

甘斌,李华南,李松,等. 基于脂代谢和炎症反应探讨两种湿热证痛风性关节炎大鼠模型的构建 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 26-33.

Gan B, Li HN, Li S, et al. Establishment of two rat models of gouty arthritis with damp-heat syndrome based on lipid metabolism and proinflammatory factors [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 26-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.004

基于脂代谢和炎症反应探讨两种湿热证痛风性关节炎大鼠模型的构建

甘 斌¹, 李华南^{2*}, 李 松¹, 章晓云¹, 陈 宇³, 顾 兵³, 张云开¹, 刘永乾¹, 邵子晨¹

(1.江西中医药大学临床医学院,南昌 330004;2.江西中医药大学附属医院,南昌 330006;
3.江西科技师范大学生命科学学院,南昌 330013)

【摘要】 目的 比较两种不同湿热证 GA 大鼠模型在脂代谢和炎症反应的差异,以探索安全、稳定、可重复性高的湿热证 GA 模型。**方法** 44 只 SD 大鼠随机分为正常对照组($n=10$)、GA 对照组($n=10$)、模型组 A($n=12$)和模型组 B($n=12$)。观察造模期间各组大鼠一般情况及死亡率;周长法测定踝关节肿胀度;酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清脂代谢(TG、TC、LDL-C、HDL-C)和炎症因子(NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6)。**结果** 模型组 A 死亡率 8.3%(1/12),模型组 B 死亡率 25%(3/12);与正常对照组和 GA 对照组比较,模型组 A 和模型组 B 血清 TG、TC 和 LDL-C 表达显著升高($P<0.01$),而 HDL-C 表达显著降低($P<0.01$);与模型组 A 相比,模型组 B 的 TG 和 HDL-C 趋势有所升高,TC 和 LDL-C 趋势降低,但无统计学意义($P>0.05$)。与正常对照组比较,GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 的 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达显著升高($P<0.01$);与 GA 对照组比较,模型组 A 的 NF- κ B 和 TNF- α 表达有所升高($P<0.05$),模型组 B 的 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达有所升高($P<0.05$);与模型组 A 比较,模型组 B 的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达有所升高($P<0.05$)。**结论** 两种方式均可成功诱导湿热证 GA 病证结合模型。二者既有共性也有各自特点,高脂高糖饮食是脂代谢紊乱的直接影响因素,生物因子较单纯的高温高湿环境对大鼠炎症影响更明显。

【关键词】 痛风性关节炎;湿热证;脂代谢;炎症因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0026-08

Establishment of two rat models of gouty arthritis with damp-heat syndrome based on lipid metabolism and proinflammatory factors

GAN Bin¹, LI Huanan^{2*}, LI Song¹, ZHANG Xiaoyun¹, CHEN Yu³, GU Bing³, ZHANG Yunkai¹,
LIU Yongqian¹, SHAO Zichen¹

(1. Clinical Medicine College of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006. 3. College of Life Sciences, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013)

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81860857,82060871);江西省自然科学基金(20202BAB206071);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190582);江西省第二届国医名师邓运明名医工作室(赣中医药综合[2021]12号);江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目(JZYC20S26)。

【作者简介】 甘斌(1994—),男,硕士研究生,研究方向:中医药在痛风的基础研究。E-mail:ganbin134@163.com

【通信作者】 李华南(1974—),女,博士,主任,博士生导师,研究方向:痛风的现代中医药诊治。E-mail:lihuanan1974@126.com

【Abstract】 Objective To explore a safe, stable and repeatable model of gouty arthritis (GA) with damp-heat syndrome by comparing changes in lipid metabolism and proinflammatory factors between two rat models of GA with damp-heat. **Methods** Overall, 44 male SD rats were randomly divided into a control group ($n=10$), GA group ($n=10$), model group A ($n=12$) and model group B ($n=12$). The specific method was provided in full text, and the experimental period lasted for 21 days. The general condition of rats in each group was observed during the modeling period and the mortality rate was assessed after modeling. Ankle swelling was measured by the circumference method. Serum contents of lipid metabolism factors (TG, TC, LDL-C and HDL-C) and proinflammatory factors (NF- κ B, IL-1 β , TNF- α and IL-6) were determined by ELISA. **Results** The mortality rate was 8.3% (1/12) in model group A and 25% (3/12) in model group B. Compared with control and GA groups, the serum TG, TC, and LDL-C were significantly higher in the model group A and B ($P<0.01$), while HDL-C was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model group A, TG and HDL-C were increased in the model group B, while TC and LDL-C were decreased, but without statistical significance ($P>0.05$). Compared with the control group, serum NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly higher in the GA group, and model group A and B ($P<0.01$). Compared with the GA group, NF- κ B and TNF- α were increased in the model group A ($P<0.05$), and NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were increased in model group B ($P<0.05$). Compared with model group A, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were increased in model group B ($P<0.05$). **Conclusions** Both approaches successfully induced a combined model of GA with damp-heat syndrome. Both of them had commonalities and individualities. The high fat and sugar diet was a directly influencing factor for lipid metabolism disorder. Biological factors had more obvious effects on inflammation in rats than a high temperature and humidity environment.

