

资生肾气丸对痛风大鼠 GSH、NF- κ B 表达水平的影响

韩洁茹 解颖 陈飞 李富震 姜德友

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨, 150040)

摘要 目的:观察资生肾气丸对痛风大鼠血清中谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及大鼠滑膜核因子 κ B(NF- κ B)的表达水平的影响,探讨资生肾气丸防治痛风的作用机制。方法:将105只SD大鼠随机分为空白组(BG)、模型组(MG)、中药对照组(CMCG)、西药对照组(WMCG)及资生肾气丸复方低、中、高观察组(ZSD-L/M/HG)7组,每组15只。采用尿酸钠(MSU)联合氧嗪酸钾(OXO)注射建立大鼠痛风模型,检测各组大鼠血清中GSH、GSH-Px含量,检测大鼠滑膜组织中NF- κ B含量。结果:MG和BG的GSH、GSH-Px和NF- κ B含量比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);WMCG、ZSD-MG、ZSD-HG的GSH、GSH-Px和NF- κ B含量与MG比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);ZSD-MG与CMCG比较,GSH、GSH-Px和NF- κ B含量差异有统计学意义($P < 0.05$),与WMCG比较,GSH、GSH-Px和NF- κ B含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:资生肾气丸可调控痛风大鼠GSH、GSH-Px和NF- κ B的表达,对痛风具有防治作用。

关键词 痛风;资生肾气丸;中药复方;GSH;GSH-Px;NF- κ B;大鼠;实验研究

Effects of Zisheng Shenqi Pills on Expression of GSH and NF- κ B in Gouty Rats

Han Jieru, Xie Ying, Chen Fei, Li Fuzhen, Jiang Deyou

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Zisheng Shenqi Pills on expression of GSH, GSH-Px and NF- κ B in gouty rats and to explore the mechanism of Zisheng Shenqi Decoction in the treatment of the gout. **Methods:** A total of 105 rats were randomly divided into 7 groups: a blank control group, a model group, a Chinese medicine control group, a western medicine control group, high, medium, low dosage Zisheng Shenqi Pills group, with 15 rats in each group. The uric acid sodium and oxygen polybenzoxazines potassium were used to induce rat gouty arthritis model. The concentration of serum GSH and GSH-Px and the contents of synovial NF- κ B in rats were detected. **Results:** The differences of GSH, GSH-Px and NF- κ B level between the model group and the blank group had statistical significance ($P < 0.01$). The expression of GSH, GSH-Px and NF- κ B in model group was also apparently different from that in western medicine control group, high and medium dosage Zisheng Shenqi Pills group, and the differences had statistical significance ($P < 0.01$). The expression of GSH, GSH-Px and NF- κ B in medium dosage herbal group was apparently different from that in Tongfengshu control group ($P < 0.05$), and had not apparently difference from Colchicine control group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Zisheng Shenqi Pills can control the expression of GSH, GSH-Px and NF- κ B in gout rats. It has certain curative effect with gout.

Key Words Gouty arthritis; Zisheng Shenqi Pills; Chinese medicine compound; GSH; GSH-Px; NF- κ B; Experimental rats; Experimental studies

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.12.017

痛风是一组嘌呤代谢紊乱所致的代谢紊乱疾病,其主要临床特点是体内尿酸产生过多或排泄尿酸减少,引起血尿酸升高,形成高尿酸血症以及痛风性关节炎等^[1]。研究结果表明^[2],痛风源于饮食,但其致病因素众多,与遗传、年龄、性别、精神因素、环境因素、地区分布等均有密切联系。痛风对患者身体危害极大,发作主要以局部关节剧烈疼痛为主要表现,长期患病得不到控制的痛风患者,可能会引起

肾脏损害,对身体危害极大,患者生命质量降低,经济负担加重。对于痛风的治疗,西药能有效地控制其急性发作,但不良反应较多^[3],因此选用安全有效的中医中药是治疗痛风的必然趋势。本课题组总结多年的临床经验,提出中医经典方剂——资生肾气丸中药复方治疗痛风,前期动物实验^[4-5]已验证,资生肾气丸中药复方具有抗炎及镇痛作用。本实验就资生肾气丸中药复方对痛风大鼠模型血清中氧化应

基金项目:国家自然科学基金项目(81704055);2017年黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2017224)

