

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.17.012

痛风汤对急性痛风性关节炎模型大鼠踝关节滑膜组织中 NLRP3 炎症小体及 NETs 的影响

邓雍钰¹, 孟庆良²✉, 马俊福², 崔家康², 李凯³, 王赓丰¹, 宋晨阳¹, 卞华³

1. 河南中医药大学骨伤学院, 河南省郑州市金水区金水东路1号, 450053; 2. 河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院); 3. 南阳理工学院

[摘要] **目的** 探讨痛风汤防治急性痛风性关节炎的可能作用机制。**方法** 将60只Wistar雄性大鼠按照随机数字表法分为正常组、模型组、秋水仙碱组及痛风汤低、中、高剂量组, 每组10只。痛风汤低、中、高剂量组分别给予痛风汤11.34、22.68、45.36 g/(kg·d)灌胃, 秋水仙碱组给予秋水仙碱 3.15×10^{-4} g/(kg·d)灌胃, 正常组和模型组给予生理盐水10 ml/(kg·d)灌胃, 连续7天。第5天灌胃1 h后, 除正常组外其余各组大鼠参照改良Coderre法对右侧后肢踝关节建立急性痛风性关节炎模型; 正常组大鼠在相同位置注射0.2 ml生理盐水。分别于造模前及造模6 h、12 h、24 h、48 h后测量大鼠踝关节肿胀度; 采用HE染色观察踝关节滑膜组织病理学形态变化; 免疫印迹法和RT-qPCR法分别检测踝关节滑膜组织中NOD样受体蛋白3 (NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1 (Caspase-1)、白细胞介素1 β (IL-1 β) 蛋白及mRNA表达水平; 免疫组化法检测踝关节滑膜组织中Caspase-1、IL-1 β 阳性表达; ELISA法检测血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-1 β 、白细胞介素6 (IL-6) 含量; 免疫荧光染色法观察踝关节滑膜组织中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 形成情况。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠各时间点关节肿胀度升高, 踝关节滑膜组织中炎症细胞浸润及滑膜细胞层数明显增多, NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 蛋白及mRNA表达均升高, Caspase-1和IL-1 β 阳性表达升高, NETs形成增多, 血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 秋水仙碱组与痛风汤高、中剂量组踝关节滑膜细胞增生及炎症细胞浸润均有改善; 秋水仙碱组与痛风汤高、中、低剂量组在造模24 h、48 h后关节肿胀度, 踝关节滑膜组织中Caspase-1、IL-1 β 阳性表达和NETs形成, 以及血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量均降低; 秋水仙碱与痛风汤高剂量组踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白及mRNA表达均降低 ($P < 0.05$)。秋水仙碱组和痛风汤高剂量组在降低踝关节滑膜组织中ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白及mRNA表达, Caspase-1阳性表达, 以及血清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量方面优于痛风汤低剂量组 ($P < 0.05$)。**结论** 痛风汤对急性痛风性关节炎有较好的防治作用, 其机制可能与抑制踝关节滑膜组织中NLRP3炎症小体的组装和激活, 抑制炎症因子的释放以及NETs的形成有关。**[关键词]** 痛风性关节炎; 踝关节; NOD样受体蛋白3; 炎症小体; 中性粒细胞胞外诱捕网; 痛风汤

急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 是一种由嘌呤代谢紊乱所诱发的代谢性风湿病, 主要为尿酸代谢障碍引起血液尿酸浓度过饱和, 造成单钠尿酸盐以结晶形式析出, 并沉积于关节滑膜囊

及周围组织, 导致局部出现不同程度的发热、灼痛、红肿, 多累及第一跖趾关节^[1]。目前我国痛风患病率呈上升趋势, 其中沿海地区的痛风患病率高于内陆^[2]。临床用于治疗 AGA 的药物主要包括非甾体类抗炎药、秋水仙碱等, 但部分药物对皮肤、消化道及心血管均有不同程度的影响^[3]。国医大师朱良春将痛风性关节炎的中医病名定义为“浊瘀痹”, 并提出“泄浊化瘀”治则, 拟定临床经验方

基金项目:国家自然科学基金(81874456);河南省中医药传承与创新人才工程(仲景工程)中医药学科拔尖人才项目;河南省中医药科学研究专项(20-21ZYD05);河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项(2021JDZX2079)

✉ 通讯作者:mq1678@163.com

痛风汤^[4-5], 经临床研究^[6-8]证实其能有效改善痛风的临床症状。现代研究认为, AGA 的发展与免疫反应密切相关^[9], 其中 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体的激活被认为是 AGA 炎症反应过程中的关键环节^[10]。基于此, 本研究从 NLRP3 炎症小体角度探讨痛风汤治疗 AGA 的可能作用机制, 为痛风汤的临床应用提供实验依据。本实验方案已通过河南中医药大学实验动物福利伦理委员会审批 (批准号: IACUC-202405057)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康 Wistar 雄性大鼠 60 只, 体质量 (180±10) g, 8 周龄, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010。饲养于河南中医药大学第二附属医院动物实验研究中心, 饲养环境为干燥、通风, 光暗周期 12 h, 温度 23~25 °C, 湿度 45%~55%, 自由进食饮水。

1.2 药物

痛风汤组成: 土茯苓 30 g, 萆薢 30 g, 蚕沙 30 g, 薏苡仁 30 g, 威灵仙 15 g, 车前子 15 g, 赤芍 15 g, 白芍 15 g, 白芥子 15 g, 法半夏 9 g, 僵蚕 12 g。以上药物由河南省中医院药剂科统一采购, 经主管药师鉴定为正品, 并由中药煎药室制成浓度为 1.134、2.268、4.536 g/ml 水煎液。秋水仙碱片 (0.5 mg/片, 批号: 20220302, 广东彼迪药业有限公司), 纯净水配制成浓度为 0.0315 mg/ml 混悬液。

