

除湿通痹方对大鼠急性痛风性关节炎抗炎作用的实验研究*

王 涛¹, 廖江龙¹, 艾元亮¹, 许燕飞¹, 邱发敏², 徐 平², 温 辉², 黄文泽², 李 雷^{1△}

(1. 昆明市中医医院, 云南 昆明 650011; 2. 云南中医学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 研究除湿通痹方对尿酸钠(MSU)诱导的急性痛风性关节炎模型大鼠足关节肿胀率及足关节滑膜细胞因子表达的影响,探讨该方治疗急性痛风性关节炎的部分作用机制。**方法** 选用 Wistar 雄性大鼠 40 只,随机分成生理盐水组、阳性对照组、除湿通痹方 I 组、II 组。各组给予相应药物灌胃,2 次/d,第 5 天灌胃 1.5h 后予尿酸钠晶体注射局部关节腔形成大鼠急性痛风性关节炎模型,并于不同时间测量大鼠足关节肿胀度,观察该方对大鼠足关节肿胀率的影响;注射尿酸钠 24h 后,处死大鼠并应用 RT-PCR,检测对关节滑膜细胞因子 TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA 表达的影响。**结果** 除湿通痹方可有效抑制大鼠踝关节肿胀程度;与生理盐水组比较,TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 的表达明显减低。**结论** 除湿通痹方可抑制痛风性关节炎 TNF- α 和 IL-1 β 的表达而发挥抗炎作用,明显减轻关节的病理性损伤,有效抑制关节炎的临床进程。

关键词: 除湿通痹方; 急性痛风性关节炎; 尿酸钠; TNF- α ; IL-1 β

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)03-0010-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.03.003

痛风性关节炎(gouty arthritis)又称为尿酸性关节炎,是由尿酸钠(monosodiumurate, MSU)在关节腔内形成微晶体沉淀而引起非特异性关节炎^[1],以关节红肿热痛为主的炎症反应是痛风的主要病理表现^[2]。自身免疫介导的免疫炎症反应是急性痛风性关节炎发作的重要原因之一^[3]。但目前关于中医药治疗痛风性关节炎的实验研究中,重点往往关注药物对人体内血尿酸浓度的影响,而忽略中药抗炎作用的效应。除湿通痹方由王不留行、萆薢、川芎、羌活等组成,具有益气补肾、利湿除痹的功效,是昆明市中医医院李雷教授治疗急性痛风性关节炎的有效方剂,临床应用多年,疗效显著。本实验通过观察除湿通痹方对大鼠急性痛风性关节炎模型足关节肿胀率及关节滑膜细胞因子的影响,为明确除湿通痹方临床疗效产生的机制提供实验依据,也为进一步开发治疗急性痛风性关节炎的临床有效药物奠定理论基础。

1 实验材料

1.1 实验动物

Wistar 大鼠 40 只,雄性,体质量 180~220g。由

成都中医药大学实验动物中心提供,生产许可证号:SYXK(川)2014-049,饲养于云南中医学院动物实验中心,使用前适应性喂养 7d,饮食、饮水、活动正常,无不良反应即开始实验。整个实验过程中自由摄食和饮水。

1.2 实验器材

PCR 仪(上海复华公司产品),550 型酶标仪(BIO-RAD 公司产品),全自动电泳系统,全自动特定蛋白分析仪,游标卡尺,灌胃器,注射器等。

1.3 实验试剂

尿酸钠(MSU, Sigma 公司生产,批号:10010995),TRIzol RNA 提取试剂(GIBCO),RT-kit(Roche),Taq DNA 聚合酶(Promega),PCR 引物(上海博亚),T4DNA 连接酶(Promega),PCR 产物分子量标准(华美公司),dNTP 混合物(TaKaPa)。

1.4 实验药物及制备

1.4.1 除湿通痹方

由昆明市中医医院制剂室提供。为院内制剂,由王不留行、萆薢、荆芥、防风、川芎、羌活、川木通、猪苓、泽泻、地龙、元胡、牛膝、桔梗、茯苓组成,除湿

* 基金项目: 云南省科技计划项目(2013FD099); 云南省应用基础研究计划项目(201401SH00018)

收稿日期: 2016-04-03

作者简介: 王涛(1984-),男,云南昆明人,主治医师,研究方向:中西医结合骨伤科基础与临床。

△通信作者: 李雷, E-mail: 183070775@qq.com

通痹方水煎液为 2g/mL,冰箱保存备用。中药饮片由昆明蓝海中药材饮片公司提供;秋水仙碱(50mg/片,西双版纳版纳药业有限公司生产,批号 H53021369)。

