

# 加味四妙散汤剂对大鼠急性痛风性关节炎的疗效及可能作用机制的研究

刘璐 张全波 青玉凤 周京国 何泳龙

**【摘要】 目的** 探讨加味四妙散汤剂 (MSD) 对急性痛风性关节炎的疗效及其可能的作用机制。**方法** 建立大鼠急性痛风性关节炎模型, 将大鼠分为模型组、秋水仙碱组 (PC 组)、加味四妙散汤剂低剂量组 (MSD1 组) 及高剂量组 (MSD2 组), 另设立空白对照组 (BC 组), 分别予相应药物灌胃, 在 0、6、24、48、72 h 测定各组大鼠右踝关节肿胀指数; 给药 3 d 后收集各组关节液, ELISA 法检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的含量; 处死大鼠, 收集各组关节周围软组织制作病理组织切片, 显微镜下观察炎症细胞浸润程度。**结果** 模型组在各时点的关节肿胀度均高于 BC 组 ( $P$  均  $<0.05$ )。与 BC 组相比, 模型组大鼠注射尿酸盐后 6 h 关节肿胀, 24 h 肿胀达高峰。在注射尿酸盐 24 h 后, PC 组、MSD1 组、MSD2 组大鼠的关节肿胀度均比模型组降低 ( $P$  均  $<0.05$ ); MSD1 组、MSD2 组大鼠的关节肿胀度高于 PC 组 ( $P$  均  $<0.05$ ); MSD2 组的关节肿胀度均比 MSD1 组降低 ( $P$  均  $<0.05$ )。模型组关节液中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平均高于 BC 组 ( $P$  均  $<0.05$ )。治疗后, PC 组、MSD1 组、MSD2 组关节液中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平均低于模型组 ( $P$  均  $<0.05$ )。显微镜下见 PC 组、MSD1 组、MSD2 组关节软组织的炎症细胞浸润均较模型组减少。**结论** MSD 可能通过抑制炎症细胞的聚集、下调关节液中炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达, 减轻痛风性关节炎的急性炎症反应。

**【关键词】** 急性痛风性关节炎; 加味四妙散; 大鼠; 白介素-1 $\beta$ ; 白介素-6; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

## Effect and potential mechanism of modified Simiao decoction in rat models with acute gouty arthritis

Liu Lu, Zhang Quanbo, Qing Yufeng, Zhou Jingguo, He Yonglong. Department of Rheumatology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Corresponding author, Qing Yufeng, E-mail: 349230295@qq.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effect and potential mechanism of modified Simiao decoction (MSD) in rat models with acute gouty arthritis. **Methods** The rat models with acute gouty arthritis were established and divided into the model, colchicine (PC), low-dose (MSD1) and high-dosage MSD (MSD2) and blank control groups (BC). Rats in different groups were given with corresponding medicine via intra-gastric approach. The index of joint swelling in the right ankle was measured at 0, 6, 24, 48 and 72 h. At 3 d after medicine administration, the synovial fluid was collected for the detection of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels by ELISA. The rats were sacrificed and the soft tissues surrounding the joint were sampled and subject to histological examination of the infiltration of inflammatory cells. **Results** At different time points, the index of joint swelling in the model group was significantly higher compared with that in the BC group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the BC group, joint swelling was observed at 6 h and peaked at 24 h after MSD administration in the model group. At 24 h following MSD administration, the index of joint swelling in the PC, MSD1 and MSD2 groups was significantly lower than that in the model group (all  $P < 0.05$ ). The index of joint swelling in the MSD1 and MSD2 groups was considerably higher compared with that in the PC group (all  $P < 0.05$ ). The index of joint swelling in the MSD2 group was significantly lower than that in the MSD1 group at different time

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2017.06.003

基金项目: 国家重点研发计划“精准医学研究专项”(2016YFC0903503); 国家自然科学基金(81401767); 四川省科技支撑计划基金项目(2012SZ0171)

作者单位: 637000 南充, 川北医学院附属医院风湿科

通讯作者, 青玉凤, E-mail: 349230295@qq.com

points (all  $P < 0.05$ ). In the model group, the expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly up-regulated than those in the BC group. The expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  in PC, MSD1 and MSD2 groups were significantly down-regulated than those in the BC group (all  $P < 0.05$ ). Under microscope, the quantity of infiltrative inflammatory cells in the PC, MSD1 and MSD2 groups was lower compared with that in the model group. **Conclusions** MSD can mitigate the inflammatory response in rats with acute gouty arthritis by suppressing the aggregation of inflammatory cells, down-regulating the expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in synovial fluid.

