

·方药研究·

本文引用:陆小龙,曾朋,向黎黎,熊辉,齐新宇,郭玉星,周彪. 蠲痹历节清酊对大鼠急性痛风性关节炎模型滑膜组织中 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(12): 1299-1302.

## 蠲痹历节清酊对大鼠急性痛风性关节炎模型滑膜组织中 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 表达的影响

陆小龙<sup>1</sup>, 曾朋<sup>1</sup>, 向黎黎<sup>1</sup>, 熊辉<sup>2\*</sup>, 齐新宇<sup>2</sup>, 郭玉星<sup>1</sup>, 周彪<sup>2</sup>

(1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南长沙 410005; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 初步探讨蠲痹历节清酊对大鼠急性痛风性关节炎模型的作用机制。**方法** 选用 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 40 只, 分成蠲痹历节清酊组、扶他林软膏组、模型组、空白对照组, 每组 10 只。对前三组采用踝关节腔注射尿酸钠溶液造成急性痛风性关节炎模型, 并予以相应干预。观察各组大鼠造模后一般状态; 用缚线法检测大鼠踝关节肿胀度; 光镜下观察踝关节滑膜的病理变化; 采用免疫组化染色检测滑膜组织中细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和核转录因子(NF- $\kappa$ B)含量。**结果** 与模型组比较, 扶他林软膏组、蠲痹历节清酊组肿胀度降低( $P<0.05$ ); 大鼠踝关节滑膜光镜观察: 空白对照组滑膜组织结构整齐、层次分明。模型组滑膜组织结构破坏、层次混乱, 组织充血、水肿, 大量炎性细胞浸润、成纤维细胞增生, 少量巨噬细胞浸润; 扶他林软膏组、蠲痹历节清酊组与模型组比较改善明显; 大鼠踝关节滑膜组织中, 空白对照组与模型组 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 表达比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。扶他林软膏组、蠲痹历节清酊组与模型组 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 表达比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 蠲痹历节清酊具有缓解肿胀、改善滑膜炎症、抑制关节滑膜中 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 表达的作用。

**[关键词]** 蠲痹历节清酊; 痛风性关节炎; ICAM-1; NF- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R285.5; R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.12.001

### Effects of Juanbi Lijieqing Tincture on ICAM-1, NF- $\kappa$ B Expression of Synovial Tissue in Model Rats with Acute Gouty Arthritis

LU Xiaolong<sup>1</sup>, ZENG Peng<sup>1</sup>, XIANG Lili<sup>1</sup>, XIONG Hui<sup>2\*</sup>, QI Xinyu<sup>2</sup>, GUO Yuxing<sup>1</sup>, ZHOU Biao<sup>2</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect mechanism of Juanbi Lijieqing tincture on the model rats with acute gouty arthritis. **Methods** The 40 SPF level healthy male SD rats were divided into Juanbi Lijieqing tincture group, Futalin ointment group, model group, blank control group, 10 rats in each group. The former three groups were established acute gouty arthritis model, and intervened by Futalin ointment and Juanbi Lijieqing tincture. Rats were observed after modeled in general condition, then compared. The ankle swelling of rats after drug intervention was detected by the line method; the ankle synovial pathological changes were observed under light microscope; the ankle joint synovial tissue intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and nuclear-transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in rats were determined by immunohistochemical staining method. **Results** The swelling degree of Futalin ointment group and Juanbi Lijieqing tincture group, compared with the control group ( $P<0.05$ ). The synovial tissue structure in the blank group was neat and clear under the light microscope, while the synovial tissue structure in model group was disorder, synovial hyperemia, edema, and a large number of infiltration of inflammatory cells and

**[收稿日期]** 2017-04-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81574005); 湖南省自然科学基金(2015JJ6083); 湖南省教育厅科研项目(13C680)。

**[作者简介]** 陆小龙, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 骨病、筋伤的中医药防治研究。

**[通讯作者]** \*熊辉, 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, E-mail: xh\_hn@sina.com。

proliferation of fibroblast, a small amount macrophage infiltration were also observed in the model group; Futalin ointment group and Juanbi Lijieqing tincture group showed obvious improvement, compared with the model group. The expression of ICAM-1 and NF- $\kappa$ B between the blank control group, Futalin ointment group and Juanbi Lijieqing tincture group with the model group were significantly different ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Juanbi Lijieqing tincture shows the effects of relieving swelling, improving synovial inflammation, inhibiting the expression of ICAM-1 and NF- $\kappa$ B in the synovial membrane of the joint.

