

本文引文格式: 尤元梅, 袁松, 徐凌. 痛风康对急性痛风性关节炎大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(6): 736-740.

【论著与临床报道】

痛风康对急性痛风性关节炎大鼠的治疗作用及机制研究

尤元梅¹, 袁松², 徐凌¹

1. 皖北卫生职业学院, 安徽 宿州 234000;
2. 安徽省宿州市中医院, 安徽 宿州 234000

摘要: **目的** 通过应用中药组方痛风康对急性痛风性关节炎大鼠进行治疗, 探讨痛风康治疗急性痛风性关节炎的可能机制。 **方法** 将60只雄性健康SD大鼠随机分为6组, 分别为正常组、模型组、吲哚美辛组、痛风康高剂量组、痛风康中剂量组、痛风康低剂量组, 每组10只。痛风康高、中、低剂量组采用痛风康配置的不同浓度中药灌胃, 吲哚美辛组采用吲哚美辛灌胃, 正常组、模型组采用生理盐水灌胃, 连续给药8 d。灌胃5 d后, 除正常组外, 其余各组采用尿酸钠溶液注射大鼠右踝关节腔造模, 诱导急性痛风性关节炎模型。造模前1天检测大鼠体质量, 造模后不同时间检测大鼠体质量、踝关节肿胀度、步态评分。灌胃8 d后, ELISA法检测大鼠血清中细胞间黏附因子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)的含量。 **结果** ①与正常组相比, 造模后其余各组大鼠步态改变, 踝关节肿胀明显, 呈急性炎性红肿, 活动障碍明显; ②与模型组相比, 治疗后痛风康高剂量组、痛风康中剂量组及痛风康低剂量组大鼠踝关节肿胀度减轻($P < 0.05$); 大鼠步态评分下降($P < 0.05$); 血清中ICAM-1、TNF- α 、IL-1 β 含量降低($P < 0.05$)。 **结论** 中药组方痛风康治疗大鼠急性痛风性关节炎具有改善大鼠关节症状, 降低实验室检测指标的作用, 其机制可能与下调TLR4/NF- κ B通路下游的炎症因子有关。

关键词: 痛风康; 吲哚美辛; 痛风性关节炎

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2021)06-0736-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.06.007

Therapeutic effect and mechanism of Tongfengkang on rats with acute gouty arthritis

You Yuanmei¹, Yuan Song², Xu Ling¹

1. North Anhui Health Vocational College, Suzhou 234000, Anhui, China;
2. Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou 234000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the possible mechanism of traditional Chinese medicine (TCM) formula Tongfengkang in the treatment of acute gouty arthritis by treating rats with acute gouty arthritis. **Methods** Sixty healthy male SD rats were randomly divided into 6 groups: the normal group, the model group, the indomethacin group, high-dose Tongfengkang group, medium-dose Tongfengkang group and low-dose Tongfengkang group, with 10 rats in each group. Rats in high-, medium- and low-dose Tongfengkang groups were given intragastrically different concentrations of Chinese medicine made of Tongfengkang. Rats in the indomethacin group were given indomethacin by intragastric administration. The normal group and the model group were given normal saline by intragastric administration. All the rats were given medicine following the above ways for 8 consecutive days. After 5 days of intragastric administration, the solution of sodium urate was injected into the right ankle cavity of rats to induce the model of acute gouty arthritis, except for the normal group. The body mass of rats was measured one day before modeling, and the body mass, ankle swelling and gait scores were determined at different times after modeling. After 8 days of intragastric administration, Elisa was adopted to detect the levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), tumor necrosis factor (TNF- α) and

基金项目: 皖北卫生职业学院校级科学研究重点项目(WZK201903)

第一作者简介: 尤元梅(1989-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 常见病的辨证规律的研究, E-mail: 1145883421@qq.com

interleukin-1 β (IL-1 β) in serum of rats. **Results** ①Compared with those of the normal group, rats in other groups showed significant gait changes, ankle swelling, acute inflammatory redness and activity disorders after modeling. ②Compared with that of the model group, the swelling of ankle joint was relieved in rats of the high-dose Tongfengkang group as well as the medium-dose Tongfengkang group and the low-dose Tongfengkang group after treatment ($P < 0.05$). And there was an decrease in the gait scores of these groups ($P < 0.05$) as well as inserum ICAM-1, TNF- α and IL-1 β of the rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Tongfengkang, a kind of TCM formula, can improve the joint symptoms and reduce the laboratory test indexes in the treatment of rats with acute gouty arthritis. The mechanism may be related to down-regulation of inflammatory factors downstream the TLR4/NF- κ B pathway.

