

四妙勇安汤通过 MEK1/2-Erk1/2 途径改善尿酸钠诱导大鼠痛风性关节炎的作用

沈雨宇¹, 牛梦伟¹, 杨小英¹, 俸婷婷¹, 周 英¹, 尹志刚², 刘 畅^{1*}

1. 贵州中医药大学 药学院 药食两用资源应用与开发研究中心, 贵州 贵阳 550025

2. 湘南学院 基础医学院, 湖南 郴州 423000

摘要: 目的 探讨四妙勇安汤对尿酸钠诱导的痛风性关节炎大鼠的作用机制。方法 运用网络药理学方法预测四妙勇安汤干预痛风性关节炎的靶点, 构建“成分-靶点-通路”关系网络。将48只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱(阳性对照, 0.000 3 g·kg⁻¹)组及四妙勇安汤低、中、高剂量(6.075、12.150、24.300 g·kg⁻¹)组, 每组8只, 预防性ig给药, 每天1次, 持续7 d, ig第3天, 除了对照组, 构建痛风性关节炎大鼠模型。测量并计算大鼠踝关节肿胀度, HE染色检测大鼠踝关节滑膜组织病理学改变; ELISA试剂盒法检测各组大鼠血清中炎症因子白细胞介素(IL)-17A、IL-17F、环氧化酶-2(COX-2)、趋化因子配体2(CXCL2)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF)- α 的水平; 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blotting检测关节组织中MEK1/2-Erk1/2途径基因mRNA和蛋白表达水平。结果 网络药理学结果显示, AKT1、ALB、TNF、HSP90AA1、EGFR、SRC、VEGFA、CCND1、HRAS、MAPK3、MAP2K1可能是四妙勇安汤治疗痛风性关节炎的关键靶点; β -谷甾醇、山柰酚、槲皮素、木犀草素可能为治疗痛风性关节炎中较重要的有效成分; 生物过程(BP)中富集基因主要与炎症反应、对细胞迁移的积极调节、对外部刺激反应的负调节、小分子代谢过程的调控等过程密切相关, 细胞组分(CC)分析包括分泌颗粒、细胞质囊泡、内质网、高尔基、血小板颗粒等, 分子功能(MF)中富集基因靠前的有转录因子结合、蛋白激酶活性、激酶调节活性等; KEGG代谢通路主要富集于MAPK信号通路、PI3K-Akt信号通路、IL-17信号通路、Ras信号通路等。与模型组比较, 四妙勇安汤高剂量可明显改善踝关节肿胀度($P<0.05$); 中、高剂量可缓解痛风性关节炎大鼠滑膜组织炎症浸润; 中、高剂量组炎症因子水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 中、高剂量组MAPK3、MAP2K1的基因mRNA表达量显著下调($P<0.01$); 高剂量组Erk1/2、MEK1/2蛋白的表达量显著下调($P<0.01$)。结论 四妙勇安汤对痛风性关节炎大鼠具有治疗作用, 其可能是通过抑制MAPK信号通路关键靶点Erk1/2、MEK1/2的表达, 抑制下游炎症因子IL-17、TNF- α 、IL-1 β 表达, 减轻炎症反应, 从而发挥对痛风性关节炎的治疗作用。

关键词: 四妙勇安汤; 痛风性关节炎; MEK1/2-Erk1/2途径; β -谷甾醇; 山柰酚; 槲皮素; 木犀草素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)07-1572-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.016

Study on mechanism of Simiao Yong'an Decoction in treating MSU-induced gouty arthritis through MEK1/2-ERK1/2 pathway

SHEN Yuyu¹, NIU Mengwei¹, YANG Xiaoying¹, FENG Tingting¹, ZHOU Ying¹, YIN Zhigang², LIU Chang¹

1. School of Pharmacy/Research Center for Application and Development of Medicine and Food Dual-use Resources, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. School of Basic Medicine, Xiang Nan University, Chenzhou 423000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Simiao Yong'an Decoction on gouty arthritis rats induced by monosodium urate (MUS) and its possible mechanism. **Methods** The target of Simiao Yong'an Decoction in the intervention of gouty arthritis was predicted by network pharmacology, and the relationship network of active ingredient-target and target-pathway was constructed. Totally 48 male SD rats were randomly divided into control group, model group, Simiao Yong'an Decoction low, medium and high dose group (6.075, 12.150, and 24.300 g·kg⁻¹), with eight rats in each group. Prophylactic ig administration once a day for seven

收稿日期: 2023-12-29

基金项目: 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目(贵中医大创合字(2021)16号); 贵州省科学技术基金(黔科合基础-ZK[2021]一般515); 贵州省教育厅2023年度自然科学研究项目(黔教技[2023]069号)

第一作者: 沈雨宇(1999—), 女, 本科生, 中药学专业。E-mail: 3263917451@qq.com

*通信作者: 刘 畅(1988—), 女, 副教授, 从事中药及民族药基础研究及开发。E-mail: 19liuchang@163.com

days. On the 3rd day of ig administration, except for the control group, the GA rat model was established according to the classical modeling method. The different doses of Simiao Yong'an Decoction were injected into the stomach to measure and calculate the degree of ankle swelling, and the histopathological changes of ankle synovium and the levels of inflammatory factors in serum of rats in each group were detected. Finally, real-time quantitative fluorescent PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression levels of MEK1/2-Erk1/2 pathway genes in joint tissues. **Results** The network pharmacology results show that AKT1, ALB, TNF, HSP90AA1, EGFR, SRC, VEGFA, CCND1, and HRAS may be the key targets of Simiao Yong'an Decoction for the treatment of gouty arthritis; β -sitosterol, kaempferol, quercetin, and lutein may be the more important effective components for the treatment of gouty arthritis; the enriched genes in biological processes (BP) are mainly related to inflammatory responses, positive regulation of cell migration, negative regulation of responses to external stimuli, and regulation of small molecule metabolic processes; the enriched genes in cellular components (CC) include secretory granules, cytoplasmic vesicles, endoplasmic reticulum, Golgi, and platelet granules; the enriched genes in molecular functions (MF) include transcription factor binding, protein kinase activity, and kinase regulatory activity at the front; the KEGG metabolic pathways are mainly enriched in MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, IL-17 signaling pathway, and Ras signaling pathway. Compared with the model group, Simiao Yong'an Decoction at high dose can significantly improve the degree of ankle edema ($P < 0.05$); at medium and high doses, it can alleviate the inflammatory infiltration of synovial tissue in rats with gouty arthritis; at medium and high doses, the levels of inflammatory factors are significantly lower ($P < 0.05, 0.01$); at medium and high doses, the gene mRNA expression of MAPK3 and MAP2K1 is significantly downregulated ($P < 0.01$); at high dose, the expression of Erk1/2 and MEK1/2 proteins is significantly downregulated ($P < 0.01$). **Conclusion** Simiao Yong'an Decoction has a certain intervention effect on GA rats, and its active components may inhibit the expression of inflammatory factors such as TNF- α and IL-1 β by inhibiting the expression of key targets in MAPK signaling pathway, and alleviate the inflammatory response, so as to play a therapeutic role in gouty arthritis.

