

地塞米松对胶原诱导性关节炎大鼠模型软骨退化的改善作用

许冰馨¹, 范凯健^{1,2}, 王婷玉¹, 陈慧瑾¹

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011; 2. 上海市崇明区精神卫生中心药剂科, 上海 202150)

[摘要] **目的** 建立胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠模型, 即一种类风湿性关节炎大鼠模型, 并研究地塞米松对 CIA 大鼠软骨的保护作用。**方法** 30 只 Wistar 大鼠随机均分为 3 组: 正常组、模型组和地塞米松组。通过向大鼠尾部皮内注射 0.1 mL 牛 II 型胶原与弗氏不完全佐剂等比例混匀而成的白色乳剂建立 CIA 模型, 一共注射 2 次, 分别记为第 0 天和第 7 天; 模型建立后, 给药组腹腔注射地塞米松 (1 mg/kg), 每周 3 次, 连续 4 周。给药结束后处死大鼠, 每组 10 只大鼠的膝关节软骨分成 3 部分: 一部分进行固定、脱钙、阿尔新蓝染色, 观察软骨层病理变化; 另一部分采用实时定量 PCR 方法检测其股骨头软骨中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) -9、MMP-13、解聚蛋白样金属蛋白酶 4 (a disintegrin-like and metallo-proteinase with thrombospondin motifs-4, ADAMTS-4) 和 ADAMTS-5 的 mRNA 表达; 最后一部分采用免疫组织化学法检测膝关节软骨层 MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 的表达水平。**结果** 与模型组相比, 经地塞米松治疗后 CIA 大鼠膝关节软骨面积、厚度和细胞数量下降程度明显被抑制 ($P < 0.05$), 软骨表面较光滑且侵袭程度明显改善, 提示软骨破坏得到抑制。地塞米松治疗后 CIA 大鼠软骨中 MMP-9、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 mRNA 水平降低 ($P < 0.001$), MMP-9、MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平也明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 地塞米松可以抑制 CIA 大鼠中多种基质金属蛋白酶的表达, 对软骨破坏具有治疗作用。

[关键词] 类风湿性关节炎; 胶原诱导性关节炎; 地塞米松; 软骨; Wistar 大鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)05-0416-07

Effect of Dexamethasone on Cartilage Degeneration in Rats with Collagen-induced Arthritis

XU Bingxin¹, FAN Kaijian^{1,2}, WANG Tingyu¹, CHEN Huijin¹

(1. Department of Pharmacy, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Department of Pharmacy, Mental Health Center, Chongming District, Shanghai 202150, China)

Correspondence to: CHEN Huijin (ORCID: 0000-0002-8835-6620), E-mail: 69321687@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** To establish a rat model of collagen-induced arthritis (CIA), a rat model of rheumatoid arthritis, and to study the protective effect of dexamethasone (DEX) on cartilage in CIA rats. **Methods** Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups: normal, model, and DEX groups. The CIA model was established by intradermal injection of a white emulsion mixed with 0.1 mL bovine type II collagen and Freund's incomplete adjuvant in equal proportions into the distal part of the rat tail. The dates of the two injections were recorded as days 0 and 7, respectively. After the establishment of the CIA model, DEX (1 mg/kg) was intraperitoneally injected in the treatment group 3 times a week for 4 weeks. After the administration, the rats were euthanized, and the knee cartilages of 10 rats in each group were divided into three parts. The first part was fixed, decalcified, and stained with Alcian blue to observe the pathological changes in the cartilage layer. The second part was used for detection of mRNA expression of matrix metalloproteinase (MMP) -9 and MMP-13, and a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombo-

[基金项目] 上海市崇明区科委科技项目“黄芪甲苷抑制炎症分泌防治类风湿性关节炎伴抑郁症的作用及其机制”(CKY2020-15)

[第一作者] 许冰馨 (1989—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药理学。E-mail: 15001850704@163.com。ORCID: 0000-0002-7442-9630

[通信作者] 陈慧瑾 (1971—), 女, 学士, 主管药师, 研究方向: 药理学、临床药学。E-mail: 69321687@qq.com。ORCID: 0000-0002-8835-6620

spondin motifs (ADAMTS)-4 and ADAMTS-5 by using real-time quantitative PCR analysis in the femoral head cartilage. The third part was used for detection of the expression levels of MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5 using immunohistochemistry in the cartilage layer of knee joint. **Results** Compared with the model group, the decrease of cartilage area, cartilage thickness, and cartilage cell numbers were significantly inhibited after DEX treatment ($P<0.05$). The cartilage surface was smooth and the invasion degree significantly improved, which indicated that cartilage destruction was inhibited. After DEX treatment, the mRNA levels of MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4, and ADAMTS-5 in the cartilage of CIA rats were decreased ($P<0.001$), and the protein expression levels of MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5 were also significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** DEX can inhibit the expression of various MMP in CIA rats and has a therapeutic effect on cartilage destruction.

