

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.12.019

关节腔内注射滇白珠醇提取液治疗急性痛风性关节炎的实验研究^{*}

姚文琴, 覃云璐, 党荣敏, 王 恒, 邓 莹, 王定瑜

黔南民族医学高等专科学校, 贵州都匀 558003

摘要:目的 观察关节腔内注射滇白珠醇提取液对急性痛风性关节炎的治疗作用及可能的机制。方法 SD 雄性大鼠 50 只按随机数字表法分为空白对照组、模型组及滇白珠醇提取液高、中、低剂量组。除空白对照组外,其余组大鼠均通过关节腔内注射单钠尿酸盐晶体混悬液制备急性痛风性关节炎模型,造模成功后,滇白珠醇提取液不同剂量组给予不同剂量(4、2、1 g/kg)滇白珠醇提取液 0.2 mL 关节腔内注射治疗,模型组以同样方法注射等量无菌生理盐水,持续 1 周后,各组大鼠取外周血采用酶联免疫吸附试验检测血清白细胞介素(IL)-17、血管内皮生长因子(VEGF)、IL-6 水平,同时取踝关节组织进行病理学检查。结果 与模型组相比,滇白珠醇提取液不同剂量组均可明显降低血清中 IL-17、VEGF、IL-6 水平,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。滇白珠醇提取液中、高剂量组血清 IL-17、VEGF、IL-6 水平均低于滇白珠醇提取液低剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);滇白珠醇提取液高剂量组血清 IL-17、VEGF 水平与滇白珠醇提取液中剂量组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$);滇白珠醇提取液高剂量组血清 IL-6 水平低于滇白珠醇提取液中剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。踝关节病理结果显示:治疗后,滇白珠醇提取液低剂量组纤维组织及滑膜轻度增生;滇白珠醇提取液中剂量组较多淋巴细胞、浆细胞浸润,色素沉着,滑膜轻度增生;滇白珠醇提取液高剂量组肉芽组织增生,大量淋巴细胞、浆细胞浸润,滑膜未见增生,关节软骨及骨组织结构形态正常,未见痛风结节。结论 关节腔内注射滇白珠醇提取液对急性痛风性关节炎有治疗效果,且呈现剂量依赖性,可能与下调血清 IL-17、VEGF、IL-6 等炎症因子水平有关。

关键词:滇白珠; 急性痛风性关节炎; 炎症因子

中图法分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)12-1755-04

Experimental study on intra-articular cavity injection of gaultheria yunnanensis alcohol extract in treating acute gouty arthritis^{*}YAO Wenqin, QIN Yunlu, DANG Rongmin, WANG Heng, DENG Ying, WANG Dingyu
Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun, Guizhou 558003, China

Abstract: **Objective** To observe the therapeutic effect and possible mechanism of intra-articular injection of gaultheria yunnanensis alcohol extract on acute gouty arthritis. **Methods** Fifty SD male rats were randomly divided into the blank control group, model group, and high, medium and low dose groups of gaultheria yunnanensis alcohol extract. Except for the blank control group, the rats in the other groups were used to prepare the acute gouty arthritis models by intra-articular injection of monosodium urate crystal suspension. After successful modeling, different dosage groups of gaultheria yunnanensis alcohol extract were treated by intra-articular injection of different doses (4, 2, 1 g/kg) of 0.2 mL gaultheria yunnanensis alcohol extract. The model group was injected with the same amount of sterile physiological saline using the same method. After one week of continuous use, the peripheral blood in each group was collected for detecting serum interleukin (IL)-17, vascular endothelial growth factor (VEGF) and IL-6 levels by enzyme-linked immunosorbent assay. At the same time, the ankle joint tissue was taken for conducting the pathological examination. **Results** Compared with the model group, different doses groups of gaultheria yunnanensis alcohol extract could significantly reduce the serum IL-17, VEGF and IL-6 levels, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The serum IL-17, VEGF and IL-6 levels in the yunnanensis alcohol extract middle and high dose groups were lower than those in the yunnanensis alcohol extract low dose group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); there was no statistically significant difference in serum IL-17 and VEGF levels between the yunnanensis alcohol extract high dose group and middle dose group ($P > 0.05$); the serum IL-6 level in the yun-