1.4.2 尿酸钠结晶及溶液

根据相关文献改进方法^[4],无菌条件下将 800mg 尿酸钠和 155mL 生理盐水混合,并置于烧瓶中用电炉加热煮沸至尿酸钠完全溶解。迅速小滴滴入 1mol/L 的盐酸调整 pH6.8~7.2,自然降温后于 3 000r/min 离心至晶体不再析出后,弃上清,将晶体混悬于无菌缓冲液中配成所需浓度,置于 4℃冰箱保存备用;停止加热后保持无菌操作。镜下可见大量单个骨针状结晶。

2 实验方法

2.1 大鼠急性痛风性关节炎模型的制备^[5-6]

采用改良后的 Cdoerre 方法造模。对大鼠腹腔注射水合氯醛 30mg/kg 进行麻醉,在受试大鼠右侧踝关节背侧进行碘伏消毒后,以 6 号注射针从与胫骨成 45°方向插入胫骨肌腱内侧,在踝关节腔内注入 50μL 尿酸钠溶液^[7],以关节囊对侧鼓起为注入标准,复制急性痛风性关节炎模型。

2.2 对大鼠急性痛风性关节炎的关节肿胀的影响

2.2.1 分组与给药方法

选用健康 Wistar 大鼠 40 只,雄性,随机分为正常对照组、生理盐水组、阳性对照组(秋水仙碱组)、除湿通痹方 I 组、除湿通痹方 II 组 5 组,每组 8 只。根据人与动物体表面积剂量换算方法^[7],除湿通痹方 I 组日剂量为 4g·kg⁻¹;除湿通痹方 II 组日剂量为 18g·kg⁻¹;秋水仙碱组日剂量为 0.1mg·kg⁻¹;正常对照组,正常饮食喂养,生理盐水组给予等量的生理盐水,各组灌胃给药,2 次/d,连续灌胃 5d。

2.2.2 测取及观察方法

第 5 天灌胃 1.5h 后用游标卡尺测取各鼠踝关节周径,并于每鼠右后踝关节注射微晶型尿酸钠混悬液 50μL(20mg/mL),然后分别于 2,4,8,12,24h 测量大鼠右后足踝关节周径,计算出足踝关节肿胀率(计算公式:[(用药前内外踝肿胀最高点之间的周径-用药后内外踝肿胀最高点之间的周径)/ (用药前内外踝肿胀最高点之间的周径-健侧内外踝肿胀最高点之间的周径)]×100%)。

2.3 对大鼠急性痛风性关节炎滑膜细胞因子表达的影响

大鼠注射微晶型尿酸钠混悬液 24h 后,脱颈处死,打开注射药的踝关节,以眼科剪和手术刀片剪切滑膜及其周围组织^[8]。于 PBS 中快速洗涤一遍后立即转入组织匀浆器研磨中以 1mL TRIzol 抽提总 RNA。总 RNA 提取参见 TRIzol RNA 分离试剂产品说明书;逆转录按照逆转录试剂盒说明书进行。取逆转录产物 2μL 作模板,分别用 IL-1β、TNF-α、β-actin 的特异性引物(见表 1),进行 PCR 扩增,TNF-α 的 PCR 循环为:94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 1min,28 个循环,74℃ 10min;IL-1 的 PCR 循环为:94℃ 30s,62℃ 1min,72℃ 1min,26 个循环,74℃ 10min。分别取 PCR 产物各 5μL,加入 6×上样缓冲液 1μL 混合,100V 恒压、1%琼脂糖凝胶电泳 45min,在长波紫外灯下观察结果并照相。用四星图像分析系统软件进行条带灰度扫描,以 β-actin 扫描值校正加样误差,计算 RT-PCR 产物的相对量。

表 1 各基因 qPCR 引物序列

基因	引物序列
IL-1	P1:5'-GATAACCTGCTGCTGTGTGA-3'
	P2:5'-CTTGTGAGGTGCTGATGTAC-3'
TNF-α	P1:5'-GCCGATCATGGTCAGATCATCTTCTCGAA-3'
	P2:5'-CCCAAGCTTCAGGGCAATGATCCCAAAGTA-3'
β-actin	P1:5'-AACGGCTCCGGCATGTGCAA-3'
	P2:5'-CTTCTGACCCATGCCACCA-3'

2.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。所有数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间均数比较用 *t* 检验,多组间均数比较用方差分析。

