

玉米须黄酮提取物对痛风性关节炎大鼠的影响

林贺¹, 董金香¹, 邱智东¹, 律广富², 张婧卓², 常志达², 林喆²

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117)

(2. 长春中医药大学中药与生物工程研究开发中心, 吉林长春 130117)

摘要: 研究了玉米须黄酮提取物对尿酸钠所致大鼠痛风性关节炎的影响。给药组大鼠灌胃给予玉米须黄酮提取物 (1 g/kg、0.5 g/kg、0.25 g/kg), 连续 8 天, 空白及模型对照组灌胃给予等体积蒸馏水, 第 5 天灌胃 1 小时后于模型及给药组大鼠右踝关节腔内注射尿酸钠溶液 2.5 mg/mL, 诱导痛风性关节炎的发生, 72 小时后测定大鼠踝关节肿胀度及血浆中白细胞介素 1 α (IL-1 α)、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、细胞间粘附分子 1 (ICAM-1) 及基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) 的水平, 并进行大鼠右踝关节病理组织学检查。与模型对照组比较, 给予玉米须黄酮提取物后, 其高、中剂量组 (1 g/kg、0.5 g/kg) 的踝关节肿胀度均明显降低 ($P < 0.01$), 血浆 IL-1 α 、IL-6、TNF- α 及血浆 ICAM-1、MMP-1 水平明显降低 ($P < 0.05$), 并且可以改善造模大鼠关节滑膜组织的病理改变。提示玉米须黄酮提取物具有较好的抗痛风性关节炎的作用。

关键词: 玉米须; 黄酮提取物; 痛风; 急性关节炎; 炎症细胞因子

文章编号: 1673-9078(2015)4-13-16

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.003

Effect of Flavonoids Extracted from Corn Silk (FESM) on Rats with Gouty Arthritis

LIN He¹, DONG Jin-xiang¹, QIU Zhi-dong¹, LV Guang-fu², ZHANG Jing-zhuo², CHANG Zhi-da², LIN Zhe²

(1. College of Pharmaceutical Science, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

(2. Research and Exploitation Center of Chinese Medicine and Bioengineering, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: The effect of flavonoids extracted from corn (*Stigma Maydis*) silk (FESM) on gouty arthritic rats was determined in this study. Rats in the treatment group were treated with different quantities of FESM (1, 0.5, and 0.25 g/kg) via gavage for 8 days; rats in the control and model groups were treated with the same amount of distilled water. On the fifth day, rats from the treatment and model groups were injected with sodium urate (2.5 mg/mL) in the right ankle joint cavity one hour after gavage, in order to induce gouty arthritis. The extent of swelling in the right ankle joint, and plasma interleukin 1 α (IL-1 α), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) contents were measured after 72 hours. The right ankle joint was also subjected to an histopathological examination. Rats belonging to the groups treated with high and moderate doses of FESM (1 and 0.5 g/kg) displayed significantly lower right ankle joint swelling ($P < 0.01$) and plasma IL-1 α , IL-6, TNF- α , ICAM-1, and MMP-1 content ($P < 0.05$), compared to the rats in the control group. Therefore, FESM was believed to improve the degree of pathomorphological changes in the synovial tissue of the joints. These results indicated the beneficial effect of FESM on gouty arthritis.

Key words: corn (*Stigma Maydis*) silk; flavonoid extract; gout; acute arthritis; inflammatory cytokine

痛风性关节炎是嘌呤代谢紊乱引发体内尿酸增加或尿酸排泄量减少而导致尿酸盐沉积在关节腔、滑

收稿日期: 2014-08-13

基金项目: 国家科技重大专项课题 (2009ZX09103-348); 吉林省自然科学基金项目 (201115166); 吉林省中医药科研重点项目 (2011-zd03)

作者简介: 林贺 (1982-), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向: 中药资源利用与开发

通讯作者: 林喆 (1966-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药资源利用与开发

膜囊、软骨、骨质和其他组织中引起的炎症反应^[1-2]。临床中多发生于 40 岁以上的男性, 常见于拇趾的跖趾关节, 尤其是人身体远端部位如在踝部与足部关节。其发病机制普遍认为与多形核白血球有关, 痛风发作时滑膜组织和关节软骨中释放的尿酸钠结晶被关节液中的白血球吞噬^[3]。而白血球坏死崩解释放出蛋白酶和炎症因子进入滑液。酶和炎症因子使关节中的白血球升高, 于是就有更多的吞噬了尿酸盐晶体的白血球相继破裂, 释放出酶和炎症成分, 形成恶性循环, 进

