

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.16.017

泄浊解毒方对急性痛风性关节炎大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 的影响

王红霞¹, 封丽华², 张相鹏³, 刘晓冉¹, 曹东义^{1*}

(1. 河北省中医药科学院, 河北省石家庄市建华南大街 209 号, 050031; 2. 石家庄市第三医院; 3. 河北中医学院)

摘要 目的 探讨泄浊解毒方治疗急性痛风性关节炎的可能作用机制。方法 将 100 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、秋水仙碱组、泄浊解毒方低剂量组、泄浊解毒方高剂量组, 每组 20 只。秋水仙碱组每日给予 0.1 mg/ml 秋水仙碱混悬液 2 ml 灌胃, 泄浊解毒方高、低剂量组每日分别给予含生药量 24.7、6.175 g/L 的泄浊解毒方中药混悬液 2 ml 灌胃, 空白组和模型组每日给予 2 ml 生理盐水灌胃。各组均灌胃 10 天, 每天 1 次。除空白组外, 其余各组于灌胃第 4 天采用单尿酸钠晶体溶液注射大鼠右后侧膝关节制备急性痛风性关节炎模型。造模后 5、10、24、48、72 h 测量大鼠膝关节肿胀度, 计算关节肿胀指数。测定各组大鼠血清白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 含量。结果 与空白组比较, 其余各组各时间点膝关节肿胀指数均增大 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 造模 10、24、48、72 h 秋水仙碱组及泄浊解毒方低、高剂量组膝关节肿胀指数均减小 ($P < 0.01$)。与泄浊解毒方低剂量组比较, 泄浊解毒方高剂量组造模 10、24、48、72 h 膝关节肿胀指数均减小 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 其余各组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 含量均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 秋水仙碱组及泄浊解毒方高、低剂量组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 含量均降低 ($P < 0.01$); 泄浊解毒方高剂量组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 含量低于泄浊解毒方低剂量组 ($P < 0.01$)。结论 泄浊解毒方能显著减轻急性痛风性关节炎大鼠膝关节肿胀, 且以高剂量效果最佳, 降低血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 含量可能为其作用机制之一。

关键词 痛风性关节炎; 泄浊解毒方; 白细胞介素 1 β ; 肿瘤坏死因子 α ; 基质金属蛋白酶 3

痛风是由于嘌呤代谢障碍造成尿酸升高, 导致急慢性炎症和组织损伤而出现的以急性关节炎、痛风肾、痛风石等为主要表现的临床综合症。现代医学研究发现, 急性痛风性关节炎是由尿酸盐结晶诱发的自身炎症性疾病, 尿酸盐结晶能激活人体内固有免疫系统, 诱导白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18 (IL-18) 等细胞因子分化、成熟而大量释放, 经过一些列复杂的级联反应, 从而导致急性关节炎发作^[1]。我们在临床上以泄浊解毒为主要治疗原则, 自拟泄浊解毒方治疗急性痛风性关节炎, 取得了显著疗效^[2]。为进一步探讨泄浊解毒方治疗痛风性关节炎的作用机理, 本研究以尿酸盐模型大鼠为研究对象, 观察泄浊解毒方对急性痛风性关节炎模型大鼠血清 IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 的影响,

现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 Wistar 雄性大鼠 100 只, 体重 (250 $\pm$ 20) g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号 (冀) 2016-5-00。

1.2 药物

泄浊解毒方组成: 土茯苓 60 g, 黄柏 6 g, 萆薢 15 g, 泽泻 10 g, 白花蛇舌草 30 g, 黄芩 6 g, 红花 6 g, 穿山龙 10 g, 白茅根 20 g, 虎杖 20 g, 漏芦 10 g。中药均购自河北省中医药科学院附属医院, 并由制剂室煎成汤剂。秋水仙碱 (西双版纳版纳药业有限责任公司, 批号: 160307)。

1.3 主要试剂与仪器

尿酸钠 (批号: 60H6031), 上海度生生物有限公司; IL-1 β 、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号分别为 141108、20111105248), 上海森雄科技实业有

基金项目: 河北省中医药管理局科研项目 (2015010)

