

实验研究

痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠模型 IL-1 及 MMP-9 的研究

佟颖¹ 孟洁² 金汤³ 王博¹ 杨福庆⁴ 苏冠霞² 杜丽坤¹ 王育红¹ 王石⁵

(1 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨, 150040; 2 黑龙江中医药大学, 哈尔滨, 150040; 3 哈尔滨市中医医院, 哈尔滨, 150008; 4 黑龙江省饶河县中医院, 哈尔滨, 155700; 5 哈尔滨市道外区太平人民医院, 哈尔滨, 150050)

摘要 目的: 观察痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠模型滑膜组织的抗炎作用。方法: 将 Wistar 大鼠 60 只, 雌雄各半, 造模成功后, 随机分为空白组、模型组、西药组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组, 药物干预 7 d。于造模前、造模后、治疗结束处死前测定大鼠右侧足踝关节容积及血白细胞介素-1 (Interleukin-1, IL-1), 并在处死后将右侧踝关节滑膜组织做常规 HE 染色, 光镜下观察病理滑膜组织并评分。结果: 痹宁胶囊有利于大鼠受损的滑膜组织炎症修复, 优于西药组, 以中药高剂量组为佳。结论: 痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠模型滑膜组织有明显的抗炎作用。

关键词 急性痛风性关节炎; @ 痹宁胶囊; 足跖容积; IL-1; 滑膜组织; 基质金属蛋白酶-9

Study on Effect of Bining Capsule on Levels of IL-1 and MMP-9 of Rats with Acute Gouty Arthritis

Tong Ying¹, Meng Jie², Jin Tang³, Wang Bo¹, Yang Fuqing⁴, Su Guanxia², Du Likun¹, Wang Yuhong¹, Wang Shi⁵

(1 First Hospital Affiliated to Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040, China; 2 Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040, China; 3 Harbin Chinese Medicine Hospital, Harbin, 150008, China;

4 Raohe County TCM Hospital of Heilongjiang Province, Harbin, 155700, China;

5 Taiping People's Hospital of Daowai District, Harbin, 150050, China)

Abstract Objective: To observe the anti-inflammatory effect of Bining Capsule on synovial tissue of rats with acute gouty arthritis.

Methods: After a successful modeling of 60 half male and half female Wistar rats, they were randomly divided into blank control group, model group, Western medicine group, Chinese medicine high dose group, Chinese medicine middle dose group, and Chinese medicine low dose group. They were all intervened by drugs for 7 days. The right ankle volume of rats and the level of Interleukin-1 (IL-1) before modeling, after modeling and the end of treatment were measured. Besides, the synovial tissue of right ankles were put in routine HE staining after the death of rats, in order to observe and score the pathological synovial tissue through light microscopy. **Results:** Bining Capsule was beneficial to the repair of inflammation of damaged synovial tissue in rats, better than Western medicine group, and the Chinese medicine high dose group showed the best effect. **Conclusion:** Bining Capsule has significant anti-inflammatory effect in synovial tissue of rats model with acute gouty arthritis.

Key Words Bining Capsule; Acute gouty arthritis; Paw volume; (IL-1; Synovial tissue; Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9))

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.05.023

尿酸盐结晶沉积于关节周围组织是急性痛风性关节炎发作的主要原因。本实验以急性痛风性关节炎模型大鼠作为研究对象, 测定大鼠足跖容积及血 IL-1 水平, 并在处死后光镜下观察常规 HE 染色的病理滑膜组织, 观察痹宁胶囊对滑膜组织的抗炎作用。

1 实验材料

1.1 实验动物 Wistar 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 200~250g, 由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。

1.2 主要试剂 MMP-9 免疫组化染色试剂盒, 由哈尔滨博润生物科技公司提供。

1.3 实验药物 中药组痹宁胶囊由黑龙江中医药大学附属一院提供, 组成为: 金钱草 15 g, 山慈菇 20 g, 车前子 12 g, 威灵仙 15 g, 秦艽 15 g, 草薢 15 g, 土茯苓 15 g, 连翘 10 g, 川芎 12 g, 忍冬藤 20 g, 牛膝 10 g 等, 规格为 0.5 g/粒, 每粒含生药 0.3 g。西药组别嘌呤醇由重庆青阳药业有限公司提供。空白组和模型组均给予等

