

金藤清痹颗粒治疗急性痛风性关节炎的作用机制研究

卫博文^{1,2}, 高晶月^{1,2#}, 刘 维^{1,2*}, 王爱华^{1,2}, 岳青云^{1,2}, 顾庆香^{1,2}, 卡玉秀^{1,2}, 林芳芳^{1,2}, 苟小平^{1,2}, 王 文^{1,2}

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300193

摘要: **目的** 应用网络药理学分析金藤清痹颗粒治疗急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 的作用机制, 并建立 AGA 大鼠模型进行验证。 **方法** 在清热解毒、活血止痛治法指导下, 通过 TCMSPP 数据库搜集金藤清痹颗粒的活性成分及靶点, 利用 GeneCards、NCBI 数据库等搜集 AGA 相关靶点, 与金藤清痹颗粒作用靶点整合后, 构建共有靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络和“金藤清痹颗粒-中药-活性成分-靶点-AGA”网络, 并进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、秋水仙碱 (0.3 mg/kg) 组和金藤清痹颗粒低、中、高剂量 (1.05、2.10、4.20 g/kg) 组, 每组 6 只, 踝关节注射单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 晶体建立 AGA 大鼠模型。采用游标卡尺测量大鼠踝关节直径, 计算踝关节肿胀度; 采用全自动生化仪检测血清尿酸 (serum uric acid, SUA)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察踝关节组织病理变化; 采用 qRT-PCR、ELISA 和 Western blotting 检测踝关节组织及血清中关键靶点和信号通路的表达。 **结果** 共检索到金藤清痹颗粒 110 种活性成分、212 个作用靶点, 272 个 AGA 治疗靶点, 共有靶点 29 个, 关键靶点有白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 及 IL-6, 涉及 TNF 信号通路、IL-17 信号通路和 NOD 样受体信号通路等。大鼠踝关节注射 MSU 晶体后明显肿胀 ($P < 0.01$), SUA 及 CRP 显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 滑膜组织增生明显、结构紊乱, 有大量炎症细胞浸润, NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、NIMA 相关蛋白激酶 7 (NIMA-related kinases 7, NEK7)、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)、消皮素 D (gasdermin D, GSDMD)、IL-18、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 秋水仙碱或金藤清痹颗粒治疗后, 有效缓解踝关节肿胀 ($P < 0.05$ 、0.01), SUA 及 CRP 均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 关节滑膜增生、炎症细胞浸润均得到改善, 同时显著抑制 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 等靶点和 NOD 样受体信号通路的表达 ($P < 0.05$ 、0.01)。 **结论** 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠具有明显的保护作用, 其机制可能与抑制 NOD 样受体信号通路的异常激活, 降低炎症因子水平, 改善关节滑膜增生、炎症细胞浸润有关。

关键词: 网络药理学; 金藤清痹颗粒; 急性痛风性关节炎; NOD 样受体信号通路; 炎症因子; 清热解毒; 活血止痛

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)21-7086-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.017

Mechanism of Jinteng Qingbi Granules in treatment of acute gouty arthritis

WEI Bo-wen^{1,2}, GAO Jing-yue^{1,2}, LIU Wei^{1,2}, WANG Ai-hua^{1,2}, YUE Qing-yun^{1,2}, GU Qing-xiang^{1,2}, KA Yu-xiu^{1,2}, LIN Fang-fang^{1,2}, GOU Xiao-ping^{1,2}, WANG Wen^{1,2}

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the mechanism of Jinteng Qingbi Granules (金藤清痹颗粒) in treating acute gouty arthritis (AGA) by network pharmacology and establish AGA rat model for verification. **Methods** The active components and targets of Jinteng

收稿日期: 2023-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074377); 中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 岐黄学者 (20210602-1); 国家中医药管理局名老中医传承工作室 (975022); 金藤清痹颗粒二次开发项目 (20220626-1)

作者简介: 卫博文, 男, 博士研究生, 研究方向为风湿免疫类疾病发病机制及中药防治研究。E-mail: 278713948@qq.com

*通信作者: 刘 维, 女, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向为风湿免疫类疾病发病机制及中药防治研究。E-mail: fengshiliuwei@163.com

#共同第一作者: 高晶月, 女, 主治医师, 博士, 研究方向为中西医结合诊疗风湿病。E-mail: gaojingyue0603@163.com

Qingbi Granules were collected by TCMS database, and AGA-related targets were collected by GeneCards and NCBI database under the guidance of clearing heat and detoxification, promoting blood circulation and relieving pain. After integrating with the targets of Jinteng Qingbi Granules, protein-protein interaction (PPI) and “Jinteng Qingbi Granules-traditional Chinese medicine-active component-target-AGA” network was constructed, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out. Male SD rats were randomly divided into blank group, model group, colchicine (0.3 mg/kg) group and Jinteng Qingbi Granules low-, medium- and high-dose (1.05, 2.10, 4.20 g/kg) groups, with six rats in each group. The AGA rat model was established by ankle injection of monosodium urate (MSU) crystals. The diameter of ankle joint in rats was measured by vernier caliper, and the swelling degree of ankle joint was calculated. Serum uric acid (SUA) and C-reactive protein (CRP) levels were detected by automatic biochemical analyzer. HE staining was used to observe the pathological changes of ankle joint. qRT-PCR, ELISA and Western blotting were used to detect the expressions of key targets and signal pathways in ankle joint tissue and serum. **Results** A total of 110 active ingredients, 212 targets and 272 AGA therapeutic targets were retrieved, with a total of 29 common targets. The key targets were interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF) and IL-6, involving TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway and NOD-like receptor signaling pathway. After injecting MSU crystal into the ankle joint of rats, the swelling was obvious ($P < 0.01$), SUA and CRP were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), synovial tissue proliferated obviously, the structure was disordered, and a large number of inflammatory cells infiltrated. NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), NIMA-related kinases 7 (NEK7), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1), gasdermin D (GSDMD), IL-18, IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression levels were significantly increased ($P < 0.01$). After treatment with colchicine or Jinteng Qingbi Granules, ankle swelling was effectively relieved ($P < 0.05, 0.01$), SUA and CRP were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration of joints were improved, and the expressions of IL-1 β , TNF- α and IL-6 and NOD-like receptor signaling pathway were significantly inhibited ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Jinteng Qingbi Granules has significant protective effects on AGA rats, and the mechanism may be related to the inhibition of abnormal activation of NOD-like receptor signaling pathway, reducing inflammatory factor levels, and improvement of synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration in joints.

