

十五味乳鹏散对尿酸钠致大鼠急性痛风性膝关节炎 COX-2, PGE₂水平的影响

寇毅英*, 李永芳, 杨梅, 吕慧玲, 李瑞莲
(青海大学医学院, 西宁 810001)

[摘要] **目的:**通过观察十五味乳鹏散对尿酸钠(MSU)致急性痛风性关节炎大鼠膝关节液及滑膜组织中环氧酶 2(COX-2), 前列腺素 E₂(PGE₂)蛋白及 mRNA 水平的影响, 探讨十五味乳鹏散治疗急性痛风性关节炎的机制。**方法:**大鼠分为正常组, 模型组, 十五味乳鹏散低、中、高剂量(0.4, 0.8, 1.2 g·kg⁻¹)组, 吲哚美辛(3 mg·kg⁻¹)组。正常组和模型组 *ig* 生理盐水; 各给药组按剂量 *ig* 给药, 连续 7 d。末次给药 1 h 后, 正常组双侧膝关节腔注射 50 μL 无菌 1% 磷酸盐缓冲液(PBS), 其余各组注射 50 μL 尿酸钠溶液, 于造模后 24 h 用酶联免疫吸附试验(ELISA)和实时荧光定量 PCR(QPCR)检测关节滑液和滑膜组织 COX-2, PGE₂ 蛋白及 mRNA 水平。**结果:**与正常组比较, 模型组 MSU 注射进大鼠膝关节腔 24 h 后, COX-2, PGE₂ 在大鼠关节滑液中的含量及在滑膜组织中的 mRNA 表达量均明显增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 十五味乳鹏散低、中、高剂量组及吲哚美辛组均显著降低 MSU 致大鼠痛风性关节炎关节滑液 COX-2 和 PGE₂ 的蛋白水平及滑膜组织 COX-2 mRNA 水平($P < 0.05, P < 0.01$), 但滑膜组织 PGE₂ mRNA 水平在各组间并无显著性差异。**结论:**MSU 可以增加关节滑液及滑膜组织中 COX-2 的表达, 同时伴有 COX-2, PGE₂ 水平的增加; 十五味乳鹏散可能通过降低 COX-2 的表达, 降低 COX-2, PGE₂ 的水平产生抗 MSU 痛风性关节炎的作用。

[关键词] 十五味乳鹏散; 尿酸钠; 痛风性关节炎

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0117-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010117

Influence of Rupeng 15 Powder on COX-2, PGE₂ Protein and mRNA Expression Levels in Rat with Mono Sodium Urate Crystals-induced Gouty Arthritis

KOU Yi-ying*, LI Yong-fang, YANG Mei, LYU Hui-ling, LI Rui-lian
(Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Rupeng 15 powder (RPP15) on cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E₂ (PGE₂) protein and mRNA expression levels in the knee joint fluid and synovium tissues, and explore the therapeutic mechanism of RPP15 in rats with monosodium urate (MSU) crystals-induced gouty arthritis. **Method:** The rats were divided into normal group, model group, RPP15 low-dose, middle-dose and high dose groups (0.4, 0.8, 1.2 g·kg⁻¹), indomethacin group (3 mg·kg⁻¹). The normal group and model group were *ig* administered with normal saline; various treatment groups were *ig* administered with corresponding doses for continuous 7 days. One hour after the last administering, 50 μL sterile 1% PBS was injected in bilateral knee joint cavity in normal group, and 50 μL MSU was injected in other groups. Twenty-four h after modeling, enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) method and real-time fluorescent quantitative PCR method were used to detect COX-2, PGE₂ protein and mRNA expression levels in the knee joint fluid and synovium tissues. **Result:** Data from our study showed that rat with gouty arthritis induced by MSU crystal demonstrated an elevation in COX-2, PGE₂ in knee joint fluid and mRNA expression levels in synovium tissues ($P < 0.01$). Compared with the

[收稿日期] 20150318(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160410)

[通讯作者] * 寇毅英, 硕士, 副教授, 从事藏药药理学研究, Tel:0971-6104046, E-mail:sainaerky@163.com

model group, RPP15 (0.4, 0.8, 1.2 g·kg⁻¹) groups and indomethacin group had significantly lower COX-2 and PGE₂ protein levels in knee joint fluid COX-2 mRNA level in synovium tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but PGE₂ mRNA was no statistically significant difference in synovium tissues. **Conclusion:** MSU can increase the expression of COX-2 and PGE₂ in knee joint fluid and synovium tissues. RPP15 may have the effect on MSU-induced gouty arthritis by decreasing COX-2 expression, COX-2 level and PGE₂ level.

