

◆ 实验研究 ◆

祛瘀清热方对尿酸钠诱导的痛风性关节炎大鼠 NLRP6/Caspase-1/IL-1 β 信号通路的影响

钟秋生, 杨巧玉, 邵洁琦, 黄欢欢, 陈博, 王昱

东莞市松山湖中心医院, 广东 东莞 523326

[摘要] 目的: 观察祛瘀清热方对尿酸钠诱导的痛风性关节炎(GA)大鼠 NLRP6/Caspase-1/IL-1 β 信号通路的影响。方法: 检测受试大鼠踝关节肿胀度。用酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的含量, 用 Western Blot 检测滑膜组织 NLRP6 和 Caspase-1 含量。结果: 与正常组比较, 其余各组造模之后, 在不同时间点上, 受试大鼠踝关节肿胀度增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 祛瘀清热方低、中、高剂量组及秋水仙碱组大鼠, 在造模后各时间节点, 大鼠踝关节肿胀度降低 ($P < 0.05$)。与秋水仙碱组比较, 祛瘀清热方低、中、高剂量组受试大鼠, 在造模后各时间节点, 大鼠踝关节肿胀度增加 ($P < 0.05$)。模型组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 水平较正常组上升 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 祛瘀清热方低、中、高 3 个剂量组及秋水仙碱组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 的水平降低 ($P < 0.05$)。与秋水仙碱组比较, 祛瘀清热方低、中、高剂量组 IL-1 β 、TNF- α 水平增加 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组及祛瘀清热方中、高剂量组滑膜组织 NLRP6 蛋白表达下调 ($P < 0.05$), 模型组 Caspase-1 蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 祛瘀清热方高剂量组滑膜组织 NLRP6 蛋白表达上调 ($P < 0.05$), Caspase-1 蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。结论: 祛瘀清热方可抑制 GA 炎性反应, 降低血清中 IL-1 β 、TNF- α 含量, 上调滑膜组织 NLRP6 蛋白和下调滑膜组织 Caspase-1 蛋白的表达。

[关键词] 痛风性关节炎; 祛瘀清热方; 尿酸钠; 炎性反应

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2023) 18-0001-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2023.18.001

Effect of Quyu Qingre Prescription on NLRP6/Caspase-1/IL-1 β Signaling Pathway in Rats with Gouty Arthritis Induced by Sodium Urate

ZHONG Qiusheng, YANG Qiaoyu, SHAO Jieqi, HUANG Huanhuan, CHEN Bo, WANG Yu

Songshan Lake Central Hospital, Dongguan Guangdong 523326, China

Abstract: **Objective:** To observe the effect of Quyu Qingre Prescription on NLRP6/Caspase-1/IL-1 β signaling pathway in rats with gouty arthritis (GA) induced by sodium urate. **Methods:** The swelling degree of ankle joint was detected. The contents of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The contents of NLRP6 and Caspase-1 in synovial tissue were detected by Western Blot. **Results:** Compared with the normal group, the swelling degree of ankle joint in other groups was significantly increased at different time points after

[收稿日期] 2023-03-11
[修回日期] 2023-06-25
[基金项目] 广东省中医药局科研课题 (20221417)
[作者简介] 钟秋生 (1968-), 男, 主任医师, E-mail: arandy@163.com。
[通信作者] 杨巧玉 (1990-), 女, 中医师, E-mail: 493897459@qq.com。

