

黑骨藤醇提取物调控急性痛风性关节炎模型大鼠血清炎症因子及滑膜功能

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3193>

党荣敏¹, 李宁怡², 谢洪书¹, 蒋催蓉¹, 罗康华¹, 姚文琴¹

2095-4344.3193

投稿日期: 2020-04-01

送审日期: 2020-04-09

采用日期: 2020-05-20

在线日期: 2020-11-20

中图分类号:

R459.9; R318; R684.3

文章编号:

2095-4344(2021)17-02681-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

实验动物及分组

将 60 只健康 SD 大鼠随机分为 6 组, 分别为空白对照组、模型对照组、秋水仙碱治疗组、黑骨藤醇提取物高、中、低剂量治疗组, 每组 10 只。

造模及药物干预

除空白对照组外, 其他各组均在关节腔内注入尿酸钠溶液制备急性痛风性关节炎模型, 然后予以秋水仙碱、高、中、低剂量黑骨藤醇提取物治疗。

主要检测指标

- (1) 关节肿胀度;
- (2) 血清和滑膜组织中白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 17 水平;
- (3) 滑膜病理改变;
- (4) 滑膜组织中 NF- κ B、ERK1/2 和 JNK 蛋白表达。

文章描述一

△黑骨藤醇提取物为黑骨藤有效部位, 其药理作用包括抗炎、镇痛等;

△黑骨藤醇提取物能明显改善急性痛风性关节炎大鼠关节症状, 下调炎症因子表达水平, 改善滑膜功能, 该作用可能与其下调 NF- κ B、ERK1/2 和 p-JNK 蛋白表达有关。

文题释义:

痛风性关节炎: 是由于尿酸盐沉积在关节囊、滑囊、软骨、骨质和其他组织中而引起病损及炎症反应, 多见于第一跖趾关节, 也可发生于其他较大关节, 尤其是踝部与足部关节。

白细胞介素 17: 是一种主要由活化的 T 细胞产生的致炎细胞因子, 可以促进 T 细胞的激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子如白细胞介素 6、白细胞介素 8、粒细胞-巨噬细胞刺激因子和化学趋活素及细胞黏附分子 1, 从而导致炎症的产生。

摘要

背景: 研究发现, 阻断滑膜分泌炎症递质的药物治疗急性痛风性关节炎有较好的应用前景。近年来, 中药治疗急性痛风性关节炎的研究取得了很大成就。

目的: 探讨黑骨藤醇提取物对急性痛风性关节炎血清炎症因子及滑膜功能的影响。

方法: 将 60 只健康 SD 大鼠随机分为 6 组, 分别为空白对照组、模型对照组、秋水仙碱治疗组、黑骨藤醇提取物高、中、低剂量治疗组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其他各组均在关节腔内注入尿酸钠溶液制备急性痛风性关节炎模型, 然后予以秋水仙碱、高、中、低剂量黑骨藤醇提取物治疗。造模后 1-7 d 观察关节肿胀度; 造模后 7 d 采用 ELISA 检测血清和滑膜组织中白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 17 水平, 苏木精-伊红染色观察滑膜病理改变, Western blot 检测滑膜组织中 NF- κ B、ERK1/2 和 JNK 蛋白表达。

结果与结论: ①模型对照组大鼠关节肿胀, 血清和滑膜组织中白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 17 水平升高, 滑膜组织具有明显炎症细胞浸润和滑膜细胞增生, NF- κ B、ERK1/2 和 p-JNK 蛋白表达水平明显升高; ②给予秋水仙碱、黑骨藤醇提取物治疗后, 上述指标明显改善, 高剂量黑骨藤醇提取物组与秋水仙碱组无显著差异, 且黑骨藤醇提取物具有剂量依赖性; ③结果表明, 黑骨藤醇提取物能明显改善急性痛风性关节炎大鼠关节症状, 下调炎症因子表达水平, 改善滑膜功能, 该作用可能与其下调 NF- κ B、ERK1/2 和 p-JNK 蛋白表达有关。

关键词: 骨; 痛风性关节炎; 黑骨藤醇提取物; 炎症; 因子; 滑膜; 大鼠; 实验

Regulating serum inflammatory factors and synovial cell function of gouty arthritis model rats by alcohol extract of *Gardneria angustifolia*

Dang Rongmin¹, Li Ningyi², Xie Hongshu¹, Jiang Cuirong¹, Luo Kanghua¹, Yao Wenqin¹

¹Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558000, Guizhou Province, China; ²Research Section of Pain, School of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

Dang Rongmin, Associate professor, Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558000, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have found that drugs that block the secretion of inflammatory transmitters in the synovium have good application prospects in the treatment of acute gouty arthritis. In recent years, great achievements have been made in the treatment of acute gouty arthritis with traditional Chinese medicine.

¹黔南民族医学高等专科学校, 贵州省都匀市 558000; ²贵州医科大学麻醉学院疼痛教研室, 贵州省贵阳市 550000

第一作者: 党荣敏, 女, 1976 年生, 贵州省湄潭县人, 汉族, 副教授, 主要从事病原微生物学和免疫学等方面研究。

<https://orcid.org/0000-0002-0410-1437> (党荣敏)

基金资助: 黔南民族医学高等专科学校 2017 校基金项目 (QNYZ201704), 项目负责人: 党荣敏; 贵州省厅校联合自然科学类项目 (GZWKJ2013-2-003), 项目负责人: 党荣敏

引用本文: 党荣敏, 李宁怡, 谢洪书, 蒋催蓉, 罗康华, 姚文琴. 黑骨藤醇提取物调控急性痛风性关节炎模型大鼠血清炎症因子及滑膜功能 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(17):2681-2686.



