

· 基础研究 ·

抗痛风胶囊治疗大鼠急性痛风性关节炎及下调 TNF- α 水平*于 泓¹, 袁良东^{1#}, 钟正霞¹, 姚观平², 余丽梅², 徐尚福³, 吴 芹³

(1. 遵义医学院附属医院肾内科 563003; 2. 遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室 563003;

3. 遵义医学院贵州省基础药理重点实验室, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 观测抗痛风胶囊(AGC)治疗急性痛风性关节炎(AGA)时肿瘤坏死因子(TNF- α)水平的变化,探讨 AGC 的作用机制。方法 大鼠随机分为 5 组,关节腔内注射尿酸钠制备 AGA 模型,容积法测定关节容积,ELISA 法定量测定血清及关节液中 TNF- α 含量。结果 与模型组比较,高、低剂量的 AGC(0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹ 和 1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹)和阳性药(秋水仙碱 0.8 mg/kg)均明显降低 AGA 大鼠踝关节容积,减少尿酸钠所致关节肿胀程度,明显改善大鼠步态。模型组外周血血清和关节液中 TNF- α 含量均明显高于空白组,AGC 和秋水仙碱均降低 AGA 大鼠外周血血清和关节液中 TNF- α 的含量,但 AGC 组 TNF- α 水平下降更明显。结论 AGC 对大鼠 AGA 具有明显治疗作用,其机制与降低血循环和关节液的 TNF- α 水平,减轻消除炎症损伤有关。

关键词:抗痛风胶囊;急性痛风性关节炎;肿瘤坏死因子- α ;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.22.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)22-2273-03

Anti-gout capsules treated acute gouty arthritis of rats and downregulating the level of TNF- α *Yu Hong¹, Yuan Liangdong^{1#}, Zhong Zhengxia¹, Yao Guanping², Yu Limei², Xu Shangfu³, Wu Qin³

(1. Nephritic Medical Department of Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China;

2. Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, Zunyi, Guizhou 563003, China;

3. Key Laboratory of Basic Pharmacology, Zunyi Guizhou, 563003, China)

Abstract: Objective To observe and determine the change of TNF- α in acute gouty arthritis(AGA) rat treated with anti-gout capsule, and explored the mechanism of anti-gout capsule. **Methods** Rats were randomly divided into 5 groups. AGA rat was made by intraarticular injection uric acid sodium. The gait changes were observed, and joint volume were determined by volume method. The content of TNF- α were detected by ELISA in serum and synovial fluid. Histopathological changes were test by HE staining. Expression of TNF- α protein was determined by immunohistochemistry and image analysis. **Results** Compared with model group, All of low(0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹), high dose(1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹) anti-gout capsule and positive control cochlincine(0.8 mg/kg) could obviously decreased joint volume, and inhibited ankle swelling caused by uric acid sodium. The content of TNF- α were obviously higher in serum and synovial fluid of AGA rats. The level of serum and synovial fluid TNF- α were lower in anti-gout capsule groups than model group. **Conclusion** Anti-gout capsule has significantly therapeutic effects for AGA in rat. The mechanism may be related to decreasing the level of TNF- α in blood circulation and local ankle joint, and relieving injury of joint tissue.

Key words: anti-gout capsule; acute gouty arthritis; tumor necrosis factor- α ; rat

痛风是嘌呤代谢障碍引起的代谢性疾病,其临床主要表现为高尿酸血症、急性关节炎反复发作、痛风石沉积、慢性关节炎和关节畸形及功能障碍、肾实质退行性病变甚至尿毒症。随着人们生活水平的不断提高,饮食结构和生活习惯的改变,其发病率呈上升趋势,已成为危害人类健康的常见病。目前,主要采用秋水仙碱等控制急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, AGA)发作症状,但复发率高,发症难控制,治疗药物不良反应较大^[1-4]。

尿酸结石导致关节炎反应发生是 AGA 发病的主要机制之一,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-6(IL-6)等炎症因子是引起关节炎反应的关键因子,从而导致关节的红、肿、疼痛。秋水仙碱、糖皮质激素等通过减少炎性介质生成或阻断炎性因子作用,从而缓解 AGA 临床症状^[5]。

抗痛风胶囊(anti-gout capsule, AGC)以祛风通络的中医学理论为基础配制而成,由乌梢蛇、桃仁、红花、枸杞、木瓜、桂

圆等中药组成,民间用于治疗 AGA,缓解关节炎及疼痛效果显著。本研究主要在评价抗痛风胶囊治疗 AGA 疗效的同时,检测 TNF- α 在 AGA 大鼠血清、关节液和关节组织中的变化情况,探讨抗痛风胶囊的抗炎作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 AGC 由遵义医学院附属医院肾内科提供,0.5 g/粒;秋水仙碱(西双版纳版纳药业有限责任公司生产),每片 0.5 mg(批号 20100502)。尿酸钠结晶(批号 100982303)购于美国 Sigma 公司, TNF- α ELISA 检测试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司。吐温 80 等其他化学试剂均为国产分析纯产品。

