

## 藏药短穗兔耳草不同部位对急性痛风性关节炎模型大鼠的作用及其机制研究

单佳铃, 欧阳香, 杨海艳, 魏荣锐, 刘洋, 钟国跃, 刘红宁, 朱继孝(江西中医药大学, 中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004)

**摘要:** **目的** 探讨藏药短穗兔耳草不同极性部位对急性痛风性关节炎大鼠模型的作用, 及对模型大鼠 Toll 样受体 2(TLR2)/髓样分化因子 88(MyD88)/核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和 NOD 样受体蛋白 3(NALP3)信号通路的影响。**方法** 110 只 SD 雄性大鼠, 随机均分成正常组, 模型组, 秋水仙碱( $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组及短穗兔耳草 30%乙醇低、高剂量组( $0.8$ 、 $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 短穗兔耳草 50%乙醇低、高剂量组( $0.8$ 、 $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 短穗兔耳草 95%乙醇低、高剂量组( $0.8$ 、 $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 短穗兔耳草水部位低、高剂量组( $0.8$ 、 $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。适应性喂养 7 d 后各给药组每天按  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃剂量进行给药处理, 连续灌胃给药 7 d, 正常组和模型组同等剂量灌胃蒸馏水。于第 5 d 给药 1 h 后向各组(正常组除外)大鼠右后踝关节处注射  $0.1 \text{ mL}$  尿酸钠混悬液( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )建立大鼠急性痛风性关节炎模型, 正常组注射等体积的无菌生理盐水。用足趾容积测量仪检测大鼠右后踝关节的肿胀度; 造模 48 h 后取血清和滑膜组织, 采用 Elisa 法检测血清中肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素  $1\beta$ (IL- $1\beta$ )含量, 蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测关节滑膜组织中 TLR2、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 和 NALP3 等相关蛋白含量的表达; HE 染色法检测大鼠滑膜组织的病理学变化。**结果** 与正常组比较, 模型组各时间点均出现明显的踝关节肿胀, 且具有明显差异( $P < 0.01$ ); 模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL- $1\beta$  含量及滑膜组织中 TLR2、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 和 NALP3 等蛋白含量水平均明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 在造模后 48 h 内, 秋水仙碱组、30%乙醇部位低剂量组和 50%乙醇部位的低、高剂量组大鼠踝关节肿胀率均明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。秋水仙碱组及 30%乙醇部位低、高剂量组均能使血清 TNF- $\alpha$  和 IL- $1\beta$  含量及滑膜组织中 TLR2、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 和 NALP3 蛋白表达量下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。同时, 滑膜病理切片显示 30%乙醇部位更能改善大鼠滑膜组织病理变化。**结论** 藏药短穗兔耳草对尿酸钠诱导的急性痛风性关节炎大鼠具有一定的保护作用, 其中 30%乙醇部位为有效部位, 其作用机制与 TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B 和 NALP3 信号通路有关。**关键词:** 短穗兔耳草; 信号通路; 急性痛风性关节炎; 有效部位; 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)04-0492-07

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.04.007

### Study on the Effective Parts of *Lagotis brachystachys* Maxim Against Acute Gouty Arthritis in Rats

SHAN Jialing, OUYANG Xiang, YANG Haiyan, WEI Rongrui, LIU Yang, ZHONG Guoyue, LIU Hongning, ZHU Jixiao (Research Center of Chinese Herbal Medicine and Ethnic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of different polar fractions from Tibetan medicine *L. brachystachys* Maxim on rats with acute gouty arthritis, and select an effective part on Toll-like receptor2(TLR2)/myeloid differentiation factor 88(MyD88)/ nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B)and NALP3 signaling pathways. **Methods** A total of 110 SD male rats were randomly divided into normal group, model group, colchicine( $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group and 30% ethanol low/

收稿日期: 2020-10-26

作者简介: 单佳铃, 女, 硕士研究生, 研究方向: 民族药药理。Email: 1486605822@qq.com。通信作者: 朱继孝, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药与民族药有效成分与作用机理研究。Email: zhujx81@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060757); 国家重点研发计划项目(2019YFC1712302); 江西省教育厅科学技术研究项目重点项目(GJJ190632); 江西省中医药管理局科技计划项目(2019A004)。

