

· 基础研究 ·

痛风宁含药血清对尿酸盐诱导 THP-1 中 NALP3 炎性体相关蛋白及炎症因子表达的影响

苏友新^{1,2} 滕方舟² 蔡唐彦³ 郭洁梅^{1,3} 李保林² 王建辉³ 朱亚菊³ 赖兴泉³ 黄露露³ 张艺强³

摘要 目的 通过检测痛风宁含药血清对尿酸盐(monosodium urate, MSU)诱导人单核细胞株 THP-1(human monocytic cell line, THP-1)中 NALP3 炎性体相关蛋白与 mRNA 及上清液中 IL-1 β 、PGE₂表达的影响,探讨痛风宁对痛风性关节炎的抗炎机制。**方法** 制备低、中、高剂量痛风宁含药血清。将 THP-1 随机分为空白组和 MSU 干预组,MSU 干预组予 200 mg/L MSU 混悬液诱导 12 h 建立炎症细胞模型,模型鉴定成功后采用随机数字表法分为模型组及低、中、高剂量痛风宁含药血清组(以下简称低、中、高剂量痛风宁组)、阳性对照组,分别予 10% 空白血清,10% 低、中、高剂量痛风宁含药血清,10% 空白血清 + Caspase-1 抑制剂干预,无 MSU 干预的空白组予 10% 空白血清干预。24 h 后,离心收集各组 THP-1 及细胞上清液。采用 ELISA 检测各组细胞上清液中 IL-1 β 、PGE₂含量,Western Blot、RT-qPCR 分别检测各组 THP-1 中 NALP3、Caspase-1、ASC 蛋白及 mRNA 表达。**结果** 与空白组比较,模型组 NALP3、Caspase-1、ASC 蛋白与 mRNA 表达及 IL-1 β 、PGE₂含量均升高($P < 0.01$);各剂量痛风宁组所有指标均低于模型组及阳性对照组($P < 0.01$),同时低、高剂量痛风宁组所有指标水平均高于中剂量痛风宁组($P < 0.05$, $P < 0.01$);阳性对照组 Caspase-1 蛋白表达及 IL-1 β 、PGE₂含量低于模型组($P < 0.01$),Caspase-1 mRNA、NALP3、ASC 蛋白及 mRNA 表达与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 痛风宁对 AGA 的抗炎机制可能与抑制 NALP3 炎性体相关蛋白及 mRNA 表达,减少炎症因子 IL-1 β 、PGE₂的产生有关。

关键词 痛风宁含药血清;尿酸盐;THP-1 细胞株;NALP3 炎性体;炎症因子

Effects of Serum Containing Tongfengning on the Expression of NALP3 Inflammasome Related Proteins and Inflammatory Cytokines in THP-1 Induced by Uric Acid SU You-xin^{1,2}, TENG Fang-zhou², CAI Tang-yan³, GUO Jie-mei^{1,3}, LI Bao-lin², WANG Jian-hui³, ZHU Ya-ju³, LAI Xing-quan³, HUANG Lu-lu³, and ZHANG Yi-qiang³ 1 Fujian Health College, Fuzhou (350101); 2 College of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 3 College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122)

ABSTRACT Objective To explore the anti-inflammatory mechanism of Tongfengning on gouty arthritis by detecting the effects of serum containing Tongfengning on the expression of NALP3 inflammasome related protein and mRNA and the levels of IL-1 β , PGE₂ in human monocytic cell line THP-1 induced by monosodium urate (MSU). **Methods** The low, medium, high dose serum containing Tongfengning were prepared. THP-1 was randomly divided into blank group and MSU intervention group. 200 mg/L MSU suspension induced the MSU intervention group for 12 h to establish the cell model of inflammation. After the successful identification of the model, THP-1 in the MSU intervention group was randomly divided into model group and low, medium, high dose serum containing Tongfengning group and positive control group. These groups respectively received 10% blank serum, 10% low, 10% medium, 10% high dose serum containing Tongfengning, 10% blank serum plus Caspase-1 inhibitor intervention, the blank group without MSU intervention received 10% blank serum in-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81473495)

作者单位:1. 福建卫生职业技术学院(福州 350101); 2. 福建中医药大学中医学院(福州 350122); 3. 福建中医药大学康复医学院(福州 350122)

