论 著

载地塞米松纳米胶束治疗类风湿性关节炎的体内药效学研究

刘　妍[1]，付　玉[2]，王成龙[1]，贾　铭[1]，郑　秀[1]，李春红[1]
1.西南医科大学药学院 药剂教研室（泸州 646000）；2.泸州市龙马潭区中医院 妇产科（泸州 646000）

【摘　要】目的 研究以γ-聚谷氨酸（γ-PGA）载体包载地塞米松（DEX）制备的γ-PGA-DEX纳米胶束治疗类风湿关节炎的体内药效学。**方法** 采用DBA/1小鼠建立胶原蛋白诱导的关节炎（collagen-induced arthritis，CIA）模型，于首次免疫后第21 d，按关节炎评分，随机将小鼠分组，每组5只，通过尾静脉注射γ-PGA-DEX；按各组给药剂量每3 d给药。每次给药过程中对小鼠关节肿胀度、体重变化、关节评分，并对小鼠踝关节进行组织病理学检查。除此之外，采用ebiosicence的小鼠TNF-α、IL-1β和IL-6测定试剂盒进行测定小鼠血清中的前炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6。**结果** 与空白组小鼠相比，治疗期间γ-PGA-DEX组小鼠体重呈现增长趋势，关节指数评分显著低于游离DEX治疗组，且在所有治疗组中最低，显示出其较好的治疗效果；关节病理切片HE染色显示，γ-PGA-DEX组与normal组相比没有显著性差异，无明显的炎性细胞浸润和骨破坏现象，病理评分为2分。相较于游离组，γ-PGA-DEX组小鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6炎性因子的含量均显著降低（$P<0.01$）。**结论** γ-PGA-DEX具有较好的治疗类风湿关节炎的效果，是一种具有潜在应用前景的治疗类风湿关节炎及其它炎症疾病的纳米药物。

【关键词】γ-聚谷氨酸-地塞米松纳米胶束；类风湿性关节炎；体内药效学；地塞米松
【中图分类号】 R94　　**文献标志码** A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.013

In vivo pharmacodynamics of γ-PGA-DEX micelles in the treatment of rheumatoid arthritis

LIU Yan[1]，*FU Yu*[2]，*WANG Chenglong*[1]，*JIA Ming*[1]，*ZHENG Xiu*[1]，*LI Chunhong*[1]
1. *Department of Pharmaceutical Sciences，School of Pharmacy，Luzhou 646000，China*；2. *Department of obstetrics and gynecology，Luzhou Longmatan District Hospital of Traditional Chinese Medicine，Luzhou 646000，China*

【Abstract】Objective To investigate the in vivo pharmacodynamics of γ-PGA-DEX micelle which was prepared by loading dexamethasone（DEX）with γ-polyglutamic acid（γ-PGA）in the treatment of rheumatoid arthritis（RA）. **Methods** DBA / 1 mice were used to establish the collagen-induced arthritis（CIA）model. On the 21st day after the first immunization，the mice were randomly grouped according to the arthritis scores，with 5 mice in each group，and γ-PGA-DEX was given by tail vein injection every 3 days according to the dose of each group. The joint swelling degree，weight change，joint score and histopathological examination of ankle joint were performed during each administration. In addition，the ebiosicence mouse TNF-α，IL-1βand IL-6 kits were used to determine the pro-inflammatory cytokines TNF-α，IL-1βand IL-6 in mouse serum. **Results** Compared with the blank group，the body weight of mice in the γ-PGA-DEX group showed an increasing trend during the treatment，and the joint index score was significantly lower than that of the free DEX treatment group，and it was the lowest in all treatment groups，showing a good therapeutic effect. HE staining of joint pathological sections demonstrated that there was no significant difference between the γ-PGA-DEX group and the normal group. Furthermore，there was no obvious inflammatory cell infiltration and bone destruction，and the pathological score was 2. Compared with the free group，the levels of TNF-α，IL-1β and IL-6 in the serum of mice in the γ-PGA-DEX group were significantly decreased（$P<0.01$）. **Conclusion** γ-PGA-DEX micelle showed good therapy effect in the treatment of RA，and it would be a nano-drug with potential application prospect in the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases.

