

## 除湿通痹方对急性痛风性关节炎大鼠炎症级联反应的作用\*

王涛<sup>1</sup>, 郭英<sup>1</sup>, 艾元亮<sup>1</sup>, 廖江龙<sup>1</sup>, 许燕飞<sup>1</sup>, 邱发敏<sup>2</sup>, 温辉<sup>2</sup>, 李雷<sup>1△</sup>

(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** 探讨除湿通痹方对急性痛风性关节炎炎症级联反应的作用。**方法** SD 大鼠随机分为空白组、模型组、秋水仙碱组, 除湿通痹方高、中、低剂量组共 6 组, 每组 10 只, 于给药前 1d 和给药第 6 天, 除空白组给予生理盐水外, 其余 5 组复制急性痛风性关节炎模型, 连续灌胃 22d 后处死采取标本取材, 观察各组大鼠关节肿胀度、功能障碍指数和炎症指数、测定 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度, 检测 caspase-1、ASC、NLRP3 基因表达, 并分析其关系。**结果** 各给药组对急性痛风性关节炎大鼠活动障碍均有缓解作用; 秋水仙碱组 TNF- $\alpha$  表达水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ); 秋水仙碱组及除湿通痹方高剂量组 IL-1 $\beta$ 、caspase-1、ASC、NLRP3 表达水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ); caspase-1、ASC、NLRP3 均与 IL-1 $\beta$  存在相关性 ( $P < 0.05$ ); TNF- $\alpha$  与 ASC 存在相关性 ( $P < 0.05$ )。**结论** 秋水仙碱及除湿通痹方高剂量能通过抑制 NLRP3 炎性体的表达, 从而抑制 IL-1 $\beta$  相关的炎症过程, 发挥其抗炎免疫作用。

**关键词:** 急性痛风性关节炎; 除湿通痹方; ASC; caspase-1; NLRP3

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2017)01-0014-04

**DOI:** 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.01.004

目前, 关于中医药治疗痛风性关节炎的研究中明确中药具有抗炎作用的实验研究相对较少。除湿通痹方是运用中医基础理论, 在多年运用中医药治疗痛风性关节炎的基础上总结而来, 临床应用多年, 显示出良好的抗炎、消肿及镇痛作用<sup>[1]</sup>。本研究以期从实验研究方面为临床提供数据。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 动物

SD 大鼠 60 只, 清洁级, 雌雄各半, 体质量 180~200g (购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (沪) 2013-0016), 饲养于云南中医学院动物实验中心, 使用前适应性喂养 3d, 饮食、饮水、活动正常, 无不良反应即开始实验<sup>[2]</sup>。整个实验过程中自由摄食和饮水。

##### 1.1.2 药物

除湿通痹方(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, 上述药材煎液浓缩到每 1mL 药液含生药 2g 备用)由昆明市中医医院制剂室提供<sup>[1-2]</sup>; 秋水仙碱由西双版纳药业有限公司生产。

##### 1.1.3 试剂

尿酸钠; IL-1 $\beta$ ; GoScript 逆转录试剂盒; Gotag 定量聚合酶链反应(qPCR)试剂盒等。

##### 1.1.4 主要设备

5810R 型高速冷冻离心机; DG5033A 型酶标仪; 7500H 型 qPCR 仪(美国 ABI 公司)等<sup>[3-4]</sup>。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 尿酸钠结晶及尿酸钠溶液的制备

根据相关文献<sup>[5]</sup>改进方法, 步骤如下: ①将尿酸钠加入生理盐水中后, 并用电炉加热煮沸; ②加入盐酸调整 pH 值于 6.8~7.2 之间<sup>[3]</sup>; ③降温离心后将晶体混悬于无菌缓冲液中, 配成所需浓度并置于 4℃ 冰箱保存备用。

\* 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); 云南省中西医结合骨伤研究中心内设项目

收稿日期: 2016-12-20

作者简介: 王涛(1984-), 男, 云南昆明人, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合骨伤科学。

△通信作者: 李雷, E-mail: 183070775@qq.com

### 1.2.2 动物模型的制备

采用改良的 Coderre 方法<sup>[6]</sup>造模。将水合氯醛(30mg/kg)注射大鼠腹腔进行麻醉,大鼠左侧踝关节背侧行常规消毒后,将尿酸钠溶液注入到左踝关节腔,复制急性痛风性关节炎模型。

