

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

陈光亮*, 段玉光, 李莉, 刘海鹏
(安徽中医学院药理学教研室, 安徽 合肥 230038)

[摘要] 目的: 研究加味四妙汤对动物痛风性关节炎的防治作用及其作用机制。方法: 采用尿酸、酵母膏分别致高尿酸血症模型, 测定小鼠、大鼠血清尿酸水平、大鼠尿尿酸水平, 计算尿酸排泄量; 微晶型尿酸钠(MSU) 诱导大鼠痛风性关节炎模型, 观察大鼠步态, 测定关节肿胀度、关节浸出液中TNF- α 和PGE₂水平。结果: 加味四妙汤24, 12 g·kg⁻¹ ig能明显降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平; 12, 6 g·kg⁻¹ ig能显著降低高尿酸血症大鼠血清尿酸水平, 增加尿酸相对排泄量; 显著抑制MSU致急性痛风性关节炎大鼠关节肿胀度, 改善大鼠步态, 降低关节浸出液中TNF- α 、PGE₂含量。结论: 加味四妙汤有明显的抗高尿酸血症、防治痛风性关节炎的作用, 其机制可能主要是促进尿酸排泄, 抑制关节TNF- α 、PGE₂等因子合成与释放有关。

[关键词] 加味四妙汤; 痛风性关节炎; 尿酸; 高尿酸血症

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)03-0048-05

Experimental Study of the Protective Effects and Mechanisms of Additional Si-miao Decoction on Acute Gouty Arthritis and Hyperuricemia

CHEN Guang-liang*, DUAN Yu-guang, LI Li, LIU Hai-peng

(Department of Pharmacology, Anhui College of Chinese Traditional Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects and mechanisms of Additional Si-miao Decoction on gouty arthritis and hyperuricemia in animal models. **Methods:** Mice were given uric acid ip or yeast extract ig to establish hyperuricemic model, serum uric acid levels were detected. Rat hyperuricemic models were made by orally administering yeast extract, uric acid in serum or urine was detected. Rat acute gouty arthritis model were established by MSU intraarticular injection, the joint swell degree, TNF- α and PGE₂ in synovia were also measured. **Results:** Additional Si-miao Decoction 24 g·kg⁻¹ and 12 g·kg⁻¹ ig could significantly reduce the serum uric acid level in hyperuricemic mice, meanwhile, 12 g·kg⁻¹ and 6 g·kg⁻¹ ig could significantly reduce the serum uric acid level in hyperuricemic rat, together with increasing 24 hrs uric acid excretion. Additional Si-miao Decoction 12 g·kg⁻¹ and, 6 g·kg⁻¹ ig could obviously restrain the joint swelling degree in the gouty arthritis model rat and improve their gait accordingly. TNF- α and PGE₂ levels in the gouty arthritis model rat were also decreased significantly after administration. **Conclusions:** Additional Si-miao Decoction could obviously ameliorate symptoms of hyperuricacidemia and gouty arthritis. Mechanisms of its effects may consist in accelerating the uric acid excretion and restraining the synthesis of TNF- α , PGE₂ in joint.

[收稿日期] 2007-07-11

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助(99JL0125)

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

[**Key words**] Additional Si-miao Decoction; gouty arthritis; uric acid; hyperuricemia

痛风是长期嘌呤代谢障碍, 血尿酸增高引起组织损伤的一种临床综合征。在全世界范围内痛风发生率在增加。高尿酸血症及原发性痛风与肥胖症、高脂血症、高血压病、糖尿病、动脉粥样硬化等疾病呈显著正相关^[1]。因此, 痛风是危害人类健康的一种严重的代谢疾病^[2]。

