

化湿止痛凝胶的制备工艺优化及其抗痛风性关节炎作用和机制研究

李泽宇^{1,2,3}, 庄培均^{1,2}, 曾雪琪^{1,2}, 韦成波^{1,2}, 曹 瑞^{1,2}, 韦棣婷^{1,2}, 郝二伟^{1,2}, 杜正彩^{1,2}, 侯小涛^{1,2*}, 邓家刚^{1,2*}

1. 广西中医药大学 广西中药药效研究重点实验室, 广西 南宁 530200

2. 广西中医药大学 中国-东盟传统药物研究国际合作联合实验室, 广西 南宁 530200

3. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700

摘要: 目的 优化化湿止痛方的提取工艺与凝胶剂制备工艺, 探究化湿止痛凝胶对痛风性关节炎的治疗效果及作用机制, 为痛风性关节炎外用治疗新药研发提供候选制剂与理论依据。方法 采用紫外分光光度法测定化湿止痛方的总酚酸含量, 通过单因素与正交试验优化提取工艺; 以外观、黏度、延展性及稳定性为指标筛选凝胶基质及辅料配比, 运用 Box-Behnken 响应面法优化制备工艺。建立大鼠急性痛风性关节炎模型, 通过检测关节肿胀、皮温、疼痛及炎症因子[白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)] 表达, 考察化湿止痛凝胶抗痛风性关节炎的药效作用。结合 GEO 数据、网络药理学与分子对接构建“物质-效应组群”网络, 分析化湿止痛凝胶抗痛风性关节炎的作用机制并进行实验验证。结果 化湿止痛方的最佳提取工艺为 60%乙醇、料液比 1:10、70 °C 提取 1.5 h, 提取 2 次; 凝胶剂最佳配方为 1%卡波姆 940 与 0.2%泊洛沙姆 188 为基质, 搭配 7.5%保湿剂、1.2%促渗剂、14.7%含药量及 0.07%抗氧化剂。药效学实验结果显示, 化湿止痛凝胶能显著减轻痛风性关节炎大鼠关节肿胀和疼痛 ($P<0.01$ 、0.001), 降低血清中 IL-1 β 、MIP-1 α 水平及滑膜组织 TLR4、MMP9 表达 ($P<0.05$ 、0.01), 升高血清中 SOD 活性 ($P<0.05$ 、0.01)。机制研究表明, 化湿止痛凝胶通过调控前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 等靶点及环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、趋化因子、钙信号等通路发挥抗痛风性关节炎的作用; 免疫荧光染色和 qRT-PCR 实验证实化湿止痛凝胶能显著抑制痛风性关节炎大鼠滑膜组织环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、VEGFA 和 EGFR 的表达 ($P<0.01$)。结论 成功优化化湿止痛凝胶剂的提取与制备工艺, 化湿止痛凝胶具有良好的抗痛风性关节炎作用, 且其作用机制与多靶点、多通路调控相关。

关键词: 化湿止痛方; 凝胶剂; 痛风性关节炎; 绿原酸; 炎症反应; 环氧合酶-2; 血管内皮生长因子 A; 表皮生长因子受体

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)14-5396-20

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.14.004

Optimization of preparation of Huashi Zhitong Gel and research on its anti-gouty arthritis effect and mechanism

LI Zeyu^{1,2,3}, ZHUANG Peijun^{1,2}, ZENG Xueqi^{1,2}, WEI Chengbo^{1,2}, CAO Rui^{1,2}, WEI Yanting^{1,2}, HAO Erwei^{1,2}, DU Zhengcai^{1,2}, HOU Xiaotao^{1,2}, DENG Jiagang^{1,2}

1. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. China-ASEAN Joint Laboratory for International Cooperation in Traditional Medicine Research, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

3. Medical Experiment Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

收稿日期: 2026-02-02

基金项目: 广西中药药效研究重点实验室项目 (桂科计字[2005]6 号); 中药资源循环利用广西高校工程研究中心 (桂教科研[2024]10 号); 广西“带土移植”人才引进计划项目 (桂科 AA23026008)

作者简介: 李泽宇, 博士研究生, 研究方向为中药复杂作用机制解析。E-mail: chestnutfish1998@126.com

*通信作者: 邓家刚, 教授, 研究方向为中药基础理论与药效筛选研究。E-mail: dengjg53@126.com

侯小涛, 教授, 研究方向为中药物质基础与质量控制研究。E-mail: xthou@126.com

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Huashi Zhitong Formula (化湿止痛方) and preparation technology of its gel formulation, elucidate the therapeutic efficacy and mechanism of Huashi Zhitong Gel against gouty arthritis, and provide a candidate formulation and theoretical basis for the development of new topical drugs for gouty arthritis. **Methods** The total phenolic acid content in Huashi Zhitong Formula was determined by ultraviolet spectrophotometry. The extraction process was optimized through single-factor and orthogonal tests. The gel matrix and excipient ratios were screened based on appearance, viscosity, ductility and stability, and the preparation process was further optimized using Box-Behnken response surface methodology. A rat gouty arthritis model was established, anti-gouty arthritis efficacy of Huashi Zhitong Gel was investigated by detecting joint swelling, skin temperature, pain and expressions of inflammatory factors [interleukin-1 β (IL-1 β), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), superoxide dismutase (SOD), Toll-like receptor 4 (TLR4), matrix metalloproteinase 9 (MMP9)]. Integrated with GEO data, network pharmacology and molecular docking, a “component-effect group” network was constructed to analyze the mechanism of Huashi Zhitong Gel against gouty arthritis, followed by experimental validation. **Results** The optimal extraction conditions of Huashi Zhitong Formula were determined as 60% ethanol, a solid-to-liquid ratio of 1 : 10, extraction at 70 °C for 1.5 h (repeated twice). The optimal gel formulation consisted of 1% carbomer 940 and 0.2% poloxamer 188 as the matrix, combined with 7.5% humectant, 1.2% penetration enhancer, 14.7% drug load and 0.07% antioxidant. Pharmacodynamic experiment results demonstrated that Huashi Zhitong Gel significantly alleviated joint swelling and pain in rats with gouty arthritis ($P < 0.01, 0.001$), reduced the levels of IL-1 β , MIP-1 α in serum and expressions of TLR4, MMP9 in synovial tissue ($P < 0.05, 0.01$), and increased the activity of SOD in serum ($P < 0.05, 0.01$). The mechanism study showed that Huashi Zhitong Gel could play an anti-gouty arthritis role by regulating the targets such as prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2), epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), and the pathways such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP), chemokines, and calcium signaling. Immunofluorescence staining and qRT-PCR confirmed that Huashi Zhitong Gel could significantly inhibit the expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2), VEGFA and EGFR in synovium of rats with gouty arthritis ($P < 0.01$). **Conclusion** The extraction and preparation process of Huashi Zhitong Gel are successfully optimized. Huashi Zhitong Gel has a good anti-gouty arthritis effect, and its mechanism is related to multi target and multi pathway regulation.

Key words: Huashi Zhitong Formula; gel; gouty arthritis; chlorogenic acid; inflammatory response; cyclooxygenase-2; vascular endothelial growth factor A; epidermal growth factor receptor

痛风性关节炎是一种代谢性疾病,是由于尿酸钠晶体沉积在关节腔引起的关节炎^[1],急性发作时常表现为病变关节红肿、局部皮肤温度升高、疼痛剧烈,具有发病急、易反复的特点。在我国大约有1.1%的人口患有痛风性关节炎,发病率逐年升高,并且年轻化趋势越发明显^[2]。研究表明,随着痛风性关节炎发病率的上升,其合并肥胖、高血压、高血脂症、糖尿病及肾病等并发症的发生率亦随之上升^[3],严重影响患者的健康以及生活质量,还会造成经济上的负担^[4-5]。而现代治疗痛风性关节炎急性发作常口服秋水仙碱、丙磺舒等化学药,其只以缓解症状为主,且不良反应大、停药后易复发。

凝胶剂是近些年来快速发展的新剂型,作为一种具有诸多优点的外用制剂,具有质地细腻、易于涂布等特点^[6],由于其良好的生物相容性、较高的生物利用度、制备工艺简单、稳定性好等特点,目前已广泛应用于日常生活及医疗领域。近年来,中药凝胶剂如水凝胶作为一种以中医药理论为基础的透皮给药制剂,得到了越来越多的关注和研发^[7]。《景岳全书》中记载痛风是由“外湿侵袭”及“饮食

不节”引起的内生湿热所致,风、寒、湿、热、瘀为痛风急性发作的病因病机,痛风按照证候分类可分为湿热蕴结型、瘀热阻滞型、痰浊阻滞型、肝肾阴虚型^[8],而中医药能够更好地把握痛风的病因病机,从而分证论治,在治疗痛风、降尿酸、改善关节功能方面更具优势^[9]。化湿止痛方由厚藤、独活、海桐皮、威灵仙、两面针、徐长卿、松节、三七等中药组成,该方中的各味药是针对中药的外用特点配伍而成,在治疗痛风性关节炎方面存在较大的应用与开发潜力。因此本研究系统分析化湿止痛方的提取工艺、凝胶剂制备工艺、药效及机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠80只,体质量(200 $\pm$ 10)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号SCXK(湘)2016-0002。动物饲养于温度(23 $\pm$ 2)°C、相对湿度50%~60%、12h/12h昼夜交替光照的环境中,自由进食饮水。动物实验经广西中医药大学动物伦理委员会批准(批准号DW20220525-012)。

1.2 药材

厚藤(自采) 30 g, 独活 12 g、海桐皮 12 g、威灵仙 30 g、两面针 20 g、徐长卿 30 g、松节 30 g、三七 6 g、乳香 6 g、生半夏 12 g、救必应 20 g、山慈菇 20 g、山豆根 10 g、蒲公英 20 g、金银花 20 g 购自广西仙茱中药科技有限公司, 批号 01336790, 经邓家刚教授鉴定分别为旋花科植物厚藤 *Ipomoea pescaprae* (L.) R. Br. 的干燥全草、伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根、豆科植物刺桐 *Erythrina variegata* L. 的干燥树皮、毛茛科植物威灵仙 *Clematis chinensis* Osbeck 的干燥根及根茎、芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的干燥根、萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag. 的干燥根及根茎、松科植物油松 *Pinus tabulaeformis* Carr. 的干燥瘤状节、五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎、橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 的干燥树脂、天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎、冬青科植物铁冬青 *Ilex rotunda* Thunb. 的干燥树皮、兰科植物杜鹃兰 *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino 的干燥假鳞茎、豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根及根茎、菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. 的干燥全草、忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。

1.3 药品与试剂

对照品绿原酸(批号 A0022, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自成都曼思特生物科技有限公司; 卡波姆 940(批号 C832684)、泊洛沙姆 188(批号 P131347)、明胶(批号 P263688) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 甘油(批号 G116203)、氮酮(批号 A104374) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 无水三氯化铁(批号 F108075)、铁氰化钾(批号 P109951)、十二烷基硫酸钠(批号 S108347)、亚硫酸氢钠(批号 S111751)、EDTA 二钠(批号 E118471)、醋酸乙酯(批号 E116433)、石油醚(批号 P116831)、甲醇(批号 M116117)、三氯甲烷(批号 C116643) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 尿酸钠(批号 U2875) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 4%多聚甲醛组织固定液(批号 P1110)、EDTA 脱钙液(批号 E1171)、苏木素染液(批号 G1080)、伊红染液(批号 G1100) 购自北京索莱宝科技有限公司; 总超氧化物歧化酶

(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(批号 A001-1) 购自南京建成生物工程研究所; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)检测试剂盒(批号 ZC-36394)、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)检测试剂盒(批号 ZC-36401) 购自上海茁彩生物科技有限公司; Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4) 抗体(批号 19811-1-AP)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 抗体(批号 BA2202)、前列腺素内过氧化物合酶 2/环氧合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2/cyclooxygenase-2, PTGS2/COX-2) 抗体(批号 27308-1-AP) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 逆转录试剂盒(批号 M16325)、总 RNA 提取试剂盒(批号 K0731) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 引物(批号 20221021-09) 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 仪器

N-1100 型小型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); JG-30 型高速万能粉碎机(上海精益工贸有限公司); ZNHW 型智能恒温电热套(巩义市予华仪器有限责任公司); Hei-VAP 型 20 L 旋转蒸发仪(德国 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); UV-2600 型紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu Corporation 公司); EL204 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); PH-100B 型精密 pH 计(上海力辰邦西仪器科技有限公司); NDJ-9S 型数字黏度计(上海叶拓仪器仪表有限公司); SpectraMAX Plus384 型酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]; JJ-1 型数显精密增力电动搅拌机(金坛区西城新瑞仪器厂); SHZ-DIII 型循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); SCZKG-2 型薄层鉴别使用到双槽展开缸(上海信谊仪器厂有限公司); ZF-20C 型暗箱三用紫外分析仪(上海精密科学仪器有限公司); 硅胶板(青岛海洋化工厂分厂); KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司); TGL-16M 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); Tgrcelient 型全自动实时荧光定量 PCR 仪(德国耶拿分析仪器股份公司); 1374 型生物安全柜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); RM2016 型转轮式切片机(德国 Leica 公司); TSJ-II 型全自动组织脱水机、BMJ-III 型包埋机、PHY-III 型漂烘仪(常州市中威电子仪器