high dose group( $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 50% ethanol low/high dose group( $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 95% ethanol low/high dose group( $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), water extract low/high dose group( $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) of *L. brachystachys* Maxim. After 7 days of adaptive feeding, each group was given the corresponding drug( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) by gavage every morning for 7 days. Normal group and model group were given the same amount of distilled water. One hour after the 5th day of gavage,  $0.1 \text{ mL}$  sodium urate solution( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) was injected into the right posterior ankle joint of rats(except the normal group) to establish an acute gouty arthritis model and the normal group was injected with an equal volume of sterile sodium chloride solution. The swelling degree of right ankle joint was detected by toe volume measurement instrument. Serum and synovial tissue were collected at 48 h after modeling. The levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in serum were measured by Elisa. The expression of TLR2, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B and NALP3 in synovial tissue was detected by Western Blot; The pathological changes of synovial tissue were also observed by HE staining. **Results** Compared with the normal group, the swelling degree of the model group at each time was significantly different( $P < 0.01$ ). The contents of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in serum as well as the levels of TLR2, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B and NALP3 in the synovial tissue of the model group were significantly increased( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the ankle swelling degrees of rats in the colchicine group, the low-dose 30% ethanol group, and the low- and high-dose 50% ethanol groups were significantly reduced( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) within 48 h after modeling. Western Blot results showed that TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in serum, the levels of TLR2, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B, and NALP3 in synovial tissue were down-regulated in both the colchicine group and the low- and high- dose 30% ethanol groups( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Simultaneously, the results of HE staining showed that the 30% ethanol faction could effectively improve the pathological changes of the synovial tissue in rats. **Conclusion** The Tibetan medicine *L. brachystachys* Maxim has a certain protective effect on acute gouty arthritis rats. 30% ethanol extract was found to be the most effective. The mechanism of *L. brachystachys* Maxim against acute gouty arthritis might be related to the TLR / MyD88 / NF- $\kappa$ B and NALP3 signaling pathways.

**Keywords:** *Lagotis brachystachys* Maxim; signaling pathway; acute gouty arthritis; effective faction; rats

急性痛风性关节炎(Acute Gout arthritis, AGA)是由于体内嘌呤代谢增加,尿酸产生过多或排泄不良而致血中尿酸升高,尿酸盐结晶沉积在关节滑膜、关节囊或其他组织中而引起的炎性疾病<sup>[1]</sup>。急性痛风性关节炎的临床表现,主要是在急性发作期往往起病急骤,患者多在半夜或者清晨发病,受累及的关节会迅速出现红、肿、热、痛,伴有活动受限<sup>[2]</sup>。目前临床上治疗急性痛风性关节炎的药物主要包括秋水仙碱和非甾体抗炎类药物等,然而由于其在使用过程中常常伴有消化系统损害和肝肾毒性等不良反应而限制了其在临床上的应用<sup>[3]</sup>。藏医药历史悠久,是我国医药学的重要组成部分。藏药在临床疾病的治疗方面具有药源纯净无污染、含氧量高、药性持久且副作用少等特点,具有很好的疗效<sup>[4-5]</sup>。近年来的一些研究<sup>[6-8]</sup>结果表明,传统医药具有良好的抗 AGA 效果,这为寻找治疗 AGA 的有效药物提供了途径。

中医学上认为,“浊瘀痹”是痛风发病的主要病因病机特点,机体脾肾亏虚导致湿浊、痰浊和瘀血的产生<sup>[9]</sup>。短穗兔耳草(*Lagotis brachystachys* Maxim),藏药名“直打洒曾”,为藏医治疗“黄水病”的常用特色药材(黄水病藏医上指的是“湿与湿热”),为玄参科植物短穗兔耳草的干燥全草,主要分布于甘肃、四川、青海和西藏等地。本课题组前期研究<sup>[10]</sup>表明,藏药短穗兔耳草提取物能够降低高尿酸血症小鼠尿酸水平,同时,短穗兔耳草提取物对急性痛风性关节炎也有一定的保护作用<sup>[11]</sup>,因此本研究在此基础上,基于 Toll 样受体(TLR)/髓样分化因子 88(MyD88)/核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和 NOD 样受体蛋白 3(NALP3)信号通路,进一步研究短穗兔耳草不同极性部位对急性痛风性关节炎的保护作用及其作用机制,以期筛选并获得其抗急性痛风性关节炎的有效部位。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 110 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 7 周龄, 体重 180~220 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(湘)20160002。自由饮水, 适应性喂养 1 周后进行实验。

**1.2 药物及试剂** 短穗兔耳草购自成都中药材市场, 由江西中医药大学张亚梅副教授鉴定为玄参科短穗兔耳草(*L. brachystachys* Maxim)。将 4.7 kg 短穗兔耳草全草粉碎, 用 10 倍体积 75% 的乙醇加热回流提取 3 次, 过滤, 减压浓缩得到干浸膏。干浸膏溶于少量水经大孔吸附树脂分别用水、30%乙醇、50%乙醇、95%乙醇洗脱, 得到不同极性部位。其中水部位提取率为 30.7%; 30%乙醇提取率为 4.64%、50%乙醇提取率为 3.50%、95%乙醇提取率为 0.93%。根据不同极性部位提取率按生药给药量( $0.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $3.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )换算成不同极性部位低、高剂量组的剂量, 用 0.5% 的羧甲基纤维素钠为溶剂得到不同极性部位的低、高剂量组。

