

· 基础研究 ·

基于 Toll 样受体/髓系分化初级反应蛋白质 88 信号通路 探讨四妙汤加土茯苓方治疗急性痛风性关节炎的 作用机制

顾富城¹, 杨美鑫¹, 林惠红², 吴伟欣¹, 耿秋东³, 王和鸣⁴, 李楠¹

(1. 福建中医药大学中医学院, 福建 福州 350122;

2. 福建省漳州市中医院, 福建 漳州 363000;

3. 中医骨伤及运动康复教育部重点实验室, 福建 福州 350122;

4. 福建中医药大学附属人民医院, 福建 福州 350122)

摘要 目的:基于 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)/髓系分化初级反应蛋白质 88 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) 信号通路探讨四妙汤加土茯苓方治疗急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 的作用机制。**方法:**将 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 6 组, 每组 8 只。模型组、秋水仙碱组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组大鼠以高尿酸造模法结合尿酸盐注射法在右侧踝关节进行 AGA 造模, 空白组以生理盐水灌胃, 并在右侧踝关节注射生理盐水。AGA 造模结束后, 观察大鼠右侧踝关节, 评估炎症指数, 并计算踝关节肿胀指数。AGA 造模结束后 24 h, 中药低、中、高剂量组大鼠均以四妙汤加土茯苓方药液灌胃 (生药用量分别为 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 秋水仙碱组以秋水仙碱混悬液灌胃, 空白组和模型组大鼠均以等量生理盐水灌胃, 每天 1 次, 连续灌胃 7 d。药物干预结束后 24 h, 腹主动脉取血, 测定血清尿素氮和肌酐含量; 取右侧踝关节滑膜组织, 以实时荧光定量聚合酶链反应技术检测 TLR/MyD88 信号通路相关基因 TLR2、TLR4、MyD88、核因子 κB 抑制剂激酶 α (nuclear factor- κB inhibitor kinase- α , IKK- α)、核因子 κB 抑制剂 α (nuclear factor- κB inhibitor- α , I κB - α) mRNA 表达水平, 以蛋白质印迹技术检测 IKK- α 、I κB - α 蛋白表达水平, 采用免疫组化技术观察 TLR2、TLR4 蛋白表达情况及巨噬细胞聚集情况。**结果:**①模型验证结果。除空白组外, 其余 5 组大鼠右侧踝关节注射尿酸盐混悬液后均逐渐发生肿胀, 24 h 后炎症指数均达到 2 级以上。造模后 4 h、8 h、12 h、24 h, 模型组、秋水仙碱组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组的踝关节肿胀指数均高于空白组 (造模后 4 h: $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.002$, $P=0.004$, $P=0.031$; 造模后 8 h: $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.002$, $P=0.007$, $P=0.002$; 造模后 12 h: $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.004$, $P=0.010$, $P=0.006$; 造模后 24 h: $P=0.004$, $P=0.000$, $P=0.003$, $P=0.001$, $P=0.006$)。②血清尿素氮和肌酐含量检测结果。6 组大鼠血清尿素氮、肌酐含量总体比较, 组间差异均无统计学意义。③踝关节滑膜组织中 TLR/MyD88 信号通路相关基因 mRNA 水平检测结果。6 组大鼠踝关节滑膜组织中 MyD88 mRNA 水平比较, 差异无统计学意义。模型组的 TLR2、TLR4、IKK- α 、I κB - α mRNA 水平均高于空白组 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.020$)。秋水仙碱组和中药中剂量组的 TLR2、TLR4、IKK- α 、I κB - α mRNA 水平均低于模型组 (TLR2: $P=0.000$, $P=0.005$; TLR4: $P=0.018$, $P=0.000$; IKK- α : $P=0.003$, $P=0.004$; I κB - α : $P=0.008$, $P=0.010$); 中药低剂量组的 TLR2、I κB - α mRNA 水平均低于模型组 ($P=0.000$, $P=0.020$), 2 组 TLR4、IKK- α mRNA 水平的组间差异均无统计学意义 ($P=0.564$, $P=0.884$); 中药高剂量组的 TLR4 mRNA 水平低于模型组 ($P=0.024$), 2 组 TLR2、IKK- α 、I κB - α mRNA 水平的组间差异均无统计学意义 ($P=0.349$, $P=0.320$, $P=0.579$)。中药低、中剂量组与秋水仙碱组的 TLR2、TLR4、IKK- α 、I κB - α mRNA 水平比较, 组间差异均无统计学意义 (TLR2: $P=0.836$, $P=0.056$; TLR4: $P=0.669$, $P=0.069$; IKK- α : $P=0.387$, $P=0.989$; I κB - α : $P=0.721$, $P=0.518$); 中药高剂量组的 TLR2、TLR4 mRNA 水平均高于秋水仙碱组 ($P=0.000$, $P=0.002$), 2 组 IKK- α 、I κB - α mRNA 水平的组间差异均无统计学意义 ($P=0.313$, $P=0.136$)。中药低、高剂量组的 TLR2、TLR4、IKK- α 、I κB - α mRNA 水平均高于中药中剂量组 (TLR2: $P=0.000$, $P=0.047$; TLR4: $P=0.000$, $P=0.001$; IKK- α : $P=0.006$, $P=0.042$; I κB - α : $P=0.021$, $P=0.037$); 中药低剂量组的 TLR2、TLR4 mRNA 水平均低于中药高剂量组 ($P=0.001$, $P=0.006$), 2 组 IKK- α 、I κB - α mRNA 水平的组间差异均无统计学意义 ($P=0.394$, $P=0.068$)。④踝关节滑膜组织中 IKK- α 、I κB - α 蛋白水平检测结果。模型组大鼠踝关节滑膜组织中 IKK- α 、I κB - α 蛋白水平均高于空白组 ($P=0.000$, $P=0.000$); 秋水仙碱组 IKK- α 、I κB - α 蛋白水平均低于模型组 ($P=0.000$, $P=0.000$); 秋水仙碱组 IKK- α 蛋白水平高

基金项目:福建省卫生健康科技计划项目(2021QNA068)

