

豨桐丸对大鼠痛风性关节炎的影响及机制

贾萍^{1*}, 陈刚²

(1. 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016; 2. 重庆工商大学环境与资源学院, 重庆 400067)

[摘要] 目的:观察豨桐丸对尿酸钠晶体诱导的大鼠痛风性关节炎的影响及其药理机制。方法:分别给予大鼠豨桐丸(200,400,800 mg·kg⁻¹)及秋水仙碱(4 mg·kg⁻¹)灌胃用药7 d。第5天大鼠踝关节腔注射尿酸钠晶体诱导痛风性关节炎模型。检测大鼠足肿胀和步态评分,苏木素-伊红(HE)染色法检测关节组织学评分,抗酒石酸酸性磷酸酶染色法检测破骨细胞形成,免疫组化法分析关节组织中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α ,白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-6表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)分析NLRP3炎性体表达。结果:注射尿酸钠晶体导致了大鼠明显的足肿胀,并使步态评分和组织学评分均明显增高,关节组织中的破骨细胞数量及TNF- α ,IL-1 β ,IL-6和NLRP3炎性体表达也都明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。给予400,800 mg·kg⁻¹豨桐丸治疗后,大鼠足肿胀显著减轻,步态评分和组织学评分均显著减少,同时关节组织中的破骨细胞数量及TNF- α ,IL-1 β ,IL-6和NLRP3炎性体表达也都显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:豨桐丸可抑制尿酸钠晶体诱导的大鼠痛风性关节炎的发展,其机制与抑制炎性介质的表达密切相关。

[关键词] 豨桐丸; 痛风性关节炎; 尿酸钠; 炎性介质; NLRP3炎性体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0096-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010096

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1411.034.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 14:11

Effect and Mechanism of Xitongwan on Gouty Arthritis Induced by Monosodium Urate in Rats

JIA Ping^{1*}, CHEN Gang²

(1. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. School of Environment and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect and pharmacological mechanism of Xitongwan on monosodium urate (MSU)-induced gouty arthritis. **Method:** Rats were intragastrically treated with Xitongwan (200, 400, 800 mg·kg⁻¹) for consecutively 7 days. MSU-induced gouty arthritis in rats was prepared through intra-articular injection with MSU crystals in the left ankle joint on the 5th day. Paw volume was measured at 0, 6, 12, 24, 48 h, as well as gait score was calculated at 24 h after MSU induction. Histological score in ankle joint was calculated by hematoxylin and eosin staining. Osteoclast formation in ankle joint was detected by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. Expressions of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 and nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing family of receptor protein 3 (NLRP3) in articular tissues were analyzed by immunohistochemistry staining or Western blot assay. **Result:** Intra-articular injection with MSU crystals led to apparently elevated paw volume and gait score compared with control rats. Meanwhile, histological score, osteoclast formation and expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NLRP3 of gouty arthritis rats were significantly increased compared with control rats. However, treatment with Xitongwan significantly alleviated paw volume and decreased gait score in gouty arthritis rats compared with control rats.

[收稿日期] 20170718(010)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81503420);重庆市卫生局中医药科技项目(ZY201702072)

[通信作者] *贾萍,博士,副主任医师,从事中医药防治风湿性疾病基础与临床研究, Tel: 023-89012864, E-mail: jiap008@qq.com

Meanwhile, treatment with Xitongwan significantly reduced histological score, osteoclast formation and expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NLRP3 in gouty arthritis rats compared with control rats. **Conclusion:** Xitongwan could attenuate the inflammatory development and structural damage by inhibiting the production of inflammatory mediators in gouty arthritis rats.

