

白头翁皂苷 B₄栓剂改善大鼠痛风药效学研究

梁晓伟^{1,2}, 何佳^{1,2}, 高翔^{1,2}, 李佶朗^{1,2}, 徐志鹏^{1,2}, 倪兴华^{1,2}, 苑仁祎坤^{1,2}, 高红伟^{1,2*}, 杨世林^{1,2}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530020

2. 广西优势中成药与民族药开发工程技术中心, 广西 南宁 530020

摘要: 目的 研究白头翁皂苷 B₄栓剂抗痛风作用。方法 应用混合脂肪酸甘油酯制备白头翁皂苷 B₄栓剂; 使用尿酸钠诱导大鼠急性痛风性关节炎模型, 观察白头翁皂苷 B₄栓剂 (9、18、36 mg·kg⁻¹, 直肠给药) 对大鼠踝关节肿胀度的影响, 试剂盒法检测血清炎症因子单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, HE 染色后观察踝关节组织病理学变化; 使用氧嗪酸钾诱导大鼠急性高尿酸血症, 给予别嘌醇 (阳性药, 22 mg·kg⁻¹, ip 给药) 和白头翁皂苷 B₄栓剂低、中、高剂量 (9、18、36 mg·kg⁻¹), 试剂盒法检测大鼠血清中尿酸、黄嘌呤氧化酶 (XOD)、尿素氮 (BUN) 水平, 检测肝脏组织中尿酸、BUN、肌酐 (CRE)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT) 水平, HE 染色后检测肾脏组织病理学变化; 使用角叉菜胶诱导大鼠足肿胀建立炎症动物模型, 足容积测量仪观察白头翁皂苷 B₄栓剂对肿胀率的影响; 使用甲醛诱导小鼠致痛模型, 观察白头翁皂苷 B₄栓剂 (13、26、52 mg·kg⁻¹) 对舔足次数的影响。结果 与模型组比较, 白头翁皂苷 B₄栓剂能够显著抑制尿酸钠诱导急性痛风性关节炎大鼠的关节肿胀 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 降低血清炎症因子 MCP-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); 降低氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症大鼠血清尿酸、XOD、BUN 水平, 降低肝脏中尿酸、BUN、CRE 和 MDA 水平, 升高肝脏中 GSH-Px、CAT 水平 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 改善肾脏组织病理改变; 显著抑制角叉菜胶诱导大鼠足肿胀 ($P < 0.05$); 显著减少甲醛诱导小鼠致痛模型的舔足次数 ($P < 0.01$)。结论 白头翁皂苷 B₄栓剂具有抗痛风性关节炎、抗急性高尿酸血症及抗炎镇痛作用。

关键词: 白头翁皂苷 B₄; 高尿酸血症; 痛风; 镇痛; 抗炎

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 07-1466-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.006

Pharmacodynamic study of *Pulsatilla* saponin B₄ suppository in treatment of gout in rats

LIANG Xiaowei^{1,2}, HE Jia^{1,2}, GAO Xiang^{1,2}, LI Jilang^{1,2}, XU Zhipeng^{1,2}, NI Xinghua^{1,2}, YUAN Renyikun^{1,2}, GAO Hongwei^{1,2}, YANG Shilin^{1,2}

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Guangxi Engineering Technology Research Center for Choice Chinese Patent Drug and Ethnic Drug Development, Nanning 530020, China

Abstract: Objective To study the anti-gout effect of *Pulsatilla* saponin B₄ suppository. **Methods** *Pulsatilla* saponin B₄ suppository was prepared using a mixture of fatty acid glycerides; rats were induced with sodium urate to develop acute gouty arthritis, and the effects of the suppository (9, 18, 36 mg·kg⁻¹, rectal administration) on the degree of ankle edema were observed, and the levels of inflammatory cytokines monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum were detected using a kit, and the pathological changes in the ankle tissue were observed by HE staining; rats were induced with oxalic acid potassium to develop acute hyperuricemia, and allopurinol (a positive control, 22 mg·kg⁻¹, ip administration) and the low, medium, and high doses of *Pulsatilla* saponin B₄ suppository (9, 18, 36 mg·kg⁻¹) were given, and the levels of uric acid, xanthine oxidase (XOD), and blood urea nitrogen (BUN) in the serum were detected using a kit, and the levels of uric acid, BUN, creatinine (CRE), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT) in the liver tissue were detected, and the pathological changes in the kidney tissue were observed by HE staining; rats were induced with agarose to

收稿日期: 2024-02-11

基金项目: 广西科技基地和人才专项(2022AC18022)

第一作者: 梁晓伟, 男, 中药学硕士。E-mail: 15278378436@163.com

*通信作者: 高红伟, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药抗炎活性。E-mail: gaohongwei@126.com

establish an inflammatory animal model, and the suppository was observed to affect the degree of edema using a foot volume measurement instrument. Mice were induced with formaldehyde to establish a pain model, and the effect of the suppository (13, 26, and 52 mg·kg⁻¹) on the number of licking feet was observed. **Results** Compared with the model group, *Pulsatilla* saponin B₄ ointment could significantly inhibit the joint swelling induced by sodium urate in acute gouty arthritis rats ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), reduce the levels of inflammatory factors MCP-1, TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), reduce the levels of serum uric acid, XOD, and BUN in hyperuricemia rats, and reduce the levels of uric acid, BUN, CRE, and MDA in liver, and increased the levels of GSH-Px and CAT in liver ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), improve the pathological changes of renal tissue; significantly inhibit the paw swelling induced by carrageenan ($P < 0.05$), significantly reduce the licking foot frequency induced by formaldehyde in mice ($P < 0.01$). **Conclusion** *Pulsatilla* saponin B₄ suppository had anti-gouty arthritis, acute hyperuricemia, anti-inflammatory and analgesic effects.