【Keywords】 gouty arthritis; damp-heat syndrome; lipid metabolism; proinflammatory factors

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

痛风性关节炎(gouty arthritis,GA)是最常见的由晶体诱发的自身炎症性疾病之一,其特征是单钠尿酸盐(monosodium urate,MSU)晶体沉积于关节和(或)非关节结构中诱发^[1]。全球患病率在 1%~4%之间^[2]。随着国民经济提高和饮食习惯的改变,我国 GA 的患病率呈显著上升趋势,患病率数据显示已达 1136.24/100 000^[3],且愈趋于年轻化^[4]。一般来说,根据机体对 MSU 晶体炎症反应的临床表现可分为四期^[5]:持续性高尿酸血症期、剧烈疼痛的急性炎症性关节期(GA 发作期)、无痛无症状期(临界期)以及 MSU 晶体引起的持续性炎症期(慢性 GA)和痛风石(Tophi)期,其中 GA 发作期在临床中最为常见^[6]。

古代医学认为病之总者为病,而一病总有数证。94 版《中医病症诊断疗效标准》^[7]根据 GA 阶段性本质的症状集合将其概括为四证:湿热蕴结证、痰浊阻滞证、瘀热阻滞证、肝肾阴虚证。本课题组临床观察发现湿热证 GA 占比 73.14%^[8],这可能与江西人体质多属湿热质相关。江西省位于北回归线附近,属长江中下游地区,地形南高北低,雨量偏多,日照充足,为亚热带湿润气候;此外江西人饮食重油重辣,多食油脂等厚味之品,长此已久,故江西人体质偏湿热质。既往湿热内伏伤邪理论在临床学术研究中占首要,余邪伏于里遇诱因(外邪)而发-外邪入里、内湿为合,这也是湿热证最基础的

病机^[9]。

目前西医临床一线治疗急性期 GA 主要口服皮质内固醇、非甾体抗炎药或秋水仙碱等对症治疗^[5],这些药物可迅速控制疼痛并抑制炎症,但使用时普遍受肾功能不全和心血管等诸多合并症的限制^[10],此外还存在胃肠道和肾毒性等副作用。中药自古以来就用于 GA 治疗^[11],从单味中药或中药组方中分离出的部分化学成分具有多靶点、低毒等特点,在 GA 防治中展示出良好前景^[12]。动物模型是开展药物研究的重要载体,将“病”和“证”相结合构建接近人体湿热证 GA(急性发作期 GA)病证结合动物模型更是深入研究湿热证参与 GA 急性发作的病理生理机制及中药药效评价的基础^[13]。尽管单独的“湿热证”模型和“GA”模型造模方式繁多,但尚无公认合理成熟的湿热证 GA 病证结合动物模型造模方法。基于此,本实验以雄性 SD 大鼠为造模对象,从脂代谢和炎症反应出发探讨两种不同湿热证 GA 病证结合模型造模差异,以期筛选稳定且具备可重复性的湿热证 GA 病证结合大鼠模型提供客观数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 44 只,6 周龄,体重

180~200 g,由江西中医药大学实验动物科学技术中心提供[SCXK(赣)2018-0001],饲养于江西中医药大学实验动物科学技术中心[SYXK(赣)2017-0004]。实验过程通过了江西中医药大学实验动物伦理委员会审查(JZSYDWLL-20200901),并严格遵循实验动物 3R 原则。于江西中医药大学动物中心无特定病原体级屏障系统内采用昼夜间断 12 h/12 h 照明方式饲养,温度(23 ± 2)℃,相对湿度(55 ± 3)%。所有大鼠均由江西中医药大学实验动物科学技术中心的工作人员检疫并适应性饲养 1 周后开始造模。适应性饲养期间大鼠自由饮水、进食,同时每 3 d 更换高温灭菌后的玉米芯垫料。

1.2 主要试剂与仪器

正常普通基础饲料:成分为玉米 30%,小麦 25.5%,豆粕 20%,酪蛋白 10%,鱼粉 5%,蜜糖酵母 2.5%,油 2.5%,磷酸氢钙 2%,生长预混料 1%,石粉 1%,食盐 0.3%,氯化胆碱 0.2%;高脂高糖饲料:在上述正常普通基础饲料基础上添加糖、黄油和鱼粉,具体成分为 58.9%普通基础饲料、黄油 15%,绵糖 15%、蛋黄粉 5%,鱼粉 5%,胆固醇 1%,猪胆盐 0.1%。

