

# 苗药痛风汤方剂对痛风性关节炎大鼠炎症反应及 NALP3 炎性体信号的影响\*

樊丰夷 蓝天座 于黔 吴欣 杨旻 杨静

(贵阳市第一人民医院肾内科, 贵州 贵阳 550000)

**【摘要】** 目的 探讨苗药痛风汤方剂对痛风性关节炎(GA)大鼠炎症反应及 NALP3 炎性体信号的影响。方法 40 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,即空白组、模型组、双氯芬酸钠肠溶片组、苗药痛风汤方剂低、高剂量组,每组 8 只。采用踝关节腔内一次性注射尿酸钠构建急性 GA 大鼠模型,造模成功后,空白组、模型组给予生理盐水,双氯芬酸钠肠溶片组及苗药痛风汤方剂低、高剂量组分别按相应剂量给予双氯芬酸钠肠溶片及苗药痛风汤方剂连续灌胃 5 d,处死大鼠,取膝关节滑膜组织。采用 HE 染色观察滑膜组织病理变化;ELISA 检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、 $\beta$ -gal、NAG、SOD、MDA 水平;qRT-PCR 检测滑膜组织 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达;Western Blot 检测滑膜组织 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达。结果 与空白组相比,模型组滑膜组织衬里下层大量炎性细胞浸润,关节肿胀指数明显增加,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、 $\beta$ -gal、NAG、MDA、NALP3、Caspase-1、ASC、pro-IL-1 $\beta$  水平明显升高,SOD 水平明显降低(均  $P < 0.05$ );与模型组比较,苗药痛风汤方剂高剂量组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、 $\beta$ -gal、NAG、MDA、NALP3、Caspase-1、ASC、pro-IL-1 $\beta$  水平明显降低,SOD 水平明显升高(均  $P < 0.05$ )。结论 苗药痛风汤方剂可减轻 GA 大鼠组织炎症程度,下调 NALP3 及炎性细胞因子的表达,可能有抑制急性痛风性关节炎发作的重要作用。

**【关键词】** 痛风性关节炎;苗药痛风汤方剂;双氯芬酸钠肠溶片;NALP3

**【中图分类号】** R285.5;R589.7 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.03.011

## Effect of Miao medicine gout decoction on inflammatory reaction and NALP3 in inflammasome pathway of rats with arthritis

FAN Fengyi, LAN Tianzuo, YU Qian, WU Xing, YANG Yang, YANG Jing

(Department of Nephrology, Guiyang First People's Hospital, Guiyang 550002, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of Miao medicine gout decoction on inflammatory reaction and NALP3 inflammasome pathway of gouty arthritis. **Methods** A total of 40 healthy SD rats were randomly divided into control group, model group, diclofenac sodium enteric-coated tablet group, low-dose and high-dose Miao Yao gout decoction group. The rat model of acute gouty arthritis was successfully established via a one-time injection of sodium urate into ankle joint cavity. After successful modeling, the rats in the control group and model group were given physiological salt water, diclofenac sodium enteric-coated tablets group and low-dose and high-dose Miao medicine gout decoction groups respectively according to the corresponding dose for 5 days. The rats were killed, and the synovium of knee joint was taken. The pathological changes of synovial tissue were observed by HE staining, the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8,  $\beta$ -gal, NAG, SOD and MDA were detected by ELISA, and the expression of NALP3, Caspase-1 and ASC mRNA in synovial tissue was detected by qRT-PCR. Western Blotting was used to detect the expression of NALP3, Caspase-1 and pro-IL-1 $\beta$  protein in synovial tissue. **Results** Compared with the control group, a large number of inflammatory cells infiltrated the lower layer of synovial tissue, and the joint swelling index increased significantly in the model group, and the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8,  $\beta$ -gal, NAG, MDA, NALP3, Caspase-1, ASC and pro-IL-1 $\beta$  increased significantly,

基金项目:贵阳市科技计划项目(2019-9-8)

通信作者:蓝天座, E-mail: sisi555yf@163.com

引用本文:樊丰夷,蓝天座,于黔,等.苗药痛风汤方剂对痛风性关节炎大鼠炎症反应及 NALP3 炎性体信号的影响[J].西部医学,2022,34(3):375-380,385. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.03.011

while the level of SOD decreased significantly in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8,  $\beta$ -gal, NAG, MDA, NALP3, Caspase-1, ASC and pro-IL-1 $\beta$  in the high dose group of Miao medicine gout decoction decreased significantly, while the level of SOD increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Miao medicine gout decoction can reduce the degree of inflammation with gout rat model, and down-regulate the expression of NALP3 and inflammatory factors, which may play an important role in inhibiting the attack of acute gouty arthritis.

