雷公藤甲素脂质体透皮制剂对 II 型胶原诱发的关节炎的影响

李瀚旻*，兰少波，常明向*
湖北中医药大学附属医院，湖北 武汉 430061

摘 要：目的 观察雷公藤甲素脂质体透皮制剂对 II 型胶原诱发的关节炎（CIA）的影响及不良反应。**方法** 制备 CIA 小鼠模型。造模后小鼠随机分为模型组、雷公藤片剂对照组、雷公藤甲素脂质体透皮制剂（简称透皮制剂）高、中、低剂量（200、100、50 mg/kg）组。免疫组化法计数滑膜血管翳数目；检测血清丙氨酸转氨酶（ALT）和尿素氮（BUN）水平；观察小鼠心、肝、肾、胃病理组织学改变。**结果** 与模型组比较，透皮制剂高剂量组和雷公藤片剂组滑膜增生血管翳数量显著减少（$P<0.01$）。与模型组比较，雷公藤片剂组小鼠血清 ALT 和 BUN 水平显著升高（$P<0.01$）；透皮制剂高、中、低剂量组小鼠血清 ALT 和 BUN 水平较雷公藤片剂组显著降低（$P<0.01$）。雷公藤片剂组小鼠显示明显的心、肝、肾、胃细胞及组织损伤；透皮制剂高剂量组小鼠心、肝、肾、胃均未发现明显的病理改变。**结论** 雷公藤甲素脂质体透皮制剂高剂量和雷公藤片剂均具有抗 CIA 的作用；雷公藤甲素脂质体透皮制剂具有较高的生物活性，与口服给药的作用相当，且明显减少大剂量口服给药所产生的不良反应。

关键词：雷公藤甲素；脂质体透皮制剂；II 型胶原；关节炎；血管翳
中图分类号：R282.710.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2013)02 - 0199 - 04
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.016

Effects of transdermal liposome preparation of triptolide on arthritis induced by collagen II

LI Han-min, LAN Shao-bo, CHANG Ming-xiang
Affiliated Hospital of Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China

Abstract: Objective To observe the effects and side effects of transdermal liposome preparation of triptolide (TLPT) on collagen II-induced arthritis (CIA). **Methods** The model of mice with CIA was established. And then the mice were randomly divided into model, *Tripterygium wilfordii* Tablet (TWT), TLPT high-, mid-, and low-dose (200, 100, and 50 mg/kg) groups. Immunohistochemical method was used to count the number of pannus in knee join; ALT and BUN levels were measured. Pathological changes of heart, liver, kidney, and stomach were observed by histologic method. **Results** Compared with the model group, the number of pannus in knee join in TLPT high-dose group and TWT group was significantly reduced ($P < 0.01$). The ALT and BUN levels in mice serum of TWT group were obviously increased ($P < 0.01$). The ALT and BUN levels in serum of mice in TLPT high-, mid-, and low-dose groups were significantly reduced ($P < 0.01$). The cell and tissue damage were obvious in TWT group, but no obviously pathological changes were observed in TLPT high-dose group. **Conclusion** The TLPT high-dose group and the TWT group could protect against CIA in mice. The biological activities of TLPT are higher and equivalent to ig administration, but the side effects of ig TLPT administration in high-dose are decreased largely.

Key words: triptolide; transdermal liposome preparation; collagen II; arthritis; pannus

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 系卫矛科植物，临床上治疗类风湿性关节炎疗效显著，被推荐为治疗类风湿性关节炎的首选药物[1-2]。雷公藤甲素（雷公藤内酯，triptolide）系环氧化二萜内酯化合物，是雷公藤中最主要的抗炎和免疫抑制成分之一[3]，亦是治疗类风湿性关节炎的有效药物[4]。

收稿日期：2012-05-06
基金项目：国家自然科学基金资助项目（90709041，30672590，30271562，30371787，81274147）；国家科技部重大基础研究项目（“973”项目，2002CCC00300）；湖北省“十五”攻关计划项目（2002AA3010C8）
作者简介：李瀚旻，男，医学博士，博士生导师，主任医师。
*通信作者 李瀚旻 Tel: (027)88929180 E-mail: Lihanmin69@126.com
常明向 Tel: (027)88929180 E-mail: changmingx@163.com