Key words: Simiao Yong'an Decoction; gouty arthritis; MEK1/2-Erk1/2 pathway; β -sitosterol; kaempferol; quercetin; lutein

痛风是一种与高尿酸血症及尿酸盐结晶沉积密切相关的代谢性疾病,血尿酸升高达到一定程度时会在关节局部形成尿酸钠晶体并沉积,继而诱发局部炎症反应和组织破坏,即痛风性关节炎^[1]。中医认为痛风属于“痹症”的范畴,《黄帝内经》中提到“膏粱之变,足生大疔”,且随疾病的发展逐渐加重,不仅会造成关节畸形,而且可累及肾脏损伤,引发糖尿病、心脑血管疾病等,严重影响患者的身心健康和生活质量^[2]。

目前,临床上多使用非甾体类抗炎药、秋水仙碱或降尿酸药物来减轻和控制急性痛风发作^[3-4],但由于痛风是一种代谢缺陷性疾病,上述药物只能在一定程度上改善症状、延缓病程,均不能有效地预防和治疗痛风性关节炎^[5-6]。因此寻找安全有效并可长期使用的控制手段对痛风的预防和治疗具有重要意义。中药民族药具有多途径、多靶点、多层次对症治疗的优势,在调控炎症因子、趋化因子、细胞免疫应答等方面发挥着重要的作用,已被证实具有抑制痛风炎症发作的功效^[7-11]。

经典名方四妙勇安汤由药食同源药材金银花、玄参、当归、甘草组成,常用于治疗热毒炽盛之脱疽,其化学成分包括木犀草素、槲皮素、原儿茶酸、甘草酸等^[12-14]。现代药理研究表明,其具有抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化等作用。四妙勇安汤可以通

过调节肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(ILs)、基质金属蛋白酶(MMP)等参与机体炎症反应,主要通过调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等炎症信号传导通路来减少炎症损伤,抑制炎症相关因子TNF- α 、IL-6等表达来发挥抗炎作用^[15-21]。临床研究表明,四妙勇安汤能够有效降低湿热蕴结型痛风性关节炎患者的炎症指标,减轻临床症状^[22-24]。生物信息学分析表明其可能通过下调炎症因子的表达、调节免疫功能等发挥干预痛风性关节炎的作用^[25],但缺乏对其机制的深入研究。

本研究结合“成分-靶点-通路”关联分析结果,建立急性痛风性关节炎大鼠模型,考察四妙勇安汤治疗痛风性关节炎的药效,利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blotting检测关节组织中丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)1/2-细胞外调节蛋白激酶(Erk)1/2途径mRNA和蛋白表达水平,探讨四妙勇安汤预防痛风性关节炎的药效物质基础,阐明其预防痛风性关节炎的作用机制,为其治疗痛风性关节炎的临床治疗提供实验依据,为该复方的精准临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要试剂

金银花、玄参、当归、甘草,购自贵州省贵阳市万东桥药材市场,药材经贵州中医药大学孙庆文教

授鉴定分别为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。阳性对照药秋水仙碱(批号 HY-16569)购自 MedChemExpress; 水合氯醛(批号 XG0879)购自天津市科密欧化学试剂有限公司; 尿酸钠(批号 C14461966)购自上海麦克林生化科技有限公司; 总 RNA 提取试剂盒(批号 X0124)、荧光定量试剂盒(批号 X0324)购自天根生化科技(北京)有限公司; MEK1/2 抗体(批号 #8727)、ErK1/2(批号 #4695)购自 Cell signaling Technology; GAPDH 抗体(批号 AP0063)购自 Bioworld。

1.2 主要仪器及相关数据库

Multiskan Mk3 酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司); 数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团); Sorvall Legend Micro 17R 高速冷冻离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; N60 系列超微量分光光度计(德国 IMPLÉN 公司); CFX Connect 三通道梯度荧光定量 PCR 仪、免染蛋白印迹系统(美国 Bio-rad 公司)。

TCMSP 数据库 (<http://tcmospw.com/tcmosp.php>); PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); GeneCards 数据库 (<https://genecards.weizmann.ac.il/v3/>); DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>); OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>); CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>); STRING 数据库 (<https://string-db.org/>); KOBAS 3.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>); ALOGPS 2.1 (<http://www.vccclab.org/lab/alogps/>); Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>); 微生物信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>)。

1.3 实验动物

48 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(湘)2022-0011; 质量检测单位: 苏州西山生物技术有限公司。本研究严格按照贵州中医药大学动物实验伦理要求进行(伦理审批编号: 20230059)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 四妙勇安汤主要活性成分及靶点预测

TCMSP 数据库中搜索关键词“金银花”“玄参”“当归”“甘草”, 按药物口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 初步筛选活性成分, 结合 Lipinski 五原则 (相对分子质量 ≤ 500 、miLogP ≤ 5 、nOHNH ≤ 5 、nOH ≤ 10) 进一步筛选主要活性成分。收集金银花、玄参、当归、甘草主要成分的 target name, 导入 Uniprot 数据库获取基因名, 物种选择“Homo sapiens”, 保存到 Excel 表中筛选汇总并去重后, 即得到药物的潜在作用靶点。痛风性关节炎靶点的筛选以“gouty arthritis”为关键词, 利用 GeneCard、DrugBank 和 OMIM 等数据库搜索下载相关靶点基因, 根据 Score > 1 筛选, 将各数据库筛选得到的靶点合并, 删除重复项即得痛风性关节炎的靶点。

2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络和“药物-靶点”网络的构建 将上述得到的四妙勇安汤与痛风性关节炎相互作用的交集靶点导入 STRING 数据库中, 设置种属为“Homo Sapiens”, 将获得的靶点数据以 TSV 形式下载, 导入 Cytoscape3.9.1 软件, 并利用 Cytoscape3.9.1 软件中 CytoNCA 插件筛选靶点, 把分值较高的节点再次构建网络, 以筛选出 PPI 中的关键靶点。将建立好的网络文件和属性文件导入 Cytoscape3.9.1 中绘制“药物-靶点”网络图, 根据软件中的 CytoNCA 插件, 选择 Closeness unDir (CD)、Betweenness unDir (BD)、Degree unDir (DD), 根据 CD、BD、DD 的值筛选核心靶点, 再次整理靶点数据, 绘制“药物-靶点”网络图。

2.1.3 通路富集分析 利用 Metascape 数据库进行通路富集分析, 物种设置为“H. sapiens”, 点击“Custom Analysis”, 在“Enrichment”下依次选择“GO Biological Processes”“GO Cellular Components”“GO Molecular Functions”进行基因本体 (GO) 生物过程的富集分析与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 利用微生物信在线平台作图。

2.2 动物实验

2.2.1 四妙勇安汤水提液的制备 四妙勇安汤由金银花、玄参、当归、甘草 4 味药组成, 参考文献报道^[26], 根据人与大鼠的体表面积折算的等效剂量比值 0.018 按成人给药量计算得到大鼠的给药剂量为 $24.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以生药量计)。称取金银花药材 180 g、玄参药材 180 g、当归药材 120 g、甘草药材 60 g, 剪碎, 实验中采用回流提取法, 以水作为溶剂, 提取 2 次。第 1 次在圆底烧瓶中加入 10 倍量水, 回流提取