有限公司); Pannoramic 250 型数字切片扫描仪(济南丹吉尔电子有限公司); UPH-II-10T 型优普超纯水制造系统(四川优普超纯科技有限公司)。

2 方法

2.1 化湿止痛方的提取工艺研究

为确定化湿止痛方的最佳提取工艺,采用正交试验设计,以加水量、提取时间及提取次数为考察因素,以提取液中总酚酸含量和浸膏率为评价指标进行优化。

2.1.1 化湿止痛方提取物的制备 取厚藤 30 g、独活 12 g、海桐皮 12 g、威灵仙 30 g、两面针 20 g、徐长卿 30 g、松节 30 g、三七 6 g、乳香 6 g、生半夏 12 g、救必应 20 g、山慈菇 20 g、山豆根 10 g、蒲公英 20 g、金银花 20 g,加入 10 倍量的 60%乙醇,70 ℃提取 1.5 h,提取 2 次,合并 2 次滤液,浓缩干燥。

2.1.2 总酚酸含量测定方法的建立 精密称取绿原酸对照品适量,加 80%乙醇制成 0.20 mg/mL 的对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80 mL,置 10 mL 量瓶中,加 80%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 6、8、10、12、14、16 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。取化湿止痛方提取物约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80%乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 80%乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加 80%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。取对照品溶液或供试品溶液,与 0.3%十二烷基硫酸钠及 0.6% $\text{FeCl}_3 \sim 0.9\% \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 混合溶液显色后,采用紫外分光光度法测定吸光度(A)值。通过对供试品和对照品溶液进行 200~800 nm 光谱扫描,发现在 327 nm 处两者有明显的共有峰,且峰形一致,故选择 327 nm 作为总酚酸含量测定波长。对照品的标准曲线回归方程为 $y = 56.9889x + 0.00244217$, $R^2 = 0.999$,表明绿原酸在 6~16 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好($R^2 = 0.999$)。精密度试验结果显示,在 327 nm 波长连续 6 次测定 A 值的 RSD 为 0.66%,表明该方法具有良好的精密度。取供试品溶液,室温下分别于 0、15、30、40、55 min 测定 A 值, RSD 为 0.73%,表明供试品溶液在 55 min 内具有良好的稳定性。取同一批化湿止痛方提取物,平行制备 6 份供试品溶液,分别测定总酚酸含量,计算得 RSD 为 0.85%,表明方法重复性良

好。取已知总酚酸含量的化湿止痛方提取物 9 份,分为低、中、高 3 个加标水平,每份精密称定 0.25 g;分别精密加入相当于样品中绿原酸含量 80%、100%、120%的绿原酸对照品,按照供试品制备方法提取、稀释、显色后测定 A 值,计算总酚酸实测含量与理论加入总量的比值,结果显示平均回收率为 $(99.52 \pm 1.06)\%$ 。对制备的 3 批样品进行含量测定,测得总酚酸的平均质量分数为 8.556 mg/g, RSD 值为 0.56%。

2.1.3 提取工艺单因素考察 分别考察提取溶剂(甲醇、乙醇)、溶剂体积分数(50%~90%)、提取时间(0.5~2.5 h)、提取次数(1~5 次)、料液比(1:6~1:14)及提取温度(50~90 ℃)对提取效果的影响。总酚酸质量分数为关键药效成分,直接反映活性物质提取效果;出膏率体现整体提取效率,故以总酚酸质量分数和出膏率计算评分,并基于预实验中两者对后续药效贡献的等价性考量,设定二者权重相等,以兼顾药效物质基础与工业生产可行性。以评分作为评判依据,初步筛选各因素的较优范围。所有单因素及正交试验均使用同一批次的混合药材,提取液均采用相同方法浓缩、干燥,确保原料的同质性。

$$\text{评分} = \text{总酚酸质量分数} \times 50\% + \text{出膏率} \times 50\%$$

2.1.4 正交试验优化与验证 在单因素试验结果的基础上,设计正交试验,进一步优化关键工艺参数。最终确定最佳提取工艺,并进行 3 批平行验证试验。

2.2 化湿止痛凝胶剂的制备工艺研究

2.2.1 化湿止痛方提取物的制备 按照“2.1.4”项下优化的最佳提取工艺制备化湿止痛方提取物,作为凝胶剂的活性成分。

2.2.2 凝胶基质的筛选与优化 以黏度、透明度和延展性为主要评价指标,对卡波姆 940、泊洛沙姆 188、明胶及黄原胶等常用水性凝胶基质进行初步筛选。结果表明,卡波姆 940 的综合性能最佳。进一步考察卡波姆 940 在不同浓度下的性状,确定其适宜浓度范围。为解决主基质可能因 pH 值、电解质或药物加入导致的黏度下降问题,考察混合基质的使用,以提升凝胶剂稳定性。

2.2.3 辅料处方的单因素考察 在确定基质的基础上,采用单因素试验系统考察保湿剂(3%~15%)、促渗剂(0.5%~2.5%)、含药量(5%~25%)及抗氧剂的用量(0.02%~0.10%)对凝胶剂质量的影响。参考相关文献方法^[10-13],每次仅改变 1 个因素,固定其他辅料比例,以外观、延展性、黏度及

稳定性（包括耐热、耐寒、耐冷及离心稳定性）为评价指标。凝胶剂稳定性定义为制剂在经历不同温度环境及机械力作用后，保持其物理性质（如外观、质地均匀性、不分层）的能力。

（1）耐热稳定性：取化湿止痛凝胶剂 5 g 于 10 mL 离心管中，在 40 ℃烘箱中放置 48 h，观察凝胶的性质变化。

（2）耐寒稳定性：取化湿止痛凝胶剂 5 g 于 10 mL 离心管中，在-15 ℃冰箱冷冻放置 48 h，观察凝胶的性质变化。

（3）耐冷稳定性：取化湿止痛凝胶剂 5 g 于 10 mL 离心管中，在 4 ℃冰箱冷藏放置 48 h，观察凝

胶的性质变化。

（4）离心稳定性：取化湿止痛凝胶剂 5 g 于 10 mL 离心管中，以 4 000 r/min 的速度离心 30 min，观察凝胶是否发生分层。

依据建立的综合评分标准（表 1）进行评判，初步确定各辅料的较优用量范围，每项指标满分为 8 分（外观、延展性、黏度各占 8 分，稳定性四项各占 8 分），综合评分满分为 32 分。所有处方筛选实验均使用同一批次的化湿止痛方提取物，凝胶基质、辅料均使用同一批次试剂。

综合评分 = 外观得分 + 延展性得分 + 黏度得分 + 稳定性平均分

表 1 评价指标及评分标准的建立
Table 1 Establishment of evaluation indicators and scoring criteria

得分 (x) / 分	外观	延展性	黏度	稳定性			
				耐热稳定性	耐寒稳定性	耐冷稳定性	离心稳定性
6 < x ≤ 8	表面光滑有光泽，整体均匀一致，细腻，无颗粒团块，略有少量小气泡	易于涂布，涂于皮肤后舒适度优，可均匀涂开	搅拌时有阻力较小，凝胶可挂于玻璃棒	较凝胶无分层	凝胶无分层	凝胶无分层	凝胶无分层
4 < x ≤ 6	表面平整有光泽，整体均匀，较细腻，有大量小气泡	可涂布但细腻度差，涂于皮肤后舒适度良好，可均匀涂开	玻璃棒能搅动，轻度分层，凝胶挂玻璃棒成条状	轻度分层，有小颗粒	轻度分层，有小颗粒	轻度分层，有小颗粒	轻度分层，有小颗粒
2 < x ≤ 4	表面无光泽，整体均匀但略浑浊，较粗糙，无团块，有大气泡	可涂布但涂布性差，涂于皮肤后舒适度适中，易涂开	玻璃棒能搅动，轻度分层，凝胶不易挂玻璃棒	轻度分层，有大颗粒	轻度分层，有大颗粒	轻度分层，有大颗粒	轻度分层，有大颗粒
0 ≤ x ≤ 2	无光泽且表面不平整，粗糙，有团块和气泡，且不透明	黏性大不宜涂布，涂于皮肤后舒适度差，不易涂开	玻璃棒搅拌较困难	分层明显	分层明显	分层明显	分层明显

2.2.4 响应面法优化处方 基于单因素试验结果，选取促渗剂、保湿剂、含药量和抗氧化剂 4 个关键因素，采用 Box-Behnken 设计原理，以凝胶综合评分为响应值，进行 4 因素 3 水平的响应面分析。利用 Design-Expert 8.0.6 软件设计与分析共计 29 组实验，最终优化得出化湿止痛凝胶剂的最佳制备处方。

2.3 化湿止痛凝胶剂抗痛风性关节炎药效学研究

2.3.1 动物分组、造模与给药 SD 大鼠适应性饲养 1 周后，按体质量随机分为对照组、模型组、扶他林凝胶（3.1 mg/kg）组及化湿止痛凝胶高、中、低剂量（3.90、1.90、0.97 g/kg，以生药量计）组和扶他林凝胶（3.1 mg/kg）+化湿止痛凝胶中剂量（1.9 g/kg）组，每组 10 只。参照 Coderre 法构建急性痛风性关节炎模型，大鼠 ip 10%水合氯醛（3 mL/kg）麻醉后，于右后肢踝关节腔注射 0.1 mL 尿酸钠溶液（50 mg/mL），以关节囊对侧鼓起、关节出现红肿为

造模成功标志。实验所用尿酸钠溶液为同一批次配制，造模操作由同一实验人员在相同时间段内完成，以消除操作者及时间差异对实验结果的影响。造模成功后 1 h 开始给药，对照组和模型组给予空白基质，每日涂抹 3 次，连续给药至造模后 72 h。给药期间每日观察大鼠关节状况，末次给药后禁食 12 h 进行后续指标检测。

2.3.2 一般情况及关节指标观察 每日观察大鼠一般状况。于造模前及造模后 2、4、8、12、24、36、48、60、72 h，分别测量大鼠踝关节周长及足垫厚度。

2.3.3 疼痛行为评价 参照《药理实验方法学》，缓慢弯曲大鼠右后踝关节，根据大鼠的反应进行疼痛行为评分：0 分，无反应；1~3 分，轻度缩腿或轻微嘶叫；4~6 分，中度缩腿伴嘶叫；7~9 分，剧烈缩腿、嘶叫并试图逃脱；10 分，不能触碰或自发性嘶叫。

2.3.4 血清中 IL-1 β 、MIP-1 α 水平及 SOD 活性的检测 末次给药后禁食 12 h, 麻醉后腹主动脉取血, 分离血清。按照试剂盒说明书操作, 采用 Luminex 多因子检测技术测定血清中 IL-1 β 、MIP-1 α 水平及 SOD 活性。

2.3.5 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察滑膜组织病理变化 取踝关节滑膜组织, 经 4% 多聚甲醛固定、脱钙、石蜡包埋后切片, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.3.6 免疫组化检测滑膜组织 MMP9 和 TLR4 表达 取踝关节滑膜组织石蜡切片, 经柠檬酸钠抗原修复液热修复, 自然冷却。5% 牛血清白蛋白封闭后, 加入 MMP9、TLR4 抗体 (1:100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 孵育二抗, DAB 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 树胶封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.4 基于“物质-效应组群”网络的化湿止痛凝胶剂抗痛风性关节炎作用机制研究

2.4.1 网络药理学分析 基于外用药物经皮吸收特性, 按照外用网络药理学筛选方法^[4], 设定类药性 (drug-likeness, DL) > 0.18、相对分子质量 < 500、脂水分配系数 (AlogP) 1~3 为筛选条件, 从化湿止痛方中筛选潜在活性成分, 该范围可确保化合物具有良好的经皮渗透能力。从 GEO 数据库获取痛风性关节炎相关基因表达数据集 (GSE160170), 利用 R 语言 Limma 包筛选差异表达基因, 筛选标准为 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) | > 1、 $P < 0.05$ 。将成分靶点与疾病靶点取交集, 获得潜在作用靶点。

2.4.2 GSEA 与免疫浸润分析 采用 clusterProfiler 包进行 GSEA 分析, 以校正后 P 值 (P_{adj}) < 0.05 为显著性阈值, 考察差异表达基因在基因本体 (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) 通路中的富集情况。通过 ImmuCellAI 平台分析 24 种免疫细胞在样本中的浸润程度^[15]。

2.4.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建与核心靶点筛选 基于 String 数据库, 物种限定为 “Homo sapiens”, 设置置信度阈值 > 0.7, 运用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络。通过拓扑分析 (度中心性、接近中心性、紧密度中心性) 筛选核心靶点, 并进行 ROC 曲线评估^[16]。