**【Key words】** Acute gouty arthritis; Modified Simiao decoction; Rat; IL-1 $\beta$ ; IL-6; TNF- $\alpha$

痛风是指尿酸生成增多和(或)排泄减少所致的血尿酸升高,尿酸盐晶体沉积于组织或器官的一组临床综合征。痛风典型的临床表现为受累关节的红、肿、热、痛及功能障碍,甚至出现关节致残及肾衰竭,危害严重。作为痛风急性发作的一线用药,秋水仙碱、NSAID 及糖皮质激素(激素)存在着胃肠道、肝肾等不良反应<sup>[1]</sup>。因此,开发一种有效、不良反应少的药物是非常必要的。我国传统医学对痛风性关节炎急性发作的治疗以清热利湿、活血泻浊、化淤通络为主,常用四妙方治疗,而土茯苓是四妙散组方中最常见的单味中药,能解毒、除湿、通利关节。我院临床上用土茯苓加四妙散汤剂(加味四妙散汤剂, MSD)治疗急性痛风性关节炎患者发现有效,但其具体机制不详。有研究证实, IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  等炎症介质在尿酸盐晶体诱导的痛风性关节炎中发挥重要作用<sup>[2-3]</sup>。本研究构造急性痛风性关节炎鼠模型,予不同浓度 MSD 灌胃后观察疗效,并检测关节周围软组织炎症细胞的变化、关节滑液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-6 炎症介质的变化,从而为 MSD 治疗急性痛风性关节炎的疗效提供理论依据,也为其可能机制及以后药物的药理、毒理研究提供理论依据。

## 材料与方法

### 一、实验动物

健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 45 只,体质量 180~220 g,约 3 月龄。所有大鼠均由川北医学院实验动物中心提供,动物生产许可证号: SCXK(川) 2013-18、使用许可证号: SYXK(川) 2013-076。分笼饲养,饲养环境室温 22~24℃,自由饮食、饮水,自然昼夜节律光照,定期更换垫料。标准饲料由川北医学院实验动物中心提供。实验过程中对动物的处置符合相应的伦理学原则。

### 二、药物制备及主要试剂

#### 1. 尿酸盐混悬液的制备

在无菌的超净台上,用高压灭菌干燥的 1.5 ml

的离心管,量取 2 管 80 mg 的尿酸盐晶体(已制作好,无热源、无内毒素),用灭菌后的枪头取 1 ml 的磷酸盐缓冲液(PBS)配成 80 mg/ml 的混悬液。

#### 2. 受试药物

实验用药: MSD 由 5 味中草药组成,包括黄柏 15 g、苍术 15 g、牛膝 15 g、薏苡仁 30 g、土茯苓 30 g,以上中药由南充市泰鹏药业有限公司提供,均为优质生药。根据人与动物及各类动物间药物剂量的换算方法, MSD 低、高剂量组分别为正常成人临床用药量的 6.25 倍、12.5 倍。

MSD 的煎剂及浓缩:取上述药物共 10 付,用 10 倍体积蒸馏水泡 30 min 后煎煮 2 次,每次煎约 90 min,合并 2 次水煎液,用高压旋转蒸发仪将其浓缩至 233 ml,使生药浓度为 4.5 g/ml。

#### 3. 其他药物

秋水仙碱混悬液的制备:将云南植物药业有限公司生产的秋水仙碱(每片 0.5 mg,共 20 片)用研钵磨碎,将粉末溶于蒸馏水中形成 0.01 mg/ml 的混悬液。