[**Key words**] Xitongwan; gouty arthritis; monosodium urate; inflammatory mediator; NLRP3 inflammasome

痛风是由于尿酸盐结晶在关节及其周围组织沉积而诱发的反复发作性关节炎炎症性疾病。近年来随着人们生活水平的提高,饮食结构的改变(高蛋白、高嘌呤饮食和饮酒),人口老年化,我国痛风的发病率不断升高,发病年龄也呈现低龄化趋势^[1]。痛风可导致关节剧烈疼痛、畸形、痛风性肾病,同时痛风也与肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化、冠心病、高血压等疾病集聚发生^[2]。因此,痛风已成为严重危害人类健康的常见病,多发病,如何防治痛风已成为全世界关注的课题。

尿酸盐晶体诱导的炎症是痛风的病理基础。尿酸盐晶体可诱导中性粒细胞向关节组织的迁移和浸润,刺激中性粒细胞、单核-巨噬细胞及滑膜成纤维细胞的活化,从而释放大量的促炎介质,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α , 白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 等,其中尤以 IL-1 β 在痛风中的作用最为关键^[3]。研究发现尿酸盐晶体可通过 2 个途径调节 IL-1 β 的表达。首先,尿酸盐晶体可通过 Toll 样受体 4 而激活核转录因子- κ B, 促进 IL-1 β 基因的转录,形成 IL-1 β 前体蛋白^[4];同时,尿酸盐晶体还可通过激活活性体(nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing family of receptor protein 3, NLRP3)而剪切 IL-1 β 前体蛋白为 IL-1 β 成熟体^[5]。IL-1 β 可增强中性粒细胞的黏附性和趋化性,从而促进中性粒细胞在痛风关节炎区域的游走与聚集;IL-1 β 也可激活骨组织中的破骨细胞,诱导多种酶的表达,促进痛风关节组织的破坏;此外 IL-1 β 还可降低神经的痛阈,加重痛风痛感^[6]。由此可见,调控尿酸盐晶体诱导的炎症介质表达,对抑制痛风炎症发展和减轻患者疼痛有非常重要的意义。

尽管痛风的危害性已人所共知,但现有的抗痛风西药存在着疗效有限且毒副作用大的缺陷^[7],因此从中医药中发掘有效的抗痛风药物成为抗痛风药物研究的热点之一。豨桐丸出自清·毛世洪所著《济世养生集》,由豨莶草和臭梧桐叶各等分组成,具有祛风胜湿,舒筋活络之功效,用治感受风湿,两

足酸软,步履艰难,状似风瘫。临床研究证实,豨桐丸治疗膝骨性关节炎 120 例总有效率达到 91.7%^[8];豨桐丸联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎可改善患者类风湿因子和 C 反应蛋白指数,提高临床疗效^[9]。有关豨桐丸的现代药理机制至今研究很少。笔者以往研究证实了豨桐丸可明显抑制大鼠佐剂性关节炎的发展,其机制与降低 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 等炎性因子的表达密切相关^[10];作为豨桐丸主要活性成分之一的奇壬醇被证实可通过抑制 TNF- α , IL-17 和 IL-6 表达,增强 IL-4, IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β)表达而抑制大鼠胶原性关节炎的发展^[11]。但到目前为止,豨桐丸对痛风性关节炎的影响如何还未见报道。本研究应用尿酸钠晶体诱导的大鼠痛风性关节炎模型,观察了豨桐丸对大鼠足肿胀,关节功能与病理损伤,破骨细胞形成,炎性介质表达等指标的影响,以阐明豨桐丸抗痛风的药理作用及其机制,为临床应用豨桐丸治疗痛风提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,SPF 级,雄性,200 ~ 220 g,购自重庆医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(渝)2015-0009。所有大鼠适应性喂养 1 周后开始实验。本实验经重庆医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号 CMU2015-011)。

1.2 药物及试剂 豨莶草,臭梧桐叶,购自重庆桐君阁股份有限公司(批号分别为 14110,13626),由西南大学药学院张继芬副教授鉴定为菊科植物豨莶 *Siegesbeckia orientalis* 的干燥地上部分和马鞭草科植物海州常山 *Clerodendron trichotomum* 的干燥叶,均符合 2015 年版《中国药典》规定。秋水仙碱(西双版纳版纳药业有限责任公司,国药准字 H53021369,批号 150801);免疫组织化学染色试剂盒(二步法)(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 K92413A);TNF- α , IL-1 β , IL-6, NLRP3 和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 C1613, C1522, C1608, C1533, C1966);抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)

染色试剂盒(美国 Sigma 公司,批号 SLBJ7300V);蛋白酶抑制剂 Cocktail(瑞士 Roche 公司,批号 10995100);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号 P0012)。