通讯作者:李楠 E-mail:mr.linan@126.com

于中药低剂量组($P=0.000$), 2 组 I κ B- α 蛋白水平的差异无统计学意义($P=0.050$);秋水仙碱组 IKK- α 、I κ B- α 蛋白水平均高于中药中、高剂量组(IKK- α : $P=0.000$, $P=0.000$;I κ B- α : $P=0.000$, $P=0.000$);中药低剂量组 IKK- α 、I κ B- α 蛋白水平均高于中药中、高剂量组(IKK- α : $P=0.000$, $P=0.005$;I κ B- α : $P=0.000$, $P=0.006$);中药中剂量组 IKK- α 蛋白水平低于中药高剂量组($P=0.005$), 2 组 I κ B- α 蛋白水平的差异无统计学意义($P=0.108$)。⑤踝关节滑膜组织中巨噬细胞聚集情况观察结果。与空白组相比,其余 5 组大鼠踝关节滑膜组织中巨噬细胞均明显聚集,其中模型组巨噬细胞数量最多;4 个药物干预组巨噬细胞数量均较模型组减少,其中中药中剂量组和秋水仙碱组巨噬细胞数量减少更明显。⑥踝关节滑膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白表达情况观察结果。与空白组相比,其余 5 组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白均明显表达,其中模型组表达最明显;4 个药物干预组 TLR2、TLR4 蛋白表达水平均较模型组降低,其中中药中剂量组和秋水仙碱组降低更明显。**结论:**四妙汤加土茯苓方治疗 AGA 的机制可能与其减少巨噬细胞聚集,下调 TLR/MyD88 信号通路相关基因表达,减少炎症因子释放有关,其中中剂量作用效果最佳,作用效果与秋水仙碱相当。

关键词 关节炎, 痛风性; 四妙汤; 土茯苓; 类 Toll 受体; 髓系分化因子 88

The mechanism of Simiaotang and Tufuling Fang(四妙汤加土茯苓方) for treatment of acute gouty arthritis: a Toll-like receptor/myeloid differentiation primary response protein 88 signaling pathway-based experimental study

GU Fucheng¹, YANG Meixin¹, LIN Huihong², WU Weixin¹, GENG Qiudong³, WANG Heming⁴, LI Nan¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

2. Zhangzhou Traditional Chinese Medical Hospital, Zhangzhou 363000, Fujian, China

3. Key Laboratory of Orthopedics&Traumatology and Rehabilitation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Fuzhou 350122, Fujian, China

4. People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of Simiaotang and Tufuling Fang(四妙汤加土茯苓方, SMTTFLF) in treatment of acute gouty arthritis(AGA) based on the Toll-like receptor(TLR)/myeloid differentiation primary response protein 88(MyD88) signaling pathway. **Methods:** Forty-eight specific pathogen-free(SPF)-grade male Sprague-Dawley(SD) rats were selected and randomized into blank group, model group, colchicine group, low-dose SMTTFLF(L-SMTTFLF) group, medium-dose SMTTFLF(M-SMTTFLF) group, and high-dose SMTTFLF(H-SMTTFLF) group, 8 cases in each group. All rats but the ones in blank group were intervened by intragastric administration with potassium oxonate(PO) and hypoxanthine(Hx) suspension, followed by intra-articular injection of urate suspension into the right ankle joint for inducing AGA; while the ones in blank group by intragastric administration and intra-articular injection with the same dosage of normal saline. After the end of AGA modeling, the right ankle joint of the rats was observed for assessing the inflammation index, and the ankle swelling index was calculated for confirming whether the AGA models were built successfully. Twenty-four hours after the end of AGA modeling, the successfully modeled rats in L-, M-, and H-SMTTFLF group were further intragastric administrated with SMTTFLF in corresponding concentration(consuming the crude drug as 5, 10, and 20 g/kg, respectively), the ones in colchicine group with colchicine suspension, whereas, the ones in blank group and model group with the same dosage of normal saline, once a day for consecutive 7 days. Twenty-four hours after the end of drug intervention, the blood was drawn from the abdominal aorta of rats in each group for detecting the serum levels of urea nitrogen and creatinine. After phlebotomizing, the synovial tissues were harvested from the right ankle joints, and the mRNA levels of TLR/MyD88 signaling pathway-related genes, including TLR2, TLR4, MyD88, nuclear factor- κ B inhibitor kinase- α (IKK- α) and nuclear factor- κ B inhibitor- α (I κ B- α), were detected by using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(qPCR) technology. The protein expression levels of IKK- α and I κ B- α were detected by using Western blotting assay, and the expression of TLR2 and TLR4 proteins, as well as the aggregation of macrophages, were observed by using immunohistochemistry(IHC). **Results:** ①After injection of urate suspension, the swelling gradually appeared in the right ankle joints of all rats but the ones in blank group, and peaked after 24 hours, with the inflammation index being grade 2 or above. At hour 4, 8, 12, and 24 after successful modeling, the ankle swelling indexes of the modeled rats were all higher in model group, colchicine group, L-SMTTFLF group, M-SMTTFLF group, and H-SMTTFLF group compared to blank group(at hour 4 after successful modeling: $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.002$, $P=0.004$, $P=0.031$; at hour 8 after successful modeling:

$P = 0.001, P = 0.000, P = 0.002, P = 0.007, P = 0.002$; at hour 12 after successful modeling: $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.004, P = 0.010, P = 0.006$; at hour 24 after successful modeling: $P = 0.004, P = 0.000, P = 0.003, P = 0.001, P = 0.006$).

② There was no statistical difference in the serum levels of urea nitrogen and creatinine among the 6 groups in general. ③ The difference was not statistically significant among the 6 groups in the mRNA level of MyD88 in the synovial tissues of ankle, while, was statistically significant in the mRNA levels of TLR2, TLR4, IKK- α and I κ B- α . The mRNA levels of TLR2, TLR4, IKK- α and I κ B- α were higher in model group compared to blank group ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.020$), while, were lower in colchicine group and M-SMTTFLF group compared to model group (TLR2: $P = 0.000, P = 0.005$; TLR4: $P = 0.018, P = 0.000$; IKK- α : $P = 0.003, P = 0.004$; I κ B- α : $P = 0.008, P = 0.010$). The mRNA levels of TLR2 and I κ B- α were lower in L-SMTTFLF group compared to model group, while, the differences were not statistically significant between the 2 groups in the mRNA levels of TLR4 and IKK- α ($P = 0.000, P = 0.020; P = 0.564, P = 0.884$). The mRNA level of TLR4 was lower in H-SMTTFLF group compared to model group ($P = 0.024$), while, the differences were not statistically significant between the 2 groups in the mRNA levels of TLR2, IKK- α and I κ B- α ($P = 0.349, P = 0.320, P = 0.579$). Furthermore, the differences were not statistically significant between L-SMTTFLF group and colchicine group as well as between M-SMTTFLF group and colchicine group in the mRNA levels of TLR2, TLR4, IKK- α and I κ B- α (TLR2: $P = 0.836, P = 0.056$; TLR4: $P = 0.669, P = 0.069$; IKK- α : $P = 0.387, P = 0.989$; I κ B- α : $P = 0.721, P = 0.518$). The mRNA levels of TLR2 and TLR4 were higher in H-SMTTFLF group compared to colchicine group ($P = 0.000, P = 0.002$), while, the comparison of the mRNA levels of IKK- α and I κ B- α between the 2 groups revealed no significant differences ($P = 0.313, P = 0.136$). The mRNA levels of TLR2, TLR4, IKK- α and I κ B- α were higher in L-SMTTFLF group and H-SMTTFLF group compared to M-SMTTFLF group (TLR2: $P = 0.000, P = 0.047$; TLR4: $P = 0.000, P = 0.001$; IKK- α : $P = 0.006, P = 0.042$; I κ B- α : $P = 0.021, P = 0.037$). The mRNA levels of TLR2 and TLR4 were lower in L-SMTTFLF group compared to H-SMTTFLF group ($P = 0.001, P = 0.006$), while, the comparison of the mRNA levels of IKK- α and I κ B- α between the 2 groups revealed no significant differences ($P = 0.394, P = 0.068$).