体积的生理盐水。

2 实验方法

2.1 分组与造模 Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g,每组 10 只,称重后随机分为空白组、模型组、西药组(别嘌呤醇)组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组。除空白组外,其余各组均按 Coderre 经典方法,制造大鼠急性痛风性关节炎模型^[1]。

2.2 给药方法 空白组和模型组均给予 2 mL/次的生理盐水灌胃;西药组以别嘌呤醇加蒸馏水制成混悬液,浓度为 1 mg/kg 灌胃;痹宁胶囊高、中、低剂量组分别按 2.4 g/kg、1.2 g/kg、0.6 g/kg 灌胃;每组给药容积均为 2 mL/次;每日清晨灌胃给药 1 次,连续 7 d。

2.3 结果判定

2.3.1 采用足跖容积法,于造模前及造模后、动物治疗结束处死前测定大鼠右侧足踝关节容积。

2.3.2 采用大鼠尾静脉采血法,于造模前及造模后、动物治疗结束处死前尾静脉采血,测定血中 IL-1 水平。

2.3.3 治疗结束后处死大鼠,将取样的含有滑膜的软组织常规 HE 染色及 MMP-9 着色。光镜下观察大鼠滑膜组织病理形态,改进后标准如下:1)上皮细胞损伤程度;2)炎性细胞浸润程度;3)血管充血程度;4)MMP-9 着色程度。重度 3 分,中度 2 分,轻度 1 分,正常 0 分。

2.4 统计方法 结果经单因素方差分析,组间比较选用 LSD 及 SNK 分析。

3 结果

3.1 痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠足跖肿胀度的影响 造模前,各组足跖容积比较($P > 0.05$),提示各组具有可比性;造模后,除空白组外其余组足跖容积增大,与空白组比较($P < 0.01$),提示造模成功;在治疗结束时,除模型组外足肿胀程度均明显降低,与模型组比较($P < 0.05$),尤以高剂量组为佳。见表 1。

表 1 痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠足跖肿胀度的影响($\bar{x} \pm s$, mL)

组别	例数	造模前(mL)	造模后(mL)	治疗结束(mL)
空白组	10	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.04 *
模型组	10	0.22 ± 0.03	0.41 ± 0.05 **	0.39 ± 0.06
西药组	10	0.23 ± 0.01	0.39 ± 0.06 **	0.26 ± 0.05 *
中药高剂量组	10	0.24 ± 0.02	0.40 ± 0.03 **	0.25 ± 0.02 *
中药中剂量组	10	0.23 ± 0.01	0.38 ± 0.07 **	0.27 ± 0.01 *
中药低剂量组	10	0.22 ± 0.04	0.40 ± 0.04 **	0.29 ± 0.05 *

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

3.2 痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠血 IL-1 水

平的影响 模型组与空白组比较,血 IL-1 水平明显升高,有统计学意义($P < 0.05$),说明造模成功;在治疗结束时,除模型组外血 IL-1 水平有不同程度降低,与模型组比较($P < 0.05$),尤以高剂量组为佳。见表 2。

表 2 痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠血清 IL-1 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-1
空白组	10	8.07 ± 1.12
模型组	10	26.67 ± 2.62 *
西药组	10	17.52 ± 1.96 Δ
中药高剂量组	10	9.84 ± 1.05 Δ
中药中剂量组	10	12.35 ± 1.51 Δ
中药低剂量组	10	16.20 ± 1.24 Δ

