

萆薢除痹汤抗实验性痛风作用机制探讨

平凡, 谭唱, 颜至昭, 汪悦*
(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] **目的:** 研究萆薢除痹汤降尿酸、抗炎及镇痛作用, 并探讨其作用机制。**方法:** 将雄性昆明小鼠 32 只, 随机分为正常组、模型组、萆薢除痹汤组 ($20.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药)、别嘌醇组 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 8 只, 除正常组外, 其他各组采用氧嗪酸钾 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 建立高尿酸血症模型, 每天 ig 给药 1 次, 连续 7 d, 试剂盒检测小鼠血清尿酸 (SUA), 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 水平, 观察萆薢除痹汤降尿酸作用及可能的降尿酸机制; 另取两组雄性昆明种小鼠 30 只, 随机分为模型组、萆薢除痹汤组 ($20.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、别嘌醇组 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, 每天 ig 给药 1 次, 连续 3 d, 分别采用冰乙酸致扭体法观察萆薢除痹汤镇痛作用、采用二甲苯致耳肿胀法观察萆薢除痹汤抗炎作用; 雄性昆明种小鼠 32 只, 随机分为正常组、模型组、萆薢除痹汤组 ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、吲哚美辛组 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 8 只, 每天 ig 给药 1 次, 连续 6 d, 通过关节腔注射尿酸盐结晶 (MSU) 建立急性痛风性关节炎 (AGA) 模型, 并检测白细胞介素- 1β (IL- 1β), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, 分析其抗炎作用及可能的机制。**结果:** 与正常组比较, 模型组 SUA 和 XOD 水平明显升高 ($P < 0.01$), IL- 1β , TNF- α 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 萆薢除痹汤能够显著降低 SUA 和 XOD 水平 ($P < 0.05$), 明显降低小鼠初次扭体时间 ($P < 0.05$) 和扭体次数 ($P < 0.05$), 明显减轻小鼠耳肿胀程度 ($P < 0.05$), 明显降低造模后 24 h 小鼠的踝关节肿胀度 ($P < 0.05$) 和 IL- 1β , TNF- α ($P < 0.01$) 的表达。**结论:** 萆薢除痹汤具有明显降低小鼠 SUA 作用, 其降尿酸机制可能是抑制 XOD 的表达; 萆薢除痹汤还具有抗炎镇痛作用, 其抗炎作用机制可能是与 IL- 1β , TNF- α 的含量相关。

[关键词] 萆薢除痹汤; 痛风; 尿酸; 抗炎镇痛

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0129-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090129

Experimental Study of Bixie Chubi Tang in Treating Gout PING Fan, TAN Chang, YAN Zhi-zhao, WANG Yue* (Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Bixie Chubi Tang (BXCBT) on reducing serum uric acid (SUA), anti-inflammation and analgesia, and to discuss its mechanism. **Method:** The 32 Kunming mice were randomly divided into four groups: the normal group, the model group, the BXCBT group ($20.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and the llopurinol group ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The mouse hyperuricemia model were induced in mice by intraperitoneally injecting allantoxanic acid potassium of $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The levels of SUA and xanthine oxidase (XOD) were detected. The anti-inflammatory and antalgic effect was observed on the writhing test caused by glacial acetic acid and ear swelling caused by dimethylbenzene in mice. Both two experiments included the model group, the BXCBT group ($20.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and the allopurinol group of 10 mice each. In another experiment, the acute gouty arthritis (AGA) model of mice was established by uric acid sodium salt. The 32 mice were randomly divided into the normal group, the model group, the BXCBT group ($20.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and the indomethacin group ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The levels of interleukin- 1β (IL- 1β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected, and the anti-inflammatory effects and possible mechanisms were analyzed. **Result:** Compared with the normal group, the levels of SUA and XOD increased, the levels of IL- 1β and TNF- α increased in the model groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, levels of SUA and XOD decreased, the writhing times decreased, the mouse ear swelling and

[收稿日期] 20140925(005)

