

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002318

小檗碱对小鼠痛风性关节炎模型中 NLRP3/TLRs 的调控作用

蹇睿, 杨敏, 郑书林

(西南医科大学附属医院康复医学科, 泸州 646000)

【摘要】目的:探究小檗碱对痛风性关节炎小鼠 NLRP3/TLRs 信号通路的调控作用。**方法:**C57BL/6 小鼠随机均分为 6 组, 分别为正常对照组, 模型组, 秋水仙碱组(阳性对照, 0.65 mg/kg), 小檗碱高、中、低剂量组(150、100、50 mg/kg), 造模给药 7 d, 每天测定小鼠踝关节肿胀度, 观察治疗作用; 同时, 采用 ELISA 法测定血清白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及干扰素- α (interferon- α , IFN- α)表达水平。进一步采用 RT-PCR、Western blot 分别检测关节滑膜组织中 NLRP3/TLRs 关键靶点基因及蛋白的表达。**结果:**关节肿胀度结果显示, 小檗碱高、中、低剂量组(分别为 18.35%、21.35%、25.35%)和秋水仙碱组(15.35%)与模型组(31.34%)比较明显降低, 差异具有统计学意义($F=11.240, P=0.005$)。且各剂量小檗碱治疗后, 小鼠踝关节滑膜组织中炎性细胞浸润及水肿现象明显减轻。ELISA 结果显示, 与模型组比较, 小檗碱各组小鼠血清 IL-2、IL-6、TNF- α 及 IFN- α 表达水平均明显下降(IL-2: $F=5.690, P=0.005$; IL-6: $F=10.370, P=0.009$; TNF- α : $F=15.240, P=0.002$; IFN- α : $F=4.520, P=0.02$)。RT-PCR 及 Western blot 结果显示, 小檗碱高、中、低剂量组的小鼠滑膜组织 NLRP3、TLR3、TLR7、MyD88 及 NF- κ B p65 的基因和蛋白表达均明显降低($P<0.05$)。**结论:**小檗碱能缓解小鼠痛风性关节炎, 其机制可能与下调炎症因子水平, 抑制 NLRP3/TLRs 信号通路有关。

【关键词】小檗碱; 痛风性关节炎; 炎症因子; NLRP3/TLRs 信号通路

【中图分类号】R684.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-03-06

Regulatory effect of berberine on NLRP3/TLRs in mice with gouty arthritis

Jian Rui, Yang Min, Zheng Shulin

(Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the regulatory effect of berberine on NLRP3/TLRs signal pathway in mice with gouty arthritis. **Methods:** C57BL/6 mice were randomly divided into 6 groups: normal control group, model group, colchicine group (positive control, 0.65 mg/kg), and berberine groups with high, middle and low doses (150, 100, 50 mg/kg), respectively. Administration for 7 days after modeled, and the swelling degree of the ankle joint was measured every day to observe therapeutic effects. Meanwhile, serum interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- α (IFN- α) expression levels were measured by ELISA. And the expressions of key target genes and proteins of NLRP3/TLRs in the mice's ankle synovial tissue were detected by RT-PCR and Western blot assays. **Results:** Compared with the model group (31.34%), the swelling degrees of the ankle joint of the berberine groups with high, medium and low doses (18.35%, 21.35%, 25.35%, respectively) and the colchicine group (15.35%) were significantly reduced, and the difference was statistically significant ($F=11.240, P=0.005$). After the berberine treatment with different doses, inflammatory cell infiltration and edema in the ankle synovial tissue were significantly alleviated. The ELISA results showed that compared with the model group, the serum levels of IL-2, IL-6, TNF- α and IFN- α in the berberine groups were significantly decreased (IL-2: $F=5.690, P=0.005$; IL-6: $F=10.370, P=0.009$; TNF- α : $F=15.240, P=0.002$; IFN- α : $F=4.520, P=0.020$). RT-PCR and Western blot results showed that the expression levels of NLRP3, TLR3, TLR7, MyD88 and NF- κ B p65 genes and proteins were obviously decreased in the mice's synovial tissue of the berberine groups with high, medium and low doses ($P<0.05$). **Conclusion:** Berberine can alleviate gouty arthritis in mice, and its mechanism may be related to down-regulating inflammatory cytokine levels and inhibiting

NLRP3/TLRs signal pathway.