1.3 仪器 Infinite M200 型酶标仪(美国 BioTek 公司);ChemiDoc XRS 型凝胶成像系统, Basic 型电泳仪, Mini-protein Tetra 型电泳槽, Trans-Blot 小型转印槽(美国 Bio-Rad 公司);RC24 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司);1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Mill-iQ 型纯水系统(美国 Millipore 公司);PBC7140 型组织肿胀测量仪(意大利 Ugo Basile 公司);80i 正置显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 豨桐丸提取物的制备 豨莶草 500 g 与臭梧桐叶 500 g 于 10 倍体积的蒸馏水浸泡 1 h 后煮沸提取 1 h,反复提取 3 次。合并提取液,过滤,浓缩,真空冷冻干燥,获得固体提取物 208 g,提取率为 20.8%。豨桐丸固体提取物保存于 -20 °C 备用。高效液相色谱法色谱条件为 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(28.5:71.5),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 215 nm,柱温 35 °C,进样量 20 μL。检测证实每 1 g 豨桐丸提取物中含有奇壬醇 1.36 mg 和金丝桃苷 0.22 mg。

2.2 尿酸钠晶体制备^[12] 取尿酸 4 g 溶于预热至 60 °C 的 800 mL 双蒸水中,用 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调节 pH 至 8.9,4 °C 冰箱过夜。4 000 r·min⁻¹ 离心收集沉淀即为尿酸钠晶体。高压灭菌,烘干后备用。

2.3 分组,造模及给药 大鼠随机分为空白组,模型组,秋水仙碱组(阳性药,4 mg·kg⁻¹),豨桐丸低、中、高剂量组(200,400,800 mg·kg⁻¹),每组 10 只。按照人(60 kg)常规使用豨桐丸的剂量为豨莶草 10 g,抽梧桐叶 10 g,本实验豨桐丸的提取率为 20.8%,依据体表面积换算法转换为大鼠剂量为大约 400 mg·kg⁻¹。豨桐丸和秋水仙碱均溶于生理盐水,按 1 mL·kg⁻¹ 灌胃给药,空白组和模型组均灌胃等量生理盐水,连续 7 d。第 5 天给药后 1 h,戊巴比妥钠麻醉大鼠,从大鼠左后肢踝关节腔内注入 3 mg 尿酸钠晶体^[13][溶于磷酸盐缓冲液(PBS)50 μL],空白组注射等体积生理盐水。最后一次用药后 1 h 处死大鼠,取材进行相关检测。

2.4 足肿胀检测 分别在尿酸钠晶体注射之前(0 h)及之后 6,12,24,48 h 用组织肿胀测量仪测量

大鼠左后肢的体积。

2.5 步态评分检测 在注射尿酸钠晶体后 24 h 进行步态评分检测,评分标准参考文献[14]所述,0 分:双足正常行走;1 分:轻度跛行,左后足可着地;2 分:中度跛行,左后足可着地但马上收回;3 分:重度跛行,左后足不能着地,只能 3 足着地行走。

2.6 组织学评分检测 取大鼠左后足踝关节,快速去皮毛后于 4% 多聚甲醛缓冲液中固定 48 h,10% EDTA 溶液脱钙 28 d,常规脱水,透明,包埋,切片及苏木素-伊红(HE)染色,然后依据文献[15]所述进行组织学评分,评分参数包括组织肿胀,炎性细胞浸润,滑膜组织增生和组织坏死。0 分:正常;1 分:轻度病变;2 分:中度病变;3 分:重度病变。步态评分及组织学评分均由不知道本研究方案的实验员完成。

2.7 TRAP 染色检测 取 2.6 项下方法所制备的切片,按照 TRAP 染色试剂盒说明书进行染色。100 倍镜下计数 TRAP 阳性(酒红色)染色细胞数作为破骨细胞数量。

2.8 免疫组化染色检测 取 2.6 项下方法所制备的切片,按照“二步法”免疫组化染色试剂盒说明书进行染色。所用抗体分别为抗 TNF-α,抗 IL-1β 和抗 IL-6 抗体(均 1:50)。DAB 显色,中性树胶封片。200 倍镜下分析阳性染色的吸光度 A,随机取同组 10 张切片的平均 A 代表该细胞因子的表达值。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 取大鼠左后足踝关节滑膜组织,液氮中速冻,加入 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂充分匀浆,4 °C 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转移蛋白至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,4 °C 下与 NLRP3(1:500)抗体(1:500)或者 β-actin 抗体共同孵育过夜,再与相应的二抗在室温下共同孵育 1 h,滴加 ECL 试剂后成像系统检测分析信号。以目的蛋白和内参蛋白的灰度值 A 比值代表目的蛋白的相对表达量。

