

· 基础研究 ·

## 双膦酸盐纳米乳在大鼠实验性自身免疫性神经炎中的应用

张蒙,张本铮,吴向辉,张志远\*,徐璐\*

南京医科大学病理学系,江苏 南京 211166

**[摘要]** **目的:**探讨双膦酸盐(bisphosphonate nanoemulsion, BP)纳米乳对实验性自身免疫性神经炎(experimental autoimmune neuritis, EAN)的治疗作用。**方法:**BP纳米乳体外处理巨噬细胞系RAW264.7,实时定量PCR(real-time PCR, RT-PCR)检测炎症因子白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及抑炎因子IL-10、巨噬细胞M2型标记物CD206的表达。构建EAN大鼠模型,给予BP纳米乳处理,测大鼠体重,分析机械疼痛阈值及临床评分,劳克坚牢蓝(luxol fast blue, LFB)染色检测坐骨神经髓鞘病变,免疫组化观察其炎性细胞浸润及病理改变;RT-PCR检测EAN大鼠坐骨神经IL-1 $\beta$ 、IL-17、iNOS及基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)等炎症因子表达。**结果:**BP与BP纳米乳体外处理巨噬细胞,均可降低IL-1 $\beta$ 、iNOS,同时提高IL-10和CD206的表达,促进M1型巨噬细胞向M2型转化。BP纳米乳干预的EAN大鼠体重下降减轻、临床评分降低,机械性疼痛程度缓解,病程明显缩短。同时坐骨神经炎性细胞浸润及髓鞘病变显著减轻,IL-1 $\beta$ 、IL-17、iNOS、MMP-9表达降低。**结论:**BP纳米乳可能通过减轻大鼠坐骨神经炎性细胞浸润及抑制促炎因子表达,来缓解EAN的临床病理变化,提示BP纳米乳可作为神经炎性病变的潜在治疗药物。

**[关键词]** 实验性自身免疫性神经炎;双膦酸盐;纳米乳;巨噬细胞;炎症相关因子

**[中图分类号]** R593.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-043-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190108

## Bisphosphonate nanoemulsion attenuates inflammatory response in rat experimental autoimmune neuritis

Zhang Meng, Zhang Benzhen, Wu Xianghui, Zhang Zhiyuan\*, Xu Lu\*

Department of Pathology, NMU, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To test potential therapeutic effects of bisphosphonate nanoemulsion (BP nanoemulsion) in the experimental autoimmune neuritis (EAN). **Methods:** *In vitro* BP nanoemulsion treatment was performed in macrophage cell line RAW264.7, real-time PCR (RT-PCR) was used to evaluate the expression of inflammatory factors interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS), anti-inflammatory factor IL-10 and macrophage M2 marker CD206. After successfully establishing EAN rats model, BP nanoemulsion treatment was given, weight change of rats was assessed. The mechanical pain threshold and clinical score were analyzed. Luxol fast blue (LFB) staining was applied to show sciatic myelinopathy. Inflammatory cell infiltration and pathological changes in the sciatic nerve were evaluated by immunohistochemistry. The expressions of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-17, iNOS and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) mRNA level in sciatic nerve were detected by RT-PCR. **Results:** BP and BP nanoemulsion treatments inhibited IL-1 $\beta$  and iNOS, increased the expressions of IL-10 and CD206, and induced phenotypic switch of macrophage polarization from M1 to M2 subtype in cell culture. In EAN rats: BP nanoemulsion ameliorated body weight loss and neurological signs, ameliorated mechanical allodynia, shortened disease duration, reduced myelin lesions. Meanwhile, it inhibited accumulation of macrophages and other immune cells, and decreased expressions of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-17, iNOS, and MMP-9 mRNA level in sciatic nerves of EAN rats. **Conclusion:** BP nanoemulsion can reduce accumulation of immune cells and attenuated inflammatory cytokines in sciatic nerves, and improve the clinical pathological changes of EAN rats. BP nanoemulsion may therefore be considered a potential therapeutic option for neuroinflammatory diseases.

**[Key words]** experimental autoimmune neuritis; bisphosphonate; nano-emulsion; macrophages; inflammation cytokines

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):043-049, 103]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81571240, 81771171)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zzy@njmu.edu.cn; xulu@njmu.edu.cn

人格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)是以周围神经神经根的脱髓鞘病变及炎性细胞浸润为病理特点的自身免疫性周围神经病。目前临床治疗手段有限,效果不佳<sup>[1]</sup>。实验性自身免疫性神经炎(experimental autoimmune neuritis, EAN)是GBS的经典动物模型<sup>[2]</sup>。该模型模拟GBS的病理变化,对实验动物周围神经造成脱髓鞘性自身免疫性炎症反应。病变局部可见大量炎症细胞浸润,其中T细胞介导炎症发生,巨噬细胞为主要效应细胞,造成周围神经的脱髓鞘病变<sup>[3]</sup>。以往研究提示,对巨噬细胞激活表型的调控,特别是促进M1(炎症促进)型向M2(炎症抑制)型的转化,能有效缓解EAN大鼠外周神经炎症<sup>[4]</sup>。

