

· 基础研究 ·

# 蠲痹历节清方对急性痛风性关节炎大鼠的影响及其作用机制

尤卓<sup>1</sup>, 熊辉<sup>1</sup>, 吴海金<sup>1</sup>, 郭玉星<sup>2</sup>, 周彪<sup>1</sup>, 齐新宇<sup>1</sup>, 向黎黎<sup>2</sup>

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005)

**摘要 目的:**探讨蠲痹历节清方对急性痛风性关节炎大鼠的影响及其作用机制。**方法:**将 96 只 2 月龄雄性清洁级健康 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、蠲痹历节清方组、依托考昔组, 每组 24 只。模型组、蠲痹历节清方组、依托考昔组大鼠以氧嗪酸钾溶液连续腹腔注射后, 于大鼠右侧踝关节腔内注射尿酸钠溶液; 正常对照组大鼠腹腔及右侧踝关节腔分别注入等剂量生理盐水。关节腔内注射后即刻给予药物干预, 正常对照组和模型组以 10 mL · kg<sup>-1</sup> 生理盐水灌胃, 蠲痹历节清方组以 22 g · kg<sup>-1</sup> 剂量的蠲痹历节清方悬混液灌胃, 依托考昔组以 5.5 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量的依托考昔悬混液灌胃; 每日 2 次, 连续灌胃 2 d。分别于药物干预开始后 4 h、12 h、24 h、48 h 采用免疫组化法检测各组大鼠踝关节滑膜组织中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor - α, TNF - α)、白细胞介素 (interleukin, IL) - 1β、IL - 6 蛋白含量; 于药物干预开始后 48 h 采用全自动生化分析仪检测血尿酸含量, 并观察各组大鼠踝关节滑膜组织形态。**结果:**①踝关节滑膜组织中 TNF - α 蛋白含量。药物干预开始后 4 h、12 h、24 h、48 h, 4 组大鼠踝关节滑膜组织中 TNF - α 蛋白含量比较, 差异均有统计学意义 [(14.72 ± 0.98) pg · mL<sup>-1</sup>, (40.05 ± 1.31) pg · mL<sup>-1</sup>, (19.59 ± 2.63) pg · mL<sup>-1</sup>, (19.00 ± 1.32) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 72.528, P = 0.012; (16.14 ± 0.86) pg · mL<sup>-1</sup>, (40.95 ± 2.56) pg · mL<sup>-1</sup>, (24.10 ± 2.50) pg · mL<sup>-1</sup>, (21.02 ± 2.68) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 59.314, P = 0.000; (14.95 ± 0.39) pg · mL<sup>-1</sup>, (38.65 ± 0.75) pg · mL<sup>-1</sup>, (19.49 ± 0.59) pg · mL<sup>-1</sup>, (18.64 ± 0.62) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 35.681, P = 0.001; (14.83 ± 1.26) pg · mL<sup>-1</sup>, (37.91 ± 1.30) pg · mL<sup>-1</sup>, (18.16 ± 0.84) pg · mL<sup>-1</sup>, (17.32 ± 0.83) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 37.553, P = 0.000]; 正常对照组大鼠踝关节滑膜组织中 TNF - α 蛋白含量均低于模型组、蠲痹历节清方组和依托考昔组 (P = 0.000, P = 0.000, P = 0.003, P = 0.001; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.008; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.001); 模型组踝关节滑膜组织中 TNF - α 蛋白含量均高于蠲痹历节清方组和依托考昔组 (P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000); 蠲痹历节清方组踝关节滑膜组织中 TNF - α 蛋白含量与依托考昔组比较, 差异均无统计学意义 (P = 0.212, P = 0.079, P = 0.091, P = 0.088)。②踝关节滑膜组织中 IL - 1β 蛋白含量。药物干预开始后 4 h、12 h、24 h、48 h, 4 组大鼠踝关节滑膜组织中 IL - 1β 蛋白含量比较, 差异均有统计学意义 [(3.43 ± 0.68) pg · mL<sup>-1</sup>, (7.40 ± 0.51) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.84 ± 0.21) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.67 ± 0.18) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 64.473, P = 0.028; (3.61 ± 0.34) pg · mL<sup>-1</sup>, (7.95 ± 0.63) pg · mL<sup>-1</sup>, (5.28 ± 0.34) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.91 ± 0.42) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 50.119, P = 0.006; (3.51 ± 0.50) pg · mL<sup>-1</sup>, (6.98 ± 0.60) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.73 ± 0.25) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.47 ± 0.23) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 41.346, P = 0.002; (3.47 ± 0.29) pg · mL<sup>-1</sup>, (6.90 ± 0.68) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.58 ± 0.27) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.12 ± 0.11) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 68.784, P = 0.000]; 正常对照组大鼠踝关节滑膜组织中 IL - 1β 蛋白含量均低于模型组、蠲痹历节清方组和依托考昔组 (P = 0.003, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.002, P = 0.004; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000); 模型组踝关节滑膜组织中 IL - 1β 蛋白含量均高于蠲痹历节清方组和依托考昔组 (P = 0.000, P = 0.001, P = 0.003, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.008, P = 0.000, P = 0.000); 蠲痹历节清方组踝关节滑膜组织中 IL - 1β 蛋白含量与依托考昔组比较, 差异均无统计学意义 (P = 0.198, P = 0.081, P = 0.101, P = 0.097)。③踝关节滑膜组织中 IL - 6 蛋白含量。药物干预开始后 4 h、12 h、24 h、48 h, 4 组大鼠踝关节滑膜组织中 IL - 6 蛋白含量比较, 差异均有统计学意义 [(3.72 ± 0.31) pg · mL<sup>-1</sup>, (7.83 ± 0.33) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.87 ± 0.12) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.75 ± 0.23) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 32.582, P = 0.018; (4.07 ± 0.38) pg · mL<sup>-1</sup>, (8.04 ± 0.13) pg · mL<sup>-1</sup>, (5.62 ± 0.38) pg · mL<sup>-1</sup>, (5.12 ± 0.20) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 86.127, P = 0.007; (3.77 ± 0.14) pg · mL<sup>-1</sup>, (7.86 ± 0.27) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.79 ± 0.53) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.68 ± 0.11) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 49.038, P = 0.001; (3.55 ± 0.14) pg · mL<sup>-1</sup>, (7.85 ± 0.24) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.67 ± 0.38) pg · mL<sup>-1</sup>, (4.57 ± 0.13) pg · mL<sup>-1</sup>, F = 33.115, P = 0.000]; 正常对照组大鼠踝关节滑膜组织中 IL - 6 蛋白含量均低于模型组、蠲痹历节清方组和依托考昔组 (P = 0.001, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.006; P = 0.000, P = 0.000,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81574005)

