎动物模型炎症因子水平而发挥抗神经源性炎症功效。

材料与方 法

一、主要实验材料

共选取成年清洁级 Wistar 雄性大鼠 120 只, 体重 250~300 g, 由青岛派特福德白鼠养殖基地提供, 大鼠购入后自由进食、进水, 给予自然光照, 经适应性饲养

1 周后进行模型制作。主要实验设备包括 SPECTRUM 9000MB 型红外线热影像摄像诊断系统 (购自台湾汉唐集成股份有限公司)、低温高速离心机 (德国产)、奥林巴斯倒置显微镜 (日本)、UVP 凝胶成像分析系统 (美国 UVP 公司), 主要实验试剂为抗白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)—抗 (ab9722) 购自美国 Abcam 公司, 抗兔 IgG 单克隆二抗 (ab193984) 购自美国 Abcam 公司, 完全弗式佐剂 (complete Freund adjuvant, CFA) 购自美国 Sigma 公司。

二、关节炎动物模型制作及关节炎指数评分

根据 Pearson 等^[14]介绍的方法向 90 只 Wistar 大鼠左侧足趾皮垫内注射 0.1 ml 完全弗氏佐剂进行免疫, 从而制作大鼠佐剂诱导性关节炎 (adjuvant induce arthritis, AIA) 动物模型, 依据 van Holten^[15]等介绍性关节炎评分方法每隔 3 d 对免疫后的大鼠进行关节炎指数 (arthritis index, AI) 评分, 观察关节炎发生、发展情况并以此作为关节炎成模评价指标。关节炎评分标准如下: 0 分表示关节正常; 1 分表示大鼠踝关节出现红斑和轻微肿胀; 2 分表示大鼠踝关节到趾关节或掌关节出现红斑和轻微肿胀; 3 分表示大鼠踝关节到跖趾关节或掌关节出现红斑和中度肿胀; 4 分表示大鼠踝关节到趾关节出现红斑和重度肿胀^[15], 每只大鼠最多评 12 分^[16]。

三、实验分组及处理

相关文献证实大鼠弗式佐剂性关节炎模型为慢性关节炎模型, 在免疫后 8 h 即会出现足趾红肿, 3 d 后肿胀明显, 继发性改变 (如较明显的关节肿胀及红斑) 多出现在免疫后 10~15 d 期间, 于 20~25 d 时出现第 2 次高峰, 此时关节炎明显加重, 且出现不可逆退行性病变^[17], 故将免疫后 21 d 视为成模时间点较为可靠^[18]。于免疫后 21 d 时采用随机数字表法将所有成模大鼠 ($n=90$) 分为 BoNT 组、生理盐水组 (简称 NS 组) 及假手术组, 每组 30 只; 另将余下的 30 只正常 Wistar 大鼠纳入空白组。BoNT 组大鼠成模后向踝关节腔内注射 0.1 ml BoNT/A (20 IU); NS 组大鼠成模后向踝关节腔内注射生理盐水 0.1 ml; 假手术组大鼠成模后则向踝关节腔内穿刺, 但不注射任何药物试剂。

四、观察指标

1. 红外热影像检测: 红外热成像检查是近年来应用较广泛的检查项目, 可探测受试者皮肤表面温度, 比较不同区域温度差异以判断病变部位, 目前常用于脑

卒中后肩痛、颈椎痛、腰腿痛、关节炎等检查^[19]。本研究采用红外热成像仪于大鼠免疫后每隔 3 d 进行双侧踝关节拍摄,观察大鼠踝部温度变化以及各组大鼠平均温度之间有无差异。