[**Keywords**] Juanbi Lijieqing tincture; gouty arthritis; ICAM-1; NF- $\kappa$ B

痛风(Gout)是体内嘌呤代谢紊乱导致的代谢性疾病,病因是尿酸盐在关节及关节周围组织中沉积引起的急性炎症反应,其发生与体内嘌呤代谢障碍和(或)尿酸排泄减少致血尿酸升高有关<sup>[1]</sup>,近年来国内该病的发病率逐年升高<sup>[2]</sup>。本团队根据痛风性关节炎的病机及发病特点,在临床应用中药蠲痹历节清方治疗急性痛风性关节炎取得了满意的临床疗效<sup>[3-4]</sup>。本课题通过改变剂型和作用途径,将蠲痹历节清方由水煎剂改成酊剂,为验证其疗效及探讨可能的作用机制,进行了蠲痹利节清酊干预大鼠急性痛风性关节炎模型实验,现将其报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选用 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 ( $194.50 \pm 19.21$ ) g, 由湖南中医药大学动物实验中心采购, 许可证号: SYXK(湘)2015-0004。实验通过医学实验动物伦理委员会批准, 在湖南中医药大学动物实验中心饲养、造模, 实验, 隔 2 日清洁 1 次鼠笼。

### 1.2 实验药物

蠲痹历节清方由苍术、茵陈、黄柏、黄芩、当归、防己、泽泻、土茯苓、白术、甘草等配伍组成, 称取蠲痹历节清方药粉碎成粗粉, 加 75%乙醇 900 mL 浸渍, 3 d 后滤过, 药渣压榨, 滤液与榨出液合并, 静置 24 h, 滤过, 合并滤液, 补充 75%乙醇至 1 000 mL, 搅匀, 分装, 密封即得。蠲痹历节清酊 50 mL/瓶, 生药含量约 0.064 g/mL, 由湖南中医药大学第二附属医院药剂科制备。扶他林软膏 20 g/支, 北京诺华制药有限公司生产。

### 1.3 实验试剂

尿酸结晶体(aladdin industrial corporation, 批号: 21041220); 苏木素(武汉德士生物工程有限公司, 批号: 20141124); 大鼠细胞间粘附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)ELISA 试剂盒 [博灿生物科技(上海)有限公司, 批号: 20110224]; 大鼠核转录因子(nuclear transcription factor, NF- $\kappa$ B)ELISA 试剂盒[博灿生物科技(上海)有限公司, 批号: 20110303]。

### 1.4 实验仪器

JY3002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); LECIA DM LB2 型双目显微镜(德国 LECIA 公司); MIAS 医学图像分析系统(北航公司); Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司); DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司); MotisB5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组

SPF 级 SD 大鼠, 喂养 3 d 后按随机原则分为 4 组, 即空白对照组、模型组、扶他林软膏组、蠲痹历节清酊组, 每组 10 只。4 组动物在正常温湿度(温度 24~28  $^{\circ}$ C, 相对湿度 60%~75%)环境下, 普通饲料喂养, 自由饮水 3 d, 第 4 天开始实验。

### 2.2 动物造模

除空白对照组外, 其他组动物参照吕军等<sup>[5]</sup>建立高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的方法进行造模。按无菌操作方法, 用 4 号注射针头, 用 3%氧嗪酸钾溶液 1 mL/100 g 行腹腔内注射, 2 次/d, 连续注射 1 周后开始造模。将大鼠右小腿下段毛剔除后, 常规消毒, 用直径 0.25 mm 注射针(5 mL 注射器), 取受试大鼠右后肢背侧的踝关节正中与小腿之间的间隙, 将 5%尿酸钠溶液 50  $\mu$ L 注入关节腔。对照组大鼠同样使用相同方法注射 0.2 mL 生理盐水<sup>[6]</sup>。造模后大鼠关节红肿, 不欲行动, 步履蹒跚或者跛行, 饮食饮水较空白对照组少, 根据 Coderre 等<sup>[7]</sup>大鼠步态分级评分标准, 大鼠出现跛行, 受试下肢刚触及地面甚至受试下肢离开地面, 三足着地行走为造模成功<sup>[1,8]</sup>。

