

苏萸痛风方通过ROS/TXNIP/NLRP3信号通路抗痛风性关节炎的作用机制^Δ

程媛^{1*}, 张礼², 唐熠¹, 谭亿民¹, 李涓¹, 宋英³, 袁强华³, 谭晓语^{4#} (1. 成都中医药大学附属医院药理学室, 成都 610072; 2. 成都市新都区中医院呼吸内科, 成都 610500; 3. 成都中医药大学附属医院药剂科, 成都 610072; 4. 成都中医药大学附属医院检验科, 成都 610072)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)19-2343-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.19.08



摘要 目的 研究苏萸痛风方抗痛风性关节炎的作用机制。方法 将雄性SD大鼠按体质量随机分为正常对照组、模型组、秋水仙碱片组(阳性对照药, 0.3 mg/kg)和苏萸痛风方高、中、低剂量组(5、2.5、1.25 g/kg), 每组10只。给药组大鼠每日灌胃相应药物1次(10 mL/kg), 连续给药7 d。正常对照组和模型组大鼠同法灌胃等体积水。第6天给药后1 h, 除正常对照组外, 其余各组大鼠于关节腔注入尿酸钠复制痛风性关节炎模型。检测大鼠造模后2、6、24 h的关节肿胀度和炎症指数评分。末次给药后1 h, 检测大鼠血清中氧化应激相关指标[超氧化物歧化酶(SOD)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、丙二醛(MDA)]活性及炎症因子[白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-18、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)]水平, 观察各组大鼠踝关节组织病理学变化, 检测大鼠踝关节组织中硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的表达水平。结果 经苏萸痛风方干预后, 大鼠关节肿胀度减轻、炎症指数评分降低、滑膜组织水肿改善、炎症细胞数量减少。苏萸痛风方高剂量组大鼠血清中SOD活性显著升高($P < 0.01$), XOD、MDA活性以及IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平均显著降低($P < 0.01$), 踝关节组织中ROS水平和TXNIP、NLRP3、ASC蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。苏萸痛风方中、低剂量组上述部分指标活性/水平也发生显著逆转($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 苏萸痛风方可通过ROS/TXNIP/NLRP3信号通路, 抑制NLRP3炎性小体激活, 进而发挥抗痛风性关节炎的作用。

关键词 苏萸痛风方; 痛风性关节炎; ROS/TXNIP/NLRP3信号通路; NLRP3炎性小体; 大鼠

Mechanism of Suyu tongfeng prescription in the treatment of gouty arthritis through ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway

CHENG Yuan¹, ZHANG Li², TANG Yi¹, TAN Yimin¹, LI Juan¹, SONG Ying³, YUAN Qianghua³, TAN Xiaoyu⁴ (1. Dept. of Pharmacology, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China; 2. Dept. of Respiratory Medicine, Chengdu Xindu District Hospital of TCM, Chengdu 610500, China; 3. Dept. of Pharmacy, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China; 4. Dept. of Clinical Laboratory, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the mechanism of Suyu tongfeng prescription against gouty arthritis. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into normal control group, model group, colchicine tablets group (positive control drug, 0.3 mg/kg) and high-dose, medium-dose and low-dose groups (5, 2.5, 1.25 g/kg) of Suyu tongfeng prescription according to body mass, with 10 rats in each group. The rats in the administration group were orally given the corresponding drugs once a day (10 mL/kg) for 7 consecutive days. Rats in the normal control group and model group were given equal volume of water intragastrically. On the 6th day, 1 h after administration, except for normal control group, the rats in other groups were injected with sodium urate into the joint to replicate the gouty arthritis model. The degree of joint swelling and the score of inflammatory indexes were measured at 2, 6 and 24 h after the establishment of the model. One hour after the last administration, the activity of oxidative stress related indicators [superoxide dismutase (SOD), xanthine oxidase (XOD), malondialdehyde (MDA)] and the levels of inflammatory factors [interleukin 1 β (IL-1 β), IL-18, tumor necrosis factor α (TNF- α)] were detected in the serum. The histopathological changes of ankle joints in each group were observed; the expressions level of thioredoxin interacting protein (TXNIP), NOD like receptor thermoprotein domain related protein 3 (NLRP3), apoptosis related spot like protein (ASC) in the ankle joint of rats were detected. **RESULTS** After intervened

