

# 痛风宁对急性痛风性关节炎模型大鼠 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 及 NALP3 炎性体的影响

滕方舟<sup>1</sup>, 蔡唐彦<sup>1</sup>, 郭洁梅<sup>1,2</sup>, 李保林<sup>1</sup>, 王建辉<sup>1</sup>, 赖兴泉<sup>1</sup>,  
张艺强<sup>1</sup>, 朱亚菊<sup>1</sup>, 黄露露<sup>1</sup>, 苏友新<sup>1,2\*</sup>

(1. 福建中医药大学 中医学院, 康复医学院, 福州 350122;  
2. 福建卫生职业技术学院, 福州 350101)

**[摘要]** **目的:**从核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NALP3)炎性体角度探讨痛风宁的抗炎作用机制。**方法:**将48只SD大鼠随机分为造模大鼠36只、正常大鼠12只。造模大鼠采用踝关节局部注射0.2 mL尿酸钠(monosodium urate, MSU)混悬液建立急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, AGA)模型,正常大鼠予相同部位注射生理盐水。造模成功后,随机分为模型组、痛风宁组、秋水仙碱组,分别用生理盐水、痛风宁药液、秋水仙碱混悬液灌胃,每天2次,共3 d。正常大鼠为正常组,同时予等量生理盐水灌胃。造模成功后72 h,行腹腔注射麻醉后取踝关节液及滑膜组织。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠踝关节液白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测滑膜组织NALP3炎性体相关蛋白与mRNA表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠踝关节液IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 含量显著升高,滑膜组织NALP3,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1),凋亡相关斑点样蛋白(ASC)蛋白及mRNA表达均显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,痛风宁组与秋水仙碱组大鼠踝关节液IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 含量显著下降,且滑膜组织中NALP3, Caspase-1, ASC蛋白及mRNA表达均显著降低( $P < 0.01$ );与秋水仙碱组比较,痛风宁组大鼠踝关节液IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 含量仍较高( $P < 0.05$ ),但滑膜组织中NALP3, Caspase-1, ASC蛋白及mRNA表达均较低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**痛风宁对AGA的抗炎作用机制可能是通过抑制NALP3炎性体相关蛋白及mRNA表达,从而减少IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 的生成,减轻关节炎反应。

**[关键词]** 痛风宁; 急性痛风性关节炎; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NALP3)炎性体; 白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ); 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0120-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181730

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180613.1202.004.html>

**[网络出版时间]** 2018-06-14 10:26

## Effect of Tongfengning on IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ and NALP3 Inflammasome in Model Rats with Acute Gouty Arthritis

TENG Fang-zhou<sup>1</sup>, CAI Tang-yan<sup>1</sup>, GUO Jie-mei<sup>1,2</sup>, LI Bao-lin<sup>1</sup>, WANG Jian-hui<sup>1</sup>,  
LAI Xing-quan<sup>1</sup>, ZHANG Yi-qiang<sup>1</sup>, ZHU Ya-ju<sup>1</sup>, HUANG Lu-lu<sup>1</sup>, SU You-xin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Fujjiang Health College, Fuzhou 350101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the anti-inflammatory mechanism of Tongfengning from the perspective of nucleotide binding oligomeric domain-like receptor protein 3 (NALP3) inflammasome. **Method:** A total of 48