通讯作者: 熊辉 E-mail: xh\_hn@sina.com

$P=0.000, P=0.003$ ); 模型组踝关节滑膜组织中 IL-6 蛋白含量均高于蠲痹历节清方组和依托考昔组( $P=0.000, P=0.000, P=0.002, P=0.000; P=0.000, P=0.001, P=0.000, P=0.000$ ); 蠲痹历节清方组踝关节滑膜组织中 IL-6 蛋白含量与依托考昔组比较, 差异均无统计学意义( $P=0.256, P=0.075, P=0.933, P=0.108$ )。④血尿酸含量。药物干预开始后 48 h, 4 组大鼠血尿酸含量比较, 差异有统计学意义 [ $(132.52 \pm 3.32) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, (352.30 \pm 14.42) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, (165.08 \pm 3.57) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, (321.08 \pm 16.44) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, F=46.176, P=0.000$ ]; 正常对照组大鼠血尿酸含量低于模型组、蠲痹历节清方组和依托考昔组( $P=0.000, P=0.028, P=0.000$ ), 模型组血尿酸含量高于蠲痹历节清方组和依托考昔组( $P=0.000, P=0.032$ ), 蠲痹历节清方组血尿酸含量低于依托考昔组( $P=0.001$ )。⑤踝关节滑膜组织形态。药物干预开始后 48 h, 正常对照组踝关节滑膜上皮排列完整, 无炎性细胞浸润; 模型组踝关节滑膜上皮脱落, 大量白细胞浸润; 蠲痹历节清方组和依托考昔组踝关节滑膜上皮较完整, 炎性细胞浸润较少。结论: 蠲痹历节清方能有效降低急性痛风性关节炎大鼠的血尿酸水平, 抑制其关节滑膜组织炎症反应, 其作用机制可能与其能下调 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的蛋白表达有关。

**关键词** 关节炎; 痛风性; 蠲痹历节清方; 尿酸; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 白细胞介素 6; 大鼠; 动物实验

## Effect of Juanbi Lijie Qing Fang(蠲痹历节清方) on rats with acute gouty arthritis and its mechanism of action

YOU Zhuo<sup>1</sup>, XIONG Hui<sup>1</sup>, WU Haijin<sup>1</sup>, GUO Yuxing<sup>2</sup>, ZHOU Biao<sup>1</sup>, QI Xinyu<sup>1</sup>, XIANG Lili<sup>2</sup>