^Δ基金项目 四川省科技计划项目(No.2019YJ0614);四川省中医药管理局科学技术研究专项课题(No.2020JC0050);成都中医药大学附属医院科技发展基金(No.19MZ16)

* 第一作者 主管药师。研究方向:院内制剂及中药药理。E-mail:150120239@qq.com

通信作者 主管技师。研究方向:医学检验。E-mail:547913973@qq.com

with Suyu tongfeng prescription, the swelling degree of joints, the score of inflammation indexes, the edema of synovial tissue and the amount of inflammatory cells were reduced. The activity of SOD in Suyu tongfeng prescription high-dose group was increased significantly ($P<0.01$), while the activities of XOD and MDA as well as the levels of IL-1 β , IL-18 and TNF- α were all decreased significantly ($P<0.01$). The level of ROS and the protein expressions of TXNIP, NLRP3 and ASC in ankle joint were all decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The activities/levels of the above indexes were also significantly reversed in the middle-dose and low-dose groups of Suyu tongfeng prescription ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Suyu tongfeng prescription can inhibit the activation of NLRP3 inflammasome through ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway, and then play the role of anti-gouty arthritis.

KEYWORDS Suyu tongfeng prescription; gouty arthritis; ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway; NLRP3 inflammasome; rats;

痛风是长期嘌呤代谢紊乱及(或)尿酸排泄减少引起的一种代谢疾病^[1]。目前我国痛风的患病率为1%~3%,呈逐年上升趋势,且发病年龄呈现出低龄化趋势^[2]。痛风的临床表现为高尿酸血症及反复发作的急性关节炎,常累及肾脏,引起慢性间质性肾炎、肾结石等^[3]。痛风的临床分期包括无症状期、急性关节炎期、间歇期和慢性关节炎期^[4]。痛风急性关节炎期的治疗药物以非甾体抗炎药、秋水仙碱、糖皮质激素为主^[5],间歇期的治疗药物主要有抑制尿酸生成的别嘌醇、非布司他和促进尿酸排泄的丙磺舒、苯溴马隆等^[6]。总体而言,抗痛风药物无法同时达到急性关节炎期抗炎和间歇期降尿酸的效果,且停药后患者易复发,不良反应较多^[7]。苏萸痛风方是基于《备急千金药方》卷七引苏长史方茱萸汤加薏苡仁化裁而成,具有降尿酸和抗炎镇痛的作用^[8],成都中医药大学附属医院拟将其开发成抗痛风性关节炎药物。

已有研究表明,炎性小体在痛风性关节炎发病机制中起核心作用,尿酸盐结晶可通过上调活性氧(reactive oxygen species, ROS),诱导硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)与NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermoprotein domain related protein 3, NLRP3)结合,激活NLRP3炎性小体从而引起下游炎症因子释放^[9]。由此可知,ROS/TXNIP/NLRP3信号通路对痛风性关节炎具有重要作用。本研究拟基于ROS/TXNIP/NLRP3信号通路,探讨苏萸痛风方抗痛风性关节炎的作用机制,以期对痛风治疗药物的开发及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有PV-200型足趾容积测量仪(成都泰盟科技有限公司)、3-5M型台式低速离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司)、DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)、SpectraMAX Plus384型酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]、UV752N型紫外-可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司)、CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司)等。

1.2 主要药品与试剂

苏萸痛风方干粉由成都中医药大学附属医院药剂科提供(批号20210617,其中吴茱萸碱含量为3.471 mg/g,吴茱萸次碱含量为2.298 mg/g)。秋水仙碱片(国药准字H53021534,批号18LA,规格1 mg/片)购自昆药集团股份有限公司;尿酸钠(批号BCCB4889)购自美国Sigma公司;黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、ROS的测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(批号分别为20210309、20210326、20210406、20210507);白细胞介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-18、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司(批号均为202103);兔源TXNIP、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis related spot like protein, ASC)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体均购自成都正能生物技术有限责任公司(批号分别为382206、381207、340097、380624);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号511203)购自成都正能生物技术有限公司。其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性SD大鼠,体质量为180~220 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,动物生产许可证号为SCXK(川)2020-030。大鼠饲养于成都中医药大学实验动物中心,动物使用许可证号为SYXK(川)2019-049。饲养观察室温度为22~24℃,相对湿度为65%~75%。本实验遵循3R原则,并经成都大学附属医院动物伦理委员会批准(批准号为2022DL-006)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