虽然雷公藤甲素的生物活性较高，但其不良反应也较大[5-6]，因而极大地限制了其临床应用。

脂质体进入体内主要被网状内皮系统吞噬而影响机体的自身免疫功能，并改变被包封药物在体内的分布，使药物主要在肝、脾等网状内皮系统的组织器官中蓄积（雷公藤抗炎及免疫抑制的作用靶点主要在肝、脾等网状内皮系统），从而提高药物的治疗指数，减少用药剂量和降低不良反应[7]。II 型胶原诱导的关节炎（CIA）是一种用同源或异源性 II 型胶原免疫动物而制备的一种慢性多处关节炎，在病理形态学、免疫学及遗传学方面与人的类风湿性关节炎相似[8]。为此，本实验采用脂质体技术包裹雷公藤甲素并制成透皮制剂，观察其对 CIA 的治疗作用及其不良反应。

1　材料

1.1　药品与试剂

雷公藤甲素由中国医学科学院皮肤病研究所马鹏程研究员惠赠，质量分数 98%。雷公藤片剂，含雷公藤甲素 33 μg/片，湖北黄石三九制药厂，批号 42021534，用前取素片研成细末，加蒸馏水配制成含雷公藤甲素为 20 μg/mL 的混悬液。

小牛Ⅱ型胶原蛋白，Sigma 公司；血管内皮生长因子（VEGF）试剂盒，北京中生生物工程技术公司；丙氨酸转氨酶（ALT）试剂盒、尿素氮（BUN）试剂盒、RPMI 1640 细胞培养液、10%中性福尔马林、瑞氏染色液、多聚甲醛、二氨基联苯胺（DAB），吉诺生物技术有限公司；乙二胺四乙酸二钠（EDTA）脱钙液：10 g EDTA 加磷酸盐缓冲液（pH 7.2）80 mL，滴加 NaOH 充分溶解后用 1 mol HCl 调 pH 至 7.2，再加 APS 缓冲液（pH 7.2）至 100 mL。

1.2　动物

清洁级昆明种小鼠 60 只，雄性，体质量（20±2）g，购于湖北省医学科学院实验动物中心，动物合格证号 SCXK（鄂）2003-0005。

1.3　仪器

倒置相差显微镜及 IMF—2B 显微镜摄像装置、Olympus BX—40 显微镜，日本 Olympus 公司；Toshbia TBA—120FR 全自动分析仪，日本东芝公司；TB—718 生物组织自动包埋机、TC—120 型智能程控生物组织自动脱水机，湖北省孝感市泰维电子设备有限公司；Hl—1210 摊片机，Leica 公司；SLEE MAINZ CUT 5062 切片机，德国 SLEE 公司；HPIAS—1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统，华中科技大学同济医学院千屏公司。

2　方法

2.1　雷公藤甲素脂质体透皮制剂的制备

采用均匀设计法，以包封率、脂质体外观为指标，得以下优化工艺：大豆卵磷脂 1 000 mg，置于密闭容器中，加入 10 mL 乙醇和 0.1 mg/mL 雷公藤甲素的乙醇溶液 5 mL，使分散均匀，控制温度在 30 ℃，在上述密闭容器中，持续搅拌下缓慢滴加 30 mL 蒸馏水，加毕继续搅拌 5 min，即得雷公藤甲素脂质体。将雷公藤甲素脂质体与适量卡波姆制备的凝胶基质相混合，搅拌均匀制得雷公藤甲素脂质体凝胶透皮制剂[9]（简称透皮制剂），含雷公藤甲素 10 μg/g。