双膦酸盐(bisphosphonate, BP)传统上是一种治疗骨骼疾病及钙代谢性疾病的临床药物<sup>[5]</sup>,对多种恶性肿瘤也具有一定治疗作用,其对肺癌的治疗已进入临床前研究<sup>[6]</sup>。值得重视的是,新近研究也证实BP在多种实验性动物炎症反应及EAN自身免疫疾病模型中,能够发挥抗炎治疗作用,其中,对巨噬细胞激活表型的调控,引起了特别关注<sup>[7-8]</sup>。然而,由于血脑/神经屏障的作用,在针对神经系统疾病的治疗中,BP外周血给药所需剂量较大,易引发多种不良反应,这些不良反应在很大程度上限制了BP在神经炎症治疗中的应用。

纳米乳是一种药物传递介质,能够穿透血脑屏障,增强药物渗透性及组织细胞的靶向性,从而增加药物的生物利用度,因此在中枢神经系统疾病中有广阔的应用前景<sup>[9]</sup>。本研究采用脂肪乳剂与BP制备BP纳米乳,体外实验研究BP纳米乳及BP对巨噬细胞系炎症因子表达及表型转化的影响;构建EAN大鼠模型,分别给予EAN大鼠BP纳米乳和BP单独处理,通过观察治疗后大鼠的症状、病理变化及免疫指标,评价BP纳米乳对EAN的治疗效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

巨噬细胞系Raw264.7购于美国Rockville公司;雄性Lewis大鼠,10~12周,230~250g,购于德国Charles River公司,在安静、清洁,室温(22±2)℃的实验环境中饲养,正常饮食,昼夜节律为12h:12h;二氯-1,1-二膦酸盐(bisphosphonate, BP, 通用名:氯膦酸盐/氯膦酸二钠),购自德国Bayer Vital GmbH公司;脂肪乳剂(商品名:力保肪宁, Lipofundin, Lipo<sup>®</sup>),主要成分为10%的中长链脂肪乳注射液,购于

德国B. Braun Melsungen AG公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 双膦酸盐纳米乳(bisphosphonate nanoemulsion, BP nano)的制备

首先将40 mL BP初步分散于80 mL脂肪乳剂中,随后使用EmulsiflexC3匀浆机(Avestin Inc公司,加拿大)进行高压匀浆(750 bar 5个循环,1 750 bar 5个循环),使其均匀分布,从而得到120 mL浓度为20 mg/mL的BP纳米乳。

#### 1.2.2 细胞培养及处理

巨噬细胞系RAW264.7细胞,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,培养基为含10%胎牛血清和1%双抗的RPMI1640培养基。根据细胞生长情况,每1~2 d更换新鲜培养基,待细胞生长至80%~90%,使用0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞接种于12孔板中培养,观察细胞融合度大约至60%时,更换新鲜培养基并行药物处理。取LPS诱导巨噬细胞炎症<sup>[10]</sup>,实验分组为:空白对照组(control)、LPS组、LPS BP组和LPS BP nano组。其中LPS(Sigma公司,德国)使用浓度为500 ng/mL, BP及BP纳米乳的浓度为20 μmol/L,处理24 h后提取RNA,转成cDNA,行后续实验。

#### 1.2.3 构建EAN大鼠模型诱导及BP纳米乳治疗

取100 μg P2<sub>57-81</sub>多肽(GeneScript公司,美国)溶于PBS,浓度为2 mg/mL。多肽与同体积弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)(Sigma公司,德国)乳化混匀,致终浓度1 mg/mL。取24只大鼠,给予大鼠尾根部皮下免疫,多肽/CFA乳化液用量为100 μL/鼠,后随机将大鼠分为4组,每组6只。4组大鼠从免疫第8天(出现明显症状)开始,依据分组分别腹腔注射相应药物进行干预。具体实验分组为:Nano+BP 20 mg/(mL·kg);BP 20 mg/(mL·kg);Lipo对照组(Lipo 1 mL/kg);control组(PBS 1 mL/kg)。

#### 1.2.4 大鼠神经系统体征临床评分

自免疫第0天开始,于每天同一时间段称重,并观察发病情况。大鼠临床评分标准:0分:无明显异常;1分:鼠尾松弛无力,肌张力降低(尾尖上翘);2分:尾瘫,翻正反射部分缺失;3分:翻正反射缺失;4分:存在步态失调,姿态异常;5分:后肢轻瘫;6分:中度瘫痪;7分:后肢严重瘫痪;8分:四肢瘫痪;9分:濒临死亡;10分:死亡<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.5 机械性疼痛评价

机械性疼痛通过测量大鼠后肢足掌的机械缩足反射阈值(hind-paw withdrawal threshold, HWT)进

行评价,测定方法:在安静环境中,于免疫后每日的11:00—13:00采用自动的 von Frey 系统-机械足底试验装置(UgoBasile公司,意大利)测定HWT,每天1次。测量前4 d,对大鼠进行训练,每天让其熟悉外部环境至少10 min,之后将其放入观察箱内适应10 min(观察箱底部为网状,周围为有孔有机玻璃)。检测时用1个细金属丝刺激大鼠后掌中部,刺激轨迹稍呈S形,机械增加刺激力度,从0~50 g逐渐增加重量,持续4~6 s,整个过程超过15 s。触发大鼠缩足反射的力度由仪器自动记录,左右后肢每次测量5次,每次刺激及计算平均值之间至少间隔1 min。大鼠在 von Frey 纤维刺激或移开时出现快速缩足反应,视为阳性反应,而非刺激下的缩足不做记录,将出现≥5次阳性反应的最小力度定为HWT值。

