

# 抗痛风胶囊对急性痛风性关节炎大鼠的 抗炎作用及机制探讨

于泓<sup>1</sup>, 袁良东<sup>2</sup>, 姚观平<sup>3</sup>, 钟正霞<sup>1</sup>, 余丽梅<sup>3\*</sup>

(1. 遵义医学院附属医院肾病风湿科, 贵州 遵义 563003;

2. 济宁医学院附属医院肾内二科, 山东 济宁 272029;

3. 遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 贵州 遵义 563003)

**[摘要]** 目的: 观察抗痛风胶囊对急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, AGA)大鼠的抗炎作用及其作用机制。方法: 大鼠足踝关节注射尿酸钠悬液诱导 AGA, 容积法检测足踝关节肿胀程度, ELISA 法测定血清及关节液中白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )含量, 免疫组织化学和图像分析观测踝关节软骨组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )蛋白表达水平。结果: 尿酸钠混悬液注射后 1~5 d, 与正常组比较, AGA 模型大鼠足踝关节肿胀度明显增高; 与模型组比较, 抗痛风胶囊低、高剂量(0.3, 1.2 g·kg<sup>-1</sup>)与阳性药秋水仙碱(8×10<sup>-4</sup>g·kg<sup>-1</sup>)组大鼠足踝关节肿胀度显著降低( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ); 第5天, 抗痛风胶囊高剂量与秋水仙碱组大鼠足踝关节肿胀度已降低至正常组水平。模型组大鼠足踝关节液 IL-1 $\beta$  水平明显高于正常组, 抗痛风胶囊和秋水仙碱组大鼠足踝关节液 IL-1 $\beta$  水平均显著低于模型组。模型组大鼠踝关节软骨组织 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平增高( $P < 0.01$ ); 抗痛风胶囊组踝关节软骨组织 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平明显降低, 与正常组无显著差异。结论: 抗痛风胶囊治疗急性痛风性关节炎的作用机制可能与降低关节组织局部的炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平有关。

**[关键词]** 抗痛风胶囊; 痛风; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 肿瘤坏死因子  $\alpha$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0283-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130124.0927.003.html>

**[网络出版时间]** 2013-01-24 9:27

## Anti-inflammation Effect and Related Mechanism of Anti-gout Capsules in Rats with Acute Gouty Arthritis

YU Hong<sup>1</sup>, YUAN Liang-dong<sup>2</sup>, YAO Guan-ping<sup>3</sup>, ZHONG Zhen-xia<sup>1</sup>, YU Li-mei<sup>3\*</sup>

(1. Nephritic Medical Department, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;

2. Nephritic Medical Department, Affiliated Hospital of Jiling Medical College, Jining 272029, China;

3. Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Affiliated Hospital  
of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the anti-inflammation effect and related mechanism of anti-gout capsules (AGC) in rat with acute gouty arthritis (AGA). **Method:** AGA model was made by injection of sodium urate in the ankle joint cavity of rat. The joint swelling degree was estimated by volume method. The level of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was detected by ELISA method in serum and joint fluid. The expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) protein was observed and analysis by immunohistochemistry and image analysis. **Result:** Compared with normal rats, the joint swelling degree of foots and ankles were higher after injection of sodium urate in the ankle joint cavity of rat for 1-5 d. AGC (0.3, 1.2 g·kg<sup>-1</sup>) and colchicine group (0.8 mg·kg<sup>-1</sup>)

**[收稿日期]** 20120909(511)

**[基金项目]** 遵义医学院附属医院课题项目(院字 201009 号)

**[第一作者]** 于泓, 副主任医师, 从事风湿病肾脏病研究, Tel:0852-8608934, E-mail: yyyhong6567@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 余丽梅, 教授, 博士, 从事药理学与细胞工程学研究, Tel:0852-8608812, E-mail: ylm720@sina.com

significantly decreased joint swelling degree of foots and ankles compared to the model group ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). Especially in 5 d, the joint swelling degree of foots and ankles showed obviously reduced to normal group in AGC high dose and colchicine groups. Compared with normal group, the level of IL-1 $\beta$  was higher in joint fluid of AGA model rat. The levels of IL-1 $\beta$  were decreased by AGC and colchicine in joint fluids of AGA rat compared with model group. The expression of TNF- $\alpha$  protein was higher in model group than that in the normal rats ( $P < 0.01$ ). The expression of TNF- $\alpha$  protein was significantly decreased in articular cartilage tissues of AGA rat in AGC group compared with those in the model group. **Conclusion:** The mechanism of AGC on therapeutic effect of AGA is related to decreasing in the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in articular tissue of AGA rats.