OBJECTIVE: To study the effect of alcohol extract of *Gardneria angustifolia* on serum inflammatory factors and synovial cell function in patients with acute gouty arthritis.

METHODS: Sixty healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups: blank control group, model control group, colchicine treatment group, *Gardneria angustifolia* alcohol extract high, medium and low dose treatment groups, with 10 rats in each group. In addition to the blank control group, the other groups were injected with sodium urate solution into the articular cavity to prepare acute gouty arthritis models, and then treated with colchicine, high, medium and low doses of *Gardneria angustifolia* alcohol extract. The swelling degree of the joint was observed at 1–7 days after modeling. At 7 days after modeling, the levels of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , interleukin-17 in the serum and synovium were detected by ELISA; the pathological changes of the synovium were observed by hematoxylin-eosin staining, and the expression of nuclear factor- κ B, ERK1/2 and JNK protein in the synovium was detected by western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: In the model control group, the joint swelling, the level of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and interleukin-17 in the serum and synovium were increased, the synovium had obvious inflammatory cell infiltration and synovium cell proliferation, the expression of nuclear factor- κ B, ERK1/2 and p-JNK protein was significantly increased. After the treatment with colchicine and *Gardneria angustifolia* alcohol extract, the above indexes were significantly improved, and there was no significant difference in the high dose *Gardneria angustifolia* alcohol extract group and colchicine group. Moreover, *Gardneria angustifolia* alcohol extracts showed a dose-dependent effect. The alcohol extract of *Gardneria angustifolia* can significantly improve the symptoms of acute gouty arthritis in rats, down-regulate the expression of inflammatory factors, and improve the function of synovial cells, which may be related to the down-regulation of nuclear factor- κ B, ERK1/2 and p-JNK protein expression.

Key words: bone; gouty arthritis; *Gardneria angustifolia* alcohol extract; inflammation; factor; synovium; rat; experiment

Funding: the 2017 Foundation of Qiannan Medical College for Nationalities, No. QNYZ201704 (to DRM); Guizhou Provincial Department-School Joint Natural Science Project, No. GZWKJ2013-2-003 (to DRM)

How to cite this article: DANG RM, LI NY, XIE HS, JIANG CR, LUO KH, YAO WQ. Regulating serum inflammatory factors and synovial cell function of gouty arthritis model rats by alcohol extract of *Gardneria angustifolia*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(17):2681-2686.

0 引言 Introduction

随着人们生活水平的不断提高, 生活习惯和饮食结构也发生变化, 痛风在中国的发病率明显升高, 且呈年轻化趋势, 严重危害患者的身体健康。痛风是嘌呤物质代谢紊乱、尿酸浓度持续增高导致尿酸盐结晶沉积软组织所致的一组代谢性疾病, 其临床表现为尿酸水平升高及由此引起的痛风性关节炎反复发作^[1]、痛风石沉积^[2-3]、痛风石慢性关节炎和关节畸形等^[4-5]。急性痛风性关节炎是痛风最常见的首发症状, 如不积极治疗, 易导致机体严重性的疾病。目前对痛风常规治疗的西药有秋水仙碱、非类固醇类抗炎药、糖皮质激素、非布索坦、别嘌醇或苯溴马龙等, 临床发现它们的毒副作用较大^[6-9], 从而在临床上应用受限。近年来, 单味中药或中药提取物、复方中药治疗急性痛风性关节炎方面的研究取得了很大成就, 例如苗药透骨香、虎杖乙醇提取物、绞股蓝提取物、槲皮素、加味四妙丸、川胡抗痛风合剂等^[10-13], 均可不同程度减轻关节肿胀度, 对炎性疼痛发挥镇痛作用, 降低尿酸和黄嘌呤氧化酶水平, 改善关节滑膜组织病理改变。黑骨藤是贵州苗族地区民间广泛用于风湿、类风湿、痛风等疾病的民族药, 苗药名为蛙莽塞(贵州黔南州), 俗称黑骨头、滇杠柳, 为萝藦科植物黑龙骨的根或全草, 味苦、辛, 性凉, 小毒, 具有舒筋活血、祛风除湿、消炎解毒、镇痛等功效, 研究表明黑骨藤有抗炎镇痛、抗肿瘤、抗氧化损伤、抗类风湿性关节炎及抗急性痛风性关节炎等作用^[14-17]。课题组进一步以镇痛和抗炎作为主要药效学指标对黑骨藤有效部位进行筛选, 结果发现黑骨藤水提物和石油醚提取物的镇痛、抗炎作用均不如醇提物, 最后确定黑骨藤醇提取物为黑骨藤有效部位^[18]。该实验拟用苗药黑骨藤醇提取物不同剂量(高、中、低剂量治疗组分别为100, 50, 25 mg/kg)灌胃尿酸钠诱导的急性痛风性关节炎模型, 来研究黑骨藤醇提取物对急性痛风性关节炎的作用及机制, 为挖掘苗药黑骨藤的药用价值提供科学的理论基础和实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年3至11月在黔南民族医学高等专科学校完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 12周龄SPF级雄性SD大鼠60只, 体质量180–200 g, 由黔南民族医学高等专科学校实验动物中心提供。实验过程中对动物的饲养及操作处置符合相关动物伦理学标准。