Key words: *Pulsatilla* saponin B₄; hyperuricemia; gout; analgesic; anti-inflammatory

痛风是由体内嘌呤代谢紊乱及(或)尿酸排泄减少导致的尿酸钠或尿酸钠结晶沉积在关节、组织、器官的一种临床综合征,其临床主要表现为高尿酸血症和急性痛风性关节炎^[1-3]。痛风给患者带来痛苦的同时,还可能引发一些并发症,如增加骨质疏松症、前列腺癌、抑郁的风险^[4-6],以及引发肾脏疾病^[7]等。

痛风性关节炎的发生是由于尿酸钠晶体沉积在关节和关节周围组织中,进而引起炎症反应^[8],临床上病理表现为红肿、热、痛等炎症反应^[9]。高尿酸血症是尿酸生成增加或者排泄减少从而导致体内尿酸高于正常值的代谢性疾病^[10],通常认为高尿酸血症是痛风最重要的生化基础,研究表明5%~12%的高尿酸血症最终可发展为痛风^[11]。目前临床常使用秋水仙碱、非甾体类抗炎药(NSAIDs)、肾上腺皮质激素、镇痛药等治疗痛风,但是大多数药物具有明显不良反应^[12]。因此,研究高效低毒的抗痛风药物依然是药学研究的热点。

白头翁是毛茛科白头翁属植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根,白头翁皂苷 B₄ 是其中的有效皂苷,含量丰富,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、肾损伤保护、镇痛、免疫调节等活性^[13-14]。本研究使用尿酸钠(MSU)诱导大鼠痛风性关节炎模型、使用氧嗪酸钾诱导大鼠急性高尿酸血症模型、使用角叉菜胶诱导大鼠足肿胀模型、使用甲醛诱导小鼠致痛模型,探讨白头翁皂苷 B₄ 栓剂治疗痛风的效果,为开发白头翁皂苷 B₄ 栓剂治疗痛风提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF级SD雄性大鼠,6~8周龄;SPF级Wistar大鼠,6~8周龄;SPF级SD大鼠,4~5周龄;SPF级ICR雄性小鼠108只,3周龄,由广东维通利华实验

动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(粤)2022-0063。本研究动物实验方案通过广西中医药大学伦理审查委员会审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定,批准编号DW20230830-150。

1.2 药物及试剂

白头翁皂苷 B₄ 原料药(质量分数≥99%,广西林洋药业有限公司,批号YL20211101);尿酸钠盐(批号U886060)、氧嗪酸钾(批号P831461),上海麦克林生化科技股份有限公司;尿酸(酶比色法)、肌酐(CRE)、尿素氮(BUN)、丙二醛(MDA)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)可见光测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;大鼠人单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA试剂盒,青岛仪信科学仪器有限公司,批号分别为F2975-A、F3066-A、F2923-A和F3056-A;戊巴比妥钠,德国Merck公司,批号120210;别嘌醇片,每片0.1 g,批号5161002,广州白云山医药集团股份有限公司;角叉菜胶,每瓶100 g,批号C14181712,上海麦克林生化科技有限公司;吲哚美辛栓,每粒50 mg,批号210801,马应龙药业集团股份有限公司。

1.3 仪器

HH-8数显恒温水浴锅,常州易晨仪器制造有限公司;2X15-3恒温磁力搅拌器,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;BC-5000vet Mindray血常规检测仪,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;5425R低温高速离心机,Eppendorf公司;SYNERGYH1酶联免疫检测仪,美国BioTek公司;BX-60病理图像分析仪,日本Olympus;ME204E电子天平(感量1/10 000),梅特勒-托利多仪器上海有限公司;5425R低温高速离心机,Eppendorf公司;电子天平:GP2100、TE4100-L、BS224S、BP3100S、BL3100,

BS124S, TE601-L, BSA2202S, BSA2201-CW, BS400S-WE1, 赛多利斯公司; PV-200 足容积测量仪, 成都泰盟科技有限公司。

2 方法

2.1 白头翁皂苷 B₄ 栓剂制备

栓剂制备方法参照张琛伟等^[15]的文献报道, 称取 0.9 g 白头翁皂苷 B₄, 研磨至粉末, 过 100 目筛, 备用, 将模具提前放进冰箱冷藏。称取 99.1 g 混合脂肪酸甘油酯[36 型号-38 型号(1:1)]于烧杯中, 80 °C 水浴加热, 充分溶解。混合脂肪酸甘油酯完全溶解后, 将研磨过筛后的白头翁皂苷 B₄ 粉末加入其中, 用玻璃棒搅拌使其混合均匀, 并将烧杯转移至磁力搅拌器上, 磁力搅拌器设置为温度 60 °C、转速 100 r·min⁻¹。取出模具, 将混合液倾入模具内至稍溢出模口, 放入冰箱冷藏 15 min, 待完全凝固后, 用刀切去溢出部分, 开启模型, 将栓剂推出, 即可得每粒 9 mg 白头翁皂苷 B₄ 栓剂。每粒 0 (空白栓剂)、13、18、26、36、56 mg 栓剂制备方法相同, 白头翁皂苷 B₄ 分别称取 0、1.3、1.8、2.6、3.6、5.6 g, 混合脂肪酸甘油酯[36 型号-38 型号(1:1)]分别称取 100.0、98.7、98.2、97.4、96.4、94.4 g。

2.2 白头翁皂苷 B₄ 栓剂对尿酸钠诱导大鼠急性痛风性关节炎的治疗作用

SD 大鼠, 6~8 周龄, 按体质量随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、秋水仙碱(阳性药, 0.3 mg·kg⁻¹, ig 给药)组和白头翁皂苷 B₄ 栓剂低、中、高剂量(9、18、36 mg·kg⁻¹, 直肠给药)组, 每组 7 只。适应性喂养后造模^[16], 模型组及给药组大鼠右侧踝关节注射 200 μL 尿酸钠悬液, 造模后 0、24、48、72 h 分别给药, 对照组和模型组给予空白栓剂。尿酸钠刺激 12、24 h 后, 测量大鼠趾围, 计算大鼠足跖的肿胀度; 末次给药后 3 h 解剖动物, 腹主动脉取血, 试剂盒法检测血清炎症因子 MCP-1、IL-1β、TNF-α、IL-6 水平; 取大鼠踝关节进行 HE 染色, 观察组织病理学变化。