**[收稿日期]** 20180320(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473495)

**[第一作者]** 滕方舟,在读硕士,从事骨与关节疾病防治与康复的基础与临床研究工作, E-mail:332119934@qq.com

**[通信作者]** \*苏友新,博士,教授,从事骨与关节疾病防治与康复的基础与临床研究工作, Tel:0591-22869933, E-mail: suyouxin777@hotmail.com

SD rats were randomly divided into the model rats ( $n = 36$ ) and the normal rats ( $n = 12$ ). The model rats were injected with 0.2 mL monosodium urate (MSU) suspension through the ankle joint to establish the acute gouty arthritis (AGA) model, while the normal rats were injected with saline at the same location. After the AGA model was established successfully, the model rats were randomly divided into model group, Tongfengning group and colchicine group; saline, Tongfengning liquid and colchicine suspension were administered respectively to the three groups by gavage for 3 days, twice a day. The normal rats were taken as normal group, and administered with the equal volume of saline by gavage at the same time. All of the rats received intraperitoneal anesthesia, and their synovial fluid and tissues were collected in 72 h after successful modeling. Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA), Western blot and Real-time PCR technology were used to detect the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in synovial fluid and the nucleotide binding oligomeric domains-containing protein 3 (NALP3) inflammasome-related protein and mRNA expressions in synovial tissues. **Result:** Compared with the normal group rats, the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in synovial fluid of the model group were increased, and the expressions of NALP3, cystein-aspartic acid protease-1 (Caspase-1), apoptosis-associated speck-like protein (ASC) and their mRNA in synovial tissues of the model group were increased ( $P < 0.01$ ); compared with the model group rats, the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of in synovial fluid of the Tongfengning group and the colchicine group were significantly decreased, and the expressions of NALP3, Caspase-1, ASC protein and mRNA in synovial tissues of the Tongfengning group and the colchicine group were also decreased ( $P < 0.01$ ); compared with the colchicine group rats, the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in synovial fluid of the Tongfengning group were still higher ( $P < 0.05$ ), but the expressions of NALP3, Caspase-1, ASC protein and mRNA in synovial tissues of the Tongfengning group were lower ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Tongfengning may have an anti-inflammatory mechanism in treating AGA by inhibiting the expressions of NALP3 inflammasome-related protein and mRNA, so as to decrease the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and alleviating joint inflammation.

[**Key words**] Tongfengning; acute gouty arthritis; nucleotide binding oligomeric domain-like receptor protein 3 (NALP3) inflammasome; interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )

痛风性关节炎是一种尿酸钠 (monosodium urate, MSU) 晶体沉积所致的关节疾病, 临床表现为受累关节剧烈的红肿热痛、关节活动受限, 日久常引起关节畸形等, 严重影响患者日常生活<sup>[1-2]</sup>。有研究显示<sup>[3]</sup>, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NALP3) 炎性体与本病的发生关系密切。NALP3 炎性体由 NALP3, 凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 等蛋白组成, 是细胞质外源性微生物或内源性危险信号的感受器。当 MSU 晶体作为内源性危险信号被 NALP3 蛋白识别时, 可激活 NALP3 蛋白, 使其构象发生改变, 继而 NALP3 蛋白与 ASC 蛋白及 Caspase-1 前体结合形成激活状态的 NALP3 炎性体, 后者使 Caspase-1 前体水解形成活化的 Caspase-1, 活化后的 Caspase-1 进一步促使白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 前体裂解成 IL-1 $\beta$ <sup>[4-7]</sup>, 从而诱发急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 的发作。

目前临床上针对 AGA 的西药, 如秋水仙碱、非甾体类抗炎药、肾上腺糖皮质激素, 虽治疗效果显

著, 但药物的毒副作用较大, 很难长期使用, 且部分药物影响胃肠道功能, 患者依从性差, 影响治疗效果<sup>[8]</sup>。建立在辨证论治基础上的中医药疗法, 具有标本兼治的优势, 可兼顾痛风患者的其他合并症, 具有整体调节、多靶点治疗的特点, 日益成为 AGA 治疗的研究热点。有多项研究已表明<sup>[9-12]</sup>, 中药可通过抑制 NALP3 炎性体信号通路, 下调其下游相关炎症因子如 IL-1 $\beta$ , IL-6, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达水平, 达到治疗 AGA 的目的。痛风宁是课题组经多年临床实践总结出治疗痛风的效验方, 该方由土茯苓、萆薢、丹参、肿节风等组成, 前期研究证实该方能显著降低患者血尿酸水平, 消肿镇痛、减轻关节炎症, 改善关节活动功能, 疗效确切<sup>[13-15]</sup>, 但其具体作用机制尚不明确。因此, 本实验拟从 NALP3 炎性体角度, 观察痛风宁对 AGA 模型大鼠踝关节液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量及滑膜组织中 NALP3 炎性体相关蛋白及 mRNA 表达的影响, 以探究痛风宁治疗 AGA 的具体作用机制, 为其临床推广应用奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康3月龄SPF级SD雄性大鼠48只,体质量(200±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(沪)2012-0002,委托福建中医药大学实验动物中心[实验动物使用许可证号SYXK(闽)2014-0001]代购并饲养。本实验经福建中医药大学动物伦理委员会批准(福利伦理审查号福中医[2016]伦理审字第(017)号)。