【Key words】γ-glutamic acid-DEX micelle；Rheumatoid arthritis；in vivo pharmacodynamics；Dexamethasone（DEX）

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种以对称性关节滑膜炎为特征，骨和关节呈慢性和进行性破坏的全身性自身免疫性疾病，病变呈持续性、反复发作过程，最终造成全身关节破坏，并呈现出功能渐进性障碍，甚至残疾，且多数RA病人10年内失去劳动能力[1-4]。

糖皮质激素能够迅速控制RA病情和缓解疼痛，使得其在RA的药物治疗中占有重要地位。地塞米松（dexamethasone，DEX）是临床最常用的治疗RA的糖皮质激素类药物之一，但是由于DEX的受体在体内各脏器均有分布，使其不具备靶向性，从而需要反复给药，这样长期大剂量应用DEX势必会造成较大的毒副作

基金项目：国家自然科学基金（81803478）
第一作者简介：刘　妍，硕士生。
通信作者：李春红，教授，博士。E-mail：lispringhong@126.com
引用本文：刘妍，付玉，王成龙，等. 载地塞米松纳米胶束治疗类风湿性关节炎的体内药效学研究[J]. 西南医科大学学报，2022，45（5）：431-435. DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.05.013

用，如引起骨质疏松、青光眼、继发性感染加重以及高血糖等[5-8]。将药物用适当载体包载，制备成纳米递药系统可以增加药物在炎症部位的蓄积，从而减少其在健康部位的分布，可以极大降低药物毒副作用和增强治疗效果[9-13]。本课题组在前期工作中，已经利用γ-PGA作为载体，将DEX制备成了γ-PGA-DEX纳米胶束，体外性质考察以及体外细胞学考察显示，γ-PGA-DEX可以增加局部滞留作用，并具有较好的体外治疗效果和细胞摄取效率[14]。

本研究在前期工作的基础上，进一步考察γ-PGA-DEX治疗RA的体内药效学，并对其体内毒性进行评价，以期为制备一种新型的抗RA纳米制剂提供前期基础研究。

1 仪器与实验动物

1.1 仪器与试药

XR205SM-DR型电子天平（瑞士Precisa）；离心机（Beckman-Coulter，USA）；γ-PGA-DEX为自制；牛二型胶原蛋白、完全弗式佐剂、不完全弗式佐剂（Chondrex，USA）；水为超纯水；其余试剂为分析纯级别试剂。

1.2 实验动物

健康雄性DBA/1小鼠，体重（20 ± 2）g，购自北京华阜康实验动物有限公司。动物实验依据西南医科大学关于实验动物的饲养和使用准则进行。本实验研究经西南医科大学动物保护与伦理委员会审核批准（许可证号:20210223-231）。

2 方法

2.1 小鼠胶原蛋白诱导关节炎（CIA）模型的建立

健康DBA/1小鼠在自由饮水和饲料的条件下饲养一周，使其充分适应环境。于第1 d，取等体积的牛二型胶原蛋白和完全弗式佐剂，充分混匀制备成乳剂后，每只小鼠尾根部皮下注射上述乳剂各100 μL。接着于第21 d boost，取等体积的牛二型胶原蛋白和不完全弗式佐剂充分混匀制备成乳剂，各取50 μL注射到上述各小鼠尾根部皮下。

2.2 小鼠分组及给药方案

normal组：选择健康的DBA/1小鼠5只作为normal组，于第21 d给予生理盐水，每3 d给药一次，共三次。

saline组：随机选择造模后的小鼠作为saline组，于第21 d给予生理盐水，每3 d给药一次，共三次。

游离DEX组：随机选择造模后的小鼠作为游离DEX组，于第21 d给予2 mg/kg游离DEX药物，每3 d给药一次，共三次。

γ-PGA-DEX组：随机选择造模后的小鼠作为γ-PGA-DEX组，于第21 d给予γ-PGA-DEX（剂量相当于2 mg/kg游离DEX药物），每3 d给药一次，共三次。