Key words: Tongfengkang; indomethacin; gouty arthritis

痛风性关节炎归属于中医“痹证”、“痛风”范畴。“痛风”之名最早见于梁代陶弘景的《名医别录》“……百节痛风无久新者”。《丹溪心法·痛风》描述痛风的症状为“四肢百骸走痛是也”，还指出“他方谓白虎历节证”。《证治准绳·痛风》认为痛风是由“风湿客于肾经，血脉瘀滞所致”。典型的急性痛风性关节炎的特点是起病急骤，有时甚至呈暴发性，通常第一次突然发作多在夜间，受累关节及其周围软组织明显红肿、发热、压痛及活动受限，局部接触被单等物时疼痛加重，可持续 3~10 d。急性痛风性关节炎发作期绝大多数患者血清尿酸升高，肿胀关节腔内可有积液，抽取关节炎检查，约 95% 以上急性痛风性关节炎滑液中可发现尿酸盐结晶。急性痛风性关节炎临床治疗首要应尽早控制临床症状，西药治疗以抗炎止痛药秋水仙碱及非甾体抗炎药 COX-2 抑制剂(如塞来昔布)或 COX-1 抑制剂(如双氯芬酸等)。但研究表明秋水仙碱胃肠道反应明显有导致胃肠道出血的可能，非甾体类抗炎药(NSAIDs)有心血管毒性的可能，本研究以中医理论为指导，结合现代医学实验方法，复制急性痛风性关节炎大鼠模型，评价大鼠关节症状改善情况，研究中药组方痛风康对急性痛风性关节炎治疗效果，在前期研究基础上探讨痛风康治疗急性痛风性关节炎的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 SD 大鼠 60 只，雄性，体重(200 \pm 20) g，由皖南实验中心提供，合格证号：SCXK(皖)2011-002。

1.2 主要药物与试剂 痛风康方药组成：附子 6 g、续断 10 g、白术 10 g、白芥子 10 g、制南星 10 g、桃仁 10 g、泽兰 20 g、僵蚕 10 g、苦参 6 g、土茯苓 60 g、泽泻 20 g，上述药材由宿州市中医医院提供。吲哚美辛片：25 毫克/片(上海辛帕斯制药有限公司，国药准字 H14020549)。试剂：吐温 80(Sigma 公司，59924)、微晶型尿酸钠(Sigma 公司，SU287501)、大鼠细胞间黏附因子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒(上海信裕生物科技有

限公司)。

1.3 主要仪器设备 足趾容积测量仪、电热恒温箱、酶标仪、显微镜、恒温箱、干燥箱、冰箱、微孔板迷你离心机、搅拌器等。

1.4 实验方法

1.4.1 动物饲养条件 动物饲养于安静、整洁环境下，分笼饲养，室温控制在 25 $^{\circ}$ C，相对湿度 55%~65%，塑料笼内以消毒木屑作垫料，正常饮食，自由饮水。

1.4.2 动物分组 电脑随机数字法分为 6 组：正常组(Normal)、模型组(Model)、吲哚美辛组(Indometacin)、痛风康高剂量组(H-TFG)、痛风康中剂量组(M-TFG)、痛风康低剂量组(L-TFG)。每组 10 只，总计 60 只大鼠。

1.4.3 动物给药 适应性喂养 14 d 后开始给药。依据成人标准体重 70 kg 计算，用体表面积法得出大鼠每日灌胃剂量是成人的 6.25 倍。中药组方痛风康成人每日剂量为 120 g，折算出大鼠每日药物剂量为 10.71 g/kg。设定大鼠高、中、低剂量组用药剂量分别为 21.42 g/kg、10.71 g/kg、5.36 g/kg。吲哚美辛用药剂量为成人每日 75 mg，折算出大鼠每日给药剂量为 6.70 mg/kg。Normal 组：相同体积生理盐水灌胃，每天 1 次，共 8 d；Model 组：相同体积生理盐水灌胃，每天 1 次，共 8 d；Indometacin 组：吲哚美辛混悬液(6.70mg/kg)灌胃，每天 1 次，共 8 d；H-TFG 组：痛风康高浓度溶液(21.42 g/kg)灌胃，每天 1 次，共 8 d；M-TFG 组：痛风康中浓度溶液(10.71 g/kg)灌胃，每天 1 次，共 8 d；L-TFG 组：痛风康低浓度溶液(5.36 g/kg)灌胃，每天 1 次，共 8 d。灌胃 8 d 后，于实验第 5 天灌胃前，除 Normal 组外其余 5 组均造模，第 8 天灌胃后 2 h 取材并处死大鼠。

