

# 补肾利湿法对急性痛风性关节炎大鼠血清 hs-CRP 和 Dickkopf-1 的影响

姜德友 袁颖超 刘春红 谢颖 韩洁茹 张淼 冯涛 陈飞

(黑龙江中医药大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要** 目的:观察补肾利湿法对急性痛风性关节炎大鼠血清超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和 Dickkopf-1(DKK-1)表达水平的影响,探讨补肾利湿法防治急性痛风性关节炎的机理。方法:将 84 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、中药对照组、西药对照组及补肾利湿低、中、高剂量组,每组 12 只。空白组与模型组灌胃生理盐水,中药对照组和西药对照组分别灌胃痛风舒片溶液和秋水仙碱溶液,补肾利湿低、中、高剂量组分别灌胃 18.7、37.4、74.8ml/kg 补肾利湿中药复方,每日 1 次,连续 7d。随后除空白组外,其余各组大鼠采用尿酸钠和氧嗪酸钾诱导急性痛风性关节炎。造模 4h 后眼眶取血,分离血清,应用 ELISA 法,检测各组大鼠血清中 hs-CRP 和 DKK-1 的含量。结果:模型组大鼠血清 hs-CRP 和 DKK-1 均明显高于空白组( $P<0.01$ )。各给药组大鼠血清 hs-CRP 含量均明显低于模型组( $P<0.01$ ),其中以西药对照组和补肾利湿中剂量组效果最为明显。各给药组大鼠血清 DKK-1 含量与模型组比较无统计学差异。结论:补肾利湿中药复方可降低急性痛风性关节炎模型大鼠血清 hs-CRP 水平,对防治急性痛风性关节炎具有一定作用;对降低 DKK-1 效果不明显,可能与急性期血清中 DKK-1 表达特点有关,需要作进一步研究。

**关键词** 急性痛风性关节炎 补肾利湿 中药复方 hs-CRP DKK-1 病理学 SD 大鼠

**中图分类号** R289.7 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2015)07-0077-03

痛风(gouty arthritis, GA)是嘌呤代谢紊乱及/或尿酸排泄减少所引起的一种代谢性疾病。临床表现为高尿酸血症和尿酸盐结晶沉积所致的特征性急、慢性关节炎,病程日久可引起泌尿系结石或痛风性肾病,导致肾功能不全,严重影响患者健康状况和生存质量<sup>[1]</sup>。急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis)是痛风比较典型的表现形式。目前临床仍以西药为主来控制急性发作期的痛风性关节炎,如促尿酸排泄剂、抑制尿酸生成剂、秋水仙碱、激素等。此类药物虽作用迅速,但副作用多、中毒率高,易引发肾功能损害、皮肤过敏甚至毒性上皮坏死等,因此众多中医学者开始重视研究开发防治痛风性关节炎安全有效的中药制剂。本研究采用尿酸钠联合氧嗪酸钾诱导大鼠急性痛风性关节炎模型,分别用秋水仙碱、痛风舒片和补肾利湿中药复方进行预处理,观察各组大鼠血清超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和 Dickkopf-1(DKK-1)表达水平,探讨补肾利湿法防治急性痛风性关节炎的作用机制。

## 1 实验材料

**1.1 实验动物** 选用健康雄性 SD 大鼠 84 只,体重(200±20)g,黑龙江中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号:[SCXK(黑)2008004]。实验对动物的

处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[2]</sup>。

**1.2 药物与试剂** 补肾利湿中药复方由熟地黄 20g、山药 15g、山茱萸 20g、泽泻 15g、怀牛膝 15g、草薢 20g、土茯苓 30g 组成<sup>[3]</sup>,方中药材从黑龙江中医药大学附属第一医院中药房一次性选购。秋水仙碱购自西双版纳药业有限责任公司,批号 140807;痛风舒片(主要成分:大黄、车前子、泽泻、川牛膝、防己)购自湖北绿金子药业有限责任公司,批号 140301;微量尿酸钠结晶(批号 CAS1198-77-2)、氧嗪酸钾(批号 CAS2207-75-2)均购自美国 Sigma 公司。hs-CRP 试剂盒购于北京诚森生物技术有限公司,批号 201501。

**1.3 仪器** 多用途高速台式离心机(贝克曼 X-22R),电子分析天平(梅特勒公司 AL204),酶标仪(Gene Company synergy H7),恒温鼓风干燥箱(上海一恒,型号:DHG-9140A)。

## 2 实验方法

**2.1 动物分组** 适应性喂养 1 周后将大鼠按随机数字表随机分为 7 组,每组 12 只,分别为空白组、模型组、中药对照组、西药对照组和补肾利湿低、中、高剂量组。

基金项目:国家自然科学基金项目(81173170)