1.5 h;第2次加入8倍量水,回流提取1 h,再合并2次滤液,浓缩为低、中、高3个质量浓度,分别为0.607 5、1.215 0、2.430 0 g·mL⁻¹(以生药量计),-20℃冰箱保存。通过HPLC法检测,0.1 g·mL⁻¹质量浓度的四妙勇安汤中绿原酸质量分数为1.944%、阿魏酸质量分数为0.007%、哈巴俄苷质量分数为0.029%、甘草酸质量分数为0.436%。

2.2.2 动物造模、分组及给药 将48只SD大鼠适应性喂养3 d后随机分为对照组、模型组、秋水仙碱(阳性药,0.000 3 g·kg⁻¹)组和四妙勇安汤低、中、高剂量(6.075、12.150、24.300 g·kg⁻¹)组,每组8只。对照组和模型组分别ig等体积的0.9%氯化钠溶液,其他4组大鼠ig相应的药物,每天1次,持续7 d,进行预防性ig给药。在ig的第3天,参照经典造模方法^[27],从大鼠右后踝关节侧将0.1 mL的尿酸钠混悬液(1.25 mg)注入到踝关节腔内,注射过程中在关节腔内会明显感受有落空感,大鼠关节腔对侧鼓起和关节红肿发热表示造模成功。记录每天给药后大鼠的体质量变化。在造模的第0、6、24、48小时使用游标卡尺对大鼠右踝关节同一部位测量,计算踝关节肿胀度。最后1次给药24 h后ip 10%水合氯醛麻醉,取大鼠血清、踝关节滑膜组织进行检测。

关节肿胀度=(测定时间点厚度-初始厚度)/初始厚度

2.2.3 大鼠血清炎症指标检测和关节滑膜组织病理损伤变化 在大鼠ip 10%水合氯醛麻醉后于腹主动脉取血,离心15 min取上清液放置-20℃冷藏,参照ELISA试剂盒的操作步骤测定各组动物血清中IL-17、IL-17F、环氧化酶-2(COX-2)、趋化因子-2(CXCL-2)、IL-1β、TNF-α水平,并进行统计学分析。将各组大鼠踝关节组织用10%多聚甲醛固定,用石蜡包埋,切片,苏木-伊红(HE)染色,置于显微镜下观察。

2.2.4 qRT-PCR法检测MAPK通路关键基因的表达 qRT-PCR检测MAPK信号通路关键靶点MAPK3、MAP2K1的表达,以GAPDH作为内参。提取各组大鼠关节滑膜组织总RNA,反转录合成cDNA,通过荧光定量PCR仪进行qRT-PCR检测。MAPK3、MAP2K1、GAPDH引物(表1),按照2^{-ΔΔCt}相对定量方法计算。

2.2.5 Western blotting检测 取各组大鼠踝关节组织,置研钵中研细,加入含PMSF、蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取蛋白,离心后加入蛋白缓冲液,于100℃恒温水浴10 min使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,加入5%脱脂牛奶,室温封闭1 h,分别加入

表1 引物设计

Table 1 Primer sequence

基因	NCBI序列号	引物序列(5'→3')
MAPK3	NM_017347.3	F:ATCCTCCGGGGCCCTCAAGTA R:GGGCAAGGCCAAAATCACAG
MAP2K1	NM_031643.4	F:GCGCTGCTGTTCATCGTGAC R:CATGCATGCACTGCCTGTGA
GAPDH	NM_017008.4	F:GGGCTCTCTGCTCCTCCCTGT R:ACGGCCAAATCCGTTCCAC

MEK1/2、ErK1/2抗体(1:1 000)、GAPDH抗体(1:5 000),4℃孵育过夜;TBST洗涤3次后,加入二抗(1:10 000),室温避光摇床1 h,TBST洗涤3次后,使用凝胶成像系统显影,利用Image J软件分析条带灰度值。

2.3 统计学分析

利用SPSS 26.0统计软件,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,并利用GraphPad Prism 8绘制柱状图。

3 结果

3.1 四妙勇安汤-痛风性关节炎共同靶点的筛选

在TCMSP数据库中以“金银花”“玄参”“当归”“甘草”为关键词,检索并筛选得到125个活性成分,其有效成分作用靶点共806个。在OMIM数据库、GeneCards数据库等多个数据库中以“gouty arthritis”为关键词检索,删去重复值,共筛选到痛风性关节炎相关靶点15 965个,将15 965个疾病靶点与806个药物靶点通过veeny2.1.0在线软件取交集,得到四妙勇安汤和痛风性关节炎的共同靶点700个。

3.2 PPI网络图的构建与分析

筛选出的四妙勇安汤和痛风性关节炎的700个共同靶点,将其导入STRING数据库相应位置,构建PPI网络图,同时在该界面下载tsv文件,将该文件导入Cytoscape3.9.1工具中绘制网络图,图中节点越大,则表明靶点的度值(degree)越高。选取出度值大于80的基因进行作图展示,如图1所示,AKT1、ALB、TNF、HSP90AA1、EGFR、SRC、VEGFA、CCND1、HRAS、MAPK3、MAP2K1可能是四妙勇安汤治疗痛风性关节炎的关键靶点。

3.3 药物-成分-靶点网络图的构建与分析

将四妙勇安汤125个活性成分和筛选得到的700个交集靶点数据导入Cytoscape3.9.1软件,根据Cytoscape3.9.1软件中的“Analyze Network”计算度值,其度值越高,表示与其他节点有更高的关联度。

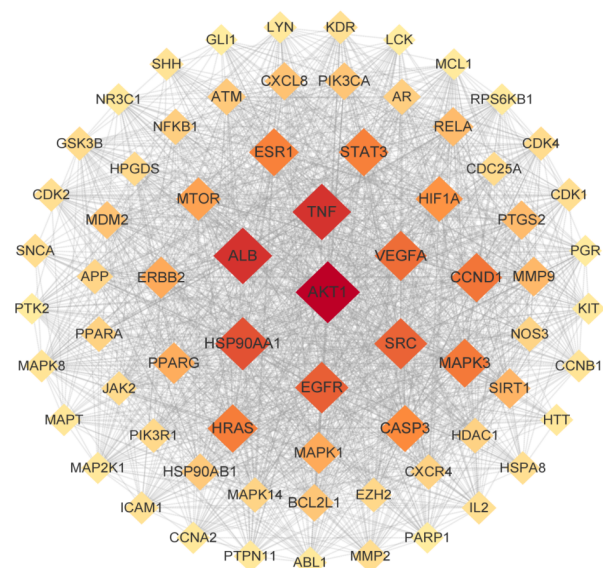


图1 PPI网络
Fig. 1 PPI network

根据 degree 值筛选出的较高的有 β -谷甾醇、山柰酚、槲皮素、木犀草素等,可能为治疗痛风性关节炎中较重要的有效成分(图2)。

3.4 化合物-靶点-*GO*、*KEGG*通路网络图的构建与分析

运用 Metascape 在线数据库将四妙勇安汤与痛风性关节炎的 700 个共同靶点基因进行 *GO* 和 *KEGG* 通路分析,在 *GO* 分析中,如图3所示,生物过程(BP)中富集基因主要与炎症反应、对细胞迁移的积极调节、对外部刺激反应的负调节、小分子代谢