1.4.4 动物造模 参照文献中 Coderre 方法^[1]制备尿酸钠溶液并进行造模。吐温 80 1 ml，尿酸钠结晶 250 mg，生理盐水 9 ml，混合加热搅拌配制成尿酸钠溶液 10 ml。除正常组外，其余组选择大鼠右踝关节腔，用 4 号注射器注射 0.2 ml 尿酸钠溶液，复制急性

痛风性关节炎大鼠模型。

1.5 动物关节症状评价

1.5.1 关节肿胀指数的测定 测定时间造模前、造模后4 h、24 h、48 h、72 h。测量方法:试验前每鼠右后足踝关节处用记号笔作一清晰横线,分别于造模后4 h、24 h、48 h和72 h用足趾容积测量仪测取每鼠右后足足趾容积^[2],以造模后各时间点足容积—造模前足容积的差值作为关节肿胀度。

1.5.2 步态观察评分^[3] 造模后4 h、24 h、48 h、72 h分别观察大鼠步态:0级为正常步态,评分为1分;1级为足着地减轻,轻度跛行,评分为2分;2级为明显跛行评分为3分;3级为足完全离地,三足步态评分为4分。

1.5.3 大鼠造模后体质量测定 造模后4 h、24 h、48 h、72 h分别测定大鼠体质量。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 观察样品的采集与处理 大鼠末次灌胃72 h后,用10%水合氯醛0.3 ml/100 g剂量腹腔注射麻醉后,经腹主动脉采血,每只大鼠取5 ml血置于玻璃离心管,2500 r/min离心5 min,收集上层血清约1 ml。

1.6.2 观察指标及方法 血清中ICAM-1、TNF- α 、IL-1 β 采用酶联免疫吸附分析(ELISA),严格按照说明书进行含量检测^[4]。

1.7 统计学方法 运用SPSS 22.0对数据进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较时方差齐性采用LSD- t 检验,两两比较时方差不齐采用Dunnett's T3检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 痛风康对痛风性关节炎大鼠体质量的影响 各组在造模前24 h,造模后24 h、48 h及72 h的体质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠体质量比较

单位:g

组别	<i>n</i>	剂量/(g·kg ⁻¹)	造模前24 h	造模后24 h	造模后48 h	造模后72 h
Normal组	10	—	203.45±12.89	204.23±16.20	206.61±15.93	214.83±13.80
Model组	10	—	204.10±13.52	203.85±17.21	206.32±17.47	201.63±17.69
Indometacin组	10	0.0067	205.18±15.56	204.68±14.53	204.12±11.48	203.41±15.90
H-TFG组	10	21.42	204.74±11.92	204.15±14.22	204.34±14.37	205.84±18.12
M-TFG组	10	10.71	204.93±18.80	209.24±17.42	203.30±17.28	204.72±12.57
L-TFG组	10	5.36	202.32±12.23	207.65±15.75	204.85±16.54	207.41±18.45
<i>F</i>			0.070	0.190	0.069	0.810
<i>P</i>			0.996	0.965	0.997	0.548

注:表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

2.2 痛风康对痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度的影响 大鼠右踝关节一次性注射尿酸钠溶液后,大鼠内踝的胫跗关节均出现不同程度的关节肿胀、行走迟缓、足爪卷曲,肢体不愿着力负重,个别动物后肢过度俯屈甚至跛行,局部解剖发现尿酸盐结晶沉着于踝关节腔内,光镜下可见明显的关节炎病理改变,示造模成功。

除正常组外,大鼠踝关节肿胀度在造模后4 h开始上升,Model组与Normal组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Indometacin组、H-TFG组、M-TFG组同Model组比较,在用药24~72 h,大鼠踝关节肿胀度明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠造模后关节肿胀度比较

单位:ml

组别	<i>n</i>	剂量/(g·kg ⁻¹)	4 h	24 h	48 h	72 h
Normal组	10	—	0.05±0.05	0.05±0.04	0.06±0.02	0.06±0.04
Model组	10	—	0.48±0.06 ^a	0.55±0.12 ^a	0.52±0.10 ^a	0.44±0.08 ^a
Indometacin组	10	0.0067	0.32±0.04 ^b	0.38±0.06 ^b	0.32±0.04 ^b	0.16±0.03 ^b
H-TFG组	10	21.42	0.33±0.11 ^b	0.39±0.03 ^b	0.32±0.09 ^b	0.17±0.05 ^b
M-TFG组	10	10.71	0.36±0.03 ^b	0.40±0.10 ^b	0.33±0.02 ^b	0.20±0.06 ^b
L-TFG组	10	5.36	0.38±0.09 ^b	0.42±0.07 ^b	0.32±0.03 ^b	0.23±0.02 ^b
<i>F</i>			44.210	46.208	46.010	55.066
<i>P</i>			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与Normal组比较,a: $P < 0.05$;与Model组比较,b: $P < 0.05$ 。