2.4.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 使用 R 包对差异表达基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析, 物种设定为 “Homo sapiens”, 以 $P_{\text{adj}} < 0.05$

为显著性阈值, 揭示化湿止痛凝胶剂抗痛风性关节炎的关键生物学过程与信号通路。

2.4.5 分子对接验证 从 PDB 数据库获取核心靶点蛋白结构, 从 TCMSP 数据库下载活性成分结构, 采用 AutoDock 软件进行分子对接, 验证成分与靶点的结合能力。核心成分与靶蛋白是基于网络药理学分析中 “出现频次高、度值高” 的原则进行选择, 一般认为, 结合能 < 0 表示配体的小分子组分可以独立地结合受体的靶蛋白。结合能越低, 分子构象越稳定, 作用的可能性越大, 结合能的绝对值越大, 即配体和受体之间的结合越好。

2.4.6 实验验证 采用 qRT-PCR 和免疫荧光法检测化湿止痛凝胶剂对痛风性关节炎大鼠滑膜组织中核心靶点表达的影响。

(1) qRT-PCR 检测滑膜组织中 VEGFA 和 EGFR 的基因表达: 按照试剂盒说明书提取滑膜组织中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: 血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 上游引物序列 5'-CACCAAAGCCAGCATAGGAGAG-3', 下游引物序列 5'-CTGCGGATCTTGGACAAACAAATGC-3', 扩增产物长度为 144 bp; 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 上游引物序列 5'-AGGAGGTGGCTGGCTATGTTCTC-3', 下游引物序列 5'-TAGTTGGACAGGACGGCTA-AGGC-3', 扩增产物长度为 127 bp; GAPDH 上游引物序列 5'-CAGGAGGCA-TTGCTGATGAT-3', 下游引物序列 5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3', 扩增产物长度为 138 bp。

(2) 免疫荧光检测滑膜组织中 COX-2 表达: 取踝关节滑膜组织石蜡切片, 封闭后滴加 COX-2 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜; 加入荧光二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min, 加入含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片液, 于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 化湿止痛方提取工艺优化结果

3.1.1 提取溶剂及提取方法的考察 如表 2 所示, 乙醇作为提取溶剂、以超声为提取方法的评分最高, 因此采用乙醇超声提取法。

3.1.2 溶剂体积分数、提取时间、提取次数、料液比和提取温度的考察 如图 1 所示, 当乙醇体积分

表 2 提取溶剂及方法考察结果

Table 2 Investigation of extraction solvents and methods

溶剂	提取方法	总酚酸质量分数/ (mg·g ⁻¹)	出膏率/%	评分
甲醇	水浴提取	7.158 6	17.62	10.297 0
	超声提取	8.518 3	19.91	11.935 8
乙醇	水浴提取	10.340 4	19.93	13.217 3
	超声提取	10.925 3	20.96	13.935 7

数小于 70% 时, 评分随着乙醇体积分数的增加而升高, 而当乙醇体积分数大于 70% 时, 评分则随着乙醇体积分数的增加而降低, 这可能是由于随着乙醇体积分数的增大, 提取出的非酚酸类杂质占比变大, 从而使得酚酸类成分相对减少。当提取时间大于 1.5 h 时, 评分相对稳定, 可能是由于提取 1.5 h 时, 化湿止痛方中的酚酸类成分已经完全释放, 并

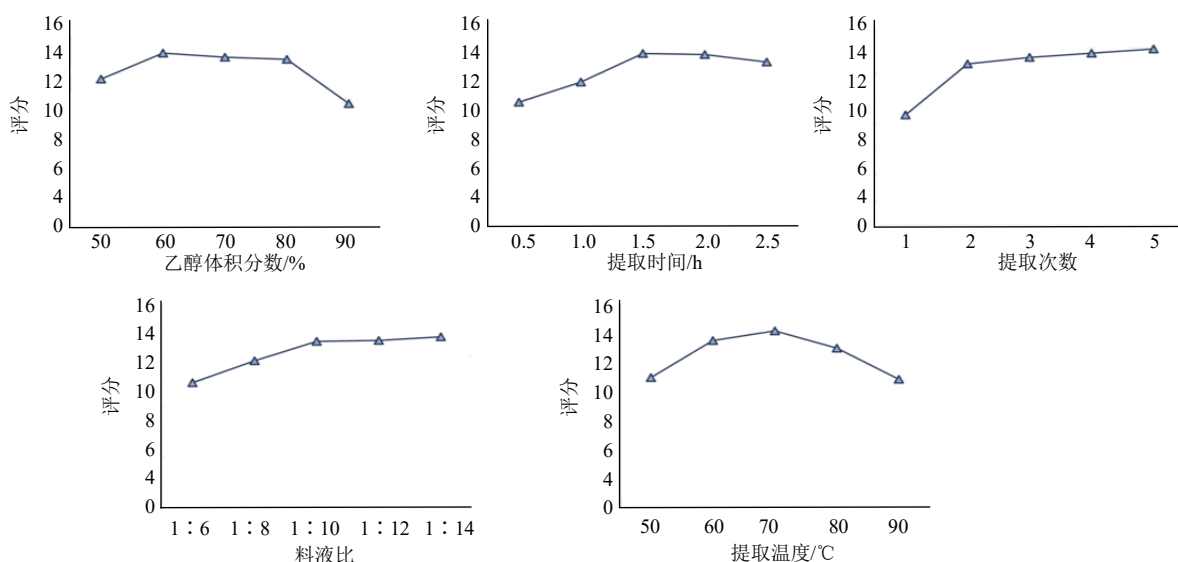


图 1 溶剂体积分数、提取时间、提取次数、料液比和提取温度的考察结果

Fig. 1 Investigation results of solvent concentration, extraction time, number of extractions, solid-to-liquid ratio and extraction temperature

达到一定的溶解平衡, 而再延长时间对提取率的影响不大。化湿止痛方中的酚酸类成分含量及出膏率随着提取次数的增加而增加, 当提取 2 次时, 评分趋于平稳, 结合相关工艺实际情况, 提取 2 次较为合理。化湿止痛方中的酚酸类成分及出膏率随着溶剂体积的增加而增加, 当料液比大于 1:10 时, 评分趋于稳定。当提取温度为 70℃ 时, 评分较高。

3.2 正交试验分析

根据以上结果, 发现提取次数、料液比变化趋势较为平缓, 溶剂体积分数、提取时间、提取温度均对总酚酸提取率及出膏率有显著影响, 且组间差异显著, 所以选择溶剂体积分数(A)、提取时间(B)、提取温度(C)做后续的正交试验分析。L₉(3³) 正交试验因素水平见表 3。

3.2.1 正交试验结果及方差分析 按照 L₉(3³) 正交试验表依次进行, 每个试验平行 3 次。试验方案及结果见表 4。由表 5 方差分析可知, 各因素影响程度依次为 B>A>C, 优化工艺参数为 A₁B₂C₂。

表 3 正交试验因素水平

Table 3 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	溶剂体积分数 (A) /%	提取时间 (B) /h	提取温度 (C) /℃
1	60	1.0	60
2	70	1.5	70
3	80	2.0	80

3.2.2 验证实验 在正交试验设计优化的最佳条件(乙醇体积分数 60%、提取时间 1.5 h、提取温度 70℃、提取 2 次、料液比 1:10)下, 对化湿止痛方进行 3 次平行提取, 结果如表 6 所示。

3.3 凝胶基质的筛选

在化湿止痛方提取物加入前, 4 种基质延展性良好, 其中卡波姆 940 黏度较大, 其余 3 者黏度较差, 卡波姆 940 和泊洛沙姆 188 澄清度良好, 明胶和黄原胶较差, 综合考虑, 选用卡波姆 940 为主要凝胶基质。1%卡波姆 940 溶液在黏度、澄明度、延展性方面特性均较好, 拟选用卡波姆 940 的质量分

表4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test

试验号	A/%	B/h	C/℃	D (空白)	出膏率/%	总酚酸质量 分数/(mg·g ⁻¹)
1	60	1.0	60	1	18.89	7.98
2	60	1.5	70	2	23.08	10.32
3	60	2.0	80	3	20.32	9.71
4	70	1.0	80	3	19.13	8.30
5	70	1.5	60	1	19.89	8.27
6	70	2.0	70	2	22.04	9.87
7	80	1.0	70	2	19.93	7.92
8	80	1.5	80	3	21.60	9.76
9	80	2.0	60	1	20.33	8.63
K ₁	62.29	57.95	62.53			
K ₂	61.06	64.57	62.54			
K ₃	61.86	62.69	60.14			
k ₁	20.76	19.32	20.84			
k ₂	20.35	21.52	20.85			
k ₃	20.62	20.90	20.05			
R	0.41	2.21	0.003			

表5 方差分析结果

Table 5 Results of analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值
A	0.259 8	2	0.129 9	0.042 5
B	7.758 5	2	3.879 2	1.268 5
C	1.274 7	2	0.637 3	0.208 4

表6 最佳提取工艺验证结果 (n=3)

Table 6 Verification results of optimal extraction process

批次	总酚酸质量分数/ (mg·g ⁻¹)	出膏率/%	评分
1	10.23	22.96	14.049
2	10.01	22.77	13.838
3	10.37	23.32	14.255
均值	10.20	23.02	14.047
RSD/%	1.78	1.21	1.48

数为1%。将0.2%泊洛沙姆188、0.2%明胶、0.2%黄原胶分别与1%卡波姆940进行混合配比,结果如表7所示,0.2%泊洛沙姆188、0.2%黄原胶与1%卡波姆940配比后涂抹均较均匀,但0.2%泊洛沙姆188除了能够增加黏度之外,还可以促进药物渗透吸收,因此选择0.2%泊洛沙姆188与1%卡波姆940进行混合配比。

3.4 单因素实验结果

单因素实验结果(图2)显示,保湿剂5%~10%、促渗剂1.0%~2.0%、含药量10%~20%、抗氧化剂0.04~0.08%时,凝胶剂的综合评分较高,因此选择该范围作为后续响应面实验的测试范围。

表7 混合凝胶基质的筛选结果

Table 7 Screening results of mixed gel matrices

混合凝胶基质	黏度	澄明度	延展性
1%卡波姆940和0.2%泊洛沙姆188	适中	透明状	较好
1%卡波姆940和0.2%明胶	适中	不透明状	较差
1%卡波姆940和0.2%黄原胶	适中	不透明状	较好

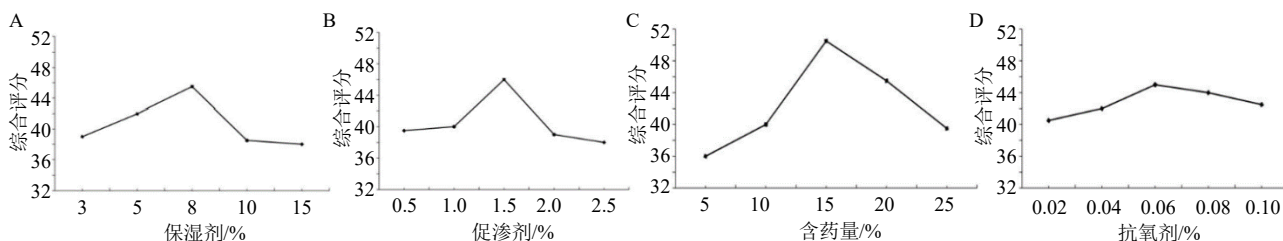


图2 保湿剂(A)、促渗剂(B)、含药量(C)和抗氧化剂(D)对凝胶剂综合评分的影响

Fig. 2 Effects of moisturizers (A), penetration enhancers (B), drug content (C) and antioxidants (D) on comprehensive score of gel

3.5 响应面实验结果

以凝胶剂的综合评分为响应值进行分析,使用Design-Expert 8.0.6软件进行Box-Behnken的实验设计,结果见表8。

根据Design-Expert 8.0.6软件对表8中数据结果进行分析,根据试验设计和试验结果进行多元回归、拟合分析。4个因素的编码值二次回归方程为: $Y=48.50-0.042 A-0.29 B-1.17 C+0.67 D+0.50$

$$AB-0.25 AC+0.38 AD-1.25 BC-0.87 BD+0.25 CD-5.69 A^2-0.19 B^2-2.63 C^2-0.75 D^2。$$

3.5.1 响应面回归模型方差分析 应用Design-Expert 8.0.6软件进行对应的方差分析,结果见表9。残差正态概率分布、残差与方程预测值的对应关系和预测值与试验实际值的对应关系如图3所示,分析结果显示数据稳定性良好。由表9可知,模型的 $P<0.000 1$,表明模型显著。一次项C显著($P<$