### 1.2.6 形态学检测

劳克坚牢蓝(luxol fast blue, LFB)染色观察坐骨神经脱髓鞘情况,半定量评估各组EAN大鼠的组织学改变,标准如下:0分:血管周围区域正常;1分:血管附近轻微的细胞浸润;2分:靠近血管的地方有细胞浸润和脱髓鞘;3分:整个区域有细胞浸润和脱髓鞘。计算组织学评分的平均值<sup>[11]</sup>。

坐骨神经免疫组化:大鼠免疫后第15天,用乙醚深度麻醉后,心内灌注预冷的4%多聚甲醛,快速取出左侧和右侧的坐骨神经,4%多聚甲醛中固定24 h,石蜡包埋。常规脱蜡、灭活内源酶、微波修复抗原、滴加10%标准猪血清封片,然后滴加适当稀释的一抗:T淋巴细胞抗体W3/13(1:50, Serotec公司,英国);B淋巴细胞抗体OX22(1:200, Serotec公司,英国);M1型巨噬细胞抗体ED1(1:100, Serotec公司,英国),于4℃孵育过夜。加二抗室温孵育,然后加二氨基联苯胺(DAB)底物显色(Fluka公司,德国)。使用有固定参数的Nikon显微镜(Nikon公司,德国)采集图像,观察坐骨神经横截面上的阳性细胞形态并计数。

### 1.2.7 RNA 逆转录实时定量PCR

用TRIzol LS试剂盒(Invitrogen公司,德国)从大鼠坐骨神经及Raw264.7细胞中提取RNA,用QuantiTect逆转录试剂盒(Qiagen公司,德国)逆转录成cDNA,进行RT-PCR(Roche公司,德国)反应,检测IL-1 $\beta$ 、IL-6、iNOS、IL-10、CD206、IL-17、MMP-9等mRNA表达水平的变化, $\beta$ -actin作为内参。

### 1.3 统计学方法

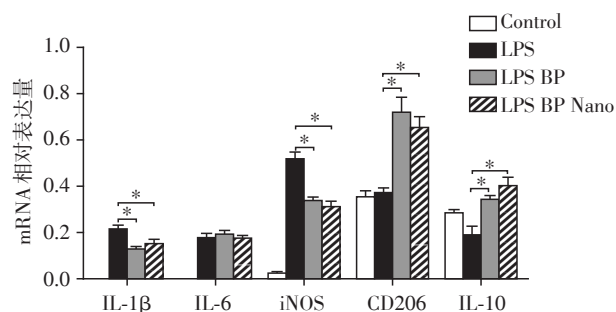
采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析。以上所有实验重复3次,计量数据结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm$

s)表示,数据不满足正态分布及方差齐性,故多组数据间比较采用Kruskal-Wallis检验,两两比较采用Mann-Whitney U检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞实验

RT-PCR检测:LPS刺激RAW264.7细胞后,促炎因子IL-1 $\beta$ 、IL-6和iNOS mRNA表达水平均明显增加(图1);与对照组相比,BP和BP Nano处理后IL-1 $\beta$ 和iNOS mRNA表达水平均明显降低;同时,抑炎因子IL-10和M2型巨噬细胞标记物CD206 mRNA表达水平显著上升( $P < 0.05$ )。以上体外实验结果提示,BP及其纳米乳制剂均具有抗炎活性,且促进M1型巨噬细胞向M2型转变。



在LPS的诱导后,BP和BP Nano均降低促炎型细胞因子IL-1 $\beta$ 、iNOS的mRNA表达水平,显著增加M2型细胞因子CD206和IL-10 mRNA表达水平。两组比较, $P < 0.05$ 。

图1 BP及BP纳米乳作用下巨噬细胞炎症相关因子表达  
Figure 1 The expression of inflammatory cytokines in macrophage after BP or BP nanoemulsion

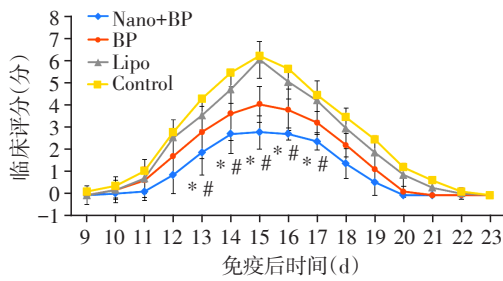
### 2.2 大鼠临床评分和体重变化

成功构建EAN大鼠模型。EAN病理变化于免疫后第9天开始出现,第15天瘫痪症状达高峰,第16天开始逐渐缓解。Nano+BP与BP处理组大鼠在疾病高峰期(免疫后第15天)临床评分与对照组(control、Lipo对照组间无统计学差异)相比均明显降低,持续时间与对照组(control、Lipo对照组间无统计学差异)相比明显缩短,其中Nano+BP效果更加明显(图2)。各组EAN大鼠均在第9天开始出现体重减轻,从免疫后第12至17天,Nano+BP与BP处理组体重减轻程度明显低于control和Lipo对照组。从第18天开始,所有EAN大鼠体重开始恢复(图3)。

### 2.3 机械性疼痛评价

神经性疼痛是炎症脱髓鞘性多发性神经病最常见的症状,因此我们检测了Nano+BP及BP在

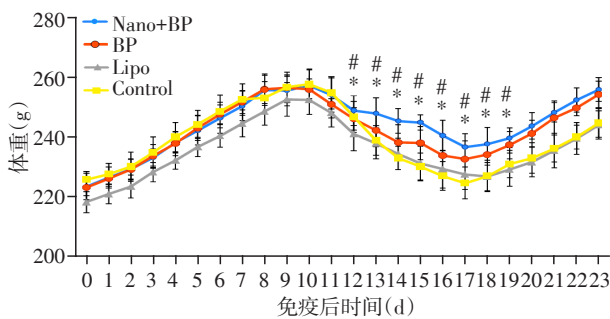




\* $P < 0.05$  Nano+BP vs. Lipo; # $P < 0.05$  BP vs. control.