一步导致急性滑膜炎和关节软骨的破坏^[4]。而 IL-1、IL-6 和 TNF- α 在痛风性关节炎的炎症介导过程中起着至关重要的作用,是炎症反应的关键调节剂^[5]。其中 IL-1 是调节炎症反应的始动因素,是炎症因子网络中的第一个细胞因子,它又能促使 IL-6 生成的增加和提高 TNF- α 的活性。TNF- α 还可以促进中性粒细胞的聚集,使中性粒细胞产生多种炎性介质,这些炎症因子相互作用和影响,从而加重组织损伤和炎症反应^[6]。此时,受炎性因子 IL-1、TNF 等刺激,细胞粘附因子 ICAM-1 的表达就会相应增强^[7],并且随着结缔组织细胞发生崩解,酶激活物激活胶原酶 (MMP-1、MMP-8、MMP-13),使胶原酶的活性增加^[8]。近年来,随着人们生活方式的改变,大量高嘌呤食物被摄入导致其发病率呈逐年上升趋势,但目前其治疗药物往往治标不治本,且伴有不良反应,因此天然、安全、有效的抗痛风药物越来越受到人们的关注。

玉米须(Stigma Maydis)为禾本科植物玉蜀黍 *Zea mays* L 的花柱和柱头,又名玉蜀黍蕊,是我国传统的药食兼用中药材,最早记载于《滇南本草》。玉米须味甘、淡,性平,归肾、肝、胆经。具有泄热通淋、利水消肿、清肝利胆的功效^[9]。玉米须在民间常被用于药膳、药茶中来缓解高血压、糖尿病等病症,也常作为治疗痛风的药物与其他药物配伍使用^[10]。现代研究表明,玉米须中含有糖类、黄酮、矿物质元素、挥发油、生物碱、氨基酸等多种化学成分,具有利尿、提高免疫力、抗氧化、抑菌、抗肿瘤、降血糖、降血压及肝保护等药理作用^[11]。

在我国玉米产量十分丰富,是一种来源广泛,价格低廉,便于收集的药材。虽然目前对其相关的报道有很多,但由于大多数研究并不系统和深入,导致玉米须很少被当作一种具有医疗保健作用的药材而被充分利用。本研究首先从玉米须中分离得到黄酮类提取物,建立尿酸钠诱发的痛风性关节炎大鼠模型,通过关节肿胀度及炎症细胞因子水平考察玉米须黄酮提取物对痛风性关节炎大鼠的治疗作用,为玉米须进一步的研究开发提供理论依据及参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与动物

鲜玉米须产自吉林省九台市,由长春中医药大学药学院中药鉴定教研室鉴定,晾干备用。wistar 大鼠,体重 180~220 g,雄性,动物质量合格证编号: SCXK-(吉)2010-0004,购自吉林大学基础医学院动物实验中心。饲养条件:室温 20~25 °C,湿度 40~50%,动

物自由进食及饮水,自然昼夜节律,饮用水为净化水。

1.2 试剂

尿酸钠购自 sigma 公司;白细胞介素 1 α (IL-1 α)、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、细胞间粘附分子 1 (ICAM-1)、基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) ELISA 试剂盒,购自美国 R&D 试剂公司。

1.3 主要仪器

MULTISKAN FC 型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司产品;PV-200 足趾容积测量仪,成都泰盟科技有限公司产品。

1.4 试验方法

1.4.1 玉米须黄酮提取物的制备及含量测定

取玉米须药材加 8 倍量水煎煮 3 次,每次 1 小时,合并煎液,滤过,滤液浓缩至相对密度 1.10 (80 °C),6000 r/min 转速离心 30 min,取上清液,调整浓度为 0.7 g 药材/mL,以 AB-8 型大孔树脂纯化,湿法装柱,“径高比”约为 1:10,上柱浓度为 0.7 g 药材/mL,上样速度为 2 BV/h,静置吸附 2 小时,先用 5 BV 的盐酸 (pH 2) 溶液洗脱,再用 5 BV 的 50% 乙醇 (pH 10) 洗脱,洗脱速度为 2 BV/h,收集乙醇洗脱液,回收乙醇,浓缩相对密度为 1.05 (80 °C),再依次用 4 倍量乙酸乙酯和水饱和正丁醇分别萃取 3 次,合并提取液,回收溶剂,得提取物^[12]。