表 8 Box-Behnken 试验设计参数
Table 8 Parameters of Box-Behnken experimental design

组号	试验号	保湿剂 (A) /%	促渗剂 (B) /%	含药量 (C) /%	抗氧化剂 (D) /%	总分
1	24	5.0	1.0	15	0.06	44.0
2	16	10.0	1.0	15	0.06	42.5
3	25	5.0	2.0	15	0.06	41.5
4	2	10.0	2.0	15	0.06	42.0
5	27	7.5	1.5	10	0.04	46.0
6	5	7.5	1.5	20	0.04	43.0
7	1	7.5	1.5	10	0.08	46.5
8	26	7.5	1.5	20	0.08	44.5
9	22	5.0	1.5	15	0.04	41.0
10	7	10.0	1.5	15	0.04	40.5
11	10	5.0	1.5	15	0.08	41.0
12	17	10.0	1.5	15	0.08	42.0
13	6	7.5	1.0	10	0.06	44.5
14	9	7.5	2.0	10	0.06	47.5
15	19	7.5	1.0	20	0.06	44.5
16	11	7.5	2.0	20	0.06	42.5
17	29	5.0	1.5	10	0.06	42.0
18	18	10.0	1.5	10	0.06	42.5
19	12	5.0	1.5	20	0.06	40.5
20	21	10.0	1.5	20	0.06	40.0
21	28	7.5	1.0	15	0.04	47.0
22	4	7.5	2.0	15	0.04	48.0
23	15	7.5	1.0	15	0.08	51.0
24	20	7.5	2.0	15	0.08	48.5
25	13	7.5	1.5	15	0.06	48.5
26	3	7.5	1.5	15	0.06	49.5
27	8	7.5	1.5	15	0.06	47.5
28	14	7.5	1.5	15	0.06	48.0
29	23	7.5	1.5	15	0.06	49.0

0.01), 二次项 A^2 、 C^2 极显著 ($P<0.000\ 1$), B^2 、 D^2 不显著。说明 A^2 、 C^2 极显著地影响化湿止痛凝胶剂评分 ($P<0.000\ 1$), C 显著影响化湿止痛凝胶剂评分 ($P<0.01$), 其余因素对化湿止痛凝胶剂评分的影响不显著。失拟项的 P 值= $0.137\ 0>0.05$ (不显著)。 $R^2=0.923\ 2$, $R_{adj}^2=0.884\ 64$, 有 11.54% 的情况该模型无法解释。总体来说, 该模型拟合程度良好, 误差较小, 回归显著, 可很好地描述不同辅料与化湿止痛凝胶剂评分之间的关系。综合以上数据分析, 实验范围内各因素对化湿止痛凝胶剂评分的影响大小为 C (含药量) $>A$ (保湿剂) $>B$ (促渗剂) $>D$ (抗氧化剂)。

3.5.2 响应面热图及等高图分析 为确定上述 4 因素及其交互作用对化湿止痛凝胶剂综合评分的影响, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件绘制相应的响应面图, 见图 4。响应面图中, 若等高线为圆形, 则两因素之间存在较弱的交互作用; 而若等高线为椭圆形, 则两因素之间的交互作用则较强。在这 4 个因素之间双因素交互作用的响应面均呈现出开口向下的凸形曲线, 表明实验范围内化湿止痛凝胶剂综合评分的响应值存在 1 个极高值, 即筛选出的评分最优条件存在于所设计的整个因素水平范围之内。根据结果可知, 化湿止痛凝胶剂综合评分的优化工艺条件中各因素等高线趋于-圆形, 结合模型方差分析结果, 各因素的交互作用相对较弱。

表 9 响应面试验方差参数分析
Table 9 Analysis of variance parameters of response surface methodology

来源	平方和	自由度	均方差	F值	P值
模型	270.158 8	14	19.297 1	12.018 2	1.79×10^{-5}
A	0.020 8	1	0.020 8	0.013 0	0.910 9
B	1.020 8	1	1.020 8	0.635 8	0.438 6
C	16.333 3	1	16.333 3	10.172 4	0.006 6
D	5.333 3	1	5.333 3	3.321 6	0.089 8
AB	1.000 0	1	1.000 0	0.622 8	0.443 2
AC	0.250 0	1	0.250 0	0.155 7	0.699 1
AD	0.562 5	1	0.562 5	0.350 3	0.563 4
BC	6.250 0	1	6.250 0	3.892 5	0.068 6
BD	3.062 5	1	3.062 5	1.907 3	0.188 9
CD	0.250 0	1	0.250 0	0.155 7	0.699 1
A^2	209.822 6	1	209.822 6	130.677 3	1.74×10^{-8}
B^2	0.228 0	1	0.228 0	0.142 0	0.711 9
C^2	44.695 9	1	44.695 9	27.836 6	1.17×10^{-4}
D^2	3.648 6	1	3.648 6	2.272 4	0.153 9
残差	22.479 2	14	1.605 7		
失拟项	19.979 2	10	1.997 9	3.196 7	0.137 0
纯偏差	2.500 0	4	0.625 0		
总离差	292.637 9	28			

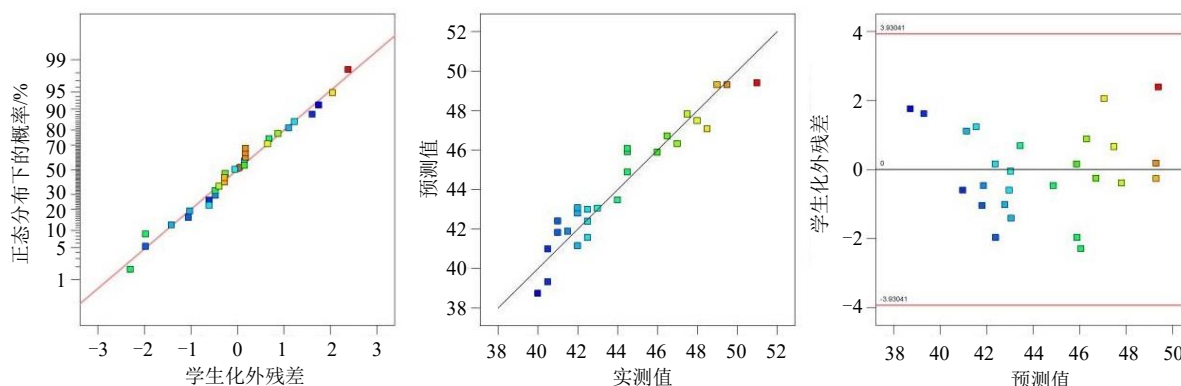


图 3 响应面试验数据稳定性分析

Fig. 3 Stability analysis of response surface experimental data

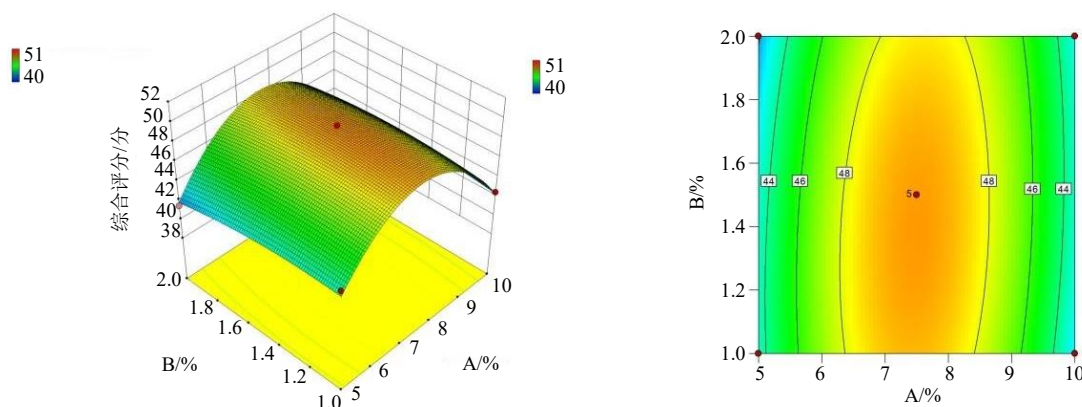


图 4 不同影响因素间的响应面热图及等高图分析

Fig. 4 Response surface heatmaps and contour plots among different influencing factors

3.5.3 验证试验 根据上述分析,发现各因素间的等高线和响应面与其相对应的回归方程分析结果吻合,根据 Design-Expert 软件预测的分析结果,得到化湿止痛凝胶剂辅料最优配比工艺参数。结果表明化湿止痛凝胶剂辅料最优配比工艺为保湿剂 7.474%、促渗剂 1.219%、含药量 14.722%、抗氧化剂 0.070%。在此条件下,化湿止痛凝胶剂的理论评分预测值可达为 49.58。结合理论预测和实际应用,并充分考虑实际可操作性,将最佳提取工艺参数修正为保湿剂 7.5%、促渗剂 1.2%、含药量 14.7%、抗氧化剂 0.07%。利用选定的最优条件检验模型方程预测最优响应值的适用性,化湿止痛凝胶剂的实际评分为 49.5 ± 1.0 ,结果吻合度较高,与理论预测值相比相对误差较小,表明该优化工艺具有较好的稳定性和可行性。

3.6 化湿止痛凝胶抗痛风性关节炎药效学评价

3.6.1 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠关节肿胀、右后足垫厚度和镇痛作用的影响 如图 5-A、

B 所示,与对照组比较,造模后 4 h 大鼠的关节肿胀周长显著升高 ($P < 0.01$),提示造模成功。模型组大鼠关节肿胀周长于 12 h 达到峰值,扶他林凝胶组和扶他林凝胶+化湿止痛凝胶组关节肿胀周长于 4 h 达到峰值,化湿止痛凝胶中剂量组关节肿胀周长于 8 h 达到峰值,化湿止痛凝胶低、高剂量组关节肿胀周长于 12 h 达到峰值。与模型组比较,各给药组均能显著缓解大鼠关节肿胀程度 ($P < 0.01$ 、 0.001)。如图 5-C 所示,造模前各组大鼠右后足垫厚度无显著性差异,造模后大鼠足垫厚度显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组均能显著降低大鼠足垫厚度 ($P < 0.01$)。通过缓慢弯曲 SD 大鼠一侧踝关节,根据嘶叫与缩腿次数来综合测定各组的疼痛行为评分。结果如图 5-D 所示,与对照组比较,模型组大鼠疼痛行为评分普遍偏高,表明造模后大鼠的痛感十分显著;与模型组比较,扶他林凝胶+化湿止痛凝胶组、扶他林凝胶组和化湿止痛凝胶中、高剂量组疼痛行为评分明显降低,其中

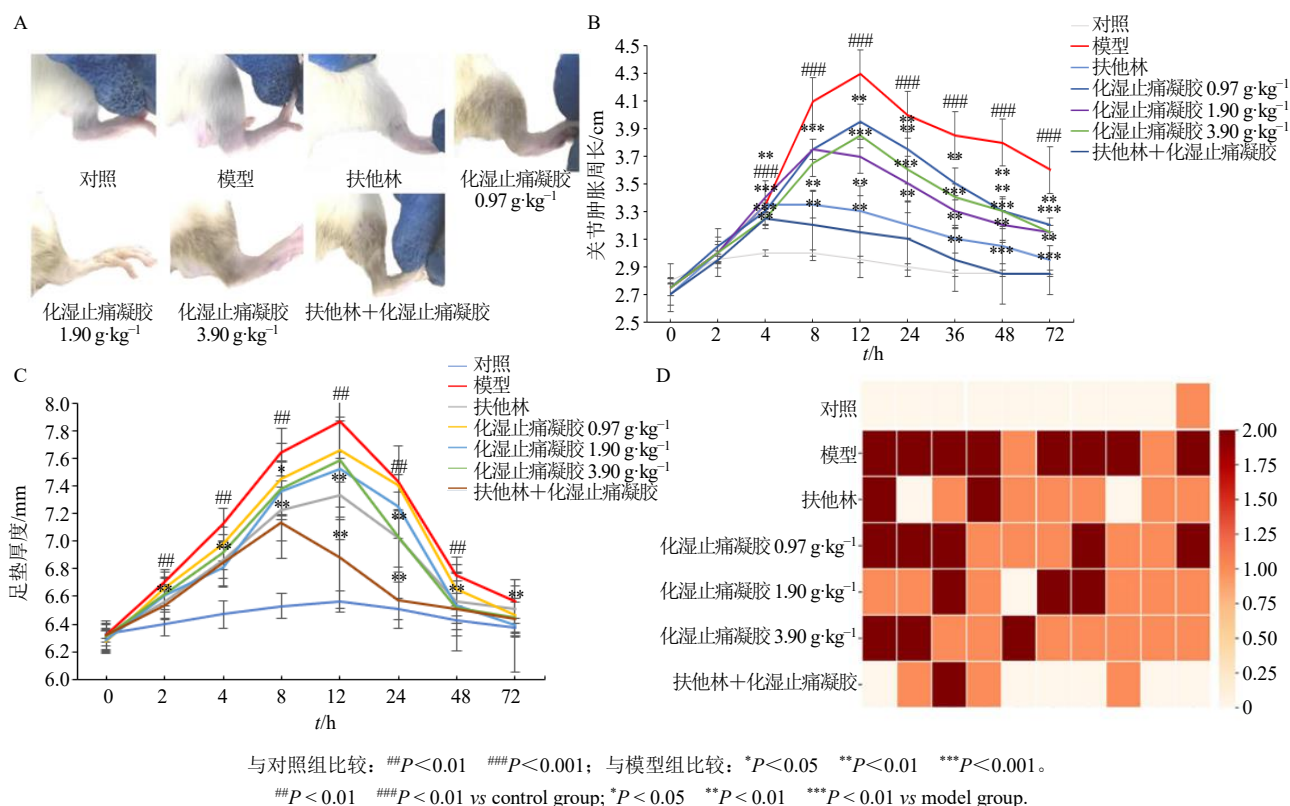


图 5 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠关节肿胀 (A、B) 及右后足垫厚度 (C) 和疼痛行为评分热图 (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effect of Huashi Zhitong Gel on joint swelling (A, B), thickness of right hind foot pad (C) and pain behavior score heatmap (D) in rats with gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