过程的调控等过程密切相关;细胞组分(CC)分析包括分泌颗粒、细胞质囊泡、内质网、高尔基、血小板颗粒等;分子功能(MF)中富集基因靠前的有转录因子结合、蛋白激酶活性、激酶调节活性等。*KEGG* 代谢通路主要富集于 *MAPK* 信号通路、*PI3K-Akt* 信号通路、*IL-17* 信号通路、*Ras* 信号通路等(图4)。其中 *MAPK* 信号通路中有 *AKT1*、*CASP3*、*CHUK*、*MAPK14*、*HSPB1*、*ERBB2*、*MAPK3*、*MAP2K1*、*TNF* 等靶点(图5),主要相关的活性成分包括槲皮素、山柰酚、木犀草素、 β -谷甾醇等。

3.5 四妙勇安汤改善痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度

如表2所示,与对照组比较,模型组造模后踝关节肿胀度显著增加($P < 0.01$),提示大鼠痛风性关节炎模型成功;与模型组比较,秋水仙碱组、四妙勇安汤低、中剂量组大鼠踝关节肿胀减小程度均不明显,高剂量组可明显改善踝关节肿胀度($P < 0.05$),并且随着时间推移,各组大鼠踝关节肿胀均逐渐恢复正常。

3.6 四妙勇安汤可缓解痛风性关节炎大鼠滑膜组织炎性浸润

对照组大鼠踝关节组织形态完整,滑膜光滑连续,骨质无破坏,没有炎症细胞浸润;模型组局部滑膜细胞坏死,见滑膜细胞胞核固缩、崩解,胞质较多浆液性物质渗出,周围伴有炎性细胞浸润,主要见巨噬细胞和核呈圆形深染的淋巴细胞;阳性药秋水

