

## 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

周子朋, 郑福增, 孟庆良, 范围  
(河南省中医院, 郑州 450002)

**[摘要]** 目的:探究梔黄止痛颗粒治疗大鼠痛风性关节炎以及对 NALP3 炎性体(NACHT-LRR-PYD-containing proteins-3, NALP3)信号通路的影响。方法:将 SD 大鼠分为 6 组,分别为正常组,模型组(踝关节腔注射尿酸钠制备),梔黄止痛颗粒低、中、高剂量(1.0,2.5,5.0 g·kg<sup>-1</sup>)和阳性药组(秋水仙碱,3.0 g·kg<sup>-1</sup>),酶联免疫吸附法(ELISA)法测定血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )含量,造模后 24 h 评定大鼠步态以及关节炎症指数,造模前、造模后 6,12,24,48 h 测定大鼠裸关节肿胀度。苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠踝关节组织病理学变化,逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot),免疫组化法检测关节组织中 NLRP3,IL-1 $\beta$ ,凋亡相关斑点样蛋白(ASC),半胱天冬酶-1(Caspase-1)表达。结果:与正常组比较,模型组血清中 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$  含量显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒低、中、高剂量组显著降低 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$  含量( $P < 0.01$ )。与正常组比较,模型组大鼠步态较差、关节肿胀显著( $P < 0.01$ );与模型组比较,秋水仙碱组、药物处理组步态、关节肿胀得到所改善,随着药物剂量浓度的增加,步态、关节肿胀分级逐渐降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与正常组比较,模型组踝关节组织中 NLRP3,IL-1 $\beta$ ,ASC,Caspase-1 mRNA 及蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒低、中、高剂量组均显著降低 NLRP3,IL-1 $\beta$ ,ASC,Caspase-1 mRNA 及蛋白的表达( $P < 0.01$ )。免疫组化显示,与正常组比较,模型组 NLRP3,IL-1 $\beta$ ,ASC,Caspase-1 表达阳性表达量显著升高,而与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒中、高剂量组显著降低阳性表达率( $P < 0.01$ ),具有剂量依赖性。结论:梔黄止痛颗粒能够缓解痛风性关节炎大鼠关节肿胀,其机制可能与抑制 NALP3 炎性体信号通路有关。

**[关键词]** 梔黄止痛颗粒; 痛风性关节炎; NALP3 炎性体; 关节肿胀; 作用机制

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0140-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180728

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180110.1636.012.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-12 9:10

### Mechanism of Zhihuang Zhitong Granule in Treatment of Rat Gouty Arthritis Based on NALP3 Inflammasome Pathway

ZHOU Zi-peng, ZHENG Fu-zeng, MENG Qing-liang, FAN Wei

(Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the application of Zhihuang Zhitong granule in the treatment of gouty arthritis in rats and its effects on NACHT-LRR-PYD-containing proteins-3 inflammasome (NALP3) signaling pathway. **Method:** The SD rats were divided into six groups, normal group, model group (preparation by sodium urate injection into ankle joint cavity), Zhihuang Zhitong granule low dose group (1.0 g·kg<sup>-1</sup>), middle dose group (2.5 g·kg<sup>-1</sup>), high dose group (5 g·kg<sup>-1</sup>) and positive group (colchicine, 3.0 g·kg<sup>-1</sup>). The levels of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the gait and joint inflammation index at 24 h after modeling were evaluated; and the swelling degree of the naked joint was assessed before modeling, 6, 12, 24, 48 h after

**[收稿日期]** 20171108(014)

**[基金项目]** 河南省医学科技攻关计划项目(201603051)

**[第一作者]** 周子朋, 硕士, 主治医师, 从事中医药防治风湿类疾病研究, Tel:13613863247, E-mail:zhouzipe1981@126.com

modeling. Hematoxylin eosin staining (HE) was used to observe the histopathological changes of ankle joint in each group; reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of NLRP3, IL-1 $\beta$ , apoptosis-associated speck-like protein (ASC) and Caspase-1 in the joint tissue. **Result:** Serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in model group were significantly increased in the model group as compared with the normal group ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  were decreased in positive group, medium and high dose Zhihuang Zhitong granule groups ( $P < 0.01$ ). As compared with the normal group, the rats in the model group had poor gait and swelling joint ( $P < 0.01$ ); as compared with the model group, the poor gait and joint swelling got improved in the positive group and drug treatment groups, and the gait and joint swelling grades decreased gradually with the increase of drug concentration ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). As compared with the normal group, the NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, and Caspase-1 mRNA, protein expression levels in the ankle joint tissue were increased in model group ( $P < 0.01$ ), and these levels were significantly decreased in positive group, middle dose and high dose Zhihuang Zhitong granule groups as compared with the model group ( $P < 0.01$ ). Immunohistochemistry showed that, as compared with the normal group, the positive expression rate of NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC and Caspase-1 was increased in model group; and as compared with the model group, the positive expression rate was decreased in positive group, low dose, middle dose and high dose Zhihuang Zhitong granule groups ( $P < 0.01$ ) in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Zhihuang Zhitong granule can alleviate the swelling of joint in rats with gouty arthritis, and its mechanism may be related to the inhibition of NALP3 inflammatory signaling pathway.

