

酸脂清胶囊对实验大鼠急性痛风性关节炎模型 IL-10 和 IL-1Ra 的影响

朱金凤 吴 萍

(青海大学医学院, 西宁, 810010)

摘要 目的:通过观察酸脂清胶囊的不同提取物对实验大鼠痛风性关节炎模型 IL-10 和 IL-1Ra 的影响,研究酸脂清胶囊的抗炎机制和对痛风性关节炎软骨破坏的影响,进一步指导临床用药。方法:酸脂清胶囊不同提取物(水提物,醇提物)给大鼠灌胃 7d 后,以尿酸钠晶体造成大鼠急性痛风性关节炎模型,分别在造模后 9 h 和 12 h 随机抽取 8 只大鼠测量踝关节直径,下腔静脉取血 Elisa 检测 IL-10 和 IL-1Ra 的量。结果:三个药物组的 IL-10 和 IL-1Ra 较模型组均有不同程度的升高,但水提组升高最为明显($P < 0.05$)。结论:酸脂清胶囊通过提高 IL-10 和 IL-1Ra 的水平,达到抗炎、保护关节软骨的作用,尤以水提组为优。

关键词 酸脂清胶囊;急性痛风性关节炎;IL-10;IL-1Ra

The influence of Suanzhiqing Capsules on IL-10 and IL-1Ra in Rats Model with Acute Gouty Arthritis

Zhu Jinfeng, Wu Ping

(Qinghai University, Qinghai 810010, China)

Abstract Objective: To observe the effects of different extractions of Suanzhiqing capsules on rats with acute gouty arthritis. To study on the anti-inflammation mechanism and effect on cartilage damages in acute gouty arthritis rats. **Methods:** Water extractions and ethanol extractions of Chinese medicines Suanzhiqing capsules were administrated intragastrically to the model rats. Seven days later, the rats were given uric acid sodium to cause acute gouty arthritis. And after 9 hours and 12 hours, eight rats were randomly selected each time in each group to measure the diameter of the ankle joint, and the contents of IL-1 and IL-1Ra through Elisa method on the blood taken from inferior vena cava. **Results:** The level of IL-10 and IL-1Ra in the medicine groups were increased to some extent compared with the control group. The most significant increase was observed in the water extraction group. **Conclusion:** Suanzhiqing capsules can raise the level of IL-10 and IL-1 to cure inflammation and protect articular cartilage, especially with its water extraction group.

Key Words Suanzhiqing capsules; Acute gouty arthritis; IL-10; IL-1Ra

中图分类号:R243;R684.3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.01.028

急性痛风性关节炎是一种严重危害人类健康的代谢性疾病,急性发作主要表现为关节剧烈红肿疼痛,病情多持久迁延,严重的滑膜炎伴随痛风性关节炎反复发作会导致关节软骨破坏。酸脂清胶囊是青海大学医学院文绍敦教授开发的中药胶囊制剂,临床研究表明酸脂清胶囊对痛风及痛风性关节炎有良好的治疗作用。大量炎症因子参与疾病的发展导致严重的关节炎和软骨破坏,但也有一部分炎症因子有拮抗炎症的作用,其中炎症因子 IL-10 和 IL-1Ra 有明显的抗炎及关节保护作用。本实验拟通过酸脂清胶囊对急性痛风性关节炎模型大鼠 IL-10 和 IL-1Ra 的影响,研究其抗炎及关节保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 二级 Wistar 大鼠(200 ± 20) g,雄

性,兰州大学医学院实验动物中心提供。

1.1.2 试验药物 酸脂清提取物的制备:按大黄 100 g,姜黄 33 g,土茯苓 27 g 的比例入药,采用清水煎煮和 95% 乙醇索氏提取、浓缩后,稀释成 0.7 g / mL(生药折合量)的溶液。羧甲基纤维素钠(蒸馏水配制,2%)溶液中加入研细的秋水仙碱片制成 5 mg / L 的混悬剂。

