胡烈奎,黄鑫,袁启鹏,等. 痛风清消方通过抑制巨噬细胞 M1 极化和花生四烯酸代谢改善急性痛风性关节炎的机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2026, 36(19): 1-15.
Hu LK, Huang X, Yuan QP, et al. Study on the mechanism of Tongfeng Qingxiao Formula in ameliorating acute gouty arthritis by inhibiting macrophage M1 polarization and arachidonic acid metabolism [J]. Chin J Comp Med, 2026, 36(19): 1-15.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2026.19.001

痛风清消方通过抑制巨噬细胞 M1 极化和花生四烯酸代谢改善急性痛风性关节炎的机制研究

胡烈奎[1,2],黄　鑫[1],袁启鹏[1],马玮玮[1],吴东雨[1],李华南[3*]

(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足踝骨科,南昌　330006;
3.江西中医药大学附属医院科研科,南昌　330025)

【摘要】　目的　探讨痛风清消方通过调控巨噬细胞花生四烯酸(AA)代谢抑制巨噬细胞 M1 极化缓解痛风性关节炎(GA)的作用机制。**方法**　体外实验:采用 LPS(200 ng/mL)和 MSU(200 μg/mL)构建巨噬细胞炎症模型,采用 CCK-8 实验筛选痛风清消方最佳含药血清浓度;免疫荧光(IF)检测 iNOS、CD80、CD204、CD206 的细胞阳性率;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 CRP、IL-1β、IL-6、TNF-α、LTs、PG、5-LOX、COX-2、KAT5 水平;实时荧光定量 PCR 法检测 5-*LOX*、*COX*-2、*KAT*5 mRNA 表达量;蛋白免疫印迹(Western blot)分析检测 5-LOX、COX-2、KAT5 蛋白表达;免疫共沉淀(Co-IP)检测 KAT5 与 5-LOX、COX-2 的蛋白互作关系;分子对接技术预测蛋白间的结合能和对接结构。体内实验:采用高脂高糖饮食和人工气候箱并结合经典 Coderre 法构建急性 GA 模型。将 60 只雄性 SD 大鼠根据随机数字表法分为空白组、模型组、双氯芬酸钠组(0.03 g/kg)和痛风清消方低(11.25 g/kg)、中(22.50 g/kg)、高(45.00 g/kg)剂量组,每组 10 只,各组大鼠均给药 7 d,每天 1 次。游标卡尺测量踝关节直径评估踝关节肿胀度;苏木素-伊红(HE)染色法观察滑膜组织结构和形态变化;IF 染色评估滑膜组织 CD80、CD206 表达情况,ELISA 检测大鼠血清 CRP、IL-1β、IL-6、TNF-α 水平。**结果**　体外实验发现,与 LPS+MSU 组比较,痛风清消方组能明显下调巨噬细胞荧光 CD80、iNOS 阳性率($P<0.01$),但对 CD204、CD206 荧光阳性率无显著上调作用;与 LPS+MSU 组比较,痛风清消方显著降低巨噬细胞 CRP、IL-1β、IL-6、TNF-α、LTs、PG、5-LOX、COX-2、KAT5 水平,减少 5-LOX、COX-2、KAT5 蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),同时抑制 5-*LOX*、*COX*-2、*KAT*5 mRNA 水平($P<0.01$);此外,体外 Co-IP 实验发现 LPS+MSU 组中 KAT5 与 5-LOX、COX-2 之间存在紧密互作关系。体内实验发现,与模型组相比,痛风清消方能明显减轻 GA 大鼠踝关节肿胀度($P<0.05$, $P<0.01$),且 MSU 干预后 24 h,痛风清消方中、高剂量组效果优于低剂量组($P<0.05$);与模型组相比,痛风清消方缓解 GA 大鼠踝关节滑膜组织增生、炎症细胞浸润,中、高剂量组下调血清 CRP、IL-1β、IL-6、TNF-α 表达($P<0.05$, $P<0.01$),显著降低 CD80 平均荧光强度($P<0.01$),但对 CD206 平均荧光强度无明显增强效果。**结论**　痛风清消方对 GA 大鼠踝关节炎症的改善与抑制巨噬细胞 M1 极化和调控 AA 代谢密切相关。

【关键词】　痛风性关节炎;痛风清消方;巨噬细胞极化;花生四烯酸代谢
【中图分类号】R332;R392.12;R589.7　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856 (2026) 19-0001-15

[**基金项目**]国家自然科学基金(82560945);江西省科技厅领军人才项目(20243BCE51009);江西省自然科学基金重点项目(20232ACB206051);江西省中医药标委会标准化项目(2024A012);江西省卫生健康委员会科技计划一般项目(202510058);江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目(XJ-B202406)。

[**作者简介**]胡烈奎(1993—),男,在读博士研究生,研究方向:中医药防治关节炎性疾病。E-mail:157392994@qq.com
[**通信作者**]李华南(1974—),女,博士,教授,主任中医师,研究方向:中医药防治代谢性骨病。E-mail:lihuanan1974@126.com

Study on the mechanism of Tongfeng Qingxiao Formula in ameliorating acute gouty arthritis by inhibiting macrophage M1 polarization and arachidonic acid metabolism

HU Liekui[1,2], HUANG Xin[1], YUAN Qipeng[1], MA Weiwei[1], WU Dongyu[1], LI Huanan[3*]

(1. College of Clinical Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. Department of Foot and Ankle Orthopedics, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006. 3. Scientific Research Department, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330025)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the mechanism by which Tongfeng Qingxiao Formula (TFQXF) alleviates gouty arthritis (GA) by regulating macrophage arachidonic acid (AA) metabolism and inhibiting M1 polarization. **Methods** *In vitro* experiments involved a macrophage inflammation model induced by LPS (200 ng/mL) and MSU (200 μg/mL). The optimal concentration of TFQXF-containing serum was screened with the CCK-8 assay. Immunofluorescence detected the positive rates of inducible nitric oxide synthase, CD80, CD204, and CD206. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measured protein levels of C-reactive protein (CRP), interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α, LTs, PG, 5-LOX, and COX-2. Real-time quantitative PCR quantified mRNA expression of 5-*LOX*, *COX*-2, and *KAT*5. Western blot detected the protein expression of 5-LOX, COX-2, and KAT5; co-immunoprecipitation verified protein interactions between KAT5 and 5-LOX and COX-2, and molecular docking predicted the binding energy and docking structures between proteins. *In vivo*, a syndrome model of acute GA was established by combining a high-fat and high-sugar diet, artificial climate chamber exposure, and the classic Coderre method. Sixty male SD rats were divided into Blank, Model, and diclofenac sodium groups (0.03 g/kg), as well as TFQXF low-, medium-, and high-dose (TFQXF-L,-M,-H) groups (11.25, 22.50, and 45.00 g/kg) using a random number table, with ten rats per group. All rats in each group received the corresponding treatment once daily for 7 consecutive days. Ankle joint diameter was measured to evaluate swelling with a vernier caliper. Hematoxylin-eosin staining was used to observe synovial tissue structure and morphology; IF staining assessed CD80 and CD206 expression in synovial tissue, while ELISA detected serum levels of CRP, IL-1β, IL-6, and TNF-α. **Results** Compared with the LPS + MSU group, the TFQXF group significantly downregulated the fluorescence positivity rates of CD80 and iNOS in macrophages ($P<0.01$), but had no significant upregulating effect on the fluorescence positive rates of CD204 and CD206. TFQXF significantly reduced macrophage protein expression of CRP, IL-1β, IL-6, TNF-α, LTs, PG, 5-LOX, COX-2, and KAT5 ($P<0.05$,$P<0.01$), and inhibited the mRNA expression of 5-*LOX*, *COX*-2, and *KAT*5 ($P<0.01$) compared with the LPS+MSU group. *In vitro* experiments revealed a close interaction between KAT5 and 5-LOX, COX-2. *In vivo*, TFQXF significantly alleviated ankle joint swelling in GA rats compared with the model group ($P<0.05$,$P<0.01$). Twenty-four hours after MSU intervention, TFQXF-M and TFQXF-H groups exhibited better efficacy than TFQXF-L group ($P<0.05$). TFQXF reduced synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration in the ankle joints of GA rats, and TFQXF-M and TFQXF-H groups downregulated serum expression of CRP, IL-1β, IL-6, and TNF-α ($P<0.05$,$P<0.01$), and significantly decreased the mean fluorescence intensity of CD80 ($P<0.01$) compared with the model group, but showed no significant CD206 mean fluorescence intensity enhancement. **Conclusions** The therapeutic effect of TFQXF on GA ankle inflammation is closely associated with inhibiting macrophage M1 polarization and regulating AA metabolism.