**1.2 药物与试剂** 痛风宁由土茯苓、黄柏、泽泻、金钱草(安徽嘉佑中药饮片有限公司,批号分别为170520,160801,170512,170520),苍术(安徽济顺中药饮片有限公司,批号150702),川牛膝(厦门燕来福制药有限公司,批号150803),草薢(河北楚风中成药饮片有限公司,批号8506041),丹参(广东康美药业股份有限公司,批号160650171),秦艽(江西樟树国康中药饮片有限公司,批号170201),肿节风(江西樟树天齐堂中药饮片有限公司,批号1403002)等组成;秋水仙碱片(每片0.5mg,西双版纳制药厂,批号H53021369)。所有药材均由福建中医药大学附属国医堂提供,经由福建中医药大学药学院中药鉴定教研室黄泽豪副教授鉴定为正品。MSU晶体(美国Sigma公司,批号101498836);聚山梨酯-80(上海古朵生物科技有限公司,批号304A054);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号20141011);大鼠IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海西唐科技有限公司,货号分别为F20190,F3151);兔抗大鼠NALP3单克隆抗体(美国Novus公司,批号BM4490);兔抗大鼠ASC单克隆抗体(美国Santa Cruz公司,批号10500-1-AP-100);兔抗大鼠Caspase-1单克隆抗体(美国Abcam公司,批号22915-1-AP-100); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体,辣根素过氧化物酶(HRP)羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G(北京EMAR公司,批号66009-1-Ig-100,SA00001-1);HRP羊抗兔IgG(美国Earthox公司,批号SA00001-2);ChamQ SYBR qPCR反应混合物(Master Mix),总RNA提取试剂(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为Q311-02,R401-01)。

**1.3 仪器** RH-B-1-S25型加热磁力搅拌器(德国IKA公司);FA604A型电子天平(上海精天电子仪器有限公司);ELX800型全自动酶标仪(美国Bio-Tek公司);ChemiDocXRS型化学发光成像系统,PowerPac™型电泳仪及转膜仪(美国Bio-Rad公司);PE 9600型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美

国PE公司);ABI 7500型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国ABI公司)。

## 2 方法

### 2.1 实验用药制备

**2.1.1 MSU混悬液的制备** 电子天平称取MSU晶体500mg,加聚山梨酯-80 2mL,再加无菌生理盐水定容至20mL。用磁力搅拌器加热搅拌,直至晶体完全溶解,制成质量浓度为25g·L<sup>-1</sup>的MSU混悬液,高压灭菌后,4℃保存,用前摇匀。

**2.1.2 痛风宁药液的制备** 将痛风宁全方药物先用600mL凉水浸泡30min,头煎30min,再加水400mL,二煎30min,混合2次药液,用旋转蒸发仪浓缩成含生药1g·mL<sup>-1</sup>的药液,密封,4℃保存备用。

**2.1.3 秋水仙碱混悬液的制备** 将秋水仙碱片4mg溶于100mL超纯水中,制成质量浓度0.04g·L<sup>-1</sup>秋水仙碱混悬液,密封,4℃保存备用。

**2.2 动物分组及造模** SD大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法分为造模大鼠36只、正常大鼠12只。造模大鼠参照Coderre等<sup>[16]</sup>造模方法,以大鼠右后肢背侧正中踝关节与胫腓骨之间的关节腔为进针点,将踝关节摆放成直角,充分暴露出踝关节与胫腓骨之间的间隙,以45度从该间隙直插入关节腔,注射MSU混悬液0.2mL。于造模后4h进行模型鉴定<sup>[17]</sup>,模型鉴定成功后,随机分为模型组、痛风宁组、秋水仙碱组,每组各12只。正常大鼠为正常组,以相同方法向右踝关节腔内注射生理盐水0.2mL。

