1、 通过对有此需要的患者施用治疗有效量的可诱导氧化氮合成酶抑制剂来调节 IL-Iβ水平的方法。

2、 通过对有此需要的患者施用有效量的可诱导氧化氮合成酶抑制剂来降低滑膜液的数量的方法。

3、 通过施用有效量的可诱导氧化氮合成酶的抑制剂来调节骨关节炎患者软骨退化的数量的方法。

4、 权利要求 3 的方法，其中提到的疾病的严重程度减轻。

5、 权利要求 3 的方法，其中病灶的大小减小了。

6、 权利要求 3 的方法，其中疾病的基质不规则（disorganization）被修饰。

7、 通过对有此需要的患者施用治疗有效量的可诱导的氧化氮合成酶抑制剂来调节骨赘的形成及发展的方法。

8、 通过 对有此需要的患者施用治疗有效量的可诱导的氧化氮合成酶抑制剂来调节软骨病灶的方法。

9、 权利要求 8 的方法，其中所述的病灶在骨突上。

10、 权利要求 8 的方法，其中所述的病灶在高丘上。

11、 通过对有此需要的患者施用有效量的可诱导的氧化氮合成酶抑制剂来治疗骨关节炎的方法。

12、 通过对有此需要的患者施用有效量的可诱导的氧化氮合成酶抑制剂来防止骨关节炎的方法。

13、 通过对有此需要的患者施用有效量的可诱导的氧化氮合成酶抑制剂来调节金属蛋白酶的方法。

14、 通过对有此需要的患者施用有效量的可诱导的氧化氮合成酶抑制剂来治疗急性关节伤害的方法。

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 31/198
A61P 19/02

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99812982.8

[43] 公开日 2003 年 5 月 28 日

[11] 公开号 CN 1420769A

[22] 申请日 1999.9.7 [21] 申请号 99812982.8
[86] 国际申请 PCT/US99/20545 1999.9.7
[87] 国际公布 WO00/13709 英 2000.3.16
[85] 进入国家阶段日期 2001.5.8
[71] 申请人 孟山都公司
地址 美国密苏里州
[72] 发明人 P·T·曼宁 J·-P·佩莱蒂尔
J·M·佩莱蒂尔 J·R·康诺
M·G·库里

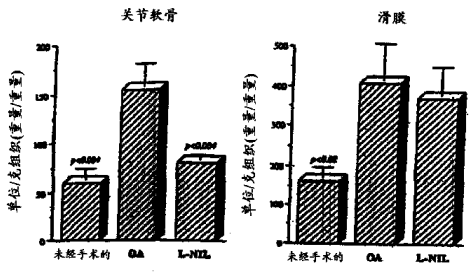
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗 宏 钟守期

权利要求书 1 页 说明书 27 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用可诱导的氧化氮合成酶的抑制剂治疗骨关节炎的方法

[57] 摘要

提供了通过施用治疗有效量的 iNOS 抑制剂来治疗骨关节炎的方法。



ISSN1008-4274

用可诱导的氧化氮合成酶的抑制剂治疗骨关节炎的方法

发明领域

本发明广义地涉及氧化氮合成酶抑制剂并更特别地涉及用氧化氮合成酶抑制剂治疗骨关节炎患者。

发明背景

氧化氮（NO）是一种无机的反应气体分子，在许多生理和病理过程中起重要作用，在这些过程中被细胞合成来介导重要的生物功能。

氧化氮在大脑中作为一种神经递质，在间歇的基质上小量产生来对各种内源性分子信号作出应答。血管内衬的内皮细胞也小量产生氧化氮来放松平滑肌和调节血压。事实上，氧化氮的产生对于循环血液细胞的功能，例如血小板和嗜中性白血球与对于包括血管和其它器官的平滑肌一样起着重要作用。氧化氮也在免疫系统中被合成。内毒素和细胞因子诱导大量的氧化氮的产生来应答感染和炎症刺激，并起作用于两个主体防御过程例如杀死细菌和病毒以及与在许多种疾病中的急性和慢性炎症相关的病理学。

氧化氮是由哺乳动物细胞中至少三种不同的氧化氮合成酶（NOS）异构体通过 L - 精氨酸氧化作用而形成，这三种酶被成两个不同的种类，组成的和诱导的。这三个 NOS 异构酶被区分为:

（i）内皮氧化氮合成酶（eNOS）；（III 型 NOS），是一种组成的 Ca^{++}/钙调素依赖的酶，存在于内皮中释放氧化氮对受体或生理刺激作出应答;

（ii）神经氧化氮合成酶（nNOS）；（I 型 NOS），是一种组成的，Ca^{++}/钙调素依赖的酶，有在于大脑中释放氧化氮对受体或生理刺激作出应答。

（iii）诱导的氧化氮合成酶（iNOS）；（II 型 NOS），是一种 Ca^{++}依赖酶，它是在血管平滑肌，巨噬细胞，内皮细胞，以及许多其它细胞被内毒素和细胞因子激活后被诱导产生的，一旦被表达，这种诱导的 NOS 能长期合成大量的氧化氮（NO）。

由组成酶产生的氧化氮作为下面的几个生理应答的转导机制而

起作用，举例来说，eNOS对于最初被认定为内皮细胞舒血管因子(ERDF)的氧化氮的合成是十分关键的，由 eNOS 所产生的氧化氮能调节动物的血压，人的血流，以及防止白血球粘连。

另一方面，由诱导酶产生的大量的氧化氮是一种细胞毒素作用器分子。已在美国专利号 5629322 上公开，这里引入作为参考，iNOS 已从人肝中被克隆，并已在超过一打的其它细胞和组织包括平滑肌细胞，肾和许多种组织包括肺和结肠中的大量上皮细胞中被鉴别出来。这种酶被脂多糖（LPS）和细胞因子例如干扰素（IFN -γ），白细胞介素 1β（IL - 1β）和肿瘤坏死因子（TNF）所诱导产生。一旦被诱导，iNOS 所产生的氧化氮能持续长时间并且 iNOS 的活性相对地不依赖于细胞内的钙离子浓度。

INOS 参与到那些引起细胞因子诱导的血压过低包括败血病休克，血液渗析和肿瘤患者中的 IL - 2 治疗的情况之中。由氧化氮合成酶的诱导形式所产生的过量的氧化氮也似乎促成细胞因子介导的炎症，细胞毒性和组织损害。因此，抑制氧化氮产量是有利的那些特定情况已被确定.这些情况包括关节炎，肠炎，心血管局部缺血，糖尿病，充血性心脏病，心肌炎，动脉粥样硬化，偏头痛，回流性食管炎，腹泻，过敏性肠综合症，囊性纤维化，肺气肿，气喘，支气管扩张，痛觉过敏（allodynia），大脑局部缺血（即包括点局部缺血，血栓休克也包括球面局部缺血（从属于心脏停滞）），多发性硬化症和其它中枢神经系统疾病，例如帕金森氏病和阿尔茨海默氏病，以及其它由 NO 介导的疾病包括在需要长期的麻醉止痛药的患者中的麻醉剂耐受性，使用苯并二氮杂草患者中的苯并二氮杂卓耐受性，以及其它嗜好行为例如尼古丁和暴食症。

更多的抑制从 L-精氨酸产生 NO 是有利的情况包括与由多种物质诱发的败血性和/或中毒性休克相关的系统性低血压；用细胞因子例如 TNF，IL - 1 和 IL - 2 治疗；在移植治疗中作为维持短期免疫抑制的辅助剂；以及作为化学预防剂。虽然，NOS 抑制剂的潜在应用已参与许多疾病，但应用一个 NOS 抑制剂去防止，处理和治愈许多疾病的有效性和结果从未被确定。举例来说，美国专利号 5，629，322 在卷 15 开始于第 60 行列出了 NOS 抑制剂可能被用于治疗的疾病的大病类型，然而，疾病类型被称为是推测的结果，没有例子或分析。其它