^{*} 基金项目:黔南民族医专科研基金(QNYZ 201906)。

作者简介:姚文琴,女,副教授,主要从事病原生物学与免疫学检验教学及科研工作。

nanensis alcohol extract high-dose group was lower than that in the yunnanensis alcohol extract middle-dose group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The pathological results ankle joint showed that after treatment, the yunnanensis alcohol extract low-dose group showed mild hyperplasia of fibrous tissue and synovium; in the yunnanensis alcohol extract middle dose group, there were the infiltration of multiple lymphocytes and plasma cells, pigmentation and mild synovial hyperplasia; in the yunnanensis alcohol extract high dose group, there were the granulation tissue hyperplasia, a large number of lymphocytes and plasma cell infiltration without synovium hyperplasia, the structure and morphology of joint cartilage and bone tissue were normal, and no gout nodules were found. **Conclusion** Intra-articular injection of gaultheria yunnanensis alcohol extract has a therapeutic effect on acute gouty arthritis in a dose-dependent manner, which may be related to down-regulate the levels of inflammatory factors such as serum IL-17, VEGF and IL-6.

Key words: gaultheria yunnanensis; acute gouty arthritis; inflammatory cytokines

急性痛风性关节炎是由单钠尿酸盐沉积在关节囊、滑囊、软骨、骨质和其他组织中所致的晶体相关性关节病。越来越多的证据表明,代谢-免疫-炎症是一个相互影响的复杂“网络”,“网络”中各种分子间相互作用,导致疾病发生、发展^[1]。目前痛风性关节炎的治疗主要包括缓解发作时疼痛和抑制炎症反应,常用药物为非甾体消炎药、秋水仙碱、糖皮质激素等,药物不良反应大。杜鹃花科植物滇白珠的茎叶性热、味辛辣,属热药,入冷经,其根、梗具有活血化瘀、祛风除湿作用,可治疗风寒湿痹、筋骨疼痛^[2]。滇白珠的化学成分类型主要有黄酮类、萜类、水杨酸甲酯糖苷类、木脂素类、香豆精类、有机酸类和甾体类,还含有香豆素、生物碱等^[3],具有镇痛、抗炎、抗病毒作用。临床常见含滇白珠的复方成药有痛风灵、滇白珠糖浆、复方伸筋胶囊等,多用于急性痛风性关节炎、类风湿关节炎、跌打损伤和湿疹等方面的治疗^[4]。滇白珠是贵州苗族民间治疗痛风的常用药材,有研究报道采用灌胃治疗效果突出^[5-6]。本研究采用大鼠关节腔内注射滇白珠醇提取液的新治疗手段,观察其治疗作用并分析作用机制,为临床用药、开发新药、扩大新药源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 SPF 级 SD 雄性大鼠 50 只,体质量 250~270 g,购自贵州医科大学实验动物中心,合格证号:SCXK(黔) 2018-0001。滇白珠购自贵州省都匀市药材市场,经黔南民族医药学系鉴定为杜鹃花植物滇白珠。

1.2 仪器与试剂 尿酸钠结晶(Sigma 公司,规格:5 g,批号:102306692);大鼠白细胞介素(IL)-17、血管内皮生长因子(VEGF)、IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:201904);酶标仪(北京凯奥 K6600A)。

1.3 方法

1.3.1 滇白珠醇提取液的提取 药物提取采用醇提法,提取方法如下:称取滇白珠粗粉 74 g 置于 100 mL 圆底烧瓶中加 70%乙醇 800 mL,水浴加热 1 h,减压过滤,取滤渣置于原烧瓶内加 70%乙醇 700 mL,再次

水浴加热 1 h 后减压过滤,合并两次提取液,减压浓缩到无醇味,分别取一定体积配制成浓度(相当于原药材)为 4、2、1 g/mL 储备液备用。

1.3.2 动物分组 50 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 5 组,每组 10 只,分别设空白对照组、模型组及滇白珠醇提取液治疗高剂量组(4 g/kg)、中剂量组(2 g/kg)、低剂量组(1 g/kg)。