**2.3 药物干预** 痛风宁组按人与大鼠体表面积折算等效剂量换算<sup>[18]</sup>,以每日15.3mL·kg<sup>-1</sup>痛风宁药液灌胃;秋水仙碱组按成人每日秋水仙碱最大用量6mg换算,根据人与大鼠药量关系换算得出每日药物用量为0.6mg·kg<sup>-1</sup>,以每日15mL·kg<sup>-1</sup>秋水仙碱混悬液灌胃;正常组与模型组予等量生理盐水灌胃。于造模后4h开始灌胃,每天2次(于上午8时、下午16时各灌胃1次),共3d。

**2.4 标本采集** 于造模成功后72h,采用10%水合氯醛3mL·kg<sup>-1</sup>行腹腔注射麻醉,待麻醉成功后,以大鼠右后肢踝关节为中心,常规备皮,碘伏消毒后切开右踝关节囊,用1mL注射器抽取生理盐水反复冲洗关节腔,收集关节液于离心管中,于4℃,4000r·min<sup>-1</sup>离心10min,吸取上清液,-20℃保存备用;同时取踝关节滑膜组织置于离心管中,经液氮冷冻后于-80℃保存备用。

## 2.5 指标检查

**2.5.1 一般情况观察** 观察实验过程中各组大鼠精神、饮食、行为、毛发、大便及右踝关节局部的皮色等一般情况。

**2.5.2 关节液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量的检测** 采用 ELISA 检测关节液 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量, 具体步骤按试剂盒说明书操作, 采用酶标仪检测波长为 450 nm 的吸光度  $A$ , 根据待测样品的  $A$  计算相应的 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量。

**2.5.3 滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白表达的检测** 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测, 将滑膜组织置于 4  $^{\circ}\text{C}$  超声波细胞粉碎机中进行匀浆裂解, 按滑膜组织 (1 mg)-裂解液 (10  $\mu\text{L}$ ) 的比例提取蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后, 加入蛋白上样缓冲液混匀, 于 100  $^{\circ}\text{C}$  金属浴变性 5 min。每孔按 50  $\mu\text{g}$  蛋白上样, Marker 上样量为 4  $\mu\text{L}$ , 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶电泳 (20 V 10 min, 60 V 20 min, 100 V 100 min)。切取目的蛋白所在胶条条带, 采用半干转膜将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。Western 封闭液室温封闭 2 h; 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜 (一抗稀释比例为 NALP3, 1 : 200; ASC, 1 : 200; Caspase-1, 1 : 5 000;  $\beta$ -actin, 1 : 5 000); 洗涤缓冲液 (TBST) 洗 3 次, 每次 10 min; 二抗室温孵育 2 h; TBST 洗 3 次, 每次 10 min。配制 ECL Plus 工作液 (A 液-B 液 1 : 1), 将 PVDF 膜置于化学发光成像仪上, 滴加工作液, 室温反应 1 min 后拍照, 并记录分析各目的蛋白的相对表达量。

**2.5.4 滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC mRNA 表达的检测** 采用 Real-time PCR 检测, trizol 法提取大鼠踝关节滑膜组织总 RNA, 严格按照试剂盒说明书步骤操作。取 RNA 样品 1  $\mu\text{L}$  加到紫外分光光度计中, 测定样品在 260 nm 和 280 nm 的  $A$ , 计算出  $A_{260}/A_{280}$  值, 按  $1A = 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  RNA 计算 RNA 的浓度。cDNA 的合成: 在 PCR 管中配制反应体系, 根据 RNA 的  $A$  计算出 1  $\mu\text{g}$  RNA 的体积, 用 ddH<sub>2</sub>O 调整体系至 30  $\mu\text{L}$ ; 在 PCR 仪上设置反应条件, 42  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 50  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 逆转录后于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。Real-time PCR 反应: 从 Gene bank 中查找目的基因的 CDS 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 并委托上海生工生物工程有限公司合成, 见表 1; 在八联管中配制反应体系, 每个样本均做 2 个复孔。将八联管置于 PCR 扩增仪中, 设置反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  34 s, 扩增 40 个循环。