2.3 体内药效学检测指标

2.3.1 小鼠体重变化情况 各治疗组分别于第21 d开始测定体重，3 d测定一次，至第27 d，计算并作图。

2.3.2 小鼠关节指数评分标准及关节评分情况 小鼠关节指数评分标准[15-17]：观察小鼠关节炎症表现，进行关节炎指数评分。按照如下评分标准评分：0分为无关节炎；1分为趾关节轻微红斑、肿胀；2分为关节轻度红肿，2个区域以上的炎症；3分为关节中度红肿，轻度功能障碍；4分为多关节重度红肿，严重功能障碍。

各治疗组关节评分情况：各治疗组分别于第21 d开始对其关节指数进行评分，3 d评分一次，至第27 d，计算并作图。

2.3.3 关节病理组织切片 各组小鼠给药3次后，每组随机挑选3只。处死小鼠后剪下小鼠右后踝关节。PBS冲洗后浸泡于5倍体积的4%的多聚甲醛中固定48 h，再用PBS漂洗后转入10% EDTA脱钙液（pH 7.2-7.5）中脱钙2周，每天更换一次脱钙液。至关节组织变软，硬度与肌肉相仿，针刺无阻力视为组织脱钙完成。制备石蜡切片，并进行苏木精-伊红染色，中性树胶封片，并于显微镜下观察病理切片，同时进行病理组织学评分。

2.3.4 血清中前炎症因子的测定 小鼠眼眶取血，全血置肝素化EP管中，4 500 rpm离心5 min，精密吸取上清0.30 mL，置于-40 ℃冰箱中保存备用。采用ebiosicence的小鼠TNF-α、IL-1β和IL-6测定试剂盒进行测定上述血清中的前炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6。

3 结果

3.1 各治疗组小鼠体重变化情况

由图1可知，γ-PGA-DEX治疗组小鼠体重呈现一定的增长趋势，并且与normal组小鼠体重无显著性差异，证明γ-PGA-DEX具有较好的治疗效果。

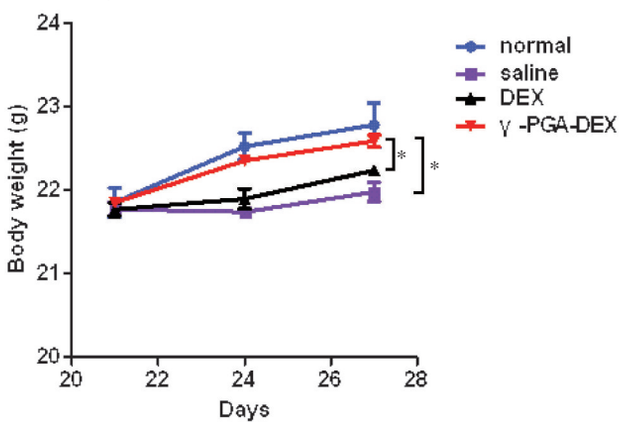


图1 各组小鼠体重变化情况（$n = 5$）

Figure 1 Changes of body weights of mice after different treatments ($n = 5$)