**【Key words】** Gouty arthritis; Miao medicine gout decoction; Diclofenac sodium enteric-coated tablets; NALP3

痛风性关节炎(Gouty arthritis, GA)是由于尿酸沉积在关节囊韧带、滑膜、软骨、硬化素等关节组织中而引起的一种急性风湿性病变。血液中尿酸浓度高是由于嘌呤代谢紊乱所致<sup>[1]</sup>。流行病学研究表明,饮料,特别是啤酒以及含有大量红肉、贝类和脂肪的饮食是 GA 发作的主要原因<sup>[2-3]</sup>。近年来,GA 在世界范围内的发病率呈上升趋势<sup>[4]</sup>。在 GA 的发生发展过程中,NALP3 在淀粉体中起着重要作用,NALP3 炎性小体主要表达于中性粒细胞、单核巨噬细胞等初级免疫细胞,这些细胞主要位于皮肤、关节、眼睛、耳朵和胃肠上皮的内表面,一旦 NALP3 炎性体被激活,可加剧炎症反应<sup>[5]</sup>。痛风在中医称历节病、浊瘀痹,中药在治疗痛风方面已取得较好效果,不仅可清热止痛且有降低血尿酸的作用。贵州是一个多民族的省份,其中苗药资源丰富,苗族人民长期用来治疗风湿病,其中苗药千里光(窝与那)、车前草(窝乃八降)、马鞭草(加洛根)、黑骨藤(蚌莽塞)等具有清热、活血、止痛等作用<sup>[6]</sup>。因此,本研究选取苗药痛风汤方剂观察其对 GA 抗氧化能力、炎症因子及 NALP3 炎性体的影响,为其治疗 GA 提供理论依据,也为中药在 GA 的应用提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 40 只,体重 220~260 g,由贵州医科大学动物中心提供,造模前于动物房适应性喂养 7 d。实验动物符合动物伦理要求,并经医院伦理委员会审核同意。

1.1.2 主要试剂及设备 中药方剂苗药痛风汤方剂(黑骨藤、土茯苓、萆薢、鸡血藤、千里光)购自贵州中医药大学第二附属医院,双氯芬酸钠肠溶片购自贵州医科大学附属第一医院,规格:25 mg/片,生产厂家:北京诺华制药有限公司。尿酸钠晶体(MSU,美国 Sigma-Aldrich)、ELISA 试剂盒(上海茁彩)、RNA 提取试剂盒(Invitgen,美国)、实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒(南京建成)、BCA 蛋白定量试剂盒(上海汉恒生物)、NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  一抗(英国 Abcam)、过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(上海晶天生物)、TB718 生物组织包埋机(湖北泰维电子有限公

司)、酶标仪(美国 Thermo 公司)、凝胶成像仪(美国 Bio-Rad)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 药物换算 按大鼠与人之间用药剂量换算,公式:S 大鼠的给药剂量(mg/kg) = W(折算系数) × 人的给药剂量(mg/kg),W 约为 6.25。按双氯芬酸钠肠溶片人的使用量为 1 mg/kg,则 SD 大鼠需给药 6.25 mg/kg;依此类推:黑骨藤 1.8 g/kg,土茯苓 5.4 g/kg,萆薢 2.8 g/kg,鸡血藤 2.8 g/kg,千里光 1.8 g/kg。则大鼠剂量 × 2/3 为低剂量,即:黑骨藤 1.2 g/kg,土茯苓 3.6 g/kg,萆薢 1.8 g/kg,鸡血藤 1.8 g/kg,千里光 1.2 g/kg。高剂量药物组为低剂量的两倍。双氯芬酸钠肠溶片磨成粉末后使用蒸馏水配成 0.5 mg/mL。低剂量药物组称取黑骨藤 2.4 g、土茯苓 7.2 g、萆薢 3.6 g、鸡血藤 3.6 g、千里光 2.4 g 混合后由贵阳医学院附属医院中药房使用蒸馏水电子煎药制成汤剂,最终浓度为黑骨藤 0.08 g/mL、土茯苓 0.24 g/mL、萆薢 0.12 g/mL、鸡血藤 0.12 g/mL、千里光 0.08 g/mL。高剂量药物组最终浓度为低剂量药物组的两倍。

1.2.2 GA 大鼠模型建立及给药 将 40 只大鼠随机分成空白组、模型组、双氯芬酸钠肠溶片组、苗药痛风汤方剂低剂量组、苗药痛风汤方剂高剂量组,每组 8 只。采用踝关节腔内一次性注射 200  $\mu$ L 尿酸钠溶液(2.5 g/100mL),成功建立急性 GA 大鼠模型<sup>[7]</sup>。造模成功后,空白组和模型组给予 3 mL 生理盐水,双氯芬酸钠肠溶片组、苗药痛风汤方剂组按相应剂量给予双氯芬酸钠和苗药痛风汤方剂连续灌胃 5 d,每天 2 次。第 3 天灌胃 2 h 后,各组均给予戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔麻醉,除空白组外,各组大鼠以右踝关节外侧后方为穿刺点,将右踝关节弯曲,局部消毒,针口斜面朝上与胫骨成 45°夹角关节腔内注射 MSU 混悬液(20 mg/mL)50  $\mu$ L/只,空白组相应关节注射等量生理盐水,以对侧鼓起为注入标准,继续灌胃 2 d。

1.2.3 关节肿胀指数 分别于造模前 1 h、造模后 8 h、处死前 1 h 采用缚线法于大鼠受试关节同一部位测量周径(取平均值),并计算各阶段肿胀指数。肿胀指数 = [测量时间点关节周径 - 初始周径(即造模前 1 h