尿酸, 美国 Sigma 公司, 批号: #BCBW1894; 秋水仙碱片, 西双版纳版纳药业有限公司, 批号: 20180906; 无毒环保 HE 染液, 南昌雨露实验器材有限公司, 批号: 190214、190218; 脱脂奶粉, 美国 BD 公司, 批号: 8211649; 过硫酸铵, 麦克林生化科技有限公司, 批号: #C10168590; Tris, 美国 Geneview 公司, 批号: 710260106400; SDS, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 530M033; TEMED, 北京鼎国昌盛生物科技有限公司, 批号: 87B001200; ECL 显影液, 美国 Abbkine 公司, 批号: ATRJL0201; PVDF 膜, 美国 PALL 公司, 批号: #30659A; TLR2、NALP3 抗体, 博奥森生物技术有限公司, 批号分别为: bs-1019R、bs-10021R; MyD88、NF- $\kappa$ B 及二抗, 武汉 proteintech 公司, 批号分别为: 23230-1-AP、10745-1-AP、SA00001-2;  $\beta$ -actin, 美国 GeneTeX 公司, 批号: 42858。

**1.3 仪器** TissueLyser II 高通量组织研磨器, 德国 Qiagen 公司; Multiskan Go1510 酶标仪, 美国 THERMO 公司; CP225D 型电子分析天平, 德国赛多利斯公司; PowerPac Basic 型电泳仪、Chemic Dox XR+ 型凝胶成像仪, 美国 BIO-RAD 公司; WD-9405B 型水平摇床, 沃德生物医学仪器公司; Centrifuge 5430R 型低温冷冻离心机, 美国 eppendorf 公司; HI1210 型捞片机、HistoCore Arcadia C 型切片机、TP1020-1 型包埋机, 德国 Leika 公司; Nikon

elipseci-s 生物显微镜, 日本尼康公司。

**1.4 尿酸钠晶体的制备** 制备过程参考相关研究<sup>[12]</sup>并加以改进。以 800 mL 超纯水加入 4.5 mL 的  $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液中, 煮沸后加入 2g 尿酸粉末, 边加边搅拌使其快速溶解。放于预先设定成  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴锅中, 待温度降至  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  用 NaOH 溶液调 pH 值至 8.9, 冷却至室温后放于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。第 2 天抽滤去上清, 盛入蒸发皿中放于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温干燥箱中干燥 2 h, 经高温灭菌得到尿酸钠晶体粉末, 最后在显微镜下观察到针状结晶。临用时称取需要用量, 以无菌生理盐水配成浓度为  $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的尿酸钠晶体混悬液。

**1.5 动物分组、给药及模型复制**<sup>[6]</sup> 将 110 只大鼠随机分成 11 组, 每组 10 只, 分为正常组, 模型组, 秋水仙碱( $0.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶解)组, 短穗兔耳草 30%乙醇低、高剂量组( $0.8$ 、 $3.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 短穗兔耳草 50%乙醇低、高剂量组( $0.8$ 、 $3.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 短穗兔耳草 95%乙醇低、高剂量组( $0.8$ 、 $3.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 短穗兔耳草水提部位低、高剂量组( $0.8$ 、 $3.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。

大鼠适应性喂养 7 d 后, 各给药组每天按  $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃剂量进行给药处理, 正常组和模型组给予等量的蒸馏水, 连续灌胃给药 7 d; 第 5 天给药 1 h 后, 除正常组外, 其余各组大鼠右后踝关节均一次性注射  $0.1\text{ mL}$  尿酸钠晶体混悬液( $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )诱导建立急性痛风性关节炎模型, 正常组注射等体积的无菌氯化钠溶液。最后 1 次给药 1 h 后用 10% 的水合氯醛( $0.35\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 以  $956\times\text{g}$  离心 10 min 后取血清; 于冰台上迅速剥离大鼠关节滑膜组织, 每组取一部分置于 10% 的甲醛固定液中固定, 而其他关节滑膜组织置于 EP 管中放于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

**1.6 踝关节肿胀度检测** 于造模前(0 h)用足趾容积测量仪测量大鼠右后踝关节容积, 造模后于各时间点(2、4、6、8、12、16、24、48 h)检测大鼠右后踝关节容积, 根据公式计算大鼠踝关节肿胀度: 关节肿胀度=(测定点关节容积-初始容积)/初始容积 $\times$ 100%。

**1.7 大鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的测定** 按照试剂盒说明书, 采用 ELISA 方法检测。

**1.8 滑膜组织病理学检测** 取已经用 10% 的甲醛溶液固定好的大鼠滑膜, 每组取 3 个样本, 用刀片切成小块放于包埋盒中经流水冲洗过夜, 再经过常规的



由低到高浓度(50%、60%、70%、80%、90%)的乙醇、无水乙醇及二甲苯脱水处理、石蜡浸腊、包埋、切片、HE 染色等步骤,于显微镜下观察其病理学形态变化。

**1.9 大鼠踝关节滑膜组织 TLR2、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 和 NALP3 蛋白表达的检测** 取 60 mg 大鼠踝关节滑膜组织放入加有 1 mL 2% SDS 裂解液的 1.5 mL EP 管中,用组织破碎仪破碎得到蛋白匀浆液,室温放置裂解 20 min 使其充分裂解,于室温以  $106\times g$  离心取上清,100  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 min,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品的蛋白浓度,根据浓度制备样品后进行常规上样电泳(电泳条件 80 V 30 min,120 V 1 h),电泳完于有转膜液的转膜槽中转膜(250 mA,90 min),取出 PVDF 膜于 5% 的脱脂牛奶中室温封闭 1 h,1TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;一抗  $\beta$ -actin(稀释比 1:5 000)、TLR2、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B、NALP3(稀释比 1:2 000)于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。所有抗体用 3%BSA 稀释,第 2 天取出洗膜后于水平摇床上室温孵育二抗(稀释比 1:5 000)1 h,洗膜,ECL 显色。

