

Study on Pharmacodynamics of Human Endostatin Peptide in the Treatment of Rheumatoid Arthritis

Heyu Liu¹, Ying Wang², Jinhui Liu¹, Yuanyuan Jiang², Yan Huang², Huicheng Li^{1*}

¹Harbin Pharmaceutical Group Bioengineering Co., Ltd, Harbin Heilongjiang

²Harbin Pharmaceutical Group R&D Center, Harbin Heilongjiang

Email: hayaoshengwu@hotmail.com, *huichengli@hotmail.com

Received: Aug. 27th, 2017; accepted: Sep. 8th, 2017; published: Sep. 14th, 2017

Abstract

Objective: Study on the efficacy of human endostatin peptide in the treatment of rheumatoid arthritis, and to provide experimental results for the subsequent development of the human endostatin peptide. **Method:** Using the method of intradermal injection of bovine collagen and complete Freund's adjuvant into right foot of Lewis rats, to make a model of rheumatoid arthritis. After the administration, by mean of the change of water level, measure all rats' foot volume, to calculate the difference of foot volume of all the rats (right minus left foot), which can help observe the therapeutic effect of human endothelin peptide. **Result:** The treatment group had obvious therapeutic effect and significant difference ($p < 0.05$). **Conclusion:** Human endostatin peptide has therapeutic effect on rheumatoid arthritis.

Keywords

Human Endostatin Peptide, Rheumatoid Arthritis, Endostatin

人血管内皮抑制肽治疗类风湿性关节炎药效学研究

刘贺煜¹, 王莹², 刘锦辉¹, 姜媛媛², 黄炎², 李会成^{1*}

¹哈药集团生物工程有限公司, 黑龙江 哈尔滨

²哈药集团技术中心, 黑龙江 哈尔滨

Email: hayaoshengwu@hotmail.com, *huichengli@hotmail.com

*通讯作者。

收稿日期: 2017年8月27日; 录用日期: 2017年9月8日; 发布日期: 2017年9月14日

摘要

目的: 研究人血管内皮抑制肽治疗类风湿性关节炎的药效, 为人血管内皮抑制肽后续开发提供实验结果的支持。**方法:** 使用Lewis大鼠, 右后足跖皮内注射牛Ⅱ型胶原蛋白加完全弗氏佐剂的方法, 制作类风湿性关节炎模型, 给药结束后, 通过水位变化的方法测量所有大鼠后脚体积, 并计算所有大鼠的后脚体积之差(右脚减左脚)。以此考察人血管内皮抑制肽的治疗效果。**结果:** 给药组具有明显的治疗效果, 且具有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:** 人血管内皮抑制肽具有治疗类风湿性关节炎的作用。

关键词

人血管内皮抑制肽, 类风湿型关节炎, 内皮抑素

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

类风湿性关节炎是一种常见的慢性全身自身免疫性疾病。临床表现为疼痛、肌肉疼痛和不规律发热等症状, 给患者带来了很大的痛苦。

统计表明, RA 在全世界均有发病, 平均发病率为 1%, 而我国患病率为 0.3%~0.4% [1]。因此在我国类风湿关节炎患者人数至少达到了 500 万之多。如果类风湿型关节炎得不到有效的治疗, 随着病情的恶化, 甚至会导致残疾。有新闻报道据有关部门统计我国类风湿关节炎的致残率高达 7 成。

类风湿关节炎, 是一种最终可能导致患者残疾的慢性疾病。但由于发病周期漫长, 初期症状往往并不引起患者的重视。常规检查时, X 射线片无法发现早期手腕关节的滑膜炎、关节周围炎性渗出及早期骨破坏[2]。而当患者感觉明显症状而就医时病情已比较严重。随着我国人口寿命的提高, 类风湿关节炎这类慢性疾病的发病率也跟着慢慢升高, 严重影响了我国人民的健康。

虽然临床上对治疗类风湿型关节炎的期望很大, 由于其发病机理不明, 目前没有治疗类风湿性关节炎的特效药。常见的药物为免疫抑制剂, 也取得了不错的疗效。但免疫抑制剂本身也有可能导致机体免疫力下降, 从而引起其他疾病。因此就需要其它作用机理的治疗药物, 或是新的辅助治疗药物, 在疗效不变或是提升疗效的基础上, 降低免疫抑制剂的用量, 从而降低使用免疫抑制剂带来的副作用。

内皮抑素是由胶原蛋白 XIII 羧基末端的 184 个氨基酸组成的一种内源性血管生成抑素, 于 1997 年由 O'Reilly 等发现。它能特异性地抑制内皮细胞的增殖和血管的生成[3]。