精密称取上述提取物 0.2 g,置锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇溶液 100 mL,称定重量,加热回流 2 小时,放冷,称重,补足减失的重量,滤过,精密移取续滤液 0.5 mL 加甲醇定容至 10 mL,摇匀,作为供试品溶液。加三氯化铝试液 5 mL,用乙醇稀释至刻度,摇匀,静置显色 15 min。另取相应的试剂,同法制备空白液。测定吸光度。并以芦丁为标准对照品绘制标准曲线,计算得出上述提取物中黄酮类化合物的含量为 52.92%^[13]。

1.4.2 模型制备

固定大鼠,将右踝关节弯曲,局部消毒后,用 6 号注射针自两骨突之间进针,除空白对照组大鼠注射生理盐水 0.2 mL 外,其余各组大鼠在右踝关节腔内注射 2.5 mg/mL 尿酸钠溶液 0.2 mL,以关节囊对侧鼓起为注入标准,诱导痛风性关节炎的发生^[14]。

1.4.3 分组及给药

60 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为空白对照组、模型对照组、阳性对照组、玉米须黄酮提取物高、中、低剂量组 (1 g/kg、0.5 g/kg、0.25

g/kg)。动物自由饲养一周之后,玉米须黄酮提取物各给药组分别灌胃给药相应剂量的玉米须黄酮提取物溶液,阳性对照组给予秋水仙碱(0.45 g/kg),空白及模型对照组给予等体积蒸馏水,连续8天,期间于第5天用药后1小时造模。

1.4.4 指标检测

试验前测定大鼠右踝关节体积,造模72小时后再次测定大鼠踝关节体积,计算踝关节肿胀度,公式:踝关节肿胀度(mL)=试验后体积(mL)-试验前体积(mL)。测定踝关节体积后麻醉大鼠,腹主动脉采血,抗凝,离心,取上清液,采用酶联免疫吸附法,测定血浆中IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、ICAM-1和MMP-1的含量。并取右侧踝关节,经10%中性福尔马林固定、5%甲酸脱钙、石蜡包埋、切片、HE染色,普通光学显微镜观察。

1.4.5 统计学分析

应用SPSS13.0统计软件,计量资料以均值 \pm 标准差表示,采用t检验进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 玉米须黄酮提取物对关节肿胀度的影响

与空白对照组比较,模型对照组的踝关节肿胀度增加,两者之间有显著性差异(P<0.01),表明模型制备成功;与模型对照组比较,阳性对照组、玉米须黄酮提取物高、中剂量组的踝关节肿胀度均明显降低,且有显著性差异(P<0.01),玉米须黄酮提取物低剂量组肿胀度有降低趋势,但无显著性差异,提示玉米须

黄酮提取物能够减轻痛风性关节炎的肿胀,可以从症状上看出对痛风性关节炎的缓解作用。见表1。

表1 玉米须黄酮提取物对踝关节肿胀程度的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 1 The effect of FESM on the extent of ankle joint swelling

in gouty arthritic rats		
组别	剂量/(g/kg)	踝关节肿胀度/mL
空白对照组	0	0.02 \pm 0.01
模型对照组	0	0.22 \pm 0.08 $\Delta\Delta$
阳性对照组	0.45(秋水仙碱)	0.02 \pm 0.01 **
高剂量组	1.0	0.07 \pm 0.03 **
中剂量组	0.5	0.10 \pm 0.06 **
低剂量组	0.25	0.17 \pm 0.03

注:与空白组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $^{**} P < 0.01$ 。

2.2 玉米须黄酮提取物对血浆炎症细胞因子的影响

与空白对照组比较,模型组的IL-1 α 、IL-6和TNF- α 水平升高,两者之间有显著性差异(P<0.01),表明模型大鼠踝关节内存在炎症反应;与模型对照组比较,阳性对照组IL-1 α 浓度降低,两者之间有显著性差异(P<0.01),玉米须黄酮提取物高、中剂量组IL-1 α 浓度降低,两者之间有明显差异(P<0.05),提示玉米须黄酮提取物能够通过降低血中炎症因子IL-1 α 、IL-6和TNF- α 的浓度,即在炎症反应的生化源头来达到抑制痛风性关节炎发生的作用。见表2。

表2 玉米须黄酮提取物对血浆炎症因子的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 2 The effect of FESM on plasma inflammatory cytokine content in control, model, and gouty arthritis-induced rats