表 1 短穗兔耳草不同极性部位对痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Table 1 Effect of *L. brachystachys* Maxim different polar parts on swelling degree of ankle joint in rats with gouty arthritis at different times( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

| 分组          | 肿胀度/%                          |                                |                                 |                                 |                                 |                                 |                                |                                |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|             | 2 h                            | 4 h                            | 6 h                             | 8 h                             | 12 h                            | 16 h                            | 24 h                           | 48 h                           |
| 正常组         | 3.49 $\pm$ 3.15                | 0.39 $\pm$ 3.12                | 5.51 $\pm$ 3.59                 | 2.99 $\pm$ 2.62                 | 3.14 $\pm$ 4.09                 | 3.14 $\pm$ 4.54                 | 4.96 $\pm$ 3.54                | 2.57 $\pm$ 4.28                |
| 模型组         | 10.01 $\pm$ 5.29 <sup>##</sup> | 18.80 $\pm$ 7.26 <sup>##</sup> | 22.15 $\pm$ 10.84 <sup>##</sup> | 32.48 $\pm$ 14.02 <sup>##</sup> | 39.81 $\pm$ 12.72 <sup>##</sup> | 43.73 $\pm$ 10.23 <sup>##</sup> | 29.27 $\pm$ 6.41 <sup>##</sup> | 24.62 $\pm$ 5.49 <sup>##</sup> |
| 秋水仙碱组       | 13.67 $\pm$ 9.55               | 17.71 $\pm$ 9.53               | 22.27 $\pm$ 12.67               | 31.16 $\pm$ 13.69               | 45.47 $\pm$ 16.88               | 42.89 $\pm$ 8.52                | 26.01 $\pm$ 6.70               | 15.66 $\pm$ 5.83 <sup>**</sup> |
| 30%乙醇部位低剂量组 | 8.57 $\pm$ 4.45                | 12.58 $\pm$ 4.88               | 17.87 $\pm$ 4.47                | 31.41 $\pm$ 7.48                | 42.65 $\pm$ 8.32                | 40.60 $\pm$ 5.72                | 22.57 $\pm$ 6.16 <sup>*</sup>  | 17.15 $\pm$ 2.51 <sup>**</sup> |
| 30%乙醇部位高剂量组 | 11.37 $\pm$ 8.94               | 10.87 $\pm$ 9.09 <sup>*</sup>  | 19.68 $\pm$ 7.03                | 29.60 $\pm$ 8.31                | 45.44 $\pm$ 8.21                | 32.98 $\pm$ 7.11 <sup>*</sup>   | 25.06 $\pm$ 6.81               | 20.27 $\pm$ 7.06               |
| 50%乙醇部位低剂量组 | 7.85 $\pm$ 4.61                | 12.98 $\pm$ 3.10               | 22.61 $\pm$ 5.14                | 28.01 $\pm$ 7.51                | 35.56 $\pm$ 4.08                | 31.32 $\pm$ 1.74 <sup>**</sup>  | 16.00 $\pm$ 2.76 <sup>**</sup> | 13.31 $\pm$ 2.94 <sup>**</sup> |
| 50%乙醇部位高剂量组 | 6.21 $\pm$ 4.31                | 14.13 $\pm$ 6.15               | 18.99 $\pm$ 10.93               | 33.24 $\pm$ 16.72               | 31.55 $\pm$ 12.55               | 30.51 $\pm$ 8.78 <sup>**</sup>  | 19.81 $\pm$ 4.29 <sup>**</sup> | 16.16 $\pm$ 5.67 <sup>**</sup> |
| 95%乙醇部位低剂量组 | 6.86 $\pm$ 4.35                | 7.17 $\pm$ 3.61                | 11.92 $\pm$ 2.52                | 21.54 $\pm$ 6.32                | 31.70 $\pm$ 3.77                | 38.98 $\pm$ 12.57               | 28.02 $\pm$ 3.84               | 17.16 $\pm$ 2.99 <sup>*</sup>  |
| 95%乙醇部位高剂量组 | 10.80 $\pm$ 6.96               | 15.66 $\pm$ 8.52               | 22.54 $\pm$ 8.15                | 28.69 $\pm$ 11.28               | 38.25 $\pm$ 7.76                | 37.33 $\pm$ 8.69                | 28.84 $\pm$ 10.92              | 21.72 $\pm$ 5.42               |
| 水提部位低剂量组    | 10.77 $\pm$ 6.45               | 17.76 $\pm$ 7.02               | 20.95 $\pm$ 6.33                | 30.94 $\pm$ 9.05                | 37.99 $\pm$ 8.62                | 33.20 $\pm$ 6.97                | 19.46 $\pm$ 5.15 <sup>**</sup> | 16.49 $\pm$ 2.30 <sup>*</sup>  |
| 水提部位高剂量组    | 10.25 $\pm$ 5.82               | 14.05 $\pm$ 6.25               | 21.53 $\pm$ 9.18                | 29.32 $\pm$ 10.51               | 37.09 $\pm$ 8.07                | 38.70 $\pm$ 8.45                | 24.65 $\pm$ 6.87               | 20.08 $\pm$ 3.54               |

