

加味四妙汤对微晶型尿酸钠致兔急性痛风性关节炎的防治作用

陈光亮*, 韩 茹, 谷仿丽, 曹 康, 李 莉, 王元勋
(安徽中医学院药理学教研室, 安徽 合肥 230038)

[摘要] 目的: 观察加味四妙汤对微晶型尿酸钠(MSU) 诱导的兔急性痛风性关节炎的防治作用, 并初步探讨其作用机制。方法: 用 MSU 诱导兔痛风性关节炎, 致炎 5 h 后收集关节液进行白细胞计数, 测定关节液中细胞因子和炎症因子含量, 并对关节及周围软组织进行病理组织学检查。结果: 加味四妙汤 $12, 6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃可显著降低兔关节液白细胞数以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 前列腺素 E_2 (PGE $_2$), IL-1 β , IL-8 水平, 减轻关节及软组织水肿和炎细胞浸润、变性坏死。加味四妙汤各组对关节液中 IL-6, 一氧化氮(NO) 抑制作用不明显。结论: 加味四妙汤能明显改善 MSU 诱导的兔痛风性关节炎, 其机制可能是抑制炎症细胞趋化和激活, 抑制炎症因子、细胞因子的合成与释放。

[关键词] 四妙汤; 痛风性关节炎; 微晶型尿酸钠; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)02-0042-04

[收稿日期] 2007-06-25

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助(No. 99JLO125)

[通讯作者] * 陈光亮, Tel: (0551) 5169060; E-mail: chguangl@163.com

Protective Effects of Si-miao Decoction on Acute Gouty Arthritis Induced by MSU in Rabbits

CHEN Guang-liang^{*}, HAN Ru, GU Fang-li, CAO Kang, LI Li, WANG Yuan-xun
(Department of Pharmacology, Anhui College of Chinese Traditional Medicine, Hefei 230038, China)

[**Abstract**] **Objective:** To explore the effects and mechanisms of Si-miao Decoction on gouty arthritis induced by MSU in rabbits. **Methods:** Si-miao Decoction and colchicine were orally administrated for 7 or 4 days. Acute gouty arthritis model of rabbits was induced by MSU suspension intraarticular injection. After MSU injection for 5 hours, synovia of each rabbit was collected to do leukocyte count. Meanwhile, relevant cytokines levels in synovia of each group were measured. Histopathologic examination of knee joint and surrounding soft tissue of each rabbit was also performed. **Results:** Si-miao Decoction $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ could significantly decrease the leukocyte quantity and the levels of TNF- α , PGE₂, IL-1 β and IL-8 in synovia of model rabbits, as well as ameliorating edema and inflammatory cell and inflammatory cell infiltration in knee joint of model rabbits. **Conclusions:** Si-miao Decoction could obviously alleviate symptoms of acute gouty arthritis induced by MSU in rabbits. Mechanisms may lie in inhibiting leukocyte activation, chemotaxis, and decreasing cytokines levels in synovia.

[**Key words**] Si-miao Decoction; gouty arthritis; MSU; cytokines

痛风是长期嘌呤代谢障碍, 尿酸增高引起组织损伤的一种临床综合征。在全球范围内痛风发生率增加, 对上海、成都、南京调查结果显示, 高尿酸血症患病率为 10% ~ 13%, 痛风患病率为 0.77% ~ 1.33%, 男女比例约为 2:1。痛风是危害人类健康的一种严重的代谢性疾病, 因此寻找研究疗效确切, 不良反应少或轻的药物防治高尿酸血症和痛风性关节炎具有重要的意义。四妙丸(散)出自《成方便读》, 由二妙散(苍术、黄柏)加牛膝(三妙丸)再加薏苡仁组成, 清热利湿、舒筋壮骨, 主治湿热痿证, 近年来治疗痛风的方药多是在四妙丸的基础上加减^[1]。加味四妙汤是在四妙汤(苍术、黄柏、牛膝、薏苡仁)的基础上加上黄芪、萆薢, 为安徽中医学院的经验方。本文研究加味四妙汤对兔痛风性关节炎的防治作用和作用机制, 为加味四妙汤在临床上治疗痛风性关节炎提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 加味四妙汤中的中药材(苍术、黄柏、牛膝、薏苡仁、黄芪、萆薢)购自合肥市药材公司。按比例(1:1:1:2:2:2)配药后, 加 10 倍量水浸泡 30 min, 煮沸 60 min, 过滤, 药渣再加 8 倍量水, 煮沸 60 min, 过滤, 合并滤液, 水浴浓缩至每毫升合生药 2.0 g, 冰箱保存, 临用时用 0.5% CMC-Na 溶液配成所需浓度。秋水仙碱片, 昆明制药集团股份有限