通讯作者:苏友新, Tel: 0591-22869933, E-mail: suyouxin777@hotmail.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20181119.265

tervention. After intervention for 24 h, THP-1 and cell supernatant were collected by centrifugation. ELISA was used to detect the levels of IL-1 β and PGE₂ in cell supernatant of all groups. Western Blot and RT-qPCR were used respectively to detect the protein and mRNA expression of NALP3, Caspase-1, ASC in THP-1 of all the groups. Results Compared with the blank group, the protein and mRNA expression of NALP3, Caspase-1, ASC and the levels of IL-1 β , PGE₂ in the model group were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group and the positive control group, the levels of all indexes in each dose serum containing Tongfengning groups were decreased ($P < 0.01$). The levels of all indexes in the low and high dose serum containing Tongfengning groups were higher than those in the medium dose serum containing Tongfengning group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of Caspase-1 protein and levels of IL-1 β , PGE₂ in the positive control group were lower than those in the model group ($P < 0.01$), and there was no significant difference in the expression of Caspase-1 mRNA, NALP3, ASC protein and mRNA between the two groups ($P > 0.05$). Conclusion The anti-inflammatory mechanism of Tongfengning on AGA may be related to inhibiting the expression of NALP3 inflammasome related protein and mRNA, decreasing the levels of inflammatory cytokines IL-1 β and PGE₂.

KEYWORDS serum containing Tongfengning; monosodium urate; THP-1 cell line; NALP3 inflammasome; inflammatory cytokines

急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis, AGA) 是由于血尿酸浓度持续增高, 导致尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 晶体析出并沉积于关节软骨、滑膜及周围组织, 刺激滑膜内衬细胞和白细胞, 引起多种炎症级联反应而出现关节红肿热痛等急性炎症表现。研究表明, AGA 的关键病理环节是 MSU 晶体激活单核细胞中核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (natch domain-, leucine-rich repeat-, and PYD-containing protein 3, NALP3) 炎性体^[1]。NALP3 炎性体是由 NALP3、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1 (cysteine-containing aspartate-specific proteases 1, Caspase-1) 和凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis associated speck-like protein containing, ASC) 3 个蛋白构成^[2], 当内源性危险信号 (如沉积的 MSU 晶体) 被 NALP3 蛋白识别时, 会促使 NALP3 蛋白构象发生改变, 并与 ASC 及无活性的 Caspase-1 蛋白结合成 NALP3 炎性体^[3]。而无活性的 Caspase-1 在 NALP3 炎性体分子平台中可通过自身催化加工成二聚体, 再进一步形成四聚体, 形成有活性的 Caspase-1^[4]。NALP3 炎性体中活化后的 Caspase-1 再将无活性的 pro-IL-1 β 剪切成有活性的 IL-1 β ^[5], 而 IL-1 β 又可激活 COX-2 合成 PGE₂, 最终诱发痛风急性炎症反应^[6]。研究已证实, 经 MSU 晶体诱导后的人单核细胞株 THP-1 (human monocytic cell line THP-1, 以下简称 THP-1) 可以出现类似 AGA 炎症状态的功能与形态改变, 如细胞增殖加快, 可在细胞上清液中检测到 IL-1 β , 这种刺激后的 THP-1 可被人为干预, 因此常被作为研究痛风性关节炎的细

胞模型^[7,8]。

痛风宁是治疗痛风的效验方, 前期临床研究表明, 其可显著降低急、慢性痛风性关节炎患者的血尿酸水平、减轻病变关节局部炎症、改善关节活动功能^[9-11]; 实验研究表明其可抑制 AGA 动物模型关节液中 PGE₂、IL-8 的分泌与释放^[12]。既然现代医学已明确 NALP3 炎性体在 AGA 中起重要作用, 那么痛风宁对 AGA 的抗炎效果是否涉及其对 NALP3 炎性体相关蛋白表达及炎症因子分泌等环节的影响? 鉴于此, 本研究通过观察不同剂量痛风宁含药血清对 MSU 诱导的 THP-1 中 NALP3 炎性体相关蛋白与其 mRNA 以及上清液中 IL-1 β 、PGE₂ 表达的影响, 以在细胞分子水平阐明痛风宁对痛风性关节炎的抗炎机制。

材料与方法

1 动物及细胞株 16 只普通级 3 月龄健康新西兰大白兔, 体重为 1.5~2.0 kg, 雌雄各半。由上海松江松联实验动物场提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2012-0011。委托福建中医药大学实验动物中心代购并饲养, 实验动物使用许可证号: SYXK (闽) 2014-0006。本实验经福建中医药大学动物伦理委员会批准, No. 福利伦理审查号福中医[2017]伦理审字第(025)号。THP-1 细胞株 (细胞浓度为 1×10^4 /mL, 江苏齐氏生物科技有限公司, 批号: 7-1103)。

2 实验药物 痛风宁全方由土茯苓、萆薢、丹参、川牛膝、秦艽、肿节风、泽泻、金钱草、苍术、黄柏, 按 10:5:5:4:3:5:5:7:3:2 比例组成, 中药饮片由福建