**2.2 药物溶液制备** (1)尿酸钠溶液的制备:将 1g 微晶尿酸钠结晶加 9mL 无菌生理盐水,加热搅拌,定容成 10mL 尿酸钠溶液。(2)氧嗪酸钾溶液的制备:将 3g 氧嗪酸钾晶体溶解于 97mL 生理盐水中,加热搅拌,配置成 3%氧嗪酸钾溶液。(3)痛风舒片溶液的制备:将痛风舒片研成细末,配置成 0.029g/mL 的痛风舒片溶液,4℃冰箱保存备用。(4)秋水仙碱混悬液的制备:将秋水仙碱片研成细末,配置成 0.028mg/mL 的秋水仙碱混悬液,4℃冰箱保存备用。(5)补肾利湿中药复方溶液的制备:将熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、怀牛膝、萆薢、土茯苓入砂锅中加 4 倍体积的水浸泡 30min,煎 2 次,30min/次,去渣,两煎混合,G4 滤器过滤,于 60℃水浴中加热,分别将原药液 1.87mL、3.74mL、7.48mL 浓缩成 1mL,密封隔水煮沸消毒,置 4℃冰箱保存备用。

**2.3 给药方法** 以每 100g 大鼠体质量灌胃 1mL 为标准,空白组和模型组分别灌胃等量生理盐水,中药对照组和西药对照组分别灌胃痛风舒片溶液和秋水仙碱溶液,补肾利湿低、中、高剂量组分别给予补肾利湿中药复方 18.7、37.4、74.8mL/kg 灌胃,各组均每日灌胃 1 次,连续 7d,末次给药后造模。

**2.4 造模方法** 用 3%氧嗪酸钾溶液 (15mL/kg) 进行腹腔内注射,15min 后将大鼠仰卧固定,碘伏消毒右后肢小腿膝关节,用 BD 针在大鼠右后肢膝关节右后侧从 30°~40°方向插入至肌腱内侧,有落空感后,注入 10%尿酸钠溶液 0.2mL,制备急性痛风性关节炎模型。空白组右后肢膝关节注射等体积生理盐水。

**2.5 血清样本采集** 造模 4h 后眼眶取血,室温下放置 30min,3500r/min 离心 15min,分离血清,-4℃冰箱冻存待测。

**2.6 hs-CRP、DKK-1 含量测定** 取血清上清液,采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清中 hs-CRP、DKK-1 的浓度,具体步骤按照试剂盒说明书进行。

**2.7 关节滑膜组织病理学检查** 用锐利刀片取受试关节滑膜组织,95%乙醇固定,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋切片,HE 染色,光镜观察关节滑膜组织病变。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。组间比较采用 One-Way ANOVA 分析,多组样本均数间比较选择单因素方差分析,采用 LSD-t 检验,所有计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。 $P < 0.05$  为有统计学

差异。

### 3 实验结果

**3.1 各组大鼠血清 hs-CRP、DKK-1 含量比较** 结果见表 1。与空白组比较,模型组大鼠 hs-CRP、DKK-1 水平明显增高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各用药组 hs-CRP 水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ),提示各组药物均对降低 hs-CRP 水平有作用。其中,西药对照组和补肾利湿中剂量组效果更明显,此 2 组间比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。血清 DKK-1 水平方面,与模型组比较,补肾利湿中剂量组和西药对照组均有较大程度的降低趋势,但无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠血清 hs-CRP、DKK-1 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 动物数(只) | 剂量                        | hs-CRP( $\mu\text{g/L}$ ) | DKK-1( $\mu\text{g/L}$ ) |
|----------|--------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 空白组      | 12     |                           | 0.39±0.02                 | 0.93±0.04                |
| 模型组      | 12     |                           | 0.89±0.06**               | 1.06±0.11**              |
| 中药对照组    | 12     | 2.9×10 <sup>-1</sup> g/kg | 0.69±0.07***              | 1.05±0.06**              |
| 西药对照组    | 12     | 2.8×10 <sup>-4</sup> g/kg | 0.49±0.05***▲             | 0.98±0.09                |
| 补肾利湿低剂量组 | 12     | 18.7mL/kg                 | 0.63±0.06***△             | 1.06±0.14**△             |
| 补肾利湿中剂量组 | 12     | 37.4mL/kg                 | 0.48±0.04***▲             | 0.97±0.07                |
| 补肾利湿高剂量组 | 12     | 74.8mL/kg                 | 0.63±0.05***△             | 1.02±0.07                |