1. Hunan Chinese Medical University, Changsha 410208, Hunan, China

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan Chinese Medical University, Changsha 410005, Hunan, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the effects of Juanbi Lijie Qing Fang(蠲痹历节清方, JBLJQF) on rats with acute gouty arthritis and its mechanism of action. **Methods:** Ninety-six 2-month-old healthy clean-grade male SD rats were randomly divided into normal control group, model group, JBLJQF group and etoricoxib group, 24 cases in each group. The rats in model group, JBLJQF group and etoricoxib group were intraperitoneal injected continuously with oteracil potassium solutions, and then the sodium urate solutions were injected into their right ankles, while the rats in normal control group were administrated with intraperitoneal injection and intra-articular injection of the same dose of normal saline(NS) respectively. Drug interventions were performed on the rats immediately after intra-articular injection. The rats in normal control group, model group, JBLJQF group and etoricoxib group were intragastric administrated with NS(10 mL/kg), NS(10 mL/kg), JBLJQF suspension(22 g/kg) and etoricoxib suspension(5.5 mg/kg) respectively, twice a day for 2 consecutive days. The contents of tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) protein, interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) protein and interleukin-6(IL-6) protein in ankle synovial tissues were detected by using immunohistochemical method at 4, 12, 24 and 48 hours after the beginning of drug intervention respectively. The blood uric acid(UA) contents were detected by using full-automatic biochemical analyser at 48 hours after the beginning of drug intervention, and the ankle synovial tissue morphologies of rats in each group were observed. **Results:** There was statistical difference in content of TNF- $\alpha$  protein in ankle synovial tissues between the 4 groups at 4, 12, 24 and 48 hours after the beginning of drug intervention ( $14.72 \pm 0.98, 40.05 \pm 1.31, 19.59 \pm 2.63, 19.00 \pm 1.32$  pg/mL,  $F=72.528, P=0.012; 16.14 \pm 0.86, 40.95 \pm 2.56, 24.10 \pm 2.50, 21.02 \pm 2.68$  pg/mL,  $F=59.314, P=0.000; 14.95 \pm 0.39, 38.65 \pm 0.75, 19.49 \pm 0.59, 18.64 \pm 0.62$  pg/mL,  $F=35.681, P=0.001; 14.83 \pm 1.26, 37.91 \pm 1.30, 18.16 \pm 0.84, 17.32 \pm 0.83$  pg/mL,  $F=37.553, P=0.000$ ). The content of TNF- $\alpha$  protein in ankle synovial tissues was lower in normal control group compared to model group, JBLJQF group and etoricoxib group( $P=0.000, P=0.000, P=0.003, P=0.001; P=0.000, P=0.000, P=0.001, P=0.008; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ), and was higher in model group compared to JBLJQF group and etoricoxib group( $P=0.000, P=0.001, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). There was no statistical difference in content of TNF- $\alpha$  protein in ankle synovial tissues between JBLJQF group and etoricoxib group( $P=0.212, P=0.079, P=0.091, P=0.088$ ). There was statistical difference in content of IL-1 $\beta$  protein in ankle synovial tissues between the 4 groups at 4, 12, 24 and 48 hours after the beginning of drug intervention ( $3.43 \pm 0.68, 7.40 \pm 0.51, 4.84 \pm 0.21, 4.67 \pm 0.18$  pg/mL,  $F=64.473, P=0.028; 3.61 \pm 0.34, 7.95 \pm 0.63, 5.28 \pm 0.34, 4.91 \pm 0.42$  pg/mL,  $F=50.119, P=0.006; 3.51 \pm 0.50, 6.98 \pm 0.60, 4.73 \pm 0.25, 4.47 \pm 0.23$  pg/mL,  $F=41.346, P=0.002; 3.47 \pm 0.29, 6.90 \pm 0.68, 4.58 \pm 0.27, 4.12 \pm 0.11$  pg/mL,  $F=68.784, P=0.000$ ). The content of IL-1 $\beta$  protein in ankle synovial tissues was lower in normal control group compared to model group, JBLJQF group and etoricoxib group( $P=0.003, P=0.000, P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.002, P=0.004; P=0.000, P=0.000, P=0.001, P=0.000$ ), and was higher in model group compared to JBLJQF group and etoricoxib group( $P=0.000, P=0.001, P=0.003, P=0.000; P=0.000, P=0.008, P=$