中医药大学国医堂提供。用旋转蒸发仪浓缩成含生药 1 g/mL 的药液,高温高压后灭菌、密封,于 4 ℃ 保存。

3 主要试剂及仪器 MSU 晶体(美国 Sigma 公司,批号:1198-77-2);Caspase-1 抑制剂 Z-YVAD-FMK(美国 ApexBio Technology 公司,批号:A8955);RPMI-1640 培养基(美国 Thermo Scientific 公司,批号:03717);胎牛血清(FBS,澳洲 ExCell Bio 公司,批号:11G292);PGE₂ ELISA 试剂盒(上海西唐科技有限公司,批号:F0229);ChamQ SYBR qPCR Master Mix、RNA Isolater Total RNA Extraction Reagent(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:7E231F8,7E211D8);兔抗人 NALP3 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA3677);IL-1 β ELISA 试剂盒、兔抗人 Caspase-1 单克隆抗体、兔抗人 ASC 单克隆抗体、 β -actin 单克隆抗体、HRP 羊抗兔 IgG、HRP 羊抗鼠 IgG(美国 Proteintech Group 公司,批号:20170712,00053015,00055889,10004156,20000003,20000002);ECL Star 化学发光试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物研究所,批号:041818180518,112217171213)。

光学显微镜(DM4000B-LED,德国 Leica 公司);低速离心机(TDZ4A-WS,湖南湘仪仪器有限公司);低温高速离心机(64R,美国 Beckman 公司);旋转蒸发仪(RE-52AA,上海亚荣生化仪器厂);PCR 扩增仪(PE9600,美国 PE 公司);7500 Real-Time PCR 仪(ABI7500,美国 ABI 公司);恒温金属浴(JS-400A,德国 Eppendorf 公司);电泳仪、半干转印系统、化学发光成像系统(PowerPacTM、690BR006827、ChemiDocXRS,美国 Bio-Rad 公司)。

4 痛风宁含药血清的制备 16 只大白兔适应性喂养 1 周后,按照随机数字表法分为空白组及低、中、高剂量痛风宁组,每组 4 只。根据人与动物体表面积换算^[13],低、中、高剂量痛风宁组分别予痛风宁药液 4.0425、8.085、16.17 mL/(kg·d)药量灌胃,每天分 2 次给药,连续 3 天。于末次灌胃 1 h,用 10% 水合氯醛 5 mL/kg 行腹腔注射麻醉后进行腹主动脉采血。空白组不予灌胃,同时采血。经离心获得血清,灭活后于 -20 ℃ 保存。

5 THP-1 培养液的制备

5.1 10% FBS 制备 RPMI-1640 培养基 90 mL、FBS 10 mL、双抗 1 mL。

5.2 10% 空白血清制备 RPMI-1640 培养基

90 mL、空白血清 10 mL、双抗 1 mL。

5.3 10% 低、中、高剂量痛风宁含药血清制备 RPMI-1640 培养基 90 mL、低、中、高剂量痛风宁含药血清 10 mL、双抗 1 mL。

6 MSU 混悬液的制备 用电子天平称取 20 mg MSU 晶体,加入 1 mL 吐温 80 并用 RPMI-1640 培养基定容至 100 mL,用磁力搅拌器加热搅拌至晶体完全溶解,制成浓度为 200 mg/L MSU 混悬液。高压灭菌、密封,于 4 ℃ 保存备用。

7 THP-1 的培养 从液氮中取出 THP-1 细胞株冻存管,投入 37 ℃ 水浴锅中并迅速晃动冻存管至冻存液溶解。将细胞冻存悬液转移至离心管中,加入 6 mL 10% FBS,混匀后以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,再加入 6 mL 10% FBS,混匀后将细胞悬液转移至培养瓶。于 37 ℃、5% CO₂ 培养,次日更换培养液继续培养。待 THP-1 悬浮生长至约 90% 时予 1:2 传代。

8 THP-1 的干预 取 6 瓶处于对数生长期的第三代 THP-1,采用随机数字表法分为空白组 1 瓶和 MSU 干预组 5 瓶。MSU 干预组采用浓度为 200 mg/L MSU 混悬液诱导炎症细胞模型,于 12 h 后通过显微镜镜下观察可见大部分 THP-1 细胞形状呈类球形,部分细胞形状不规则且细胞边界不清晰,在 MSU 晶体周围出现 THP-1 细胞簇拥、丛集现象,并检测细胞上清液中 IL-1 β 、PGE₂ 的含量以进行模型鉴定^[14],当 IL-1 β > 6 ng/L, PGE₂ > 200 ng/L 时视为模型构建成功。模型鉴定成功后再随机分为模型组、低、中、高剂量痛风宁组、阳性对照组。分别用 10% 空白血清,10% 低、中、高剂量痛风宁含药血清及 10% 空白血清 + 5 μ L 1 mg/mL Caspase-1 抑制剂 Z-YVAD-FMK 的培养液对模型组、低、中、高剂量痛风宁组及阳性对照组的 THP-1 进行干预,未用 MSU 干预的空白组同步用 10% 空白血清干预。24 h 后 1 500 r/min 离心 5 min,收集 THP-1 及其上清液。