2.3 痛风康对大鼠步态的影响 与 Normal 组比较, 4~24 h Model 组大鼠步态评分明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明造模成功。与 Model 组比

较, Indometacin 组、H-TFG 组、M-TFG 组、L-TFG 组在用药 24~72 h 大鼠步态评分明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠步态评分比较

单位:分

组别	n	剂量/(g·kg ⁻¹)	4 h	24 h	48 h	72 h
Normal 组	10	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.20	1.01±0.12
Model 组	10	—	3.35±0.45 ^a	3.55±0.65 ^a	3.46±0.45 ^a	3.15±0.52 ^a
Indometacin 组	10	0.0067	3.33±0.51 ^b	2.95±0.49 ^b	2.85±0.59 ^b	2.62±0.28 ^b
H-TFG 组	10	21.42	3.18±0.55 ^b	3.16±0.66 ^b	2.97±0.38 ^b	2.58±0.57 ^b
M-TFG 组	10	10.71	3.45±0.65 ^b	3.15±0.55 ^b	3.08±0.53 ^b	2.65±0.62 ^b
L-TFG 组	10	5.36	3.26±0.45 ^b	3.25±0.55 ^b	3.09±0.32 ^b	2.75±0.65 ^b
F			38.676	29.686	43.229	21.531
P			<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与 Normal 组比较, a: $P < 0.05$; 与 Model 组比较, b: $P < 0.05$ 。

2.4 痛风康对大鼠炎症因子 TNF- α 、IL- β 、ICAM-1 的影响 与 Normal 组比较, Model 组大鼠血清的 TNF- α 、IL- β 、ICAM-1 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Normal 组比较, Indometacin 组、H-TFG 组、M-TFG 组、L-TFG 组的 TNF- α 、IL- β 、ICAM-1 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠血清中 TNF- α 、IL- β 、ICAM-1 水平比较

组别	n	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF- α /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL- β /(ng·L ⁻¹)	ICAM-1/(pg·ml ⁻¹)
Normal 组	10	—	0.96±0.11	11.55±1.73	522.50±14.38
Model 组	10	—	2.10±0.41 ^a	20.42±2.85 ^a	649.50±11.14 ^a
Indometacin 组	10	0.0067	1.04±0.25 ^b	10.34±1.44 ^b	610.50±10.71 ^b
H-TFG 组	10	21.42	1.08±0.03 ^b	11.56±1.46 ^b	620.43±12.83 ^b
M-TFG 组	10	10.71	1.17±0.20 ^b	15.87±2.54 ^b	631.50±10.04 ^b
L-TFG 组	10	5.36	1.07±0.07 ^b	17.64±1.89 ^b	630.50±12.10 ^b
F			38.829	37.766	142.745
P			<0.001	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与 Normal 组比较, a: $P < 0.05$; 与 Model 组比较, b: $P < 0.05$ 。

3 讨论

急性痛风性关节炎是由于单钠尿酸盐(MSU)晶体沉积导致的急性关节及周围组织炎症^[5]。TLR/NF- κ B 通路是参与调节机体炎症、坏死及凋亡等的重要信号通路, 同时参与调节体内重要细胞因子、炎症因子、黏附分子等的表达^[6]。本实验前期在从“TLR/NF- κ B”信号通路中下游的关键信号分子及信号通路的部分效应产物着手, 通过痛风康对急性痛风性关节炎大鼠关节滑膜组织 TLR4mRNA、MyD88mRNA、TRAF6mRNA、NF- κ Bp65 指标的观察及痛风康对大鼠关节滑膜组织病理变化的影响, 探究痛风康治疗急

