

蠲痹历节清方对大鼠痛风性关节炎关节肿胀指数 和滑膜组织中炎症因子的影响*

周彪^{1,3}, 郭玉星², 陆小龙², 周友良¹, 曾鹏², 齐新宇¹, 熊辉^{1△}

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005;

3. 湘潭市第一人民医院, 湖南 湘潭 411101)

摘要: **目的** 观察蠲痹历节清方对大鼠痛风性关节炎关节肿胀指数和滑膜组织中炎症因子的影响, 探讨蠲痹历节清方治疗痛风性关节炎的潜在机制。**方法** 48 只雄性 SD 大鼠随机分为 A(正常对照)、B(模型对照)、C(蠲痹历节清方治疗)和 D(阳性对照)4 组, 每组 12 只。除 A 组(空白对照)外, 其余 3 组均采用局部尿酸钠盐关节腔注射的方法建立大鼠痛风性关节炎膝关节模型, A、B 组予以生理盐水灌胃, C 组予以蠲痹历节清方灌胃, D 组予以依托考昔灌胃。观察造模前、后不同时相点测量大鼠膝关节周径, 并计算出膝关节肿胀指数; 采用 ELISA 法检测大鼠膝关节滑膜组织中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2 和 TGF- β 的含量。**结果** 与 A 组比较, B 组(模型组)大鼠的膝关节肿胀指数和滑膜组织中炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2)含量明显升高($P < 0.05$), 而 TGF- β 含量明显减少($P < 0.05$)。与 B 组(模型组)比较, C 组(蠲痹历节清方治疗组)大鼠膝关节肿胀指数明显较低($P < 0.05$), 且滑膜组织中炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2)含量明显低于 C 组($P < 0.05$), 而抗炎因子 TGF- β 含量明显高于 C 组($P < 0.05$)。**结论** 蠲痹历节清方能够有效缓解痛风性关节炎大鼠膝关节炎性肿胀, 其作用机制可能与抑制局部组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2 的合成、释放, 同时增加局部组织中抗炎因子 TGF- β 的含量有关。

关键词: 蠲痹历节清方; 痛风性关节炎; 关节肿胀指数; 炎症因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)03-0015-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.03.004

痛风性关节炎(gout arthritis, GA)是由于各种原因引起的体内血尿酸升高, 尿酸钠盐沉积于关节及周围局部组织引起损伤的一组异质性疾病^[1], 以疼痛并伴有自限性为特点, 临床多表现为: 关节的疼痛、红肿、功能活动受限, 症状反复发作, 严重者可出现痛风石形成, 或致关节畸形。研究表明: 痛风性关节炎是尿酸钠致体内 TLR4/MyD88 等多条炎症细胞信号通路被激活最终引起下游炎症因子大量表达的结果^[1-3]。基于清热利湿散瘀立法处方设立的蠲痹历节清方, 在长期治疗痛风性关节炎的实践中获得了肯定的临床疗效, 临床研究也证实了其能迅速缓解关节肿痛、消除关节急性炎症反应、降低血尿酸水平^[4-5]。同时, 课题组前期基础研究^[6-7]也证实, 蠲痹历节清

方能够有效降低鸟类痛风性关节炎模型血尿酸, 缓解关节红肿症状, 减轻关节滑膜组织炎症病理反应。但其具体抗炎作用机制尚待进一步明确, 本研究以关节局部肿胀程度和关节滑膜局部组织炎症因子为研究靶点, 探讨蠲痹历节清方对上述两者的影响, 进而验证其抗炎消肿作用, 并进一步阐释其潜在作用机制, 为蠲痹历节清方治疗痛风性关节炎及该方的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

雄性, SPF 级 8 周龄 SD 大鼠 48 只, 体质量(200±20)g。(湖南中医药大学动物实验中心提供, SPF 级,

* 基金项目: 国家自然科学基金(81574005)

收稿日期: 2017-04-23

作者简介: 周彪(1986-), 男, 湖南湘潭人, 博士, 主治医师, 研究方向: 筋伤与骨病的中医药防治。

△通信作者: 熊辉, E-mail: xh-hn@sina.com

许可证号:SCXK(湘)2015-0006)。对实验动物的处置均符合相关动物伦理学标准条例。

1.1.2 实验药物及试剂

蠲痹历节清方:苍术 20g,黄芩 10g,黄柏 10g,茵陈 15g,土茯苓 15g,防己 10g,白术 10g,泽泻 10g,当归 15g,甘草 6g 等。中药由湖南中医药大学第二附属医院药剂科提供。依托考昔片(美国 Merck Sharp & amp, 60mg/片,批号:H20130299)。尿酸钠盐(北京 Solarbio)、氧嗪酸钾(上海瀚渤)。TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β (R&D)酶联免疫分析试剂盒购自安迪生物科技(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 灌胃用药品的配制