④ The protein expression levels of IKK- α and I κ B- α in the synovial tissues of ankle were higher in model group compared to blank group ($P = 0.000, P = 0.000$), and were higher in model group compared to colchicine group ($P = 0.000, P = 0.000$). The protein expression level of IKK- α was higher in colchicine group compared to L-SMTTFLF group ($P = 0.000$), while the comparison of the protein expression level of I κ B- α between the 2 groups revealed no significant differences ($P = 0.050$). The protein expression levels of IKK- α and I κ B- α were higher in colchicine group compared to M-SMTTFLF group and H-SMTTFLF group (IKK- α : $P = 0.000, P = 0.000$; I κ B- α : $P = 0.000, P = 0.000$), and were higher in L-SMTTFLF group compared to M-SMTTFLF group and H-SMTTFLF group (IKK- α : $P = 0.000, P = 0.005$; I κ B- α : $P = 0.000, P = 0.006$). The protein expression level of IKK- α was lower in M-SMTTFLF group compared to H-SMTTFLF group ($P = 0.005$), while the comparison of the protein expression level of I κ B- α between the 2 groups revealed no significant differences ($P = 0.108$).

⑤ Compared to the blank group, the macrophages in the synovial tissues of ankle were significantly aggregated in rats of the other 5 groups, with the model group presenting the most in number. Additionally, the macrophages decreased in colchicine group, L-SMTTFLF group, M-SMTTFLF group, and H-SMTTFLF group compared to model group, with the M-SMTTFLF group and colchicine group decreasing more pronounced.

⑥ Compared to the blank group, the TLR2 and TLR4 proteins in the synovial tissues of ankle were significantly expressed in rats of the other 5 groups, with the model group expressed the most pronounced. Besides, the expression levels of TLR2 and TLR4 proteins decreased in colchicine group, L-SMTTFLF group, M-SMTTFLF group, and H-SMTTFLF group compared to model group, with the M-SMTTFLF group and colchicine group decreasing more pronounced.

Conclusion: SMTTFLF may work by reducing the aggregation of macrophage and the release of inflammatory factors, as well as down-regulating the expression of TLR/MyD88 signaling pathway-related genes in treatment of AGA, with medium-dose acting best in the effects, which are comparable to that of colchicine.

Keywords arthritis, gouty; Si Miao Tang; smilacis glabrae rhizoma; toll-like receptors; myeloid differentiation factor 88

急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 是单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 晶体介导的多种炎症细胞参与的炎症反应^[1], Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 信号通路在其中发挥重要作用^[2-3]。髓系分化初级反应蛋白质 88 (myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88) 作为 TLR 信号通

路中的关键分子, 通过传递上游信息, 参与炎症的发生和发展^[3]。我们在临床中发现, 四妙汤加土茯苓方治疗 AGA 湿热蕴结证具有较好的疗效, 但其作用机制尚未完全明确。本研究从 TLR/MyD88 信号通路入手探讨了四妙汤加土茯苓方治疗 AGA 的作用机制, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

2 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量 200 ~ 220 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[动物生产许可证号: SCXK(沪)2012-0002], 由福建中医药大学实验动物中心代购并饲养。实验方案经福建中医药大学实验动物伦理委员会审查通过, 伦理批件号: 2022140。

1.2 药物与试剂

四妙汤加土茯苓方药物组成为苍术 25 g、黄柏 20 g、薏苡仁 30 g、牛膝 20 g、土茯苓 20 g, 中药饮片均购自福建省闽侯县上街致诚医药商店; 按照《中药药理实验方法学》中等效剂量系数折算法^[4], 以体质量 70 kg 成人等效剂量为大鼠中剂量, 设置低、中、高剂量比为 1:2:4, 经计算本研究中大鼠低、中、高剂量对应的四妙汤加土茯苓方生药用量分别为 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 将中药煎剂浓缩成生药浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存, 使用时根据需以蒸馏水配制相应浓度的药液使用。秋水仙碱片(西双版纳药业有限责任公司), 研磨成粉末, 以蒸馏水配制成浓度为 $1.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液。次黄嘌呤、氧嗪酸钾(上海源叶生物科技有限公司), 将二者混合配置成氧嗪酸钾(3%)、次黄嘌呤($500 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的混悬液备用。尿酸盐(上海源叶生物科技有限公司), 以蒸馏水配置成浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的尿酸盐混悬液, 常规高温高压灭菌处理后在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存, 使用前恢复至室温, 充分混匀。

预混液形式的两步法定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)专用逆转录试剂(去基因组)、通用型高灵敏度染料法 qPCR 检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 增强型放射免疫沉淀法裂解液、蛋白酶抑制剂、二喹啉甲酸法蛋白定量试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶制备试剂盒、三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸-十二烷基硫酸钠电泳缓冲液、Western 专用一抗二抗稀释液、增强型蛋白印迹再生液、快速转膜液、聚偏二氟乙烯膜、含吐温-20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液、超敏化学发光底物(博士德生化科技有限公司), 蛋白质常规分子量标记(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.3 实验仪器

VORTEX-6 漩涡混合器(福州康和尔生物科技有限公司), Opticlean-1300 超净工作台(力康生物医疗科技控股有限公司), MV-C155-ov71 梯度聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(杭州米欧仪器有限公司), Archimed X6 qPCR 仪[鲲鹏基因(北京)科学仪器有限公司], SpectraMax 吸光度读板机、CMax Plus 滤光片型光吸收酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司], JID-17R 冷冻离心机(广州吉迪仪器有限公司), DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模

将大鼠按体质量排序编号, 从随机数字表中选取 48 个连续 2 位随机数字记录在大鼠编号下方, 再将 48 个随机数字从小到大排序, 随机数字排序 1~8 对应的大鼠纳入空白组、9~16 对应的大鼠纳入模型组、17~24 对应的大鼠纳入秋水仙碱组、25~32 对应的大鼠纳入中药低剂量组、33~40 对应的大鼠纳入中药中剂量组、41~48 对应的大鼠纳入中药高剂量组。除空白组外, 其他 5 组大鼠均以氧嗪酸钾(3%)、次黄嘌呤($500 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)混悬液灌胃, 每天 2 次, 连续灌胃 7 d, 模拟临床中 AGA 患者发病的危险因素^[5]; 空白组以等量生理盐水灌胃。氧嗪酸钾(3%)、次黄嘌呤($500 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)混悬液灌胃结束后, 除空白组外, 其他 5 组大鼠均以 Coderre 经典法^[6]在右侧踝关节注射尿酸盐混悬液进行 AGA 造模; 空白组大鼠右侧踝关节注射等量生理盐水。