1.3.3 模型的建立与实验干预 取 500 mg 单钠尿酸盐晶体,加 2 mL 吐温 80,再加入无菌生理盐水后用磁力搅拌器加热搅拌,直至晶体完全溶解,定容至 20 mL,制成 25 mg/mL 单钠尿酸盐晶体混悬液,高压灭菌后,于 4℃ 保存,用前摇匀。SD 大鼠适应性喂养 1 周,参照文献[7]造模方法,水合氯醛麻醉后以大鼠右后肢背侧正中踝关节与胫腓骨之间的关节腔为进针点,将踝关节摆放成直角,充分暴露踝关节与胫腓骨的间隙,注射针头与胫骨成 45°夹角插入关节腔,模型组及滇白珠醇提取液各剂量组均注射 0.2 mL 25 mg/mL 单钠尿酸盐晶体混悬液制备急性痛风性关节炎模型。造模成功后,滇白珠醇提取液高、中、低剂量组分别给予 4、2、1 g/kg 滇白珠醇提取液 0.2 mL 关节腔内注射,模型组以同样方法仅注射 0.2 mL 无菌生理盐水,均连续给药 1 周。空白组不予任何处理。

1.3.4 指标检测 模型组造模第 7 天,滇白珠醇提取液各剂量组末次给药 1 h 后,取各组大鼠股动脉血,静置,2 000 r/min 离心 15 min,取上清液,在 -20℃ 下保存待测。采用 ELISA 检测血清 IL-17、VEGF、IL-6 水平。

病理检查:剪取踝关节置 10%甲醛液中固定脱钙,梯度乙醇脱水,将透明处理后的组织块放入已溶化石蜡内浸蜡包埋、切片,干燥待染。将石蜡切片脱蜡、水洗后 HE 染色镜检。光学显微镜下观察大鼠踝关节滑膜炎症与程度及关节软骨细胞等情况。炎症细胞浸润评分标准^[8]:无炎症,计 0 分;轻度炎症,可见少量白细胞浸润,计 1 分;中度炎症,可见 2 个或以上的白细胞聚集物,计 2 分;重度炎症,出现白细胞融合及浸润显著,计 3 分。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据分

析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠血清 IL-17、VEGF、IL-6 水平比较 与模型组相比,滇白珠醇提取液不同剂量组血清中 IL-17、VEGF、IL-6 水平均明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),滇白珠醇提取液中、高剂量组血清 IL-17、VEGF、IL-6 水平均低于滇白珠醇提取液低剂量组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);滇白珠醇提取液高剂量组血清 IL-17、VEGF 水平与滇白珠醇提取液中剂量组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

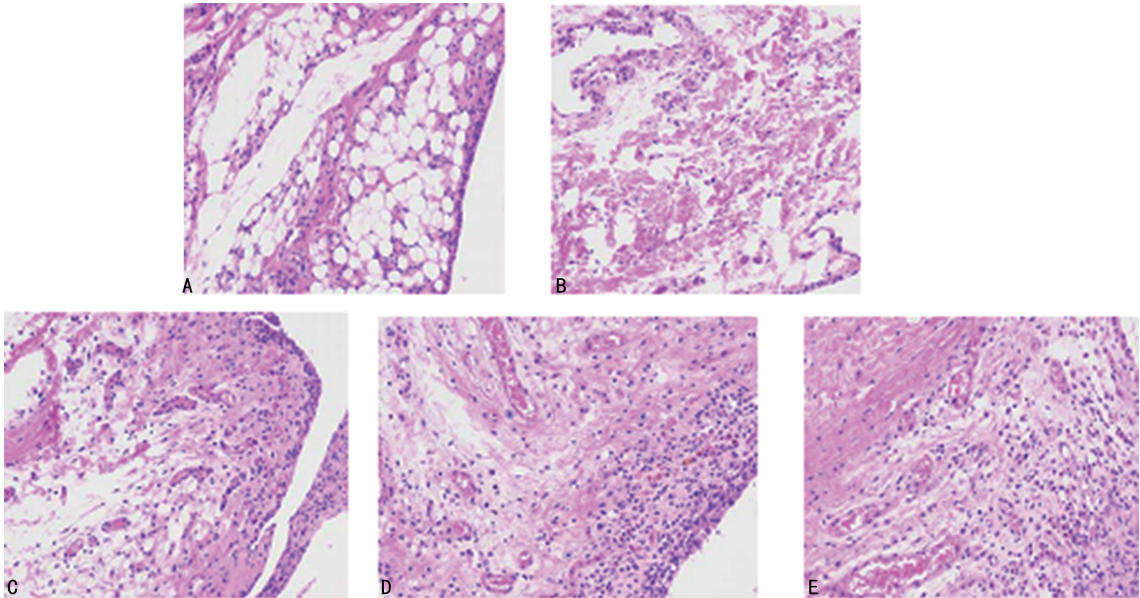
滇白珠醇提取液高剂量组血清 IL-6 水平低于滇白珠醇提取液中剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 急性痛风性关节炎大鼠踝关节病理检查结果 病理检查结果显示:滇白珠醇提取液不同剂量组与模型组比较,局部血管内有较多中性粒细胞,上皮及皮下充血明显。滇白珠醇提取液低剂量组纤维组织及滑膜轻度增生;滇白珠醇提取液中剂量组较多淋巴细胞、浆细胞浸润,色素沉着,滑膜轻度增生;滇白珠醇提取液高剂量组肉芽组织增生,大量淋巴细胞、浆细胞浸润,滑膜未见增生,关节软骨及骨组织结构形态正常,未见痛风结节。见图 1。