蠲痹历节清方的配制:中药由湖南中医药大学第二附属医院药剂科进行煎煮、浓缩至相当于原生药浓度 2.2g/mL,用前加蒸馏水配成所需浓度。依托考昔片水溶液:将其片研成细粉末,配置成含药浓度为 1.1mg/mL 悬浊液。配制液置 4℃冰箱中备用。

1.2.2 分组、造模及给药

48 只 SD 雄性大鼠常规适应性饲养 1w 后,随机分为 A(正常对照)、B(模型对照)、C(蠲痹历节清方治疗)和 D(阳性对照)4 组,每组 12 只。

除正常对照组(A 组)外,其余 3 组大鼠均参照文献[8]的方法,遵照无菌操作原则,以 1mL 注射针头经大鼠左膝关节髌骨上方髌骨韧带外侧刺入至关节腔,将 0.2mL 浓度为 25mg/mL 的尿酸钠溶液注入膝关节腔内,以对侧关节囊鼓起为注入标准,制作大鼠左膝关节痛风性关节炎模型。A 组向左膝关节腔注入同等体积的生理盐水。

造模后的 SD 大鼠出现毛色干枯、变黄,甚至脱落;出现进食、饮水减少;左膝关节肿胀、发红伴肤温增高,患肢不能着地,呈现出典型的三足步态,活动量明显减少。提示造模成功。

完成造模后即刻给予相应药物干预。参照课题组前期研究结果^[9]:C 组蠲痹历节清方灌胃采用最佳治疗剂量,即 44g/(kg·d)。D 组依托考昔参照人与动物间效剂量换算方法折算出大鼠等效剂量^[10],即 11mg/(kg·d),最终得出大鼠的具体给药剂量^[9]溶于生理盐水并定容至 10mL,备用。A、B 两组大鼠以等体积的生理盐水灌胃。各组均灌胃 2d。

1.2.3 膝关节肿胀指数检测

参照文献[11]提供的方法,分别于造模前、造模后 4h、12h、24h、48h 5 个时相点测量各组大鼠左膝关节周径,并根据公式计算膝关节肿胀指数。关节肿胀指数=(造模后周长-造模前周长)/造模前周长。

1.2.4 滑膜组织炎症因子检测

于造模 48h 后,将大鼠腹腔注射麻醉后处死取材,取得的滑膜组织置于研钵中研碎,加入生理盐水,匀浆后离心,取上清液采用 ELISA 法检测滑膜组织中炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2、TGF- β)的含量,具体检测步骤参照试剂盒说明进行。

1.2.5 统计学方法

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并采用 SPSS20.0 统计软件处理,符合正态分布且方差齐同,组间差异比较采用单因素方差分析,不符合正态分布,使用秩和检验;组内前后比较采用配对 *t* 检验。以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠膝关节肿胀指数的影响

药物干预后 4h、12h、24h、48h,与正常对照组(A 组)同时相点比较,动物造模后各造模组(即 B、C、D 组)大鼠膝关节肿胀指数均明显升高($P<0.01$),提示大鼠急性痛风性关节炎造模成功;蠲痹历节清方治疗组(C 组)、依托考昔治疗组(D 组)与模型组(B 组)比较,药物干预后 12h、24h、48h 肿胀指数均有不同程度降低,组间比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点膝关节肿胀指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	干预后 4h	干预后 12h	干预后 24h	干预后 48h
A 组	12	0.064 $\pm$ 0.008	0.056 $\pm$ 0.009	0.032 $\pm$ 0.002	0.015 $\pm$ 0.004
B 组	12	0.277 $\pm$ 0.012 ^{▲▲}	0.323 $\pm$ 0.016 ^{▲▲}	0.297 $\pm$ 0.012 ^{▲▲}	0.224 $\pm$ 0.015 ^{▲▲}
C 组	12	0.220 $\pm$ 0.008 ^{**}	0.275 $\pm$ 0.009 ^{**}	0.243 $\pm$ 0.011 ^{**}	0.122 $\pm$ 0.011 ^{**}
D 组	12	0.234 $\pm$ 0.010 ^{**}	0.282 $\pm$ 0.011 ^{**}	0.256 $\pm$ 0.012 ^{**}	0.164 $\pm$ 0.013 ^{**}