* 通讯作者: 13613301298@163.com

限公司; MMP-3 试剂盒 (批号: 1501051), 上海西唐生物科技有限公司。AT-858 型自动酶标分析仪, 上海安泰分析仪器有限公司。

1.4 动物分组、造模及给药

将 100 只大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、秋水仙碱组及泄浊解毒方低、高剂量组, 每组 20 只。大鼠适应性喂养 10 天后, 空白组和模型组每日给予 2 ml 生理盐水灌胃, 秋水仙碱组每日给予 0.1 mg/ml 秋水仙碱混悬液 2 ml 灌胃, 泄浊解毒方高、低剂量组每日分别给予含生药量 24.7、6.175 g/L 的泄浊解毒方中药混悬液 2 ml 灌胃。各组均灌胃 10 天, 每天 1 次。于灌胃第 4 天给予造模药物 1 次。空白组大鼠右后侧膝关节注射 0.2 ml 生理盐水, 其余各组大鼠参照文献 [6] 给予右后侧膝关节注射 20 mg/ml 尿酸钠晶体溶液 0.2 ml 建立急性痛风性关节炎模型。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 膝关节肿胀指数 关节肿胀指数 = (测定时间点关节周径 - 初始关节周径) / 初始关节周径 × 100%。于造模后 5、10、24、48、72 h 用软尺分别测定大鼠右后侧膝关节周径。

1.5.2 血清 IL-1β、TNF-α、MMP-3 检测 实验结束后大鼠断头取血, 以 ELISA 法测定大鼠血清中 IL-1β、TNF-α、MMP-3 的浓度, 严格按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计处理。计量资料呈正态分布数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析; 偏态分布资料以中位数 (四分位数间距) [M (Q₂₅ ~ Q₇₅)] 表示, 采用非参数检验中的中位数检验 (k 样本)。检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠造模后不同时间膝关节肿胀指数比较

表 1 示, 空白组给予生理盐水膝关节注射后 72 h 时肿胀完全消失。模型组大鼠膝关节在给予尿

酸钠晶体液注射后逐渐肿胀, 并在造模后 10 ~ 24 h 达高峰, 此后逐渐下降。与空白组比较, 其余各组各时间点 (除造模 72 h) 膝关节肿胀指数均增大 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 造模 10、24、48、72 h 秋水仙碱组、泄浊解毒方低剂量组、泄浊解毒方高剂量组膝关节肿胀指数均减小, 造模 5 h 秋水仙碱组、泄浊解毒方高剂量组亦减小 ($P < 0.01$)。与秋水仙碱组比较, 泄浊解毒方低剂量组各时间点膝关节肿胀指数均增大, 泄浊解毒方高剂量组造模 5、10 h 膝关节肿胀指数增大 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 造模 24、48、72 h 膝关节肿胀指数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与泄浊解毒方低剂量组比较, 泄浊解毒方高剂量组造模 10、24、48、72 h 膝关节肿胀指数均减小 ($P < 0.01$)。与造模 5 h 比较, 模型组、秋水仙碱组及泄浊解毒方低、高剂量组造模 10 h、24 h 肿胀指数均升高, 造模 48 h、72 h 肿胀指数均下降 ($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠血清 IL-1β、TNF-α、MMP-3 含量比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组、秋水仙碱组及泄浊解毒方高、低剂量组大鼠血清 IL-1β、TNF-α 含量均升高 ($Z_{IL-1\beta} = 36.19、32.40、19.60、32.40, P < 0.001; Z_{TNF-\alpha} = 40.00、25.859、40.00、40.00, P < 0.001$); 与模型组比较, 秋水仙碱组及泄浊解毒方高、低剂量组大鼠血清 IL-1β、TNF-α 含量均降低 ($Z_{IL-1\beta} = 22.556、19.60、19.60, P < 0.001; Z_{TNF-\alpha} = 25.6、36.19、28.972, P < 0.001$); 与秋水仙碱组比较, 泄浊解毒方高剂量组大鼠血清 IL-1β、TNF-α 含量差异无统计学意义 ($Z_{IL-1\beta} = 1.6, P = 0.206; Z_{TNF-\alpha} = 0.921, P = 0.337$); 泄浊解毒方低剂量组大鼠血清 IL-1β、TNF-α 含量高于秋水仙碱组 ($Z_{IL-1\beta} = 22.556, P < 0.001; Z_{TNF-\alpha} = 32.4, P < 0.001$); 泄浊解毒方高剂量组低于泄浊解毒方低剂量组 ($Z_{IL-1\beta} = 19.6, P < 0.001; Z_{TNF-\alpha} = 40.0, P < 0.001$)。MMP-3 含量,