0.000,  $P=0.000$ ). There was no statistical difference in content of IL-1 $\beta$  protein in ankle synovial tissues between JBLJQF group and etoricoxib group ( $P=0.198, P=0.081, P=0.101, P=0.097$ ). There was statistical difference in content of IL-6 protein in ankle synovial tissues between the 4 groups at 4, 12, 24 and 48 hours after the beginning of drug intervention ( $3.72 \pm 0.31, 7.83 \pm 0.33, 4.87 \pm 0.12, 4.75 \pm 0.23$  pg/mL,  $F=32.582, P=0.018; 4.07 \pm 0.38, 8.04 \pm 0.13, 5.62 \pm 0.38, 5.12 \pm 0.20$  pg/mL,  $F=86.127, P=0.007; 3.77 \pm 0.14, 7.86 \pm 0.27, 4.79 \pm 0.53, 4.68 \pm 0.11$  pg/mL,  $F=49.038, P=0.001; 3.55 \pm 0.14, 7.85 \pm 0.24, 4.67 \pm 0.38, 4.57 \pm 0.13$  pg/mL,  $F=33.115, P=0.000$ ). The content of IL-6 protein in ankle synovial tissues was lower in normal control group compared to model group, JBLJQF group and etoricoxib group ( $P=0.001, P=0.000, P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.001, P=0.006; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.003$ ), and was higher in model group compared to JBLJQF group and etoricoxib group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.002, P=0.000; P=0.000, P=0.001, P=0.000, P=0.000$ ). There was no statistical difference in content of IL-6 protein in ankle synovial tissues between JBLJQF group and etoricoxib group ( $P=0.256, P=0.075, P=0.933, P=0.108$ ). There was statistical difference in blood UA content between the 4 groups at 48 hours after the beginning of drug intervention ( $132.52 \pm 3.32, 352.30 \pm 14.42, 165.08 \pm 3.57, 321.08 \pm 16.44$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $F=46.176, P=0.000$ ). The blood UA content was lower in normal control group compared to model group, JBLJQF group and etoricoxib group ( $P=0.000, P=0.028, P=0.000$ ), and was higher in model group compared to JBLJQF group and etoricoxib group ( $P=0.000, P=0.032$ ), and was lower in JBLJQF group compared to etoricoxib group ( $P=0.001$ ). At 48 hours after the beginning of drug intervention, the ankle synovial epithelium of rats in normal control group was complete without inflammatory cell infiltration, and the ankle synovial epithelium of rats in model group was exfoliated with a large amount of leukocytic infiltration, and the ankle synovial epithelium of rats in JBLJQF group and etoricoxib group were relatively complete with less inflammatory cell infiltration. **Conclusion:** JBLJQF can effectively reduce the blood UA level and inhibit the inflammatory reaction in synovial tissue in rats with acute gouty arthritis, and its mechanisms of action may be that it can down-regulate the protein expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6.

**Keywords** arthritis; gouty; Juanbi Lijie Qing Fang; uric acid; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-6; rats; animal experimentation

痛风是由于长期嘌呤代谢障碍、血尿酸升高而引起的人体组织受损的疾病,其常见临床表现为急性痛风性关节炎、高尿酸血症、痛风石形成及关节畸形等<sup>[1]</sup>。近年来,临床上痛风性关节炎的发病率有逐年递增的趋势<sup>[2-4]</sup>。虽然西药治疗该病可取得一定的疗效,但普遍存在不同程度的不良反应<sup>[5-6]</sup>。近年来,我们根据痛风性关节炎的病因病机,在临床上应用蠲痹历节清方治疗急性痛风性关节炎取得了满意的临床疗效。本研究以大鼠高尿酸血症并急性痛风性关节炎为模型,观察蠲痹历节清方对急性痛风性关节炎大鼠的影响,并探讨其作用机制,为临床应用蠲痹历节清方治疗急性痛风性关节炎提供实验依据。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 2月龄健康雄性清洁级 SD 大鼠 96 只,体质量 200~220 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,实验动物许可证号:SCXK(湘)2011-0003。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

**1.2 实验药物与试剂** 蠲痹历节清方由苍术 20 g、黄柏 10 g、黄芩 10 g、茵陈 15 g、土茯苓 15 g、当归

15 g、防己 10 g、白术 10 g、泽泻 10 g、甘草 6 g 等组成。将上述药物煎煮后浓缩至含生药量为  $2.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液(由湖南中医药大学第二附属医院药剂科执行)。依托考昔悬混液:依托考昔片(美国 Merck Sharp & Dohme Australia Pty Ltd),每片 60 mg,研碎后将药粉配成浓度为  $1.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的悬浊液,置于 4℃ 冰箱冷藏备用。尿酸钠溶液:取 1250 mg 尿酸钠盐(北京索莱宝科技有限公司),研成细粉后加 50 mL 生理盐水,制成  $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的尿酸钠溶液。氧嗪酸钾溶液:将 3 g 氧嗪酸钾晶体(北京索莱宝科技有限公司)溶解于 97 mL 的生理盐水中,配成浓度为 3% 的氧嗪酸钾溶液。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 免疫组化试剂盒、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$  免疫组化试剂盒、IL-6 免疫组化试剂盒[安迪生物科技(上海)有限公司生产]。

**1.3 实验仪器** TD5A 台式离心机(湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司),HF-120 全自动生化分析仪(山东海力孚企业管理有限公司),石蜡切片机(金华科迪设备有限公司),酶标仪(芬兰雷博公司),显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司),ER-182 A 型电

子天平(日本 AND 公司), TGL20 高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司), 光学显微镜(日本 Olympus 公司),  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱(日本 SANYO 公司)。

## 2 方 法

**2.1 动物分组与造模** 适应性喂养 1 周后将 96 只 2 月龄健康雄性清洁级 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、罂痹历节清方组、依托考昔组, 每组 24 只。参照吕军等<sup>[7]</sup>建立的高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型方法进行造模: 模型组、罂痹历节清方组、依托考昔组大鼠首先以氧嗪酸钾溶液( $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )行腹腔注射, 每天 2 次, 连续注射 1 周; 然后将 6 号注射针在大鼠右侧踝关节后侧沿跟腱内侧以  $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$  方向插入至关节腔, 有漏空感后将  $0.2\text{ mL}$  浓度为  $25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的尿酸钠溶液注入至关节腔内, 以关节囊对侧鼓起为注入标准。正常对照组大鼠腹腔及右侧踝关节腔分别注入等剂量生理盐水。