### 2.3 动物给药剂量<sup>[9]</sup>及方法

根据人与动物体表面积换算公式计算蠲痹历节清酊组、扶他林软膏组大鼠的给药剂量。蠲痹历节清酊剂: 规格 50 mL/瓶, 成人每次剂量为 5 mL/d, 每日给药 3 次。根据人与动物体表面积换算公式, 大鼠按 1.35 mL/kg 每天使用蠲痹历节清酊, 即每天使用生药量为 0.087 g/kg。扶他林软膏: 成人每次剂量为 4 cm 膏体, 每日给药 3 次。根据人与动物体表

面积换算公式,扶他林软膏组大鼠每次约使用 0.7 cm。生理盐水;模型组、空白对照组大鼠涂以等剂量医用 0.9%生理盐水。

用分液器将罂痹历节清酩涂于罂痹历节清酩组大鼠右踝,使用棉签将扶他林软膏涂于扶他林软膏组大鼠右踝,模型组、空白对照组大鼠涂以生理盐水,用输液贴覆盖。每天 3 次,共干预 3 d。

#### 2.4 观察指标

2.4.1 一般状态 观察各组大鼠的食量、水量、大小便、体质量、外观、步态、精神状态等的变化情况,做详细记录并进行对比分析。

2.4.2 踝关节肿胀度测定 第一次给药前在各组大鼠右踝关节处用画标志线,以确定给药后量取相同部位,棉线绕其一圈后直尺量长度,作为给药前右后肢踝关节周径记为 L1,给药 3 d 后再次量取关节的周径记为 L2。以(L2-L1)/L1 作为大鼠右后肢踝关节肿胀度。

2.4.3 踝关节滑膜组织镜下形态学检查 大鼠处死后,以踝关节为中心上下 0.5 cm 处剪断,取下受试关节和周围软组织,分别快速切取踝关节滑膜,放入 40 g/L 中性甲醛溶液中固定,乙二胺四乙酸 100 g/L 脱钙,常规脱水、透明、包埋、切片和 HE 染色,显微镜下观察局部病理组织学变化。

2.4.4 滑膜组织中 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平测定 取滑膜组织浸入生理盐水中,使用 10 mg/0.5 mL 的浓度比例;将组织匀浆器放到冰盒中;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;将均匀一致的悬浊液倒入 EP 管中,将 EP 管用全自动离心机进行 3 000 r/min 的高速离心 5 min,以分离匀浆液;用移液枪把上清液移至已经标记好的 EP 管内,存储于-80 °C 冰箱里备用。用 ELISA 法检测 ICAM-1、NF- $\kappa$ B,严格按照试剂盒说明书进行。

#### 2.5 统计学分析

统计分析采用 SPSS 20.0 统计软件分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。如果满足正态性和方差齐性检验,采用单因素方差分析的最小二乘法(LSD)法行多组均数间的两两比较,若不满足方差齐性则采用 *t* 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

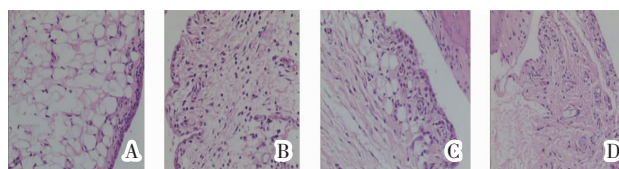
#### 3.1 一般状态比较

造模后,空白对照组大鼠体毛润泽,活动自如,反应灵敏,饮食及二便正常;其余造模各组大鼠体毛欠光泽,精神欠佳,懒动,食量减少,大便稀溏,大鼠

关节红肿,不欲行动,步履蹒跚或者跛行,饮食饮水较空白对照组少。

#### 3.2 关节滑膜组织形态观察

空白对照组:镜下可见滑膜组织无病理改变,结构整齐、层与层之间间隔分明,滑膜层细胞性内膜由 1-3 层细胞组成(图 1A)。模型组:镜下可见滑膜组织病理改变,结构损坏、层与层之间间隔混乱,滑膜组织的充血、水肿,可见大量炎性细胞的浸润,同时可见大量成纤维细胞的增生,少量巨噬细胞浸润(图 1B)。扶他林软膏组:镜下可见滑膜组织病理改变,结构损坏、层与层之间间隔混乱,滑膜组织的充血、水肿,偶尔少量炎性细胞的浸润,同时可见中量成纤维细胞的增生,少量巨噬细胞浸润(图 1C)。罂痹历节清酩组:镜下可见滑膜组织病理改变,结构损坏、层与层之间间隔混乱,滑膜组织的充血、水肿,偶尔可见炎性细胞的浸润,同时可见中量成纤维细胞的增生,少量巨噬细胞浸润(图 1D)。