2.2 模型验证

AGA 造模结束后, 观察大鼠右侧踝关节, 评估炎症指数, 分级标准^[7]见表 1。分别于 AGA 造模前(尿酸盐混悬液注射前)及造模结束后 4 h、8 h、12 h、24 h 测量大鼠右侧踝关节周径, 计算踝关节肿胀指数。踝关节周径测量方法为: 用记号笔标记大鼠右侧内外踝尖所在平面, 标记的曲线长度即为踝关节周径, 测量精度 0.1 mm。踝关节肿胀指数 = (造模后周径 - 造模前周径) / 造模前周径。根据上述指标判定造模是否成功及模型的稳定性。

2.3 药物干预

AGA 造模结束后 24 h, 中药低、中、高剂量组大鼠均按照 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以相应浓度的四妙散加土茯苓方

药液灌胃,对应生药用量分别为 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;秋水仙碱组按照 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以秋水仙碱混悬液灌胃;空白组和模型组大鼠均以等量生理盐水灌胃。各组大鼠均每天灌胃 1 次,连续灌胃 7 d。

表 1 踝关节炎指数分级标准

等级	具体表现
0 级	正常
1 级	踝关节周围皮肤红斑,轻度肿胀,骨性标志可见
2 级	踝关节明显红肿,骨性标志消失,但肿胀局限于关节部位
3 级	踝关节以外肢体出现肿胀

2.4 标本采集

药物干预结束后 24 h,所有大鼠均按照 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以 7% 乌拉坦腹腔注射麻醉。麻醉后腹主动脉取血,在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,离心半径 10 cm,取上清液在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存备用。采血后,剥除大鼠右膝以下部位皮毛,在跟腱与腓肠肌交界处做横切口,并沿横切口两端分别做指向踝关节远端的纵切口,暴露关节腔但不损伤滑膜组织,用眼科镊提起覆盖在踝关节表面的淡黄色滑膜组织,用手术刀片切取滑膜组织,迅速在 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.5 血清尿素氮和肌酐含量检测

取保存的大鼠血清,分别以硫酸铵法和肌酐酶法检测尿素氮和肌酐含量,评估大鼠肝肾功能损伤情况。

2.6 踝关节滑膜组织中 TLR/MyD88 信号通路相关基因 mRNA 水平检测

运用实时荧光 qPCR 技术检测大鼠踝关节滑膜组织中 TLR/MyD88 信号通路相关基因 TLR2、TLR4、MyD88、核因子 κB 抑制剂激酶 α (nuclear factor- κB inhibitor kinase- α , IKK- α)、核因子 κB 抑制剂 α (nuclear factor- κB inhibitor- α , I κB - α) mRNA 表达水平。

引物信息见表 2,采用标准曲线法计算相关基因 mRNA 的绝对表达量。

2.7 踝关节滑膜组织中 IKK- α 、I κB - α 蛋白水平检测

采用蛋白质印迹技术检测 IKK- α 、I κB - α 蛋白表达水平,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为内参蛋白,最终通过 Image 软件测定条带灰度值进行定量分析。

2.8 踝关节滑膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白表达及巨噬细胞聚集情况观察

采用免疫荧光法观察各组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白表达情况及巨噬细胞聚集情况。

2.9 数据统计

采用 SPSS29.0 软件进行数据统计分析。6 组大鼠踝关节肿胀指数、TLR/MyD88 信号通路相关基因 mRNA 水平及 IKK- α 、I κB - α 蛋白表达水平的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验;6 组大鼠血清尿素氮、肌酐含量组间总体比较均采用 Wilcoxon 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 模型验证结果

除空白组外,其余 5 组大鼠右侧踝关节注射尿酸盐混悬液后均逐渐发生肿胀,24 h 后炎症指数均达到 2 级以上。造模后 4 h、8 h、12 h、24 h,模型组、秋水仙碱组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组的踝关节肿胀指数均高于空白组(造模后 4 h: $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.002$, $P = 0.004$, $P = 0.031$;造模后 8 h: $P = 0.001$, $P = 0.000$, $P = 0.002$, $P = 0.007$, $P = 0.002$;造模后 12 h: $P = 0.000$, $P = 0.000$, $P = 0.004$, $P = 0.010$, $P = 0.006$;造模后 24 h: $P = 0.004$, $P = 0.000$, $P = 0.003$, $P = 0.001$, $P = 0.006$)。见图 1、表 3。

表 2 实时荧光定量聚合酶链反应引物信息

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
Toll 样受体 2	上游引物 TGTTCGGGCAAATGGATCA	160
	下游引物 GCCTGAAGTGGGAGAAGTCC	
Toll 样受体 4	上游引物 GGCAGCAGGTGCAATTGTAT	203
	下游引物 GCTTCTTGTTCTTCTCTGATGT	
髓系分化初级反应蛋白质 88	上游引物 CTCCAGGTGTCCAACAGAAG	185
	下游引物 TGGTATAGTCCGAGATAGTGATGA	
核因子 κB 抑制剂激酶 α	上游引物 TAGCAGACCGTGAACATCCT	155
	下游引物 AACCAACTCCAATCAAGACTCATC	
核因子 κB 抑制剂 α	上游引物 CTCAAGAAGGAGCGGTTGGT	218
	下游引物 CCAAGTGCAGGAACGAGTCT	

3.2 血清尿素氮和肌酐含量检测结果

6 组大鼠血清尿素氮、肌酐含量总体比较,组间差异均无统计学意义(表 4)。

3.3 踝关节滑膜组织中 TLR/MyD88 信号通路相关基因 mRNA 水平检测结果

6 组大鼠踝关节滑膜组织中 MyD88 mRNA 水平比较,差异无统计学意义。模型组的 TLR2、TLR4、IKK- α 、I κ B- α mRNA 水平均高于空白组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.020$)。秋水仙碱组和中药中剂量组的 TLR2、TLR4、IKK- α 、I κ B- α mRNA 水平均低于模型组(TLR2: $P=0.000$, $P=0.005$; TLR4: $P=0.018$, $P=0.000$; IKK- α : $P=0.003$, $P=0.004$; I κ B- α : $P=0.008$, $P=0.010$); 中药低剂量组的 TLR2、I κ B- α mRNA 水平均低于模型组($P=0.000$, $P=0.020$), 2 组 TLR4、IKK- α mRNA 水平的组间差异均