9 检测指标及方法

9.1 THP-1 细胞上清液中 IL-1 β 、PGE₂ 含量的检测 采用 ELISA 检测 THP-1 细胞上清液中 IL-1 β 、PGE₂ 的含量,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,于 450 nm 处检测吸光度(OD 值),根据说明书绘制标准曲线,由标准曲线公式计算细胞上清液中 IL-1 β 和 PGE₂ 的含量。

9.2 THP-1 中 NALP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达检测 (1) 蛋白提取:收集 THP-1,按每 1 $\times$ 10⁶ 个细胞加入 200 μ L 裂解液,于冰上裂解 30 min,

4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。(2) 总蛋白浓度测定: 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书操作, 计算蛋白浓度。(3) 蛋白变性、上样: 按蛋白样品体积: 蛋白上样缓冲液体积(×6)=5:1 混匀, 100 ℃ 金属浴 5 min。根据蛋白样品浓度计算上样体积, 依次在凝胶泳道内上样, 两边各加一孔 2 μL Marker。(4) 电泳: 安装电泳仪装置, 设置电泳条件为 20 V 10 min, 60 V 20 min, 100 V 80 min。(5) 转膜: 切取目的蛋白胶条, 甲醇活化 PVDF 膜 5 min, 将胶条、PVDF 膜及厚滤纸浸泡于转膜液中; 依次放置厚滤纸、PVDF 膜、胶条、厚滤纸, 运用半干转印系统进行转膜。(6) 封闭: 转膜后, TBST 洗涤 PVDF 膜 5 min, 置于封闭液中, 摇床室温孵育 2 h。(7) 一抗孵育: 封闭后, TBST 洗涤 PVDF 膜 10 min, 置于一抗工作液中(兔抗大鼠 NALP3 单克隆抗体 1:400, 兔抗大鼠 Caspase-1 单克隆抗体 1:5 000, 兔抗大鼠 ASC 单克隆抗体 1:200, β-actin 单克隆抗体 1:5 000), 摇床 4 ℃ 孵育过夜。(8) 二抗孵育: 一抗孵育后, 用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min, 置于二抗工作液中(HRP 羊抗兔 IgG 1:10 000, HRP 羊抗鼠 IgG 1:10 000), 摇床室温孵育 1 h。(9) 显影: 二抗孵育后, 用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。根据 A 液: B 液=1:1 配制显影液, 将 PVDF 膜置于化学发光成像仪上, 每条 PVDF 膜滴加 200 μL 显影液, 室温反应 1 min。设置 Image Lab 软件程序对条带进行成像记录, 重复检测两次, 对条带灰度体积取平均值。

9.3 THP-1 中 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达检测 (1) 引物设计及合成: 从 Gene bank 中查找 NALP3、Caspase-1、ASC 目的基因的 CDS 序列, 运用 Primer 5.0 软件设计引物, 并委托福建尚亚生物工程有限公司进行引物序列合成(见表 1)。(2) 总 RNA 提取: 收集 THP-1 于 EP 管, 加入 1 mL Trizol 并吹打至无明显颗粒后室温静置 10 min。加入 200 μL 氯仿, 剧烈震荡 15 s, 混匀成乳浊液, 室温静置 10 min。4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min, 吸取 600 μL 上层水相至新 EP 管中。加入 600 μL 预冷的异丙醇, 上下颠倒混匀, -20 ℃ 静置 30 min。4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 加入 1 mL DEPC 水配制的 75% 乙醇, 充分洗涤管壁, 并轻弹管底使 RNA 沉淀悬浮。4 ℃、13 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入 25 μL DEPC 水, 吹打使沉淀溶解, 即为总 RNA 溶液。(3) 总 RNA 浓度检测: 加 1 μL DEPC 水在紫外分光光度计的测样台上进行仪

器调零。加 1 μL RNA 样本进行测量, 记录 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。计算 RNA 浓度, 根据每孔加 2 000 μg 计算加样体积, RNA 样品于 -80 ℃ 保存。(4) cDNA 合成: RNA 样本于冰上解冻后混匀, 4 ℃、13 000 r/min 离心 1 min。向各 EP 管中依次加入各组 RNA 样本, 用 ddH₂O 定容至 18 μL, 再每管加入 6 μL dNTP Mixture, 混匀后放入 PCR 仪, 42 ℃ 2 min。每管依次加入 6 μL 5×RT Buffer, 放入 PCR 仪, 50 ℃ 15 min, 85 ℃ 2 min。每管依次加入 30 μL ddH₂O。(5) 实时荧光定量 PCR 检测: 将 RT-qPCR 反应体系(见表 2)依次加入八联管中, 每个样本均做 2 个复孔。放入 PCR 扩增仪中, 设置反应条件为 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 扩增 40 个循环。以 β-actin 为内参照, 通过 Ct 值, 计算 $\Delta Ct, 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 并分析基因相对表达量。