### 1.2.3 动物分组及给药方法

给药剂量按 60kg 成人体表面积换算<sup>[7]</sup>,60 只 SD 大鼠随机分为 6 组。模型组灌胃生理盐水 4mL/kg、秋水仙碱组灌胃秋水仙碱 0.0012g/kg、除湿通痹方低剂量组灌胃除湿通痹方 9g/kg、除湿通痹方中剂量组灌胃除湿通痹方 18g/kg、除湿通痹方高剂量组灌胃除湿通痹方 36g/kg。适应性喂养 3d 后开始造模,开始连续灌胃给药 22d,1 次/d。给药前 1d,空白组左踝关节腔注射生理盐水 0.3mL,其余 5 组左踝关节腔注射 50 $\mu$ L 尿酸钠溶液;给药第 6 天,空白组左踝关节腔注射生理盐水 0.1mL,其余 5 组再次于左踝关节腔注射 50 $\mu$ L 尿酸钠溶液,复制急性痛风性关节炎模型,22d 后处死采取标本。

### 1.3 观察指标

#### 1.3.1 症状观测

炎症指数判定:参考 Coderre 等<sup>[6]</sup>关于炎症指数分级评定标准,设 4 分级制评分标准:0 分,正常;1 分,左后足关节皮肤红斑,轻度肿胀,骨性标志可见;2 分,左后足关节明显红肿,骨性标志消失,但肿胀局限于关节部位;3 分,左后足关节以外肢体肿胀。功能障碍指数:参考 Coderre 等<sup>[6]</sup>关于功能障碍指数分级评定标准,设 4 分级制评分标准:0 分,正常步态,四足均匀着地;1 分,左后足着地减轻,足趾未展开,轻度跛行;2 分,左后足屈起,趾背着地,明显跛行;3 分,左后足完全离地,呈三足步态。足肿胀度评定:采用足容积测量仪测量,精确到 0.1mL。以上指标在造模前、造模后 5h、造模后每天灌胃前评估。每天的评估值减去造模前评估值作为度量,评估急性关节炎症状动态变化<sup>[3,8]</sup>。

#### 1.3.2 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 浓度检测

取大鼠静脉血 4mL,静置 2h,离心 15min,3 000r/min,用 ELISA 试剂盒进行检测。

#### 1.3.3 NLRP3 炎性体基因表达检测

①取抗凝血 2mL,用 Hanks 液稀释 1 倍后,将混合液移至 3mL 大鼠淋巴细胞分离液上层并离心;②吸取浑浊带细胞,用 Hanks 液洗涤细胞,离心,留取沉淀细胞;③加入 1mL Trizo1 液吹打,震荡 30s,加 0.2mL

氯仿,置冰上 5min,并离心;留取上层水相 0.5mL,加异丙醇<sup>[3]</sup>。-20 $^{\circ}$ C 下静置 30min,4 $^{\circ}$ C 下离心 10min;弃上清,加体积分数 75%乙醇 1mL,4 $^{\circ}$ C 下离心 10min;弃上清,沉淀溶于 30 $\mu$ L DEPC 水,检测总 RNA 完整性、浓度、纯度,-80 $^{\circ}$ C 保存。操作过程要严格按照逆转录试剂盒和 qPCR 试剂盒说明书<sup>[3]</sup>。

表 1 各基因 qPCR 引物序列

基因	引物序列
caspase-1	F:5'-TGCCTGGTCTTGTGACTTGGAC-3'
	R:5'-ATGTCCTGGGAAGAGGTAGAAACG-3'
ASC	F:5'-TTATGGAAGAGTCTGGAGCTGTGG-3'
	R:5'-AATGAGTGCTTGCCCTGTGTTGG-3'
NLRP3	F:5'-CAGACCTCCAAGACCACGACTG-3'
	R:5'-CATCCGCAGCCAATGAACAGAG-3'
GAPDH	R:5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
	F:5'-GATGCAGGGATGATGTTC-3'