2. 关节炎指数评定:于大鼠免疫后每隔 3 d 对其踝关节进行关节炎指数评估^[15],并观察各组大鼠关节炎发展情况及继发性变化。

3. 组织学观察:除空白组(任意时间点处死)外,BoNT 组、NS 组及假手术组均于成模当天(即免疫后第 21 天)、成模后 7 d(即免疫后第 28 天)、成模后 14 d(即免疫后第 35 天)时各取 5 只大鼠行 8% 水合氯醛腹腔注射麻醉,随后将大鼠仰卧位固定于解剖板上,打开腹腔后经左心室插针至主动脉,后将右心耳剪开,用输液器快速滴注 4 ℃ 生理盐水 250 ml,待流出液清亮后再缓慢滴注 4 ℃ 多聚甲醛 250 ml,待滴注结束后将大鼠双侧踝关节取下并置于 4 ℃ 多聚甲醛中固定 6~8 h,再置于 8% 乙二胺四乙酸(EDTA)中脱钙 2~4 周,经石蜡包埋脱水后切片(片厚 5~10 μm),行苏木素-伊红(haematoxylin and eosin, HE)染色,封片后置于显微镜下观察,采用 ImageJ 1.36 版软件系统进行图像分析,观察各组大鼠踝关节软骨退变、滑膜增生、炎细胞浸润等情况。踝关节 HE 评分内容包括 5 个方面,其中滑膜细胞增殖评分标准如下:0 分表示无增殖;1 分表示轻微增殖,能看到 2~4 层滑膜细胞;2 分表示中度增殖,能看到 4 层以上滑膜细胞;3 分表示滑膜细胞过度增殖,侵及软骨及骨组织,关节间隙消失;细胞侵蚀评分标准如下:0 分表示无侵蚀;1 分表示有 1~2 个细胞侵蚀灶;2 分表示有 2~5 个细胞侵蚀灶;3 分表示有 5 个以上细胞侵蚀灶,并累及关节囊组织;血管翳评分标准如下:0 分表示无改变;1 分表示有 2 个部位出现血管翳;2 分表示有 4 个部位出现血管翳并伴有软骨表层侵蚀;3 分表示有 4 个以上部位出现血管翳或有 2 个部位出现较大范围血管翳;炎症评分标准如下:0 分表示正常;1 分表示轻度炎症,出现 1 个炎细胞聚集物或能观察到少量散在炎性细胞浸润;2 分表示中度炎症,出现 2 个或 2 个以上炎细胞聚集物;3 分表示重度炎症,可见大量炎性细胞浸润、聚集,分散浸润明显;软骨侵蚀评分标准如下:0 分表示正常;1 分表示微量侵蚀,可见 1~2 个小侵蚀灶;2 分表示少量侵蚀,可见 1~4 个中等大小和深度侵蚀灶;3 分表示中度侵蚀,可见 5 个以上侵蚀灶,局部骨皮质有侵蚀表现;4 分表示重度侵蚀,局部骨皮质遭完全侵蚀;5 分表示广泛损伤,皮质穿透骨长度超过 25%^[20]。

五、IL-1β 检测

除空白组外,BoNT 组、NS 组及假手术组均于成模当天、成模后 7 d、成模后 14 d 时各取 5 只大鼠经腹腔

麻醉后取踝关节滑膜组织进行 IL-1β 蛋白检测,将提取的关节滑膜组织迅速剪碎后置入含蛋白酶抑制剂的裂解液中,并用匀浆机打匀,所有操作均在冰上进行(防止蛋白降解),将打好的匀浆置于 4 ℃ 恒温离心机上离心 20 min,离心后取上清液。小部分上清液用于计算上样体积,剩余的上清液与加样缓冲液(loading buffer)按 3:7 比例配成混合液后置于沸水(95 ℃)中煮 5 min 获得蛋白样品;将蛋白样品加到 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳槽中,电压 110 V,电泳时间 1.5~2.0 h(以 loading buffer 跑到底为止)。采用湿转法将蛋白转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,将 PVDF 膜浸入 5% 脱脂奶粉封闭液中,室温下摇床封闭 2 h,兔抗大鼠 IL-1β 抗体(ab9722)于 4 ℃ 冰箱中摇床过夜,洗膜 3 次后加入抗兔 IgG 单克隆二抗(ab193984),室温摇床封闭 2 h,洗膜 3 次后滴加发光液并置于凝胶成像系统中显影,通过 ImageJ 1.36 版软件分析目标条带灰度值。

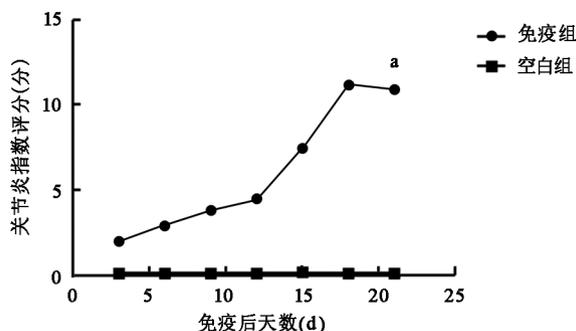
六、统计学分析

本研究所得计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 版统计学软件包进行数据分析,计量资料比较采用单因素方差分析和多样本间 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、大鼠关节炎指数评分以及体征表现比较