以上药物经冷却后分装,置于 4℃ 冰箱保存备用。

#### 4. 主要试剂和仪器

尿酸钠为美国 Sigma 公司产品;大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA KIT 均购自武汉博士德有限公司。DHP-420 电热恒温培育箱(Etrnal 永恒公司);酶标仪(澳大利亚 TECAN 公司);-80℃超低温冰箱(香港力康生物医疗科技控股集团);游标卡尺(永康五金公司)

### 三、方 法

#### 1. 动物分组及处理

45 只大鼠在开放式实验环境中适应性喂养 1 周后,随机分为 5 组,即模型组、空白对照组(BC 组)、MSD 低剂量组(MSD1 组)、MSD 高剂量组(MSD2 组)、秋水仙碱组(PC 组),每组各 9 只大鼠。

2. 痛风性关节炎动物模型的制作及给药

对大鼠行吸入乙醚麻醉后，在无菌条件下选右踝关节外侧后方为穿刺点，针口斜面朝前上方与胫骨成 45 度夹角穿入踝关节腔，向 BC 组大鼠右踝关节注入 PBS 50 μl，其余组别大鼠的关节腔均注入 50 μl 80 mg/ml 的尿酸盐混悬液，以关节囊对侧鼓起为注入标准，随后在关节腔注射部位涂少量红霉素软膏预防感染。尿酸盐注射 1 h 后，BC 组、模型组以生理盐水灌胃，2.5 ml/次，每日 1 次；MSD1 组、MSD2 组分别以 10.94、21.88 g/(kg·d) 的剂量给大鼠灌服加味四妙散汤剂混悬液 2.5 ml，每日 1 次；PC 组按 0.1 mg/(kg·d) 的剂量给大鼠灌服秋水仙碱混悬液 2.5 ml，每日 1 次。治疗期间，各组大鼠均自由饮水及正常饮食。实验过程中，因乙醚麻醉过度有 2 只大鼠死亡，有 3 只大鼠因斗殴致外伤感染淘汰。连续给药 3 d。

3. 关节肿胀度的检测

在 0、6、24、48、72 h 用缚线法于各组大鼠右踝关节的同一部位测量其周长，计算关节肿胀指数，关节肿胀指数 = (测定时间点关节周长 - 初始周长)/初始周长，初始周长即 0 h 时周长。

4. 关节液炎症因子的检测

末次给药后 1 h，在戊巴比妥腹腔注射麻醉下，用颈椎脱臼法将其处死，随后用 1 ml PBS 对右踝关节腔进行冲洗，收集冲洗液，4℃、12 000 转/分

离心 10 min，取上清液用 ELISA 法检测各细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平，检测步骤参考试剂盒说明书。

5. 病理组织学检测

取右侧踝关节，切开发节囊，剥离关节周围软组织，用甲醛溶液固定各组大鼠的关节周围软组织后包埋、切片、行苏木素-伊红（HE）染色，显微镜下观察各组炎症细胞浸润情况。

四、统计学处理

应用 SPSS 17.0 对检测结果进行统计学分析。结果以  $\bar{x} \pm s$  表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、5 组大鼠的关节肿胀度比较

模型组在各时点的关节肿胀度均高于 BC 组 (*P* 均 < 0.05)。与 BC 组相比，模型组大鼠注射尿酸盐后 6 h 关节肿胀，24 h 肿胀达高峰。在注射尿酸盐 24 h 后，PC 组、MSD1 组、MSD2 组大鼠的关节肿胀度均比模型组降低 (*P* 均 < 0.05)；MSD1 组、MSD2 组大鼠的关节肿胀度均高于 PC 组 (*P* 均 < 0.05)；MSD2 组的关节肿胀度均比 MSD 1 组降低 (*P* 均 < 0.05)，见表 1。