无统计学意义($P=0.564$, $P=0.884$); 中药高剂量组的 TLR4 mRNA 水平低于模型组($P=0.024$), 2 组 TLR2、IKK- α 、I κ B- α mRNA 水平的组间差异均无统计学意义($P=0.349$, $P=0.320$, $P=0.579$)。中药低、中剂量组与秋水仙碱组的 TLR2、TLR4、IKK- α 、I κ B- α mRNA 水平比较,组间差异均无统计学意义(TLR2: $P=0.836$, $P=0.056$; TLR4: $P=0.669$, $P=0.069$; IKK- α : $P=0.387$, $P=0.989$; I κ B- α : $P=0.721$, $P=0.518$); 中药高剂量组的 TLR2、TLR4 mRNA 水平均高于秋水仙碱组($P=0.000$, $P=0.002$), 2 组 IKK- α 、I κ B- α mRNA 水平的组间差异均无统计学意义($P=0.313$, $P=0.136$)。中药低、高剂量组的 TLR2、TLR4、IKK- α 、I κ B- α mRNA 水平均高于中药中剂量组(TLR2: $P=0.000$, $P=0.047$; TLR4: $P=0.000$, $P=0.001$; IKK- α : $P=0.006$, $P=0.042$; I κ B- α : $P=0.021$,



图 1 尿酸盐注射 24 h 后模型组大鼠双侧足踝外观图片

表 3 造模后 6 组大鼠右侧踝关节肿胀指数测定结果

组别	样本量/ 只	踝关节肿胀指数($\bar{x} \pm s$)			
		造模后 4 h	造模后 8 h	造模后 12 h	造模后 24 h
空白组	8	0.069 \pm 0.034	0.069 \pm 0.053	0.104 \pm 0.069	0.099 \pm 0.096
模型组	8	0.242 \pm 0.131	0.277 \pm 0.151	0.473 \pm 0.204	0.276 \pm 0.143
秋水仙碱组	8	0.256 \pm 0.109	0.423 \pm 0.159	0.411 \pm 0.156	0.344 \pm 0.110
中药低剂量组	8	0.126 \pm 0.060	0.265 \pm 0.087	0.307 \pm 0.107	0.281 \pm 0.105
中药中剂量组	8	0.106 \pm 0.059	0.233 \pm 0.101	0.286 \pm 0.078	0.294 \pm 0.115
中药高剂量组	8	0.167 \pm 0.059	0.262 \pm 0.115	0.298 \pm 0.140	0.266 \pm 0.114
F 值		5.907	7.496	7.803	4.266
P 值		0.000	0.000	0.000	0.003

表 4 6 组大鼠血清尿素氮和肌酐含量检测结果

组别	样本量/只	尿素氮含量/[(M, Q) , mg \cdot mL $^{-1}$]	肌酐含量/[(M, Q) , μ mol \cdot mL $^{-1}$]
空白组	8	7.772, 1.314	26.635, 7.850
模型组	8	4.796, 0.824	19.376, 11.130
秋水仙碱组	8	4.876, 1.121	24.276, 4.910
中药低剂量组	8	6.426, 1.401	28.952, 1.290
中药中剂量组	8	7.365, 0.519	38.756, 10.000
中药高剂量组	8	6.497, 3.509	26.614, 8.350
W 值		6.154	6.846
P 值		0.292	0.232

$P = 0.037$); 中药低剂量组的 TLR2、TLR4 mRNA 水平均低于中药高剂量组 ($P = 0.001, P = 0.006$), 2 组 IKK- α 、I κ B- α mRNA 水平的组间差异均无统计学意义 ($P = 0.394, P = 0.068$)。见表 5。

3.4 踝关节滑膜组织中 IKK- α 、I κ B- α 蛋白水平检测结果

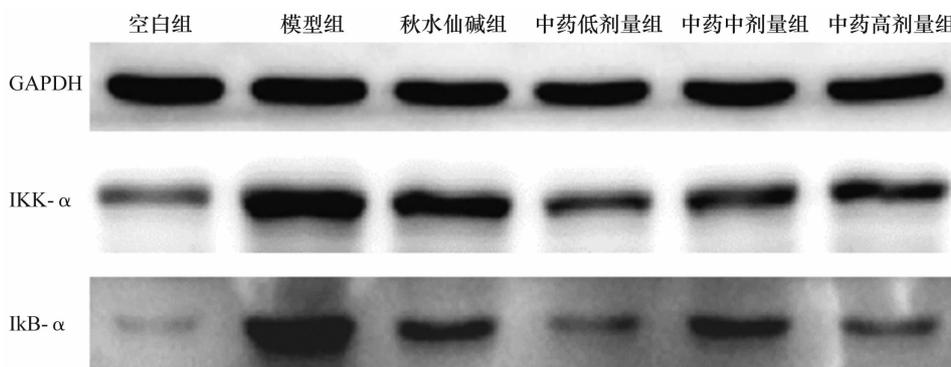
模型组大鼠踝关节滑膜组织中 IKK- α 、I κ B- α 蛋白水平均高于空白组 ($P = 0.000, P = 0.000$); 秋水仙碱组 IKK- α 、I κ B- α 蛋白水平均低于模型组 ($P = 0.000, P = 0.000$); 秋水仙碱组 IKK- α 蛋白水平高于

中药低剂量组 ($P = 0.000$), 2 组 I κ B- α 蛋白水平的差异无统计学意义 ($P = 0.050$); 秋水仙碱组 IKK- α 、I κ B- α 蛋白水平均高于中药中、高剂量组 (IKK- α : $P = 0.000, P = 0.000$; I κ B- α : $P = 0.000, P = 0.000$); 中药低剂量组 IKK- α 、I κ B- α 蛋白水平均高于中药中、高剂量组 (IKK- α : $P = 0.000, P = 0.005$; I κ B- α : $P = 0.000, P = 0.006$); 中药中剂量组 IKK- α 蛋白水平低于中药高剂量组 ($P = 0.005$), 2 组 I κ B- α 蛋白水平的差异无统计学意义 ($P = 0.108$)。见图 2、表 6。