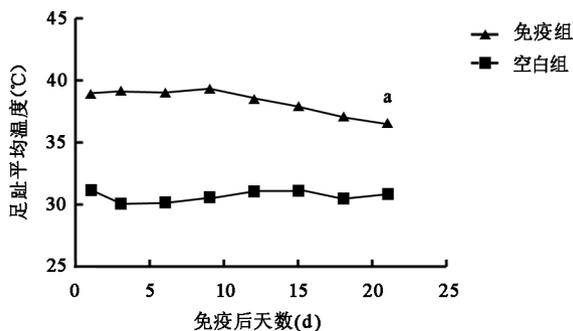
实验大鼠免疫后每隔 3 d 对其进行关节炎指数评估,发现免疫 10 d 左右时关节炎指数明显升高,并随着时间进展逐渐增高,至免疫 18~20 d 时达到峰值。大鼠免疫后早期出现踝部炎症症状,表现为局部肿胀明显、活动受限、精神萎靡等,免疫 3 d 后足趾肿胀程度减轻,10 d 后足趾再次肿胀并出现对侧足趾及全身症状,如前爪、耳缘、尾部红斑、结节等,免疫 18~20 d 时关节炎评分达到峰值,具体情况见图 1。



注:大鼠免疫 3 d 后关节炎指数开始升高,10~15 d 后关节炎指数明显升高,18~20 d 时达到峰值,与空白组各个时间点比较,差异均具有统计学意义, $^a P < 0.05$

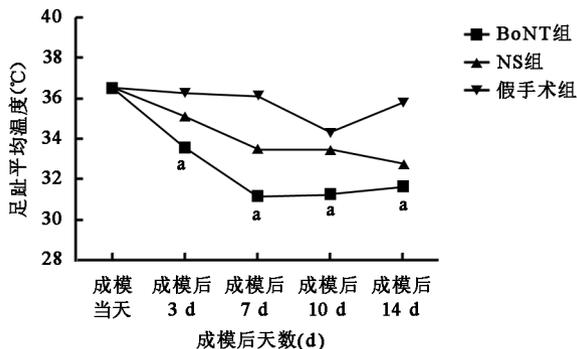
图 1 大鼠免疫后不同时间点其关节炎指数评分结果比较

二、免疫后及成模后各组大鼠红外热成像结果比较
 实验大鼠免疫后每隔 3 d 对其足爪进行红外热成像拍摄,发现大鼠免疫后 3 d 内出现右侧踝关节区域温度明显升高,10 d 左右达到峰值,随后皮肤温度平缓下降,于免疫 20 d 左右时趋于稳定,具体情况见图 2;成模后 BoNT 组大鼠踝关节平均温度出现下降趋势,以成模后 7 d 时下降幅度较明显,与相同时间点 NS 组及假手术组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);而 NS 组与假手术组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。成模后不同时间点各组大鼠红外热成像变化趋势见图 3。



注:大鼠免疫后 3 d 内踝关节皮肤温度明显升高,随后缓慢升高,10 d 左右时温度开始下降,20 d 左右时趋于平衡,与空白组各时间点比较,差异均具有统计学意义, $^a P < 0.05$

图 2 大鼠免疫后踝关节皮肤温度变化趋势图



注:BoNT 组在成模后 7 d、14 d 时其双侧踝关节平均温度较成模当天有明显下降,且与相同时间点 NS 组及假手术组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);NS 组及假手术组在成模后 7 d、14 d 时其双侧踝关节平均温度较成模当天均无明显变化 ($P > 0.05$),且组间差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$);与 NS 组及假手术组比较,组间差异均具有统计学意义, $^a P < 0.05$