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, 具有清热利湿、舒筋壮骨之功效, 主治湿热痿证, 是治疗痛风的经典方和基础方, 近年来治疗痛风的方药多是在四妙丸的基础上加减^[3]。加味四妙汤是在四妙汤的基础上加黄芪、萆薢, 为安徽中医学院张杰主任医师多年临床应用的经验方, 具有清热利湿、通络止痛、益气健脾之功效, 临床上对湿热型痛风有良好的疗效。本文研究加味四妙汤对大鼠痛风性关节炎、小鼠及大鼠高尿酸血症的防治作用和作用机制, 为加味四妙汤治疗痛风性关节炎提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 加味四妙汤中药材(苍术、黄柏、牛膝、薏苡仁、黄芪、萆薢) 购自合肥市药材公司, 并经安徽中医学院中药鉴定教研室周建理教授鉴定。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 2 g 生药·mL⁻¹, 冰箱保存备用, 临用时用 0.5% CMC-Na 溶液配成所需浓度。消炎痛片, 上海九福药业公司生产, 批号 20001007; 苯溴马隆胶囊, 成都中医药大学华神制药厂, 批号 9910125; 别嘌呤醇片, 上海延安制药厂生产, 批号 2000201。尿酸, Sigma 公司产品; 酵母膏, 北京奥博星生物技术责任有限公司产品, 批号 011110; 尿酸测定试剂盒, 上海荣盛生物技术有限公司生产, 批号 0011001, 0011201; PGE₂ 放免药盒, 由苏州医学院血栓室提供; TNF- α 检测试剂盒, 购自北京东亚免疫技术研究所。

1.2 动物 雄性昆明种小鼠, 体重(25~ 30) g; 雄性 Wistar 大鼠, 体重(200~ 250) g; 购于安徽医科大学动物试验中心。合格证: 皖医实验动物准第 01 号。

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生产; GC-911 型放射免疫计数器, 中国科学技术大学科技实业公司生产。

2 方法

2.1 尿酸致小鼠高尿酸血症^[4] 70 只小鼠, 随机均分为 7 组($n = 10$): 正常组、模型组、加味四妙汤高(24 g·kg⁻¹), 中(12 g·kg⁻¹), 低剂量组(6 g·kg⁻¹), 苯溴马隆组(20 mg·kg⁻¹) 及别嘌呤醇组(40 mg·kg⁻¹), ig, 1 次/d, 连续 7 d, 正常组和模型组给等量的 0.5% CMC-Na 溶液。末次给药后 60 min, 除正常组 ip 生理盐水外, 其余动物 ip 尿酸 250 mg·kg⁻¹, 60 min 后小鼠摘眼球取血, 分离血清, 测定血清尿酸水平。

2.2 酵母致小鼠高尿酸血症^[5] 70 只小鼠, 分组同上, 以酵母膏 30 g·kg⁻¹ ig, 1 次/d, 连续 8 d, 造模第 5 天开始 ig 给药, 1 次/d, 连续 4 d, 正常组和模型组给等量的 0.5% CMC-Na 溶液。末次给药 60 min 后小鼠摘眼球取血, 分离血清, 测定血清尿酸水平。

2.3 酵母致大鼠高尿酸血症 70 只雄性 Wistar 大鼠, 随机分为正常对照组、模型组、加味四妙汤高(12 g·kg⁻¹), 中(6 g·kg⁻¹), 低剂量组(3 g·kg⁻¹), 苯溴马隆组(10 mg·kg⁻¹) 及别嘌呤醇组(20 mg·kg⁻¹), 以酵母膏 20 g·kg⁻¹ ig, 1 次/d, 连续 8 d, 造模第 5 天开始 ig 给药, 1 次/d, 连续 4 d, 正常组和模型组给等量的 0.5% CMC-Na 溶液。收集第(7~ 8) d 大鼠 24 h 尿液, 记录尿量, 第 8 天给药后 60 min 取血, 分离血清, 测定血清和尿液尿酸水平。

2.4 微晶型尿酸钠(MSU) 诱导大鼠急性痛风性关节炎

2.4.1 尿酸钠结晶及尿酸钠溶液的制备 参照文献^[6]。

2.4.2 动物分组、给药与造模 雄性 Wistar 大鼠, 体重(200~ 240) g, 随机均分为 6 组($n = 10$): 正常组、模型组、加味四妙汤高(12 g·kg⁻¹), 中(6 g·kg⁻¹), 低剂量组(3 g·kg⁻¹), 阳性对照组(消炎痛 5 mg·kg⁻¹), 正常组和模型组 ig 等量生理盐水, 加味四妙汤组 ig 给药, 1 次/d, 连续 7 d, 消炎痛组第 7 天开始给药, 末次给药 1 h 后, 正常组大鼠右侧踝关节背侧注射无菌生理盐水 0.2 mL, 其它各组大鼠右踝关节的背侧(关节伸直 45 度进针) 将 0.2 mL(50 mg·mL⁻¹) MSU 混悬液注入到关节腔造模, 造模后继续给药, 1 次/d, 连续给药 2 d, 直至大鼠处死。