2.2　CIA 模型的制备

将 II 型胶原蛋白溶于 0.l mol/L 的醋酸中，其试管置于冰袋上，4 ℃下搅拌使其充分溶解（质量浓度为 2 g/L），置 4 ℃冰箱过夜，将其与弗氏完全佐剂等体积混合，在冰袋上研磨中乳化，制成 II 型胶原乳剂。除对照组外，其他小鼠尾根部皮内注射 II 型胶原乳剂（含 II 型胶原 l mg/mL、弗氏完全佐剂 l mg/mL）0.l mL；第 20 天，ip 该乳剂 0.1 mL 作为激发注射。

2.3　分组与给药

60 只小鼠随机分为 6 组（每组 10 只）：对照组，模型组（ig 生理盐水 20 mL/kg），雷公藤片剂阳性对照组（ig 雷公藤片混悬液 400 μg/kg），透皮制剂低、中、高剂量（50、100、200 mg/kg）组，造模成功后给药。透皮制剂各组在用试药涂搽关节部位的同时，均 ig 生理盐水 20 mL/kg，对照组、模型组、雷公藤片剂组涂抹生理盐水，每天 1 次，连续给药 25 d。

2.4　标本采集与处理

治疗第 25 天，各组小鼠摘眼球取血，制备血清待测 ALT、BUN。小鼠脱颈椎处死，立即打开腹腔，取心、肝、肾，10%中性福尔马林固定，小心取出胃，剥开后仔细观察，摄像。小鼠处死后立刻截取膝关节上下 1 cm 左右长度的下肢，小心剥离皮毛、肌肉，部分标本 4%多聚甲醛固定，24 h 后放在 EDTA 脱钙液中脱钙，用于免疫组化检测；部分标本以 10%中性福尔马林固定。

2.5　观察指标

2.5.1　血清生化指标　采用赖氏法检测血清 ALT，采用化学比色分析法检测血清 BUN。

2.5.2　病理切片观察　取出心、肝、肾、膝关节等标本后立即放入含有 2/3 的固定液（10%中性福尔

马林）中，显微镜（×100）观察组织病理学改变。

2.5.3 VEGF 免疫组化法检测增生血管翳数 将已固定的带滑膜的关节组织放入相当于标本 10～20 倍的 EDTA 脱钙液内，4 ℃冰箱放置 3 d 至脱钙完成，石蜡切片脱蜡至水。3% H_2O_2 室温孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶的活性，蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 min，进行抗原修复。5%～10%正常山羊血清封闭，室温孵育 10 min，倾去血清（勿洗），滴加以适当比例稀释的一抗（PDGF-B 或 TIMP-1），37 ℃孵育 2 h，PBS 冲洗，5 min×3 次；滴加对应的生物素标记二抗，37 ℃孵育 20 min，PBS 冲洗，5 min×3 次；滴加对应的辣根过氧化物酶标记链霉卵白素，37 ℃孵育 20 min，PBS 冲洗，5 min×3 次。DAB 显色，自来水冲洗，苏木素复染，封片。血管翳计数方法：在镜下（×400）找到血管翳增生明显的区域，每张切片选 10 个区域，计数，取其平均值作为该标本的增生血管翳数目。

2.6 数据处理

所有计数资料用 SPSS11.5 处理，用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对 CIA 小鼠血清生化指标的影响

雷公藤片剂组小鼠血清 ALT 和 BUN 水平显著高于模型组和对照组（P＜0.01）。透皮制剂高、中、低剂量组小鼠血清 ALT 和 BUN 水平显著低于雷公藤片剂组（P＜0.01）。结果见表 1。

3.2 小鼠滑膜组织病理学观察

对照组小鼠关节面光滑；模型组小鼠的关节面明显异常，软骨滑膜粘连明显；雷公藤片剂组关节面正常血管较少。透皮制剂高剂量组关节面基本正常，但与对照组相比，滑膜组织的血管有一定程度的增加。结果见图 1。

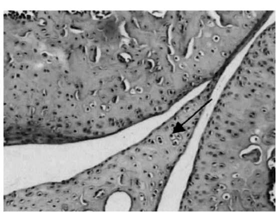
表 1 雷公藤甲素脂质体透皮制剂对 CIA 小鼠血清 ALT 和 BUN 水平的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 10$）