[**Key words**] Rupeng 15 powder; monosodium urate; gouty arthritis

痛风(gout)是因尿酸钠结晶沉积所引起的关节及其周围软组织的急性炎症反应,临床症状主要表现为关节红,肿,热,痛^[1]。其急性发作期的抗炎药物治疗主要是用非甾体类的抗炎药(NSAIDs)消除炎症,缓解疼痛。虽然此类药物种类较多,但有引起胃肠道溃疡,出血,肾脏损伤等不良反应^[2]。在我国治疗痛风方面除了合成类药物,还有丰富的民族医药资源。十五味乳鹏散为传统藏药(藏名毕琼久埃日布),是藏医治疗关节疼痛,肿胀,关节腔积水诸证的古方^[3],至今已有1 000多年的历史。目前十五味乳鹏散是藏医治疗痛风性关节炎的首选药,临床疗效观察其效果显著^[4-5],本课题组通过动物实验观察到藏药十五味乳鹏散有镇痛,抗炎的效果^[6]。为阐明其抗炎镇痛作用机制,本实验通过十五味乳鹏散对 MSU 致大鼠急性痛风性关节炎膝关节液及滑膜组织中环氧酶 2(COX-2),前列腺素 E₂(PGE₂)蛋白及 mRNA 水平的影响,探讨十五味乳鹏散治疗急性痛风性关节炎的机制。

1 材料

1.1 药物 藏药十五味乳鹏散由乳香 150 g, 宽筋藤 150 g, 决明子 120 g, 渣驯膏 75 g, 黄葵子 120 g, 藏菖蒲 120 g, 巴夏嘎 110 g, 儿茶 75 g, 诃子 150 g, 安息香 60 g, 毛诃子 150 g, 铁棒锤 75 g, 木香 150 g, 麝香 1.5 g, 余甘子 150 g 组成。以上 15 味组成碾磨成细粉,十五味乳鹏散低,中,高剂量组混悬液的制备按照成人每公斤体重用量的 10,20,30 倍(即 0.4,0.8,1.2 g·kg⁻¹,成人推荐剂量为每日 2.4 g),用蒸馏水配制成相应的混悬液备用。吲哚美辛(山西云鹏制药有限公司,批号 A100902),研粉,蒸馏水配制成悬浮液,以 3 mg·kg⁻¹ ig 给药。

1.2 动物 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重(220 ± 40) g,由甘肃中医学院动物实验中心提供,合格证号 SCXK(甘)2004-0006。动物购得后于实验前 1 周适应环境,自由饮食,自然光照,室温控制在(20 ± 2)℃。

1.3 试剂与仪器 尿酸钠(MSU)晶体(美国 Sigma-aidrich 公司,批号 120k5305);Trizol 试剂(批

号 66222), SYBR Green PCR Master Mix (批号 1310013),均为美国 Life technologies 公司提供;逆转录酶试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号 AK2102];COX-2,PGE₂酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所进口分装);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物(美国 QIGEN 公司,QT00199633);COX-2 引物序列 Forward:5'-GAAATGGCTGCAGAGTTGAA-3', Reverse: 5'-TCATCTA GTCTGGAGTGGGA-3';PGE₂引物 Forward:5'-AGT-GAGCTGAGCCTCGTGAT-3', Reverse: 5'-GCAG-CAGACGTCCAGTGTTA-3' (均由 Invitrogen Life Technologies 合成)。xMark™ 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 大鼠痛风性关节炎模型的制备 实验前 MSU 晶体 180℃ 加热 2 h 进行消毒。按照文献[7-10]方法造模,大鼠末次给药 1 h 后,用 20% 乌拉坦 5 mL·kg⁻¹麻醉,背位固定双侧前肢,将大鼠双侧后腿膝关节周围拔毛,医用酒精消毒皮肤,轻度弯曲膝关节,经关节正中进针,将 50 μL 尿酸钠晶体溶液(20 g·L⁻¹)通过髌上韧带注入大鼠膝关节腔。

2.2 动物分组与给药 雄性 SD 大鼠,随机分为 6 组($n = 12$):正常组,模型组,十五味乳鹏散低、中、高剂量组,吲哚美辛组。正常组和模型组 ig 生理盐水;十五味乳鹏散低,中,高剂量组 ig 低,中,高剂量的十五味乳鹏散(0.4, 0.8, 1.2 g·kg⁻¹);吲哚美辛组 ig 3 mg·kg⁻¹的吲哚美辛。每天 1 次,连续 7 d。末次给药 1 h 后,正常组双侧膝关节腔注射 50 μL 无菌 1% PBS,其余各组注射 50 μL 尿酸钠溶液,注射前尿酸钠混悬液漩涡混匀。