图2 BP及BP纳米乳减轻EAN神经症状

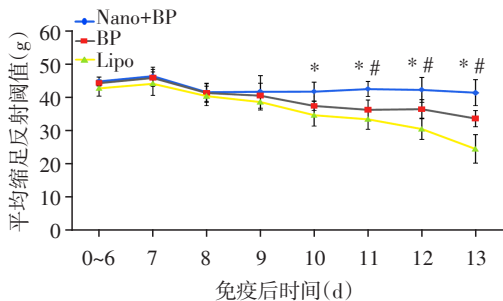
Figure 2 BP or BP nanoemulsion treatments ameliorate neurological disease in EAN



所有EAN大鼠均在第9天开始出现体重减轻,从免疫后第12~17天,Nano+BP与BP处理组体重减轻程度明显低于对照组( $P < 0.05$  Nano+BP vs. Lipo; # $P < 0.05$  BP vs. control)。从第18天开始,所有EAN大鼠体重开始恢复。

图3 BP纳米乳和BP治疗改善了EAN大鼠的体重下降

Figure 3 BP or BP nanoemulsion treatments ameliorate neurological disease and body weight loss in EAN



Nano+BP和BP治疗抑制了大鼠的机械性痛觉异常。Nano+BP从第9天开始抑制机械性疼痛的进展,从第10天开始缩足反射阈值较Lipo组有明显不同( $P < 0.05$  Nano+BP vs. Lipo; # $P < 0.05$  BP vs. Lipo)。

图4 大鼠后肢足掌的机械缩足反射阈值(HWT)测定不同处理组EAN大鼠机械性疼痛程度

Figure 4 Mechanical allodynia between different groups is assessed by measuring rat hind-paw withdrawal threshold(HWT)

EAN大鼠机械性疼痛进展中的作用。首先,EAN大鼠(与在免疫前前4d获得的平均HWT比较)随病情

进展其缩足反射阈值(HWT)明显降低,如图4所示,机械性疼痛出现于第8天,从第8天开始每天1次给予Nano+BP、BP及Lipo处理。Lipo对照组从第8天开始HWT降低,持续到第13天,提示机械性疼痛持续进展。而Nano+BP及BP处理组,HWT降低较不明显,从第10天开始趋势更为平缓,提示机械性疼痛进展缓慢。由于大部分EAN大鼠在第14天出现后肢瘫痪或截瘫,对检测不再能够做出恰当的反应,所以本实验观察到第13天结束。直到第13天观察结束,治疗组和对照组HWT值在疾病进展过程中均有显著差异。综上,Nano+BP和BP均延缓了EAN大鼠的机械性疼痛进展,且Nano+BP组延缓EAN机械性疼痛进展的作用优于BP单独处理组。

#### 2.4 坐骨神经的髓鞘脱失和炎性细胞浸润情况

于疾病高峰期(免疫第15天)处死大鼠,取坐骨神经行LFB染色和组织病理学检查。LFB结果显示,在Nano+BP和BP处理组中,血管周围的炎性细胞浸润和脱髓鞘程度较对照组均明显减轻(图5A、E、I,  $P < 0.05$ )。免疫组化分析显示,在Nano+BP和BP处理组中,EAN大鼠坐骨神经中M1型巨噬细胞(ED1<sup>+</sup>) (图5B、F、J)、T细胞(W3/13<sup>+</sup>) (图5C、G、K)和B细胞(OX22<sup>+</sup>) (图5D、H、L)浸润数目较对照组均明显减少( $P < 0.05$ )。另外,Nano+BP处理组ED1<sup>+</sup>及OX22<sup>+</sup>细胞浸润数较BP处理组均减少(图5J、L,  $P < 0.05$ )。