【Key words】 berberine; gouty arthritis; inflammatory cytokines; NLRP3/TLRs signal pathway

作者介绍: 蹇睿, Email: jr64324@163.com,

研究方向: 骨关节及脑卒中疾病康复研究。

通信作者: 杨敏, Email: 358556834@qq.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20191009.0925.002.html>

(2019-10-09)

痛风性关节炎突发于关节,伴有剧烈疼痛、关节及周围组织红肿发热、肿胀^[1],最常见的表现形式是关节红肿热痛的炎症反应^[2],多见于拇指关节、踝部及足部关节等^[3],严重影响患者的日常活动。当前,人类饮食结构及生活规律的改变为痛风性关节炎发病率大大增加的重要原因^[4]。有研究认为,尿酸钠为引起痛风性关节炎的关键物质,且会诱导炎症因子的产生^[5-6]。而炎症因子可引发炎症反应,如水肿、血浆渗出、白细胞聚集、发热等^[7-8],加重痛风病情。据报道,固有免疫可调控炎症反应,其存在一类重要感受器核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性体,属于 NOD 样受体蛋白,能够识别病原体上的相关分子模式^[3]。此外, Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLRs) 信号通路也参与固有免疫,可调控炎症反应^[9];该信号通路包含关键接头蛋白髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88),可连接上游 TLRs 信号通路受体 (TLR3、TLR7 等) 与下游关键信号核转录因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B),从而介导细胞因子白细胞介素 (interleukin, IL)-2、IL-6 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等释放,诱导关节炎等炎症反应^[9-11]。已有研究表明, NLRP3 炎性体可由 TLRs 信号诱导激活,且 NLRP3 炎性体和 TLRs 信号通路均在调控痛风性关节炎发病过程中具有重要作用^[9,12]。

小檗碱是中药黄连的主要活性成分,又名黄连素。国内外研究发现,小檗碱具有治疗胃肠炎、调血脂、抗内皮损伤、抗血栓、抗炎等多种药理作用^[13]。有报道显示,小檗碱具有良好的治疗类风湿关节炎作用^[14-15]。但小檗碱治疗痛风性关节炎及其对 NLRP3/TLRs 的调控机制未见报道。

本研究拟建立小鼠痛风性关节炎模型,观察小檗碱对小鼠关节炎的治疗作用,测定炎症因子表达水平,进一步考察关节滑膜 NLRP3/TLRs 信号通路中关键蛋白及 mRNA 的表达,探讨小檗碱调控 NLRP3/TLRs 干预痛风性关节炎的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 小檗碱对照品 (批号:110713-200208,中国食品药品检定研究院);秋水仙碱片 (批号:161S,昆药集团

股份有限公司);尿酸钠 (美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 BCB7559);生理盐水 (批号:2A15090928,浙江莎普爱思药业股份有限公司);小鼠 IL-2、IL-6、TNF- α 、干扰素- α (interferon- α , IFN- α) 检测试剂盒 (批号分别为 149541015、145466017、147819013、1764853017,美国 eBioscience 公司);Trizol 试剂 (批号 20150502,Invitrogen 公司);SYBRGreen PCR 试剂盒、逆转录试剂盒 (批号分别为 A5001-1, AA406-1,日本 Takara 公司);NLRP3、TLR3、TLR7、MyD88 和 NF- κ B p65 兔抗小鼠一抗 (批号分别为 B1716、J1612、B0146、D0212 和 D0313,美国 Santa Cruz 公司);GAPDH 兔抗小鼠一抗、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗、蛋白质分子量 Marker、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号分别为 00021408、00081307、00131456、23072018,北京康为世纪生物科技有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 R-4100 型酶标仪 (美国 Dynatech 公司);FA1004N 电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司);-80 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo);F6-10 手提式电动匀浆机 (德国 FLUKO 公司);ABI-7300 Real-time 检测仪 (美国 ABI 公司);D-37520 型低温离心机 (赛默飞世尔科技公司)。

1.1.3 动物 SPF 级的 C57BL/6 小鼠 60 只,雄性,体质量 (20.0 $\pm$ 3.2) g,均购自重庆医科大学实验动物中心,合格证编号:SCXK (渝 2012-0001)。