2.3 白头翁皂苷 B₄ 栓剂对氧嗪酸钾诱导大鼠急性高尿酸血症的治疗作用

Wistar 大鼠, 6~8 周龄, 按体质量随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、别嘌醇(阳性药, 22 mg·kg⁻¹, ip 给药)组和白头翁皂苷 B₄ 栓剂低、中、高剂量(9、18、36 mg·kg⁻¹, 直肠给药)组, 每组 7 只。适应性喂养后进行造模^[17], 模型组及给药组大鼠分别于 0、24、48、72 h ip 氧嗪酸钾 300 mg·kg⁻¹, 构建高尿酸血症模型。每次 ip 氧嗪酸钾后立即给药, 对照组和模型组给予空白栓剂。末次给药后 3 h 解剖动物, 腹

主动脉取血, 试剂盒法检测血清尿酸、XOD、BUN 水平和肝脏尿酸、BUN、CRE、MDA、GSH-Px、CAT 水平。取大鼠肾脏, HE 染色后观察肾脏组织病理学变化。

2.4 白头翁皂苷 B₄ 栓剂对角叉菜胶诱导大鼠足肿胀的治疗作用

SD 大鼠, 4~5 周龄, 按体质量随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、吲哚美辛栓(阳性药, 18 mg·kg⁻¹)组和白头翁皂苷 B₄ 栓剂低、中、高剂量(9、18、36 mg·kg⁻¹)组, 每组 10 只。适应性喂养后, 均直肠给药, 对照组和模型组给予空白栓剂, 每天 2 次, 连续给药 3 d, 末次给药后, 除对照组外, 其余各组动物右后足跖掌腱筋膜下注射 1% 角叉菜胶混悬液^[18], 每只 0.1 mL; 对照组动物注射等体积的 0.9% 氯化钠溶液。分别于注射后 1、2、3、4、5、6 h, 足容积测量仪测量各组动物右后足的足跖体积。

2.5 白头翁皂苷 B₄ 栓剂对甲醛诱导的小鼠致痛模型的影响

SPF 级 ICR 小鼠, 3 周龄, 随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、吲哚美辛栓(阳性药, 26 mg·kg⁻¹)组和白头翁皂苷 B₄ 栓剂低、中、高剂量(13、26、52 mg·kg⁻¹)组, 每组 14 只, 适应性喂养后, 均直肠给药, 对照组和模型组给予空白栓剂, 每天 2 次, 连续给药 3 d。末次给药后 1 h, 除对照组外, 其他各组小鼠右后足足底缓慢 sc 20 μL 甲醛溶液, 构建小鼠致痛模型^[19], 对照组小鼠右后足足底 sc 20 μL 0.9% 氯化钠溶液。造模后小鼠即刻置于透明的大烧杯中观察, 以舔右后足次数为小鼠疼痛反应指标, 记录小鼠 0~5 min 和 15~55 min 累计舔足次数, 分别代表第 I 和第 II 相疼痛程度。

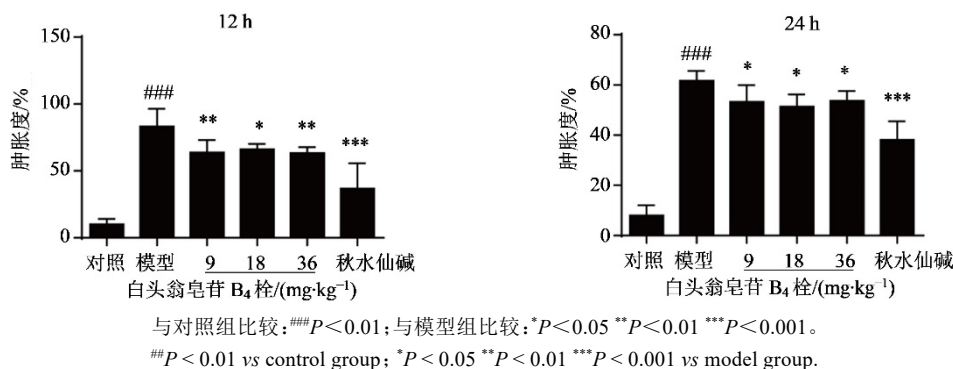
2.6 统计学方法

采用 Graph Pad 7 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量数据符合正态分布和方差齐性, 则采用单因素方差分析, $P > 0.05$, 则统计结束; $P < 0.05$, 则进行组间两两比较 LSD Test 分析。

3 结果

3.1 白头翁皂苷 B₄ 栓剂对尿酸钠诱导大鼠急性痛风性关节炎的治疗作用研究

3.1.1 白头翁皂苷 B₄ 栓剂对大鼠踝关节肿胀度的影响 尿酸钠刺激 12、24 h 后, 与对照组比较, 模型组大鼠踝关节肿胀度明显增加($P < 0.001$); 与模型组比较, 白头翁皂苷 B₄ 栓剂各剂量组和阳性药秋水仙碱组大鼠踝关节肿胀度水平均显著降低($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。见图 1。

图1 白头翁皂苷B₄栓剂对急性痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)Fig. 1 Effect of *Pulsatilla saponin B₄* suppository on degree of ankle swelling in acute gouty arthritis rats($\bar{x} \pm s, n=7$)

3.1.2 白头翁皂苷B₄栓剂对大鼠血清炎症因子的影响 与对照组比较,模型组大鼠血清中MCP-1、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平均明显增加($P < 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷B₄栓剂中、高剂量组大鼠血清中MCP-1的水平显著降低($P < 0.05$);各剂量组和阳性药秋水仙碱组大鼠血清中TNF- α 、IL-6水平显著降低($P < 0.001$);白头翁皂苷B₄栓剂各剂量组IL-1 β 水平显著降低($P < 0.01, 0.001$)。见图2。