作者简介:韩洁茹(1982.07—),女,医学博士,副教授,教研室主任,研究方向:经方治疗内伤疑难杂病的临床与基础研究和龙江医派研究, E-mail:87569229@qq.com

通信作者:姜德友(1960.05—),男,医学博士,教授,院长,研究方向:经方治疗内伤疑难杂病的临床研究和龙江医派研究, E-mail:jiangdeyou@126.com

激相关指标谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和滑膜组织转录因子核因子 κ B(NF- κ B)的影响展开研究,为资生肾气丸中药复方的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 105 只,体质量(200±20)g,由黑龙江中医药大学实验动物研究中心提供[合格证号 SCXK(黑)2013004],实验室常规环境饲养。

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、山药、车前子、土茯苓等,由黑龙江中医药大学附属第一医药制剂科提供,以中药原液 0.94、1.88、3.76 mL 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,批号 170126):配置成 0.05 mg/mL 秋水仙碱混悬液;痛风舒片(湖北绿金子药业有限责任公司,批号 170705):配置成 0.1 g/mL 痛风舒片混悬液。均置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.1.3 试剂与仪器 痛风造模试剂产品:氧嗪酸钾盐(批号 CAS2207-75-2, Sigma),微晶尿酸钠结晶(批号 CAS1198-77-2, Sigma);比色法检测试剂产品:GSH 和 GSH-Px 试剂盒(南京建成,批号 201801);WB 检测试剂产品:Nf κ B 羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP 均购自碧云天公司,NF- κ B p65 antibody 为 Boster 产品。仪器:紫外可见分光光度计(上海佑科,型号:UV752 型),酶标仪(美国 BIOTEK,型号:ELX-800 型),WD-9413B 型凝胶成像系统(北京六一)。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型制备 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为空白组(BG)、模型组(MG)、中药对照组(CMCG)、西药对照组(WMCG)、资生肾气丸高剂量组(ZSD-HG)、资生肾气丸中剂量组(ZSD-MD)、资生肾气丸低剂量组(ZSD-LG)7 组,每组 15 只。除 BG 外,其他各组均按以下方法造模^[6]:用 3% OXO 溶液按每 100 g 大鼠注射 1 mL 的剂量进行腹腔内注射,15 min 后用 BD 针以 30°~40°角度插入大鼠左侧膝关节腔,注射 10% MSU 溶液 0.2 mL。BG 只采用 BD 针将 0.2 mL 生理盐水注入膝关节腔内。

1.2.2 干预方法 大鼠灌胃溶液以每 100 g/mL 为标准,BG 和 MG 均用生理盐水灌胃,WMCG 和 CM-

CG 分别用秋水仙碱溶液和痛风舒片溶液灌胃,ZSD-LG、ZSD-MG、ZSD-HG 分别给予相应浓度的资生肾气丸原液灌胃。2 次/d,连续 7 d,末次给药 1 h 后造模。

1.2.3 检测指标与方法 造模后 4 h 后,各组大鼠眼眶取血,4℃ 4 000 r/min 离心 15 min,分离血清,置于-80℃ 冰箱内保存待测。大鼠取血后处死,解剖大鼠右膝关节,切取受试关节的滑膜组织,迅速置于-80℃ 冰箱内保存待测。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.3 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,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。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 GSH 及 GSH-Px 含量比较 MG 血清 GSH 和 GSH-Px 含量较 BG 明显降低($P < 0.01$),除 ZSD-LG 各观察组经治疗后血清 GSH 和 GSH-Px 含量与 MG 比较均显著升高($P < 0.05$),但仍低于 BG;与 MG 比较,ZSD-LG 血清中 GSH 含量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 GSH-Px 升高,差异无统计学意义($P > 0.05$);与 MG 比较,ZSD-HG 和 ZSD-MG 组血清中 GSH 和 GSH-Px 的含量明显升高($P < 0.01$);而 CMCG、ZSD-LG 血清中 GSH 和 GSH-Px 含量与 WMCG 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);ZSD-MG 组血清 GSH、GSH-Px 含量与 CMCG 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);WMCG 血清 GSH 和 GSH-Px 含量与 ZSD-HG、ZSD-MG 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),且 ZSD-MG 和 ZSD-HG 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 GSH 和 GSH-Px 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	GSH (nmol/mL)	GSH-Px (U/mL)
BG	191.93 ± 39.21	65.46 ± 15.17
MG	69.82 ± 18.05 **	32.57 ± 8.34 **
WMCG	163.20 ± 51.46 Δ	62.51 ± 12.52 Δ
CMCG	111.91 ± 32.86 Δ ▲	52.19 ± 15.45 Δ ▲
ZSD-LG	83.56 ± 27.01 Δ ▲	36.39 ± 7.66 ▲
ZSD-MD	146.27 ± 34.91 Δ □	57.10 ± 8.94 Δ □
ZSD-HG	147.26 ± 38.47 Δ	57.70 ± 15.44 Δ