### 1.4 统计方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据统计分析,关节肿胀指数采用重复测量设计资料的单变量方差分析(General Linear Model/Repeated Measures ANOVA)<sup>[8]</sup>。关节炎指数及关节功能障碍指数采用多个独立样本的非参数检验。相关系数采用 Spearman 秩相关系数测定。其中, $P < 0.05$  表示有显著性差异, $P < 0.01$  表示有极显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 大鼠急性痛风性关节炎关节活动情况比较

表 2 大鼠炎症指数变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	第 1 天	第 12 天	第 22 天
空白组	10	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	10	2.01 $\pm$ 0.54 <sup>△</sup>	2.39 $\pm$ 0.51 <sup>△</sup>	1.22 $\pm$ 0.71 <sup>△</sup>
秋水组	10	2.00 $\pm$ 0.64	2.00 $\pm$ 0.53	0.56 $\pm$ 0.73 <sup>*</sup>
除低组	10	1.88 $\pm$ 0.53	1.88 $\pm$ 0.35	0.81 $\pm$ 0.75
除中组	10	1.88 $\pm$ 0.35	1.75 $\pm$ 0.37 <sup>*</sup>	0.95 $\pm$ 0.77
除高组	10	1.66 $\pm$ 0.64	1.69 $\pm$ 0.46 <sup>*</sup>	0.57 $\pm$ 0.51 <sup>*</sup>

注:与空白组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$

表 2 结果显示:模型组大鼠炎症指数显著高于空白组( $P < 0.05$ ),表明造模成功。炎症指数造模第 12 天除湿通痹方中、高剂量组显著低于模型组( $P < 0.05$ ),造模第 22 天除湿通痹方高剂量组及秋水仙碱组显著低于模型组( $P < 0.05$ )。(备注:表 2 至表 6 除湿通痹方高、中、低剂量组统一简写为除高组、除中组、除低组;秋水仙碱组简写为秋水组。)

表 3 大鼠功能障碍指数变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	第 1 天	第 12 天	第 22 天
空白组	10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	10	1.88±0.84 <sup>△</sup>	1.51±1.08 <sup>△</sup>	0.00±0.00
秋水组	10	1.62±0.92	0.68±0.47*	0.00±0.00
除低组	10	1.51±1.06	0.43±0.51*	0.00±0.00
除中组	10	1.50±1.07	0.44±0.50*	0.00±0.00
除高组	10	1.63±0.74	0.31±0.46*	0.00±0.00

注:与空白组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ 。

表 3 结果显示:第 12 天,各给药组功能障碍指数显著低于模型组( $P < 0.05$ )。

表 4 大鼠左足肿胀程度变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	第 1 天	第 12 天	第 22 天
空白组	10	0.037±0.051	0.000±0.000	0.012±0.036
模型组	10	0.343±0.154 <sup>△</sup>	0.401±0.190 <sup>△</sup>	0.181±0.106
秋水组	10	0.325±0.125	0.319±0.133	0.138±0.103
除低组	10	0.250±0.116	0.325±0.160	0.131±0.162
除中组	10	0.313±0.190	0.275±0.149	0.056±0.199
除高组	10	0.231±0.070	0.194±0.145*	0.000±0.056*

注:与空白组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$

表 4 结果显示:足肿胀度造模第 12 天除湿通痹方高剂量组显著低于模型组( $P < 0.05$ );造模第 22 天除湿通痹方高剂量组显著低于模型组( $P < 0.05$ )。

2.2 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度的测定比较

表 5 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  浓度比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
空白组	10	259.9±106.2	225.0±71.4
模型组	10	422.3±99.5 <sup>△</sup>	317.9±70.4 <sup>△</sup>
秋水组	10	281.5±98.8*	237.1±69.3*
除低组	10	361.1±110.0	265.1±47.6
除中组	10	344.7±117.7	250.8±66.6
除高组	10	307.3±107.8*	252.9±69.6

注:与空白组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$

表 5 结果显示:除湿通痹方高剂量组、秋水仙碱组 IL-1 $\beta$  浓度均显著低于模型组( $P < 0.05$ ),秋水仙碱组 TNF- $\alpha$  浓度显著低于模型组( $P < 0.05$ )。