1.3.2 实验药材及试剂、仪器 黑骨藤药材购于贵阳市万东桥中药材市场, 由贵阳医学院生药室鉴定并进行提取; 秋水仙碱片为云南西双版纳版纳药业有限责任公司生产, 使用前用蒸馏水稀释成0.003 g/L; 尿酸钠结晶购自美国Sigma公司; 吐温80购自天津复精细化工研究所; 白细胞介素1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素17试剂盒购自南京建成生物工程研究所; BCA蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所; 兔抗鼠NF- κ B p65、ERK1、ERK2、JNK和p-JNK抗体购于英国Abcam公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 黑骨藤醇提取物的制备 取黑骨藤药材, 粉碎, 过60目筛, 加入8倍质量的体积分数80%乙醇, 在70℃水浴中回流提取3次, 每次2 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至相对密度为1.5的流浸膏, 再加入1倍体积量的水, 冷藏并静置24 h, 取上清液, 回收乙醇, 浓缩, 干燥, 即得黑骨藤醇提取物。

1.4.2 实验动物分组 SD大鼠适应性饲养3 d后, 将60只健康SD大鼠随机分为6组, 分别为空白对照组、模型对照组、秋水仙碱治疗组、黑骨藤醇提取物高、中、低剂量治疗组, 每组10只。实验大鼠均分笼饲养, 自由摄食饮水, 自然光照并定期清洁、消毒。

1.4.3 急性痛风性关节炎造模^[17] 除空白对照组外, 其他各组均用水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 麻醉15 min后用6号注射针于右侧踝关节后侧30°–40°方向

插入至跟腱内侧，感觉有落空感后，将 0.2 mL 尿酸钠溶液（取 250 mg 尿酸钠结晶，加入 45 mL 生理盐水注射液，再加 5 mL 吐温 80，加热搅拌，配成 50 g/L 的尿酸钠溶液）注入关节腔内，以关节囊对侧鼓起为注入标准，诱导急性痛性关节炎。空白对照组采用 6 号注射针于右侧踝关节后侧 30°-40° 方向插入至跟腱内侧，将 0.2 mL 生理盐水注入关节腔内。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

选择动物的基本资料	12 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，体质量 180-200 g，由黔南民族医学高等专科学校实验动物中心提供
造模技术描述	用 6 号注射针于右侧踝关节后侧 30°-40° 方向插入至跟腱内侧，感觉有落空感后，将 0.2 mL 尿酸钠溶液注入关节腔内，诱导急性痛性关节炎
动物数量及分组方法	SD 大鼠适应性饲养 3 d 后，将 60 只健康 SD 大鼠随机分为 6 组，分别为空白对照组、模型对照组、秋水仙碱治疗组、黑骨藤醇提取物高、中、低剂量治疗组，每组 10 只
造模成功评价指标	以关节囊对侧鼓起为注入成功标准，诱导急性痛性关节炎
造模后取材及观察指标	造模前 1 h 及造模后 1-7 d 观察关节肿胀度；在造模后第 7 天取血清和滑膜组织，ELISA 法检测白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 17 水平，Western blot 检测滑膜组织中 NF- κ B、ERK1/2 和 JNK 蛋白表达
伦理委员会批准	实验方案经黔南民族医学高等专科学校医学伦理委员会批准

1.4.4 给药治疗 造模后 1 h 开始给药，秋水仙碱治疗组每天给予秋水仙碱 9 mg/kg 灌胃，连续 7 d；黑骨藤醇提取物高、中、低剂量治疗组分别给予 100，50，20 mg/kg 黑骨藤醇提取物灌胃，连续 7 d。空白对照组和模型对照组给予等体积蒸馏水灌胃，连续 7 d。以上各组大鼠均为每天上午 9:00 灌胃，1 次/d。

1.5 主要观察指标

1.5.1 关节肿胀度 造模前 1 h 及造模后 1-7 d 观察关节肿胀度，每天灌胃前采用 2 cm 试纸配合游标卡尺测量踝关节周长，并计算肿胀度，每个时间点测量 3 次，取平均值。关节肿胀度 (%) = (不同时间点关节周长 - 初始周长) / 初始周长 \times 100%。

1.5.2 血清和滑膜组织中白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 17 水平 在第 7 天灌胃 2 h 后于股动脉采血，血液在真空采血管中静置 0.5 h，然后 3 500 r/min 离心 15 min，收集血清，-20 $^{\circ}$ C 保存。采血后处死大鼠，取大鼠造模踝关节以下 0.5 cm 至以上 2 cm 部分，将分离出的滑膜组织置于研钵中研碎，加入生理盐水，用组织匀浆器进行匀浆，直至匀浆液体呈现均匀一致的悬浊液，倒入 EP 管中，3 000 r/min 离心 5 min，取上清液，-20 $^{\circ}$ C 保存。按照 ELISA 试剂盒说明书要求检测血清和滑膜组织中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 17 水平。对于同一指标，每一样本重复测量 3 次，取平均值。