[Key words] Rheumatoid arthritis; Collagen induced arthritis; Dexamethasone; Cartilage; Wistar rats

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的致病因素尚不明确, 可能与遗传、免疫、环境有关^[1]。RA 的主要特征是滑膜炎和软骨破坏。软骨组织由基质、纤维、软骨细胞构成, 兼具硬度和弹性, 在承重和防止骨骼磨损中发挥着重要作用。由于软骨中不含血管和神经, 一旦受损, 后期修复能力较差^[2]。现阶段, 临床上用于软骨保护的药物有生物制剂、抗风湿药物、软骨营养补充剂等^[3-4]。这些营养补充剂含有如氨基葡萄糖、硫酸软骨素等物质, 可以对关节软骨起到营养、润滑作用。中医的热敷、针灸等理疗方式也可以促进血液循环, 从而改善软骨修复。由于目前骨保护药物和中医理疗对软骨的作用仍存在局限性, 因此抑制软骨损伤机制的研究及相关药物的开发对控制疾病发展具有重要意义。

地塞米松 (dexamethasone, DEX) 是一类长效且强效的糖皮质激素, 具有抗炎和解热镇痛作用。临床上常结合抗风湿药、生物制剂等用于治疗 RA。Yu 等^[5] 研究发现, 局部注射 DEX 可以显著缓解关节肿痛。Formica 等^[6] 研究发现, 将 DEX 与 II 型胶原亲和性复合物或壳聚糖结合, 可提高 DEX 在软骨中的渗透性, 延长其保留时间, 从而抑制炎症标志物表达, 并提高糖胺聚糖水平。临床上小剂量 DEX 注射关节腔用于治疗 RA 是安全有效的。有研究发现, 关节内注射糖皮质激素可以减少药物引起的全身性不良反应^[7]。虽然中低剂量的激素常被作为 RA 的维持治疗药物, 但大剂量长期使用激素也会造成严重不良反应。因此, 选择给予适当剂量的 DEX 治疗可以起到保护软骨和延缓疾病进展的作用。本课题组前期通过腹腔注射 1 mg/kg DEX 制剂, 研究 DEX 对胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 疼痛和炎症的作用机制^[8-9]。在此基础上, 本研究继续验证腹腔注射 1 mg/kg DEX 对

软骨的影响, 并探讨其保护软骨的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只, 6 周龄, 体质量为 (160±20) g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2018-0016]。饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物中心 [SYXK (沪) 2020-0025], 环境温度 (22±2) °C, 相对湿度 50%~60%, 光照为 12 h 昼夜各半。实验经本院实验动物伦理委员会审核批准 (HKDL [2015] 16)。

1.2 试剂

牛 II 型胶原和弗氏不完全佐剂 (美国 Chondrex 公司)、DEX (加拿大 Stemcell 公司)、TRIzol (美国 Ambion 公司)、PCR 引物 (上海生工生物科技有限公司)、SYBR Green qPCR 预混液 (日本 TaKaRa 公司)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 和解聚蛋白样金属蛋白酶 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADMATS) 的一抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司)、4% 多聚甲醛溶液、乙二胺四乙酸 (EDTA)、阿尔新蓝染色液 (武汉谷歌生物科技有限公司)、戊巴比妥钠 (美国 Sigma 公司)。

1.3 仪器

荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Scientific 公司), ProFlex PCR 热循环仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Microfuge 20R 离心机 (德国 Beckman 公司)、显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.4 实验分组及 CIA 造模方法

30 只大鼠适应性喂养 1 周后, 随机均分成正常组、模型组和 DEX 组, 每组 10 只。4 °C 冰浴条件下, 将牛

Ⅱ型胶原与弗氏不完全佐剂1:1充分混匀形成白色乳剂。将实验当天即第一次免疫造模时间定义为第0天,将0.1 mL白色乳剂注射于模型组和给药组大鼠尾根部皮内,正常组大鼠尾根部皮内仅注射0.1 mL生理盐水(即0.9% NaCl溶液)。在第一次免疫后的第7天,再次制备相同乳剂,采用相同方法对模型组和DEX组进行加强免疫,正常组大鼠尾根部皮内仅注射0.1 mL生理盐水,此时即完成造模^[10-11]。