[基金项目] 国家中医药管理局重点学科(中医痹证学)开放基金项目(BBXK2013101);江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师培养项目(2012)

[第一作者] 平凡, 博士, 从事痛风病研究, Tel: 18251831261, E-mail: 499653082@qq.com

[通讯作者] *汪悦, 博士, 教授, 博士生导师, 从事风湿病科研究与临床研究, Tel: 13057576471, E-mail: 13582984944@163.com

ankle swelling improved, and the levels of IL-1 β and TNF- α decreased in the BXCBT group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** BXCBT has an effect on reducing SUA in mice, and the mechanism may be related to inhibiting the expression of XOD. It also has an effect on inflammation and pain, and the mechanism may be related to inhibiting the levels of IL-1 β and TNF- α .

[**Key words**] Bixie Chubi Tang; gout; uric acid; anti-inflammation and analgesia

痛风(gout)是一种由于尿酸盐结晶沉积于局部滑囊、软骨等组织,造成的炎症反应性疾病。全世界痛风患病率大约 0.08%^[1],并呈逐年上升趋势^[2]。本病具有反复发作性、长期性的特点。目前医学界对待尿酸升高,更加强调整标治疗的重要性^[3],并且在急性发作期需调节相关炎症因子的表达,以达到抗炎镇痛的目的^[4]。萆薢除痹汤为汪悦教授临床经验方,本方具有清热利湿、通络止痛的功效,临床疗效显著,副作用较小。为深入研究萆薢除痹汤作用机制,笔者通过氧嗉酸钾 ip 造模,观察小鼠血尿酸(serum uric acid, SUA)、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)水平;小鼠冰乙酸 ip,观测萆薢除痹汤的镇痛效果;小鼠二甲苯致耳肿胀方法,观察本方抗炎效果;运用尿酸钠结晶(MSU)在关节腔局部注射,采用酶联免疫法,检测血白细胞介素-1 β (IL-1 β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠 124 只,雄性,体重 18~22 g,上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2012-0002。

1.2 药物及试剂 中药购自南京同仁堂药店,氧嗉酸钾盐(上海阿达玛斯公司,批号 P1050992),别嘌醇片(广东彼迪药业有限公司,批号 H44021368),尿酸试剂盒(南京建成生物技术有限公司,批号 20121210),黄嘌呤氧化酶试剂盒(南京建成生物技术有限公司,批号 20121210),IL-1 β 试剂盒(美国 RD 公司,批号 20130420A),TNF- α 试剂盒(美国 RD 公司,批号 20130420A),尿酸钠结晶(美国 Sigma 公司,批号 U2875),吡嗪美辛(山西云鹏制药有限公司,批号 A120402),二甲苯(南京化学试剂厂,批号 990306),冰乙酸(上海化学试剂有限公司,批号 0304101)。

1.3 仪器 Centrifuge 5810R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),SPECTRAMAX 190 型酶标仪(美国 MD 公司),CPA2250 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 SUA, XOD 测定 小鼠 32 只,随机分为 4 组,

每组 8 只。正常组、模型组等量生理盐水 ig;萆薢除痹汤组 20.9 g·kg⁻¹ ig;别嘌醇组 40 mg·kg⁻¹ ig。各组均为每天 ig 1 次,连续 7 d。第 7 天,除正常组外,其余各组在末次给药前 1 h,ip 氧嗉酸钾盐混悬液 300 mg·kg⁻¹。给药后 1 h,眼眶采血,检测 SUA;摘取肝脏,剪碎、匀浆、离心,测定 XOD。

2.2 小鼠扭体反应观察 将小鼠 30 只,随机分为 3 组,每组 10 只。模型组等量生理盐水 ig,萆薢除痹汤组 20.9 g·kg⁻¹ ig,吡嗪美辛组 2 mg·kg⁻¹ ig。各组均每天 ig 1 次,连续 3 d。末次给药 1 h 后 0.6% 冰乙酸 ip,每只 0.2 mL,引起小鼠腹膜炎性疼痛,小鼠会出现腹部内凹、躯干与后肢伸长、臀部上提等反应。观察每只小鼠初次扭体时间与 15 min 内的扭体次数。