1.3 主要试剂与仪器

尿酸钠 (批号: U8291)、4% 组织细胞固定液 (批号: P1110)、HE 染色试剂盒 (批号: G1120)、DAPI 染液 (批号: S2110)、蛋白酶抑制剂 (PMSF, 批号: P0100)、Trizol 试剂 (批号: R1100), 北京索莱宝科技有限公司; NLRP3 抗体 (批号: WLH3383)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 抗体 (批号: WL02462), 沈阳万类生物科技有限公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 抗体 (批号: 22915-1-AP-50)、 β -Actin 抗体 (批号: 66009-1-Ig)、弹性蛋白酶 2B (ELA2B) 多克隆抗体 (批号: 27642-1-AP)、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体 (批号: SA00001-1)、HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (批号: SA00001-2), 武汉三鹰生物技术有限公司; 白细胞介素 1 β (IL-1 β) 抗体 (批号: PAA563Ra08), 武汉云克隆科技股份有限公司; 肿瘤坏死因子 α

(TNF- α , 批号: MM-0047R1)、IL-1 β (批号: MM-0190R1)、白细胞介素 6 (IL-6, 批号: MM-0180R1) ELISA 试剂盒, 江苏酶免实业有限公司; 无水乙醇 (批号: 100092183), 国药集团化学试剂有限公司; 柠檬酸抗原修复液 (批号: G1202)、抗荧光淬灭封片剂 (批号: G1401), 武汉赛维尔生物科技有限公司; 抗 c-kit 兔单克隆抗体 (批号: Ab256345), 英国 Abcam 公司; 4% 多聚甲醛 (批号: BL539A), 广州硕谱生物科技有限公司; 免疫组化染色试剂盒 (批号: HR0725)、RIPA 组织裂解液 (批号: HT0520)、BCA 试剂盒 (批号: HC0801)、ECL 试剂盒 (批号: HC0802), 河南鼎瀚生物技术有限公司; 异氟烷 (批号: YS1412C), 上海雅吉生物科技有限公司; EDTA 脱钙液 (批号: B1056-100), 北京普利莱基因技术有限公司。

YB3002 型分析天平, 上海力能电子仪器公司; Donatello 型脱水机, 意大利 Diapath 公司; SYNERGY H1 型酶标仪, 美国 BioTek 公司; RM2016 型病理切片机, 上海徠卡仪器有限公司; NIKON ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; JB-P5 型包埋机, 武汉俊杰电子有限公司; IX73 型倒置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; 5430R 型超速冰冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; EPS-600Western 型电泳仪, 上海天能生命科学有限公司; PV-200 型足趾容积测量仪, 成都泰盟软件有限公司。

1.4 分组、造模及给药

将 60 只大鼠按照随机数字表法分为正常组、模型组、秋水仙碱组及痛风汤高、中、低剂量组, 每组 10 只。大鼠适应性喂养 1 周后, 按人与大鼠体表面积折算等效剂量换算^[11]计算出秋水仙碱组大鼠给予秋水仙碱 3.15×10⁻⁴g/(kg·d) 灌胃; 痛风汤低、中、高剂量组大鼠给予痛风汤 11.34、22.68、45.36 g/(kg·d) 灌胃, 痛风汤低剂量为临床等效剂量; 正常组和模型组大鼠给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 均每天 1 次, 连续 7 天。第 5 天灌胃 1 h 后, 除正常组外其余各组大鼠采用 2% 异氟烷吸入法麻醉大鼠, 参照改良 Coderre 法^[12], 对右侧后肢踝关节进行局部消毒, 使用 1 ml 医用注射器从右侧后肢踝关节外后方进针, 进针方向朝上与胫骨成 45° 角, 向关节腔内注射 0.2 ml 尿酸钠混悬液 (50 mg/ml) 诱导 AGA 模型; 正常组大鼠在相同位置注入 0.2 ml 生理盐水, 以大鼠踝关节腔对侧鼓起为度。通过关节肿胀度评估模型, 造模后大鼠关节肿胀度较正常组大鼠对比显著升高, 差异有统计学意义即判定为

模型复制成功^[13]。

1.5 观察指标与方法

第7天灌胃2 h后,采用2%异氟烷吸入法麻醉大鼠,腹主动脉取血于促凝管中,4℃、3500 r/min离心10 min(离心半径10 cm),收集上层血清并冻存于-80℃冰箱贮存备用。脱颈处死大鼠,分离每只大鼠右侧后肢踝关节并收集滑膜组织于冻存管中,-80℃冰箱保存备用。

1.5.1 HE染色观察大鼠踝关节滑膜组织病理学形态变化 大鼠踝关节滑膜组织用4%多聚甲醛固定,使用EDTA脱钙液脱钙,常规石蜡包埋、切片、HE染色、脱水、透明、封片,在显微镜下观察踝关节滑膜组织病理学形态变化。

1.5.2 大鼠踝关节肿胀度 关节肿胀度测定分别于造模前及造模6 h、12 h、24 h、48 h后进行,参考文献[13]中方法,采用足趾容积测量仪测量大鼠右侧后肢踝关节排水体积,评估大鼠关节肿胀度。关节肿胀度=(测试时间点关节排水体积-初始关节排水体积)/造模前关节排水体积×100%。

1.5.3 免疫印迹法检测踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β蛋白表达 采用随机数字表法每组选取3只大鼠踝关节滑膜组织,每只大鼠取0.5 g,置于研磨器内,加入RIPA组织裂解液和蛋白酶抑制剂(PMSF)于冰上充分研磨、裂解,在4℃、12 000 r/min离心15 min(离心半径6.5 cm)后,收集上清液,BCA试剂盒检测蛋白浓度;将备好的蛋白样品依次电泳、转膜、封闭1 h,4℃孵育过夜,相应一抗稀释比例为NLRP3(1:1000)、ASC(1:500)、Caspase-1(1:1000)、IL-1β(1:500)及β-actin(1:5000)。TBST洗膜3次,用HRP标记的二抗IgG(稀释比例为1:8000)室温孵育1 h,ECL试剂盒显色,Image J 1.51软件分析目标蛋白灰度值,以目的蛋白与内参β-actin灰度值比值作为结果。