3.1.3 白头翁皂苷B₄栓剂对大鼠踝关节组织病理改变的影响 HE染色病理切片显示,对照组小鼠踝关节滑膜组织结构清楚完备,细胞排列较为疏松,无明显炎细胞浸润情况,几乎未见炎症发生;模型组显示出明显的滑膜炎,大量的滑膜细胞增加并伴有炎细胞浸润以及大量细小血管新生;白头翁皂苷B₄栓剂各剂量组表现出无明显的滑膜细胞改变及炎细胞浸润情况,且细小血管及成纤维细胞的

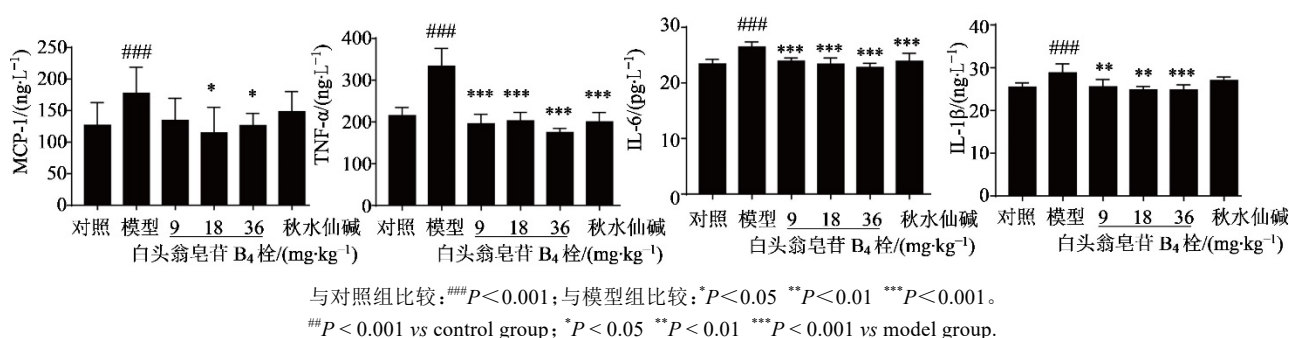
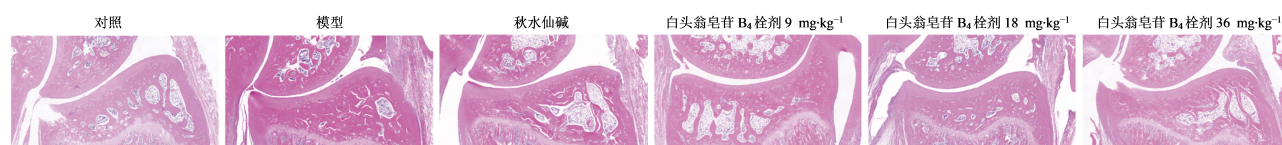
数量较模型组有所减少。见图3。

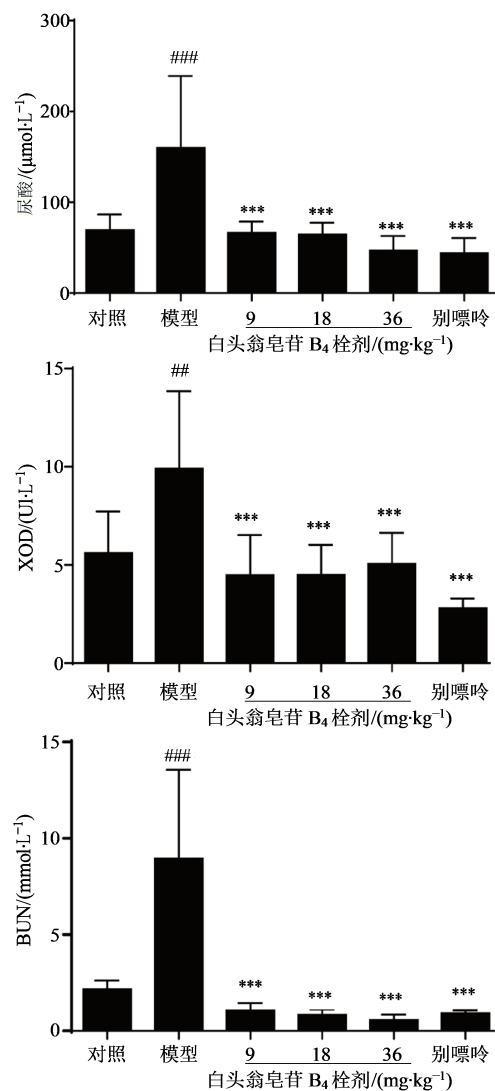
3.2 白头翁皂苷B₄栓剂对氧嗪酸钾诱导的大鼠急性高尿酸血症的作用

3.2.1 白头翁皂苷B₄栓剂对大鼠血清尿酸、XOD、BUN水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠血清尿酸、XOD、BUN水平均显著升高($P < 0.01, 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷B₄栓剂各剂量组和阳性药别嘌呤组大鼠血清尿酸、XOD、BUN水平显著降低($P < 0.001$)。见图4。

3.2.2 白头翁皂苷B₄栓剂对大鼠肝脏尿酸、BUN、CRE水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠肝脏尿酸、BUN、CRE水平均显著升高($P < 0.01, 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷B₄栓剂中、高剂量组大鼠肝脏尿酸、BUN、CRE水平显著降低($P < 0.01, 0.001$)。见图5。