[**Key words**] anti-gout capsule; acute gouty arthritis; interleukin-1 $\beta$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$

痛风是由嘌呤代谢障碍引起的高尿酸血症和尿酸盐沉积所致,随着生活水平提高,饮食结构和生活习惯改变,其发病率呈上升趋势。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, AGA)是痛风典型的表现形式<sup>[1-2]</sup>,受累关节出现红、肿、热、痛,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6 和前列腺素 E<sub>2</sub> 等炎症因子产生增加,产生关节软骨的炎症损伤,诱导基质降解,导致疼痛、肿胀等,从而破坏关节,导致关节畸形及功能障碍<sup>[3-4]</sup>。目前常用的皮质激素、免疫抑制剂等主要通过抗炎和免疫抑制作用等控制 AGA 发作症状,但复发率高,不能阻滞疾病进程和根治<sup>[5-6]</sup>。抗痛风胶囊是以乌梢蛇、木瓜、薏苡仁、红花、黑芝麻、枸杞子等配伍制成的药物,在黔北地区民间用于痛风治疗,尤其是激素治疗等缓解不明显者仍可迅速缓解 AGA 症状,并可一定程度地消减痛风结石。虽有研究报道该药可降低血清和关节液中 TNF- $\alpha$  水平,减轻炎症损伤<sup>[7]</sup>,但该药对关节局部炎症因子表达水平变化及其抗炎作用机制尚不清楚。因而本研究在动态观察抗痛风胶囊对 AGA 大鼠治疗作用同时,重点观测其对 AGA 大鼠血清和关节液 IL-1 $\beta$  水平及关节软骨组织 TNF- $\alpha$  表达的影响,从而进一步分析其抗炎作用机制。

## 1 材料

**1.1 药品** 抗痛风胶囊,由遵义医学院附属医院与贵阳春科药业技术研发有限公司研制,每粒含生药干粉 0.5 g,其质量控制采用薄层色谱法鉴定木瓜、薏苡仁和枸杞子,用高效液相色谱检测,计算含齐墩果酸和熊果酸总量不 < 0.50%;秋水仙碱,西双版纳药业有限责任公司生产,批号 081203。

**1.2 动物** 健康雄性 SD 大鼠 50 只,体重 240 ~ 250 g,购于第三军医大学大坪医院实验动物中心,

SPF 级,合格证号 SEXK(渝)2007-00050。试验前适应性饲养 5 d。

**1.3 试剂** 尿酸钠(Sigma 公司,批号 100982303),取 250 mg 尿酸钠结晶加入 0.9% 氯化钠注射液 45 mL,再加 5 mL 吐温-80,加热搅拌,配制成 50 mL 尿酸钠注射悬液。兔抗大鼠 TNF- $\alpha$  抗体、免疫组化检测试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司和基因科技(上海)有限公司,IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司。

**1.4 仪器** AEL200 电子天平(日本岛津),BX-50 Olympus 显微镜、DMLB2HC 图像分析系统(德国 Leica 公司),YLS-TA 型足容积测量器(山东省医学科学院设备站),通用酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** SD 大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,正常组及模型组给予等体积蒸馏水,阳性对照药(秋水仙碱组)给予秋水仙碱  $8 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,抗痛风胶囊低、高剂量组每日上午 9 时给予抗痛风胶囊内容物 0.3, 1.2  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,于造模同天开始 ig 给药,连续 5 d。

**2.2 AGA 大鼠模型制备**<sup>[8]</sup> 除正常组外,其余各组大鼠均用 10% 水合氯醛 0.3  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 麻醉,仰卧位固定,大鼠右踝关节外侧后方穿刺,向关节腔内注入 0.2 mL 尿酸钠混悬液,诱导 AGA 模型,正常组关节腔内注射等体积生理盐水。

**2.3 足容积测定与足踝关节肿胀度计算** 大鼠右后足踝关节上方 1.0 cm 处用编号笔作一横线标记,每天采用足爪容器测量仪测量足容积,以注射后不同时间足容积与注射前足容积差值表示足踝关节肿胀程度,值越大,足踝关节肿胀越明显。

**2.4 ELISA 法检测 IL-1 $\beta$  含量** 大鼠诱导 AGA 模型第 5 天末次给药后 2 h 处死,取腹主动脉血 2 mL, 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心 10 min,分离血清,保存、备用。同时于右后踝关节上方 0.5 cm 处剪下大鼠足,暴露

足踝关节,纵切其连接处,置于 5 mL 生理盐水中,4 °C 浸泡过夜,离心留取上清液,按 ELISA 法检测试剂盒操作说明书,绘制标准曲线,测定血清和关节液 IL-1 $\beta$  含量。

