

引用:吴睿哲,吴洁,张德生,周培荣,姚金龙,荣尚,孙绍裘. 宣痹通络膏对急性痛风性关节炎大鼠 MyD88 表达及踝关节滑膜组织形态的影响[J]. 湖南中医杂志,2022,38(4):179-183.

宣痹通络膏对急性痛风性关节炎大鼠 MyD88 表达及踝关节滑膜组织形态的影响

吴睿哲,吴洁,张德生,周培荣,姚金龙,荣尚,孙绍裘
(湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙,410005)

[摘要] 目的:观察宣痹通络膏对急性痛风性关节炎(AGA)模型大鼠髓样分化因子 88(MyD88)表达的影响。方法:将 60 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 6 组:宣痹通络膏低、中、高剂量组(简称为低、中、高剂量组),秋水仙碱组,模型组,空白组,每组各 10 只。于大鼠踝关节局部注射尿酸钠晶体混悬液制备 AGA 模型,造模后当天开始进行药物干预,连续 3 d。观察各组大鼠不同时间点的关节肿胀度,血清及滑膜组织中 MyD88 蛋白表达水平,踝关节滑膜组织病理形态学变化。结果:关节肿胀度比较,24 h 时,模型组较空白组上升;48h 时,高剂量组、秋水仙碱组较模型组降低;72 h 时,各给药组均较模型组降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠血清、滑膜组织 MyD88 含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组血清 MyD88 含量以及高、中剂量组和秋水仙碱组滑膜组织 MyD88 蛋白含量均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比,各药物组的踝关节滑膜组织病理形态得到改善。结论:宣痹通络膏可能通过下调 MyD88 蛋白表达,从而改善 AGA 模型大鼠的踝关节滑膜损伤。

[关键词] 急性痛风性关节炎;宣痹通络膏;MyD88;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.04.042

Effect of Xuanbi Tongluo ointment on the expression of myeloid differentiation factor 88 and the histomorphology of ankle joint synovial membrane in rats with acute gouty arthritis

WU Ruizhe, WU Jie, ZHANG Desheng, ZHOU Peirong, YAO Jinlong, RONG Shang, SUN Shaoqiu

(The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Xuanbi Tongluo ointment on the expression of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and the histomorphology of ankle joint synovial membrane in rats with acute gouty arthritis (AGA). Methods: A total of 60 male Wistar rats were randomly divided into low-, middle-, and high-dose Xuanbi Tongluo ointment groups (low-, middle-, and high-dose groups), colchicine group, model group, and blank group, with 10 rats in each group. The rats were given local injection of sodium urate crystal suspension to prepare a model of AGA, and drug intervention was given since the day of modeling for 3 consecutive days. The rats were observed in terms of joint swelling, protein expression level of MyD88 in serum and synovial membrane, and histopathological changes of ankle joint synovial membrane at different time points. Results: As for the comparison of joint swelling, the model group had a significant increase compared with the blank group at 24 hours; the high-dose group and the colchicine group had a significant reduction compared with the model group at 72 hours, and each ad-

基金项目:湖南省中医药科研计划项目(201972)

第一作者:吴睿哲,男,2019 级硕士研究生,研究方向:中医药防治骨与关节损伤

通信作者:张德生,男,医学硕士,主治医师,研究方向:中医药防治骨与关节损伤,E-mail:372201592@qq.com

孙绍裘,男,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中医药防治骨与关节损伤,E-mail:54sunshaoqiu@163.com

ministration group had a significant reduction compared with the model group ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the model group had significant increases in the content of MyD88 in serum and synovial membrane ($P < 0.01$); compared with the model group, each administration group had a significant reduction in the content of MyD88 in serum, and the high- and middle-dose groups and the colchicine group had a significant reduction in the content of MyD88 in synovial membrane ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, each administration group had improvement in the histopathology of ankle joint synovial membrane. Conclusion: Xuanbi Tongluo ointment can improve the injury of ankle joint synovial membrane in a rat model of AGA possibly by downregulating the protein expression of MyD88.