扶他林凝胶+化湿止痛凝胶组作用最佳。以上结果表明, 各给药组均能显著降低关节肿胀程度、足垫厚度及疼痛评分, 其中扶他林凝胶+化湿止痛凝胶组效果最为显著, 提示化湿止痛凝胶具有良好的抗炎镇痛作用。

3.6.2 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠血清中 IL-1 β 、MIP-1 α 水平和 SOD 活性的影响 如表 10

所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 和 MIP-1 α 水平显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组血清中 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), SOD 活性显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 扶他林凝胶组及化湿止痛凝胶中、高剂量组和扶他林凝胶+化湿止痛凝胶组 MIP-1 α 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。本研究

表 10 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠血清中 IL-1 β 、MIP-1 α 水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 10 Effect of Huashi Zhitong Gel on levels of IL-1 β , MIP-1 α and activity of SOD in serum of rats with gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	MIP-1 α /(pg·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)
对照	—	164.5 $\pm$ 17.9	158.3 $\pm$ 19.4	86.3 $\pm$ 6.9
模型	—	416.7 $\pm$ 75.3 ^{##}	271.7 $\pm$ 54.1 ^{##}	76.0 $\pm$ 8.0 [#]
扶他林凝胶	3.1 $\times$ 10 ⁻³	227.3 $\pm$ 25.5 ^{**}	186.7 $\pm$ 22.0 ^{**}	104.6 $\pm$ 7.5 ^{**}
化湿止痛凝胶	0.97	311.9 $\pm$ 48.4 [*]	227.2 $\pm$ 34.2	89.4 $\pm$ 6.9 [*]
	1.90	278.6 $\pm$ 35.6 ^{**}	203.9 $\pm$ 15.2 [*]	92.5 $\pm$ 6.6 ^{**}
	3.90	274.1 $\pm$ 33.5 ^{**}	212.4 $\pm$ 26.0 [*]	95.2 $\pm$ 6.9 ^{**}
扶他林凝胶+化湿止痛凝胶	3.1 $\times$ 10 ⁻³ +1.9	153.2 $\pm$ 20.3 ^{**}	152.7 $\pm$ 11.5 ^{**}	115.7 $\pm$ 4.6 ^{**}

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

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

化湿止痛凝胶高剂量组在多数指标上未表现出优于中剂量组的趋势,推测可能与外用制剂的经皮吸收特性有关:当药物浓度达到一定水平后,皮肤通透性趋于饱和,继续增加剂量并不能提高局部有效浓度;此外,过高浓度的提取物可能含有较多杂质,反而干扰活性成分的透皮吸收或产生局部刺激。提示临床应用中并非剂量越高效果越好,应寻求最佳有效剂量。

3.6.3 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠滑膜组织病理变化的影响 如图 6 所示,对照组大鼠踝关节滑膜组织结构较为清晰,具有显著的轮廓,滑膜细胞形态呈现正常,结构较为完整并呈现单层式分布,无细血管充血、炎性细胞浸润的现象出现;而

模型组踝关节滑膜组织炎性细胞浸润较为显著,以淋巴细胞和中性粒细胞浸润为主,且滑膜细胞出现增生现象;与模型组比较,各给药组滑膜组织结构较清晰,炎性细胞浸润、滑膜细胞增生等情况得到明显改善。

3.6.4 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠滑膜组织 TLR4 和 MMP9 蛋白表达的影响 如图 7 所示,阳性表达区域呈棕褐色,以胞质染色为主。与对照组比较,模型组大鼠踝关节滑膜组织 TLR4 和 MMP9 的阳性表达明显增加;与模型组比较,各给药组 TLR4 和 MMP9 的阳性表达明显降低,表明化湿止痛凝胶能够抑制大鼠踝关节滑膜组织局部炎症反应的进一步扩大,从而改善痛风性关节炎。

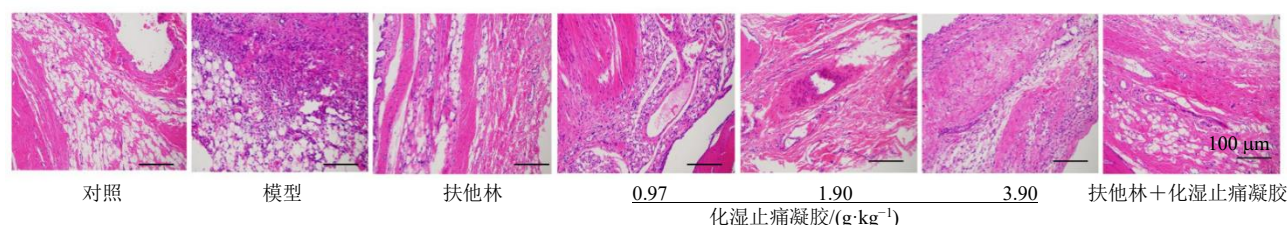


图 6 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠滑膜组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 6 Effect of Huashi Zhitong Gel on pathological changes in synovial tissue of rats with gouty arthritis (HE, ×100)

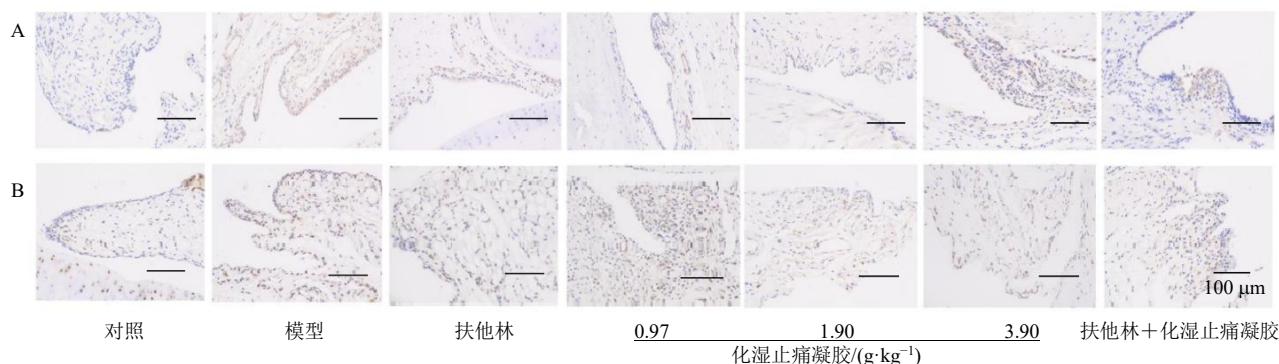


图 7 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠滑膜组织 TLR4 (A) 和 MMP9 (B) 表达的影响 (×200)

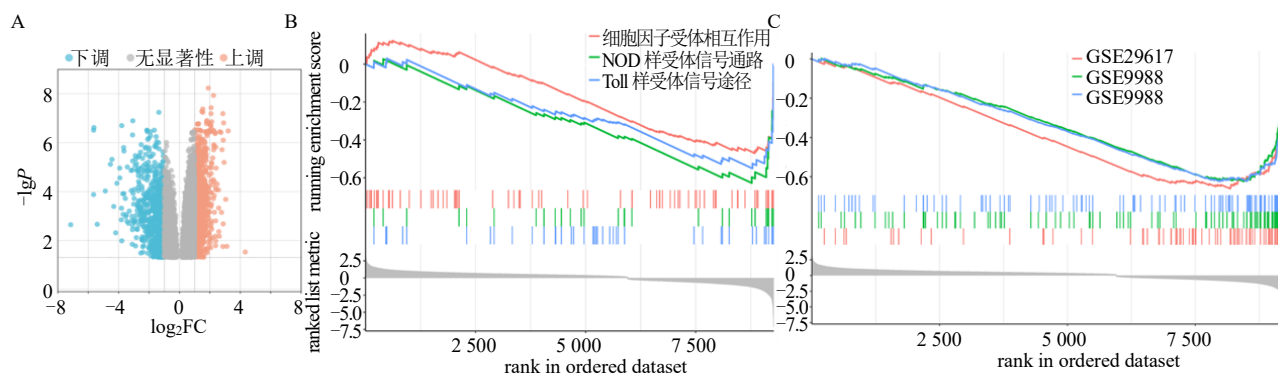
Fig. 7 Effect of Huashi Zhitong Gel on expressions of MMP9 (A) and TLR4 (B) in synovial tissue of rats with gouty arthritis (×200)

3.7 基于网络药理学的化湿止痛凝胶抗痛风性关节炎机制研究

3.7.1 痛风性关节炎 GEO 芯片基因分析 获取 GEO 数据集并进行数据的拷贝下载,通过应用 R 语言将一系列的 SEQUENCE 数据级与探针 ID 进行对应。按照 $P < 0.05$ 的筛选条件将基因 ID 进行转换,根据 $|\log_2FC| > 1$ 的原则绘制差异表达基因火山图 (图 8-A),得到痛风性关节炎患者的上调差异基因 1 088 个,下调差异基因 867 个。应用 GSEA 获取差异性表达最显著的作用通路 (图 8-B),分别为细胞因子

受体相互作用、NOD 样受体信号通路、Toll 样受体信号途径。通过免疫浸润分析确定了与免疫相关的最显著的组别 GSE29617、GSE9988 (图 8-C),为化湿止痛凝胶可能通过调节 T 细胞、巨噬细胞等免疫细胞浸润来发挥抗炎作用提供分析基础。

3.7.2 化湿止痛方外用活性成分的确定 结合外用药物经皮吸收的特点,设置 $DL > 0.18$ 、相对分子质量 < 500 、 A_{logP} 为 1~3,在 TCMSP 数据库中筛选出化湿止痛方外用活性成分 66 个 (表 11),可作为化湿止痛方外用治疗的活性成分。



A-痛风性关节炎患者差异基因表达图; B-GSEA; C-免疫浸润分析。

A-differential gene expression profile in patients with gouty arthritis; B-GSEA; C-immune infiltration analysis.

图8 痛风性关节炎 GEO 芯片基因分析

Fig. 8 GEO chip gene analysis for gouty arthritis

表11 化湿止痛方外用活性分子属性

Table 11 Properties of active molecules for external use in Huashi Zhitong Formula

序号	Mol ID	化合物	相对分子质量	AlogP	DL	来源
1	MOL000098	槲皮素	302.25	1.50	0.28	厚藤、三七、山豆根、蒲公英、金银花
2	MOL000422	山柰酚	286.25	1.77	0.24	厚藤、山豆根、金银花
3	MOL002008	杨梅素	318.25	1.24	0.31	厚藤
4	MOL001987	β-谷甾醇	546.57	1.55	0.70	厚藤
5	MOL003608	O-acetylcolumbianetin	288.32	2.41	0.26	独活
6	MOL004777	当归醇D	376.44	2.77	0.34	独活
7	MOL004778	[(1R,2R)-2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxochromen-6-yl)-3-methylbutyl]-(Z)-2-methylbut-2-enoate	376.44	2.77	0.34	独活
8	MOL004782	[(1R,2R)-2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxochromen-6-yl)-3-methylbutyl]-3-methylbutanoate	378.46	2.59	0.34	独活
9	MOL000443	erythraline	297.38	2.06	0.55	海桐皮
10	MOL000451	erysodienone	313.38	1.61	0.44	海桐皮
11	MOL000453	1,2,6,7-tetradecahydro-3,15-dimethoxyerythrinan-16-ol	299.40	2.01	0.39	海桐皮
12	MOL000454	erysotine	317.42	1.35	0.44	海桐皮
13	MOL000455	刺桐特灵碱	313.43	2.26	0.44	海桐皮
14	MOL001558	芝麻素	354.38	2.24	0.83	两面针
15	MOL002663	茵芋碱	259.28	2.33	0.20	两面针
16	MOL002881	香叶木素	300.28	2.32	0.27	两面针、蒲公英
17	MOL000396	丁香树脂酚	418.48	2.10	0.72	两面针
18	MOL004217	鹅掌楸碱	275.27	2.88	0.53	两面针
19	MOL005097	5-[(1S,3aS,4R,6aS)-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[4,3-c]furan-4-yl]-2-methoxyphenol	356.40	2.19	0.67	两面针
20	MOL005098	chelerythrine methanolate	381.46	2.46	0.86	两面针
21	MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	302.30	2.28	0.27	两面针
22	MOL005103	6-[(2R)-2,3-dihydroxy-3-methyl-butyl]-5,7-dimethoxy-coumarin	308.36	1.66	0.22	两面针
23	MOL005106	oxyterihanine	349.36	2.90	0.81	两面针
24	MOL000986	1-asarinine	354.38	2.24	0.83	两面针
25	MOL005622	tomentogenin	368.57	1.07	0.53	徐长卿
26	MOL005631	cynatratoside B_qt	360.49	1.77	0.80	徐长卿
27	MOL001792	食脂素	256.27	2.57	0.18	三七
28	MOL001280	异乳香醇	340.56	2.97	0.28	乳香
29	MOL000390	大豆苷元	254.25	2.33	0.19	乳香、山豆根
30	MOL000751	铁线莲酚A	358.42	2.13	0.52	威灵仙
31	MOL001729	大黄酚	254.25	2.76	0.21	半夏
32	MOL002714	黄芩素	270.25	2.33	0.21	半夏
33	MOL006931	异落叶松脂素	360.44	2.25	0.39	半夏
34	MOL006957	(3S,6S)-3-(benzyl)-6-(4-hydroxybenzyl)piperazine-2,5-quinone	310.38	2.15	0.27	半夏

