

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

金晓敏, 张晓熙, 郭璐, 李杨蕾, 邢梦雨, 田崇梅, 夏道宗*
(浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

[摘要] **目的:**研究土茯苓总黄酮(TFSG)对急性痛风性关节炎小鼠的抗炎作用,并初步探讨其作用机制。**方法:**将90只雄性C57BL/6小鼠随机分为正常组,模型组,秋水仙碱组($0.65\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),土茯苓总黄酮低、中、高剂量组(100, 300, 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组15只。除正常组外,其余各组采用尿酸钠结晶复制小鼠痛风性关节炎模型,测定小鼠踝关节肿胀度;酶联免疫吸附法(ELISA)检测不同组别滑膜组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β), IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定滑膜组织中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3), 凋亡相关斑点样蛋白(ASC), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)的蛋白表达,实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA水平的表达。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠踝关节肿胀度明显增加($P < 0.01$),模型组小鼠滑膜组织中IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$), NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达和mRNA水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,土茯苓总黄酮组能够显著降低小鼠踝关节肿胀度($P < 0.01$),滑膜组织中IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平以及NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白水平和mRNA水平显著降低($P < 0.01$)。**结论:**土茯苓总黄酮具有一定的抗痛风性关节炎作用,其作用机制与NLRP3炎性体轴有关。

[关键词] 土茯苓总黄酮; 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(NLRP3)炎性体轴

[中图分类号] R22; R285.5; R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0090-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040090

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1510.024.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:10

Effect and Mechanism of Total Flavonoids from Smilacis Glabrae Rhizoma in Treatment of Gouty Arthritis Based on NLRP3 Inflammasomes Axis

JIN Xiao-min, ZHANG Xiao-xi, GUO Lu, LI Yang-lei, XING Meng-yu, TIAN Chong-mei, XIA Dao-zong*
(School of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-inflammatory effect of total flavonoids from Smilacis Glabrae Rhizoma (TFSG) on acute gouty arthritis and its mechanism. **Method:** Totally 90 C57BL/6 mice were randomly divided into the normal group, the model group, the colchicine group ($0.65\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the TFSG group (100, 300, 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 15 mice in each group. The acute gouty arthritis model was induced with monosodium urate (MSU) crystals, except for the normal group, and the mice's ankle swelling degree was measured. The mice's synovium tissues were collected to detect the inflammatory mediators interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) by enzyme-linked immunosorbent assay. The protein expressions of Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), and cysteine aspartic acid protease-1 (Caspase-1) were detected by Western blot, and the mRNA expressions of NLRP3, ASC, and Caspase-1 messenger in synovium tissues were detected by Real-time PCR. **Result:** Compared with the normal

[收稿日期] 20170921(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673656, 81102861, 81374048);浙江省中医药科技计划项目(2015ZA062)

[第一作者] 金晓敏,在读硕士,从事中药代谢与抗炎药理研究, E-mail: myrw2016@163.com

[通信作者] *夏道宗,博士,教授,从事中药代谢与抗炎药理研究, Tel: 0571-86633367, E-mail: xiadaozong@zcmu.edu.cn

group, mice ankle swelling degree of the model group increased significantly ($P < 0.01$), and the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and the protein and mRNA expressions of NLRP3, ASC and Caspase-1 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the TFSG group could significantly reduce ankle swelling degree and IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels ($P < 0.01$), as well as NLRP3, ASC, Caspase-1 protein and mRNA expressions ($P < 0.01$). **Conclusion:** TFSG has an anti-gouty arthritis effect, and its mechanism is correlated with NLRP3 inflammasome axis.

[Key words] total flavonoids from *Smilacis Glabrae Rhizoma*; acute gouty arthritis; NLRP3 inflammasome axis

痛风(Gout)是因嘌呤代谢障碍和(或)尿酸排泄减少,血尿酸持续升高而导致尿酸盐结晶(monoso-diumurate, MSU)析出并沉积于组织或器官引起的临床证候群^[1]。痛风最常见的表现形式是以关节红肿热痛的炎症反应为主^[2],多见于拇指的环趾关节以及踝部,足部关节等,严重影响患者的日常活动。近年来,痛风发病率逐年上升,且与年龄的增长呈现正相关,也逐渐呈现低龄化趋势^[3]。流行病学调查显示,每年男性痛风新发病率约为0.4%,女性约为0.14%,山东沿海地区的痛风发病率已高达1.14%^[4-5]。临床常用非甾体抗炎药,秋水仙碱等治疗痛风性关节炎,但这些药物具有较明显的不良反应,口服秋水仙碱后,超过80%的患者在临床完全改善症状之前经历了腹痛^[6]。此外,非甾体抗炎药的不良反应在老年人中更为明显。虽然已经有新近研发的抗白细胞介素-1(IL-1)药物,例如anakinra, canakinumab和riloncept等,但因其成本高,药物的半衰期短等原因,给患者带来不便,难以达到患者期望的效果^[7-8]。目前,从中医药中寻找新型有效的抗痛风药物成为一大研究热点。