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

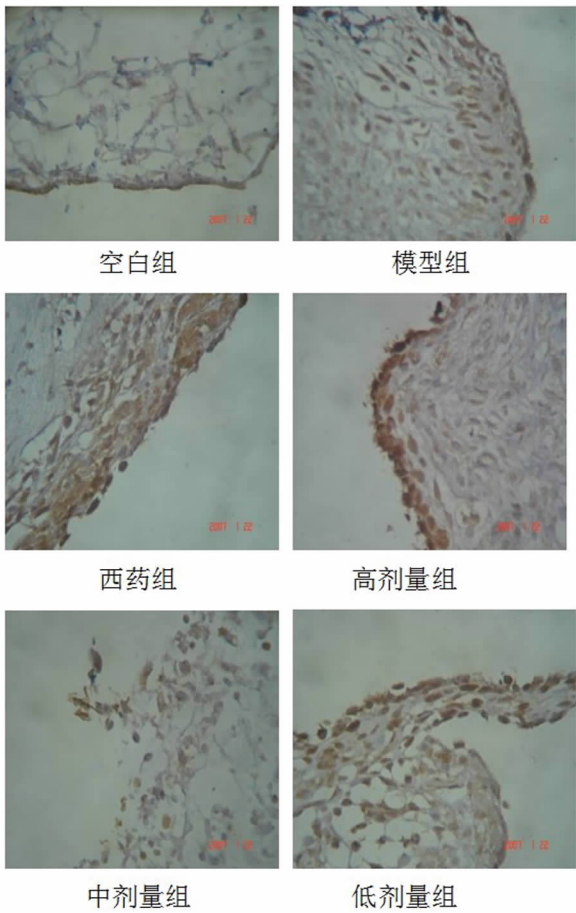


图 1 大鼠滑膜组织形态学改变及血管壁上 MMP-9 着色程度(HE 染色)

3.3 痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠模型滑膜组织 MMP-9(棕黄色颗粒)免疫组化结果 模型组与空白组比较,血管数量及血管壁上 MMP-9 阳性着色(棕黄色颗粒样)物质明显增多,有统计学意义($P < 0.05$),说明造模后滑膜组织细胞中 MMP-9 明显升高;在治疗结束时,除模型组外大鼠滑膜组织中血管数量及血管壁上 MMP-9 阳性着色(棕黄色颗粒样)有

不同程度减少,与模型组比较($P < 0.05$),尤以高剂量组为佳。见图 1、表 3。

表 3 痹宁胶囊对急性痛风性关节炎大鼠模型滑膜组织形态学的影响($\bar{x} \pm s$,分)

组别	例数	评分(分)
空白组	10	1.53 ± 0.34
模型组	10	10.72 ± 0.73 *
西药组	10	5.24 ± 0.82 [△]
中药高剂量组	10	2.75 ± 0.64 [△]
中药中剂量组	10	4.92 ± 0.96 [△]
中药低剂量组	10	6.36 ± 0.53 [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$ 。

4 讨论

在急性痛风性关节炎的治疗当中,抑制白细胞的游走及吞噬,减少或阻断炎症反应过程是一个重要的目标。IL-1 主要由单核巨噬细胞产生,多存在于血液及组织液中,其生物学活性主要是诱导血管内皮细胞表达粘附分子、活化巨噬细胞,是一类重要的炎症介质。基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase,MMPS)是一组金属锌离子依赖的蛋白质水解酶家族,MMPS 可以调节炎症反应,因为它可以使炎症细胞聚集浸润^[2];MMP-9 是 MMPS 家族中的一员,又称为明胶酶 B,主要作用是降解 IV 型胶原纤维,并且可以触发炎症^[3],使中性粒细胞的趋化活性增加。近来许多研究表明 MMP-9 在结缔组织疾病中表达增强,其对关节的破坏作用主要在于降解软骨和骨质的细胞外基质(Extracellular Matrix,ECM)^[4],它能被多种物质诱导上调,如肿瘤坏死因子(TNF- α)可以刺激单核细胞产生 MMP-9^[3]。金属蛋白酶组织抑制因子是 MMPs 家族的组织抑制剂,TIMP-1 是 MMP-9 的抑制剂。从表 1、2、3 及图 1 中可以看出,模型组大鼠足跖肿胀度、血 IL-1 水平、MMP-9 着色明显增多,而通过药物干预后,大鼠足跖肿胀度、血 IL-1 水平、MMP-9 着色减少,痹宁胶囊可能通过调节 IL-1 水平及上调 TIMPs 和下调 MMPs 两大家族关系,达到抗炎保护作用。