1.5.4 RT-qPCR法检测踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β mRNA表达 采用随机数字表法每组选取3只大鼠踝关节滑膜组织,每只大鼠取0.3 g,按照试剂盒说明书用Trizol法提取大鼠滑膜组织总RNA,经过分析RNA纯度及浓度后,设置聚合酶链反应条件为95℃预反应30 s,95℃变性13 s,60℃退火延伸31 s,共扩增循环40次,结果通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1β mRNA相对表达量。引物由苏州金唯智有限公司合成,NLRP3:上游CTGCAGAGCCTACAGTTGGG,

下游ACCCTACACTAAAAGCGCCC,产物大小228 bp;Caspase-1:上游TCCAGGAGGGAATATGTGGGA,下游ACTCCTTGTTTCTCTCCACGG,产物大小160 bp;ASC:上游GGCACAGCCAGAACAGAACA,下游ACGAAGTGCCTGGTACTGTC,产物大小132 bp;IL-1β:上游TGTCTGACCCATGTGAGCTG,下游TTTGGGATCCACACTCTCCAG,产物大小206 bp;GAPDH:上游AACTCCCATTCTTCCACCT,下游TTGTCATACCAGGAAATGAGC,产物大小83 bp。

1.5.5 免疫组化法检测踝关节滑膜组织中Caspase-1、IL-1β阳性表达 采用随机数字表法每组选取3只大鼠踝关节滑膜组织石蜡切片,60℃烤箱烤片2 h,将切片经二甲苯及梯度乙醇脱蜡水化,滴加抗原修复液修复后,将切片置于内源性过氧化物酶阻断剂中封闭10 min,PBS冲洗3 min×3次,分别滴加Caspase-1(稀释比例为1:1000)、IL-1β(稀释比例为1:500)一抗,37℃孵育60 min,PBS冲洗3 min×3次,滴加反应增强液37℃孵育20 min;滴加HRP酶标记羊抗兔聚合物,37℃孵育20 min,PBS清洗3次后滴加DAB显色液显色,苏木精复染5 min,依次梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,于显微镜下观察大鼠踝关节滑膜组织中Caspase-1及IL-1β阳性表达。结果判定:以细胞质中出现淡黄至褐黄色颗粒状着色者为阳性细胞,通过Image J 1.51软件定量分析Caspase-1、IL-1β阳性表达。

1.5.6 ELISA法检测血清中炎症因子含量 采用随机数字表法每组选取5只大鼠血清,室温解冻,使用ELISA试剂盒测定血清中TNF-α、IL-6、IL-1β含量,操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.5.7 免疫荧光染色法观察大鼠踝关节滑膜组织中中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)形成情况 大鼠踝关节滑膜组织石蜡切片室温封闭30 min后,加入ELA2B多克隆抗体(稀释比例为1:200),4℃孵育过夜。加入TRITC标记抗兔二抗(稀释比例为1:250),避光室温孵育50 min。PBS洗涤3次,DAPI染液复染标记细胞核DNA,避光室温孵育10 min。抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜采集图像,参考中性粒细胞衍生蛋白和细胞外DNA的共定位方法评估NETs的表达^[14]。NE染色与DNA染色重合的部位代表形成的NETs,即共定位的方法观察NETs的形成状况,使用Image J 1.51软件分析计算NE染色与DNA染色重合的阳性区域面积,表示NETs形成的百分率。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，计量资料均符合正态分布，采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐者多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验，方差不齐者采用 Kruskal-Wallis *H* 秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠踝关节滑膜组织病理学形态变化比较

图 1 示，正常组滑膜组织细胞排列有序，间距疏松且结构清晰，无炎症细胞浸润，无血管充血、滑膜增生等现象。与正常组比较，模型组滑膜组织

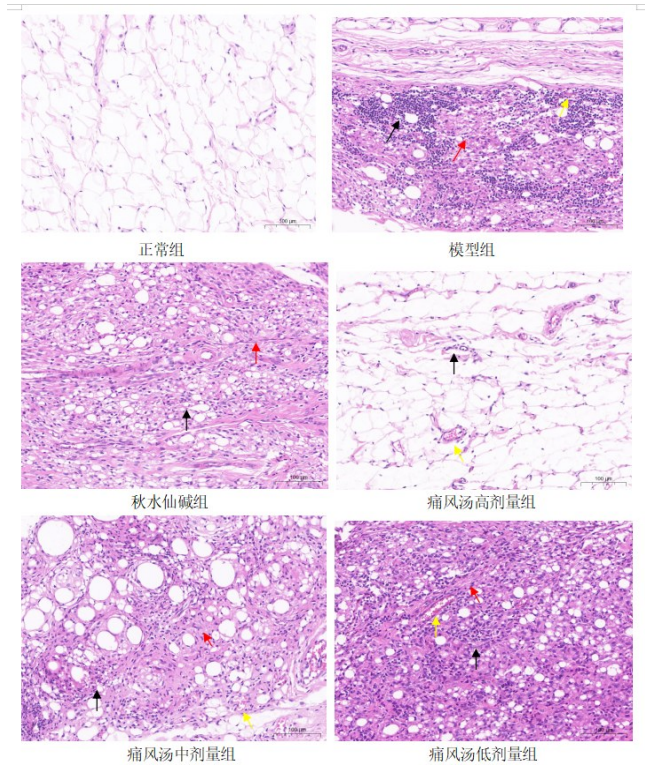
有大量炎症细胞浸润，可见大量淋巴细胞聚集成团，滑膜细胞层数明显增多，排列紊乱，血管增生、纤维组织增生明显，表明造模成功。与模型组比较，痛风汤高剂量组可见部分血管增生，滑膜细胞层数基本正常，炎症细胞浸润改善明显，仅有轻微血管充血。痛风汤中剂量组与秋水仙碱组相似，可见部分血管增生，滑膜细胞有增生，炎症细胞浸润程度较模型组改善明显。痛风汤低剂量组可见明显炎症细胞浸润，血管充血和纤维组织增生，病理改善程度较模型组不明显。