表 1 各组大鼠血清 IL-17、VEGF、IL-6 水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	IL-17(pg/mL)	VEGF(ng/L)	IL-6(ng/L)
空白组	10	100.93±3.78	275.19±6.86	152.00±0.79
模型组	10	135.82±1.99	350.52±7.85	211.18±6.51
滇白珠醇提取液低剂量组	10	122.16±4.23 [*]	332.59±7.13 [*]	191.46±5.56 [*]
滇白珠醇提取液中剂量组	10	113.03±3.43 ^{*△}	302.09±11.56 ^{*△}	174.31±4.85 ^{*△}
滇白珠醇提取液高剂量组	10	109.49±4.86 ^{*△}	295.50±8.13 ^{*△}	157.66±6.19 ^{*△#}

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与滇白珠醇提取液低剂量组比较,[△] $P < 0.05$;与滇白珠醇提取液中剂量组比较,[#] $P < 0.05$ 。



注:A 为空白对照组;B 为模型组;C 为滇白珠醇提取液低剂量组;D 为滇白珠醇提取液中剂量组;E 为滇白珠醇提取液高剂量组。

图 1 踝关节组织病理检查结果(HE 染色,×200)

3 讨 论

急性痛风性关节炎是临床常见病,发作时严重影响患者的日常生活,如不积极治疗极易致残、致畸,影响关节功能。急性痛风性关节炎发病的免疫学机制涉及多条与炎症相关的信号通路,即 Toll 样因子受体 4(TLR4)/髓样分化因子 88(MyD88)依赖性核因子- κ B 信号通路、Nod 样受体蛋白 3 炎性小体、脂联素、三磷酸腺苷(ATP)-P2X7R 信号通路等,关节滑膜炎症因子及其组成的滑膜免疫微环境在急性痛风性关

节炎发病过程中占有重要地位,它们可通过多个信号通路介导痛风的发病^[9]。

痛风性关节炎急性期多采用秋水仙碱、非甾体消炎药进行抗炎止痛对症治疗,但存在胃肠反应及肝肾功能损害等不良反应。中医认为“浊瘀”是痛风的发病病机,使用祛湿化浊或祛湿化瘀药可缓解。我国天然物产资源丰富,作为安全、有效的天然抗急性痛风性关节炎制剂的药用植物研发必将取得突破性进展,潜藏着巨大的开发价值。肖壮等^[10]研究证实滇白珠

具有抗炎镇痛、抑菌、抗氧化及抑制炎症介质产生与分泌的作用。天然药物治疗急性痛风性关节炎给药方式多数为口服,关节腔内注射是目前临床用于骨、关节疾病治疗的常用方法,可用于缓解关节肿痛、损伤^[11-12]。采用不同剂量滇白珠醇提取液关节腔注射治疗急性痛风性关节炎,通过将药物直接输送到炎症部位,改变药物在体内的分布模式,避开了药物在体内转运过程中必经的生理屏障,以最小的剂量发挥最大的作用。