[**Keywords**] acute gouty arthritis; Xuanbi Tongluo ointment; myeloid differentiation factor 88; experimental study

急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 是一种由多种原因引起尿酸钠晶体 (MSU) 在人体关节囊、滑囊、软骨等周围组织中长期沉积,并在沉积灶附近出现多种炎性因子和细胞浸润而导致周围组织出现特异性炎性反应,以关节红、肿、热、痛为主要表现的疾病。其病因和发病机制尚未明确,多在剧烈运动和暴饮暴食后出现^[1]。其反复发作会导致关节进行性损伤^[2],严重者可导致患者关节畸形、肾功能不全等损害^[3],严重影响患者的生活水平和生活质量。随着人类饮食结构和生活习惯的不断变化,近年来 AGA 的发病出现年轻化趋势^[4]。目前 AGA 主要采用尿酸排泄剂、非甾体抗炎药、秋水仙碱、糖皮质激素等治疗,见效较快,但这些药物具有胃肠道毒性、肝肾功能损伤、出血和心血管疾病等不良反应,不适合长期使用^[5]。

宣痹通络膏为国家名老中医孙达武教授经验方,本课题组前期研究表明,宣痹通络膏治疗 AGA 疗效显著^[6-7],但具体作用机制尚不明确。研究表明,由 Toll 样受体 (TLR) 介导的信号通路 with AGA 的炎症反应密切相关,其中髓样分化因子 (MyD88) 是该信号通路的重要转导蛋白^[8]。因此,本研究通过构建 AGA 模型大鼠,研究宣痹通络膏对模型大鼠 MyD88 蛋白表达及踝关节滑膜组织的影响,探索其作用机制,为临床治疗提供依据。

1 实验材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,7 周龄,体质量 (200±20) g,统一购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK (京) 2016-0006。由湖南中医药大学动物实验中心提供,使用许可证号:SYXK2013 (湘)-0005,实验期间遵守动

物伦理学喂养标准进行喂养。

1.2 药物 宣痹通络膏由苍术 10 g、黄柏 12 g、薏苡仁 30 g、泽泻 10 g、防己 10 g、金银花 10 g、土茯苓 15 g、甘草 6 g、丹参 10 g、陈皮 10 g、延胡索 12 g、川牛膝 15 g 组成。中药材均由我院药剂科按《药典》所载道地药材的指定主产地购进,并配制成膏剂,放置于冰箱冷藏,灌胃时根据需要溶于 0.9% 氯化钠注射液中分别配置成相应的浓度汤剂。秋水仙碱片 (西双版纳版纳药业有限责任公司,批准文号:国药准字 H53021369,规格:0.5 mg/片),灌胃时于 0.9% 氯化钠注射液中定容至所需浓度。

1.3 主要试剂与仪器 尿酸钠晶体 (MSU,上海沪震实业有限公司,规格:5 g/瓶,货号:HZ-11304); Rat MyD88 ELISA KIT (江苏酶免实业有限公司,货号:FY40134-B); HE 染液套装 (武汉塞维尔生物科技有限公司,货号:G1003); MyD88 Rabbit Monoclonal Antibody (英国 abcam,货号:ab133739); β -Actin Mouse Monoclonal Antibody (美国 proteintech,货号:60008-1-Ig)。摇床 (江苏其林贝尔仪器制造有限公司,型号:TS-1); 脱水机 (意大利 DIA-PATH, Donatello); 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5); 病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016); 冻台 (武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-L5); 组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-P); 染色机 (意大利 DIA-PATH Giotto); 台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R); 光学显微镜 (日本 Nikon,型号:Eclipse E100); 成像系统 (日本 Nikon,型号:DS-U33)。

2 实验方法

2.1 动物分组 将 60 只大鼠适应性饲养 7 d,按

照体质量排序编号,采取随机数字表法分为6组:宣痹通络膏低、中、高剂量组(简称为低、中、高剂量组)及秋水仙碱组、模型组、空白组,每组各10只。

2.2 模型制备 参照文献[9]中的造模方法进行造模。于10 ml 0.9%氯化钠注射液中加入250 mg MSU,加热搅拌,使其充分溶解,制成25 mg/ml的MSU溶液。用注射器取0.4 ml MSU溶液注入大鼠右侧踝关节腔内,建立AGA大鼠模型。操作过程:将大鼠固定在操作台上,充分暴露右侧踝关节,将其摆放成直角后找到后肢背侧正中胫腓骨与踝关节的间隙处,注射器针头倾斜30~45°,通过此间隙直接进入关节腔内,将尿酸钠溶液注入关节腔内,并观察对侧关节囊。对照组予以0.4 ml 0.9%氯化钠注射液注入关节腔内。注射后大鼠出现跛行及关节红肿发热,观察到受试下肢呈悬空姿态或下垂刚触及地面,三足着地行走,说明造模成功^[10]。