3 实验结果

3.1 大鼠急性痛风性关节炎模型的建立

大鼠踝关节注射尿酸钠后,每只大鼠均出现烦躁不安,2h 后均出现关节肿胀,且逐渐加重表现明显,于 8~12h 达到高峰期,右后肢踝关节极度红肿、走路缓慢,关节腔出现积液,伴三足步态,进食减少等症状。本实验以尿酸钠诱发的大鼠关节炎模型发病率为 100%,充分模拟了急性痛风性关节炎发作的局部症状。

3.2 对大鼠急性痛风性关节炎关节肿胀的影响

表 2 结果显示:与生理盐水组比较,在不同时间段内,秋水仙碱组与除湿通痹方 I 组、II 组大鼠急性痛风性关节炎的肿胀率均明显降低。提示:除湿通痹方能够抑制大鼠急性痛风性关节炎的关节肿

表 2 除湿通痹方大鼠急性痛风性关节炎的关节肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	关节肿胀率/%				
		2h	4h	8h	12h	24h
正常对照组	—	51.5±17.5	63.6±18.9	68.3±15.2	98.7±20.6	70.6±12.5
生理盐水组	—	50.8±16.8	58.9±15.7	71.9±16.4	97.8±19.9	68.7±10.2
阳性对照组	0.1	27.9±16.2 [△]	37.6±10.7 [△]	41.2±17.3	50.5±16.5	19.2±9.5
除湿通痹方 I 组	4	24.7±17.2 [△]	36.8±16.3 [△]	43.2±21.5 [△]	46.7±18.0 [△]	23.8±7.6 [△]
除湿通痹方 II 组	18	24.4±8.10 [△]	40.7±9.6 [△]	44.4±16.5 [△]	47.1±18.1 [△]	21.5±6.1 [△]

注:与生理盐水组比较,[△] $P<0.05$

胀率。

3.3 对大鼠急性痛风性关节炎滑膜细胞因子表达的影响

表 3 结果显示:与生理盐水组比较,其余各组大鼠急性痛风性关节炎滑膜细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达,明显受到抑制,差异有统计学意义 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$);提示:除湿通痹方能够抑制大鼠急性痛风性关节炎滑膜细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达。

表 3 对大鼠急性痛风性关节炎滑膜细胞因子表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	IL-1 β /μL	TNF- α /μL
正常对照组	—	0.1235±0.032	0.642±0.172
生理盐水组	—	0.1369±0.039	0.664±0.179
阳性对照组	0.1	0.046±0.029 [△]	0.120±0.025 ^{△△}
除湿通痹方 I 组	4	0.047±0.028 [△]	0.121±0.024 ^{△△}
除湿通痹方 II 组	18	0.046±0.027 [△]	0.120±0.022 ^{△△}

注:与生理盐水组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

4 讨论

急性痛风性关节炎以肾虚为本,水湿、痰湿、湿浊、浊毒闭阻经脉为标,气血运行失畅痹阻关节,不通则痛而发病,除湿通痹方基于此理论组方,由王不留行、萆薢、荆芥、防风、川芎、羌活、川木通、猪苓、泽泻、地龙、元胡、牛膝、桔梗、茯苓等药物组成。方中重用王不留行活血、行血、消肿止痛;萆薢利湿去浊,祛风除痹^[9-10];川木通通利九窍血脉关节;茯苓、猪苓、泽泻益气利湿而泄肾浊^[11];牛膝补肾通经;桔梗通利五脏^[12];荆芥、防风胜湿止痛,止痉定搐^[13];元胡、地龙、川芎,配伍益气行血药常用于气虚血瘀,经络不利^[14-15];羌活,祛湿止痛。诸药合用共奏益气补肾、利湿降浊、除痹止痛,从而达到良好的治疗效果。

急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, AGA)

与各种原因导致的高尿酸血症关系密切,高尿酸血症促使关节局部析出的尿酸晶体沉积关节软骨、滑膜及周围组织,刺激肿瘤坏死因子- α 等炎性细胞因子产生和白细胞辅助因子等促炎性物质分泌,释放出各种趋化性炎性因子如 IL-1 β 、TNF- α 等,可导致痛风的急性炎症症状^[16]。

进一步实验结果显示该方对关节囊局部炎性细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达有抑制作用。说明除湿通痹方能够缓解大鼠关节局部的组织损伤及抑制大鼠关节肿胀率,可能与其能够抑制大鼠关节局部炎症因子如 IL-1 β 、TNF- α 的释放有关。本实验结果为明确除湿通痹方的临床疗效产生机制提供了一定的实验依据。