注:A 组:正常对照组;B 组:模型组;C 组:中药蠲痹历节清方治疗组;D 组:依托考昔治疗组。与 A 组(正常对照组)相比,▲ $P<0.05$;▲▲ $P<0.01$;与 B 组(模型组)相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

各组大鼠膝关节肿胀指数变化趋势表现为:造模后各组大鼠膝关节肿胀指数升高,至药物干预后 12h 达到高峰;药物干预后 24h 开始逐步呈下降趋势。见图 1。

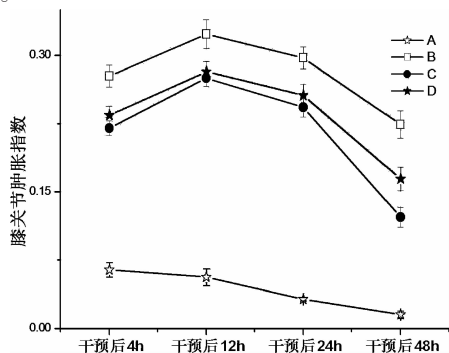


图 1 各组大鼠不同时相点膝关节肿胀指数比较

表 2 各组滑膜组织中炎症因子水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	IL-6 ($\mu\text{g/L}$)	IL-1 β (ng/L)	Cox-2 ($\mu\text{g/L}$)	TGF- β ($\mu\text{g/L}$)
A 组	12	0.32 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.03	88.21 $\pm$ 10.03	0.18 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.03
B 组	12	0.51 $\pm$ 0.02*	0.94 $\pm$ 0.03*	266.75 $\pm$ 25.18*	0.31 $\pm$ 0.01*	1.10 $\pm$ 0.06*
C 组	12	0.28 $\pm$ 0.01▲■	0.55 $\pm$ 0.01▲■	96.15 $\pm$ 12.84▲■	0.24 $\pm$ 0.01▲■	2.13 $\pm$ 0.14▲■
D 组	12	0.67 $\pm$ 0.02▲	0.67 $\pm$ 0.02▲	134.63 $\pm$ 18.20▲	0.16 $\pm$ 0.01▲	1.77 $\pm$ 0.11▲

注:A:正常对照组;B:模型组;C:蠲痹历节清方治疗组;D:阳性药物依托考昔对照组。与 A 组比较,* $P<0.05$;与 B 组比较,▲ $P<0.05$;与 D 组比较,■ $P<0.05$

3 讨论

痛风是一个古老的疾病。尿酸钠盐(MSU)在关节内沉积引起的一系列关节周围组织炎症反应是痛风性关节炎公认的关键病理因素^[12]。当机体接受一定刺激后(如创伤、寒冷等),尿酸盐结晶脱落进入关节腔,体内多种介导炎症反应的固有免疫细胞(巨噬细胞、中性粒细胞和滑膜细胞)被激活,参与识别和吞噬局部沉积的尿酸钠盐,进而引起局部关节红肿疼痛和细胞内多种炎性信号通路被激活^[2,3,13]。近年来研究发现,单核-巨噬细胞、滑膜细胞中产生的大量细胞因子形成的炎症信号通路网络失衡在痛风性关节炎的病程中起重要作用^[14-15],其中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2 等致炎因子在痛风性关节炎局部组织炎症反应过程中起关键作用^[14],而 TGF- β 作为抗炎因子,被认为与痛风的自限性高度相关^[15]。因此本题选择关节滑膜组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2、TGF- β 作为观察靶点研究探讨蠲痹历节清方的抗痛风作用。

蠲痹历节清方为熊辉教授治疗痛风性关节炎的

2.2 对大鼠膝关节滑膜组织中炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2、TGF- β)的影响

模型组(B组)滑膜组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2 测定值较正常对照组(A组)明显升高($P<0.05$),而 TGF- β 测定值明显低于正常对照组($P<0.05$),说明造模后滑膜组织炎症反应明显。而 C、D 两组造模后分别经蠲痹历节清方和依托考昔灌胃干预后, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2 测定值较模型组(B组)明显下降($P<0.05$),而 TGF- β 明显升高($P<0.05$),说明蠲痹历节清方能够有效抑制滑膜组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2 的表达,同时升高 TGF- β 的表达,具有良好的抗炎作用。见表 2。