2.10 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠足肿胀和步态评分的影响 与空白组大鼠比较,模型组大鼠在注射尿酸钠晶体 6 h 后大鼠出现明显的足肿胀($P < 0.01$),12 h 后足肿胀达到高峰($P < 0.01$),并持续至注射后 48 h($P < 0.01$)。与模型组大鼠足肿胀比较,给予 400,800 mg·kg⁻¹ 豨桐丸治疗使得尿酸钠

晶体诱导 48 h 后的大鼠足肿胀明显减轻 ($P < 0.01$)。与此同时,注射尿酸钠晶体 24 h 后大鼠步态评分明显升高。给予 400,800 mg·kg⁻¹ 豨桐丸治疗则

显著降低了痛风性关节炎大鼠的步态评分 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。秋水仙碱也显著降低了痛风性关节炎大鼠足肿胀和步态评分 ($P < 0.01$)。见表 1,2。

表 1 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠足肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Xitongwan on paw swelling in rats with gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

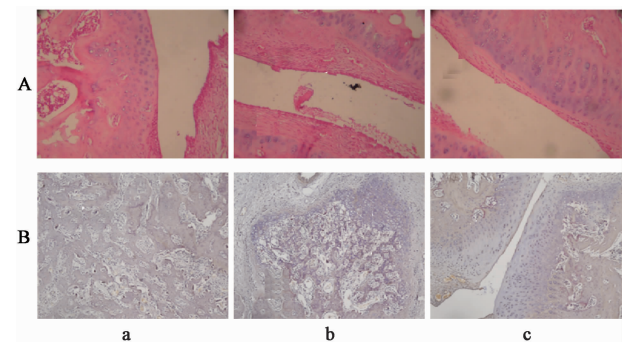
mL

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
空白	-	0.39 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.03
模型	-	0.38 ± 0.02	1.31 ± 0.05 ¹⁾	1.54 ± 0.06 ¹⁾	1.48 ± 0.05 ¹⁾	1.37 ± 0.05 ¹⁾
秋水仙碱	4	0.39 ± 0.02	0.68 ± 0.07 ³⁾	0.92 ± 0.06 ³⁾	0.87 ± 0.06 ³⁾	0.69 ± 0.05 ³⁾
豨桐丸	200	0.40 ± 0.03	1.25 ± 0.05	1.51 ± 0.06	1.43 ± 0.04	1.24 ± 0.04
	400	0.38 ± 0.03	1.20 ± 0.05	1.30 ± 0.07 ²⁾	1.14 ± 0.05 ²⁾	0.98 ± 0.07 ³⁾
	800	0.40 ± 0.03	1.11 ± 0.06 ²⁾	1.25 ± 0.04 ³⁾	1.17 ± 0.06 ³⁾	0.84 ± 0.04 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2,3,图 4 同)。

3.2 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠组织学评分和破骨细胞活化的影响 与空白组大鼠相比较,注射尿酸钠 48 h 后,模型组大鼠踝关节组织学评分明显升高 ($P < 0.01$);与此同时,注射尿酸钠 48 h 后大鼠踝关节 TRAP 阳性染色细胞数也比空白组显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组大鼠相比较,给予 400,800 mg·kg⁻¹ 豨桐丸治疗则显著降低了痛风性关节炎大鼠组织学评分和 TRAP 阳性染色细胞数 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈现出剂量依赖性。见图 1,表 2。

3.3 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 NLRP3 表达的影响 与空白组大鼠比较,模型组大鼠注射尿酸钠 48 h 后关节炎组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 NLRP3 表达均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组大鼠比较,给予 400,800 mg·kg⁻¹ 豨桐丸治



a. 空白组; b. 模型组; c. 豨桐丸 800 mg·kg⁻¹ 剂量组(图 3 同)

图 1 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠踝关节病理损伤 (A, HE) 和破骨细胞形成 (B, TRAP) 的影响 ($\times 100$)