5 结论

除湿通痹方对大鼠急性痛风性关节炎的关节肿胀及滑膜细胞因子表达影响的试验表明:其够抑制大鼠急性痛风性关节炎的关节肿胀及大鼠急性痛风性关节炎滑膜细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达,可明显减轻关节的病理性损伤,有效减缓急性痛风性关节炎的临床进程。

参考文献:

- [1] Hachica M, Naccahe PH, Mccoll SR. Inflammatory microcrystals differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory pratein and IL-8 by human neutrophils: a possible mechanism of neutrophilic recruit-ment to sites of inflammation in synovitis[J]. J Exp Med, 1995, 182(6):2019-2025.
- [2] 赵巴根那,董华,董清平. 纳米中药对急性痛风性关节炎 IL- β 、IL-6、IL-8 影响的实验研究 [J]. 中医药信息, 2012, 29(1):117-119.
- [3] 万春平,李兆福,徐翔峰,等. 急性痛风性关节炎免疫学发病机制研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(4):52-55.
- [4] 黄火高,孙运峰,胡明,等. 大鼠急性痛风性关节炎模型的

- 建立及特点[J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(6): 538-542.
- [5] 黄尉霞. 药物对痛风性关节炎模型 IL-1、IL-6 的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2002, 3(6): 359-360.
- [6] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rat: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. Pain, 1987, 28(3): 379-393.
- [7] 施新酉. 医用实验动物学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 418-419.
- [8] 姜萍, 王占奎. 清泻浊毒法对高尿酸血症大鼠尿量及尿酸水平的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(6): 605-607.
- [9] 党晓芬. 王不留行抗炎、镇痛活性部位筛选及其作用机制研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2014.
- [10] 陈光亮, 吕红霞, 王媛媛, 等. 草薢牛膝总皂苷对尿酸钠诱导的大鼠急性痛风性关节炎的防治作用[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1): 34-37.
- [11] 刘洪超, 杨小龙, 王淑英. 猪苓药理作用研究进展[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2011, 29(2): 159-160.
- [12] 李婷, 徐文珊, 李西文, 等. 中药桔梗的现代药理研究进展[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 205-208.
- [13] 王长林, 王秀君, 浦仕飞. 荆芥与防风的药理作用试验研究 [J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2009, 29(1): 6-8.
- [14] 金玉青, 洪远林, 李建蕊, 等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床, 2013, 4(3): 44-48.
- [15] 王春玲. 中药地龙的活性成分与药理作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(7): 53-54.
- [16] Choi HK, Mount DB, Reqnato AM, et al. Pathogenesis of gout[J]. Ann Intern Med, 2005, 143(7): 499-516.
- (编辑: 徐建平)

Experimental Study on the Anti-inflammatory Effects in Rats with Acute Gouty Arthritis of the Gout One Prescription

WANG Tao¹, LIAO Jianglong¹, AI Yuanliang¹, XU Yanfei¹, QIU Famin²,
XU Ping², WEN Hui², HUANG Wenzhe², LI Lei¹

(1. Kunming City Hospital of Tradition Chinese Medicine, Kunming 650011, China;

2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the influence of swelling ratio and the expression of cytokines in synovial cell of foot joint of MSU-induced rats with acute gouty arthritis of the gout one prescription, and to investigate the mechanism of the treatment of acute gouty arthritis. **Methods** Forty Wistar (40) male rates were randomly divided into 4 groups: the normal saline group, positive control group, group I of the gout one prescription and group II of the gout one prescription. The corresponding drugs were administered to each group, and 2 times a day, and 1.5 hours after filling the stomach in fifth day, the rats were injected into the Sodium uric acid cavity to form the model of acute gout arthritis in rats, and the swelling degree of the rats was measured at different times to observe the effect of the square on the swelling ratio of the joint; After 24 hours of injection of sodium, rats were executed and the effect of the expression of TNF- α mRNA and IL-1 β mRNA in articular synovial cells was detected by RT-PCR. **Results** The gout one prescription can effectively inhibit the swelling of ankle joint in rats; Compared with the normal saline group, the expression of TNF- α mRNA and IL-1 β mRNA was significantly decreased. **Conclusion** The gout one prescription can inhibit the expression of TNF- α and IL-1 β in the gouty arthritis and play an anti-inflammatory effect and it can reduce the pathological damage of the joints and inhibit the clinical course of arthritis effectively.

KEY WORDS: gout one prescription; acute gouty arthritis; monosodiumurate; TNF- α ; IL-1 β