

实验研究

资生肾气丸对痛风性关节炎大鼠 IL-1 表达水平的影响

韩洁茹¹ 解颖¹ 刘淑兰¹ 孟璐¹ 王书惠²

(1 黑龙江中医药大学, 哈尔滨, 150040; 2 牡丹江医学院附属红旗医院, 牡丹江, 157011)

摘要 目的:观察资生肾气丸对痛风性关节炎大鼠血清中白介素 1 β (IL-1 β)及大鼠滑膜半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶-1(Caspase-1)的表达水平的影响,探讨资生肾气丸防治痛风性关节炎(GA)的作用机制。方法:将 84 只 SD 大鼠随机分为 7 组:空白组、模型组、中药痛风舒对照组、西药秋水仙碱对照组及资生肾气丸复方低、中、高剂量组,每组 12 只。采用尿酸钠联合氧嗪酸钾诱导大鼠痛风性关节炎模型,应用 ELISA 方法检测各组大鼠血清中 IL-1 β 含量,应用免疫组化方法检测大鼠滑膜 Caspase-1 含量。结果:模型组和空白组 IL-1 β 、Caspase-1 含量差异有统计学意义($P < 0.01$);西药秋水仙碱对照组、资生肾气丸复方低、中、高剂量组 IL-1 β 和 Caspase-1 含量与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);中药中剂量组与痛风舒对照组比较,IL-1 β 、Caspase-1 含量差异有统计学意义($P < 0.01$),但与西药对照组比较差异无统计学意义($P > 0.01$)。结论:资生肾气丸可影响痛风性关节炎大鼠 IL-1 β 和 Caspase-1 表达,对痛风性关节炎具有防治作用。

关键词 痛风性关节炎;资生肾气丸;IL-1 β ;Caspase-1;实验研究

Effect of Zisheng Shenqi Decoction on Expression of IL-1 β and Caspase-1 in Gouty Arthritis Rats

Han Jieru¹, Xie Ying¹, Liu Shulan¹, Meng Lu¹, Wang Shuhui²

(1 Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China; 2 Department of urinary surgery, Mudanjiang Medical University affiliated Hongqi Hospital, Mudanjiang 157011, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Zisheng Shenqi Decoction on expression of IL-1 β and Caspase-1 in gouty arthritis rats and to explore the mechanism of Zisheng Shenqi Decoction in the treatment of GA. **Methods:** Eighty four rats were randomly divided into seven groups: blank control group, model group, herbal control group, western medicine control group, high dosage herbal group, medium dosage herbal group and low dosage herbal group, twelve rats in each group. The uric acid sodium and oxygen polybenzoxazines potassium were used to induce rat gouty arthritis model. ELISA was used to detect the concentration of serum IL-1 β in rats and analyze the data. Using immunohistochemical method to detect the contents of synovial Caspase-1 in rats. **Results:** The differences of IL-1 β and Caspase-1 level between model group and blank group had statistical significance($P < 0.01$). The expression of IL-1 β and Caspase-1 in model group was also apparently different from that in western medicine control group, high dosage herbal group, medium dosage herbal group and low dosage herbal group, the differences had statistical significance($P < 0.01$); The expression of IL-1 β and Caspase-1 in medium dosage herbal group was apparently different from that in herbal control group($P < 0.01$), but had not apparently difference from western medicine control group($P > 0.01$). **Conclusion:** Zisheng Shenqi Decoction can inhibit the expression of IL-1 β and Caspase-1 in gouty arthritis rats. It has certain curative effect gouty arthritis.

Key Words Gouty arthritis; Zisheng Shenqi Decoction; IL-1 β ; Caspase-1; Experimental studies

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.08.037

骨与关节疾病是一种常见病和多发病,是造成长期剧烈疼痛和残疾的主要因素,WTO 将骨关节炎与心脑血管疾病、肿瘤癌症列为人类健康的三大杀

手^[1],其中,痛风性关节炎(Gouty Arthritis, GA)是最常见和疼痛最明显的骨关节疾病之一,已经成为严重危害人类健康的一种的代谢性疾病。GA 的发病

基金项目:黑龙江省教育厅基金项目(1254b022);国家自然科学基金项目(81173170);黑龙江中医药大学基金项目(201107)

作者简介:韩洁茹(1982.07—),女,博士研究生,副教授,教研室主任,研究方向:经方治疗内科疑难杂病的临床与实验研究, E-mail: 87569229@qq.com