**2.2 药物干预** 大鼠给药剂量按《药理学实验》<sup>[8]</sup>中人和动物体表面积折算的等效剂量比值表计算。关节腔内注射后即刻给予药物干预: 正常对照组和模型组以  $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  生理盐水灌胃, 罂痹历节清方组以  $22\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量的罂痹历节清方悬混液灌胃, 依托考昔组以  $5.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量的依托考昔悬浊液灌胃; 每日 2 次, 连续灌胃 2 d。

**2.3 踝关节滑膜组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白含量检测** 药物干预开始后 4 h、12 h、24 h、48 h 分别从各组大鼠中随机抽取 6 只大鼠, 采用断颈法处死大鼠, 取大鼠右侧踝关节, 切关关节囊, 分离滑膜组织, 将其在液氮中冷冻后, 置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待用。采用免疫组化法检测滑膜组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白含量, 具体步骤、方法严格按说明书进行。

**2.4 血尿酸含量检测** 药物干预开始后 48 h, 在处死大鼠前以 10% 水合氯醛( $3.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )行腹腔麻醉, 腹主动脉采血  $4\sim 6\text{ mL}$  置于玻璃离心管, 离心

后取上层淡黄色血清  $1\sim 1.5\text{ mL}$ , 采用全自动生化分析仪检测血尿酸含量。

**2.5 踝关节滑膜组织形态学观察** 药物干预开始后 48 h 将一部分大鼠滑膜置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察滑膜组织形态。

**2.6 数据统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件对所得数据进行统计学分析, 4 组大鼠血尿酸含量以及踝关节滑膜组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白含量的组间比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结 果

**3.1 踝关节滑膜组织中 TNF- $\alpha$  蛋白含量** 药物干预开始后 4 h、12 h、24 h、48 h, 4 组大鼠踝关节滑膜组织中 TNF- $\alpha$  蛋白含量比较, 差异均有统计学意义; 正常对照组大鼠踝关节滑膜组织中 TNF- $\alpha$  蛋白含量均低于模型组、罂痹历节清方组和依托考昔组 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.003, P=0.001; P=0.000, P=0.000, P=0.001, P=0.008; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.001$ ); 模型组踝关节滑膜组织中 TNF- $\alpha$  蛋白含量均高于罂痹历节清方组和依托考昔组 ( $P=0.000, P=0.001, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ); 罂痹历节清方组踝关节滑膜组织中 TNF- $\alpha$  蛋白含量与依托考昔组比较, 差异均无统计学意义 ( $P=0.212, P=0.079, P=0.091, P=0.088$ )。见表 1。

**3.2 踝关节滑膜组织中 IL-1 $\beta$  蛋白含量** 药物干预开始后 4 h、12 h、24 h、48 h, 4 组大鼠踝关节滑膜组织中 IL-1 $\beta$  蛋白含量比较, 差异均有统计学意义; 正常对照组大鼠踝关节滑膜组织中 IL-1 $\beta$  蛋白含量均低于模型组、罂痹历节清方组和依托考昔组 ( $P=0.003, P=0.000, P=0.001, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.002, P=0.004; P=0.000, P=0.000, P=0.001, P=0.000$ ); 模型组踝关节滑膜组织中 IL-1 $\beta$

表 1 4 组大鼠踝关节滑膜组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  蛋白含量比较  $\bar{x}\pm s, \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$

组别	样本量(只)	药物干预开始后 4 h	药物干预开始后 12 h	药物干预开始后 24 h	药物干预开始后 48 h
正常对照组	6	$14.72\pm 0.98$	$16.14\pm 0.86$	$14.95\pm 0.39$	$14.83\pm 1.26$
模型组	6	$40.05\pm 1.31$	$40.95\pm 2.56$	$38.65\pm 0.75$	$37.91\pm 1.30$
罂痹历节清方组	6	$19.59\pm 2.63$	$24.10\pm 2.50$	$19.49\pm 0.59$	$18.16\pm 0.84$
依托考昔组	6	$19.00\pm 1.32$	$21.02\pm 2.68$	$18.64\pm 0.62$	$17.32\pm 0.83$
F 值		72.528	59.314	35.681	37.553
P 值		0.012	0.000	0.001	0.000

蛋白含量均高于蠲痹历节清方组和依托考昔组 ( $P = 0.000, P = 0.001, P = 0.003, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.008, P = 0.000, P = 0.000$ ); 蠲痹历节清方组踝关节滑膜组织中 IL-1 $\beta$  蛋白含量与依托考昔组比较, 差异均无统计学意义 ( $P = 0.198, P = 0.081, P = 0.101, P = 0.097$ )。见表 2。