2.4.3 关节肿胀度测定 分别于造模前, 造模后 6, 12, 24, 48 h 测定右踝关节的容积, 以(造模后关节容

积-造模前关节容积)的差值作为关节肿胀度。

2.4.4 大鼠步态分级 造模 24 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。

2.4.5 肿胀组织炎症因子与细胞因子的测定 按照文献方法^[9,10],造模后 48 h 处死大鼠,在右踝关节上 0.5 cm 剪断,剪去脚爪,在盛有 5 mL 生理盐水的水烧杯中剥去皮肤,剪开关节周围组织,将生理盐水和组织一同移至试管,振荡 10 min,浸泡 1 h,4 ℃离心,25 000 r·min⁻¹,10 min,取上清液 0.5 mL 测定相关指标。TNF-α PGE₂ 含量采用放射免疫测定法。

2.5 统计学方法 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,等级资料用 Ridit 检验。

3 结果

3.1 对尿酸致高尿酸血症小鼠血清尿酸水平影响 见表 1。模型组小鼠血尿酸水平显著升高。加味四妙汤高,中剂量组、苯溴马隆组小鼠血清尿酸水平显著降低,与模型组比较有显著差异($P < 0.01$)。表明加味四妙汤能降低尿酸致高尿酸血症小鼠血清尿酸水平。

表 1 加味四妙汤对尿酸致高尿酸血症小鼠血清尿酸水平影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	血清尿酸水平(μmol·L ⁻¹)
正常	—	103.3 ± 16.5 ²⁾
模型	—	186.4 ± 37.6
加味四妙汤	24.0	140.5 ± 29.8 ²⁾
	12.0	146.7 ± 24.6 ²⁾
	6.0	175.7 ± 30.4
苯溴马隆	0.02	116.3 ± 19.5 ²⁾
别嘌呤醇	0.04	172.1 ± 31.6

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

3.2 对酵母致高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的影响 见表 2。模型组小鼠血清尿酸水平显著升高。加味四妙汤高,中剂量组、苯溴马隆组和别嘌呤醇组小鼠血清尿酸水平显著降低,与模型组比较有显著差异($P < 0.01$)。表明加味四妙汤能降低酵母致高尿酸血症小鼠血清尿酸水平。

表 2 加味四妙汤对酵母致高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	血清尿酸水平(μmol·L ⁻¹)
正常	—	123.8 ± 26.7 ²⁾
模型	—	202.6 ± 41.4
加味四妙汤	24.0	145.5 ± 32.8 ²⁾
	12.0	140.3 ± 44.9 ²⁾
	6.0	184.1 ± 43.2
苯溴马隆	0.02	98.6 ± 33.4 ²⁾
别嘌呤醇	0.04	102.4 ± 23.6 ²⁾

3.3 对酵母致高尿酸血症大鼠血清和尿中尿酸水平及 24 h 尿酸排泄量的影响 模型组大鼠血清和尿中尿酸水平显著升高,尿酸排泄量增加。加味四妙汤高,中剂量组、苯溴马隆组和别嘌呤醇组大鼠血清尿酸水平均显著降低,与模型组比较有显著差异($P < 0.01$)。别嘌呤醇组大鼠尿尿酸水平、尿酸排泄量显著降低($P < 0.01$)。苯溴马隆组、加味四妙汤高,中剂量组,在血尿酸浓度显著低于模型组的情况下,而尿尿酸水平、24 h 尿酸排泄量与模型组相近。与模型组比较,苯溴马隆组、加味四妙汤高,中剂量组尿尿酸排泄量/血尿酸比值显著增加,表明加味四妙汤能降低酵母致高尿酸血症大鼠血清尿酸水平,显著增加大鼠尿尿酸相对排泄量。见表 3。