2.2 各组大鼠造模后不同时间点踝关节肿胀度比较

表 1 示，与正常组同时时间点比较，模型组大鼠在造模 6 h、12 h、24 h、48 h 后踝关节肿胀度均升高 ($P<0.05$)，且在造模 24 h 后达到高峰。与模型组同时时间点比较，在造模 6 h 后秋水仙碱组和痛风汤高剂量组踝关节肿胀度降低，在造模 12 h 后秋水仙碱组和痛风汤中剂量组踝关节肿胀度降低，在造模 24 h、48 h 后秋水仙碱组和痛风汤高、中、低剂量组踝关节肿胀度均降低 ($P<0.05$)。秋水仙碱组与痛风汤高、中、低剂量组各时间点踝关节肿胀度比较，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠踝关节滑膜组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达比较

表 2 示，与正常组比较，模型组大鼠踝关节滑膜组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，秋水仙碱组和痛风汤高剂量组 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达降低，痛风汤中剂量组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达降低，痛风汤低剂量组 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与秋水仙碱组比较，痛风汤高剂量组 ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达升高，痛风汤中、低剂量组 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与痛风汤高剂量组比较，痛风汤中剂量组 ASC 蛋白表



注：图中黑色箭头指示炎症细胞浸润，黄色箭头指示血管增生，红色箭头指示纤维组织增生。

图 1 各组大鼠踝关节滑膜组织病理学形态(HE 染色,×200)
Figure 1 Histopathological morphology of the synovial membrane of the ankle joint of rats in each group (HE staining, ×200)

表 1 各组大鼠造模后不同时间点踝关节肿胀度比较

Table 1 Comparison of ankle joint swelling at different time points after modelling in rats of each group (% , $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	6 h	12 h	24 h	48 h
正常组	10	10.67±9.30	12.31±8.45	11.67±10.08	8.95±5.68
模型组	10	55.33±32.19 ^{a)}	72.54±46.42 ^{a)}	73.44±42.99 ^{a)}	68.63±44.69 ^{a)}
秋水仙碱组	10	31.63±14.78 ^{b)}	43.36±10.08 ^{b)}	37.67±14.08 ^{b)}	30.99±15.01 ^{b)}
痛风汤高剂量组	10	37.21±18.75 ^{b)}	52.73±22.85	36.85±15.70 ^{b)}	29.55±16.85 ^{b)}
痛风汤中剂量组	10	42.76±10.97	51.60±10.89 ^{b)}	44.93±10.02 ^{b)}	34.63±8.91 ^{b)}
痛风汤低剂量组	10	45.39±11.63	57.63±12.03	52.21±9.12 ^{b)}	47.51±10.58 ^{b)}

注：a) 与正常组同时时间点比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组同时时间点比较， $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达比较

Table 2 Comparison of protein expression of NLRP3, ASC, Caspase-1 and IL-1 β in synovial tissues of ankle joints of rats in various groups (/ β -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NLRP3	ASC	Caspase-1	IL-1 β
正常组	3	1.00 $\pm$ 0.22	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.09
模型组	3	3.86 $\pm$ 0.46 ^{a)}	1.85 $\pm$ 0.05 ^{a)}	3.90 $\pm$ 0.38 ^{a)}	3.89 $\pm$ 0.37 ^{a)}
秋水仙碱组	3	1.65 $\pm$ 0.45 ^{b)}	0.46 $\pm$ 0.07 ^{b)}	0.75 $\pm$ 0.17 ^{b)}	0.81 $\pm$ 0.18 ^{b)}
痛风汤高剂量组	3	2.14 $\pm$ 0.51 ^{b)}	0.80 $\pm$ 0.05 ^{b) c)}	1.33 $\pm$ 0.17 ^{b) c)}	1.35 $\pm$ 0.03 ^{b) c)}
痛风汤中剂量组	3	2.57 $\pm$ 0.64 ^{b) c)}	1.71 $\pm$ 0.29 ^{c) d)}	1.61 $\pm$ 0.36 ^{b) c)}	1.69 $\pm$ 0.21 ^{b) c)}
痛风汤低剂量组	3	2.95 $\pm$ 0.67 ^{c)}	1.80 $\pm$ 0.09 ^{c) d)}	2.05 $\pm$ 0.41 ^{b) c) d)}	2.13 $\pm$ 0.34 ^{b) c) d) e)}

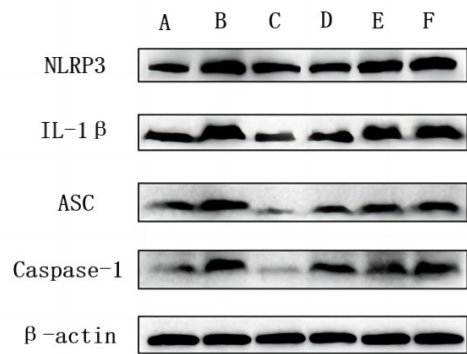
注：NLRP3，NOD样受体蛋白3；ASC，凋亡相关斑点样蛋白；Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1；IL-1 β ，白细胞介素1 β 。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与秋水仙碱组比较， $P<0.05$ ；d) 与痛风汤高剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与痛风汤中剂量组比较， $P<0.05$ 。

达升高，痛风汤低剂量组ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达升高（ $P<0.05$ ）。与痛风汤中剂量组比较，痛风汤低剂量组IL-1 β 蛋白表达升高（ $P<0.05$ ）。其中，痛风汤各剂量组均能降低IL-1 β 蛋白表达，且呈一定的剂量依赖性。各组大鼠踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白电泳图见图2。

