

痛风液抗痛风性关节炎的实验研究

杨和金, 苏梅*, 赵春梅, 崔涛

(云南省药物研究所 天然药物筛选中心, 云南 昆明 650111)

摘要:目的 研究痛风液抗痛风性关节炎的作用。方法 采用微晶型尿酸钠诱导的大鼠痛风性关节炎模型、小鼠痛风性关节炎模型、家兔急性痛风性关节炎模型, 对其进行主要的药效学研究。结果 痛风液外涂给药, 在 0.66、1.32、2.64 g/kg 剂量下对微晶型尿酸钠诱导的小鼠足肿胀有显著抑制作用; 在 0.33、0.66、1.32 g/kg 剂量下对大鼠急性痛风性关节炎有显著抑制作用。在 0.66、0.33 g/kg 剂量下对家兔急性痛风性关节炎具有显著的保护作用。结论 痛风液具有抗痛风性关节炎作用, 作用与减少炎性物质渗出, 抑制白细胞聚集有关。

关键词: 痛风液; 痛风性关节炎; 微晶型尿酸钠

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1504-04

痛风液是由丽江山慈菇、七叶莲茎叶、黄柏等 8 味中药组成的复方制剂, 具有消肿止痛之功效, 主治痛风性关节炎, 临床用于治疗痛风性关节炎, 对红肿、热痛诸症疗效非常显著。为了验证该制剂的临床疗效, 并将其开发成中药新药, 根据其功能主治, 本课题组对该药进行了治疗痛风性关节炎的实验研究。

1 材料

1.1 药品: 痛风液为中试样品, 批号 20080528, 由本所科研管理部提供, 含原生药 0.3 g/mL, 含大黄素 80 μg/mL、秋水仙碱 75 μg/mL、薄荷脑 6 mg/mL, 为棕色均一液体, 溶剂为 65% 乙醇, 临床用量为 3.9 g/d, 3~4 次/d。试验时动物外涂给药, 小鼠用量为 2.64、1.32、0.66 g/kg; 大鼠用量为 1.32、0.66、0.33 g/kg; 家兔用量 0.66、0.33、0.165 g/kg。

1.2 阳性对照药品: 吲哚美辛片, 昆明振华制药有限公司生产(批号 20070901) 用卡波姆凝胶基质配制成 10 mg/mL 的凝胶, 供动物外涂给药。

1.3 试剂: 微晶型尿酸钠, Sigma 公司产品, 用时以生理盐水配制成 100 mg/mL 混悬液。血尿酸试剂盒, 中生北控生物科技有限公司生产; 大鼠白细胞介素-1β(IL-1β) 酶联免疫检测试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α) 酶联免疫检测试剂盒, 美国 R&D 公司生产, 深圳赛尔生物技术有限公司分装。

1.4 动物: ICR 小鼠, 体质量 18~22 g; SD 大鼠, 体质量 180~220 g; 日本大耳白家兔, 体质量 2.2~2.5 kg; 由昆明医学院动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(滇)20050008, 动物使用许可证:

SYXK(滇)20050001。

1.5 仪器: JJ2000 精密电子天平, 常熟双杰测试仪器有限公司; XS-201 显微镜, 南京江南光电(集团)股份有限公司; 游标卡尺, 桂林广陆数字测控股份公司; UV-2501 紫外分光光度计, 日本岛津公司生产。

2 方法

2.1 对尿酸钠诱导大鼠痛风性关节炎的影响^[1-2]: 70 只雄性大鼠, 随机分为 7 组, 分别为对照组、模型组、溶剂对照组、吲哚美辛组、痛风液 3 个剂量组。各组动物每天按剂量涂药, 连续 3 d; 于末次给药后 30 min, 固定大鼠, 将右踝关节弯曲, 局部消毒后, 用 6 号注射针自两骨突之间进针, 除对照组大鼠注射生理盐水 0.05 mL 外, 其余各组大鼠在右关节腔内注射尿酸钠生理盐水混悬液 0.05 mL, 以关节囊对侧鼓起为注入标准, 诱导痛风性关节炎的发生。检测指标: (1) 关节肿胀度: 分别用游标卡尺测量致炎前及致炎后 1、2、4、6、8 h 大鼠右踝关节的厚度, 以致炎前后的差值作为痛风性关节炎的肿胀度。(2) 对大鼠血清中血尿酸水平的影响: 致炎后 48 h 麻醉动物, 眼眶后静脉丛取血, 离心分离血清, 按血尿酸试剂盒说明书进行血尿酸水平检测。(3) 对大鼠关节及周围软组织中 IL-1β 及 TNF-α 的影响: 致炎 48 h 取血后, 处死动物, 取关节滑膜及周围软组织, 称质量, 在冰浴中制成匀浆, 按 1:20 比例加生理盐水稀释, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 分装于 Ep 管中, 于 -80 ℃ 冰箱保存, 按双抗体夹心 ELISA 法试剂盒说明书进行 IL-1β、TNF-α 定量检测。