取雄性SD大鼠60只,按体质量随机分为正常对照组、模型组、秋水仙碱片组(阳性对照药,0.3 mg/kg,剂量根据临床等效剂量换算而得)和苏萸痛风方高、中、低剂量组(5、2.5、1.25 g/kg,剂量分别为临床等效剂量的4、2、1倍),每组10只。给药组大鼠以10 mL/kg每日灌胃相应药物1次,连续给药7 d。正常对照组和模型组大鼠同

法灌胃等体积水。第6天给药后1 h,除正常对照组外,其余各组大鼠均参照文献[10—11]方法复制痛风性关节炎模型:采用1 mL注射器,于大鼠后肢右踝关节背侧45°方向沿胫骨肌腱内侧插入至关节腔,注入25 mg/mL尿酸钠混悬液50 μ L。正常对照组同法注射等体积0.9%氯化钠溶液。第7天给药后(即末次给药后)1 h,腹腔注射1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠,取血,取材进行后续检测。

2.2 大鼠关节肿胀度的检测

采用足趾容积测量仪检测各组大鼠造模后2、6、24 h的关节肿胀度,各时间点重复测量2次后取平均值。关节肿胀度(mL)=造模后各时间点足趾容积—造模前足趾容积。

2.3 大鼠关节炎症指数评分的检测

大鼠造模后2、6、24 h,各组大鼠参照文献[10,12]进行关节炎症指数分级评定:0分为正常;1分为关节皮肤轻度红肿,骨性标志可见;2分为关节明显红肿,骨性标志消失,但局限于关节部位;3分为关节及以外肢体肿胀。

2.4 大鼠血清中氧化应激相关指标活性及炎症因子水平的检测

末次给药1 h后,各组大鼠麻醉后腹主动脉取血,以3 000 r/min离心10 min,取上清液,采用紫外-可见分光光度法测定血清中氧化应激指标SOD、XOD、MDA的活性,采用ELISA法测定血清中炎症因子IL-1 β 、IL-18、TNF- α 的水平。

2.5 大鼠踝关节组织中ROS水平的测定

取大鼠右后踝关节组织适量,剪碎,用预冷的生理盐水冲洗后,加入玻璃匀浆器中,于冰上充分研磨。收集组织匀浆,以300目尼龙网过滤,滤液以800 r/min离心2 min,收集沉淀细胞;将沉淀细胞以磷酸盐缓冲液重悬,取部分悬液进行蛋白定量分析后,再按试剂盒说明书相关方法检测大鼠踝关节组织中ROS水平(以ROS荧光强度与蛋白含量的比值表示)。

2.6 大鼠踝关节组织的病理形态学观察

取大鼠右后踝关节组织,以4%多聚甲醛溶液固定,经20%的乙二胺四乙酸溶液脱钙后使用梯度乙醇进行脱水、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色,于倒置显微镜下观察大鼠踝关节组织的病理形态学改变。

2.7 大鼠踝关节组织中TXNIP/NLRP3信号通路相关蛋白的表达水平检测

取大鼠右后踝关节组织适量,加入预冷的裂解液于冰上进行匀浆,离心后取上清液,采用BCA法检测蛋白浓度。蛋白经变性后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,室温封闭,洗膜,加入TXNIP、NLRP3、ASC、 β -actin一抗(稀释度均为1:500),4℃孵育过夜;洗膜,加入二抗(稀释度为1:1 000),室温孵育2 h。采用ECL法显色,经凝胶成像仪拍照后,采用Image J软件分析目的蛋白灰度值,以目的蛋白条带与内参蛋白(β -actin)条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠关节肿胀度及炎症指数评分检测结果