2.3 小鼠耳肿胀程度的观察 小鼠 30 只,随机分为 3 组,每组 10 只。分组及给药情况同 2.2。末次给药 1 h 后,在小鼠右耳正反两面均匀涂抹二甲苯 50 μ L,1 h 后脱颈处死,并剪下双耳,在两耳相同位置用直径 8 mm 打孔器分别冲下耳片,称重,计算两耳质量的差值。

2.4 小鼠后足容积,IL-1 β ,TNF- α 的测定 小鼠 32 只,随即分为正常组、模型组、萆薢除痹汤组、吡嗪美辛组 4 组,每组 8 只。各组给药剂量同 2.2,每天 1 次,连续 6 d。第 3 天,给药 1 h 后,按照 Coderre 经典方法^[5],略作改进^[6](用 1 mL 注射器沿小鼠右踝关节背侧 45 度方向进针,插入其胫骨肌腱的内侧)进行造模。模型组、萆薢除痹汤组、吡嗪美辛组小鼠关节腔注射 25 g·L⁻¹ 的尿酸钠溶液 0.05 mL,正常组注射等体积生理盐水。于造模前、造模后 24,72 h,运用自制小鼠后足容积测定装置,测量小鼠右后足体积。第 6 天给药 1 h 后,脱颈处死,用剪刀从右踝关节上方 0.5 cm 处剪断,随即放于盛有冰块的托盘中,除去毛爪、皮肤、骨骼,剔出受试关节及周围软组织,剪碎、匀浆、离心,按 ELISA 试剂盒说明检测 IL-1 β ,TNF- α 。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,组间比较采用单因素方差分析或秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对高尿酸血症模型小鼠 SUA, XOD 的影响 与正常组比较, 模型组小鼠 SUA 明显升高 ($P < 0.01$), 说明氧嗪酸钾盐腹腔注射方法造模成功。与模型组比较, 萆薢除痹汤组 SUA, XOD 水平明显降低 ($P < 0.05$), 别嘌醇组 SUA, XOD 水平显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 萆薢除痹汤对小鼠 SUA, XOD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effects of Bixie Chubi decoction on SUA, XOD in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SUA /μmol·L ⁻¹	XOD /U·L ⁻¹
正常	-	111.52 ± 21.48	27.12 ± 6.86
模型	-	247.60 ± 76.55 ²⁾	89.01 ± 7.52 ²⁾
萆薢除痹汤	20.9	157.76 ± 66.47 ³⁾	79.62 ± 7.10 ³⁾
别嘌醇	0.04	127.42 ± 44.96 ⁴⁾	66.63 ± 6.72 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4~5 同)。

3.2 对冰醋酸致小鼠扭体反应镇痛作用的影响 与模型组比较, 萆薢除痹汤组小鼠初次扭体时间明显推迟, 15 min 内扭体次数明显降低, 具有显著统计学意义 ($P < 0.05$), 吲哚美辛组初次扭体时间显著推迟, 15 min 内扭体次数显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 萆薢除痹汤对冰醋酸致小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effects of Bixie Chubi decoction on mice body torsion reaction caused by glacial acetic acid ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	初次扭体时间 /min	15 min 扭体数 /次
模型	-	3.64 ± 1.20	20.40 ± 5.27
萆薢除痹汤	20.9	5.77 ± 2.41 ¹⁾	14.60 ± 5.72 ¹⁾
吲哚美辛	0.002	7.21 ± 1.98 ²⁾	8.80 ± 4.54 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 对小鼠二甲苯致耳肿胀度的影响 与模型组比较, 萆薢除痹汤组小鼠耳肿胀程度明显减轻 ($P < 0.05$), 吲哚美辛组小鼠耳肿胀程度显著减轻 ($P < 0.01$)。见表 3。