1.1.2 主要仪器 YLS-TA 型足爪容积测量器购于山东省医学科学院设备站,通用酶标仪和 KDC-2044 低速冷冻离心机分别为美国 BIO-RAD 公司和科大创新股份有限公司产品。

1.1.3 动物 健康雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 240~250 g,第

* 基金项目:遵义医学院附属医院课题资助项目(院字 201009 号)。

现在山东省济宁医学院附属医院肾内科工作。

三军医大学大坪医院实验动物中心提供,SPF 级动物合格证号 SEXK(渝)2007-00050。实验前适应性饲养 5 d。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 大鼠称体重、编号,随机分为 5 组,每组 10 只,即空白组、模型组、阳性药物组、AGC 低剂量组、AGC 高剂量组。于造模前、后测量大鼠足爪容积,每天测量 1 次;制备 AGA 模型同时,每天灌胃给药一次,连续 5 d,空白组和模型组给予等容积(1 mL/100 g)生理盐水,阳性药物组给予秋水仙碱 0.8 mg/kg,AGC 组则分别给予 AGC 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹、1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹。第 5 天灌胃 2 h 后处死大鼠,留取标本,-80 °C 低温冰箱保存待用。

1.2.2 AGA 大鼠模型制备^[6-7] 除空白组外,其余大鼠均腹腔注射 10%水合氯醛 0.3 mL/100 g 麻醉,仰卧位固定,右踝关节局部消毒,以其外侧后方为穿刺点,穿刺进入踝关节腔,向关节腔注入 0.2 mL 尿酸钠溶液(尿酸钠结晶 250 mg 加 0.9% 氯化钠注射液 45 mL,再加 5 mL 吐温 80,加热搅拌,配制成尿酸钠溶液 50 mL),以关节囊对侧鼓起为注入标准。空白组注射等容积生理盐水。

1.2.3 步态行为学评分^[8] 观察模型制备后 24~48 h AGA 大鼠步态变化。评分标准:0 分为正常步态;1 分为轻度跛行,受试下肢略弯曲;2 分为中度跛行,受试下肢刚触及地面;3 分为重度跛行,受试下肢离开地面,三足着地行走。

1.2.4 关节容积测定 实验前与 AGC 治疗前后,用足趾容器测量大鼠足趾容积,以反应足踝关节容积,连续监测大鼠关节容积的变化。

1.2.5 TNF-α 含量测定 AGA 大鼠连续灌胃给药治疗 5 d 处死,取腹主动脉血 2 mL,离心、分离血清,备用。另在踝关节上方 0.5 cm 处剪下含踝关节的足爪,去皮后足爪纵切,放入

5 mL 生理盐水,4 °C 浸泡过夜,留取上清液 1 mL。按照试剂盒说明书,采用 ELISA 法测定光密度值,按标准曲线计算血清和关节液中 TNF-α 含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验,配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态 实验期间可见空白组和 AGC 组大鼠皮毛白而光泽。反应灵敏,饮食及尿便正常。模型组精神、饮食尚可,大小便正常,但体毛稍欠光泽,秋水仙碱组大鼠体毛欠光泽,精神欠佳,懒动,食量减少,少数大鼠出现大便稀溏。

2.2 AGC 对大鼠步态变化的影响 与空白组比较,模型组大鼠步态评分值明显升高($P < 0.01$),活动减少,右下肢弯曲,行走时出现不同程度的跛行,以模型制备后 24~48 h 变化明显。与模型组比较,秋水仙碱组和 AGC 各组大鼠活动状态得到显著改善,评分显著降低($P < 0.01$),见表 1。

表 1 AGC 对大鼠步态变化的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	平均积分	
		24 h	48 h
空白组	等量蒸馏水	0	0
模型组	等量蒸馏水	2.4±0.516	2.0±0.677
秋水仙碱组	0.8 mg/kg	1.5±0.527 [#]	1.2±0.422 [*]
AGC 低剂量组	0.3 g/kg	1.7±0.675 [#]	1.5±0.527 [*]
AGC 高剂量组	1.2 g/kg	1.6±0.699 [#]	1.4±0.516 [*]

