

补肾利湿法对急性痛风性关节炎大鼠 VEGF 表达水平的影响

姜德友*, 刘爽, 韩洁茹, 解颖, 陈飞, 常佳怡, 李富震, 乔羽
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:观察补肾利湿法对痛风性关节炎大鼠血管内皮生长因子(VEGF)表达水平的影响,探讨补肾利湿法防治急性痛风性关节炎(GA)的作用机制。方法:将 70 只 Wistar 大鼠随机分为 7 组:空白组、模型组、中药对照组、西药对照组及中药低、中、高剂量组,每组 10 只。采用尿酸钠联合氧嗪酸钾诱导大鼠急性痛风性关节炎模型,应用 ELISA 法,分别检测各组大鼠血清 VEGF 的含量,并对关节滑膜组织进行病理组织学检查。结果:7 组 VEGF 水平差异均有统计学意义($P < 0.01$),模型组 VEGF 含量明显高于空白组($P < 0.01$);中药对照组、西药对照组和中药低、中、高剂量组 VEGF 含量均较模型组低($P < 0.01$),其中,西药对照组和中药中剂量组效果更明显;中药中剂量组与中药对照组、中药低剂量组、中药高剂量组相比有显著性差异($P < 0.01$),但与西药对照组相比无显著性差异。结论:补肾利湿法处方可抑制急性痛风性关节炎大鼠 VEGF 的表达,对防治痛风性关节炎具有一定作用。

[关键词] 痛风性关节炎; 补肾利湿; 血管内皮生长因子; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0236-04

[doi] 10.11653/syfy2013240236

Effect of Bushen Lishi Methods on Expression of VEGF in Acute Gouty Arthritis Rats

JIANG De-you*, LIU Shuang, HAN Jie-ru, XIE Ying, CHEN Fei, CHANG Jia-yi, LI Fu-zhen, QIAO Yu*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Bushen Lishi methods on expression of VEGF (vascular endothelial growth factor) in acute gouty arthritis rats and to explore the mechanism of Bushen Lishi methods in the treatment of GA. **Method:** Seventy rats were randomly divided into seven groups: blank control group, model group, herbal control group, western medicine control group, high dosage herbal group, medium dosage herbal group and low dosage herbal group, 10 rats in each group. The uric acid sodium and oxygen polybenzoxazines potassium were used to induce rat acute gouty arthritis model. ELISA was used to detect the concentration of serum VEGF in rats and analyze the data. Histopathologic examination of synovial tissue was also performed. **Result:** The differences of VEGF level between 7 groups were significant ($P < 0.01$). The expression of VEGF in model group was higher than that in blank group, and the difference was significant ($P < 0.01$). The expression of VEGF in model group was also apparently higher than that in herbal control group, western medicine control group, high dosage herbal group, medium dosage herbal group and low dosage herbal group ($P < 0.01$), especially the effect of western medicine control group and medium dosage herbal group was more obvious. **Conclusion:** Bushen Lishi methods can inhibit the expression of VEGF in acute gouty arthritis rats. It has certain curative effect gouty arthritis.

[Key words] gouty arthritis; Bushen Lishi methods; vascular endothelial growth factor; experimental studies

[收稿日期] 20130601(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173170)

[第一作者] 姜德友,教授,博士,从事经方治疗内科疑难杂病临床与基础研究,Tel:0451-82193627,E-mail:jiangdeyou@126.com

[通讯作者] * 乔羽,讲师,博士,从事经方治疗内科疑难杂病临床与基础研究,Tel:0451-82193628,E-mail:13904656959@139.com

