

白芍总苷治疗大鼠急性痛风性关节炎的作用及对血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

李振彬 马旭 杨静 刘彦卿 路占忠 李达 刘乐 刘芝

【摘要】 目的 观察白芍总苷对大鼠急性痛风性关节炎(AGA)的防治效果及对 AGA 大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平的影响。**方法** 选取雄性 SD 大鼠 48 只,随机分为对照组、模型组、秋水仙碱 0.8 mg/kg 组、白芍总苷低、中、高剂量(75、150、300 mg/kg)组,共 6 组,每组各 8 只大鼠。给药 5 d 后,采用踝关节注射微晶型尿酸钠(MSU)混悬液法建立 AGA 大鼠模型。检测基线期及造模后不同时间点的踝关节直径,以造模后与基线期踝关节直径的差值作为关节肿胀度。试验结束后,大鼠腹主动脉采血,ELISA 检测血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量,比较组间差异。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠造模后不同时间点的关节肿胀度均增加(P 均 <0.01);与模型组相比,白芍总苷低、中、高剂量组及秋水仙碱组在造模后各时间点的关节肿胀度均降低(P 均 <0.05),各治疗组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平升高(P 均 <0.01);造模后 24 h,白芍总苷低、中、高剂量组与秋水仙碱组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平较模型组降低(P 均 <0.01),而各治疗组间比较差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。**结论** 白芍总苷对 AGA 大鼠有治疗作用,其作用机制可能与抑制 MSU 诱导的促炎细胞因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的产生有关。

【关键词】 白芍总苷;急性痛风性关节炎;肿瘤坏死因子- α ;白介素-1 β ;白介素-6;大鼠

Effect of total glucosides of peony therapy on acute gouty arthritis and serum levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in rat models Li Zhenbin, Ma Xu, Yang Jing, Liu Yanqing, Lu Zhanzhong, Li Da, Liu Le, Liu Zhi. Department of Rheumatology and Immunology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, China

Corresponding author, Li Zhenbin, E-mail: Lizhenbin1962@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of total glucosides of peony upon acute gouty arthritis (AGA) and serum levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in AGA rat models. **Methods** Forty-eight male SD rats were chosen and randomly divided into the control, model, colchicine (0.8 mg/kg), low, moderate and high dose (75, 150 and 300 mg/kg) of total glucosides of peony groups ($n=8$ for each group). At 5 d after medicine administration, AGA rat models were established by injection of microcrystalline monosodium urate (MSU) suspension in the ankle joint. The diameter of ankle joint at baseline and different time points after model establishment was measured. The difference in the ankle joint diameter before and after model establishment was used to reflect the degree of knee joint swelling. After experiment, blood sampling was collected via the abdominal aorta. The serum levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α were quantitatively measured by using ELISA and statistically compared among different groups. **Results** Compared with the control group, the degree of knee joint swelling in the model group was significantly enhanced at different time points (all $P < 0.01$). Compared with the model group, the degree of joint swelling in the low-, moderate- and high-dose total glucosides of peony, and colchicine groups was significantly decreased at different time points (all $P < 0.05$). No statistical significance was identified among different treatment groups (all $P > 0.05$). Compared with the control group, the serum levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in the model group were significantly up-regulated (all $P < 0.01$). At 24 h after model establishment, the serum levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in the low-, moderate- and

high-dose total glucosides of peony and colchicine groups were considerably down-regulated than those in the model group (all $P < 0.01$). No statistical significance was documented among different treatment groups (all $P > 0.05$). **Conclusion** Use of total glucosides of peony exerts therapeutic effect upon AGA, probably by suppressing the production of pro-inflammatory cytokines of IL-6, IL-1 β and TNF- α induced by MSU.