1.5.3 病理组织形态学观察 取滑膜组织，采用 40 g/L 多聚甲醛固定，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，切片厚度 4 μ m，置于干净载玻片上，60% 恒温箱中孵育 4 h，脱蜡后苏木精染色 10 min，流水冲洗 1 min，1% 盐酸乙醇分化 5 s，

待颜色由蓝色变为红色后，蒸馏水冲洗 6 min，用 1% 伊红染色 5 s，乙醇脱水后采用二甲苯透明，晾干，封固，在显微镜下观察滑膜病理改变。

1.5.4 Western blot 检测滑膜组织中 NF- κ B、ERK1/2 和 JNK 蛋白表达 取滑膜组织，放入干净研磨器于冰上操作，加入组织裂解液提取滑膜组织总蛋白，严格按 BCA 蛋白定量试剂盒操作说明测定蛋白浓度，提取的蛋白与 SDS 上样缓冲液混匀，煮沸变性 10 min，经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移蛋白至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉室温孵育 2 h，加入 NF- κ B、ERK1/2、JNK 和 GAPDH 抗体，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，TBS-T 缓冲液洗膜 10 min \times 5 次，加入 HRP 标记的二抗工作液，37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 2 h，TBS-T 缓冲液洗膜 10 min \times 5 次，采用 ECL 法显色，凝胶成像系统拍照并分析，以 NF- κ B、ERK1/2、p-JNK/JNK 蛋白灰度值与 GAPDH 蛋白灰度值的比值作为目的蛋白表达水平。对于同一指标，每一样本重复测量 3 次，取平均值。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，踝关节肿胀度计量资料比较应用重复测量方差分析，其他指标计量资料比较用单因素方差分析，组间两两比较用 LSD-*t* 检验，*P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 60 只 SD 大鼠全部进入结果分析，中途无脱落。

2.2 各组大鼠不同时间点的踝关节肿胀度 注射尿酸钠后，模型对照组大鼠关节肿胀增加，于造模 1 d 后达到高峰。治疗 5 d 后，与模型对照组相比，秋水仙碱组 (*P* < 0.01) 和黑骨藤醇提取物高剂量组 (*P* < 0.05) 关节肿胀度明显降低。治疗 7 d 后，与模型对照组相比，秋水仙碱组 (*P* < 0.01)、黑骨藤醇提取物高剂量组 (*P* < 0.01)、中剂量组 (*P* < 0.05)、低剂量组 (*P* < 0.05) 关节肿胀度明显降低，且黑骨藤醇提取物高剂量组关节肿胀度明显低于低剂量组 (*P* < 0.05)，见表 1。

2.3 各组大鼠血清、滑膜组织炎症因子水平 从表 2、3 可以看出，秋水仙碱组、黑骨藤醇提取物高剂量组血清、滑膜组织白细胞介素 1 β 、白细胞介素 17、肿瘤坏死因子 α 水平显著低于模型对照组 (*P* < 0.01)；黑骨藤醇提取物中剂量组、低剂量组与模型对照组相比也均有显著性差异 (*P* < 0.05)，秋水仙碱组、黑骨藤醇提取物高剂量组也显著低于黑骨藤醇提取物低剂量组 (*P* < 0.05)，说明黑骨藤醇提取物各个剂量组均能不同程度地降低血清、滑膜组织中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 17、肿瘤坏死因子 α 水平，且呈剂量依赖关系。

2.4 各组大鼠滑膜组织病理形态改变 空白对照组滑膜组织结构清晰，滑膜细胞排列规则，其间为胶原性间质，未见炎性细胞浸润；模型对照组滑膜组织具有明显炎症，可见炎性细胞浸润，滑膜细胞增生，有纤维炎性蛋白渗出物；秋水仙碱组、黑骨藤醇提取物高、中、低剂量组滑膜细胞增生及炎性细胞浸润均有不同程度减轻，其中秋水仙碱组、黑骨藤醇提取物高剂量组相差不大，见图 1。

表 1 | 各组大鼠不同时间点的踝关节肿胀度

($\bar{x} \pm s$, $n=10$, %)

Table 1 | Swelling degree of the rat ankle joint at different time points

时间	空白对照组	模型对照组	秋水仙碱组	黑骨藤醇提取物高剂量组	黑骨藤醇提取物中剂量组	黑骨藤醇提取物低剂量组
治疗 1 d	9.24±0.27	13.35±0.65	13.15±0.62	13.20±0.60	13.30±0.64	13.32±0.63
治疗 2 d	9.25±0.29	12.84±0.50	12.66±0.52	12.70±0.53	12.75±0.55	12.80±0.58
治疗 3 d	9.27±0.30	12.48±0.51	11.96±0.66	11.90±0.64	11.92±0.65	12.10±0.69
治疗 4 d	9.25±0.30	12.41±0.55	11.79±0.69	11.82±0.71	11.85±0.72	11.90±0.73
治疗 5 d	9.24±0.33	12.40±0.59	10.15±0.38 ^b	10.35±0.50 ^a	11.32±0.54	11.68±0.66
治疗 6 d	9.25±0.32	12.25±0.58	10.00±0.36 ^b	10.21±0.55 ^a	11.04±0.53	11.26±0.63
治疗 7 d	9.26±0.33	12.04±0.56	9.72±0.34 ^{bc}	9.78±0.45 ^{bc}	10.25±0.58 ^a	10.56±0.60 ^a