通信作者:王书惠(1981.01—),女,硕士研究生,讲师/主治医师,研究方向:经方治疗内科疑难杂病的临床与实验研究, E-mail: bcf55555@163.com

机制是由于尿酸钠(MSU)或尿酸钠结晶从细胞外液沉积于关节滑膜、关节软骨等组织器官,导致滑膜及关节周围组织的炎症反应^[2]。痛风性关节炎在中医属痹证范畴,为本虚标实之证,其受累关节出现红、肿、热、痛的表现,并且活动受限^[3]。姜德友教授提出从肾论治痛风的学术观点,以补肾利湿法予以治疗,由此思路选择宋·严用和《济生方》中资生肾气丸化裁,临证用之,颇多效验。本课题前期实验已验证^[4-5],资生肾气丸中药复方显示出良好的抗炎及镇痛作用。本实验就其对GA大鼠模型血清中特异的炎症反应因子白介素1 β (IL-1 β)和滑膜炎性反应因子半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶-1(Caspase-1)的影响开展研究,探讨资生肾气丸中药复方防治痛风性关节炎的抗炎作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性SD大鼠84只,体重(180 \pm 20)g,由黑龙江中医药大学实验动物研究中心提供(合格证编号:SCXK(黑)2008004)。在温度20~22 $^{\circ}$ C,相对湿度30%~35%通风良好的动物室内常规饲养。

1.1.2 药物 资生肾气丸中药复方汤剂(熟地黄、泽泻、山茱萸、怀牛膝、牡丹皮、萆薢、车前子等),由黑龙江中医药大学附属第一医院制剂科提供,将中药原液分别按1.87:1,3.74:1,7.48:1浓缩为实验药液,经高温消毒后封瓶,置于冰箱中保存备用。秋水仙碱片(云南昊邦制药有限公司,国药准字H53021798,生产批号140807)。使用前将秋水仙碱片放入研钵内研成细末,过筛,加灭菌注射用水配置成0.05 mg/mL秋水仙碱混悬液,置于冰箱保存备用。痛风舒片(湖北绿金子药业有限责任公司,国药准字Z20090687,批号:140301)。使用前将痛风舒片放入研钵内研成细末,过筛,加灭菌注射用水配置成0.1 g/mL痛风舒片混悬液,置于冰箱中保存备用。

1.1.3 试剂与仪器 氧嗪酸钾盐(OXO)(美国Sigma公司提供,生产批号CAS2207-75-2);微晶尿酸钠结晶(MSU)(美国Sigma公司提供,生产批号CAS1198-77-2)。Caspase-1和IL-1 β 试剂盒(北京诚森生物技术有限公司提供,生产批号:201501)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将84只健康SD大鼠,随机分为7组,分别为空白组、模型组、中药痛风舒对照组、西药秋水仙碱对照组、资生肾气丸复方低剂量

组、资生肾气丸复方中剂量组、资生肾气丸复方高剂量组,每组12只。空白组只采用BD针将0.2 mL生理盐水注入到大鼠左侧膝关节腔内。其余6组按以下方法GA造模:用3%OXO混悬溶液按大鼠体重注射1 mL/100 g的剂量进行腹腔内注射,15 min后用BD针将0.2 mL MSU混悬溶液注入到大鼠左侧膝关节腔内^[6]。

1.2.2 给药方法 大鼠灌胃1 mL/100 g溶液为标准,空白组和模型组均用生理盐水灌胃,中药痛风舒对照组和西药秋水仙碱对照组分别用痛风舒片溶液和秋水仙碱溶液灌胃,资生肾气丸复方低、中、高剂量组分别给予相应资生肾气丸实验溶液灌胃,2次/d,连续7 d,末次给药1 h后造模。

1.2.3 取材方法 造模4 h后,各组大鼠给予10%水合氯醛腹腔麻醉后心脏取血,4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min离心10 min,取上清液,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱内保存,待测。解剖大鼠右膝关节,用锐利的刀片切取大鼠受试关节的滑膜组织,用等渗生理盐水漂洗滑膜组织,去除表面附着的肌肉组织、血液等,迅速置于无水乙醇溶液中固定24 h,待免疫组织化学检测。