【Key words】 Total glucosides of peony; Acute gouty arthritis; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-1 β ; Interleukin-6; Rat

流行病学资料显示,痛风已成为最常见的炎性疾病之一^[1-2]。临床上,痛风以高尿酸血症、急性痛风性关节炎(AGA)反复发作、痛风石沉积等为特征。其中 AGA 以其疼痛剧烈、影响生活和工作,反复发作可致关节活动障碍,成为患者就医的主要原因。目前,针对 AGA 以及降尿酸过程中预防 AGA 发作的一线药物有 NSAID、秋水仙碱和糖皮质激素(激素)。研究发现,患者在使用上述药物 36~48 h 后仍遗留 50% 的急性疼痛^[3]。同时,上述药物的不良反应也在一定程度上限制其临床应用,特别是影响患者在降尿酸初始 6 个月应用其预防 AGA 发作的依从性^[4]。为此,寻找新的痛风治疗药物显得十分重要。本研究在既往初步实验结果的基础上,观察白芍总苷对大鼠 AGA 的治疗作用,并分析其对血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量的影响,探讨白芍总苷防治 AGA 的可能机制,为进一步临床应用提供实验依据^[5]。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,清洁级,体质量(200 \pm 50) g,购自河北医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(冀)2013-1-003,饲养于白求恩国际和平医院 SPF 级动物房。饲养条件:固定光照时间(白天 07:00—19:00,夜间 19:00—07:00),温度 24~27℃,空气湿度 24%~29%。适应性喂饲 1 周后开始实验。实验中涉及的大鼠实验方案均经白求恩国际和平医院医学伦理委员会批准。

2. 主要试剂与仪器

主要试剂:白芍总苷(由宁波朗生药业有限公司提供,批号 150912);秋水仙碱(美国 Sigma 公司,批号 201509);尿酸钠(美国 Sigma 公司);IL-6 ELISA 试剂盒(RayBiotech 公司);IL-1 β ELISA 试剂盒(联科生物技术有限公司);TNF- α ELISA 试剂盒(RayBiotech 公司)。主要仪器:MK3 酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);三用游标卡尺(桂林量具刃具有限公司);MDF-U32V 超低温

冰箱(日本三洋);YLS-Q2 大鼠固定筒架(济南益延科技发展有限公司);TGL-16G 台式高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);JCZ-GPL 智能型干燥培养两用箱(上海成顺仪器仪表有限公司)。

二、实验方法

1. 微晶型尿酸钠(MSU)混悬液的制备

参照文献[6]方法加以改进:无菌条件下将 800 mg 尿酸钠加入至 5 ml 1 mol/L 氢氧化钠,混匀后加入 155 ml 去热原灭菌注射用水,煮沸,尿酸钠完全溶解后自然降温并搅拌,用 1 mol/L 的盐酸调节 pH 值至 7.0,溶液呈乳白色后即 3 000 转/分离心 2 min,吸取上清液反复离心至无沉淀析出,4℃冷却 1 h,弃去上清液,烤箱烘干,收集晶体,高压蒸汽灭菌,4℃保存备用。用前将 MSU 晶体溶于磷酸盐缓冲液(PBS),按 25 mg/ml 配成 MSU 混悬剂备用。

2. AGA 大鼠模型的建立

参照文献[7],将大鼠置于笼架内固定,在踝关节后外侧选定穿刺点,针头斜面朝向前上方、与胫骨呈 45 度刺入踝关节腔,注入 25 mg/ml 的 MSU 混悬液 100 μ l,诱导急性关节炎模型。对照组于相同部位注射等体积 PBS。

3. 实验分组及给药

48 只动物适应性喂饲 1 周后,称重、编号,按随机排列法分为秋水仙碱组、白芍总苷低剂量组、白芍总苷中剂量组、白芍总苷高剂量组、对照组、模型组,每组各 8 只大鼠,灌胃给药 5 d。其中秋水仙碱组予 0.8 mg/(kg·d),白芍总苷低剂量组予白芍总苷 75 mg/(kg·d),白芍总苷中剂量组予白芍总苷 150 mg/(kg·d),白芍总苷高剂量组予白芍总苷 300 mg/(kg·d),对照组和模型组均予等体积 0.9%氯化钠注射液。第 6 日除对照组外,各组均行 MSU 晶体注射造模,对照组予注射等量 PBS。造模 24 h 后,腹腔麻醉大鼠,腹主动脉采集血清后以脊椎脱臼法处死大鼠。