modeling ($P < 0.05$). Compared with the model group, the swelling degree of ankle joint in low-, medium- and high-dose groups of Quyu Qingre Prescription and colchicine group decreased at each time point after modeling ($P < 0.05$). Compared with colchicine group, the swelling degree of ankle joint in low-, medium- and high-dose groups of Quyu Qingre Prescription increased at each time point after modeling ($P < 0.05$). Serum levels of IL-1 β and TNF- α in model group were higher than those in normal group ($P < 0.05$). Compared with the model group, serum IL-1 β and TNF- α levels were decreased in low-, medium- and high-dose groups of Quyu Qingre Prescription and colchicine group ($P < 0.05$). Compared with colchicine group, the concentration levels of IL-1 β and TNF- α in low-, medium- and high-dose groups of Quyu Qingre Prescription increased ($P < 0.05$). Compared with the normal group, NLRP6 protein expression in synovial tissue of model group and medium- and high-dose groups of Quyu Qingre Prescription was down-regulated ($P < 0.05$), and Caspase-1 protein expression of model group was up-regulated ($P < 0.05$). Compared with the model group, NLRP6 protein expression was up-regulated and Caspase-1 protein expression was down-regulated in synovial tissue of Quyu Qingre Prescription high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Quyu Qingre Prescription can inhibit the inflammatory response of GA, reduce the content of IL-1 β and TNF- α in serum, up-regulate the expression of NLRP6 and down-regulate the expression of Caspase-1 protein in synovial tissue.

Keywords: Gouty arthritis; Quyu Qingre Prescription; Sodium urate; Inflammatory response

痛风性关节炎(GA)是一种异质性疾病,通常伴有尿酸钠结晶体的沉积,其沉积部位多位于关节及其周围处。流行病学表明,GA的发病率高,随着社会经济的发展,本病呈现出明显的上升势头,GA可累及多个脏器,对人类的健康构成严重威胁。GA的发病机制与炎症反应密切相关。炎症细胞因子直接或间接参与GA的炎症反应,炎症因子的释放受到多种相关信号通路的调节,免疫细胞也参与调控。NLRP6是一种新的NLR家族成员,在不同的细胞类型中,发挥不同的角色,并参与多个信号通路的调控,如核因子- κ B(NF- κ B)和MAPK信号等的转导。本研究团队应用祛瘀清热方治疗GA,取得较好的临床疗效,研究发现,其可明显降低血尿酸水平、中医证候积分和炎症反应指标如C-反应蛋白、血沉^[1]。本研究拟通过动物实验,观察祛瘀清热方对尿酸钠诱导的GA大鼠踝关节肿胀度影响、血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的变化,探讨祛瘀清热方对NLRP6/Caspase-1/IL-1 β 信号通路的调控作用。

1 材料

1.1 动物 选取雄性大鼠,SPF级SD,60只,体质

量180~200g,全部从南方医科大学购买,大鼠随机分空白组、模型组、秋水仙碱组、祛瘀清热高剂量组、祛瘀清热中剂量组和祛瘀清热低剂量组,共6组,每组各10只。

1.2 药物 祛瘀清热方处方:当归、泽兰、桃仁、泽泻、地龙各10g,益母草、白茅根、车前子、秦艽各15g,薏苡仁20g。生药由东莞市松山湖中心医院中药房提供,并协助煎煮,100℃水浴,浓缩至200%,相当于生药2g/mL,4℃保存,备用。秋水仙碱0.5mg×20片/盒,由云南植物药业有限公司(国药准字H53020166)提供,切磨成粉状,保存,备用。应用方法:造模后60min,开始给药。秋水仙碱组:秋水仙碱9mg/kg,每天1次,灌胃,连续7d;祛瘀清热方高、中、低剂量治疗组:分别给予祛瘀清热方100mg/kg、50mg/kg、20mg/kg,灌胃,连续7d;空白组和模型组:每组大鼠予等容量蒸馏水灌胃,连续7d。各组大鼠,均每天上午9时灌胃,每天1次。

1.3 试剂 IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒,购自上海酶联生物科技有限公司,批号均为202104。NLRP6、Caspase-1 Western Blot购自武

汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器 电子天平、双目显微镜、石蜡切片机、双重纯水蒸馏器、不锈钢水浴锅、恒温培养箱、医用微波炉和显微摄像系统。