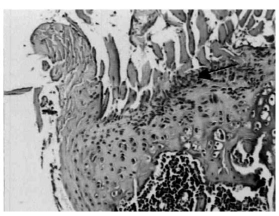
Table 1 Effect of TLPT on serum ALT and BUN levels of mice with CIA ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

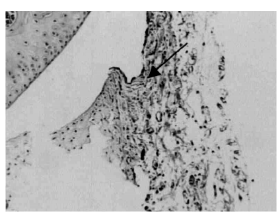
组 别	剂量 / ($mg \cdot kg^{-1}$)	ALT / ($U \cdot L^{-1}$)	BUN / ($mmol \cdot L^{-1}$)
对照	–	48.90±14.59	7.63±1.64
模型	–	47.38± 7.01	9.73±2.33
透皮制剂	50	43.57± 9.96▲▲	5.39±0.99▲▲
	100	39.00±34.70▲▲	6.19±4.28▲▲
	200	46.40±39.35▲▲	6.54±2.42▲▲
雷公藤片	0.4	91.38±11.08**	12.53±2.45**

与模型组比较：$^{**}P$＜0.01；与雷公藤片组比较：$^{▲▲}P$＜0.01

$^{**}P < 0.01$ *vs* model group; $^{▲▲}P < 0.01$ *vs* TWT group


对照


模型


雷公藤片

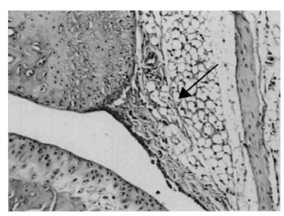

透皮制剂高剂量

图 1 小鼠膝关节滑膜组织病理学观察

Fig. 1 Histopathology observation of synovium in knee joint of mice

3.3 对小鼠滑膜增生血管翳数的影响

对照组小鼠滑膜只有极少血管翳；模型组小鼠滑膜血管翳较多，增生显著；与模型组相比，透皮制剂高剂量组、雷公藤片剂组小鼠滑膜血管翳明显减少（P＜0.01），增生减弱，2 组相比血管翳数量无显著差异（P＞0.05），提示这 2 种雷公藤制剂对 CIA 早期的滑膜血管增生均有抑制作用。结果见表 2 和图 2。

3.4 心、肝、肾、胃病理组织学观察

雷公藤片剂组小鼠心、肝、肾、胃的细胞及组织损伤明显，而透皮制剂高剂量组小鼠心、肝、肾、胃均未发现明显的病理改变。

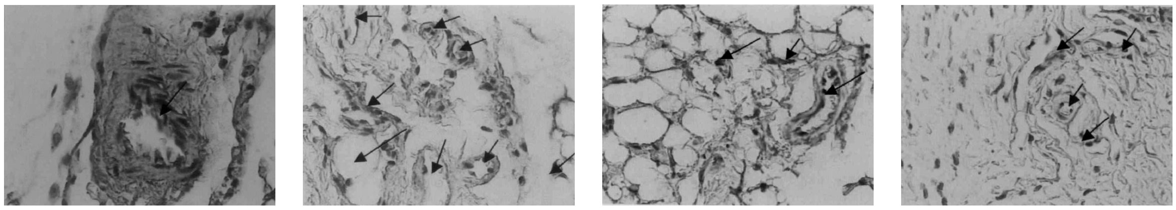
表 2 雷公藤甲素脂质体透皮制剂对 CIA 小鼠膝关节增生血管翳数目的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 10$）

Table 2 Effect of TLPT on number of pannus in knee joint of mice with CIA ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂量 / ($mg \cdot kg^{-1}$)	血管翳数目
模型	–	7.80±2.12
透皮制剂	50	7.24±1.41
	100	5.90±1.53
	200	4.02±1.26**
雷公藤片	0.4	3.66±1.68**