痛风(gouty arthritis, GA)是由嘌呤代谢障碍引起的高尿酸血症和尿酸盐沉积所致的一种代谢性骨关节疾病。临床表现为高尿酸血症、反复发作的关节炎、痛风石沉积、肾实质退行性病变等。急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis)是痛风典型的表现形式^[1-2],受累关节出现红、肿、热、痛,导致关节畸形及功能障碍。目前,西医对急性痛风性关节炎的治疗尚无特效药物,临床上多采用秋水仙碱、非甾体类消炎药、别嘌呤醇以及激素等,主要通过抗炎和免疫抑制作用控制急性痛风性关节炎发作症状,但复发率高,且不良反应较为明显,不能阻滞疾病进程和根治^[3-4],寻求安全有效的中医中药治疗痛风性关节炎是未来的一种趋势。本研究采用尿酸钠联合氧嗪酸钾诱导大鼠急性痛风性关节炎模型^[5],分别用秋水仙碱、痛风舒片和补肾利湿法处方中药进行干预,观察各组大鼠血清 VEGF 表达水平,探讨补肾利湿法防治急性痛风性关节炎的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康 10 周龄 Wistar 大鼠 70 只,雄性,体质量(180 ± 20)g,购自黑龙江中医药大学实验动物研究中心,合格证号 SCXK(黑)2008004。饲养温度(20 ± 2)℃,相对湿度 30% ~ 35%,通风良好,自然光照。动物实验室为清洁级。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[2]。

1.2 药物与试剂 补肾利湿法处方^[6]由熟地黄、泽泻、山茱萸、怀牛膝、萆薢等组成,方中药材从黑龙江中医药大学附属第一医院中药房一次性选购。秋水仙碱片购于西双版纳药业有限责任公司,批号 110807。痛风舒片(大黄、车前子、泽泻、川牛膝、防己)购于湖北绿金子药业有限责任公司,批号 110601。吐温 80 购于天津市富宁精细化工有限公司,批号 101020。氧嗪酸钾盐购于美国 Sigma 公司,批号 CAS2207-75-2。微晶尿酸钠结晶购于美国 Sigma 公司,批号 CAS1198-77-2。大鼠血管内皮生长因子(VEGF)ELISA 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所,批号 20101108。

1.3 仪器 恒温水浴箱(上海一恒)、高速台式离心机(美国贝克曼)、酶标仪(美国伯腾)、微孔板恒温振荡器(杭州奥盛)、FA1104 型电子天平(梅特勒公司)。

2 方法

2.1 动物分组 70 只 Wistar 大鼠,适应性喂养 1 周后,按随机数字表随机分为 7 组:空白组、模型组、

中药对照组、西药对照组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组,每组 10 只。

2.2 溶液制备

2.2.1 尿酸钠溶液的制备 将 1 g 微晶尿酸钠结晶加 9 mL 无菌生理盐水,再加 1 mL 吐温 80,加热搅拌,配成 10 mL 尿酸钠溶液。

2.2.2 痛风舒片溶液的制备 将痛风舒片研成细末,配置成 0.1 g · mL⁻¹的痛风舒片溶液,4℃冰箱保存备用。

2.2.3 秋水仙碱混悬液的制备 将秋水仙碱片研成细末,配置成 0.05 g · L⁻¹的秋水仙碱混悬液,4℃冰箱保存备用。

2.2.4 补肾利湿法处方中药溶液的制备 熟地黄、泽泻、山茱萸、怀牛膝、萆薢等入砂锅中加 4 倍体积的水浸泡 30 min,煎 2 次,30 min/次,去渣,两煎混合,G4 滤器过滤,于 60℃水浴中浓缩成含生药 0.8,0.4,0.2 g · mL⁻¹的药液,密封隔水煮沸消毒,4℃冰箱保存备用。

2.2.5 氧嗪酸钾溶液的制备 将 3 g 氧嗪酸钾晶体溶解于 97 mL 生理盐水,加热搅拌,配置成 3% 氧嗪酸钾溶液。

2.3 给药方法 以每 100 g 大鼠体质量灌胃 1 mL 为标准,空白组和模型组分别灌胃生理盐水,中药对照组和西药对照组分别灌胃痛风舒片溶液和秋水仙碱溶液,中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组分别给予补肾利湿法处方中药溶液(其剂量依次为 2,4,8 g · kg⁻¹)灌胃,每日 1 次,连续 7 d,末次给药后造模。