1.2 方法

1.2.1 造模与给药 C57BL/6 小鼠 60 只,每组 10 只,随机分为 6 组:正常对照组、模型组、秋水仙碱组,以及小檗碱高、中、低剂量组。根据文献及预实验,确定小檗碱高、中、低剂量分别为 150、100 及 50 mg/kg,秋水仙碱剂量为 0.65 mg/kg^[14-15]。适应性饲养 1 周后,以 Coderre 等^[16]和 Reber 等^[17]经典造模方法为参考,将尿酸钠配制成 100 mg/mL,采用灭菌注射器沿小鼠右踝关节背侧注入 0.025 mL 尿酸钠溶液至踝关节腔内,以对侧鼓起为注入标准,诱导小鼠急性痛风性关节炎模型 (除正常组注射等体积的生理盐水外)。造模后灌胃给药相应的药物,其中正常组与模型组分别给予相同体积的水。按小檗碱高、中、低剂量配制小檗碱浓度分别为 7.5、5、2.5 mg/mL,灌胃剂量为 0.4 mL/20 g,灌胃 7 d,于末次给药后 1 h 眼眶静脉丛采血,麻醉处死,以踝关节为中心取长度为 0.5 cm 的组织为测定样本。

1.2.2 踝关节肿胀度测定^[3] 在小鼠踝关节上方 0.8 cm 处标示测量线,采用简易自制足容积装置测量小鼠足踝关节容积,测定各组小鼠在造模前和造模后每天试验足的足踝关节容积,计算踝关节肿胀度 (%)。肿胀度=(测定时间点足容积-初始足容积)/初始足容积 $\times$ 100%。

1.2.3 病理切片观察 收集小鼠踝关节滑膜组织,4 °C 生理盐水洗净,滤纸将其表面水分吸干,然后将其立即投入 10% 的福尔马林溶液中固定,1 周后,乙醇脱水,二甲苯透化,石

蜡包埋,常规切片(厚度 4 μm),HE 染色,光学显微镜观察小鼠踝关节滑膜组织的病理变化。

1.2.4 炎症因子含量测定 末次给药 1 h 后,眼眶静脉丛采血,以 3 000 r/min 低温离心 15 min,取上清液,按 ELISA 试剂盒说明书测定各组小鼠血清 IL-2、IL-6、TNF- α 、IFN- α 等炎症因子表达水平。

1.2.5 关节滑膜组织中 NLRP3/TLRs 信号通路关键基因的测定 剔除小鼠试验踝关节皮毛及肌肉组织等,匀浆机将关节腔与滑膜迅速匀浆,先按 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,测定总 RNA 浓度和光密度(optical density, OD)值, $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 时符合实验要求。逆转录试剂盒逆转录各 RNA 样本为 cDNA。将上述 cDNA 进行 PCR 扩增,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 45 s,共 40 个循环。*GAPDH* 作为内参基因,在 Real-time PCR 检测仪上检测 *NLRP3*、*TLR3*、*TLR7*、*MyD88* 及 *NF- κB p65* 基因表达。经仪器分析得出各个样品量的 C_t 值,所有样品基因均经过内参 *GAPDH* 的均一化处理,然后用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 的相对表达量, $\Delta\Delta C_t$ 计算公式如下: $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{ 目的基因}} - C_{t\text{ 内参}})_{\text{实验组}} - (C_{t\text{ 目的基因}} - C_{t\text{ 内参}})_{\text{正常对照组}}$ 。各引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,各引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列	长度
<i>NLRP3</i>	上游 5'-CTCGCATTGGTTCGAGCTCA-3'	153 bp
	下游 5'-AGTAAGGCCGGAATTCACCA-3'	
<i>TLR3</i>	上游 5'-AAAGGGTGTTCCTCTTATC-3'	212 bp
	下游 5'-AAGTTGGTAGGTGCTAATC-3'	
<i>TLR7</i>	上游 5'-GCATCCTCTGTTCTTCTGG-3'	109 bp
	下游 5'-GGTGAAGTTGGCTTCTGCTC-3'	
<i>MyD88</i>	上游 5'-AAGCGCATGAAGAAGAC-3'	235 bp
	下游 5'-CATTGAACACGGGTGAG-3'	
<i>NF-κB p65</i>	上游 5'-GCACAGATACCACCAAGAC-3'	155 bp
	下游 5'-AGCCTCATAGTAGCCATCC-3'	
<i>GAPDH</i>	上游 5'-GTGACACCCACTCTCCACC-3'	162 bp
	下游 5'-GTGGTCCAGGAGGCTCTTAC-3'	