* 收稿日期: 2010-02-03

基金项目: 重点创新工程[中药现代化科技产业(云南)基地建设]项目(2008IF015)

作者简介: 杨和金(1972-), 男, 云南省牟定县人, 高级工程师, 研究方向为新药研究开发。

Tel: 13888971905 E-mail: yanghejindayuan@sina.com

* 通讯作者 苏梅 Tel: (0871) 6220009-8301 E-mail: smkms@126.com

2.2 对尿酸钠诱导小鼠痛风性关节炎的影响: 70 只雄性小鼠, 分组及给药方法同 2.1 项。于末次给药后 30 min, 除对照组小鼠在右足垫部注射生理盐水 0.05 mL 外, 其余各组小鼠在右足垫部注射尿酸钠生理盐水混悬液 0.05 mL, 诱导痛风性关节炎的发生。分别用游标卡尺测量致炎前及致炎后 1、2、4、6 h 小鼠右足垫部的宽度, 以致炎前后的差值作为痛风性关节炎的肿胀度。

2.3 对尿酸钠诱导的家兔急性痛风性关节炎的影响: 取 2.2~2.5 kg 雄性大耳白兔 56 只, 分组方法同 2.1 项, 各组动物每日按剂量右后关节涂药, 连续 3 d; 末次给药后 30 min, 除对照组关节腔注射生理盐水外, 其余各组每只家兔右膝关节腔内注射尿酸钠生理盐水混悬液 0.6 mL, 诱导痛风性关节炎的发生。检测指标: (1) 关节液白细胞计数, 致炎后 6 h 处死家兔, 收集关节液, 取 20 μL 进行白细胞计数。

表 1 痛风液对痛风性关节炎大鼠关节肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of Tongfeng Liquid on joint swelling of gouty arthritic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	致炎前关节厚度/ mm	致炎后不同时间关节肿胀度/mm				
			1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
对照	-	4.81 ± 0.21	0.11 ± 0.17	0.03 ± 0.27	0.02 ± 0.18	0.01 ± 0.14	0.04 ± 0.24
模型	-	4.40 ± 0.13	0.76 ± 0.13 ^{▲▲}	1.48 ± 0.16 ^{▲▲}	1.66 ± 0.24 ^{▲▲}	2.09 ± 0.15 ^{▲▲}	1.82 ± 0.26 ^{▲▲}
溶剂	-	4.44 ± 0.24	0.62 ± 0.26	1.43 ± 0.23	1.62 ± 0.29	1.93 ± 0.31	1.82 ± 0.27
吲哚美辛	0.000 05	4.23 ± 0.27	0.51 ± 0.20 [*]	0.74 ± 0.14 ^{**}	1.29 ± 0.23 ^{**}	1.77 ± 0.22 ^{**}	1.72 ± 0.22
痛风液	1.32	4.21 ± 0.19	0.63 ± 0.19	0.82 ± 0.18 ^{**△△}	1.36 ± 0.25 [△]	1.73 ± 0.47 [*]	1.99 ± 0.40
	0.66	4.20 ± 0.27	0.73 ± 0.27	0.82 ± 0.34 ^{**△△}	1.34 ± 0.31 [△]	1.70 ± 0.37 ^{**}	1.95 ± 0.28
	0.33	4.32 ± 0.26	0.58 ± 0.20 [*]	0.91 ± 0.29 ^{**△△}	1.31 ± 0.32 [△]	1.74 ± 0.61 [*]	1.76 ± 0.55

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与溶剂组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs solution group

3.1.2 对痛风性关节炎大鼠血清中血尿酸和关节及周围组织中 IL-1 β 及 TNF- α 水平的影响: 大鼠关节腔内注入微晶尿酸钠 48 h 后, 模型组大鼠关节周围组织中的 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著升高, 与对照组比较具有非常显著的差异 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 痛风液 3 个剂量组大鼠关节组织中的 IL-1 β 和 TNF- α 水平仅有降低趋势, 但无统计学意义。痛风液 3 个剂量组大鼠的血尿酸水平介于模型组与对照组之间。结果见表 2。