【**Keywords**】 gouty arthritis; Tongfeng Qingxiao Formula; macrophage polarization; arachidonic acid metabolism

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

痛风性关节炎(gouty arthritis, GA)是单钠尿酸盐(monosodium urate, MSU)沉积所致代谢性晶体相关性关节病[1]。由于生活习惯和饮食结构变化,全球 GA 发病率在过去 20 年间增加了 63.44%[2],2023 年我国痛风患病率高达 1%~3%,成为继糖尿病之后第二大代谢性疾病[3]。

GA 不仅会引起关节持续性炎症和结构性损伤，亦可伴发肾脏病变及其他代谢综合征如糖尿病、高血压病、冠心病、高脂血症等，严重影响患者生命健康和生活质量，给社会带来了沉重负担[4,5]。

GA 的病理本质是 MSU 结晶触发的“晶体-免疫细胞-炎症介质”级联反应。MSU 晶体沉积于关节后，激活固有免疫系统，其中巨噬细胞是炎症反应的始动者和调节者[6]。MSU 晶体通过模式识别受体激活巨噬细胞中炎症小体，释放白细胞介素（interleukin, IL）-1β、肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor-alpha, TNF-α）等促炎因子，引发急性炎症[7]。近年来研究证实，巨噬细胞极化状态是调控炎症进程的关键，巨噬细胞分为 M1 和 M2 两种表型，分别发挥促炎和抑炎作用[8,9]。在 GA 病程中，早期巨噬细胞极化以 M1 型为主，晚期向 M2 型转化[10]。经典活化的 M1 型巨噬细胞（高表达 CD80、CD86）通过分泌促炎因子加剧组织损伤，而替代活化的 M2 型巨噬细胞（高表达 CD204、CD206）则通过吞噬结晶、释放抗炎因子促进炎症消退[11]。

巨噬细胞的极化状态并非固定不变，其主要受微环境中各类代谢物质的动态调控，这种调控机制在多种疾病的发生发展中起到关键作用，而脂质代谢变化是其中重要的一环。花生四烯酸（arachidonic acid, AA）代谢是脂质代谢网络的核心环节，也是 GA 炎症的核心通路。AA 经环氧合酶（cyclooxygenase, COX）和脂氧合酶（lipoxygenase, LOX）途径生成的前列腺素 E2（prostaglandin E2, PGE2）、白三烯 B4（leukotriene B4, LTB4）等产物，这类分子是加剧疼痛反应、放大炎症级联的关键信号[12]。值得注意的是，巨噬细胞极化与 AA 代谢存在密切交叉调控，M1 型巨噬细胞高表达 COX-2、5-LOX 以促进促炎代谢产物的生成，而 M2 型巨噬细胞可能通过上调 5-LOX 生成抗炎性脂氧素，提示二者共同构成 GA 炎症调控的“分子开关”[13,14]。

近年来，中医药治疗 GA 的机制研究已取得一定进展。多项研究表明，中药复方可通过抑制 NLRP3 炎症小体活化、降低 M1 型巨噬细胞极化水平等机制发挥疗效[15,16]。多种中成药能够改善 GA 病程中的脂质代谢失衡，并通过干预脂质代谢过程，达到治疗 GA 的效果[17,18]。然而，现有研究多聚焦单一靶点或通路，对于中医药如何通过调控巨噬细胞极化与 AA 代谢的交叉网络干预 GA 炎症进程的研究较为匮乏。此外，多数研究采用非特异性炎症模型，未能充分模拟 MSU 结晶诱导的 GA 病理特征，导致相关机制阐释的临床转化价值受限。

全国名老中医邓运明教授认为 GA 病位在中焦脾胃，病机以脾失健运为本，湿热蕴结为标，遵四妙散之意创立痛风清消方，该方以白苍二术为君，黄柏、薏苡仁、白豆蔻为臣，并佐以徐长卿、青风藤、蒲公英等，具有健脾益气、清热利湿之效，已广泛运用于临床，疗效确切，能够降低踝关节炎症水平，且与巨噬细胞极化密切相关，但其作用机制尚未完全阐明[19]。因此，本研究拟在细胞和分子层面通过体外和体内实验探讨痛风清消方通过调控巨噬细胞 M1 极化和 AA 代谢治疗 GA 的作用机制。

1　材料和方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物

76 只 SPF 级 6 周龄雄性 SD 大鼠，体质量（200±20）g，购自江西中医药大学[SCXK（赣）2023-0001]，饲养于江西中医药大学实验动物科技中心[SYXK（赣）2022-0002]。动物自由摄食、饮水，按昼夜节律提供人工照明，饲养温度 24~26 ℃，湿度 50%~70%，适应性饲养 1 周。实验前均获得江西中医药大学实验动物伦理委员会批准（JZLLSC20250578），实验设计和操作均遵循实验动物 3R 原则。

1.1.2　细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞株（RAW264.7，货号 TCM-C758）由苏州海星生物科技有限公司提供。

1.2　主要试剂与仪器

痛风清消方所需草药均购自江中中药饮片有限公司，执行标准符合《中国药典》2020 年版第一部，每剂痛风清消方的组成：青风藤（15 g，批号 220823）、苍术（15 g，批号 220812）、薏苡仁（30 g，批号 221114）、蒲公英（10 g，批号 221009）、徐长卿（15 g，批号 220808）、黄柏（15 g，批号 220920）、白豆蔻（15 g，批号 210927）、土茯苓（15 g，批号 220915）、车前草（15 g，批号 220808）、川牛膝

(15 g,批号 220622)、绵萆薢(15 g,批号 220905)、重楼(10 g,批号 220620)、白术(15 g,批号 221021)、山慈菇(10 g,批号 220819)、金钱草(15 g,批号 220920)。双氯芬酸钠缓释片(宜春仁和药业股份有限公司,国药准字 H20067776);MSU 晶体(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 U166391);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS,大连美仑生物技术有限公司,批号 MB5198);DMEM 培养基(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 G4512);胎牛血清(fetal bovine serum,FBS,大连美仑生物技术有限公司,批号 M0509E);青霉素-链霉素(penicillin-streptomycin,P/S,美国 Gibco 公司,批号 25300054);细胞计数试剂盒(cell counting kit,CCK)-8(北京白鲨易生物科技有限公司,批号 BS328B);苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染液试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1052);小鼠 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、IL-1β、IL-6、TNF-α、5-LOX、COX-2 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(泉州睿信生物科技有限公司,批号分别为 RX2D200516、RXW203063M、RXW203049M、RXW202412M、RXW202229M、RX202301M);RNA 提取试剂盒(泰州康为世纪生物科技股份有限公司,批号 CW0581M);实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction,qPCR)试剂盒(泰州康为世纪生物科技股份有限公司,批号 CW3008H);放射免疫沉淀法裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号 R0010);双喹啉酸(BCA)蛋白定量试剂盒(北京白鲨易生物科技有限公司,批号 BL521A);诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)、CD206、5-LOX、赖氨酸乙酰转移酶 5(lysine acetyltransferase 5, KAT5)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 22226-1-AP、18704-1-AP、10021-1-Ig、10827-1-AP);CD80、CD204 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab315832、ab271070);COX-2 抗体(澳大利亚 Affinity 公司,批号 AF7003);辣根过氧化物酶-山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 SA00001-2);辣根过氧化物酶-山羊抗小鼠二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 SA00001-1)。