Key words: network pharmacology; Jinteng Qingbi Granules; acute gouty arthritis; NOD-like receptor signaling pathway; inflammatory factor; clearing heat and detoxification; promoting blood circulation and relieving pain

急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 是由于机体嘌呤代谢异常和 (或) 尿酸排泄减少, 导致血尿酸升高, 单钠尿酸盐析出、沉积于关节所致的疾病, 具有高发病率和致残率。近年来, 随着生活水平提高, 痛风患病率呈逐年上升趋势, 且发病年龄趋于年轻化^[1-2]。2020 年美国风湿病学会痛风管理指南^[3]推荐秋水仙碱、非甾体抗炎药和糖皮质激素为治疗 AGA 的药物。西医可有效缓解患者症状, 但目前用于治疗 AGA 的药物会导致患者出现中枢神经系统及胃肠道不良反应^[4], 因此有必要寻找安全有效的治疗药物。中医药治疗 AGA 历史悠久, 具有疗效显著、不良反应小等优势, 在长期临床实践中积累了丰富经验。

金藤清痹颗粒为“四妙勇安汤”加减化裁而来, 由金银花、青风藤、鹿衔草、山慈菇、蜈蚣等 11 味中药组成, 有清热解毒、活血止痛之功, 具有抗炎、止痛、解热和免疫调节作用^[5-6]。临床上金藤清痹颗粒也常用于 AGA 的治疗, 但相关研究鲜有报道。本研究以刘维教授的“毒痹论”为指导思想^[7-8], 以

金藤清痹颗粒作为清热解毒、活血止痛治法的载体, 将网络药理学^[9]与动物实验相结合, 通过踝关节注射单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 晶体建立 AGA 大鼠模型, 评价金藤清痹颗粒治疗 AGA 的疗效, 并探索其相关作用机制, 以期为临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只, 6 周龄, 体质量 (200 \pm 10) g, 购自北京斯贝福实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010。大鼠饲养于天津市南开医院清洁级动物房, 12 h 光照循环, 普通饲料喂养, 自由进食饮水。所有操作及动物处理均严格遵守相关动物保护及使用规定, 伦理批准号 NKYY-DWLL-2023-043。

1.2 药品与试剂

金藤清痹颗粒 (国药准字 Z20123065, 批号 28180061) 由鲁南厚普制药有限公司提供; MSU (批号 BCCF5862)、聚山梨酯 80 (批号 096K00781) 购

自美国 Sigma 公司；秋水仙碱片（国药准字 H20113208，批号 20220302）购自广东彼迪药业有限公司；白细胞介素-1 β （interleukin-1 β ，IL-1 β ）、IL-6、IL-18、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α ，TNF- α ）ELISA 试剂盒（批号分别为 2023032947R、2023032990R、2023032994R、2023032980R）购自江苏酶免实业有限公司；HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗（批号 20000671）、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗（批号 20000679）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1（cystein-aspartate protease-1，Caspase-1）抗体（批号 00121900）、消皮素 D（gasdermin D，GSDMD）抗体（批号 00122309）、 β -actin 抗体（批号 10025459）购自美国 Proteintech 公司；NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）抗体（批号 5123）购自美国 SAB 公司；凋亡相关斑点样蛋白（apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD，ASC）抗体（批号 10w2797）、NIMA 相关蛋白激酶 7（NIMA-related kinases 7，NEK7）抗体（批号 59y9138）购自美国 Affinity 公司；RNA 提取试剂盒（批号 M3211080）购自上海翌圣生物科技有限公司；反转录试剂盒（批号 0202122021）、荧光定量预混液（批号 0202010531）北京兰博利德生物科技有限公司；引物序列由上海生工设计合成。

1.3 仪器

ASP300S 型自动脱水机、HistocoreArcadia H 包埋机、RM2265 型超薄全自动半薄轮式切片机（德国 Leica 公司）；BX43 型正置光学显微镜、AU480 型全自动生化仪（日本 Olympus 公司）；Grinder-96 型研磨仪（杭州佑宁仪器有限公司）；54178 型低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；Colibri 超微量分光光度计（德国 Berthold Technologies 公司）；ABI7500 型 qRT-PCR 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Synergy II 全波段酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）；1645050 型 MINI 电泳仪、1703810 型垂直电泳系统、1658004 型湿法电转印系统（美国 Bio-Rad 公司）。

1.4 数据库与软件

TCMSP 数据库（<http://tcmospw.com/>）；Uniprot 数据库（<http://www.uniprot.org/>）；GeneCards 数据库（<http://www.genecards.org/>）；NCBI 数据库（<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>）；OMIM 数据库（<https://omim.org/>）；String 数据库（<https://string-db.org/>）；

微生信（<http://www.bioinformatics.com.cn/>）；上海生工（<https://www.sangon.com/>）；Cytoscape v3.7.2 软件；Rv4.2.1 软件；SPSS 20.0 软件。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 金藤清痹颗粒成分及靶点搜集 分别以金藤清痹颗粒的中药“金银花”“青风藤”“鹿衔草”“山慈菇”“蜈蚣”“白花蛇舌草”“白芍”“当归”“甘草”“生地黄”“玄参”为关键词，在 TCMSP 数据库中以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 且类药性 ≥ 0.18 为条件检索、筛选活性成分及其靶点，并用 Uniprot 数据库对靶点名称进行校正。

2.1.2 AGA 靶点采集、筛选 以“acute gouty arthritis”和“gouty arthritis”为关键词，在 GeneCards、NCBI 和 OMIM 数据库中搜索疾病靶点。

2.1.3 共有靶点的筛选及网络构建 筛选金藤清痹颗粒与 AGA 的共有靶点，上传至 String 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI 网络，导入 Cytoscape 软件呈现，并应用 R 软件绘制度值直方图。利用 DAVID 数据库对共有靶点进行基因本体（gene ontology，GO）功能及京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）富集分析，结果提交至微生信可视化，并应用 Cytoscape 构建“金藤清痹颗粒-中药-活性成分-靶点-AGA”网络。