2.4 各组大鼠踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA表达比较

表3示，与正常组比较，模型组大鼠踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA表达升高（ $P<0.05$ ）。与模型组比较，秋水仙碱组与痛风汤高剂量组NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA表达降低，痛风汤中剂量组NLRP3、ASC、IL-1 β mRNA表达降低，痛风汤低剂量组NLRP3、ASC mRNA表达降低（ $P<0.05$ ）。与秋水仙碱组和痛风汤高剂量组比较，痛风汤中剂量组



注：A，正常组；B，模型组；C，秋水仙碱组；D，痛风汤高剂量组；E，痛风汤中剂量组；F，痛风汤低剂量组；NLRP3，NOD样受体蛋白3；IL-1 β ，白细胞介素1 β ；ASC，凋亡相关斑点样蛋白；Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1。

图2 各组大鼠踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis of NLRP3, ASC, Caspase-1 and IL-1 β proteins in synovial tissues of ankle joints of rats in each group

表3 各组大鼠踝关节滑膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA表达比较

Table 3 Comparison of mRNA expression of NLRP3, ASC, Caspase-1 and IL-1 β in synovial tissues of ankle joints of rats in each group ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NLRP3 mRNA	ASC mRNA	Caspase-1 mRNA	IL-1 β mRNA
正常组	3	1.00 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.23	1.01 $\pm$ 0.19	1.02 $\pm$ 0.25
模型组	3	12.18 $\pm$ 4.39 ^{a)}	28.41 $\pm$ 5.82 ^{a)}	9.19 $\pm$ 2.54 ^{a)}	17.90 $\pm$ 2.85 ^{a)}
秋水仙碱组	3	1.53 $\pm$ 0.22 ^{b)}	1.58 $\pm$ 1.21 ^{b)}	1.16 $\pm$ 0.51 ^{b)}	2.09 $\pm$ 0.24 ^{b)}
痛风汤高剂量组	3	1.08 $\pm$ 0.25 ^{b)}	1.85 $\pm$ 1.11 ^{b)}	1.27 $\pm$ 0.67 ^{b)}	1.80 $\pm$ 0.75 ^{b)}
痛风汤中剂量组	3	2.40 $\pm$ 1.19 ^{b)}	3.90 $\pm$ 2.89 ^{b) c)}	6.02 $\pm$ 3.34 ^{c) d)}	5.42 $\pm$ 2.26 ^{b) c) d)}
痛风汤低剂量组	3	5.97 $\pm$ 2.85 ^{b) c) d)}	9.90 $\pm$ 3.12 ^{b) c) d) e)}	9.11 $\pm$ 3.49 ^{c) d)}	15.32 $\pm$ 2.47 ^{c) d) e)}

注：NLRP3，NOD样受体蛋白3；ASC，凋亡相关斑点样蛋白；Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1；IL-1 β ，白细胞介素1 β 。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与秋水仙碱组比较， $P<0.05$ ；d) 与痛风汤高剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与痛风汤中剂量组比较， $P<0.05$ 。

Caspase-1、IL-1β mRNA 表达升高，痛风汤低剂量组 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。与痛风汤中剂量组比较，痛风汤低剂量组 ASC、IL-1β mRNA 表达升高($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠踝关节滑膜组织中 Caspase-1、IL-1β 阳性表达比较

表 4 示，与正常组比较，模型组大鼠踝关节滑膜组织中 Caspase-1、IL-1β 阳性表达升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，秋水仙碱组与痛风汤高、中、低剂量组 Caspase-1、IL-1β 阳性表达降低 ($P<0.05$)。与秋水仙碱组比较，痛风汤中、低剂量组 Caspase-1 阳性表达升高，痛风汤高剂量组 IL-1β 阳性表达降低 ($P<0.05$)。与痛风汤高剂量组比较，痛风汤低剂量组 Caspase-1、IL-1β 阳性表达升高 ($P<0.05$)。与痛风汤中剂量组比较，痛风汤低剂量组 IL-1β 阳性表达升高 ($P<0.05$)。

表 4 各组大鼠踝关节滑膜组织中 Caspase-1、IL-1β 阳性表达比较

Table 4 Comparison of positive expression of Caspase-1 and IL-1β in synovial tissues of ankle joints of rats in each group (AOD 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Caspase-1	IL-1β
正常组	3	6.24±2.71	2.55±0.55
模型组	3	35.30±2.51 ^{a)}	23.86±5.22 ^{a)}
秋水仙碱组	3	8.84±1.95 ^{b)}	11.19±2.12 ^{b)}
痛风汤高剂量组	3	12.92±3.21 ^{b)}	6.12±2.44 ^{b) c)}
痛风汤中剂量组	3	16.62±1.63 ^{b) c)}	9.79±2.49 ^{b)}
痛风汤低剂量组	3	22.67±7.92 ^{b) c) d)}	15.14±1.98 ^{b) d) e)}

注：Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1；IL-1β，白细胞介素 1β。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与秋水仙碱组比较， $P<0.05$ ；d) 与痛风汤高剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与痛风汤中剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.6 各组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量比较

表 5 示，与正常组比较，模型组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-1β 升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，秋水仙碱组与痛风汤高、中、低剂量组 TNF-α、IL-6、IL-1β 降低 ($P<0.05$)。与秋水仙碱组比较，痛风汤高剂量组 TNF-α 降低，IL-6、IL-1β 升高；痛风汤中剂量组 IL-6、IL-1β 升高；痛风汤低剂量组 TNF-α、IL-6、IL-1β 升高 ($P<0.05$)。与痛风汤高剂量组比较，痛风汤中、低剂量组 TNF-α、IL-6、IL-1β 升高 ($P<0.05$)。与痛风汤中剂量组比较，痛风汤低剂量组 TNF-α、IL-6、IL-1β 升高 ($P<0.05$)。