图 3 成模后不同时间点各组大鼠踝关节温度比较

三、各组大鼠踝关节腔滑膜组织中 IL-1 β 比较

通过分析 Western Blotting 条带结果发现,成模后 7 d、14 d 时 BoNT 组滑膜组织中 IL-1 β 表达明显下降,不同时间点各组大鼠滑膜组织中 IL-1 β 表达情况详见图 4。通过对条带数据比较后发现,成模后各组大鼠 IL-1 β 灰度值均较空白组明显增高;成模后 7 d、14 d 时除了空白组外,BoNT 组 IL-1 β 灰度值较成模当天灰度值有较显著降低 ($P < 0.05$),并且与相同时间点 NS 组

及假手术组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);而相同时间点 NS 组及假手术组 IL-1 β 灰度值较成模当天灰度值均无明显变化 ($P > 0.05$),且组间差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。成模后不同时间点各组大鼠 IL-1 β 表达灰度值数据详见图 5。

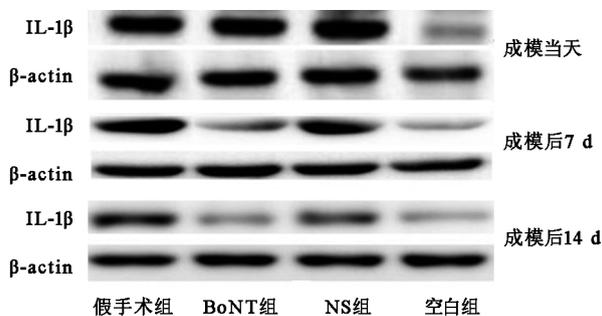
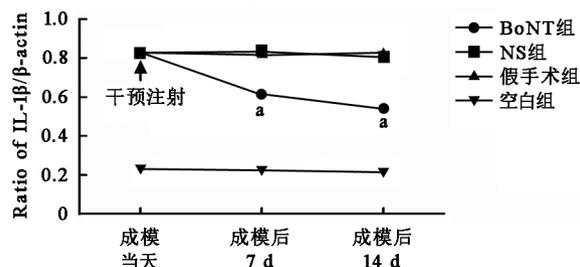


图 4 成模后不同时间点各组大鼠滑膜组织中 IL-1 β 表达



注:图中数据显示成模后大鼠滑膜中 IL-1 β 表达量较空白组大鼠明显增多,且成模后 7 d、14 d 时 BoNT 组 IL-1 β 表达量有明显下降趋势,与相同时间点 NS 组及假手术组间比较, $^a P < 0.05$