表 1		不同时点 5 组大鼠的关节肿胀度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )				%
组 别	例数	6 h	24 h	48 h	72 h	
BC 组	8	4.68 ± 1.38	4.07 ± 1.18	1.56 ± 0.81	1.18 ± 0.54	
模型组	8	9.32 ± 0.97 <sup>b</sup>	10.05 ± 0.83 <sup>a</sup>	8.49 ± 1.22 <sup>a</sup>	5.21 ± 0.57 <sup>b</sup>	
PC 组	8	9.30 ± 0.89 <sup>b</sup>	4.23 ± 0.46 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.50 <sup>ce</sup>	1.95 ± 0.67 <sup>ad</sup>	
MSD1 组	8	9.20 ± 0.69 <sup>b</sup>	7.90 ± 0.38 <sup>ace</sup>	5.95 ± 0.32 <sup>ce</sup>	3.61 ± 0.95 <sup>bdf</sup>	
MSD2 组	8	9.85 ± 0.83 <sup>b</sup>	6.30 ± 0.97 <sup>aceg</sup>	4.02 ± 0.79 <sup>ceg</sup>	2.15 ± 0.65 <sup>bgh</sup>	
<i>F</i> 值		37.99	57.94	98.02	42.65	
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

注：与 BC 组比较，<sup>a</sup>*P* < 0.05、<sup>b</sup>*P* < 0.01；与模型组比较，<sup>c</sup>*P* < 0.05、<sup>d</sup>*P* < 0.01；与 PC 组比较，<sup>e</sup>*P* < 0.05、<sup>f</sup>*P* < 0.01；与 MSD1 组比较，<sup>g</sup>*P* < 0.05、<sup>h</sup>*P* < 0.01

二、5 组大鼠关节液中的炎症因子表达水平比较

模型组关节液中的 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达水平均高于 BC 组 (*P* 均 < 0.05)。给药 3 d 后，PC 组、MSD1 组、MSD2 组关节液中的 IL-1β、IL-6、

TNF-α 表达水平均低于模型组 (*P* 均 < 0.01)。MSD1 组、MSD2 组与 PC 组关节液中的 IL-1β、IL-6 表达水平组间比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。MSD1 组、MSD2 组关节液中的 TNF-α 表达水平高于 PC 组 (*P* 均 < 0.05)，见表 2、图 1。

表 2		5 组大鼠关节液中的炎症因子表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )			ng/L
组 别	例数	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	
BC 组	8	95.02 $\pm$ 28.79	144.93 $\pm$ 24.78	111.81 $\pm$ 28.88	
模型组	8	202.64 $\pm$ 108.77 <sup>a</sup>	281.88 $\pm$ 59.64 <sup>b</sup>	638.37 $\pm$ 98.02 <sup>a</sup>	
PC 组	8	69.68 $\pm$ 26.66 <sup>c</sup>	120.54 $\pm$ 31.03 <sup>d</sup>	138.19 $\pm$ 36.10 <sup>c</sup>	
MSD1 组	8	111.99 $\pm$ 39.18 <sup>c</sup>	161.53 $\pm$ 31.16 <sup>d</sup>	232.58 $\pm$ 33.51 <sup>ace</sup>	
MSD2 组	8	94.83 $\pm$ 46.33 <sup>cd</sup>	140.73 $\pm$ 40.76 <sup>df</sup>	262.89 $\pm$ 45.45 <sup>acef</sup>	
F 值		6.19	21.27	120.07	
P 值		0.001	<0.001	<0.001	

注：与 BC 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，<sup>b</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ，<sup>d</sup> $P < 0.01$ ；与 PC 组比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$ ；与 MSD1 组比较，<sup>f</sup> $P < 0.05$

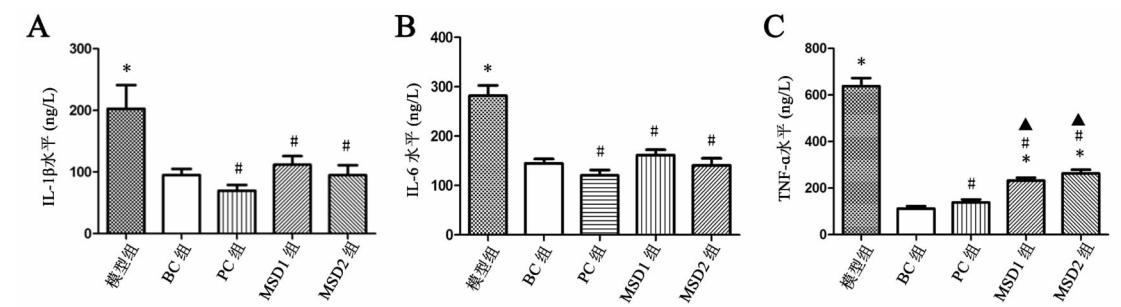


图 1 MSD 对大鼠急性痛风性关节炎模型关节液中 IL-6 表达的影响

与 BC 组比较，\* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ；与 PC 组比较，▲ $P < 0.05$