2.3 关节腔滑液及滑膜组织取材 大鼠于造模后 24 h 用乌拉坦过量麻醉致死,沿膝关节正中纵行切开皮直至暴露出以膝关节为中心约 3 cm × 3 cm 的区域,以有齿镊提起髌骨。沿髌骨上缘约 0.13 ~ 0.14 cm 处向下切割直至股骨,再分别沿髌骨两侧向下分离至胫骨,打开膝关节腔,用 1 mL 无菌 PBS

灌洗关节腔留取关节滑液,然后以 $400 \times g$ 离心 10 min,取上清,储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。灌洗后可见由髌骨下缘向下延续有一层平滑光亮呈淡黄色的滑膜组织。完整剥离滑膜组织,最后以眼科镊轻轻夹住其游离端,将其完整切下并迅速放入液氮待测。

2.4 关节滑液 COX-2, PGE₂ 含量的测定 ELISA 法测定以上指标,均按试剂盒要求操作。

2.5 关节滑膜组织 COX-2, PGE₂ mRNA 表达水平 组织样品加入 600 μL Trizol 溶液,电动匀浆,匀浆液加 120 μL 三氯甲烷剧烈振荡混匀 30 s, $12\ 000 \times g$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。轻轻吸取水相层,加入等体积异丙醇充分混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 1 h,然后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\ 000 \times g$ 离心 10 min,去上清收集 RNA 沉淀;用 75% 乙醇洗涤 2 次,超净台风干,总 RNA 加入适量 DEPC 水溶解。使用 TaKaRa 逆转录试剂盒将 1.5 μg RNA 逆转录为 cDNA。cDNA 储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待扩增。使用 SYBR Green PCR Master Mix 进行荧光定量 PCR 检测。检测反应管内的荧光信号到达设定阈值所经历的循环数(C_t),求出 ΔC_t ,即目的基因 $C_{t\text{mean}}$ - 内参基因 $C_{t\text{mean}}$,以各组 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行比较。

2.6 统计方法 运用 SPSS 17.0 进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的显著性检验使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有显著性差异。

3 结果

3.1 对痛风性关节炎大鼠关节滑液 COX-2, PGE₂ 含量的影响 50 μL MSU ($20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 注射到大鼠膝关节 24 h 后,关节滑液中 COX-2 和 PGE₂ 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,十五味乳鹏散低、中、高剂量及吡罗昔康均显著降低 MSU 致大鼠痛风性关节炎关节滑液 COX-2 和 PGE₂ 的水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对痛风性关节炎大鼠滑膜组织 COX-2, PGE₂ mRNA 表达水平的影响 与正常组比较,将 MSU 注射进大鼠膝关节腔 24 h 后,大鼠滑膜组织 COX-2, PGE₂ mRNA 表达水平明显增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,十五味乳鹏散 3 个剂量组和吡罗昔康组滑膜组织 COX-2 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),但 PGE₂ 表达水平并未显著改变。见表 2。

4 结论

痛风是由于嘌呤代谢紊乱,导致血尿酸水平增高和/或尿酸排泄减少而导致尿酸盐在组织沉积的

表 1 十五味乳鹏散对 MSU 所致大鼠痛风性关节炎关节滑液 COX-2, PGE₂ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of Rupeng 15 powder in synovial fluid COX-2 and PGE₂ levels in MSU crystal-induced gouty arthritis rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	COX-2	PGE ₂
正常	-	1.77 \pm 0.11	283.6 \pm 17.9
模型	-	2.14 \pm 0.14 ¹⁾	337.2 \pm 29.7 ¹⁾
十五味乳鹏散	0.4	1.91 \pm 0.22 ²⁾	301.4 \pm 22.5 ³⁾
	0.8	1.65 \pm 0.25 ³⁾	290.9 \pm 18.2 ³⁾
	1.2	1.68 \pm 0.20 ³⁾	301.0 \pm 11.4 ³⁾
吡罗昔康	0.003	1.65 \pm 0.26 ³⁾	304.9 \pm 14.0 ³⁾

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

表 2 十五味乳鹏散对 MSU 所致大鼠痛风性关节炎滑膜组织 COX-2, PGE₂ mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of Rupeng 15 powder in synovial tissue COX-2 and PGE₂ mRNA expression in MSU crystal-induced gouty arthritis rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	COX-2	PGE ₂
正常	-	0.07 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03
模型	-	1.39 \pm 0.33 ¹⁾	0.89 \pm 0.23 ¹⁾
十五味乳鹏散	0.4	0.86 \pm 0.40 ²⁾	0.96 \pm 0.54
	0.8	0.89 \pm 0.42 ²⁾	0.98 \pm 0.57
	1.2	0.92 \pm 0.53 ²⁾	1.11 \pm 0.38
吡罗昔康	0.003	0.71 \pm 0.35 ³⁾	0.91 \pm 0.70