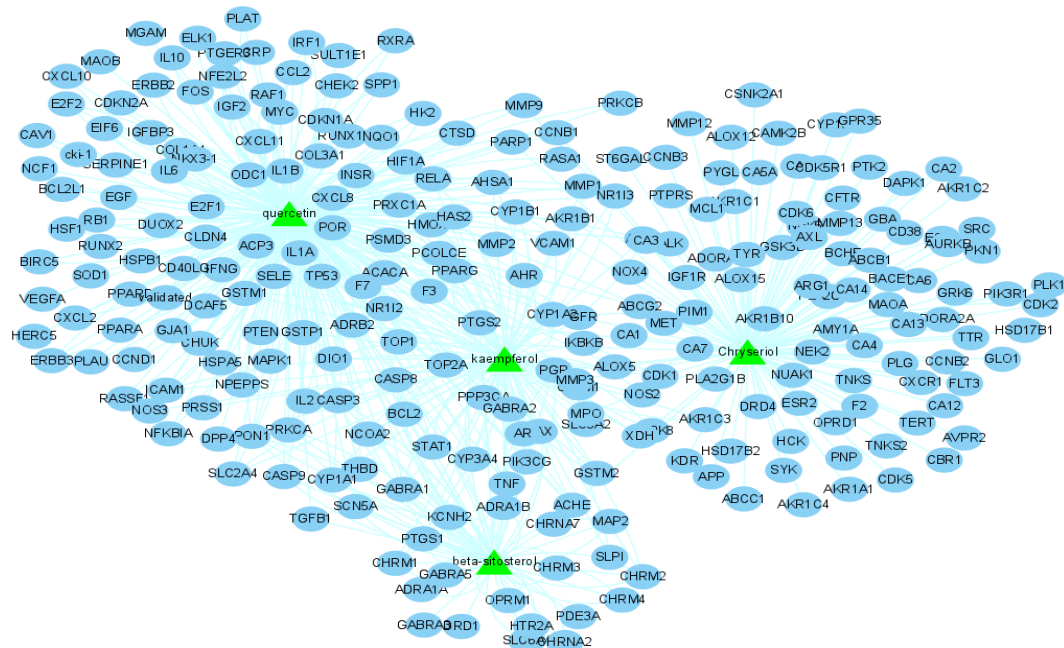


图2 药物-核心靶点图
Fig. 2 Medicine-core target

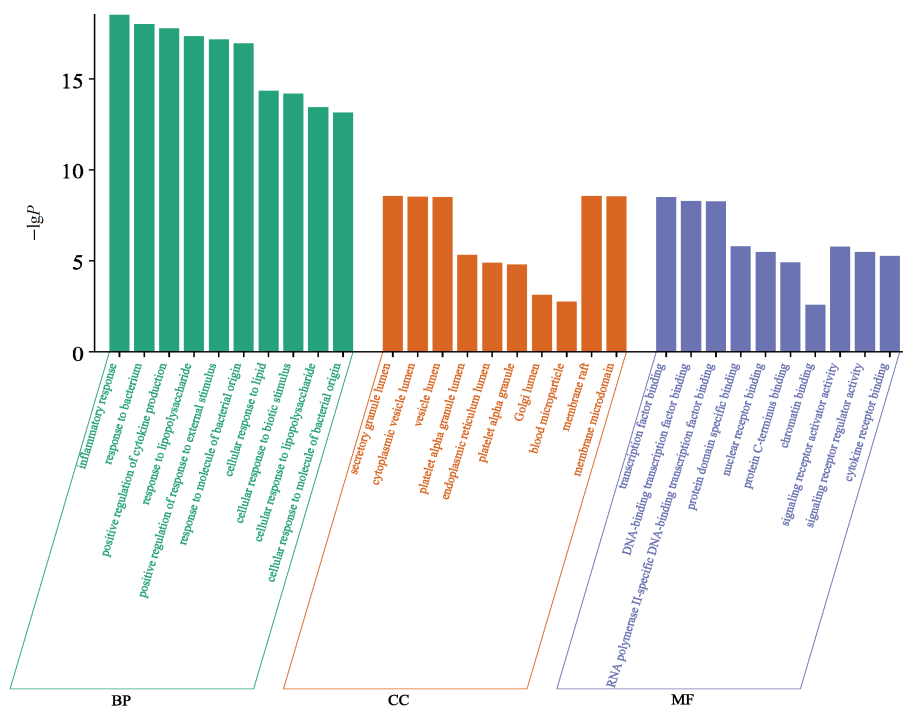


图3 GO分析结果

Fig. 3 GO analysis result

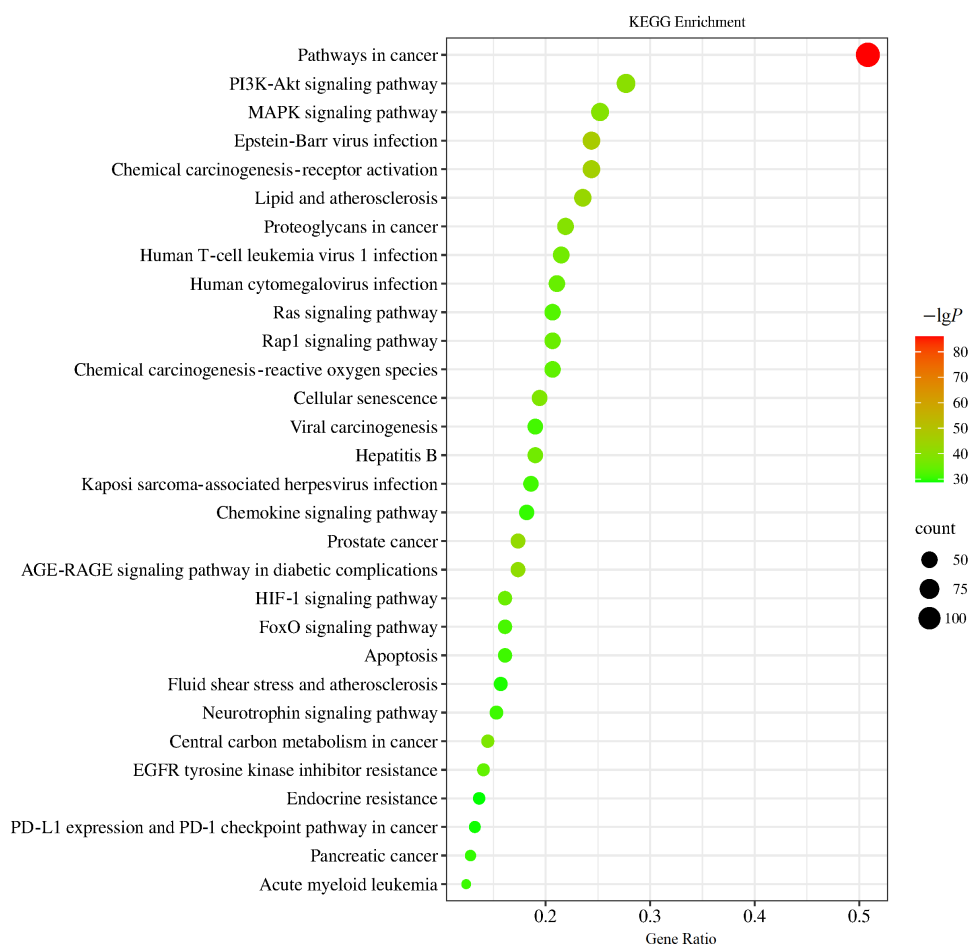


图4 KEGG富集分析气泡图

Fig. 4 Bubble map of KEGG enrichment analysis

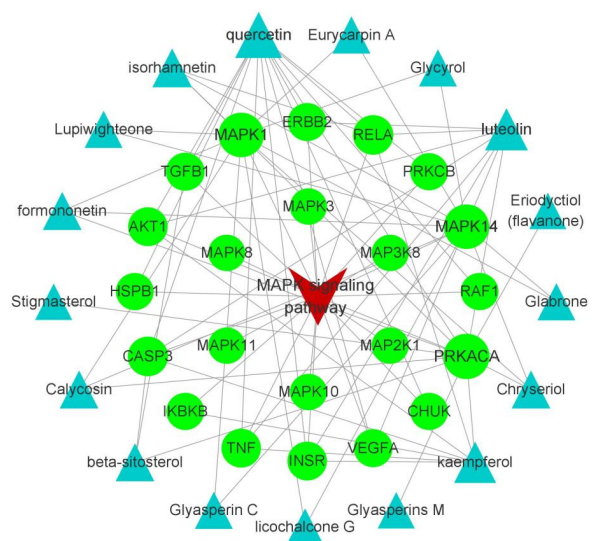


图 5 MAPK 信号通路-靶点-化合物网络
Fig. 5 MAPK signal pathway-target-compound network

仙碱关节组织滑膜结构清晰完整,但衬里层和衬里下层不同程度炎性细胞浸润和纤维组织增生,炎性细胞主要见巨噬细胞、淋巴细胞、核偏向于细胞一侧的浆细胞和少量核呈杆状或分叶状的中性粒细胞;四妙勇安汤低剂量组滑膜组织仍有较多炎性细胞浸润,四妙勇安汤中、高剂量组踝关节组织形态基本正常(图6)。

3.7 四妙勇安汤可显著降低痛风性关节炎大鼠血清炎症因子水平

如表 3 所示,与对照组相比,模型组大鼠血清

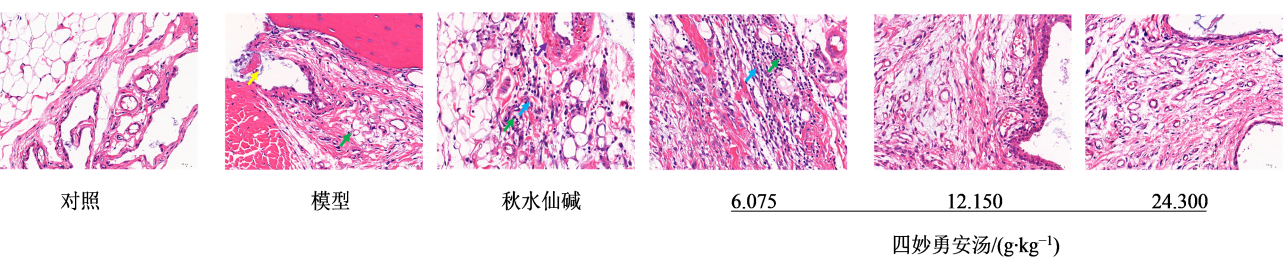


图 6 四妙勇安汤对痛风性关节炎大鼠踝关节组织病理变化的影响(HE,×400)
Fig. 6 Effect of Simiao Yong'an Decoction on histopathological changes of ankle joint in rats with GA (HE, ×400)

表 3 各组血清炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 3 Comparison of serum inflammatory factors in each group ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	IL-17A/(ng·L ⁻¹)	IL-17F/(ng·L ⁻¹)	COX-2/(ng·L ⁻¹)	CXCL-2/(ng·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·L ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)
对照	—	39.12±6.16	13.71±2.43	16.43±2.42	25.76±5.92	7.09±1.50	71.66±13.85
模型	—	54.15±6.87 ^{##}	20.25±2.58 ^{##}	28.07±5.39 ^{##}	43.72±9.45 ^{##}	10.38±2.42 ^{##}	97.69±10.81 ^{##}
秋水仙碱	0.000 3	44.72±6.46 ^{**}	15.45±2.31 ^{**}	19.37±4.65 ^{**}	30.84±7.05 ^{**}	7.75±2.27 ^{**}	82.67±14.05 [*]
四妙勇	6.075	47.06±6.49 [*]	17.16±3.33 [*]	23.45±6.31	38.23±7.74	8.28±1.50 [*]	87.56±13.91
安汤	12.150	42.47±3.77 ^{**}	14.77±1.59 ^{**}	19.52±4.50 ^{**}	33.82±6.59 [*]	7.23±1.16 ^{**}	77.28±15.09 ^{**}
	24.300	41.32±9.05 ^{**}	14.84±2.08 ^{**}	18.43±3.96 ^{**}	32.92±6.81 ^{**}	7.28±1.73 ^{**}	76.56±12.41 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。
^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

表 2 大鼠踝关节肿胀率($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Swelling rate of ankle joint in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