1.2.6 关节滑膜组织中 NLRP3/TLRs 信号通路关键蛋白的测定 剔除小鼠试验踝关节皮毛及肌肉组织等,匀浆机将关节腔与滑膜迅速匀浆,然后按照 1:10(g/mL)的比例加入 RIPA 裂解液,按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定各滑膜组织的总蛋白含量,以确保每组样本之间的上样量相同。裂解、提取各组小鼠肺组织蛋白后,经 SDS-PAGE 电泳分离,转至硝酸纤维素膜,将转好的 PVDF 膜于 5% 脱脂奶粉溶液中室温封闭 2 h, TBST 洗涤液漂洗 3、4 次。加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。再漂洗 3、4 次,加入 HRP 标记的二抗体,室温孵育 2 h,漂洗 3、4 次。化学发光检测底物 ECL 工作液显色,采用 Image J 图像分

析系统对蛋白显影图进行灰度分析,分别考察各组小鼠踝关节滑膜组织中 NLRP3、TLR3、TLR7、MyD88 及 NF- κB p65 的蛋白表达水平。

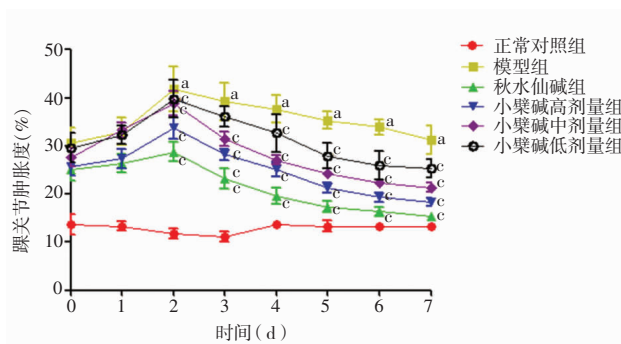
1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件处理数据,ELISA 数据分析采用 ELISA Calc 回归/拟合计算软件处理,结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;组间比较采用单因素方差分析,多组均数之间两两比较使用 LSD- t 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 踝关节肿胀度

与正常对照组比较,各组在造模后踝关节容积肿胀度明显高于正常对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),提示造模成功^[9]。与模型组相比,造模后各组后踝关节容积肿胀度与模型组相近,差异无统计学意义。灌胃 7 d 后,小檗碱高、中、低剂量组 [(18.35 $\pm$ 0.94)%、(21.35 $\pm$ 0.96)%、(25.35 $\pm$ 1.98)%] 及秋水仙碱组 [(15.35 $\pm$ 0.74)%] 与模型组肿胀度 [(31.34 $\pm$ 0.98)%] 比较,差异具有统计学意义 ($F=11.240$, $P=0.005$),且高剂量组肿胀度最低。结果如图 1 所示。



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

图 1 小檗碱对小鼠踝关节肿胀度的影响

2.2 对关节滑膜组织病理的影响

正常对照组滑膜组织细胞结构完整光滑,仅极少量炎症细胞浸润周边组织。模型组滑膜组织增生,有大量炎症细胞浸润,并伴有水肿等病变情况。秋水仙碱组滑膜上皮细胞与正常对照组近似,未见滑膜细胞增生,有一定量炎症细胞浸润组织。小檗碱高、中、低组有炎症细胞浸润踝关节腔滑膜和周边组织,各剂量炎症细胞浸润及水肿现象具有一定程度减轻,如图 2 所示。

2.3 炎症因子

治疗 7 d 后,与正常对照组比较,模型组血清中 IL-2、IL-6、TNF- α 及 IFN- α 表达水平分别为 (38.14 $\pm$ 2.58) ng/L、(124.37 $\pm$ 11.59) ng/L、(156.81 $\pm$ 10.98) ng/L、(17.21 $\pm$ 0.93) ng/L,均明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,秋水仙碱组,小檗碱