三、5 组大鼠关节周围软组织的病理组织学观察结果

显微镜下观察 5 组大鼠的关节周围软组织石蜡切片，结果示 BC 组关节周围软组织未见炎症细胞浸润；模型组关节周围软组织可见大量的炎症细胞

浸润，其中以中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞浸润为主，伴有异物巨细胞的形成；MSD1 组及 MSD2 组关节周围软组织炎症细胞浸润较模型组减少；PC 组关节周围软组织的炎症细胞浸润较模型组、MSD1 组、MSD2 组均减少，见图 2。

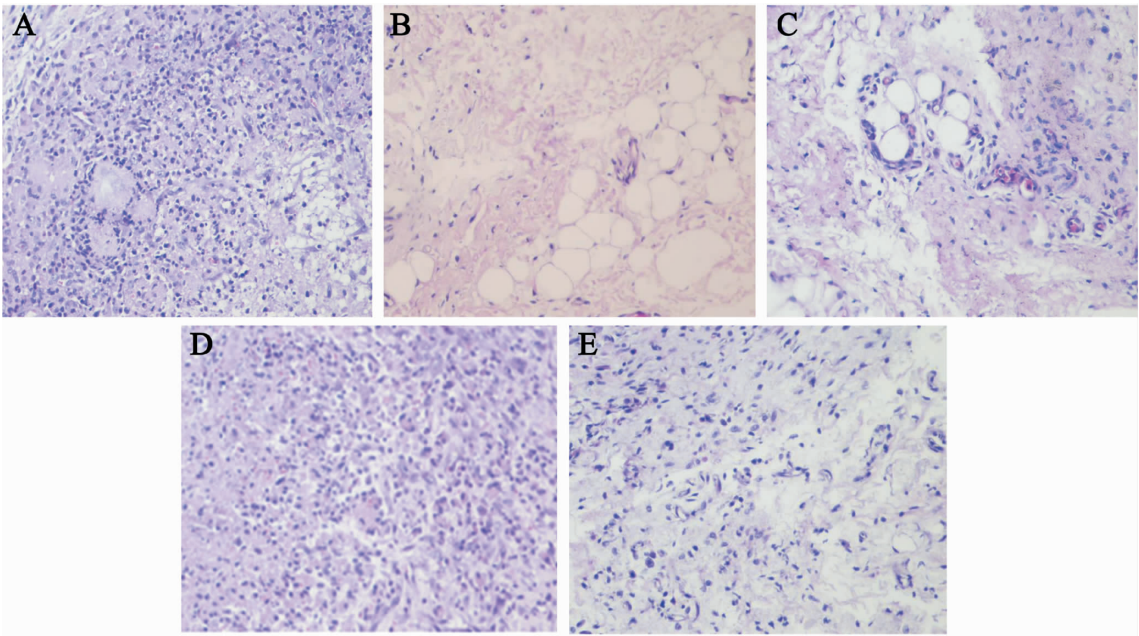


图 2 5 组大鼠右踝关节周围软组织的炎症细胞表达情况 (HE 染色， $\times 200$ )

A：模型组；B：BC 组；C：PC 组；D：MSD1 组；E：MSD2 组

## 讨 论

急性痛风性关节炎是由于尿酸盐晶体沉积在关节及关节周围组织,引起的急性无菌性炎症。作为内源性危险信号,尿酸盐被机体识别,吞噬细胞将其吞噬后可通过破坏溶酶体释放相关蛋白酶、或通过钾离子外流、或产生大量的活性氧簇等方式激活 NALP3 炎症体,进而分泌、释放成熟的有活性的 IL-1 $\beta$ ,诱导急性炎症发生。同时,释放到胞外的 IL-1 $\beta$  与 IL-1R 结合,通过激活 IL-1 信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路,募集大量炎症细胞聚集到炎症部位,并产生大量 TNF- $\alpha$ 、IL-8 等炎症细胞因子及趋化因子,引起炎症级联放大效应和尿酸盐沉积处的组织损伤<sup>[4]</sup>。多项研究表明,尿酸盐晶体介导 IL-1 $\beta$  产生的主要信号通路包括 NALP3 炎症体依赖的信号通路、Toll 样受体依赖的信号通路等<sup>[5-8]</sup>。