**3.3 踝关节滑膜组织中 IL-6 蛋白含量** 药物干预开始后 4 h、12 h、24 h、48 h, 4 组大鼠踝关节滑膜组织中 IL-6 蛋白含量比较, 差异均有统计学意义; 正常对照组大鼠踝关节滑膜组织中 IL-6 蛋白含量均低

于模型组、蠲痹历节清方组和依托考昔组 ( $P = 0.001, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.001, P = 0.006; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.003$ ); 模型组踝关节滑膜组织中 IL-6 蛋白含量均高于蠲痹历节清方组和依托考昔组 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.002, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.001, P = 0.000, P = 0.000$ ); 蠲痹历节清方组踝关节滑膜组织中 IL-6 蛋白含量与依托考昔组比较, 差异均无统计学意义 ( $P = 0.256, P = 0.075, P = 0.933, P = 0.108$ )。见表 3。

表 2 4 组大鼠踝关节滑膜组织白细胞介素-1 $\beta$  蛋白含量比较  $\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	样本量(只)	药物干预开始后 4 h	药物干预开始后 12 h	药物干预开始后 24 h	药物干预开始后 48 h
正常对照组	6	3.43 $\pm$ 0.68	3.61 $\pm$ 0.34	3.51 $\pm$ 0.50	3.47 $\pm$ 0.29
模型组	6	7.40 $\pm$ 0.51	7.95 $\pm$ 0.63	6.98 $\pm$ 0.60	6.90 $\pm$ 0.68
蠲痹历节清方组	6	4.84 $\pm$ 0.21	5.28 $\pm$ 0.34	4.73 $\pm$ 0.25	4.58 $\pm$ 0.27
依托考昔组	6	4.67 $\pm$ 0.18	4.91 $\pm$ 0.42	4.47 $\pm$ 0.23	4.12 $\pm$ 0.11
<i>F</i> 值		64.473	50.119	41.346	68.784
<i>P</i> 值		0.028	0.006	0.002	0.000

表 3 4 组大鼠踝关节滑膜组织白细胞介素-6 蛋白含量比较  $\bar{x} \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

组别	样本量(只)	药物干预开始后 4 h	药物干预开始后 12 h	药物干预开始后 24 h	药物干预开始后 48 h
正常对照组	6	3.72 $\pm$ 0.31	4.07 $\pm$ 0.38	3.77 $\pm$ 0.14	3.55 $\pm$ 0.14
模型组	6	7.83 $\pm$ 0.33	8.04 $\pm$ 0.13	7.86 $\pm$ 0.27	7.85 $\pm$ 0.24
蠲痹历节清方组	6	4.87 $\pm$ 0.12	5.62 $\pm$ 0.38	4.79 $\pm$ 0.53	4.67 $\pm$ 0.38
依托考昔组	6	4.75 $\pm$ 0.23	5.12 $\pm$ 0.20	4.68 $\pm$ 0.11	4.57 $\pm$ 0.13
<i>F</i> 值		32.582	86.127	49.038	33.115
<i>P</i> 值		0.018	0.007	0.001	0.000

**3.4 血尿酸含量** 药物干预开始后 48 h, 4 组大鼠血尿酸含量比较, 差异有统计学意义; 正常对照组大鼠血尿酸含量低于模型组、蠲痹历节清方组和依托考昔组 ( $P = 0.000, P = 0.028, P = 0.000$ ), 模型组血尿酸含量高于蠲痹历节清方组和依托考昔组 ( $P = 0.000, P = 0.032$ ), 蠲痹历节清方组血尿酸含量低于依托考昔组 ( $P = 0.001$ )。见表 4。

表 4 4 组大鼠药物干预开始后 48 h 血尿酸含量比较

$\bar{x} \pm s, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	样本量(只)	血尿酸含量
正常对照组	6	132.52 $\pm$ 3.32
模型组	6	352.30 $\pm$ 14.42
蠲痹历节清方组	6	165.08 $\pm$ 3.57
依托考昔组	6	321.08 $\pm$ 16.44
<i>F</i> 值		46.176
<i>P</i> 值		0.000

**3.5 踝关节滑膜组织形态** 药物干预开始后 48 h, 正常对照组踝关节滑膜上皮排列完整, 无炎性细胞浸润 [图 1(1)]; 模型组踝关节滑膜上皮脱落, 大量白细胞浸

润 [图 1(2)]; 蠲痹历节清方组和依托考昔组踝关节滑膜上皮较完整, 炎性细胞浸润较少 [图 1(3)、图 1(4)]。

## 4 讨论

急性痛风性关节炎属中医“痹证”“痛风”“白虎历节”等范畴, 多因后天饮食不节, 损伤脾胃, 升降失司, 湿浊内生, 久而酿热, 加之机体劳倦, 外感风寒湿邪, 阻塞脉道, 化生瘀浊, 闭阻不通而为热痛<sup>[9]</sup>。蠲痹历节清方是熊辉教授根据自己多年临床经验总结出来的, 由具有清热利湿作用的四妙丸和当归拈痛汤化裁而来。方中以苍术、黄柏为君, 苍术燥湿健脾, 祛风除湿, 为标本兼顾之药; 黄柏清热解毒力强, 主清下焦之热, 有加强利湿的作用。黄芩清热燥湿, 土茯苓解毒、祛湿热, 茵陈清热利湿共为臣药, 助苍术、黄柏清热利湿。防己祛风湿, 白术、泽泻燥湿利水, 当归活血散瘀、通经络为佐助之药。甘草性平调和诸药为使。诸药合用, 共奏清热、利湿、散瘀之功效, 同时亦有补脾益气之功, 标本兼顾。我们的前期临床研究已证实该方能有效缓解痛风性关节炎患者的疼痛症状, 降低