抑制氧化氮产生的化合物的例子可见于美国专利号 5，684，008 和 W093 13055，在这里引入作为参考。

NOS 抑制和特异的选择性的 iNOS 抑制剂在体内对许多疾病的疾病进程的效果和有效性仍未被提出来。因此，在体内在许多实例中对疾病进程应用抑制剂的结果和后果仍是未知的。尽管通过模拟人风湿性关节炎的体内炎症性关节炎得到一些信息说明或者是非选择性的或者在几个实例中是选择性的 NOS 抑制剂减轻疾病的严重性，但是没有利用 NOS 抑制剂去调治关节炎的实验模型的报告。（18，19，21－24）。

因此，有必要去确定 NOS 抑制剂对关节炎进程的影响，并发现 NOS 抑制剂新的应用和治疗关节炎的方法。

发明概述

因此，本发明提供了通过调节以下几方面来治疗关节炎的新方法：（1）滑膜液的数量；（2）IL－1β的水平；（3）骨赘的发展情况；（4）软骨退化的数量；（5）金属蛋白酶的产生；和（6）通过给予有此需要的患者以有效量的 iNOS 抑制剂造成的急性关节损伤。特别是，一种在体内具有治疗有效性的诱导的 NOS 选择性抑制剂，N－亚氨基乙基 －L－赖氨酸（L－NIL）被用来确定其对关节炎病灶进程，关节金属蛋白酶的产生及活性，IL－1β的水平，以及前列腺素 E_2（PGE_2）和对滑膜液中亚硝酸盐/硝酸盐（氧化氮的稳定终产品）的影响。

用 iNOS 选择性抑制剂治疗能减轻病灶的严重性，这证明 iNOS 抑制剂对于减弱疾病进程的有效性。此外，抑制剂 L－NIL 能降低软骨中金属蛋白酶的产量和活性，降解已知在关节炎病灶的病理生理学中起主要作用的酶。这些影响被显示出部分是通过抑制剂对 IL－1β的产量的抑制效果而介导的。

除此之外，iNOS 抑制剂减弱了在炎症位点伴随着氧化氮产量的上升而引起的 PGE_2 产量的增加。氧化氮和 PGE_2 的促炎作用都被选择性的 iNOS 抑制剂所抑制。体内对选择性 iNOS 抑制剂治疗的结果为滑膜液中氧化氮和 PGE_2 水平显著下降，iNOS 和负责产生 PGE_2 的环氧合酶（COX－2）的表达降低。

本发明是第一个提供了直接的证据来说明在体内 iNOS 选择性抑

制剂对关节炎组织中氧化氮产量的抑制作用伴随着滑膜液白细胞介素 1（IL - 1β）和软骨金属蛋白酶的原位合成的减少，以及同样的 iNOS，过氧化亚硝酸盐和 COX - 2 在 OA 组织中水平的降低。这进一步说明了 iNOS 抑制剂对实验性骨关节炎中可见的结构和生化变化的防护效果的作用机制。

OA 病灶(lesion)在软骨中的发展是在疾病发展期间合成代谢和分解代谢过程不平衡的结果。（1）由诱导形式的氧化氮合成酶所产生的过量的氧化氮导致细胞因子介导的炎症，细胞毒性和组织损害。本发明显示这种疾病中软骨细胞新陈代谢的变化至少部分地是由于促炎细胞因子例如白细胞介素 -1β（IL - 1β）的合成增多所致。软骨细胞这种功能上的变化破坏了软骨基质的稳态。（2）。

促炎细胞因子促进了软骨基质的降解。（2，3）。通过诱导蛋白水解酶的合成，细胞因子干扰生长因子例如胰岛素生长因子 -1（IGF -1）结合蛋白质的作用。（4）。而且，炎症细胞因子也减少了聚集蛋白聚糖的合成，而它是负责维持特异的软骨功能性质的主要基质大分子。（5，6）。氧化氮（NO）产量的上升是导致 IL - 1β减少聚集蛋白聚糖合成的主要因素之一。（5 - 7）。

在促炎细胞因子的刺激下软骨细胞产生了大量的氧化氮。（7 - 13）与正常软骨相比较，骨关节炎的软骨自发产生氧化氮。（12 - 14），已发现在关节炎患者的滑膜液和血清中有高水平的氧化氮稳定终产物的存在。（15）相似地，从 OA 患者的滑膜组织中也检测到了诱导型 NO 合成酶的信使 RNA 和蛋白质，这种酶负责产生细胞毒水平的 NO（14 - 16）。

直至本发明之前，氧化氮仅仅被认为有助于关节炎病灶的发展。（17 - 19）。这种假说是建立在体外数据显示氧化氮增强金属白酶（MMP）的活性和抑制蛋白多糖的合成的基础之上。更多地，还假设氧化氮减少了软骨细胞中 IL - 1 受体撷抗剂的合成，该过程可能负责增强 IL - 1 对这些细胞的影响。（13）。

在本发明的实践中，18 只狗被用来检验 NOS 抑制剂在体内对骨关节炎的效果。OA 狗模型是通过刺伤来切断（12）只狗的右膝关节的前端十字交叉韧带而产生的。狗被分成三组。组 1 包括 5 只狗（n = 5），它们未做手术，不作治疗，认为是正常的。组 II 包括 6 只狗（6），

它们有关节炎（OA 狗），不作治疗。组 III 包括 6 只 OA 狗（6），它们在外科手术后立即开始接受 10 个星期(10)的一天 2 次口服 L－NIL（1omg /kg）。

与未经治疗的狗相对比，用 L- NIL 治疗的狗的膝盖显示出了骨赘形成的减少（58% VS 92%），同样地也减少了它们的大小（1.92±0.58mm VS 5.08±0.66mm）。肉眼可见地，L－NIL 降低了软骨病灶在骨突和高丘（plateaus）的大小，与未治疗的狗相比较大约降低了百分之五十（50%）。在组织学的水平，对照于未治疗的狗用 L－NIL 治疗的狗其骨突的软骨病灶的严重程度和滑膜炎症的严重程度都统计学地下降。用 L－NIL 也能显著降低软骨中一般的金属蛋白酶和溶基质素的活性，以及滑膜液中 IL－1β，PGE_2 和亚硝酸盐/硝酸盐的水平。

本发明的目标是通过对有此需要的患者施用治疗有效的数量的 iNOS 抑制剂来提供治疗骨关节炎的新方法。

本发明的许多其它目标和目的可从下面对发明的描述中清楚了解。

虽然说明书，包括了特别地指出并具体地对构成本发明的主体的标的提出了权利要求，但是下面对优选实施方案的详述被认为能使本发明更好地被理解。

发明详述

INOS 选择性抑制剂首次被显示出在体内能减小骨关节炎病灶的进程。用选择性 iNOS 抑制剂在体内治疗也降低了促炎中介子，IL－1β 和 PGE_2 以及滑膜液中亚硝酸盐/硝酸盐的水平，而且显示出它能显著降低软骨中金属蛋白酶的活性和表达以及减小关节渗出液的体积。它也能导致软骨中 iNOS，过氧化亚硝酸盐和 COX － 2 表达量的下降。

在早期模型中，骨赘的形成被显示出是骨关节炎的一个占优势的结构变化，特别是在股骨的骨突上。（25 － 28）。骨赘的形成和生长被假设与发炎的滑膜，机械因子，各种生长因子和细胞因子相关（33，34）。

本发明指出在体内用选择性 iNOS 抑制剂进行治疗可减少骨赘的生长，也降低 IL － 1β的产量，尽管在以前的狗模型中，关节内注射 IL －1 受体拮抗剂显示出能降低骨赘的形成，说明 IL － 1β 在骨赘的