3.2 对小鼠痛风性关节炎的影响: 小鼠足垫部注射微晶尿酸钠后, 模型组与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 证明尿酸盐诱导的小鼠痛风性关节炎模型成功。痛风液 3 个剂量在不同时间点对尿酸盐诱导的小鼠足肿胀均有显著抑制作用, 尤其是 1.32、0.66 g/kg 剂量在造模后 1 h 有非常显著的抑制作用。提示痛风液对小鼠痛风性关节炎具有显著的拮抗作用。结果见表 3。

(2) 关节滑膜及周围软组织病理学检查: 用手术刀切开家兔膝关节, 取滑膜及周围软组织于福尔马林中固定, 进行病理组织学检查。

2.4 统计方法: 采用统计软件 SPSS 11.5 处理数据, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布数据用 t 检验, 偏态分布数据用秩和检验进行数理统计。

3 结果

3.1 对大鼠痛风性关节炎的影响

3.1.1 对痛风性关节炎大鼠关节肿胀的影响: 大鼠关节腔内注入微晶尿酸钠后, 模型组关节肿胀度与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 证明尿酸钠诱导的大鼠痛风性关节炎模型成功。痛风液 3 个剂量在不同时间点对尿酸钠诱导的大鼠关节肿胀均有显著的抑制作用, 其中 0.33 g/kg 剂量组在致炎后 1 h 已显示出显著的抑制作用。提示痛风液对大鼠痛风性关节炎肿胀具有显著的拮抗作用。结果见表 1。

表 2 痛风液对痛风性关节炎大鼠血尿酸和关节组织中 IL-1 β 、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of Tongfeng Liquid on uric acid in serum and IL-1 β , TNF- α levels in joint tissue of gouty arthritic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	TNF- α /(pg · g ⁻¹)	IL-1 β /(pg · g ⁻¹)	血尿酸/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	-	1.78 ± 0.88	0.11 ± 0.11	151.49 ± 59.28
模型	-	7.74 ± 4.04 ^{▲▲}	1.00 ± 1.06 ^{▲▲}	43.95 ± 22.87
溶剂	-	6.41 ± 3.63	0.94 ± 0.30	59.40 ± 10.48
吲哚美辛	0.000 05	2.91 ± 1.62 ^{**}	0.23 ± 0.18 [*]	61.39 ± 39.42
痛风液	1.32	5.09 ± 1.19	0.67 ± 0.34	46.82 ± 10.40
	0.66	5.22 ± 1.08	0.72 ± 0.64	59.92 ± 8.45
	0.33	5.68 ± 1.19	0.64 ± 0.24	49.61 ± 15.93

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

3.3 对尿酸钠诱导家兔急性痛风性关节炎的影响

3.3.1 对急性痛风性关节炎家兔关节液中白细胞数的影响: 家兔关节腔内注入微晶尿酸钠混悬液后, 与对照组比较, 模型组动物关节腔中的白细胞数显

著升高,证明造模成功。而痛风液 0.66、0.33 g/kg 剂量能使家兔关节腔中的白细胞数量明显减少,且 0.66 g/kg 剂量具有非常显著的差异,结果表明痛风液对微晶型尿酸钠所致的急性炎症具有显著的改善作用。结果见表 4。

3.3.2 关节及周围软组织病理学检查:病理组织学检查表明,对照组家兔膝关节软组织未见异常,即滑膜细胞、滑膜内组织结构正常,未见中性白细胞浸润。模型组家兔关节软组织炎症显著,滑膜层明显增厚,滑膜层局部可见炎性灶,滑膜内组织充血水

表 3 痛风液对痛风性关节炎小鼠足肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Tongfeng Liquid on paw swelling of gouty arthritic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	致炎前足垫宽度/ mm	致炎后不同时间足肿胀度/mm			
			1 h	2 h	4 h	6 h
对照	-	4.75±0.29	0.12±0.15	0.04±0.17	0.02±0.11	0.06±0.13
模型	-	4.79±0.29	0.51±0.33 ^{▲▲▲}	0.68±0.32 ^{▲▲▲}	1.04±0.33 ^{▲▲▲}	1.09±0.48 ^{▲▲▲}
溶剂	-	4.79±0.29	0.27±0.28	0.48±0.42	0.97±0.37	1.03±0.54
吲哚美辛	0.00005	4.72±0.29	0.32±0.31	0.37±0.35 [*]	0.40±0.43 ^{**}	0.74±0.56
痛风液	2.64	4.78±0.29	0.28±0.32	0.43±0.41	0.64±0.43 [*]	1.05±0.50
	1.32	4.72±0.26	0.20±0.18 [*]	0.03±0.30 [*]	0.72±0.39 [*]	0.87±0.44
	0.66	4.77±0.20	0.15±0.18 [*]	0.55±0.44	0.60±0.41 ^{**v}	0.85±0.39