中医认为痛风的基本病机是本虚标实。以脾肾亏虚为本,痰瘀湿热为标,痰瘀为病之变,湿热为病之现^[5]。痹宁胶囊具有清热利湿、活血化瘀、通络止痛的功效。方中金钱草、车前子共为君药,有利尿通淋之功;威灵仙、秦艽、土茯苓共为臣药,威灵仙能祛风湿,通络止痛,通十二经,秦艽能祛风湿,舒筋络,滑利关节,土茯苓有利湿、解毒、利关节之功效。据现代药理研究表明:金钱草具有利尿、抑制草酸钙形成、降低血尿酸水平、抗炎镇痛、抗氧化、肾保护等作用^[6-7];车前子具有抗炎利尿作用^[8-9];威灵仙有镇痛抗炎、免疫

抑制、降低尿酸的作用^[10-11];秦艽具有抗炎镇痛,保肝,免疫抑制等作用^[12-13];土茯苓可以通过下调肾脏 URAT1 基因的 mRNA 的表达而促进尿酸的排泄^[14-15]。诸药合用,相辅相成,走窜之功颇强,能使药力速达病所,迅速缓解肿痛症状。

中医在治疗此病时有很好的疗效,文献大多都是临床观察,较少有关于作用机制的基础实验研究,本实验从细胞因子 IL-1 及 MMP-9 水平说明痹宁胶囊的疗效,为其广泛用于临床提供依据。综上所述,金属蛋白酶及相关的生物活性物质的动态平衡调控失调,可能是炎症难以愈合的一个重要因素,找出金属蛋白酶调控失衡的关键及其与创伤修复的关系,探索临床干预的可能性和方法,可望为滑膜的修复提供全新的治疗手段。

参考文献

- [1]刘静,徐玲玲.常用痛风模型的作用机制及评价[J].中国药师,2012,15(8):1193-1194.
- [2]Monika Merkle, Andrea Ribeiro, Simone Koppel. TNF- α enhances TLR3 dependent effects on MMP-9 expression in human mesangial cells [J]. Cell Biology International, 2012, 36(12): 1155-1160.
- [3]罗婧莹,陈德华,黄熙.基质金属蛋白酶-9 与结缔组织疾病的研究进展[J].中国皮肤性病学杂志,2010,24(4):373-374.
- [4]郭新响,王庆文.基质金属蛋白酶家族与风湿性疾病的关系研究[J].山西医药杂志,2011,40(8):790-792.
- [5]崔炎,李玉凤.崔公让教授治疗痛风性关节炎经验介绍[J].新中医,2009,41(10):12-13.
- [6]蔡华芳.金钱草治疗尿结石的作用和机理研究[J].中国医疗前沿,2010,5(12):7-8.
- [7]邵绍丰,张爱鸣,刘耀,等.单味中药金钱草、石韦、车前子对大鼠肾结石肾保护作用的实验研究[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(6):342-344.
- [8]何永婷,朱贺年.车前子的研究进展[J].北方药学,2011,8(1):55-57.
- [9]冯娜,刘芳,郭会彩,等.车前子多糖抗炎作用机制的实验研究[J].天津医药,2012,40(6):598-601.
- [10]李佳,刘继永.中药威灵仙的化学成分及药理作用研究进展[J].特产研究,2011(1):67-75.
- [11]周效思,周凯,封芬.威灵仙对兔膝关节 IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ 的影响[J].时珍国医国药,2011,22(5):1143-1144.
- [12]蔡秋生,张志红,高慧琴.秦艽药理作用及临床应用研究进展[J].甘肃中医学院学报,2010,27(6):55-58.
- [13]聂继红,张海英,郭亭亭.中药秦艽抗炎镇痛作用的实验研究[J].中国现代医药杂志,2010,12(12):12-14.
- [14]孙红,王少明,庄捷,等.土茯苓等中药抑制 URAT1 表达及降尿酸作用筛选研究[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(4):403-407.
- [15]郭淑云,张薇,张琰.土茯苓对高尿酸血症小鼠血清尿酸的影响[J].药物研究,2012,21(13):3-4.

(2012-10-31 收稿)