注：*表示与r-PGA-DEX组相比，$P < 0.05$

3.2 各治疗组关节指数评分情况

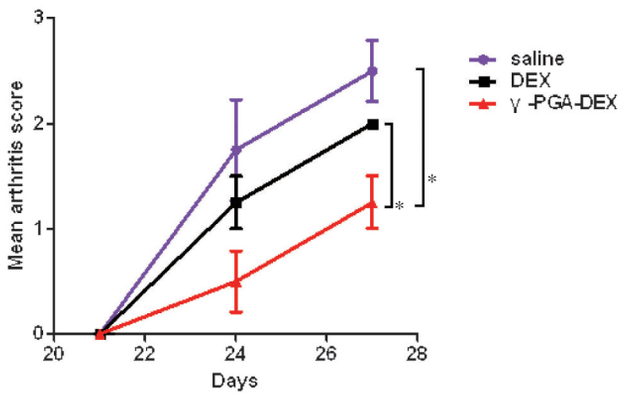


图2 各组关节指数评分情况（$n=5$）

Figure 2 Scores of articular index of mice in each group（$n=5$）

注：*表示与r-PGA-DEX组相比，$P<0.05$

从上述图2显示，γ-PGA-DEX治疗组小鼠关节指数评分显著低于游离DEX治疗组（$P<0.05$），且在所有治疗组中为最低，显示出其较好的治疗效果。

3.3 病理组织切片评价

关节病理切片HE染色显示：正常关节滑膜衬里层厚为1~2层，细胞排列整齐，无炎性细胞浸润及血管增生，关节软骨光滑无破坏；而Saline组的关节囊内具有大量炎细胞浸润（包括中性粒和淋巴细胞，以淋巴细胞浸润为主）。部分骨质破坏严重，关节囊内大量纤维增生，关节周炎细胞浸润，关节腔间隙缩小（可见坏死骨），其病理评分＞7分；游离DEX组仍可见炎细胞浸润、骨质破坏和纤维增生，但程度明显低于saline组，其病理评分大约为5分；γ-PGA-DEX组与normal组相比没有显著性差异，无明显的炎性细胞浸润和骨破坏现象，病理评分为2分。以上结果显示，γ-PGA-DEX组具有明显优于游离DEX组的治疗效果，见图3。

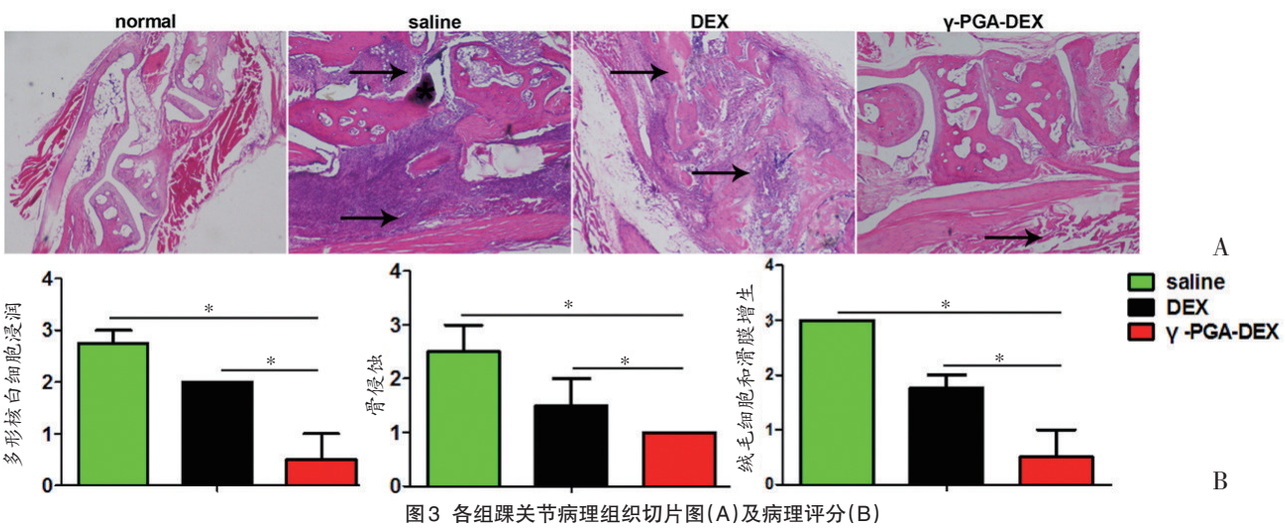


图3 各组踝关节病理组织切片图（A）及病理评分（B）

Figure 3 Histopathology of the joints（A）and pathological scores（B）in different treatment groups

注：*表示与saline组相比，$P<0.05$

3.4 血清中前炎症因子测定

3.4.1 血清中TNF-α水平　从图4的结果可以看出，与DEX组相比，γ-PGA-DEX组在血清中的TNF-α的水平明显降低（$P<0.05$），以上结果显示γ-PGA-DEX的抗炎效果明显强于游离DEX。