中药黄酮类化合物药理作用最为广泛,多项研究表明黄酮类化合物有降尿酸效果,表现出一定的抗痛风作用^[9]。土茯苓首载《滇南本草》,其性甘淡平和,归肝,肾,脾,胃经,系清热毒,除湿浊,疗疮肿,利关节之要药^[10]。《本草纲目》载其“治拘挛骨痛,恶疮臃肿,解汞粉,银朱毒”^[11]。因此,土茯苓黄酮类成分可能是治疗痛风的有效成分。目前,关于痛风性关节炎的发病机制仍未完全阐明,新近的研究认为,局部沉积的尿酸盐可以作为一种内源性危险信号来激活免疫反应和炎症反应,进而造成疾病的发生^[12]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)是一类胞质型模式识别受体,能够与凋亡相关斑点样蛋白(ASC)以及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)形成NLRP3炎症体信号转导通路,通过识别MSU等配体后参与炎症反应的调控^[13-14]。当NLRP3炎症转导通路被激活后,会导致大量炎症

因子如IL-1 β 等的成熟和释放,进一步导致痛风发作^[15]。本实验以土茯苓为原料,用MSU复制小鼠痛风性关节炎模型,通过测定NLRP3炎症体轴的炎症因子IL-1 β , IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平以及NLRP3, ASC, Caspase-1表达等,研究土茯苓总黄酮对小鼠痛风性关节炎的作用和机制,为以后治疗痛风性关节炎提供一定的实验基础。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6小鼠90只,雄性,7周龄,体质量(22 \pm 2)g,购自上海斯莱克公司,合格证号SCXK(沪)2002-0002。饲养于浙江中医药大学动物实验中心,动物使用许可证号SYXK(浙)2015-0004。实验小鼠饲养7d后进行实验,小鼠生活环境适宜,水和食物充足,12h光暗循环。实验动物研究的开展取得了浙江中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号ZSLL-2017-066)。

1.2 药物及试剂 土茯苓购自浙江中医药大学中药饮片厂,经浙江中医药大学药学院陈孔荣副教授鉴定为百合科植物光叶菝葜*Smilax glabra*的干燥根茎;秋水仙碱片(昆药集团股份有限公司,批号16IS);IL-1 β , IL-6, TNF- α 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国eBioscience公司,批号分别为147435029, 145466017, 147819013);ASC, Caspase-1兔多克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为2813878, GR202191-1);NLRP3兔多克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号0003);抗 β -肌动蛋白(β -actin)鼠单克隆抗体,山羊抗鼠IgG,山羊抗兔IgG,BCA蛋白定量试剂盒,蛋白酶抑制剂混合物, RIPA裂解液, SDS-PAGE Loading Buffer, SDS-PAGE Gel Kit, 蛋白印迹膜再生液, eECL Western blot Kit(康为世纪生物科技有限公司,批号分别为2415G, 1715K, 0915I, 02065, 20215, 10203, 01411/70138, 50131, 01426/20142, 2015K/1715K);MSU(美国Sigma-Aldrich公司,批号BCBR7559);RNA提取试剂盒,反转录试剂盒,定量扩增试剂盒(日本TaKaRa公司,批号分别为A1503-1, A5001-1,

AA406-1); Pxxis™ Protein Transfer Stack (南京思普金生物科技有限公司, 批号 20170106001); β -actin, NLRP3, ASC, Caspase-1 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 仪器 D-37520 型低温离心机(赛默飞世尔科技公司); MR-4100 型酶标仪(美国 Dynatech 公司); CHB-100 型恒温金属浴(杭州博日科技有限公司); Mini-PROTEAN Tetra System 型垂直电泳系统(美国 Bio-Rad 公司); Pxxis™ Gel Processor 型半干转膜仪(南京思普金生物科技有限公司); ChemiScope 3600mini 化学发光成像仪(中国 Clix 公司); Nanodrop 2000 型微量核酸蛋白检测仪(赛默飞世尔科技公司); ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 土茯苓总黄酮的制备 土茯苓饮片烘干后粉碎过筛,用 60% 乙醇以 1:20 的料液比提取 3 h,提取温度 60 °C,提取液旋蒸至无乙醇后用正丁醇萃取,再旋蒸至无正丁醇后冷冻干燥,备用。