2.4 造模方法^[5] 除空白组外均采用以下方法造模:用 3% 氧嗪酸钾溶液进行腹腔内注射,0.03 mL · g⁻¹,15 min 后用 6 号注射针在大鼠右侧踝关节后侧从 30° ~ 40° 方向插入至跟腱内侧,将 0.2 mL 尿酸钠溶液注入到关节腔内。空白组只采用 6 号注射针在大鼠右侧踝关节后侧从 30° ~ 40° 方向插入至跟腱内侧,将 0.2 mL 生理盐水注入到关节腔内。

2.5 大鼠步态分级 造模 1 h 后,按 Coderre 等^[7-8]的方法观察大鼠步态,0 级:正常行走;1 级:轻微跛行,受试下肢略有弯曲;2 级:中度跛行,受试下肢刚触及地面;3 级:重度跛行,受试下肢离开地面,三足着地行走。

2.6 VEGF 含量测定 各组大鼠造模 24 h 后,眼眶取血后处死,4 000 r · min⁻¹离心 10 min,取上清液,按 ELISA 法试剂盒说明书进行检测各组实验动物 VEGF 含量。

2.7 关节滑膜组织病理学检查 用锐利刀片取受试关节滑膜组织,10%福尔马林溶液固定、梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋切片,HE染色,光镜观察关节滑膜组织病变。

2.8 统计学分析 运用 SPSS 17.0 进行统计分析,组间比较采用 One-Way ANOVA 分析,多个样本均数间两两比较采用 LSD-*t* 检验,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,等级资料用 Kruskal-Wallis H,进一步两两比较采用秩变换分析。

3 结果

3.1 大鼠步态评定 与空白组相比,模型组大鼠注射尿酸钠溶液后,活动减少,右后肢弯曲,有的行走时后肢抬起,三足着地行走,有的安静时后肢抬起。与模型组比较,西药对照组、中药中剂量、中药高剂量组大鼠步态明显好转,中药对照组、中药低剂量组未见明显好转。见表 1。

表 1 补肾祛湿药对各组大鼠造模后步态比较 ($n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	步态				平均秩
		0 级	1 级	2 级	3 级	
空白	-	10	0	0	0	5.50
模型	-	0	1	2	7	51.9
中药对照	1	0	1	5	4	45.3
西药对照	5 × 10 ⁻⁴	0	5	3	2	32.9 ¹⁾
中药	2	0	2	5	3	41.1
	4	0	4	4	2	34.9 ¹⁾
	8	0	3	5	2	36.9 ¹⁾

注:与模型组比¹⁾ $P < 0.05$

3.2 VEGF 含量测定 与空白组比较,模型组大鼠 VEGF 水平明显增高 ($P < 0.01$),提示造模成功。与模型组相比,中药对照组、西药对照组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组的 VEGF 水平均明显降低 ($P < 0.01$),提示各组药物均对降低 VEGF 水平有作用。其中,西药对照组和中药中剂量组效果更明显。与西药对照组比较,中药对照组、中药中剂量组差异无统计学意义,中药低剂量组、中药高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与中药对照组比较,中药低剂量组、中药高剂量组差异无统计学意义,中药中剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

3.3 病理组织学观察 空白组大鼠关节滑膜细胞形态规则,排列整齐;模型组滑膜组织上皮细胞排列不整齐,间质疏松水肿,弥漫性炎症细胞浸润,滑膜细胞坏死脱落。中药对照组大量中性粒细胞浸润见

滑膜细胞坏死脱落。西药对照组滑膜仍有少量炎症细胞渗出,但结构基本完整。中药低剂量组滑膜组织明显见炎症细胞浸润和浆液纤维素渗出,滑膜细胞边缘不规整。中药中剂量组滑膜组织水肿减轻,但无渗出及炎症细胞浸润。高剂量组滑膜组织有仍炎症细胞和浆液纤维渗出,但渗出减轻。见图 1。