发生中的作用，但 iNOS 抑制剂对骨赘形成的影响仍是未知的。（33）

用于检测本发明的方法的狗 OA 模型以前被用来检测抗关节炎药物在体内的效果。（25 - 28）。这个模型由于展示了软骨病灶的发展过程而与人 OA 相似。（32）。在检测本发明的方法的过程中，未治疗的 OA 狗在外科手述 10 周后其骨突和高丘的软骨病灶在大小和等级上都很明显，这与本模型的预期和我们以前的报告相符。（25 - 28）。采用选择性 iNOS 抑制剂治疗能显著减小软骨病灶的大小达 50% 多。L - NIL 也影响病灶等级，更特异地在骨突上，这也能通过病灶组织学上的严重程度的极大减轻而反映出来。选择性 iNOS 抑制剂的防护效果首要表现在减轻了结构改变（糜烂深度）的严重程度，这通过番红 - O 染色带的丧失而指示出来。

我们的发现证明选择性 iNOS 抑制剂介导了软骨基质瓦解的减少。这可能归功于 iNOS 抑制剂的直接作用，通过滑膜液中亚硝酸盐/硝酸盐水平的减少而被反映出来，但也可能从属于对蛋白水解酶活性的抑制作用，近来的报告认为 NO 可刺激在体内 MMP 在软骨细胞中的合成和/或活性。（8，20）我们的发现提供证据说明在体内软骨 MMP 活性能通过抑制 iNOS 的活性而降低，而且软骨中 MMP 活性的降低与软骨细胞表达和合成这些酶的下降相关。因此，选择性 iNOS 抑制剂对 NO 产量的抑制作用通过减少软骨中 MMP 合成和活性水平来维持软骨中蛋白多糖的浓度。相似地，结构变化严重程度的降低同时带有胶原酶活性的抑制解释了选择性 iNOS 抑制剂是如何为构成软骨结构的胶原网络提供防护的。iNOS 抑制剂其它可能的机制可能最终结果是降低软骨的破坏，其中包括软骨细胞凋亡细胞死亡的减少和有毒的高反应活性氧化剂，过氧化亚硝酸盐形成的减少。

相对比于未治疗的 OA 狗的滑膜，用 L - NIL 治疗的 OA 狗滑膜炎症程度的减轻与其滑膜、滑膜液中 IL - 1β水平的下降相关。由 L - NIL 介导的 IL - 1β合成的降低既可通过直接机制也可通过间接机制发生。毫无疑问，IL - 1β的减少至少部分有助于在体内选择性抑制剂减少 MMP 合成的机制。

在被治疗的狗中，无论从宏观还是微观上滑膜炎症的较低水平都是引人注意的，并被主要观察到绒毛增生和组织中浸润液单核细胞数目十分有意义地减少，这一发现解释了用选择性抑制剂的治疗是如何

减少了滑膜液渗出的数量。

相似的NOS抑制剂抗炎效果以前在叉藻聚糖刺激的气囊和大鼠爪炎症模型中报告过。以前的L－NIL的口服应用发挥其它抗炎效果例如减少亚硝酸盐/硝酸盐的积累，减轻发炎的爪子和囊液中细胞的渗出。相对照，在体内用选择抑制剂对OA狗的治疗降低了PGE_2的水平或PG异构酶的活性及其表达。（37，38）

实验组

十七只成年杂交狗（2－3年），每只20到25kg重，被用于研究。通过刺伤手术切断右膝的ACL，如同以前描述过的一样实施在12只狗身上。（25－28）。手术之前，动物用戊巴比妥钠（25mg/kg）静脉注射麻醉并被孵育着。手术之后，狗被放入动物养护设备饲养一个星期，然后送到一个养马场上，那里它们可以大范围自由活动。

狗相应地分成三个治疗组：组I（n＝5）由未做手术的狗组成，不接受任何治疗（正常），组II（n＝6）是不接受治疗的OA狗，组III（n＝6）是用一天两次10mg/kg L－NIL治疗的OA狗。

药物施用和循环系统中药物的水平

L－NIL一天两次在8和16小时施用于狗身上，用量为10mg/kg。药物被以液体溶液形式口服给予。药物治疗在手术后立即开始，持续10周，然后动物被处死。血清中L－NIL的浓度在治疗中期和经过10周治疗研究结束时进行测量，而L－NIL在滑膜液中的浓度仅在研究结束时测量。L－NIL的测量采用从化合物中起源的离子片段（M/Z84）的多选择性探测方式的电子喷射MS/MS（Sciex API III）.

肉眼可见的病灶的等级。

狗的右膝关节在狗被处死后立即置于冰上被解剖，并抽出滑膜液，测量其体积。如以前描述的，每一个膝盖都被检查其总体形态学的变化，包括骨赘形成和软骨病灶的存在。检查由两名独立的不知情的观察者进行。骨赘形成的程度通过测量每一个股骨骨突上的肉距的最大宽度（mm）而划分等级。股骨骨突内侧和外侧软骨的变化和胫骨高丘在解剖微镜下单独划分等级。（Stereo zoom, Bausch Lomb, Roche ster, NY）。

糜烂的程度划分为如下4个等级：0=表面看上去正常，1=微小的原纤维形成或表面轻微的浅黄色变色；2=糜烂延伸入表面或中层，3=

糜烂达深层，4=糜烂延伸到软骨下的骨头上。关节表面变化的表面积以 mm^2 进行测量和表述。

组织学上的等级

组织学的评定是通过对从描述过的股骨骨突和胫骨高丘的病灶处得到的软骨进行矢形切片而进行的（25 - 28）。标本被解剖，在10%福尔马林缓冲液中固定，并包埋入石蜡中以便进行组织学评定。连续切片（5um）用番红 - O 染色。OA 病灶的严重程度采用 Mankin 等人的组织学/组织化学的评分由两个独立的观察者进行等级划分，评分从 0 到 14。（29）这个对 OA 病灶严重程度的评分评定是建立在如下基础之上的，番红 - O 染色带丧失（评分 0 - 4），细胞内变化（评分 0 - 3），通过血管潮标点的发病（评分 0 - 1）和结构变化（评分 0 - 6）。在这最后的评分上，0 显示正常的软骨结构而 6 代表软骨糜烂已深入软骨下面的骨头。这个评分系统是建立在每个软骨切片最严重的组织学变化的基础上。

内侧和补侧膝盖板的滑膜的代表标本也从其下组织中解剖。标本以 10%福尔马林固定，包埋入石蜡中，切片（5um）并用苏本精--伊红染色。每块板的两个滑膜被检查，保留每块板的最高评分。计算平均值并作为整个膝盖的值。通过两个独立的观察者对滑膜炎的严重程度进行 0 - 10（14）评分的等级划分，划分时加上 3 个组织学标准的记录：滑膜内衬细胞增生（评分 0 - 2），绒毛增生（评分 0 - 3）单核和多形核细胞的细胞侵入程度（评分 0 - 5）。

金属蛋白酶（MMP）活性测定

在宏观的检测进行以及切片被制备以进行组织学评定之后，股骨骨突，胫骨高丘和滑膜处保存下的软骨被仔细解剖：

MMP 的提取如（28）描述过的那样实施。主要地，组织切成薄片并在提取液中搅匀（50MM Tris HCl,10mM $CaCl_2$，2M 盐酸胍，0.05% Brij -35，PH7.5）。混合物在 4°C 搅拌过夜，然后离心（18000g，30 分钟，4°C）。上清液采用一个 12000Da 截止的 Sepctrapor4 透析管对测定缓冲液（50mm Tris HCl,10mM $CaCl_2$，0.05% Brij -35，PH7.5）进行深度（entensively）透析（4°C，48 小时）（Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA）.

