

• 基础研究 •

芦丁治疗急性痛风性关节炎的实验研究

黄敬群, 宋 扬, 赵 鹏, 冯 悦, 刘 媛

【摘要】 目的 通过尿酸钠(monosodium urate monohydrate, MSU)晶体诱导的炎症动物模型,探讨黄酮类化合物芦丁对急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, GA)的治疗作用。方法 选用 48 只健康雄性 SD 大鼠,随机均分为 6 组:空白对照组(A 组),模型组(B 组),吲哚美辛组(C 组),低剂量芦丁组(D 组),中剂量芦丁组(E 组)和高剂量芦丁组(F 组)。A、B 组给予蒸馏水,C 组给予吲哚美辛,D、E、F 组给予不同剂量芦丁灌胃,每天 1 次,连续给药 5 天后采用 MSU 晶体制备大鼠 GA 模型。造模后继续给药 2 天,用丝线测定造模前及造模后 2、4、8、12、24 和 48 h 大鼠的踝关节周径;造模后 48 h 大鼠以戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,取肝脏和踝关节滑膜,制备血清和组织匀浆,采用硫代巴比妥酸(thio-barbituric acid, TBA)比色法测定脂质过氧化程度丙二醛(malondialdehyde, MDA)和一氧化氮(nitric oxide, NO)以及抗氧化酶:超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)的水平。结果 造模后 48 h,吲哚美辛和芦丁能够显著降低 GA 模型大鼠的踝关节肿胀度及 MDA 和 NO 水平($P < 0.05$ 或 0.01),提高 SOD、GSH-PX、CAT 活性($P < 0.05$ 或 0.01)。结论 芦丁对 MSU 晶体诱导大鼠 GA 有显著的改善作用,其机制可能与抗氧化作用有关。

【关键词】 芦丁;痛风性关节炎;尿酸钠;脂质过氧化反应;抗氧化酶

【中图分类号】 R 541.2

【文献标识码】 A

doi:10.3969/j.issn.1009-2595.2013.08.001

Experimental Study of Rutin in the Treatment of Acute Gouty Arthritis

HUANG Jing-qun, SONG Yang, ZHAO Peng, FENG Yue, LIU Yuan. Department of Pharmacy, No. 252 Hospital of the People's Liberation Army, Baoding Hebei 071000, China

【Abstract】 Objective To study the treatment effect of flavonoid Rutin on acute gouty arthritis (GA) in the animal model of monosodium urate monohydrate (MSU) crystal-induced inflammations. **Methods** Forty-eight healthy female SD rats were enrolled and equally randomized to six groups: blank control (group A), model (group B), Indometacin group (group C), low-Rutin group (group D) and middle-Rutin group (group E) and high-Rutin group (group F). Groups A and B were given distilled water, group C were given Indometacin, groups D, E and F were given different doses of Rutin. Rutin, indometacin or distilled water was given orally, once daily, for five consecutive days. GA models were made using sodium urate crystal and medicating for two days. The circumference of the ankle joints was measured by tie line before modeling and 2, 4, 8, 12, 24 and 48 hours after modeling. At 48 hours after modeling, the rats were anaesthetized with sodium pentobarbital and then sacrificed. Their blood was collected to isolate serum. The liver and synovial tissue of the right hind limb ankle joints were immediately removed and homogenized, the levels of lipid peroxidation malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) as well as anti-oxidant enzyme including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-PX) were observed with thiobarbituric acid (TBA). **Results** At 48 hours after modeling, Rutin could significantly relieve edema in rats and decline the levels of MDA and NO ($P < 0.05$ or 0.01), as well as enhancing the antioxidant enzymes activity such as SOD, GSH-PX and CAT in serum, liver and synovial tissue ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion** Rutin has remarkable effect on improving symptoms of acute GA induced by MSU crystals in rats, which might be related to its antioxidative effect.