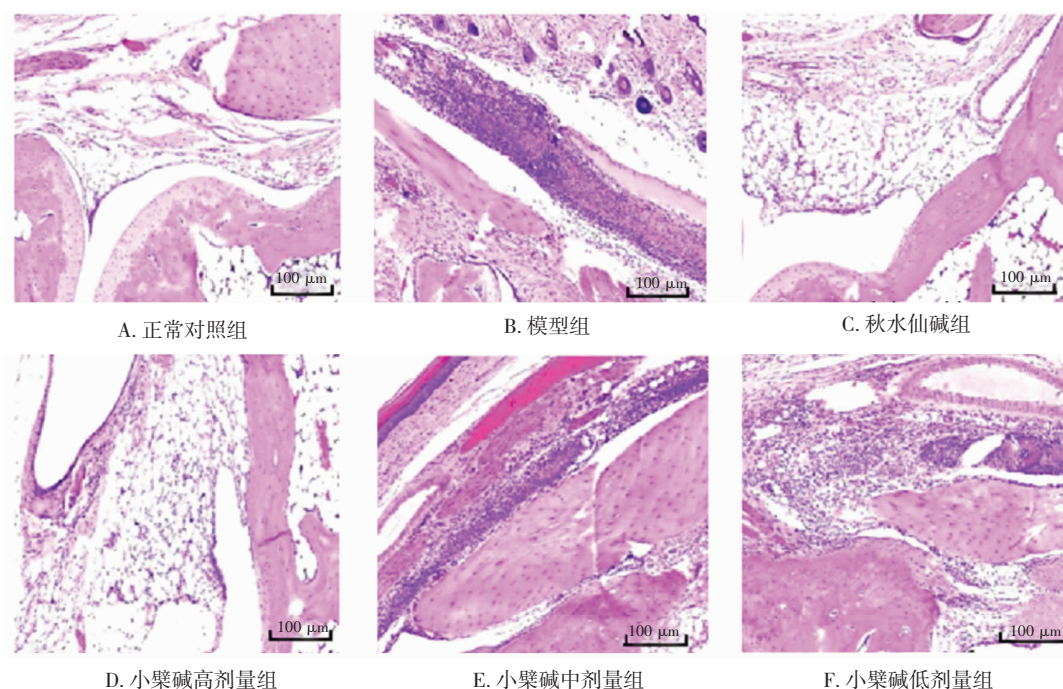


图 2 小檗碱对踝关节滑膜组织的病理影响 (200 ×)

表 2 小檗碱对炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	IL-2 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)	IFN- α (ng/L)
正常对照组	—	26.46 $\pm$ 2.79	97.25 $\pm$ 4.12	119.58 $\pm$ 6.48	9.84 $\pm$ 0.91
模型组	—	38.14 $\pm$ 2.58 ^a	124.37 $\pm$ 11.59 ^a	156.81 $\pm$ 10.98 ^a	17.21 $\pm$ 0.93 ^a
秋水仙碱组	0.65	29.26 $\pm$ 1.95 ^c	105.24 $\pm$ 5.67 ^c	125.09 $\pm$ 8.33 ^c	10.92 $\pm$ 1.02 ^c
小檗碱高剂量组	150	31.78 $\pm$ 2.07 ^c	111.25 $\pm$ 6.59 ^c	129.35 $\pm$ 6.94 ^c	12.32 $\pm$ 0.63 ^c
小檗碱中剂量组	100	33.48 $\pm$ 1.57 ^c	118.68 $\pm$ 5.37 ^c	132.63 $\pm$ 10.27 ^c	14.02 $\pm$ 0.82 ^c
小檗碱低剂量组	50	35.83 $\pm$ 1.98 ^c	120.94 $\pm$ 8.32 ^c	142.39 $\pm$ 11.65 ^c	15.94 $\pm$ 1.26 ^b
F 值	—	5.686	10.373	15.244	4.521
P 值	—	0.005	0.009	0.002	0.020

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

高、中、低剂量组 IL-2、IL-6、TNF- α 及 IFN- α 含量明显下降 (IL-2: $t=4.284, P=0.005$; IL-6: $t=5.216, P=0.009$; TNF- α : $t=4.391, P=0.002$; IFN- α : $t=2.357, P=0.020$), 且高剂量组含量降低程度高于中、低剂量组 ($P<0.05$)。见表 2。