2 方法

2.1 分组与造模 60只SD大鼠,随机分为6组,每组10只。造模方法,采用党荣敏等^[2]尿酸钠溶液注射关节腔内的方法。

2.2 观察指标及监测方法 观察大鼠关节的肿胀度:选取大鼠踝关节,测其周长、肿胀度,监测时间分别为造模前1h、造模后1d、2d和1周。

2.3 病理组织形态观察 取滑膜组织,固定,脱水,石蜡包埋处理,放在干净载玻片上,在恒温箱中孵化,脱蜡后,染色,流水冲洗,乙醇分化,蒸馏水冲洗,伊红染色,二甲苯透明,封固,观察滑膜的病理情况。

2.4 血清中IL-1 β 、TNF- α 测定 检测血清中的细胞因子TNF- α 、IL-1 β 选股动脉,采血,在真空采血管中,血静置0.5h后,离心15min,血清采集,保存。

2.5 Western Blot检测滑膜组织NLRP6、Caspase-1表达水平 试剂批号为380625,选取组织样本

100mg,剪碎后,加用裂解液匀浆,进行充分的裂解,使用BCA法,行蛋白的定量,计算上样量,电泳及电转化,恒流200mA,1h,在5%脱脂奶粉溶液中,进行PVDF膜置,封闭,在室温下1h,TBST洗膜,抗稀释液4℃,孵育,过1夜,第2天,TBST10min,洗3次,置二抗稀释液4℃中,孵育1h,后进行TBST10min,洗3次,行显影,应用ECL液行发光与条带分析。

2.6 统计学方法 数据符合正态分布和方差齐性,使用SPSS22.0统计学软件分析,测量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示计量资料,以单因素方差分析,进行指标计量资料比较,以LSD-*t*检验行组间两两比较,取 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠受试踝关节肿胀度比较 见表1。与正常组比较,其余各组造模之后,在不同时间点上,受试大鼠踝关节肿胀度有增加($P<0.05$)。与模型组比较,祛瘀清热方低、中、高剂量组及秋水仙碱组大鼠,在造模后各时间节点,大鼠踝关节肿胀度降低($P<0.05$)。与秋水仙碱组比较,祛瘀清热方低、中、高剂量组受试大鼠,在造模后各时间节点,大鼠踝关节肿胀度增加($P<0.05$)。

表1 各组大鼠受试踝关节肿胀度比较($\bar{x}\pm s$)

cm

组别	鼠数	造模前1h	造模后24h	造模后48h	造模后168h
正常组	10	0.031 $\pm$ 0.002	0.030 $\pm$ 0.007	0.029 $\pm$ 0.005	0.030 $\pm$ 0.002
模型组	10	0.131 $\pm$ 0.036 ^①	0.335 $\pm$ 0.041 ^①	0.318 $\pm$ 0.040 ^①	0.302 $\pm$ 0.039 ^①
秋水仙碱组	10	0.065 $\pm$ 0.026 ^{①②}	0.143 $\pm$ 0.036 ^{①②}	0.162 $\pm$ 0.043 ^{①②}	0.114 $\pm$ 0.039 ^{①②}
祛瘀清热方低剂量组	10	0.122 $\pm$ 0.025 ^{①②③}	0.215 $\pm$ 0.039 ^{①②③}	0.255 $\pm$ 0.046 ^{①②③}	0.211 $\pm$ 0.051 ^{①②③}
祛瘀清热方中剂量组	10	0.111 $\pm$ 0.041 ^{①②③}	0.198 $\pm$ 0.056 ^{①②③}	0.241 $\pm$ 0.063 ^{①②③}	0.196 $\pm$ 0.038 ^{①②③}
祛瘀清热方高剂量组	10	0.093 $\pm$ 0.036 ^{①②③}	0.162 $\pm$ 0.063 ^{①②③}	0.186 $\pm$ 0.062 ^{①②③}	0.139 $\pm$ 0.058 ^{①②③}