*: $P < 0.05$, #: $P < 0.01$,与模型组比较。

表 2 AGC 对大鼠关节容积的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	足趾容积(mL)					
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
空白组	等量蒸馏水	1.99±0.09	2.03±0.11	2.00±0.07	1.98±0.06	1.98±0.06	2.00±0.07
模型组	等量蒸馏水	1.98±0.05	2.29±0.07 ^{*△}	2.24±0.07 ^{*△}	2.22±0.06 ^{*△}	2.19±0.06 ^{*△}	2.18±0.07 [*]
秋水仙碱组	0.8 mg/kg	1.98±0.10	2.22±0.08 ^{*△}	2.20±0.07 ^{*△△}	2.08±0.08 ^{*#△}	2.04±0.07 ^{*□△}	2.00±0.07 [□]
AGC 低剂量组	0.3 g/kg	1.91±0.07	2.10±0.09 ^{*△}	2.14±0.10 ^{*□△}	2.04±0.07 [□]	1.99±0.06 [□]	1.97±0.05 [□]
AGC 高剂量组	1.2 g/kg	1.90±0.08	2.22±0.07 ^{*△}	2.14±0.07 ^{*#△}	2.04±0.10 [□]	1.98±0.06 [□]	1.96±0.07 [□]

*: $P < 0.05$,与空白组比较; #: $P < 0.05$, □: $P < 0.01$,与模型组比较; △: $P < 0.05$,与 0 h 比较。

表 3 AGC 对大鼠血清 TNF-α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	TNF-α(ng/mL)
空白组	等量蒸馏水	1.054±0.382
模型组	等量蒸馏水	1.728±0.511 [*]
秋水仙碱组	0.8 mg/kg	1.205±0.382 [#]
AGC 低剂量组	0.3 g/kg	0.723±0.167 [□]
AGC 高剂量组	1.2 g/kg	0.743±0.158 [□]

*: $P < 0.05$,与空白组比较; #: $P < 0.05$, □: $P < 0.01$,与模型组比较。

2.3 AGC 对大鼠关节肿胀度的影响 以足趾容积变化反应踝关节容积,其值增加表示关节肿胀度增大,结果可见,除空白组外,注射尿酸钠结晶各组,1~5 d,大鼠的踝关节容积均明显高于注射前水平($P < 0.01$),存在不同程度的关节肿胀,且关节肿胀度随时间延长,有不同程度的减轻(表 2)。与空白组比

较,模型组大鼠关节容积显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,AGC 低、高剂量组和秋水仙碱组关节容积均明显降低,但仍高于治疗前水平。

表 4 AGC 对大鼠关节液中 TNF-α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量	TNF-α(pg/mL)
空白组	等量蒸馏水	2.023±0.113
模型组	等量蒸馏水	2.571±0.551 [*]
秋水仙碱组	0.8 mg/kg	1.771±0.324 [□]
AGC 低剂量组	0.3 g/kg	1.629±0.207 [□]
AGC 高剂量组	1.2 g/kg	1.613±0.123 [□]

*: $P < 0.05$,与空白组比较; □: $P < 0.01$,与模型组比较。

2.4 AGC 对大鼠血清和关节液中 TNF-α 含量的影响 给药治疗 5 d,TNF-α 含量测定结果显示,与空白组比较,模型组大

鼠血清和关节液中 TNF- α 含量均明显升高 ($P < 0.05$), 经秋水仙碱和低、高剂量 AGC 治疗后, 与模型组比较, AGA 大鼠血清和关节液中 TNF- α 含量明显降低 (表 3、4), 且抗痛风胶囊与秋水仙碱组 TNF- α 含量无显著差异。

3 讨论

大鼠后足踝关节注射尿酸钠结晶制备 AGA 模型, 已被广泛用于痛风性关节炎治疗药物的研究, 所引起的症状和病理变化与人体 AGA 的临床表现极为相似^[9], TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子参与了尿酸钠诱导的关节组织免疫炎症反应^[10-12]。一般认为中性粒细胞、内皮细胞黏附是急性痛风产生的本质, 而 TNF- α 等可上调内皮细胞选择素活性, 增加中性粒细胞的募集, 使内皮细胞和中性粒细胞表面的黏附分子相结合, 浸润关节部位, 释放炎症介质, 引起关节局部炎症反应的发生。因而降低 AGA 患者关节局部 TNF- α 水平, 可减少或终止炎症因子的恶性循环, 是 AGA 治疗的有效措施之一。TNF- α 水平的变化既可能反应关节炎反应的轻重, 也是 AGA 发病的机制, 已被用于治疗痛风药物疗效评价的重要检测指标之一^[13-15]。此外, TNF- α 还可通过诱导前列腺素等致痛物质释放, 产生致痛效应。因而减少局部的 TNF- α , 也可一定程度地缓解局部疼痛。