表 11 (续)

序号	Mol ID	化合物	相对分子质量	AlogP	DL	来源
35	MOL001484	inermine	284.28	2.44	0.54	山豆根
36	MOL000354	异鼠李素	316.28	1.76	0.31	山豆根
37	MOL003627	槐果碱	246.39	1.39	0.25	山豆根
38	MOL003633	oxynarcotine	431.48	2.45	0.6	山豆根
39	MOL003648	马卡因	284.28	2.44	0.54	山豆根
40	MOL003662	7,4'-二羟基黄酮	254.25	2.60	0.18	山豆根
41	MOL003667	subprogenin B	488.78	2.89	0.72	山豆根
42	MOL003675	3,4,5,6-tetradehydrospartein-2-one	244.37	1.15	0.24	山豆根
43	MOL003676	槐胺碱	244.37	1.15	0.25	山豆根
44	MOL003677	槐醇碱	262.44	1.86	0.28	山豆根
45	MOL003680	槐定碱	248.41	1.42	0.25	山豆根
46	MOL005944	苦参碱	248.41	1.42	0.25	山豆根
47	MOL003684	氧化槐果碱	262.39	1.36	0.29	山豆根
48	MOL003685	氧化苦参碱	264.41	1.38	0.28	山豆根
49	MOL003687	anagyrine	242.4	2.05	0.24	山豆根
50	MOL000390	daidzein	254.25	2.33	0.19	山豆根
51	MOL000392	芒柄花素	268.28	2.58	0.21	山豆根
52	MOL000472	大黄素	270.25	2.49	0.24	山豆根
53	MOL000476	大黄素甲醚	284.28	2.74	0.27	山豆根
54	MOL000481	染料木素	270.25	2.07	0.21	山豆根
55	MOL000006	木犀草素	286.25	2.07	0.25	蒲公英、金银花
56	MOL000008	芹菜素	270.25	2.33	0.21	蒲公英、金银花
57	MOL002083	苜蓿素	330.31	2.30	0.34	金银花
58	MOL002566	3-O-甲基槲皮素	316.28	1.57	0.30	金银花
59	MOL002914	圣草酚	288.27	2.03	0.24	金银花
60	MOL003044	金圣草素	300.28	2.32	0.27	金银花
61	MOL003093	5-O-caffeoyl quinic acid butyl ester	410.46	1.16	0.41	金银花
62	MOL003095	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	358.37	2.80	0.41	金银花
63	MOL003096	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-hydroxy-7-methoxy-chromone	328.34	2.82	0.34	金银花
64	MOL003097	黄酮	298.31	2.84	0.27	金银花
65	MOL003098	2-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-7-methoxy-chromone	328.34	2.52	0.33	金银花
66	MOL003117	ioniceracetalides B _{qt}	314.37	1.00	0.19	金银花

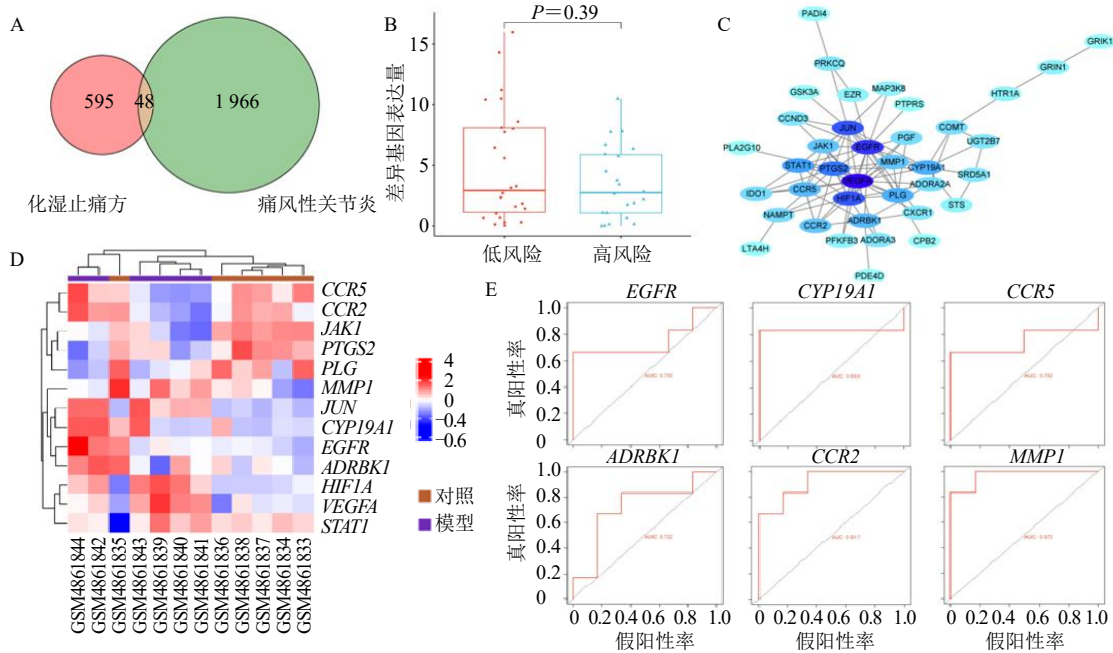
3.7.3 化湿止痛方抗痛风性关节炎关键靶点分析

根据获得的化湿止痛方外用活性成分, 结合 TCMSP、SWISS TP、Drugbank 数据库获取药物的作用靶点, 去重后, 得到成分有效作用靶点 643 个, 通过与痛风性关节炎患者差异基因取交集 (图 9-A), 确定了化湿止痛方外用抗痛风性关节炎的作用靶点 48 个, 其中包含上调靶点 22 个、下调靶点 26 个 (图 9-B), 这些靶点可作为化湿止痛方抗痛风性关节炎的作用靶点。将获取的差异靶点导入 String 数据库进行 PPI 分析, 将分析结果导入 Cytoscape 软件进行可视化处理, 根据度值、平均最短路径长度、介电性、封闭性综合评分确定血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, *VEGFA*)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*)、*PTGS2*、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , *HIF1A*)、转录因子 AP-1 (Jun proto-oncogene, *JUN*)、信号转导及转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, *STAT1*)、细胞色素 P450 19A1 (cytochrome P450

family 19 subfamily A member 1, *CYP19A1*)、纤溶酶原 (plasminogen, *PLG*)、G 蛋白偶联受体激酶 2 (G protein-coupled receptor kinase 2, *ADRBK1*)、C-C 趋化因子受体 5 (C-C motif chemokine receptor 5, *CCR5*)、C-C 趋化因子受体 2 (C-C motif chemokine receptor 2, *CCR2*)、Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, *JAK1*)、*MMP1* 为核心基因 (图 9-C)。对这些核心靶点进行差异表达分析, 通过分析患者的基因表达量构建聚类热图。如图 9-D 所示, *JUN*、*CYP19A1*、*EGFR*、*ADRBK1* 等基因在患者体内呈现出聚集高表达状态。对关键基因进行 ROC 分析 (图 9-E), 结果显示 *EGFR*、*CYP19A1*、*CCR5*、*ADRBK1*、*CCR2* 以及 *MMP1* 均大于 0.7, 提示关键基因的诊断价值良好。

3.7.4 化湿止痛方抗痛风性关节炎 GO 及 KEGG 分析

GO 富集分析结果如图 10-A 所示, 生物学过程 (biological process, BP) 主要富集在细胞分泌调节、细胞对氮化合物的反应、血液循环、炎症反应、离子转运调节、对无机物质的反应、对外源性刺激的

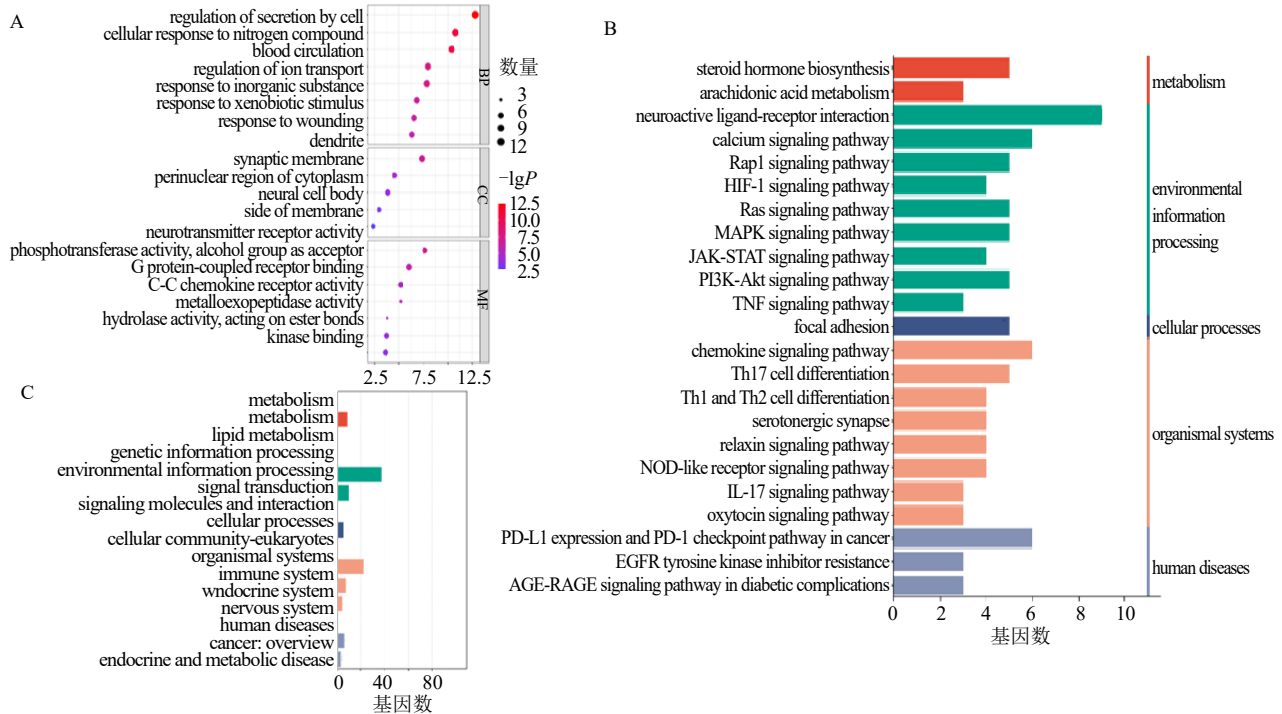


A-化湿止痛方抗痛风性关节炎的潜在靶点; B-化湿止痛方抗痛风性关节炎差异基因表达量; C-化湿止痛方抗痛风性关节炎 Hub 基因筛选; D-患者体内 Hub 基因差异表达聚类图; E-关键基因的 ROC 分析。

A-potential targets of Huashi Zhitong Formula against gouty arthritis; B-differential gene expression levels of Huashi Zhitong Formula against gouty arthritis; C-Hub gene screening of Huashi Zhitong Formula against gouty arthritis; D-cluster heatmap of differentially expressed Hub genes in patients; E-ROC analysis of key genes.

图 9 化湿止痛方抗痛风性关节炎关键靶点分析

Fig. 9 Analysis of key targets of Huashi Zhitong Formula against gouty arthritis



A-化湿止痛方抗痛风性关节炎 GO 分析; B-化湿止痛方抗痛风性关节炎作用通路分析; C-化湿止痛方抗痛风性关节炎具体二级通路分析。

A-GO analysis of Huashi Zhitong Formula against gouty arthritis; B-pathway analysis of Huashi Zhitong Formula against gouty arthritis; C-analysis of specific secondary pathways of Huashi Zhitong Formula against gouty arthritis.