注:①与正常组同时时间点比较, $P<0.05$;②与模型组同时时间点比较, $P<0.05$;③与秋水仙碱组同时时间点比较, $P<0.05$

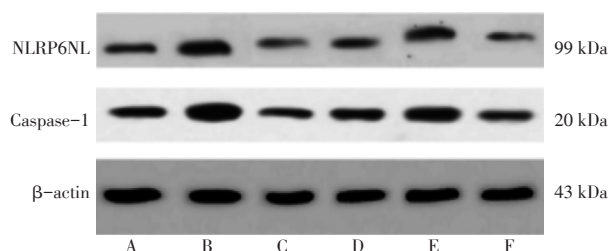
3.2 各组大鼠血清中IL-1 β 及TNF- α 含量比较 见表2。模型组中大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 水平较正常组上升($P<0.05$)。与模型组比较,在祛瘀清热方低、中、高3个剂量组及秋水仙碱组中,大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 的水平降低($P<0.05$)。与秋水仙碱组比较,祛瘀清热方低、中、高剂量组IL-1 β 、TNF- α 水平增加($P<0.05$)。

表2 各组大鼠血清中IL-1 β 及TNF- α 含量比较($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组别	鼠数	IL-1 β	TNF- α
正常组	10	52.48 $\pm$ 5.75	41.35 $\pm$ 4.92
模型组	10	132.95 $\pm$ 9.56 ^①	162.3 $\pm$ 8.96 ^①
秋水仙碱组	10	62.80 $\pm$ 7.58 ^{①②}	69.86 $\pm$ 4.68 ^{①②}
祛瘀清热低剂量组	10	126.32 $\pm$ 7.89 ^{①②③}	145.93 $\pm$ 8.68 ^{①②③}
祛瘀清热中剂量组	10	101.12 $\pm$ 6.31 ^{①②③}	104.15 $\pm$ 6.81 ^{①②③}
祛瘀清热高剂量组	10	88.21 $\pm$ 6.35 ^{①②③}	84.53 $\pm$ 7.59 ^{①②③}

注:①与正常组比较, $P<0.05$;②与模型组比较, $P<0.05$;③与秋水仙碱组比较, $P<0.05$

3.3 各组大鼠滑膜组织中 NLRP6、Caspase-1 含量比较 见图 1、见表 3。与正常组比较,模型组及祛瘀清热中、高剂量组滑膜组织 NLRP6 蛋白表达下调($P<0.05$),模型组 Caspase-1 蛋白表达上调($P<0.05$)。与模型组比较,祛瘀清热高剂量组滑膜组织 NLRP6 蛋白表达上调($P<0.05$),Caspase-1 蛋白表达下调($P<0.05$)。



注: A. 正常对照组; B. 模型组; C. 祛瘀清热方高剂量组; D. 祛瘀清热方中剂量组; E. 祛瘀清热方低剂量组; F. 秋水仙碱组

图 1 各组大鼠踝关节组织 NLRP6、Caspase-1 相关蛋白表达电泳图

表 3 各组大鼠滑膜组织中 NLRP6、Caspase-1 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NLRP6	Caspase-1
正常组	10	1.00±0.09	0.92±0.06
模型组	10	0.82±0.05 ^①	1.08±0.07 ^①
秋水仙碱组	10	0.90±0.07	0.94±0.08
祛瘀清热低剂量组	10	0.86±0.06	0.93±0.05
祛瘀清热中剂量组	10	0.89±0.08 ^①	0.91±0.06
祛瘀清热高剂量组	10	0.99±0.09 ^{①②}	0.78±0.04 ^②

注: ①与正常组比较, $P<0.05$; ②与模型组比较, $P<0.05$

4 讨论

中医药治疗 GA, 颇具特色, 有用单一的中药治疗, 有予中药提取物治疗, 其治疗 GA 有多成分、多通道、多靶点的作用特点^[3-4], 已取得了一系列成果, 如青藤碱能有效降低 GA 大鼠滑膜中 TNF- α 、IL-1 β 水平, 抑制炎性细胞因子, 从而对 GA 起到治疗作用^[4]。《中医病证诊断疗效标准》明确将 GA 证型分为 4 型, 并就相应证型提出了详尽治疗原则和方药^[5]。一般认为, 临床常见的 GA 证型, 多为湿热蕴结与瘀热阻滞, 故祛瘀清热法成为 GA 的常用治法之一。研究团队成员曾较系统应用祛瘀清热汤治疗 GA, 取得较好的疗效^[6]。