2.2 分组及给药 将实验小鼠随机分为正常组,模型组,秋水仙碱组,土茯苓总黄酮低、中、高剂量组,每组 15 只。分别于造模前 6 d,造模后 1 d 灌胃给药,秋水仙碱组小鼠给予秋水仙碱剂量设定为 0.65 mg·kg⁻¹,土茯苓总黄酮低、中、高剂量组给药剂量分别为 100,300,500 mg·kg⁻¹,正常组和模型组小鼠给予同体积的水。

2.3 痛风性关节炎模型建立 在参考 Coderre 等^[16]经典造模方法基础上,对 Reber 等^[17]造模方法稍作修改,将 MSU 配制成 100 g·L⁻¹,第 6 天灌胃 1 h 后,除正常组注射等体积的生理盐水外,其余各组用灭菌注射器沿小鼠右踝关节背侧 45° 方向将 0.025 mL 尿酸钠溶液注入到踝关节腔内,以对侧鼓起为注入标准,诱导小鼠急性痛风性关节炎模型。

2.4 踝关节肿胀测定 造模前,用记号笔在小鼠踝关节上方 0.8 cm 处划 1 条清晰的直线,以备测量足

趾容积时需要。用自制简易足趾容积测量装置(将 5 mL 针筒和 1 mL 针筒相连接,把小鼠右后肢按照划线放入 5 mL 针筒内,读数,另一侧 1 mL 针筒液面的前后差值即为足趾容积值)测定小鼠足趾容积。造模后,观察小鼠右后足肿胀情况,并于注射后 1,2,4,6,10,24 h 测定足趾容积,按肿胀率 = (致炎后足趾容积 - 致炎前足趾容积)/致炎前足趾容积 × 100% 计算踝关节肿胀度。

2.5 ELISA 检测关节滑膜组织中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 含量 第 7 天灌胃给药 3 h 后,小鼠脱颈处死,在右踝关节上方 0.5 cm 处剪断,放入盛有冰块的托盘中除去皮毛等,加入适量液氮,研磨至粉碎,加入适量生理盐水用匀浆器研匀,3 000 r·min⁻¹ 低温离心 10 min,取上清液,IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平按对应的 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定关节滑膜组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达 受试踝关节除去皮毛和肌肉等,将其放入离心管中,再加入裂解液 1 mL 和蛋白酶抑制剂 10 μ L 混合物,连同关节腔和滑膜剪碎,匀浆,冰上裂解 30 min,离心取上清,测定蛋白浓度后分装,保存至 -80 °C 冰箱中,Western blot 测定滑膜组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 的蛋白含量表达。以目的蛋白与 β -actin 蛋白条带灰度值比来评价蛋白表达水平。

2.7 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测关节滑膜组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 表达 受试踝关节除去皮毛和肌肉等,加入适量液氮,研磨至粉碎,先按 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,测定总 RNA 浓度和吸光度 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.0 时符合实验要求。再将总 RNA 按反转录试剂盒说明书操作,合成 cDNA。最后按定量扩增试剂盒说明书进行 PCR 扩增,具体实验条件为 95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 34 s,共 42 个循环,每组设 2 个复孔,检测 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 含量表达。PCR 引物序列见表 1。按 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算待测目的基因的相对表达。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')		长度/bp
	上游	下游	
β -actin	GCTCTCTTCAGCCTTCCTT	GGTCTTTACGGATGTCAACG	100
NLRP3	CTCGCATTGGTTCTGAGCTCA	AGTAAGGCCGGAATTCACCA	153
ASC	AGAGACATGGGCATACAGGAG	GTTCTTGCAGGTCAGGTTCC	300
Caspase-1	ACTCGTACACGTCTTGCCTC	CTGGGCAGGCAGCAAATTC	190

2.8 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 ANOVA 方差分析,两两比较采用 SNK 检验方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 土茯苓总黄酮对 C57BL/6 小鼠踝关节肿胀度的影响 造模 1 h 后,各组小鼠踝关节肿胀度均有所增加,说明造模成功。除正常组外,其余各组小鼠的肿胀程度在 6 h 达到最大值,之后有

