

# 上中下通用痛风汤治疗急性痛风性关节炎 及对 Th17 细胞的影响

周丽雅, 邹佳宏, 李欣\*

(长春中医药大学基础医学院, 长春 130117)

**[摘要]** **目的:**研究上中下通用痛风汤对尿酸钠诱导大鼠急性痛风性关节炎(GA)的治疗作用及对 Th17 细胞的影响。**方法:**取 60 只大鼠,随机分成 6 组,对照组、模型组、吲哚美辛组、上中下通用痛风汤高、中、低剂量组( $20, 10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每组 10 只。上中下通用痛风汤组 ig 给药,1 次/d,连续 7 d,吲哚美辛( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组第 7 天开始给药,末次给药 1 h 后,按 Coderre 经典方法,除空白组外,其余 5 组采用尿酸钠晶体溶液踝关节注射建立急性痛风性关节炎模型。以上中下通用痛风汤与吲哚美辛对比治疗,观察大鼠步态,测定关节肿胀度,流式细胞术检测外周血 Th17 细胞含量,ELISA 方法检测血清白介素(IL)-17, IL-6 水平。**结果:**上中下通用痛风汤高、中、低剂量在致炎后各时间点均能不同程度的抑制尿酸钠所致大鼠踝关节疼痛,减轻肿胀程度,降低步态评分,降低外周血 Th17 细胞含量。高剂量组 Th17 细胞含量( $1.65 \pm 0.25$ )% 明显低于模型组( $3.25 \pm 0.96$ )%,相关炎性因子 IL-17 含量( $0.54 \pm 0.09$ ) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 明显低于模型组( $0.69 \pm 0.07$ ) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,IL-6 含量亦明显低于模型组,差异有显著性( $P < 0.05$ )。**结论:**上中下通用痛风汤对尿酸钠所致急性痛风性关节炎炎症有较好的抗炎镇痛作用,其作用机制可能与降低 Th17 细胞及炎症因子 IL-17,IL-6 水平有关。

**[关键词]** 上中下通用痛风汤; 痛风性关节炎; Th17 细胞; 白介素 17

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0199-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014090199

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfx.000051.html>

**[网络出版时间]** 2014-02-25 13:29

## Effect of Shangzhongxia General Gout Decoction on Acute Gouty Arthritis and Th17 Cells

ZHOU Li-ya, ZOU Jia-hong, LI Xin\*

(Changchun University of Chinese Medicine, College of Basic Medical Sciences, Changchun 130117, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study anti-inflammatory and analgesic effects of Shangzhongxia generic gout decoction (SGGD) on sodium urate induced acute gouty arthritis (GA). **Method:** 60 rats were randomly divided into six groups, the control group, the model group, indomethacin group, SGGD high dose group, middle dose group, low dose group ( $20, 10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 10 in each group. SGGD was given once each day for 7 days. 1 h after the last administration, according to the classical method Coderre, in addition to the control group, and rats in the remaining five groups were injected ankle injection of sodium urate crystal solution to establish acute gouty arthritis model. The degree of joint swelling were measured the, Flow cytometry was used to detect the content of peripheral blood Th17 cells, ELISA was used to detect serum IL-17, IL-6. **Result:** SGGD inhibited sodium urate induced ankle pain, decreased the levels of Th17 in peripheral blood, in high dose group, Th17 cells ( $1.65 \pm 0.25$ )% was significantly lower than that in the model group ( $3.25 \pm 0.96$ )%. Th17 cell related inflammatory

**[收稿日期]** 20131014(001)

**[基金项目]** 吉林省自然科学基金项目(201212152);吉林省教育厅项目(吉教科合字[2012]第 75 号);吉林省卫生厅项目(2012Z014);吉林省中医药管理局项目(2012-094)

**[第一作者]** 周丽雅, 硕士, 教授, 从事中医药防治代谢类疾病研究, Tel:0431-86172305, E-mail:lximmue@126.com

**[通讯作者]** \*李欣, 博士, 讲师, 从事中医药免疫机制研究, Tel:0431-86172304, E-mail:xinxin211@sina.com

factor IL-17 ( $0.54 \pm 0.09$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  was significantly lower than that in the model group ( $0.69 \pm 0.07$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Inflammatory IL-6 content was obviously lower than that in the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** SGGD has better therapeutic effect on sodium urate gouty arthritis, the mechanism may be related to the decreasing Th17 cells and the level of inflammatory factors IL-17, IL-6.