1.3 统计学方法 运用SPSS 17.3进行统计分析,若数据属于正态分布且方差相齐,则多个样本均数间两两比较采用LSD-t检验;若条件不满足则采用非参数检验,结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-1 β 含量测定 从图表1可以看出:模型组血清IL-1 β 含量较空白组增高明显($P < 0.01$),各观察组经治疗后血清IL-1 β 含量与模型组比较显著下降,但仍高于空白组,差异有统计学意义($P < 0.01$);与痛风舒对照组比较,秋水仙碱对照组血清IL-1 β 含量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),资生肾气丸复方中剂量组血清IL-1 β 含量下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);与资生肾气丸复方高剂量组比较,资生肾气丸复方中剂量组和秋水仙碱对照组血清IL-1 β 含量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与资生肾气丸复方低剂量组比较,资生肾气丸复方中剂量组血清IL-1 β 含量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);资生肾气丸复方中剂量组与秋水仙碱对照组比较,血清IL-1 β 水平降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。以上统计结果说明各给药组均能降低痛风性关节炎大鼠血清IL-1 β 水平,但以资生肾气丸复方中剂量组和西药秋水仙碱组疗效较好。

2.2 Caspase-1 表达测定 各组大鼠取滑膜组织按常规制作石蜡切片,免疫组织化学染色 Caspase-1, 每张切片通过 Motic3000 显微摄影系统摄影随机摄取 3 个视域,采用麦克奥迪 image advanced3.2 病理图像分析系软件进行分析,计算阳性表达的平均灰度值(0-255),阳性表达为淡黄色或棕黄色见图 1 ~ 7。见表 1。

表 1 资生肾气丸复方对各组大鼠血清中 IL-1β 与滑膜中 Caspase-1 含量的比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

| 组别 | IL-1β(μmol/L) | 灰度比值 |
|-------------|---------------------|------------------|
| 空白对照组 | 0.7800 ± 0.5778 | 171.00 ± 7.69 |
| 模型组 | 4.6763 ± 0.8423 * | 151.86 ± 4.79 * |
| 中药痛风舒对照组 | 2.5938 ± 0.3434 Δ | 155.75 ± 9.19 |
| 西药秋水仙碱对照组 | 1.5750 ± 0.6274 Δ▲ | 169.00 ± 6.99 Δ▲ |
| 资生肾气丸复方低剂量组 | 2.3900 ± 0.1867 Δ | 166.25 ± 7.25 Δ |
| 资生肾气丸复方中剂量组 | 1.6375 ± 0.3565 Δ▲□ | 167.38 ± 6.89 Δ▲ |
| 资生肾气丸复方高剂量组 | 2.5314 ± 0.2676 Δ | 165.75 ± 10.96 Δ |

注:与空白组比 * P < 0.01;与模型组比 Δ P < 0.01;与中药痛风舒对照组比较,▲ P < 0.05;与西药秋水仙碱对照组比 □ P > 0.01

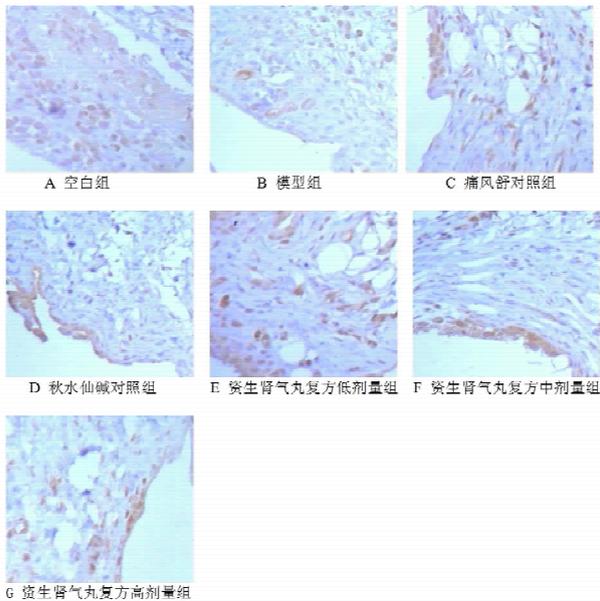


图 1 各组大鼠滑膜组织病理图

从以上图表 1 可以看出:与空白对照组比较,模型组 Caspase-1 的表达明显上调,差异有统计学意义 (P < 0.01);与模型组比较,痛风舒对照组经治疗后滑膜 Caspase-1 表达下降,但差异无统计学意义 (P > 0.05);资生肾气丸复方低、中、高剂量组及秋水仙碱对照组与模型组比较,差异有统计学意义 (P < 0.01);与痛风舒对照组比较,秋水仙碱对照组和资生肾气丸复方中剂量组滑膜 Caspase-1 表达下降,差异有统计学意义 (P < 0.05)。以上统计结果说明各给药组均能降低痛风性关节炎大鼠滑膜组织 Caspase-1 表达,但以资生肾气丸复方中剂量组和西