所降低。与正常组比较,在造模 2 ~ 24 h,模型组小鼠踝关节肿胀度明显增加 ($P < 0.01$);在 6 ~ 10 h,土茯苓总黄酮组和秋水仙碱组的小鼠踝关节肿胀度有下降趋势 ($P < 0.01$);在 24 h,土茯苓总黄酮高剂量组小鼠踝关节肿胀度下降,均具有显著性差异 ($P < 0.05$),土茯苓总黄酮低、中剂量组虽与模型组差异不具有统计学意义,但从数据上仍能看出,小鼠踝关节肿胀度减小。见表 2。

表 2 土茯苓总黄酮对小鼠踝关节肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effect of TFSG on swelling of mice ankle joint ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	1 h	2 h	4 h	6 h	10 h	24 h
正常	-	15.573 \pm 7.302	13.205 \pm 5.027	7.536 \pm 3.151	6.635 \pm 3.342	5.278 \pm 3.474	4.916 \pm 2.145
模型	-	14.235 \pm 6.671	21.053 \pm 6.530 ²⁾	30.963 \pm 7.275 ²⁾	49.685 \pm 9.523 ²⁾	40.157 \pm 9.940 ²⁾	25.458 \pm 10.243 ²⁾
土茯苓总黄酮	0.1	11.911 \pm 6.845	18.741 \pm 7.773 ¹⁾	27.174 \pm 7.019 ²⁾	41.804 \pm 10.170 ^{2,3)}	34.469 \pm 9.481 ²⁾	23.946 \pm 11.125 ²⁾
	0.3	14.393 \pm 7.117	22.427 \pm 7.56 ²⁾	31.241 \pm 10.076 ²⁾	38.509 \pm 9.092 ^{2,4)}	29.779 \pm 9.261 ^{2,4)}	20.539 \pm 9.565 ²⁾
	0.5	15.657 \pm 5.915	20.631 \pm 7.869 ²⁾	29.917 \pm 8.048 ²⁾	35.812 \pm 9.119 ^{2,4)}	26.605 \pm 9.808 ^{2,4)}	17.019 \pm 8.475 ^{1,3)}
秋水仙碱	6.5×10^{-4}	10.874 \pm 2.886	17.700 \pm 7.253	25.275 \pm 6.394 ^{2,3)}	34.236 \pm 7.791 ^{2,4)}	24.971 \pm 8.251 ^{2,4)}	14.535 \pm 7.478 ^{1,4)}

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 3 ~ 5 同)。

3.2 土茯苓总黄酮对 C57BL/6 小鼠滑膜组织中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平的影响 与正常组比较,模型组的 IL-1 β , IL-6, TNF- α 含量明显升高 ($P <$

0.01)。与模型组比较,土茯苓总黄酮组和秋水仙碱组的 IL-1 β , IL-6, TNF- α 含量明显降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 土茯苓总黄酮对小鼠滑膜组织中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 3 Effect of TFSG on levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α in synovial tissues ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

ng \cdot L⁻¹

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常	-	2.254 \pm 0.933	157.5 \pm 6.033	89.37 \pm 8.618
模型	-	72.60 \pm 4.125 ²⁾	1 431.0 \pm 202.5 ²⁾	1 007.0 \pm 86.84 ²⁾
土茯苓总黄酮	0.1	56.50 \pm 1.636 ^{2,4)}	1 226.0 \pm 113.6 ^{2,4)}	878.5 \pm 14.00 ^{2,4)}
	0.3	41.44 \pm 2.192 ^{2,4)}	711.8 \pm 61.08 ^{2,4)}	550.4 \pm 17.08 ^{2,4)}
	0.5	19.94 \pm 1.471 ^{2,4)}	448.8 \pm 29.01 ^{2,4)}	383.3 \pm 10.02 ^{2,4)}
秋水仙碱	6.5×10^{-4}	15.53 \pm 1.501 ^{2,4)}	220.9 \pm 4.412 ^{2,4)}	256.2 \pm 9.824 ^{2,4)}

3.3 土茯苓总黄酮对 C57BL/6 小鼠滑膜组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组的 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白含量明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,土茯苓总黄酮组和秋水仙碱组的 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白含量明显降低 ($P < 0.01$)。见图 1,表 4。

组和秋水仙碱组的 NLRP3, ASC, Caspase-1 的 mRNA 含量明显降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

3.4 土茯苓总黄酮对 C57BL/6 小鼠滑膜组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 含量明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,土茯苓总黄酮