表 2 补肾祛湿药对各组大鼠血清中 VEGF 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

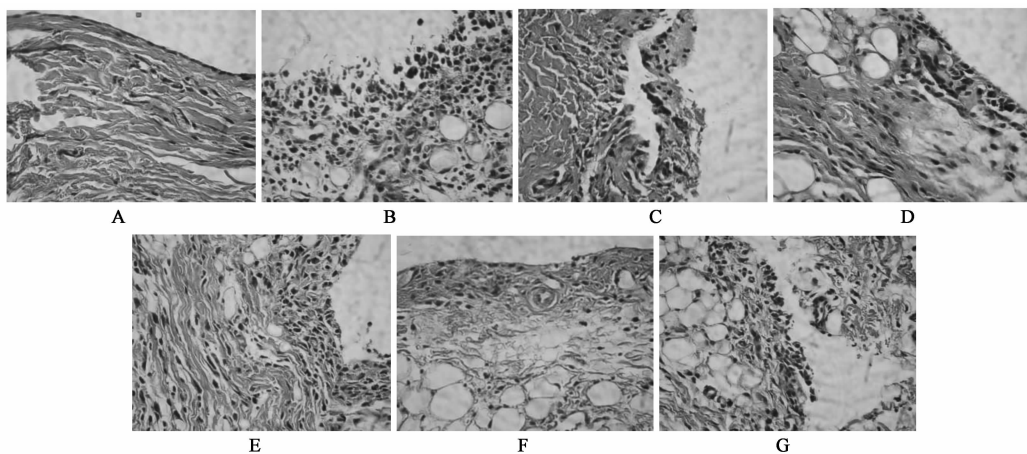
组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	0.34 ± 0.01
模型	-	1.21 ± 0.21 ¹⁾
中药对照	1	0.83 ± 0.17 ^{1,2)}
西药对照	5 × 10 ⁻⁴	0.67 ± 0.09 ^{1,2)}
中药	2	0.89 ± 0.11 ^{1,2,3)}
	4	0.69 ± 0.04 ^{1,2,4)}
	8	0.90 ± 0.09 ^{1,2,3)}

注:与空白组比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比²⁾ $P < 0.01$;与西药对照组比³⁾ $P < 0.05$;与中药对照组比⁴⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

现代研究发现^[9]:微晶型尿酸钠沉积于关节组织是痛风发作的主要原因,局部的粒细胞吞噬尿酸盐结晶引起关节组织发生炎症反应,增强的中性粒细胞-内皮细胞黏连是急性痛风产生的本质,中性粒细胞依赖性急性炎症是急性痛风的中心环节。研究表明^[10],VEGF 广泛参与了肿瘤、炎症等疾病过程中的血管生成作用。VEGF 具有两项重要的生理功能^[11]:①促进血管内皮细胞的有丝分裂,从而促进新生血管的形成;②增强血管的通透性,促使血管内物质的渗出,从而刺激炎症的形成和发展。1999 年 Maeno^[12]发现血清 VEGF 水平与关节炎反应呈正相关,可认为血清 VEGF 水平可以作为判断急性痛风性关节炎病情程度的重要指标。

中药治疗痛风性关节炎具有多环节、多靶点或整体调节或双向调节的作用,且毒副作用少^[13]。肾司二便功能失调,则湿浊排泄缓慢量少,以致痰浊内聚。此时感受风寒湿热之邪,劳倦过度,七情所伤,或酗酒,食伤,或关节外伤等,则加重并促进痰浊流注关节、肌肉、骨骼,气血运行不畅而形成痹痛,即痛风性关节炎^[13]。因此对痛风性关节炎急性发作的病机认识是本虚标实:肾脏亏虚是本,关节红肿热痛,气滞、湿聚、血瘀、痰积、热蕴是标,所以对本病的治疗要标本并重,补肾利湿并举。补肾利湿法处方^[6]选用熟地黄、泽泻、山茱萸、怀牛膝、萆薢等药