表注: 重复测量方差分析结果显示: $F_{\text{组别}}=8.072$, $F_{\text{时间}}=10.420$, $F_{\text{交互}}=3.145$; P 均 < 0.05 。与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与黑骨藤醇提取物低剂量组比较, ^c $P < 0.05$

表 2 | 各组大鼠血清白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 17 水平

($\bar{x} \pm s$, $n=10$, $\mu\text{g/L}$)

Table 2 | Serum levels of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interleukin-17 in the rat serum

组别	白细胞介素 1 β	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 17
空白对照组	18.50±5.22	116.38±9.34	17.64±4.21
模型对照组	45.23±10.20 ^a	195.55±12.78 ^a	48.96±6.87 ^a
秋水仙碱组	22.92±4.06 ^{cd}	128.42±11.36 ^{cd}	21.46±4.89 ^{cd}
黑骨藤醇提取物高剂量组	23.53±4.50 ^{cd}	133.16±11.54 ^{cd}	23.66±5.05 ^{cd}
黑骨藤醇提取物中剂量组	31.46±5.35 ^b	154.67±12.07 ^b	30.32±5.81 ^b
黑骨藤醇提取物低剂量组	36.55±5.19 ^b	177.13±12.45 ^b	37.59±6.35 ^b

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与黑骨藤醇提取物低剂量组比较, ^d $P < 0.05$

表 3 | 各组大鼠滑膜组织白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 17 水平

($\bar{x} \pm s$, $n=10$, $\mu\text{g/g}$)

Table 3 | Serum levels of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interleukin-17 in the rat synovium

组别	白细胞介素 1 β	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 17
空白对照组	30.04±4.12	140.38±12.46	42.15±7.56
模型对照组	80.12±9.57 ^a	380.45±15.23 ^a	67.40±9.47 ^a
秋水仙碱组	38.27±8.44 ^{cd}	170.22±14.85 ^{cd}	47.34±8.43 ^{cd}
黑骨藤醇提取物高剂量组	39.15±7.27 ^{cd}	175.24±15.01 ^{cd}	48.42±8.55 ^{cd}
黑骨藤醇提取物中剂量组	48.15±8.74 ^b	204.43±18.26 ^b	52.27±8.89 ^b
黑骨藤醇提取物低剂量组	50.24±8.46 ^b	267.33±22.04 ^b	57.68±9.05 ^b

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与黑骨藤醇提取物低剂量组比较, ^d $P < 0.05$

2.5 各组滑膜组织 NF- κ B、ERK1/2 和 JNK 蛋白表达水平 与空白对照组比较, 模型对照组 NF- κ B、ERK1/2 和 p-JNK 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型对照组比较, 秋水仙碱组、黑骨藤醇提取物高、中、低剂量组 NF- κ B、ERK1/2 和 p-JNK 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且黑骨藤醇提取物具有剂量依赖性 ($P < 0.05$), 见图 2。

3 讨论 Discussion

急性痛风性关节炎是尿酸钠盐晶体沉积在关节组织引起的, 发作时以四肢远端关节非对称的急性剧痛、红肿、发热为主要特征, 起病急剧, 是痛风首发症状。该研究采用踝关节注射尿酸钠溶液制备急性痛风性关节炎大鼠模型, 大鼠造模关节在造模 6 h 后至 48 h 显著肿胀, 在 24 h 达到高峰, 符合该病的临床特点, 提示造模成功。根据美国风湿病协会治疗和预防痛风的指南, 急性痛风性关节炎的治疗是以秋水仙碱及非类固醇抗炎药的应用为主^[19]。该研究选择临床治疗急性痛风性关节炎常用的秋水仙碱 (9 mg/kg) 作为阳性对照, 研究不同剂量黑骨藤醇提取物 (100, 50, 20 mg/kg) 对急性痛风性关节炎的治疗作用及机制。在秋水仙碱和高剂量黑骨藤醇提取物治疗 5 d 后, 关节肿胀度明显降低, 与模型对照组比较差异有显著性意义; 治疗 7 d 后, 疗效依然维持, 关节未发生复肿, 且中、低剂量黑骨藤醇提取物组关节肿胀度也明显降低, 研究初步证明了黑骨藤醇提取物对急性痛风性关节炎有消肿止痛、改善局部症状的疗效, 且呈现量效关系。