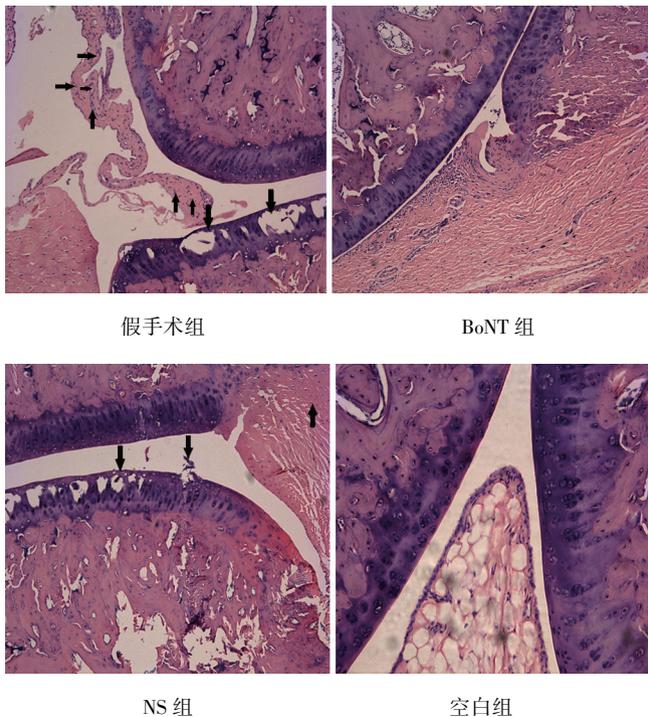
图 5 各组大鼠不同时间点 IL-1 β 灰度值数据比较

四、成模后各组大鼠踝关节病理表现及踝关节 HE 评分比较

成模后 14 d 时各组大鼠踝关节病理组织切片 HE 染色结果见图 6,可见空白组大鼠踝关节滑膜组织由 1~2 层上皮细胞构成并覆盖于脂肪组织表面;模型组大鼠可见滑膜组织显著增生(可达 4~6 层)、水肿、滑膜炎性细胞浸润以及血管翳形成,严重区域出现软骨表面以及软骨下骨侵蚀破坏;BoNT 组显示滑膜组织增生、炎性细胞浸润、血管翳形成、软骨破坏等较模型组及 NS 组明显减轻,成模后不同时间点各组大鼠 HE 评分结果详见表 1。表中数据显示,成模当天 BoNT 组、NS 组及假手术组 HE 评分均较空白组明显增高,组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);成模后 7 d、14 d 时 BoNT 组 HE 评分较相同时间点 NS 组及假手术组均明显降低,组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);而 NS 组与假手术组 HE 评分在上述时间点组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

目前 BoNT/A 被广泛应用于治疗临床多种疾病,



注: ➔ 表新生的血管翳; ⬆ 代表浸润的炎性细胞; ⬇ 代表软骨侵蚀

图 6 成模后 14 d 时各组大鼠踝关节病理组织切片观察 (HE 染色, $\times 40$)

表 1 成模后不同时间点各组大鼠 HE 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	HE 评分		
		成模当天	成模后 7 d	成模后 14 d
空白组	10	1.2 \pm 0.71	1.0 \pm 0.86 ^a	1.2 \pm 0.71 ^a
假手术组	10	3.6 \pm 0.84	4.7 \pm 0.48 ^b	4.9 \pm 0.32 ^{bc}
NS 组	10	3.6 \pm 0.84	4.6 \pm 0.51 ^{ab}	4.9 \pm 0.31 ^{abc}
BoNT 组	10	3.6 \pm 0.84	3.8 \pm 0.63 ^{abd}	3.7 \pm 0.82 ^{abcd}

注: 与假手术组相同时间点比较, ^a $P < 0.05$; 与成模当天组内比较, ^b $P < 0.05$; 与成模后 7 d 时组内比较, ^c $P < 0.05$; 与 NS 组相同时间点比较, ^d $P < 0.05$

包括肌张力障碍、面肌痉挛、偏头痛、三叉神经痛及难治性关节痛等^[12],其作用机制为抑制神经肌肉接头处或外周感觉神经末梢处 Ach、SP、CGRP 等肽类物质释放^[21-22],且其抑制疼痛的效果早于其抑制神经肌肉接头处递质释放^[23]。Lam 等^[24]证实在关节炎发生、发展过程中,SP、CGRP 释放可加剧关节炎进展,如出现血管扩张、血浆渗出、巨噬细胞趋化、肥大细胞脱颗粒等炎性反应,造成关节炎神经源性炎症,使关节炎病情持续进展。本研究通过向关节炎模型大鼠关节腔内注射 BoNT/A,观察其是否可通过抑制关节腔滑膜组织中炎性因子释放,进而减轻关节炎神经源性炎症。

红外热成像技术广泛应用于医疗卫生、航空航天等领域^[25],近年来该技术被逐渐用于临床特定疾病(如关节炎、脑卒中后肩痛等疾病)诊断及检查^[19,26]。本研究通过红外热成像检查发现,关节炎模型大鼠在炎症反应初期,其双侧踝关节平均温度随时间进展明

显升高,最高可达 39 $^{\circ}\text{C}$,提示其关节炎症反应增强,3 周后大鼠双侧踝关节温度趋于稳定,表明关节炎进入慢性持续状态,上述结果客观反映了关节炎神经源性炎症的发展规律。此外本研究结果还显示,BoNT 组大鼠在成模后 7 d、14 d 时其双侧足趾平均温度较成模当天有显著降低趋势,与同时时间点 NS 组及假手术组间差异亦具有统计学意义($P < 0.05$)。由此可见,向关节腔内注射 BoNT/A 确实能有效减轻关节炎所致神经源性炎症表现。