表 5 6 组大鼠踝关节滑膜组织中 Toll 样受体/髓系分化初级反应蛋白质 88 信号通路相关基因 mRNA 水平检测结果

组别	样本量/只	TLR2 ¹⁾ mRNA ($\bar{x} \pm s$)	TLR4 ²⁾ mRNA ($\bar{x} \pm s$)	MyD88 ³⁾ mRNA ($\bar{x} \pm s$)	IKK- α ⁴⁾ mRNA ($\bar{x} \pm s$)	I κ B- α ⁵⁾ mRNA ($\bar{x} \pm s$)
空白组	8	2.225 ± 0.548	0.951 ± 0.187	1.038 ± 0.232	0.762 ± 0.075	0.849 ± 0.076
模型组	8	2.485 ± 0.431	2.446 ± 0.051	2.185 ± 0.578	2.378 ± 0.701	2.731 ± 0.030
秋水仙碱组	8	0.386 ± 0.069	0.693 ± 0.206	0.938 ± 0.239	1.291 ± 0.424	1.345 ± 0.155
中药低剂量组	8	1.219 ± 0.163	1.447 ± 0.200	1.818 ± 0.366	1.510 ± 0.228	2.530 ± 0.923
中药中剂量组	8	0.474 ± 0.096	0.803 ± 0.270	0.863 ± 0.290	0.838 ± 0.261	1.233 ± 0.036
中药高剂量组	8	2.086 ± 0.031	1.556 ± 0.046	1.299 ± 0.105	1.284 ± 0.035	2.283 ± 0.726
F 值		9.854	13.167	2.532	2.533	2.605
P 值		0.000	0.000	0.050	0.049	0.045

注: 1) Toll 样受体 2, 2) Toll 样受体 4, 3) 髓系分化初级反应蛋白质 88, 4) 核因子 κ B 抑制剂激酶 α , 5) 核因子 κ B 抑制剂 α 。



GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶, IKK- α 为核因子 κ B 抑制剂激酶 α , I κ B- α 为核因子 κ B 抑制剂 α 。

图 2 6 组大鼠踝关节滑膜组织中核因子 κ B 抑制剂激酶 α 、核因子 κ B 抑制剂 α 蛋白水平测定蛋白印迹图

表 6 6 组大鼠踝关节滑膜组织中核因子 κ B 抑制剂激酶 α 、核因子 κ B 抑制剂 α 蛋白水平检测结果

组别	样本量/只	IKK- α ¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)	I κ B- α ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)
空白组	8	0.265 ± 0.008	0.098 ± 0.011
模型组	8	1.097 ± 0.008	0.880 ± 0.010
秋水仙碱组	8	0.887 ± 0.024	0.571 ± 0.054
中药低剂量组	8	0.658 ± 0.028	0.464 ± 0.039
中药中剂量组	8	0.408 ± 0.026	0.213 ± 0.023
中药高剂量组	8	0.558 ± 0.019	0.299 ± 0.046
F 值		222.814	65.281
P 值		0.000	0.000

注: 1) 核因子 κ B 抑制剂激酶 α , 2) 核因子 κ B 抑制剂 α 。

3.5 踝关节滑膜组织中巨噬细胞聚集情况观察结果

与空白组相比,其余 5 组大鼠踝关节滑膜组织中巨噬细胞均明显聚集,其中模型组巨噬细胞数量最多;4 个药物干预组巨噬细胞数量均较模型组减少,其中中药中剂量组和秋水碱组巨噬细胞数量减少更明显(图 3)。

3.6 踝关节滑膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白表达情况观察结果

与空白组相比,其余 5 组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR2、TLR4 蛋白均明显表达,其中模型组表达最明显;4 个药物干预组 TLR2、TLR4 蛋白表达水平均较模型组降低,其中中药中剂量组和秋水仙碱组降低更明显(图 4、图 5)。

4 讨论

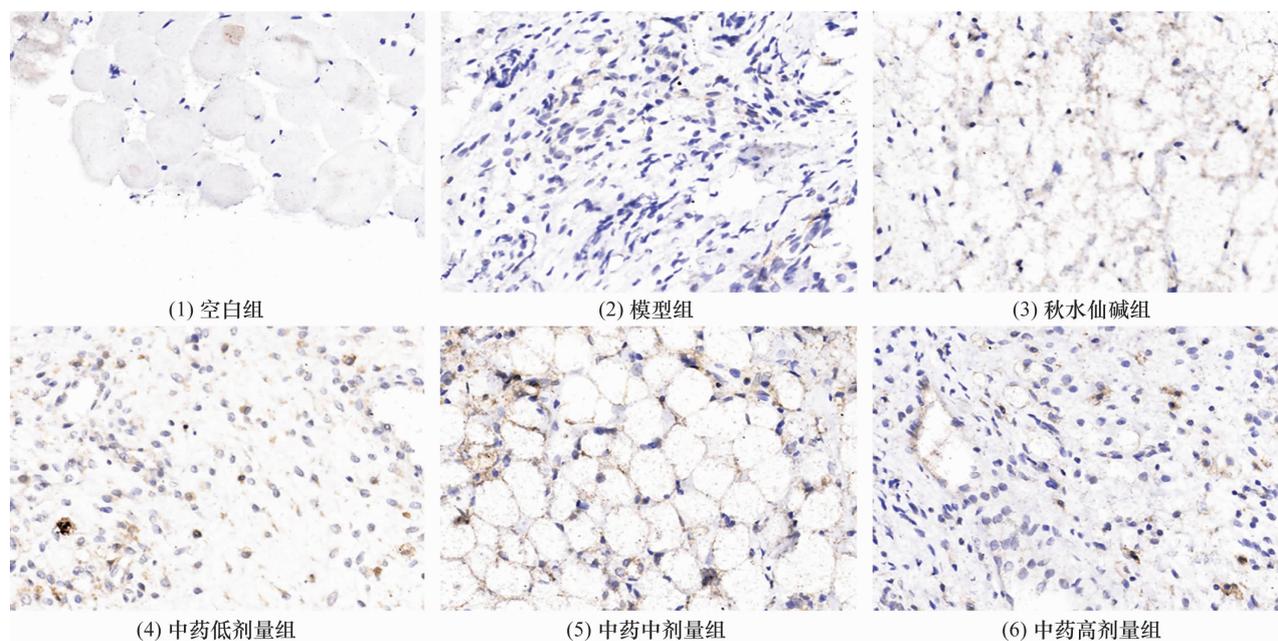
根据 AGA 的发病特点和关节症状,可将其归属于中医学“痹证”“痛风”“痛痹”“历节”等范畴。AGA 中医辨证多属湿热蕴结证^[8],临床多推荐使用四妙汤进行治疗^[9-10]。我们在临床中治疗痛风性关节炎湿热蕴结证时发现,在四妙汤的基础上加入具有活血止痛减毒功效的土茯苓,能够增强疗效。既往数据挖掘研究也发现,土茯苓、薏苡仁、牛膝、黄柏、苍术均属于中医治疗 AGA 使用频数前 10 位的中药^[11-13]。

土茯苓,性平,味甘、淡,归肝、胃经,具有解毒、除湿、利关节等功效。现代药理学研究证实,土茯苓具有利尿作用,可通过促进尿酸排泄,降低血尿酸水平,

因而对痛风性关节炎具有一定的治疗作用^[14]。四妙汤加土茯苓方中,苍术能够燥湿健脾;黄柏走下焦,除肝肾之湿热;薏苡仁入阳明经,祛湿热、利筋络;牛膝引诸药之力下行,使药物到达病所;土茯苓行健脾胃、祛风湿之功。诸药合用,可清湿热、宣通经络,达到止痛消肿之功。