[**Key words**] Shangzhongxia generic gout decoction; gouty arthritis; Th17 cell; IL-17

痛风性关节炎是由于嘌呤代谢障碍引起的尿酸浓度过高而导致尿酸盐结晶沉积于关节所致的一种代谢性骨关节疾病<sup>[1]</sup>。痛风属于中医学“痹证”范畴。湿浊热毒内蕴是痛风病的主要病理基础,湿浊郁久蕴热化毒,流注关节,阻滞筋脉骨节是急性痛风性关节炎的发病原因<sup>[2-4]</sup>。上中下通用痛风汤源于《丹溪心法》,是由金元四大家之一朱震亨所创制,该方具有清热利湿,宣畅气机,活血化瘀,通络止痛的作用。但该药对痛风性关节炎炎症因子表达水平变化及其抗炎作用机制尚不清楚。本研究通过建立急性痛风性关节炎大鼠模型,探讨上中下通用痛风汤对痛风性关节炎治疗作用,并对Th17细胞和炎症因子的影响,以进一步阐明上中下通用痛风汤治疗痛风的作用机制,并为更好地理解痛风性关节炎的发病机制、寻找更好的治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar大鼠60只,体重180~220 g,雄性,购自吉林大学白求恩医学院动物实验中心,清洁级,许可证号SYXK(吉)2007-0011。

**1.2 药物与试剂** 上中下通用痛风汤组方:苍术10 g,黄柏10 g,制胆南星10 g,木防己10 g,威灵仙10 g,羌活10 g,红花10 g,桂枝10 g,桃仁10 g,白芷10 g,川芎10 g,神曲10 g,龙胆草6 g。各药物加水浸泡30 min,先加药量8倍的水,沸腾后煎40 min,过滤取汁,再加6倍的水,沸腾后煎20 min,合并2次滤液浓缩至含生药1 g·mL<sup>-1</sup>,4℃冰箱冷藏备用。白介素(IL)-17,IL-6 ELISA试剂盒(购自美国R&D公司,批号201304);吲哚美辛片(上海信谊万象药业股份有限公司,批号111101);尿酸(国药集团化学试剂有限公司)。

**1.3 仪器** AEL200型电子天平(日本岛津),680型自动酶标仪(美国BIO-RAD)。

## 2 方法

**2.1 尿酸钠结晶及尿酸钠溶液的制备**<sup>[5]</sup> 取1 g尿酸加入200 mL的沸水中,用NaOH(1 mol·L<sup>-1</sup>)调pH至7.4,室温冷却并轻轻搅拌,4℃放置4~6 h,析出絮状沉淀,过滤,得微晶型尿酸钠,80℃干燥

2 h。用前称取1 000 mg尿酸钠,充分研磨,加无菌生理盐水20 mL配成50 g·L<sup>-1</sup>(5%)的混悬液。

**2.2 动物分组、给药及造模** 雄性Wistar大鼠,体重(180~220)g,60只,随机均分为6组:正常组、急性痛风性关节炎模型组、上中下通用痛风汤高、中、低剂量组(20,10,5 g·kg<sup>-1</sup>),吲哚美辛阳性对照组(5 mg·kg<sup>-1</sup>),正常组和模型组ig等量生理盐水,上中下通用痛风汤组ig给药,1次/d,连续7 d,吲哚美辛组第7天开始给药,末次给药1 h后,按Coderre<sup>[5]</sup>经典方法,将大鼠用10%水合氯醛(0.3 mL·100 g<sup>-1</sup>,ip)麻醉后仰卧固定,将左踝关节弯曲,扪及两骨突起,局部消毒后,用注射器自两骨突之间进针,感觉有漏空感后,注入尿酸钠溶液50  $\mu\text{L}$ ,以关节囊对侧鼓起为注入标准,制备急性痛风性关节炎模型。空白对照组左踝关节注射等体积的生理盐水。