**2.5 踝关节组织免疫组织化检查** 末次给药 2 h 后处死大鼠,取右踝关节组织,4% 甲醛液固定,脱钙、脱水,常规石蜡包埋切片,采用免疫组织化学二步法染色,检测关节软骨组织 TNF- $\alpha$  蛋白表达情况。按 1:200 滴加兔抗大鼠 TNF- $\alpha$  抗体,DAB 显色,苏木素复染,光镜下观察 TNF- $\alpha$  阳性棕黄色颗粒表达情况;取 10 个视野/片,全自动图像分析系统测量每张切片的阳性细胞(10 $\times$ 40 倍)吸光度(A),以积分吸光度(IA)代表 TNF- $\alpha$  阳性表达的水平。

**2.6 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 LDS 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 AGA 大鼠足踝关节肿胀程度的影响** 尿酸钠混悬液注射后 1~5 d,与正常组比较,模型组足踝关节肿胀度明显增高( $P < 0.05$ )。药物治疗 3~5 d,与模型组比较,抗痛风胶囊高、低剂量组和秋水仙碱组足踝关节肿胀度明显降低( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ),第 5 天,抗痛风胶囊高剂量组和秋水仙碱组的足踝关节肿胀度显著降低至正常组水平。见图 1。

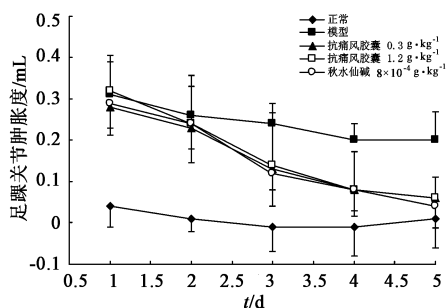


图 1 抗痛风胶囊对尿酸钠诱导 AGA 大鼠足踝关节肿胀度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**3.2 对 AGA 大鼠关节液和血清 IL-1 $\beta$  水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠关节液 IL-1 $\beta$  水平明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,秋水仙碱组、抗痛风胶囊高、低剂量组大鼠关节液 IL-1 $\beta$  均降低( $P < 0.05$ )。与正常组相比,模型组血清 IL-1 $\beta$  水平仅增高趋势,各治疗组虽低于模型组,但无统计学差异,见表 1。

**3.3 对 AGA 大鼠关节软骨组织中 TNF- $\alpha$  蛋白表达**

表 1 抗痛风胶囊对 AGA 大鼠血清和关节液中 IL-1 $\beta$  水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ /mg·L <sup>-1</sup>	
		关节液	血清
正常	-	0.59 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.57 ± 0.04
模型	-	0.71 ± 0.09	0.60 ± 0.17
抗痛风胶囊	0.3	0.60 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.45 ± 0.07
	1.2	0.59 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.51 ± 0.07
秋水仙碱	8 × 10 <sup>-4</sup>	0.61 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.46 ± 0.08

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

的影响 正常组软骨细胞偶见少量 TNF- $\alpha$  蛋白表达。模型组软骨组织中 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平明显升高,其 IA 明显高于正常组( $P < 0.01$ );与模型组比较,抗痛风胶囊低、高剂量组 TNF- $\alpha$  蛋白表达降低,IA 明显降低( $P < 0.01$ ),而秋水仙碱组 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平无明显改变,见表 2。

表 2 抗痛风胶囊对大鼠关节软骨组织 TNF- $\alpha$  蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IA
正常	-	0.23 ± 0.03 <sup>1)</sup>
模型	-	0.34 ± 0.05
抗痛风胶囊	0.3	0.24 ± 0.04 <sup>1)</sup>
	1.2	0.26 ± 0.04 <sup>1)</sup>
秋水仙碱	8 × 10 <sup>-4</sup>	0.33 ± 0.05

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

### 4 讨论

本实验大鼠关节腔内注射尿酸钠混悬液后,足容积增加,足踝关节肿胀度显著增高,表明 AGA 大鼠模型成功制备,虽然足踝关节肿胀度有自行恢复的趋势,但模型组大鼠足踝关节肿胀度至第 5 天仍未恢复至正常。与模型组比较,秋水仙碱和抗痛风胶囊治疗 3~5 d,AGA 大鼠足踝关节肿胀度显著降低;第 5 天,抗痛风胶囊高剂量组和秋水仙碱组,足踝关节肿胀度已降低至正常组水平,表明抗痛风胶囊对大鼠 AGA 具有明显治疗作用,起效快,控制关节肿胀迅速。

诸多研究表明,炎细胞招募与内皮细胞激活所引发的炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等释放和炎症反应,在 AGA 的疾病过程中起着重要作用<sup>[9-10]</sup>。IL-1 $\beta$  与 TNF- $\alpha$  之间还可相互作用,共同参与内皮细胞的激活和炎细胞募集而加重炎性损伤,促进 AGA 发生、发展。IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  还可产生很强的致痛效