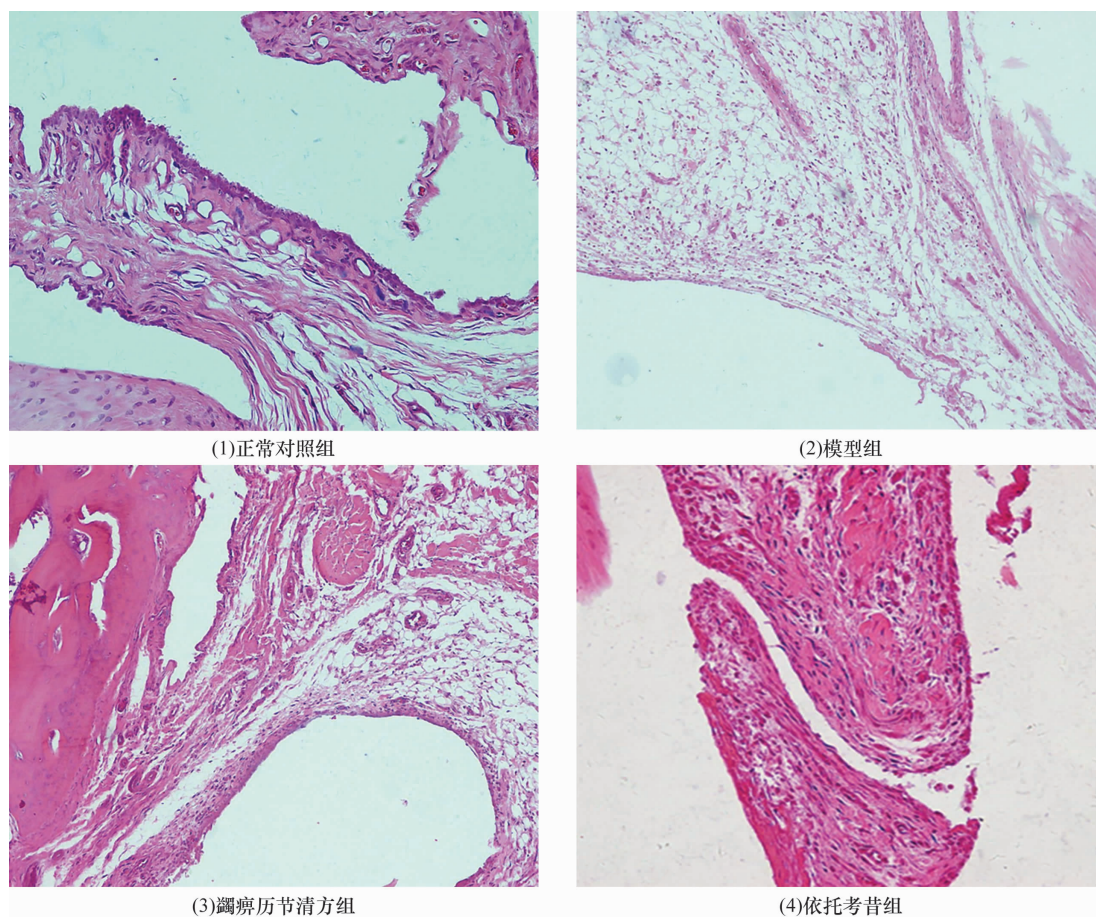


图1 药物干预开始 48 h 后 4 组大鼠踝关节滑膜组织形态(HE 染色 ×200)