2.3 干预方法 根据人与动物体表面积换算公式: $D_{鼠}=D_{人} \times R_{鼠}/R_{人}$ (D 为给药剂量, R 为动物与人体表面积比值系数)计算给药剂量^[11]。每次灌胃容量以1 ml/100 g计算,根据大鼠质量200 g计算,则每次灌胃容量为2 ml。造模后当天开始灌胃,每天1次,连续3 d。低、中、高剂量组药物浓度分别为0.9、1.8、3.6 g/ml,每天分别按照9、18、36 g/kg灌胃;秋水仙碱组药物浓度为0.6 mg/ml,每天以6 mg/kg灌胃;模型组和空白组每天予以等量0.9%氯化钠注射液灌胃。

2.4 观察指标

2.4.1 关节肿胀率 利用缚线法测得注射尿酸钠晶体混悬液后24、48、72 h大鼠右后足踝周径,计算关节肿胀率。计算公式为:肿胀率(%)=(注射后不同时间关节周长-注射前关节周长)/注射前关节周长 $\times 100\%$ 。

2.4.2 MyD88蛋白表达 采用ELISA法测定血清中MyD88蛋白水平,严格按照试剂盒说明书进行。Western blot法测定滑膜组织中MyD88蛋白表达情况,按说明书制备电泳胶,样品经过上样、电泳、转膜、免疫印迹和显色。记录并进行灰度值分析测量,将目的蛋白与内参蛋白(β -actin)灰度值比较,作为目的蛋白的相对表达量。

2.4.3 踝关节滑膜组织形态学 取大鼠踝关节滑膜组织,将标本固定于4%多聚甲醛溶液内,20%乙二胺四乙酸溶液脱钙,使用梯度乙醇进行脱水,石蜡包埋,切片后行HE染色,显微镜下观察关节滑膜组织病理形态学改变。

2.5 统计学方法 采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

所有大鼠均造模成功,实验过程中无死亡大鼠。

3.1 各组大鼠踝关节肿胀度比较 24 h时,相较于空白组,模型组、高、中、低剂量组,秋水仙碱组踝关节肿胀率均上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$);48 h时,高剂量组、秋水仙碱组较模型组肿胀率下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);72 h时,各给药组与模型组比较,关节肿胀率均下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(见图1)

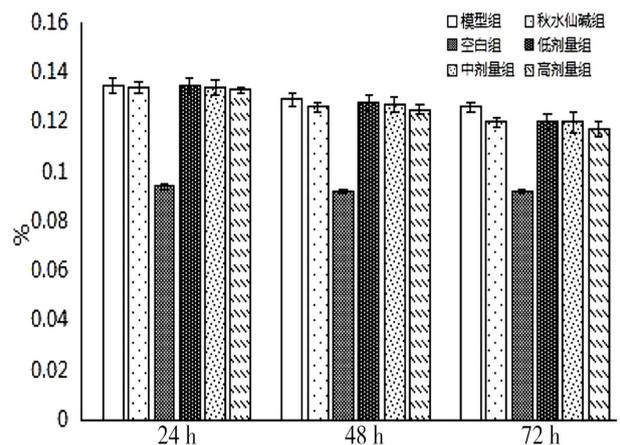


图1 各组大鼠踝关节肿胀率比较

3.2 各组大鼠血清、滑膜组织 MyD88 蛋白含量比较 与空白组相比,模型组大鼠血清、滑膜组织 MyD88 含量显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,高、中、低剂量组、秋水仙碱组血清 MyD88 含量降低,高、中剂量组、秋水仙碱组滑膜组织 MyD88 蛋白含量降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。高、中、低剂量组及秋水仙碱组血清 MyD88 含量组间比较,高、中剂量组与秋水仙碱组滑膜组织 MyD88 蛋白表达比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。(见表1、图2)