注:与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,### $P < 0.01$ ;与西药对照组比较,△ $P < 0.05$ ;与中药对照组比较,▲ $P < 0.05$ 。

**3.2 病理组织学观察** 空白组大鼠关节滑膜细胞形态规则,排列整齐。模型组滑膜细胞排列不整,表面渗出,有不同程度的坏死,滑膜组织内见有尿酸盐晶体,结合血尿酸测定,提示造模成功。中药对照组滑膜组织仍见水肿、坏死、大量中性粒细胞浸润,炎性渗出减轻。西药对照组滑膜组织仍有水肿、炎细胞浸润,渗出不明显。补肾利湿低剂量组滑膜组织仍有明显水肿,炎细胞浸润;中剂量组滑膜组织轻度水肿,渗出减轻,少量炎细胞浸润;高剂量组滑膜组织仍见有退变、水肿、大量中性粒细胞浸润。见图 1。

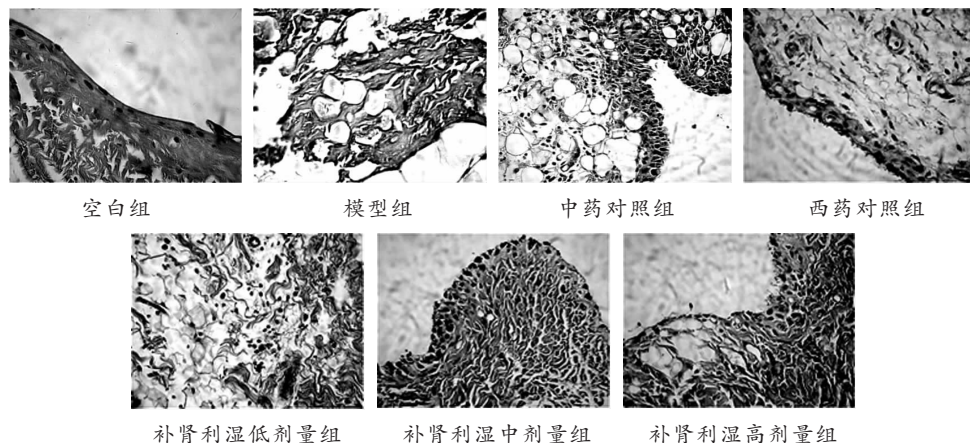


图 1 各组大鼠关节滑膜病理组织学图片 (HE 染色, ×400)

#### 4 讨论

急性痛风性关节炎归属于中医学痹证范畴。医圣张仲景所著《金匮要略》中提及“历节”，与本病症状相似，后世医家多沿用此病名，并根据其病势剧烈的特点称之为“白虎风”、“历节风”。近代医家认为本病病因多由于人体遭受风寒、湿热之邪侵袭，致气血、经络受病邪闭阻而引起关节红肿热痛、畸形等症。我们根据多年临床经验，详审本病病机，认为痛风应从肾论治<sup>[4]</sup>。肾主水，且为一身阴阳之根本，人身水液代谢虽有多种脏器参与，归根结底全赖肾阳蒸腾气化作用。若先天不足或后天调养不当引起肾脏亏虚，以致肾不温化，湿浊内泛，久蕴不去，酿生浊毒，加之外受风寒湿热之邪，内有七情劳倦之灾，或关节外伤，天虚人虚，两害交加，湿浊随气机运行无处不到，流注关节、肌肉则为痹为痛。《素问·太阴阳明论》云“伤于湿者，下先受之”，指出了急性痛风性关节炎临床症状以下肢关节受累为主的原因。综上所述，急性痛风性关节炎属本虚标实，以肾脏亏虚为本，气滞、血瘀、湿聚、痰凝、热蕴杂合为标，治以补肾利湿法。补肾利湿中药复方由资生肾气丸化裁而来，方中熟地黄气味厚重以滋阴补肾、填精益髓，山茱萸酸、微温以补益肝肾、收敛固涩，两药配合，肝肾并补，取“肝肾同源”之意，加入山药补脾益气，三药合用，意在三阴并补，复其在内之真阴。纯用补益之剂，味厚而有壅滞之弊，难免事倍功半，根据本病补肾之治法，加入泽泻利湿以泄肾浊，调和熟地滋腻之性，另据现代药理学研究指出，泽泻有明显的利尿和抗炎作用<sup>[9]</sup>。萆薢利湿去浊，祛风除痹；土茯苓清热解毒，除湿通络；牛膝活血通经，舒筋利痹，引血下行，利尿通淋。上三味药对于气、血、湿浊多有通利作用，以针对本病在标之气滞、血瘀、湿浊为患。诸药配伍，标本兼治。