2.3 各组大鼠单核细胞炎症小体基因表达比较

表 6 结果提示:各给药物组大鼠单核细胞 caspase-1、ASC 基因表达均显著低于模型组( $P < 0.05$ );除湿通痹方高剂量组大鼠单核细胞 NLRP3 基因表达显著低于模型组( $P < 0.05$ )。

表 6 大鼠单核细胞炎症小体基因表达比较( $\bar{x} \pm s, n_2 - \Delta \Delta_{CT}$ )

组别	n	caspase-1	ASC	NLRP3
空白组	10	1.29±0.82	1.23±0.76	1.65±1.52
模型组	10	7.58±3.88 <sup>△</sup>	7.83±3.29 <sup>△</sup>	2.09±1.35
秋水组	10	1.03±0.92*	1.10±1.45*	0.57±0.43*
除低组	10	2.10±2.88*	2.15±3.73*	1.20±0.98
除中组	10	1.92±2.14*	2.24±2.29*	1.47±1.41
除高组	10	2.10±2.67*	2.20±3.00*	0.86±0.26*

注:与空白组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$

2.4 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与 caspase-1、ASC、NLRP3 相关性分析

表 7 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与 caspase-1、ASC、NLRP3 相关性分析表

炎症因子	caspase-1		ASC		NLRP3	
	r	p	r	p	r	p
IL-1 $\beta$	0.26	0.04 <sup>△</sup>	0.35	0.03 <sup>△</sup>	0.25	0.03 <sup>△</sup>
TNF- $\alpha$	0.19	0.11	0.27	0.02 <sup>△</sup>	0.17	0.12

注:<sup>△</sup> $P < 0.05$

表 7 结果提示:IL-1 $\beta$  与 caspase-1、ASC、NLRP3 存在显著相关性;TNF- $\alpha$  与 ASC 存在显著相关性<sup>[3]</sup>。

3 讨论

急性痛风性关节炎属中医“痹证”范畴,其病因病机为脏腑失职,或脾虚不运、或脏腑阳盛积热,或肝肾精血不足筋骨失养,致寒湿浊、痰热、毒瘀痹阻关节,气血不通,甚则留注经络,腐蚀筋骨,日久而成本病,因此,脾肾亏虚是本,而寒湿浊、痰热、毒瘀是标,总属本虚标实之病证<sup>[9]</sup>。急性期当以“通”立法,通湿,除痰、化痰,以“通”止痛,“通则不痛”;间歇期当以“荣”立法,荣脾肾,荣气血,以“荣”止痛。由此组方的除湿通痹方。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,诸药配合活血通经除痹止痛以治标;川木通除脾胃寒热,通利九窍血脉关节;茯苓、泽泻利湿而泄肾浊;牛膝活血通经除痹;桔梗利五脏,荆芥、防风胜湿止痛,止痉定搐;元胡、地龙、川芎,配伍益气行血药常用于气虚血瘀,经络不利;配合羌活,止痛效果更佳。诸药合用共奏益气补脾肾、利尿、祛湿、降浊、通窍从而达到良好的治疗效果<sup>[11-2]</sup>。

本研究结果提示:除湿通痹方高剂量组对急性痛风性关节炎大鼠活动障碍有明显改善作用,且对炎症因子 IL-1 $\beta$ 、caspase-1、ASC 基因的表达有明显抑制作用。痛风性关节炎急性发作初期,单核细胞进入

组织炎症部位, 逐渐发展成为成熟的巨噬细胞吞噬尿酸钠(MSU)晶体, MSU 通过募集 ASC 和 caspase-1, 形成复杂的复合物-NLRP3 炎性体, 并诱导活化 caspase-1, 进而引起大量的促炎因子转录, 激活中性粒细胞, 诱导炎症介质的释放<sup>[3,10]</sup>。NLRP3 炎性体的激活→ASC、caspase-1 合成 NLRP3 炎性复合体→诱导 caspase-1、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等终末炎症因子→级联放大效应<sup>[11-12]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  均与 ASC 有相关性, 同时 IL-1 $\beta$  与 caspase-1、NLRP3 也存在相关性, 但目前其具体机制暂不明确, 有待进一步研究探讨。本研究表明: 除湿通痹方高剂量可能抑制 NLRP3 炎性体诱导的炎症过程, 缓解急性痛风性关节炎大鼠模型的局部症状, 除湿通痹方高剂量组具有抗炎免疫作用。结论: 秋水仙碱及除湿通痹方高剂量组能通过抑制 NLRP3 炎性体的表达, 从而抑制 IL-1 $\beta$  相关的炎症过程, 发挥其抗炎免疫作用。