2.7 各组大鼠踝关节滑膜组织中 NETs 形成比较

染色后，中性粒细胞细胞核呈蓝色，NE 呈红色。表 6 示，与正常组比较，模型组大鼠踝关节滑膜组织中 NETs 形成增多 ($P<0.05$)。与模型组比较，秋水仙碱组和痛风汤高、中、低剂量组 NETs 形成均减少 ($P<0.05$)。与痛风汤低剂量组比较，痛风汤高、中剂量组 NETs 形成减少 ($P<0.05$)。秋水仙碱组与痛风汤高、中、低剂量组 NETs 形成比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 6 各组大鼠踝关节滑膜组织中 NETs 形成比较

Table 6 Comparison of NETs formation in synovial tissues of ankle joints of rats in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NETs
正常组	3	3.81±0.39
模型组	3	12.23±1.78 ^{a)}
秋水仙碱组	3	4.59±0.86 ^{b)}
痛风汤高剂量组	3	2.59±0.07 ^{b) c)}
痛风汤中剂量组	3	2.72±0.61 ^{b) c)}
痛风汤低剂量组	3	6.14±1.85 ^{b)}

注：NETs，中性粒细胞胞外诱捕网。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与痛风汤低剂量组比较， $P<0.05$ 。

表 5 各组大鼠血清炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量比较

Table 5 Comparison of serum inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-6 levels in rats of each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TNF-α	IL-1β	IL-6
正常组	5	215.90±14.15	29.01±1.70	108.39±3.92
模型组	5	443.41±22.94 ^{a)}	115.86±1.55 ^{a)}	151.63±3.59 ^{a)}
秋水仙碱组	5	278.04±8.48 ^{b)}	31.27±0.67 ^{b)}	91.79±4.67 ^{b)}
痛风汤高剂量组	5	238.38±12.47 ^{b) c)}	34.73±1.93 ^{b) c)}	104.27±3.97 ^{b) c)}
痛风汤中剂量组	5	276.56±11.46 ^{b) d)}	46.20±1.11 ^{b) c) d)}	115.57±2.07 ^{b) c) d)}
痛风汤低剂量组	5	317.59±17.13 ^{b) c) d) e)}	73.33±3.99 ^{b) c) d) e)}	124.75±4.92 ^{b) c) d) e)}

注：TNF-α，肿瘤坏死因子 α；IL-1β，白细胞介素 1β；IL-6，白细胞介素 6。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与秋水仙碱组比较， $P<0.05$ ；d) 与痛风汤高剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与痛风汤中剂量组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

AGA 属于代谢性风湿病, 体内嘌呤代谢紊乱导致血尿酸浓度过高, 从而产生尿酸盐晶体在关节腔和周围组织中聚集和沉淀, 导致炎症因子快速释放和中性粒细胞大量浸润, 形成免疫级联反应, 从而诱发痛风炎症的出现^[15]。中医学将 AGA 归属于“痹病”“历节风”范畴, 历代医家认为本病多为外邪或湿热、郁火致病, 治疗多采用清热利湿解毒、逐瘀通络法为主^[16]。国医大师朱良春认为本病多因脏腑功能失调, 清浊升降失司, 导致病理产物积聚, 经脉气血痹阻, 凝为浊瘀, 阻滞筋脉关节, 故提出“泄浊化瘀”治则^[5]。痛风汤由朱良春根据泄浊化瘀法拟定, 方中土茯苓益肾敛精, 健脾除湿; 萆薢祛风除痹, 分清泄浊; 蚕沙祛湿活血, 和胃降浊; 威灵仙消痰癖积, 祛湿止痛; 车前子利水渗湿, 清热祛痰; 薏苡仁健脾利湿, 除痹散结; 赤芍清热散瘀止痛; 白芍祛湿活血止痛; 白芥子、法半夏、僵蚕化痰散结软坚。全方共奏泄浊化瘀、调益脾肾之功。既往研究^[6-7]表明, 痛风汤能有效控制痛风性关节炎临床症状, 具有改善关节疼痛红肿、恢复关节功能、抗尿酸和降低血沉等作用。

本研究通过改良 Coderre 法^[12]建立 AGA 大鼠模型, 以治疗痛风性关节炎的常用药物秋水仙碱作为阳性对照药物, 分析高、中、低三种不同剂量痛风汤的干预效果。本研究结果表明, 模型组大鼠在造模 6 h、12 h、24 h、48 h 后踝关节显著肿胀, 提示 AGA 造模成功。在造模后 24 h、48 h, 秋水仙碱组和痛风汤各剂量组大鼠踝关节肿胀度较模型组明显降低。病理结果显示, 模型组大鼠踝关节滑膜组织出现大量炎症细胞浸润, 滑膜细胞层数明显增多, 排列紊乱, 纤维组织增生明显, 而高、中剂量痛风汤与秋水仙碱均可改善 AGA 大鼠踝关节滑膜组织增生及炎症细胞浸润的情况, 其中高剂量痛风汤和秋水仙碱改善作用最为明显。以上结果提示痛风汤对 AGA 模型大鼠具有一定抗炎消肿的作用。

现代研究认为, AGA 的发病和发展与 NLRP3 炎性小体的激活及其介导的促炎细胞因子联系最为密切^[9]。单钠尿酸盐结晶被局部驻留的固有免疫细胞感知和吞噬后, 激活 NLRP3, 进而调节下游炎症细胞因子如 IL-1 β 、IL-6 等的成熟和释放, 参与痛风炎症级联过程^[17]。NALP3 炎症小体属于 NOD 样受体蛋白家族, 其由 NLRP3 支架、ASC 和效应蛋白 Caspase-1 三部分组成^[18]。当受到单钠尿酸盐

结晶的刺激后, NLRP3 炎症小体作为痛风炎症发作时 IL-1 β 激活的开关, 开启炎症小体的组装和 Caspase-1 的激活, 从而使无活性的白细胞介素 1 (IL-1) 前体水解成为成熟的 IL-1 β ^[19]。成熟的 IL-1 β 与 IL-1 β 受体相互作用, 触发免疫细胞产生如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等各种促炎性细胞因子, 有利于募集中性粒细胞, 其中 IL-1 β 被认为是 AGA 发作的核心促炎性细胞因子^[20]。大量被募集的中性粒细胞、单核吞噬细胞等多种固有免疫细胞浸润参与痛风的炎症反应, 导致急性炎症发作的持续和反复^[21]。由此可见, NLRP3 炎症小体的激活与 IL-1 β 的释放在 AGA 炎症反应过程中起到关键作用。