组别	剂量/(g/kg)	IL-1 α /(Pg/mL)	IL-6/(Pg/mL)	TNF- α /(ng/L)
空白对照组	0	10.42 \pm 0.01	20.16 \pm 0.91	10.83 \pm 0.05
模型对照组	0	10.59 \pm 0.02 $\Delta\Delta$	21.34 \pm 0.35 $\Delta\Delta$	11.01 \pm 0.12 $\Delta\Delta$
阳性对照组	0.45(秋水仙碱)	10.44 \pm 0.02 **	20.73 \pm 0.54 *	10.58 \pm 0.08 *
高剂量组	1.0	10.47 \pm 0.02 *	20.96 \pm 0.20 *	10.66 \pm 0.09 *
中剂量组	0.5	10.48 \pm 0.01 *	20.99 \pm 0.59	10.86 \pm 0.30 *
低剂量组	0.25	10.57 \pm 0.17	21.19 \pm 0.34	10.88 \pm 0.06

注:与空白组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $^{**} P < 0.01$, $^* P < 0.05$ 。

2.3 玉米须黄酮提取物对血浆 ICAM-1 及 MMP-1 水平的影响

与空白对照组比较,模型对照组ICAM-1的水平升高,两者之间有显著性差异(P<0.01),模型对照组MMP-1的水平升高,两者之间有明显差异(P<0.05),

表明模型大鼠存在关节组织的损伤,出现炎症反应;与模型对照组比较,阳性对照组ICAM-1水平降低,两者之间有显著性差异(P<0.01),玉米须黄酮提取物高、中剂量组ICAM-1水平降低,且有显著性差异(P<0.05);阳性对照组MMP-1水平降低,两者之间有显著性差异(P<0.01),玉米须总黄酮提取物高剂量组ICAM-1水平降低,两者之间有明显差异(P<0.05)。

提示玉米须黄酮提取物可以通过降低 ICAM-1 及 MMP-1 的表达来降低炎症反应,缓解踝关节组织的损伤,从而达到对抗痛风性关节炎的作用。见表 3。

表 3 玉米须黄酮提取物对血浆中 ICAM-1 和 MMP-1 的影响
($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 3 The effect of FESM on plasma ICAM-1 and MMP-1 content in control, model, and gouty arthritis-induced rats

组别	剂量/(g/kg)	ICAM-1/(ng/L)	MMP-1/(μ g/L)
空白对照组	0	184.96 \pm 2.73	6.08 \pm 1.76
模型对照组	0	188.36 \pm 1.76 ^{△△}	7.47 \pm 0.12 [△]
阳性对照组	0.45(秋水仙碱)	185.41 \pm 1.63 ^{**}	7.00 \pm 0.32 ^{**}
高剂量组	1.0	186.41 \pm 1.66 [*]	7.34 \pm 0.11 [*]
中剂量组	0.5	186.72 \pm 1.50 [*]	7.37 \pm 0.16
低剂量组	0.25	187.26 \pm 1.72	7.42 \pm 0.09

注:与空白组比较,△△P<0.01,△P<0.05;与模型组比较,**P<0.01,*P<0.05。

2.4 玉米须黄酮提取物对大鼠关节病理组织学的影响

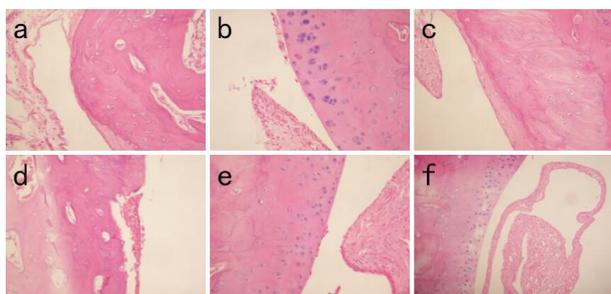


图 1 玉米须黄酮提取物对大鼠痛风性关节炎影响的病理学照片 (HE×200)

Fig.1 Histopathological images representing the effect of FESM on gouty arthritis in rats (HE×200)

注: a-空白对照组, b-模型对照组, c-阳性对照组, d-高剂量组, e-中剂量组, f-低剂量组。

大鼠踝关节病理组织学观察结果显示,正常对照组大鼠滑膜细胞排列规则,表面光滑,关节软骨面亦光滑,关节内及关节周围的软组织未见或偶见炎细胞浸润。模型对照组大鼠滑膜组织呈轻度扩张充血、水肿,可见滑膜细胞增生及明显炎细胞浸润,但未见明显关节软骨及骨组织结构破坏,关节周围可见炎细胞浸润。玉米须黄酮提取物高、中剂量组及阳性对照组大鼠滑膜组织呈轻度扩张充血、水肿,滑膜细胞轻度增生,偶见炎细胞浸润,未见明显关节软骨及骨组织结构破坏,关节周围可见少量炎细胞浸润。提示玉米须黄酮提取物可以改善痛风性关节炎大鼠踝关节炎反应所致病理组织学改变。