4 讨论

由于鼠、兔等体内嘌呤核苷酸代谢途径不同于人体,在复制痛风性关节炎动物模型时,很难从嘌呤代谢途径入手,故常选择通过关节腔注射尿酸盐溶液来复制类似人类痛风性关节炎的动物模型^[18]。该模型虽然只是一种急性非特异性炎症反应,不同于人类痛风性关节炎的发病机制,但可以用来模拟局部痛风症状,其中鼠兔模型已是国际上筛选

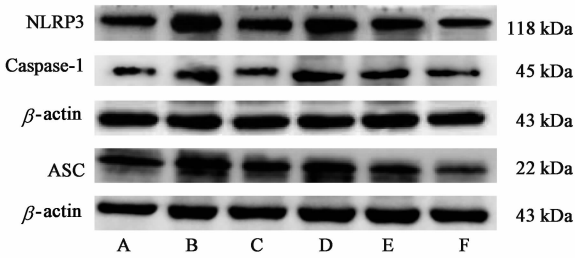


图 1 土茯苓总黄酮对 C57BL/6 小鼠滑膜组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达电泳

Fig. 1 Effect of TFSG on electrophoretic expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins in synovial tissue

表 4 土茯苓总黄酮对小鼠滑膜组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of TFSG on protein levels of NLRP3, ASC, Caspase-1 in synovial tissues ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	NLRP3/ β -actin	ASC/ β -actin	Caspase-1/ β -actin
正常	-	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01
模型	-	2.05 \pm 0.05 ²⁾	2.61 \pm 0.08 ²⁾	1.74 \pm 0.02 ²⁾
土茯苓总黄酮	0.1	1.82 \pm 0.07 ^{2,4)}	2.00 \pm 0.02 ^{2,4)}	1.52 \pm 0.03 ^{2,4)}
	0.3	1.39 \pm 0.08 ^{2,4)}	1.11 \pm 0.05 ^{2,4)}	1.30 \pm 0.03 ⁴⁾
	0.5	0.96 \pm 0.05 ⁴⁾	0.70 \pm 0.07 ^{2,4)}	1.21 \pm 0.05 ^{2,4)}
秋水仙碱	6.5×10^{-4}	1.24 \pm 0.03 ^{2,4)}	1.49 \pm 0.04 ^{2,4)}	1.08 \pm 0.01 ^{2,4)}

表 5 土茯苓总黄酮对小鼠滑膜组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of TFSG NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA in synovial tissues ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	NLRP3	ASC	Caspase-1
正常	-	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.025	1.00 \pm 0.02
模型	-	1.60 \pm 0.03 ²⁾	2.00 \pm 0.01 ²⁾	2.20 \pm 0.08 ²⁾
土茯苓总黄酮	0.1	1.35 \pm 0.03 ^{2,4)}	1.63 \pm 0.02 ^{2,4)}	1.85 \pm 0.01 ^{2,4)}
	0.3	1.20 \pm 0.04 ^{2,4)}	1.30 \pm 0.04 ^{2,4)}	1.55 \pm 0.02 ^{2,4)}
	0.5	1.10 \pm 0.03 ^{2,4)}	1.10 \pm 0.02 ⁴⁾	1.37 \pm 0.04 ^{2,4)}
秋水仙碱	6.5×10^{-4}	1.05 \pm 0.02 ⁴⁾	1.19 \pm 0.01 ^{2,4)}	1.28 \pm 0.05 ^{2,4)}

注入 MSU 晶体后, IL-1 β 的成熟和释放明显受到抑制; 当小鼠 NLRP3 被敲除时, IL-1 β 的产生受到抑制, 在注射 MSU 晶体后, 中性粒细胞的聚集削弱^[25-26], 证实了 NLRP3 炎性体在痛风急性发作中发挥了重要的作用。本研究从 NLRP3 炎性体轴探讨了土茯苓总黄酮对痛风性关节炎小鼠的保护作用机制, 结果显示土茯苓总黄酮能有效降低小鼠踝关节肿胀度, 降低 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平以及 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白相对表达量和 mRNA 相对表达量, 说明土茯苓总黄酮具有一定的抗痛风性关节炎作用, 通过抑制 NLRP3 炎性体轴活化, 减少下游炎症因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的表达以及 NLRP3, ASC,