血管生成是类风湿性关节炎(RA)早期滑膜病理改变特征之一, 也是产生和维持 RA 血管翳的主要因素。内皮抑素可特异性抑制新生血管内皮细胞增殖、迁移、诱导其凋亡而发挥抗血管生成作用, 应用内皮抑素抑制滑膜新生血管生成可成为治疗 RA 的一种全新方法。内皮抑素还可通过抑制成纤维样滑膜细胞增殖, 促进其凋亡发挥抗 RA 效应[4]。

人血管内皮抑制肽是我公司从哈尔滨医科大学刘兴汉教授引进的项目, 它是一种具有 30 个氨基酸的内皮抑素。

本项目立项时准备开发的适应症为抗肿瘤，为了增加产品的核心竞争力，拟增加类风湿性关节炎的适应症。本次试验设计了体外试验和体内试验，来考察人血管内皮抑制肽是否具有治疗类风湿性关节炎的作用。

2. 体外活性实验

取对数生长期的人脐静脉内皮细胞 HUVEC (购于 Science-Cell™ Research Laboratory), 胰酶消化后用含 10% FBS 的 DMEM 培养基制成 5×10^4 个/ml 浓度的细胞悬液, 铺于 96 孔板中, 每孔 100 μ l。置于 37℃, CO₂ 培养箱中培养。

第二日, 将人血管内皮抑制肽原料冻干粉用无菌去离子水配置成 10 mg/ml 的溶液, 用 DMEM 稀释为起始浓度 3 mg/ml, 以后各浓度为倍比稀释的溶液, 加入到各孔中。

37℃, 5% CO₂ 培养 3 天, 换为含有 10% cck-8 的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 培养 1 h 后用酶标仪 OD 450 nm 读数, 测定活性。

将 3 批供试品进行体外活性测定, 活性应在 80%~120% 之间, 结果如表 1 所示, 以批号*****01 样品活性为 100% 计算, 其他两批样品的活性分别为 95.4% 和 92.8%, 符合活性标准。

3. 动物实验

3.1. 材料与方法

3.1.1. 实验动物与饲养环境

雌性 Lewis 鼠, 200 g 左右, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2015-0001]。实验场所为本公司(哈药集团生物工程有限公司)实验室[SYXK(黑)2015-008]。⁶⁰Co 灭菌全价颗粒饲料, 购于北京科澳协力饲料有限公司[SCXK(京)2014-0010], 饮用水为灭菌水, 自由采食。

3.1.2. 实验试剂

牛 II 型胶原蛋白(CII)、完全弗氏佐剂(CFA), 均购于西格玛公司。

3.2. 实验方法

3.2.1. 类风湿性关节炎大鼠模型的建立

参照张新梅[5]-[10]等的方法, 进行改进, 制定此方案。

将天然牛 CII 溶于 0.01 mol/L 醋酸, 使终浓度为 3 mg/ml, 放置冰箱 4℃ 过夜后, 加等体积的 CFA 乳化。将 Lewis 大鼠经戊巴比妥钠麻醉后, 于右后足跖皮内注射 0.1 ml。第 21 天予以腹腔内注射 75 μ g 牛 II 型胶原(溶解于 0.01 mol/L 醋酸中)。

3.2.2. 实验动物分组与给药

造模结束后第 2 天, 将所有大鼠随机分为 2 组, 一组为人血管内皮抑制肽组 13 只大鼠, 腹腔注射人血管内皮抑制肽 21 mg; 一组为阴性对照组 13 只大鼠, 腹腔注射生理盐水 0.5 ml。连续给药 7 天。

Table 1. Result of biological activity
表 1. 活性测定结果

批号	活性
*****01	100%
*****02	95.4%
*****03	92.8%

3.2.3. 大鼠脚部肿胀程度的测定

用纯化水将烧杯灌满，再将麻醉后的大鼠后脚深入水中，水溢出后，测量烧杯内剩下水量，计算溢出水的体积，即为大鼠后脚体积。测量所有大鼠后脚体积，并计算所有大鼠的后脚体积之差(右脚减左脚)。

3.3. 统计学方法

应用 SPSS18.0 对实验数据进行统计分析，结果均使用均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm s$)，组间差异比较使用秩和检验法，选取 $\alpha = 0.05$ 。

3.4. 结果

从表 2、图 1 可见，给药组大鼠肿胀程度平均为 0.52 ± 0.24 ，阴性对照组肿胀程度平均为 0.78 ± 0.34 。人血管内皮抑制肽给药组脚部肿胀程度，明显降低($P < 0.05$)。