2.4 蛋白质与基因

与正常对照组比较,各组的 NLRP3、TLR3、TLR7、MyD88 及 NF- κ B p65 蛋白与 mRNA 表达量均升高。与模型组相比,小檗碱各组和秋水仙碱组 NLRP3、TLR3、TLR7、MyD88 及 NF- κ B p65 蛋白与 mRNA 表达量均降低 (蛋白: $t_{\text{NLRP3}}=5.015, t_{\text{TLR3}}=3.523, t_{\text{TLR7}}=2.195, t_{\text{MyD88}}=1.438, t_{\text{NF-}\kappa\text{B p65}}=3.268$, 均 $P<0.05$; 基因: $t_{\text{NLRP3}}=5.394, t_{\text{TLR3}}=1.236, t_{\text{TLR7}}=2.317, t_{\text{MyD88}}=4.951, t_{\text{NF-}\kappa\text{B p65}}=4.428$, 均 $P<0.05$), 其中小檗碱各组表达量高于秋水仙碱组,且小檗碱高剂量组与秋水仙碱组相近,结果见图 3、图 4 和表 3。

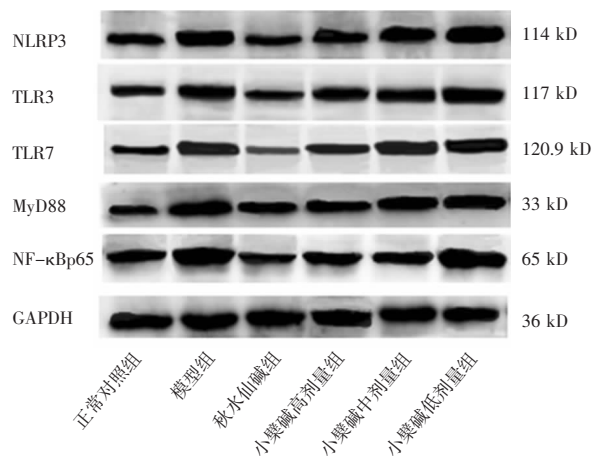


图 3 小檗碱对痛风性关节炎小鼠滑膜组织中 NLRP3 及 TLRs 信号通路相关蛋白表达的影响

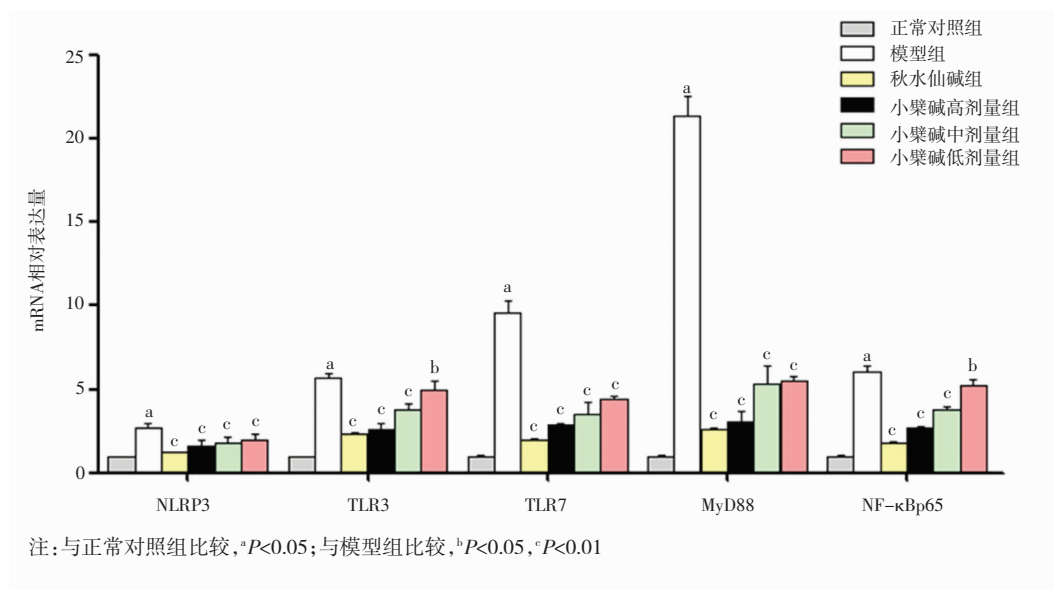


图 4 小檗碱对痛风性关节炎小鼠滑膜组织中 NLRP3 及 TLRs 信号通路相关基因表达的影响

表 3 小檗碱对痛风性关节炎小鼠滑膜组织中 NLRP3 及 TLRs 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	NLRP3/GAPDH	TLR3/GAPDH	TLR7/GAPDH	MyD88/GAPDH	NF-κB p65/GAPDH
正常对照组	0.40 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.47 ± 0.04	1.08 ± 0.05
模型组	1.58 ± 0.02 ^a	0.86 ± 0.02 ^a	0.79 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.02 ^a	2.17 ± 0.03 ^a
秋水仙碱组	0.46 ± 0.01 ^c	0.45 ± 0.02 ^c	0.42 ± 0.04 ^c	0.58 ± 0.01 ^c	1.24 ± 0.03 ^c
小檗碱高剂量组	1.08 ± 0.02 ^c	0.56 ± 0.05 ^c	0.54 ± 0.02 ^c	0.67 ± 0.06 ^c	1.48 ± 0.02 ^c
小檗碱中剂量组	1.24 ± 0.02 ^c	0.62 ± 0.02 ^c	0.63 ± 0.03 ^c	0.74 ± 0.03 ^c	1.57 ± 0.05 ^c