Fig. 1 Effect of Xitongwan on pathological damage (A, HE staining) and osteoclast formation (B, TRAP staining) in rats with gouty arthritis ($\times 100$)

表 2 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠步态评分,组织学评分和破骨细胞活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Xitongwan on gait score, histological score and osteoclast formation in rats with gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	步态评分/分	组织学评分/分	破骨细胞数量/个
空白	-	0	0	14.2 ± 3.9
模型	-	2.86 ± 0.35	2.90 ± 0.32	86.9 ± 9.5 ¹⁾
秋水仙碱	4	1.63 ± 0.52 ³⁾	1.90 ± 0.32 ³⁾	37.8 ± 9.6 ³⁾
豨桐丸	200	2.63 ± 0.52	2.60 ± 0.52	82.4 ± 8.9
	400	2.25 ± 0.71 ²⁾	2.40 ± 0.52 ²⁾	75.9 ± 7.9 ²⁾
	800	2.13 ± 0.35 ³⁾	2.10 ± 0.56 ³⁾	65.2 ± 13.8 ³⁾

疗则显著降低了大鼠关节炎组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 NLRP3 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈现出剂量依赖性。见表 3,图 2,3。

4 讨论

本研究利用尿酸钠晶体诱导的大鼠痛风性关节炎模型,证明了豨桐丸可改善大鼠痛风性关节炎的足肿胀和关节功能,减轻关节功能障碍与病理损伤,降低破骨细胞的形成,以及抑制促炎介质 TNF- α ,

IL-1 β , IL-6 和 NLRP3 的表达。

中国的痛风发病率在过去的几十年增长明显,痛风已成为中老年人群中最常见的关节炎形式^[1],如何防治痛风已成为当今老百姓和医药界都十分关注的话题。高尿酸血症是痛风的生化基础^[16]。血液中过高浓度的尿酸形成尿酸盐结晶而沉积在关节组织。尿酸盐晶体可诱导关节组织中的中性粒细胞、单核-巨噬细胞、滑膜成纤维细胞等多种细胞

表 3 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 表达 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Xitongwan on expressions of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in rats with gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	IL-6
空白	-	0.07 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.05
模型	-	0.80 ± 0.05 ¹⁾	0.85 ± 0.08 ¹⁾	0.72 ± 0.07 ¹⁾
秋水仙碱	4	0.31 ± 0.06	0.45 ± 0.07	0.39 ± 0.04
豨桐丸	200	0.77 ± 0.08	0.82 ± 0.06	0.69 ± 0.08
	400	0.70 ± 0.06 ²⁾	0.73 ± 0.07 ²⁾	0.61 ± 0.06 ²⁾
	800	0.59 ± 0.07 ³⁾	0.62 ± 0.06 ³⁾	0.54 ± 0.10 ³⁾

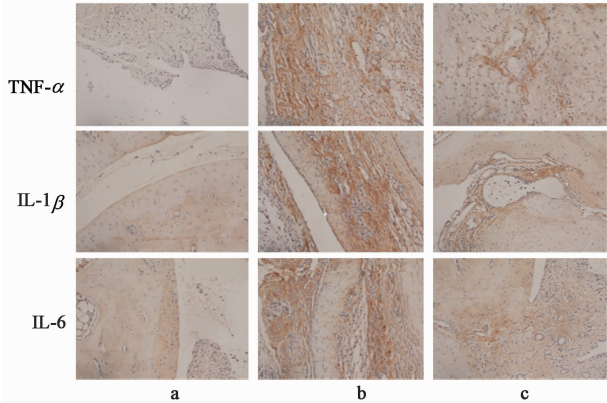
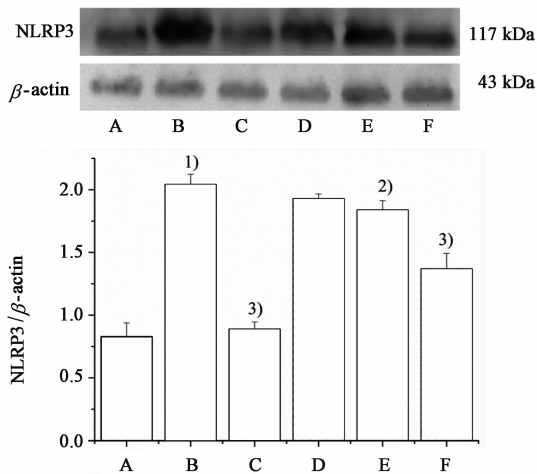