MGC-350-HP-2 人工气候箱(上海一恒科学仪器有限公司);skny25020501 千分电子游标卡尺(广州诗科耐生命科技有限公司);EL10A 自动酶标仪(德国 BIOBASE 公司);Mini protean 3 cell 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);TE77XP 电转仪(美国 Hoefer 公司);SCG-W3000 化学发光成像系统(武汉赛维尔生物科技有限公司);16K-R 台式高速冷冻离心机(长沙吉尔森科技发展有限公司);EPS600 凝胶电泳仪(上海天能科技有限公司);US850 超微量分光光度计(北京诺禾致源科技股份有限公司);Archimed-X4 荧光定量 PCR 仪(北京鲲鹏基因科学仪器有限公司);DM6000B 荧光显微镜(德国 Leica 公司);DXS-2 光学显微镜(上海缔伦光学仪器有限公司);QP-80 CO_2 培养箱(济南鑫贝西生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞分组与处理

RAW264.7 细胞培养在 DMEM+10% FBS+1% P/S 培养基中,并于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内孵育。取对数期生长的 RAW264.7 细胞随机分为空白组(DMEM+10% FBS+1% P/S)、LPS+MSU 组(DMEM+10% FBS+1% P/S+200 ng/mL LPS+200 μg/mL MSU 刺激 12 h)和痛风清消方(TFQXF)组(DMEM+10% FBS+1% P/S+200 ng/mL LPS+200 μg/mL MSU 刺激 12 h 后,用痛风清消方含药血清孵育 24 h)[20]。

1.3.2 含药血清制备

16 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为正常组和含药血清组,每组 8 只,两组大鼠均自由进食喂水,含药血清组每天予以 45.00 g/kg 痛风清消方中药液灌胃 1 次,给药 7 d,最后 1 次灌胃 1 h 后,用戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉大鼠,收集 2 组大鼠腹主动脉血样,并于-80 ℃储存。

1.3.3 动物分组与处理

适应性喂养 1 周后,随机将 60 只雄性 SD 大鼠分为 6 组,每组 10 只。空白(Blank)组:予喂饲标准饲料,每天予 0.9%氯化钠溶液灌胃;模型(Model)组:造模第 1 天开始,每天喂食高糖高脂饲料,以 52 度白酒(10 mL/kg)和猪油(10 mL/kg)隔天交替灌胃,每天置于气候箱 8 h(10:00~18:00),温度设置为(35±2)℃,相对湿度(95±3)%,照明灯全开。第 18 天麻醉后采用 Coderre 法

于右踝关节注射 50 μL MSU 混悬液(20 mg/mL)1 次。双氯芬酸钠组:造模 14 d 后,予以 0.03 g/kg 双氯芬酸钠灌胃 7 d;痛风清消方低(TFQXF-L)、中(TFQXF-M)、高(TFQXF-H)剂量组:造模 14 d 后,分别予以 11.25 g/kg、22.50 g/kg、45.00 g/kg 痛风清消方药液灌胃 7 d。所有大鼠在造模第 21 天称重后,用戊巴比妥钠溶液(30 mg/kg)进行腹腔注射麻醉,取材后处死。

1.3.4　CCK-8 法对细胞进行计数

采用 CCK-8 法检测痛风清消方作用于 RAW264.7 细胞的最佳浓度,设置 0%、5%、10%、20%浓度的痛风清消方含药血清培养基,将 RAW264.7 细胞以 1×10^6/mL 的细胞浓度接种到 96 孔板中,分别采用不同浓度的痛风清消方含药血清培养基进行干预,在干预 12 h、24 h、48 h 后每孔加入 CCK-8 溶液(10 μL),37 ℃下孵育 2 h 后,使用酶标仪检测细胞在 450 nm 波长处的吸光度 *A*。

1.3.5　测量踝关节直径评估肿胀度

各组大鼠踝关节注射 MSU 混悬液 0 h、6 h、12 h、24 h 后,采用千分电子游标卡尺测量右侧内外踝最肿大处的间距作为踝关节直径,评估踝关节肿胀及消退情况。

1.3.6　HE 染色观察踝关节滑膜病理形态

处死各组大鼠后,将收集的大鼠踝关节固定在 4%中性甲醛中 1 周。随后将踝关节包埋在石蜡中并处理以进行组织学分析。将踝关节制成 5 μm 切片,并按照标准程序用 HE 染色。使用光学显微镜捕获数字图像。

1.3.7　免疫荧光(immunofluorescence,IF)检测平均荧光强度和细胞阳性率

将处理后的各组滑膜组织切片或细胞固定在 4%聚甲醛中 15 min,再使用 5% BSA 封闭 30 min。分别与抗 CD80、抗 iNOS、抗 CD204、抗 CD206(1∶200)4 ℃孵育过夜,然后与辣根过氧化物酶偶联的二抗在室温下避光孵育 1 h。用 DAPI 染液对细胞核进行染色 5 min。在荧光显微镜下捕获图像,并使用 ImageJ 1.54 g 进行分析。

1.3.8　ELISA 法检测炎症因子和 AA 代谢水平

收集大鼠血清或胰酶消化后的细胞上清液,采用 ELISA 试剂盒测量 CRP、IL-1β、IL-6、TNF-α、LTs、PG、5-LOX、COX-2、KAT5 水平。将不同浓度的标准品和稀释两次的样品加入到 96 孔测试板中。通过酶标仪在指定波长和标准曲线下测量每个孔的吸光度 *A*。采用标准曲线计算各血清样本中该指标的浓度。

1.3.9　qPCR 检测细胞 5-*LOX*、*COX*-2、*KAT*5 mRNA 水平

使用通用 RNA 纯化试剂盒从组织和细胞中分离总 RNA;采用超微量分光光度计测量 RNA 浓度和纯度;在反转录后使用 PCR 仪进行 qPCR 分析。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析数据。引物序列见表 1。

1.3.10　Western blot 检测 5-LOX、COX-2、KAT5 蛋白表达情况

收集细胞后用总蛋白提取试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒提取细胞总蛋白。定量后,样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-phoresis,SDS-PAGE)分离,随后转移至聚偏二氟乙烯膜上。在 4 ℃下将膜与抗 COX-2(1∶1 000)、抗 5-LOX(1∶1 000)、抗 KAT5(1∶2 000)的一抗孵育。用 1×TBST 洗涤后,

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequences

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度/bp Product length /bp
GAPDH	mus-GAPDH-F	GCCCAGAACATCATCCCTGCAT	188
	mus-GAPDH-R	GCCTGCTTCACCACCTTCTTGA	
COX-2	mus-COX-2-F	AGGTCATTGGTGGAGAGGTG	192
	mus-COX-2-R	CCTGCTTGAGTATGTCGCAC	
5-*LOX*	mus-5-LOX-F	CAAAATCTGGGTGCGTTCCA	132
	mus-5-LOX-R	TTGAAAAGGGGATGCACAGC	
*KAT*5	mus-KAT5-F	CTTGGCCTCCTATCCTACCG	101
	mus-KAT5-R	TTGATGGTGATCTGTGGCCT	

加入二抗在室温下再次孵育 1 h。用 1×TBST 洗涤膜 6 次,以去除非特异性结合的二抗。最后,使用增强化学发光底物和化学发光成像系统进行检测,并使用 ImageJ 1.54 g 软件分析条带强度。

1.3.11 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation,Co-IP)检测 KAT5 与 5-LOX、COX-2 蛋白互作关系

收集细胞的蛋白样品,用裂解缓冲液处理后,LPS+MSU 组加入 KAT5(1∶2 000)单克隆抗体,空白组使用同型 IgG 抗体,4 ℃下孵育过夜。结合的样品用 Protein G 琼脂糖珠在 4 ℃下沉淀 2 h。采用 IP 裂解缓冲液冲洗琼脂糖珠,然后用 10×上样缓冲液洗脱。样品经 SDS-PAGE 分离后进行免疫印迹分析。