TG、TC、LDL-C、HDL-C(批号分别为:20210118、20210115、20210118、20210304,南京建成生物工程研究所);NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6(批号分别为:YX-201406R、YX-091203R、YX-201407R、YX-091206R,上海赫澎生物科技有限公司);红星二锅头白酒(批号:20160424,北京红星股份有限公司);冠生园蜂蜜(批号:GB14963,上海冠生园蜂制品有限公司);鼠伤寒沙门菌(批号:ATCC14028,美国菌株保藏中心);戊巴比妥钠(批号:SIGMA-P3761,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

人工气候箱(批号:MGC-350-HP-2,上海一恒科学仪器有限公司);全波长多功能酶标仪(批号:3001-1950,美国 Thermo 公司);高速冷冻离心机(批号:C2500-RC,美国 Labnet 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 MSU 混悬液的配置

向关节腔内注射 MSU 混悬液是湿热证 GA 病证结合模型中“GA”模型诱导的关键。按照黄火高^[14]的方法并结合 MSU 晶体在不同 pH 值环境下的形态改变^[15]对其配制方法进行改良,具体步骤如下:将 4.5 mL NaOH 溶液(浓度:0.5 mol/L)加入 400 mL 超纯水中,加入 2 g 尿酸,用磁力搅拌器缓慢

加热并不断搅拌,直至尿酸完全溶解。随后将温度保持在 60℃用 1 mol/L 的 HCl 溶液调 pH=7.2,室温冷却后置于 4℃冰箱过夜冷藏,隔日滤去上清,盛入蒸发皿中经水浴锅干燥,干燥后用碾钵碾成细末并通过 250 μ m 孔径金属网筛过筛,经高温高压灭菌后用无菌 EP 管收集。以无菌生理盐水配成浓度 20 mg/mL MSU 混悬液,使用前置于高压灭菌锅内灭菌 30 min,现配现用。

1.3.2 实验分组及干预

健康 SD 雄性大鼠 44 只,经由江西中医药大学实验动物科学技术中心的工作人员检疫并适应性喂养 1 周后按随机数字表法分为 4 组:正常对照组、GA 对照组、模型组 A、模型组 B。除正常对照组和 GA 对照组 10 只外其余各组每组 12 只(根据预实验中大鼠死亡率评估增加 20%)。

正常对照组:在屏障实验室恒温恒湿环境内普通饲料喂养,自由饮水 21 d。

GA 对照组:喂养方式同正常对照组,第 18 天以大鼠踝关节外侧两骨突出为注射定位点,将抽取了 MSU 混悬液注射器配 6 号注射器针头,针头斜面朝关节腔沿胫骨前肌内侧向下插至关节腔,有落空感时停止进针且回抽无血后注入 50 μ L MSU 溶液(浓度:20 mg/mL)以对侧关节囊鼓起为注入标准,诱导 GA 模型。

模型组 A:第一阶段即高脂高糖和高温高湿阶段制备湿热证模型,给大鼠饲以高脂高糖饮食,并在高脂高糖饲料喂养的基础上,用 200 g/L 蜂蜜水自由饮用,且白酒 1 mL/100 g 和猪脂 1.5 mL/100 g 交替灌服,共持续 14 d。从第 8 天开始每日上午 8:00 放入人工气候箱中,温度为(32 ± 2)℃,相对湿度 95%,8 h,共持续 14 d;第二阶段制备 GA“病”模型,在第 18 天造模同 GA 对照组。通过上述复合多因素造模方式制备湿热证 GA 病症结合大鼠模型。

模型组 B:第一阶段即高脂高糖阶段联合生物因素干预制备湿热证模型,给大鼠饲以高脂高糖饮食,并在高脂高糖饲料喂养的基础上,加用 200 g/L 蜂蜜水自由饮用,且白酒 1 mL/100 g 和猪脂 1.5 mL/100 g 交替灌服,共持续 14 d。于第 10 天灌服鼠伤寒沙门氏菌液(10 mL/kg,每毫升 10^9 个),第 15 天加强一次(5 mL/kg);第二阶段制备 GA“病”模型,在第 18 天造模同 GA 对照组。通过上述复合多因素造模方式制备湿热证 GA 病症结合大鼠模型。

1.3.3 观测指标

(1) 一般情况观测及统计造模后各组死亡率

确定以第 1、8、15、21 天同一时刻对大鼠表征进行观察,包括:①精神状态;②饮食饮水;③毛色;④大小便等情况;最后造模结束统计大鼠死亡率。

(2) 踝关节肿胀的测定

周长法:使用缚线测量注射 MSU 混悬液前 0 h 及造模后 4、8、12、24、48 及 72 h 后大鼠踝关节划线部位的周长。以造模前后周长的差值作为肿胀度变化,即肿胀度=造模后周长-造模前周长。