图 2 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 表达的影响 (免疫组化, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of Xitongwan on expressions of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in rats with gouty arthritis (IHC, $\times 100$)



A. 空白组; B. 模型组; C. 秋水仙碱组; D ~ F. 豨桐丸 200, 400, 800 mg·kg⁻¹ 组

图 3 豨桐丸对痛风性关节炎大鼠 NLRP3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of Xitongwan on NLRP3 expression in rats with gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

活化, 释放出大量细胞因子从而促进痛风炎症的发生、发展^[17]。因此, 应用关节腔内注射尿酸钠晶体诱导的关节炎就成为了当前公认的痛风动物模型^[18]。本研究中给予大鼠踝关节注射尿酸钠晶体 6 h 后, 大鼠关节出现了典型的红、肿、热、痛的症

状, 关节肿胀在 12 h 后达到最高峰, 并持续到注射后 48 h。步态评分和组织学评分是被广泛用于评价大鼠关节功能和病理损伤的指标^[14-15]。本研究中大鼠注射尿酸钠晶体后步态评分明显升高, 所有大鼠的注射足均不能正常行走甚至三足跛行, 提示大鼠关节功能严重障碍。病理学检测也发现病变关节滑膜组织增生, 肿胀明显, 大量炎性细胞浸润, 破骨细胞形成异常增多而破坏关节结构, 导致组织学评分显著增高。给予豨桐丸治疗后, 大鼠痛风性关节炎的关节肿胀、功能障碍及关节病理损伤均明显减轻, 且呈现出明显的剂量依赖性, 这些实验结果充分证明了豨桐丸抑制痛风性关节炎发展的药理作用。

已有不少研究结果证实了炎性介质在痛风炎症发展和骨质破坏过程中的核心作用^[19]。尿酸盐晶体沉积在关节局部组织可刺激局部的免疫活性细胞 (如滑膜成纤维细胞) 活化以吞噬尿酸盐晶体, 并产生大量的趋化因子 (如 IL-8, 补体 5a, 白三烯 B4 等), 从而诱导中性粒细胞浸润。浸润的炎性细胞可产生多种细胞因子, 包括 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6; 与此同时, 产生的细胞因子又能活化多种细胞产生更多的促炎细胞介质, 从而促进炎症的发生, 发展^[20]。在众多促炎细胞因子中, IL-1 β 的作用尤其引人关注。中性粒细胞, 单核-巨噬细胞吞噬了尿酸盐晶体后, 一方面可激活核转录因子- κ B, 导致 IL-1 β 基因转录增加, 最终产生大量的 IL-1 β 前体蛋白^[21]; 同时也可激活 NLRP3 炎性体, 剪切 IL-1 β 前体 (31 kDa) 为 IL-1 β (17 kDa)^[22]。IL-1 β 既可刺激免疫细胞产生其他促炎介质, 也可活化破骨细胞促进骨与关节结构的病理损伤, 还可作用于神经元导致痛风患者对炎症疼痛过度敏感^[23]。Canakinumab 是重组的、完全人源化中和 IL-1 β 的单克隆抗体, 临床研究证实 Canakinumab 可迅速、持续缓解痛风患者关节疼痛^[24]。由此可见, 拮抗 IL-1 β 的表达或者成熟是治疗痛风的有效途径。本研究发现, 注射尿酸盐晶体显著诱导了大鼠关节组织中 TNF- α , IL-1 β 和

IL-6 的表达;同时还伴随有 NLRP3 炎性体表达量明显增高。给予豨桐丸治疗后,痛风性关节炎大鼠关节组织中 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 的表达显著降低, NLRP3 炎性体表达也明显减少。这些结果说明,豨桐丸对尿酸盐晶体诱导的多种促炎介质的表达均有抑制作用,尤其是对痛风炎症的关键细胞因子 IL-1 β 的成熟表达的抑制作用明显,提示豨桐丸抑制大鼠痛风性关节炎发展的药理作用与其抑制促炎介质的表达密切相关。