应;也可启动其他炎性细胞因子的转录,加重关节损伤;TNF- $\alpha$  则可降低 II 型胶原 mRNA 在人软骨细胞的表达<sup>[11]</sup>,刺激前列腺素 E<sub>2</sub> 产生,引起金属蛋白酶表达增加,而降解软骨基质。业已证明,抗 TNF- $\alpha$  能明显抑制内皮细胞的激活和中性粒细胞的募集,从而抑制炎症反应<sup>[4,8]</sup>。由此可见,降低 AGA 关节组织局部 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平,可能终止炎性细胞因子的恶性循环,是 AGA 有效治疗的作用靶点。

ELISA 检测结果显示,模型组大鼠足踝关节关节液 IL-1 $\beta$  水平明显高于正常组,血清中 IL-1 $\beta$  水平变化却不明显;抗痛风胶囊和秋水仙碱治疗后,AGA 大鼠足踝关节关节液 IL-1 $\beta$  水平显著降低,表明抗痛风胶囊降低关节软骨组织局部的炎症因子 IL-1 $\beta$  水平可能是其发挥 AGA 治疗作用的机制,与文献报道秋水仙碱治疗 AGA,降低 IL-1 $\beta$  水平发挥抗炎作用相似<sup>[12]</sup>。近期的研究已经报道<sup>[7]</sup>,抗痛风胶囊降低血清和关节液 TNF- $\alpha$  水平是其发挥 AGA 治疗作用的机制之一。结果显示,抗痛风胶囊治疗后显著降低 AGA 关节软骨组织 TNF- $\alpha$  表达水平,秋水仙碱组变化却不明显,提示抗痛风胶囊降低关节软骨组织 TNF- $\alpha$  水平也可能是其发挥抗炎作用,治疗 AGA 的一个重要机制之一,也是抗痛风胶囊不同于秋水仙碱抗炎作用的机制之一。

现代药理学研究表明,抗痛风胶囊的主要组方成分乌梢蛇具有镇静、抗惊、镇痛、抗炎的作用,可抑制滑膜细胞炎症因子水平与活性<sup>[13]</sup>,木瓜也能通过抑制 TNF- $\alpha$  等细胞因子的产生和分泌,改善 II 型胶原免疫诱导大鼠关节炎的症状和特征;木瓜中所含的齐墩果酸和熊果酸可通过抑制人白细胞弹性蛋白酶活性、抗氧化活性、干扰炎症因子形成等,产生与糖皮质激素相似的抗炎、镇痛作用,且美国等已批准将这二种单体成分用于骨关节炎与类风湿关节炎的治疗<sup>[14-15]</sup>,由此可见,抗痛风胶囊中齐墩果酸和熊果酸可能是该药在 AGA 治疗中显著降低炎症因子水平的一个重要组分,抗痛风胶囊治疗 AGA 的机制及其主要活性成分值得深入探讨。

### [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]. *Curr Rheumatol Rep*, 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] 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 R*, 2010,43(2):225.  
[4] 惠初华,姜宏,吴士良.痛风平对大鼠实验性急性痛风性关节炎 IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 MMP-1 的影响[J]. *中医正骨*, 2006,18(3):8.  
[5] Cocco G, Chu D C, Pandolfi S. Colchicine in clinical medicine. A guide for internists[J]. *Eur J Intern Med*, 2010,21(6):503.  
[6] 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.  
[7] 于泓,袁良东,钟正霞,等.抗痛风胶囊治疗大鼠急性痛风性关节炎及下调 TNF- $\alpha$  水平[J]. *重庆医学*, 2012,41(22):2271.  
[8] 黄敬群,孙文娟,王四旺,等.槲皮素对大鼠痛风性关节炎抗炎抗氧化活性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012,18(2):169.  
[9] Di Giovine F S, Malwista S E, Nuki G, et al. Interleukin-1 as a mediator of crystal arthritis: Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL-1 [J]. *J Immunol*, 1987,138:2131.  
[10] Chapman P T, Yarwood H, Harrison A A, et al. Endothelial activation in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation: *in vitro* and *in vivo* studies on the roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 [J]. *J Arthritis Rheum*, 1997,40(5):9551.  
[11] 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.  
[12] 谢建祥,黄敏,黄国栋.白艾痛风灵免煎颗粒剂对急性痛风模型炎症因子的调节作用[J]. *世界中西医结合杂志*, 2010,5(12):1037.  
[13] 庞捷,李娟,吴湘慧,等.乌梢蛇 II 型胶原蛋白对大鼠佐剂型关节炎滑膜细胞因子的作用[J]. *中药材*, 2009,32(4):556.  
[14] 孙帅,谢培山.野木瓜的研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2011,22(6):696.  
[15] 张明发,沈雅琴.齐墩果酸和熊果酸的抗炎及其抗变态反应[J]. *抗感染药学*, 2011,8(4):235.

[责任编辑 何伟]