表 1 NALP3、Caspase-1、ASC 及 β-actin 基因的引物序列

基因	基因引物序列	引物大小 (bp)
NALP3	上游引物 5'-TACATCTCCTTGGTCCTCAGCAG-3'	295
	下游引物 5'-GCAGGTTACACTGTGGATTCTTG-3'	
Caspase-1	上游引物 5'-CAAATGCCTTCCCGAATACC-3'	268
	下游引物 5'-TAATGGACAAGTCAAGCCGC-3'	
ASC	上游引物 5'-TGAAGGTCCTGACGGATGAG-3'	198
	下游引物 5'-TTAGTGTGCTGGGAAGGAG-3'	
β-actin	上游引物 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	87
	下游引物 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	

表 2 实时荧光定量 PCR 反应体系

组成成分	体积(μL)
2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix	10.0
上游引物	0.5
下游引物	0.5
ddH ₂ O	8.0
cDNA	1.0

10 统计学方法 采用统计软件 SPSS 22.0 对实验数据进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 THP-1 上清液中 IL-1β、PGE₂ 含量比较 (表 3) 与空白组比较, 模型组 IL-1β、PGE₂ 含量增多(P<0.01); 与模型组比较, 各剂量痛风宁组及阳性对照组 IL-1β、PGE₂ 含量减少(P<0.01); 各剂量痛风宁组 IL-1β、PGE₂ 含量均低于阳性对照组(P<0.01); 低、高剂量痛风宁组 IL-1β、PGE₂ 含量高于中剂量痛风宁组(P<0.05, P<0.01)。

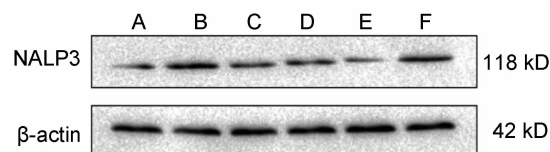
表 3 各组 THP-1 上清液 IL-1 β 和 PGE₂ 含量比较

(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β	PGE ₂
空白	3	1.923 9 $\pm$ 0.359 3	19.764 9 $\pm$ 2.809 3
模型	3	10.677 0 $\pm$ 0.912 0*	205.866 7 $\pm$ 5.387 7*
低剂量痛风宁	3	3.779 2 $\pm$ 0.127 0 $\Delta^{\Delta}\bigcirc\bigcirc$	74.192 0 $\pm$ 1.037 5 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$
中剂量痛风宁	3	2.513 4 $\pm$ 0.108 2 Δ^{Δ}	60.879 0 $\pm$ 2.275 2 Δ^{Δ}
高剂量痛风宁	3	3.243 1 $\pm$ 0.083 7 $\Delta^{\Delta}\bigcirc\bigcirc$	77.841 3 $\pm$ 0.577 4 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$
阳性对照	3	4.743 3 $\pm$ 0.087 0 Δ	88.519 0 $\pm$ 1.178 7 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与阳性对照组比较, $\Delta^{\Delta} P < 0.01$;与中剂量痛风宁组比较, $\bigcirc P < 0.05$, $\bigcirc\bigcirc P < 0.01$

2 各组 THP-1 中 NALP3、Caspase-1 及 ASC 蛋白表达比较(表 4,图 1~3) 各组均可见 NALP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达;与空白组比较,模型组 NALP3、Caspase-1 及 ASC 蛋白表达均升高($P < 0.01$);与模型组比较,各剂量痛风宁组 NALP3、Caspase-1 及 ASC 蛋白表达均降低($P < 0.01$);阳性对照组 Caspase-1 蛋白表达低于模型组($P < 0.01$),但 NALP3、ASC 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$);各剂量痛风宁组 NALP3、Caspase-1 及 ASC 蛋白表达均低于阳性对照组($P < 0.01$);低、高剂量痛风宁组则均高于中剂量痛风宁组($P < 0.01$)。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为低剂量痛风宁组;D 为中剂量痛风宁组;E 为高剂量痛风宁组;F 为阳性对照组;下同