综上所述,本研究证明了经典中医药方剂豨桐丸可抑制尿酸钠晶体诱导的大鼠痛风性关节炎发展和病理损伤,其机制与抑制多种促炎介质的表达密切相关,从而为临床应用豨桐丸治疗痛风提供了科学依据。在后续的研究中,结合 IL-1 β 在痛风炎症发展和病理损伤中的核心作用,笔者将分别从核转录因子- κ B 介导的 IL-1 β 基因表达,及 NLRP3 炎性体介导的 IL-1 β 成熟分泌两个途径,进一步深入探讨和阐明豨桐丸调控痛风炎症中 IL-1 β 表达的分子机制。

[参考文献]

[1] 石白,殷海波,张锦花. 痛风现代流行病学及其发病机制研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2012,1(6): 51-55.

[2] Richette P, Bardin T. Gout [J]. Lancet, 2010, 375(9711):318-328.

[3] Desai J, Steiger S, Anders H J. Molecular pathophysiology of gout [J]. Trends Mol Med, 2017,23(8):756-768.

[4] Hahn M, Frey S, Hueber A J. The novel interleukin-1 cytokine family members in inflammatory diseases [J]. Curr Opin Rheumatol, 2017,29(2):208-213.

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

[6] Mitroulis I, Kambas K, Ritis K. Neutrophils, IL-1 β , and gout: is there a link [J]. Semin Immunopathol, 2013,35(4):501-512.

[7] 承良凤,陆进明. 痛风药物治疗新进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015,20(9):1066-1071.

[8] 李万,唐本夫. 豨桐丸治疗膝骨性关节炎 120 例临床观察 [J]. 湖南中医杂志, 2013,29(2):65-66.

[9] 梁瑞芝,丁菱. 豨桐丸联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎的有效性与安全性探讨 [J]. 内蒙古中医药, 2017,36(9):79-80.

[10] JIA P, CHEN G, QIN W Y, et al. Xitong Wan attenuates inflammation development through inhibiting the activation of nuclear factor- κ B in rats with adjuvant-

induced arthritis [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 193(3):266-271.

[11] LU Y, XIAO J, WU Z W, et al. Kirenol exerts a potent anti-arthritic effect in collagen-induced arthritis by modifying the T cells balance [J]. Phytomedicine, 2012, 19(10):882-889.

[12] dos Santos R M, Oliveira S M, Silva C R, et al. Antinociceptive and anti-edematogenic effects of glibenclamide in a model of acute gouty attack in rats [J]. Inflamm Res, 2013,62(6):617-625.

[13] 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对尿酸钠诱导的大鼠中性粒细胞炎性信号表达的影响 [J]. 中国药物与临床, 2016,16(2):170-175.

[14] 李利生,史源泉,龚其海. 淫羊藿苷抗尿酸钠诱导的大鼠急性痛风性关节炎作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(11):134-138.

[15] SHAN W, QUE H F. On action mechanism of Sanmiao Pill and medicinal cyathula root for inflammatory reaction of acute gouty arthritis [J]. World Chin Med, 2003,8(2):189-193.

[16] 梁晓萍,梁琼麟,胡坪,等. 高尿酸血症与痛风研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(10):1265-1268.

[17] 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.

[18] 李娜,华龙,袁慧. 痛风动物模型的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2016,29(24):3335-3337.

[19] Busso N, So A. Mechanisms of inflammation in gout [J]. Arthritis Res Ther, 2005,44(9):1090-1096.

[20] Cronstein B N, Terkeltaub R. The inflammatory process of gout and its treatment [J]. Arthritis Res Ther, 2006,8(1):1-7.

[21] CHEN C J, SHI Y, Hearn A, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals [J]. J Clin Invest, 2006,116(8):2262-2271.

[22] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. Nature, 2006,440(3):237-241.

[23] Church L D, Cook G P, McDermott M F. Primer: inflammasomes and interleukin 1 β in inflammatory disorders [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008,4(1):34-42.

[24] Lysengwilliamson K A. Canakinumab: a guide to its use in acute gouty arthritis flares [J]. Bio Drugs, 2013,27(4):401-406.

[责任编辑 邹晓翠]