3.2.3 白头翁皂苷B₄栓剂对大鼠肝脏MDA、GSH-

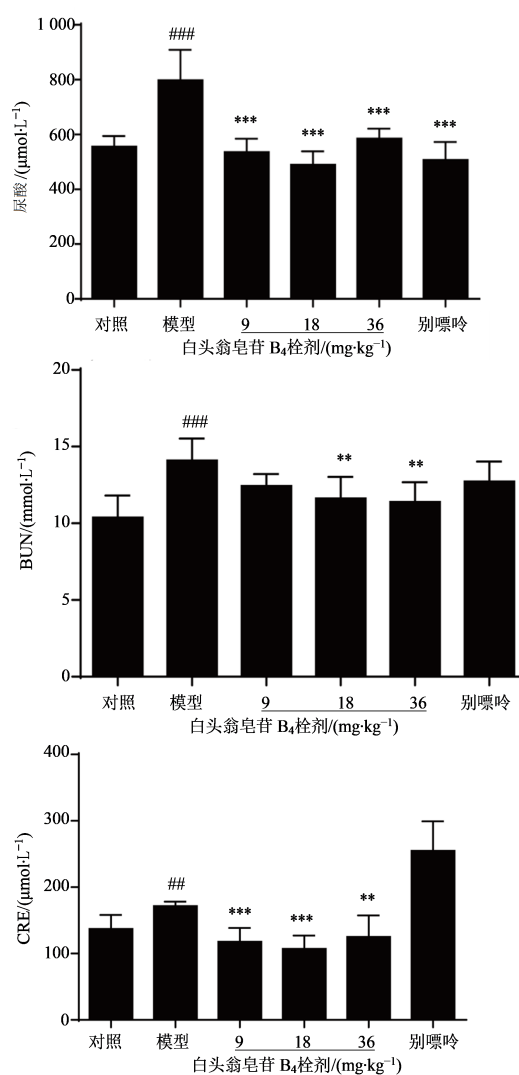
图2 白头翁皂苷B₄栓剂对急性痛风性关节炎大鼠血清炎症因子水平的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)Fig. 2 Effect of *Pulsatilla saponin B₄* suppository on serum inflammatory factor levels in acute gouty arthritis rats($\bar{x} \pm s, n=7$)图3 白头翁皂苷B₄栓剂对大鼠踝关节的影响($\times 100$)Fig. 3 Effect of *Pulsatilla saponin B₄* supposition on ankle joint of rats($\times 100$)



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P < 0.001$ 。
^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{***} $P < 0.001$ vs model group.
图4 白头翁皂苷 B_4 栓剂对急性高尿酸血症大鼠血清尿酸、XOD、BUN水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 4 Effect of *Pulsatilla saponin B₄* suppository on serum UA, XOD, and BUN levels in acute hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Px、CAT水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠肝脏MDA水平显著升高($P < 0.05$),GSH-Px、CAT水平均显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 栓剂中、剂量组大鼠肝脏MDA水平显著降低($P < 0.05, 0.001$),各给药组GSH-Px、CAT水平均显著升高($P < 0.05, 0.01$),见图6。

3.2.4 白头翁皂苷 B_4 栓剂对大鼠肾脏组织病理学改变的影响 HE结果显示,对照组肾脏组织未见明显病理病变,肾小球大小、形态正常,边界清晰,肾小球囊腔明显,肾小管形态正常;模型对照组肾脏组织中肾小球囊腔边界模糊,肾小球出现分叶状并萎



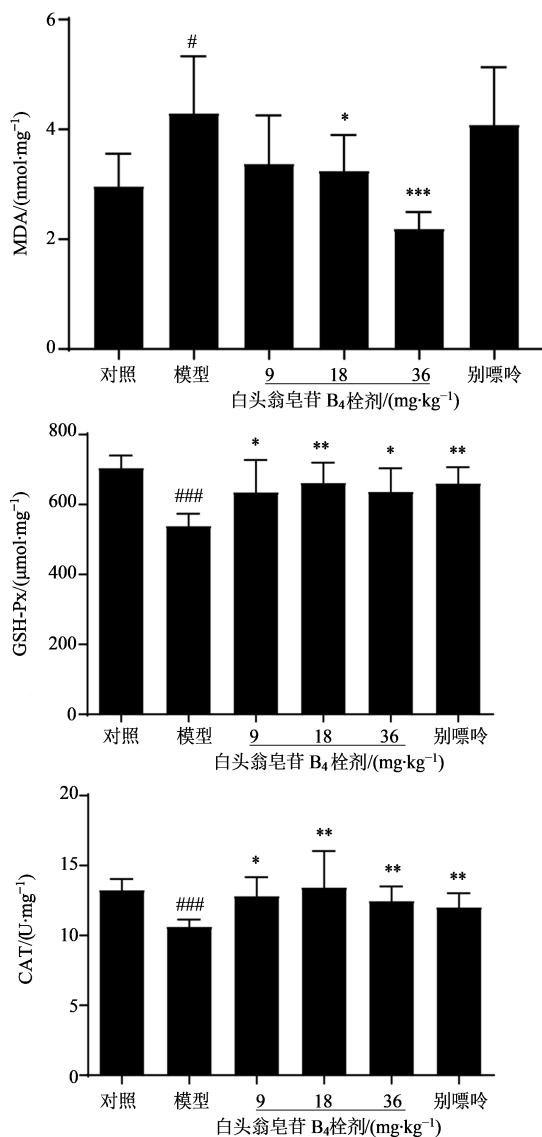
与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。
^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图5 白头翁皂苷 B_4 栓剂对急性高尿酸血症大鼠肝脏尿酸、BUN、CRE水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 5 Effect of *Pulsatilla saponin B₄* suppository on UA, BUN, and CRE levels in liver of acute hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

缩,肾小管排列紊乱,可见萎缩及空泡变性,管腔扩张,肾小球和肾间质伴有大量炎性细胞浸润;别嘌醇组及白头翁皂苷 B_4 栓剂各剂量组肾脏组织损伤得到明显改善,肾小球萎缩减少,肾小管排列恢复整齐,萎缩及空泡变性降,管腔扩张程度降低,炎性细胞浸润明显减轻。结果见图7。