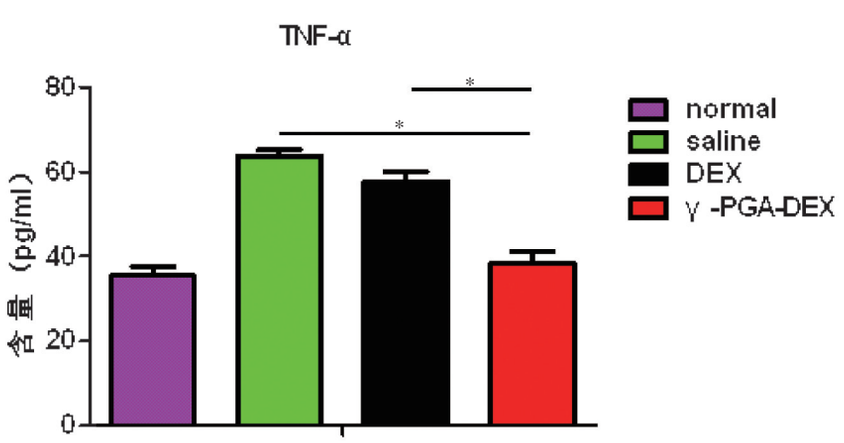


图4 各组血清中前炎症因子TNF-α水平（$n=5$）

Figure 4 Serum levels of pro-inflammatory cytokines TNF-α in different treatment groups（$n=5$）

注：*表示与r-PGA-DEX组相比，$P<0.05$

3.4.2 血清中IL-1β水平　从图5的结果可以看出，γ-PGA-DEX组在血清中的IL-1β的水平明显低于游离DEX组和saline组（$P < 0.05$），显示出其具有较好的抗炎效果。

3.4.3 血清中IL-6水平　从图6的结果可以看出，γ-PGA-DEX组在血清中的IL-6的水平明显低于游离DEX组和saline组（$P < 0.05$），说明γ-PGA-DEX具有较好的抗炎效果。

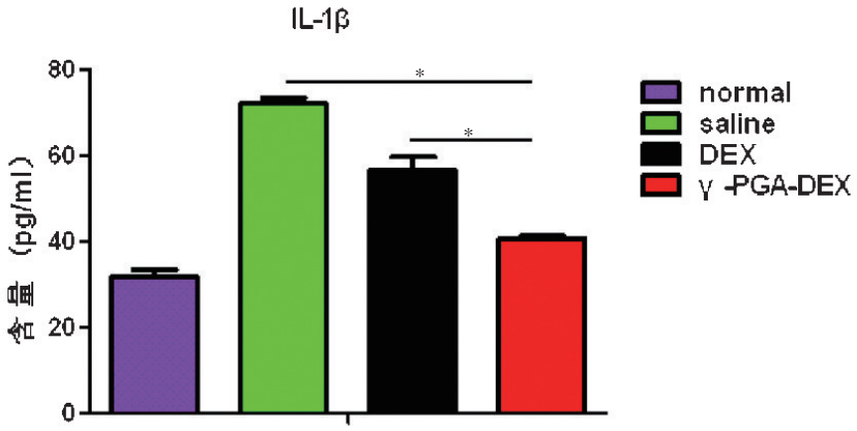


图5 各组血清中前炎症因子IL-1β水平（$n = 5$）

Figure 5 Serum levels of pro-inflammatory cytokines IL-1β in different treatment groups（$n = 5$）

注：*表示与r-PGA-DEX组相比，$P < 0.05$

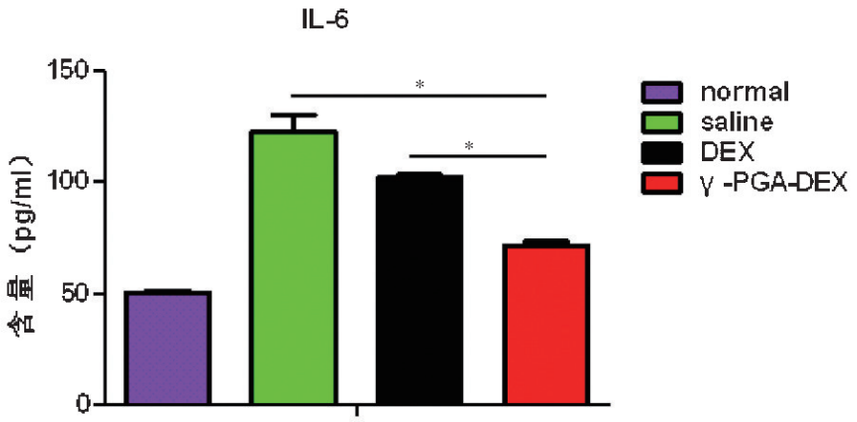


图6 各组血清中前炎症因子IL-6水平（$n = 5$）

Figure 6 Serum levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 in different treatment groups（$n = 5$）