[Key words] Zhihuang Zhitong granule; gouty arthritis; NALP3 inflammasome; joint swelling; mechanism

痛风性关节炎是临床常见骨性炎症,调查显示在 40 岁男性中发病率较高,近年来发病率有逐渐年轻化趋势,严重困扰人们的工作与生活<sup>[1]</sup>。固有免疫在痛风性关节炎的发展中起着重要作用,多种免疫细胞以及炎症因子通过识别尿酸钠,激活细胞内信号传递,进而调控凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC), 半胱天冬酶-1 (Caspase-1), 白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 成熟,其中 NALP3 炎性体 (NACHT-LRR-PYD-containing proteins-3, NALP3) 是该过程中重要的信号活化产物<sup>[2]</sup>。临床治疗痛风性关节炎的药物主要有糖皮质激素、秋水仙碱以及非甾体类消炎药物,其中秋水仙碱应用较多,但临床毒副作用较大,因此使用受限<sup>[3]</sup>。梔黄止痛颗粒主要由梔子、大黄等组成,在关节扭伤、肿胀、消炎方面功效较好,有关研究显示将梔黄止痛散外敷联合针灸能够明显缓解痛风性关节炎<sup>[4]</sup>。但目前还未见梔黄止痛颗粒内服药在痛风性关节炎的研究。本研究通过制备痛风性关节炎大鼠,并给予不同剂量梔黄止痛颗粒进行干预,以探究梔黄止痛颗粒内服药对痛风性关节炎治疗效果以及与 NALP3 炎性体信号通路的关系。

## 1 材料

1.1 动物 SPF 清洁级 SD 大鼠 90 只,8 周龄,体

质量(200  $\pm$  20) g,由上海医科大学动物实验中心提供,许可证号 SYXK(沪)2015-0004,所有动物均在统一环境中饲养,温度控制在 25  $^{\circ}$ C,湿度为 70%,严格按照动物饲养规则进行喂养。本研究中所有大鼠均经上海医科大学动物伦理委员会批准同意,编号 IACUC-04(20150619)。

1.2 药物及试剂 梔黄止痛颗粒由大黄(酒)、梔子、乳香、没药、姜黄、木香、黄柏、白芷、白芍、赤小豆、赤芍、土茯苓、萆薢,颗粒为河南省中医院自制方);尿酸钠(美国 Sigma 公司,批号 1198772);秋水仙碱片(云南西双版纳药业有限责任公司,批号 B14200011502);多聚甲醛(武汉汉博士德生物工程有限公司,批号 30525894);大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海吉泰依科赛生物科技有限公司,批号 ER006);大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(美国 Sciencell 公司,批号 EK0412);大鼠 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒(上海古朵生物科技有限公司,批号 GD-DS1583);NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)兔抗鼠单抗(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-7302, sc-8206, sc-8243, sc-8248);Caspase-1,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗(美国 Abnova 公司,批号分别为 AB10024, 301005);RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号 DP419);反转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号

K1622);BCA 测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0010);苏木素染色剂(Ba So 公司,批号 DH0006)。

**1.3 仪器** E100 型尼康光学显微镜(普赫光电科技有限公司),Biomate 35 型蛋白核酸分析仪(美国 Thermo Scientific 公司),CFX96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司),AI600 型凝胶成像仪(美国 GE 公司)。

## 2 方法

**2.1 实验动物分组与给药** 将大鼠分为 6 组,正常组、模型组、阳性药组、梔黄止痛颗粒低、中、高剂量组,每组 15 只大鼠,正常组、模型组大鼠灌胃等量蒸馏水,其余各组均灌胃给药,每天 1 次,连续灌胃 1 周。大鼠灌胃药物剂量根据体表法进行计算,根据标准成年人体质量 70 kg,则对应大鼠药物剂量为成人的 6.25 倍,标本成人每日梔黄止痛颗粒用量为 30 g,则大鼠每日给药剂量为  $2.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,因此设置低、中、高剂量为  $1.0, 2.5, 5.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。阳性药组秋水仙碱剂量为  $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