1.5 给药方式与剂量

给药组大鼠在加强造模免疫后第1天(即第一次免疫造模后第8天)开始给予DEX腹腔注射,剂量为1 mg/kg^[12]。给药频次为隔日给药,连续4周。其余动物给予等体积的生理盐水腹腔注射。

1.6 取材

给药完成后,采用戊巴比妥钠(45 mg/kg)对大鼠进行腹腔注射麻醉,待彻底麻醉后经腹主动脉取血,处死大鼠。然后沿股骨头分离大鼠后肢,用显微剪刀轻轻将股骨头上半透明状的软骨剥离,保存于-80℃,用于实时定量PCR检测。剥离大鼠后肢上多余的肌肉组织并暴露出膝关节,将膝关节浸没在多聚甲醛溶液中固定过夜,用于后期制备石蜡切片,以及分别进行阿尔新蓝染色和免疫组织化学实验。

表1 实时定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time quantitative PCR

基因 Gene	上游引物序列 Forward primer	下游引物序列 Reverse primer
MMP-9	5'-ATCCCTCTATGGACCTCCCAC-3'	5'-AACAAGACTTCTCCCCGCAG-3'
MMP-13	5'-ACCCAGCCCTATCCCTTGAT-3'	5'-TCTCGGGATGGATGCTCGTA-3'
ADAMTS-4	5'-CATCCTACGCCGGAAGAGTC-3'	5'-AAGCGAAGCGCTTGTCTCTG-3'
ADAMTS-5	5'-GCCACCTAACGGCAAATCT-3'	5'-AGGACACCTGCGTATTTGGG-3'

注: MMP-9 和 MMP-13 即基质金属蛋白酶9和基质金属蛋白酶13; ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 即解聚蛋白样金属蛋白酶4和解聚蛋白样金属蛋白酶5。

Note: MMP-9 and MMP-13, matrix metalloproteinases-9 and -13; ADAMTS-4 and ADAMTS-5, a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 and -5.

1.10 免疫组织化学

将用于免疫组织化学检测的大鼠膝关节切片经脱蜡水化后,首先进行抗原修复,过氧化氢阻断过氧化物酶,血清封闭,然后进行一抗孵育、二抗孵育,DAB显色。苏木精对比染色细胞核、冲洗、干燥、封固后,显微镜下观察。

1.11 统计学分析

采用统计学分析软件SPSS 22.0进行结果分析,数据采用平均数±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。组间数据差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.7 膝关节脱钙并制作石蜡切片

将大鼠膝关节浸没在EDTA脱钙液中,隔日更换一次脱钙液。4℃摇床上脱钙30 d以上。采用针刺法检测脱钙程度,即注射器针头可无障碍穿透骨头才表示脱钙成功。脱钙后的样本,经脱水、软石蜡34 h、硬石蜡0.5 h的浸蜡后,置于熔融态的石蜡包埋框中完成石蜡包埋,冷却凝固后制作成4 μm厚的膝关节矢状面石蜡切片。

1.8 阿尔新蓝染色

大鼠膝关节病理切片经过脱蜡后,进行阿尔新蓝染色、漂洗、脱水、中性树胶封固。显微镜下观察膝关节软骨破坏情况,运用Image J 1.8.0软件计算各组大鼠膝关节的软骨面积、厚度、软骨细胞数,并分析膝关节损坏严重程度。

1.9 实时定量PCR检测软骨中蛋白酶转录水平

实验前取出保存于-80℃的软骨,置于研钵中,倒入液氮并将其研碎。TRIzol法提取总RNA,在PCR仪上转成cDNA。实时定量PCR法检测各组软骨组织中MMP-9、MMP-13、ADAMTS-4和ADAMTS-5的mRNA表达水平。实时定量PCR程序如下:95℃变性、退火至60℃,经过40个循环后,65℃延伸5 s。引物序列见表1。

2 结果

2.1 DEX对大鼠膝关节软骨病理的影响

阿尔新蓝染色结果如图1所示。与正常组相比,CIA大鼠膝关节中软骨厚度和面积减少($P < 0.001$),软骨细胞数量($P < 0.001$)和表面光滑度下降,软骨侵蚀严重。