表1 各组大鼠血清、滑膜组织 MyD88 蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	血清 (mmol/ml)	滑膜组织 (MyD88/actin)
模型组	10	1.03±0.12 ^a	0.78±0.09 ^a
空白组	10	0.67±0.02	0.25±0.04
低剂量组	10	0.78±0.16 ^b	0.64±0.15
中剂量组	10	0.63±0.06 ^c	0.51±0.12 ^b
高剂量组	10	0.67±0.10 ^c	0.56±0.15 ^b
秋水仙碱组	10	0.59±0.24 ^c	0.40±0.15 ^c

注:与空白组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。



图2 各组大鼠滑膜组织中 MyD88 蛋白表达电泳图

3.3 各组大鼠滑膜组织病理组织学结果 低剂量组:表面光滑平整,细胞数量及形态正常,潮线不明显。中剂量组:表面光滑平整,细胞数量及形态正常,潮线清晰。高剂量组:表面光滑平整,细胞数量及形态正常,潮线清晰。秋水仙碱组:表面光滑平整,细胞数量及形态正常,潮线清晰。模型组:表面光滑平整,软骨基质增生,胶原原纤维增生,潮线不明显,部分血管侵犯潮线。空白组:表面较平整,软骨细胞轻度增生,潮线不明显。(见图3)

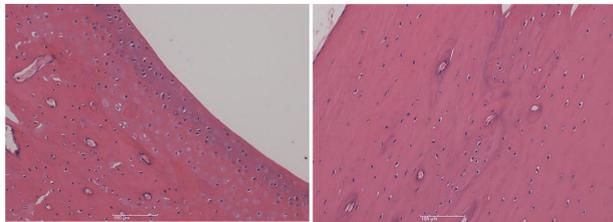


图3-1 低剂量组

图3-2 模型组

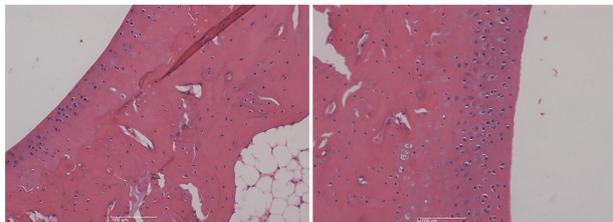


图3-3 中剂量组

图3-4 空白组

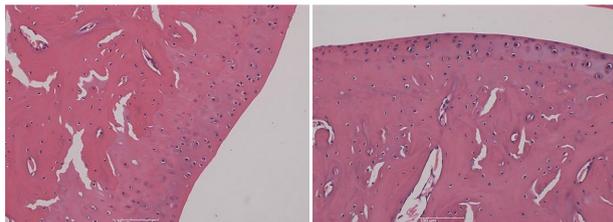


图3-5 高剂量组

图3-6 秋水仙碱组

图3 各组大鼠滑膜组织病理组织学观察

4 讨 论

中医学将 AGA 归于“痹证”范畴,分为热痹、着痹、痛痹、行痹。《素问·痹论》记载:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为着痹也。”“其热者,阳气多,阴气少,病气盛,故为痹热。”临床上 AGA 多属“湿热痹”范畴,治疗主以祛湿除痹方药。《万病回春》载:“痛风者,遍身骨节走注疼痛也。谓之白虎历节风,都是血气、风湿、痰火,皆令作痛。”“凡治痛风,用苍术、羌活、酒芩三味散风行湿之妙药耳。”宣痹通络膏方中以苍术、黄柏为君药,入下焦,清热燥湿,祛湿利毒。臣以薏苡仁渗湿泄浊,导湿热从小便出;泽泻利水消肿、渗湿泄热;防己既能祛风湿止痛,又能清热。金银花清热解毒、凉血消肿;土茯苓解毒除湿、通利关节;丹参清热凉血、止痛;陈皮、延胡索行气止痛,皆为佐药。甘草清热解毒、缓急止痛;川牛膝活血通经,引血下行,为佐使之药。全方共奏清热利湿、通络止痛之功。