注:与正常组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$

**2.2 短穗兔耳草不同极性部位对痛风性关节炎大鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的影响** 结果如表 2 所示,与正常组比较,模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平明显升高( $P<0.01$ );与模型组比较,秋水仙碱组,短穗兔耳草 30%乙醇部位低、高剂量组,50%乙醇部位的高剂量组,均能明显降低大鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

**1.10 统计学处理方法** 采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行处理,结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 ImageJ 软件对蛋白条带进行灰度值扫描,之后用 Graphpad prism 进行数据处理。组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 短穗兔耳草不同极性部位对痛风性关节炎大鼠不同时间踝关节肿胀度的影响** 结果如表 1 所示,正常组踝关节在给予无菌生理盐水注射之后各时间点肿胀度无明显变化。与正常组比较,模型组大鼠踝关节在各时间点(2~48 h)均出现明显的关节肿胀( $P<0.01$ ),且在造模后 16 h 到达高峰,此后呈现下降趋势;与模型组比较,在造模后 48 h 时,阳性药秋水仙碱组,短穗兔耳草 30%乙醇部位低剂量组,50%乙醇部位的低、高剂量组,95%乙醇低剂量组,以及水提部位低剂量组,大鼠踝关节肿胀率均明显下降且差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

**2.3 短穗兔耳草不同极性部位对急性痛风性关节炎大鼠踝关节滑膜病理学的影响** 如图 1 所示,正常组注射无菌氯化钠溶液后,大鼠踝关节滑膜及其周围组织细胞正常,排列整齐;尿酸钠晶体造模 48 h 后,模型组细胞排列紊乱,伴有大量的炎性浸润和小血管增生;秋水仙碱组和短穗兔耳草 30%乙醇部位低、高剂量组滑膜炎性浸润较模型组明显减少,



表2 短穗兔耳草不同极性部位对急性痛风性关节炎大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Table 2 Effect of *L. brachystachys* Maxim different polar parts on serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in rats with acute gouty arthritis ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

| 分组          | 剂量<br>/(g·kg <sup>-1</sup> ) | TNF- $\alpha$<br>/(pg·mL <sup>-1</sup> ) | IL-1 $\beta$<br>/(pg·mL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 正常组         | -                            | 63.52 ± 8.01                             | 50.20 ± 8.71                            |
| 模型组         | -                            | 86.13 ± 9.35 <sup>#</sup>                | 75.22 ± 10.23 <sup>#</sup>              |
| 秋水仙碱组       | 0.0003                       | 70.79 ± 5.88 <sup>**</sup>               | 52.31 ± 6.78 <sup>**</sup>              |
| 30%乙醇部位低剂量组 | 0.8                          | 75.64 ± 6.27 <sup>*</sup>                | 62.78 ± 9.12 <sup>*</sup>               |
| 30%乙醇部位高剂量组 | 3.2                          | 69.19 ± 8.46 <sup>**</sup>               | 55.34 ± 6.55 <sup>**</sup>              |
| 50%乙醇部位低剂量组 | 0.8                          | 78.55 ± 9.24                             | 69.19 ± 10.57                           |
| 50%乙醇部位高剂量组 | 3.2                          | 76.22 ± 4.47 <sup>*</sup>                | 63.12 ± 7.99 <sup>*</sup>               |
| 95%乙醇部位低剂量组 | 0.8                          | 85.14 ± 8.02                             | 79.62 ± 11.52                           |
| 95%乙醇部位高剂量组 | 3.2                          | 83.94 ± 6.45                             | 74.88 ± 8.51                            |
| 水提部位低剂量组    | 0.8                          | 82.54 ± 5.46                             | 72.66 ± 6.15                            |
| 水提部位高剂量组    | 3.2                          | 88.60 ± 6.33                             | 73.43 ± 7.02                            |