测得关节周径]/初始周径。

1.2.4 样本采集 给药结束后,腹主动脉取血,以 3500 r/min 离心 15 min,收集血清。采用颈椎脱臼法处死各组大鼠,取滑膜组织分成两份,一份于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,另一份 4% 多聚甲醛固定,经脱水,石蜡包埋,制成石蜡切片,待测。

1.2.5 大鼠滑膜组织病理学观察 固定的滑膜组织经全自动脱水机脱水,包埋,切片,放入苏木精中染色约 10 min,自来水冲洗使切片颜色变蓝,1% 盐酸酒精分化数秒钟,使细胞核呈紫蓝色,1% 氨水中数秒,至返蓝,1% 伊红染色 3 min 左右,脱水,透明,中性树脂封存,镜检观察组织病理变化。炎症浸润评分:0 分为无炎症细胞浸润;1 分为 20 个炎症细胞浸润(每高倍视野);2 分为 20~50 个炎症细胞浸润(每高倍视野);3 分为 >50 个炎症细胞浸润(每高倍视野)。

1.2.6 ELISA 检测血清因子炎细胞因子的表达 按照 ELISA 试剂盒说明操作,检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8 表达水平及血清中  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)、 $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)、SOD、MDA 活性。

1.2.7 qRT-PCR 检测滑膜组织 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达 采用 RNA 提取试剂盒提取滑膜组织总 RNA,测定 A260 和 A280 吸光度值,电泳确定 RNA 的完整性后,依据 mRNA 反转录试剂盒说明,合成 cDNA,采用 SYBR Green I real-time PCR 的方法检测 mRNA 的相对表达量,GAPDH 作为内参。PCR 循环条件为  $95^{\circ}\text{C}$  30 s; $95^{\circ}\text{C}$  5 s; $60^{\circ}\text{C}$  30 s;40 个循环。记录 CT 值,并采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法分析滑膜组织 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 相对表达水平。

1.2.8 Western blot 检测 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达 用 RIPA 裂解液从滑膜组织中提取总蛋白,以 BCA 法进行蛋白质定量,并用蛋白上样缓冲液(5 $\times$ )变性样品,样品于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。使用等量蛋白质上样,选择 10% 的 SDS-PAGE 进行分离,分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,封闭结束后按照实验目的结合一抗 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$ 、 $\beta$ -actin(均按 1:500 稀释) $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,TBST 清洗,加入二抗室温孵育 1 h,TBST 清洗,ECL 暗室显色。显色后的蛋白使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像,Image-ProPlus 分析光密度,以  $\beta$ -actin 为内参,计算各组蛋白质的相对表达量,实验重复 3 次。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件分析,试验数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,数据统计采用单因素方差分析, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及关节肿胀指数比较 造模前大鼠活跃好动,反应灵敏。造模后大鼠活动减少,后肢弯曲,轻触或抬高地面,关节局部红肿程度严重。双氯芬酸钠肠溶片组大鼠活动减少,关节局部有红肿。苗药痛风汤方剂低、高剂量组大鼠活动减少,局部红肿减轻。关节肿胀指数结果显示,造模前 1 h,大鼠关节肿胀指数均无变化,造模后 8 h 和处死前 1 h,模型组大鼠关节肿胀指数明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,双氯芬酸钠肠溶片组、苗药痛风汤方剂低、高剂量组大鼠关节肿胀指数均明显降低( $P<0.05$ );与双氯芬酸钠肠溶片组比较,苗药痛风汤方剂高剂量组大鼠关节肿胀指数明显降低( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠踝关节肿胀指数在不同时期的比较[( $\bar{x}\pm s$ ), $n=8$ ]

Table 1 Comparison of the ankle joint swelling index in each group of rats with different periods

组别	造模前 1 h	造模后 8 h	处死前 1 h
空白组	0.000 $\pm$ 0.000	0.022 $\pm$ 0.001	0.033 $\pm$ 0.002
模型组	0.000 $\pm$ 0.000	0.244 $\pm$ 0.002 <sup>①</sup>	0.228 $\pm$ 0.001 <sup>①</sup>
双氯芬酸钠肠溶片组	0.000 $\pm$ 0.000	0.238 $\pm$ 0.001 <sup>①②</sup>	0.188 $\pm$ 0.001 <sup>①②</sup>
苗药痛风汤方剂低剂量组	0.000 $\pm$ 0.000	0.236 $\pm$ 0.001 <sup>①②</sup>	0.187 $\pm$ 0.001 <sup>①②</sup>
苗药痛风汤方剂高剂量组	0.000 $\pm$ 0.000	0.196 $\pm$ 0.001 <sup>①②③</sup>	0.181 $\pm$ 0.001 <sup>①②③</sup>
F		16736.208	14959.500
P		<0.001	<0.001