【Key words】 Rutin; Gouty arthritis; Sodium urate; Lipid peroxidation; Antioxidant enzymes

【基金项目】 中国博士后科学基金项目(2012M512105)

【作者单位】 071000 河北保定,解放军 252 医院制剂中心(黄敬群、赵鹏、冯悦、刘媛);保定市药品检验所(宋扬)

痛风性关节炎(gouty arthritis, GA)是嘌呤代谢障碍、尿酸增高所致反复发作的关节炎。尿酸盐沉积于关节、关节周围组织和皮下组织,引起关节炎的反复发作,有急性红、肿、剧痛,逐渐产生骨与关节破

坏、畸形、关节强直和功能障碍^[1]。常用的治疗药物,如秋水仙碱和非甾体类抗炎药吲哚美辛等普遍导致难以承受的不良反应,如肝肾功能损害、骨髓抑制和胃肠毒性等^[2-3]。中药和天然药物治疗痛风性关节炎具有疗效确切、安全可靠、不良反应小等优势,近年来逐渐受到医学界的重视。黄酮类化合物芦丁具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗过敏、扩张血管、神经保护和免疫调节等多种药理活性^[4-5]。有研究表明,芦丁通过抑制脂质过氧化反应和一氧化氮(nitric oxide, NO)的累积,提高抗氧化酶系统的活性,对胶原蛋白诱导的大鼠风湿性关节炎具有良好的抗炎作用^[6-7]。本研究观察芦丁给药后对尿酸钠(monosodium urate monohydrate, MSU)诱导的急性 GA 模型大鼠踝关节肿胀度的影响,测定血清、肝脏和滑膜中脂质过氧化程度:丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 NO 以及抗氧化酶,包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性,探讨其抗炎和抗氧化作用机制。

1 资料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物与试剂 芦丁(陕西慈缘生物技术有限公司,纯度>98%),吲哚美辛肠溶片(山西云鹏制药有限公司,国药准字 H4020771),MSU(美国 Sigma 公司),其他试剂均为分析纯。MDA、NO、SOD、GSH-PX 和 CAT 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.1.2 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,体质量(200±20)g,鼠龄 6~7 周,由第四军医大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(军)字第 2007-007 号]。SD 大鼠独立通气笼分笼喂养,实验前 1 周时间适应环境,自由进食标准鼠粮和饮水,环境温度 25℃,12 h 光照和 12 h 黑暗交替进行。

1.1.3 主要仪器 Sartorius 电子分析天平(赛多利斯天平公司,德国),Biofuge Primo R 多用途台式高速离心机(Heraeus 公司,德国),FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂),RT-9600 半自动生化分析仪(雷杜生命科学股份有限公司,深圳)。

1.2 方法

1.2.1 分组和给药方式 将 48 只大鼠随机分为空白对照组(A 组)、模型组(B 组)、吲哚美辛组(C 组)、低剂量芦丁组(D 组)、中剂量芦丁组(E 组)和高剂量芦丁组(F 组),每组 8 只。A 组和 B 组灌胃等量的蒸馏

水,C 组给予吲哚美辛 3.0 mg/kg 灌胃,D 组、E 组和 F 组分别灌胃芦丁 75、150、300 mg/kg,连续 7 天。

1.2.2 模型的制备 用 6 号注射针从受试大鼠右后肢踝关节背侧 45°方向插入胫骨肌腱内侧,将 100 μl 3.0% MSU 溶液注入到踝关节腔,制备急性 GA 模型。A 组注射等体积生理盐水。

1.2.3 观察指标 通过缚线法测量造模前和造模后 2、4、8、12、24、48 h 右踝关节同一部位周径(取均值),计算肿胀率[肿胀率(%)=(致炎后踝关节周径-致炎前踝关节周径)/致炎前踝关节周径×100%]。

1.2.4 标本采集及检测 造模后 48 h,以 3 g/L 戊巴比妥钠 0.4 ml 麻醉大鼠后腹主动脉取血,室温下放置 1 h 后,3500 r/min 离心 12 min,取上清置于-70℃冰箱冻存。肝脏和右后肢踝关节滑膜分别以 1:9 比例加生理盐水稀释,匀浆,4℃条件下 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,分装于 Ep 管中,于-70℃冰箱冻存。血清及肝脏和滑膜匀浆上清液 MDA、NO 和 SOD、GSH-PX、CAT 检测采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)比色法,严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理

结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件处理。各组均数间比较采用方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验。检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 药物对 GA 大鼠踝关节周径的影响