作为中药对照组的痛风舒片，主要药物为大黄、车前子、泽泻、川牛膝、防己，功用清热、利湿、解毒，治标为主，虽祛邪但由于不能扶正，忽略了肾脏亏虚之本，所以疗效有限。临床中常用的治疗急性痛风性关节炎的西药是秋水仙碱，其消炎止痛作用显著，但是副作用较大，尤其是胃肠道反应。

急性痛风性关节炎发病机制十分复杂，现代研究认为：高尿酸血症状态易形成尿酸盐结晶，作为异物触发机体固有免疫反应，导致关节及周围组织的急性炎症反应。hs-CRP 是一种炎症因子，是反映机体炎症过程的灵敏指标<sup>[9]</sup>。现代研究表明，血清中 hs-CRP 含量在风湿性疾病时会升高，升高的原因在于炎症反应和组织损伤，且 hs-CRP 水平与其损伤程度成正比<sup>[7]</sup>。刘国生等<sup>[8]</sup>的研究表明，血清中 hs-CRP 水平对痛风性关节炎的发作与转归具有一定的相关性，可作为痛风性关节炎诊疗的一项新指

标。另外，Wnt pathway 在骨与关节形成和破坏中通过几个抑制性的分泌型分子起到关键的调控作用，DKK-1 是最重要的抑制剂<sup>[9]</sup>。赵卫等<sup>[10]</sup>的研究结果表明，血清中的尿酸和沉积于骨组织中的尿酸盐共同作用导致骨破坏，DKK-1 是参与原发性痛风性关节炎骨破坏的重要因子之一。由于研究较少，DKK-1 在急性期痛风性关节炎期的表达特点尚有争论。

本实验通过测定各组大鼠血清中 hs-CRP 和 DKK-1 的含量，证实补肾利湿法中药复方能降低痛风性关节炎模型大鼠血 hs-CRP 的表达，从而缓解红、肿、热、痛等炎症症状；对 Wnt 途径抑制剂 DKK-1 的表达具有一定抑制作用，有减少软骨及骨质破坏的可能性。这可能是补肾利湿中药复方治疗急性痛风性关节炎众多机制中的一种。但是，由于有关 DKK-1 在急性痛风性关节炎大鼠模型中的具体表达过程尚不是十分明确，补肾利湿中药复方对其作用不太明确的原因仍需要进一步进行实验研究。

#### 参考文献

- [1] 张众. 中西药联用治疗湿热蕴结型原发性急性痛风 36 例临床研究. 江苏中医药, 2011, 43(6): 30
- [2] 中华人民共和国科学技术部.《关于善待实验动物的指导性意见》的通知 [EB/OL]. [2006-09-30] [http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930\\_54389.htm](http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm)
- [3] 王俊霞, 韩洁茹, 周雪明. 姜德友从肾论治痛风经验. 上海中医药杂志, 2010, 44(2): 16
- [4] 姜德友, 安伟涛, 谢颖, 等. 补肾利湿法治疗痛风性关节炎疗效观察. 新中医, 2012, 44(10): 35
- [5] 沈映君. 中药药理学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 433
- [6] 胡艳立, 朱伟斌. 血清超敏 C 反应蛋白对痛风的诊断价值. 海南医学, 2012, 23(3): 95
- [7] He P, Xie XH, Ding YP, et al. Correlation between high sensitive C-reactive protein, lipoprotein (a), blood uric acid and severity of coronary artery disease. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2010, 90(28): 1989
- [8] 刘国生, 周发为, 唐生尧, 等. 超敏 C 反应蛋白在痛风性关节炎诊疗中的价值. 湖北民族学院学报 (医学版), 2014, 31(3): 22
- [9] Miller JR. The Wnts. Genome Biol, 2002, 3(1): 3001
- [10] 赵卫, 高辉, 朱佳鑫, 等. 血清 Dickkopf-1 与原发性痛风性关节炎骨破坏的相关性. 北京大学学报 (医学版), 2012, 44(2): 254

第一作者: 姜德友 (1960—), 男, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 从事经方治疗疑难杂症与龙江医派研究。

通讯作者: 陈飞, 医学博士. chenfei0622@126.com

收稿日期: 2015-04-30

编辑: 吴 宁