经验方,作为大学多家附属医院的院内协定处方,在长期的临床应用中疗效确切,能有效缓解患者关节肿痛等临床症状,并能有效降低血尿酸水平。方中茵陈清热利湿,苍术祛风散寒、健脾燥湿,两者共为君药;黄芩、黄柏清热燥湿,防己祛风湿、止痛、利水消肿,土茯苓解毒除湿、通利关节,四者共为臣药;佐以泽泻利水渗湿、泄热,当归活血止痛,白术益气健脾、燥湿利水;甘草为使以缓急止痛、调和诸药。诸药合用,共奏清热健脾燥湿、通利活血止痛之功。

本研究结果显示,蠲痹历节清方能够有效抑制尿酸钠盐诱导的大鼠痛风模型膝关节肿胀。此外蠲痹历节清方还能有效降低大鼠模型膝关节滑膜组织中炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2)的水平,同时升高抗炎因子 TGF- β 的水平,从而显示其良好的抗炎作用,揭示蠲痹历节清方可能通过抑制局部组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2 的合成和释放,并增加 TGF- β 的合成和释放起到抗炎作用。此外,从实验结果中还可以发现,除 COX-2 以外,蠲痹历节清方对炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、TGF-

β) 的调控作用均优于阳性药物依托考昔。这可能是因为依托考昔的作用是通过选择性抑制 COX-2, 最终通过抑制体内 PGs 的合成起到抗炎镇痛的作用, 其作用靶点明确单一。而蠲痹历节清方作为中药复方, 具有化学成分复杂, 多作用靶点的特点。本研究从组织中炎症分子水平探讨蠲痹历节清方治疗痛风性关节炎的作用机制, 但对炎症因子上游细胞分子和痛风相关细胞信号通路的调节作用及靶点的研究仍有待进一步深入。如从组织病理学水平以及从基因和蛋白表达水平检测炎症细胞因子及模式识别受体相关信号通路在关节局部组织和靶细胞中的表达均是课题组下一步将要研究的内容。

参考文献:

- [1] Vinik O, Wechalekar MD, Falzon L, et al. Treatment of asymptomatic hyperuricemia for the prevention of gouty arthritis, renal disease, and cardiovascular events: a systematic literature review[J]. J Rheumatol Suppl, 2014, 92: 70-74.
- [2] Kostalova E, Pavelka K, Vlaskova H, et al. Hyperuricemia and gout due to deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in female carriers: New insight to differential diagnosis [J]. Clin Chim Acta, 2015, 440: 214-217.
- [3] Bakker PJ, Butter LM, Kors L, et al. Nlrp3 is a key modulator of diet-induced nephropathy and renal cholesterol accumulation [J]. Kidney Int, 2013, 85 (5): 1112-1122.
- [4] 陆小龙, 郭玉星, 熊辉, 等. 蠲痹历节清方治疗湿热蕴结型痛风性关节炎的临床观察 [J]. 中医药导报, 2015, 21 (5): 23-25.
- [5] 齐新宇, 董大立, 熊辉, 等. 蠲痹历节清方治疗急性痛风性关节炎湿热证疗效观察 [J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34 (5): 42-44.
- [6] 齐新宇. 蠲痹历节清方对实验性鸡痛风模型尿酸代谢的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [7] 齐新宇, 熊辉, 周彪, 等. 蠲痹历节清方干预鸡急性痛风性关节炎模型的实验研究 [J]. 中医正骨, 2015, 27 (3): 5-11.
- [8] 吕军, 吕芳, 方和金, 等. 高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的建立 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23 (27): 11-16.
- [9] 郭玉星. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路的蠲痹历节清方治疗痛风性关节炎机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [10] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民军医出版社, 2012: 1662.
- [11] 黄永明, 潘建科, 郭达, 等. II 型胶原蛋白酶诱导 SD 大鼠膝关节炎模型的建立 [J]. 广东医学, 2015, 36 (8), 1145-1148.
- [12] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学[M]. 4 版. 北京: 人民军医出版社, 2012: 1662.
- [13] Licandro U, Ling Khor H, Beretta O, et al. The NLRP3 inflammasome affects DNA damage responses alter oxidative and genotoxic stress in dendritic cells [J]. Eur J Immunol, 2013, 43 (8): 2126-2137.
- [14] Terkeltaub RA, Schumacher HR, Carter JD, et al. Rilonacept in the treatment of acute gouty arthritis: a randomized, controlled clinical trial using indomethacin as the active comparator [J]. Arthritis Reseach Therapy, 2013, 15 (1): R25.
- [15] Schlesinger N, De Meulemeester M, Pikhlik A, et al. Canakinumab relieves symptoms of acute flares and improves health-related quality of life in patients with difficult-to-treat Gouty Arthritis by suppressing inflammation: results of a randomized, dose-ranging study [J]. Arthritis Research Therapy, 2011, 13 (2): R53.