注: 与正常组比较, <sup>#</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

细胞排列较整齐, 无明显小血管增生; 50%乙醇部位炎性浸润及小血管增生较模型组略有改善; 而 95%乙醇部位及水部位与模型组比较无明显差异, 炎性浸润明显。

**2.4 短穗兔耳草不同极性部位对急性痛风性关节炎 TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B 和 NALP3 信号通路蛋白表达的影响** 见图 2。与正常组比较, 急性痛风性关节炎模型组大鼠右后踝关节滑膜组织中 TLR4、TLR2、MyD88、NF- $\kappa$ B、NALP3 等蛋白表达水平明显上调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 秋水仙碱组及短穗兔耳草 30%乙醇部位低、高剂量组均能降低滑膜组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 短穗兔耳草各部位不同剂量组均能够明显下调滑膜组织中 TLR2 和 NALP3 蛋白表达水平 (均  $P < 0.01$ ); 而 50%乙醇部位、95%乙醇部位及水部位低、高剂量组中 TLR4、MyD88 及 NF- $\kappa$ B 蛋白表达下调不明显, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

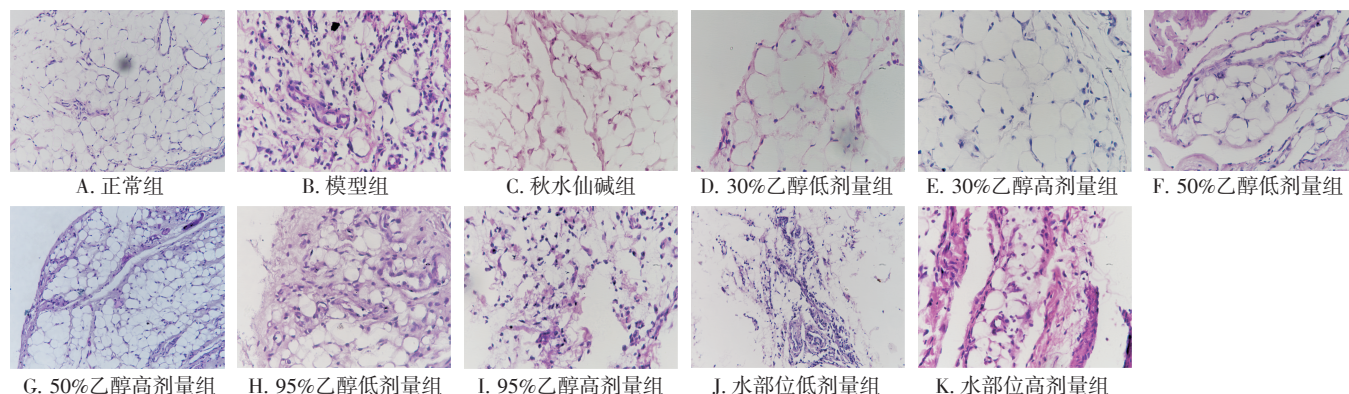


图1 短穗兔耳草不同极性部位对痛风性关节炎大鼠滑膜组织病理切片的影响(HE染色,  $\times 400$ )

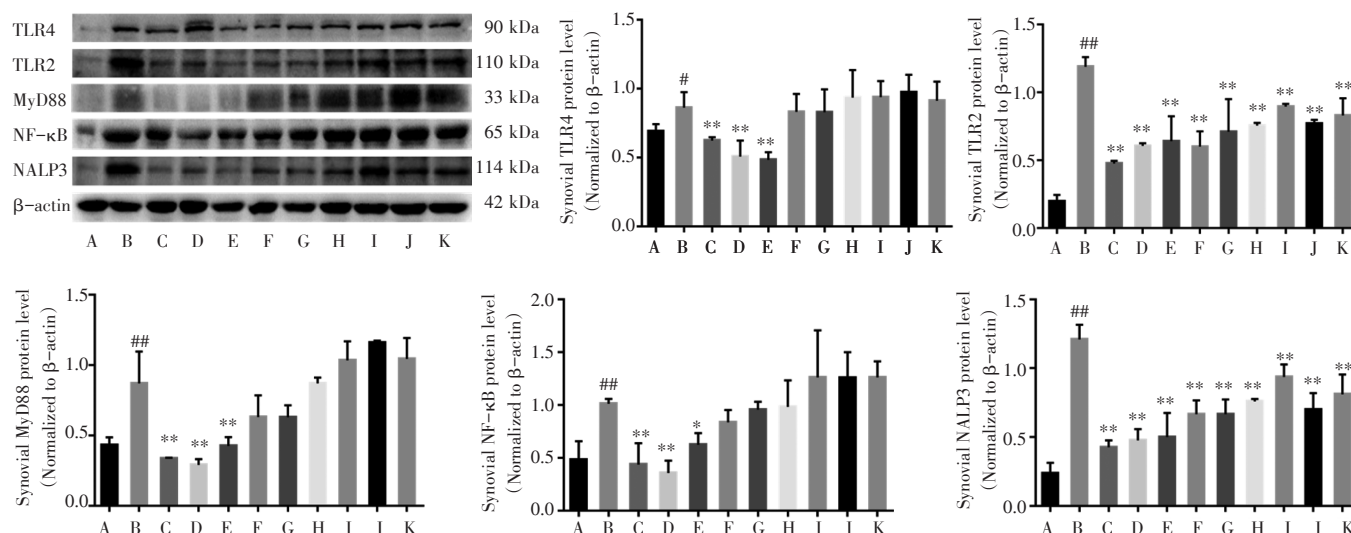
Figure 1 Effect of *L. brachystachys* Maxim different polar parts on the pathological section of synovial tissue in rats with gouty arthritis (HE staining,  $\times 400$ )