表 1 NALP3, Caspase-1, ASC 及  $\beta$ -actin 引物序列

Table 1 Primer sequence of NALP3, Caspase-1, ASC and  $\beta$ -actin genes

引物名称	引物序列	片段长度 /bp
NALP3	上游 5'-CCCCGTGAGTCCCATT-3'	141
	下游 5'-GACGCCAGTCCAACAT-3'	
Caspase-1	上游 5'-AGATGGCAGATTTCAGGAC-3'	108
	下游 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	
ASC	上游 5'-CAGGCCCTCCTCAGTCGGCA-3'	93
	下游 5'-CCACTCAACGTTTGTGACCCT-3'	
$\beta$ -actin	上游 5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3'	120
	下游 5'-GTACTTTCTGGATGCCACAG-3'	

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据处理分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  进行统计描述, 组间比较采用单因素方差分析进行统计推断, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 各组大鼠一般情况观察** 在整个实验过程中, 正常组大鼠精神状态良好, 皮毛光泽色白, 活泼好动, 饮食及大便正常; 模型组大鼠精神欠佳, 皮毛无光泽, 懒动, 饮食欠佳, 大便正常; 痛风宁组大鼠精神尚可, 活泼好动, 皮毛欠光泽, 饮食与大便正常; 秋水仙碱组大鼠精神慵懒, 不好动, 皮毛干枯, 饮食欠佳, 大便稀溏。

**3.2 对 AGA 大鼠关节液 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠关节液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 痛风宁组和秋水仙碱组关节液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与秋水仙碱组比较, 痛风宁组关节液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量较高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

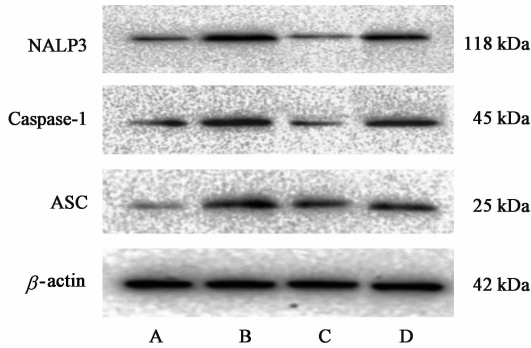
表 2 痛风宁对 AGA 大鼠关节液 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

Table 2 Effect of Tongfengning on levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in synovial fluid of AGA rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

组别	剂量 /g · kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
正常	-	31.67 $\pm$ 2.08	38.99 $\pm$ 2.69
模型	-	82.33 $\pm$ 1.15 <sup>1)</sup>	121.00 $\pm$ 4.58 <sup>1)</sup>
痛风宁	15.3	42.64 $\pm$ 0.75 <sup>2,3)</sup>	61.67 $\pm$ 2.97 <sup>2,3)</sup>
秋水仙碱	6 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	39.37 $\pm$ 1.29 <sup>2)</sup>	53.53 $\pm$ 1.29 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与秋水仙碱组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 4 同)。

**3.3 对 AGA 大鼠滑膜组织 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC 3 个蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,痛风宁组与秋水仙碱组滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与秋水仙碱组比较,痛风宁组滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白表达均较低 ( $P < 0.01$ )。见图 1, 表 3。



A. 正常组; B. 模型组; C. 痛风宁组; D. 秋水仙碱组

图 1 各组大鼠滑膜组织 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白表达电泳

Fig. 1 Expression of NALP3, Caspase-1 and ASC protein in synovial tissues of each rats by electrophoresis

表 3 痛风宁对 AGA 大鼠滑膜组织 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effect of Tongfengning on expression of NALP3, Caspase-1 and ASC protein in synovial tissues of AGA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	NALP3 /β-actin	Caspase-1 /β-actin	ASC /β-actin
正常	-	0.326 ± 0.013	0.304 ± 0.031	0.193 ± 0.020
模型	-	1.893 ± 0.039 <sup>1)</sup>	1.337 ± 0.046 <sup>1)</sup>	1.196 ± 0.015 <sup>1)</sup>
痛风宁	15.3	0.454 ± 0.017 <sup>2,3)</sup>	0.367 ± 0.015 <sup>2,3)</sup>	0.569 ± 0.007 <sup>2,3)</sup>
秋水仙碱	0.6 × 10 <sup>-4</sup>	0.932 ± 0.015 <sup>2)</sup>	0.627 ± 0.061 <sup>2)</sup>	0.617 ± 0.020 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与秋水仙碱组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.4 对 AGA 大鼠滑膜组织 NALP3, ASC, Caspase-1 mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC mRNA 表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,痛风宁组与秋水仙碱组滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC mRNA 表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与秋水仙碱组比较,痛风宁组滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC mRNA 表达均较低 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