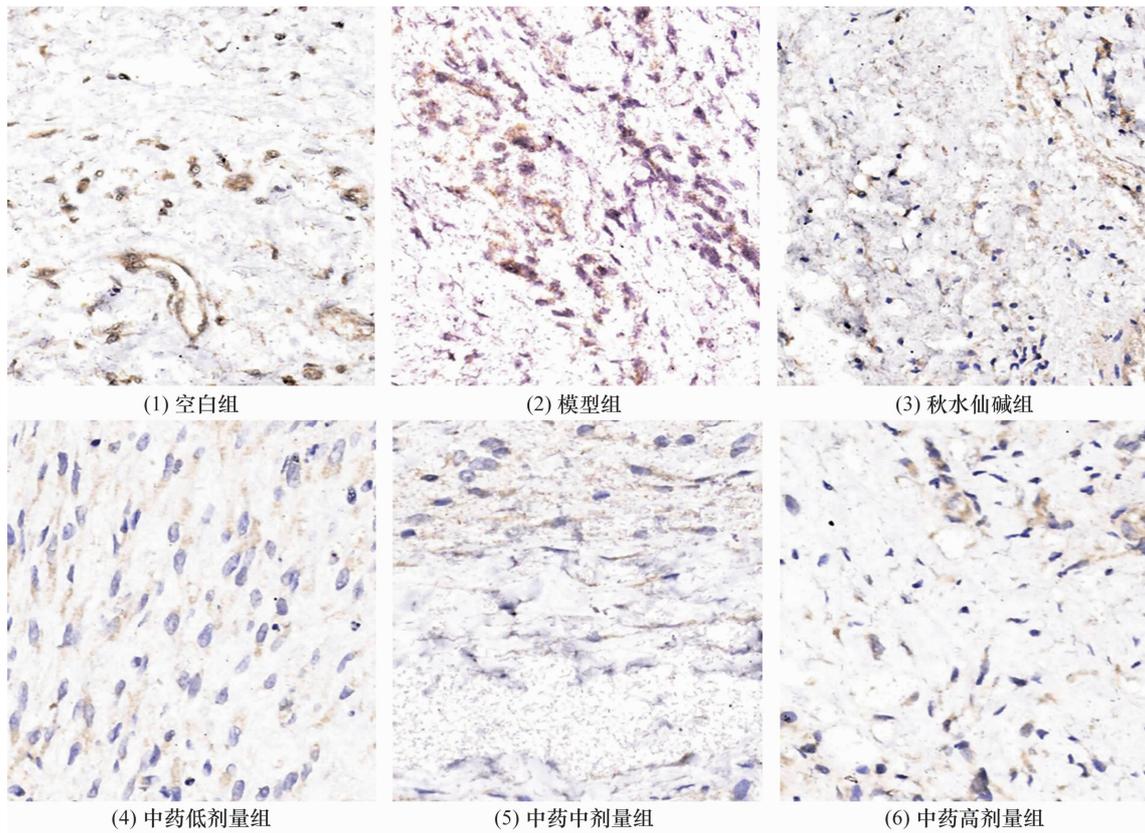
本实验中预先采用氧嗪酸钾、次黄嘌呤混悬液灌胃 1 周,之后局部注射尿酸盐制备 AGA 模型。该造模方法符合临床中 AGA 的发病过程。造模后,造模大鼠右侧踝关节均发生肿胀,且在造模后各时点造模大鼠的踝关节肿胀指数均高于空白组。这提示本研究制备的 AGA 模型成功,且较为稳定。药物干预结束后,各组大鼠血清尿素氮和肌酐含量均未出现明显差异。这可能是由于大鼠体内存在尿酸酶,造模未对其肝脏和肾脏造成明显损伤。

TLR/MyD88 通路是机体参与炎症反应的重要信号通路^[15-16]。当 MSU 晶体作为内源性危险信号相关分子侵入关节后,会引起大量巨噬细胞聚集。本研究中大鼠踝关节滑膜组织免疫组化结果证实了这一点。MSU 引起巨噬细胞聚集后,被巨噬细胞表面及细胞内的 TLR 识别^[17-18],从而大量募集下游 MyD88 通路因子。MyD88 作为一种衔接蛋白,可以进一步激活 IKK- α 等信号分子^[19];IKK- α 进一步磷酸化激活 I κ B- α ,继而与 NF- κ B 结合,发挥激酶活性,介导炎症反应,最终释放多种炎症因子^[20-21]。



