

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

姜德友 李文昊 解颖 隋方宇 孙许涛 韩洁茹 刘彤彤 常佳怡

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨, 150040)

摘要 目的:研究并观察补肾利湿法对痛风性关节炎大鼠白介素 17(IL-17)表达水平的影响,探讨补肾利湿法防治急性痛风性关节炎(Gouty Arthritis, GA)的作用机制。方法:将 84 只 Wistar 大鼠随机分为 7 组:空白组(BG)、模型组(MG)、中药对照组(CMCG)、西药对照组(WMCG)及中药复方低、中、高浓度组(CMLG、CMMG、CMHG),每组 12 只。采用 MSU 联合草酰钾诱导大鼠急性痛风性关节炎模型,应用 ELISA 法,分别检测各组大鼠血清 IL-17 的含量。结果:与空白组比较,造模各组大鼠血清 IL-17 的水平明显升高,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,西药对照组、中药对照组、中药复方低、中、高浓度各组 IL-17 水平明显降低,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);西药对照组与中药复方中浓度组比较,IL-17 含量差异不大($P > 0.01$)。结论:补肾利湿法处方可明显抑制急性痛风性关节炎大鼠 IL-17 的表达,对防治痛风性关节炎具有一定作用。

关键词 补肾利湿;痛风性关节炎;白介素 17;实验研究

The Effect of Bushen Lishi Method on the Expression of Serum IL-17 Of Rats with Acute Gouty Arthritis

Jiang Deyou, Li Wenhao, Xie Ying, Sui Fangyu, Sun Xutao, Han Jieru, Liu Tongtong, Chang Jiayi

(Heilongjiang University Of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Bushen Lishi Method on gouty arthritis on rat interleukin 17 (IL-17) expression level and to study the mechanism of Bushen Lishi Method in the prevention and treatment of acute gouty arthritis (GA). **Methods:** A total of 84 Wistar rats were randomly divided into 7 groups: blank group, model group, Chinese medicine control group, western medicine control group and Chinese medicine with low, medium and high dose groups, with 12 rats in each group. Using the model of uric acid sodium combined with potassium oxonate to induce acute gouty arthritis, and then use ELISA method to detect the content of serum IL-17 of rats. **Results:** Compared with the blank group, the levels of the serum IL-17 of model group rats were significantly increased, and there was a significant difference ($P < 0.01$); compared with the model group, western medicine control group, Chinese medicine control group, Chinese herbal compound in low, high concentration, the level of IL-17 of which were significantly reduced, and there was a significant difference ($P < 0.01$); western medicine control group compared with Chinese herbal compound in middle concentration, the IL-17 content of them had little difference ($P > 0.01$). **Conclusion:** The prescription of Bushen Lishi Method can reduce the expression of IL-17 in rats with acute gouty arthritis significantly, which has a certain effect on the prevention and treatment of gouty arthritis.

Key Words Bushen Lishi; Gouty arthritis; Interleukin 17; Experimental study

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.10.032

痛风是以尿酸盐(Monosodium Urate, MSU)沉积和血尿酸升高为主要病理改变的一种嘌呤代谢紊乱性疾病,其自然病程经历 4 个阶段,分别为无症状高尿酸血症、急性痛风性关节炎、间歇性痛风和慢性痛风石性痛风^[1]。其中,以急性期为主要表现,即关节受累出现红、肿、热、痛,同时伴有高尿酸血症和/或

尿酸盐沉积,轻者影响人们生活工作,重者导致肢体活动及功能障碍,累及肾脏引起慢性间质性肾炎和尿酸性泌尿系统结石^[2-3],甚至致残。西医治疗以秋水仙碱、苯溴马隆、丙磺舒和 NSAIDs 等药物为主,近年来亦研究出许多新型治疗靶向药物,如趋化因子 CXC1、TNF- α 、NALP3 炎性小体等^[4],究其不良反应

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81173170);黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划(编号:1254G055)

作者简介:姜德友(1960—),男,黑龙江省牡丹江市东宁县,博士生导师,博士后,研究方向:经方治疗疑难杂症与龙江医派研究, E-mail: jiangdeyou@126.com

通信作者:常佳怡(1983—),女,黑龙江省,讲师,博士,研究方向:从事经方治疗内伤疑难杂病的临床与基础研究与龙江医派研究, E-mail: 26054630@qq.com