1.3.12 分子对接技术预测蛋白间的结合能和对接结构

从 RCSB PDB 数据库平台下载 5-LOX、COX-2、KAT5 蛋白结构,采用 HDOCK Server 平台对 KAT5 与 5-LOX、COX-2 蛋白进行对接,分析蛋白间的结合能,再将得到的 PDB 文件导入 Pymol 3.1.6.1 软件进行蛋白互作可视化分析。

1.4 统计学方法

所有实验数据均使用 SPSS 26.0 统计软件进行分析,数值以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。符合正态分布且方差齐性的多组间比较使用单因素方差分析(ANOVA)并结合 LSD 检验。对于方差不齐或偏态分布的数据,采用 Kruskal-Wallis 统计检验,并运用 Bonferroni 方法校正 P 值。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 痛风清消方含药血清最佳浓度筛选

为评估痛风清消方含药血清对 RAW264.7 细胞的毒性作用,进行了 CCK-8 实验。结果发现,经不同浓度含药血清干预后 12 h,各组细胞活力无明显差异;经不同浓度含药血清干预后 24 h,与 0%含药血清组相比,20%含药血清组细胞活力显著下降($P<0.05$),5%、10%含药血清组细胞活力无明显差异;经不同浓度含药血清干预后 48 h,与 0%含药血清组相比,10%、20%含药血清组细胞活力显著降低($P<0.01$),而 5%含药血清组细胞活力无明显差异。因此,选择浓度为 5%的痛风清消方含药血清为最佳浓度血清用于进一步体外实验。见表 2。

2.2 痛风清消方含药血清对巨噬细胞炎性状态的调节作用

与空白组比较,LPS+MSU 组细胞 CRP、IL-1β、IL-6、TNF-α 表达显著升高($P<0.01$),痛风清消方含药血清能够显著降低细胞中 CRP、IL-1β、IL-6、TNF-α 表达水平($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 3。

表 2 不同浓度痛风清消方含药血清对 RAW264.7 细胞活力影响($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

Table 2 Effect of different concentrations of Tongfeng Qingxiao Formula drug-containing serum on viability of RAW264.7 cells($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

组别 Groups	细胞活力/% Cell viability/%		
	12 h	24 h	48 h
0%含药血清组 0% drug-containing serum group	98.88±2.73	101.97±3.77	109.35±2.01
5%含药血清组 5% drug-containing serum group	98.42±2.41	102.73±4.28	109.79±1.59
10%含药血清组 10% drug-containing serum group	101.49±5.66	98.60±4.68	77.65±1.89**
20%含药血清组 20% drug-containing serum group	94.33±4.92	88.90±5.66*	59.03±3.08**

注:与 0%含药血清组相比,*$P<0.05$,**$P<0.01$。

Note. Compared with 0% drug-containing serum group, *$P<0.05$, **$P<0.01$.

表 3 痛风清消方对巨噬细胞炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

Table 3 Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on levels of inflammatory factors in macrophages($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

组别 Groups	CRP/(mg/L)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
空白组 Blank group	2.46±0.42	40.70±7.24	3.60±0.72	12.71±2.40
LPS+MSU 组 LPS+MSU group	4.30±0.55##	99.17±15.15##	7.33±0.88##	25.14±6.10##
痛风清消方组 TFQXF group	3.44±0.24■■	71.86±12.39■■	5.02±0.82■■	16.47±4.85■

注:与空白组相比,##$P<0.01$;与 LPS+MSU 组相比,■$P<0.05$,■■$P<0.01$。

Note. Compared with Blank group, ##$P<0.01$. Compared with LPS+MSU group, ■$P<0.05$, ■■$P<0.01$.

2.3　痛风清消方含药血清对巨噬细胞极化的调节作用

染色细胞计数结果发现，与空白组比较，LPS+MSU 组细胞 CD80、iNOS 细胞阳性率显著上升（$P<0.01$），CD204 和 CD206 细胞阳性率显著下降（$P<0.01$）；痛风清消方含药血清干预后，CD80、iNOS 细胞阳性率显著下降（$P<0.01$），CD204 和 CD206 细胞阳性率无明显差异。见图 1 和表 4。

2.4　痛风清消方含药血清对巨噬细胞中 AA 代谢的影响

ELISA 检测显示，与空白组比较，LPS+MSU 组细胞 LTs、PG、5-LOX、COX-2、KAT5 表达显著升高（$P<0.01$），痛风清消方组与 LPS+MSU 组比较能显著降低 LTs、PG、5-LOX、COX-2、KAT5 水平（$P<0.01$，表 5）。qPCR 检测提示，与空白组相比，LPS+MSU 组 5-*LOX*、*COX*-2 和 *KAT*5 mRNA 表达水平均显著上升（$P<0.01$），而痛风清消方组

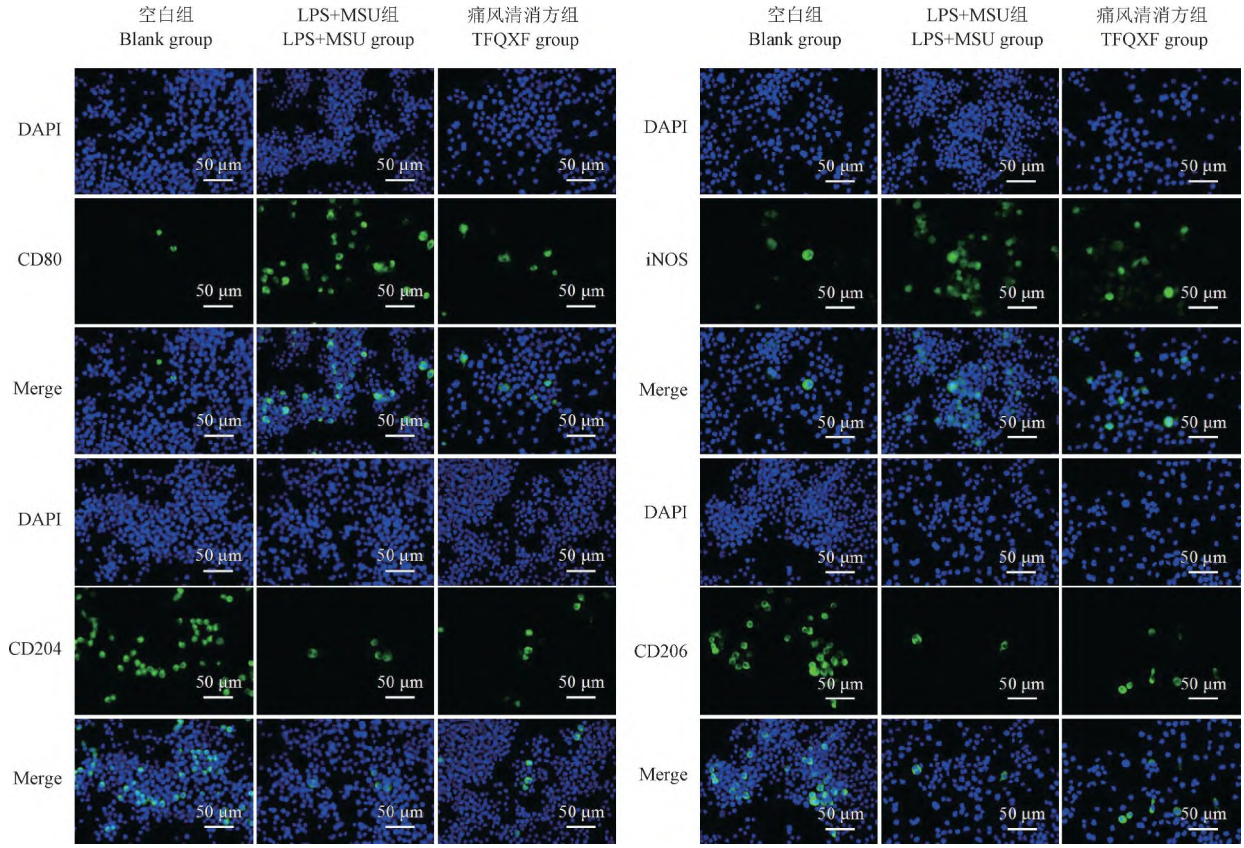


图 1　痛风清消方对巨噬细胞极化的影响（IF，400×）

Figure 1　Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on macrophage polarization (IF, 400×)

表 4　各组巨噬细胞 CD80、iNOS、CD204、CD206 的阳性率情况（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 4　Positive rates of CD80, iNOS, CD204, and CD206 in macrophages of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别 Groups	细胞阳性率/% Cell positive rate/%			
	CD80	iNOS	CD204	CD206
空白组 Blank group	1.55±0.95	0.99±0.15	1.18±0.18	0.73±0.23
LPS+MSU 组 LPS+MSU group	16.39±4.63$^{\#\#}$	8.09±2.82$^{\#\#}$	0.10±0.00$^{\#\#}$	0.12±0.04$^{\#\#}$
痛风清消方组 TFQXF group	7.28±2.15$^{■■}$	1.89±0.78$^{■■}$	0.23±0.07	0.27±0.13

注：与空白组相比，$^{\#\#}P<0.01$；与 LPS+MSU 组相比，$^{■■}P<0.01$。

Note. Compared with Blank group, $^{\#\#}P<0.01$. Compared with LPS+MSU group, $^{■■}P<0.01$.