表 1 各组大鼠造模后不同时间膝关节肿胀指数比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	造模 5 h	造模 10 h	造模 24 h	造模 48 h	造模 72 h
空白组	20	8.50 ± 0.35	6.39 ± 0.36*	3.33 ± 0.06*	0.45 ± 0.02*	—
模型组	20	25.54 ± 1.35*	42.49 ± 1.43**	36.44 ± 2.00**	21.83 ± 1.41**	12.44 ± 1.64*
秋水仙碱组	20	21.47 ± 0.91*△	33.43 ± 1.57*△*	26.69 ± 1.33*△*	13.57 ± 1.32*△*	6.54 ± 0.98△*
泄浊解毒方低剂量组	20	24.26 ± 1.73*▲▲	38.33 ± 1.24*△▲▲*	33.00 ± 2.01*△▲▲*	16.93 ± 1.36*△▲▲*	7.46 ± 1.00△▲*
泄浊解毒方高剂量组	20	23.44 ± 1.71*△▲▲	35.49 ± 1.27*△▲▲**	28.51 ± 1.68*△#*	14.15 ± 1.41*△#*	6.35 ± 1.28△#*

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.01$; 与秋水仙碱组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与泄浊解毒方低剂量组比较, # $P < 0.01$; 与本组造模 5 h 比较, ★ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 含量比较

组别	鼠数	IL-1 β [ng/L, M (Q ₂₅ ~ Q ₇₅)]	TNF- α [ng/L, M (Q ₂₅ ~ Q ₇₅)]	MMP-3 (μ g/L, $\bar{x} \pm s$)
空白组	20	0.22 (0.20 ~ 0.24)	0.27 (0.25 ~ 0.28)	78.46 $\pm$ 7.51
模型组	20	0.76 (0.63 ~ 0.81) *	0.80 (0.69 ~ 0.85) *	136.52 $\pm$ 6.82 *
秋水仙碱组	20	0.36 (0.34 ~ 0.38) * Δ	0.35 (0.33 ~ 0.37) * Δ	109.33 $\pm$ 5.73 * Δ
泄浊解毒方低剂量组	20	0.48 (0.46 ~ 0.50) * Δ $\blacktriangle$	0.51 (0.50 ~ 0.52) * Δ $\blacktriangle$	115.42 $\pm$ 8.42 * Δ $\blacktriangle$
泄浊解毒方高剂量组	20	0.37 (0.35 ~ 0.39) * Δ $\#\#$	0.36 (0.35 ~ 0.37) * Δ $\#\#$	110.78 $\pm$ 5.64 * Δ $\#\#$

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; MMP-3, 基质金属蛋白酶 3; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与秋水仙碱组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 与泄浊解毒方低剂量组比较, $\#\# P < 0.05$, $\#\#\# P < 0.01$

组间比较差异有统计学意义 ($F = 181.20$, $P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组、秋水仙碱组、泄浊解毒方高、低剂量组 MMP-3 含量均升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 秋水仙碱组及泄浊解毒方高、低剂量组 MMP-3 含量均降低 ($P < 0.001$); 泄浊解毒方高剂量组与秋水仙碱组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.508$), 泄浊解毒方低剂量组 MMP-3 含量高于秋水仙碱组 ($P = 0.006$); 泄浊解毒方高剂量组 MMP-3 含量低于泄浊解毒方低剂量组 ($P = 0.036$)。