本研究结果显示, 相较于正常组, 模型组大鼠踝关节滑膜组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达均显著升高, 血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量显著升高, 说明 AGA 大鼠模型成功诱导了 NLRP3 炎症小体的组装和激活, 引发了炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的释放, 导致 AGA 的发生。经过高剂量痛风汤与秋水仙碱干预, 大鼠踝关节滑膜组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达均显著降低; 痛风汤各剂量均能降低 IL-1 β 蛋白表达水平, 且痛风汤在降低 IL-1 β 蛋白表达方面呈现剂量依赖性。同时, 秋水仙碱组和痛风汤各剂量组血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量均显著降低, 且痛风汤各剂量组在降低炎症因子方面呈剂量依赖性。NLRP3 炎症小体的组装离不开 Caspase-1 的激活以及成熟 IL- β 的释放^[10], 因此有必要进一步验证痛风汤对 Caspase-1 和 IL-1 β 表达的影响。通过免疫组化染色结果发现, 痛风汤各剂量组与秋水仙碱组踝关节滑膜组织中 Caspase-1 和 IL-1 β 阳性表达降低。以上结果共同提示, 痛风汤通过遏制 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达, 尤其是 IL-1 β 和 Caspase-1 的表达水平, 并抑制炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的释放来发挥抗炎作用, 从而缓解 AGA 的炎症反应。

随着深入的研究, 中性粒细胞被包括单钠尿酸盐结晶在内的各种感染性、促炎刺激后会导致 NETs 的形成^[22]。中性粒细胞作为参与 AGA 过程中重要的固有免疫细胞之一^[23], 其通过吞噬单钠尿酸盐结晶所释放的早期的 NETs, 扩增了 AGA 的局部炎症反应^[3, 24]。在痛风急性发作期, 成熟的 IL-1 β 通过诱导中性粒细胞释放大量 NETs, NETs 通过暴露自身成分激活和招募免疫细胞, 进而驱动或放大大局急性免疫反应^[25]。因此, 本课题组认为对

NETs 的有效干预在 AGA 的治疗过程中具有重要意义, 而 NLRP3 炎症小体、IL-1 β 和 NETs 之间在痛风性关节炎的发生、发展过程中可能有着紧密联系。本研究免疫组织荧光结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠踝关节滑膜组织中 NETs 形成明显增多, 提示本研究采用的改良 Coderre 法上调了 AGA 大鼠踝关节滑膜组织中 NETs 的表达; 与模型组比较, 痛风汤各剂量组大鼠踝关节滑膜组织中 NETs 形成均降低, 提示痛风汤可通过有效下调 AGA 模型大鼠踝关节滑膜组织中 NETs 的释放, 以缓解 AGA 的炎症反应。

综上所述, 本研究结果显示痛风汤在 AGA 大鼠模型中具有改善关节病理状态及炎症反应的作用。痛风汤发挥抗 AGA 的机制可能通过下调 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达、抑制 IL-1 β 等相关炎症因子的释放及 NETs 的形成有关。本研究为痛风汤的临床应用提供了实验依据, 但本研究对于痛风汤作用机制的研究尚处初步阶段, 同时 NLRP3 炎症小体与其上游调控分子机制或 NETs 之间深层的关系尚未完全明确, 后续有待进一步的探索和验证, 为痛风汤的临床应用和机制研究提供更多依据。

参考文献

- [1] 中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会. 痛风及高尿酸血症中西医结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2023, 64(1): 98-106.
- [2] 杨丽华, 刘晓丽, 蒋雅琼, 等. 我国痛风的患病率及危险因素[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(12): 4-6, 10.
- [3] 中国民族卫生协会重症代谢疾病分会, 高尿酸血症相关疾病诊疗多学科共识专家组. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识(2023年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2023, 43(6): 461-480.
- [4] 朱婉华, 顾冬梅, 蒋恬, 等. 浊瘀痹: 痛风中医病名探讨[J]. 中医杂志, 2011, 52(17): 1521-1522.
- [5] 孟庆良, 张子扬, 苗喜云. 朱良春泄浊化瘀法治疗痛风性关节炎经验[J]. 中医杂志, 2017, 58(16): 1368-1370.
- [6] 孟庆良, 王西彬, 郑福增. 中西医结合治疗痛风性关节炎 105 例疗效观察[J]. 中医正骨, 2006, 18(4): 14-15, 80.
- [7] 蒋恬, 顾冬梅, 张爱红. 泄浊化瘀法治疗痛风性关节炎临床观察[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(1): 65-69.
- [8] 纪璇. 朱良春痛风汤治疗间歇期痛风的临床疗效观察并基于网络药理学的潜在机制探讨[D]. 汕头: 汕头大学, 2021.
- [9] DALBETH N, MERRIMAN TR, STAMP LK. Gout [J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2039-2052.
- [10] 张春泽, 苏娟. NLRP3 炎症小体及血管细胞黏附分子-1 在痛风性关节炎中的研究进展[J]. 中国医学创新, 2022, 19(30): 174-177.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1861.
- [12] CODERRE TJ, WALL PD. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1988, 29(3): 461-466.
- [13] 黑晓晶, 吕耀中, 李良, 等. 基于 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路探讨独活醇提物对 MSU 诱导的痛风性关节炎的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13): 79-87.
- [14] MASUDA S, NAKAZAWA D, SHIDA H, et al. NETosis markers: quest for specific, objective, and quantitative markers[J]. Clin Chim Acta, 2016, 459: 89-93. doi: 10.1016/j.cca.2016.05.029.
- [15] ZHANG YJ, ZHANG N, SONG H, et al. Design, characterization and comparison of transdermal delivery of colchicine via borneol-chemically-modified and borneol-physically-modified ethosome[J]. Drug Deliv, 2019, 26(1): 70-77.
- [16] 朱婉华, 张爱红, 顾冬梅, 等. 痛风性关节炎中医证候分布规律探讨[J]. 中医杂志, 2012, 53(19): 1667-1670.
- [17] CHATFIELD SM, GREBE K, WHITEHEAD LW, et al. Monosodium urate crystals generate nuclease-resistant neutrophil extracellular traps via a distinct molecular pathway[J]. J Immunol, 2018, 200(5): 1802-1816.
- [18] SIDIROPOULOS PI, GOULIELMOS G, VOLOUDAKIS GK, et al. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(10): 1382-1389.
- [19] MARTINON F, PETRILLI V, MAYOR A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. Nature, 2006, 440(7081): 237-241.
- [20] MITROULIS I, KAMBAS K, CHRYSANTHOPOULOU A, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29318.
- [21] PEREZ-RUIZ F, CASTILLO E, CHINCHILLA SP, et al. Clinical manifestations and diagnosis of gout[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2014, 40(2): 193-206.
- [22] MITROULIS I, KAMBAS K, CHRYSANTHOPOULOU A, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29318.
- [23] SIL P, WICKLUM H, SURELL C, et al. Macrophage-