图 1 各组 THP-1 中 NALP3 蛋白表达比较

表 4 各组 THP-1 中 NALP3 炎性体相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NALP3/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	ASC/ β -actin
空白	3	0.351 6 $\pm$ 0.043 6	0.272 7 $\pm$ 0.005 5	0.161 0 $\pm$ 0.017 6
模型	3	1.490 5 $\pm$ 0.026 5*	1.379 1 $\pm$ 0.076 4*	1.247 9 $\pm$ 0.039 0*
低剂量痛风宁	3	0.560 5 $\pm$ 0.015 3 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$	0.342 2 $\pm$ 0.020 8 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$	0.568 3 $\pm$ 0.036 5 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$
中剂量痛风宁	3	0.459 9 $\pm$ 0.030 6 Δ^{Δ}	0.286 7 $\pm$ 0.025 2 Δ^{Δ}	0.310 2 $\pm$ 0.016 9 Δ^{Δ}
高剂量痛风宁	3	0.714 4 $\pm$ 0.020 0 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$	0.544 8 $\pm$ 0.036 1 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$	0.488 6 $\pm$ 0.014 0 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$
阳性对照	3	1.418 6 $\pm$ 0.015 3	0.784 9 $\pm$ 0.050 6 Δ	1.143 1 $\pm$ 0.052 7

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与阳性对照组比较, $\Delta^{\Delta} P < 0.01$;与中剂量痛风宁组比较, $\bigcirc P < 0.01$

表 5 各组 THP-1 中 NALP3 炎性体相关蛋白 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NALP3	Caspase-1	ASC
空白	3	0.197 8 $\pm$ 0.001 6	0.154 2 $\pm$ 0.008 9	0.130 4 $\pm$ 0.007 4
模型	3	0.744 8 $\pm$ 0.039 7*	0.982 3 $\pm$ 0.036 8*	0.833 2 $\pm$ 0.051 3*
低剂量痛风宁	3	0.386 7 $\pm$ 0.012 3 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$	0.440 1 $\pm$ 0.022 2 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$	0.418 1 $\pm$ 0.034 9 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$
中剂量痛风宁	3	0.359 1 $\pm$ 0.033 5 Δ^{Δ}	0.308 4 $\pm$ 0.017 9 Δ^{Δ}	0.260 7 $\pm$ 0.014 8 Δ^{Δ}
高剂量痛风宁	3	0.507 8 $\pm$ 0.058 9 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$	0.473 9 $\pm$ 0.076 5 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$	0.516 9 $\pm$ 0.037 4 $\Delta^{\Delta}\bigcirc$
阳性对照	3	0.636 4 $\pm$ 0.024 0	1.125 1 $\pm$ 0.021 6	0.764 4 $\pm$ 0.021 0

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与阳性对照组比较, $\Delta^{\Delta} P < 0.01$;与中剂量痛风宁组比较, $\bigcirc P < 0.01$

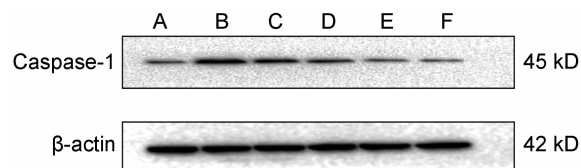


图 2 各组 THP-1 中 Caspase-1 蛋白表达比较

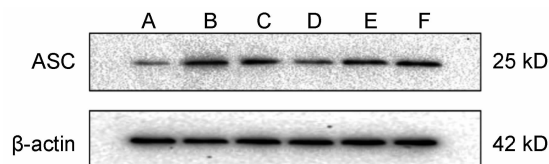


图 3 各组 THP-1 中 ASC 蛋白表达比较

3 各组 THP-1 中 NALP3、Caspase-1 及 ASC mRNA 表达比较(表 5) 各组均可见 NALP3、Caspase-1、ASC mRNA 表达;与空白组比较,模型组 NALP3、Caspase-1 及 ASC mRNA 表达均升高($P < 0.01$);与模型组比较,各剂量痛风宁组 NALP3、Caspase-1 及 ASC mRNA 表达均降低($P < 0.01$);各剂量痛风宁组 mRNA 表达均低于阳性对照组($P < 0.01$);低、高剂量痛风宁组 NALP3、Caspase-1 及 ASC mRNA 表达均高于中剂量痛风宁组($P < 0.01$)。

讨 论

AGA 主要表现为受累关节剧烈的红肿热痛、活动受限,反复发作会造成关节畸形^[15]。现代医学研究发现,NALP3 炎性体在 AGA 发病过程中发挥着关键作用。有学者将 MSU 晶体分别干预正常小鼠、NALP3、Caspase-1、ASC 基因缺陷小鼠的巨噬细胞,

结果发现各基因缺陷小鼠巨噬细胞中 IL-1 β 含量均明显低于正常小鼠,证实了这 3 个基因均与 MSU 晶体诱发的炎症反应关系密切^[16]。秋水仙碱是 AGA 诊疗指南推荐药物,药理研究发现,其可抑制 MSU 晶体诱导的 THP-1 中 NALP3 炎性体 Caspase-1 蛋白的活化,降低 IL-1 β 的活化和释放^[17],这提示了 Caspase-1 蛋白的活化是 AGA 发病的关键。