关节肿胀度结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠造模2 h后,关节肿胀度显著升高($P<0.01$),且在造模6 h后达到高峰并持续至24 h。与模型组比较,苏萸痛风方各剂量组大鼠在造模2 h后,关节肿胀度均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),苏萸痛风方中剂量组药物作用时间持续至6 h,苏萸痛风方高剂量组药物作用时间持续至24 h,具有一定剂量依赖趋势。炎症指数评分结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠造模2、6、24 h后,炎症指数评分均显著升高($P<0.01$),关节红肿明显,骨性标志消失。与模型组比较,苏萸痛风方高、中剂量组大鼠炎症指数评分均显著降低(苏萸痛风方中剂量组造模24 h后除外, $P<0.01$ 或 $P<0.05$),关节红肿减轻;秋水仙碱片组大鼠各时间点的关节肿胀度和炎症指数评分均显著降低($P<0.01$)。结果见表1。

3.2 大鼠踝关节组织的病理形态学观察结果

与正常对照组比较,模型组大鼠滑膜组织增厚,炎症细胞数量增加,提示炎症和水肿形成。与模型组比较,秋水仙碱片组大鼠滑膜组织未明显增厚及水肿,炎症细胞数量明显减少;苏萸痛风方各剂量组大鼠滑膜组织厚度降低,炎症细胞数量减少,说明苏萸痛风方能减轻大鼠踝关节滑膜组织的炎症。结果见图1。

表1 各组大鼠造模后不同时间点的关节肿胀度和炎症指数评分测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	2 h		6 h		24 h	
	关节肿胀度/mL	炎症指数评分	关节肿胀度/mL	炎症指数评分	关节肿胀度/mL	炎症指数评分
正常对照组	0.094±0.032	0.3±0.5	0.114±0.053	0.2±0.4	0.034±0.029	0.1±0.3
模型组	0.486±0.089 ^a	1.7±0.5 ^a	0.541±0.102 ^a	2.2±0.4 ^a	0.505±0.106 ^a	1.8±0.4 ^a
秋水仙碱片组	0.291±0.053 ^b	0.8±0.4 ^b	0.342±0.073 ^b	0.9±0.6 ^b	0.272±0.058 ^b	0.5±0.5 ^b
苏萸痛风方高剂量组	0.343±0.089 ^b	1.1±0.3 ^b	0.418±0.092 ^c	1.4±0.5 ^c	0.385±0.071 ^b	1.2±0.6 ^b
苏萸痛风方中剂量组	0.373±0.099 ^c	1.3±0.5 ^c	0.437±0.081 ^c	1.6±0.5 ^c	0.403±0.097	1.4±0.5
苏萸痛风方低剂量组	0.397±0.094 ^c	1.4±0.5	0.454±0.082	1.9±0.3	0.441±0.076	1.7±0.5

a:与正常对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$

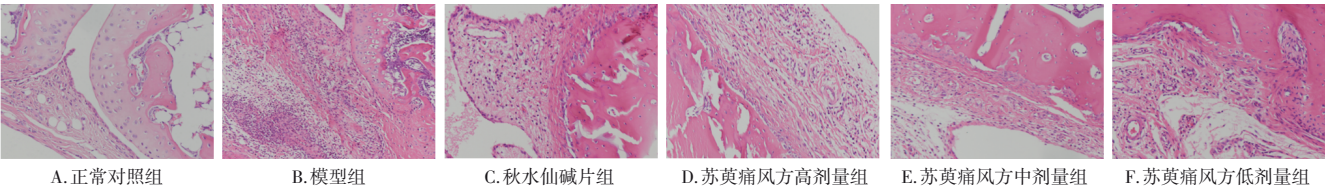


图1 各组大鼠踝关节组织的病理形态学观察结果(HE染色,×100)

3.3 大鼠血清中氧化应激相关指标活性及炎症因子水平的检测结果

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中SOD活性显著降低($P<0.01$),XOD、MDA活性以及IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,苏萸痛风方高剂量组和秋水仙碱片组大鼠血清中上述指标活性/水平均显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$),苏萸痛风方中、低剂量组大鼠血清中XOD活性以及IL-1 β 、IL-18水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表2。