造模后各组大鼠踝关节肿胀度均有所增加,且 2~24 h 达到高峰,以 B 组最为明显,与 A 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。各药物干预组关节肿胀程度与 B 组相比均有不同程度的下降,与 B 组相比差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01)。C 组与 F 组相比,无统计学差异,见表 1。

2.2 药物对 GA 大鼠脂质过氧化程度的影响

与 A 组相比,B 组血清、肝脏和滑膜中 NO 和 MDA 水平都明显升高($P<0.05$ 或 0.01)。C、D、E、F 各组与 B 组相比,都能够显著降低脂质过氧化程度($P<0.05$ 或 0.01),并接近正常水平,见表 2。

2.3 药物对 GA 大鼠抗氧化酶活性的影响

与 A 组相比,B 组血清、肝脏和滑膜中 SOD、CAT 和 GSH-PX 水平都显著降低($P<0.05$ 或 0.01)。C、D、E、F 各组与 B 组相比,都能够显著升高这三种抗氧化酶水平($P<0.05$ 或 0.01),并接近正常水平,见表 3。

表 1 芦丁对急性痛风性关节炎大鼠踝关节肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8/\text{组}$)

Table 1 Effect of Rutin on ankle joint edema in rats with acute gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n=8/\text{group}$)

组别	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
空白对照组	6.31±1.38**	5.72±0.93**	5.04±1.34**	3.24±0.48**△	1.83±0.75**△	1.09±0.18**△
模型组	14.71±1.63△	15.51±1.73△	14.76±1.55△	12.46±2.17△	11.81±2.07△	7.28±1.18△
吲哚美辛组	6.03±1.05**	5.61±1.20**	5.24±1.31**	4.81±1.06**	4.05±0.64**	3.55±0.75**
低剂量芦丁组	13.29±1.92△	12.33±1.98**△	11.87±1.79**△	10.43±1.74△	9.47±2.09**△	5.33±1.33**△
中剂量芦丁组	12.00±2.32△	10.71±1.51**△	9.36±1.43**△	8.65±1.60**△	8.26±1.69**△	4.51±1.11**
高剂量芦丁组	7.35±1.95**	7.23±1.78**	6.47±1.32**	6.11±1.21**△	4.84±1.33**	3.58±0.89**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与吲哚美辛组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

表 2 芦丁对急性痛风性关节炎大鼠脂质过氧化程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8/\text{组}$)

Table 2 Effect of Rutin on lipid peroxidation in rats with acute gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n=8/\text{group}$)

组别	血清		肝脏		滑膜	
	NO($\mu\text{mol/L}$)	MDA(nmol/ml)	NO($\mu\text{mol/g}\cdot\text{prot}$)	MDA(nmol/mg $\cdot\text{prot}$)	NO($\mu\text{mol/g}\cdot\text{prot}$)	MDA(nmol/mg $\cdot\text{prot}$)
空白对照组	2.97±0.39**△	8.10±0.73**	0.07±0.01*	0.59±0.10**△	0.39±0.08**	0.77±0.11**
模型组	3.95±0.34△	12.33±1.07△	0.08±0.01△	0.98±0.19	0.59±0.11△	1.04±0.23△
吲哚美辛组	2.18±0.46**	8.85±0.86**	0.06±0.01**	0.84±0.12	0.38±0.09**	0.72±0.14**
低剂量芦丁组	2.53±0.45	9.34±1.04**	0.07±0.01*	0.70±0.10**△	0.48±0.10△	0.94±0.14△
中剂量芦丁组	2.32±0.21**	8.66±1.28**	0.06±0.01**	0.62±0.12**△	0.34±0.09**	0.71±0.16**
高剂量芦丁组	2.17±0.28**	8.16±0.86**	0.06±0.01**	0.56±0.10**△	0.26±0.07**△	0.68±0.13**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与吲哚美辛组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

表 3 芦丁对急性痛风性关节炎大鼠抗氧化酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8/\text{组}$)

Table 3 Effect of Rutin on enzymic anti-oxidant status in rats with acute gouty arthritis ($\bar{x} \pm s, n=8/\text{group}$)