急性痛风性关节炎是由于嘌呤代谢紊乱使血尿酸水平

升高, 尿酸钠盐结晶沉积于关节腔内, 引起白细胞趋化、吞噬, 从而形成了关节红肿热痛的急性炎症反应。缓解关节症状、抑制炎症反应对防治痛风性关节炎具有重要意义^[20-21]。白细胞介素 17、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 等炎症因子参与了尿酸钠诱导的关节组织免疫炎症反应, 阻断炎症因子产生是解决炎症的关键所在^[22-23]。白细胞介素 17 是一种强大的前炎症细胞因子, 也是炎症反应的微调因子, 与多种自身免疫性疾病有关, 然而迄今为止对白细胞介素 17 在急性痛风性关节炎中的作用知之甚少。成纤维细胞、角质细胞、上皮及内皮细胞在白细胞介素 17 的刺激下释放白细胞介素 6、白细胞介素 8、前列腺素 E2、基质金属蛋白酶 1、单核细胞趋化蛋白 1 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等细胞因子; 白细胞介素 17 还有强大的招募中性粒细胞的作用及与多种细胞因子产生协同作用以放大炎症反应, 与其他前炎症细胞因子如肿瘤坏死因子 α 产生协同作用促进白细胞介素 6、白细胞介素 8、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等细胞因子的产生和促进一氧化氮合成, 与白细胞介素 1 β 作用后增加前列腺素 E2 的合成。白细胞介素 1 β 是白细胞介素 1 家族核心成员, 几乎一切核细胞均可分泌白细胞介素 1 β , 作用于临近细胞或远处靶细胞介导炎症反应^[24]。随着细胞损伤程度逐渐加深, 大量 ATP 和尿酸释放到关节腔中, 诱导中性粒细胞氧化爆发产生 ATP, 加重损伤^[25], LIU 等^[26] 研究急性痛风性关节炎患者血清白细胞介素 17 水平在痛风发作早期显著升高, 并随着痛风症状的减轻而逐渐降低。相关分析表明, 白细胞介素 17 的表达不仅与疾病活动呈正相关, 而且与血清

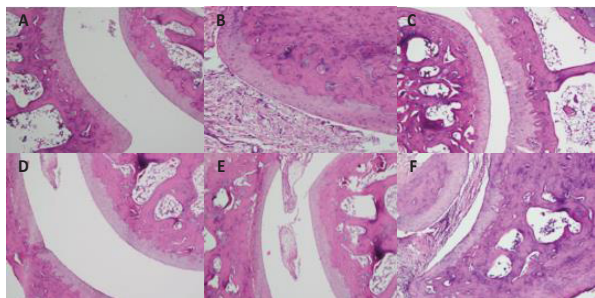
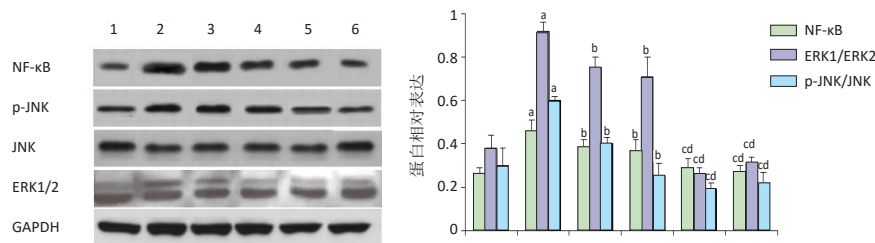


图 1 | 各组大鼠滑膜组织病理形态改变 (苏木精 - 伊红染色, ×400)

Figure 1 | Pathological changes of the rat synovium (hematoxylin-eosin staining, ×400)

图注: A 为空白对照组; B 为模型对照组; C 为秋水仙碱组; D 为黑骨藤醇提取物高剂量组; E 为黑骨藤醇提取物中剂量组; F 为黑骨藤醇提取物低剂量组



图注: 1-6 分别为空白对照组、模型对照组、黑骨藤醇提取物低剂量组、黑骨藤醇提取物中剂量组、黑骨藤醇提取物高剂量组、秋水仙碱组。与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与黑骨藤醇提取物中、低剂量组比较, ^d $P < 0.05$

图 2 | 各组滑膜组织 NF-κB、ERK1/2 和 JNK 蛋白表达水平

Figure 2 | Expression level of nuclear factor-κB, ERK1/2 and JNK protein in the rat synovium

藤醇提取物能下调外周血和滑膜中白细胞介素 17、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 的表达, 且高剂量黑骨藤醇提取物作用与秋水仙碱相近, 这表明黑骨藤醇提取物能显著减轻急性痛风性关节炎大鼠血清及滑膜的炎症反应。

体外研究显示抑制 NF-κB 信号通路可以缓解炎症反应, 推测 NF-κB 信号通路在痛风炎症与免疫调节中发挥重要作用^[30-31]。DHANASEKAR 等^[32]研究了桑色素对尿酸钠盐晶体诱导的急性痛风性关节炎模型 RAW 264.7 巨噬细胞的抗炎机制, 为了比较, 以秋水仙碱作为阳性对照, 结果观察到桑色素 (100-300 $\mu\text{mol/L}$) 能显著抑制尿酸钠盐晶体刺激的巨噬细胞中炎症细胞因子 (肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、单核细胞趋化蛋白 1)、炎症递质 (一氧化氮和前列腺素 E2) 和溶酶体酶 (β -半乳糖苷酶、N-乙酰氨基葡萄糖酶和组织蛋白酶 D) 水平, 促炎细胞因子 (肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和单核细胞趋化蛋白 1)、炎症酶 (诱导型一氧化氮合酶和环氧合酶 2) 和 NF-κBp65 的 mRNA 表达下调, 而次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 的 mRNA 表达升高; 流式细胞仪分析显示, 桑色素处理降低了尿酸钠盐晶体刺激巨噬细胞内活性氧的含量; Western blot 分析表明, 桑色素主要通过抑制尿酸钠盐晶体诱导的环氧合酶 2 和肿瘤坏死因子 α 蛋白表达来发挥抗炎作用, 其途径与 BAY 11-7082 (I κ B 激酶抑制剂) 相似。NF-κB 是转录因子家族中的重要成员之一, 它在许多细胞刺激诱导的细胞信息的转录调控中起核心作用, 广泛参与多项生理和病理过程的基因调控, 包括炎症反应、免疫应答、细胞凋亡、胚胎发生等^[33-37]。通常情况下以 p50-p65 异二聚体的形式与其抑制性蛋白 I κ B 结