痛风药物抗炎作用的常用方法, 具有稳定, 易操作等优点^[19]。本实验通过观察小鼠足部和测量足趾容积, 显示模型制备是成功的, 说明该方法行之有效。

近年来, 有研究认为, MSU 是引起痛风性关节炎的关键物质, 能诱导各种炎症因子的产生。这些分泌的炎症因子能引起水肿, 血浆渗出, 白细胞聚集, 发热等炎症反应, 引发并加重痛风病情^[20-22]。NLRP3 炎性体是固有免疫系统的一类重要感受器, 作为炎症反应的一个关键调控因素, 能够识别病原体上的相关分子模式^[23]。Martinon 等^[24] 通过研究发现, 向敲除 NLRP3/ASC/Caspase-1 的小鼠体内

Caspase-1 的表达来降低痛风性关节炎的炎症反应。今后, 仍需继续深入研究土茯苓治疗痛风性关节炎的作用机制, 以期研究和开发防治痛风的安全有效的中药新药。

[参考文献]

[1] Richette P, Bardin T. Gout [J]. Lancet, 2009, 375 (9711): 318-328.
 [2] 叶仁群, 林国彬, 宋晓容, 等. 清热利湿活血法对急性痛风性关节炎患者 IL-6 和 TNF- α 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(4): 845-847.
 [3] ZENG Q Y, CHEN R, Darmawan J, et al. Rheumatic

- diseases in China [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10 (1): R17-R27.
- [4] Roddy E, Doherty M. Epidemiology of gout [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2014, 40(2): 155-175.
- [5] MIAO Z M, LI C G, CHEN Y, et al. Dietary and lifestyle changes associated with high prevalence of hyperuricemia and gout in the Shandong coastal cities of eastern China [J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(9): 1859.
- [6] Lee H E, YANG G, Kim N D, et al. Targeting ASC in NLRP3 inflammasome by caffeic acid phenethyl ester: a novel strategy to treat acute gout [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep38622.
- [7] So A, Smedt T D, Revaz S, et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(2): R28-R34.
- [8] Dumusc A, So A. Interleukin-1 as a therapeutic target in gout [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2015, 27(2): 156-163.
- [9] 马锐, 吴胜本. 中药黄酮类化合物药理作用及作用机制研究进展 [J]. *中国药物警戒*, 2013, 11 (5): 286-290.
- [10] 薛梅红. 土茯苓应用经验举隅 [J]. *医学理论与实践*, 2011, 24(24): 2968-2969.
- [11] 李时珍. 本草纲目 [M]. 陈贵廷, 傅世垣, 傅景华, 等, 点校. 北京: 中医古籍出版社, 1994: 556-557.
- [12] Steiger S, Harper J L. Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2014, 16(1): 392-395.
- [13] Liubryan R. Intracellular innate immunity in gouty arthritis; role of NALP3 inflammasome [J]. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88(1): 20-23.
- [14] WEI H, HU C, XIE J B, et al. Doliroside a attenuates monosodium urate crystals-induced inflammation by targeting NLRP3 inflammasome [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 321-328.
- [15] 王缘, 白雪, 王艳秋, 等. NALP3 在痛风炎症反应中的作用 [J]. *黑龙江医药科学*, 2015, 38(3): 17-18, 20.
- [16] 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]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988, 29(3): 461-465.
- [17] Reber L L, Marichal T, Sokolove J, et al. Contribution of mast cell-derived interleukin-1 β to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(10): 2881-2891.
- [18] 何泳龙, 青玉凤, 周京国. 高尿酸血症及痛风性关节炎动物模型及其中药复方治疗概况 [J]. *川北医学院学报*, 2015, 30(4): 574-578.
- [19] 杨玲玲, 黄丽贞, 邓家刚. 痛风性关节炎动物模型研究进展 [J]. *世界中医药*, 2015, 10 (9): 1461-1463, 1467.
- [20] Ponce L, Arjona M, Blanco G, et al. The effect of montelukast in a model of gouty arthritis induced by sodium monourate crystals [J]. *Invest Clin*, 2011, 52 (1): 15-22.
- [21] Landis R C, Haskard D O. Pathogenesis of crystal-induced inflammation [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2001, 3(1): 36-41.
- [22] 张玉梅, 王荟. 痛风发病机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2012, 18(15): 2441-2444.
- [23] 杨其彬. NLRP3 炎性体信号通路在急性痛风性关节炎患者中变化的研究 [D]. 南充: 川北医学院, 2011.
- [24] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. *Nature*, 2006, 440(7081): 237-241.
- [25] Martion F. Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 218-232.
- [26] 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): 474-484.

[责任编辑 邹晓翠]