derived IL-1 β enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation[J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(3): 227–237.

[24] MAHAJAN A, GRÜNEBOOM A, PETRU L, et al. Front-line science: aggregated neutrophil extracellular traps prevent inflammation on the neutrophil-rich ocular surface

[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 105(6): 1087–1098.

[25] LI Y, CAO X, LIU Y, et al. Neutrophil extracellular traps formation and aggregation orchestrate induction and resolution of sterile crystal-mediated inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1559. doi: 10.3389/fimmu.2018.01559.

Effect of *Tongfeng Decoction* (痛风汤) on NLRP3 Inflammatory Vesicles and Neutrophil Extracellular Traps in Synovial Tissues of Ankle Joints in Acute Gouty Arthritis Model Rats

DENG Yongzheng¹, MENG Qingliang², MA Junfu², CUI Jiakang², LI Kai³, WANG Gengfeng¹, SONG Chenyang¹, BIAN Hua³

1. College of Traumatology and Orthopedics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450053; 2. Henan Province Hospital of TCM (The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine); 3. Nanyang Institute of Technology

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Tongfeng Decoction* (痛风汤) for preventing and treating acute gouty arthritis. **Methods** Sixty Wistar male rats were divided into normal group, model group, colchicine group and low-, medium- and high-dose *Tongfeng Decoction* groups according to the random number table, 10 rats in each group. *Tongfeng Decoction* of 11.34, 22.68 and 45.36 g/kg were given by gavage to low-, medium- and high-dose *Tongfeng Decoction* groups, colchicine 3.15×10^{-4} g/(kg·d) to the colchicine group, and normal saline 10 ml/(kg·d) to the normal group and model group respectively for 7 consecutive days. After 1 hour of gavage on day 5, rats in all groups except the normal group were modelled as acute gouty arthritis in the ankle joint of the right hind limb with the modified Coderre's method; rats in the normal group were injected with 0.2 ml of normal saline at the same location. The swelling degree of the ankle joint was measured before modelling and after 6 h, 12 h, 24 h and 48 h of modelling, respectively. HE staining was used to observe the histopathological and morphological changes in the synovial tissue of the ankle joint; immunoblotting and RT-qPCR were used to detect NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), cysteine aspartate protease 1 (Caspase-1), and interleukin 1 β (IL-1 β) protein and mRNA expression levels in ankle synovial tissues, respectively; immunohistochemistry was used to detect the positive expression of Caspase-1 and IL-1 β in ankle synovial tissues; ELISA was used to detect the tumour necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1 β , and interleukin in serum; immunofluorescence staining was used to observe the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in the synovial tissues of the ankle joints. **Results** Compared with the normal group, rats in the model group showed elevated joint swelling at all time points, significantly increased inflammatory cell infiltration and the number of synovial cell layers in the synovial tissues of the ankle joints, elevated NLRP3, Caspase-1, ASC and IL-1 β protein and mRNA expression, elevated positive expression of Caspase-1 and IL-1 β , increased formation of NETs, and elevation of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum ($P < 0.05$). Compared with the model group, there was an improvement in synovial cell proliferation and inflammatory cell infiltration of the ankle joint in the colchicine group, high- and medium-dose *Tongfeng Decoction* groups. In the colchicine group and the high-, medium- and low-dose *Tongfeng Decoction* groups, the degree of joint swelling, positive expression of Caspase-1, IL-1 β and formation of NETs in the synovial tissue of the ankle joint, and TNF- α , IL-6 and IL-1 β in serum reduced 24 h and 48 h after modelling; in colchicine group and high-dose *Tongfeng Decoction* group, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β protein and mRNA expression in the synovial tissues of ankle joints all reduced ($P < 0.05$). The colchicine group and high-dose *Tongfeng Decoction* group were superior to the low-dose *Tongfeng Decoction* group in reducing ASC, Caspase-1, IL-1 β protein and mRNA expression in the ankle synovial tissues, the positive expression of Caspase-1, as well as TNF- α , IL-6, and IL-1 β level in serum ($P < 0.05$). **Conclusion** *Tongfeng Decoction* showed effectiveness for the prevention and treatment of acute gouty arthritis, and its mechanism may be related to the inhibition of the assembly and activation of NLRP3 inflammatory vesicles in ankle synovial tissues, the inhibition of the release of inflammatory factors, and the formation of NETs.

Keywords gouty arthritis; ankle joint; NOD-like receptor protein 3; inflammatory vesicles; neutrophil extracellular traps; *Tongfeng Decoction* (痛风汤)

(收稿日期: 2024-04-01; 修回日期: 2024-05-30)

[编辑: 邓媛]