公司, 批号 20021171。尿酸, Sigma 公司产品; IL-1 β , IL-6, IL-8 ELISA 检测试剂盒, 深圳晶美生物工程有限公司产品; 一氧化氮(NO)检测试剂盒, 南京建成生物技术研究所产品, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒, 北京东亚免疫技术研究所产品, PGE₂ 放免试剂盒, 由苏州医学院血栓室提供。

1.2 动物 雄性家兔, 体重(2~3) kg, 购于安徽医科大学动物试验中心。在实验室正常饲养 1 周后进行试验。

1.3 主要仪器 UV-754 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); PYX-DHS 电热恒温培养箱(上海市医疗器械一厂); FA2004 型电子天平(上海精密仪器厂); GKC11CR4 型可控恒温水浴锅(上海锦屏仪表有限公司); GC-911 型放射免疫计数器(中国科学技术大学科技实业公司); BIO-RAD 550 型酶标仪(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 尿酸钠结晶及尿酸钠溶液的制备^[2] 取 2 g 尿酸加入 400 mL 沸水中, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调 pH 值至 7.4, 再加热至 95 °C, 室温冷却并轻轻搅拌, 4 °C 放置(4~6) h, 析出絮状沉淀, 过滤, 得微晶型尿酸钠, 80 °C 灭菌。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 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液。

2.2 动物给药与造模 雄性家兔, 随机分 6 组($n =$

8): 正常组, 模型组, 加味四妙汤高、中、低剂量组 ($12, 6, 3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), ig 给药, 每天 1 次, 连续 7 d; 对照组 ig 等量的 0.5% CMC-Na 溶液; 阳性对照组(秋水仙碱 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 从第 4 天开始 ig 给药, 末次给药 1 h 后, 除正常组关节腔注射无菌生理盐水外, 每只家兔右侧膝关节腔内注射 $0.5 \text{ mL MSU}(50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1})$ 混悬液致炎^[2,3]。

2.3 大体观察和关节液观察 观察各组造模前后关节皮色、皮温、肿胀情况。致炎后 5 h 处死家兔, 收集关节液, 观察其颜色、清亮度。

2.4 关节液白细胞计数及炎症因子、细胞因子的测定 收集关节液, 进行白细胞计数。IL-1 β , IL-6, IL-8 含量检测按双抗体夹心 ELISA 法试剂盒说明书进行; TNF- α , PGE₂ 采用放射免疫测定法; NO 测定采用比色法。

2.5 关节及周围软组织病理学检查 用锐利刀片取少量关节囊、滑膜组织, 10% 福尔马林溶液固定、梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察关节囊及滑膜组织病变。

2.6 统计方法 所测数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 统计学处理采用 SPSS10.0 统计软件包, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对兔急性痛风性关节炎的关节及关节液的影响 造模后, 模型组兔关节出现明显红肿和皮肤温度增高, 关节液呈浅黄色, 混浊状; 各给药组兔关节亦出现红肿和皮肤温度增高, 同时关节液呈浅黄色, 混浊状, 但均较模型组减轻。

3.2 对兔急性痛风性关节炎关节液白细胞计数及关节液中 NO, TNF- α 和 PGE₂ 水平的影响 造模后, 兔关节液中白细胞数量明显增加, 提示出现急性炎症反应; 与模型组比较, 加味四妙汤高、中、低剂量组和秋水仙碱组兔关节液中白细胞数量明显减少($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 加味四妙汤对兔急性痛风性关节炎关节液白细胞计数的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	白细胞计数 ($10^9\cdot\text{L}^{-1}$)
正常组	—	$1.31 \pm 0.42^{(2)}$
模型组	—	5.04 ± 0.75
秋水仙碱	3×10^{-4}	$2.72 \pm 0.56^{(2)}$
加味四妙汤	12	$2.98 \pm 0.81^{(2)}$
	6	$3.41 \pm 0.96^{(2)}$
	3	$3.72 \pm 0.69^{(2)}$