药秋水仙碱组疗效较好。

3 讨论

痛风性关节炎是一种作为临床病症而被人们认识的最古老疾病之一^[7],血液或滑囊液中的尿酸钠盐浓度达到饱和状态,尿酸钠盐从超饱和的细胞外液沉积出来,即在关节滑膜、软骨等组织器官出现结晶沉淀,导致滑膜及关节周围组织的炎性反应^[8],这是痛风性关节炎形成的基础。MSU 结晶体脱落、沉积致关节腔时,可以引起更多炎性递质释放,从而引起一系列炎性反应^[9],而典型的炎性反应则表现为局部充血、水肿,关节腔中大量炎性反应细胞浸润、纤维素渗出,则沉积部位出现组织凝固性坏死以及结缔组织细胞间质纤维变性,关节局部表现为明显红肿、剧烈疼痛和局部温度升高。

现代研究证实,IL-1β 的功能主要包括 1) 参加炎性反应;2) 调节免疫反应;3) 促进组织损伤的修复;4) 调控神经生物效应。Chapman 等证实 MSU 晶体刺激关节滑液中吞噬细胞和单核细胞引起 IL-1 的大量释放,并认为 IL-1β 是痛风性关节炎的一个炎性反应递质^[10]。Giovine 认为 IL-1β 在急慢性痛风性关节炎中都起非常重要作用,被认为是最经典的炎性反应调节剂^[11]。国外许多专家、学者发现并证明 IL-1β 是前炎性反应网链中的一级细胞因子,在痛风性关节炎急性发生时,IL-1β 能造成局部 pH 值降低,更有利于尿酸盐结晶的沉积,形成恶性循环,作为炎性反应激活因子和趋化因子在痛风性关节炎的发生、发展过程中发挥关键作用。本实验研究发现,GA 模型大鼠血清中 IL-1β 的水平明显增高,而在西药秋水仙碱对照组、资生肾气丸复方低、中、高剂量组的干预下,IL-1β 均有不同程度的下调,以西药秋水仙碱对照组和资生肾气丸复方中剂量组下调最为明显。提示 IL-1β 和 IL-18 可能参与了 GA 的发病;资生肾气丸中药复方与秋水仙碱作用相似,可能降低 GA 大鼠模型血清 IL-1β 和 IL-18 含量来减轻、阻断炎性反应,从而达到抗炎的作用。

Caspase-1 又称白细胞介素-1β 转化酶 (Interleukin-1β Converting Enzyme, ICE), Caspase-1 主要参与白介素前体的活化,主要作用是参与细胞因子介导的炎性反应。Caspase-1 存在于哺乳动物体内,主要由单核细胞合成,常以无活性的酶原形式存在。当机体感受到危险信号后,形成炎性体(如 NALP3),使无活性的 Caspase-1 酶原通过自动加工活化,活化的 Caspase-1 可以在位点为 Tyr-Val-His-Asp116/Ala117 处,将 31 kD 的 IL-1β 前体剪切成 IL-1β,还

能在 IL-18 前体 Asp36 处剪切成为成熟的 IL-18^[12]。目前研究表明,在关节炎性反应中,Caspase-1 下游产物——IL-1 β 和 IL-18 所形成的调节网络对 GA 的发病扮演重要作用。本实验运用免疫组化方法检测各组大鼠滑膜中 Caspase-1 表达,研究发现:与空白组比较,GA 模型组大鼠关节滑膜组织 Caspase-1 表达增强;与模型组比较,西药秋水仙碱对照组及资生肾气丸复方高、中、低剂量均对滑膜组织 Caspase-1 的表达有不同程度下调,其中以资生肾气丸复方中剂量组下调最为明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。从而提示:Caspase-1 在 GA 大鼠模型滑膜组织中处于高表达,而在降低 Caspase-1 表达水平上,资生肾气丸复方中剂量组优于其他组,这可能是其防治 GA 的作用机制之一。