注：*表示与r-PGA-DEX组相比，$P < 0.05$

4 讨论

纳米递药系统提高了药物的靶向性，使药物在疾病部位的蓄积显著增加，具有降低药物毒副作用、增强治疗效果等优势。目前治疗类风湿性关节炎的载糖皮质激素的纳米递药系统包括脂质体[18]、纳米粒[19]、胶束[20-22]、水凝胶及各种仿生纳米递药系统[23-24]，胶束由于其粒径较小，因此在炎症部位的蓄积效果更好[20-22]，因此本课题组选择纳米胶束作为纳米递药系统。课题组前期考察了γ-PGA-DEX纳米胶束的体外性质以及体外细胞学，并证明了γ-PGA与DEX形成胶束后，延缓了DEX的释放，增强了其在细胞的摄取率。本研究基于上述前期工作，进一步考察了γ-PGA-DEX治疗RA的体内药效学，结果显示，γ-PGA-DEX能够显著增加小鼠体重、降低CIA小鼠关节指数评分，并且通过对病理切片的量化评分，显示出该纳米胶束具有显著的降低炎症因子和骨保护作用。

在RA的炎症关节局部环境分泌有大量的前炎症因子，如TNF-α、IL-1β、IL-6等，这些炎症因子同时又进一步促进RA疾病的发展进程，因此，通过考察这些前炎症因子的水平，可以有效地反应对于疾病的治疗效果[25-27]。本研究中，通过测定血清中前炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6，结果显示，与游离DEX组相比，γ-PGA-DEX均可以显著降低血清中上述三种前炎症因子的水平，因此显示出较好的治疗RA的效果。

以上均证明，γ-PGA-DEX具有较好的治疗RA的疗效，同时也有用于治疗其他炎症性疾病的潜力，有望为开发治疗炎症疾病的新药提供一定理论基础。

5 结论

本研究构建的γ-PGA-DEX纳米胶束在治疗类风湿性关节炎CIA小鼠模型上，显示出较好的体内治疗效果，能够降低关节肿胀程度和关节评分，并且抑制促炎症因子，减少炎症因子浸润，具有较好的骨保护作用，为治疗炎症性疾病提供了理论依据。

（利益冲突：无）

参 考 文 献

[1] GONG T, TAN TT, ZHANG P, *et al*. Palmitic acid-modified bovine serum albumin nanoparticles target scavenger receptor-A on activated macrophages to treat rheumatoid arthritis[J]. Biomaterials, 2020, 258: 120296.

[2] SIOUTI E, ANDREAKOS E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis[J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 152-169.

[3] YAN F L, ZHONG Z R, WANG Y, *et al*. Exosome-based biomimetic nanoparticles targeted to inflamed joints for enhanced treatment of rheumatoid arthritis[J]. J Nanobiotechnology, 2020, 18(1): 115.

[4] 晏飞利，李慧，李春红. 巨噬细胞来源外泌体的提取与鉴定[J]. 西南医科大学学报，2020，43(3)：238-241.

[5] LI RX, HE YW, ZHU Y, *et al*. Route to rheumatoid arthritis by macrophage-derived microvesicle-coated nanoparticles[J]. Nano Lett, 2019, 19(1): 124-134.

[6] YAN FL, LI H, ZHONG ZR, *et al*. Co-delivery of prednisolone and curcumin in human serum albumin nanoparticles for effective treatment of rheumatoid arthritis[J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 9113-9125.

[7] 兰瑛，胡蝶，宋海宁，等. 甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎有效性与安全性的系统评价[J]. 中国药房，2016，27(21)：2928-2932，2933.