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

造模后, 模型组兔关节液中 NO, TNF- α 和 PGE₂

水平均明显增加; 与模型组比较, 秋水仙碱组和加味四妙汤高、中剂量组 TNF- α 和 PGE₂ 显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同时, 秋水仙碱组 NO 显著降低($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 加味四妙汤对兔急性痛风性关节炎关节液中 NO, TNF- α 和 PGE₂ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	NO ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TNF- α ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PGE ₂ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
正常组	—	$100.9 \pm 21.8^{(2)}$	$15.2 \pm 2.8^{(2)}$	$8.1 \pm 4.2^{(2)}$
模型组	—	185.6 ± 57.2	38.9 ± 10.8	26.7 ± 9.5
秋水仙碱	3×10^{-4}	$124.9 \pm 25.5^{(2)}$	$19.2 \pm 8.1^{(1)}$	$14.7 \pm 5.3^{(2)}$
加味四妙汤	12	169.9 ± 37.1	$22.3 \pm 9.4^{(2)}$	$15.2 \pm 3.3^{(2)}$
	6	157.8 ± 29.4	$27.4 \pm 7.9^{(2)}$	$17.1 \pm 4.2^{(2)}$
	3	159.9 ± 51.5	31.7 ± 9.7	20.9 ± 7.9

3.3 对兔急性痛风性关节炎关节液中 IL-1 β , IL-6 和 IL-8 水平的影响 造模后, 模型组兔关节液中 IL-1 β , IL-6 和 IL-8 水平均明显升高; 与模型组比较, 加味四妙汤各剂量组对 IL-6 作用不明显; 加味四妙汤高、中剂量组 IL-1 β 和 IL-8 显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同时, 秋水仙碱组 IL-1 β , IL-6 和 IL-8 均显著降低($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 加味四妙汤对兔急性痛风性关节炎关节液中 IL-6, IL-1 β 和 IL-8 水平影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	IL-1 β ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-6 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-8 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
正常组	—	$0.148 \pm 0.053^{(2)}$	$0.108 \pm 0.022^{(2)}$	$0.112 \pm 0.034^{(2)}$
模型组	—	0.352 ± 0.077	0.173 ± 0.049	0.438 ± 0.046
秋水仙碱	3×10^{-4}	$0.237 \pm 0.067^{(2)}$	$0.128 \pm 0.028^{(2)}$	$0.237 \pm 0.026^{(2)}$
加味四妙汤	12	$0.261 \pm 0.083^{(2)}$	0.159 ± 0.024	$0.330 \pm 0.038^{(2)}$
	6	$0.291 \pm 0.073^{(1)}$	0.165 ± 0.033	$0.379 \pm 0.050^{(1)}$
	3	0.318 ± 0.068	0.161 ± 0.057	0.422 ± 0.093

3.4 对兔急性痛风性关节炎关节软组织及滑膜组织的影响 正常组家兔关节软组织细胞未见异常表现; 模型组关节软组织充血水肿, 弥漫性多核白细胞、单核细胞浸润, 滑膜细胞坏死脱落。秋水仙碱组关节软组织有炎细胞和浆液纤维素渗出, 滑膜细胞变性, 但结构基本完整。加味四妙汤高、中剂量组关节周围软组织有炎细胞和浆液纤维素渗出, 滑膜和软骨基本正常, 小剂量组关节周围软组织见明显炎细胞浸润, 滑膜及软骨细胞变性、坏死。

4 讨论

Coderre 等^[3] 最早应用尿酸钠盐局部关节注射造成痛风性关节炎模型, 引起关节周围组织广泛的炎症反应, 被认为是经典的痛风性关节炎的造模方法。目前此法已在多种动物体内成功地诱导出急性痛风性关节炎模型, 其病理表现、机制与人类痛风性关节炎相似, 故可用于评价抗痛风性关节炎药物的药效^[4-5]。

加味四妙汤由川黄柏、薏苡仁、苍术、怀牛膝、黄

芪、萆薢组成。黄柏苦寒沉降,清热燥湿,长于清泻下焦湿热,可治湿热下注,足膝肿痛;薏苡仁能渗湿,舒筋脉,缓和挛急;苍术辛散苦燥,长于祛湿,痹症湿胜者尤宜;黄芪能益气健脾,渗水利湿;萆薢祛风利湿;怀牛膝活血通络,现代药理研究证明牛膝具有抗炎、镇痛作用,其机理在于提高机体免疫功能,激活巨噬细胞的吞噬作用以及扩张血管、改善微循环、促进病变的吸收^[6]。六者共用具有清热利湿、通筋利痹之功,可用于湿热下注,两足麻木,筋骨酸痛等的治疗。