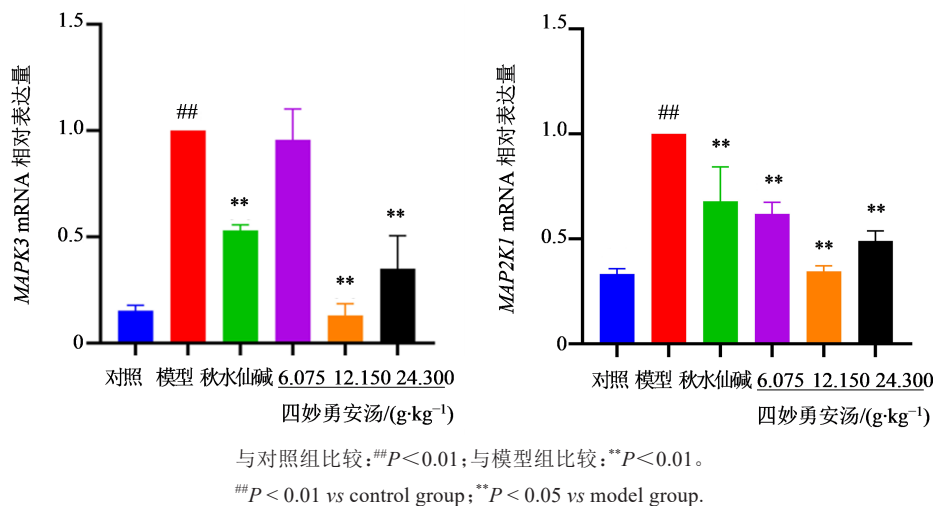
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	踝关节肿胀率/%		
		6 h	24 h	48 h
对照	—	6.00±1.22	1.98±0.78	0.73±0.41
模型	—	18.23±8.35 ^{##}	22.44±10.76 ^{##}	16.70±6.30 ^{##}
秋水仙碱	0.000 3	11.32±3.90 [*]	13.30±4.40 [*]	15.12±6.19
四妙勇	6.075	14.49±4.95	17.00±5.79	13.29±4.00
安汤	12.150	14.94±6.05	18.46±8.35	14.45±2.16
	24.300	11.78±2.43 [*]	14.06±6.51 [*]	11.66±4.96

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ 。
^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group.

IL-17A、IL-17F、COX-2、CXCL-2、IL-1β、TNF-α 水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,ig 给予阳性药和四妙勇安汤后,大鼠血清 IL-17A、IL-17F、COX-2、CXCL-2、IL-1β、TNF-α 水平降低,且四妙勇安汤中、高剂量组炎症因子水平显著降低($P<0.05、0.01$)。

3.8 四妙勇安汤降低 MAPK 通路关键靶点 MAPK3、MAP2K1 mRNA 表达水平

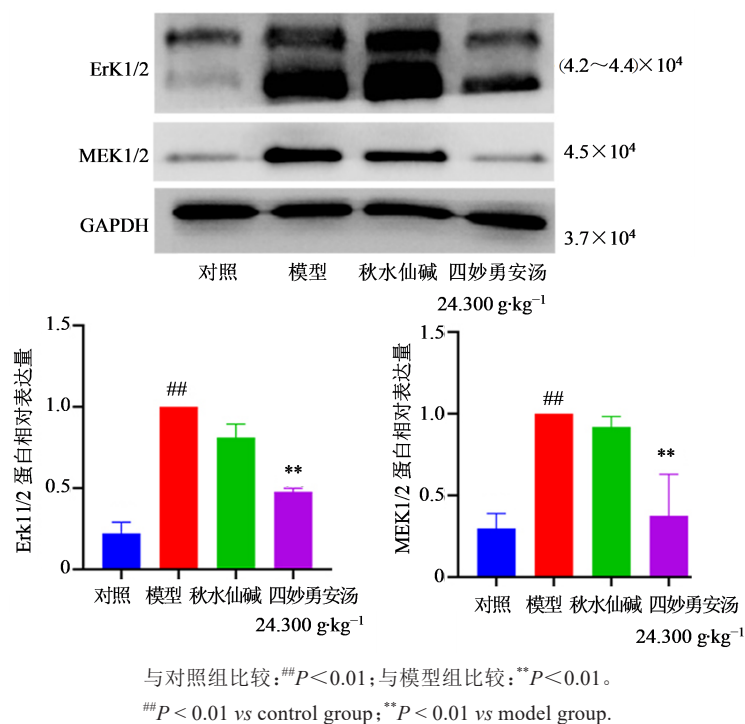
如图 7 所示,与对照组比较,模型组 MAPK3、MAP2K1 的基因 mRNA 表达量显著上调($P<0.01$);与模型组相比,四妙勇安汤中、高剂量组 MAPK3、MAP2K1 的基因 mRNA 表达量显著下调($P<0.01$)。

图7 四妙勇安汤对痛风性关节炎大鼠MAPK信号通路mRNA表达的调控作用($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 7 Regulation effect of Simiao Yong'an Decoction on mRNA expression of MAPK signaling pathway in GA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.9 四妙勇安汤对MEK1/2-ERK1/2途径相关蛋白表达的影响

如图8所示,与对照组相比,模型组中ErK1/2、MEK1/2蛋白的表达量显著上调($P < 0.01$);与模型组相比,阳性组、四妙勇安汤高剂量组

中ErK1/2、MEK1/2蛋白的表达量显著下调($P < 0.01$)。四妙勇安汤可能通过降低痛风性关节炎大鼠踝关节组织MEK1/2、ErK1/2蛋白表达,减轻炎症反应,从而对痛风性关节炎有一定治疗作用。

图8 四妙勇安汤对痛风性关节炎大鼠MEK1/2-ERK1/2通路蛋白表达的调控作用($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 8 Regulation effect of Simiao Yong'an Decoction on protein expression of MEK1/2-ERK1/2 pathway in GA rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

痛风属于中医“痹症”范畴,最早载于朱丹溪《格致余论·痛风》,《内经》载:风湿寒三气杂至,合而为痹。中医药治疗痛风性关节炎的作用机制主

要与减少尿酸生成、促进尿酸排泄、降低炎症因子表达等方面有关^[28-31]。四妙勇安汤由四味药食同源药材金银花、玄参、当归、甘草组成,网络药理学结果表明槲皮素、山柰酚、木犀草素、 β -谷甾醇等是其

主要的活性成分,主要富集于MAPK信号通路。槲皮素是一种天然的黄酮类化合物,可以降低细胞内氧化应激,能够抑制参与尿酸盐产生的酶而降低血清尿酸盐水平,增加肾脏尿酸盐排泄,同时还具备抗炎作用,通过抑制NLRP3炎症小体激活降低炎症反应^[32]。槲皮素能够减轻痛风性关节炎引起踝关节骨破坏,降低IL-17通路中IL-6、IL-17A和IL-17F的表达以达到治疗痛风性关节炎的作用^[33]。山柰酚属于天然多酚类化合物,其对类风湿关节炎是通过阻断MAPK途径活化干预成纤维细胞样滑膜细胞的迁移和迁徙而发挥作用^[34]。木犀草素以糖苷的形式存在于多种植物中,有抗炎、抗氧化等多种生物活性^[35],能够抑制TNF- α 、IL-1 β 等因子的表达,有效缓解急性痛风性关节炎模型大鼠的肿胀^[36]。 β -谷甾醇是青蒿属植物的有效成分,具有抗菌、抗炎、抗氧化等作用^[37],能抑制炎症因子的产生^[38]。这些可能是四妙勇安汤发挥治疗痛风性关节炎作用的主要药效物质基础。MAPK信号通路主要参与细胞凋亡及炎症因子信号传递,既能调节免疫细胞的功能,又能促进免疫系统的活化,以助于抵抗外来的感染性病原体,干预并减弱机体对于炎症反应的发生^[39]。MAPK作为经典的炎症信号通路之一,转导包括细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、C-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)3条信号转导途径,其均介导了痛风性关节炎的发生与发展^[29]。