### 3 讨论

随着现代人们生活水平的提高及过大的生活压力, 痛风的发病率明显升高, 同时发病的年龄也日趋年轻化, 而目前我国痛风的发病率约为 0.15%~0.67%<sup>[13]</sup>。痛风的自然病程可分为 4 期, 每一期的症状也不相同。即无症状高尿酸血症期、急性期、间歇期、慢性期<sup>[14]</sup>。造成痛风的原因有许多, 如饮食习惯、外伤及手术刺激、精神心理因素、劳累等。临床上痛风首发症状为痛风性关节炎。痛风的治疗以降尿酸为主, 而痛风性关节炎的治疗以抗炎为主。痛风性关节炎患者一般伴有肥胖、高血压、高血脂等<sup>[15]</sup>。而目前对痛风和痛风性关节炎的治疗尚无法根

治, 只能通过药物缓解, 减慢疾病进程。

在急性痛风性关节炎发生阶段, 尿酸钠结晶可同时激活 TLR2 和 TLR4。TLRs 属 I 型跨膜蛋白, 其活化后能够与髓样活化因子 88(MyD88)结合, 募集白细胞介素 1 受体相关激酶 (IRAK), IRAK 被活化后与 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 结合活化生长因子  $\beta$  活化激酶 1 (TAK1), 最终在 IKK 激酶的催化下激活 NF- $\kappa$ B, 启动一系列炎症因子、趋化因子、黏附因子 (如: IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等) 的转录和表达, 从而介导炎症反应完成信号传导<sup>[16-17]</sup>。已有研究<sup>[18-19]</sup>表明, 在“TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B”信号通路中 TLRs 和 MyD88 对急性痛风性炎症反应过程是必需的。NALP3 (NLRP3)



注：与正常组比较， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比较， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$

A. 正常组；B. 模型组；C. 秋水仙组；D. 30%乙醇低剂量组；E. 30%乙醇高剂量组；F. 50%乙醇低剂量组；G. 50%乙醇高剂量组；H. 95%乙醇低剂量组；I. 95%乙醇高剂量组；J. 水部位低剂量组；K. 水部位高剂量组

图2 短穗兔耳草不同极性部位对急性痛风性关节炎大鼠TLR4、TLR2、MyD88、NF- $\kappa$ B、NALP3蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 2 Effect of *L. brachystachys* Maxim different polar parts on expression of TLR4, TLR2, MyD88, NF- $\kappa$ B and NALP3 in rats with acute gouty arthritis( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

是一类能感知细胞内病原性信号的胞浆型模式识别受体，它能形成炎性体参与各种酶和蛋白的加工、分泌，诱导细胞炎症或凋亡<sup>[20]</sup>。NALP3可激活caspase1，后者将“TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B”信号通路中由NF- $\kappa$ B激活的pro IL-1 $\beta$ 剪切为IL-1 $\beta$ <sup>[21]</sup>。TLRs与NLRs具有协同作用，通过TLRs/MyD88/NF- $\kappa$ B通路与NLRP3炎性体共同调控MSU介导的痛风炎症反应的发生<sup>[22]</sup>。MSU作为一个危险信号分子也能被NALP3蛋白C端的LRR识别后经过一系列的反应激活NALP3炎性小体，从而刺激炎症因子(如：IL-1 $\beta$ 等)的产生而引起炎症级联反应<sup>[23]</sup>。

本课题组前期研究<sup>[1]</sup>结果表明短穗兔耳草提取物对急性痛风性关节炎具有一定的保护作用，其作用机制主要表现在能够降低急性痛风性关节炎大鼠的踝关节肿胀度，且可以降低TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B和NALP3信号通路的蛋白表达水平。因此，本研究在此基础上进一步筛选其抗痛风性关节炎的有效部位。结果显示，与正常组比较，模型组大鼠踝关节肿胀度以及滑膜组织中TLR2、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B和NALP3表达均明显升高( $P<0.01$ )；经过短穗兔耳草不同极性部位药物干预后，造模后48h秋水仙碱组，30%、95%乙醇部位和水提部位低剂量组以及50%乙醇部位低、高剂量组大鼠右后踝关节肿胀度较模型组明显下降( $P<0.05$ ， $P<0.01$ )；而其