THP-1 是从白血病患者血液分离的单核细胞而构建的细胞株,Di Giovine FS 等^[18]研究发现,当 MSU 晶体刺激 THP-1 时,可诱发 IL-1 β 等促炎因子的释放,故认为 THP-1 是 AGA 炎症反应的关键细胞。Martinon F 等^[4]用 Caspase-1 抑制剂干预 MSU 晶体刺激的 THP-1,发现其可完全阻断 MSU 晶体诱导 IL-1 β 产生的途径。还有研究表明,Caspase-1 抑制剂可通过阻断 Caspase-1 蛋白的活化来减少 IL-1 β 的产生^[19,20]。因此本实验采用 MSU 晶体混悬液建立 THP-1 炎症细胞模型,并以 Caspase-1 抑制剂 Z-YVAD-fmk 作为阳性对照组干预药物。

本实验结果表明,Caspase-1 抑制剂 Z-YVAD-fmk 干预的阳性对照组中 Caspase-1 蛋白表达下降,而 Caspase-1 mRNA、NALP3、ASC 蛋白及 mRNA 表达与模型组比差异无统计学意义,说明 Caspase-1 抑制剂仅阻断了 Caspase-1 蛋白的活化而对 Caspase-1 基因、NALP3、ASC 蛋白及基因表达无明显抑制作用。同时该组中 IL-1 β 、PGE₂ 含量降低,说明了 Caspase-1 蛋白的活化是 IL-1 β 、PGE₂ 炎症因子分泌和释放的关键,这与许多学者研究结果一致^[4,20,21]。而各剂量痛风宁含药血清可抑制 THP-1 中 NALP3 炎性体 3 个相关蛋白及 mRNA 表达,明显降低上清液中 IL-1 β 、PGE₂ 含量,提示痛风宁的抗炎效果可能涉及其对 NALP3 炎性体相关蛋白表达及炎症因子释放等多环节、多靶点的调控。从痛风宁的组方分析,方中苍术、土茯苓、黄柏三药配伍,可清湿热、泄浊毒,针对痛风“内湿致痹”的病机特点;肿节风、川牛膝共奏利湿泄浊、消肿止痛,可加强清除湿浊的作用,又可针对湿浊痹阻肢节所致关节肿痛;泽泻、萆薢分清泌浊,导湿浊之邪自小便排出,金钱草、秦艽清湿热,又辅助土茯苓、肿节风散结解毒,丹参合川牛膝、肿节风以活血化瘀、散结止痛。以上诸药合用,共奏利湿浊、清湿热、消肿痛之功效。从现代药理学研究分析,本方多味中药均具有抗炎作用,可减轻 AGA 的炎症反应。例如土茯苓有效成分总黄酮具有抗炎作用,可降低 AGA 模型大鼠滑膜组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子含量,且可抑制 NALP3 炎性体相关蛋白及 mRNA 的表

达^[22]。金钱草中的槲皮素可改善 AGA 模型大鼠的炎症细胞浸润,降低 IL-1 β 、TNF- α 、COX-2 和 NO 等炎症因子水平,具有较强的抗炎作用^[23]。萆薢总皂苷、牛膝总皂苷均可抑制 AGA 模型大鼠血清及关节浸出液中 PGE₂、TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等炎症因子的合成,从而减轻痛风炎症^[24]。

另外,笔者发现中剂量痛风宁含药血清能更好地抑制 NALP3 炎性体相关蛋白及 mRNA 的表达,对炎症因子的抑制作用也优于低、高剂量的痛风宁含药血清。因此,笔者推测这是由于痛风宁含药血清成分较复杂,药物成分之间可能在 NALP3 炎性体干预方面存在抑制与促进两种相反的作用,会出现相互抵消现象,从而影响含药血清总体功效。低剂量痛风宁含药血清所含抑制和促进 NALP3 炎性体表达的药物成分浓度均偏低,相互抵消后对 NALP3 炎性体的抑制作用相对偏弱;中剂量痛风宁含药血清所含抑制 NALP3 炎性体的药物成分浓度较高,但促进 NALP3 炎性体的药物成分仍较低,两者作用相互抵消后,抑制 NALP3 炎性体作用仍较强,故可显著抑制 NALP3 炎性体的表达;高剂量痛风宁含药血清所含药物抑制 NALP3 炎性体表达的药物成分浓度较高,但促进 NALP3 炎性体的药物成分的浓度也较高,两者作用相互抵消后,使得抑制 NALP3 炎性体的作用反而减弱。这也提示,对于体外血清药理学的实验,药物灌胃剂量的高低与含药血清功效之间不一定成正比,含药血清某一方面功效的发挥是其含有的药物成分综合作用的结果。至于痛风宁组方中对 NALP3 炎性体干预的具体成分及各自的作用特点,还有待在今后的研究中进行探讨。同时,AGA“湿浊、湿热内蕴、痹阻肢节”的中医病机认识与尿酸盐沉积诱发 NALP3 炎性体形成、激活及相关炎症因子升高的现代发病机制认识之间的内在关联性,还有待于针对性的研究设计阐释。本研究未对 NALP3 炎性体复合蛋白进行检测,也未对痛风宁含药血清中有效成分进行筛查,将是下一步研究探讨的重点。