A. 空白组;B. 模型组;C. 中药对照组;D. 西药对照组;E. 中药低剂量组;F. 中药中剂量组;G. 中药高剂量组

图1 补肾利湿法处方中药对大鼠关节滑膜病理学的影响(HE染色, ×400)

物,以补肾利湿为主,兼以活血通络止痛。方中重用熟地黄滋阴补肾、填精益髓;山茱萸滋肾益肝,取“肝肾同源”之意,两药配合,补肾以治本;泽泻利湿而泄肾浊,有明显的利尿作用,能增加尿素及氯化钠的排泄,并且能够抑制尿结石的形成。怀牛膝活血通经除痹,使通则不痛,具有抗炎镇痛作用,可用于治疗关节炎。萆薢利湿祛浊,祛风除痹,诸药配合活血通经除痹止痛以治标。而痛风舒片由大黄、车前子、泽泻、川牛膝、防己组成,功效清热,利湿,解毒,以治标为主,忽略了肾脏亏虚之本,虽祛邪但不能扶正,故疗效次之。

补肾利湿法处方中药在控制痛风性关节炎的关节炎症状,缓解关节肿胀方面具有明显疗效。造模后模型组血清 VEGF 表达趋势显著上升,补肾利湿法处方中药可能通过抑制 VEGF 表达,从而达到缓解炎症的目的,其作用效果与秋水仙碱相当,对痛风性关节炎具有良好的防治作用。

[参考文献]

[1] Mikuls T R, Saag K G. Gout treatment: what is evidence-based and how do we determine and promote optimized clinical care? [J]. *Current Rheumatology Reports*, 2005, 7(3): 242.

[2] 薛耀明,李晨钟. 痛风的诊断与治疗[M]. 2版. 北京: 人民军医出版社, 2006: 2231.

[3] 劳志英. 原发性痛风性关节炎的诊断和药物治疗[J]. *中国新药与临床杂志*, 2004, 23(9): 632.

[4] Cocco G, Chu D C, Pandolfi S. Colchicine in clinical medicine. A guide for internists [J]. *Eur J Inter Med*, 2010, 21(6): 503.

[5] 韩洁茹,谢颖,高恩宇,等. 补肾利湿法防治痛风性关节炎的实验研究[J]. *四川中医*, 2011, 29(4): 26.

[6] 王俊霞,韩洁茹,周雪明. 姜德友从肾论治痛风经验[J]. *上海中医药杂志*, 2010, 44(2): 16.

[7] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint arthritis in rats provide a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents [J]. *Pharm Biochem Behav*, 1988, 29: 261.

[8] 前田悦子,藤吉俊夫,植松利南. Alminoprofen 对尿酸盐诱发炎症的作用[J]. *日本药理杂志*, 1991, 98: 467.

[9] 陈光亮,段玉光,李莉,等. 加味四妙汤对高尿酸血症和痛风性关节炎防治作用的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(3): 48.

[10] 朱兵,刘金兰,朱勤瑞. VEGF 及 TNF- α 在不同分期类风湿性关节炎患者血清中表达的研究[J]. *现代预防医学*, 2012, 39(22): 5938.

[11] 梁清华,何金华,李霞玲,等. 痹肿消汤对实验性关节炎大鼠滑膜 VEGF 表达水平的影响[J]. *湖南医科大学学报*, 2002, 27(6): 491.

[12] Maeno N, Takei S, Imanaka H. Increased circulating vascular endothelial growth factor is correlated with disease activity in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 1999, 26: 2244.

[13] 杨保林,丁岗. 芪桂痛风舒颗粒治疗痛风性关节炎 16 例疗效观察[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(2): 276.

[责任编辑 邹晓翠]