较多,以及作用机制尚不明确,不能彻底解除患者痛苦,因此应用安全性高、不良反应小的中医中药治疗 GA 已经初显优势,且易于被患者接受。本实验中应用草酰钾及 MSU 联合作用以建造大鼠急性通性关节炎模型^[5],并对比秋水仙碱、中成药(痛风舒)以及补肾利水处方中药对急性痛风性关节炎大鼠血清 IL-17 的表达,进行研究和完善补肾利水法在 GA 中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 84 只,体质量 180 ~ 220 g,购自黑龙江中医药大学实验动物研究中心,合格证号 SCXK(黑)2008004,饲养温度(20 ± 2)℃,相对湿度 35% ~ 40%,动物实验室为高清洁级,良好通风,光照自然,符合《实验动物环境及设施》^[6]要求。

1.2 实验药物与试剂 秋水仙碱片(西双版纳药业有限责任公司,批号 140807)。痛风舒片(大黄、车前子、泽泻、川牛膝、防己)(湖北绿金子药业有限责任公司,批号:140301)。补肾利湿法处方^[4]由滋肾气丸加怀牛膝、土茯苓等组成,方中药材从黑龙江中医药大学附属第一医院中药房一次性选购。微晶 MSU 结晶(Sigma,批号 CAS1198-77-2)。草酰钾盐(Sigma 公司,批号 CAS2207-75-2)。大鼠白细胞介素 17 ELISA 检测试剂盒(批号 201501,南京建成生物工程研究所)。

1.3 溶液准备

1.3.1 秋水仙碱混悬液 将秋水仙碱片研成细末,配置成 0.028 mg/mL 的秋水仙碱混悬液,放于 4℃ 恒温冰箱保存以备使用。

1.3.2 痛风舒片溶液 将痛风舒片研成细末,配置成 0.029 g/mL 的痛风舒片溶液,放于 4℃ 恒温冰箱保存以备使用。

1.3.3 补肾利湿法处方中药溶液 由黑龙江中医药大学附属第一医院中药房统一规范化煎煮而成,以中药原液 3.74 mL 浓缩成 1 mL 的比例,于 60℃ 水浴中浓缩药液,密封隔水煮沸消毒,放于 4℃ 恒温冰箱保存以备使用。

1.3.4 MSU 溶液 向 1 g 微晶 MSU 结晶中加入灭菌注射用水,配成 10 mL MSU 溶液。

1.3.5 草酰钾溶液 将 3 g 草酰钾晶体溶解于 97 mL 生理盐水,加热搅拌,配置成 97 mL 草酰钾溶液。

1.4 仪器 恒温散风干燥箱(上海一恒,型号:DHG-9140A);天平 AL204(梅特勒公司);离心机(美国贝克曼,型号:X-22R);酶标仪(美国伯爵)。

1.5 方法

1.5.1 动物分组 适应性喂养 1 周的 84 只 Wistar 大鼠,并随机将其分为 7 组,即 BG、MG、WMCG、CMCG、CMLG、CMMG、CMHG,每组 12 只。

1.5.2 给药方法 以每 0.1 kg 大鼠体质量灌胃 1 mL 为标准,BG 和 MG 分别灌胃生理盐水;CMCG 和 WMCG 分别灌胃痛风舒片溶液和秋水仙碱溶液;CMLG、CMMG 分别给予补肾利湿法处方中药溶液(给药计量换算比例依次为 5 mL/kg、10 mL/kg 灌胃,1 次/d,连续 7 d;CMHG 给予补肾利湿法处方中药溶液,给药计量换算比例为 20 mL/kg,早晚各 1 次/d,连续 7 d,末次给药后造模。

1.5.3 造模方法 除 BG 外均采用以下方法造模^[5]:用 3% 草酰钾溶液进行腹腔内注射 0.03 mL/g,15 min 后用 6 号注射针在受试大鼠右侧踝关节背侧从 45 度方向插入至胫骨肌腱内侧,将 0.2 mL MSU 溶液注入到关节腔内。而 BG 只采用 6 号注射针在受试大鼠右侧踝关节背侧从 45 度方向插入至胫骨肌腱内侧,将 0.2 mL 注射用水注入到关节腔内。