注:与空白组比较,① $P<0.05$ ;与模型组比较,② $P<0.05$ ;与双氯芬酸钠肠溶片组比较,③ $P<0.05$

2.2 各组大鼠滑膜组织病理变化 空白组大鼠滑膜结构清晰完整未见明显病理改变。模型组大鼠滑膜组织衬里下层大量炎性细胞浸润,见大量淋巴细胞聚集成团,并有大量纤维组织增生,成纤维细胞核呈椭圆形。双氯芬酸钠肠溶片组大鼠滑膜组织衬里下层较多炎性细胞浸润,以淋巴细胞和巨噬细胞为主,并有较多纤维组织增生。苗药痛风汤方剂低剂量组大鼠滑膜组织衬里下层少量炎性细胞浸润,包括淋巴细

胞和少量巨噬细胞,纤维组织增生不明显。苗药痛风汤方剂高剂量组大鼠滑膜组织衬里层增生,衬里层多由 3 层及以上滑膜细胞组成,并伴有较多炎性细胞,以淋巴细胞为主,衬里下层未见明显病理改变。炎症评分结果显示,与空白组比较,模型组大鼠炎症评分明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,双氯芬酸钠肠溶片组、苗药痛风汤方剂低、高剂量组炎症评分均明显降低( $P<0.05$ ),见图 1。

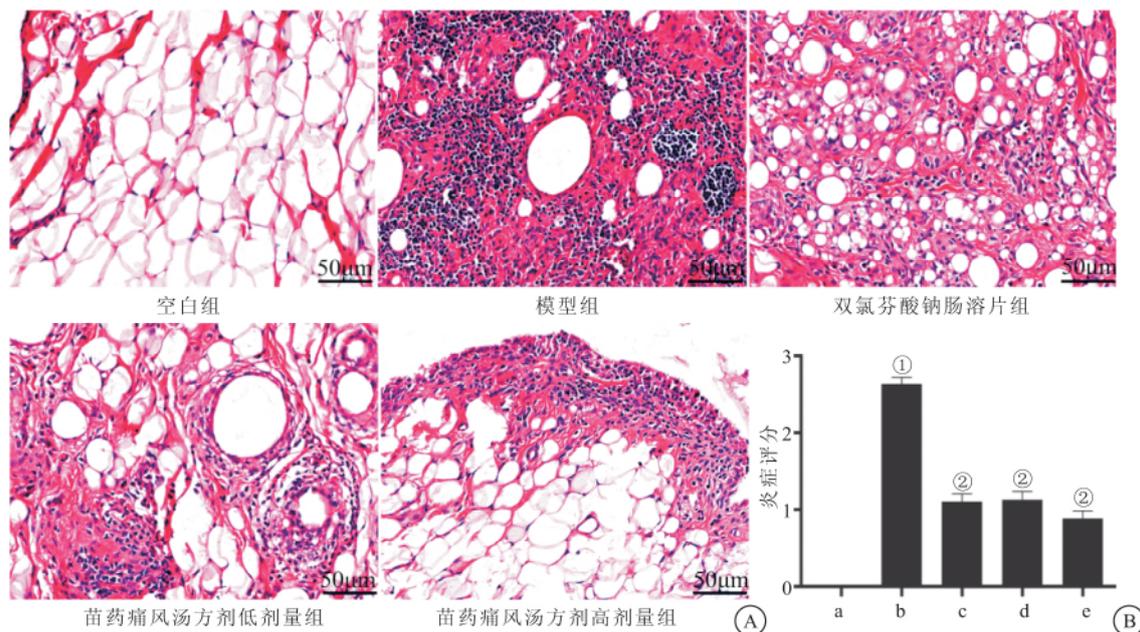


图 1 各组大鼠滑膜组织病理变化(HE, 400×)

Figure 1 Pathological changes of synovial tissue of rats in each group

注:A. 各组滑膜组织病理变化;B. 各组炎症评分。a. 空白组;b. 模型组;c. 双氯芬酸钠肠溶片组;d. 苗药痛风汤方剂低剂量组;e. 苗药痛风汤方剂高剂量组。与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.3 各组大鼠血清  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$  水平 与空白组相比,模型组  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$  水平均明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,仅苗药痛风汤方剂高剂

量组  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$  水平均明显降低( $P < 0.05$ );与双氯芬酸钠肠溶片组比较,苗药痛风汤方剂高剂量组  $TNF-\alpha$ 、 $IL-8$  水平明显降低( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 大鼠血清中  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$  水平比较[ $(\bar{x} \pm s)$ ,  $n=8$ ]

Table 2 The expression of  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-8$  in serum of rats

组别	$TNF-\alpha$ (pg/mg)	$IL-1\beta$ (pg/mL)	$IL-8$ (pg/mg)
空白组	48.64 ± 2.86	3.91 ± 0.38	21.08 ± 1.24
模型组	56.35 ± 3.06 <sup>①</sup>	4.79 ± 0.32 <sup>①</sup>	30.50 ± 0.77 <sup>①</sup>
双氯芬酸钠肠溶片组	54.87 ± 1.50 <sup>①</sup>	4.53 ± 0.38 <sup>①</sup>	28.44 ± 2.28 <sup>①</sup>
苗药痛风汤方剂低剂量组	51.30 ± 1.94 <sup>②③</sup>	4.23 ± 0.20 <sup>②</sup>	26.99 ± 3.39 <sup>①</sup>
苗药痛风汤方剂高剂量组	49.28 ± 3.21 <sup>②③</sup>	4.08 ± 0.22 <sup>②</sup>	23.95 ± 3.08 <sup>②③</sup>
F	4.505	3.128	6.603
P	0.015	0.049	0.004