3 讨论

痛风属于中医学“热痹”“痹证”“历节”“脚气”等范畴。痛风性关节炎是由于饮食不节, 嗜食膏粱厚味, 酿生湿热, 湿热蕴结日久化生浊毒, 浊毒滞留于血中循行于关节, 浊毒痹阻关节而发生关节疼痛, 毒日久化生痰浊, 阻滞气血运行, 最终导致痰瘀进一步痹阻经脉, 造成关节反复疼痛, 日久关节变形。湿热内闭于里尤其是闭于关节最易化热, 与湿热胶结成毒, 浊毒壅滞是本病最大的特点, 因此治疗上以化浊解毒为治疗原则。泄浊解毒方为我们临床治疗急性痛风性关节炎的经验方, 方中君药土茯苓、黄柏解毒化浊, 促进尿酸排泄; 泽泻、萆薢、白花蛇舌草、黄芩共为臣药, 清热利湿解毒; 佐以红花、穿山龙祛风除湿, 活血通络; 漏芦、虎杖、白茅根利湿清热通络。全方共奏化浊解毒、利湿消肿、活血通络之功。现代药理研究显示, 土茯苓可明显降低血尿酸水平抑制黄嘌呤氧化酶活性, 通过控制高尿酸血症治疗痛风^[6]; 黄柏具有抗痛风作用^[7]; 白花蛇舌草能刺激网状内皮细胞增生, 提高机体免疫力, 而具有镇痛、镇静、催眠效果^[8]; 萆薢、泽泻有降压、促进尿酸排泄^[9]; 黄芩抗炎、调节免疫力^[10]; 穿山龙乙醇洗脱液可显著降低高尿酸血症小鼠的血尿酸水平^[11]; 虎杖提取物能够显著降低高尿酸血症动物模型血尿酸水平并抑制黄嘌呤氧化酶活性, 可改善

痛风性关节炎的病理症状^[12]。

尿酸钠诱导的痛风性关节炎模型是目前国际上通用模型。本研究结果显示, 模型组大鼠在造模后 5 h 关节肿胀度与空白组比较已升高, 造模后 10 h 是各观察时间点关节肿胀的高峰期, 造模后 48 h 模型组大鼠关节肿胀度已经较高峰期显著下降, 且低于造模后 5 h。空白组大鼠由于注射的是生理盐水, 仅仅会出现注射后的容积性轻度肿胀, 并且关节肿胀度注射后的持续下降并很快趋于消失。而各用药组由于造模前后已经给予药物治疗, 故造模后各时间点关节肿胀度均低于模型组, 说明秋水仙碱组及泄浊解毒方高、低剂量组对模型大鼠急性关节炎有明确治疗效果, 并且在一定剂量范围内泄浊解毒方剂量增大疗效也相应提高。

IL-1 β 对于促进痛风炎症的发作起关键性作用, 是一级炎症细胞因子, 能促进炎细胞的活性, 刺激单核-巨噬细胞合成 IL-8 等二级炎症调节因子^[13]。TNF- α 主要是由脂多糖对细胞的刺激而分泌的一种蛋白质, 能够刺激并介入炎症反应, 也是一种重要的趋化因子, 能诱导细胞缓慢浸入炎症局部, 加强炎症浸润作用从而造成组织进一步损伤^[14]。而基质金属蛋白酶可以造成关节软骨细胞外基质的损伤, 是一族降解关节软骨细胞外基质的最主要的酶^[15]。有研究提示, 在急性痛风性关节炎患者或痛风模型动物血清中或发病关节周围组织中炎症因子明显升高, 给予有效治疗后 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 等致炎细胞因子明显下降^[14-16]。本实验结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 含量升高, 验证了这三个指标在急性痛风性关节炎发作中起促进作用。泄浊解毒方高低剂量均能显著降低大鼠血清炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-3 的含量, 疗效与秋水仙碱无显著差异, 表明泄浊解毒方可以通过抑制炎症细胞因子的释放及基质金属蛋白酶的降解而有效控制痛风发作且防止关节结构的破坏, 为临床治疗痛风提供了理论依据。

参考文献

- [1] 王缘,白雪,王艳秋,等. NALP3 在痛风炎症反应中的作用 [J]. 黑龙江医药科学, 2015, 38(3): 17-20.
- [2] 王红霞,张相鹏,刘晓冉,等. 泄浊解毒方治疗浊毒内蕴型急性痛风临床研究 [J]. 河北中医药学报, 2017, 32(6): 24-26.
- [3] 黄火高,孙运峰,胡明. 大鼠急性痛风性关节炎模型的建立及特点 [J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(6): 538-542.
- [4] 郭淑云,张薇,张淡,等. 土茯苓对尿酸血症小鼠血清尿酸的影响 [J]. 中国药业, 2012, 21(13): 3-4.
- [5] 杨澄,朱继孝,王颖,等. 盐制黄柏抗痛风作用的影响 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 145-147.
- [6] 张子臻,李刚,郭中恒. 白花蛇舌草降酶、降尿酸效佳 [J]. 中医杂志, 2008, 49(6): 531.
- [7] 赵岭梅. 中药治疗高尿酸血症 27 例 [J]. 中医杂志, 2007, 48(6): 533-534.
- [8] 史雪靖. 黄芩药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2003, 20(4): 128-130.
- [9] 姚丽,刘树民. 穿山龙治疗急性痛风性关节炎有效部位的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1724-1726.