**2.2 痛风性关节炎大鼠模型建立** 参照改良 Coderre 法<sup>[5]</sup>进行痛风性关节炎大鼠模型制备,除正常组大鼠外,其余各组大鼠均于腹腔注射浓度为  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 10% 水合氯醛进行麻醉,以右踝关节外后方作为进穿刺部位,将其弯曲并进行局部消毒,进针方向朝上与胫骨成  $45^\circ$  角,向大鼠关节腔内注射  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  尿酸钠混悬液  $50 \mu\text{L}$ ,正常组相同部位给予等量生理盐水,连续注射 3 d,所有大鼠模型制备后大鼠步态、关节炎指数以及踝关节肿胀度均显著高于正常组,说明造模成功。

**2.3 血清中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  含量测定** 在造模后 48 h 后经腹腔抽取静脉血 3 mL,室温下放置 20 min 后,置于离心机中  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,收集血清,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

**2.4 大鼠步态与关节炎指数评定** 造模后 24 h,参照 Coderre 法<sup>[6]</sup>进行对大鼠步态进行评定,其中正常行走为 0 级;跛行,下肢稍微弯曲为 1 级;跛行,下肢仅能接触地面为 2 级;重度跛行,三足着地行走为 3 级。关节正常为 0 级;关节皮肤红肿且出现较明显骨性标志为 1 级;关节皮肤红肿且仅关节部位红肿为 2 级;关节以外红肿为 3 级。

**2.5 裸关节肿胀度测定** 分别在造模前以及造模后 6, 12, 24, 48 h 测定大鼠裸关节肿胀度,测定时固定好大鼠右后足踝,并将进行测量部位进行标记,用小纸条绕脚踝 1 周做好标记,进行 3 次测量求取平

均值,计算大鼠踝关节相对肿胀度 = 造模前脚踝容积 - 造模前脚踝容积。

**2.6 大鼠踝关节组织苏木素-伊红(HE)染色** 造模 48 h 后,处死大鼠,取以踝关节为中心上下 0.5 cm 的关节组织,置于 4% 多聚甲醛溶液进行固定,常规制备石蜡切片,浸入二甲苯中固定 30 min,分别在质量分数为 100%, 95%, 85%, 75% 的乙醇溶液中分别进行脱水 5 min;用自来水冲洗后,滴加苏木素染液染色 10 min,浸入 1% 盐酸 3 s 后用蒸馏水进行冲洗。加入伊红染液复染 4 min,分别在 75%, 85%, 95%, 100% 中 2 min 进行脱水处理,加入二甲苯进行透明处理,滴加中性树脂进行封片,放置显微镜下进行观察。

**2.7 Real-time PCR 检测踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 mRNA 表达** 取出保存踝关节滑膜组织,采用 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 进行提取,参照逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, RT-PCR 引物序列为如下表 1。反应体系为  $10 \times \text{cDNA}$  模板  $1 \mu\text{L}$ , 上下游引物各  $1 \mu\text{L}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$   $8 \mu\text{L}$ ,  $2 \times \text{SYBR Mix}$   $10 \mu\text{L}$ 。按照反应程序  $95^\circ\text{C}$  3 min,  $95^\circ\text{C}$  10 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  2 min, 40 个循环,  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。将甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)作为内参基因在 CFX manager 软件上按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  算法进行基因相对定量分析。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

基因名称	序列(5'-3')	引物长度/bp
NLRP3	上游 CCCGTGAGTCCCATTA	141
	下游 GACGCCAGTCCAACAT	
ASC	上游 GATGCTCTGTACGGGAAGGTC	115
	下游 TCCAGTCCAGGCTGGTGT	
Caspase-1	上游 CGCAGATGCCACCACCT	96
	下游 TGCCACAGACATTCATACAG	
IL-1 $\beta$	上游 ATGGCTTATTACAGTGGCA	137
	下游 TAGTGGTGGTCGGAGATT	
GADPH	上游 TGTGTCCCTCCTGGATCTGA	128
	下游 TTGCTGTGAAGTCGCAGGAG	

**2.8 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 蛋白表达** 将滑膜组织剪碎后加入蛋白裂解液在冰上反应 30 min,离心后收集上清液,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,制备 8% 分离胶, 12.5% 浓缩胶,蛋白上样量统一为  $30 \mu\text{g}$ ,电泳开始时电压设置为 80 V,进入分离胶后,

电压调整为 120 V,电泳结束后转移蛋白凝胶至 PVDF 膜上,转膜反应在冰上进行,电压设置为 100 V,进行 1 h 转膜反应,加入 TBST 溶液进行清洗后,加入 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h, TBST 溶液清洗 PVDF 膜,加入一抗稀释液(NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 抗体, 1:500), 4  $^{\circ}$ C 震荡过夜, PBST 清洗 3 次,加入二抗稀释液(1:5 000), 室温下孵育 2 h, PBST 清洗后在凝胶成像仪中观察蛋白表达情况。