表2 各组大鼠血清中氧化应激相关指标活性及炎症因子水平的检测结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	SOD/ (U/L)	XOD/ (U/mL)	MDA/ (nmol/mL)	IL-1 β / (pg/mL)	IL-18/ (pg/mL)	TNF- α / (pg/mL)
正常对照组	322.58 $\pm$ 25.35	37.60 $\pm$ 6.22	8.44 $\pm$ 1.95	52.35 $\pm$ 11.75	139.84 $\pm$ 14.63	89.48 $\pm$ 14.95
模型组	258.39 $\pm$ 32.01 ^a	48.88 $\pm$ 5.99 ^a	12.10 $\pm$ 2.72 ^a	156.30 $\pm$ 18.72 ^a	226.37 $\pm$ 26.07 ^a	114.29 $\pm$ 17.78 ^a
秋水仙碱片组	294.87 $\pm$ 28.08 ^b	7.37 $\pm$ 3.96 ^b	9.24 $\pm$ 2.16 ^b	68.39 $\pm$ 12.38 ^b	133.90 $\pm$ 24.18 ^b	87.74 $\pm$ 14.28 ^b
苏萸痛风方高剂量组	300.01 $\pm$ 31.58 ^c	38.14 $\pm$ 8.79 ^c	8.92 $\pm$ 2.53 ^c	112.86 $\pm$ 20.08 ^c	178.48 $\pm$ 18.64 ^c	92.04 $\pm$ 15.65 ^c
苏萸痛风方中剂量组	281.76 $\pm$ 40.37	40.46 $\pm$ 8.05 ^c	11.94 $\pm$ 2.09	130.51 $\pm$ 12.15 ^c	192.45 $\pm$ 15.63 ^c	94.89 $\pm$ 18.23
苏萸痛风方低剂量组	276.71 $\pm$ 36.43	40.53 $\pm$ 5.86 ^c	11.33 $\pm$ 1.83	134.94 $\pm$ 20.19 ^c	203.96 $\pm$ 19.18 ^c	106.69 $\pm$ 13.40

a:与正常对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$

3.4 大鼠踝关节组织中ROS水平的检测结果

与正常对照组比较,模型组大鼠踝关节组织中ROS水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,秋水仙碱片组和苏萸痛风方高、中剂量组大鼠踝关节组织中ROS水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表3。

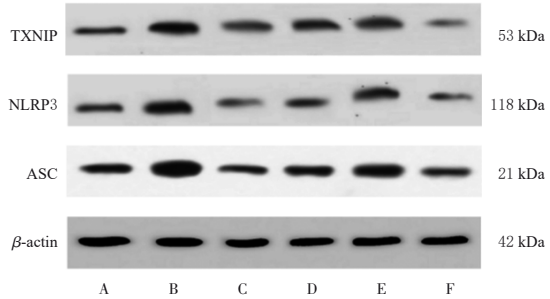
表3 各组大鼠踝关节组织中ROS水平的检测结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	ROS水平	组别	ROS水平
正常对照组	52.7 $\pm$ 18.0	苏萸痛风方高剂量组	139.2 $\pm$ 32.8 ^b
模型组	236.7 $\pm$ 36.3 ^a	苏萸痛风方中剂量组	194.6 $\pm$ 43.0 ^b
秋水仙碱片组	68.0 $\pm$ 24.2 ^b	苏萸痛风方低剂量组	216.8 $\pm$ 37.9

a:与正常对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$

3.5 大鼠踝关节组织中TXNIP/NLRP3信号通路相关蛋白表达水平的检测结果

与正常对照组比较,模型组大鼠踝关节组织中TXNIP、NLRP3、ASC蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,秋水仙碱片组和苏萸痛风方高、中剂量组大鼠踝关节组织中TXNIP、NLRP3、ASC蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图2、表4。