**2.3 大鼠步态评分** 造模24 h,按Coderre<sup>[3]</sup>方法观察大鼠步态,并评分,0级:正常行走;1级(1分):轻微跛行,受试下肢略有弯曲;2级(2分):中度跛行,受试下肢刚触及地面;3级(3分):重度跛行,受试下肢离开地面,3足着地行走。

**2.4 检测大鼠踝周径变化值** 分别于造模前及造模后6,12,24,48 h后分别在受试踝关节相同部位,用无弹性软尺测量周长,观察造模前后及受试大鼠关节周长的变化。

**2.5 CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>Th17细胞的表型检测** Th17细胞检测前需用PMA和离子霉素刺激4~6 h。离心收集刺激后的外周血单个核细胞,并用PBS调整细胞密度为1×10<sup>7</sup>/mL;取2支试管分别加入单个核细胞悬液100  $\mu\text{L}$ 和FITC-CD4 10  $\mu\text{L}$ ,混匀后室温下避光反应15 min;加入2 mL的PBS,混匀,300×g,离心5 min,弃上清液;两管分别加入细胞破膜剂试剂A 200  $\mu\text{L}$ ,混匀后室温下避光反应15 min;再加入2 mL的PBS,混匀,300×g离心5 min,弃上清液;重悬细胞,在测定管中加入试剂B 200  $\mu\text{L}$ 和PE-IL17A 10  $\mu\text{L}$ ,在对照管中则加试剂B 200  $\mu\text{L}$ 和相应的同型对照-PE 10  $\mu\text{L}$ ,混匀后室温下避光孵育15~20 min;加入2 mL的PBS,混匀,300×g,离心5 min,弃上清;加适量的PBS重悬细胞,上流式细胞

仪检测。

**2.6 IL-17,IL-6 含量测定**大鼠诱导于造模后 48 h 处死大鼠,腹主动脉取血 4 mL,静置 30 min 后,4 ℃ 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min,分离血清,采用双抗夹心 ELISA 法检测 IL-17,IL-6 含量,具体步骤按试剂盒说明进行。

**2.7 统计学方法**检测数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计分析。组间比较采用 *F* 分析或秩和检验。*P* < 0.05 为具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对急性痛风性关节炎大鼠步态的影响**模型组造模后活动减少,左后肢弯曲,行走迟缓,个别动物出现后肢过度俯屈,甚至跛行,行为学评分显著升高,具有显著性差异(*P* < 0.05)。与模型组比较,上中下通用痛风汤高、中、低剂量组及吡罗美辛组大鼠活动状态显著得到改善,评分显著降低(*P* < 0.05),见表 1。

**3.2 对尿酸钠致大鼠踝周径的影响**与空白对照组比较,模型组大鼠造模后不同时间点大鼠关节肿

表 1 上中下通用痛风汤对急性痛风性关节炎大鼠步态的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	24 h 步态评分			
		0 分	1 分	2 分	3 分
对照	-	10	0	0	0
模型	-	0	0	6	4 <sup>1)</sup>
吡罗美辛	5 × 10 <sup>-3</sup>	0	4 <sup>2)</sup>	3	3 <sup>2)</sup>
上中下通用痛风汤	20	0	5	4	1 <sup>2,3)</sup>
	10	0	4	3	3 <sup>2)</sup>
	5	0	4	2	4 <sup>2)</sup>

注:与对照组比<sup>1)</sup>*P* < 0.05;与模型组比<sup>2)</sup>*P* < 0.05;与吡罗美辛组比<sup>3)</sup>*P* < 0.05(表 2~3 同)。