**2.9 免疫组化法检测关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 表达** 常规制备踝关节组织石蜡切片脱水后置于柠檬酸盐缓冲液中 20 min 进行抗原热修复,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,加入 3% 过氧化氢溶液常温下放置 25 min, PBS 溶液清洗后,滴加山羊血清反应 15 min, 加 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 一抗(1:1 000)置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中进行过夜, PBS 清洗后加入二抗稀释液室温下孵育 20 min, 用 PBS 溶液清洗后加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 孵育 15 min 后加入 DAB 显色液进行显色反应,蒸馏水清洗后,进行苏木素进行复染蒸馏水冲洗后置于 1% 盐酸中 5 s 后清洗,随后在乙醇中脱水,滴加二甲苯进行透明处理,用中性树脂进行封片,置于显微镜下进行观察。每张切片挑选 10 个视野,统计阳性染色细胞数,计算阳性率 = 阳性数/细胞总数  $\times$  100%。

**2.10 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计,计数资料用  $\chi^2$  检验,步态、大鼠关节指数等等级资料采用秩和检验,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验,多组间对比采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对痛风性关节炎大鼠血清中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  的影响** 与正常组比较,模型组血清中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  含量显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒低、中、高剂量组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  含量显著下降,且高剂量组含量降低程度高于中剂量组( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.2 各组大鼠步态与关节炎症指数评定结果比较** 与正常组比较,模型组大鼠步态较差、关节肿胀,步态、关节指数分级对比差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒低、中、高剂量组步态、关节肿胀情况有所改善,分级对比差异具有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ ),具有剂量依赖性。见表 3。

表 2 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠血清中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 2 Effect of Zhihuang Zhitong granule on serum TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in gouty arthritis (GA) rats( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
正常	-	0.92 $\pm$ 0.17	0.28 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.04
模型	-	1.88 $\pm$ 0.35 <sup>2)</sup>	0.87 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	3.0	1.03 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.04
梔黄止痛颗粒	1.0	1.67 $\pm$ 0.33	0.77 $\pm$ 0.13	0.43 $\pm$ 0.06
	2.5	1.53 $\pm$ 0.09 <sup>4)</sup>	0.68 $\pm$ 0.07 <sup>4)</sup>	0.35 $\pm$ 0.05 <sup>4)</sup>
	5.0	1.15 $\pm$ 0.17 <sup>4)</sup>	0.55 $\pm$ 0.12 <sup>4)</sup>	0.27 $\pm$ 0.03 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~7 同)。

表 3 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠大鼠步态、关节指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 3 Effect of Zhihuang Zhitong granule on gait evaluation joint, index results in GA rats( $\bar{x} \pm s, n = 15$ ) 级

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	步态级别	关节炎症指数
正常	-	0	0
模型	-	2.82 $\pm$ 0.66 <sup>2)</sup>	2.68 $\pm$ 0.82 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	3.0	0.93 $\pm$ 0.32 <sup>4)</sup>	1.06 $\pm$ 0.31 <sup>4)</sup>
梔黄止痛颗粒	1.0	2.24 $\pm$ 0.63 <sup>3)</sup>	2.10 $\pm$ 0.66 <sup>3)</sup>
	2.5	1.61 $\pm$ 0.57 <sup>4)</sup>	1.72 $\pm$ 0.55 <sup>4)</sup>
	5.0	0.97 $\pm$ 0.28 <sup>4)</sup>	1.13 $\pm$ 0.37 <sup>4)</sup>

**3.3 对痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度的影响** 与正常组比较,模型组在造模后 6, 12, 24, 48 h 关节肿胀度均显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒低、中、高剂量组造模后不同时间点关节肿胀度均降低,且具有剂量依赖性( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4。

**3.4 对痛风性关节炎大鼠踝关节组织病理学的影响** 正常组大鼠组织中无炎症细胞浸润,滑膜层细胞分布较均匀;模型组大鼠关节组织出现水肿以及大量中性粒细胞等炎性细胞浸润,梔黄止痛颗粒低剂量组显示炎性细胞浸润仍较多,存在部分水肿相比模型组有所改善;梔黄止痛颗粒中剂量组存在炎性细胞浸润与水肿,但相比低剂量组改善程度提高;梔黄止痛颗粒高剂量组与秋水仙碱组相似,滑膜层细胞大部分恢复正常,炎性细胞浸润明显较少,存在少部分水肿。见图 1。

**3.5 对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 mRNA 及蛋白表达影响** 与正常组比较,模型组踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 mRNA 及蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒低、中、高剂量