A:正常对照组;B:模型组;C:苏萸痛风方高剂量组;D:苏萸痛风方中剂量组;E:苏萸痛风方低剂量组;F:秋水仙碱片组

图2 各组大鼠踝关节组织中TXNIP/NLRP3信号通路相关蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠踝关节组织中TXNIP/NLRP3信号通路相关蛋白表达水平的检测结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	TXNIP/ β -actin	NLRP3/ β -actin	ASC/ β -actin
正常对照组	0.886 $\pm$ 0.207	0.774 $\pm$ 0.192	0.903 $\pm$ 0.117
模型组	1.422 $\pm$ 0.218 ^a	1.301 $\pm$ 0.231 ^a	1.482 $\pm$ 0.185 ^a
秋水仙碱片组	0.349 $\pm$ 0.113 ^b	0.603 $\pm$ 0.171 ^b	0.841 $\pm$ 0.153 ^b
苏萸痛风方高剂量组	1.102 $\pm$ 0.131 ^b	0.857 $\pm$ 0.217 ^b	0.927 $\pm$ 0.226 ^b
苏萸痛风方中剂量组	1.234 $\pm$ 0.175 ^c	1.031 $\pm$ 0.227 ^c	1.215 $\pm$ 0.201 ^c
苏萸痛风方低剂量组	1.366 $\pm$ 0.268	1.210 $\pm$ 0.201	1.362 $\pm$ 0.260

a:与正常对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$

4 讨论

痛风在中医学中类似于“痹证”“历节”“脚气”“痛风”等病症,病机主要为痰湿浊毒内阻血脉、四肢以致脉络不通,不通则痛。苏萸痛风方中吴茱萸为温降之品,既能理气降逆,又可止痛除湿、逐风行痹;木瓜味酸、性温,具有舒筋活络、祛湿的功效;薏苡仁利水渗湿、除痹散结;诸药合用,共奏祛湿降浊、舒筋通络之功。本研究表明,苏萸痛风方能明显减轻痛风性关节炎模型大鼠的关节肿胀度,降低关节炎症指数评分和滑膜组织水肿,减少炎症细胞浸润。这表明苏萸痛风方能有效降低关节炎症反应,改善痛风性关节炎。

现代医学认为,痛风性关节炎是由沉积在关节处的尿酸盐结晶通过活化巨噬细胞等固有免疫细胞释放多种促炎细胞因子和趋化因子(如IL-1 β 、TNF- α 等),进而诱导大量中性粒细胞浸润至关节腔的炎症反应^[13]。研究表明,NLRP3炎性小体活化在痛风性关节炎炎症反应中处于中心位置^[14]。尿酸盐结晶被NLRP3蛋白C端的亮氨酸重复序列识别后,使NLRP3发生结构上的变化,形成高度有序的NLRP3蛋白寡聚体,随后通过募集

ASC 与 Pro-caspase-1 激活形成 NLRP3 炎性小体复合物,活化 caspase-1,然后将无活性的 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 剪切为成熟的 IL-1 β 和 IL-18,并分泌相应的活性成分至细胞外,引起炎症反应^[15]。另有研究表明,NLRP3 炎性小体被尿酸盐结晶激活可能有 3 种机制:(1)溶酶体破裂导致组织蛋白酶释放^[16];(2)钾离子外流^[17];(3)ROS 的产生^[18]。ROS 的来源主要有 NADPH 氧化酶、线粒体呼吸链、XOD 等^[19-20]。XOD 活力增强可引起氧自由基产生增多;SOD 能够分解有害的氧自由基,消除组织细胞脂质过氧化;MDA 是氧自由基作用于脂质发生氧化反应的终产物^[21-22]。TXNIP 是 NLRP3 的配体,对 ROS 敏感,在正常生理条件下,硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)可与 TXNIP 结合形成复合物,从而抑制 TXNIP 的活性;当细胞内 ROS 浓度增加时,该复合物解离, TXNIP 与 NLRP3 结合,进而激活 NLRP3 炎性小体^[18]。由此说明,尿酸盐结晶能上调 ROS,经 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路诱导 NLRP3 炎性小体激活,从而释放炎症因子导致痛风^[18]。本研究结果显示,经苏萸痛风方干预后,大鼠血清中 SOD 活性升高,XOD、MDA 活性以及 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平降低,踝关节组织中 ROS 水平和 TXNIP、NLRP3、ASC 蛋白表达水平也降低,这表明苏萸痛风方可能是通过下调 ROS、TXNIP、ASC 水平干扰 NLRP3 炎性小体复合物的激活,从而抑制炎症因子 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 的分泌,进而发挥抗痛风性关节炎的作用。