1.5.4 IL-17 含量测定 各组大鼠造模 4 h 后,眶下取血后处死,将血样静止 30 min 后以 3 800 r/min 速度离心 15 min,取上清液,按 ELISA 法试剂盒说明书进行检测各组实验动物血清 IL-17 含量。

1.6 统计学分析 运用 SPSS 17.0 进行统计分析,根据 K-S/S-W 描述统计, $P > 0.05$,满足正态分布,各组间方差相齐,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 IL-17 含量测定 与 BG 比较,MG 差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。与 MG 相比,除 BG 以外,其余各组大鼠血清 IL-17 水平明显降低,尤其以 CMCG 和 WMCG 为显著,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),提示补肾利水法处方中药有效,结果见表 1。

表 1 补肾利湿法中药对各组大鼠血清中 IL-17 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	相应给药浓度	例数	IL-17 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白组(BG)	-	12	7.19 ± 0.86
模型组(MG)	-	12	15.12 ± 1.10*
中药对照组(CMCG)	0.029 g · mL ⁻¹	12	11.20 ± 1.25 Δ □
西药对照组(WMCG)	0.028 mg · mL ⁻¹	12	8.42 ± 1.09 Δ ▲
中药复方低浓度组(CMLG)	5 mL · kg ⁻¹	12	10.07 ± 1.07 Δ □
中药复方中浓度组(CMMG)	10 mL · kg ⁻¹	12	8.44 ± 1.12 Δ ▲
中药复方高浓度组(CMHG)	20 mL · kg ⁻¹	12	10.02 ± 1.09 Δ □

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

2.2 HE 染色病理组织学结果 电镜下观察各组大鼠关节腔滑膜细胞,除 BG 滑膜细胞排列整齐、形态规则以外,其余各组大鼠滑膜组织均有不同程度坏死,周围见不同程度的炎性浸润。MG 中各大鼠的右膝关节滑膜组织内肉眼见不同含量的尿酸盐结晶,电镜下观察其炎性反应程度不均,有滑膜间质水肿表现,并见大量中性粒细胞浸润,结合本次实验中血尿酸含量提示造模成功。在治疗组中,WMCG 仍有轻度退变坏死、炎性水肿,但有血管增生;CMCG 仍见水肿,炎性反应细胞渗出减少;CMLG 可见大量中性粒细胞浸润;CMHG 亦有退变、水肿的表现;CMMG 的炎性表现轻微,无渗出,仅见少量炎性反应细胞浸润,伴有轻度水肿,见图 1。

以及肿瘤坏死因子 $\alpha^{[13-14]}$;另一方面,相关实验研究亦证明 IL-17 参与部分趋化因子和中性粒细胞移动因子的产生以促进单核细胞、中性粒细胞^[15-16]等免疫细胞的迅速聚集,如重组人单核细胞趋化因子 1、白介素 8、基质金属蛋白酶等。因此可由本实验的研究结果推论,血清白介素 17 的水平与急性痛风性关节炎的病情轻重有关。虽然未有明确实验研究报道 IL-17 与痛风的直接关系,但大量研究证实 IL-17 通过诱发其他细胞因子表达,逐级放大炎症反应,最终导致滑膜增生,促进了痛风性关节炎的发病。本实验中的模型组在造模后,其血清 IL-17 表达趋势显著上升,而中药复方中浓度组的 IL-17 水平则明显降低,因此可推论本方对血清 IL-17 水平有影响,进一步证明应用 IL-17 来研究补肾利湿法处方中药对大鼠急性痛风性关节炎的影响很有意义。