组织提取物中胶原酶的活性采用从鼠尾腱中被 $I^{14}C$ - 乙酰酐乙酰

化的不含端肽 I 型胶原测定。一百微升 $I^{14}C$-胶原悬液（12,000 DPM）在以下条件中孵育：（1）在 1mM 氨基苯基汞酸（APMA）存在的情况下，加入 100uL 组织提取物的整份，和（2）包含 1mM APMA 和 25mM 乙二胺四乙酸（EDTA）的 100uL 组织提取物的整份，作为空白。每种液在 30°C 下孵育 48 小时，之后在 4°C 下以 12000g 离心 15 分钟。上清液中放射性活性采用β闪烁仪（Beta Rack, Model1218; LKB, Stockholm, Sweden）测定。全酶活性以每克组织湿重（w.w）中活力单位数表示，一个活力单位相当于在 30°C 每小时能水解 1ug 底物的酶。超过 90%的胶原酶活性被 EDTA 抑制。

软骨提取的 MMP 总活性通过 Chavira 等人（31）的方法采用偶氮胶（azocoll）作为底物进行测定。100μl 偶氮胶上清液采用与胶原酶测定相似的方法进行孵育，但以 1mM 1,10-二氮杂菲作为空白，孵育后（37°C, 48 小时）溶液被离心（12000g, 15 分钟 4°C）。上清液的光密度用分光光度计分析，一般 MMP 活性以每克组织 W.W. 的活力单位数表示，一个活力单位相当于在 37°C 每小时水解 1ug 底物的酶。偶氮胶在提取物中的水解活性超过 90%被 1, 10 - 二氮杂菲抑制。

酶免测定

滑膜液中 ZL - 1β的水平采用特殊的固相双抗 ELISA 测定。PGE_2 通过酶免检测。IL - 1β检测试剂盒来自 Bio Surce International（Camarillo, CA），PGE_2 检测试剂盒来自 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI). 测定的灵敏性 IL - 1B 可达 0.3pa/ml，PGE_2 可达 29pg/mL。根据生产者的说明，测定要重复进行。反应在微 - ELISA Vmax 测光表（Molecular Devices Corp. Melno Park, CA USA）上进行测定。他他在关节滑膜液的表达总量为 pg 或 ng。

氧化氮测定

滑膜液中亚硝酸盐和硝酸盐采用（21）描述的荧光分析测定。主要地，是将滑膜液通过一个 10000Da 截断值的 UI trafree 微离心过滤装置（Millip ore, Bedford, MA）14000rpm 离心 15 分钟进行过滤。为了将硝酸盐转变成亚硝酸盐，5-10uL 过滤的滑膜液被加入 20mMTris, PH7.6 包含 40uM NADPH 和 14mM 硝酸盐还原酶，终体积 100uL，20°C 孵育 5 分钟后，通过加入 10mM 0.62M HCL 溶解的 0.05mg/ml 2,3 一二氨基萘来起始荧光反应。20°C10 分钟后，用 10uL

1.4N NaOH 中止反应。荧光在波长 365/450nm（电子激发/电磁发射）下采用荧光扳计数器（IDEXX Laboratories, Westbrook, ME）进行测定。亚硝酸盐在关节滑膜液中的表达总量以 nmol 表示。

免疫组化研究

从骨突和高丘得到的软骨标本与滑膜一样进行以前描述过的免疫组化分折.主要是把标本在 4%的多聚甲醛中固定 24 小时,然后包埋入石蜡中。石蜡包埋标本的切片（7uM）被置于 Superfrost Plus 载玻片上（Fisher Scientific ,Nippon, Ontario Canada）,在甲苯中脱蜡，在各级乙醇中洗脱，和用软骨素酶 ABC （0.25 Units/mL）在磷酸盐缓冲液（PBS, Sigma Aldrich Canada Ltd., Oakville , Ontario, Canada）中 37°C 前孵育 60 分钟。随后，标品在 PBS 中清洗，然后再在 0.3%过氧化氢/甲醛中外理 30 分钟，载玻片进一步用 2%正常血清（Dimension Laborat ories, Miss issauga , Ontario, Canada）孵育 20 分钟，吸干然后覆盖上:抗 iNOS 兔多抗（IgG）(100ug/ml, 稀释 1/100, Banta Gruz BiotechnologyInc, Santa Cruz, CA, USA)室温在湿室中放 2 小时; ii）抗硝基酪氨酸兔多抗（IgG）（稀释 1/100, Dr. P. Manning, Searle /Monsanto R & D, St. Louis, Mo, USA）室温 1 小时; iii）抗 rhIL－1β小鼠单抗（IgG）(1mg /mL, 稀释 1/25,Bio Source International, Montreal, Quebec, Canada); iv)抗 rh 溶基质素-1 兔多抗（IgG）(MMP－3, 500ug/mL, 稀释 1/1000, Oncogene Science, Cambridge, MA, SA); V)抗 rh 胶原酶鼠单抗（MMP － 1; 100ug/ml, 稀释 11500, Oncogene Science,Cambridge,MA,USA）; v)抗 rh 胶原酶鼠单抗(MMP-1;100ug/mL,稀释 1/500, Oncogene Science);或 vi）抗 rhCOX － 2 兔多抗(IgG)(稀释 1/500,Oxford Biomedical Research Inc, Oxford, MI, USA)。除了抗 MMP － 3 的抗体在 4°C 孵育 18 小时这外，所有抗体在室温孵育 1 小时。

每块载玻片在（PH7.4）PBS 中洗三次用抗生物素蛋白一生物素复合体方法（Vectastain ABC kit, Dimension Laboratories）进行染色。这种方法必需在生物素结合的二抗存在下在室温孵育 30 分钟，随后加入抗生物素蛋白--生物素--过氧化物酶复合体孵育 45 分钟，所有的孵育在湿室中进行，并用含过氧化氢的 3，3，-二氨基联苯胺

（Dimension Laboratories）进行显色。

为了确定染色的特异性，对于同样的实验方案加入三个对照程序：（1）采用带有 10 至 20 倍克分子过量的重组或纯化抗原；（2）去除原始抗体；（3）用自体前免疫血清替代原始抗体。在这个研究中纯化的抗原是 rhIL－1β（Genezyme, Cam bridge, MA, USA），rh MMP－1, rhMMP－3, rhiNos 和 rhCOX－2（Monsanto/ Searle, St Louis, MO, USA）和硝基酪氨酸（Bigma－Aldrich St. Louis, MO, USA）。

从软骨的每个断面制取几张切片，每个标本的 3 张载玻片进行免疫组化分析。每个切片放在光学显微镜下检查（Leitz Orthoplan; Wile Leitz, Ville St－Laurent, Qmbec, Canda），并用 Kodak Edtachrorr 64 ASA 胶卷（Rochester, NY, USA）

进行拍照

形态度量分析

软骨

从所有内侧和外侧的股骨骨突和胫骨高丘得到的软骨样品得到的软骨标本被进行分析。从每个软骨标本中取三个载玻片进行免疫组化研究。对不同抗原在软骨和滑膜液中的定量采用我们以前公开的方法 并略微加以修饰，蛋白质合成水平通过确定在不同层软骨中染色阳性软骨细胞的数目来估计出来。每个软骨切片被分成六个显微镜视野（X40; Leitz Diaplan），三个视野在下列两个区域的每一个中：表面和上中层，下中层和深层.外层包括以形成盘状细胞为特征随着优势纤维定向的边线模式而立即被表面特异化的软骨细胞，以及上层中 50%以圆形或球形细胞为特征的过渡区。深层包括下层过渡区的 50%和定位于柱中的那些细胞。对于每一个关节标本，一定要先确保对整个关节表面的评估能被探查，并作为宏观度量分析有效性的标志。

软骨细胞的总数和对特异抗原染色阳性的软骨细胞总数被用来估算软骨的总厚度。最后的结果以抗原染色阳性的软骨细胞百分数来表示（细胞计数），最大计数可达 100%。每张载玻片进行双育评估，结果计数差异小于 5%。从内侧侧生骨突和胫骨高丘取得的数据被认为独立于统计学分析目的之外。