小檗碱低剂量组	1.45 ± 0.03 ^a	0.71 ± 0.06 ^c	0.74 ± 0.05 ^b	0.79 ± 0.06 ^c	1.73 ± 0.07 ^b
F 值	1.241	0.582	0.273	0.687	1.350
P 值	0.004	0.006	0.008	0.002	0.009

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

3 讨论

痛风性关节炎的特征包括高尿酸血症、关节内尿酸盐晶体(monosodium urate, MSU)沉积及炎症反应^[3]。临床治疗首选秋水仙碱^[16]。因此,本研究采用尿酸盐溶液注射诱导小鼠关节炎经典模型,并以秋水仙碱为阳性对照组^[17-18]。各组踝关节肿胀度结果显示,该模型构建良好,可用于本实验^[3]。

研究证实炎性体^[17-18]及 TLRs 信号通路^[19-20]均在痛风性关节炎中发挥重要作用。其中,NLRP3 是一类胞质型模式识别受体,可明显抑制敲除 NLRP3 小鼠在 MSU 晶体刺激后 IL-1β 的成熟和释放^[3];TLRs 为模式识别受体之一,机体受炎性损伤时,会激活 TLRs 信号通路,使 TLR 相关受体(TLR3、TLR4、TLR7 等)与 MyD88 结合,激活下游信号,进一步使转录因

子 NF-κB 活化、表达增加发生核转位 TLRs^[21]。报道显示,TLRs 信号通路可调控尿酸钠结晶引起的急性炎症^[20]。同时,两者均属于固有免疫的模式识别受体,可促发天然免疫,调控 IL-6、TNF-α、IFN-α 等重要炎症因子,抑制炎症反应^[22-23]。还有报道表明,IL-6、TNF-α、IFN-α 等炎症因子可准确反映痛风性关节炎患者的炎症反应状态^[19]。

本研究以黄连中提取的小檗碱为研究对象,考察其对小鼠痛风性关节炎的治疗作用。结果显示,造模后各组踝关节容积肿胀度明显高于正常对照组;造模后小檗碱高、中、低剂量组小鼠踝关节容积肿胀度与模型组相近。治疗 7 d 后,小檗碱高、中、低剂量组及秋水仙碱组与模型组肿胀度有明显差异,且小檗碱高剂量组肿胀度最低。同时,由病理切片可观察到,小檗碱治疗后,小鼠踝关节滑膜组织中炎性细胞浸润及水肿现象减轻。同时,治疗 7 d 后,

模型组血清中 IL-2、IL-6、TNF- α 及 IFN- α 表达水平均明显高于正常对照组。与模型组比较,秋水仙碱组,小檗碱高、中、低剂量组 IL-2、IL-6、TNF- α 及 IFN- α 含量明显下降,且高剂量组含量降低程度高于中、低剂量组。基于此,进一步考察小檗碱对小鼠痛风性关节炎模型中 NLRP3/TLRs 信号通路的调控作用。结果显示,与模型组相比,小檗碱各组和秋水仙碱组中 NLRP3、TLR3、TLR7、MyD88 及 NF- κ B p65 蛋白与 mRNA 表达量均降低;其中小檗碱各组表达量高于秋水仙碱组,且小檗碱高剂量组与秋水仙碱组相近。因此,本研究提示小檗碱可通过下调 NLRP3/TLRs 信号通路抑制炎症因子的表达,从而缓解小鼠痛风性关节炎的炎症反应,治疗痛风性关节炎。