表 3 加味四妙汤对酵母致高尿酸血症大鼠血清和尿中尿酸水平及 24 h 尿酸排泄量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	血清尿酸水平(μmol·L ⁻¹)	尿尿酸水平(nmol·L ⁻¹)	24 h 尿酸排泄量(μmol)	尿尿酸排泄量/血尿酸
正常	—	122.8 ± 25.3 ²⁾	1.42 ± 0.38 ²⁾	18.5 ± 3.8 ²⁾	0.156 ± 0.042
模型	—	224.6 ± 50.1	2.02 ± 0.43	28.1 ± 10.2	0.128 ± 0.036
加味四妙汤	12.0	164.2 ± 45.7 ²⁾	2.26 ± 0.61	30.4 ± 7.4	0.190 ± 0.042 ²⁾
	6.0	170.3 ± 38.9 ²⁾	1.90 ± 0.36	27.3 ± 6.5	0.163 ± 0.033 ¹⁾
	3.0	186.8 ± 47.3	1.78 ± 0.27	26.1 ± 7.6	0.147 ± 0.049
苯溴马隆	0.01	132.6 ± 30.2 ²⁾	2.06 ± 0.48	27.8 ± 9.1	0.203 ± 0.065 ²⁾
别嘌呤醇	0.02	106.2 ± 27.2 ²⁾	1.11 ± 0.24 ²⁾	15.3 ± 4.7 ²⁾	0.146 ± 0.041

3.4 对 MSU 诱导大鼠急性痛风性关节炎的防治作用

3.4.1 对大鼠关节肿胀度的影响 与正常组比较,模型组大鼠注射 MSU 溶液后 6 h 关节明显肿胀,24 h 肿胀达高峰。与模型组相比,消炎痛组、加味四妙汤高,中剂量组(6~48)h 大鼠关节肿胀度均明显降

低($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而低剂量组大鼠关节肿胀度仅有降低趋势。见表 4。

3.4.2 对大鼠步态的影响 与正常组相比, 模型组大鼠注射 MSU 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, 消炎痛组、加味四妙汤高剂量组大鼠步态明显好转, 中、低剂量组大鼠步态无明显好转。见表 5。

表 4 加味四妙汤对 MSU 致急性痛风性关节炎大鼠关节肿胀的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	关节肿胀度(ΔmL)			
		6 h	12 h	24 h	48 h
正常	—	0.06 \pm 0.07 ²⁾	0.08 \pm 0.10 ²⁾	0.03 \pm 0.09 ²⁾	0.02 \pm 0.11 ²⁾
模型	—	0.47 \pm 0.10	0.56 \pm 0.12	0.60 \pm 0.14	0.54 \pm 0.13
消炎痛	0.005	0.28 \pm 0.09 ²⁾	0.34 \pm 0.08 ²⁾	0.30 \pm 0.12 ²⁾	0.35 \pm 0.09 ²⁾
加味四妙汤	12.0	0.35 \pm 0.11 ¹⁾	0.43 \pm 0.13 ¹⁾	0.41 \pm 0.10 ²⁾	0.40 \pm 0.12 ²⁾
	6.0	0.43 \pm 0.07	0.45 \pm 0.11 ¹⁾	0.46 \pm 0.12 ²⁾	0.42 \pm 0.12 ¹⁾
	3.0	0.44 \pm 0.13	0.51 \pm 0.15	0.48 \pm 0.13	0.46 \pm 0.14

表 5 加味四妙汤对 MSU 致急性痛风性关节炎大鼠步态的影响($n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	步态				P 值
		0 级	1 级	2 级	3 级	
正常	—	10	0	0	0	
模型	—	0	1	2	7	
消炎痛	0.005	0	5	3	2	0.022 ²⁾
加味四妙汤	12.0	0	4	4	2	0.031 ¹⁾
	6.0	0	1	5	4	0.280
	3.0	0	0	5	5	0.471

3.4.3 对大鼠肿胀关节浸出液中 TNF- α 和 PGE₂ 水平的影响 与正常组相比, 模型组大鼠肿胀关节浸出液中 TNF- α 和 PGE₂ 水平均显著增高; 与模型组比较, 消炎痛组、加味四妙汤高、中剂量组大鼠肿胀关节浸出液中 TNF- α 和 PGE₂ 显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表 6。