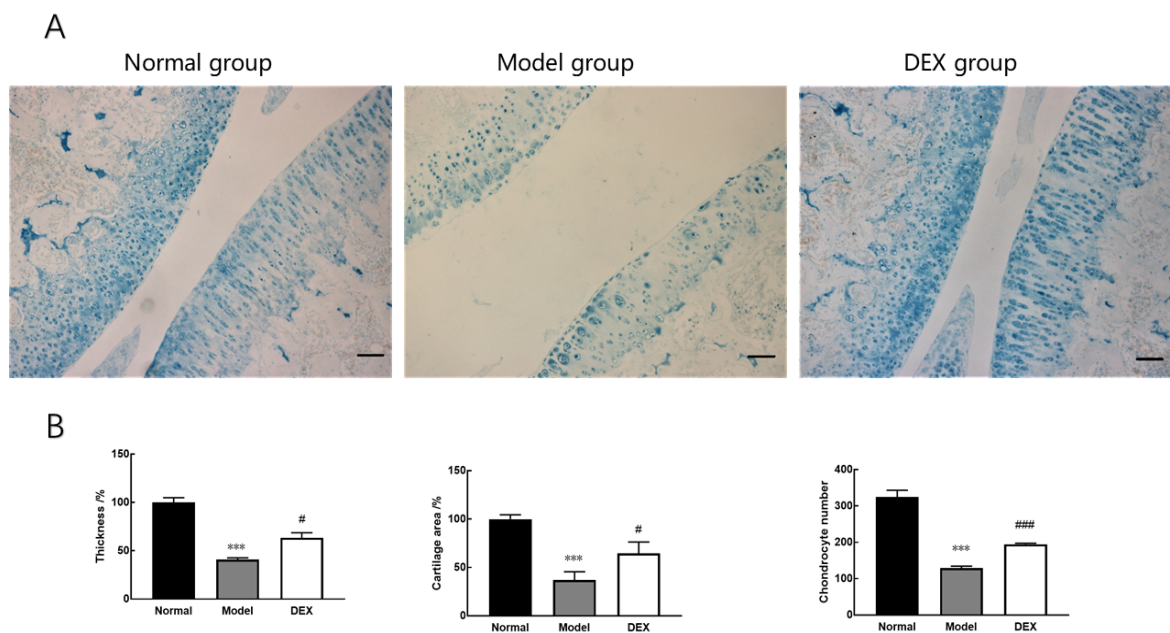
经过DEX治疗后,软骨面积、厚度和细胞数量下降程度得到明显抑制,与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);而且软骨表面较光滑,软骨侵蚀程度

也得到明显改善。结果说明DEX治疗可以一定程度上抑制CIA大鼠膝关节软骨破坏。

2.2 DEX对软骨中基质蛋白酶mRNA表达的影响

实时定量PCR结果(图2)显示, CIA大鼠软骨中MMP-9、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5 mRNA的表

达水平明显较正常组升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而DEX治疗后, 这些基质蛋白酶的表达量均较模型组出现不同程度的下降, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。结果表明DEX治疗可以减少CIA软骨组织中这些基质蛋白酶的mRNA表达。

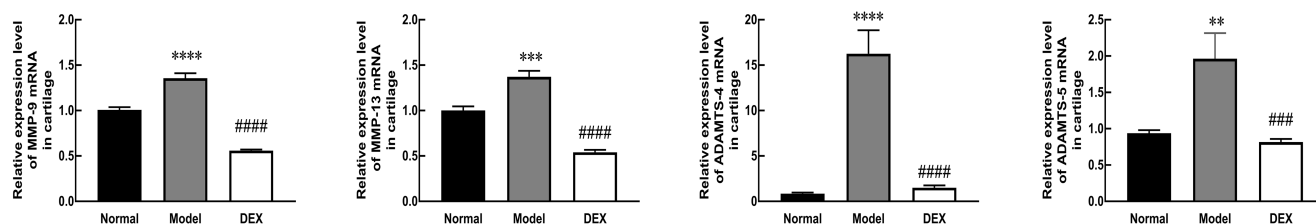


注: A为三组大鼠膝关节的阿尔新蓝染色图, 比例尺为100 μm , 放大倍数为100倍。B图由左往右依次为各组软骨厚度、软骨面积、软骨细胞个数的统计学分析图。DEX即地塞米松治疗组。每组3只大鼠, 数据表示为平均值 $\pm$ 标准误。与正常组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 。

Note: A, Alcian blue staining of knee joints of the three groups of rats; the scale bar is 100 μm and magnification is $\times 100$. B, (left to right) Charts of cartilage thickness, cartilage area, and number of cartilage cells in each group. DEX, dexamethasone treatment group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM with 10 rats per group. Compared with the normal group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$.