与模型组比较：$^{**}P$＜0.01

$^{**}P < 0.01$ *vs* model group



对照　　模型　　雷公藤片剂　　透皮制剂高剂量

箭头所指为血管翳

Arrow refers to pannus

图 2　雷公藤甲素脂质体透皮制剂对 CIA 小鼠膝关节增生血管翳的影响

Fig. 2　Effect of TLPT on pannus in knee joint of mice with CIA

4　讨论

类风湿性关节炎是主要累及关节滑膜组织及关节软骨的慢性炎症，许多炎症因子及生长因子参与了这一复杂的生物学过程。胶原性关节炎是近年来研究类风湿性关节炎发病机制及治疗方法最常用的模型[10]。本实验采用注射 II 型胶原的方法制备小鼠 CIA 模型，发现小鼠致敏 2 周后便形成典型的滑膜炎，3～4 周后滑膜组织大量增生，丰富的滑膜血管翳生成，这一过程的形成伴随着 VEGF 的表达和分泌。给药结果显示，透皮制剂高剂量组和雷公藤片剂组小鼠关节肿胀及活动情况均较好。膝软骨滑膜组织切片显示，模型组小鼠关节面明显异常，软骨滑膜粘连明显，而雷公藤片剂组、透皮制剂高剂量组小鼠关节面基本正常。VEGF 免疫组化染色结果显示，雷公藤片剂组、透皮制剂高剂量组小鼠关节增生血管翳数量比较接近，且均少于模型组，表明透皮制剂高剂量与雷公藤片剂对实验性关节炎的早期病变均有良好的防治效果，且作用相当。血清生化指标检测结果表明，雷公藤片剂组小鼠血清 ALT、BUN 显著升高，而透皮制剂高、中、低剂量组小鼠血清 ALT 均较低，高剂量组小鼠 BUN 正常。病理组织学观察可见，雷公藤片剂组小鼠心、肝、肾、胃的细胞及组织有明显损伤，而透皮制剂高剂量组小鼠心、肝、肾、胃均未发现明显病理改变。实验结果表明，与雷公藤片剂相比，透皮制剂更能有效降低雷公藤甲素对心、肝、肾、胃等的损害。

有研究显示，雷公藤甲素对大鼠佐剂性关节炎具有不同程度的预防和治疗作用，能够使原发和继发病变减轻[11]。本研究表明，雷公藤片剂及透皮制剂对 II 型胶原诱导的关节炎也具有显著的抑制作用，2 种制剂作用相当，并且脂质体透皮制剂对心、肝、肾、胃等的不良反应显著降低。本实验为采用合适剂型发挥雷公藤甲素独特的药理作用，尽量避免和减少其全身不良反应，保证临床用药的高效安全提供参考。

参考文献

[1] 吴柏林. 雷公藤治疗类风湿性关节炎的机理探要 [J]. 实用中医内科杂志, 2003, 17(3): 150.

[2] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1215-1218.

[3] Qiu D, Kao P N. Immunosuppressive and anti-inflammatory mechanisms of triptolide, the principal active diterpenoid from the Chinese medicinal herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f [J]. *Drugs R D*, 2003, 4(1): 1-18.

[4] Chen B J. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42(3): 253-265.

[5] 骆永伟, 施　畅, 原　野, 等. 雷公藤甲素的毒理学研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2009, 23(1): 74-77.

[6] 王　贝, 江振洲, 张陆勇. 雷公藤甲素毒性及减毒的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 211-215.

[7] Drummond D C, Meyer O, Hong K, *et al*. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors [J]. *Pharmacol Rev*, 1999, 51(3): 691-698.

[8] 刘元刚, 刘树滔, 饶平凡. 类风湿性关节炎啮齿动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(6): 470-473.

[9] 秦宗玲, 袁　易, 郑幼兰. 氟化洛芬醇质体凝胶的制备及质量控制 [J]. 中国药房, 2007, 19(18): 1484-1486

[10] Trentham D E. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis evidence pro and con [J]. *Arthritis Rheum*, 1982, 25(9): 11-17.

[11] 林建峰, 朱　惠, 郑幼兰. 雷公藤内酯醇对大鼠佐剂性关节炎的影响 [J]. 福建医药杂志, 1998, 20(6): 101-102.