对于痛风性关节炎的病因病机,现代医家越来越注重体质及先天禀赋的重要性,同时亦强调后天的调摄。如房氏^[13]认为,本病的主要病机为先天禀赋不足,肾气亏虚,由于肾司二便的功能失调,湿浊排泄减少;又加之平素嗜食膏粱厚味,伤及脾胃,运化无权,就使得湿浊内聚,久则化热,流注关节、肌肉,闭阻经脉,致关节部位红、肿、热、痛、重着、麻木、屈伸不利等症状。盖氏^[14]认为致痹之病邪非受自于外,而主生于内。大凡痛风者,多有先天禀赋不足;或因命火不能暖坤土而导致素体脾虚;又或年事已高,脏气日衰,若加之调摄失宜,如饮食不节,过食肥甘厚味,久之,必将致使脾失健运,无以升清降浊无权;肾乏气化,而水失总司,于是水谷不归正化,痰湿内生,滞留血中进而瘀结为患。所以在治疗 GA 时要考虑固护肾气,扶正祛邪。故本课题组采用补肾利湿法指导临床用药,以资生肾气丸为代表方进行加减。药物组成有熟地黄、山药、泽泻、山茱萸、茯苓、怀牛膝、萆薢等,以补肾利湿为主,兼以祛湿止痛。并且目前已发现资生肾气丸中茯苓等单味中药都具有降尿酸作用^[15],复方中药经过配伍,能够多环节、多靶点治疗痛风,同时可以减轻单味药的带来的不良反应,提高用药的安全性。

资生肾气丸复方中药可以明显降低痛风性关节

炎模型大鼠血清中 IL-1 β 和滑膜中 caspase-1 的活性,缓解痛风性关节炎的炎性反应症状。在防治急性痛风性关节炎实验中,资生肾气丸复方中药表现出较好的抗炎作用,以期为指导临床用药和新药研发提供方向。

参考文献

- [1]何清.高尿酸血症和痛风的病因与流行病学[J].中国临床医生杂志,2009,37(1):11-13.
- [2]Sabina EP,Rasool M. An in vivo and in vitro potential of Indian ayurvedic herbal formulation Triphala on experimental gouty arthritis in mice[J]. Vascu Pharmacol,2008,48(1):14-20.
- [3]葛星.痛风急性关节炎期中医辨证及临床研究[J].浙江中医药大学学报,2007,31(3):323,312.
- [4]姜德友,邹丽,隋方宇,等.补肾利湿法对急性痛风性关节炎大鼠血清 MMP-7 影响的实验研究[J].吉林中医药,2015,35(12):1264-1267.
- [5]姜德友,李文昊,解颖,等.补肾利湿法对急性痛风性关节炎大鼠血清 IL-17 表达水平的影响[J].世界中医药,2015,10(10):1574-1577.
- [6]姚丽,刘树民,于书仪.痛风性关节炎动物模型的改良[J].中国实验动物学报,2009,17(3):210-212,后插 6.
- [7]G Nuki,PA Simkin. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment[J]. Arthritis Research & Therapy,2006,8(1):S1.
- [8]Akahoshi T,Murakami Y,Kitasato H. Recent advances in crystal-induced acute inflammation[J]. Curr Opin Rheumatol,2007,19(2):146-50.
- [9]Yan Shi,Ashley D. Mucsi,Gilbert Ng. Monosodium urate crystal in inflammation and immunity[J]. Immunological Reviews,2010,233(1):203-217.
- [10]张治宇,方策,王秀华,等.痛风湿关节炎的分子生物学基础[J].中国骨伤,2001,14(3):160-162.
- [11]Blomgran R,Patcha BV,Verma D,et al. Common genetic variations in the NALP3 inflammasome are associated with delayed apoptosis of human neutrophils[J]. PLoS One,2012,7(3):e31326.
- [13]周茂福.房定亚验案二则[J].江西中医药,2001,32(6):10.
- [14]赫伟彦.盖国忠教授论治急性痛风性关节炎经验[J].中国中医急症,2004,13(9):606.
- [15]姜德友,曲晓雪,陈飞,等.补肾利湿法对痛风性关节炎大鼠超氧化物歧化酶表达的影响[J].湖北中医药大学学报,2016,18(1):11-14.

(2017-04-19 收稿 责任编辑:王明)