图1 地塞米松对胶原诱导性关节炎大鼠膝关节软骨退化的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of dexamethasone on degeneration of knee articular cartilage in collagen-induced arthritis rats



注: MMP-9和MMP-13即基质金属蛋白酶9和基质金属蛋白酶13; ADAMTS-4和ADAMTS-5即解聚蛋白样金属蛋白酶4和解聚蛋白样金属蛋白酶5。DEX即地塞米松治疗组。每组4只大鼠, 数据表示为平均值 $\pm$ 标准误。与正常组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与模型组相比, #### $P < 0.0001$, ### $P < 0.001$ 。

Note: MMP-9 and MMP-13, matrix metalloproteinases-9 and -13; ADAMTS-4 and ADAMTS-5, a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 and -5. DEX, dexamethasone treatment group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM with 10 rats per group. Compared with the normal group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; Compared with the model group, #### $P < 0.0001$, ### $P < 0.001$.

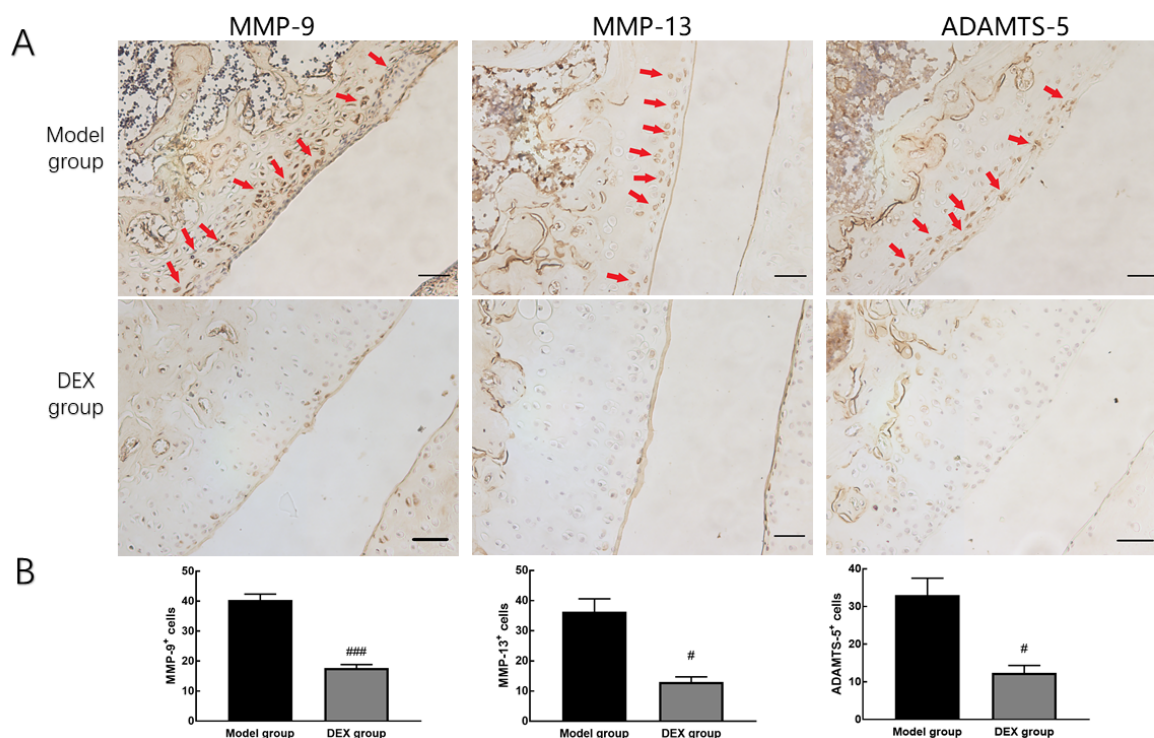
图2 实时定量PCR检测地塞米松对胶原诱导性关节炎大鼠膝关节软骨组织中基质蛋白酶mRNA转录的抑制作用

Figure 2 Inhibitory effect of dexamethasone on matrix metalloproteinases transcription in the knee cartilage tissue of collagen-induced arthritis rats detected by real-time quantitative PCR