#### 4 讨论

痛风与嘌呤代谢紊乱,尿酸生成增多和/或尿酸

表 4 痛风宁对 AGA 大鼠滑膜组织 NALP3, Caspase-1, ASC mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 4 Effect of Tongfengning on expression of NALP3, Caspase-1 and ASC mRNA in synovial tissues of AGA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	NALP3	Caspase-1	ASC
正常	-	0.198 ± 0.002	0.154 ± 0.009	0.261 ± 0.015
模型	-	0.745 ± 0.040 <sup>1)</sup>	0.982 ± 0.037 <sup>1)</sup>	0.833 ± 0.051 <sup>1)</sup>
痛风宁	15.3	0.363 ± 0.023 <sup>2,3)</sup>	0.327 ± 0.011 <sup>2,3)</sup>	0.449 ± 0.017 <sup>2,3)</sup>
秋水仙碱	6 × 10 <sup>-4</sup>	0.430 ± 0.021 <sup>2)</sup>	0.385 ± 0.011 <sup>2)</sup>	0.517 ± 0.023 <sup>2)</sup>

排泄减少所致的高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 直接相关,属于代谢性风湿病范畴<sup>[1]</sup>,当体内尿酸浓度达到过饱和状态时,MSU 结晶在关节、软骨、滑膜及关节周围组织中沉积,引起关节骨质的破坏,病变局部可出现滑膜微血管充血扩张、通透性升高和大量炎性细胞渗出等病理反应,出现受累关节红肿热痛等急性炎症表现。本病属中医“痹证”范畴,其多因素体肥胖,过食肥甘厚味,而致湿热内蕴,热极生毒,湿热毒邪阻于经络,流注关节,而出现关节红肿热痛等症状,治疗当以清热利湿、消肿止痛为主。本研究采用的痛风宁是经过临床不断调整与完善,总结出治疗痛风的效验方<sup>[19]</sup>。该方主要由土茯苓、黄柏、苍术、川牛膝、萆薢、丹参、泽泻、金钱草、秦艽、肿节风等组成,其中苍术辛苦性温,可燥中焦湿阻;黄柏苦寒,可清下焦湿热,川牛膝味甘性平,可补肝肾益肾、强筋壮骨,且能引药下行,三者合为三妙丸,具有除湿清热排浊之功;土茯苓甘淡,具有清热除湿、通利关节的功效;丹参苦微寒,可活血通络、清热凉血,肿节风苦辛,祛风除湿、清热解毒;萆薢苦平,能除湿解毒、通利关节;泽泻甘寒,可利水渗湿,尤擅清热;金钱草甘微寒,可清热利湿排浊,使湿热之邪从小便排出;秦艽苦辛,善清利湿热、消肿止痛。诸药合用,共奏利湿排浊,消肿止痛之功效。

现代医学研究发现<sup>[20]</sup>,在 AGA 的发病过程中,IL-1β, TNF-α 等作为炎症趋化因子会诱导大量中性粒细胞浸润到关节腔,使更多炎症介质释放,产生炎症级联反应,进一步引起本病的急性发作。因此,病变关节的关节液中 IL-1β, TNF-α 含量可在一定程度上反映炎症程度。体内外研究已证实<sup>[4-7]</sup>,当 NALP3 识别内源性危险信号——MSU 晶体时, NALP3 蛋白的构象随即发生改变,进而与 ASC 蛋白及 Caspase-1 前体结合形成激活状态的 NALP3 炎性体,使大量 Caspase-1 前体水解成活化的 Caspase-1,促进无活性的 IL-1β 前体裂解成有活性的 IL-1β,后