痛风患者的血尿酸水平,且未见不良反应<sup>[10-11]</sup>。

现代医学认为,尿酸盐是痛风性关节炎致病的关键因素。当血尿酸水平急剧上升时,尿酸盐析出结晶,沉积于关节滑膜附近,机体受到异物刺激后会进行免疫应答,引起肥大细胞、单核巨噬细胞系统的活化,通过一系列复杂的细胞内级联反应释放  $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\beta$ 、 $\text{IL}-6$ 、组织胺等多种炎症介质,参与炎症反应<sup>[12-13]</sup>。当组织内  $\text{TNF}-\alpha$  含量升高时,中性粒细胞便会接收信号使自身活性增强,亦会激活周边细胞合成和释放其他炎性相关因子如  $\text{IL}-1\beta$ 、 $\text{IL}-6$ 、 $\text{IL}-8$  等;同时,血管内皮细胞的骨架将会改变,完整性遭到破坏,毛细血管通透性增强,使炎症反应逐级放大<sup>[14]</sup>。 $\text{IL}-1\beta$  作为炎症因子,主要由活化的巨噬细胞分泌,充当介导体和致病体双重角色。当体内  $\text{IL}-1\beta$  浓度较低时,它可与抗原发生协同作用,使自然杀伤细胞活性增强,放大机体免疫应答,同时聚集中性粒细胞、巨噬细胞等,促进炎症介质释放。 $\text{IL}-1\beta$  的大量分泌或注射可通过血液循环引起发热、急性蛋白合成等全身反应。Martinon 等<sup>[15]</sup> 研究表明, $\text{IL}-1\beta$  是尿酸盐引起炎症级联反应中不可或缺的因子之

一。 $\text{IL}-6$  是一种多效性前炎症细胞因子,具有炎症介导和免疫调节的作用,由纤维母细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、单核巨噬细胞等多种细胞产生,可与  $\text{IL}-1$  一起协同促进 T 细胞增殖,与  $\text{IL}-1$  一样参与炎症反应和发热反应<sup>[16-17]</sup>。实际上,人体内的炎症因子均不是单独作用于人体,而是与多种介质相互作用,各因子间相互结合、互相影响,使体内炎症从无到有,从局部到周围,共同参与痛风性关节炎发生发展的过程。

本研究结果表明,髌痹历节清方能有效降低急性痛风性关节炎大鼠的血尿酸水平,抑制其关节滑膜组织炎症反应,其作用机制可能与其能下调  $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\beta$ 、 $\text{IL}-6$  的蛋白表达有关,但其具体下调机理尚待进一步探究。

## 5 参考文献

- [1] VINIK O, WECHALEKAR MD, FALZON L, et al. Treatment of asymptomatic hyperuricemia for the prevention of gouty arthritis, renal disease and cardiovascular events: a systematic literature review[J]. J Rheumatol Suppl, 2014, 92:70-74.

(下转第 15 页)

(上接第6页)

- [2] YU KH,SEE LC,KUO CF,et al. Prevalence and incidence in patients with autoimmune rheumatic diseases;A nation-wide population – based study in Taiwan[J]. Arthritis Care Res (Hoboken),2013,65(2):244 – 250.
- [3] SINGH JA. Racial and gender disparities among patients with gout[J]. Curr Rheumatol Rep,2013,15(2):1 – 9.
- [4] 匡红,曾琳,刘书蓉,等. 成都地区 28097 例健康体检者血尿酸水平分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(16):2121 – 2122.
- [5] 濮永杰,孔卫东,徐珽. 不同剂量秋水仙碱治疗急性痛风疗效的 Meta 分析[J]. 中国药业,2015,24(16):21 – 23.
- [6] CONWAY N,SCHWARTZ S. Diagnosis and management of acute gout[J]. Med Health R I,2009,92(11):356 – 358.
- [7] 吕军,吕芳,方和金,等. 高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的建立[J]. 中国现代医学杂志,2013,23(27):11 – 16.
- [8] 章元沛. 药理学实验[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996:238.
- [9] 杨良山,钟琴. 痛风性关节炎中医病因病机研究综述[J]. 风湿病与关节炎,2014,3(8):53 – 56.
- [10] 向黎黎,熊辉,李腾龙,等. 蠲痹历节清方治疗急性期湿热蕴结型痛风性关节炎 31 例[J]. 湖南中医杂志,2015,31(2):14 – 16.
- [11] 郭玉星,熊辉,陆小龙,等. 蠲痹历节清方治疗急性痛风性关节炎的临床研究[J]. 云南中医学院学报,2016,39(1):81 – 84.
- [12] 李迎春,徐建华. 急性痛风性关节炎的发病机制及研究进展[J]. 安徽医学,2013,34(1):96 – 98.
- [13] BOLZETTA F,VERONESE N,MANZATO E,et al. Chronic gout in the elderly[J]. Aging Clin Exp Res,2013,25(2):129 – 137.
- [14] 袁晓,范永升,谢冠群,等. 基于“TLR4/NF –  $\kappa$ B”信号通路研究“加味四妙丸”治疗急性痛风性关节炎大鼠的作用机制[J]. 浙江中医药大学学报,2017,41(1):17 – 24.
- [15] MARTINON F,PETRILLI V,MAYOR A,et al. Gout – associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. Nature,2006,440(781):237 – 241.
- [16] 杨洪杰,周利,吴海红,等. 清热解毒中药外敷治疗外伤感染创面的疗效观察及作用机制研究[J]. 中医正骨,2016,28(8):13 – 18.
- [17] 陈鹏,郭文韬,龙美兵,等. 退瘀消肿汤联合洛索洛芬钠片治疗急性痛风性关节炎的临床研究[J]. 中医正骨,2016,28(8):19 – 23.

(收稿日期:2017-12-12 本文编辑:时红磊)