胀度均显著增加(*P* < 0.05)。与模型组比较,上中下通用痛风汤高剂量组大鼠在造模后 6,12,24,48 h 关节肿胀度均显著降低(*P* < 0.05);上中下通用痛风汤中剂量组及吡罗美辛组大鼠在造模后 6,12,24,48 h 关节肿胀度也显著降低(*P* < 0.05),关节肿胀度的动态变化见表 2。吡罗美辛组和中药中剂量组相比无统计学意义,吡罗美辛组与中药高剂量组比较有统计学差异(*P* < 0.05)。

表 2 上中下通用痛风汤对大鼠踝周径的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	踝周径/cm			
		6 h	12 h	24 h	48 h
对照	-	2.07 ± 0.13	2.09 ± 0.06	2.06 ± 0.12	1.97 ± 0.11
模型	-	2.99 ± 0.07 <sup>1)</sup>	2.90 ± 0.39 <sup>1)</sup>	2.83 ± 0.37 <sup>1)</sup>	2.80 ± 0.17 <sup>1)</sup>
吡罗美辛	5 × 10 <sup>-3</sup>	2.69 ± 0.06 <sup>2)</sup>	2.51 ± 0.13 <sup>2)</sup>	2.45 ± 0.11	2.40 ± 0.12
上中下通用痛风汤	20	2.71 ± 0.16 <sup>2,3)</sup>	2.5 ± 0.13 <sup>2,3)</sup>	2.33 ± 0.13 <sup>2,3)</sup>	2.25 ± 0.14 <sup>2,3)</sup>
	10	2.81 ± 0.23 <sup>2)</sup>	2.74 ± 0.27 <sup>2)</sup>	2.65 ± 0.28 <sup>2)</sup>	2.55 ± 0.12 <sup>2)</sup>
	5	2.97 ± 0.17 <sup>2)</sup>	2.85 ± 0.32 <sup>2)</sup>	2.80 ± 0.14 <sup>2)</sup>	2.75 ± 0.13 <sup>2)</sup>

**3.3 对 CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>Th17 细胞含量影响**结果显示对照组外周血 Th17 细胞含量为(1.57 ± 0.35)%,模型组为(3.25 ± 0.96)%,吡罗美辛组为(2.06 ± 0.45)%,上中下通用痛风汤高剂量(1.65 ± 0.25)%,中剂量组为(1.95 ± 0.75)%,低剂量组为(2.88 ± 0.57)%。与空白对照组比较,踝关节注射尿酸钠 48 h 后,模型组大鼠外周血 Th17 细胞水平显著增高,差异有显著性(*P* < 0.01)。与模型组比较,上中下通用痛风汤高、中剂量组及吡罗美辛组大鼠外周血 Th17 细胞水平均显著降低,差异有显著性(*P* < 0.05)。

**3.4 对血清中 IL-17,IL-6 含量影响**与空白对照组比较,踝关节注射尿酸钠 48 h 后,模型组大鼠血清中 IL-17,IL-6 水平显著增高,差异有显著性

(*P* < 0.01)。与模型组比较,上中下通用痛风汤高、中剂量组及吡罗美辛组大鼠血清 IL-17,IL-6 水平均显著降低,差异有显著性(*P* < 0.05),见表 3。吡罗美辛组与中药高剂量组比较有统计学差异(*P* < 0.05)。

表 3 上中下通用痛风汤对 IL-17,IL-6 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	μg·L <sup>-1</sup>	
		IL-17	IL-6
对照	-	0.52 ± 0.02	0.18 ± 0.07
模型	-	0.69 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.32 ± 0.09 <sup>1)</sup>
吡罗美辛	5 × 10 <sup>-3</sup>	0.59 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.25 ± 0.10 <sup>2)</sup>
上中下通用痛风汤	20	0.54 ± 0.09 <sup>2)</sup>	0.20 ± 0.09 <sup>2)</sup>
	10	0.59 ± 0.10 <sup>2)</sup>	0.23 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	5	0.57 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.23 ± 0.1 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