注:与空白组比较,① $P < 0.05$ ,与模型组比较,② $P < 0.05$ ,与双氯芬酸钠肠溶片组比较,③ $P < 0.05$

2.4 各组大鼠血清中  $\beta$ -gal、NAG、SOD、MDA 水平 与空白组相比,模型组  $\beta$ -gal、NAG、MDA 水平明显升高,SOD 水平明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,苗药痛风汤方剂高剂量组  $\beta$ -gal、NAG、MDA 水平均

明显降低,SOD 水平明显升高( $P < 0.05$ );与双氯芬酸钠肠溶片组比较,苗药痛风汤方剂高剂量组  $\beta$ -gal、NAG 水平均明显降低,SOD 水平明显升高( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 各组大鼠血清中  $\beta$ -gal、NAG、SOD、MDA 水平比较[ $(\bar{x} \pm s)$ ,  $n=8$ ]

Table 3 The expression of  $\beta$ -gal, NAG, SOD, MDA in serum of rats

组别	$\beta$ -gal(U/mL)	NAG(U/mL)	SOD(ng/mL)	MDA(nmol/mL)
空白组	3.75 ± 0.40	2.94 ± 0.30	28.66 ± 1.47	0.38 ± 0.02
模型组	4.78 ± 0.38 <sup>①</sup>	4.17 ± 0.23 <sup>①</sup>	23.56 ± 1.32 <sup>①</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>①</sup>
双氯芬酸钠肠溶片组	4.69 ± 0.24 <sup>①</sup>	3.56 ± 0.29 <sup>②③</sup>	24.39 ± 1.53 <sup>①</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>①</sup>
苗药痛风汤方剂低剂量组	4.27 ± 0.41	3.45 ± 0.36 <sup>①②</sup>	26.11 ± 1.43	0.43 ± 0.02
苗药痛风汤方剂高剂量组	4.08 ± 0.29 <sup>②③</sup>	3.05 ± 0.43 <sup>②③</sup>	27.55 ± 1.95 <sup>②③</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>②</sup>
F	3.753	5.953	4.714	3.600
P	0.028	0.005	0.013	0.032

注:与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与双氯芬酸钠肠溶片组比较,③ $P < 0.05$

2.5 各组大鼠滑膜组织中 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达 与空白组比较,模型组大鼠滑膜组织中 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,苗药痛风汤方剂高剂量组 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达均明显降低

( $P < 0.05$ );与双氯芬酸钠肠溶片组比较,苗药痛风汤方剂高剂量组 NALP3、Caspase-1 mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ ),ASC mRNA 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 4。

表 4 滑膜组织中 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达 $[(\bar{x} \pm s), n=8]$   
Table 4 The expression of NALP3, Caspase-1, ASC mRNA in synovial tissue

组别	NALP3	Caspase-1	ASC
空白组	1.01±0.14	1.00±0.08	1.01±0.14
模型组	1.76±0.07 <sup>①</sup>	1.65±0.06 <sup>①</sup>	1.61±0.12 <sup>①</sup>
双氯芬酸钠肠溶片组	1.56±0.09 <sup>①</sup>	1.41±0.19 <sup>①</sup>	1.29±0.06 <sup>①②</sup>
苗药痛风汤方剂低剂量组	1.49±0.12 <sup>①②</sup>	1.48±0.10 <sup>①</sup>	1.24±0.25 <sup>②</sup>
苗药痛风汤方剂高剂量组	1.38±0.11 <sup>①②③</sup>	1.27±0.17 <sup>①②③</sup>	1.14±0.18 <sup>②</sup>
F	17.481	10.442	4.940
P	<0.001	<0.001	0.007

注:与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与双氯芬酸钠肠溶片组比较,③ $P < 0.05$

2.6 各组大鼠滑膜组织中 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达 与空白组比较,模型组大鼠滑膜组织中 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,苗药痛风汤方剂低剂量

和高剂量组 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达均明显降低( $P < 0.05$ );与双氯芬酸钠肠溶片组比较,苗药痛风汤方剂高剂量组 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),见图 2。

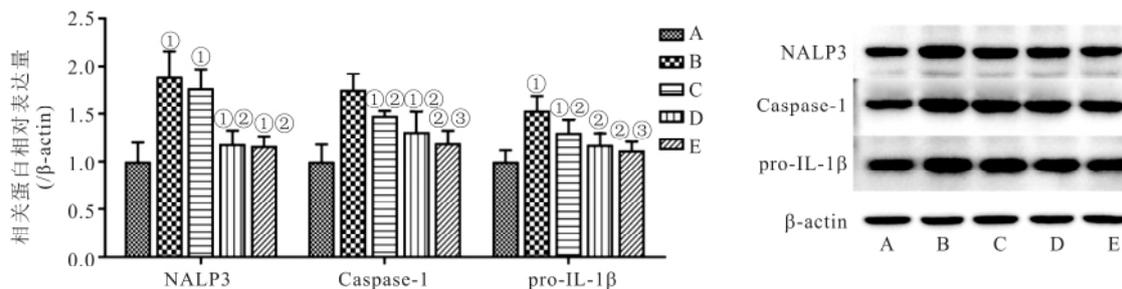


图 2 滑膜组织中 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达

Figure 2 The protein expression of NALP3, Caspase-1, pro-IL-1 $\beta$  in synovial tissue