3 结论

本研究以玉米须黄酮提取物为研究对象,考察其对尿酸钠致大鼠痛风性关节炎模型的影响。实验结果显示,模型对照组大鼠踝关节有明显的肿胀,血浆内炎症因子(IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α)、细胞粘附因子 ICAM-1 和基质金属蛋白酶 MMP-1 水平显著高于空白组对照组,表明痛风性关节炎模型制备成功。给痛风性关节炎模型大鼠灌胃高、中剂量的玉米须黄酮提取物后,大鼠踝关节肿胀度显著降低,同时其血浆 IL-1 α 、IL-6、TNF- α 及 ICAM-1、MMP-1 水平也显著降低,并且能够改善其踝关节病理组织学改变,表明玉米须黄酮提取物具有较好的抗痛风性关节炎作用,其作用机制可能是通过抑制炎症介质因子产生和释放,从而起到缓解模型大鼠的炎症的作用。

参考文献

- [1] 潘媛,徐立,时乐,等.痛风性关节炎的发生与尿酸盐结晶沉积[J].安徽医药,2009,13(11):1305-1307
PAN Yuan, XU L, SHI Le, et al. Incidence of gouty arthritis and crystallization of uric acid sodium deposition [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2009, 13(11): 1305-1307
- [2] Gentle MJ. Sodium urate arthritis: effects on the sensory properties of articular afferents in the chicken [J]. Pain, 1997, 70(2/3): 245-251
- [3] Sabina EP, Rasool M, Mathew L, et al. 6-Shogaol inhibits monosodium urate crystal-induced inflammation--an in vivo and in vitro study [J]. Food Chem. Toxicol., 2010, 48(1): 229-235
- [4] Vlak T. Clinical features and laboratory diagnostics of uric arthritis [J]. Reumatizam. 2012, 59(2): 93-96
- [5] Steiger S, Harper JL. Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation [J]. Curr. Rheumatol. Rep., 2014, 16(1): 392
- [6] Matsukawa A, Yoshimura T, Miyamoto K, et al. Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF-A, IL-1B, IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in Lps-induced rabbit arthritis [J]. Lab. Invest., 1997, 76(5): 629-638
- [7] 孙鹞.炎症反应与白细胞迁移[J].安徽农业科学, 2011, 39(21):12863-12865
SUN Li. Inflammation and Leukocyte Migration [J]. Journal of Anhui Agri. Sci., 2011, 39(21): 12863-12865
- [8] 李荣华,聂慧,刘友章.中药治疗痛风性关节炎的作用机理研究进展[J].辽宁中医杂志,2010,37(7):1398-1401
LI Rong-hua, NEI Hui, LIU You-zhang. The effect

- mechanisms of traditional Chinese medicine in the treatment of gouty arthritis [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 37(7): 1398-1401
- [9] 肖志坚.全国中草药汇编(第2版)[M].北京:人民卫生出版社,1996
XIAO ZJ. The compilation of Chinese herbal medicine (Second Edition) [M]. Bei Jing:People's Medical Publishing House, 1996
- [10] Zhang Y, Wang JB, Wang L, et al. A study on hypoglycaemic health care function of Stigma maydis polysaccharides [J]. Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med., 2013, 10(5): 401-407
- [11] Hasanudin K, Hashim P, Mustafa S. Corn silk (stigma maydis) in healthcare: a phytochemical and pharmacological review [J]. Molecules, 2012, 17(8): 9697-9715
- [12] 景怡,景荣琴,任远,等.AB-8大孔吸附树脂分离纯化玉米须中总黄酮的研究[J].中医药学报,2010,38(1):75-78
- JING Yi, JING Rong-qin, NIE Yuan, et al. Study on the separation and purification the total flavonoids in the stigma maydis by ab-8 macroporous absorption resins [J].Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2010, 38(1): 75-78
- [13] 梁冬,高艳辉,贾艾玲,等.玉米须总黄酮醇提工艺研究[J].长春中医药大学学报,2011,27(6):1046-1047
LIANG Dong, GAO Yan-hui, JIA Ai-ling, et al. Study on extraction of total flavonoids in the stigma maydis [J]. Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2011, 27(6): 1046-1047
- [14] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint arthritis in rats provide a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents [J]. Pharm Biochem Behav, 1988, 29(3): 461-466