3.3 白头翁皂苷 B_4 栓剂对角叉菜胶致足跖肿胀模型大鼠的作用

与对照组相比,模型组大鼠造模后1~6 h足跖肿胀率明显增加($P < 0.05$)。与模型组相比,白头翁



与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图6 白头翁皂苷B₄栓剂对急性高尿酸血症大鼠肝脏MDA、GSH-Px、CAT水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 6 Effect of *Pulsatilla* saponin B₄ suppository on MDA, GSH-Px, and CAT levels in liver of acute hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

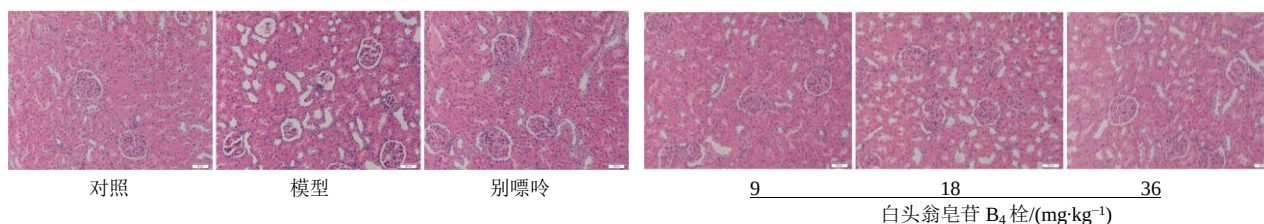


图7 白头翁皂苷B₄栓剂对急性高尿酸血症大鼠肾脏组织病理学改变的影响($\times 200$)

Fig. 7 Effect of *Pulsatilla* saponin B₄ suppository on histopathological changes in kidney of acute hyperuricemia rats ($\times 200$)

皂苷B₄栓剂中剂量组和阳性药吡罗美辛组给药3~6 h后大鼠足跖肿胀率明显减小($P < 0.05$),白头翁皂苷B₄栓剂高剂量组给药1~6 h后大鼠足跖肿胀率明显减小($P < 0.05$)。结果见表1。

3.4 白头翁皂苷B₄栓剂对甲醛致痛模型的作用

如表2所示,与对照组相比,模型组足底注射甲醛溶液后0~5 min和15~55 min小鼠舔足次数均显著增加($P < 0.01$)。与模型组相比,白头翁皂苷B₄栓剂低、中、高剂量组及阳性药吡罗美辛组足底注射甲醛溶液后15~55 min小鼠舔足次数均显著降低($P < 0.01$)。结果显示,白头翁皂苷B₄栓剂对甲醛致炎性疼痛的抑制作用具有剂量相关性。

4 讨论

痛风是以复发性性关节炎、高尿酸血症和关节及皮下尿酸盐沉积为主要特征的代谢紊乱性疾病,具有多并发症、病程长、发作时疼痛剧烈等特点^[16, 20]。尿酸钠可以诱导大鼠急性痛风性关节炎,在急性痛风性关节炎期间,关节间隙中的尿酸钠晶体沉积会引发炎症反应循环,并招募大量浸润的中性粒细胞、滑膜细胞和组织巨噬细胞^[21]。相关研究发现,细胞焦亡作为炎症相关性细胞死亡方式,参与急性痛风性关节炎(AGA)疾病的发生发展^[22]。痛风性关节炎患者体内的尿酸钠析出后,可作为内源性危险信号被机体固有免疫识别,激活NLRP3炎症小体^[23],通过Caspase-1经典途径介导细胞焦亡^[24],发生细胞膜破裂、细胞渗透性肿胀,胞内大量促炎因子,如IL-18和IL-1 β 等,被活化并释放到胞外,从而激活一系列呈级联放大的炎症反应^[25]。尿酸升高是高尿酸血症的临床指征,而抑制XOD活性可有效降低血尿酸值;血清中BUN是肾组织健康的一个指标,BUN增加会引起肾损伤;血清中CRE水平是评价肾功能的指标,选用BUN、CRE指标可评价高尿酸血症引起肾功能的变化情况^[26]。

本研究发现,白头翁皂苷B₄栓剂能够显著抑制急性痛风性关节炎大鼠的关节肿胀,降低血清中炎

表1 白头翁皂苷B₄栓剂对角叉菜胶致足跖肿胀模型大鼠足跖肿胀率的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 1 Effect of *Pulsatilla* saponin B₄ suppository on paw swelling rate in rats with paw swelling model ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	1 h		2 h		3 h	
		肿胀率/%	抑制率/%	肿胀率/%	抑制率/%	肿胀率/%	抑制率/%
对照	—	1.99±4.52	—	3.10±5.99	—	1.41±4.62	—
模型	—	11.46±5.54 [#]	—	15.69±7.87 [#]	—	17.07±7.51 [#]	—
白头翁皂	9	8.11±6.41	29.19	12.95±8.37	17.44	14.26±7.41	16.46
苷B ₄ 栓剂	18	6.77±5.89	40.88	8.53±6.85	45.62	9.08±6.44 [*]	46.82
	36	2.79±3.14 [*]	75.66	4.18±4.32 [*]	73.39	6.37±3.28 [*]	62.70
吲哚美辛栓	18	6.67±6.58	41.83	9.31±7.80	40.64	9.73±8.14 [*]	43.01

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	4 h		5 h		6 h	
		肿胀率/%	抑制率/%	肿胀率/%	抑制率/%	肿胀率/%	抑制率/%
对照	—	-0.33±4.03	—	-0.67±4.75	—	-0.26±4.15	—
模型	—	15.41±7.63 [#]	—	14.73±7.92 [#]	—	13.26±6.92 [#]	—
白头翁皂	9	11.11±6.94	27.89	8.02±8.46	45.55	7.02±8.28	47.01
苷B ₄ 栓剂	18	9.37±6.34 [*]	39.19	8.97±7.41 [*]	39.14	5.14±5.39 [*]	61.26
	36	4.78±4.29 [*]	68.97	3.78±4.20 [*]	74.35	2.71±2.55 [*]	79.58
吲哚美辛栓	18	9.03±6.38 [*]	41.38	8.01±6.39 [*]	45.66	5.85±5.19 [*]	55.89