2.2 动物实验验证

2.2.1 分组、造模及给药 36 只大鼠随机分成空白组、模型组、秋水仙碱（0.3 mg/kg）组和金藤清痹颗粒低、中、高剂量（1.05、2.10、4.20 g/kg）组，每组 6 只。称取 400 mg MSU，加入 2 mL 聚山梨酯 80，以生理盐水补足至 20 mL，超声溶解后加热搅拌，配成质量浓度为 20 mg/mL 的 MSU 晶体混悬液。除空白组外，其余各组参照 Coderre 等^[10]方法制备 AGA 模型，大鼠麻醉后，用碘伏消毒大鼠右后肢踝关节，弯曲踝关节成直角，针头从踝关节外侧与胫骨呈 45° 插入踝关节腔内，每只注射 MSU 晶体混悬液 0.2 mL（空白组注射等量无菌生理盐水），用棉签按压几秒避免药液漏出，以踝关节囊的对侧隆起作为成功注射的标准。造模前 2 d 开始，各给药组 ig 相应药物，模型组和空白组 ig 等体积蒸馏水，3 次/d，连续给药 5 d。末次给药 2 h 后，ip 10%水合氯醛麻醉，经腹主动脉采血，静置 1 h 后 3000 r/min 离心 15 min，分离血清，于 -20 °C 冻存。取

鼠后处死大鼠，剥离右侧后足踝关节进行后续分析。

2.2.2 踝关节肿胀度测量 于造模前及造模后 6、24、48 h，用游标卡尺测量大鼠右踝关节同一部位关节直径，计算踝关节肿胀度。

踝关节肿胀度=(造模后关节直径-造模前关节直径)/造模前关节直径

2.2.3 血清生化指标检测 采用全自动生化仪检测大鼠血清尿酸 (serum uric acid, SUA)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 水平。

2.2.4 苏木素-伊红 (HE) 染色观察踝关节病理 大

鼠踝关节在 4%多聚甲醛中固定 48 h 后，经脱钙、梯度乙醇脱水后，石蜡包埋切片，常规脱蜡复水，苏木素 10 min、分化液 2 s、伊红 1 min 进行染色，脱水封片后在光学显微镜下观察切片并采集图像进行分析。

2.2.5 qRT-PCR 检测踝关节 NLRP3、NEK7、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18、IL-6、TNF- α mRNA 表达 按照试剂盒说明书提取踝关节中总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向引物 (5'-3')	长度/bp	反向引物 (5'-3')	长度/bp
<i>NLRP3</i>	AGACCTCCAAGACCACGACTG	21	TTCCATCCGCAGCCAATGAAC	21
<i>NEK7</i>	GGTTGGCAGCTGAGGTATG	20	GGTTGGCAGCTGAGGTATG	22
<i>IL-1β</i>	ATGCCTCGTGCTGTCTGACC	20	TTTGTCGTTGCTGTCTCTCCTTG	24
<i>Caspase-1</i>	TTGCCCTTTAGAAATAGCCCAGAAG	25	TCAACATCAGCTCCGACTCTCC	22
<i>GSDMD</i>	GTCTGCTTGCCGTAATCCATTC	22	ACTTCTTCCTCATTGGTTCATCTG	25
<i>IL-18</i>	GACCGAACAGCCAACGAATCC	21	GTAGACATCCTTCCATCCTTCACAG	25
<i>IL-6</i>	CTTCCAGCCAGTTGCCTTCTTG	22	TGGTCTGTTGTGGGTGGTATCC	22
<i>TNF-α</i>	CACGCTCTTGTCTACTGAACCTC	25	GGGCTACGGGCTGTCACTC	20
<i>ASC</i>	ATGGAAGAGTCTGGAGCTGTGG	22	AATGAGTGCTTGCCTGTGTTGG	22
<i>GAPDH</i>	AAGTTCACGGCACAGTCAAGG	22	GACATACTCAGCACCAGCATCAC	23

2.2.6 ELISA 检测血清 IL-1 β 、IL-18、IL-6、TNF- α 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 IL-1 β 、IL-18、IL-6、TNF- α 水平。

2.2.7 Western blotting 检测踝关节 NLRP3、ASC、Caspase-1、NEK7、GSDMD 蛋白表达 取大鼠踝关节滑膜组织，加入 RIPA 强效裂解液，研磨仪 60 Hz 研磨 3 min，转至冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min 后，取上清液，加入上样缓冲液混匀，100 $^{\circ}$ C 金属浴 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，5%脱脂牛奶封闭 1 h，加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，加入二抗室温孵育 1 h 后显影曝光，采用 Image J 软件分析条带灰度，检测 NLRP3、ASC、Caspase-1、NEK7、GSDMD 蛋白表达情况。

2.2.8 统计学分析 采用 SPSS 软件进行统计学分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 PPI 网络构建 经 TCMSP 数据库及相关文献检索，纳入金藤清痹颗粒 110 个活性成分及 212

个相关靶点；经 Genecard、OMIM 和 NCBI 数据库检索，共获得 AGA 相关靶点 271 个，两者共有靶点 29 个，PPI 网络 (图 1) 中关键节点包括 IL-1 β 、TNF、IL-6。

3.1.2 共有靶点富集分析 通过构建“金藤清痹颗粒-中药-活性成分-靶点-AGA”网络，直观地呈现了金藤清痹颗粒治疗 AGA 的 11 味中药、110 种活性成分、29 个共同靶点间的关联模式 (图 2)。

GO 分析显示，金藤清痹颗粒可能干预的生物过程涉及炎症反应、细胞凋亡等，与之有关的细胞组分涉及分泌、细胞外基质等，相对应的分子功能有氧化还原酶、细胞因子等 (图 3-A)。经 KEGG 富集分析，前 20 个关键信号通路涉及代谢、凋亡、炎症等相关信号通路，包括 TNF 信号通路、IL-17 信号通路和 NOD 样受体信号通路等 (图 3-B)。

3.2 动物实验验证

3.2.1 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠踝关节肿胀度的影响 如表 2 所示，大鼠踝关节注射 MSU 晶体后逐渐发生肿胀，6 h 达到高峰。与空白组比较，大鼠造模后 6、24、48 h 踝关节肿胀度均显著增加 ($P < 0.01$)，提示大鼠 AGA 模型成功。与模型组比较，