3.4 对小鼠受试关节肿胀度的影响 造模后, 与正常组比较, 模型组关节体积明显增大 ($P < 0.01$), 提示造模成功。造模 24 h, 与模型组比较, 萆薢除痹汤组、吲哚美辛组小鼠踝关节体积均明显减小 ($P < 0.05$)。造模 72 h, 与模型组比较, 吲哚美辛组小鼠踝关节肿胀程度减轻 ($P < 0.05$), 萆薢除痹汤组虽

表 3 萆薢除痹汤对小鼠二甲苯致耳肿胀程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Effects of Bixie Chubi decoction on mice ear swelling degree caused by dimethylbenzene ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	耳肿胀度/mg
模型	-	20.44 ± 4.36
萆薢除痹汤	20.9	16.50 ± 3.86 ¹⁾
吲哚美辛	0.002	13.10 ± 4.60 ²⁾

与模型组差异不具有统计学意义, 但从数据上仍能看出, 小鼠踝关节体积减小。见表 4。

表 4 萆薢除痹汤对小鼠踝关节肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 4 Effects of Bixie Chubi decoction on ankle swelling in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模前 /mL	造模 24 h /mL	造模 72 h /mL
正常	-	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03
模型	-	0.22 ± 0.04	0.31 ± 0.04 ²⁾	0.27 ± 0.04 ²⁾
萆薢除痹汤	20.9	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.03 ³⁾	0.24 ± 0.03
吲哚美辛	0.002	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.03 ³⁾	0.23 ± 0.03 ³⁾

3.5 对小鼠关节周围软组织中 IL-1β, TNF-α 含量的影响 模型组与正常组比较, IL-1β 与 TNF-α 含量明显升高, 两组数值具有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明造模成功。与模型组比较, 萆薢除痹汤组、吲哚美辛组 IL-1β 与 TNF-α 含量明显降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 萆薢除痹汤对小鼠踝关节组织中 IL-1β, TNF-α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effects of Bixie Chubi decoction on IL-1β, TNF-α of ankle tissue in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-1β/ng·L ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹
正常	-	104.36 ± 19.37	196.52 ± 15.33
模型	-	205.26 ± 28.88 ²⁾	300.30 ± 26.33 ²⁾
萆薢除痹汤	20.9	124.10 ± 23.12 ⁴⁾	218.33 ± 23.57 ⁴⁾
吲哚美辛	0.002	113.72 ± 21.13 ⁴⁾	209.55 ± 22.09 ⁴⁾

4 讨论

西药治疗痛风的主要药物, 多起效迅速, 机制明确, 但有一定缺陷, 例如苯溴马隆、别嘌醇易出现药物性皮炎、发热、肝损伤等不良反应; 秋水仙碱有消化道、神经系统反应, 还可引起肝肾功能异常; 非甾体类抗炎药长期服用则会增加心脑血管风险^[7]。中药治疗痛风运用广泛, 临床疗效切实可靠, 但目前关于其作用机制研究较少, 还需进一步深入。中医

认为本病是由于多种原因导致人体脏腑功能失调, 湿热蕴阻, 经络不通。汪悦教授从湿热内蕴的角度考虑, 认为本病应以清利湿热为先, 兼以通络止痛, 并形成临床验方萆薢除痹汤。本方由萆薢、泽泻、车前子、土茯苓、玉米须等 11 味药组成。

痛风的生化基础是高尿酸血症。当体内尿酸生成过多, 和(或)排泄减少时, 会造成 SUA 升高, 因此, 降低体内 SUA 水平, 是控制痛风急性发作的重要环节。研究发现, 多种酶类物质可调节嘌呤类物质转化为尿酸。XOD 是尿酸生成过程中的关键酶^[8], 它能够氧化次黄嘌呤生成黄嘌呤, 进而氧化成尿酸。XOD 在尿酸的生成过程中具有重要的催化作用, 当 XOD 降低时, 尿酸前体物质变成尿酸的量亦减少, 故可通过测定 XOD 表达, 阐释药物降低尿酸的作用机制^[9]。本研究发现萆薢除痹汤具有良好的降尿酸作用, 并且与模型组比较, 中药组肝脏中 XOD 的表达亦有明显下降, 结果具有统计学意义, 因此萆薢除痹汤降低尿酸的作用机制可能是过降低 XOD 的表达, 进而减少尿酸的生成。