因此,建立痛风性关节炎大鼠模型,给予四妙勇安汤后,血清中IL-17A、IL-17F、COX-2、CXCL-2、IL-1 β 和TNF- α 等炎症因子含量降低,结合组织切片观察结果表明四妙勇安汤具有改善痛风性关节炎大鼠关节滑膜增生及炎症细胞浸润等组织病理学改变的作用,能有效减轻痛风性关节炎大鼠的炎性反应。qRT-PCR和Western blotting实验表明,与模型组相比,四妙勇安汤给药组MAPK3、MAP2K1基因mRNA和蛋白的MEK1/2、ErK1/2表达水平显著下调。MAPK3和MAP2K1都属于MAP激酶家族,MAPK3又称ERK1,与细胞的生长增殖、迁移等功能密切相关。MAP2K1又称MEK1,MEK作为MAPK激酶家族中的重要成员,包括MEK1和MEK2 2种亚型,介导其下游的靶蛋白ERK1和ERK2磷酸化,从而激活ERK1和ERK2,ERK1和ERK2磷酸化介导多种特异性蛋白的表达以及引起多种转录因子的活性改变,进而调控细胞生长、分化、发育等生理功能,参与细胞增殖分化、细胞迁

移等过程,调节MEK1/2、ErK1/2的表达,能够影响p-ERK介导的下游转录因子的表达,进而调控炎症反应^[39-41]。

本研究表明四妙勇安汤可以降低IL-17A、IL-17F、COX-2、CXCL-2、IL-1 β 、TNF- α 炎症因子含量,作用于MAPK信号通路,降低痛风性关节炎大鼠踝关节组织MEK1/2、ErK1/2蛋白表达,减轻痛风性关节炎造成的炎细胞浸润,减轻炎性反应,从而对痛风性关节炎有一定治疗作用。四妙勇安汤可能通过抑制MEK1/2-ERK1/2途径和降低炎症因子的表达来发挥治疗作用,但具体的作用机制尚未完全阐明,因此需要进一步的研究来解释这一现象。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Richette P, Doherty M, Pascual E, et al. 2018 updated European League Against Rheumatism evidence-based recommendations for the diagnosis of gout [J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(1): 31-38.
- [2] Vinik O, Wechalekar M D, Falzon L, et al. Treatment of asymptomatic hyperuricemia for the prevention of gouty arthritis, renal disease, and cardiovascular events: A systematic literature review [J]. J Rheumatol Suppl, 2014, 92: 70-74.
- [3] Keller S F, Lu N, Blumenthal K G, et al. Racial/ethnic variation and risk factors for allopurinol-associated severe cutaneous adverse reactions: A cohort study [J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77(8): 1187-1193.
- [4] Satpanich P, Pongsittisak W, Manavathongchai S. Early versus Late Allopurinol Initiation in Acute Gout Flare (ELAG): A randomized controlled trial [J]. Clin Rheumatol, 2022, 41(1): 213-221.
- [5] Van Son C, Loan N T H, Trang T H, et al. Predominant HLA alleles and haplotypes in mild adverse drug reactions caused by allopurinol in Vietnamese patients with gout [J]. Diagnostics (Basel), 2021, 11(9): 1611.
- [6] 孙伟. 秋水仙碱联合苯溴马隆治疗慢性痛风性关节炎临床疗效及不良反应 [J]. 中国药物与临床, 2020, 20(21): 3631-3633.
Sun W. Clinical efficacy and side effects of colchicine combined with benzbromarone in the treatment of chronic gouty arthritis [J]. Chin Remedies Clin, 2020, 20(21): 3631-3633.
- [7] Qin D E, Liang W, Yu Y, et al. Modified Simiaowan prevents and treats gouty arthritis via the Nrf2/NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt A): 116906.