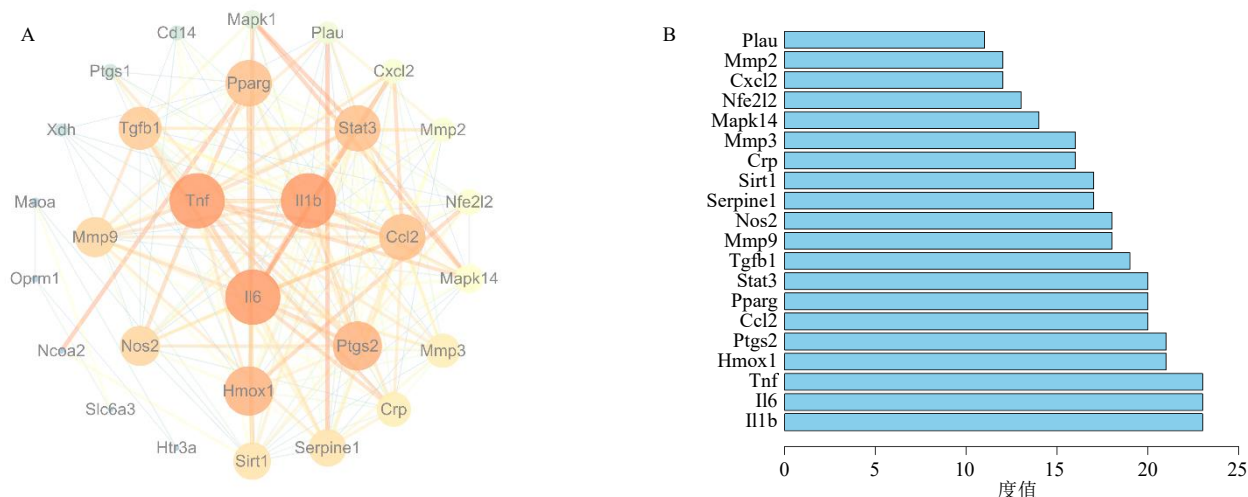
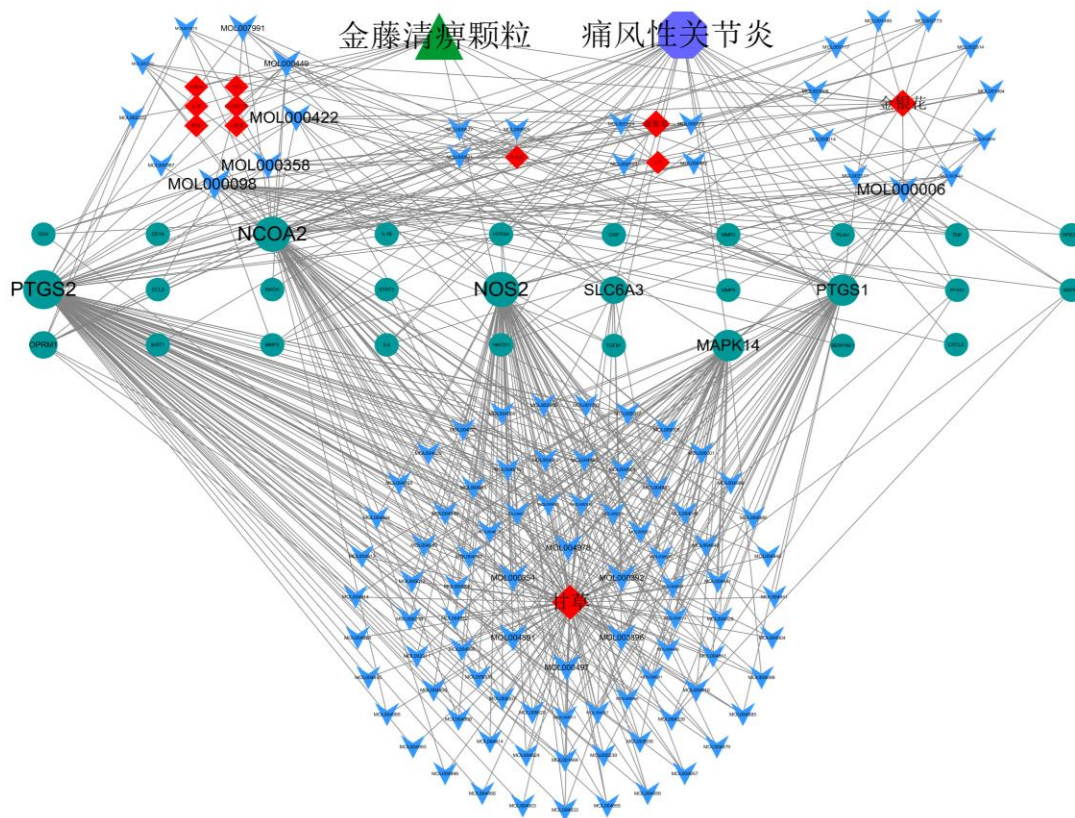


图 1 共有靶点 PPI 网络 (A) 及 top 20 高靶标阵列 (B)

Fig. 1 Shared target PPI network (A) and top 20 high target array (B)



红色菱形代表中药, 蓝色箭头代表活性成分, 墨绿色圆形代表靶点
red diamond represents traditional Chinese medicine, blue arrow represents active ingredient and dark green circle represents target

图 2 “金藤清痹颗粒-中药-活性成分-靶点-AGA”网络

Fig. 2 “Jinteng Qingbi Granules-traditional Chinese medicine-active ingredient-target-AGA” network

秋水仙碱组各时间点踝关节肿胀度显著降低 ($P < 0.01$); 金藤清痹颗粒中、高剂量组各时间点踝关节直径显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 金藤清痹颗粒低高剂量组造模后 48 h 踝关节肿胀度显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2.2 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠血清 SUA、CRP 水平的影响 如图 4 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清 SUA 及 CRP 水平均明显升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 SUA 及 CRP 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