表 6 加味四妙汤对 MSU 致急性痛风性关节炎大鼠肿胀关节浸出液中 TNF- α 和 PGE₂ 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	TNF- α ($\mu g \cdot L^{-1}$)	PGE ₂ ($\mu g \cdot L^{-1}$)
正常	—	20.3 \pm 5.9 ²⁾	10.2 \pm 3.7 ²⁾
模型	—	35.8 \pm 12.3	28.5 \pm 11.7
消炎痛	0.005	20.6 \pm 7.1 ²⁾	12.7 \pm 4.3 ²⁾
加味四妙汤	12.0	24.5 \pm 9.6 ¹⁾	17.8 \pm 5.2 ²⁾
	6.0	23.8 \pm 7.4 ¹⁾	20.4 \pm 6.6 ¹⁾
	3.0	28.6 \pm 12.4	25.6 \pm 8.9

4 讨论

4.1 加味四妙汤降低血尿酸的作用及作用分析 尿酸腹腔注射, 或酵母膏灌胃可以导致小鼠、大鼠高尿酸血症^[11], 加味四妙汤灌胃给药能显著降低高尿酸血症动物血清尿酸水平, 并且呈现一定的量效关系。表明加味四妙汤有明显的抗高尿酸血症作用。

别嘌呤醇抑制尿酸生成, 对尿酸排泄无明显影响。苯溴马隆通过抑制肾小管对尿酸重吸收, 促进尿酸排泄。加味四妙汤、苯溴马隆均能显著降低尿酸致高尿酸血症小鼠血清尿酸水平, 而别嘌呤醇组作用不明显, 表明加味四妙汤可能主要通过促进尿酸排泄而降低血尿酸水平。

酵母灌胃, 小鼠、大鼠血清尿酸水平显著升高, 大鼠尿尿酸水平、24 h 尿酸排泄量增加。加味四妙汤、苯溴马隆、别嘌呤醇均能显著降低高尿酸血症小鼠、大鼠的血清尿酸水平, 其中加味四妙汤、苯溴马隆组大鼠尿酸相对排泄量增加, 表明加味四妙汤能促进尿酸排泄。

综上所述, 加味四妙汤抗高尿酸血症作用, 其作用机制可能主要是促进尿酸排泄。

4.2 加味四妙汤对大鼠痛风性关节炎作用及作用分析 现代研究表明: MSU 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。研究表明^[12], TNF- α 是前炎症网链中的一级细胞因子, 作为炎症趋化因子和激活因子诱导了痛风性关节炎的发生、发展。一般认为, 在关节炎的发病过程中, PGE₂ 的作用最为强烈, PGE₂ 是由滑膜细胞和软骨细胞合成并释放, PGE₂ 引发滑膜炎症反应、软骨基质的崩解, 进一步使细动脉和毛细血管扩张, 通透性增加。痛

风病人滑液中 PGE₂ 含量升高。本实验中由 MSU 诱导的大鼠急性痛风性关节炎模型成功, 加味四妙汤高, 中剂量组大鼠关节肿胀明显减轻, 痛风大鼠步态改善, 大鼠肿胀关节浸出液中 TNF- α 和 PGE₂ 水平均显著降低。

本研究结果提示, 加味四妙汤能明显改善 MSU 诱导的大鼠痛风性关节炎, 其机制可能与抑制大鼠关节 TNF- α 和 PGE₂ 合成与释放有关。

[参考文献]

- [1] 庄 宏. 高尿酸血症及老年人原发性痛风的研究[J]. 中华老年医学杂志, 1993, 12(5): 314-316.
- [2] 陈光亮, 徐叔云. 高尿酸血症研究进展[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(10): 1088-1092.
- [3] 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.
- [4] 陈光亮. 小鼠高尿酸血症动物模型的研究[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(3): 350-352.
- [5] 陈光亮, 张清林, 马晓芹, 等. 酵母致小鼠高尿酸血症

模型[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(4): 467-469.

- [6] 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.
- [7] 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.
- [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]. 日本药理志, 1991, 98: 467.
- [9] 马东来, 李 俊, 陈敏珠, 等. 卡芬尼对大鼠佐剂性关节炎治疗作用的免疫机制[J]. 中国免疫学杂志, 1992, 2(8): 114.
- [10] 陈 奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社. 1993. 369-371.
- [11] 陈光亮, 徐叔云. 高尿酸血症动物模型研究进展[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(4): 3698-3673.
- [12] Mastsukawa A, Yoshimura T, Miyamoto K, *et al.* Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF- α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in Lps⁻ induced rabbit arthritis [J]. Lab Invest, 1997, 76(5): 629.