组别	血清			肝脏			滑膜		
	SOD(U/ml)	CAT(U/ml)	GSH-PX(U)	SOD(U/mg $\cdot\text{prot}$)	CAT(U/g $\cdot\text{prot}$)	GSH-PX(U)	SOD(U/mg $\cdot\text{prot}$)	CAT(U/g $\cdot\text{prot}$)	GSH-PX(U)
空白对照组	230.54±33.26**	3.42±0.33**△	323.40±29.27*	31.65±2.50*	4.06±0.18**△	27.19±2.35*	61.44±2.07**△	1.84±0.07**△	48.34±1.66**△
模型组	186.14±22.17	1.99±0.25△	293.52±17.57△	27.02±3.99△	3.65±0.32△	23.37±3.17	51.13±3.66	1.32±0.10	40.85±2.48△
吲哚美辛组	203.88±23.55	2.91±0.44**	317.32±28.33	31.22±2.12*	4.36±0.28**	24.41±3.71	54.05±2.62	1.35±0.09	62.60±4.13**
低剂量芦丁组	204.13±29.65	2.51±0.27**△	298.38±24.47	29.20±2.18	3.93±0.30△	24.65±2.49	53.94±2.22	1.40±0.15	45.51±2.35**△
中剂量芦丁组	211.68±21.30*	3.38±0.43**	314.20±21.55	30.79±2.20*	4.04±0.44	27.11±2.51*	58.01±4.85**	1.62±0.25**△	50.86±2.30**△
高剂量芦丁组	220.02±22.27**	3.62±0.40**△	321.85±17.63**	31.14±2.80*	4.25±0.43**	27.92±2.55**△	61.52±5.30**△	1.98±0.22**△	55.09±8.90**△

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与吲哚美辛组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

3 讨论

大鼠关节腔内注入 MSU 晶体,引起关节及周围组织广泛的炎症反应:中性粒细胞侵入关节腔,聚积在关节液和滑膜,吞噬尿酸单钠结晶并释放趋化和扩大炎症反应的介质。同时关节滑膜衬里增生和肥厚,关节液量增加。此方法被认为是经典的 GA 造模方法,已在多种动物体内成功地诱导出急性 GA 模型,其病理表现、机制与人类 GA 相似,故可用于评价抗 GA 药物的药效^[8]。本研究表明,芦丁给药后能够显著减少模型大鼠关节腔内关节液的容积,减轻炎症反应。作者认为,芦丁对 GA 的抗炎机制主要与其抗氧化作用有关。

研究者普遍认为,MSU 晶体在关节及组织中析出是痛风炎症发生的根本原因。MSU 晶体沉积后激活炎症反应,同时关节内也存在着氧化应激,大量氧自由

基如 NO 的生成及脂质过氧化代谢产物的产生,均导致关节的损伤,促使关节出现剧烈疼痛、红肿和功能障碍^[9]。同时自由基清除剂如 SOD、GSH-PX 和 CAT 的活性降低^[10]。因此,测定 NO、MDA 和 SOD 等的含量可间接地反映体内氧自由基的高低以及炎症和细胞损伤的严重程度。本组实验显示,芦丁能够抑制 GA 大鼠踝关节的肿胀度,降低机体脂质过氧化程度,提高机体抗氧化酶活性,从而发挥其控制和缓解炎症反应的药理作用。

参 考 文 献

[1] Fang ZH, Waizy H. Current concepts in the treatment of gouty arthritis[J]. Orthop Surg, 2013, 5(1): 6-12
 [2] Khanna D, Khanna PP, Fitzgerald JD, et al. 2012 American college of rheumatology guidelines for management of gout. Part 2: therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2012, 64(10): 1447-1461

(下转第 539 页)

要更高强度的声音才可以使其放电。对这六个神经元的刺激前后的 MT 做配对样本 *t* 检验发现, 给予短声刺激前后, 神经元的 MT 改变具有统计学差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 短声可改变下丘听觉神经元纯音的反应特性

本实验显示, 短声可以改变下丘神经元对纯音的反应特性。在给予短声后, 下丘神经元对纯音的 RF 有的向高频飘移, 有的向低频飘移, 这种神经元可塑性的改变与下丘本身接受的上行和下行核团的输入输出有关。文献报道, 电刺激激活初级听皮层可以改变下丘中央核的反应频率调谐曲线^[3]。当初级听皮层失活时, 下丘中央核的可塑性改变消失^[4], 初级听皮层的下行调节作用对于下丘中央核的可塑性调节有重要的作用。文献报道, 当刺激皮层部位的 CF 与下丘记录部位的 CF 相近时, 刺激皮层并不改变下丘神经元的可塑性, 而当两者的 CF 相差较大时, 下丘神经元就失去了对 CF、MT 的正确判断, 其 FTC 形状也发生改变^[4]。不过, 下丘本身也有维持自身频率调节可塑性的机制。不同反应类型的下丘神经元可反映输入的局部兴奋性和抑制性信息。