痛风是属于代谢紊乱所致的疾病,随着生活水平的不断提高,该病的发生率逐年提高。急性痛风性关节炎是由尿酸钠结晶在关节周围组织沉积而引起的急性炎症反应,尿酸盐在关节滑膜沉积并引起炎症介质释放是急性痛风发作的基础,炎症因子 PGE<sub>2</sub>, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , 白细胞三烯 B<sub>4</sub>, IL-8 等参与炎症过程<sup>[6-7]</sup>,可引起局部血管扩张、通透性增加、渗出、水肿、白细胞聚集等炎症反应。Th17 细胞主要分泌 IL-17,还能分泌 TNF- $\alpha$ , IL-21, IL-22 和 IL-6;此外 IL-17 可以和其他细胞因子如 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  等相互作用产生协同效应。研究发现 RA 患者关节滑液中 IL-17 的含量明显升高<sup>[8-9]</sup>;动物实验<sup>[10]</sup>初步结果显示,在关节炎早期阶段应用中性和抗 IL-17 抗体可以显著减轻关节炎的严重程度,即使在关节炎的晚期阶段抗 IL-17 抗体仍然可以显著减缓病程的发展,因此 Th17 细胞与痛风性关节炎的关系有待于进一步研究。

本实验选用上中下通用痛风汤出自金元四大家之一朱震亨《丹溪心法》一书,由苍术、黄柏、胆南星、威灵仙、羌活、防己、白芷、红花、川芎、桂枝、桃仁、神曲、龙胆草 13 味药物组成,其中黄柏清热,苍术燥湿,龙胆泻火,防己行水,四者所以治湿与热也;胆南星燥痰散风,桃仁、红花活血去瘀,川芎为血中气药,四者所以治瘀与血也;羌活祛百节之风,白芷祛头面之风,桂枝、威灵仙祛臂胫之风,四者所以治风也;加神曲者,所以消中州陈积之气也。具有疏风宣湿、化痰祛瘀、通络消肿止痛之功。本实验观察上中下通用痛风汤对大鼠步态和关节肿胀度的影响,结果表明,该方能明显改善急性痛风性关节炎模型大鼠步态和减轻关节肿胀度,具有较好的抗炎镇痛作用。进一步研究上中下通用痛风汤抗炎机制,发现上中下通用痛风汤能显著降低急性痛风模型关节炎大鼠 Th17 含量,降低炎症因子 IL-17, IL-6 水平。因此推测上中下通用痛风汤可能通过降低 Th17 细胞含量,抑制炎症因子 IL-17, IL-6 的合成,进而抑制其他炎症介质的释放,发挥其显著的抗炎作用。

综上,本课题深入探讨上中下通用痛风汤治疗痛风的机制,及其与 Th17 细胞关系,为上中下通用痛风汤的临床应用提供实验依据。

## [参考文献]

- [1] 马颖,颜海燕,刘梅,等. 鸡矢藤提取物对尿酸钠晶体诱导大鼠急性痛风性关节炎影响的研究[J]. 中国药房, 2008, 19(6): 411.
- [2] 王建明,张艳珍,张英泽. 从“虚、浊、热、瘀”辨证痛风浅谈[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(6): 376.
- [3] 李振彬. 痛风的病机及中药治疗[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4): 459.
- [4] 李欣,邹佳宏,秦昊,等. 上中下通用痛风汤治疗高尿酸血症的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 284.
- [5] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint urate arthritis (AJU\_A) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant [J]. Pain, 1987, 28(3): 379.
- [6] Lee E G, Lee S L, Chae H J, et al. Ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* inhibits IL-1 $\beta$ -induced rheumatoid synovial fibroblast proliferation and MMPs, COX-2 and PGE<sub>2</sub> production [J]. Biol Res, 2010, 43(2): 225.
- [7] 惠祗华,姜宏,吴士良. 痛风平对大鼠实验性急性痛风性关节炎 IL-1、IL-6、TNF 和 MMP-1 的影响[J]. 中医正骨, 2006, 18(3): 8.
- [8] McInnes I B, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(6): 429.
- [9] 郑莎莎,李小峰,王彩虹,等. 类风湿关节炎患者 Th17 细胞水平变化的研究[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(5): 5.
- [10] Bush K A, Farmer K M, Walker J S, et al. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(3): 802.

[责任编辑 聂淑琴]