注:A 图空白对照组;B 图模型组;C 图扶他林软膏组;D 图罂痹历节清酩组

图 1 大鼠踝关节滑膜组织形态光镜图(HE,  $\times 200$ )

#### 3.3 大鼠关节肿胀度及滑膜组织中 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 表达检测

造模后,与空白对照组比较,模型组肿胀度增高( $P<0.05$ );与模型组比较,扶他林软膏组、罂痹历节清酩组肿胀度降低( $P<0.05$ );罂痹历节清酩组与扶他林软膏组肿胀度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

与空白对照组比较,模型组滑膜组织中 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 的表达升高( $P<0.05$ );与模型组比较,扶他林软膏组、罂痹历节清酩组滑膜组织中 ICAM-1、NF- $\kappa$ B 的表达降低( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠关节肿胀度及滑膜组织中 ICAM-1、NF- $\kappa$ B

| 组别      | 表达比较                             |  |  |
|---------|----------------------------------|--|--|
|         | 关节肿胀度                            | ICAM-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | NF- $\kappa$ B/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
| 空白对照组   | 0.02 $\pm$ 0.01                  | 138.38 $\pm$ 17.17                       | 846.03 $\pm$ 54.69                               |
| 模型组     | 0.23 $\pm$ 0.03 $\Delta$         | 378.88 $\pm$ 21.18 $\Delta$              | 3065.60 $\pm$ 146.35 $\Delta$                    |
| 扶他林软膏组  | 0.14 $\pm$ 0.01 $\blacktriangle$ | 209.51 $\pm$ 24.60 $\blacktriangle$      | 1588.11 $\pm$ 233.04 $\blacktriangle$            |
| 罂痹历节清酩组 | 0.15 $\pm$ 0.01 $\blacktriangle$ | 181.85 $\pm$ 25.35 $\blacktriangle$      | 1573.05 $\pm$ 184.52 $\blacktriangle$            |
| F 值     | 23.67                            | 23.43                                    | 11.51  |
| P 值     | 0.01                             | 0.01                                     | 0.00   |

注:与空白对照组比较, $\Delta P<0.05$ ;与模型组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。



## 4 讨论

急性痛风性关节炎的研究者多从炎症因子方面着手,IL-1<sup>[10]</sup>、IL-6、IL-8<sup>[11]</sup>、PGE2<sup>[12]</sup>、ICAM-1<sup>[13]</sup>等因子成为急性痛风性关节炎常用研究指标。随着对炎症发生机制研究的深入,ICAM受到广泛关注,正常情况下ICAM-1表达较弱,在各种炎症因子刺激下其表达较基线状态明显升高,促进炎症细胞的趋化,并介导了中性粒细胞与内皮细胞的黏附,ICAM-1是急性炎症发展过程中重要的一部分,与炎症细胞的黏附、浸润过程关系密切<sup>[14]</sup>。NF- $\kappa$ B<sup>[15]</sup>是细胞内一种重要的核转录因子,它在细胞因子诱导的基因表达中起关键性的调控作用,广泛参与炎症反应、免疫应答、细胞增殖和细胞凋亡等多种生理、病理过程的基因调控。正常情况下处于未活化状态,NF- $\kappa$ B激活会引起本已发生的炎症反应持续增强,其原理与促进炎性细胞过度分泌于炎症部位有关。

本课题组在研究中医药治疗痛风方面,做了许多的临床研究和动物实验<sup>[1-4,16]</sup>,旨在能够研究出一种临床疗效确切,使用方法便利的药物。本课题在蠲痹历节清方的基础上,改变剂型和作用途径,由水煎剂转变成酊剂,通过动物实验,验证其疗效及作用机制,为蠲痹历节清方的药物开发提供实验依据。