注:与 BG 比较,** $P < 0.01$;与 MG 比较, $\Delta P < 0.05$;与 WMCG 比较,▲ $P < 0.05$;与 CMCG 比较,□ $P < 0.05$

2.2 大鼠滑膜组织 NF- κ B 含量 在滑膜组织中,NF- κ B 在 MG 中表达上调,各观察组经治疗后 NF-

κB 表达下降,蛋白印记表现见图 1。从图 1 可以看出:与 BG 比较,MCNF-κB 的表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 MG 比较,ZSD-LG 经治疗后滑膜 NF-κB 表达下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$);ZSD-HG、ZSD-MG 组、WMCG 与 MG 比较,滑膜中 NF-κB 表达显著下降($P < 0.01$);CMCG 与 MG 比较,滑膜中 NF-κB 表达下降($P < 0.05$);而 CMCG、ZSD-LG 滑膜中 NF-κB 含量与 WMCG 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);WMCG 滑膜中 NF-κB 含量与 ZSD-HG、ZSD-MG 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),且 ZSD-MG 和 ZSD-HG 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);CMCG 和 ZSD-MG 滑膜中 NF-κB 含量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 各组大鼠灰度值比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)			
组别	NF-κB p65	Histone H3	NF-κB p65/Histone H3
BG	630.07 ± 7.93	3170.4 ± 8.81	0.20 ± 0.48
MG	2439.9 ± 5.76	3128.4 ± 8.17	0.78 ± 0.34 **
WMCG	1077.7 ± 9.00	2957.6 ± 8.72	0.36 ± 0.56 △
CMCG	1572.4 ± 9.37	2903.5 ± 6.23	0.54 ± 0.29 △▲
ZSD-LG	2180.6 ± 8.63	2917.5 ± 6.02	0.75 ± 0.11 ▲
ZSD-MD	905.29 ± 5.37	3011.7 ± 7.79	0.30 ± 0.46 △□
ZSD-HG	987.08 ± 5.50	3141.7 ± 9.78	0.31 ± 0.37 △

注:与 BG 比较, ** $P < 0.01$;与 MG 比较, △ $P < 0.05$;与 WMCG 比较, ▲ $P < 0.05$;与 CMCG 比较, □ $P < 0.05$

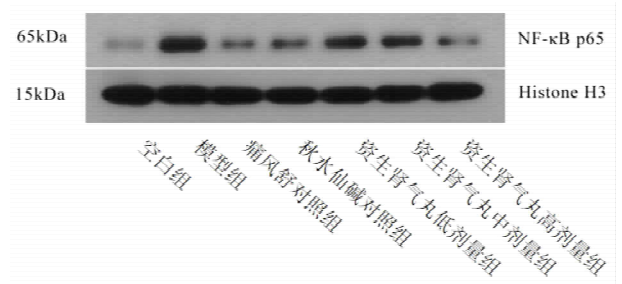


图 1 各组大鼠(痛风模型)实验滑膜中 NF-κB 蛋白电泳图

3 讨论

痛风是因嘌呤代谢紊乱所导致的一组慢性代谢性疾病,MSU 沉积是痛风的特征性病理改变^[7]。关节软骨、滑膜、关节周围软组织等部位变化主要是炎症反应细胞浸润,MSU 沉积而局部坏死、增生性变化。痛风早期 MSU 结晶从血液中析出进入关节腔中,滑液中的蛋白质立即吸附结晶,并被巨噬细胞吞噬,多核白细胞、单核细胞浸润,导致 IL-1β、TNF-α 等炎症反应因子大量分泌,诱发关节局部炎症反应发生^[8-9]。