(编辑: 徐建平)

(英文摘要见第 32 页)

Antibacterial Properties of Total Extract and Ethanol Segments from Stem of *Evodia leptota* (Spreng.) Merr. against Common Pathogenic Bacteria in Vivo and in Vitro

GAO Ying, SHI Bing, YAN Hong, ZHAN Yi, ZHA Yufeng, ZHANG Xuemei, LI Xuhong

(Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming/Innovation and R&D Center, Yunnan Bai Yao Group, Kunming/
Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** Antibacterial properties of total extract and ethanol segments from stem of *Evodia leptota* (Spreng.) Merr. in vivo and in vitro. **Methods** In vitro, minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by using the serial 2-fold broth dilution methods. In vivo, a sepsis mouse model challenged with sublethal *Staphylococcus aureus* was established to evaluate the anti-infective effect of these samples. **Results** Except the MICs of the total extract for two *Staphylococcus aureus* strains ATCC29213, ATCC43300 were both 12.5 mg/ml (206.3 mg crude drug/ml), the total extract had no significant inhibition on other pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis*. In vivo, compared with the model group, the total extract of *Evodia leptota* (Spreng.) Merr. significantly increased survival rate of the septic mice within 168 hours ($P < 0.01$). The survival rates were markedly higher in the segments (SYK20, 90)-treated groups than that in the model group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). The survival rate was highest in the SYK90, but it was slightly lower than the total extract. **Conclusion** Taken together, in vitro, the total extract from *Evodia leptota* (Spreng.) Merr. significantly inhibits the growth of *Staphylococcus aureus*. In vivo, the total extract total extract and ethanol segments (SYK20, 90) significantly protects the sepsis mice challenged with sublethal *Staphylococcus aureus*.

KEY WORDS: *Evodia leptota* (Spreng.) Merr.; bacteria; mice; sepsis

(原文见第 15 页)

Effect of Juanbilijieqing Decoction on Joint Swelling Index and Inflammatory Factors in Synovial Tissues of Rats with Gouty Arthritis

ZHOU Biao^{1,3}, GUO Yuxing², LU Xiaolong², ZHOU Youliang¹, ZENG Peng², QI Xinyu¹, XIONG Hui¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The Second Hospital Affiliated to Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China;

3. The First People's Hospital of Xiangtan, Xiangtan 411101, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effects of Juanbilijieqingfang on Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β), cyclooxygenase-2 (COX-2) and Transforming growth factor (TGF- β) expression levels in the knee joint synovium tissues, and explore the therapeutic mechanism of Juanbilijieqingfang in rats with monosodiumurate (MSU) crystals-induced gouty arthritis. **Methods** The rats were divided into normal group, model group, Juanbilijieqingfang group, Eloricoxib group. Each group of 12. In addition to the control group, the remaining 3 groups were given on Local intra-articular injection of sodium urate gouty arthritis rat model knee, The normal group and model group were ig administered with normal saline; various treatment groups were ig administered with corresponding doses for continuous 2 days. The knee circumference was measured at different time points before and after modeling, and the knee swelling index was calculated. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 and TGF- β in synovial tissue of rat knee were detected by ELISA. **Results** Data from our study showed that Compared with control group, The rat with gouty arthritis induced by MSU crystal demonstrated an elevation in TNF- α , IL-6, IL-1 β , COX-2 in synovium tissues ($P < 0.05$). While the content of TGF- β was significantly decreased ($P < 0.05$). And compared to Juanbilijieqingfang group, the rat knee swelling index in the model group was significantly lower ($P < 0.05$), and synovial tissue of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and COX-2) were significantly lower than those in Juanbilijieqingfang group ($P < 0.05$), while the levels of anti-inflammatory factor TGF- β were significantly higher than those of Juanbilijieqingfang group ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of Juanbilijieqingfang can effectively eliminate the inflammatory swelling of knee joint in gouty arthritis rats. The mechanism may be related to the inhibition of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and COX-2 in local tissue, while increasing the local tissue anti-inflammatory factor TGF- β content.

KEY WORDS: Juanbilijieqing Formula; gout arthritis; joint swelling index; inflammatory cytokines