4. 关节肿胀度的测量

采用三用游标卡尺,由专人分别于造模前和造模后 1、2、4、6、8、24 h 测量大鼠右踝关节的直

径(mm)，连续测量 2 次，结果取平均值。以造模后与造模前踝关节直径的差值(mm)作为关节肿胀度。

5. IL-1β、IL-6、TNF-α 水平的检测

采用 ELISA 检测：造模 24 h 后各组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液麻醉，成功后取仰卧位固定，解剖腹部，暴露腹主动脉，一次性注射器取血，置普通试管，室温静置 1 h，3 000 转/分，离心 15 min，吸取上清液置于 -80℃ 超低温冰箱保存备检。血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 的检测严格按照 ELISA 试剂盒说明书的具体操作步骤进行，反应终止后采用酶标仪检测吸光度，依据样品标准曲线计算 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平。

三、统计学处理

所有数据采用 SPSS 13.0 进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 法，以 $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

结 果

一、6 组大鼠在造模后不同时间点的踝关节肿胀度比较

模型组大鼠踝关节注射 MSU 晶体后逐渐发生肿胀，于 8 h 达到高峰；与对照组相比，模型组造模后各时间点关节肿胀度均增加(P 均 < 0.01)。秋水仙碱组在注射 MSU 晶体后各时间点踝关节肿胀度均较模型组降低(P 均 < 0.01)。与模型组大鼠相比，白芍总苷低、中、高剂量组大鼠在造模后各时间点关节肿胀度均降低(P 均 < 0.05)。白芍总苷高剂量组在各时点的踝关节肿胀度与中、低剂量组比较差异均无统计学意义，秋水仙碱与白芍总苷低、中、高剂量组比较差异亦无统计学意义(P 均 > 0.05)，见表 1 和图 1。

表 1		6 组大鼠在造模后不同时间点的踝关节肿胀度比较 ($\bar{x} \pm s$)						mm
组 别	例数	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h	
对照组	8	0.40 ± 0.10	1.26 ± 0.31	1.38 ± 0.47	1.07 ± 0.53	1.58 ± 0.32	0.43 ± 0.17	
模型组	8	2.04 ± 0.56 ^c	2.69 ± 0.52 ^c	3.46 ± 0.61 ^c	4.26 ± 0.46 ^c	5.80 ± 0.76 ^c	3.20 ± 0.74 ^c	
秋水仙碱组	8	1.05 ± 0.24 ^a	1.69 ± 0.30 ^a	2.00 ± 0.46 ^a	2.30 ± 0.64 ^a	2.60 ± 0.35 ^a	1.37 ± 0.48 ^a	
白芍总苷高剂量组	8	1.12 ± 0.45 ^b	1.80 ± 0.30 ^b	2.41 ± 0.27 ^b	2.27 ± 0.48 ^a	2.92 ± 0.37 ^b	1.31 ± 0.51 ^a	
白芍总苷中剂量组	8	1.17 ± 0.47 ^b	1.88 ± 0.59 ^b	2.44 ± 0.54 ^b	2.83 ± 0.56 ^b	3.16 ± 1.06 ^b	2.01 ± 0.87 ^b	
白芍总苷低剂量组	8	1.19 ± 0.37 ^b	1.93 ± 0.46 ^b	2.65 ± 0.60 ^b	3.03 ± 0.76 ^b	3.48 ± 0.61 ^b	2.04 ± 0.67 ^b	
<i>F</i> 值		13.935	9.419	14.990	26.228	38.964	18.295	
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

注：与模型组比较，^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.05$ ；与对照组比较，^c $P < 0.01$