(3) 大鼠步态分析

①步态改变分级:在造模后,请 1 名骨科医生(不知分组情况)观察大鼠步态的改变并按步态分级标准计分:正常步态为 0 级;轻度跛行,右足稍呈弯曲态行走为 1 级;中度跛行,右足弯曲明显,轻挨地面行走为 2 级;重度跛行,右足脱离接触面甚至三足步态行走为 3 级。

②炎症指数评分标准:正常为 0 级,记作 1 分;关节皮肤出现红斑,轻度肿胀,骨性标志可见为 I 级,记作 2 分;肿胀皮肤出现褶皱,骨性标志消失,但肿胀未跨出关节部位为 II 级,记作 3 分;关节皮肤呈暗红且关节以外肢体也出现肿胀为 III 级,记作 4 分。

(4) 血清制备,脂代谢指标和炎症因子检测

造模后第 21 天,各组大鼠禁食不禁水 12 h,3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后腹主动脉采血,将采血管略倾斜静置 2 h,3000 r/min × 15 min 离心,收集上层血清于-80℃中保存。严格按照 ELISA 试剂盒检测血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C、IL-1β、IL-6、TNF-α、NF-κB 的表达情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析,采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用单因素方差分析对各组间统计数据进行比较。组间多重比较,若满足方差齐性采用 LSD 法检验,反之则采用 Dunnett's T_3 检验;以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示具有极显著统计学差异。采用 Graphpad Prism 8.0.2 软件绘图。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

正常对照组:喂养期间精神状态好,活动正常,毛色柔顺亮泽,双目炯炯有神,体重增加平稳,饮食、大小便均正常;GA 对照组:由于前期未参与高

糖高脂饲料和湿热证阶段造模,故表征均正常,注射 MSU 后首先出现烦躁不安并用舌头舔舐右足,右后肢弯曲明显,轻挨地面行走甚至抬离地面,随后精神萎靡,蜷缩在角落;模型组 A 和模型组 B:大鼠逐渐出现活动力减弱,毛发粗糙疏松、毛色暗淡,前 7 d 体重逐渐增加随后增势缓慢且饮食减少尤其在放入人工气候箱后大部分出现精神倦怠、嗜睡,毛发枯槁潮湿掉毛,体重及饮食均减少,大便较正常组量少甚至不成型、溏便。在第 18 天注射 MSU 后合并 GA 对照组造模症状。与模型组 A 相比,模型组 B 大鼠在灌服鼠伤寒沙门氏菌后大鼠体重不增反减,大便粪质稀溏味臭。

2.2 实验大鼠死亡及其解剖分析

纳入的 44 只大鼠,其中有 4 只(模型组 A 死亡 1 只,模型组 B 死亡 3 只)大鼠在造模过程中死亡,模型组 A 死亡率 8.3%,模型组 B 死亡率 25%。

2.3 各组大鼠踝关节肿胀度测定比较

由表 1 可见,组内比较:正常对照组在 4 h 肿胀程度达到高峰,随后肿胀程度逐渐回落,到 72 h 基本恢复,可能是由于注射生理盐水引起的非病理性肿胀,后期生理盐水被自体吸收。GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 在 4、8、12 h 肿胀程度逐渐增大,并于 12 h 达到高峰,随后肿胀程度逐渐回落。组间比较:与正常对照组比较,造模后 4、8、12、24、48、72 h,GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 的踝关节肿胀明显增大($P < 0.01$)。这与前人研究相一致^[16-17],提示造模成功。模型组 A 在不同时间点与模型组 B 比较均不具备统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠步态分级和炎症指数评分比较

由表 2 可见 GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 大鼠步态等级大部分被评为 III 级。由图 1 可见,与正常对照组比较,GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 炎症指数存在显著差异性($P < 0.01$),说明“GA”病模型复制成功。且进一步说明大鼠步态分级和炎症指数的改变主要与 MSU 注射后引发右踝关节的炎症改变相关。

2.5 各组大鼠脂代谢指标表达比较

由表 3 可知,模型组 A 和模型组 B 的 TG、TC 和 LDL-C 均高于正常对照组和 GA 对照组,HDL-C 则显著低于正常对照组和 GA 对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组 A 相比,模型组 B 的 TG 和 HDL-C 趋势有所升高,TC 和 LDL-C 趋势降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间点踝关节周长法肿胀度测量变化($\bar{x}\pm s$, mm)

Table 1 Measure the changes of ankle joint swelling degree at different time points in each group of rats based on the circumference method

组别 Groups	<i>n</i>	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组 Control group	10	0.24±0.06	0.16±0.03	0.09±0.04	0.08±0.03	0.10±0.03	0.07±0.02
GA 对照组 GA group	10	2.38±0.35**	3.47±0.88**	4.47±0.98**	3.89±0.62**	3.07±0.54**	1.96±0.43**
模型组 A Model group A	11	2.28±0.30**	3.48±0.55**	4.88±1.07**	4.28±0.88**	3.38±0.67*	2.89±0.49**#
模型组 B Model group B	9	2.22±0.41**	3.52±0.35**	5.22±0.64**	4.97±0.57**#	3.66±0.65**	2.74±0.62**#

注:与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 GA 对照组相比, # $P<0.05$ 。Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the GA group, # $P<0.05$.