本文结果表明,关节肿胀度测定实验中,扶他林软膏组、蠲痹历节清酊组关节肿胀度与模型组比较降低( $P<0.05$ );扶他林软膏组与蠲痹历节清酊组关节肿胀度比较,差异不具有统计学意义。说明扶他林软膏与蠲痹历节清酊均具有一定的消肿作用,其作用效果相当。通过光镜观察大鼠踝关节滑膜切片,空白对照组滑膜组织结构整齐、层次分明。模型组滑膜组织结构破坏、层次混乱,组织充血、水肿,大量炎性细胞浸润、成纤维细胞增生,少量巨噬细胞浸润。扶他林软膏组、蠲痹历节清酊组与模型组比较,少量炎性细胞、巨噬细胞浸润,中量成纤维细胞增生,提示扶他林软膏与蠲痹历节清酊对滑膜增生性病变的影响相当。在大鼠滑膜组织ICAM-1、NF- $\kappa$ B的测定中,空白对照组与模型组ICAM-1、NF- $\kappa$ B表达比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示ICAM-1、NF- $\kappa$ B的表达可能是急性痛风性关节炎炎症反应诱因。扶他林软膏组、蠲痹历节清酊组与模型组ICAM-1、NF- $\kappa$ B表达比较降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示扶他林软膏、蠲痹历节清酊具有抑制

大鼠急性痛风性关节炎模型中ICAM-1、NF- $\kappa$ B表达的作用。扶他林软膏组与蠲痹历节清酊组ICAM-1、NF- $\kappa$ B表达比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示扶他林软膏与蠲痹历节清酊在抑制急性痛风性关节炎模型ICAM-1、NF- $\kappa$ B表达中效果相当。综上所述,蠲痹历节清酊具有缓解急性肿胀、改善滑膜组织炎症反应、抑制痛风性关节炎关节滑膜中ICAM-1、NF- $\kappa$ B的表达,从而减轻痛风性关节炎关节局部的炎症症状的作用。

## 参考文献:

- [1] 熊辉,曲良焯,向黎黎,等.痛风性关节炎湿热证证结合模型的建立[J].中医正骨,2014,26(3):14-20.
- [2] 齐新宇,熊辉,周彪,等.蠲痹历节清方干预鸡急性痛风性关节炎模型的实验研究[J].中医正骨,2015,27(3):5-11.
- [3] 向黎黎,熊辉,李腾龙,等.蠲痹历节清方治疗急性期湿热蕴结型痛风性关节炎31例[J].湖南中医杂志,2015,31(2):14-16.
- [4] 陆小龙,郭玉星,熊辉,等.蠲痹历节清方治疗湿热蕴结型痛风性关节炎的临床观察[J].中医药导报,2015,21(5):23-25.
- [5] 吕军,吕芳,方和金,等.高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的建立[J].中国现代医学杂志,2013,23(27):11-16.
- [6] 黄火高,孙达峰.大鼠急性痛风性关节炎模型的建立及特点[J].军事医学科学院院刊,2005,29(6):539-542.
- [7] Coderre Tj, Wall PD. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. Pain 1987, 28(3):379-393.
- [8] 江壮风,祁开泽.朱克痛风宁治疗湿热蕴结型痛风性关节炎例临床观察[J].中国医药,2003,17(4):64.
- [9] 贺石林,王健,王净净.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2006:48-49.
- [10] 叶红芳,黄平,应华忠,等.四妙合草脏渗湿汤对急性痛风性关节炎的IL-1 $\beta$ 、PGE2的影响和实验研究[J].浙江中医药大学学报,2010,32(2):158-159,162.
- [11] 石瑞舫.路志正治疗痛风痹经验[J].河北中医,2011,33(7):965-966.
- [12] 吕波,胡玉灵治疗痛风性关节炎经验[J].中医杂志,2008,49(11):979,994.
- [13] 路洁,魏华.路志正教授论痛风的学术思想[J].浙江中医学报,2005,29(6):30-31.
- [14] 沈知行.施仁潮应用丹溪痛风方治疗痛风经验[J].山东中医药大学学报,2012,36(3):215-216.
- [15] Darlan PaseRosa, Luiz Felipe Forgiarini. Antioxidants inhibit the inflammatory and apoptotic processes in an intermittent hypoxia model of sleep apnea[J]. Inflammation Research, 2015,64(1):21-29.
- [16] 尹明,向黎黎,熊辉,等.痛风性关节炎湿热蕴结证大鼠模型建立的研究[J].湖南中医药大学学报,2015,35(2):6-10.

(本文编辑 杨 瑛)