1.1.3 主要试剂 尿酸钠(批号:20120827,上海江莱生物科技有限公司提供),秋水仙碱片(批号:120401,通化盛和药业股份有限公司提供),羧甲基纤维素钠(批号:20120915,天津市百世化工有限公司提供),磷酸缓冲盐溶液(缓冲液,Phosphate Buffersaline, PBS)为自行配制,高温高压灭菌备用。

1.1.4 主要设备 索氏提取器,旋转蒸发仪 RE-3000(上海亚荣生化仪器厂),恒温水浴锅,低温冰箱

(-80℃), TG16-WS 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), 恒温箱(上海一恒科学仪器有限公司), 酶标定量测定仪(深圳雷杜生命科学有限公司), 游标卡尺(桂林可立德量器有限公司)。

1.1.5 Elisa 试剂盒(48T) IL-10(批号: JFCX2876)、IL-1Ra(批号: JFCX1321)北京久峰润达生物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药 按组间均衡原则, 将 80 只大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组(秋水仙碱组)、水提酸脂清组、醇提酸脂清组, 每组 16 只。空白组和模型组分别给予生理盐水灌胃、三个药物组分别给予秋水仙碱和酸脂清胶囊的水提物和醇提物 10 mL/kg, 2 次/d, 共 7 d。

1.2.2 尿酸钠晶体(尿酸钠, Monosodium Urate, MSU)局部注射诱导大鼠急性关节炎模型 模型组及各药物组于灌胃第 7 天最后一次灌胃 0.5 h 后大鼠抓握固定后测量右踝关节直径, 并选定踝关节外侧后方为穿刺点向关节腔注入 20 mg/mL MSU 溶液 100 μ L, 诱导急性关节炎模型, 空白组注射等体积的 PBS。

1.2.3 样本采集 造模 9 h 后各组随机抽取实验大鼠 8 只, 以 20% 乌拉坦 0.4 mL/100g 腹腔麻醉, 测量踝关节直径, 开腹下腔静脉取血, 存于普通真空采血管中, 静置 0.5 h 后 3000 r/min 离心 10 min, 取血清分装于 1.5 mL 离心管中, -20℃ 保存。12 h 后对剩余大

鼠同样进行麻醉后测量关节直径、取血。

1.2.4 指标检测 IL-10、IL-1Ra 均按照实试剂盒说明书操作进行浓度检测。

1.3 统计学方法 各检测指标组间采用单因素方差分析, 各指标 9 h 和 12 h 之间的比较采用独立样本 *t* 检验。

2 实验结果

2.1 一般情况 除空白组外, 造模后大鼠右踝关节均不同程度的红肿、活动受限, 部分出现三足行走现象。大鼠造模前后关节直径变化见表 1。

表 1 造模前后大鼠关节直径变化 (mm, $\bar{x} \pm s$)

时间	空白组	模型组	水提组	醇提组	秋水仙碱组
9 h	0.08 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.25 Δ	0.5 $\pm$ 0.26 Δ	0.62 $\pm$ 0.18 Δ	0.67 $\pm$ 0.2 Δ $\square$
12 h	0.07 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.17 Δ	0.71 $\pm$ 0.25 Δ	0.75 $\pm$ 0.25 Δ	1.02 $\pm$ 0.35 Δ $\square$ $\blacksquare$
<i>t</i>	0.114	4.386	-0.303	-0.627	-0.350
<i>P</i>	0.916	0.012	0.313	0.548	0.548

注: 与空白组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, 与水提组比较, $\square P < 0.05$, 与醇提组比较, $\blacksquare P < 0.05$ 。

2.2 酸脂清胶囊对实验大鼠痛风性关节炎模型 IL-10 和 IL-1Ra 的影响 造模 9 h、12 h 后, 各组的 IL-10 和 IL-1Ra 均有不同程度的改变(见表 2), 模型组因炎症反应抗炎因子浓度下降, 各药物组 IL-10 和 IL-1Ra 有不同程度的升高, 部分药物组 IL-10 和 IL-1Ra 浓度可以超过空白组 ($P < 0.05$), 其中以水提组 IL-10 和 IL-1Ra 浓度最高。