诸多国外指南指出, 快速缓解患者关节疼痛,

控制关节炎, 是 GA 急性期发作治疗的主要目标, 或选非甾体抗炎药, 或用激素, 或口服秋水仙碱, 旨在快速抗炎镇痛, 说明 GA 致病机制与炎症反应有较高度度的相关性, GA 致病特点通常有以下几点, 一是嘌呤代谢或排泄障碍, 二是血尿酸异常升高, 三是关节或其周围可析出尿酸钠结晶, 四是诱导关节炎, 出现关节红肿热痛症状。上述过程中, 在多种相关信号通路的调控下, 免疫细胞参与调节^[7-8]。可见, 在 GA 的发病机制中, 部分炎性因子起着重要作用, NLRP6 是 NLR 家族的一员, 具有调节炎症的功能。NLRP6 参与 NF- κ B 的转导^[9]。NLRP6 在不同细胞中, 取决于不同的途径激活。如 NLRP6 可与 Caspase-1 寡聚化结合, 从而成为 NLRP6 炎症小体, 有助于组织的修复, 同时抑制病理性增殖, 参与机体免疫应答^[10-11]。NLRP6 受体蛋白, 可以被外源或内源性信号水解, 这个过程中, 经过 Caspase-1 的参与, 分泌 IL-1 β 等炎性因子, 导致炎症的发生或细胞坏死^[12]。在一些情况下, NLRP6 存在时, 可抑制 NF- κ B 信号通路的活化, 抑制炎症反应, 起到分子开关功效^[13]。故本研究应用中, 把 NLRP6 作为祛瘀清热方治疗 GA 的观测指标。转录因子 NF- κ B, 在调节应激与免疫反应中, 在细胞的凋亡和分化过程中, 发挥了重要作用。NF- κ B 可被多种刺激激活, 从而导致诸多转录程序^[14]。依赖 NF- κ B 的转录, 不但受到某些调控机制的控制, 而且与其他信号通路关系, 也有极为密切的关联^[15]。在这种多样而复杂的关系中, NF- κ B 成为某些特定的细胞反应的关键分子^[16], NF- κ B 有着多种生物学功能。TNF- α 主要由中性粒细胞和单核巨噬细胞产生, 其在尿酸钠晶体性关节炎过程中, 具有重要地位, 表达升高, 可导致炎性因子水平升高, 促使其他炎性介质释放。有研究表明, 尿酸钠结晶可以直接或间接诱导, 促使滑膜细胞释放一些炎性介质, 激活 NF- κ B 因子, 启动和调节炎性介质的表达^[17-18]。本实验显示, 模型组血 IL-1 β 、TNF- α 上升, 滑膜组织 NLRP6 表达下调, Caspase-1 表达上调。

祛瘀清热方由当归、桃仁、泽兰、地龙、泽泻、秦艽、车前子、薏苡仁等组成, 方中地龙、桃仁、当归、泽兰, 活血散瘀, 通络止痛, 是为君药。臣以泽泻、秦艽、车前子、薏苡仁, 清热除湿, 健脾祛湿。佐以益母草, 祛瘀生新, 活血利

水,白茅根清热养阴,且益母草、白茅根两药,气血双调,凉血止痛,清热散瘀,活血利水,消肿且不伤阴。全方共奏祛瘀清热、凉血消肿之功。本课题组人员多年前就已对GA具有一定程度的研究^[19-21],本研究结果提示,祛瘀清热方对尿酸钠诱导的GA大鼠,具有较好的消肿镇痛作用,其作用机制可能与两方面有关,一是降低大鼠血清中IL-1 β 、TNF- α 含量,二是升高大鼠滑膜组织NLRP6蛋白表达和下调大鼠滑膜组织Caspase-1蛋白表达。