表 4 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	6 h	12 h	24 h	48 h
正常	-	0.12 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.04
模型	-	0.58 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.72 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.76 ± 0.13 <sup>2)</sup>	0.71 ± 0.08 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	3.0	0.43 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.57 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.56 ± 0.10 <sup>4)</sup>	0.43 ± 0.08 <sup>4)</sup>
梔黄止痛颗粒	1.0	0.56 ± 0.09	0.65 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.69 ± 0.14	0.69 ± 0.06
	2.5	0.51 ± 0.06 <sup>3)</sup>	0.58 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.57 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.48 ± 0.13 <sup>4)</sup>
	5.0	0.49 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.52 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.38 ± 0.05 <sup>4)</sup>

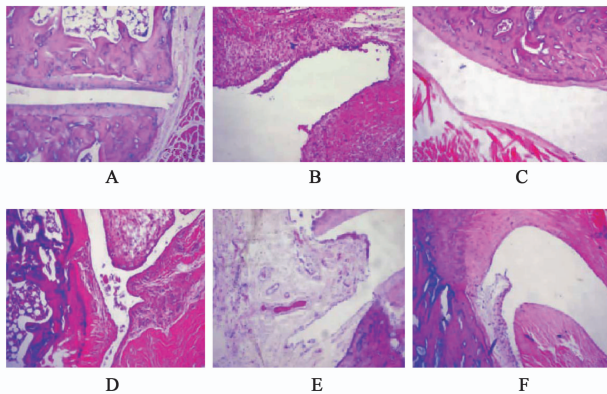


图 1 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Zhihuang Zhitong granule on histopathology of ankle in GA rats(HE, ×200)

组 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 mRNA 及蛋白含量显著下降,具有剂量依赖性( $P < 0.01$ )。见图 2,表 5,6。

表 5 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 mRNA 表达影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3	IL-1 $\beta$	ASC	Caspase-1
正常	-	0.24 ± 0.06	0.31 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.16 ± 0.05
模型	-	1.57 ± 0.08 <sup>2)</sup>	1.55 ± 0.24 <sup>2)</sup>	1.26 ± 0.08 <sup>2)</sup>	1.18 ± 0.04 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	3.0	0.62 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.72 ± 0.07 <sup>4)</sup>	0.65 ± 0.07 <sup>4)</sup>	0.68 ± 0.09 <sup>4)</sup>
梔黄止痛颗粒	1.0	1.33 ± 0.12 <sup>4)</sup>	1.31 ± 0.04 <sup>4)</sup>	1.15 ± 0.14 <sup>4)</sup>	1.06 ± 0.05 <sup>4)</sup>
	2.5	0.87 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.76 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>4)</sup>
	5.0	0.45 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.48 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.31 ± 0.07 <sup>4)</sup>

表 6 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 蛋白相对表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3/ $\beta$ -actin	IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin	ASC/ $\beta$ -actin	Caspase-1/ $\beta$ -actin
正常	-	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.03
模型	-	1.28 ± 0.06 <sup>2)</sup>	1.16 ± 0.05 <sup>2)</sup>	1.03 ± 0.08 <sup>2)</sup>	1.55 ± 0.09 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	3.0	0.29 ± 0.03 <sup>4)</sup>	0.29 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.36 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.28 ± 0.09 <sup>4)</sup>
梔黄止痛颗粒	1.0	0.58 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.56 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.68 ± 0.13 <sup>4)</sup>	0.84 ± 0.16 <sup>4)</sup>
	2.5	0.46 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.42 ± 0.07 <sup>4)</sup>	0.41 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.55 ± 0.08 <sup>4)</sup>
	5.0	0.31 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.26 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.33 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>4)</sup>

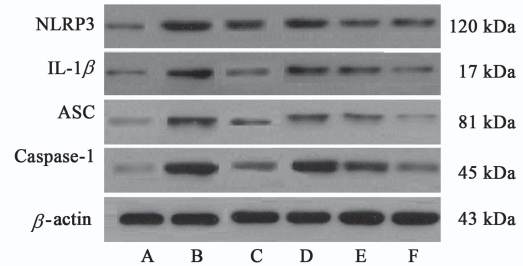


图 2 梔黄止痛颗粒对大鼠踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Zhihuang Zhitong granule on the expression of NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC and Caspase-1 in ankle joint of GA rats

3.6 对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 阳性表达的影响 正常组踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 表达较少,模型组 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 表达量显著升高( $P < 0.01$ ),且与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒低、中、高剂量组 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 阳性表达量显著降低,具有剂量依赖性( $P < 0.01$ )。见图 3~6,表 7。