表 2 IL-10 和 IL-1Ra 检测结果 (ng $\cdot$ L $^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-10			IL-1Ra		
	9 h	12 h	<i>P</i>	9 h	12 h	<i>P</i>
空白组	51.111 $\pm$ 3.600	51.351 $\pm$ 3.633	0.938	59.238 $\pm$ 3.700	59.395 $\pm$ 3.654	0.987
模型组	44.376 $\pm$ 4.837	45.167 $\pm$ 4.987	0.704	52.618 $\pm$ 8.896	51.065 $\pm$ 6.343	0.805
水提组	64.791 $\pm$ 9.175 Δ	66.503 $\pm$ 13.929 Δ	0.824	71.276 $\pm$ 10.21 Δ	71.680 $\pm$ 6.176 Δ	0.942
醇提组	48.781 $\pm$ 9.767 Δ	50.154 $\pm$ 9.475 Δ	0.827	69.000 $\pm$ 5.488 Δ	65.839 $\pm$ 6.131 Δ	0.415
秋水仙碱组	61.379 $\pm$ 8.561 Δ $\square$	51.355 $\pm$ 8.424 Δ	0.099	71.721 $\pm$ 7.687 Δ	64.290 $\pm$ 10.598 Δ	0.240

注: 与空白组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与水提组比较, $\Delta P < 0.05$, 与醇提组比较, $\square P < 0.05$ 。

3 讨论

3.1 酸脂清胶囊对痛风性关节炎关节炎症的影响 体外实验表明细胞因子如 IL-4、IL-10 可抑制促炎症性细胞因子的活性^[1]。滑膜组织培育实验表明 IL-10 可抑制 IL-1 β 和 TNF- α 的生成, 影响促炎症性细胞因子 mRNA 的稳定性, 使其水平下降^[2], 还可增加由脂多糖刺激的单核细胞 IL-1Ra 的生成。IL-1Ra 为滑膜细胞分泌的 IL-1 受体的天然拮抗剂, 是一种 IL-1 与 IL-1R 相互结合的竞争性抑制物, 可抑制 IL-1 β 的信号传递, 是 IL-1 有效的拮抗剂^[3-4]。本实验结果显示酸脂清胶囊提取物可明显升高模型大

鼠血 IL-1Ra 和 IL-10 的浓度, 表明酸脂清胶囊可通过升高血 IL-1Ra 和 IL-10 浓度发挥良好的抗炎作用, 其中水提物效果较好。

3.2 酸脂清胶囊对关节软骨破坏的影响 多种细胞因子可多方向调节软骨细胞功能, IL-10 是一种抑制或阻止软骨细胞分解的细胞因子^[5-7], 除可抑制直接破坏软骨的 IL-1^[8] 和 TNF 等炎症细胞因子的合成, 还可抑制软骨细胞 NOS 和 MMPs 的表达^[9], 抑制滑膜组织中的组织蛋白酶 K、骨性蛋白配体等^[10], 从而阻止软骨和关节破坏, 同时它还提高 I 型胶原蛋白的合成水平, 对关节软骨有保护和修复作用^[11-12]。IL-

1Ra 能特异性地抑制 T 细胞表面 IL-1R 与 IL-1 结合^[13],可抑制关节软骨细胞凋亡^[14],在关节炎中起重要的关节保护作用。本实验结果显示痛风模型组 IL-1Ra 和 IL-10 浓度较其余各组显著降低,说明痛风性关节炎发作时软骨保护机制降低。酸脂清胶囊提取物可显著升高血 IL-1Ra 和 IL-10 的浓度,Zhang 等^[15]使用基因转染的手段把 IL-1Ra 基因注射到兔膝关节,使 IL-1Ra 的表达量增多,结果观察到了关节软骨损伤的减轻,故说明酸脂清胶囊有良好的关节软骨保护作用,其中水提物作用较为明显。