合而呈非活化状态, 当机体受到病毒、炎症等刺激时, 诱导 NF-κB 活化导致多种基因表达, 进而使炎症细胞过度分泌肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 β 等炎症因子磷酸化细胞内的 I κ B 激酶, 使得 I κ B 通过蛋白酶泛素化被降解, NF-κB 进入细胞核调控细胞内炎症因子的释放, 使炎症反应持续增强^[38-40]。MAPK 是真核生物信号转导网络中最重要的途径之一, 在基因表达调控和胞质功能调节等多种信号转导途径中起着重要作用, ERK 是 MAPK 通路中极其重要的组成部分之一。MAPK 信号转导通路将信号由细胞外传导入细胞内, 调节基因表达, 导致大量炎症因子产生释放, 研究发现 ERK1/2 参与了应激刺激、炎症递质等引起的细胞反应, 说明 ERK1/2 的激活与炎症反应也有着密切关系^[41]。

该研究结果表明: 模型对照组细胞中 ERK1/2 和 NF-κB 蛋白表达水平明显高于空白对照组, 与模型对照组比较, 秋水仙碱组、黑骨藤醇提取物高、中、低剂量组 ERK1/2、NF-κB 蛋白表达水平明显降低, 且黑骨藤醇提取物具有剂量依赖性, 提示黑骨藤醇提取物可通过抑制 ERK1/2 和 NF-κB 蛋白的表达, 下调炎症因子白细胞介素 17、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 水平。还有学者指出 JNK 与炎症的发生有密切的关系^[42]。研究发现模型对照组滑膜组织中炎症因子白细胞介素 17、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 水平明显增高, 同时 Western blot 结果表明模型对照组中 JNK 信号通路异常激活, p-JNK 蛋白明显增加, 给予秋水仙碱组、黑骨藤醇提取物的痛风性关节炎大鼠 p-JNK 蛋白明显降低, 同时炎症因子也明显降低, 表明急性痛风性关节炎的发生发展可能与 JNK 异常激活有关。

综上所述, 黑骨藤醇提取物能够改善急性痛风性关节炎大鼠关节肿胀, 这一作用可能是通过抑制信号通路 NF- κ B、ERK1/2 和 JNK 的表达来实现, 具体机制还有待进一步研究。

作者贡献: 实验设计为党荣敏, 实验实施为所有作者, 实验评估为党荣敏、李宇怡, 资料收集为谢洪书、蒋催蓉、罗康华、姚文琴。

经费支持: 该文章接受了“黔南民族医学高等专科学校 2017 校基金项目(QNYZ201704)”及“贵州省厅校联合自然科学基金类项目(GZWKJ2013-2-003)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经黔南民族医学高等专科学校伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过黔南民族医学高等专科学校生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- MIRMIRAN R, BUSH T, CERRA MM, et al. Joint Clinical Consensus Statement of the American College of Foot and Ankle Surgeons® and the American Association of Nurse Practitioners®: Etiology, Diagnosis, and Treatment Consensus for Gouty Arthritis of the Foot and Ankle. *J Foot Ankle Surg.* 2018;57(6):1207-1217.
- 曹波, 唐庆昆, 李海歌, 等. 痛尿酸盐结晶在膝关节分布特征的观察与分析: 一项基于双源 CT 双能量成像的初步研究 [J]. *临床放射学杂志*, 2019,38(12):2396-2401.
- 沈嘉艳, 许飞, 周文强, 等. 痛风石的非药物疗法及其研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2018,7(10):77-80.
- CRONSTEIN BN, SUNKUREDDI P. Mechanistic aspects of inflammation and clinical management of inflammation in acute gouty arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2013;19(1):19-29.
- BLANDIN C, FORIEN M, GARDETTE A, et al. Topus size is associated with hallux valgus deformity in gout. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(1):12862.
- VARUGHESE GI, VARGHESE Al. Colchicine in acute gouty arthritis: the optimum dose? *Arthritis Res Ther.* 2006;8(5):405.
- ZAVODOVSKY BV, SIVORDOVA LE. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs in chronic inflammatory rheumatic diseases. *Ter Arkh.* 2018;90(8):101-106.
- TANAKA C, MATSUDA T, KANEKO M. Neurological side-effects of antiallergic drug, colchicine and glucocorticoids. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu.* 1999;(27 Pt 2):606-609.
- ZHOU Q, SU J, ZHOU T, et al. A study comparing the safety and efficacy of febuxostat, allopurinol, and benzbromarone in Chinese gout patients: a retrospective cohort study. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2017; 55(2):163-168.
- YUAN X, FAN YS, XU L, et al. Jia-Wei-Si-Miao-Wan alleviates acute gouty arthritis by targeting NLRP3 inflammasome. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2019;33(1):63-71.
- MA TH, SHENG T, TIAN CM, et al. Effect of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* on acute gouty arthritis in mice through NLRP3/ASC/caspase-1 axis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2019;44(3):546-552.
- WANG Y, WANG L, LI E, et al. Chuanhu anti-gout mixture versus colchicine for acute gouty arthritis: a randomized, double-blind, double-dummy, non-inferiority trial. *Int J Med Sci.* 2014;11(9):880-885.
- LEE YM, SHON EJ, KIM OS, et al. Effects of *Mollugo pentaphylla* extract on monosodium urate crystal-induced gouty arthritis in mice. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):447.
- 骆镜妃, 胡宗科, 邓康, 等. 黑骨藤追风活络胶囊抗风湿性关节炎的药理作用及机制 [J]. *中南医学科学杂志*, 2016,44(2):140-142, 146.
- 党荣敏, 龚莉莉. 苗药黑骨藤种子幼芽与黑骨藤不同部位对 PC12 细胞氧化损伤的影响 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2016,26(3):16-17.