者又可进一步激活 NF- $\kappa$ B 等炎症信号通路,生成大量炎症因子如 TNF- $\alpha$ , 白细胞介素-18 (IL-18) 等,最终导致 AGA 发作。本实验结果显示,与正常组比较,模型组踝关节液中炎症因子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量以及滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白及其 mRNA 表达均升高。一方面证实了 NALP3 炎性体的活化参与了 AGA 的发病过程;另一方面也说明本实验采用的造模方式可行,大鼠踝关节炎症反应明显。经过药物干预后发现,痛风宁组与秋水仙碱组踝关节液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量均明显下降,且滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白及 mRNA 表达均降低。说明秋水仙碱及痛风宁药液均可降低 AGA 炎症、抑制 NALP3 炎性体的表达。与秋水仙碱组比较,痛风宁组大鼠踝关节液 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量仍较高,这可能是由于本实验干预时间较短,痛风宁抑制 AGA 炎症反应较秋水仙碱略差。但痛风宁组滑膜组织中 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白及其 mRNA 表达均较秋水仙碱组低,说明痛风宁在抑制 NALP3 炎性体表达方面优于秋水仙碱组。值得一提的是,在实验过程中观察各组大鼠的一般情况发现,与模型组比较,痛风宁组大鼠一般情况恢复较好,而秋水仙碱组大鼠无明显变化,说明痛风宁能在一定程度上改善大鼠的精神、饮食、皮毛等一般状态,秋水仙碱的改善效果不佳。

通过本实验结果证实,痛风宁对 AGA 有明显的抗炎、消肿、止痛作用,其机制可能是通过影响 NALP3 炎性体中 NALP3, Caspase-1, ASC 蛋白及 mRNA 的表达,从而抑制 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  的生成,最终减轻病变关节炎症反应。

#### [参考文献]

[1] 中华医学会风湿病学分会. 2016 中国痛风诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2016, 55(11): 892-899.

[2] 蒋明, 朱立平, 林孝义, 等. 风湿病学 [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 1469-1471.

[3] 王璐, 李璐, 陈光亮. NALP3 炎性体在痛风发病中的作用与药物治疗研究进展 [J]. 生命科学, 2016, 28(3): 405-408.

[4] 周琦, 卢芳, 刘树民. Cryopyrin 炎性体在痛风性关节炎发病中的作用机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(4): 444-447.

[5] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. Nature, 2006, 440(7081): 237-241.

[6] Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a Caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. Nat Immunol, 2009, 10(3): 241-247.

[7] Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels [J]. Nature, 2002, 417(6887): 447-452.

[8] 中华医学会内分泌学分会. 高尿酸血症和痛风治疗的中国专家共识 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(11): 913-920.

[9] 金晓敏, 张晓熙, 郭璐, 等. 基于 NLRP3 炎性体轴土茯苓总黄酮对痛风性关节炎的作用和机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 90-95.

[10] 贾萍, 陈刚. 豨桐丸对大鼠痛风性关节炎的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 96-101.

[11] 周子朋, 郑福增, 孟庆良, 等. 基于 NALP3 炎性体信号通路研究梔黄止痛颗粒治疗大鼠痛风性关节炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 140-147.

[12] 房树标, 王永辉, 李艳彦, 等. 基于 NLRP3 炎性体信号通路研究桂枝芍药知母汤治疗痛风性关节炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 91-95.

[13] 苏友新, 陈伟宏, 陈凡, 等. 痛风宁颗粒对 30 例慢性痛风性关节炎患者血尿酸、血沉、血脂及血流变的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2005, 13(1): 16-18.

[14] 苏友新, 陈伟宏, 陈凡, 等. 痛风宁颗粒治疗慢性痛风性关节炎 30 例临床研究 [J]. 福建中医学院学报, 2003, 13(3): 12-14.

[15] 陈伟宏, 苏友新, 许书亮, 等. 痛风宁冲剂治疗急性痛风性关节炎 104 例临床观察 [J]. 福建中医学院学报, 2001, 11(3): 26-28.

[16] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1988, 29(3): 461-466.

[17] 蔡唐彦, 王旭, 何焯, 等. 急性痛风性关节炎大鼠模型的建立及模型维持时间观察 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(5): 494-499.

[18] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1168-1170.

[19] 何焯, 王艺茹, 李亚楠, 等. 苏友新教授治疗痛风经验 [J]. 福建中医药, 2016, 47(2): 43-44.

[20] 谷祖华, 苗志敏, 李长贵. Caspase-1 抑制剂对大鼠急性痛风性关节炎的作用 [J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(5): 437-440.

[责任编辑 周冰冰]