体内尿酸升高, 达到过饱和状态时, 会以尿酸盐结晶形式析出, 并沉积局部关节, 导致痛风的急性发作^[10]。关节液中的单核细胞、巨噬细胞等致炎细胞, 黏附、吞噬尿酸盐结晶, 释放大量的 IL-1 β 与 TNF- α 等炎性介质、细胞因子等, 进一步激活环氧化酶, 并合成前列腺素类, 使炎症扩大^[11]。控制炎症反应, 并及时消肿止痛, 是治疗 AGA 的关键。本研究采用多种动物模型, 运用不同的造模方法, 检测药物的抗炎镇痛作用。萆薢除痹汤能够显著降低冰醋酸致小鼠扭体反应的初次扭体时间和 15 min 内的扭体次数, 达到镇痛作用, 还能够降低二甲苯致炎模型小鼠的耳肿胀程度, 抑制炎症渗出。IL-1 β 与 TNF- α 在减轻尿酸盐结晶诱导的急性痛风性关节炎模型中具有重要作用^[12-13]。最新药物研究将 IL-1 β 作为治疗靶点, 能够减轻炎症反应^[14]。与模型组比较, 萆薢除痹汤在降低痛风模型小鼠关节肿胀程度的同时, 明显抑制 IL-1 β 与 TNF- α 的表达。因此, 萆薢除痹汤具有抗炎镇痛作用, 其作用机制可能是通过降低 IL-1 β 与 TNF- α 的水平实现。

[参考文献]

[1] Smith E, Hoy D, Cross M, et al. The global burden of gout: estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. *Ann Rheu Disea*, 2014, 73(8):1470-1473.

[2] Roddy E, Doherty M. Epidemiology of gout [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(6):223-227.

[3] 邹和建, 姜林娣. 2012 年美国风湿病学会痛风治疗指南评析 [J]. *内科理论与实践*, 2012, 7(6):458-460.

[4] Khanna P P, Gladue H S, Singh M K, et al. Treatment of acute gout: A systematic review [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2014, 44(1):31-34.

[5] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint unite arthritis in rat: provide a useful tool for the evaluation of analysis and anti-arthritis agents [J]. *Pharm Biochem Behav*, 1988, 29:461-465.

[6] 黄蔚霞. 药物对痛风性关节炎模型 IL-1, IL-6 的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2002, 3(6):359-360.

[7] 张开富, 张立群. 痛风病诊治新法 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2010:183.

[8] Song H P, Zhang H, Fu Y, et al. Screening for selective inhibitors of xanthine oxidase from *Flos Chrysanthemum* using ultrafiltration LC-MS combined with enzyme channel blocking [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 961:56-59.

[9] Lu J M, Yao Q, Chen C. 3, 4-Dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde (DHNB) is a potent inhibitor of xanthine oxidase: a potential therapeutic agent for treatment of hyperuricemia and gout [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(9):1328-1331.

[10] Amaral F A, Costa V V, Tavares L D, et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B (4) in a murine model of gout [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(2):474-475.

[11] Laavola M, Nieminen R, Yam M F, et al. Flavonoids eupatorin and sinensetin present in *Orthosiphon stamineus* leaves inhibit inflammatory gene expression and STAT1 activation [J]. *Planta Med*, 2012, 78(8):779-782.

[12] Crittenden D B, Pillinger M H. New therapies for gout [J]. *Annu Rev Med*, 2013, 64:325-328.

[13] Martin W J, Walton M, Harper J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(1):281-284.

[14] Khanna P P, Gladue H S, Singh M K, et al. Treatment of acute gout: A systematic review [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2014, 44(1):31-35.

[责任编辑 周冰冰]