[8] 黄毅岚，杨虹. 非甾体抗炎药的研究进展[J]. 泸州医学院学报，2002，25(5)：447-448.

[9] QUAN LD, ZHANG YJ, CRIELAARD BJ, *et al*. Nanomedicines for inflammatory arthritis: head-to-head comparison of glucocorticoid-containing polymers, micelles, and liposomes[J]. ACS Nano, 2014, 8(1): 458-466.

[10] DEGBOÉ Y, RAUWEL B, BARON M, *et al*. Polarization of rheumatoid macrophages by TNF targeting through an IL-10/STAT3 mechanism[J]. Front Immunol, 2019, 10: 3.

[11] LI CH, LI HM, WANG Q, *et al*. pH-sensitive polymeric micelles for targeted delivery to inflamed joints[J]. J Control Release, 2017, 246: 133-141.

[12] ZHOU ML, LI JB, LI CH, *et al*. Tertiary amine mediated targeted therapy against metastatic lung cancer[J]. J Control Release, 2016, 241: 81-93.

[13] 朱星星，谢吉奎，张依凡，等. 靶向巨噬细胞TSPO受体示踪剂在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 西南医科大学学报，2021，44(2)：99-104.

[14] 侯杰荣，侯思奎，杨欣，等. 地塞米松纳米胶束的制备及体外抗肿瘤作用研究[J]. 中国药房，2016，27(31)：4425-4428.

[15] WANG Q, QIN XY, FANG JY, *et al*. Nanomedicines for the treatment of rheumatoid arthritis: State of art and potential therapeutic strategies[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(5): 1158-1174.

[16] 胡展红，施爱明，曹国文，等. 国产依那西普类似物治疗早期活动性类风湿关节炎的药物经济学评价[J]. 中国医院药学杂志，2017，37(3)：258-263.

[17] 李昊然，高璐，迟湘胤，等. 糖皮质激素性骨质疏松症的药物作用机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志，2021，27(6)：910-913，921.

[18] 高一丹，张怡. 肾上腺糖皮质激素、益赛普治疗类风湿性关节炎的效果比较[J]. 福建医药杂志，2019，41(4)：51-53.

[19] 瞿功玲，郭佳男，何苇. 糖皮质激素与细胞自噬关系的研究进展[J]. 中国比较医学杂志，2021，31(5)：146-150.

[20] LIU C, ZHANG W, LI YK, *et al*. Microfluidic sonication to assemble exosome membrane-coated nanoparticles for immune evasion-mediated targeting[J]. Nano Lett, 2019, 19(11): 7836-7844.

[21] ZHUPANYN P, EWE A, BÜCH T, *et al*. Extracellular vesicle (ECV)-modified polyethylenimine (PEI) complexes for enhanced siRNA delivery in vitro and in vivo[J]. J Control Release, 2020, 319: 63-76.

[22] WANG YL, LIU ZB, LI T, *et al*. Enhanced therapeutic effect of RGD-modified polymeric micelles loaded with low-dose methotrexate and nimesulide on rheumatoid arthritis[J]. Theranostics, 2019, 9(3): 708-720.

[23] LI C, WANG JC, WANG YG, *et al*. Recent progress in drug delivery[J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9(6): 1145-1162.

[24] ZHANG RT, WU SQ, DING Q, *et al*. Recent advances in cell membrane-camouflaged nanoparticles for inflammation therapy [J]. Drug Deliv, 2021, 28(1): 1109-1119.

[25] LIANG TT, ZHANG RT, LIU XB, *et al*. Recent advances in macrophage-mediated drug delivery systems[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 2703-2714.

[26] WEI X, WU JB, ZHAO G, *et al*. Development of a Janus kinase inhibitor prodrug for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Mol Pharm, 2018, 15(8): 3456-3467.

[27] SON HS, LEE J, LEE HI, *et al*. Benzydamine inhibits osteoclast differentiation and bone resorption via down-regulation of interleukin-1β expression[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10 (3): 462-474.

（2021-09-06 收稿，2022-05-07 修回）