2.3 DEX对软骨中相关酶ADAMTS-5、MMP-9、MMP-13蛋白表达的影响

前期研究显示,相较于正常组大鼠,CIA大鼠软骨中MMP-9、MMP-13和ADAMTS-5的含量明显升高^[13]。因此,本研究侧重检测这3种蛋白在模型组和

DEX组的表达变化。免疫组织化学检测结果(图3)显示,模型组大鼠膝关节软骨中MMP-9、MMP-13、ADAMTS-5表达较明显;给药后DEX组中MMP-9、MMP-13和ADAMTS-5水平较CIA模型大鼠明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注: A图是免疫组织化学的结果(DAB染色,比例尺为50 μm ,放大倍数为400倍),红色箭头所指分别为染色的基质金属蛋白酶9(MMP-9)、基质金属蛋白酶13(MMP-13)和解聚蛋白样金属蛋白酶5(ADAMTS-5)阳性软骨细胞。B图是MMP-9、MMP-13和ADAMTS-5在模型组和地塞米松(DEX)组中表达情况的半定量分析;每组3只大鼠,数据表示为平均值 $\pm$ 标准误。与模型组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。

Note: A shows immunohistochemical results (DAB staining; the scale bar is 50 μm and magnification is $\times 400$). Red arrows indicate matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), matrix metalloproteinases-9 (MMP-13), and a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (ADAMTS-5) positive chondrocytes, respectively. B shows semi-quantitative results of MMP-9, MMP-13, and ADAMTS-5. Data are expressed as mean $\pm$ SEM with 10 rats per group. Compared with the model group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图3 免疫组织化学法检测地塞米松对胶原诱导性关节炎大鼠膝关节软骨中MMP-9、MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达的抑制作用

Figure 3 Inhibitory effect of dexamethasone on MMP-9, MMP-13 and ADAMTS-5 expression in the knee cartilage of collagen-induced arthritis rats detected by immunohistochemistry

3 讨论

软骨和骨破坏的现象常见于类风湿关节炎,但软骨破坏的进程是不可逆的,所以防止软骨损伤对于RA患者关节功能的保护具有重要意义。关节软骨属于纤维软骨,质地较坚韧,具有吸收运动产生的震动、减少摩擦和维持关节稳定性的作用。它由软骨细胞、细胞间质组成。而细胞间质则是由胶原纤维、蛋白多糖和水组成。细胞间质的降解造成了软骨损伤。现有研究证明,MMPs和ADAMTS在RA患者血液和滑膜中大量存在,有助于软骨的分解代谢,在软骨损伤修复

中具有重要作用^[14]。

MMPs是蛋白水解酶的主要成员,其活性位点需要锌离子才能发挥作用。MMPs对于维持组织结构的稳定性至关重要。它在pH中性环境下具有活性,可以催化细胞外基质(extracellular matrix, ECM)大分子(如间质和基底膜胶原蛋白)、蛋白聚糖(如聚集蛋白聚糖和纤维调节蛋白)以及辅助ECM蛋白(如纤连蛋白)降解。大多数MMPs都是以无活性的酶原形式存在,但其在病理状态下会被激活,与之对应的金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMP)可调节其活性^[15]。MMPs水平在

RA患者的软骨中显著升高,且内源性TIMP的减少可促进软骨基质合成代谢紊乱,破坏ECM蛋白,并直接促进软骨细胞凋亡和血管再生。多项研究发现,MMP-9和MMP-13可以导致软骨基质损伤^[16]。MMP-9在RA中表达量增加,并能降解关节的非胶原基质成分。而MMP-13除胶原蛋白外,还降解蛋白聚糖分子和聚集蛋白聚糖,在基质破坏中具有双重作用^[17]。Zhang等^[18]研究发现,MMPs的下调有利于小鼠半月板损伤的改善,并提升关节软骨的修复能力。

ADAMTS也可以水解软骨基质中的蛋白多糖,破坏软骨细胞,并阻止软骨内骨形成,而抑制其活性对于缓解软骨退行性病变和促进软骨修复是有利的^[16]。ADAMTS-4和ADAMTS-5已被证明在骨关节炎中起重要作用。它们可通过降解聚集蛋白聚糖和软骨寡聚基质蛋白来减少软骨细胞和细胞外基质,从而诱发关节炎^[19]。目前,ADAMTS已被广泛作为缓解骨性关节炎药物研发的靶标,ADAMTS抑制剂和其单克隆抗体也正在积极开发中^[20]。