滑膜

为了进行滑膜分析，对每个切片采用我们以前公布的方法以确定不同标本的细胞计数。每个标本分成10个不同的面积，5个显微镜视野（X40）在滑膜内衬细胞水平，5个在滑膜内衬下面积中。对特异抗原染色阳性细胞的百分率用上面软骨中描述过的方法对每个视野进行估算。阳性染色细胞百分率通过对滑膜每个面积中的所有5个视野的平均值而获得。（滑膜基线细胞和单核浸润液细胞）。每张载玻片由两个独观察者不知情地进行评估，结果两个记数间的差异小于5%。滑膜内衬细胞和单核细胞浸润液的细胞计数分别进行，每个面积的最大值可达100%。

统计学分析

平均值和平均值的标准误差被计算出来。统计学的分析采用Mann－Whitney U－test进行。P值小于0.05被认为是有意义的。

结果

循环系统中药物水平

测定了治疗中期血清中和10星期治疗的后血清中和滑膜液中L－NIL的浓度。加药2小时后开始取样。在治疗中期和治疗结束时L－NIL的平均浓度±SEM分别是201±33和119±24uM。治疗结束时滑膜液中L－NIL的浓度为96±18uM，证明了化合物到达关节。

宏观发现

骨赘：在OA狗中，92%股骨中存在骨赘。它们的平均±SEM宽度是5.08±0.66。在用L－NIL治疗的狗中，仅有58%的骨突中存在骨赘，而且它们的大小与未治疗的OA狗相比也较小（1.92±0.58mm，$P<0.002$）。未手术（正常）的狗的骨突呈正常表现而且看不见骨赘。

软骨：正常狗的骨突和高丘软骨在外观上肉眼可见地是正常的。在未治疗的OA狗中，中度等级和大小的软骨病灶在骨突和高丘中均存中，高丘上的病灶略微更严重一些。用L-NIL治疗的狗骨突上病灶的严重程度显著减轻，大约在大小上降低50%，等级降低20%。

滑膜：正常狗的滑膜带有白色光彩在外观上是透明的，OA狗的滑膜肥大并出现浅黄色褪色而且含有大量血管。用L-NIL治疗的OA狗中，滑膜比较小并含有较少血管而且与未治疗OA狗相比褪色程度较轻。

微观发现

软骨：未手术狗的软骨具有正常的组织学外观，有几只例外的狗出现

或者是表层番红 - O 染色带极少的缺失或者是软骨表面极小的不规则。未治疗的 OA 狗的标本出现形态学变化包括软骨原纤维形成和分裂，超细胞化并形成克隆，以及番红 -O 染色带缺失。骨突上病灶的组织学计数与高丘上的相似。在 L - NIL 治疗的 OA 狗中，骨突上的病灶与未治疗的 OA 狗相比较严重程度有意义地减小（P<0.05）这种区别很大程度归功于结构变化严重程度和番红-O 染色带缺失的下降。根据宏观观察，未发现在高丘上的组织学病灶的严重程度在两组 OA 狗中（未治疗的和 L- NIL 治疗的）有区别。

滑膜：未做手术狗的滑膜组织学指标在正常范围之内，有几个例外的标本有极小的和点绒毛增生（证数=0.50±0.34）。未治疗 OA 狗的滑膜很厚，有大量绒毛，并显示出滑膜内衬细胞增生以及单核细胞适度浸润液。用 L - NIL 治疗的 OA 狗的滑膜炎症比未治疗的 OA 狗的炎症要轻。（计数=2.25±0.18vs 4.42±0.47; P<0.004）。用 L - NIL 治疗而导致炎症的降低是绒毛增生和单核细胞浸润液的强度降低的结果。

金属蛋白酶活性

一般 MMP 活性：在未治疗 OA 狗中一般 MMP 平均活性在软骨和滑膜中比正常狗要明显升高（分别地，P<0.004 和 P<0.02）。在 L-NIL 治疗的 OA 狗中，软骨和滑膜中的酶活性均降低而且软骨中的达到统计学差异（P<0.004）。

胶原酶：在 OA 狗中胶原酶的平均活性在软骨和滑膜中比正常狗明显升高（P<0.002）。通过用 L-NIL 治疗，两种酶活性均降低，并再次仅在软骨中达到统计学差异（P<0.004）。

IL-1B，亚硝酸盐/硝酸盐和 PGE_2 在滑膜液中的值

滑膜液的体积从正常狗关节中的 0.3±0.04mL 上升到未治疗的 OA 狗中的 6.8±1.0mL。用 L-NIL 治疗可减小体积 68%至 2.4±0.8mL(P<0.009)。正常狗滑膜液中 IL-1β的总量非常低（0.1pg）。在未治疗 OA 狗中发现 IL-1β水平明显升高（32.9±15.3pg,P<0.001）。用 L-NIL 治疗的 OA 狗中 IL-1β水平明显降低接近于正常数量（0.5±0.2pg），与未治疗狗相比，P 值<0.004。与正常的相比（6.5±0.8nmol），未治疗的 OA 狗滑膜液中亚硝酸盐/硝酸盐的量显著上升（96.4±17.9nmol,P<0.001）。L-NIL 治疗的 OA 狗

滑膜液中亚硝酸盐/硝酸盐的浓度比未治疗 OA 狗下降 53%（48.6±12.9nmol,P<0.04）。而且，滑膜液中 PGE_2 的总量也从未治疗 OA 狗中的 9.4±5.4ng 下降至 L-NIL 治疗的 OA 狗中的 0.8±0.3ng（P<0.009）。由于样本的局限，PGE_2 在正常狗中的量未测定。

滑膜

（a）IL-1β

在未做手术狗中，IL-1β仅在滑膜内衬的很少几个细胞中观察到。在未治疗 OA 狗中，在所有标本中滑膜内衬细胞和单核细胞浸润液中均发现 IL-1β染色带。OA 狗滑膜标本中细胞记数明显高于未做手术的狗，无论是单核细胞浸润液还是滑膜内衬细胞。

在 L-NIL 治疗的狗中，虽然 ZL-Iβ在所有标本中均表达，无论是滑膜内衬细胞（P<0.008）还是单核细胞浸润液（P<0.008）其细胞记数均明显低于未治疗的 OA 狗。对照采用吸收的免疫血清仅显示背景染色。

（B）iNOS 和 3-硝基酪氨酸

除了偶然的某个滑膜内衬细胞之外，未做手术狗的滑膜未出现特异染色。在未治疗的狗 OA 滑膜中，可观察到很小的百分率的内衬和单核浸润液细胞出现 iNOS 和 3-硝基酪氨酸强烈染色带。内衬和单核细胞的细胞计数与未做手本的狗相比明显较高。在 L-NIL 治疗的狗中，除了单核细胞中对 iNOS 的细胞计数之外，内衬及单核细胞中细胞计数均明显降低。对照采用吸收的免疫血清仅显示背景染色。

（C）COX-2

在未手术的狗中，COX-2 染色带仅在滑膜内衬的几个细胞中发现。在未治疗的狗中，无论在滑膜内衬还是在单核细胞浸润液中均有大量细胞出现 COX-2 染色阳性。用 L-NIL 治疗的关节炎狗无论在内衬还是在单核细胞浸润液中对 COX-2 染色阳性的细胞数均显著降低。

软骨

（a）金属蛋白酶

未手术的狗软骨中骨突和高丘的表层及深层仅有几个细胞出现对胶原酶 -1 染色阳性。手术后未治疗狗的 OA 软骨中细胞计数则极大升高，更多阳性细胞在表层中。相反，用 L-NIL 治疗的做过手术的狗无论在骨突还是高丘胶原酶-1 细胞计数均显著降低。

对溶基质素-1（General MMP）的结果与以上对胶原酶-1的结果相似，在手术后未治疗狗的OA软骨中细胞计数明显上升，并且相似的变化在骨突和高丘中均发现。用L-HIL治疗无论在骨突还是高丘中溶基质素-1的细胞计数均明显减少。