能显著降低 5-*LOX*、*COX*-2 和 *KAT*5 mRNA 水平(P<0.01,表 6)。此外,Western blot 检测结果提示,与空白组相比,LPS+MSU 组 5-LOX、COX-2 和 KAT5 蛋白的表达水平显著提高(P<0.01),而痛风清消方能显著下调三者的表达水平(P<0.05,P<0.01)。见表 7 和图 2。

2.5 KAT5 与 5-LOX、COX-2 蛋白间互作关系的验证

Co-IP 结果显示,在 RAW264.7 细胞中,相比于 IgG 组,IP 组和 Input 组明显可富集更多的 KAT5 蛋白,相比于 IP 组,Input 组能富集更多蛋白。且与空白组比较,LPS+MSU 组蛋白间的互作关系更加明显。通过 HDOCK 进行蛋白-蛋白对接后,结果表明,5-LOX、COX-2 和 KAT5 蛋白之间结合分数较低,具有较好的亲和性和稳定性。见图 3。

表 5 痛风清消方对巨噬细胞 AA 代谢途径的影响($\bar{x}\pm s$,n=5)

Table 5 Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on AA metabolic pathway in macrophages($\bar{x}\pm s$,n=5)

组别 Groups	LTs/(pg/mL)	PG/(pg/mL)	5-LOX/(ng/mL)	COX-2/(ng/mL)	KAT5/(ng/mL)
空白组 Blank group	44.00±7.06	16.94±2.24	1.22±0.23	4.61±0.60	5.13±0.70
LPS+MSU 组 LPS+MSU group	77.79±1.89##	25.94±2.16##	2.23±0.18##	8.08±1.18##	9.75±1.23##
痛风清消方组 TFQXF group	59.38±7.15■■	21.60±1.38■■	1.76±0.12■■	6.40±0.37■■	7.47±0.59■■

注:与空白组相比,##P<0.01;与 LPS+MSU 组相比,■■P<0.01。

Note. Compared with Blank group, ##P<0.01. Compared with LPS+MSU group, ■■P<0.01.

表 6 痛风清消方对巨噬细胞 5-*LOX*、*COX*-2 和 *KAT*5 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$,n=3)

Table 6 Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on 5-*LOX*, *COX*-2, and *KAT*5 mRNA expression in macrophages($\bar{x}\pm s$,n=3)

组别 Groups	5-*LOX*	*COX*-2	*KAT*5
空白组 Blank group	1.00±0.08	1.00±0.09	1.00±0.54
LPS+MSU 组 LPS+MSU group	1.97±0.22##	3.04±0.41##	2.09±0.14##
痛风清消方组 TFQXF group	1.41±0.14■■	2.05±0.33■■	1.51±0.24■■

注:与空白组相比,##P<0.01;与 LPS+MSU 组相比,■■P<0.01。

Note. Compared with Blank group, ##P<0.01. Compared with LPS+MSU group, ■■P<0.01.

表 7 痛风清消方对巨噬细胞 5-LOX、COX-2、KAT5 蛋白相对表达量的影响($\bar{x}\pm s$,n=3)

Table 7 Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on the relative expression levels of 5-LOX, COX-2, and KAT5 protein in macrophages($\bar{x}\pm s$,n=3)

组别 Groups	5-LOX	COX-2	KAT5
空白组 Blank group	1.00±0.00	1.00±0.10	1.00±0.13
LPS+MSU 组 LPS+MSU group	1.35±0.07##	1.64±0.07##	1.76±0.07##
痛风清消方组 TFQXF group	1.20±0.09■	1.28±0.02■■	1.29±0.19■■

注:与空白组相比,##P<0.01;与 LPS+MSU 组相比,■P<0.05,■■P<0.01。

Note. Compared with Blank group, ##P<0.01. Compared with LPS+MSU group, ■P<0.05, ■■P<0.01.

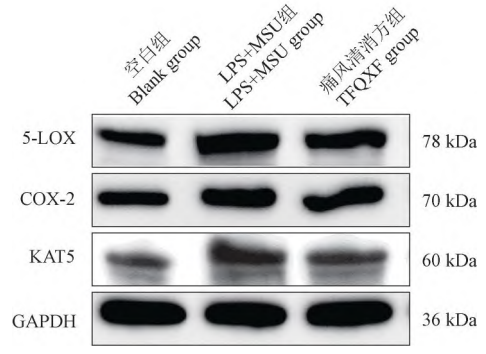
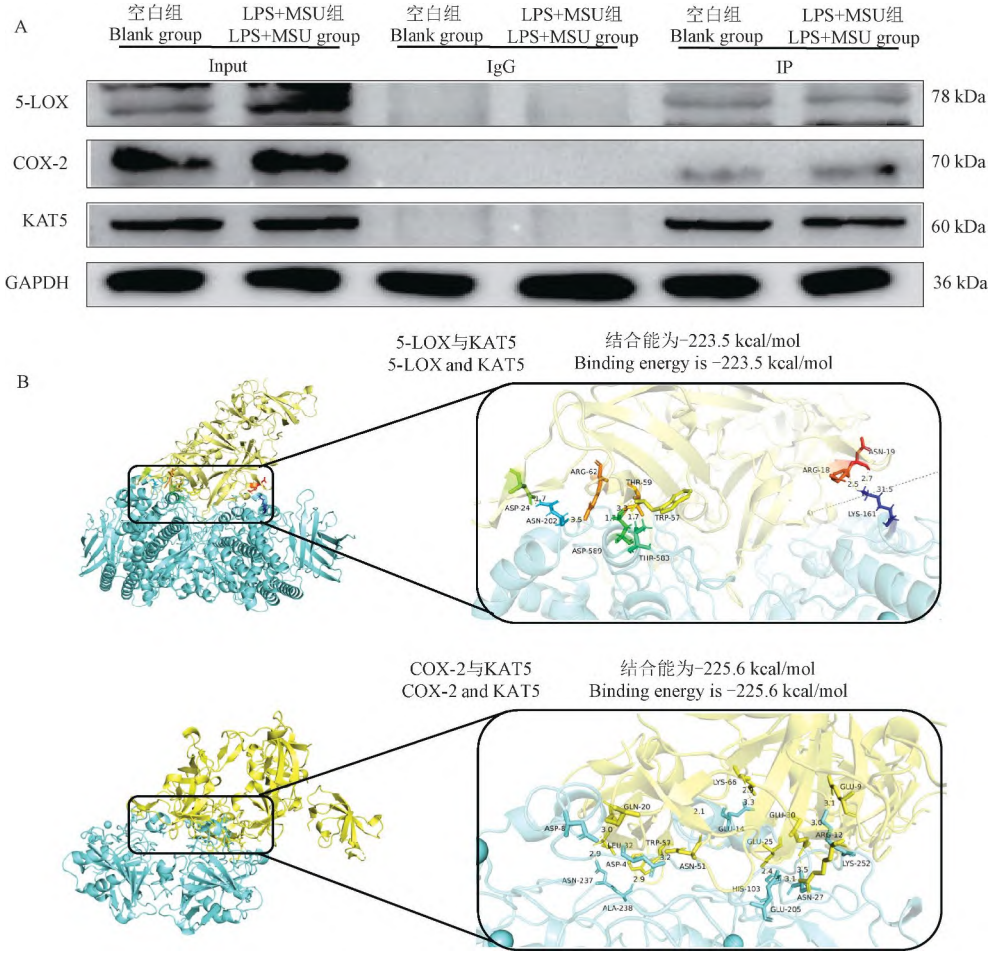