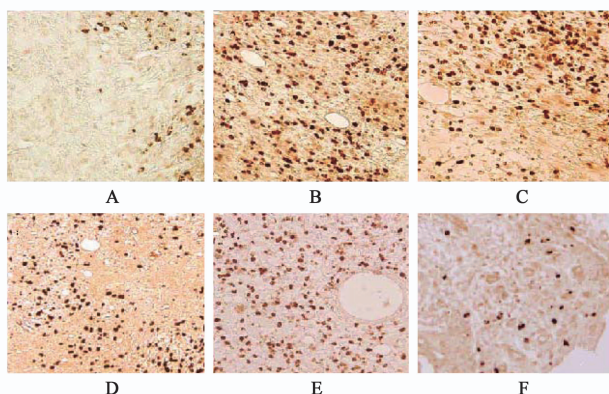


图 3 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 NLRP3 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Zhihuang Zhitong granule on NLRP3 protein expression in ankle joint of GA rats(IHC, ×400)

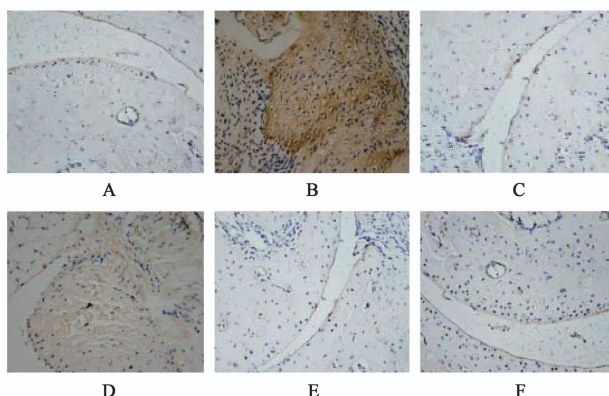


图 4 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 IL-1β 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Zhihuang Zhitong granule on IL-1β protein expression in ankle joint of GA rats(IHC, ×400)

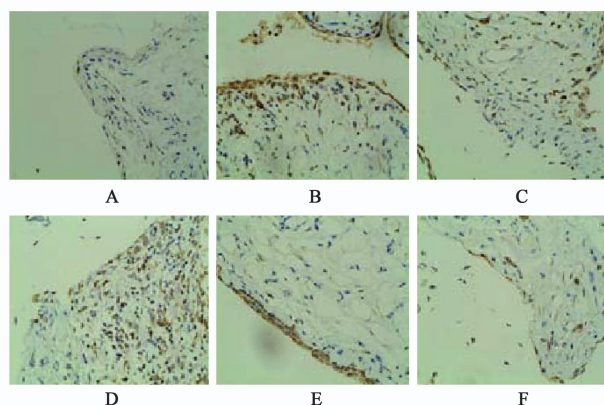


图 5 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 ASC 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of Zhihuang Zhitong granule on ASC protein expression in ankle joint of GA rats(IHC, ×400)

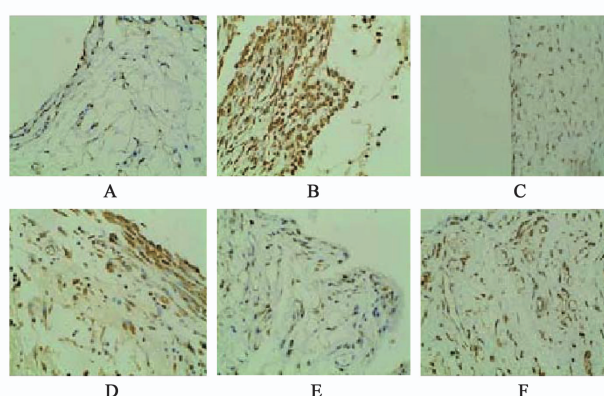


图 6 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 Caspase-1 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 6 Effect of Zhihuang Zhitong granule on Caspase-1 protein expression in ankle joint of GA rats(IHC, ×400)

表 7 梔黄止痛颗粒对痛风性关节炎大鼠踝关节组织中 NLRP3, IL-1β, ASC, Caspase-1 蛋白阳性表达率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of Zhihuang Zhitong granule on positive expression rate of NLRP3, IL-1β, ASC and Caspase-1 in GA rat ankle joint ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3	IL-1β	ASC	Caspase-1
正常	-	15.26 ± 2.35	21.64 ± 3.94	19.66 ± 2.79	17.63 ± 3.24
模型	-	81.38 ± 10.65 <sup>2)</sup>	78.69 ± 8.96 <sup>2)</sup>	75.66 ± 7.68 <sup>2)</sup>	71.64 ± 5.96 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	3.0	22.68 ± 3.67 <sup>4)</sup>	27.39 ± 5.31 <sup>4)</sup>	51.67 ± 3.69 <sup>4)</sup>	38.66 ± 2.68 <sup>4)</sup>
梔黄止痛颗粒	1.0	62.37 ± 7.95 <sup>4)</sup>	57.66 ± 5.37 <sup>4)</sup>	46.29 ± 3.26 <sup>4)</sup>	66.49 ± 4.28 <sup>4)</sup>
	2.5	48.66 ± 6.37 <sup>4)</sup>	38.64 ± 3.22 <sup>4)</sup>	37.26 ± 3.18 <sup>4)</sup>	55.29 ± 4.62 <sup>4)</sup>
	5.0	27.69 ± 2.68 <sup>4)</sup>	21.63 ± 3.68 <sup>4)</sup>	22.64 ± 4.38 <sup>4)</sup>	29.57 ± 3.66 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