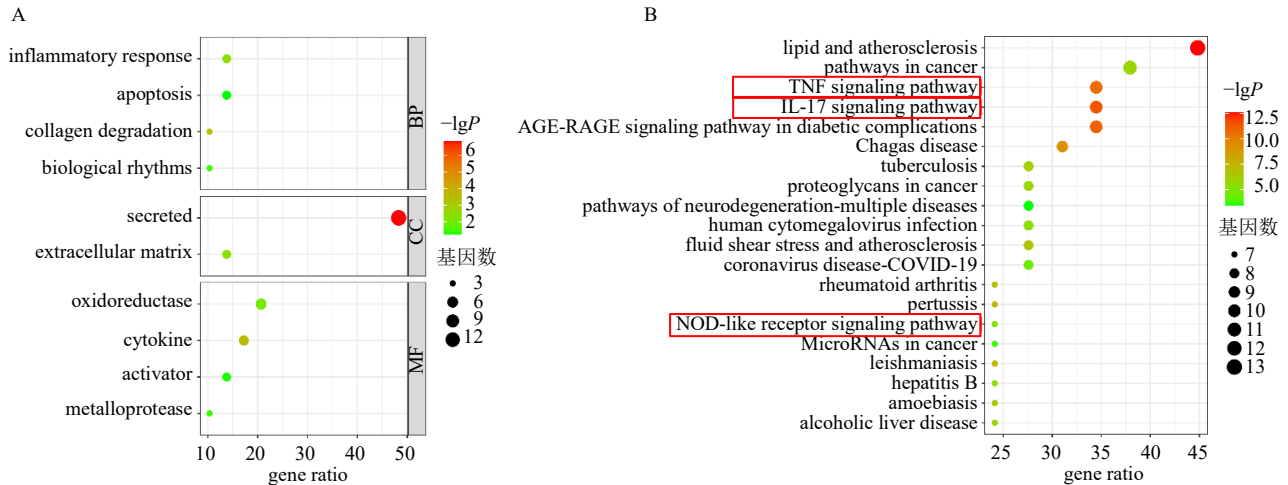


图 3 共有靶点 GO 功能 (A) 及 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 3 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of shared targets

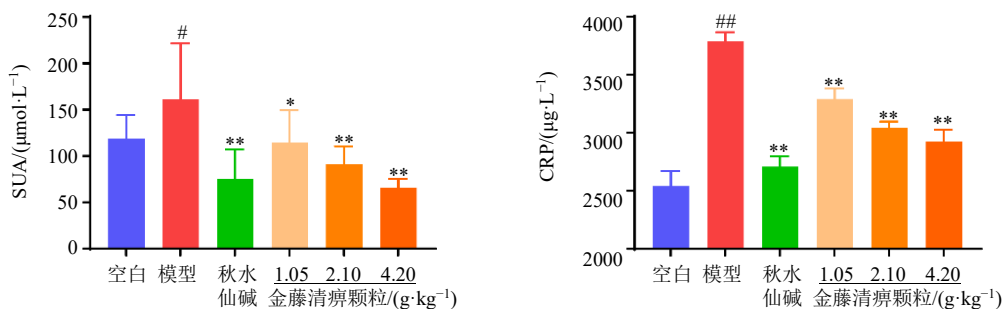
表 2 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠踝关节肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Jinteng Qingbi Granules on swelling degree of ankle joint in AGA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	踝关节肿胀度/%		
		6 h	24 h	48 h
空白	—	13.35 ± 1.39	5.87 ± 1.02	0.66 ± 0.73
模型	—	32.01 ± 5.72 ^{##}	28.31 ± 4.06 ^{##}	19.14 ± 5.30 ^{##}
秋水仙碱	3 × 10 ⁻⁴	20.30 ± 3.39 ^{**}	12.69 ± 2.71 ^{**}	5.21 ± 0.86 ^{**}
金藤清痹颗粒	1.05	31.66 ± 2.86	26.29 ± 4.02	14.55 ± 2.94 [*]
	2.10	25.50 ± 7.14 [*]	14.37 ± 4.94 ^{**}	8.21 ± 5.16 ^{**}
	4.20	26.12 ± 6.58 [*]	15.29 ± 6.36 ^{**}	5.31 ± 3.98 ^{**}

与空白组比较: ^{##}P<0.01; 与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01, 下表同

^{##}P<0.01 vs control group; ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs model group, same as below tables



与对照组比较: [#]P<0.05 ^{##}P<0.01; 与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01, 图 6 同

[#]P<0.05 ^{##}P<0.01 vs control group; ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs model group, same as fig. 6

图 4 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠血清 SUA、CRP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of Jinteng Qingbi Granules on serum SUA and CRP levels in AGA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2.3 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠踝关节滑膜组织病理变化的影响 如图 5 所示, 空白组大鼠踝关节组织结构清晰, 滑膜细胞排列正常, 无细胞增生、炎性细胞浸润及血管充血。与空白组比较, 模型组滑膜组织增生明显、结构紊乱, 大量炎性细胞浸润, 血管充血。与模型组比较, 秋水仙碱组滑膜增生及炎症浸润程度明显降低, 血管充血明显缓解; 金藤

清痹颗粒各剂量组可显著降低 AGA 大鼠关节滑膜增生及炎症浸润程度, 改善血管充血。以上结果提示, 金藤清痹颗粒与秋水仙碱均具有改善 AGA 大鼠踝关节滑膜增生及炎症浸润等组织病理的作用。

3.2.4 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠踝关节滑膜组织 *NLRP3*、*NEK7*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 表达的影响 如表 3 所

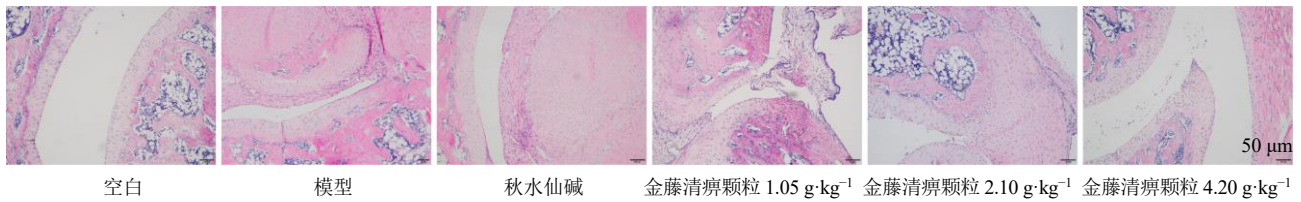


图 5 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠踝关节滑膜组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 5 Effect of Jinteng Qingbi Granules on pathological changes of synovial tissue in ankle joint of AGA rats (HE, × 100)