与对照组比较:[#] $P<0.05$;与模型组比较:^{*} $P<0.05$ 。[#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group.表2 白头翁皂苷B₄栓剂对小鼠甲醛致痛模型舔足次数的影响($\bar{x}\pm s, n=14$)Table 2 Effect of *Pulsatilla* saponin B₄ suppository on number of licks in formalin-induced pain mouse model($\bar{x}\pm s, n=14$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	舔足次数	
		0~5 min	15~55 min
对照	—	0±1	0±0
模型	—	20±5 ^{##}	270±51 ^{##}
白头翁皂苷B ₄ 栓剂	13	20±4	166±52 ^{**}
	26	18±3	147±48 ^{**}
	52	17±5	107±38 ^{**}
吲哚美辛栓	26	19±4	156±43 ^{**}

与对照组比较:^{##} $P<0.01$;与模型组比较:^{**} $P<0.01$ 。^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group.

症因子 MCP-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,表明其通过抑制炎症发挥治疗大鼠急性痛风性关节炎作用。白头翁皂苷B₄栓剂可以抑制高尿酸血症大鼠血清尿酸、XOD、BUN 水平,降低肝脏中尿酸、BUN、CRE 和 MDA 水平,升高肝脏中 GSH-Px、CAT 水平,表明其可以保护肝脏及肾脏组织,降低尿酸,从而发挥治疗高尿酸血症作用。因而白头翁皂苷B₄治疗痛风是通过缓解炎症、降低尿酸、保护肾脏。但白头翁皂苷B₄抗痛风作用更具体的机制,待进一步研究。

痛风往往伴随关节局部发热、红肿及剧痛^[27],因而使用角叉菜胶诱导大鼠足肿胀模型和甲醛诱导小鼠致痛模型对白头翁皂苷B₄抗痛风作用进行进一步补充。角叉菜胶是一种强化学物质,用于刺激释放炎症和促炎介质。炎症的初始阶段(0~1 h)是由组胺、5-羟色胺和缓激肽释放引起的。角叉菜胶注射到大鼠后爪中可诱导进行性水肿,炎症一般在24~72 h内消退^[28]。角叉菜胶致大鼠足趾早期水肿会引起中枢神经系统的环氧合酶-2(COX-2)减少,除了主要的前列腺素2(PGE2)应答诱导,还会导致前列腺素D2(PGD2)、6酮前列-腺素F1a(6-keto-PGF1 α)和血栓素B2(TXB2)的合成增加,因此相对来说角叉菜胶属于中效致炎物质,起效慢、作用持久^[29]。甲醛引起的疼痛反应与临床上的一些疼痛症状具有较好的相关性,接近临床病理性疼痛表现出的慢性持续性疼痛。实验结果提示,白头翁皂苷B₄栓剂能够改善角叉菜胶诱导大鼠足肿胀,具有明显的抗炎作用;白头翁皂苷B₄栓剂对甲醛诱导小鼠致痛具有明显的镇痛作用。