早期研究表明,AGA 的发生与尿酸单钠晶体富集于受累组织局部,出现大量中性粒细胞浸润并激活 TLRs 有关^[12]。白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 等多种炎症因子参与了 AGA 的发病过程^[13]。孙广瀚等^[14]通过蛋白质组学研究发现,AGA 患者血清中白细胞介素-8、肿瘤坏死因子受体 II 的含量与健康者相比有明显差异。上述炎症因子与 NF- κ B 代谢通路相关,可通过 TLRs 信号通路进行调控^[15]。AGA 主要是由 MSU 沉积在软组织局部,引起由 TLRs 介导的炎症反应所致^[8]。TLRs 信号通路分为 MyD88 依赖途径和非 MyD88 依赖途径,其中 MyD88 依赖途径通过与 MyD88 配体相结合并募集 IRAK 家族因子,使 IRAK 家族因子磷酸化后下传信号至细胞质内,启动 NF- κ B 以及 MAPK 信号通路,最终起到调控炎症因子的转录过程,故而通过调控 MyD88 的表达可能是防治 AGA 的一条重要通道^[16-17]。

本研究结果显示,72 h 时,各给药组关节肿胀率均较模型组下降,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比,高、中、低剂量组及秋水仙碱组血清 MyD88 含量降低,高、中剂量组及秋水仙碱组滑膜组织 MyD88 蛋白含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。组织形态学中,宣痹通络膏低剂量组对滑膜组织形态学有部分延缓作用,其余各组均未观察

到明显的滑膜组织病变,提示宣痹通络膏在局部组织病变的治疗效果中与浓度呈正相关。本研究表明,宣痹通络膏可通过下调 MyD88 蛋白表达而减轻 AGA 模型大鼠的炎症反应,但对于 MyD88 蛋白信号通路上下游相关因子的表达研究尚未完善,故下一步将更深一步探究相关机制。

参考文献

- [1] ZHANG YJ,ZHANG N,SONG H,et al. Design, characterization and comparison of transdermal delivery of colchicine via borneol-chemically-modified and borneol-physically-modified ethosome[J]. Drug Delivery,2019,26(1):70-77.
- [2] FLAVIO AA, LEANDRRO FSB, THIAGO HCO, et al. Transmembrane TNF- α is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout[J]. European Journal of Immunology,2016,46(1):204-211.
- [3] 杨媛媛. 以护理为主导的慢病管理对痛风患者生活质量的影响[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(21):210,222.
- [4] 周建华,张雷,黄豪杰,等. 白虎加桂枝汤对急性痛风性关节炎大鼠关节肿胀度及炎症因子影响的研究[J]. 新中医,2020,52(24):18-20.
- [5] OTTAVIAI S, MOLTO A, EA HK, et al. Efficacy of anakinra in gouty arthritis: A retrospective study of 40 cases[J]. Arthritis research & therapy,2013,15(5):123.
- [6] 彭凯,孙绍裘,李益亮,等. 宣痹通络膏治疗痛风(湿热痹阻证)60例临床观察[J]. 中医导报,2016,22(11):67-69.
- [7] 李益亮,孙绍裘. 孙达武教授运用口服宣痹通络膏治疗痛风

湿热痹阻证的经验[J]. 中医正骨,2016,28(2):75-76.

- [8] 刘静,谢克琴,曹跃朋,等. TLRs/MyD88 与痛风性关节炎的相关性研究[J]. 风湿病与关节炎,2018,7(4):11-15.
- [9] CODERRE TJ, WALL PD. 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.
- [10] 熊辉,曲良焯,向黎黎,等. 痛风性关节炎湿热证病证结合模型的建立[J]. 中医正骨,2014,26(3):14-20.
- [11] 贺石林,王键,王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2008:48.
- [12] TAO JH,ZHANG Y, LI XP. P2X7R: A potential key regulator of acute gouty arthritis[J]. Seminars in Arthritis & Rheumatism, 2013,43(3):376-380.
- [13] DAI XJ,TAO JH,FANG X,et al. Changes of Treg/Th17 ratio in spleen of acute gouty arthritis rat induced by MSU crystals[J]. Inflammation,2018,41(5):1955-1964.
- [14] 孙广瀚,刘健,万磊,等. 急性痛风性关节炎致炎蛋白的蛋白质组学研究[J]. 浙江大学学报:医学版,2020,49(6):743-749.
- [15] 吴燕燕,王易. Toll 样受体信号通路中 MyD88 的研究进展[J]. 免疫学杂志,2012,28(3):262-265.
- [16] 刘静,谢克琴,曹跃朋,等. TLRs/MyD88 与痛风性关节炎的相关性研究[J]. 风湿病与关节炎,2018,7(4):11-15.
- [17] 沈瑞明,马丽辉,郑颜萍. 木犀草素通过 TLR/MyD88/NF- κ B 通路参与急性痛风性关节炎大鼠的抗炎作用[J]. 中南大学学报:医学版,2020,45(2):115-122.