- [10] 侯建平,王亚军,严亚峰,等. 虎杖提取物抗动物高尿酸血症的实验研究 [J]. 西部中医药, 2012, 25(5): 21.
- [11] 金泽,张振营,姜珊珊,等. 针药并用对大鼠急性痛风性关节炎滑膜 IL-1、IL-8 的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2012, 31(12): 923-924.
- [12] 张剑勇,刘题章,邱侠,等. 痛风泰颗粒对兔滑膜细胞 IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(2): 103-105.
- [13] 俞冰,张剑勇,黄华,等. 痛风泰颗粒对急性痛风性关节炎模型大鼠炎症因子的影响 [J]. 中国药房, 2013, 24(23): 2125-2127.
- [14] 刘淑娟,丁焕发,徐晓辰,等. 急性痛风性关节炎患者血清 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α 水平的研究 [J]. 中国医药指南, 2016, 14(16): 3-5.
- [15] 罗海鸥,唐勇,王洪志,等. 火针对类风湿关节炎大鼠 IL-1、IL-6 的影响 [J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(6): 35-36.
- [16] 韩宏妮,姬艳波,陈立忠,等. 痛风合剂治疗高尿酸血症及急性痛风性关节炎的实验研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(1): 9-11.

Effects of Xiezhuo Jiedu Fang (泄浊解毒方) on Serum IL-1 β , TNF- α and MMP-3 in Acute Gouty Arthritis Model Rats

WANG Hongxia¹, FENG Lihua², ZHANG Xiangpeng³, Liu Xiaoran¹, Cao Dongyi¹

(1. Hebei Academy of Chinese Medical Sciences, Shijiazhuang, 050031; 2. The Third Hospital of Shijiazhuang City; 3. Hebei University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Xiezhuo Jiedu Fang (泄浊解毒方, XZJDF) in the treatment of acute gouty arthritis. **Methods** A total of 100 Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, colchicine group, low dose XZJDF group and high dose XZJDF group, with 20 rats in each group. Colchicine group was given intragastric administration of 2 ml colchicine solution, 0.1 mg/ml, once a day. Low dose and high dose XZJDF group were given daily intragastric administration of 2 ml Xiezhuo Jiedu Fang suspension containing herbs 24.7 g/L and 6.175 g/L respectively. The blank group and model group were given daily intragastric administration of 2 ml normal saline. The intragastric administration last for 10 days, once a day. Apart from the blank group, the rats of other groups were injected with single uric acid sodium crystal solution into the right posterior knee to establish animal model of acute gouty arthritis. The knee joint swelling degree was measured at 5, 10, 24, 48, and 72 h after modeling, and the joint swelling index was calculated. Serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α) and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) were measured in each group. **Results** Compared with the blank group, the knee joint swelling index of other groups increased at each time point ($P < 0.01$). Compared with the model group, the knee joint swelling index of the colchicine group and the low and high-dose XZJDF group were decreased at 10, 24, 48, and 72 h after modeling ($P < 0.01$). Compared with the low-dose XZJDF group, the swelling index of knee joints in the high-dose XZJDF group was decreased at 10, 24, 48, and 72 h after modeling ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the levels of serum IL-1 β , TNF- α and MMP-3 in the other groups were increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the colchicine group, high dose and low dose XZJDF group were decreased ($P < 0.01$). The levels in the high dose XZJDF group were lower than those in the low dose XZJDF group ($P < 0.01$). **Conclusion** XZJDF can significantly reduce knee joint swelling in rats with acute gouty arthritis, and it is best to use high dose. Lowering serum IL-1 β , TNF- α and MMP-3 may be one of its mechanisms.

Keywords gout arthritis; Xiezhuo Jiedu Fang; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α ; metal matrix proteinase-3

(收稿日期: 2017-02-25; 修回日期: 2018-03-01)

编辑: 王利芬