本次实验方案及实验通过本公司实验动物管理委员会伦理审核。

4. 讨论

本次试验结果表明人血管内皮抑制肽对大鼠脚部肿胀具有明显的抑制作用，且具有显著性差异，充分说明了人血管内皮抑制肽对类风湿性关节炎的治疗作用。后续可以考虑进一步开发类风湿性关节炎的适应症。

本实验所采用的模型为国内外公认的成熟模型，加上类风湿性关节炎也没有公认的特效药，故本实验没有设计阳性对照。

Table 2. The degree of foot swelling in each group of rats

表 2. 各组大鼠脚部肿胀程度

组别	肿胀程度
人血管内皮抑制肽组*	0.52 ± 0.24
阴性对照组	0.78 ± 0.34

注：*表示与对照组比较，* $P < 0.05$ 。

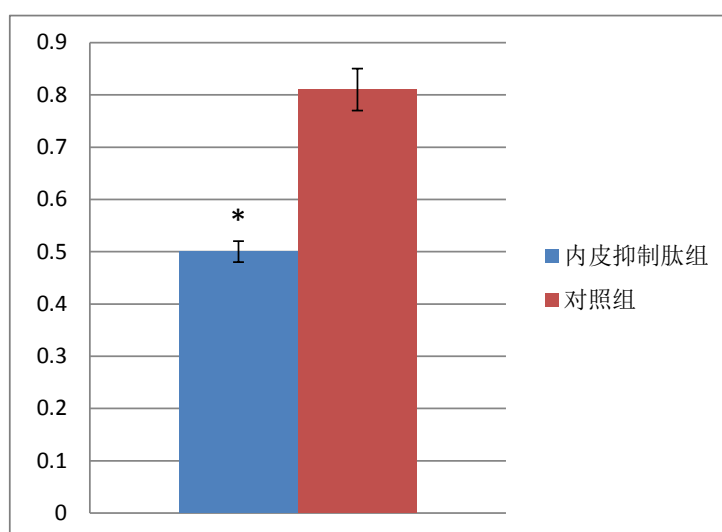


Figure 1. The degree of foot swelling in each group of rats

图 1. 大鼠脚部肿胀程度

本实验采用了牛 II 型胶原蛋白(CII)加完全弗氏佐剂(CFA)的方法, 它和传统的只使用佐剂的方法不同。虽然类风湿性关节炎发病没有公认的机理, 但有一种理论认为是关节腔内的胶原蛋白脱落, 掉入关节腔中, 引起的一系列的免疫反应。该理论解释了为何免疫抑制剂可以治疗类风湿性关节炎。另外根据这种理论现在有一种疗法, 即通过手术治疗类风湿性关节炎, 已取得了不错的疗效[11]。该疗法也佐证了这一理论。由此可以得出该理论应十分接近于类风湿性关节炎的发病机理。我们采用注射胶原蛋白的方法, 来模拟类风湿性关节炎的形成。

实验动物实验部分仅检测大鼠脚部肿胀的体积, 并没有在动物实验进行 TNF- α 等细胞因子[12] [13] [14] [15]的检测。体外实验部分开展了作用机理的验证。人血管内皮抑制肽为引进自刘兴汉教授的项目, 作用机理方面刘老师开展的很完善, 我公司项目组不需要在动物实验部分再重复研究作用机理。

人脐静脉内皮细胞 HUVEC 是一种国内外公认的内皮细胞。体外实验表明人血管内皮抑制肽对内皮细胞的生长有明显的抑制作用, 验证了人血管内皮抑制肽对血管生成的抑制作用。本次体外实验一方面是为了验证人血管内皮抑制肽抑制血管生成的作用机理, 另一方面也是为了建立新药研究质量检测体系中体外活性的检测方法。结果表明这两部分实验目的都达到预期。

类风湿性关节炎患者多为中老年。而新生血管在成年人体内不会生成。内皮抑素对血管内皮细胞有抑制作用而对非内皮细胞均无抑制作用; 内皮抑素对血管生成有抑制作用而对静止的血管组织不起作用。所以新生血管生成抑制剂本身的副作用非常小。如与免疫抑制剂联合用药, 可以降低免疫抑制剂的用量, 从而减少免疫抑制剂带来的副作用。本次实验结果充分提示了人血管内皮抑制肽可以做为一种治疗类风湿性关节炎的一种辅助用药。