注:A. 空白组;B. 模型组;C. 双氯芬酸钠肠溶片组;D. 苗药痛风汤方剂低剂量组;E. 苗药痛风汤方剂高剂量组。与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$ ;与双氯芬酸钠肠溶片组比较,③ $P < 0.05$

### 3 讨论

GA 是一种常见的关节炎,在一定程度上受到饮食变化和年龄的影响。其主要临床特征是尿酸盐结晶沉积和高尿酸血症。严重时也可能出现尿路结石、关节功能障碍和肾功能衰竭等并发症<sup>[8]</sup>。高水平的尿酸有助于尿酸钠(MSU)在关节和其他组织中的沉积,MSU 沉积在关节腔会激活炎症细胞因子,诱导巨噬细胞和中性粒细胞聚集,从而导致 GA 发生<sup>[9]</sup>。因此,本研究采用 MSU 诱导 GA 大鼠,结果发现 MSU 诱导的 GA 大鼠活动减少,后肢弯曲,关节局部红肿程度严重,踝关节肿胀指数明显高于空白组。其次,本研究从组织病理学角度观察大鼠滑膜组织病理变化,发现 GA 大鼠滑膜组织衬里下层大量炎症细胞浸润,见大量淋巴细胞聚集成团,并有大量纤维组织增

生,成纤维细胞核呈椭圆形。苗药痛风汤方剂是贵州省苗族人民长期用来治疗风湿病的药物之一,其药物成分具有清热、活血、止痛等作用<sup>[10]</sup>。本研究结果显示苗药痛风汤方剂可改善 GA 大鼠滑膜组织病理变化,减轻炎症浸润。提示苗药痛风汤方剂可能对 GA 具有改善作用。

目前,GA 的确切机制尚不清晰,本研究试图从信号转导角度探讨苗药痛风汤方剂的抗炎机制。Han 等<sup>[11]</sup>研究报道氧化应激在痛风的发病机制中起重要作用,并导致一系列炎症事件,产生炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8 等。在正常情况下,氧自由基和脂质过氧化相互协调,处于动态平衡状态,这种协调和动态平衡的失调会导致一系列代谢异常和氧自由基连锁反应,从而损害生物膜及其功能。此外,这些改

变将导致细胞的病理改变以及大面积的细胞损伤和神经、组织及器官的损伤。由于脂质过氧化产物会导致 DNA 损伤,因此,防止脂质过氧化是所有需氧生物的基本过程<sup>[12-13]</sup>。本研究结果显示苗药痛风汤方剂高剂量具有明显的降低 MSU 诱导的炎症反应的作用,其机制可能与抑制炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8 的产生、降低脂质过氧化(MDA)和提高抗氧化(SOD)状态有关。Zhou 等<sup>[14]</sup> 研究报道穿龙薯蓣总皂苷可降低痛风性关节炎 MDA 的活性,降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-8 的含量。杨扬等<sup>[15]</sup> 报道清热排毒胶囊可升高急性痛风性关节炎模型大鼠 SOD 活性、降低模型大鼠 MDA 含量。本研究与上述报道结果一致。提示苗药痛风汤方剂可能通过参与信息传递的信号通路来调节炎症细胞因子的产生。

在 GA 发展过程中,由 NALP3、caspase-1 和 ASC 组成的 NALP3 炎性体起重要作用,NALP3 炎性体可最终活化效应蛋白 caspase-1<sup>[16]</sup>。研究表明 IL-1 $\beta$  在 GA 中起着中枢调节细胞因子的作用,将中性粒细胞招募到滑膜和关节<sup>[17]</sup>。此外,IL-1 $\beta$  的产生和活性受到两个信号调控,一是细胞外模式识别受体 Toll 样受体调控 IL-1 $\beta$  的前体(pro-IL-1 $\beta$ )的产生;另一个关键信号是经 NALP3 炎性体效应蛋白 caspase-1 剪切,使 IL-1 $\beta$  的前体成有活性的形式<sup>[18-19]</sup>。活化的 IL-1 $\beta$ 、IL-8 等炎症细胞因子分泌到细胞外产生痛风的炎症级联放大效应,NALP3、caspase-1 和 ASC 是炎性体激活的关键,IL-1 等炎症细胞因子是炎性体激活后致炎的终产物<sup>[20]</sup>。在本研究中,GA 模型大鼠滑膜组织中 NALP3、caspase-1、ASC mRNA 表达及 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达均明显升高,说明 NALP3 炎性体参与 GA 炎症的发展。与模型组相比,苗药痛风汤方剂高剂量组可明显降低 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达及 NALP3、Caspase-1、pro-IL-1 $\beta$  蛋白表达。研究结果与 Zhou 等<sup>[14]</sup> 报道一致。提示苗药痛风汤方剂抗 GA 作用的发挥可能是通过抑制 NALP3 炎性体的装配以及活化,且高剂量具有更好的治疗效果。