表 2 注射 MSU 混悬液后各组大鼠踝关节步态分级情况

Table 2 Ankle gait classification of rats in each group after inject MSU suspension

组别 Groups	<i>n</i>	D1				D2				D3			
		0	I	II	III	0	I	II	III	0	I	II	III
正常对照组 Control group	10	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
GA 对照组 GA group	10	0	0	1	9	0	1	3	6	0	2	5	3
模型组 A Model group A	11	0	0	1	10	0	0	3	8	0	2	4	5
模型组 B Model group B	9	0	0	1	8	0	1	2	6	0	1	4	4

表 3 各组大鼠血脂代谢改变情况($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

Table 3 Changes of blood lipid metabolism in rats in each group

组别 Groups	<i>n</i>	甘油三酯 TG	总胆固醇 TC	低密度脂蛋白 LDL-C	高密度脂蛋白 HDL-C
正常对照组 Control group	10	0.71±0.21	1.81±0.33	0.48±0.16	1.10±0.48
GA 对照组 GA group	10	0.92±0.20	1.93±0.29	0.53±0.27	1.06±0.50
模型组 A Model group A	11	2.13±0.18***	2.62±0.55**#	0.98±0.31***	0.38±0.28***
模型组 B Model group B	9	2.30±0.34***	2.49±0.36*#	0.78±0.12*	0.41±0.33***

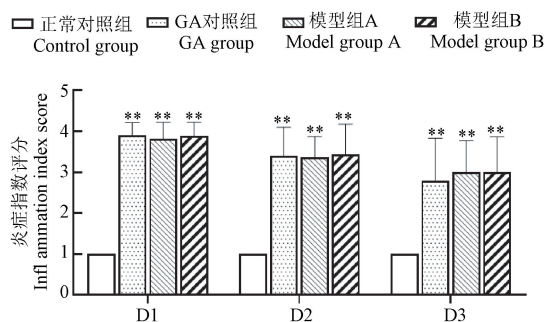
注:与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 GA 对照组相比, # $P<0.05$, *** $P<0.01$ 。Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the GA group, # $P<0.05$, *** $P<0.01$.注:与正常对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠注射 MSU 混悬液后关节炎症指数评分柱状图

Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 1 The score of ankle joint inflammation index in each group after inject MSU suspension

2.6 各组大鼠免疫炎症因子表达比较

由表 4 可知,与正常对照组相比,GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 的 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均显著升高($P<0.01$),这提示模型复制成功。与 GA 对照组相比,模型组 A 的 NF- κ B 和 TNF- α 水平有所升高($P<0.05$),模型组 B 的 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平有所升高($P<0.05$),这提示两种病证结合模型造模方式或可刺激机体产生慢性炎症反应。与模型组 A 相比,模型组 B 的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平有所升高($P<0.05$),这或许可以作为两种病证结合模型炎症反应量化指标。

表 4 各组大鼠 NF-κB、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 改变情况($\bar{x} \pm s$, pg/mL)
Table 4 The level of NF-κB, IL-1β, IL-6, TNF-α in rats of each group

组别 Groups	n	核因子-κB NF-κB	白细胞介素 1β IL-1β	白细胞介素-6 IL-6	肿瘤坏死因子-α TNF-α
正常对照组 Control group	10	391.69±22.99	46.13±10.68	32.76±5.81	4.86±1.26
GA 对照组 GA group	10	680.10±29.07**	361.50±8.58**	143.1±10.67**	58.81±6.53**
模型组 A Model group A	11	738.74±49.33**#	366.70±12.48**	146.5±11.09**	64.78±5.93**#
模型组 B Model group B	9	741.15±52.59**#	430.00±12.50**##aa	168.9±6.61**##aa	71.26±4.44**##a

注:与正常对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 GA 对照组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与模型组 A 相比,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the GA group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the model group A, ^a $P<0.05$, ^{aa} $P<0.01$.