关节中MMPs和ADAMTS的正常表达有助于维持骨稳态。然而,在RA中,促炎细胞因子的刺激会导致MMPs和ADAMTS的表达显著增加。CIA与RA类似,同样存在滑膜侵害和软骨损伤^[21]。DEX作为糖皮质激素,抗炎、抗风湿作用强大。本课题组之前的研究已发现,DEX对CIA大鼠滑膜炎和疼痛有明显的抑制作用,且治疗效果明显^[8,22]。DEX可以通过减少滑膜中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-17等炎症因子和血清中促炎因子IL-17a,并增加抗炎因子TGF- β 1,进而减轻滑膜炎。DEX通过抑制大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)中疼痛相关因子NPY、NGF、BDNF和TRPV1以及炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-17的表达,抑制大鼠足部关节疼痛。DEX通过抑制CIA大鼠脾脏T淋巴细胞中促炎因子的形成,同时调节大鼠外周血中Th1/Th2和Th17/Treg比值,对CIA大鼠具有整体免疫调节作用。上述实验结果提示,DEX治疗CIA的机制是减轻滑膜炎、抑制疼痛相关致痛因子和炎症因子表达,并调节了整体免疫失衡^[8-9]。

本实验主要研究DEX对CIA大鼠软骨退化的抑制作用并探讨其机制。阿尔新蓝染色实验中发现,CIA大鼠会产生软骨损伤,模型组大鼠的软骨厚度、面积、表面光滑度以及软骨细胞数都较正常组大鼠出现明显降低,而经过DEX注射治疗后软骨损伤明显减轻。有研究证明,MMPs和ADAMTS在软骨损伤修复中具有重要作用^[14]。本研究中,腹腔注射DEX(1 mg/kg)

治疗后CIA大鼠软骨中MMP-9、MMP-13、ADAMTS-4和ADAMTS-5的mRNA表达水平均降低,软骨厚度、面积和细胞数均较模型组大鼠增加。免疫组织化学实验也进一步发现,给药组大鼠软骨中MMP-9、MMP-13和ADAMTS-5表达量均较模型组明显减少,这与mRNA表达检测结果相一致。因此,推测DEX可能是通过抑制CIA大鼠软骨中MMP-9、MMP-13、ADAMTS-4和ADAMTS-5表达,阻遏软骨细胞和软骨面积减少,进而减轻软骨的损伤。

综上所述,DEX(1 mg/kg,每周3次,连续4周)腹腔注射治疗可以通过抑制CIA大鼠软骨中MMP-9、MMP-13、ADAMTS-4和ADAMTS-5的表达起到直接抑制关节软骨损伤的作用。本实验尚存在不足之处,例如DEX是经典的糖皮质激素,临床上常与药物联合使用来治疗各类免疫紊乱的疾病,而多次的腹腔注射在临床上容易降低患者依从性。因此,本课题组正在研究DEX的温敏凝胶缓释制剂经膝关节局部注射的用药效果,探索该新型缓释制剂在膝关节内释放给药的疗效,而本实验结果可以提供对照和用药剂量的参考依据。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理委员会批准(编号为HKDL[2015]16)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai Ninth People's Hospital (IACUC No. HKDL[2015]16). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

许冰馨负责实验操作和文章写作;范凯健参与文章修改及实验指导;王婷玉负责课题制定和实验设计;陈慧瑾参与实验设计和文章修改。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] DEANE K D, DEMORUELLE M K, KELMENSEN L B, et al.

- Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2017, 31(1): 3-18. DOI:10.1016/j.berh.2017.08.003.
- [2] HARRE U, SCHETT G. Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis[J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(4): 355-363. DOI: 10.1007/s00281-017-0634-0.
- [3] SHI W J, TJOU MAKARIS F P, LENDNER M, et al. Biologic injections for osteoarthritis and articular cartilage damage: can we modify disease? [J]. *Physician Sportsmed*, 2017, 45(3): 203-223. DOI:10.1080/00913847.2017.1357421.
- [4] BISHNOI M, JAIN A, HURKAT P, et al. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis[J]. *Glycoconj J*, 2016, 33(5): 693-705. DOI:10.1007/s10719-016-9665-3.
- [5] LORSCHIEDER M, TSAPIS N, UR-REHMAN M, et al. Dexamethasone palmitate nanoparticles: an efficient treatment for rheumatoid arthritis[J]. *J Control Release*, 2019, 296:179-189. DOI:10.1016/j.jconrel.2019.01.015.
- [6] FORMICA F A, BARRETO G, ZENOBI-WONG M. Cartilage-targeting dexamethasone prodrugs increase the efficacy of dexamethasone[J]. *J Control Release*, 2019, 295:118-129. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.12.025.
- [7] JENSEN T W, HANSEN M S, HØRSLEV-PETERSEN K, et al. Periarticular and generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis: influence of alendronate and intra-articular glucocorticoid treatment. Post hoc analyses from the CIMESTRA trial[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6):1123-1129. DOI:10.1136/annrheumdis-2012-203171.
- [8] 许冰馨, 王琪珊, 李钦, 等. 地塞米松对 CIA 大鼠 DRG 中炎症因子的抑制和关节疼痛的改善作用[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(12):1691-1696. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2020.12.012.
- XU B X, WANG Q S, LI Q, et al. Dexamethasone inhibits inflammatory factors in DRG and improves joint pain of CIA rats[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(12):1691-1696. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.12.012.
- [9] 许冰馨, 王琪珊, 范凯健, 等. 地塞米松改善胶原性关节炎大鼠免疫功能与其血药浓度的相关性研究[J]. *实用药物与临床*, 2021, 24(3):198-203. DOI:10.14053/j.cnki.ppcr.202103002.
- XU B X, WANG Q S, FAN K J, et al. Correlation between dexamethasone's improving immune function and blood concentration in rats with collagen-induced arthritis[J]. *Pract Pharm Clin Remedies*, 2021, 24(3):198-203. DOI:10.14053/j.cnki.ppcr.202103002.
- [10] WU J, FAN K J, WANG Q S, et al. DMY protects the knee joints of rats with collagen-induced arthritis by inhibition of NF- κ B signaling and osteoclastic bone resorption[J]. *Food Funct*, 2020, 11(7):6251-6264. DOI:10.1039/D0FO00396D.
- [11] FAN K J, WU J, WANG Q S, et al. Metformin inhibits inflammation and bone destruction in collagen-induced arthritis in rats[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(23): 1565. DOI: 10.21037/atm-20-3042.
- [12] 曾光, 陈芳, 熊新贵, 等. 熊果酸对 CIA 大鼠关节炎及骨质破坏的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2013, 33(7):3-7. DOI:10.3969/j.issn.1674-070X.2013.07.001.003.05.
- ZENG G, CHEN F, XIONG X G, et al. Effects of ursolic acid on arthritis and bone destruction in collagen-induced CIA rats [J]. *J Tradit Chin Med Univ Hunan*, 2013, 33(7): 3-7. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2013.07.001.003.05.
- [13] 王琪珊, 范凯健, 许冰馨, 等. DLTH 通过调节免疫功能和软骨降解从而抑制 RA 的作用[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(5):624-630. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2021.05.007
- WANG Q S, FAN K J, XU B X, et al. Study of DLTH inhibiting RA by regulating immune function and cartilage degradation [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, 37(5): 624-630. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2021.05.007
- [14] YANG C Y, CHANALARIS A, TROEBERG L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2017, 25(7): 1000-1009. DOI:10.1016/j.joca.2017.02.791.
- [15] MALEMUD C J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview[J]. *Front Biosci*, 2006, 11:1696-1701. DOI:10.2741/1915.
- [16] KOVÁCS B, VAJDA E, NAGY E E. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4653. DOI:10.3390/ijms20184653.
- [17] BURRAGE P S, MIX K S, BRINCKERHOFF C E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis[J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 529-543. DOI:10.2741/1817.
- [18] ZHANG J F, WANG G L, ZHOU Z J, et al. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and interleukins in vertebral cartilage endplate[J]. *Orthop Surg*, 2018, 10(4):306-311. DOI:10.1111/os.12409.
- [19] 冀全博, 张强, 王岩. 带有血小板凝血酶敏感蛋白结构域的解聚素与金属蛋白酶 4、5 在骨关节炎中作用的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2013, 27(9): 1080-1084. DOI: 10.7507/1002-1892.20130236.
- JI Q B, ZHANG Q, WANG Y. Research progress of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 4 and 5 in osteoarthritis[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2013, 27(9):1080-1084. DOI: 10.7507/1002-1892.20130236.
- [20] MALFAIT A M, TORTORELLA M D. The elusive DMOAD: Aggrecanase inhibition from laboratory to clinic[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37 Suppl 120(5):130-134.
- [21] MIYOSHI M, LIU S. Collagen-induced arthritis models[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1868: 3-7. DOI: 10.1007/978-1-4939-8802-0_1.
- [22] WANG Q S, XU B X, FAN K J, et al. Inflammation suppression by dexamethasone via inhibition of CD147-mediated NF- κ B pathway in collagen-induced arthritis rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 473(1):63-76. DOI:10.1007/s11010-020-03808-5.

(收稿日期: 2022-05-16 修回日期: 2022-07-27)

(本文编辑: 丁宇菁, 富群华, 姜怡欣)