对于 BoNT/A 是否具有抗炎疗效,Favre-Guilmond 等^[27]通过观察炎症性神经病理性疼痛模型发现,BoNT/A 只有镇痛作用,并无抗炎作用。相关文献证实,IL-1 β 是关节炎发生、发展过程中最重要的炎性因子之一,是关节炎由急性阶段向慢性阶段过渡必不可少炎性介质,对关节炎病情发展具有至关重要的作用^[28]。本实验通过 Western Blotting 法比较各组大鼠在不同时间点 IL-1 β 蛋白表达时发现,大鼠成模当天其滑膜组织中 IL-1 β 较免疫前明显增多;BoNT 组在成模后 7 d、14 d 时 IL-1 β 表达水平明显下降,与成模当天时差异具有统计学意义($P < 0.05$),且与相同时间点 NS 组及假手术组间差异亦具有统计学意义($P < 0.05$),NS 组和假手术组在成模后 7 d、14 d 时其 IL-1 β 表达量较成模当天未见明显改善($P > 0.05$),且上述指标相同时间点 2 组间差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果表明,向关节腔内注射 BoNT/A 能有效降低关节滑膜组织中炎性因子表达,起到抗神经源性炎症作用,这与部分先前研究结果基本一致^[10]。本实验通过病理组织学观察发现,成模当天实验大鼠滑膜组织增生明显,并伴有炎性细胞浸润和不同程度软骨破坏及软骨下骨质暴露;向 BoNT 组实验大鼠关节腔内注射 BoNT/A 后,发现成模后 7 d、14 d 时该组大鼠滑膜增生以及炎性细胞浸润均较成模当天时情况明显减少,HE 评分与相同时间点 NS 组及假手术组间差异亦具有统计学意义($P < 0.05$);而 NS 组与假手术组上述指标在相同时间点组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),由此可推断向关节腔内注射 BoNT/A 能显著降低关节炎神经源性炎症的炎性介质水平,进而延缓关节退行性病变进展,从而有效缓解关节软骨破坏,进一步在组织学上证实 BoNT/A 具有抗关节炎神经源性炎症功效。

综上所述,向关节腔内注射 BoNT/A 能有效降低关节腔滑膜组织中炎性因子水平,具有抗炎及缓解关节软骨退行性病变等功效,其治疗机制可能与 BoNT/A 能抑制关节腔滑膜中感觉神经末梢释放伤害性神经肽类物质(如 SP、CGRP 等)有关,并由此减轻关节炎神经源性炎症,在治疗关节炎及难治性关节痛方面具有重要临床价值;对于 BoNT/A 是否具有直接抗炎作用尚未明