研究发现,痛风除了炎症反应机制外,氧化应激在痛风的发生发展中也起着重要的作用^[10]。促炎

性反应因子可以引发人体内氧化应激系统的激活,当氧化应激激活后,机体倾向于氧化,引起 NO -、O₂ -、H₂O₂、RO - 等物质大量产生,在 MSU 晶体的和作用下,减弱细胞的生存能力,加快细胞凋亡的进程,进一步破坏关节组织^[11-12]。与此同时,中性粒细胞在吞噬 MSU 晶体的过程中,可以诱导大量的酶体和蛋白酶的释放,进一步加重氧化损伤^[13]。GSH 是一种小分子自由基清除剂,广泛分布于机体内,有谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成,是人体内重要的抗氧化剂。GSH 能够使氧自由基失活,保护细胞抗氧化,防止其凋亡,减轻机体组织氧化应激的反应,减轻炎症反应,这是机体正常免疫调节过程。GSH-Px 与 GSH 具有相似的作用,也是一种酶类抗氧化剂,可以清除氧自由基,抑制过氧化,从而保护机体组织免受损伤^[14]。

本实验结果显示,造模后,MG 与 BG 比较,血清中 GSH、GSH-Px 水平显著下降($P < 0.01$),说明在痛风大鼠中 GSH、GSH-Px 呈低表达,大鼠体内发生炎症反应时,产生的炎症反应因子损伤氧化防御系统。ZSD-HG 和 ZSD-MG 与 MG 比较,GSH、GSH-Px 浓度明显上调($P < 0.05$),证实资生肾气丸中药复方能够调节机体抗氧化作用,降低 O²⁻ 含量,间接抑制活性氧激活炎症反应的途径,从而起到防治痛风的作用。CMCG 和 ZSD-LG 血清中 GSH、GSH-Px 含量上调($P < 0.05$),而与秋水仙碱对照组比较差异仍有统计学意义($P < 0.05$),说明秋水仙碱和 ZSD-MG、ZSD-HG 对痛风的疗效较佳。

1986 年美国麻省理工学院癌症研究中心的 Baltimore 和生物医学研究所的 Rwnansen 首次发现 NF-κB,他们在成熟的浆细胞和 B 细胞中发现一种蛋白与免疫球蛋白 κ-轻链基因增强子的 B 位点结合,调控免疫球蛋白 κ-轻链上基因的转录,因此命名其为核转录因子 κB(NF-κB)^[15]。经典的 NF-κB 信号通路是当细胞受到病原微生物、细胞因子等刺激时,引起特异性跨膜受体(如 Toll 样受体、白细胞介素-1 受体等)的空间构象发生变化,经过一系列复杂的级联反应使 IκB 激酶复合物(IKK)激活。正常状态下,NF-κB 在胞质内与 NF-κB 抑制蛋白结合呈现为非活性状态。但激活的 IKK 可以使 NF-κB 从非活性状态的复合体结构中释放出来,并转入核内与靶基因启动子结合,调节靶基因的表达,NF-κB 调节的靶基因编码蛋白包括多种细胞因子、趋化因子等。激活的 NF-κB 又可使 IL-1β 等促炎症反应因子释放,进一步激活炎症反应,而释放出来的 IL-1β 可以

通过一系列的炎症级联反应激活 NF- κ B, 因此形成了恶性循环, 扩大炎性反应, 促进痛风炎性反应发生^[16-17]。

本实验采用 Western blot 法检测各组大鼠滑膜中 NF- κ B 表达, 结果显示 MG 与 BG 比较, 滑膜组织 NF- κ B 表达增强 ($P < 0.01$), 说明在痛风大鼠中尿酸盐刺激引发 NF- κ B 激活, 促进了炎性反应发生。ZSD-MG、ZSD-HG 与 MG 比较, NF- κ B 含量明显下降 ($P < 0.01$), 证实了资生肾气丸中药复方能够降低 NF- κ B 含量, 直接抑制炎性反应因子的释放, 这可能是资生肾气丸中药复方防治 GA 的作用机制之一。