#### 4 结论

苗药痛风汤方剂可明显改善 GA 大鼠滑膜组织病理变化,调节机体的抗氧化能力,包括提高 SOD 的活性,降低 MDA 的水平;可明显降低炎症细胞因子的含量,降低大鼠滑膜组织中 NALP3、caspase-1、ASC 表达,对痛风性关节炎改善具有潜在作用。

#### 【参考文献】

[1] SHI L, XU L, YANG Y, *et al.* Suppressive effect of modified

Simiaowan on experimental gouty arthritis; An in vivo and in vitro study[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3):1038-1044.

[2] LV H, CHEN J, LIU F, *et al.* A traditional clinic chinese medicine prescription Qu-Zhuo-Tong-Bi (QZTB) alleviates gouty arthritis in model rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019;9456318.

[3] 赵志华,唐万艳,郑波慧. 中医外治法治疗痛风性关节炎研究进展[J]. *河南中医*, 2020, 40(2):313-316.

[4] 朱克强,王晨,惠晓艳,等. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  在痛风性关节炎发病机制中的作用研究进展[J]. *浙江医学*, 2020, 42(6):638-641.

[5] WANG W, PANG J, HA E H, *et al.* Development of novel NLRP3-XOD dual inhibitors for the treatment of gout [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(4), 126944.

[6] 白子兴,曹旭含,孙承颐,等. 基于网络药理学的“萆薢、土茯苓”药对治疗痛风性关节炎作用机制研究[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(8):611-617.

[7] 蔡唐彦,王旭,何涓,等. 急性痛风性关节炎大鼠模型的建立及模型维持时间观察[J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(5):494-499.

[8] WU Z C, XUE Q, ZHAO Z L, *et al.* Suppressive effect of Huzhentongfeng on experimental gouty arthritis; an in vivo and in vitro study[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2969364.

[9] 曹源,刘杰. 土三七提取物对尿酸钠诱导的大鼠急性痛风性关节炎的缓解作用[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13):253-256, 263.

[10] 朱成香,周欣,陈华国. 苗药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(21):2669-2677.

[11] HAN J, XIE Y, SUI F, *et al.* Zisheng Shenqi decoction ameliorates monosodium urate crystal-induced gouty arthritis in rats through anti-inflammatory and anti-oxidative effects[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3), 2589-2597.

[12] STAURENGO-FERRARI L, RUIZ-MIYAZAWA K W, PINHO-RIBEIRO F A, *et al.* Trans-chalcone attenuates pain and inflammation in experimental acute gout arthritis in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1123.

[13] HSIEH C Y, LI L H, RAO Y K, *et al.* Mechanistic insight into the attenuation of gouty inflammation by Taiwanese green propolis via inhibition of the NLRP3 inflammasome[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4), 4081-4094.

[14] ZHOU Q, YU D H, ZHANG N, *et al.* Anti-inflammatory effect of total saponin fraction from *dioscorea nipponica* makino on gouty arthritis and its influence on NALP3 inflammasome [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(9):663-670.

[15] 杨扬,陈方圆,柳振华,等. 清热排毒胶囊对急性痛风性关节炎模型大鼠氧化应激损伤的影响[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(8): 219-220, 224.

[16] WANG L, ZHU L, DUAN C, *et al.* Total saponin of *dioscorea collettii* attenuates MSU crystal-induced inflammation via inhibiting the activation of the NALP3 inflammasome and caspase-1 in THP-1 macrophages[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(6), 2466-2474.

[17] 何强,尹宏,代凤雷,等. 地黄梓醇对木瓜蛋白酶诱导的大鼠膝骨关节炎模型滑膜组织中 S100A12、IL-1 $\beta$ 、Galectin-3 表达的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(21): 2597-2602.

(下转第 385 页)

TM 促进抗凝因子的表达进而发挥治疗 DVT 的作用。另一方面,证据表明血浆中 MCP-1、ICAM-1 等炎症因子介导的炎症反应与 TM 的异常表达相关, MCP-1、ICAM-1 作为炎症细胞激活和游走趋化过程的重要分子,ICA 能够显著降低二者的表达并抑制血栓组织中 TM、MCP-1、ICAM-1 mRNA 的合成,结合以往文献报道,我们发现 ICA 能够在多种疾病模型中发挥促进 SIRT6 表达、抑制 TM 及 NF- $\kappa$ B 信号通路下游靶基因活化的作用<sup>[19-20]</sup>,而 ICAM-1、MCP-1 又是 NF- $\kappa$ B 信号通路中的关键分子,提示我们 ICA 可能通过调控 TM 在 DVT 发病过程中介导 NF- $\kappa$ B 相关信号分子的转录抑制,从而发挥对 DVT 模型大鼠抑炎、抗凝的综合治疗作用。