本实验中, 大鼠注射尿酸钠结晶 24~48 h, 已出现明显的踝关节红、肿及步态异常, 与文献报道一致^[9], 产生了 AGA 的症状和体征, 表明 AGA 模型制备成功。给予 AGC 和秋水仙碱治疗后 48 h, AGA 大鼠踝关节肿胀程度已开始减轻, 大鼠步态也有所改善, 治疗 5 d, 上述症状基本消除, 关节肿胀程度也减轻 70%~90%。表明 AGC 和秋水仙碱对尿酸钠结晶引起的 AGA 具有明显治疗作用。有研究报道^[16], AGC 中的乌梢蛇具有祛风、通络止痉, 乌梢蛇体富含的乌梢蛇 II 型胶原蛋白, 可明显抑制滑膜细胞炎症因子的水平和活性; 木瓜、桃仁等则具有抗血凝、溶栓、解热镇痛等作用^[17-18], 上述药物的共同作用, 可能是 AGC 对 AGA 产生良好治疗作用的基础。

AGA 模型组大鼠血清和关节液中 TNF- α 含量明显升高, 说明循环和局部 TNF- α 水平的升高与 AGA 的发病关系密切, 是重要致炎因子。AGC 在迅速缓解 AGA 大鼠关节肿胀的同时, 还将异常增高的血清和关节液 TNF- α 水平降至正常范围, 表明下调循环和关节局部 TNF- α 水平是 AGC 发挥治疗作用的主要机制之一, 从而有效阻断 TNF- α 引起的炎症瀑布级联及网络效应, 明显减轻关节局部的炎症反应和关节损伤。然而, AGC 是否还可调节 IL-1 β 等其他炎症因子的水平, 或通过其他途径减轻关节损伤, 还需要进一步深入研究。

总之, AGC 可迅速缓解 AGA 大鼠踝关节的肿胀, 改善其步态异常, 其作用机制与显著降低血清和关节液中 TNF- α 的含量, 减少炎症损伤有关。

参考文献:

[1] 劳志英. 原发性痛风性关节炎的诊断和药物治疗[J]. 中国新药与临床杂志, 2004, 23(9): 632-634.
 [2] So A. Developments in the scientific and clinical understanding of gout[J]. Arth Res Ther, 2008, 10: 221-226.
 [3] Mikuls TR, Saag KG. Gout treatment: what is evidence-

based and how do we determine and promote optimized clinical care? [J]. Current Rheumatology Reports, 2005, 7(3): 242-249.

[4] 张忠辉. 痛风与高尿酸血症的进展[J]. 重庆医学, 2007, 36(10): 985-988.
 [5] 薛耀明, 李晨钟. 痛风的诊断与治疗[M]. 2 版. 北京: 人民军医出版社, 2006: 231.
 [6] 时乐, 徐立. 痛风性关节炎动物模型的研究现状与展望[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(1): 71-74.
 [7] 黄晓巍, 张永和, 周鸣. 痛风安胶囊对尿酸钠痛风模型动物关节炎反应的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(10): 2114-2115.
 [8] 马颖, 颜海燕, 刘梅, 等. 鸡矢藤提取物对尿酸钠晶体诱导大鼠急性痛风性关节炎影响的研究[J]. 中国药房, 2008, 19(6): 411-414.
 [9] 张昱. 痛风[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2006: 2120-2122.
 [10] Liu-Bryan RL, Scot P, Sydlaske A, et al. Innate immunity conferred by toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(9): 2936-2946.
 [11] So A, Smedt TD, Revaz S, et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout[J]. Research & Therapy, 2007, 9(2): R28.
 [12] di-Giovine FS, Malawista SE, Thornton E, et al. Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells Cytokine mRNA and protein kinetics, and cellular distribution[J]. J Clin Invest, 1991, 87(4): 1375-1381.
 [13] Chen CJ, Shi Y, Hearn A, et al. My D88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals[J]. J Clin Invest, 2006, 116(8): 2262-2271.
 [14] 陈文照, 谷焕鹏, 温成平. 痛风宁对尿酸钠致大鼠关节炎滑膜 IL-1 β 、TNF- α 含量的影响[J]. 中国医药学报, 2004, 19(2): 93-94.
 [15] 惠扔华, 姜宏, 吴士良. 痛风平对大鼠实验性急性痛风性关节炎 IL-1 β 、TNF- α 和 MP-1 的影响[J]. 中医正骨, 2006, 18(3): 8-9.
 [16] 庞捷, 李娟, 吴湘慧. 乌梢蛇 II 型胶原蛋白对大鼠佐剂型关节炎滑膜细胞因子的作用[J]. 中药材, 2009, 32(4): 556-560.
 [17] 任贻军, 张宏琳. 木瓜苷的药理作用[J]. 中医中药, 2009, 3(下): 50-51.
 [18] 胡烈. 薏苡仁临床新用举隅[J]. 中国临床医生, 2001, 29(10): 54-55.

(收稿日期: 2012-01-09 修回日期: 2012-02-22)