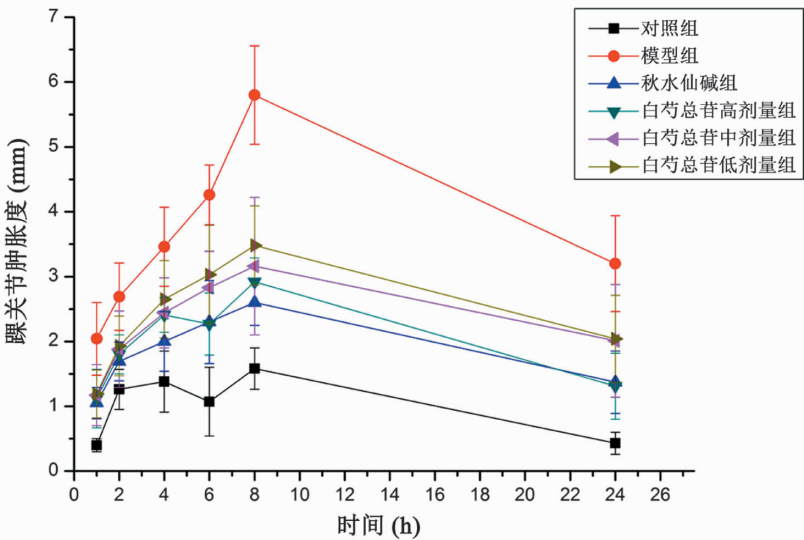


图 1 6 组大鼠造模后不同时间点的关节肿胀度变化

二、6 组大鼠的血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平比较

与对照组相比，模型组大鼠的血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均增高（*P* 均 < 0.01）。秋水仙碱组的

血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均比模型组大鼠降低（*P* 均 < 0.01）。白芍总苷低、中、高剂量组大鼠的血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均比模型组大鼠降低（*P* 均 < 0.01），见表 2 和图 2。

表 2	6 组大鼠的血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				ng/L
组 别	例数	IL-1β	IL-6	TNF-α	
对照组	8	17.7 ± 2.9	23.5 ± 3.00	85.0 ± 9.3	
模型组	8	40.4 ± 6.0 ^b	38.2 ± 5.0 ^b	120.4 ± 14.4 ^b	
秋水仙碱组	8	22.1 ± 4.1 ^a	25.9 ± 4.6 ^a	87.2 ± 16.1 ^a	
白芍总苷高剂量组	8	23.1 ± 4.2 ^a	28.3 ± 5.3 ^a	90.6 ± 12.0 ^a	
白芍总苷中剂量组	8	25.0 ± 4.9 ^a	27.7 ± 4.5 ^a	90.8 ± 13.6 ^a	
白芍总苷低剂量组	8	25.3 ± 4.5 ^a	29.9 ± 3.6 ^a	92.3 ± 14.5 ^a	
<i>F</i> 值		23.202	10.472	7.445	
<i>P</i> 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	

注：与模型组比较，^a*P* < 0.01；与对照组比较，^b*P* < 0.01

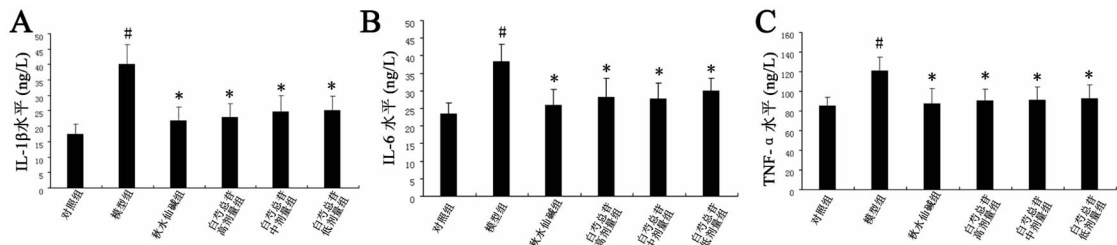


图2 6 组大鼠的血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平比较

与模型组比较，**P* < 0.01；与对照组比较，#*P* < 0.01

讨 论

AGA 是 MSU 晶体沉积于关节及其周围组织而引发的一种急性炎症反应。研究表明，MSU 晶体通过活化 NLRP3 等炎性体并激活 caspase-1 (IL-1β 转化酶)，caspase-1 裂解细胞内无活性的 IL-1β 前体促使成熟 IL-1β 形成，而 IL-1β 在与 IL-1 受体 (IL-1R) 结合后活化 IL-1 信号传导途径等导致大量 IL-1β、TNF-α、IL-6 等促炎因子表达，出现炎症级联反应^[8-9]。姜德友等^[10] 建立大鼠 AGA 模型并检测血清炎性细胞因子的表达，结果发现 AGA 模型大鼠血清中 IL-6 及 TGF-β 表达增强。本研究显示，AGA 大鼠血清 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平高于正常组大鼠，表明多种炎性细胞因子在 AGA 的发生、发展过程中发挥作用。