表 3 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠踝关节滑膜组织 *NLRP3*、*NEK7*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Jinteng Qingbi Granules on *NLRP3*, *NEK7*, *ASC*, *Caspase-1*, *GSDMD*, *IL-18*, *IL-1β*, *IL-6* and *TNF-α* mRNA expressions in synovial tissue of ankle joint in AGA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量				
		<i>NLRP3</i>	<i>NEK7</i>	<i>ASC</i>	<i>Caspase-1</i>	<i>GSDMD</i>
空白	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	35.18±14.71 ^{###}	8.61±1.54 ^{##}	8.01±2.74 ^{##}	16.33±4.43 ^{##}	3.50±0.96 ^{##}
秋水仙碱	3×10 ⁻⁴	1.94±0.46 ^{**}	1.96±0.36 ^{**}	1.25±0.08 ^{**}	2.42±0.22 ^{**}	1.52±0.25 ^{**}
金藤清痹颗粒	1.05	46.75±22.68	4.02±1.26 ^{**}	6.08±2.46	11.75±0.64 [*]	6.22±0.62 ^{**}
	2.10	8.92±2.29 [*]	3.47±0.23 ^{**}	2.97±1.16 ^{**}	5.38±0.60 ^{**}	2.61±0.58
	4.20	5.23±0.89 [*]	1.78±0.60 ^{**}	2.00±0.67 ^{**}	2.61±0.81 ^{**}	1.73±1.08 [*]

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量			
		<i>IL-18</i>	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>	<i>TNF-α</i>
空白	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	14.10±4.72 ^{###}	24.05±9.37 ^{##}	4.37±1.76 ^{##}	12.18±4.27 ^{##}
秋水仙碱	3×10 ⁻⁴	1.38±0.13 ^{**}	1.83±0.31 ^{**}	1.12±0.16 ^{**}	1.78±0.25 ^{**}
金藤清痹颗粒	1.05	9.54±9.27	4.08±0.33 ^{**}	3.98±1.20	6.47±3.31 [*]
	2.10	3.71±0.86 [*]	3.20±0.58 ^{**}	2.03±0.63 [*]	2.91±0.70 ^{**}
	4.20	2.14±0.37 [*]	1.72±0.60 ^{**}	1.46±0.03 ^{**}	1.58±0.55 ^{**}

示,与空白组比较,模型组大鼠滑膜组织中 *NLRP3*、*NEK7*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 表达水平均显著上升 ($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组和金藤清痹颗粒高剂量组大鼠滑膜组织中 *NLRP3*、*NEK7*、*ASC*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 表达水平均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$),金藤清痹颗粒中剂量组 *NEK7*、*Caspase-1*、*GSDMD*、*IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达水平均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$),金藤清痹颗粒低剂量组 *NLRP3*、*NEK7*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-18*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 表

达水平均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.2.5 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠血清中 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-18* 和 *IL-6* 水平的影响 如表 4 所示,与空白组比较,模型组大鼠血清中 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-18* 和 *IL-6* 水平均明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-18* 和 *IL-6* 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.2.6 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠踝关节滑膜组织 *NLRP3*、*NEK7*、*ASC*、*Caspase-1* 和 *GSDMD* 蛋白表达的影响 如图 6 所示,与空白组比较,模型组大鼠滑膜组织中 *NLRP3*、*NEK7*、*ASC*、*Caspase-1*

表 4 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠血清中 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-18* 和 *IL-6* 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Jinteng Qingbi Granules on levels of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-18* and *IL-6* in serum of AGA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>IL-18</i> /(ng·L ⁻¹)	<i>TNF-α</i> /(ng·L ⁻¹)	<i>IL-6</i> /(pg·mL ⁻¹)	<i>IL-1β</i> /(ng·L ⁻¹)
空白	—	173.80±7.37	377.43±9.86	122.55±7.29	38.99±1.47
模型	—	247.35±8.43 ^{##}	491.22±13.25 ^{##}	154.22±5.89 ^{##}	53.28±1.93 ^{##}
秋水仙碱	3×10 ⁻⁴	191.47±6.61 ^{**}	394.26±14.11 ^{**}	126.13±5.44 ^{**}	41.54±2.09 ^{**}
金藤清痹颗粒	1.05	230.13±6.24 ^{**}	442.61±11.13 ^{**}	144.49±3.99 ^{**}	47.66±0.75 ^{**}
	2.10	218.58±6.32 ^{**}	446.82±21.39 ^{**}	135.74±4.58 ^{**}	47.72±2.02 ^{**}
	4.20	200.83±7.61 ^{**}	413.57±14.26 ^{**}	134.60±5.55 ^{**}	44.13±0.76 ^{**}