性痛风性关节炎的具体作用机制, 实验结果显示痛风康可改善尿酸钠结晶致急性痛风性关节炎模型大鼠的滑膜组织病理变化。下调急性痛风性关节炎模型大鼠关节滑膜组织中 TLR4mRNA、MyD88mRNA、TRAF-6mRNA、NF- κ Bp65 的表达, 对 TLR4/NF- κ B 通路的干预, 可能是痛风康治疗急性痛风性关节炎的作用机制之一。本次实验在前期研究的基础上通过对大鼠体质量、大鼠踝关节肿胀度、大鼠步态评分及大鼠血清中 ICAM-1、TNF- α 、IL-1 β 指标的分析, 进一步探究痛风康治疗急性痛风性关节炎的作用机制。ICAM-1 可介导细胞与细胞外基质间, 以及细胞与细胞间相互粘连的一种跨膜糖蛋白, 可促进白细胞聚集、黏附和浸润, 促进淋巴细胞活化, 介导免疫炎症反应, ICAM-1 的持续表达可引起关节、组织器官的损伤^[7-8]。TNF- α 在关节炎众多炎性细胞因子中表现最为活跃, 可激活内皮细胞、促进白细胞聚集、活化破骨细胞, 导致炎症发生及滑膜与骨的破坏^[9], 并可诱导 IL-1 β 、IL-6 等细胞因子的产生, 作用于血管内皮细胞, 导致细胞出血、坏死^[10]。IL-1 β 是 IL-1 家族中有促炎作用的成员之一, 可抑制骨和软骨的修复, IL-1 β 是痛风急性发作的关键细胞因子^[11], 可促进中性粒细胞、吞噬细胞在炎症部位募集, 引起红、肿、热、痛等关节炎表现, 同时释放的炎性物质可刺激吞噬细胞产生更多 IL-1 β , 使炎症反应加剧^[3]。本研究发现, Model 组大鼠血清中 ICAM-1、TNF- α 、IL-1 β 显著升高, H-TFG 组能显著降低血清中 ICAM-1、TNF- α 、IL-1 β 的水平。表明痛风康能够抑制 TLR4/NF- κ B 通路下游的炎症因子。痛风康对大鼠踝关节肿胀度、步态评分有抑制作用, 同时对大鼠体质量并未有明显影响。今后, 仍需继续深入研究痛风康治疗痛风性关节炎的作用机制, 以为临床治疗痛风性关节炎提供实验依据。

参考文献:

- [1] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: An alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. Pain, 1987, 28(3): 379-393.
- [2] 曹世霞, 祝捷, 张三印, 等. 秦皮总香豆素对急性痛风性关节炎大鼠模型 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 的影响[J]. 四川中医, 2011, 29(3): 68-70.
- [3] 李扬, 任开明, 蔡克银, 等. 威柏膏外敷治疗大鼠急性痛风性关节炎的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(7): 1587-1589, 1706.
- [4] 韩彬, 胡旭光, 李钟, 等. 乐行痛风克不同配伍组方抗实验性痛风作用的比较研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2011, 21(1): 9-11.
- [5] Dai XJ, Tao JH, Fang X, et al. Changes of Treg/Th17 Ratio in Spleen of Acute Gouty Arthritis Rat Induced by MSU Crystals[J]. Inflammation, 2018, 41(5): 1955-1964.
- [6] 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.
- [7] 陆梅娟, 莫亚莉. 抑郁症患者血清 TNF- α 、IL-8、ICAM-1、NF- κ B 水平及其意义[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(32): 117-120.
- [8] 李荣华. 痛风康对急性痛风性关节炎的抗炎作用及对 TLRs/MyD88 通路的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [9] 张瑞. 电针对 CIA 模型大鼠 TNF- α 、IL-1 β 和 ICAM-1 影响的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [10] 邱兆磊, 王振杰, 程峰, 等. microRNA-155 对重症急性胰腺炎大鼠急性肺损伤作用的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(2): 151-154.
- [11] 王璐, 那莎, 陈光亮. 萆薢总皂苷对大鼠急性痛风性关节炎 NALP3 炎性体信号通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(3): 354-360.

收稿日期: 2021-09-20; 修回日期: 2021-10-14

【读者·作者·编者】

本刊对稿件图表格式的要求

本刊对来稿中的图表一律以其在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图表应冠以中文图(表)题。说明性资料应以中文格式置于图(表)下方注释中。

1. 表格: 采用三横线表(顶线、表头线、底线格式), 应使表中每一列数据的单位相同, 统计值结果(如 t 值、 P 值等)保留小数点后三位, 百分率、均数、标准差等保留小数点后两位。

2. 图片: 图片要求有良好的清晰度和对比度, 并注明图号及图的上下方向, 大体标本图片务必在图内有尺度标记, 病理图请注明染色方法和放大倍数, 以图形文件格式(.jpg)插入到正文中。

《右江民族医学院学报》编辑部