痛风作为病名首载于丹溪的《格致余论》, 在此之前, 该病皆以痹证统称。医圣张仲景首创“历节病”之名, 他在《金匮要略》中描述“疼痛如掣”“身体羸瘦”“独足肿大”“诸肢节疼痛”等作为历节病的主要表现症状, 条文中的关节疼痛、肿胀、畸形等与痛风尤为相似。孙思邈认为痹病为“肾虚”复感“外邪”而致, 定当补虚、祛邪并用, 而这一思想, 一直贯穿宋、元、明、清乃至如今的各代医学实践中, 对后世影响深远。痛风性关节炎临证虽纷杂繁多, 而中医在攻克难治疾病中发挥着得天独厚的优势。本课题组精研经典并结合多年的临床经验, 提出补肾利湿为法为痛风治疗大法。本课题组认为, 现代人群, 多久劳伤肾, 饮食不节, 致脾肾受损, 代谢失衡, 产生痰饮、瘀血等, 痰瘀互结, 痹阻经络, 流注关节, 则出现肢体肿胀疼痛, 甚至僵硬、变形。故肾虚作为疾病发生的前提条件, 贯穿于疾病的始终, 痰浊为疾病发展的病理产物, 二者互为因果, 互相影响, 最终导致痛风发生。痛风之疾, 当以补肾为本, 兼除湿邪而愈。本课题组采用补肾利湿法指导临床用药, 选用资生肾气丸化裁治疗痛风, 方药组成由熟地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、泽泻、怀牛膝、土茯苓、萆薢等中药组成。本方重用熟地黄取其滋肾阴, 益精髓之效, 山茱萸平补肝肾, 有“肝肾同源”之意。山药补脾益肾, 与熟地黄、山茱萸相合, 补肾以治其本。泽泻为臣, 既利湿而泄肾浊之气, 又可防熟地黄滋腻太过之功。土茯苓, 集解毒、除湿、通利关节于一体, 且气味平和。萆薢利湿祛浊, 祛风除痹。最终以怀牛膝、牡丹皮为佐药, 取其活血通络除痹之效, 牛膝引诸药下行, 作用于关节而发挥其疗效。诸药合用, 标本兼治, 共奏补肾利湿之功。

综上所述, 本研究显示资生肾气丸复方中药可以明显提高痛风模型大鼠血清中 GSH-Px 与 GSH 的含量, 降低滑膜中 NF- κ B 的活性, 所以推测资生肾

气丸可通过提高机体抗氧化能力, 抑制炎性反应转录因子激活, 从而缓解痛风的炎性反应症状, 为资生肾气丸治疗痛风提供实验依据。

参考文献

- [1] Sabina EP, Rasool M. An in vivo and in vitro potential of Indian ayurvedic herbal formulation triphala on experimental gouty arthritis in mice[J]. Vascular Pharmacology, 2008, 48(1): 14-20.
- [2] 张昱. 痛风[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2006: 2.
- [3] 吴东海, 王国春. 临床风湿病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 97-100.
- [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.
- [7] Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells[J]. Nature, 2003; 425(6957): 516-521.
- [8] Anzai N, Jutabha P, Amonpatumrat-Takahashi S, et al. Recent advances in renal urate transport: characterization of candidate transporters indicated by genome-wide association studies[J]. Clinical and Experimental Nephrology, 2012, 16(1): 89-92.
- [9] Shen Z, Tieu K, Wilson D, et al. Evaluation of Pharmacokinetic Interactions Between Lesubirad, a New Selective Urate Reabsorption Inhibitor, and Commonly Used Drugs for Gout[J]. Treatment Clin Pharmacol Drug, 2017, 6(4): 377-380.
- [10] Zamudio-Cuevas Y, Hernandez-Diaz C, Pineda C, et al. Molecular basis of oxidative stress in gouty arthropathy[J]. Clin Rheumatol, 2015, 34(10): 1667-1672.
- [11] George J, Struthers AD. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress[J]. Vasc Health Risk Manag, 2009, 5(1): 265-272.
- [12] So A, Thorens B. Uric acid transport and disease[J]. Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(6): 1791-1799.
- [13] Alvarez-Soria MA, Herrero-Beaumont G, Sanchez-Pernaute O, et al. Diacerein has a weak effect on the catabolic pathway of human osteoarthritis synovial fibroblast: comparison of its effects on osteoarthritic chondrocytes[J]. Rheumatology, 2008, 47(5): 627-633.
- [14] Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants[J]. J Pathol, 2003, 201(1): 28-36.
- [15] 王世涛. OPG 调控破骨细胞 NF- κ B 通路的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [16] 张治宇, 方策, 王秀华. 痛风性关节炎的分子生物学基础[J]. 中国骨伤, 2001, 14(3): 160.
- [17] Chlesinger N. Management of acute and chronic gouty arthritis: present state of the art[J]. Drugs, 2004, 64(21): 2399-2416.