研究发现，多种国内外指南推荐的一线药物（包括 NSAID、秋水仙碱和激素）对 AGA 的疗效并不理想，在给药 36 ~ 48 h 后仍遗留 50% 的疼痛^[3]。由于 AGA 关节肿痛的严重程度较高，虽降

低 50% 但仍给患者留下相当大的痛苦。目前推荐的二线药物如 IL-1 拮抗剂价格昂贵，且国内尚未上市。同时，上述药物的不良反应也影响其临床应用，特别在降尿酸治疗初始 6 个月预防 AGA 发作时，患者坚持应用上述药物的依从性较差。因此，需要寻找更安全、有效的治疗方法以满足临床需求。

白芍总苷是毛茛科芍药属植物白芍的有效成分之一。现代药理研究发现，白芍总苷可通过多种途径抑制自身炎症免疫反应，具有抗炎、镇痛、护肝等作用；临床研究证实其治疗类风湿关节炎、干燥综合征等风湿性疾病具有良好疗效和安全性^[11]。笔者前期研究采用正交 *t* 值法对多种植物药有效成分在 AGA 大鼠的抗炎效应方面进行了初步筛选，结果提示白芍总苷对 AGA 大鼠关节炎症具有较强抑制作用^[5]。本研究进一步观察了白芍总苷对大鼠 AGA 的作用，并通过分析其对血清 IL-6、TNF-α、IL-1β 含量的影响初步探讨作用机制。研究结果发现：白芍总苷高、中、低剂量组均能降低

AGA 大鼠关节肿胀度,下调外周血 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 炎性细胞因子的表达,且其作用与秋水仙碱组相近。研究结果提示,白芍总苷对大鼠 AGA 具有良好疗效,其作用机制可能与抑制 IL-1 β 等多种促炎细胞因子有关。

综上所述,白芍总苷对 AGA 具有治疗作用,为 AGA 的临床治疗提示了新的选择。有关白芍总苷对预防痛风患者初始降尿酸过程中 AGA 发作以及患者长期应用的安全性及依从性,有待进一步临床研究证实。

参 考 文 献

[1] Kuo CF, Grainge MJ, Zhang W, Doherty M. Global epidemiology of gout; prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11 (11): 649-662.

[2] 方霖楷,陈启云,温义权,古洁若. 梅州地区居民高尿酸血症及痛风的流行病学调查. *新医学*, 2016, 47 (3): 183-186.

[3] Edwards NL, So A. Emerging therapies for gout. *Rheum Dis Clin North Am*, 2014, 40 (2): 375-387.

[4] 中华医学会风湿病学分会. 原发性痛风诊断和治疗指南. *中华风湿病学杂志*, 2011, 15 (6): 410-413.

[5] 路占忠,李振彬,马旭,宋哲. 采用正交 t 值法优选治疗急性痛风性关节炎的中药有效成分复方配伍. *解放军医药杂志*, 2016, 28 (11): 33-36, 41.

[6] Akahoshi T, Namai R, Murakami Y, Watanabe M, Matsui T, Nishimura A, Kitasato H, Kameya T, Kondo H. Rapid induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human monocytes by monosodium urate monohydrate crystals. *Arthritis Rheum*, 2003, 48 (1): 231-239.

[7] 黄火高,孙运峰,胡明,袁广胜,王琼,刘永学. 大鼠急性痛风性关节炎模型的建立及特点. *军事医学科学院院刊*, 2005, 29 (6): 538-542.

[8] Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol*, 2009, 21 (4): 242-253.

[9] Sidiropoulos PI, Goulielmos G, Voloudakis GK, Petraki E, Boumpas DT. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67 (10): 1382-1389.

[10] 姜德友,刘彤彤,常佳怡,解颖,陈飞,韩海伟,张旭东,韩洁茹. 补肾利湿法对大鼠痛风性关节炎 IL-6、TGF- β 的影响. *上海中医药杂志*, 2015, 49 (9): 77-80.

[11] 张源潮,孙红胜,潘正论,李鸣. 白芍总苷在风湿免疫病中的研究进展. *世界临床药物*, 2010, 31 (8): 449-453.

(收稿日期: 2017-03-15)

(本文编辑: 林燕薇)