NLRP3 是 NLRP3 炎性体信号通路中识别免疫系统病原体的重要蛋白,大量研究显示其在尿酸钠诱导下够产生大量的炎症因子如 IL-1β 等,但其在痛风性关节炎的作用机制目前尚不清楚<sup>[7]</sup>。目前

对于痛风性关节炎与 NLRP3 炎性体信号通路的研究不多,本研究通过建立痛风性关节炎大鼠模型并给予梔黄止痛颗粒治疗,分析 NLRP3 炎性体信号通路关键蛋白的变化,为痛风性关节炎治疗提供一定的参考。

NLRP 属于 NLR 家族中的一个亚族,近年来在炎症反应中研究较多,NALP3 是 NLRP 家族中重要的蛋白,其 C 端结构 LRR 与配体结合后使 NALP3 构象改变,中部 NACHT 结构域暴露,在 ATP 的聚合下形成 NALP3 蛋白寡聚体,同时招募凋亡蛋白斑点样蛋白 ASC, Caspase-1 形成复合体后活化 Caspase-1, Caspase-1 活化后能够激活 IL-1 $\beta$  前体中天冬氨酸发生裂解,进而活化成熟并分泌至胞外引起炎症反应<sup>[8-9]</sup>。痛风炎症发作与尿酸钠的诱导密切相关,大量研究证实 NALP3 中 LRR 能够识别尿酸钠<sup>[10]</sup>。Martinon 等<sup>[11]</sup> 研究显示 NALP3 识别尿酸钠后能够活化 NALP3 及其组成部分,进而诱导 IL-1 $\beta$  成熟发生炎症反应。Gross 等<sup>[12]</sup> 研究显示通过去除 NALP3 中的 LRR 结构,尿酸钠诱导后产生的 IL-1 $\beta$  明显减少,说明 NLRP3 在尿酸钠诱导的炎症反应中发挥着关键性作用。动物模型研究显示通过 ASC, NALP3 基因缺陷性大鼠中注射尿酸钠溶液,在其血清中检测出 ASC, NALP3, Caspase-1<sup>[13]</sup>。本研究结果显示与正常组比较,模型组血清中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  含量升高,与模型组比较,秋水仙碱组、梔黄止痛颗粒中、高剂量组含量均降低,且高剂量组含量降低程度高于中剂量组,分析原因可能为活化后的 IL-1 $\beta$  引起机体炎症反应刺激血清中单核细胞释放大量炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  激活血管内皮表达血管黏附因子等,进而加剧中性粒细胞聚集,逐渐转移至晶体聚集部位,使炎症反应放大。房树标等<sup>[14]</sup> 研究显示血清中性粒细胞在尿酸钠的诱导下产生大量的趋化因子被趋化至关节滑液中,引发炎症反应,同时使关节滑膜通透性增强,关节红肿,引发急性痛风性关节炎。以上研究结果提示 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  与痛风性关节炎的发生有关。本研究通过评定造模后大鼠步态、炎症指数以及关节肿胀度显示,造模后模型组肿胀度明显增加大鼠呈三足步态,关节周围炎症严重,步态分级、炎症指数分级高的大鼠比例明显较多,经药物处理后关节状态得到明显改善,且随着药物剂量的增加,其关节改善程度也增加,效果与秋水仙碱组相似,进一步说明梔黄止痛颗粒能够明显改善关节肿胀、缓解炎症,且效果较好。

ASC 是 NLRP3 炎性体重要组成部分,能够与 Caspase-1 CARD 结构域结合使 Caspase-1 活化,进而活化 IL-1 $\beta$ , 释放到细胞外。研究证实 ASC 为细胞衔接蛋白,且磷酸化在 NLRP3 炎症信号通路中发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。国外学者研究显示在 ASC 不参