越来越多的证据表明痛风性关节炎的核心是中性粒细胞(PMN)介导的炎症,在正常情况下组织中少见 PMN,组织中 PMN 较循环中 PMN 重要,一般循环中 PMN 是非活化状态,必须在趋化因子和激活因子作用下被激活,继而侵入炎症组织引起组织损伤并在组织损伤中起重要作用。而增强的中性粒细胞-内皮细胞粘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^[5,7-9]。

细胞因子能够介导细胞间信号传导,在免疫和炎症反应中起至关重要的作用。研究表明^[9], IL-1 β , IL-8, TNF- α 作为炎症趋化因子和激活因子在痛风性关节炎的发生、发展过程中起重要作用,认为 IL-1 β , TNF- α 是前炎症网链中的一级细胞因子,而 IL-8 是由 IL-1 β , TNF- α 诱导的二级前炎症细胞因子。IL-1 β 在中性粒细胞趋化、激活过程中起重要作用,是调节炎症的始动因素和炎症反应的重要调节剂介质,在急性和慢性痛风性关节炎中都起到重要作用。多种细胞因子参与了关节炎的发作,尤其是 TNF α , IL-1 β , IL-6 和 IL-8, 它们与疾病的进程及预后密切相关。分析滑液中相关细胞因子有利于指导临床诊断、治疗和疾病预测。静脉注射秋水仙碱能抑制中性粒细胞的浸润,表明秋水仙碱直接通过抑制中性粒细胞浸润而抑制 MSU 诱导的关节炎^[10-11]。

在本研究中,各给药组家兔关节亦出现红肿、触痛、皮肤温度增高,关节液呈浅黄色,混浊状,但均较模型组减轻。给药组家兔血液、关节液中白细胞数量显著减少。造模 5 h 后,模型组兔关节液中 IL-1 β , IL-6, IL-8 和 TNF- α , NO, PGE₂ 水平均明显升高,秋水仙碱组炎症因子、细胞因子均显著降低;加味四妙汤高、中剂量组关节液中 IL-1 β , IL-8, TNF- α , PGE₂ 水平显著降低;加味四妙汤各组对 IL-6, NO 抑制作用不明显。组织学检查发现,加味四妙汤各给药组关节

周围软组织轻度水肿,关节液见炎细胞和浆液纤维素渗出,滑膜和软骨基本正常。表明加味四妙汤可以显著抑制 MSU 引起的家兔关节炎性细胞因子的合成或释放,明显改善家兔关节病理损伤程度。

本研究结果提示,加味四妙汤能明显改善 MSU 诱导的兔痛风性关节炎,其机制可能是抑制炎症细胞趋化和激活,抑制炎症因子与细胞因子的合成与释放。

[参考文献]

- [1] 陈光亮,徐叔云. 中药治疗痛风研究近况[J]. 安徽中医学院学报, 2003, 22(5): 57-59.
- [2] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药学·药理学·毒理学)[S]. 1993. 120-121.
- [3] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint arthritis in rats provide a useful tool for the evaluation of analgesic and antiarthritic agents[J]. Pharm Biochem Behav, 1988, 29: 261.
- [4] Terkeltaub R. Pathogenesis and treatment of crystal induced inflammation. In: Mc Carty DJ, Koopman WJ [J]. Arthritis and applied conditions. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 36: 1819-1833.
- [5] Weinbertaub A. Gout, uric acid metabolism and crystal induced inflammation[J]. Curropin Rheumatol, 1995, 7(4): 359-363.
- [6] 李宗锴,李电东. 牛膝的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(12): 757.
- [7] Terkeltaub R., Baird S., Sears P., et al. The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal induced gouty synovitis [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(5): 900-909.
- [8] Araki M. The role of E-selectin for neutrophil activation and tumor metastasis in vivo [J]. Leukemia, 1997, 11(suppl 3): 209-212.
- [9] Mastsukawa A., Yoshimura T., Miyamoto K., et al. Anaysis of the inflammatory cytokine network among TNF- α , IL-1 β , IL-1receptor antagonist, and IL-8 in Lps-induced rabbit arthritis [J]. Lab Invest, 1997, 76(5): 629.
- [10] Punzi L., Calo L., Plebani M., Clinical significance of cytokine determination in synovial fluid [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2002, 39(1): 63-88.
- [11] Matsukawa A., Yoshimura T., Maeda T., et al. Analysis of the cytokine network among tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 β , interleukin 8, and interleukin 1 receptor antagonist in monosodium urate crystal induced rabbit arthritis [J]. Lab Invest, 1998, 78(5): 559-569.