确。需要指出的是,本实验采用红外热成像对实验大鼠进行拍摄时易受到环境室温、空气湿度、空气对流等因素影响,故实验结果具有一定误差;此外本实验仅对 BoNT/A 的抗炎作用进行观察,不涉及疼痛行为学评定,其应用剂量以及具体作用机制均有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Borodic GE, Acquadro M, Johnson EA, et al. Botulinum toxin therapy for pain and inflammatory disorders; mechanisms and therapeutic effects [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001, 10 (8) : 1531-1544. DOI: 10.1111/j.1526-4637.2012.01394.X.
- [2] Bach-Rojecky L, Dominis M, Lackovic Z, et al. Lack of anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in experimental models of inflammation [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008, 22 (5) : 503-509. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2008.00615.X.
- [3] Cui M, Khanijou S, Rubino J, et al. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain [J]. *Pain*, 2004, 107 (1-2) : 125-133. DOI: 10.1016/j.pain.2003.10.008.
- [4] Dolly O. Synaptic transmission; inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins [J]. *Headache*, 2003, 43 (1) : S16-24. DOI: 17-01-C-6062.
- [5] Lim EC, Seet RC. Botulinum toxin, Quo Vadis? [J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69 (4) : 718-723. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2007.03.019>.
- [6] Gobel H, Heinze A, Heinze-Kuhn K, et al. Evidence-based medicine; botulinum toxin A in migraine and tension-type headache [J]. *J Neurol*, 2001, 248 (1) : 134-138. DOI: 10.1007/PL00007818.
- [7] Porta M. A comparative trial of botulinum toxin type A and methylprednisolone for the treatment of myofascial pain syndrome and pain from chronic muscle spasm [J]. *Pain*, 2000, 85 (1-2) : 101-105. DOI: 10.1016/S0304-3959(99)00264-X.
- [8] Wheeler AH. Botulinum toxin A, adjunctive therapy for refractory headaches associated with pericranial muscle tension [J]. *Headache*, 1998, 38 (6) : 468-471. DOI: 10.1046/j.1526-4610.1998.38064468.X.
- [9] Mahowald ML, Singh JA, Dykstra D, et al. Long term effects of intra-articular botulinum toxin A for refractory joint pain [J]. *Neurotox Res*, 2006, 9 (2-3) : 179-188. DOI: 1526-4610.1998.3806468.x.
- [10] Mapp P, Kidd BL. The role of substance P in rheumatic disease [J]. *Arthritis Rheum*, 1994, 23 (6) : 3-9. DOI: 10.1016/S0049-0172 (10) 80020-4.
- [11] Singh JA, Mahowald ML, Noorbalochi S, et al. Intra-articular botulinum toxin A for refractory shoulder pain: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial [J]. *Transl Res*, 2009, 153 (5) : 205-216. DOI: 10.1016/j.trsl.2009.02.004.
- [12] Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 966: 343-354. DOI: 10.1186/ar1376.
- [13] Mahowald ML, Krug HE, Singh JA, et al. Intra-articular Botulinum Toxin Type A: a new approach to treat arthritis joint pain [J]. *Toxicon*, 2009, 54 (5) : 658-667. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.03.028.
- [14] Whitehouse MW. Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by C. M. Pearson, Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvants [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56 (4) : 1133-1138. DOI: 10.1007/s00011-006-6117-8.
- [15] van Holten J, Reedquist K, Sattonet-Roche P, et al. Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6 (3) : 239-249. DOI: 10.1186/ar1165.
- [16] 李培培, 解国雄, 宋姗姗, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17 (5) : 375-380. doi: 1000-484X(2012)05-0453-05.
- [17] 陈伯松, 徐玉东, 钟淑琪, 等. 大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评价 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2005, 39 (6) : 489-491. doi: 100-1905(2005)06-0489-03.
- [18] Krug HE, Frizelle S, McGarraugh P, et al. Pain behavior measures to quantitate joint pain and response to neurotoxin treatment in murine models of arthritis [J]. *Pain Med*, 2009 (10) : 1218-1228. DOI: 10.1111/j.1526-4637.2009.00711.x.
- [19] 王帅, 刘志华, 王琳, 等. 脑卒中后肩痛患者肩部红外热成像观察 [J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29 (7) : 645-649. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2014.07.012.
- [20] Wang D, Chang Y, Wu Y, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with adjuvant arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 163 (2) : 225-234. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04293.x.
- [21] Anderson S, Krug H, Dorman C, et al. Analgesic effects of intra-articular botulinum toxin type B in a murine model of chronic degenerative knee arthritis pain [J]. *J Pain Res*, 2010, 6 (3) : 161-168. DOI: 10.2147/JPR.S12520.
- [22] Qerama E, Fuglsang-Frederiksen A, Jensen TS, et al. The role of botulinum toxin in management of pain: an evidence-based review [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2010, 23 (5) : 602-610. DOI: 10.1097/ACO.0b013e32833c3405.
- [23] Chou CL, Lee SH, Lu SY, et al. Therapeutic effects of intra-articular botulinum neurotoxin in advanced knee osteoarthritis [J]. *J Chin Med Assoc*, 2010, 73 (11) : 573-580. DOI: 10.1016/S1726-4901 (10) 70126-X.
- [24] Lam FF, Wong HH, Ng ES, et al. Time course and substance P effects on the vascular and morphological changes in adjuvant-induced monoarthritic rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4 (2) : 299-310. DOI: 10.1016/j.intimp.2004.01.009.
- [25] 朱小平, 郑曾丁, 刘蒋, 等. 红外热成像测温技术及其应用 [J]. *红外技术*, 2003, 25 (1) : 96-98. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8891.2003.01.024.
- [26] Yang H, Park H, Lim C, et al. Infrared thermal imaging in patients with medial collateral ligament injury of the knee—a retrospective study [J]. *J Pharmacopuncture*, 2014, 17 (4) : 50-54. DOI: 10.3831/KPI.2014.17.036.
- [27] Favre-Guilmond C, Auguet M, Chabrier PE, et al. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 617 (1-3) : 48-53. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.06.047.
- [28] Gianfranco F, Luisa Bracci-L, Stefano A, et al. Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2010, 16 (1) : 11-12. DOI: 10.2119/molmed.2010.00067.

(修回日期: 2015-11-23)

(本文编辑: 易 浩)