本研究结果表明,白头翁皂苷B₄栓剂具有抗痛风性关节炎、抗急性高尿酸血症及抗炎镇痛作用,是一种具有开发前景抗痛风药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhong Z, Huang Y K, Huang Q D, et al. Serum metabolic profiling analysis of gout patients based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. Clin Chim Acta, 2021, 515: 52-60.
- [2] 张丽萍, 苏东文, 杨小义, 等. 中药外用治疗痛风性关节炎用药规律分析 [J]. 风湿病与关节炎, 2020, 9(12): 9-13.
Zhang L P, Su D W, Yang X Y, et al. Analysis of medication regularity of external application of Chinese medicine in the treatment of gouty arthritis [J]. Rheum Arthritis, 2020, 9(12): 9-13.
- [3] Kang E H, Park E H, Shin A, et al. Cardiovascular risk associated with allopurinol vs. benzbromarone in patients with gout [J]. Eur Heart J, 2021, 42(44): 4578-4588.
- [4] Kok V C, Horng J T, Wang M N, et al. Gout as a risk factor for osteoporosis: Epidemiologic evidence from a population-based longitudinal study involving 108, 060 individuals [J]. Osteoporos Int, 2018, 29(4): 973-985.
- [5] Kuo C F, Luo S F, See L C, et al. Increased risk of cancer among gout patients: A nationwide population study [J]. Joint Bone Spine, 2012, 79(4): 375-378.
- [6] Changchien T C, Yen Y C, Lin C L, et al. High risk of depressive disorders in patients with gout: A nationwide population-based cohort study [J]. Medicine, 2015, 94(52): e2401.
- [7] Yu K H, Kuo C F, Luo S F, et al. Risk of end-stage renal disease associated with gout: A nationwide population study [J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(2): R83.
- [8] Ruiz-Miyazawa K W, Pinho-Ribeiro F A, Borghi S M, et al. Hesperidin methylchalcone suppresses experimental gout arthritis in mice by inhibiting NF- κ B activation [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(25): 6269-6280.
- [9] 李迎春, 徐建华. 急性痛风性关节炎的发病机制及研究进展 [J]. 安徽医学, 2013, 34(1): 96-98.
Li Y C, Xu J H. Pathogenesis and research progress of acute gouty arthritis [J]. Anhui Med J, 2013, 34(1): 96-98.
- [10] 杨海艳, 曾庆雅, 欧阳香, 等. 大车前苷对氧嗪酸钾诱导小鼠急性高尿酸血症模型的影响 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(12): 1709-1715.
Yang H Y, Zeng Q Y, Ouyang X, et al. Effect of plantamajoside on acute hyperuricemia model induced by potassium oxonate in mice [J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(12): 1709-1715.
- [11] 张凯惠, 许立拔, 冯成晶, 等. 美花石斛醇提取物对高尿酸血症小鼠的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(2): 488-491.
Zhang K H, Xu L B, Feng C J, et al. Effect of alcohol extract of *Dendrobium candidum* on hyperuricemia mice [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(2): 488-491.
- [12] 刘喜华, 黄敏琪, 林忠文, 等. 金边蚂蟥抗痛风作用研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1747-1750.
Liu X H, Huang M Q, Lin Z W, et al. Anti-gout effect of *Poecilobdella manillensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(12): 1747-1750.
- [13] 袁进, 张丽峰, 高红伟, 等. 白头翁皂苷B₄药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(7): 2229-2233.
Yuan J, Zhang L F, Gao H W, et al. Research progress on pharmacological action of *Pulsatilla* saponin B₄ [J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(7): 2229-2233.
- [14] 官紫祎, 陈兰英, 罗颖颖, 等. 基于糖酵解机制的白头翁皂苷多成分协同抑制人肺癌NCI-H460细胞增殖作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5289-5297.
Guan Z Y, Chen L Y, Luo Y Y, et al. Multi-components from *Pulsatilla chinensis* saponins synergistically inhibit proliferation of NCI-H460 cells based on tumor glycolysis mechanism [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(21): 5289-5297.
- [15] 张琛伟, 许琼明, 高红伟, 等. 白头翁皂苷B₄栓剂治疗大鼠痔疮的药效学研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 853-863.
Zhang C W, Xu Q M, Gao H W, et al. Study on pharmacodynamics of anemoside B₄ suppository in treatment of rats with hemorrhoid [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(5): 853-863.
- [16] 刘翠玲, 梁奇, 梁雁翔, 等. 参苓白术散对尿酸钠诱导急性痛风性关节炎模型大鼠的作用机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(6): 1311-1313.
Liu C L, Liang Q, Liang Y X, et al. Study on the mechanism of shenlingbaizhu powder on acute gouty arthritis model rats induced by sodium uric acid [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(6): 1311-1313.
- [17] 张馨, 崔娜, 侯俊玲, 等. 急性慢性高尿酸血症大鼠模型的建立 [J]. 世界中医药, 2023, 18(16): 2309-2313, 2318.
Zhang X, Cui N, Hou J L, et al. Establishment of acute and chronic hyperuricemia models of rats [J]. World Chin Med, 2023, 18(16): 2309-2313, 2318.
- [18] 肖百全, 朱少璇, 杨威, 等. 角叉菜胶致大鼠足肿胀模型探讨及其机制研究 [J]. 中国实用医药, 2008, 3(23): 63-65.
Xiao B Q, Zhu S X, Yang W, et al. Study on rat foot swelling model induced by carrageenan and its mechanism [J]. China Pract Med, 2008, 3(23): 63-65.
- [19] 汪倩倩, 孙丹妮, 刘春芳, 等. 乌头和"半蒺贝及"配伍对甲醛致痛模型小鼠镇痛作用的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(4): 488-491.
Wang Q Q, Sun D N, Liu C F, et al. Analgesia effect of contrary medicine combination of processed *Aconiti Radix Cocta* and *Rhizoma pinelliae*, *Fructus trichosanthis*, *Bulbus fritillariae thunbergii*, *Bletilla*

- striata* in formalin-induced pain mice [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2017, 23(4): 488-491.
- [20] 贾萍, 陈刚, 杨娟, 等. 四妙丸对大鼠痛风性关节炎发展的影响及调控巨噬细胞极化研究 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3498-3502.
- Jia P, Chen G, Yang J, et al. Study on the effect of Simiao Pills on inflammation development and regulation of macrophage polarization in rats with gouty arthritis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(6): 3498-3502.
- [21] Dinesh P, Rasool M. Berberine, an isoquinoline alkaloid suppresses TXNIP mediated NLRP3 inflammasome activation in MSU crystal stimulated RAW 264.7 macrophages through the upregulation of Nrf2 transcription factor and alleviates MSU crystal induced inflammation in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 44: 26-37.
- [22] 李华伟, 江文杰, 叶世明, 等. P2Y14受体通过调控巨细胞焦亡在急性痛风性关节炎中发挥关键作用 [J]. 细胞死亡研究, 2020, 11(5): 394.
- Li H W, Jiang W J, Ye S M, et al The P2Y14 receptor plays a crucial role in regulating giant cell pyroptosis in acute gouty arthritis [J]. Cell Death Res, 2020, 11(5): 394.
- [23] Broz P. Immunology: Caspase target drives pyroptosis [J]. Nature, 2015, 526(7575): 642-643.
- [24] Komada T, Muruve D A. The role of inflammasomes in kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(8): 501-520.
- [25] Shaw O M, Steiger S, Liu X, et al. Brief report: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor drives monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammatory macrophage differentiation and NLRP3 inflammasome up-regulation in an *in vivo* mouse model [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(9): 2423-2428.
- [26] 缪明星, 王星, 陆琰, 等. 芹菜素对氧嗪酸钾盐致高尿酸血症小鼠的降尿酸及肾保护作用机制研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(34): 4794-4797.
- Miao M X, Wang X, Lu Y, et al. Mechanism study on effects of apigenin on reducing uric acid and renal protection in oteracil potassium-induced hyperuricemia mice [J]. China Pharm, 2016, 27(34): 4794-4797.
- [27] 李金存. 痛风的临床表现和治疗 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(66): 141.
- Li J C. Clinical manifestations and treatment of gout [J]. World Latest Med Inf, 2015, 15(66): 141.
- [28] 高光武, 李玲. 黄芩提取物的抗炎作用及其作用机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(6): 550-552.
- Gao G W, Li L. Study on the anti-inflammatory effect and mechanism of the extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2014, 30(6): 550-552.
- [29] Guay J, Bateman K, Gordon R, et al. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1 [J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24866-24872.

[责任编辑 兰新新]