（b）iNOS和3-硝基酪氨酸

未做手术狗的骨突和高丘中仅有少数软骨中的细胞标本显示出对iNOS特异染色。这些细胞在表层和深层中均有。无论是在骨突还是在高丘中的OA软骨均有表达iNOS的软骨细胞数极大的明显的提高，明显高于从未做手术狗中得到的标本。细胞计数在表层和深层中是相似的。用L-NIL治疗的做过手术的狗的骨突和高丘中iNOS细胞计数非常明显地降低。

3-硝基酪氨酸染色模式与iNOS差不多类似。未手术狗骨突和高丘的软骨中所有的层中仅有几个细胞染色阳性。而OA软骨中细胞计数则明显上升。阳性细胞数在表层和深层均匀分布。用L-NIL治疗的狗软骨标本与未治疗狗相比，无论骨突还是高丘均显示明显降低的细胞计数。

（C）COX-2

OA软骨中COX-2水平极大升高，其中对这种酶染色阳性的软骨细胞数比正常软骨高5至8倍。用L-NIL治疗的OA狗在骨突和高丘上细胞计数非常明显下降。

表1.IL－1B在狗滑膜组织中的表达

组	滑膜内衬 (细胞计数) (p)⊗	单核细胞 (细胞计数) (p)
未做手术的* (n = 5)	5.20 ± 0.65 (p < 0.008)	0.21 ± 0.23 (p < 0.008)
OA§ (n = 5)	58.71 ± 3.20	46.36 ± 4.76
L-NIL@ (n = 5)	33.32 ± 2.52 (p < 0.008)	18.51 ± 2.84 (p < 0.008)

值为平均值± SE

* 处死的动物既未做手术也未治疗。

§ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查。

@ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查；
L－NIL在手术后立即开始口服给药（10mg/kg/pd/po）12周。

⊗ 统计学分析通过Mann-Whitney U-test进行；P值与OA组相比较。

表II. iNOS和3－硝基酪氨酸在狗滑膜组织中的表达

组	iNOS		3-硝基酪氨酸	
	滑膜内衬（细胞计数）®	单核细胞（细胞计数）	滑膜内衬（细胞计数）®	单核细胞（细胞计数）
未做手术的* (n = 5)	0.002 ± 0.002 (p < 0.008)	0.002 ± 0.002 (p < 0.06)	1.36 ± 0.2 (p < 0.008)	0.002 ± 0.002 (p < 0.008)
OA§ (n = 5)	8.34 ± 0.96	5.26 ± 2.07	14.84 ± 3.57	8.87 ± 1.86
L-NIL@ (n = 5)	1.09 ± 0.39 (p < 0.008)	2.46 ± 2.15 NS	2.05 ± 0.3 (p < 0.008)	2.36 ± 0.84 (p < 0.02)

值为平均值± SE

* 处死的动物既未做手术也未治疗。

§ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查。

@ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查；
L－NIL在手术后立即开始口服给药（10mg/kg/pd/po）12周。

® 统计学分析通过Mann-Whitney U-test进行；P值与OA组相比较。

表III. 股骨骨突和胫骨高丘的宏观等级

组	动物数量	股骨骨突		胫骨高丘	
		大小 (mm^2)	等级 (0-4 scale)	大小 (mm^2)	等级 (0-4 scale)
未做手术的*	5	0	0	0	0
OA†	6	15.33 ± 3.52	1.42 ± 0.19	17.02 ± 3.49	1.42 ± 0.29
L-NIL§	6	7.33 ± 2.32	1.08 ± 0.26	9.75 ± 2.45	1.33 ± 0.26

值为平均值± SEM

* 处死的动物既未做手术也未治疗。

† 手术后10周动物被处死并进行组织检查。

§ 手术后10周动物被处死并进行组织检查。L-NIL在手术后开始口服给药（10mg/kg一天两次）10周。

表IV 胶原酶（MMP－1）和溶基质素（MMP－3）在狗软骨中的表达

组	胶原酶 (MMP-1) 股骨骨突 (细胞计数)®	胶原酶 (MMP-1) 胫骨高丘 (细胞计数)	溶基质素-1 (MMP-3) 股骨骨突 (细胞计数)®	溶基质素-1 (MMP-3) 胫骨高丘 (细胞计数)
未做手术的* (n = 5)	4.12 ± 0.42 (p < 0.0001)	5.43 ± 0.71 (p < 0.0001)	4.62 ± 0.61 (p < 0.0001)	5.98 ± 0.52 (p < 0.0001)
OA§ (n = 5)	30.28 ± 3.94	36.25 ± 3.58	43.48 ± 1.98	44.94 ± 2.17
L-NIL@ (n = 5)	10.02 ± 2.26 (p < 0.0002)	18.25 ± 1.97 (p < 0.0003)	34.45 ± 2.14 (p < 0.005)	33.21 ± 1.90 (p < 0.0001)

值为平均值± SEM

* 处死的动物既未做手术也未治疗。

§ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查。

@ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查;

® L－NIL在手术后立即开始口服给药（10mg/kg/qd/po）12周。

统计学分析通过Mann-Whitney U-test进行; P值与OA组相比较。

表V. 可诱导的氧化氮合成酶(iNOS)和3-硝基酪氨酸在狗软骨中的表达

组	可诱导的氧化氮合成酶(iNOS)		硝基酪氨酸	
	股骨骨突(细胞计数)®	胫骨高丘(细胞计数)	股骨骨突(细胞计数)®	胫骨高丘(细胞计数
未做手术的* (n = 5)	5.49 ± 0.30 (p < 0.0001)	6.98 ± 0.42 (p < 0.0001)	5.36 ± 0.49 (p < 0.0001)	6.27 ± 0.36 (p < 0.0001)
OA§ (n = 5)	47.11 ± 1.98	45.82 ± 2.13	36.68 ± 2.75	45.50 ± 2.35
L-NIL@ (n = 5)	26.46 ± 2.04 (p < 0.0001)	35.82 ± 1.97 (p < 0.001)	21.81 ± 2.14 (p < 0.0004)	27.30 ± 1.88 (p < 0.0001)

值为平均值± SEM

* 处死的动物既未做手术也未治疗。

§ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查。

@ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查·

L－NIL在手术后立即开始口服给药（10mg/kg/qd/po）12周。

® 统计学分析通过Mann-Whitney U-test进行；P值与OA组相比较。

表VI. COX-2在狗软骨中的表达

组	股骨骨突 (阳性细胞的%) (p)®	胫骨高丘 (阳性细胞的%) (p)
未做手术的 * (n = 5)	5.02 ± 0.36 (p < 0.0001)	7.64 ± 0.52 (p < 0.0001)
OA§ (n = 5)	40.99 ± 3.26	39.74 ± 2.70
L-NIL@ (n = 5)	18.20 ± 2.29 (p < 0.0001)	27.68 ± 2.12 (p < 0.001)

值为平均值± SEM

* 处死的动物既未做手术也未治疗。

§ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查。

@ 手术过的动物在手术后12周被处死并进行组织检查;
L－NIL在手术后立即开始口服给药（10mg/ kg/qd/po）12周。

® 统计学分析通过Mann-Whitney U-test进行; P值与OA组相比较。

以下所列出的参考文献，专利和申请在这里被加入本申请之内。

1. Pelletier, J. P., J. Martel-Pelletier, and D. S. Howell. 1997. 骨关节炎的发病机理（Etiopathogenesis of osteoarthritis.）In Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheurnatology. W. J. Koopman, editor. Williams & Wilkins, Baltimore. 1969-1984.

2. Pelletier, J. P., J. A. DiBattista, P. J. Roughley, R. McCcllum, and J. Martel-Pelletier. 1993. 软骨退化中的细胞因子和炎症 (Cytokines and inflammation in cartilage degradation.) In Osteoarthritis, Edition of Rheumatic Disease Clinics of North America. R. W. Moskowits, editor. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 545-568.