图 2 各组巨噬细胞 5-LOX、COX-2、KAT5 蛋白电泳结果

Figure 2 Protein electrophoresis of 5-LOX, COX-2, and KAT5 in macrophages of each group

2.6 痛风清消方对 GA 大鼠踝关节肿胀的缓解情况

通过测量大鼠踝关节直径发现,造模后大鼠踝关节出现明显肿胀(P<0.01),MSU 注射后 6 h,痛风清消方低剂量组大鼠踝关节肿胀无明显



注：A：5-LOX、COX-2 和 KAT5 的 Co-IP 蛋白电泳图；B：5-LOX、COX-2 和 KAT5 的分子对接图。

图 3　巨噬细胞中 5-LOX、COX-2 和 KAT5 的互作关系

Note. A, Co-IP protein electrophoresis of 5-LOX, COX-2, and KAT5. B, Molecular docking of 5-LOX, COX-2, and KAT5.

Figure 3　Interplay of 5-LOX, COX-2, and KAT5 in macrophages

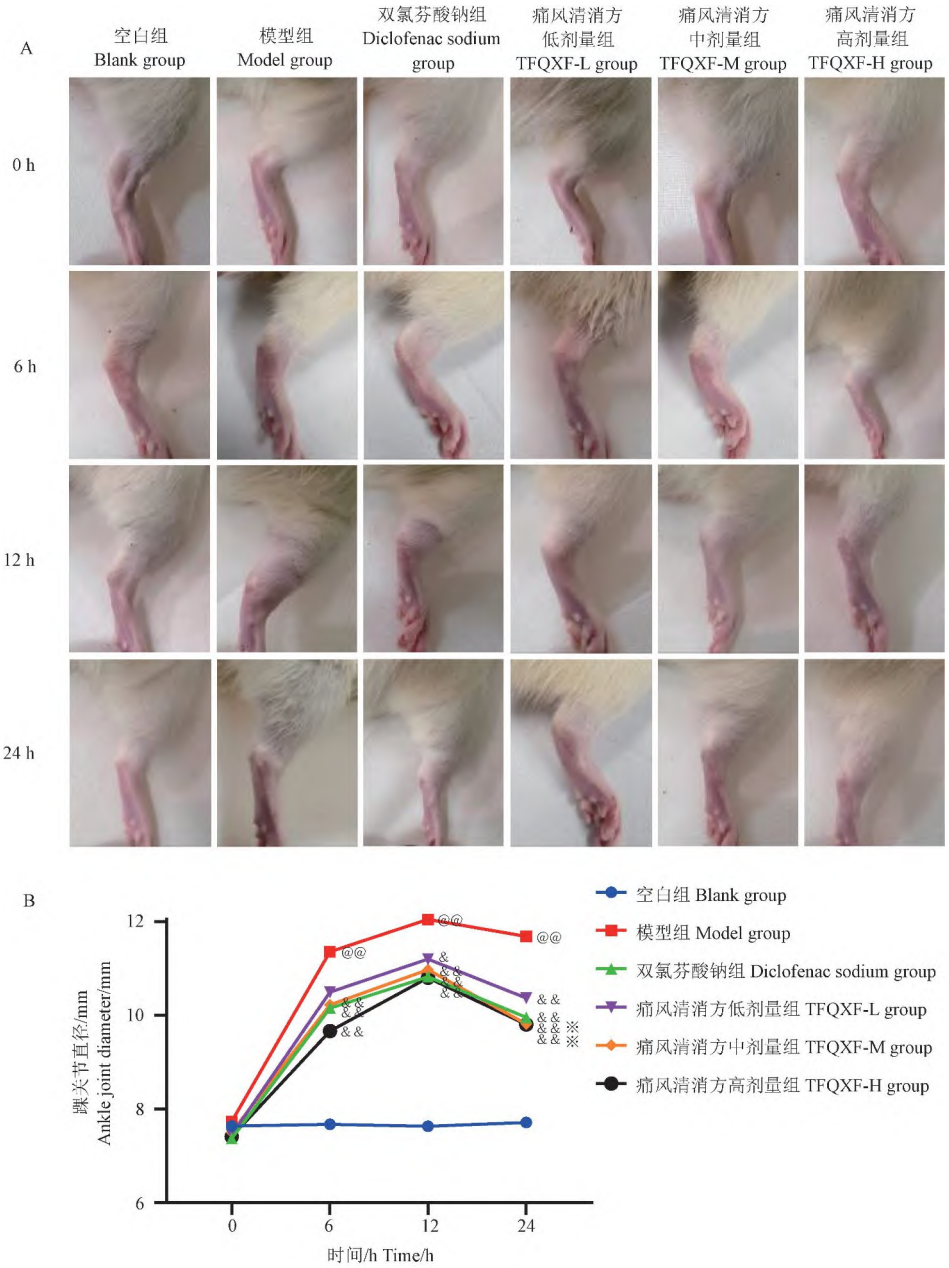
改善，但在 MSU 注射后 12 h、24 h，痛风清消方低、中、高剂量 3 组大鼠踝关节肿胀均得到显著改善（$P<0.05$，$P<0.01$），MSU 注射后 24 h 的测量数据显示，中、高剂量组效果优于低剂量组（$P<0.05$），且中、高剂量组间无明显差异。作为阳性药对照，双氯芬酸钠显著减轻了模型大鼠踝关节的肿胀程度（$P<0.01$）。见图 4。

2.7　痛风清消方对 GA 大鼠踝关节滑膜病理形态的影响

踝关节 HE 染色结果显示，空白组关节结构完整，层次分明，滑膜细胞形态正常，分布均匀；模型组大鼠滑膜组织呈现明显的病理性改变，结构混乱，组织可见较多滑膜细胞、纤维增生和明显的炎性细胞浸润。与模型组比较，各给药组大鼠踝关节滑膜组织结构及病理改变均有不同程度的改善。双氯芬酸钠组大鼠踝关节滑膜组织结构中度异常，可见部分滑膜细胞增生，组织疏松水肿，见少量炎性细胞浸润；痛风清消方低剂量组大鼠踝关节滑膜组织结构中度异常，可见部分滑膜细胞增生和组织疏松水肿，少量炎症细胞浸润；痛风清消方中、高剂量组大鼠踝关节滑膜组织结构轻度异常，排列较规则，可见少量滑膜细胞增生和新生血管形成，无明显炎性细胞浸润。见图 5。

2.8　痛风清消方对 GA 大鼠血清水平的影响

采用 ELISA 检测各组中 CRP、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平。结果表明，与空白组比较，模型组的 CRP、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，双氯芬酸钠组及痛风清消方中、高剂量组 CRP、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平均显著下降（$P<0.05$，$P<0.01$），说明痛风清消方能够显著改善 GA 大鼠的炎症反应；且与痛风清消方低剂量组比较，痛风清消方中、高剂量组的



注：A：注射 MSU 后各时间点大鼠踝关节外观；B：不同时间点大鼠踝关节直径对比。与空白组相比，$^{@@}P<0.01$；与模型组相比，$^{\&}P<0.05$，$^{\&\&}P<0.01$；与痛风清消方低剂量组相比，$^{※}P<0.05$。