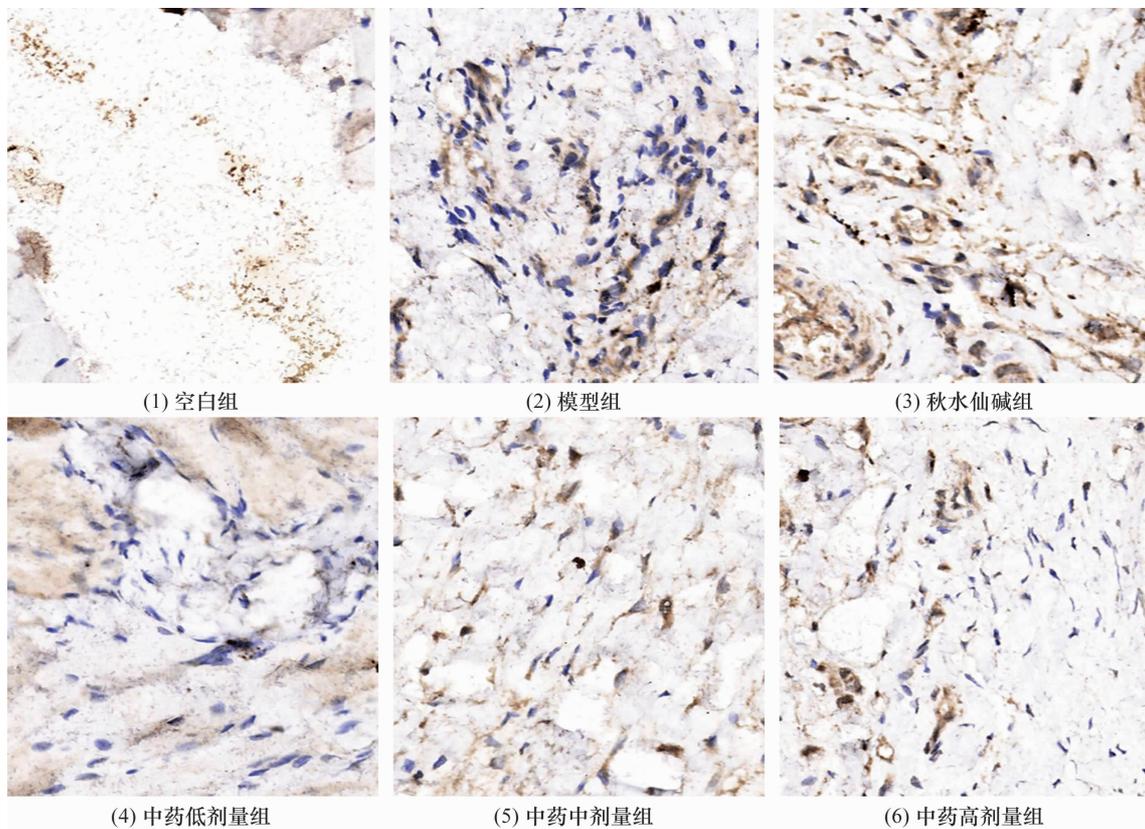
图中蓝紫色细胞为巨噬细胞。

图 3 6 组大鼠踝关节滑膜组织中巨噬细胞免疫组化染色结果($\times 200$)



图中蓝紫色染色区域为 Toll 样受体 2 蛋白。

图 4 6 组大鼠踝关节滑膜组织中 Toll 样受体 2 蛋白免疫组化染色结果 (×200)



图中蓝紫色染色区域为 Toll 样受体 4 蛋白。

图 5 6 组大鼠踝关节滑膜组织中 Toll 样受体 4 蛋白免疫组化染色结果 (×200)

本研究中实时荧光 qPCR、蛋白质印迹及免疫组化结果显示,四妙汤加土茯苓方能够减少 AGA 模型大鼠踝关节滑膜组织中巨噬细胞聚集,下调 TLR/MyD88 信号通路相关基因表达,中药中剂量组作用效果最佳。5 组大鼠踝关节滑膜组织中 MyD88 mRNA 水平的差异无统计学意义,其原因可能与部分滑膜组织保存不当,导致 mRNA 降解有关。

本研究的结果提示,四妙汤加土茯苓方治疗 AGA 的机制可能与其减少巨噬细胞聚集,下调 TLR/MyD88 信号通路相关基因表达,减少炎症因子释放有关,其中中剂量作用效果最佳,作用效果与秋水仙碱相当。

参考文献

- [1] 中国医师协会中西医结合医师分会内分泌与代谢病学专业委员会. 高尿酸血症和痛风病证结合诊疗指南(2021-01-20)[J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 183-189.
- [2] 何玲,丁明桥,雷慧敏,等. 解毒泄浊益肾汤联合苯溴马隆片治疗湿热蕴结型痛风性关节炎疗效及对血 TLR2、TLR4、MyD88 水平的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(19): 2085-2088.
- [3] 沈瑞明,马丽辉,郑颜萍. 木犀草素通过 TLR/MyD88/NF- κ B 通路参与急性痛风性关节炎大鼠的抗炎作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2020, 45(2): 115-122.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006: 1063.
- [5] 冯学轩,刘月姝,饶子亮,等. 急、慢性高尿酸血症模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 74-80.
- [6] 杨婷,林志健,王雨,等. 痛风相关模型研究进展及痛风病建模思考[J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 46-51.
- [7] 郭玉琴,鲁玉辉. 加味宣痹汤对急性痛风性关节炎大鼠 TLR4/MyD88/IRAK4 通路的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1706-1710.
- [8] 张海源,董林,胡星荣,等. 急性痛风性关节炎的中医辨证论治[J]. 中国疗养医学, 2024, 33(4): 65-68.
- [9] 钟宜腾,朱英. 四妙散治疗急性痛风性关节炎的药理、临床及实验研究进展[J]. 世界中医药, 2024, 19(6): 904-909.
- [10] 郭莉阁,季聚良,白清. 四妙散加减方对 AGA 患者 T 细胞亚群和血液流变学及炎症因子的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8): 3023-3029.
- [11] 孙宇洁,付书璠,李慧,等. 近 30 年中医药治疗痛风临床用药规律数据挖掘研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 208-213.
- [12] 吴琴,张亚男,刘艺璇,等. 基于数据挖掘的急性痛风性关节炎中医用药规律研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(7): 25-31.
- [13] 郑乾业,李略,高明利. 基于数据挖掘分析针药结合治疗急性痛风性关节炎的临床规律[J]. 中国处方药, 2024, 22(2): 7-10.
- [14] 王特,张晓宇,张薇,等. 土茯苓防治痛风的作用机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(1): 215-217.
- [15] 杨琦,赵婷,李建洪,等. 清热通络含药血清调控 TLRs/NF- κ B 通路及 NLRP3 炎性体干预急性痛风性关节炎的机制研究[J]. 四川中医, 2023, 41(5): 73-77.
- [16] 段姮妃,段荔,谢招虎,等. 基于 TLRs 及其信号通路探讨清热通络方对大鼠急性痛风性关节炎的作用机制研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(11): 2610-2612.
- [17] 杨军,姚金龙,梁爽,等. 基于 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路介导滑膜细胞焦亡探讨宣痹通络膏对急性痛风性关节炎的作用机制[J]. 中医药导报, 2023, 29(7): 41-45.
- [18] 党荣敏,蒋催蓉,谢洪书,等. 基于 TLR4/NF- κ B 研究苗药黑骨藤对 AGA 大鼠 Th17/Treg 及相关细胞因子的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(18): 4546-4549.
- [19] 刘静,谢克琴,曹跃朋,等. TLRs/MyD88 与痛风性关节炎的相关性研究[J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7(4): 11-15.
- [20] 翟鑫祥,王晶,高建明. 土威除痹汤联合针刺疗法对急性痛风性关节炎的临床效果及对 CRP、IL-1 β 的影响[J]. 四川中医, 2024, 42(4): 179-182.
- [21] 杜明瑞,宋哲,李华燕,等. 加味四妙散对急性痛风性关节炎大鼠 miR-223-3p 与 NLRP3/IL-1 β 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(14): 63-70.

(收稿日期:2024-05-06 本文编辑:李晓乐)

(上接第 8 页)

奚小冰 上海交通大学医学院附属瑞金医院
黄宏兴 广州中医药大学第三附属医院
曹 鹏 海军军医大学第二附属医院
梁 德 广州中医药大学第一附属医院
葛继荣 福建中医药大学
蒋电明 重庆医科大学附属第一医院
韩成钢 宁波大学医学院附属医院

童培建 浙江省中医院
谢兴文 甘肃中医药大学附属医院
詹红生 上海中医药大学附属曙光医院
樊效鸿 成都中医药大学附属医院
穆晓红 北京中医药大学东直门医院

本文已同时授权《中国骨伤》杂志发表, DOI: 10.12200/j. issn. 1003-0034. 20230767。

(收稿日期:2024-07-21 本文编辑:李晓乐)