急性痛风性关节炎模型中单钠尿酸盐晶体沉积在关节、滑膜引起炎症应激反应,核因子 NF- κ B 信号传导可调节大量活化的吞噬细胞、Th 细胞亚群等炎症细胞分泌细胞因子,产生炎症级联反应。有研究显示血清 VEGF、IL-17、IL-6 水平可以作为判断急性痛风性关节炎病情严重程度的重要指标^[13-14]。本实验观察关节腔内注射不同剂量滇白珠醇提取液对急性痛风性关节炎大鼠的治疗作用及对血清 IL-17、VEGF、IL-6 水平的影响,结果显示与模型组比较,滇白珠醇提取液不同剂量组血清中 IL-17、VEGF、IL-6 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。滇白珠醇提取液中、高剂量组血清 IL-17、VEGF 水平均低于滇白珠醇提取液低剂量组($P < 0.05$),而滇白珠醇提取液高剂量组血清 IL-17、VEGF 水平与滇白珠醇提取液中剂量组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。滇白珠醇提取液低、中、高剂量组血清 IL-6 水平两组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。分析其原因可能是因为滇白珠醇提取液关节腔内注射后,下调血液中 VEGF 水平,VEGF 作为直接作用于血管内皮细胞的有丝分裂原,其促进新生血管的形成能力及血管的通透性显著下降,血管内物质的渗出减少,同时 Th17 细胞分泌产生的 IL-17 减少,抑制炎症介质的产生与分泌。IL-6 是一种多功能炎症细胞因子,不仅可以直接参与炎症反应,同时也可以促进其他炎症因子的释放,加强炎症反应,在痛风性关节炎发病过程中扮演重要角色。IL-6 水平降低后,导滑膜炎症反应和软骨破坏减轻,可能与在炎症局部直接发挥抗炎作用有关,炎症的形成和发展受到抑制。病理结果也证实,滇白珠醇提取液不同剂量组与模型组比较,局部血管内有较多中性粒细胞,上皮及皮下充血明显;滇白珠醇提取液低剂量组纤维组织及滑膜轻度增生;滇白珠醇提取液中剂量组较多淋巴细胞、浆细胞浸润,色素沉着,滑膜轻度增生;滇白珠醇提取液高剂量组肉芽组织增生,大量淋巴细胞、浆细胞浸润,滑

膜未见增生,关节软骨及骨组织结构形态正常,未见痛风结节。

综上所述,本实验研究结果显示关节腔内注射滇白珠醇提取液对急性痛风性关节炎有治疗效果,呈现剂量依赖,可能与下调血清 IL-17、VEGF、IL-6 等炎症因子水平有关,但确切的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] DALBETH N, MERRIMAN T R, STAMP L K. Gout [J]. Lancet, 2010, 375(9711): 318-328.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 2003 版. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 308.
- [3] 何婷, 赵怡程, 李鹏跃, 等. 滇白珠抗炎镇痛活性部位的化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(17): 3469-3474.
- [4] 熊玉兰, 肖冰, 马小兵, 等. 滇白珠抗风湿性关节炎活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2516-2518.
- [5] 陈应康, 余福强, 刘大腾, 等. 苗药滇白珠抗急性痛风性关节炎作用的实验研究[J]. 中药材, 2016, 39(9): 2119-2122.
- [6] 陆科闯, 陆彝中. 苗药方剂学[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2009: 115.
- [7] 蔡唐彦, 王旭, 何滇, 等. 急性痛风性关节炎大鼠模型的建立及模型维持时间观察[J]. 中国实验动物学报 2017, 25(5): 494-499.
- [8] 毕四丽, 陈杜, 姜如, 等. 透骨血竭散外敷对类风湿性关节炎大鼠 T 细胞抗原受体通路中 Lck、Fyn 蛋白表达及滑膜细胞凋亡的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(9): 2129-2135.
- [9] 周蜜, 王一飞, 袁佳沁, 等. 急性痛风性关节炎免疫学发病机制研究进展[J]. 世界临床药物, 2018, 39(11): 779-782.
- [10] 肖壮, 朱成华, 唐涛, 等. 滇白珠的药理、毒副作用研究和开发应用进展[J]. 中国药房, 2017, 28(26): 3726-3729.
- [11] 温元强, 陈立, 温伯平, 等. 腔内注射并浅刺放血治疗急性痛风性跖趾关节炎 30 例[J]. 中国中医急症, 2013, 22(12): 2115.
- [12] 熊时喜. 臭氧关节腔内注射治疗痛风性关节炎 51 例[J]. 河南中医, 2013, 33(7): 1095-1096.
- [13] 梁清华, 何金华, 李霞玲, 等. 痹肿消汤对实验性关节炎大鼠滑膜 VEGF 表达水平的影响[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(6): 491.
- [14] 李振彬, 马旭, 杨静, 等. 白芍总苷治疗大鼠急性痛风性关节炎的作用及对血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响[J]. 新医学, 2017, 48(6): 380.