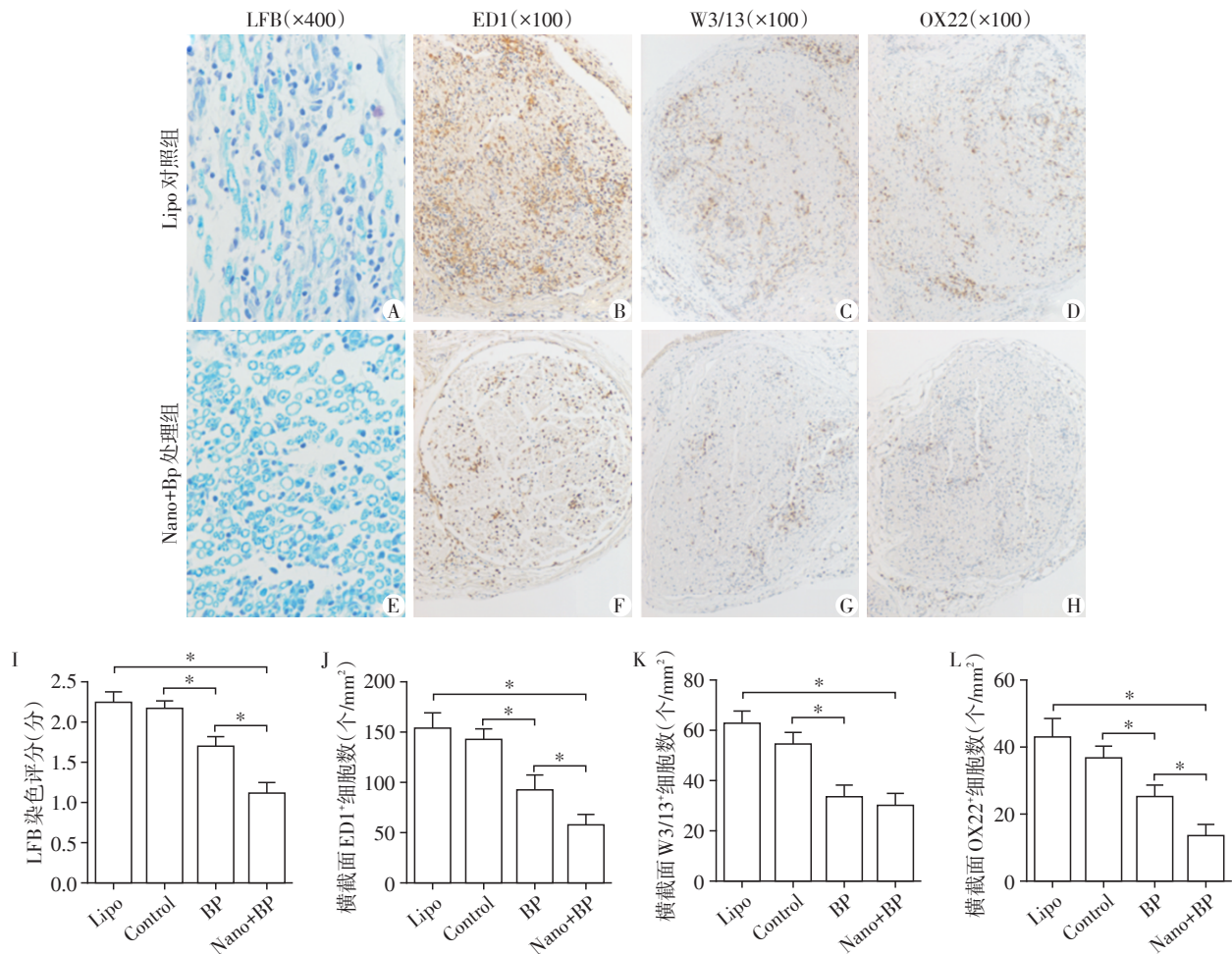
#### 2.5 坐骨神经中炎症相关细胞因子mRNA表达水平

炎症因子如IL-1 $\beta$ 、IL-17、iNOS等被认为是加重EAN进展的重要因素,因此我们通过RT-PCR分析这些因子在不同处理组坐骨神经中的mRNA表达水平。如图6所示,与对照组相比,Nano+BP处理组IL-1 $\beta$ 、IL-17、iNOS、MMP9 mRNA表达水平均明显降低,BP治疗组与对照组相比只有IL-17明显降低,而Nano+BP治疗组IL-1 $\beta$ 的降低水平与BP治疗组相比更加明显。上述实验结果证实,Nano+BP治疗后,炎症相关细胞因子表达下降,且Nano+BP处理组抑制炎症因子表达的效果明显优于BP单独处理组。

### 3 讨论

GBS是全球范围内急性神经肌肉无力的最常见原因,发病率为每10万人1.2~1.8例,所有年龄段人群(包括儿童和婴儿)均可发病,但在年龄较大的人群中更为常见。在过去20年里,GBS病死率为5%~8%,约20%的患者在12个月内有肢体残疾<sup>[1]</sup>。其主要临床表现为急性或亚急性四肢迟缓性瘫痪,感觉功能障碍,腱反射降低或消失和自主功能障碍等。





此处仅呈现有代表性的Lipo对照组与Nano+BP处理组,截面平均组织学评分和免疫细胞计数/mm<sup>2</sup>方法如方法部分所述,与其各自对照组大鼠比较。在Nano+BP和BP处理组中,血管周围的炎性细胞浸润和脱髓鞘程度较对照组均明显减轻(图5A、E、I,  $P < 0.05$ )。免疫组化分析显示,在Nano+BP和BP处理组中,EAN大鼠坐骨神经中M1型巨噬细胞(ED1<sup>+</sup>)(图5B、F、J),T细胞(W3/13<sup>+</sup>)(图5C、G、K)和B细胞(OX22<sup>+</sup>)(图5D、H、L)浸润数目较对照组均明显减少( $P < 0.05$ ),Nano+BP处理组ED1<sup>+</sup>及OX22<sup>+</sup>细胞浸润数较BP处理组均减少(图5J、L,  $P < 0.05$ )。

图5 LFB及免疫组化染色检测坐骨神经脱髓鞘及炎性细胞浸润水平

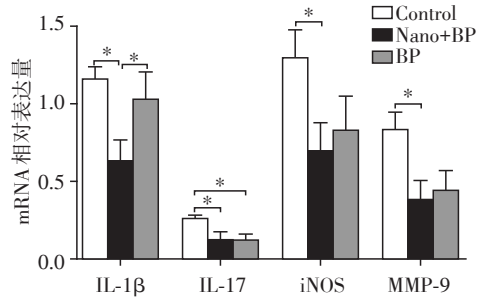
Figure 5 LFB and immunohistochemical analysis of demyelination and cellular infiltration in sciatic nerves