图 10 化湿止痛方抗痛风性关节炎 GO 及 KEGG 分析

Fig. 10 GO and KEGG analysis of Huashi Zhitong Formula against gouty arthritis

反应、对伤害的反应等条目，细胞组分（cellular component, CC）主要富集在枝晶、突触膜、细胞质核周区、神经元细胞体、膜的侧面等条目，分子功能（molecular function, MF）主要富集在神经递质受体活性、磷酸转移酶活性、G 蛋白偶联受体结合、C-C 趋化因子受体活性、金属外肽酶活性、水解酶活性、激酶结合等条目。作用通路分析结果如图 10-B 所示，作用通路包括新陈代谢、环境信息处理、细胞过程、组织系统、人类疾病 5 大类，化湿止痛方外用治疗痛风性关节炎的作用靶点主要富集在环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate, cAMP）信号通路、神经活性配体受体相互作用、程序性死亡配体 1（programmed cell death ligand 1, PD-L1）在癌症中的表达及程序性死亡受体-1（programmed cell death protein-1, PD-1）检查点通路、类固醇激素生物合成、趋化因子信号通路、Th17

细胞分化、钙信号通路、Th1 和 Th2 细胞分化等通路，提示这些经典通路可能在化湿止痛方外用治疗痛风性关节炎作用中发挥着重要作用。为进一步分析化湿止痛方基因组对通路的调控情况，对其作用的二级通路进行分析，如图 10-C 所示，基因主要富集在新陈代谢过程中的脂质代谢，环境信息中的信号转导、信号分子和相互作用，细胞过程中的细胞群落真核生物，生物体系统中的免疫系统、内分泌系统、神经系统，人类疾病中的癌症、内分泌和代谢疾病，表明化湿止痛方外用治疗痛风性关节炎与这些生物活性行为密切相关。

3.7.5 化湿止痛方外用抗痛风性关节炎“物质-效应”网络的构建 在获取化湿止痛方外用抗痛风性关节炎的有效成分、作用靶点、作用通路的基础上，构建化湿止痛方外用抗痛风性关节炎“物质-效应”网络见图 11。

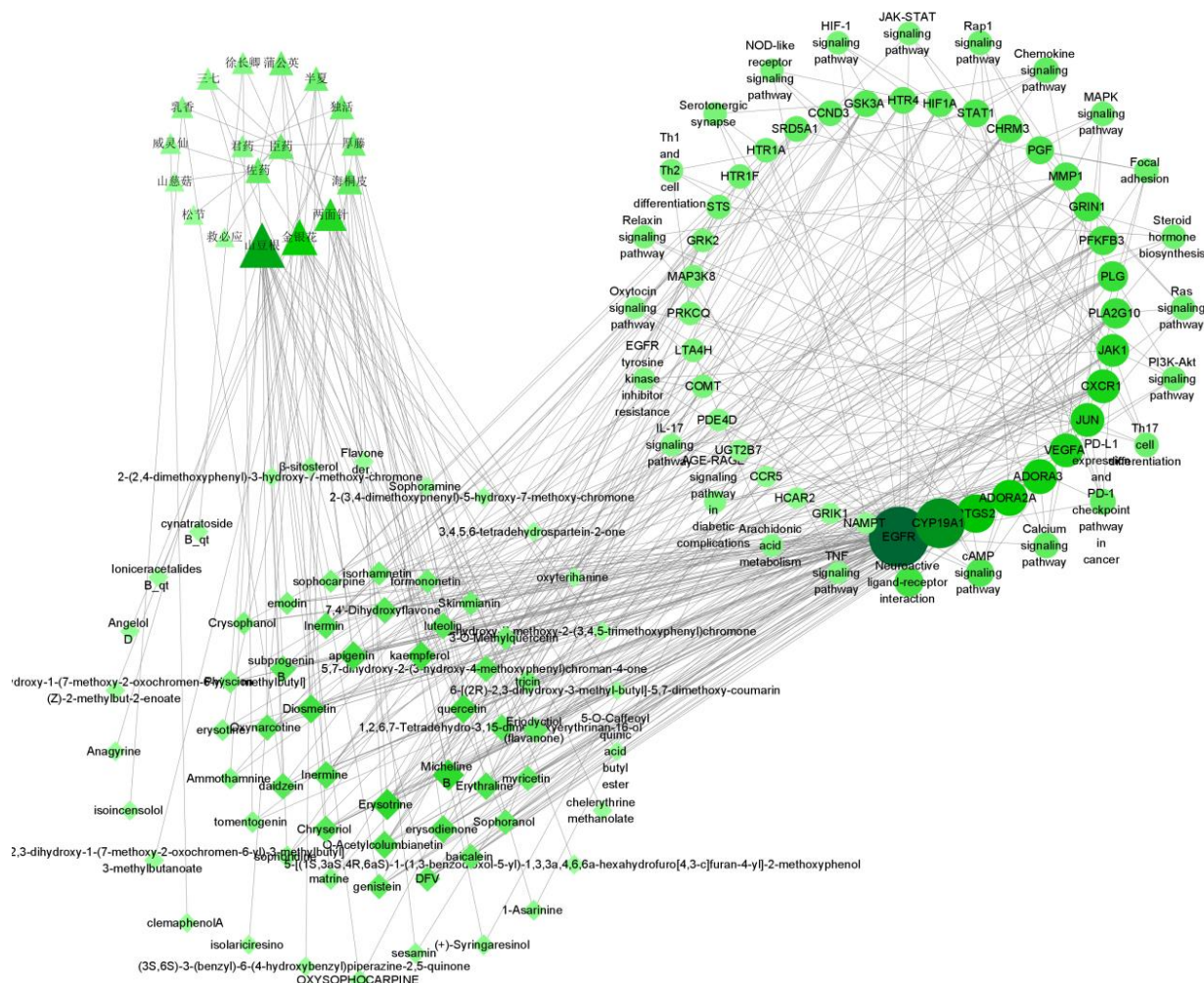


图 11 化湿止痛方外用抗痛风性关节炎“物质-效应”网络

Fig. 11 “Component-effect” network of Huashi Zhitong Formula for external application against gouty arthritis

3.7.6 分子对接验证 结合成分外用化学性质及在化湿止痛方的出现频次，使用 Autodock 4.2.6 软件将槲皮素、山柰酚与 VEGFA、EGFR、HIF1A 进行分子对接实验。如表 12 和图 12 所示，核心成分与核心靶蛋白具有良好的对接活性，可以稳定地对接在受体蛋白的活性囊中并形成氢键。

3.7.7 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠滑膜组织 COX-2 蛋白表达和 VEGFA、EGFR mRNA 表达的影响 如图 13 所示，采用免疫荧光染色和 qRT-

表 12 分子对接信息

Table 12 Molecular docking information

化合物	蛋白	PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
槲皮素	VEGFA	1mkg	-6.28
	EGFR	3ika	-6.21
	HIF1A	5jwp	-6.69
山柰酚	VEGFA	1mkg	-5.28
	EGFR	3ika	-6.60
	HIF1A	5jwp	-5.96

1 kcal·mol⁻¹=4.182 kJ·mol⁻¹

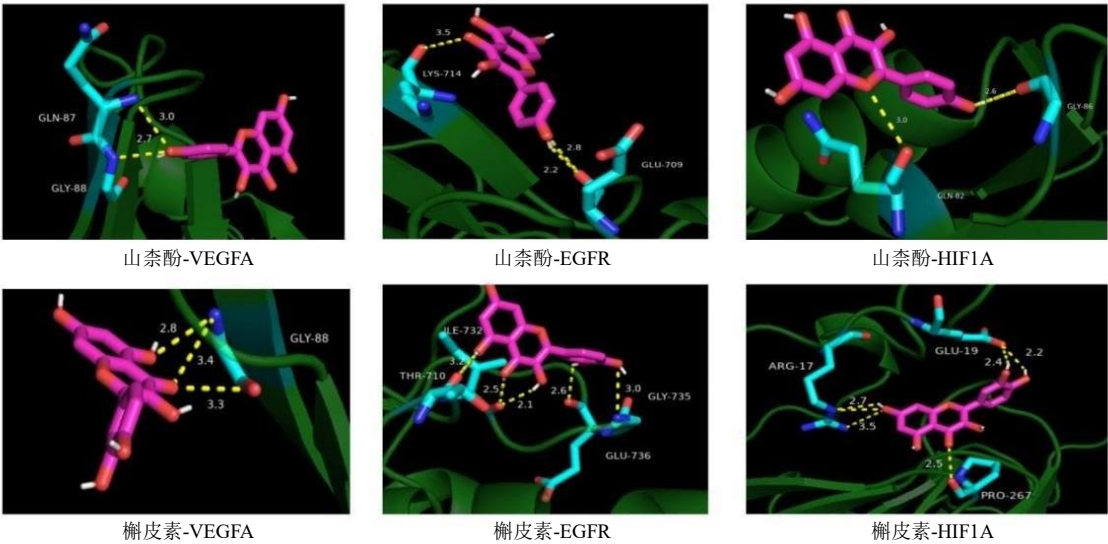


图 12 分子对接示意图

Fig. 12 Molecular docking schematic diagram

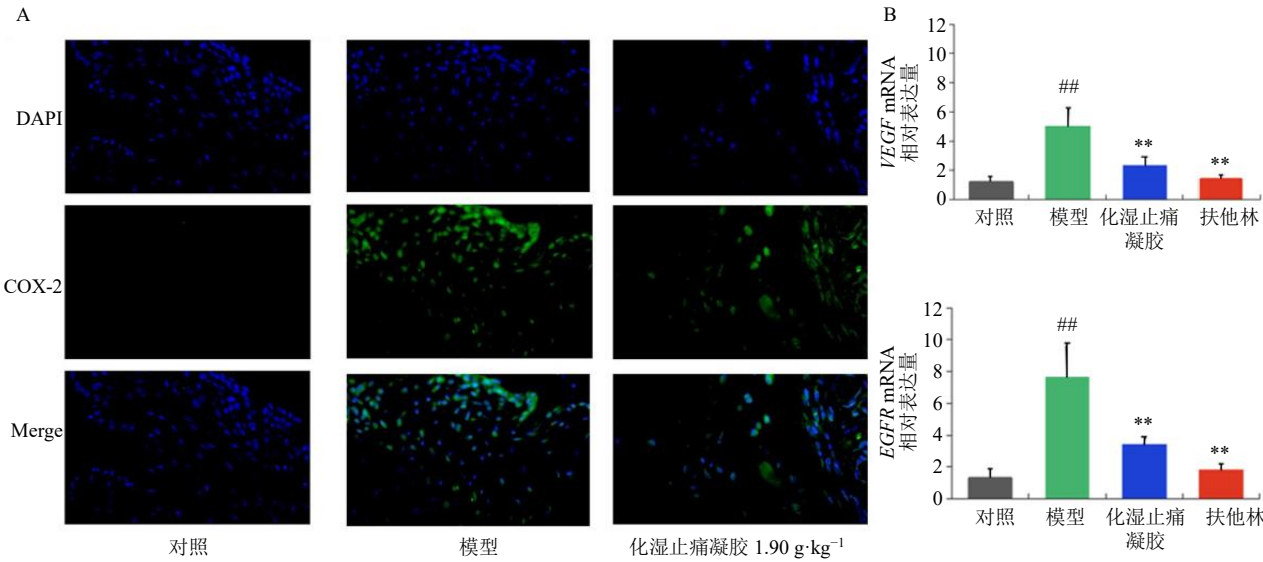


图 13 化湿止痛凝胶对痛风性关节炎大鼠滑膜组织 COX-2 蛋白表达 (A, ×400) 和 VEGFA、EGFR mRNA 表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 13 Effect of Huashi Zhitong Gel on COX-2 protein expression (A, ×400) and VEGFA, EGFR mRNA expressions (B) in synovium of gouty arthritis rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

PCR 进一步验证网络药理学预测的核心靶点,与对照组比较,模型组大鼠滑膜组织 COX-2 的荧光强度明显增加,VEGFA、EGFR mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,化湿止痛凝胶中剂量组大鼠滑膜组织 COX-2 的荧光强度明显减弱,VEGFA、EGFR mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$)。

4 讨论

本研究系统开展了化湿止痛凝胶剂的提取工艺优化、制剂成型工艺研究、药效学评价及作用机制探索,为该制剂的新药开发与临床应用提供了较为充分的实验依据。通过单因素与正交试验优化,确定了以 60%乙醇、料液比 1:10、70 °C 提取 1.5 h、2 次的最佳提取工艺。该工艺稳定、重复性好,兼顾了总酚酸质量分数与出膏率,为后续制剂提供了质量可控的原料。60%乙醇对中等极性酚酸类成分的提取效率较高,且有助于减少多糖等大分子杂质的溶出。在凝胶剂制备中,采用 Box-Behnken 响应面法优化了辅料配比,确定了以 1%卡波姆 940 与 0.2%泊洛沙姆 188 为复合基质。卡波姆是经典的水性凝胶基质,具有良好的生物相容性和流变特性,而泊洛沙姆 188 不仅能作为共基质调节体系黏度,其表面活性特性还可能促进药物的经皮渗透。该优化处方不仅具有良好的外观、黏度与延展性,且在多种稳定性考察中表现优异,符合外用凝胶剂的基本要求。