图 4 痛风清消方对 GA 大鼠踝关节肿胀度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

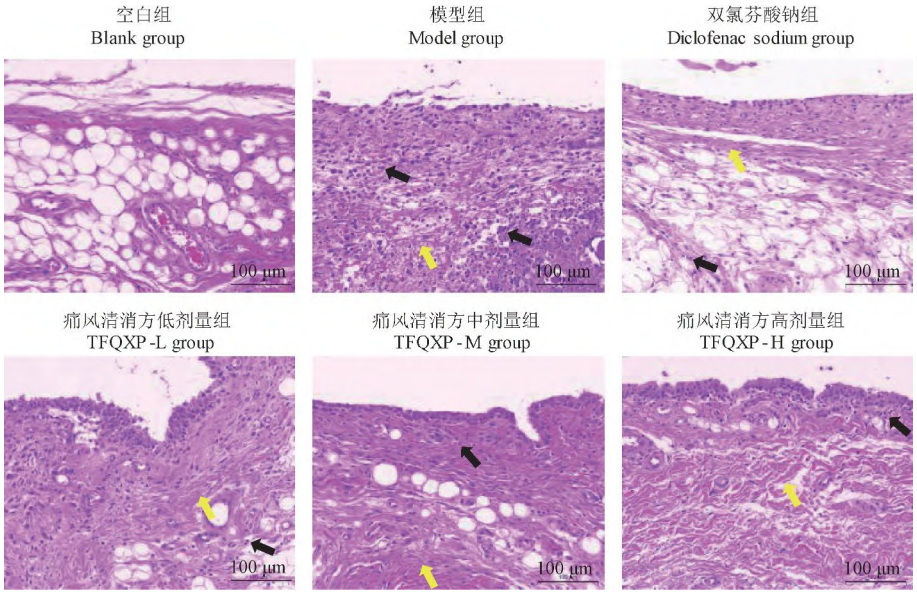
Note. A, Appearance of rat ankle joint at various time points after MSU injection. B, Comparison of rat ankle joint diameter at different time points. Compared with Blank group, $^{@@}P<0.01$. Compared with Model group, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$. Compared with TFQXF-L group, $^{※}P<0.05$.

Figure 4 Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on ankle joint swelling degree in GA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

CRP、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平下降显著（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表 8。

2.9 痛风清消方对 GA 大鼠滑膜巨噬细胞极化的影响

平均荧光强度结果显示，模型组滑膜组织中 CD80 荧光强度显著高于空白组（$P<0.01$），CD206 荧光强度显著低于空白组（$P<0.01$）；与模型组比较，双氯芬酸钠组和痛风清消方低、中、高剂量组 CD80 荧光强度显著降低（$P<0.01$），且双氯芬酸钠组 CD206 荧光强度增强（$P<0.05$），但痛风清消方低、中、高剂量组 CD206 无显著差异。见表 9 和图 6。



注：黑色箭头：炎性细胞浸润；黄色箭头：增生的纤维组织。

图 5　痛风清消方对 GA 大鼠踝关节滑膜组织病理形态的影响（HE，200×）

Note. Black arrow, Inflammatory cell infiltration. Yellow arrow, Proliferated fibrous tissue.

Figure 5　Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on pathological morphology of ankle joint synovial tissue in GA rats (HE, 200×)

表 8　痛风清消方对 GA 大鼠血清炎症因子水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 8　Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on serum inflammatory factor levels in GA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别 Groups	CRP/（ng/mL）	IL-1β/（pg/mL）	IL-6/（pg/mL）	TNF-α/（pg/mL）
空白组 Blank group	238.93±27.02	49.63±5.64	30.35±3.53	24.01±2.97
模型组 Model group	408.27±27.47$^{@@}$	137.64±11.79$^{@@}$	61.03±10.72$^{@@}$	48.09±3.12$^{@@}$
双氯芬酸钠组 Diclofenac sodium group	253.29±28.64$^{\&\&}$	93.54±6.04$^{\&\&}$	38.61±3.85$^{\&}$	32.28±2.93$^{\&\&}$
痛风清消方低剂量组 TFQXF-L group	305.34±31.76$^{\&\&\Delta\Delta}$	116.18±6.40$^{\&\Delta\Delta}$	54.52±7.90 $^{\Delta}$	40.23±2.82$^{\&\&\Delta\Delta}$
痛风清消方中剂量组 TFQXF-M group	260.18±32.19$^{\&\&*}$	101.75±5.45$^{\&\&*}$	40.35±2.80$^{\&**}$	33.52±2.92$^{\&\&*}$
痛风清消方高剂量组 TFQXF-H group	254.77±28.35$^{\&\&**}$	99.98±5.28$^{\&\&**}$	41.66±2.97$^{\&**}$	33.44±2.67$^{\&\&**}$

注：与空白组相比，$^{@@}P<0.01$；与模型组相比，$^{\&}P<0.05$，$^{\&\&}P<0.01$；与双氯芬酸钠组相比，$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$；与痛风清消方低剂量组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note. Compared with Blank group, $^{@@}P<0.01$. Compared with Model group, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$. Compared with Diclofenac sodium group, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$. Compared with TFQXF-L group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

表 9　各组滑膜组织巨噬细胞 CD80、CD206 的平均荧光强度（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 9　Mean fluorescence intensity of CD80 and CD206 in macrophages of synovial tissue among different groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别 Groups	平均荧光强度 Mean fluorescence intensity	
	CD80	CD206
空白组 Blank group	5.82±0.71	35.37±4.27
模型组 Model group	24.63±1.67$^{@@}$	10.21±0.89$^{@@}$
双氯芬酸钠组 Diclofenac sodium group	12.98±1.34$^{\&\&}$	14.61±1.10$^{\&}$
痛风清消方低剂量组 TFQXF-L group	16.79±1.88$^{\&\&}$	10.23±1.39
痛风清消方中剂量组 TFQXF-M group	7.58±0.78$^{\&\&**}$	11.26±2.66
痛风清消方高剂量组 TFQXF-H group	7.66±1.86$^{\&\&**}$	11.21±1.33

注：与空白组相比，$^{@@}P<0.01$；与模型组相比，$^{\&}P<0.05$，$^{\&\&}P<0.01$；与痛风清消方低剂量组相比，$^{**}P<0.01$。

Note. Compared with Blank group, $^{@@}P<0.01$. Compared with Model group, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$. Compared with TFQXF-L group, $^{**}P<0.01$.

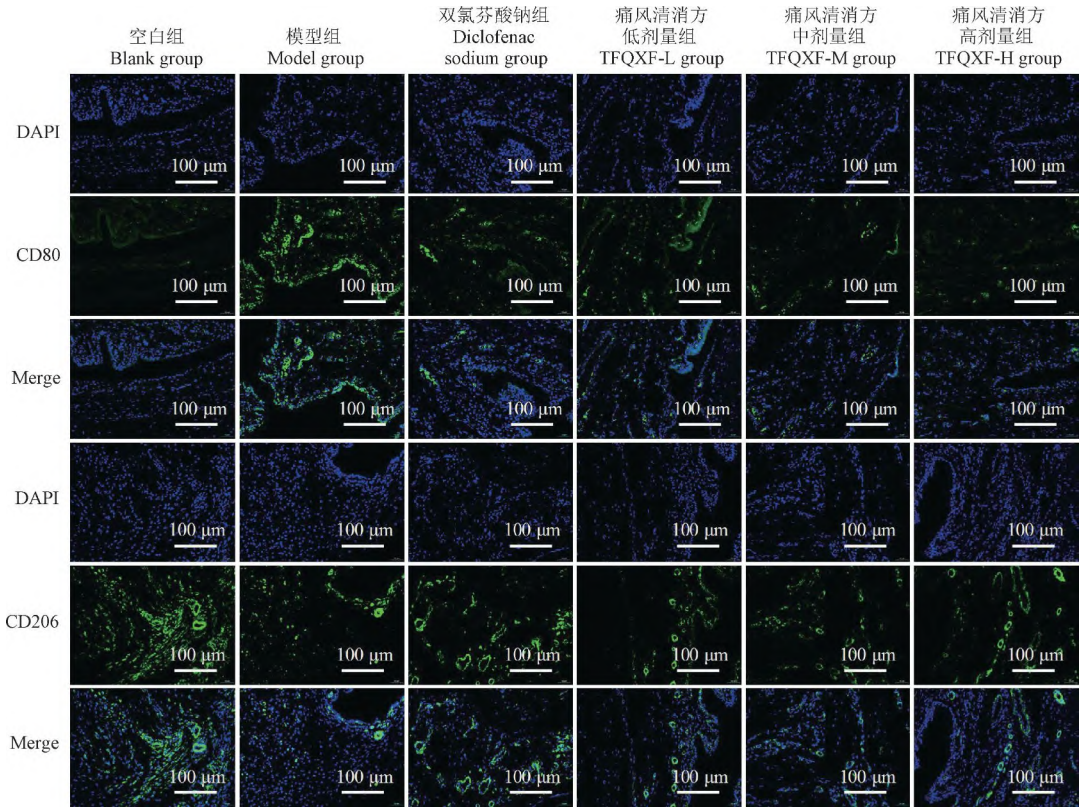


图 6 痛风清消方对 GA 大鼠踝关节滑膜巨噬细胞极化的影响(IF,200×)