参考文献

- [1] Hedhom E, Hause HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis; the role of inflammation[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(1): 45-53.
- [2] 李风雷. 白细胞介素-10 和急性肺损伤[J]. 国外医学·呼吸系统分册, 2001, 21(2): 57-58.
- [3] Silvestri T, Pullstelli L, Dolzani P, et al. In vivo expression of inflammatory cytokine receptors in the joint compartments of patients with arthritis[J]. Rheumatol Int, 2006, 26(4): 360-368.
- [4] Galich AL, Domiciano DS, Fuller R, et al. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment[J]. Clin Rheumatol, 2010, 29(5): 451-460.
- [5] Minicuci N, Noale M, Bardage C, et al. Cross-national determinants of quality of life from six longitudinal studies on aging: the CLEAS project[J]. Aging Clin Exp Res, 2003, 15(3): 187-202.
- [6] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology[J]. Biorheology, 2002, 39(1-2): 237-246.
- [7] Malemud CJ, Islam N, Haqqi TM. Pathophysiological mechanisms in os-

teoarthritis lead to novel therapeutic strategies[J]. Cells Tissues Organs, 2003, 174(1-2): 34-48.

- [8] 李刚. 骨关节炎的病因及中医药治疗研究进展[J]. 河北中医, 2010, 32(10): 1585-1586.
- [9] Yueqing Wang, Siqian Lou. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro[J]. Chinese Medical Journal, 2001, 14(4): 723.
- [10] ERIK LUBBERTS, LEO A B, JOOSTEN. MARTINE CHABAUD, et al. IL-10 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion[J]. J Clin Invest, 2000, 6, 15, 105(12): 1697-1710.
- [11] Jongensen C, Apparally F, Couret I, et al. Interleukin-4 and interleukin-10 are chondroprotective and decrease mononuclear cell recruitment in human rheumatoid synovium in vivo[J]. Immunology, 1998, 93(4): 518-523.
- [12] Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, et al. Interleukin-10 (IL-10), not IL-4 or interferon-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol, 2001, 28(9): 1960-1966.
- [13] Naghmeh R, Eline S. Association of the risk of osteoarthritis with high innate production of interleukin-1 β and low innate production of interleukin-10 ex vivo, upon lipopolysaccharide stimulation[J]. Arthritis & Rheumatism, 2005, 52(5): 1443-1450.
- [14] 马丽, 郭万首, 潘林, 等. 白细胞介素-1 受体拮抗蛋白间接体内转基因对骨关节炎软骨细胞凋亡的抑制作用[J]. 中华风湿病学杂志, 2004, 5(8): 284-287.
- [15] Zhang X, Mao Z, Yu C. Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10[J]. J Orthop Res, 2004, 22(4): 742-750.

(2013-05-22 收稿 责任编辑: 徐晖)

(上接第 77 页)

- [5] 孔锡容, 张光荣, 杨曦. 尿酸性肾病动物模型十年研究概况[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 9(8): 557-558.
- [6] 胡晓玲, 陈玉敏. 别嘌醇在尿酸性肾病中的疗效分析[J]. 西部医学, 2012, 5(24): 962-963.
- [7] 桑莉. 贺氏温通法治疗急性痛风性关节炎机理探讨[J]. 光明中医, 2011, 26(12): 2499-2500.
- [8] 李明坤, 董冀平, 刘志广. 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和超敏 C 反应蛋白 2 型糖尿病胰岛素抵抗的关系[J]. 中国基层医药, 2012, 7(19): 1034-1035.
- [9] 李玲, 邹万忠. 肾小管损伤时内皮素-1、肿瘤坏死因子 α 的表达及对离体肾间质成纤维细胞的影响[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(6): 445-449.
- [10] Kapadia S, Lee J, Torre2Amione g, et al. Tumor necrosis factor α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin admin-

istration[J]. J Clin Invest, 1995, 96(2): 1042-1052.

- [11] Yokoyama T. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart[J]. J Clin Invest, 1993, 92: 2303-2312.
- [12] 陈以平. 尿酸性肾病的治疗进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2(5): 249-250.
- [13] Kerm PA, Saghizadeh M, Ong JM, et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. J Clin Invest, 1995, 95: 2111-2119.
- [14] Jaramillo M, godbout M, Naccache PH, et al. Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals. J Biol Chem, 2004, 279: 52797-52805.
- [15] 肖祖容, 苏筠霞, 李建华. 氯沙坦对尿酸性肾病大鼠肾组织 MCP-1 和 ICAM-1 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 5(13): 406-409.

(2013-05-24 收稿 责任编辑: 徐颖)