本研究显示,PC 组、MSD1 组、MSD2 组的关节肿胀度均比模型组低、炎症细胞浸润减少,提示土茯苓加味四妙散同秋水仙碱一样,对尿酸盐诱导的急性痛风性关节炎有疗效。本研究同时显示,PC 组、MSD1 组、MSD2 组大鼠关节液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平均比模型组低,提示 MSD 可能通过下调上述炎症细胞因子,起到对抗急性痛风性关节炎炎症反应的作用。MSD1 组、MSD2 组的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平与 PC 组均无统计学意义,而 MSD1 组、MSD2 组的 TNF- $\alpha$  表达水平比 PC 组升高,提示 MSD 抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达的能力与秋水仙碱相近,而 MSD 对 TNF- $\alpha$  表达的抑制能力弱于秋水仙碱。秋水仙碱是痛风的常用治疗药物,然而由于不良反应大,治疗剂量和中毒剂量相近,限制了其临床应用。虽然 MSD 的作用弱于秋水仙碱,但其相对秋水仙碱而言具有不良反应少、价廉的优势,具有广阔的发展空间。日后下一步研究我们将增加多组剂量疗效间的对比,以探讨最适合的应用剂量。

综上所述,MSD 可减轻痛风性关节炎的急性炎症反应,其机制可能为关节液中炎性细胞因子

IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达,进而抑制炎症细胞的聚集,减轻炎症反应。至于 MSD 通过何种信号通路抑制 IL-1 $\beta$  产生仍有待进一步研究探索。

## 参 考 文 献

- [1] Khanna D, Khanna PP, Fitzgerald JD, Singh MK, Bae S, Neogi T, Pillinger MH, Merill J, Lee S, Prakash S, Kaldas M, Gogia M, Perez-Ruiz F, Taylor W, Lioté F, Choi H, Singh JA, Dalbeth N, Kaplan S, Niyyar V, Jones D, Yarows SA, Roessler B, Kerr G, King C, Levy G, Furst DE, Edwards NL, Mandell B, Schumacher HR, Robbins M, Wenger N, Terkeltaub R; American College of Rheumatology. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 2: therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64 (10): 1447-1461.
- [2] Cavalcanti NG, Marques CD, Lins E Lins TU, Pereira MC, Rêgo MJ, Duarte AL, Pitta Ida R, Pitta MG. Cytokine profile in gout: inflammation driven by IL-6 and IL-18? *Immunol Invest*, 2016, 45 (5): 383-395.
- [3] Liu YF, Tu SH, Chen Z, Wang Y, Hu YH, Dong H. Effects of modified simiao decoction on IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion in monocytic THP-1 cells with monosodium urate crystals-induced inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 406816.
- [4] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 2008, 9 (8): 847-856.
- [5] 蒋莉,周京国,青玉凤,谢文光,杨其彬,赵明才,邢艳,魏锦,袁国华,蒋红. Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 及其信号通路在原发性痛风性关节炎发病机制中作用的研究. *中华风湿病学杂志*, 2011, 15 (5): 300-304.
- [6] 杨其彬,周京国,青玉凤,谢文光,赵明才,李敏. 痛风性关节炎患者外周血单个核细胞 NLRP3 炎症体 mRNA 表达的研究. *中华风湿病学杂志*, 2010, 14 (10): 686-689.
- [7] Busso N, Ea HK. The mechanisms of inflammation in gout and pseudogout (CPP-induced arthritis). *Reumatismo*, 2012, 63 (4): 230-237.
- [8] Steiger S, Harper JL. Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation. *Curr Rheumatol Rep*, 2014, 16 (1): 392.

(收稿日期: 2017-03-27)

(本文编辑: 林燕薇)