目前针对GBS的病因治疗主要有血浆置换和静脉注射免疫球蛋白等<sup>[12]</sup>。然而这些治疗仅对部分GBS患者有一定缓解作用,其整体治疗结果仍不理想。即使在少数当时恢复良好的人群中,仍有部分患者表现出虚弱、疲劳等多种长期后遗症<sup>[13-14]</sup>。因此寻找针对GBS更有效的治疗措施,在临床治疗上有重要意义。

EAN是一种由T细胞介导的周围神经脱髓鞘性自身免疫性疾病模型,可在动物体内模拟GBS的许多临床和免疫学特征,而被广泛用于GBS研究中<sup>[3,15]</sup>。其病理特征主要为血-神经屏障破坏,周围神经脱髓鞘及反应性T细胞、B细胞和巨噬细胞浸润<sup>[4,16]</sup>。在EAN病变中,虽然病变由T细胞启动,但巨噬细胞既有抗原提呈作用,又是炎症的主要效

应细胞,其局部浸润是引起周围神经脱髓鞘等病理变化的主要原因,对EAN病情进展发挥了更重要作用。EAN的特征性病变为周围神经脱髓鞘,主要由活化的巨噬细胞通过直接吞噬和分泌炎性介质引发<sup>[17]</sup>。有研究证实,二甲基延胡索酸可通过红系衍生核因子相关因子-2(Nrf2)和血红素加氧酶(HO-1)通路,促进巨噬细胞M1型向M2型转化,进而缓解EAN症状<sup>[18]</sup>,清除M1型巨噬细胞或抑制其活性已成为EAN的主要治疗方向。

BP是人工合成的非水解焦磷酸盐类似物,其化学结构以P-C-P基团代替焦磷酸盐的P-O-P基团,在水解酶的作用下更为稳定。目前,BP已临床应用于骨质疏松症的治疗,可抑制破骨细胞介导的骨吸收作用<sup>[5,19]</sup>。同时,BP对多种恶性肿瘤也表现出一定的抑



所有的EAN大鼠在第15天处死,取坐骨神经做RT-PCR,分析EAN大鼠坐骨神经的IL-1 $\beta$ 、IL-17、iNOS和MMP-9的mRNA表达水平,Nano+BP明显降低了坐骨神经中IL-1 $\beta$ 、IL-17、iNOS和MMP-9的mRNA表达水平,但是BP单独处理组只使IL-17明显减少(两组比较,\* $P < 0.05$ , $n=6$ )。

图6 RT-PCR的方法分析不同处理后坐骨神经炎症相关细胞因子的mRNA表达水平

Figure 6 After treatment, mRNA levels of inflammatory cytokines in sciatic nerves are further analyzed by RT-PCR

制作用,其中针对肺癌的治疗已进入临床前研究<sup>[6]</sup>。BP对恶性肿瘤的治疗往往通过其对单核巨噬细胞的作用来体现。以往研究提示,BP可消除荷瘤小鼠体内的肿瘤相关巨噬细胞,从而抑制血管生成,肿瘤生长及远程转移<sup>[20]</sup>;在非肿瘤引发的炎症性疾病中,BP同样通过干预单核巨噬细胞来发挥作用。

近期研究结果提示,在多种炎症性疾病中,BP对巨噬细胞效应的干预及其M1/M2表型的调控作用也发挥了显著治疗作用。研究表明,小鼠静脉注射BP脂质体,可通过消除循环血液中的单核细胞,缓解小鼠肺部炎症<sup>[21-22]</sup>;BP可通过调节巨噬细胞活性,改善强直性脊柱炎患者的临床症状<sup>[23]</sup>;骨性关节炎患者关节内单次注射BP脂质体,可通过消除关节滑膜巨噬细胞,减轻炎症,缓解疼痛<sup>[24]</sup>。同时,BP在自身免疫性脑脊髓炎等自身免疫模型中也表现出有效的抗炎治疗作用<sup>[7-8]</sup>。

然而,由于血脑/神经屏障的存在,在针对神经系统疾病的治疗中,BP外周血给药所需剂量较大,易引发多种不良反应,如颌骨坏死、肌肉骨骼痛、食管炎、脉管炎、发热和低血钙症等<sup>[25]</sup>。这些不良反应很大程度上限制了BP在神经炎症中的应用。

纳米乳作为药物的载体,是一种安全有效的递质。纳米载体可以透过血脑/神经屏障,增加药物的生物活性,进而提高药物治疗效果。将药物载入纳米乳中,可使药物在体内迅速分布并穿过血脑屏障,进入中枢,从而发挥治疗作用<sup>[9]</sup>。以往研究提示,中长链多不饱和脂肪酸纳米乳是携带药物进入

血脑屏障的理想载体<sup>[9]</sup>。在小鼠实验性结肠炎模型中,巨噬细胞可摄取载有BP的纳米颗粒并胞内释放,抑制巨噬细胞分泌损伤性炎症因子,缓解炎症<sup>[26]</sup>。

本研究选用力保肪宁脂肪乳剂(Lipo)制备纳米乳载体,其主要成分是豆油(10%)及磷脂(0.8%卵磷脂),安全可靠。Lipo在临床上广泛用于肠外营养的患者,是一种理想的无毒生物相容药物载体。本研究将BP载入Lipo纳米乳,制成BP纳米乳。体外检测BP纳米乳及BP对巨噬细胞系表型转化的影响,IL-1 $\beta$ 、iNOS被认为是M1型巨噬细胞的标记性分泌因子,IL-10、CD206是M2型巨噬细胞的标记性因子<sup>[27]</sup>。结果提示,BP及BP纳米乳均可明显抑制IL-1 $\beta$ 、iNOS表达,增加IL-10、CD206的表达水平,推测更多M1型巨噬细胞向M2型转变,从而抑制炎症的进展。