3 讨论

《素问·至真要大论篇》指出:“诸湿肿满,皆属于脾”^[18];《素问·阴阳应象大论篇》指出:“中央生湿……其藏为脾”^[18],可见脾与湿密切相关;清代薛生白言“湿热乃阳明太阴同病也”,以上均说明湿热证病位多责之于脾胃^[19]。湿热证病程多缠绵反复,系饮食内伤致脾失健运,水液运化机能失职,导致水液留滞、内湿内生,复感外邪,内外相引,故病湿热^[20]。这也和《素问·奇病论篇》中:“甘者,肥美之所发”,指出甘为湿之应,常食膏粱厚味,易生湿蕴热,病因病机相吻合。总结以上对湿热证病因病机的论述,在本实验中模型组 A 和模型组 B 均通过自由饮用蜂蜜水,猪脂、白酒隔日灌服 14 d,以损其脾胃,复刻脾失健运,水液运化失职,导致内湿自生。模型组 A 给予高温高湿外环境,模型组 B 通过外邪(鼠伤寒沙门氏菌)从口鼻而入,模拟中医传统病因,内外相引,故病湿热。从症状表现来看,模型组 A 和模型组 B 大鼠均出现便溏的临床表现,这提示脾胃运化机能障碍,升降失序,清浊不分。根据现有的模型评判标准,可认为模型组 A 和模型组 B 均复制身重困倦、腹胀纳呆、便溏的湿热证表现。

众所周知,高尿酸血症是 GA 最主要的危险因素,但临床研究表明,许多高尿酸血症患者不会发展为 GA,也不会形成 MSU 晶体,甚至终身无症状。另有研究表明,约 70% GA 患者虽血尿酸值正常,但临床却表现出 GA 急性发作症状。这说明只有当关节内 MSU 晶体沉积并与中性粒细胞相作用时,才会导致以中性粒细胞为首的先天免疫系统被激活,进而引发 GA 发作^[21-22]。临床上 GA 起病急骤,发作时可导致患者关节红肿、剧烈疼痛和运动障碍等症

状,通常在 7~10 d 后缓解,患者自行恢复。此外本次实验造模使用的大鼠为啮齿类动物,与灵长类不同在于其自身存在可将尿酸代谢为尿囊素的尿酸酶^[23],故非长期刺激,而只是一过性刺激难以建立以高尿酸血症为基础的 GA 动物模型^[24]。MSU 晶体作为诱发 GA 发作的关键物质,因此目前建立 GA 动物模型最经典方法便通过向关节腔内注射外源性 MSU 晶体。该造模方式不仅操作简便、模型稳定而且与临床 GA 患者急性发作症状相吻合。根据本实验结果,注射 MSU 晶体混悬液 2 h 后模型逐渐形成,12 h 后模型效果达到峰值,此后即使不做干预,红肿热痛症状亦逐渐缓解。这提示本实验 GA 模型复制与临床 GA 急性发作相符合,这也提示临床 GA 发作 12 h 内是治疗的黄金时间可极大地缓解 GA 发作症状。

湿邪为有形之邪,血脂便是其生化物质基础之一,脂代谢紊乱则表明脾失健运,导致运化水湿、分清泌浊的功能失职,为湿热证的发展创造了内在条件^[25]。吕文亮等^[26]采用“人工气候箱+肥甘饮食+鼠伤寒沙门氏菌”法建立湿热证模型可引发血循环中 LDL-C 升高而 HDL-C 降低。李华锋等^[27]和阙铁生等^[28]采用“高脂饮食+高温高湿+大肠埃希菌灌胃”法制备的温病湿热证中 TC、TG、LDL-C 水平显著增加,HDL-C 水平显著减少。由此可见脂代谢紊乱是湿热证特征之一。此外临床横断面研究表明脂代谢异常是 GA 诱发因素之一^[29]。本实验中模型组 A 和模型组 B 的 TG、TC 和 LDL-C 水平显著高于正常对照组和 GA 对照组,HDL-C 水平则显著低于正常对照组和 GA 对照组,说明两种造模方式均发生脂代谢紊乱,大鼠出现湿热证表现,且对 GA 发作有促进作用。