综上所述,苏萸痛风方可通过 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路抑制 NLRP3 炎性小体激活,进而发挥抗痛风性关节炎的作用。

参考文献

- [1] 王承德,沈丕安,胡荫奇.实用中医风湿病学[M]. 2 版.北京:人民卫生出版社,2009:286-288.
- [2] 赵敏,陈婷,黄振光,等. 1990—2019 年中国痛风疾病负担研究[J]. 现代预防医学,2021,48(21):3974-3978.
- [3] 高尿酸血症相关疾病诊疗多学科共识专家组.中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识[J]. 中华内科杂志,2017,56(3):235-248.
- [4] 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.
- [5] 张超凡,刘晓莉,李雪娟,等. 痛风急性发作一线药物治疗方案的系统评价及药物经济学分析[J]. 中国新药杂志,2021,30(16):1530-1536.
- [6] 吴芑,王亮,李海涛,等.高尿酸血症模型的建立及降尿酸药物的研究进展[J]. 中国病理生理杂志,2021,37(7):1283-1294.
- [7] 颜家兴,王茜,朱英,等. 中药治疗痛风的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(12):226-236.
- [8] 程媛,李涓,唐熠,等. 苏萸痛风胶囊的抗炎、镇痛及降尿酸作用实验研究[J]. 中药与临床,2020,11(1):45-48,63.
- [9] SCHRODER K, ZHOU R B, TSCHOPP J. The NLRP3 in-

flammasome: a sensor for metabolic danger? [J]. Science, 2010,327(5963):296-300.

- [10] CODERRE T J, WALL P D. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritis agents[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1988,29(3):461-466.
- [11] 吕军,吕芳,方和金,等. 高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的建立[J]. 中国现代医学杂志,2013,23(27):11-16.
- [12] 刘伟伟,刘秋玉,周子正,等. 白虎加桂枝汤对高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠抗炎作用机制探究[J]. 中华中医药杂志,2019,34(5):2254-2259.
- [13] BUSO N, SO A. Mechanisms of inflammation in gout [J]. Arthritis Res Ther,2010,12(2):206.
- [14] WEN H T, TING J P Y, O' NEILL L A J. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases: did Warburg miss inflammation? [J]. Nat Immunol, 2012, 13 (4) : 352-357.
- [15] ROCK K L, KATAOKA H, LAI J J. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities[J]. Nat Rev Rheumatol,2013,9(1):13-23.
- [16] CHU J, THOMAS L M, WATKINS S C, et al. Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 β from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner[J]. J Leukoc Biol,2009,86(5):1227-1238.
- [17] MUÑOZ-PLANILLO R, KUFFA P, MARTÍNEZ-COLÓN G, et al. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter[J]. Immunity,2013,38(6):1142-1153.
- [18] TSCHOPP J, SCHRODER K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. Nat Rev Immunol,2010,10(3):210-215.
- [19] BEGUM R, THOTA S, ABDULKADIR A, et al. NADPH oxidase family proteins: signaling dynamics to disease management[J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19 (6) : 660-686.
- [20] ORHAN I E, DENIZ F S S. Natural products and extracts as xantine oxidase inhibitors : a hope for gout disease? [J]. Curr Pharm Des,2021,27(2):143-158.
- [21] 姜楠,张晓琳,田金英,等. 具有黄嘌呤氧化酶抑制作用的天然产物之研究进展[J]. 药学报,2021,56(5):1229-1237.
- [22] 袁牧,王昌留,王一斐,等. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2016,25(6):550-558.

(收稿日期:2022-02-25 修回日期:2022-07-22)

(编辑:唐晓莲)