进一步取BP及BP纳米乳体内干预EAN大鼠,结果提示,BP纳米乳显著降低EAN大鼠外周神经脱髓鞘病变的严重程度,明显缓解EAN大鼠下肢瘫痪症状并缩短EAN病程;改善EAN大鼠疾病进展过程中的体重下降及机械性疼痛症状。虽然单独使用BP对EAN也有一定缓解作用,但BP纳米乳的治疗效果更加明显。形态学结果提示,BP纳米乳可明显缓解EAN大鼠坐骨神经脱髓鞘病变,显著抑制M1型巨噬细胞及B细胞T细胞的浸润,且BP纳米乳效果明显优于BP单独处理组。

以往研究提示,M1型巨噬细胞分泌的炎症因子中,IL-1 $\beta$ 的表达水平主要与巨噬细胞/单核细胞的浸润有关。IL-1 $\beta$ 的表达增加,能引发EAN大鼠外周神经的局部免疫反应<sup>[11]</sup>。巨噬细胞也可分泌IL-17,直接刺激内皮细胞和成纤维细胞产生多种促炎因子及趋化因子<sup>[28]</sup>。在EAN大鼠坐骨神经中,巨噬细胞表达iNOS和MMP-9,破坏血脑屏障、引起髓鞘断裂,促进周围神经炎症细胞浸润,加剧EAN外周神经炎症反应<sup>[29]</sup>。本研究剥取大鼠坐骨神经,RT-PCR检测局部炎症因子表达。结果提示,BP纳米乳明显降低IL-1 $\beta$ 、IL-17、iNOS和MMP-9等因子在EAN大鼠坐骨神经中的表达,而BP单独使用仅能抑制IL-17表达。综上所述,BP纳米乳能显著缓解EAN大鼠的一系列炎症性病变,其效果优于BP单独使用。

我们推测,纳米载体帮助BP通过血脑/神经屏障,并加强巨噬细胞对BP的摄取,显著抑制炎症型巨噬细胞的作用,促进M1型巨噬细胞向M2型表型转化。另外,BP纳米乳通过抑制EAN大鼠坐骨神经中炎症型巨噬细胞的浸润和破坏作用,降低损伤

性相关因子的分泌和其他炎性细胞的浸润,从而总体缓解EAN症状。

本研究首次证明了双膦酸盐纳米乳在EAN模型中的抗炎效果,其机制可能是抑制炎性巨噬细胞及调控巨噬细胞的表型转化,从而缓解EAN的病理变化和进程。本研究也发现纳米乳载体能够有效帮助药物通过血脑/神经屏障,获得更好的生物利用度和药效,提示BP纳米乳可能成为GBS以及其他多发性神经炎的潜在治疗药物。在今后工作中将进一步研究双膦酸盐纳米乳在EAN中的具体机制,及其在炎症介导的其他神经疾病中的作用。

#### [参考文献]

- [1] Lunn MP, Willison HJ. Diagnosis and treatment in inflammatory neuropathies [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009, 80(3): 249-258
- [2] Ding Y, Han R, Jiang W, et al. Programmed death ligand 1 plays a neuroprotective role in experimental autoimmune neuritis by controlling peripheral nervous system inflammation of rats [J]. *J Immunol*, 2016, 197(10): 3831-3840
- [3] Soliven B. Animal models of autoimmune neuropathy [J]. *ILAR J*, 2014, 54(3): 282-290
- [4] Shen D, Chu F, Lang Y, et al. Beneficial or harmful role of macrophages in Guillain-Barre syndrome and experimental autoimmune neuritis [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 4286364
- [5] Iannitti T, Rosini S, Lodi D, et al. Bisphosphonates: focus on inflammation and bone loss [J]. *Am J Ther*, 2012, 19(3): 228-246
- [6] D'Antonio C, Passaro A, Gori B, et al. Bone and brain metastasis in lung cancer: recent advances in therapeutic strategies [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2014, 6(3): 101-114
- [7] Xu Y, He Z, Li Z, et al. Irgm1 is required for the inflammatory function of M1 macrophage in early experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 101(2): 507-517
- [8] Katzav A, Bina H, Aronovich R, et al. Treatment for experimental autoimmune neuritis with clodronate (Bonfos) [J]. *Immunol Res*, 2013, 56(2-3): 334-340
- [9] Ganta S, Deshpande D, Korde A, et al. A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers [J]. *Mol Membr Biol*, 2010, 27(7): 260-273
- [10] Yang P, Bo S, Qin G, et al. Caspase-1 inhibition attenuates activation of BV2 microglia induced by LPS-treated RAW264.7 macrophages [J]. *J Biomed Res*, 2016, 30(3): 225-233
- [11] Zhang Z, Zhang ZY, Schluesener HJ. Compound A, a plant origin ligand of glucocorticoid receptors, increases regulatory T cells and M2 macrophages to attenuate experimental autoimmune neuritis with reduced side effects [J]. *J Immunol*, 2009, 183(5): 3081-3091
- [12] Oaklander AL, Lunn MP, Hughes RA, et al. Treatments for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP): an overview of systematic reviews [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 1: Cd010369
- [13] Leger JM, Guimaraes-Costa R, Muntean C. Immunotherapy in peripheral neuropathies [J]. *Neurotherapeutics*, 2016, 13(1): 96-107
- [14] Liu Y, Luo B, Han F, et al. Erythropoietin-derived nonerythropoietic peptide ameliorates experimental autoimmune neuritis by inflammation suppression and tissue protection [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90942
- [15] Kuwabara S, Yuki N. Axonal Guillain-Barre syndrome: concepts and controversies [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(12): 1180-1188
- [16] Pitarokouli K, Ambrosius B, Meyer D, et al. Dimethyl fumarate ameliorates lewis rat experimental autoimmune neuritis and mediates axonal protection [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143416
- [17] Maurer M, Toyka KV, Gold R. Cellular immunity in inflammatory autoimmune neuropathies [J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2002, 158(12 Pt 2): S7-15
- [18] Han R, Xiao J, Zhai H, et al. Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 97
- [19] Liu X. Bone site-specific delivery of siRNA [J]. *Journal of Biomedical Research*, 2016, 30(4): 264-271
- [20] Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment [J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 167(2): 195-205
- [21] Zaslona Z, Przybranowski S, Wilke C, et al. Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma [J]. *J Immunol*, 2014, 193(8): 4245-4253
- [22] Perez-Rial S, del Puerto-Nevado L, Terron-Exposito R, et al. Role of recently migrated monocytes in cigarette smoke-induced lung inflammation in different strain of mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72975
- [23] Sambataro G, Sambataro D, Polosa R. Emerging potential for bisphosphonates in the treatment of axial spondyloarthritis [J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2017, 8(6-7): 97-99