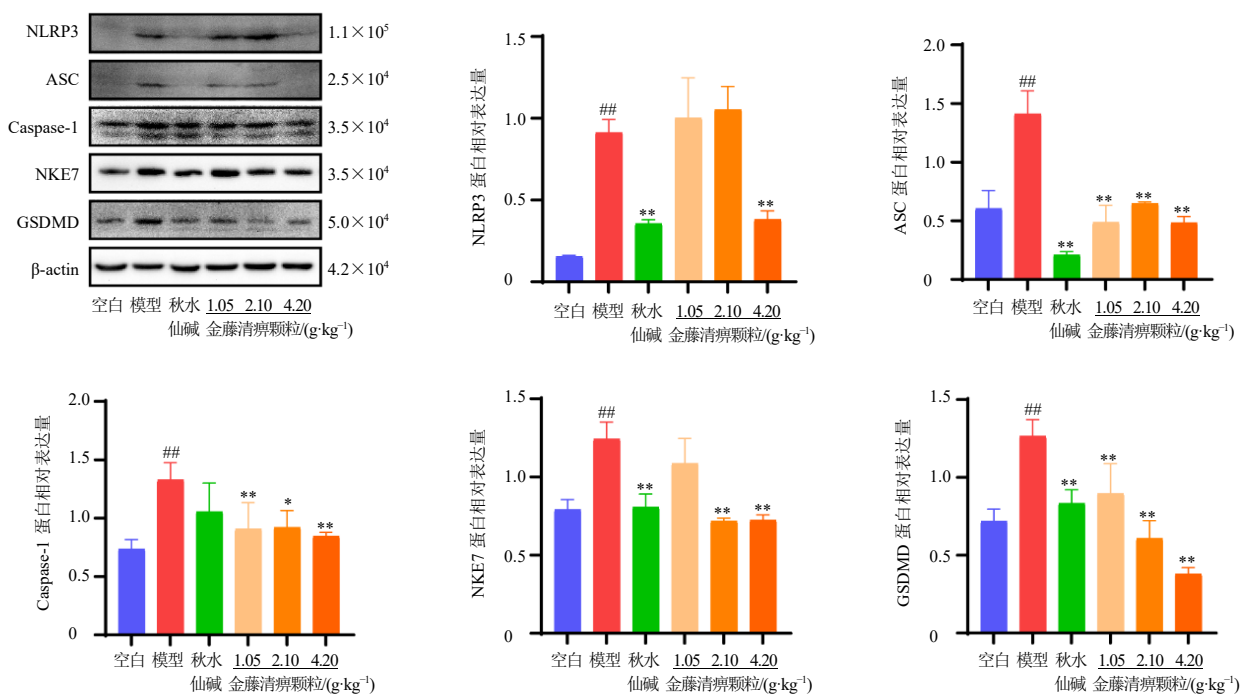


图 6 金藤清痹颗粒对 AGA 大鼠踝关节滑膜组织 NLRP3、NEK7、ASC、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of Jinteng Qingbi Granules on NLRP3, NEK7, ASC, Caspase-1 and GSDMD protein expressions in synovial tissue of ankle joint in AGA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

和 GSDMD 蛋白表达水平均显著上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 秋水仙碱组 NLRP3、NEK7、ASC 和 GSDMD 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 金藤清痹颗粒高剂量组 NLRP3、NEK7、ASC、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 金藤清痹颗粒中剂量组 NEK7、ASC、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 金藤清痹颗粒低剂量组 ASC、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

AGA 是尿酸钠晶体沉积于关节腔中, 募集巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞, 引起大量炎症因子和趋化因子释放, 而诱发的炎症性疾病^[11]。AGA 以急性慢性关节炎、痛风石等为临床特征, 严重者可致关节畸形、肾尿酸结石、痛风性肾病及肾功能不全等病变^[12]。因此, 本病的治疗原则和目标在于缓解急性期症状, 维持 SUA 水平持续达标, 减少痛风发作, 减少合并症的发生^[13]。

中医学将 AGA 归属“痹证”“历节”“痛风”等范畴, 朱丹溪最早提出“痛风”病名, 《格致余论·痛风论》记载: “痛风者, 大率因血受热, 已自沸腾, 其后或涉冷水, 或立湿地, 或扇风取凉, 或卧当风,

寒凉外搏, 热血得寒, 汗浊凝涩所以作痛, 夜则痛甚, 行于阴也”。在刘维教授“毒痹论”思想指导下, 本研究认为 AGA 的病机为禀赋不足, 脾肾亏虚, 湿浊内停, 湿浊郁久化热, 与浊毒搏结, 流注经络关节, 而湿浊内停, 日久阻滞气血运气, 导致瘀血内生而发病。金藤清痹颗粒中金银花、青风藤清热解毒, 通痹止痛, 为君药; 鹿衔草、山慈菇和白花蛇舌草清热解毒、补血活血, 强筋健骨, 缓急止痛, 为臣药; 金银花配伍玄参、当归、甘草为四妙勇安汤, 既能清热解毒活血又可养阴扶正, 配白芍, 滋阴凉血, 泻火解毒, 为佐药; 蜈蚣既可以解毒通络止痛, 又可引药入经, 直达病所, 为使药, 全方共奏清热解毒、活血止痛的功效, 具有抗炎、止痛、解热和免疫调节作用^[14]。

本研究通过网络药理学方法构建“金藤清痹颗粒-中药-活性成分-靶点-AGA”网络, 预测金藤清痹颗粒治疗 AGA 的目标靶点及其潜在机制, 结果显示靶点呈现多机制多通路的多层次趋势, 主要靶点包括 IL-1 β 、TNF 及 IL-6, 涉及 TNF 信号通路、IL-17 信号通路和 NOD 样受体信号通路等。为了进一步验证网络药理学结果, 阐明金藤清痹颗粒治疗 AGA 的机制, 本研究采用踝关节注射 MSU 晶体诱

导大鼠 AGA, 经金藤清痹颗粒 ig 治疗后, 踝关节肿胀度有效缓解, SUA 及 CRP 均显著降低, 踝关节滑膜增生、炎性细胞浸润得到改善, 同时显著抑制 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 等靶点和 NOD 样受体信号通路的表达。

NOD 样受体信号通路在痛风的发病中具有重要的作用, NLRP3 炎性小体由先天免疫传感器 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 组成^[15], 活化的 NLRP3 与 ASC 聚合形成 ASC 斑点, 导致 Caspase-1 的活化, 促进 IL-1 β 前体和 IL-18 前体的切割, 产生成熟的 IL-1 β 和 IL-18^[16-17], 并分泌到细胞外引发炎症反应, 因此在先天免疫和炎症中起着核心作用。研究显示, MSU 可激活 NLRP3, 促使 ASC 完成 NLRP3 炎性小体的装配, 从而激活 Caspase-1, 促使 IL-1 β 和 IL-18 的成熟与分泌。而在 NLRP3、ASC、Caspase-1 缺乏的细胞中, MSU 的刺激不能产生成熟的 IL-1 β ^[18]。Caspase-1 是胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族的成员之一, 含有胱氨酸募集结构域以及 p20、p10 2 个发挥活性的区域^[19], ASC 一端可与 NLRP3 聚合, 一端可与 Caspase-1 聚合, 是炎性小体重要的接头分子^[20-21]。活性 Caspase-1 执行了 GSDMD 氨基末端的切割, 这是焦亡必经的过程^[22]。Gasdermins 蛋白家族是一类具有打孔效应的蛋白, 可使细胞膜穿孔导致细胞焦亡, 其中 GSDMD 可被 Caspase 切割为具有成孔作用的 GSDMD-N 和自抑制的 GSDMD-C, 因此 GSDMD 也被称为细胞焦亡的“执行者”^[23-24]。当模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别病原体/损伤相关分子模式 (pathogen-or damage-associated molecular patterns, PAMPs/DAMPs) 细胞内 K⁺外流^[25], 线粒体损伤、活性氧释放增加^[26-27], 溶酶体破裂、组织蛋白酶漏出^[28-29], 均可导致 NLRP3 活化。NEK7 是丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员, 作用于 K⁺外流的下游, 在 ROS 的诱导下与 NLRP3 结合, 调节 NLRP3 的寡聚和激活, 其缺乏导致 NLRP3 无法与 ASC 聚合, ASC 斑点无法形成, 抑制 Caspase-1 的切割和 IL-1 β 的释放, 提示 NEK7 在 NLRP3 上游的炎症体激活中起着特异性的作用^[30-32]。TNF- α 是一种高度多效性的细胞因子, 具有细胞增殖、代谢激活、炎症反应和细胞死亡等多种生物学功能^[33]。而 IL-6 对感染和组织损伤反应迅速, 通过刺激急性期反应、造血作用和免疫反应来增强机体防御和维持内环境稳定^[34]。研究表明, MSU 诱导的痛风大鼠滑膜组织和血清中