#### 4 结论

淫羊藿苷能够抑制深静脉血栓大鼠深静脉血栓的形成,其作用机制与调控血栓调节蛋白表达,抑制下游凝血及炎症因子的活化有关,为阐明淫羊藿苷治疗深静脉血栓的作用机制提供了有力的证据。

#### 【参考文献】

- [1] 中华医学会外科学分会血管外科学组. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南(第三版)[J]. 中华普通外科杂志, 2017, 32(9): 807-812.
- [2] OLAF M, COONEY R. Deep venous thrombosis[J]. Emerg Med Clin North Am, 2017, 35(4): 743-770.
- [3] BUESING K L, MULLAPUDI B, FLOWERS K A. Deep venous thrombosis and venous thromboembolism prophylaxis[J]. Surg Clin North Am, 2015, 95(2): 285-300.
- [4] GUO F, SHASHIKIRAN T, CHEN X, *et al.* Clinical features and risk factor analysis for lower extremity deep venous thrombosis in Chinese neurosurgical patients[J]. J Neurosci Rural Pract, 2015, 6(4): 471-476.
- [5] 贾宇东, 刘又文, 秦克枫. 中药预防髋关节置换术后深静脉血栓形成的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(5): 67-69.
- [6] 喻辉, 黄肖华, 易生辉. 中药防治下肢深静脉血栓形成的研究进展[J]. 大众科技, 2015, 24(1): 96-97.
- [7] ZHANG G, QIN L, SHENG H, *et al.* A novel semisynthesized small molecule icaritin reduces incidence of steroid-associated os-

teonecrosis with inhibition of both thrombosis and lipid-deposition in a dose-dependent manner. [J]. Bone, 2009, 44(2): 345-356.

- [8] 胡彦武, 刘凯, 闫梦彤, 等. 淫羊藿总黄酮及淫羊藿苷的心血管保护作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 20(13): 227-230.
- [9] 金浪, 李勃, 杨光. 深静脉血栓形成动物模型的制备方法研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(8): 775-779.
- [10] 刘洋, 甄学敏. 淫羊藿苷抑制大鼠静脉血栓形成及对血液流变学的影响[J]. 中医药导报, 2019, 25(7): 35-38.
- [11] 方厚枢. 淫羊藿应用研究进展[J]. 健康前沿, 2015, 22(10): 43-43.
- [12] 向家培, 赵劲波, 王勇, 等. 淫羊藿苷对大鼠心肌细胞缺氧再复氧损伤的作用及机制[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(45): 3701-3704.
- [13] AHMAD A, SUNDQUIST K, ZÖLLER B, *et al.* Identification of Genetic Aberrations in Thrombomodulin Gene in Patients With Recurrent Venous Thromboembolism [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2017, 23(4): 319-328.
- [14] CHEN P S, WANG K C, CHAO T H, *et al.* Recombinant Thrombomodulin Exerts Anti-autophagic Action in Endothelial Cells and Provides Anti-atherosclerosis Effect in Apolipoprotein E Deficient Mice[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3284.
- [15] 王彦富, 张宗雷, 孙亚男, 等. 可溶性血栓调节蛋白与冠状动脉粥样硬化斑块易损性的相关性研究[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(10): 1068-1070.
- [16] 张红胜, 张敏. 血清 RB P、凝血四项和血小板指标检测在重症肝病辅助诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(17): 2413-2415.
- [17] SCHELLINGS M W M, DE MAAT M P M, DE LATHOUDER S, *et al.* Prolonged Prothrombin Time After Discontinuing Vitamin K Antagonist[J]. Clin Chem, 2017, 63(9): 1442-1444.
- [18] 宋立成, 孟激光, 韩志海. 血栓调节蛋白在凝血功能调节及炎症反应中作用的研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2017, 38(10): 984-986, 989.
- [19] 陶菲菲. 淫羊藿苷对小鼠结肠炎的改善作用及其机制[D]. 南京大学, 2013.
- [20] 陈洋, 平键, 张晶, 等. 淫羊藿苷提高 SIRT6 酶活性及抑制小鼠 NF- $\kappa$ B 炎症信号通路的实验研究[J]. 老年医学与保健, 2012, 18(6): 338-341, 346.

(收稿日期: 2020-11-20; 修回日期: 2021-11-15; 编辑: 刘灵敏)

(上接第 380 页)

- [18] SONG C, HE L, ZHANG J, *et al.* Fluorfenidone attenuates pulmonary inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NALP3 inflammasome and IL-1 $\beta$ /IL-1R1/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(11): 2064-2077.
- [19] FU H, CHEN J K, LU W J, *et al.* Inflammasome-independent NALP3 contributes to high-salt induced endothelial dysfunction

[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 968.

- [20] YANG G, LEE H E, MOON S J, *et al.* Direct binding to NLRP3 pyrin domain as a novel strategy to prevent NLRP3-driven inflammation and gouty arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2020, 72(7): 1192-1202.

(收稿日期: 2020-12-02; 修回日期: 2021-12-20; 编辑: 刘灵敏)