(收稿日期:2021-06-18)

(上接第 138 页)

- [10] 王伟明,马彩霞. 手法配合中药熏洗治疗桡骨远端骨折后腕关节功能障碍疗效观察[J]. 实用中医药杂志,2016,32(3):204-205.
- [11] 许耿彬. 辨证分期中药内服-熏洗联合关节功能锻炼治疗桡骨远端不稳定性骨折术后临床观察[J]. 新中医,2017,49(1):90-92.
- [12] 雷鸿,姚强,秦鹏俊. 外架加克氏钉固定配合后期中药熏洗治疗桡骨远端不稳定性骨折的有效性及其安全性[J]. 吉林中医药,2018,38(11):1288-1290.
- [13] 刘世珑,孙玉福. 中药熏洗结合功能锻炼治疗桡骨远端骨折后期腕关节僵硬的疗效观察[J]. 四川中医,2015,33(8):125-126.
- [14] 李丹,李高舜. 舒筋汤熏洗辅助治疗老年人桡骨远端骨折 45 例分析[J]. 中国基层医药,2019(13):1557-1560.
- [15] 吴辉俦,蔡丽真. 桡骨远端骨折使用中药联合手法复位小夹板外固定治疗的效果分析[J]. 医学理论与实践,2016,29(19):3366-3368.
- [16] 谭威,刘文龙,梁慧慧,等. 中医手法复位、小夹板外固定联合新伤湿敷液外敷治疗桡骨远端骨折 35 例临床观察[J]. 湖南中医杂志,2019,35(8):63-64.
- [17] 高志强. 桡骨远端骨折治疗进展[J]. 中国医刊,2020,55(7):707-708.

- [18] 杜竑颀,王建伟,殷钰涵. 中药内外兼治桡骨远端骨折术后肿胀及疼痛疗效观察[J]. 中国中医急症,2016,25(6):1136-1138.
- [19] 张朝仁,邓友章,常振湘. 活血疏经方中药熏洗对稳定性桡骨远端骨折后期功能恢复的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(8):1140-1142,1146.
- [20] 倪俊强. 手法复位结合中药熏洗治疗桡骨远端骨折临床观察[J]. 实用中医药杂志,2019,35(11):1322-1323.
- [21] 潘敬舜. 四肢骨折后期应用中中药熏洗配合功能锻炼效果观察[J]. 实用中医药杂志,2017,33(12):1444-1445.
- [22] 庞向华,周建飞,余绍涌,等. 桡骨远端骨折的非手术治疗进展[J]. 广西中医药,2020,43(4):55-59.
- [23] 张姝. 中药熏洗联合穴位按摩对老年中风恢复期气虚血瘀证神经功能恢复的影响[J]. 长春中医药大学学报,2017,33(4):578-580.
- [24] 徐道情,欧梁,黄维琛. 基于中医传承辅助平台挖掘《仙授理伤续断秘方》治伤用药规律[J]. 中国中医骨伤科杂志,2020,28(11):26-29.
- [25] 王立童,赵咏芳,王翔,等. 密骨胶囊和健脾方对去卵巢大鼠骨结构和力学性能的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2009,15(1):27-31.
- [26] 郑斌,魏成建,阮国辉,等. 中药熏洗对桡骨远端骨折术后腕关节功能恢复的影响[J]. 西部中医药,2019,32(10):111-114.

(收稿日期:2021-01-22)