与对照组比较: $w w w P < 0.001$; 与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$; 与溶剂组比较: $v P < 0.05$

$w w w P < 0.001$ vs control group; $* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group; $v P < 0.05$ vs solution group

表 4 痛风液对痛风性关节炎家兔关节腔中白细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Tongfeng Liquid on WBC number in joint cavity of gouty arthritic rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	白细胞/($10^9 \cdot L^{-1}$)
对照	-	0.28±0.55
模型	-	78.69±23.94 ^{w w}
溶剂	-	73.12±27.83
吲哚美辛	0.00005	10.25±7.58 ^{**}
痛风液	0.66	40.81±11.67 ^{**v}
	0.33	51.00±26.49 [*]
	0.165	78.70±25.25

与对照组比较: $w w w P < 0.01$; 与模型组比较: $* P < 0.05$

$** P < 0.01$; 与溶剂组比较: $v P < 0.05$

$w w w P < 0.01$ vs control group; $* P < 0.05$ $** P < 0.01$ vs model group; $v P < 0.05$ vs solution group

肿,弥漫性的中性粒细胞、单核细胞浸润。溶剂组家兔关节软组织可见明显炎症,滑膜层增厚明显,滑膜层局部可见炎性灶,滑膜内组织充血水肿,弥漫性的中性粒细胞、单核细胞浸润。阳性药吲哚美辛组家兔关节软组织炎症较轻,滑膜细胞出现一定增生,滑膜内组织仅见少量的中性粒细胞浸润,局部有少量出血。痛风液 0.66、0.33 g/kg 剂量组家兔关节滑膜细胞可见一定增生,滑膜层局部可见较小炎性灶,滑膜内组织仅见轻度充血水肿,有少量散在的中性粒细胞浸润。痛风液 0.165 g/kg 剂量组家兔关节滑膜细胞增生明显,滑膜内组织轻度充血水肿,有弥漫性的中性粒细胞和单核细胞浸润。结果见图 1。与模型组比较,痛风液 0.66、0.33 g/kg 剂量能显著改善家兔关节软组织的病理损伤程度。结果提示痛

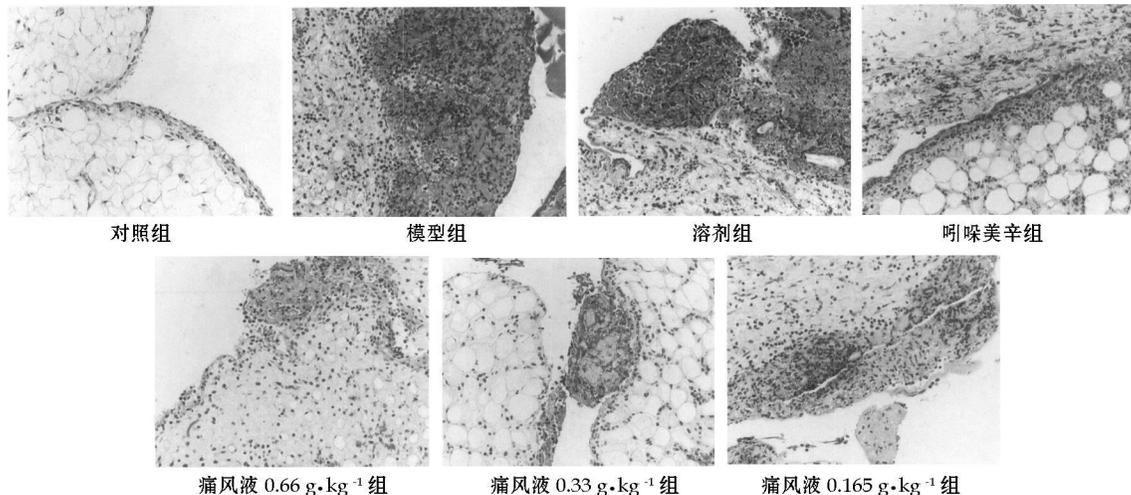


图 1 痛风性关节炎家兔关节软组织病理学观察

Fig. 1 Observation of pathology of joint soft tissue of gouty arthritic rabbits

风液对微晶型尿酸钠诱导的家兔急性痛风性关节炎具有明显的保护作用。

4 讨论

痛风性关节炎发作的主要原因是尿酸钠沉积于关节组织中,诱使炎症细胞聚集到关节周围发生吞噬反应,在吞噬反应过程中吞噬细胞破裂释放出多种致炎致痛因子,引起局部组织血管扩张、充血、毛细血管通透性增加,炎性物质大量渗出,使关节周围组织发生广泛的炎症反应,局部关节表现为明显的红肿热痛。因此抑制炎症细胞聚集,控制炎性物质渗出,降低毛细血管通透性是治疗急性痛风性关节炎的重要措施。