TNF- α 和 IL-6 水平均明显升高, 与 AGA 炎症反应的发病机制显著相关, 而 IL-1 β 可以促进其产生^[35-36]。因此, 调节免疫炎症反应是缓解 AGA 患者临床症状的主要方法。

综上, 本研究采用网络药理学结合动物实验的方法, 探究清热解毒、活血止痛治法载体金藤清痹颗粒对大鼠 AGA 的保护作用及机制, 结果表明, 金藤清痹颗粒能够降低 SUA 及 CRP, 有效缓解踝关节肿胀, 其机制可能与抑制 NOD 样受体信号通路的异常激活, 降低炎症因子水平, 改善踝关节滑膜增生、炎性细胞浸润有关。本研究丰富了清热解毒、活血止痛法治疗 AGA 的研究, 为临床应用金藤清痹颗粒提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会. 临床诊疗指南: 风湿病分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 120-126.
- [2] Dalbeth N, Gosling A L, Gaffo A, *et al.* Gout [J]. *Lancet*, 2021, 397(10287): 1843-1855.
- [3] FitzGerald J D, Dalbeth N, Mikuls T, *et al.* 2020 American college of rheumatology guideline for the management of gout [J]. *Arthritis Care Res*, 2020, 72(6): 744-760.
- [4] 邓雪蓉, 王昱, 张卓莉. 2016 年痛风治疗理念和和治疗建议的更新 [J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37(3): 217-220.
- [5] 郑新春, 杨德才. 金藤清痹颗粒治疗类风湿关节炎疗效观察 [J]. 湖北中医杂志, 2013, 35(3): 15-16.
- [6] 唐今扬, 周彩云, 王鑫, 等. 金藤清痹颗粒通过调节免疫微环境对类风湿关节炎大鼠的干预作用 [J]. 中成药, 2022, 44(11): 3459-3468.
- [7] 刘维. 毒痹论 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(1): 15.
- [8] 刘维, 于海浩, 吴沅峰. 毒痹论续 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 718-721.
- [9] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [10] Coderre T J, Wall P D. 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.
- [11] Desai J, Steiger S, Anders H J. Molecular pathophysiology of gout [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(8): 756-768.
- [12] Lorenzo J P P, Sollano M H M Z, Salido E O, *et al.* 2021 Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology clinical practice guideline for treatment of gout [J]. *Int J Rheum Dis*, 2022, 25(1): 7-20.
- [13] 刘维. 痛风及高尿酸血症中西医结合诊疗指南 [J]. 中

- 医杂志, 2023, 64(1): 98-106.
- [14] 翟弋焱, 陈美琳, 时锐, 等. 基于网络药理学的金藤清痹颗粒治疗类风湿关节炎的作用机制研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2023, 23(4): 385-392.
- [15] Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: Guardians of the body [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 229-265.
- [16] Chen G, Shaw M H, Kim Y G, et al. NOD-like receptors: Role in innate immunity and inflammatory disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2009, 4: 365-398.
- [17] Yang J, Liu Z H, Xiao T S. Post-translational regulation of inflammasomes [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(1): 65-79.
- [18] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2): 417-426.
- [19] Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases [J]. *Cell*, 2004, 117(5): 561-574.
- [20] Park H H, Lo Y C, Lin S C, et al. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 561-586.
- [21] Kohl A, Grütter M G. Fire and death: The pyrin domain joins the death-domain superfamily [J]. *C R Biol*, 2004, 327(12): 1077-1086.
- [22] Shi J J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [23] Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1352-1364.
- [24] Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(3): 143-157.
- [25] Katsnelson M A, Rucker L G, Russo H M, et al. K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling [J]. *J Immunol*, 2015, 194(8): 3937-3952.
- [26] Bruchard M, Mignot G, Derangère V, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth [J]. *Nat Med*, 2013, 19(1): 57-64.
- [27] Kim Y K, Koppula S, Shim D W, et al. Inhibitory effect and mechanism of *Arctium lappa* extract on NLRP3 inflammasome activation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 6346734.
- [28] Amaral E P, Riteau N, Moayeri M, et al. Lysosomal cathepsin release is required for NLRP3-inflammasome activation by *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1427.
- [29] Orłowski G M, Sharma S, Colbert J D, et al. Frontline Science: Multiple cathepsins promote inflammasome-independent, particle-induced cell death during NLRP3-dependent IL-1 β activation [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 102(1): 7-17.
- [30] Xu X J, Zhang L, Ye X C, et al. Nrf2/ARE pathway inhibits ROS-induced NLRP3 inflammasome activation in BV2 cells after cerebral ischemia reperfusion [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(1): 57-65.
- [31] He Y, Zeng M Y, Yang D H, et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux [J]. *Nature*, 2016, 530(7590): 354-357.
- [32] Shi H X, Wang Y, Li X H, et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(3): 250-258.
- [33] Jing Z T, Liu W, Xue C R, et al. AKT activator SC79 protects hepatocytes from TNF- α -mediated apoptosis and alleviates d-Gal/LPS-induced liver injury [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 316(3): G387-G396.
- [34] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(10): a016295.
- [35] Li C, Wang C, Guo Y J, et al. Research on the effect and underlying molecular mechanism of Cangzhu in the treatment of gouty arthritis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 927: 175044.
- [36] So A K, Martinon F. Inflammation in gout: Mechanisms and therapeutic targets [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(11): 639-647.

[责任编辑 李亚楠]