3. Dean, D. D. 1991. 骨关节炎中蛋白酶介导的软骨退化。(Proteinase-mediated cartilage degradtion in osteoarthritis) (Review) Semin. Arthrimitis Rheum. 20:2-11

4. Dore, S., J. P. Pelletier, J. A. DiBattista, G. Tardif, P. Brio eau, and J. Martel-Peletier. 1994. 人骨关节炎软骨细胞中胰岛素样生长因子结合位点增多，但并不对它的刺激产生应答 (Human osteoarthritic chondrocytes possess an increeased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation)。

5. Hickery, M. S., R. M. J. Palmer, I. G. Charles, S. Moncadil, and M. T. Bayliss. 1994. 氧化氮对 Il-1 和 TNF2 诱导人关节软骨中蛋白聚糖合成的抑制所起的作用 (The role of nitric oxide in IL-1 and TNFa-induced inhibition of proteoglycan synthesis in human articular cartilage.) Trans Orthop Res Soc 19:77. (Abstr.)

6. Taskiran, D., M. Stefanovic-Racic, H. Georgescu, and C. Erans. 1994. 氧化氮介导白细胞介素－1 对软骨蛋白聚糖合成的抑

chondrocyte.)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.90:11419-11423.

12.Amin,A.R.,P.E.Di Cesare,P.Vyas,M.Attur,E.Tzen B.T.Billiar,S.Stuchin,and S.B.Abramson.1995.在人骨关节炎影响的软骨细胞中氧化氮合成酶的表面和调控；可诱导的“神经样”氧化氮合成酶的证据。The expression and regulation of nitric exide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes:evidence for an inducible “neuronal-like”nitric oxide synthase.)J.Exp.Med.182:2097-2102.

13.Pelletier,J.P.,F.Mineau,P.Ranger,G.Tardif,and J.Mertel-pelletier.1996.人关节软骨细胞可诱导的氧化氮合成的升高抑制 IL－1Ra 合成：在骨关节炎软骨退化中的可能作用(The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1Ra syntnesis by human articular chondrocytes;possible role in osteoarthritic cartilage degradation.)Osteoarthritis Cartilage 4:77-84.

14.I.B.McInnes,B.P.Leung,M.Field,X.Q.Wei,F.-P.Enang,R.D.Sturrock,A.Kinninmonth,J.Weidner,R.Mumford and F.Y.Liew.1996.类风湿和关节炎患者滑膜中氧化氮的产量(Protuction of nitric oxide in the synovial membrane of theumatoid and osteoarthris patients.)J.Exp.Med.184:1519-1524.

15.Farrell,A.J.,D.R.Blake,R.M.Palmer,and S.Mocncade 1992.滑膜液和血清样本中亚硝酸盐浓度的提高说明类风湿病中氧化氮合成上升。(Increased concentration of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases.)ann Rheum.Dis.51:1219-1222。

16. Sakurai,H.,H.Kohsaka,M.Liu,H.Higashiyama,Y.Hicama,

制 (Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by inter eukin-1.)Biochem. Biophys. Res. Commun. 200:142-148.

7. Jarvinen, T. A. H., T. Moilanen, T. L. N. Jarvinen, and E Moilanen. 1995. 氧化氮介导白细胞介素－1对小鼠关节软骨中粘多糖合成的抑制(Nirtic oxide mediates interleukin-1 induced inhibition of glycosaminogykan synthesis in rat articular cartilage.)Mediators of Inflammation 4:`107-111.

8. Stadler, J., M. Stefanovic-Racic, T. R. Billiar, R. D. Currm, L. A. McIntyre, H. I. Georgescu, R. L. Simmons, and C. H. Evans. 1991. 关节软骨细胞合成氧化氮以应答细胞因子和脂多糖(Articular chondorcytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide.) J. Immunol, 147:3915-3920.

9. Palmer, R. M. J., M. S. Hickery, I. G. Charles, S. Moncaon, and M. T. Bayliss. 1993. 在人软骨细胞中氧化氮合成酶的诱导(Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes), Biochem Biophys. Res. Commun. 193:398-405.

10. Maier, R., G. Bilbe, J. Rediske, and M. Lotz. 1994, 来自人关节软骨细胞的可诱导的氧化氮合成酶: cDNA 克隆和 mRNA 表达的分析(Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes:cDNA cloning and analysis of mRNA expression.)Biochim. Biophys. Acta 145:1208(Abstr.)

11. I. G. Charles, R. M. Palmer, M. S. Hickery, M. T. Bayliss, A. P. Chubb, V. S. Hall, D. W. Moss and S. Moncada. 1993. 来自人软骨细胞的编码可诱导的氧化氮合成酶的 cDNA 的克隆，鉴定及表达(Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human

K. Kanno, I. Saito, and N. Miyasaka. 1995. 在炎症关节中的氧化氮的产量和可诱导的氧化氮合成酶表达量(Nitric Oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides.)J. Clin. Invest. 96:2357-2363.

17. Cannon, G. W., S. J. Openshaw, J. B. Hibbs, Jr., J. R. Hoidal, T. P. Huecksteadt, and M. M. Griffiths. 1996. (Nitric oxide production during adjuvant-mduced and collagen-induced arthritis.)在佐剂一诱导的和胶原一诱导的关节炎期间氧化氮的产量 Arthritis Rheum. 39:1677-1684.

18. Evans, C. H., M. Stefanovic-Racic, and J. Lancaster. 1995 矫形外科学中的一氧化氮及其作用(Nitric oxide and its role in orthopaedic disease.)Clin orthop 312:275-294.

19. Stefanovic-Racic, M., J. Stadler, and C. H. Evans. 1993. (Mitric oxide and arthritis.)氧化氮和关节炎 Arthritis Rheum. 36:1036-1044.

20. Murrell, G. G. C., D. Jang, and R. J. Williams. 1995. 氧化氮活化关节软骨中金属蛋白酶的活性(Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage.)Biochem Biophys Res Commun 206:15-21.

21. Connor, J. R., P. T. Manning, S. L. Settle, W. M. Moore, (I. M. Jerome, R. K. Webber, F. S. Tjoeng, and M. G. Curric. 1995. 选择性的可诱导氧化氮合成酶抑制剂对佐剂诱导的关节炎的抑制作用(Suppression of adjuvant-ir adjuvant-ir duced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase.)Eur J Pharmacol 273:15-24.

22. Stefanovic-Racic, M., K. Meyers, C. Meschter, J. W. Coffey, R. A. Hoffman, and C. H. Evans. 1994. (N-monomethy arginine, an inhibitor of nitric

oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats.)N-甲基精氨酸，氧化氮合成酶抑制剂，抑制小鼠佐剂关节炎的发展 Arthritis Rheum, 37:1062-1069.

23. stefanovic-Racic, M., K. Meyers, C. Meschter, J. W. Cofiey, R. A. Hoffman, and C. H. Evans. 1995. (Comparison of the nitric oxide synthase inhibiters methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvamt arthritis.)氧化氮合成酶抑制剂甲基精氨酸和氨基胍作为小鼠佐剂关节炎预防剂和治疗剂的对比 J. Rheumatol. 22:1922-1928.

24. McCartneyFrancis, N., J. B. Allen, D. E. Mizel, J. E. Altina, Q. Xie, D. F. Nathan, and S. M. Wahl. 1993. 氧化氮合成酶抑制剂对关节炎的抑制作用(Suppression of arthritis by an inhybitor of nitric oxide synthase.) J. Exp. Med. 178:749-754.

25. Moore, W. M., R. K. Webber, G. M. Jerome, F. S. Tjoeng, T. P. Misko, and M. G. Currie. 1994. L-N6-(1-氨基乙基)赖氨酸; 可诱导的氧化氮合成酶选择性抑制剂 (L-N6-(1-iminoethyl)lysine:a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase.) J Med Chem 37:3886-3888.