利益冲突:所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, et al. Innate immunity conferred by toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation [J]. Arthritis Rheum,

- 2005, 52(9): 2936–2946.
- [2] 王璐, 李璐, 陈光亮. NALP3 炎性体在痛风发病中的作用与药物治疗研究进展[J]. 生命科学, 2016, 26(3): 405–408.
 - [3] 周琦, 卢芳, 刘树民. Cryopyrin 炎性体在痛风性关节炎发病中的作用机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(4): 444–447.
 - [4] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. Nature, 2006, 440(7081): 237–241.
 - [5] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis[J]. Nat Immunol, 2009, 10(3): 241–247.
 - [6] Lee EG, Lee SI, Chae HJ, et al. Adrenomedullin inhibits IL-1 β -induced rheumatoid synovial fibroblast proliferation and MMPs, COX-2 and PGE₂ production[J]. Inflammation, 2011, 34(5): 335–343.
 - [7] Pineda C, Amezcua Guerra LM, Solano C, et al. Joint and tendon subclinical involvement suggestive of gouty arthritis in asymptomatic hyperuricemia: an ultrasound controlled study[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(1): R4.
 - [8] Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(1): 2–11.
 - [9] 苏友新, 陈伟宏, 陈凡, 等. 痛风宁颗粒对 30 例慢性痛风性关节炎患者血尿酸、血沉、血脂及血流变的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2005, 13(1): 16–18.
 - [10] 陈伟宏, 苏友新, 许书亮, 等. 痛风宁冲剂治疗急性痛风性关节炎 104 例临床观察[J]. 福建中医学院学报, 2001, 11(3): 26–28.
 - [11] 苏友新, 刘晓平, 郑良朴, 等. 痛风宁颗粒对尿酸钠致新西兰兔痛风性关节炎模型关节液 IL-1 β 、TNF- α 的影响[J]. 福建中医药, 2008, 39(4): 45–46.
 - [12] 周必洪, 傅玉辉, 闫虎, 等. 痛风宁颗粒对急性痛风性关节炎模型大鼠关节局部炎症因子及 TLRs/MyD88 的影响[J]. 福建中医药, 2013, 44(6): 51–53.
 - [13] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1168–1170.
 - [14] 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.
 - [15] 蒋明, 朱立平, 林孝义, 等主编. 风湿病学[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 1469–1471.
 - [16] Pope RM, Tschoep J. The role of interleukin-1 and the inflammasome in gout: implications for therapy[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(10): 3183–3188.
 - [17] Nuki G. Colchicine: its mechanism of action and efficacy crystal-induced inflammation[J]. Curr Rheumatol Rep, 2008, 10(3): 218–227.
 - [18] Di Giovine FS, Malawista SE, Nuki G, et al. Interleukin 1 (IL-1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL-1[J]. J Immunol, 1987, 138(10): 3213–3218.
 - [19] Mao Z, Liu C, Ji S, et al. The NLRP3 Inflammasome is Involved in the Pathogenesis of Parkinson's Disease in Rats[J]. Neurochem Res, 2017, 42(4): 1104–1115.
 - [20] Zhang XH, Zhu RM, Xu WA, et al. Therapeutic effects of Caspase-1 inhibitors on acute lung injury in experimental severe acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(4): 623–627.
 - [21] Zhang F, Wang L, Wang JJ, et al. The caspase-1 inhibitor AC-YVAD-CMK attenuates acute gastric injury in mice: involvement of silencing NLRP3 inflammasome activities[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24166.
 - [22] 金晓敏, 张晓熙, 郭璐, 等. 基于 NLRP3 炎性体轴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.
 - [23] 黄敬群, 孙文娟, 王四旺, 等. 尿酸钠致急性痛风性关节炎模型大鼠与槲皮素的抗炎作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2815–2819.
 - [24] 陈光亮, 吕红霞, 王媛媛, 等. 草薢牛膝总皂苷对尿酸钠诱导的大鼠急性痛风性关节炎的防治作用[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1): 34–37.

(收稿: 2018-05-21 在线: 2019-01-03)

责任编辑: 汤 静