(下转第103页)



- 2014,20(9):1007-1010
- [3] Galibert P, Deramond H, Rosat P, et al. Preliminary note on the treatment of vertebral angioma by percutaneous acrylic vertebroplasty [J]. *Neurochirurgie*, 1987, 33(2): 166-168
- [4] Yan Y, Xu R, Zou T. Is thoracolumbar fascia injury the cause of residual back pain after percutaneous vertebroplasty? A prospective cohort study [J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26(3): 1119-1124
- [5] Zhang L, Wang Q, Wang L, et al. Bone cement distribution in the vertebral body affects chances of recompression after percutaneous vertebroplasty treatment in elderly patients with osteoporotic vertebral compression fractures [J]. *Clin Interv Aging*, 2017, 12: 431-436
- [6] Kim AK, Jensen ME, Dion JE, et al. Unilateral transpedicular percutaneous vertebroplasty: initial experience [J]. *Radiology*, 2002, 222(3): 737-741
- [7] Zhang LG, Gu X, Zhang HL, et al. Unilateral or bilateral percutaneous vertebroplasty for acute osteoporotic vertebral fracture: a prospective study [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2015, 28(2): E85-E88
- [8] 郭振鹏,温国宏,李小琴,等.单、双侧经皮椎体成形术治疗骨质疏松性椎体压缩骨折疗效比较[J]. *中国现代手术学杂志*, 2015, 20(6): 439-442
- [9] Jin YJ, Yoon SH, Park KW, et al. The volumetric analysis of cement in vertebroplasty: relationship with clinical outcome and complications [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(12): E761-E772
- [10] Sun HB, Jing XS, Liu YZ, et al. The optimal volume fraction in percutaneous vertebroplasty evaluated by pain relief, cement dispersion, and cement leakage: A prospective cohort study of 130 patients with painful osteoporotic vertebral compression fracture in the thoracolumbar vertebra [J]. *World Neurosurg*, 2018, 114: e677-e688
- [11] Yang S, Chen C, Wang H, et al. A systematic review of unilateral versus bilateral percutaneous vertebroplasty/percutaneous kyphoplasty for osteoporotic vertebral compression fractures [J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2017, 51(4): 290-297
- [12] 孙育良,熊小明,万 磊,等.单双侧穿刺经皮椎体后凸成形术治疗 Kummell 病的疗效比较[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(9): 1086-1091
- [13] Hu KZ, Chen SC, Xu L. Comparison of percutaneous balloon dilation kyphoplasty and percutaneous vertebroplasty in treatment for thoracolumbar vertebral compression fractures [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1 Suppl): 96-102

[收稿日期] 2018-03-30

(上接第49页)

- [24] Palmieri B, Rottigni V, Iannitti T. Preliminary study of highly cross-linked hyaluronic acid-based combination therapy for management of knee osteoarthritis-related pain [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013, 7: 7-12
- [25] Kim JH, Kang HM, Yu SB, et al. Cytoprotective effect of flavonoid-induced autophagy on bisphosphonate mediated cell death in osteoblast [J]. 2018, 119(7): 5571-5580
- [26] Niebel W, Walkenbach K, Beduneau A, et al. Nanoparticle-based clodronate delivery mitigates murine experimental colitis [J]. *J Control Release*, 2012, 160(3): 659-665
- [27] Li C, Ding XY, Xiang DM, et al. Enhanced M1 and Im-paired M2 macrophage polarization and reduced mitochondrial biogenesis via inhibition of AMP kinase in chronic kidney disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 358-372
- [28] Zhang ZY, Zhang Z, Schluesener HJ. FTY720 attenuates lesional interleukin-17(+) cell accumulation in rat experimental autoimmune neuritis [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2009, 35(5): 487-495
- [29] Yi C, Zhang Z, Wang W, et al. Doxycycline attenuates peripheral inflammation in rat experimental autoimmune neuritis [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(11): 1984-1990

[收稿日期] 2018-10-24