3.2 听皮层对短声的反应特性

在初级听皮层神经元对快速率与慢速率的辨别实验研究中发现, 皮层神经元对短声刺激同时表现出同步与非同步反应。给声速率 < 100 Hz 时, 神经元放电数目随着给声速率增加, 且同步性较好^[5]。Imaizumi 等^[6]实验结果表明, 初级听皮层神经元在刺激声频率 < 30 Hz 时表现出很好的同步化反应, 而这种反应机制为慢速率时由放电时间编码, 而快速率时由神经元

的放电率编码^[7]。在清醒绒猴中发现, 皮层神经元对重复刺激可表现出非同步化反应, 由于实验条件因素的影响, 在不同实验室中记录到这种非同步化反应的结果不尽相同^[8]。短声作为自然界中的一种基本声音, 与纯音相比, 包含了多个频率的声音, 研究 IC 听觉神经元对短声的反应, 可为了解 IC 神经元对复杂声音的反应特性提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] Casseday JH, Covey E. Frequency tuning properties of neurons in the inferior colliculus of an FM bat[J]. *J Comp Neurol*, 1992, 319(1): 34-50
- [2] Jen PH, Zhang J. The role of GABAergic inhibition on direction-dependent sharpening of frequency tuning in bat inferior collicular neurons[J]. *Brain Res*, 2000, 862(1-2): 127-137
- [3] Yan J, Suga N. Corticofugal modulation time-domain processing of biosonar information in bats[J]. *Science*, 1996, 273(5278): 1100-1103
- [4] Yan J, Zhang Y, Ehret G. Corticofugal shaping of frequency tuning curves in the central nucleus of the inferior colliculus of mice[J]. *J Neurophysiol*, 2005, 93(1): 71-83
- [5] Dong C, Qin L, Zhang X, et al. Neural responses in the primary auditory cortex of freely behaving cats while discriminating fast and slow click-trains[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25895
- [6] Imaizumi K, Priebe NJ, Sharpee TO, et al. Encoding of temporal information by timing, rate, and place in cat auditory cortex[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11531
- [7] Bendor D, Wang X. Neural coding of periodicity in marmoset auditory cortex[J]. *J Neurophysiol*, 2010, 103(4): 1809-1822
- [8] Yin P, Johnson J, O'Connor KN, et al. Coding of amplitude modulation in primary auditory Cortex[J]. *J Neurophysiol*, 2011, 105(2): 582-600

(2013-03-20 收稿 2013-06-17 修回)

(上接第 535 页)

- [3] Sunkureddi P. Gouty arthritis: understanding the disease state and management options in primary care[J]. *Adv Ther*, 2011, 28(9): 748-760
- [4] Mahmoud AM. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(7-8): 783-789
- [5] Javed H, Khan MM, Ahmad A, et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type[J]. *Neuroscience*, 2012, 210: 340-352
- [6] Umar S, Mishra NK, Pal K, et al. Protective effect of rutin in attenuation of collagen-induced arthritis in Wistar rat by inhibiting inflammation and oxidative stress[J]. *Ind J Rheumatol*, 2012, 7(4): 191-198

- [7] Ramos-Romero S, Pérez-Cano FJ, Ramiro-Puig E, et al. Cocoa intake attenuates oxidative stress associated with rat adjuvant arthritis[J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(3): 207-212
- [8] Weinberger A. Gout, uric acid metabolism, and crystal induced inflammation[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 1995, 7(4): 359-363
- [9] Rasool M, Varalakshmi P. Suppressive effect of Withania somnifera root powder on experimental gouty arthritis: an in vivo and in vitro study[J]. *Chem Biol Interact*, 2006, 164(3): 174-180
- [10] Sahin E, Gümüşlü S. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats; comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold)[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 34(5-6): 425-431

(2013-03-26 收稿 2013-04-25 修回)