中医学博大精深,纵观历代春脚青囊,对痛风的认识不断发展完善,有学者研究认为,痛风一词最早见于《名医别录》中,并于明清时期发展成熟^[17],在此过程中其辨证论治不胜枚举,让越来越多的人认为运用中医药治疗痛风独具特色,其疗效显著,处方安全,整体调节、作用双向、不良反应少^[18],治病求本,不易复发等特点深入人心。近代医家在前人的基础上进一步总结,其认为痛风是由于先天禀赋不足,即肾精不足,间接损及后天脾胃,先天不应后天等原因,导致身体机能减弱,运化不及,湿浊不分,代谢紊乱,同时感受湿热或风寒邪气,亦或受情志刺激、饮食劳倦等影响,引起湿浊流串、产生筋骨关节疼痛、麻木甚则红肿灼热等症^[19]。急性痛风性关节炎以肾虚禀赋不足为本,以感受湿热或风寒邪气为标,属于痛风急性发作的一种情况,治疗应当采用补肾元利水湿之补肾利水法,标本兼顾,内外同调。补肾利水法处方是在滋生肾气丸基础上加减变化而成,由滋生肾气丸处方配伍土茯苓、萆薢等中药组成。通过滋生肾气丸补肾填精,利水化浊,配伍土茯苓,取其清热解毒、除湿之功,有人在中药治疗痛风的研究中表明,在其纳入的 57 篇文献中报告使用的中药共计 121 种,其中土茯苓的用药频次居第二位,占 29.75%^[20],可见其治疗痛风中的应用之多。佐萆薢利水渗湿,以祛除痛风患者体内的湿浊,诸药合用,共达补肾利湿,抗炎镇痛的作用,临床研究亦证明本方在控制痛风性关节炎的红、肿、热、痛等症状方面具有明显疗效^[21],因此通过本实验可推测运用 ELISA 法检测急性痛风性关节炎大鼠血清白介素

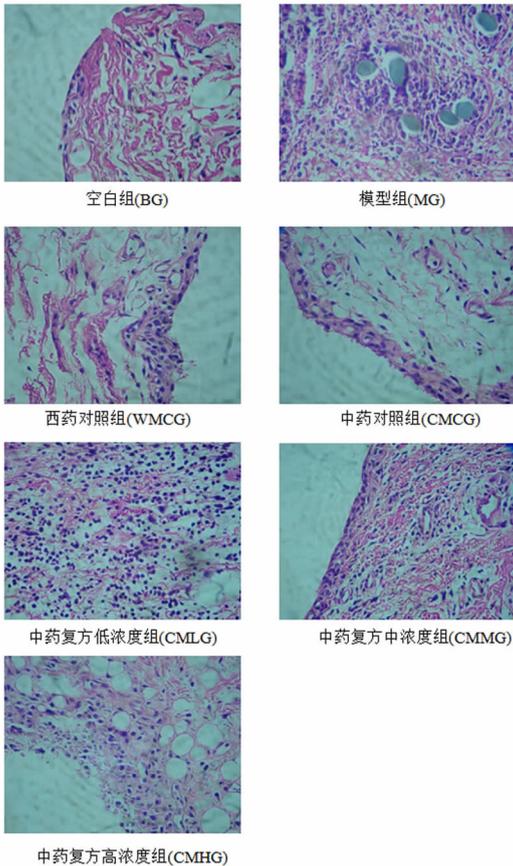


图 1 HE 染色病理组织学结果

3 讨论

在痛风的炎症反应中,除炎症反应细胞因子发挥重要作用外,促炎性反应细胞因子亦必不可少。细胞白介素 17 就是 TH17 细胞所分泌的可溶性的前/促炎性反应细胞因子^[7-8],亦是参与由 T 细胞介导的滑膜炎性反应的最重要的介质^[9-11]。其在炎症反应中起到促炎性反应作用,具体表现为两方面,一方面,实验研究证明 IL-17 参与多种细胞因子的生成,以放大局部炎症反应,如白介素 6、白介素 37^[12]

17 的含量,来判断补肾利湿处方中药对急性痛风性关节炎的治疗作用很有意义。

参考文献

- [1] Franchi, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The Inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 241-247.
- [2] 汪少琼. 痛风合剂对动物高尿酸血症及急性痛风性关节炎的实验研究[DB/OL]. 中国优秀硕士学位论文全文数据库, 2011.
- [3] 姜德友, 刘爽, 韩洁茹, 等. 补肾利湿法对急性痛风性关节炎大鼠 VEGF 表达水平的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(24): 236-237.
- [4] Robert Terkeltaub. Novel therapies for treatment of gout and hyperuricemia[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, 11(4): 236.
- [5] 韩洁茹, 谢颖, 高恩宇, 等. 补肾利湿法防治痛风性关节炎的实验研究[J]. *四川中医*, 2011, 29(4): 26.
- [6] GB14925-2010. 实验动物环境及设施[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [7] Cua DJ, Tatro M. Innate IL-17-producing cells; the sentinels of the immune system[J]. *Nat. Rev. Immunol*, 2010, 10(7): 479-489.
- [8] Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, et al. Mast cells and neutro-phil release IL-17 through extracellular trap for mation in psoriasis. [J]. *Immunol*, 2011, 187(1): 490-500.
- [9] 韩学峰. IL-17 和 YKL-40 在慢性鼻-鼻窦炎患者血浆中表达及其临床意义[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [10] Lubberts E, van den Berg WB. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2003(520): 194-202.
- [11] Sharma S, Kulk N, Nold MF, et al. The IL-1 family member 7b

translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines[J]. *Immunol*, 2008, 180(8): 5477-5482.

- [12] 王月俭, 常晓天. 脂联素在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. *中国医药*, 2013, 8(2): 280-282.
- [13] Moran EM, Mullan R, McCormick J, et al. Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(4): R113.
- [14] Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy[J]. *Periodontol*, 2007, 78(6): 1083-1093.
- [15] Laan M, Palmberg L, Larsson K, et al. Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways [J]. *Eur Respir*, 2002, 19(3): 534-537.
- [16] 王振刚. 近 10 年类风湿关节炎治疗及预后的变化趋势[J]. *中国医刊*, 2013, 48(7): 10.
- [17] 陆妍, 孟凤仙, 刘慧. 中医痛风相关病名的演变与发展[J]. *世界中医药*, 2015, 10(4): 609.
- [18] 杨保林, 丁岗. 芪桂痛风舒颗粒治疗痛风性关节炎 16 例疗效观察[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(2): 276.
- [19] 赵樑. 中药治疗痛风性关节炎的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2002.
- [20] 李昕雪. 中药治疗痛风性关节炎的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [21] 姜德友, 安伟涛, 解颖, 等. 补肾利湿法治疗痛风性关节炎疗效观察[J]. *新中医*, 2012, 44(10): 35-36.

(2015-04-14 收稿 责任编辑: 张文婷)

(上接第 1573 页)

- [5] Li RP, Wang ZZ, Sun MX, et al. Polydatin protects learning and memory impairments in a rat model of vascular dementia[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(8-9): 677-81.
- [6] 蒿心敬, 胡常林, 李正国, 等. 血管性痴呆大鼠模型海马乙酰胆碱和血小板激活因子含量变化的动态观察[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2002, 19(4): 220-221.
- [7] 魏少阳, 黄颖, 赵岗, 等. 益脑活血胶囊对血管性痴呆大鼠学习记忆及脑组织 NO、Ach、SOD、MDA 含量的影响[J]. *西北药学杂志*, 2004, 19(3): 111-113.
- [8] 包宁, 何愉胜. 盐酸多奈哌齐联合银杏叶片治疗血管性痴呆的临床疗效[J]. *中国医药*, 2012, 7(8): 965-969.
- [9] LU Y W, LI ZH X, RONG B B. Neuropeptides and vascular dementia [J]. *Medical Recapitulate*, 2006, 112(6): 348-450.

- [10] 王伯平, 于涛, 冯增文, 等. 反复脑缺血后痴呆大鼠皮质钙分布及生长抑素含量变化[J]. *卒中与神经疾病*, 2000, 7(2): 65-67.
- [11] 张吉仲, 彭成, 谢晓芳. 益智五海胶囊对大鼠血管性痴呆模型中 ET、CGRP、TXB₂、6-Keto-PGF_{1α} 的影响[J]. *华西药理学杂志*, 2010, 25(2): 242-244.
- [12] 王霞, 马建红, 刘素梅, 等. 通络中药对血管性痴呆大鼠血浆 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α} 含量的影响[J]. *中国现代药理应用*, 2009, 3(18): 85-86.
- [13] 田燕, 谭兰, 郁金泰, 等. 血浆血栓素 B₂ 水平与血管性痴呆的相关性研究[J]. *青岛大学医学院学报*, 2010, 46(1): 65-66.
- [14] 于文涛, 吴中秋, 张一听, 等. 补肾活血系列方对血管性痴呆小鼠血浆 TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 含量的影响[J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(6): 91-92.

(2015-05-30 收稿 责任编辑: 张文婷)