痛风液是由丽江山茨菇、七叶莲茎叶、黄柏等 8 味中药组成的复方制剂,具有消肿止痛之功效,主治痛风性关节炎,临床用于治疗痛风性关节炎。为了验证该制剂的临床疗效,本研究采用与人类痛风性关节炎发病机制相似的大鼠、小鼠痛风性关节炎模型、

家兔急性痛风性关节炎模型对其进行主要的药效学研究。结果证明痛风液对微晶型尿酸钠诱导的小鼠足肿胀和大鼠、家兔痛风性关节炎具有显著的抑制作用,表现为明显减轻致炎部位的肿胀程度,显著降低急性痛风性关节炎家兔关节腔中的白细胞数量和改善关节软组织的病理损伤程度;但痛风液对痛风性关节炎大鼠关节软组织中的 IL-1 β 、TNF- α 和尿酸水平无明显影响。结果提示,痛风液可能是通过抑制白细胞聚集、减少炎性物质渗出、降低毛细血管通透性,而对急性痛风性关节炎产生抑制作用。

致谢:本研究是在梅学仁教授悉心指导下完成的。

参考文献:

- [1] 王四旺,施新猷¹ 中药药效学研究及评价[M] 陕西:陕西科学技术出版社,2005
- [2] 唐春萍,江涛,田伟,等¹ 痛风舒胶囊对痛风模型动物抗炎作用及机制的研究[J] 中草药,2007,38(8):1225-1228

藿香正气软胶囊提取物对腹泻型肠易激综合征大鼠胃肠激素的调节作用

吕妍,徐芳,李丹,唐方*
(天津医科大学总医院 中医科,天津 300052)

摘要:目的 从胃肠激素水平探讨藿香正气软胶囊提取物对腹泻型肠易激综合征(D-IBS)模型大鼠肠动力紊乱的调节作用。方法 以 ig 番泻叶水煎剂和四肢束缚应激 2 h,连续 6 d,建立 D-IBS 大鼠模型。同时用药各组分别 ig 804、536、268 mg/kg 藿香正气软胶囊提取物。采用硝酸还原酶法、ELISA 法、免疫组化法及放免法测定 D-IBS 模型大鼠血清 NO、5-羟色胺(5-HT)、结肠黏膜嗜铬细胞(EC)、血浆胃动素、结肠组织生长抑素(SS)的水平。结果 藿香正气软胶囊提取物能够提高 D-IBS 模型大鼠血清 NO 水平($P < 0.01$),有效降低 5-HT 浓度($P < 0.05$),使 EC 数量减少($P < 0.01$),下调血浆胃动素、结肠组织 SS 水平($P < 0.01$),以中剂量组效果最为显著。结论 藿香正气软胶囊提取物对 D-IBS 模型大鼠胃肠激素具有调节作用。

关键词:藿香正气软胶囊提取物;腹泻型肠易激综合征;胃肠激素

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)09-1507-04

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)^[1]是临床最常见的一种胃肠道功能紊乱性疾病,近年已被公认为系一类具有特殊病理心理基础的身心疾病,是一组包括腹痛、腹胀、以大便习惯改变为主要特征,并伴大便性状异常,持续存在或间歇发作,而又缺乏形态学和生物化学异常改变可解释的临床症状,大致可分为腹泻型、便秘型、腹泻便秘交替型和腹痛型。有关 IBS 的发病机制,涉及胃肠

动力异常、内脏感觉异常、肠道感染、应激事件、行为因素等多方面。目前认为,胃肠动力异常是症状发生的主要病理基础。藿香正气软胶囊提取物源自宋代⁵太平惠民和剂局方⁶的藿香正气散,目前广泛用于现代医学的胃肠型感冒、慢性肠炎等^[2-3]。本课题组通过观察藿香正气软胶囊提取物对腹泻型肠易激综合征(D-IBS)模型大鼠胃肠激素的影响,旨在阐释中医经典方药对 D-IBS 模型大鼠肠动力紊乱

* 收稿日期:2010-01-21
基金项目:天津市科委科技创新专项基金资助项目(07FDZDS H01001)
作者简介:吕妍(1969),女,天津人,副主任医师,硕士,研究方向为消化系统疾病及肾脏疾患。E-mail: doctorydongxiu@163.com