#### 参考文献:

- [1] 王涛, 廖江龙, 艾元亮, 等. 除湿通痹方对急性痛风性关节炎小鼠抗炎镇痛的作用研究[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(4): 16-19.
- [2] 王涛, 廖江龙, 艾元亮, 等. 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[J]. 云南中医学院学报 2016, 39(3): 10-13.
- [3] 陈昉, 姚红, 童娟, 等. 白子菜提取物对急性痛风性关节炎大鼠模型的抗炎免疫作用[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(2): 275-281.
- [4] 杨飞燕; 姚红; 童娟, 等. 祛湿除痹法对急性痛风性关节炎大鼠抗炎作用的研究 [J]. 江苏中医药, 2012, 44(2): 62-64.
- [5] 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.
- [6] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. Pain, 1987, 28(3): 379-393.
- [7] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
- [8] 李荣华; 蔡骏逸; 欧志穗, 等. 痛风康 II 号颗粒对尿酸钠结晶诱导的急性痛风性关节炎的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2722-2724.
- [9] 黄丽霞. 通痹汤治疗痛风病药效学研究及其含药血清的免疫调节作用[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.
- [10] 刘昌盛, 陈昉, 何颖, 等. 白子菜提取物对急性痛风性关节炎大鼠模型抗炎作用的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(8): 26-29.
- [11] Zambetti LP, Laudisi F, Licandro G, et al. The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation and a lot more [J]. Immunol Res, 2012, 53(1-3): 78-90.
- [12] 王春秋. 火针对急性痛风性关节炎大鼠踝关节 MMP-3 及病理改变的影响 [D]. 西宁: 青海大学, 2012.

(编辑: 徐建平)

### Anti-inflammatory Immune Mechanism of Chushi Tongbi Decotion on the Acute Gouty Arthritis in Rats

WANG Tao<sup>1</sup>, GUO Ying<sup>1</sup>, AI Yuanliang<sup>1</sup>, LIAO Jianglong<sup>1</sup>, XU Yanfei<sup>1</sup>, QIU Famin<sup>2</sup>, WEN Hui<sup>2</sup>, LI Lei<sup>1</sup>

(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 effect of Chushi Tongbi Decotion of removing dampness and resolving dampness on the cascade reaction of acute gouty arthritis. **Methods** 60 SD rats were randomly divided into 6 groups: blank group, model group, colchicine group, Chushi Tongbi high-dose group, middle-dose group and low-dose group, 10 rats were included in each group. Before rats were given by gavage one day and the sixth day, acute gouty arthritis model of was replicated by intra-articular injecting monosodium urate crystal suspension inside the ankle joint and only blank group mice were injected by NS. Rats were gavaged once a day for 22 days and joint swelling, inflammation index and dysfunction index were observed. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression levels in soft tissues of joint were detected by ELISA, caspase-1, ASC, NLRP3 expression levels in soft tissues of joint were detected by qPCR, and the relationship between each other was analyzed. **Results** Dysfunction index of all the rats in the treating groups on the acute gouty arthritis was relieved. TNF- $\alpha$  of expression of colchicine group was significantly lower than that of model group ( $P < 0.05$ ); IL-1 $\beta$ 、caspase-1、ASC、NLRP3 of expression of colchicine and Chushi Tongbi high-dose group was significantly lower than that of model group ( $P < 0.05$ ); there were significant correlations between IL-1 $\beta$  and caspase-1, ASC, NLRP3; there were significant correlations between TNF- $\alpha$  and ASC ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Colchicine group and Chushi Tongbi high-dose group can decrease inflammatory of IL-1 $\beta$  by decreasing expression levels of NLRP3, and then play its anti-inflammatory immune function.

**KEY WORDS:** acute gouty arthritis; Chushi Tongbi Decotion; ASC; caspase-1; NLRP3