疾病,近年来已逐渐成为一种遍布全球的常见病。痛风临床特征为急性关节炎反复发作,主要表现为关节红,肿,热,痛。反复发作的患者在病变关节可形成痛风石,关节畸形,痛风性关节炎最易受累部位是趾关节,其次为踝、跟、膝、腕、指、肘等四肢关节。对于饱受急、慢性痛风性关节炎的患者,研究发现无论是在症状期还是无症状期,其关节组织或关节滑液中都有 MSU 晶体的存在。经证实痛风性关节炎是由于关节腔内 MSU 结晶沉积导致的炎症级联反应^[7-9]。因此,采用 MSU 关节内注射复制痛风性关节炎模型,方法合理可行。MSU 结晶引起的炎症可由释放预先沉积的 MSU 结晶或急性结晶化而触发,MSU 结晶与吞噬细胞相互作用促成短暂的炎症反应,引起不同程度膜软化,产生氧自由基,释放溶酶体酶,产生炎症介质和 IL-1 β , IL-8 等细胞因子,从而引起关节及周围组织红,肿,热,痛^[10]。

前列腺素作为第三信使是炎症反应的重要介质,炎症的发生发展与局部 PGE₂ 含量有密切关系。一般认为在炎症的发病过程中, PGE₂ 起着更为重要的作用,它能使局部毛细血管扩张,血管通透性增加,组织充血,血浆渗出,组织水肿,而且还可能导致 IL-1 β 的表达量增加。有研究报道 MSU 可以增加 COX-2 的表达,同时伴有 PGE₂ 水平的增加^[11-12]。本课题组实验研究发现五味乳鹏散有抗炎及镇痛效应的基础之上,通过复制 MSU 致大鼠痛风性关节炎来观察五味乳鹏散对 MSU 导致的 COX-2 和 PGE₂ 水平增加的影响。实验发现关节腔内注射 MSU 24 h 后,关节滑液 COX-2 及 PGE₂ 的含量均升高,滑膜组织 COX-2, PGE₂ 的 mRNA 表达水平升高。与 MSU 痛风性关节炎模型组比较,藏药五味乳鹏散能明显的降低关节液 COX-2 及 PGE₂ 的含量及滑膜组织 COX-2 mRNA 表达的水平。以上结果说明,藏药五味乳鹏散对急性痛风性关节炎的治疗机制可能是通过降低 COX-2 mRNA 的表达,降低 COX-2, PGE₂ 的水平,从而改善炎症症状,对关节局部起到保护作用。

[参考文献]

[1] 孙贵才,于学峰,李登宇. 复方豨莶草胶囊对尿酸钠致大鼠关节炎滑膜 IL-1 β , IL-8 含量的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(6): 329-331.
[2] Gonzalez E B. An update on the pathology and clinical management of gouty arthritis[J]. Clinical Rheumatol, 2012, 31(1): 13-21.
[3] 吴焕才,王明善. 常用藏成药诠释[M]. 西宁:青海

人民出版社, 2002: 242.
[4] 拉青才让. 藏药十五味乳鹏丸等治疗类风湿关节炎 100 例疗效观察[J]. 医学文选, 2003, 22(6): 900-901.
[5] 尕藏久美,马玉龙. 藏医治疗痛风性关节炎的临床疗效观察[J]. 亚太传统医药, 2006, 2(12): 42-43.
[6] 寇毅英,李永芳,杨梅,等. 藏药十五味乳鹏散镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2203-2205.
[7] Getting S J, Christian H C, Flower R J. Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotrophic hormone efficacy in gouty arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(10): 2765-2775.
[8] 陈文照,谷焕鹏,温成平. 痛风宁对尿酸钠致大鼠关节炎滑膜 IL-1、IL-6 含量的影响[J]. 中国医药学报, 2004, 19(2): 93-94.
[9] Nishimura A, Akahoshi T, Takahashi M, et al. Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8 [J]. J Leukocyte Biol, 1997, 62(4): 444-449.
[10] 钱伯初,史红,郑晓亮. 尿酸钠结晶诱导痛风性关节炎动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(6): 65-69.
[11] 陈文照,金策,林坚,等. 痛风宁对尿酸钠致大鼠关节炎模型前列腺素的影响[J]. 中国医药学报, 2000, 15(2): 24-25.
[12] Cronstein B N, Sunkureddi P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis [J]. J Clin Rheumatol, 2013, 19(1): 19-29.

[责任编辑 聂淑琴]