作为辅助用药, 一方面使用免疫抑制剂来直接治疗类风湿性关节炎, 同时使用新生血管生成抑制剂, 另一方面也可以抑制新的成纤维样滑膜细胞增殖。两者发挥协同作用, 进行治疗类风湿性关节炎。以达到减少免疫抑制剂用量, 而降低免疫抑制剂带来的免疫力下降的副作用。

人血管内皮抑制肽只有 30 个氨基酸, 既可以使用化学合成也可以使用生物工程的方法制备。目前采用中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO)方法制备。注射液生产中热原一直是质量控制的重点。常见热原为内毒素。内毒素本质是革兰阴性细菌细胞壁上的脂多糖, 当细菌裂解或其黏附在其他细胞上时脂多糖可释放出来[16]。采用动物细胞发酵制备的生物制品, 在生产中不引入内毒素, 在控制热原方面优势明显。

药物的制剂主要由主要成分和辅料组成。药物的副作用也主要来自于这两方面。随着制剂学研究的深入, 药用辅料的副作用越来越低。药物的副作用渐渐由主要成分占主导。开发主药本身副作用小的药物, 则是现代新药开发的重点之一。

人血管内皮抑制肽在作用机理上副作用小, 制备工艺又容易控制热原, 可以大幅降低在临床应用时的副作用。非常适合用于治疗类风湿性关节炎这种需长期给药的慢性疾病。具有广阔的临床应用前景。

致 谢

本课题引进自哈尔滨医科大学刘兴汉教授, 刘教授对本课题的研究帮助很大, 特此致谢。

参考文献 (References)

- [1] 池里群, 周彬, 高文远. 治疗类风湿性关节炎常用药物的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2851-2858.
- [2] 宋海霞, 王全师. 高频超声在类风湿性关节炎腕关节早期病变中的诊断价值[J]. 重庆医学, 2014(7): 809-811.
- [3] 温鸿清, 南克俊, 刘兴汉, 等. 重组人内皮抑素血管内皮抑制肽的抗肿瘤作用[J]. 研究现代肿瘤医学, 2009, 17(12): 2280-2282.
- [4] 黄学应, 陈飞虎, 张晓明, 等. 内抑素抗血管生成及抗类风湿性关节炎治疗[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(3): 287-289.

- [5] 张新梅, 赵文明, 李蕴, 等. 胶原诱导的关节炎大鼠关节中浸润的 T 细胞 TCR V β 克隆型分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(5): 538-540.
- [6] 蔡文虹, 孙保东, 张宝凤. 类风湿性关节炎动物模型研究进展中国[J]. 当代医药, 2012, 19(4): 10-12.
- [7] 孙莉莉, 周郦楠. 类风湿性关节炎动物模型的研究进展[J]. 中国实用医药, 2011, 6(24): 244-245.
- [8] 姜辉, 高家荣, 张丽. 类风湿性关节炎动物模型研究进展[C]//中华中医药学会. 中华中医药学会第十六届全国风湿病学术大会论文集, 2012.
- [9] 黄乃艳, 顾瑛, 刘凡光. 类风湿性关节炎的动物模型[J]. 激光生物学报, 2000, 9(2): 142-146.
- [10] 力弘, 贾永锋, 潘雁. II 型胶原蛋白诱导的类风湿性关节炎的动物模型[J]. 上海医科大学学报, 1997(3): 231-233.
- [11] 马步超, 刘涛. 关节镜下膝关节滑膜切除术治疗类风湿性关节炎疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2016, 16(52).
- [12] 刘春景, 田新玮, 王学涵, 等. 蓬草除痹汤干预类风湿性关节炎大鼠骨吸收骨重建及细胞因子的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4499-4504.
- [13] 杨馨, 刘旭光, 王月, 等. 艾灸对类风湿性关节炎家兔滑膜细胞 JAK-STAT 通路负反馈调节家族细胞因子信号抑制因子的影响[J]. 针刺研究, 2013, 38(2): 129-133.
- [14] 陈建双, 于海荣, 张玉玲, 等. 赤雹根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠血清细胞因子的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1097-1098.
- [15] 吴志强, 张剑勇, 陶加平, 等. 药物加天灸发泡法治疗类风湿性关节炎细胞因子影响的临床研究[J]. 中医学报, 2013, 28(6): 915-917.
- [16] 蒋梦萍, 裯婕滢, 徐春, 等. β -arrestin2 在内毒素诱导的肝脏损伤中的作用[J]. 新医学, 2016, 47(2): 84-87.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-441X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: pi@hanspub.org