GA 属炎症性疾病的一种,其最大特征是 MSU 晶体沉积诱发炎症发作。先天免疫在 GA 发作的自我缓解机制中发挥重要作用,单核/巨噬细胞是先天免疫系统的重要细胞组分。MSU 晶体作为一种“危险信号”因子,在 GA 发作的启动、放大和维持中发挥重要作用,主要与 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎因子相关^[30]。这些促炎因子主要由于单核/巨噬细胞被 MSU 晶体诱导活化而产生。有生物活性的成熟 IL-1 β 被当作 GA 发作的始动因子,其可通过活化 IL-1 受体通路刺激炎症因子和趋化因子,募集大量中性粒细胞。TNF- α 可激活中性粒细胞和淋巴细胞,从而促进其他细胞因子的合成和释放,也可诱导细胞凋亡。此外 TNF- α 可刺激黏附因子的大量分泌,随后黏附因子与白细胞共同作用损伤关节细胞和关节软骨^[31],这可能与 GA 患者剧烈疼痛相关。Liu 等^[32]发现 MSU 晶体刺激单核细胞,可刺激单核细胞分泌 IL-1 β 和 TNF- α ,且呈时间依赖性。另有研究表明 IL-6 有助于诱发 GA 炎症,是激活 MSU 介导的 NLRP3 炎症体激活所必需的炎症因子^[33]。患者 IL-6 表达检测可反映 GA 病情发展变化^[34]。徐晓辰等^[35]探讨 GA 患者不同时间点血清炎症因子的变化,结果表明 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 在炎症过程中可能存在共同作用。研究报道,30 年前 David Baltimore 和 Ranjan Sen 发现一个在炎症反应过程中的关键转录因子,即 NF- κ B,其含了一个二聚体转录因子家族,对炎症反应的调控以及几乎所有生物中细胞的增殖、生化和凋亡都至关重要^[36]。MSU 晶体、促炎因子(如:IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)和脂多糖等胞外刺激均可诱导 NF- κ Bp65 转入细胞核,促进靶基因转录表达^[37]。研究表明 MSU 晶体主要通过两种途径诱导 NF- κ B 活化:(1)在大多数细胞中,其通常以 p65/p50 二聚体形式存在,p65 主要承担 NF- κ B 转录活性。MSU 晶体可能与 toll 样受体 2 和 toll 样受体 4 结合,导致 NF- κ Bp65 的核易位,最终诱导 NF- κ B 活化。(2)MSU 晶体可诱导由核苷酸结合寡聚化结构域、亮氨酸重复序列和热蛋白结构域组成的 NLRP3 炎症小体的活化,活化的 NLRP3 炎症小体可激活效应蛋白胱冬肽酶-1,最终导致成熟 IL-1 β 的产生^[38]。成熟的 IL-1 β 能够通过 IL-1 受体通路诱导 NF- κ B 的活化。以上诸多文献均证明 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 在 GA 发作中的重要作用,同时也有研究表明湿热证与炎症密切相关^[39]。本实验结果表明 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和

NF- κ B 表达呈现模型组 B>模型组 A>GA 对照组>正常对照组,说明模型组 A、模型组 B 和 GA 对照组大鼠均表现出明显炎症反应。此外模型 B 炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 表达高于模型组 A,总体而言说明生物因子与单纯湿热环境相比,生物因子对于炎症因子的启动可反应“热”致病因子靶点所在。

综上所述,本研究结果表明两种造模方式均可诱导湿热证“证”和 GA“病”的临床表现。从脂代谢和炎症因子指标观察二者既有共性也有各自特点,但毋庸置疑高脂高糖饮食是脂代谢紊乱的直接影响因素,且脂代谢可作为“湿”致病因子靶点,炎症因子可作为“热”致病因子靶点。综合比较生物因子对于大鼠炎症影响更明显,可作为湿热证 GA 病证结合模型中“热”靶点量化评价指标。将“病”和“证”相结合制备湿热证痛风性关节炎病证结合模型可为探明中医药治疗作用和机理研究提供可行的动物模型选择。

参考文献:

- [1] Hansildaar R, Vedder D, Baniaamam M, et al. Cardiovascular risk in inflammatory arthritis: rheumatoid arthritis and gout [J]. *Lancet Rheumatol*, 2021, 3(1): e58-e70.
- [2] Singh JA, Gaffo A. Gout epidemiology and comorbidities [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2020, 50(3): S11-S16.
- [3] 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.
- [4] Chen Y, Tang Z, Huang Z, et al. The prevalence of gout in mainland China from 2000 to 2016: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Public Health*, 2017, 25(5): 521-529.
- [5] Dalbeth N, Gosling AL, Gaffo A, et al. Gout [J]. *Lancet*, 2021, 397(10287): 1843-1855.
- [6] Wilson L, Saseen JJ. Gouty arthritis: a review of acute management and prevention [J]. *Pharmacotherapy*, 2016, 36(8): 906-922.
- [7] 国家中医药管理局. 中医病症诊断疗效标准: ZY/T 001.1-1994[S]. 1994.
- [8] 陈丁鹏. 基于中医传承计算平台 V3.0 探究邓运明教授治疗痛风辨证用药规律及学术思想研究 [D]. 南昌:江西中医药大学, 2021.
- [9] 吕文亮,周姝含,孙易娜,等. 基于病证结合的脾胃病湿热理论的创新与应用研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(8): 2601-2606.
- [10] Tausche AK. Gicht [J]. *Internist (Berl)*, 2021, 62(5): 513-525.
- [11] Jia L, Wang RS, He DY. Traditional Chinese and western medicine understanding of gout pathogenesis [J]. *Rheum Arthritis*, 2018, 7(2): 61-64.
- [12] Chi X, Zhang H, Zhang S, et al. Chinese herbal medicine for