26. Pelletier, J. P., J. A. DiBattista, J. P. Raynauld, S. Wilhelm, and J. Martel-Pelletier. 1995. 在实验性骨关节炎的软骨病灶上关节内注射皮质类固醇的体内效果及溶基质素白细胞介素－1 和癌基因蛋白的合成 (The in vivo effects of intraarticular corticosteroid injectior s on cartilage lesions, stromelysin, itreleukin-1 and oncogene protein synthesis in experimental osteoarthritis.) Lab. Invest. 72:578-586.

27. Pelletier, J. P., F. Mineau, J. P. Raynauld, J. F. Jr. Woessner, Z. Gunja-Smith, and J. Martel-pelletier. 1994. 关节内注射甲基脱氢皮质甾醇乙酸减小实验性骨关节炎的关节炎病灶以及软骨细胞溶基质素的合成 (Intraarticular injections with methylpredminolone acetate reduce osteoarthritic lesions in parallel with chondrocyte stromelysin syotlesis in experimental osteoarthritis) Arthritis Rheum, 37:414-423.

28. Femandes, J. C., J. martel Pelletier, I. G. Otterness, A. Lopez-Anaya, F. Mineau, G. Tardif, and J. P. Pelletier, 1995. (Effects of tenidap on canine experimental osteoarthritis: I. Morphologic and metalloprotease analysis.) Tenidap 对大鼠实验性骨关节炎的影响: I 形态学和金属蛋白酶分析 Arthritis Rheum. 38:1290-1303.

29. Mankin, H. J., H. Dorfman, L. Lippiello, and A. Zarins, 1971. 人股骨关节炎的关节软骨生化和代谢异常 (Biochemical and metabolic abnormalities in atricular cartilage from ostreoarthritic human hips.) II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. J. Bone Jomt Surg. Am. 53:523-537.

30. Cawson, T. E. and A. J. Barrett. 1979. 应用 [1-14C] 乙酰化胶原对胶原酶迅速和可重复的测定 (A rapid and reprodncible assay for collagenase using [1-14C] acetylated collagen.) Anal. Biochem. 99:340-345.

31. Chavira, R. Jr., T. J. Burnett, and J. H. Hageman. 1984. Assaying proteinases with azocoll. Anal. Biochem. 136:446-450. 用偶氮胶测定蛋白酶。

32. Brandt, K. D. 1994. Insights into the natural history of osteoarthritis provided by the cruciate-deficient dog. An animal model of osteoarthritis. [Review]. *Ann. NY Acad. Sci.* 732:199-205.

33. Caron, J. P., J. C. Fernandes, J. Martel-Pelletier, G. Tardif, F. Mineau, C. Geng, and J. P. Pelletier. 1996. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum.* 39:1535-1544.

34. Van Beuningen, H. M., P. M. Van der Kraan, O. J. Arntz, and W. B. van den Berg. 1994. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab. Invest.* 71:279-290.

35. Blanco, F. J., R. L. Ochs, H. Schwarz and M. Lotz. 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J. Pathol.* 146:75-85.

36. Beckman, J. S. and Koppenol. 1996. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 271:C1424-C1437.

37. Salvemini, D., P. T. Manning, B. S. Zweifel, K. Siebert, J. Connor, M. G. Currie, P. Needleman, and J. L. Masferrer. 1995. Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. *J. Clin. Invest.*96:301-308.

38. Salvemini, D., Z. -Q. Wang, P. S. Wyatt, D. M. Bourdon, M. H. Marino, P. T. Manning, and M. G. Currie. 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 118:829-838.

附图简述

图 1

狗的关节软骨和滑膜中一般金属蛋白酶的活性水平。值为活力单位数/组织湿重的 gms(w.w.). 对 10 周 OA 组的 P 值通过 Mann-Whitney U-test 取得。

图 2

狗软骨和滑膜中胶原酶活性水平。值为活力单位数/组织湿重的 gms （w.w.）。对 10 周 OA 组的 P 值通过 Mann-Whitney U-test 取得。

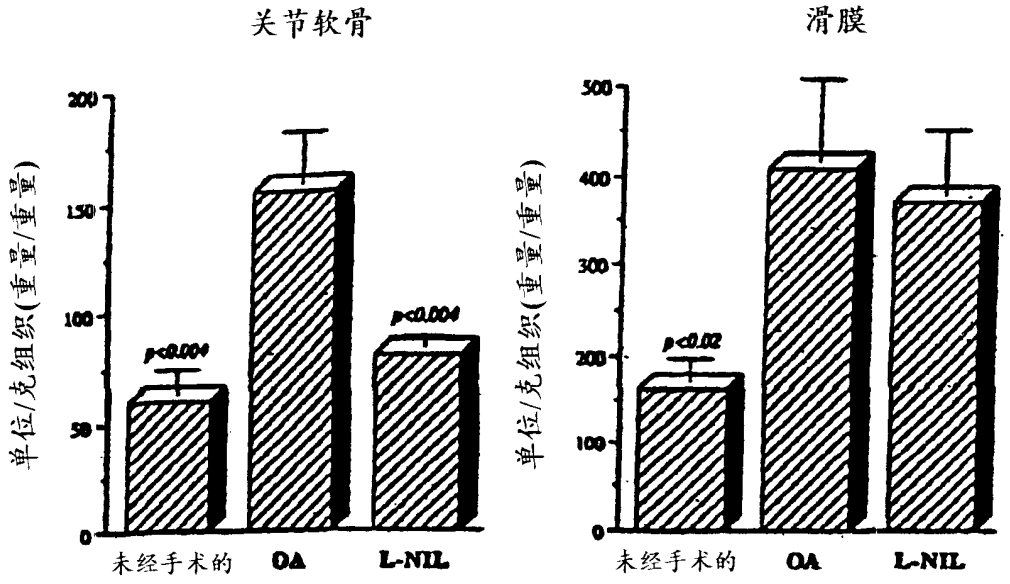

关节软骨
滑膜
单位/克组织(重量/重量)
200
150
100
50
0
500
400
300
200
100
0
p<0.004
p<0.004
p<0.02
未经手术的
OA
L-NIL
未经手术的
OA
L-NIL

图 1

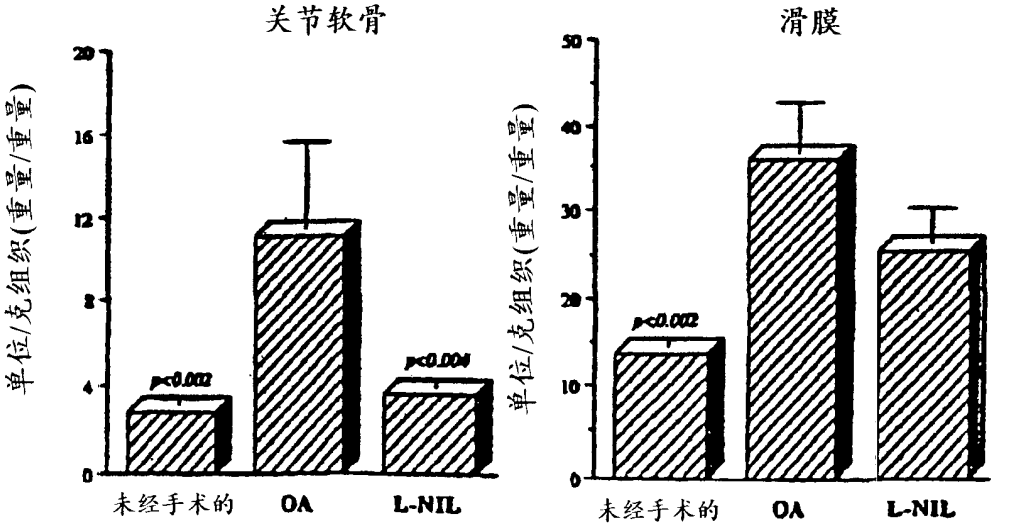

关节软骨
滑膜
单位/克组织(重量/重量)
20
16
12
8
4
0
50
40
30
20
10
0
p<0.002
p<0.004
p<0.002
未经手术的
OA
L-NIL
未经手术的
OA
L-NIL

图 2