本研究目的,旨在利用NLRP6/Caspase-1/IL-1 β 信号通路及TNF- α 相关炎症因子的研究,为临床GA治疗提供新的实验依据,然而,GA的发生与多因素密切相关,本项研究仅关注信号通路、相关炎症因子,未来可在GA相关的年龄、性别、环境、遗传和高嘌呤饮食等方面进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 蓝金全,钟秋生,李裕,等.祛瘀清热汤治疗痛风性关节炎的随机对照试验[J].中国处方药,2021,19(6):138-140.
- [2] 党荣敏,谢元忠,刘洪书,等.黑骨藤抗急性痛风性关节炎的实验研究[J].中国免疫学杂志,2016,32(9):1295-1298.
- [3] 黄胜男,胡元会,张颖,等.基于网络药理学探讨威灵仙治疗痛风的作用机制[J].中国药师,2020,23(9):1715-1720.
- [4] 王雯雯,赵恒立.基于“阳化气,阴成形”理论治疗痛风性关节炎研究进展[J].陕西中医,2022,43(9):1319-1321.
- [5] 国家中医药管理局. ZY/T001.1~001.9-94 中医病证诊断疗效标准[S].南京:南京大学出版社,1994:137.
- [6] 钟秋生,周光辉,钟婉洪,等.祛瘀清热汤治疗急性痛风疗效观察[J].陕西中医,2011,32(12):1608-1609.
- [7] LEE Y M, CHO S N, SON E, et al. Apamin from bee venom suppresses inflammation in a murine model of gouty arthritis[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 257: 112860.
- [8] 罗曼,费洪新,刘旭,等.急性痛风性关节炎的发病机制[J].黑龙江科学,2017,8(8):90-91.
- [9] LI R Z, ZHU S. NLRP6 inflammasome[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2020: 100859.
- [10] BAO C H, WANG C Y, LI G N, et al. Effect of mild moxibustion on intestinal microbiota and NLRP6 inflammasome signaling in rats with post-inflammatory irritable bowel syndrome[J]. World Journal of Gastroenterology, 2019, 25(32): 4696-4714.
- [11] MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-beta[J]. Molecular cell, 2002, 10(2): 417-426.
- [12] GHIMIRE L, PAUDALS, JIN L, et al. NLRP6 negatively regulates pulmonary host defense in Gram-positive bacterial infection through modulating neutrophil recruitment and function[J]. PLoS Pathogens, 2018, 14(9): e1007308.
- [13] HUANG W, HUANG M, OUYANG H, et al. Oridonin inhibits vascular inflammation by blocking NF- κ B and MAPK activation[J]. European Journal of Pharmacology, 2018, 826: 133-139.
- [14] OECKINGHAUS A, HAYDEN M S, GHOSH S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways[J]. Nat Immunol, 2011, 12(8): 695-708.
- [15] CATRYSSSE L, VAN LOO G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- κ B[J]. Trends in Cell Biology, 2017, 27(6): 417-429.
- [16] KAWAI T, AKIRA S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors[J]. Trends in Molecular Medicine, 2007, 13(11): 460-469.
- [17] ROCK K L, KATAOKA H, LAI J J. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2013, 9(1): 13-23.
- [18] DOUGALL W C. Molecular pathways: Osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(2): 326-335.
- [19] 钟秋生,李锦培.四妙散加味合别嘌醇治疗高尿酸血症40例临床观察[J].实用中西医结合临床,2009,9(1):16-17.
- [20] 钟秋生.邓兆智治疗痛风经验[J].中国中医骨伤科杂志,2009,17(11):235-236.
- [21] 钟秋生,周光辉,钟婉洪,等.痛风中医证型与血脂紊乱的相关性临床研究[J].新中医,2010,42(10):88-89.

(责任编辑:吴凌,李海霞)