- gout: a review of the clinical evidence and pharmacological mechanisms [J]. Chin Med, 2020, 2020(15): 17-30.
- [13] 甘斌, 李华南, 章晓云, 等. 湿热证急性痛风性关节炎动物模型的建立与评价 [J]. 江西中医药, 2021, 52(5): 77-80.
- [14] 黄火高, 孙运峰, 胡明, 等. 大鼠急性痛风性关节炎模型的建立及特点 [J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(6): 538-542.
- [15] 苏厚恒, 孙欣, 崔佳佳, 等. 单钠尿酸盐晶体在不同 pH 值环境中的形态变化与意义 [J]. 泰山医学院学报, 2010, 31(3): 197-199.
- [16] 郭玉星, 熊辉, 易法银, 等. 蠲痹历节清方对改良痛风性关节炎模型大鼠滑膜的 TLR4、NF- κ B、PPAR γ 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 126-133.
- [17] 徐轶尔, 孙贵才, 郑春雨, 等. 豨莶草对尿酸钠引起痛风性关节炎 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B 表达的影响 [J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(1): 9-13.
- [18] 朱明. 黄帝内经 [M]. 北京: 外文出版社; 2012.
- [19] 严世芸. 中医医家学说及学术思想史 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2015.
- [20] 肖照岑, 屠延寿.《湿热病篇》学术思想探讨 [J]. 天津中医学院学报, 1984, 3(1): 14-22.
- [21] Landis RC, Haskard DO. Pathogenesis of crystal-induced inflammation [J]. Curr Rheumatol Rep, 2001, 3(1): 36-41.
- [22] Rose DM, Liu-Bryan R. Innate immunity in triggering and resolution of acute gouty inflammation [J]. Curr Rheumatol Rep, 2006, 8(3): 209-214.
- [23] Chen X, Burdett TC, Desjardins CA, et al. Disrupted and transgenic urate oxidase alter urate and dopaminergic neurodegeneration [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(1): 300-305.
- [24] Lu J, Dalbeth N, Yin H, et al. Mouse models for human hyperuricaemia: a critical review [J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(7): 413-426.
- [25] 吕文亮. 湿邪与血脂代谢异常关系的探讨 [J]. 河南中医学院学报, 2004, 19(112): 5-6.
- [26] 吕文亮, 高清华, 李华锋. 清热化湿法对温病湿热证大鼠肝脏 LDL-RmRNA 的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(20): 2484-2487.
- [27] 李华锋, 林培政. 小鼠肝炎病毒温病湿热证模型的探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(7): 1318-1321.
- [28] 阙铁生, 常丽萍, 吕军影, 等. 加味藿朴夏苓汤对温病湿热证大鼠模型血清 TNF- α 、IL-10 及血脂代谢的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2012, 29(2): 197-200.
- [29] 曹硕, 刘娜, 张曼. 男性痛风患者脂代谢紊乱的相关性研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(10): 1646-1648, 1680.
- [30] Shi Y, Mucsi AD, Ng G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity [J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 203-217.
- [31] 何建平. 针灸治疗痛风性关节炎患者的临床效果及对血清炎症因子水平的影响 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17(1): 128-131.
- [32] Liu YF, Tu SH, Chen Z, et al. Effects of modified simiao decoction on IL-1 β and TNF- α secretion in monocytic THP-1 cells with monosodium urate crystals-induced inflammation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 406816.
- [33] Temmoku J, Fujita Y, Matsuoka N, et al. Uric acid-mediated inflammasome activation in IL-6 primed innate immune cells is regulated by baricitinib [J]. Mod Rheumatol, 2021, 31(1): 270-275.
- [34] Punzi L, Calò L, Plebani M. Clinical significance of cytokine determination in synovial fluid [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2002, 39(1): 63-88.
- [35] 徐晓晨, 丁焕发, 刘淑娟, 等. 血清 IL-1 β 、IL-6、IL-18 及 TNF- α 水平在急性痛风性关节炎镇痛治疗不同时间动态变化的研究 [J]. 中国医学创新, 2016, 13(24): 4-10.
- [36] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. Cell, 2017, 168(1-2): 37-57.
- [37] Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, et al. TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation [J]. J Immunol, 2005, 174(8): 5016-5023.
- [38] Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(8): 588-606.
- [39] 闫润泽, 孙卫卫, 王珍, 等. 糖尿病肾病内热证与肾功能及炎症因子的相关性研究 [J]. 中医学报, 2020, 35(2): 393-397.

[收稿日期] 2022-04-20