- [8] Li N, Chen S L, Deng W Q, et al. Kaempferol attenuates gouty arthritis by regulating the balance of Th17/treg cells and secretion of IL-17 [J]. *Inflammation*, 2023, 46(5): 1901-1916.
- [9] Wang Y M, Zhang F F, Li X K, et al. Integrated multi-omics techniques and network pharmacology analysis to explore the material basis and mechanism of Simiao pill in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(12): 11138-11150.
- [10] Zhang X H, Liu J, Sun Y Q, et al. Chinese herbal compound Huangqin Qingrechubi capsule reduces lipid metabolism disorder and inflammatory response in gouty arthritis via the LncRNA H19/APN/PI3K/AKT cascade [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 541-555.
- [11] Chen R Y, Li F F, Zhou K, et al. Component identification of modified Sanmiao pills by UPLC-Xevo G2-XS QTOF and its anti-gouty arthritis mechanism based on network pharmacology and experimental verification [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 311: 116394.
- [12] 刘鹏, 张恩惠, 张薇, 等. 四妙勇安汤水煎液化学成分研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3232-3239.
- Liu P, Zhang E H, Zhang W, et al. Chemical constituents from Simiao Yong'an Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(14): 3232-3239.
- [13] 孙克寒, 杨会, 王淑琪, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析四妙勇安汤的化学成分 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(10): 2658-2667.
- Sun K H, Yang H, Wang S Q, et al. Identification of chemical constituents in Simiao Yong'an Decoction based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(10): 2658-2667.
- [14] 张星, 赖文静, 林夏, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优化经典名方四妙勇安汤煎煮工艺研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(10): 3109-3119.
- Zhang X, Lai W J, Lin X, et al. Optimization of decocting process of Simiao Yong'an Decoction by Box-Behnken design-response surface methodology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(10): 3109-3119.
- [15] 叶招娣, 周绍唐, 徐璐, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨四妙勇安汤治疗冠心病的分子机制 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(5): 782-790.
- Ye Z D, Zhou S T, Xu L, et al. Mechanism of Simiao Yong'an Decoction in the treatment of coronary heart disease based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2022, 20(5): 782-790.
- [16] 李娜, 曲晓波, 蔺爽, 等. 四妙勇安汤对大鼠血栓闭塞性脉管炎的抗炎作用及其机制 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2013, 39(2): 264-267, 428.
- Li N, Qu X B, Lin S, et al. Anti-inflammatory effect of Simiaoyong'an Decoction in thromboangiitis obliterans rats and its mechanism [J]. *J Jilin Univ Med Ed*, 2013, 39(2): 264-267, 428.
- [17] 宋哲, 路占忠, 李振彬. 四妙勇安方水提物对大鼠急性痛风性关节炎的治疗作用及其对外周血 IL-1 β 、TNF- α 和 MIF 水平的影响 [J]. *解放军医药杂志*, 2016, 28(5): 20-23.
- Song Z, Lu Z Z, Li Z B. Therapeutic effect of simiaoyong'an recipe aqueous extract and its influence on peripheral blood IL-1 β , TNF- α and MIF levels in rats with acute gouty arthritis [J]. *Med Pharm J Chin People's Liberation Army*, 2016, 28(5): 20-23.
- [18] 钟君, 刘洁, 刘燕云. 四妙勇安汤作用机制研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(32): 25-26, 30.
- Zhong J, Liu J, Liu Y Y. Research progress on mechanism of Simiao Yong'an Decoction [J]. *World Latest Med Inf*, 2017, 17(32): 25-26, 30.
- [19] 李伟东, 王光宁. 四妙勇安汤抗炎有效部位的 HPLC 图谱研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2006, 22(5): 312-313, 341.
- Li W D, Wang G N. A study into HPLC chromatography of effective anti-inflammatory parts of Simiao Yong'an Decoction [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2006, 22(5): 312-313, 341.
- [20] 揭珊珊, 刘建鑫, 于峥, 等. 四妙勇安汤抗炎机制的研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(9): 1539-1542.
- Jie S S, Liu J X, Yu Z, et al. Research progress on anti-inflammatory mechanism of Simiao Yong'an Decoction [J]. *J Basic Chin Med*, 2022, 28(9): 1539-1542.
- [21] Zhou Q, Sun H J, Liu S M, et al. Anti-inflammation effects of the total saponin fraction from *Dioscorea nipponica* Makino on rats with gouty arthritis by influencing MAPK signalling pathway [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 261.
- [22] 轩辕敏生. 四妙勇安汤治疗痛风性关节炎疗效观察 [J]. *实用中医内科杂志*, 2011, 25(9): 73-74.
- Xuanyuan M S. Effective observation on treating gouty arthritis with Simiao Yong'an Decoction [J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2011, 25(9): 73-74.
- [23] 汤样华, 李宝萍, 莫亚峰, 等. 加味四妙勇安汤治疗湿热蕴结型急性痛风性关节炎的疗效观察 [J]. *中国现代医生*, 2022, 60(15): 148-151.
- Tang Y H, Li B P, Mo Y F, et al. Observation on the efficacy of modified Simiao Yong'an Decoction(four-valiant Decoction for well-being with additional integrants) in the treatment of acute gouty arthritis of damp-heat accumulation type [J]. *China Mod Dr*, 2022, 60(15): 148-151.

- [24] 刘少灿, 钟秀华, 汤意芝. 皮内针联合四妙散合四妙勇安汤加减内服治疗急性痛风性关节炎湿热型患者的疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16(8): 1511-1514, 1519.
Liu S C, Zhong X H, Tang Y Z. Clinical observation on treatment of acute gouty arthritis damp-heat type patients with intradermal acupuncture combined with Simiao San and Simiao Yong'an Decoction [J]. World J Integr Tradit West Med, 2021, 16(8): 1511-1514, 1519.
- [25] 江厚辰, 徐逸生, 张葆青, 等. 基于网络药理学和分子对接技术研究四妙勇安汤治疗痛风性关节炎的作用机制 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(11): 1320-1326.
Jiang H C, Xu Y S, Zhang B Q, et al. Mechanism of Simiao Yong'an Decoction in the treatment of gout arthritis based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2021, 21(11): 1320-1326.
- [26] 李兵, 曾琪, 马安献, 等. 经典名方四妙勇安汤颗粒的制备工艺研究 [J]. 生物化工, 2020, 6(2): 63-65.
Li B, Zeng Q, Ma A X, et al. Study on the preparation technology of simiaoyongantang granules [J]. Biol Chem Eng, 2020, 6(2): 63-65.
- [27] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1988, 29(3): 461-466.
- [28] Zhang K H, Wang M Q, Wei L L, et al. Investigation of the effects and mechanisms of Dendrobium loddigesii Rolfe extract on the treatment of gout [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 4367347.
- [29] Cao Y P, Zhong Q, Tang F, et al. Anethole ameliorates inflammation induced by monosodium urate in an acute gouty arthritis model via inhibiting TLRs/MyD88 pathway [J]. Allergol Immunopathol, 2022, 50(6): 107-114.
- [30] 欧阳香, 丁婷, 杨海艳, 等. 痛风性关节炎发病机制相关信号通路的研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 234-240.
Ouyang X, Ding T, Yang H Y, et al. Research progress of signal pathway related to pathogenesis of gouty arthritis [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(4): 234-240.
- [31] 章晓云, 曾浩, 李华南, 等. 痛风性关节炎的发病机制及中医药治疗研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11): 256-267.
Zhang X Y, Zeng H, Li H N, et al. Pathogenesis of gouty arthritis and intervention with Chinese medicines: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(11): 256-267.
- [32] Nutmakul T. A review on benefits of quercetin in hyperuricemia and gouty arthritis [J]. Saudi Pharm J, 2022, 30(7): 918-926.
- [33] Feng W, Zhong X Q, Zheng X X, et al. Study on the effect and mechanism of quercetin in treating gout arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 111: 109112.
- [34] Pan D M, Li N, Liu Y Y, et al. Kaempferol inhibits the migration and invasion of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by blocking activation of the MAPK pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 55: 174-182.
- [35] Oyagbemi A A, Omobowale T O, Ola-Davies O E, et al. Luteolin-mediated Kim-1/NF- κ B/Nrf2 signaling pathways protects sodium fluoride-induced hypertension and cardiovascular complications [J]. Biofactors, 2018, 44(6): 518-531.
- [36] 沈瑞明, 李国铨, 钟良宝. 木犀草素对急性痛风性关节炎模型大鼠的抗炎作用研究 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25(17): 1300-1303.
Shen R M, Li G Q, Zhong L B. Anti-inflammatory effect of luteolin in acute gouty arthritis model rats [J]. J Hainan Med Univ, 2019, 25(17): 1300-1303.
- [37] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
Chen Y K, Zeng A, Luo Z H, et al. Advances on pharmacology of β -sitosterol [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2021, 37(1): 148-153.
- [38] Liao P C, Lai M H, Hsu K P, et al. Identification of β -sitosterol as in vitro anti-inflammatory constituent in Moringa oleifera [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(41): 10748-10759.
- [39] Zhou Q, Sun H J, Liu S M, et al. Anti-inflammation effects of the total saponin fraction from Dioscorea nipponica Makino on rats with gouty arthritis by influencing MAPK signalling pathway [J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 261.
- [40] Zhang L L, Wei W, Wang Q T, et al. Cross-talk between MEK1/2-ERK1/2 signaling and G protein-couple signaling in synoviocytes of collagen-induced arthritis rats [J]. Chin Med J, 2008, 121(22): 2278-2283.
- [41] Chen H H, Shao X, Li L, et al. Electroacupuncture serum inhibits TNF- α -mediated chondrocyte inflammation via the Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 5807-5814.

[责任编辑 兰新新]