与的情况下,尿酸钠诱导的炎症反应不能够产生<sup>[16]</sup>。动物研究显示 ASC 缺陷型小鼠体内 IL-1 $\beta$  无法转化成熟状态<sup>[17]</sup>。Caspase-1 主要参与机体内炎症反应、免疫反应,在机体防御中发挥重要的作用,同时其也是 NLRP3 炎性体信号通路中终体活化蛋白<sup>[18]</sup>。Caspase-1 的活化与 NLRP3 炎性体信号通路的激活相关,且其活化与炎症反应同时发生<sup>[19]</sup>。本研究通过不同生物学方法检测结果显示与正常组比较,模型组大鼠踝关节组织中 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 表达均明显升高,表明 NLRP3 炎症信号通路参与痛风性关节炎大鼠的发生,给予不同浓度梔黄止痛颗粒治疗后显示 NLRP3, IL-1 $\beta$ , ASC, Caspase-1 表达均下降,且随着药物剂量的增加,其下降程度越高,与秋水仙碱组结果相似,表明梔黄止痛颗粒治疗痛风性关节炎与抑制 NLRP3 炎症信号通路活化有关,与秋水仙碱的治疗效果相似,以上结果也提示梔黄止痛颗粒能够抑制 NLRP3 炎症信号通路的激活,下调 IL-1 $\beta$  表达,进而缓解痛风性关节炎。

本研究还存在一定的局限性,炎症通路除了 NLRP3 炎性体信号通路外,还有 MAPK, TLRs 等信号通路,梔黄止痛颗粒治疗痛风性关节炎是否还需要通过其他途径发挥作用,还有待后续深入研究。总之,梔黄止痛颗粒治疗痛风性关节炎作用机制可能与抑制 NLRP3 炎性体信号通路蛋白表达,进而抑制 IL-1 $\beta$  分化成熟,其药效与秋水仙碱类似,为临床痛风性关节炎的治疗提供一定的参考。

#### [参考文献]

- [1] 李朝霞, 戴冽, 莫颖倩, 等. 急性痛风性关节炎的疾病负荷及诊疗状况[J]. 广东医学, 2016, 37(19): 2953-2956.
- [2] 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.
- [3] 池里群, 周彬, 高文远, 等. 治疗类风湿性关节炎常用药物的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2851-2858.
- [4] 沈锦涛, 程韶, 李基威, 等. 梔黄止痛散外敷联合弹力绷带治疗急性踝关节内翻扭伤临床研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(11): 141-143.
- [5] Diab M. The role of type IX collagen in osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. Orthop Rev, 1998, 22(2): 165-170.
- [6] 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.
- [ 7 ] 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大鼠巨噬细胞炎性信号表达的影响[J].*中国中医基础医学杂志*,2016, 16(4):472-476.
- [ 8 ] Knauf F, Asplin J R, Granja I, et al. NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy [ J ]. *Kidney Int*, 2013, 84(5):895-902.
- [ 9 ] 顾晓凌,宋勇. NALP3 炎性体在急性肺损伤中的研究进展 [ J ]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2012, 11(6):607-609.
- [ 10 ] HE J, YANG Y, PENG D Q. Monosodium urate (MSU) crystals increase gout associated coronary heart disease (CHD) risk through the activation of NLRP3 inflammasome [ J ]. *Int J Cardiol*, 2012, 160(1):72-83.
- [ 11 ] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. [ J ]. *Nature*, 2006, 440(7081):237-241.
- [ 12 ] Gross O, Poeck H, Bscheider M, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence [ J ]. *Nature*, 2009, 459(7245):433-436.
- [ 13 ] Gültekin Y, Eren E, Özören N. Overexpressed NLRC3 acts as an anti-inflammatory cytosolic protein [ J ]. *J Innate Immun*, 2015, 7(1):25-36.
- [ 14 ] 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.
- [ 15 ] Sagulenko V, Thygesen S J, Sester D P, et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC [ J ]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(9):1149-1158.
- [ 16 ] Joosten L A B, Netea M G, Mylona E, et al. Fatty acids engagement with TLR2 drive IL-1 $\beta$  production via ASC-Caspase-1 pathway by urate crystals in gouty arthritis [ J ]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(11):3237-3249.
- [ 17 ] Kamo N, Ke B, Ghaffari A A, et al. ASC/Caspase-1/IL-1 $\beta$  signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury [ J ]. *Hepatology*, 2013, 58(1):351-359.
- [ 18 ] 刘璐. 加味四妙散汤剂对急性痛风性关节炎大鼠 TLR4-NF- $\kappa$ B 和 NLRP3 炎性体信号通路调控的研究 [ D ]. 南充:川北医学院, 2016.
- [ 19 ] Mankan A K, Dau T, Jenne D, et al. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 $\beta$  processing in neutrophils [ J ]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(3):710-715.

[责任编辑 周冰冰]