他组关节肿胀度下降不明显，无明显差异。对血清炎症因子检测结果表明30%乙醇部位低、高剂量组和50%乙醇部位的高剂量组均能明显降低大鼠血清中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 水平( $P<0.05$ ， $P<0.01$ )；同时，Western Blot结果显示秋水仙碱组及短穗兔耳草30%乙醇部位低、高剂量组均能使滑膜组织中TLR2、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B和NALP3蛋白表达量下调( $P<0.05$ ， $P<0.01$ )。此外，病理切片显示藏药短穗兔耳草30%、50%乙醇部位对急性痛风性关节炎导致踝关节滑膜炎性浸润及小血管增生等具有不同程度的减轻，其中30%乙醇部位效果更佳。从本课题组前期对不同部位的化学成分分离结果来看，30%乙醇部位包括苯乙醇苷类、环烯醚萜类和黄酮类成分，50%乙醇部位以三萜类化合物为主，成分的不同可能导致两部位虽然均具有降低大鼠关节肿胀的作用，但其作用机制不同，50%乙醇部位并未对TLR4、MyD88及NF- $\kappa$ B等蛋白表现出下调作用。

综上所述，本研究认为30%乙醇部位为短穗兔耳草抗急性痛风性关节炎大鼠的有效部位，其作用机制与阻断TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B和NALP3信号通路的激活有关。

## 参考文献：

[1] SHEKELLE P G, NEWBERRY S J, FITZGERALD J D, et al.

- Management of gout: a systematic review in support of an american college of physicians clinical practice guideline[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2017, 166(1): 37-51.
- [2] 汪学良, 刘念, 秦天楠, 等. 痛风研究现状及展望[J]. *风湿病与关节炎*, 2018, 7(6): 68-70, 80.
- [3] 刘婷, 张霞, 李飞燕. 急性痛风性关节炎的中西医治疗进展[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(2): 374-376.
- [4] 钟国跃, 周福成, 石上梅, 等. 藏药材常用品种及质量标准现状调查分析研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(16): 2349-2355.
- [5] 胡文忠, 刘程惠, 姜爱丽, 等. 藏药的发展历史及研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(20): 10746-10748.
- [6] 陈兰英, 周星, 骆瑶, 等. 二十五味儿茶丸对痛风性关节炎大鼠炎症反应的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9): 128-133.
- [7] 红梅, 李先加, 刘有菊, 等. 藏药十五味云鹏散含汞制剂和无汞制剂对急性痛风性关节炎大鼠的影响[J]. *医药导报*, 2019(7): 852-855.
- [8] 杨本扎西. 藏药痛风消痛涂剂治疗急性痛风性关节炎32例临床观察[J]. *中国民族民间医药*, 2014, 23(22): 3, 10.
- [9] 孙瑜婧, 胡一帆. 痛风的中医外治法[J]. *承德医学院学报*, 2011, 28(3): 284-285.
- [10] 熊雯雯, 张红阳, 文乐, 等. 短穗兔耳草提取物对高尿酸血症小鼠黄嘌呤氧化酶和肾脏尿酸转运体的影响研究[J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(13): 1538-1543.
- [11] 单佳铃, 欧阳香, 程虹毓, 等. 藏药短穗兔耳草提取物对急性痛风性关节炎大鼠TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B和NALP3信号通路的影响研究[J]. *中药材*, 2020, 43(3): 716-720.
- [12] CHITRA D, SOWMIYA K, MAHABOOBKHAN R, et al. 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- $\kappa$ B activation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145093.
- [13] 赵伟, 刘春红, 陈文辉, 等. 中西医结合治疗顽固性痛风合并继发性肾上腺皮质功能减退症的体会——附2例报道[J]. *广西中医药大学学报*, 2014, 17(4): 14-16.
- [14] 郭立新. 痛风. 内科学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2012: 856-864.
- [15] 刘婷, 张霞, 李飞燕. 急性痛风性关节炎的中西医治疗进展[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(2): 374-376.
- [16] KELLY P N, ROMERO D L, YANG Y, et al. Selective interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitors for the treatment of autoimmune disorders and lymphoid malignancy[J]. *J Exp Med*, 2015, 212(13): 2189-2201.
- [17] QIAO H, WANG B, YIN D, et al. Kinsenoside screening with a microfluidic chip attenuates gouty arthritis through inactivating NF- $\kappa$ B signaling in macrophages and protecting endothelial cells[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(9): 1-12.
- [18] CHEN C J, SHI Y, HEARN A, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2262-2271.
- [19] LIU-BRYAN R, SCOTT P, SYDLASKE A, et al. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(9): 2936-2946.
- [20] JULIANA C, FERNANDES-ALNEMRI T, KANG S, et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(43): 36617-36622.
- [21] AMARAL F A, COSTA V V, TAVARES L D, et al. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B4 in a murine model of gout[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(2): 474-484.
- [22] QING Y F, ZHOU J G, ZHANG Q B, et al. Association of TLR4 gene rs2149356 polymorphism with primary gouty arthritis in a case-control study[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64845.
- [23] WANG L F, DING Y J, ZHAO Q, et al. Investigation on the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to primary gout[J]. *Genet Molecul Res*, 2015, 14(4): 16410-16414.

(编辑: 修春)