药效学实验结果表明,化湿止痛凝胶能显著抑制尿酸钠所致大鼠急性痛风性关节炎的关节肿胀及疼痛反应。IL-1 β 是一种关键的促炎细胞因子,其自身参与多种免疫炎症反应,在细胞增殖、分化、凋亡过程中起到重要的调节作用,对细胞防御和组织修复至关重要。IL-1 β 能够调控痛风性关节炎的发病进程,增强粒细胞和巨噬细胞的活性,使 IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎性因子的分泌增加,进而促进软骨细胞的降解,导致关节功能的损伤^[17-18]。有研究证实,尿酸钠晶体能够迅速诱导巨噬细胞趋化因子 MIP-1 α 、MIP-2 水平的升高,从而促进巨噬细胞的活化。本研究结果显示,化湿止痛凝胶剂能够显著降低尿酸钠结晶积聚引起的 IL-1 β 、MIP-1 α 升高的现象。在急性痛风性关节炎急性发作过程中,TLR4 可被激活,并募集大量髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88),从而进一步活化白细胞介素-1 受体相关激酶 4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4) 等一系列信号

因子,这些信号因子可通过自身磷酸化反应、发挥激酶活性等途径介导产生炎症级联反应,促进 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的释放^[19]。MMP9 在痛风性关节炎发病过程中也起到了重要作用,可通过释放 VEGF 参与血管生成。在多数细胞中 NF- κ B 构成异源或同源二聚体,能够以未激活状态与 NF- κ B 抑制蛋白 (NF- κ B inhibitory proteins, I κ Bs) 结合分布存在于细胞质中^[20]。当其受到刺激因子如放射线、病毒、氧自由基、TNF- α 、脂多糖等刺激时,NF- κ B-I κ Bs 复合物被激活,使得 NF- κ B 解离出来并转移至细胞核,与相应位点发生特异性结合,促进相应基因的转录,从而启动和调节相关的免疫反应,发生细胞黏附、分化、增殖、凋亡和炎症反应^[21]。本研究结果显示,化湿止痛凝胶剂能显著下调 TLR4、MMP9 蛋白表达,进而抑制大鼠踝关节滑膜组织局部炎症反应的进一步扩大。

基于网络药理学、分子对接与实验验证的综合分析,本研究初步揭示了化湿止痛凝胶抗痛风性关节炎的“物质-效应组群”网络。发现其活性成分(如槲皮素、山柰酚等)可能通过作用于 VEGFA、EGFR、PTGS2 (COX-2) 等核心靶点,调控 cAMP 信号通路、趋化因子信号通路、钙信号通路、Th17 细胞分化等多个关键通路。根据分析结果确定了 VEGFA、EGFR、COX-2 等核心作用靶蛋白和相关作用通路。VEGFA 可诱导内皮细胞增殖、抑制细胞凋亡,也可通过磷酸化过程激活 PI3K 通路;VEGFA 与炎症的表达密切相关,能够显著增加血管通透性,促进炎症的形成和发展^[22-24]。EGFR 在炎症调节中也起着重要的作用,可刺激表皮细胞,抑制炎症的发展进程^[25]。COX-2 在组织损伤、炎症反应时呈现出高表达状态^[26],可促进前列腺素合成,加重机体的炎症反应水平及发病局部的红肿热痛症状。COX-2 也可催化花生四烯酸转化为前列腺素 E₂,从而诱导相关炎症反应^[27]。药效学结果显示,化湿止痛凝胶可显著下调 TLR4、MMP9 蛋白表达及 IL-1 β 、MIP-1 α 水平,网络药理学与实验验证则证实其对 VEGFA、EGFR、COX-2 的抑制作用。这 2 部分结果并非孤立,而是共同构成了一条“上游信号-核心靶点-下游效应”的完整调控轴:尿酸钠晶体刺激首先激活 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路,一方面促进 IL-1 β 、MIP-1 α 等炎症因子释放,另一方面诱导 COX-2 表达,催化前列腺素 E₂ 合成,加剧红肿热痛;同时,NF- κ B 活化也可上调 VEGFA 和 MMP9,

促进滑膜血管生成及组织重塑。化湿止痛凝胶可能通过调控 TLR4/NF- κ B 通路,进而抑制 COX-2 的表达。后续研究将增加对 p65 磷酸化水平及下游前列腺素 E₂ 等分子的检测,以完善证据链。化湿止痛凝胶中的活性成分通过多靶点作用,既能抑制 TLR4/NF- κ B 信号,又能直接抑制 COX-2 和 EGFR 活性,从而同时阻断炎症级联和血管生成通路,实现协同增效。槲皮素和山柰酚在调控 VEGFA 和 EGFR 信号通路方面表现出显著的作用。研究表明,槲皮素能够通过抑制 EGFR 信号通路来减少炎症反应^[28-29]。此外,山柰酚也被发现能够通过调节 VEGFA 信号通路来影响细胞增殖和血管生成^[30-31]。其次,COX-2 作为炎症反应的关键酶,其表达受到槲皮素和山柰酚的显著影响。多项研究表明,槲皮素^[32-33]和山柰酚^[34-35]能够通过抑制 COX-2 的表达来减少炎症介质的产生。

由于网络药理学的局限性(如数据库不全面、忽略成分代谢),在核心成分筛选和核心靶点确定过程中也存在一定的误差,如分子对接中应用的成分为中药中常见的成分,因此后续可考虑分析化湿止痛凝胶剂对关节有效作用部位所释放的具体化学元素。且本研究也存在动物模型与人类复杂疾病的差异以及多指标验证的不足等问题。此外,本研究对于完整通路的验证也存在缺陷,后续将进一步对相关作用通路进行验证分析,以完善化湿止痛凝胶剂抗痛风性关节炎“物质-效应”组群的说法。结合痛风性关节炎中医证候分型(如湿热蕴结、瘀热阻滞),化湿止痛凝胶(以清热利湿、化瘀通络为主)最适用于湿热蕴结型和瘀热阻滞型的急性发作期患者,其可与扶他林等化学药联用,以减少化学药用量的临床应用前景,增强研究的转化价值。本研究成功将传统中药经验方转化为具有明确工艺参数和药理证据的外用凝胶剂,体现了中药现代化研究的思路。化湿止痛凝胶剂作为一种外用制剂,具有使用方便、局部药物浓度高、系统不良反应小等潜在优势,为痛风性关节炎的临床治疗提供了新的候选药物。未来研究可进一步聚焦于该制剂的经皮渗透动力学、体内代谢过程以及长期用药安全性评价,并探索其与其他抗痛风性关节炎药物的联合应用策略,为其临床转化提供更全面的数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Martins D, Tonon C R, Pacca R L, *et al.* Gout storm [J].

Am J Case Rep, 2021, 22: e932683.

- [2] 中华医学会内分泌学分会. 中国高尿酸血症与痛风诊疗指南 (2019) [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36(1): 1-13.
- [3] Dehlin M, Jacobsson L, Roddy E. Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(7): 380-390.
- [4] Elfishawi M M, Zleik N, Kvrjic Z, *et al.* The rising incidence of gout and the increasing burden of comorbidities: A population-based study over 20 years [J]. *J Rheumatol*, 2018, 45(4): 574-579.
- [5] 王旭, 罗冬平, 茹彦海, 等. 从慢性肾脏病角度看高尿酸血症与痛风的指南更新要点 [J]. 中国全科医学, 2021, 24(33): 4191-4195.
- [6] 中国药典 [S]. 四部. 2025: 53.
- [7] 卢慧, 赵冠婕, 程梅, 等. 中药凝胶剂的研究进展[J]. 人人健康, 2019(23): 406.
- [8] 李君霞, 王茂杰, 黄闰月, 等. 痛风中医证型的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(12): 2956-2958.
- [9] 宋倩, 刘健, 忻凌, 等. 基于关联规则挖掘健脾类中药对痛风性关节炎患者免疫、炎症指标的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(11): 2248-2252.
- [10] 杨媛媛, 姜旭, 王宇卿. 正交试验优化复方粉背雷公藤凝胶剂处方 [J]. 中国药房, 2017, 28(7): 961-963.
- [11] 马鑫斌, 王利胜, 巴文强. 雷公藤凝胶剂的制备工艺研究 [J]. 中国药物经济学, 2016, 11(11): 26-30.
- [12] 陈积, 赵小倩, 马彦巧, 等. 复方莪术油脂质体凝胶的制备及体外透皮作用 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(7): 830-838.
- [13] 杨萌. 黄龙汤的凝胶剂制备工艺及质量标准研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
- [14] 曹日曲. 基于数据挖掘的中医药外治黄褐斑的网络药理学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [15] Miao Y R, Zhang Q, Lei Q, *et al.* ImmuCellAI: A unique method for comprehensive T-cell subsets abundance prediction and its application in cancer immunotherapy [J]. *Adv Sci*, 2020, 7(7): 1902880.
- [16] Zhao X W, Zhang L L, Wang J, *et al.* Identification of key biomarkers and immune infiltration in systemic lupus erythematosus by integrated bioinformatics analysis [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 35.
- [17] Gong Q Y, Chen Y. Correlation between P2X7 receptor gene polymorphisms and gout [J]. *Rheumatol Int*, 2015, 35(8): 1307-1310.
- [18] 牛燕运, 郑娜, 胡翠平, 等. 祛湿清热法治疗痛风性关节炎的临床研究 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(1): 76-78.
- [19] Li J, Zhang H B, Huang W L, *et al.* TNF- α inhibitors with

- anti-oxidative stress activity from natural products [J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(13): 1408-1421.
- [20] Perkins N D. Emerging from NF- κ B's shadow, SUMOylated I κ B α represses transcription [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(2): 139-140.
- [21] Perkins N D. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(2): 121-132.
- [22] Xiang X, You X M, Li L Q. Expression of HSP90AA1/HSPA8 in hepatocellular carcinoma patients with depression [J]. *OncoTargets Ther*, 2018, 11: 3013-3023.
- [23] Punyte V, Vilkeviciute A, Gedvilaite G, et al. Association of VEGFA, TIMP-3, and IL-6 gene polymorphisms with predisposition to optic neuritis and optic neuritis with multiple sclerosis [J]. *Ophthalmic Genet*, 2021, 42(1): 35-44.
- [24] 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): 236-239.
- [25] De Tursi M, Zilli M, Carella C, et al. Skin toxicity evaluation in patients treated with cetuximab for metastatic colorectal cancer: A new tool for more accurate comprehension of quality of life impacts [J]. *OncoTargets Ther*, 2017, 10: 3007-3015.
- [26] 孙晓波. 中药复方益糖康对 DN 大鼠肾脏 nephrin、VEGF 表达的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2014.
- [27] 杨欣雨, 胡梦情, 罗雪, 等. 霍山石斛鲜、干品对急性胃炎模型大鼠作用的差异研究 [J]. 中草药, 2025, 56(17): 6242-6251.
- [28] Wang G S, Zhou B, Wang Z Y, et al. Pharmacological mechanisms underlying the anti-asthmatic effects of modified Guomin Decoction determined by network pharmacology and molecular docking [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 644561.
- [29] Zhou C, Zhou H, Zhang F R, et al. Active ingredients and potential mechanisms of the Gan Jiang-Huang Qin-Huang Lian-Ren Shen Decoction against ulcerative colitis: A network pharmacology and molecular docking-based study [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2021, 2021: 1925718.
- [30] Shi H S, Tian S S, Tian H. Network pharmacology interpretation of Fuzheng-Jiedu Decoction against colorectal cancer [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2021, 2021(1): 4652492.
- [31] Wang G X, Zeng L, Huang Q, et al. Exploring the molecular mechanism of Liuwei Dihuang Pills for treating diabetic nephropathy by combined network pharmacology and molecular docking [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 7262208.
- [32] Kim Y, Oh Y, Lee H, et al. Prediction of the therapeutic mechanism responsible for the effects of *Sophora japonica* flower buds on contact dermatitis by network-based pharmacological analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113843.
- [33] Cao J H, Xue R, He B. Quercetin protects oral mucosal keratinocytes against lipopolysaccharide-induced inflammatory toxicity by suppressing the Akt/AMPK/mTOR pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43(5): 519-526.
- [34] Li C Y, Cheng S E, Wang S H, et al. The anti-inflammatory effects of the bioactive compounds isolated from *Alpinia officinarum* Hance mediated by the suppression of NF- κ B and MAPK signaling [J]. *Chin J Physiol*, 2021, 64(1): 32-42.
- [35] Guo X Y, Yu X, Zheng B Q, et al. Network pharmacology-based identification of potential targets of *Lonicerae Japonicae Flos* acting on anti-inflammatory effects [J]. *BioMed Res Int*, 2021, 2021(1): 5507003.

[责任编辑 李亚楠]