- 张鹰, 赵爽, 李轩豪, 等. 基于网络药理学的苗药黑骨藤防治肺癌分子机制研究 [J]. *中药材*, 2019,42(2):399-404.
- 党荣敏, 刘元忠, 谢洪书, 等. 黑骨藤抗急性痛风性关节炎的实验研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016,32(9):1295-1298.
- 陈庆, 靳风云, 陈华国, 等. 苗族黑骨藤有效部位的筛选研究 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 2005(3):163-165.
- KHANNA D, KHANNA PP, FITZGERALD JD, et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 2: therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(10):1447-1461.
- CLEOPHAS MC, CRIŞAN TO, JOOSTEN LA. Factors modulating the inflammatory response in acute gouty arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2017;29(2):163-170.
- LU X, ZENG R, LIN J, et al. Pharmacological basis for use of madecassoside in gouty arthritis: anti-inflammatory, anti-hyperuricemic, and NLRP3 inhibition. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2019;41(2): 277-284.
- DUMUSC A, SO A. Interleukin-1 as a therapeutic target in gout. *Curr Opin Rheumatol.* 2015;27(2):156-163.
- 江丹, 熊金河, 尚华. 洛索洛芬钠对急性痛风性关节炎大鼠血清 IL-1 β 和滑膜组织中 NF- κ B 蛋白表达的影响 [J]. *郑州大学学报 (医学版)*, 2019,54(3):446-449.
- 周琦, 张宁, 卢芳, 等. 穿山龙总皂苷对痛风性关节炎大鼠关节滑膜 IL-1 β 及其信号转导通路的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(6):52-57.
- 胡亚彬, 杨青, 张传玉, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网和氧化应激在痛风发病机制中的作用 [J]. *国际免疫学杂志*, 2018,41(6):690-694.
- LIU Y, ZHAO Q, YIN Y, et al. Serum levels of IL-17 are elevated in patients with acute gouty arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;497(3):897-902.
- 李雪峰, 刘育辰, 刘刚. 苗药黑骨藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中成药*, 2018,40(4): 904-912.
- 梁江, 王乾宇, 黄维琛, 等. 黑骨藤追风活络胶囊抑制 CIA 大鼠滑膜组织 NF- κ B 表达并减轻关节炎炎症反应 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(3):193-198.
- 黄明进, 罗春丽, 郭刚, 等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011,17(12):174-177.
- VIATOUR P, MERVILLE MP, BOURS V, et al. Phosphorylation of NF-kappaB and I kappaB proteins: implication in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(1):43-52.
- ZHAO Z, TANG X, ZHAO X, et al. Tylvalosin exhibits anti-inflammatory property and attenuates acute lung injury in different models, possibly through suppression of NF- κ B activation. *Biochem Pharmacol.* 2014; 90(1):73-87.
- DHANASEKAR C, KALAISELVAN S, RASOOL M. Morin, a Bioflavonoid Suppresses Monosodium Urate Crystal-Induced Inflammatory Immune Response in RAW 264.7 Macrophages through the Inhibition of Inflammatory Mediators, Intracellular ROS Levels and NF- κ B Activation. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145093.
- LIN TH, PAJARINEN J, LU L, et al. NF- κ B as a Therapeutic Target in Inflammatory-Associated Bone Diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017;107:117-154.
- HAYDEN MS, GHOSH S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 2011;21(2): 223-244.
- WARD C, WALKER A, DRANSFIELD I, et al. Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt3):465-467.
- PIOTROWSKA A, IZYKOWSKA I, PODHORSKA-OKOŁÓW M, et al. The structure of NF-kappaB family proteins and their role in apoptosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008;62:64-74.
- ESPÍN-PALAZÓN R, TRAVER D. The NF- κ B family: Key players during embryonic development and HSC emergence. *Exp Hematol.* 2016; 44(7):519-527.
- 陈刚, 殷钟意, 郑旭煦, 等. 丹皮酚改善大鼠痛风性关节炎与调节核因子 κ B 活化的关系研究 [J]. *中国药理学通报*, 2018,34(12):1730-1735.
- SENFTLEBEN U, CAO Y, XIAO G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 2001; 293(5534):1495-1499.
- HAYDEN MS, GHOSH S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 2014;26(3):253-266.
- MELOCHE S, POUYSSÉGUR J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene.* 2007;26(22):3227-3239.
- 徐铁尔, 于雪峰, 陈水林, 等. 基于 JNK 信号通路探讨豨莶草对痛风性关节炎影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017,23(10):1340-1345.

(责任编辑: MZH, ZN, SX)