研究显示,小檗碱可通过 NLRP3 炎性小体调控 mRNA、NLRP3 和 IL-1 蛋白表达,缓解 THP-1 细胞内尿酸盐晶体所致炎症^[24]。本研究进一步探讨小檗碱对小鼠痛风性关节炎的治疗作用,并同时从 NLRP3/TLRs 信号通路考察其作用机制,从动物、分子及蛋白等水平,证实了小檗碱可通过调控 NLRP3/TLRs 信号通路干预痛风性关节炎,为深入探究小檗碱治疗痛风性关节炎的药效与机制提供研究基础。

参 考 文 献

- [1] Chowalloor PV, Keen HI. A systematic review of ultrasonography in gout and asymptomatic hyperuricaemia[J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72(5): 638-645.
- [2] 叶仁群, 林国彬, 宋晓容, 等. 清热利湿活血法对急性痛风性关节炎患者 IL-6 和 TNF- α 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(4): 845-847.
- [3] 金晓敏, 张晓熙, 郭璐, 等. 基于 NLRP3 炎性体轴探讨土茯苓总黄酮对痛风性关节炎的作用和机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 90-95.
- [4] 豆树珍. 原发性痛风中医证候相关性的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [5] Ponce L, Arjona M, Blanco G, et al. The effect of montelukast in a model of gouty arthritis induced by sodium monourate crystals[J]. Invest Clin, 2011, 52(1): 15-22.
- [6] Landis RC, Haskard DO. Pathogenesis of crystal-induced inflammation[J]. Curr Rheumatol Rep, 2001, 3(1): 36-41.
- [7] 茹意, 郑淇, 蒯仇, 等. 中医药治疗痛风性关节炎的机制研究近况[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(6): 1428-1430.
- [8] 张玉梅, 王芸. 痛风发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(15): 2441-2444.
- [9] 朱春霞, 顾祖莲, 杨博, 等. 虎杖苷-桂皮醛对 MSU 诱导的 THP-1 细胞痛风性关节炎模型的影响及机制[J]. 中药材, 2017, 40(7): 1710-1713.
- [10] 陈刚, 殷钟意, 郑旭煦. 丹皮酚改善大鼠痛风性关节炎与调节核因子 κ B 活化的关系研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(12): 1730-1735.
- [11] 王红艳. 基于 TLR/MyD88/NF- κ B 通路探讨萆薢除痹汤对痛风性关节炎大鼠的分子作用机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [12] 卢国, 郑东森, 李瀚文, 等. NLRP3 和 TLR4 调控的细胞焦亡在痛风性关节炎中的作用[J]. 药学研究, 2017, 36(5): 292-294, 304.
- [13] 贾燕珺, 李建军. 小檗碱的抗动脉粥样硬化作用及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 364-368.
- [14] Wang X, He X, Zhang CF, et al. Anti-arthritis effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 887-893.
- [15] Yue M, Xia Y, Shi C, et al. Berberine ameliorates collagen-induced arthritis in rats by suppressing Th17 cell responses via inducing cortistatin in the gut[J]. FEBS, 2017, 284(17): 2786-2801.
- [16] Coderre TJ, Wall PD. 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): 461-465.
- [17] Reber LL, Marichal T, Sokolove J, et al. Contribution of mast cell-derived interleukin-1 β to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice[J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(10): 2881-2891.
- [18] 滕方舟, 蔡唐彦, 郭洁梅, 等. 痛风宁对急性痛风性关节炎模型大鼠 IL-1 β , TNF- α 及 NALP3 炎性体的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 120-125.
- [19] 刘静, 谢克琴, 曹跃鹏, 等. 急性痛风性关节炎患者 TLRs/MyD88 的表达及其与中医证型关系的初探[J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7(3): 23-27, 53.
- [20] Martinon F. Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation[J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 218-232.
- [21] Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity[J]. J Mol Biol, 2014, 426(6): 1246-1264.
- [22] 刘双, 李纾. 模式识别受体和病原体相关分子模式及其在牙周病防御中的作用[J]. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(2): 212-215.
- [23] Alvarez K, Vasquez G. Damage-associated molecular patterns and their role as initiators of inflammatory and auto-immune signals in systemic lupus erythematosus[J]. Int Rev Immunol, 2017, 36(5): 259-270.
- [24] Liu YF, Wen CY, Chen Z, et al. Effects of Berberine on NLRP3 and IL-1 β expressions in monocytic THP-1 cells with monosodium urate crystals-induced inflammation[J]. Biomed Res Int, 2016, 2010(6): 2503703.

(责任编辑: 冉明会)