Figure 6 Effect of Tongfeng Qingxiao Formula on macrophage polarization in ankle joint synovium of GA rats(IF,200×)

3 讨论

GA 是由 MSU 晶体沉积引发的急性炎症性疾病,以关节红肿热痛、滑膜炎症及软骨损伤为主要特征,其病理机制涉及炎症因子释放、免疫细胞活化及代谢通路异常等多环节级联反应[21,22]。GA 属中医“痛风”范畴,以第一跖趾关节红肿热痛为其临床首要表现[23]。多因患者过度摄入肥甘厚腻,导致脾失健运,湿浊内生,痹阻经络四末,郁而化热,发为关节红肿热痛,其核心病机以“湿热蕴结”为标、“脾失健运”为本,属本虚标实之证[24,25]。痛风清消方是由清代名方“四妙散”加减化裁而来,具有“固护中焦、健运脾胃、斡旋三焦、消石排酸”的功效[19]。

GA 发病过程中,MSU 结晶沉积关节,可激活关节滑膜免疫细胞,并释放 IL-1β、TNF-α 等促炎因子,通过增加血管内皮细胞通透性、促进组织液渗出及炎症细胞浸润,导致关节肿胀。本研究通过给大鼠饲喂高脂高糖饲料、白酒等诱导内湿热,以人工气候箱模拟外湿热,结合经典 Coderre 法,构建了中医“证”、西医“病”相结合的 GA 动物模型,并使用痛风清消方灌胃干预。结果表明,痛风清消方能够显著降低血清中炎症因子水平,并改善滑膜炎症浸润情况,缓解关节肿胀。

巨噬细胞作为 GA 炎症微环境的关键调控细胞,其极化表型决定炎症方向。M1 型巨噬细胞为促炎表型,通过释放 IL-1β、TNF-α、IL-6 等促炎因子放大炎症反应;M2 型为抗炎修复表型,通过分泌 IL-10、TGF-β 等抑制炎症、促进组织修复[26]。GA 急性发作时,滑膜组织中普遍发生巨噬细胞表型变化。其中,M1 型巨噬细胞的激增在炎症爆发的级联反应阶段扮演重要角色,其机制主要是 MSU 晶体通过模式识别受体刺激巨噬细胞进入炎症级联反应过程,包括典型的 NLRP3 炎症小体的激活,从而促使下游 Pro-IL-1β、Pro-IL-18 活化,形成“促炎循环”[27]。因而,恢复巨噬细胞 M1/M2 比例平衡或许是抑制 GA 炎症爆发的重要手段。已有研究发现四妙散等清热化湿类方剂能够通过调节巨噬细胞 M1/M2 平衡达到治疗 GA 的作用[16,28]。本研究体内外实验结果显

示,痛风清消方能显著降低 M1 巨噬细胞表型蛋白(CD80、iNOS)的阳性率,但对 M2 巨噬细胞表型蛋白(CD204、CD206)的阳性率无明显影响,说明痛风清消方可能通过抑制巨噬细胞 M1 极化途径,而非促进巨噬细胞向 M2 转化,从而达到抑制炎症效果。GA 急性期炎症微环境中巨噬细胞以 M1 型细胞因子占主导,过早诱导 M2 极化可能干扰 MSU 晶体的吞噬清除过程,反而延长炎症持续时间,这种选择性调控模式与中医“急则治其标”的治疗思路不谋而合[29]。

炎症因子的释放与炎症细胞的活化,最终依赖于炎症介质的合成与释放,其中 AA 代谢通路是促炎介质生成的核心分子机制[30]。AA 经 COX 途径生成 PG(如 PGE2),经 LOX 途径生成 LTs(如 LTB4),二者均为强效炎症介质,可加剧疼痛及炎症细胞趋化,参与痛风病理过程的免疫抑制与组织修复[31,32]。LOX 途径的 LTB4 通过清道夫受体 B1 型增强 M1 型促炎表型,驱动炎症反应[33]。有趣的是,COX-2 催化生成的 PGE2 在过度累积后,又能通过激活自身 EP4 受体促进巨噬细胞向 M2 型极化,形成炎症负反馈环路,这可能与急性 GA 的自限性病程密切相关[26]。AA 代谢产物还可通过 G 蛋白偶联受体 120 等受体调控巨噬细胞表型转换,影响炎症-修复平衡[13,34,35]。此外,KAT5 作为组蛋白乙酰转移酶,可能通过乙酰化修饰 *COX*-2、5-*LOX* 基因启动子区域,促进其转录表达。故 KAT5 能够通过翻译后修饰功能,促进 AA 代谢过程,进而增加巨噬细胞 M1 极化水平。本研究结果表明,痛风清消方能够抑制 AA 代谢产物生成,且抑制 KAT5 表达,说明痛风清消方可能通过表观遗传调控减少 COX-2、5-LOX 的转录与表达,直接阻断 AA 代谢通路,减少 PGE2、LTB4 等炎症介质的生成。Co-IP 实验结果说明 GA 发病过程中 KAT5 与 COX-2、5-LOX 蛋白存在紧密的互作关系,分子对接的结果也侧面验证了这一点。痛风清消方能够同时调控 5-LOX 与 COX-2 两种酶,可避免单一抑制 COX 通路导致的 LTs 代谢代偿性升高,这或许能够降低中药副作用。因此,痛风清消方缓解关节炎症的机制可能是通过抑制 AA 代谢从而降低 M1 的极化水平来实现。炎症介质减少了对巨噬细胞活化刺激的削弱,同时痛风清消方可能通过非 AA 依赖途径(如 AMPK/NF-κB)抑制 M1 型巨噬细胞极化,减少 IL-1β、TNF-α 等促炎因子释放[36]。此外,痛风清消方可能降低促炎因子与趋化因子(如 LTs)的水平,从而抑制中性粒细胞、巨噬细胞向滑膜组织的趋化与浸润,减轻滑膜炎症。滑膜炎症的缓解进一步减少组织水肿与关节腔积液,最终表现为踝关节炎症消退[37,38]。此外,AA 代谢产物 LTB4 通过 BLT1 受体诱导基质金属蛋白酶释放,加速Ⅱ型胶原蛋白降解,而最新研究发现关节腔内的Ⅱ型胶原蛋白能被 MSU 富集,并在诱导 GA 急性发作中起到重要作用,但痛风清消方是否能通过该途径发挥抗炎作用还需进一步探究[39]。

综上所述,本研究证实痛风清消方可通过抑制巨噬细胞 M1 极化及调控 AA 代谢通路发挥抗 GA 作用,初步揭示了“AA 代谢-巨噬细胞极化”的协同调控网络,为中药复方“整体调节、多靶点协同”的作用特点提供了现代生物学解释,丰富了传统中医药治疗炎症性疾病的理论基础,为 GA 的个体化治疗提供新策略。但本研究仍有不足之处,尽管 AA 代谢通路调控和巨噬细胞极化是痛风清消方治疗 GA 过程的重要起效途径,但本研究缺乏抑制性实验深入探讨两者之间的上下游调控关系。此外,本研究发现痛风清消方可能通过抑制 KAT5 介导的表观遗传学调控作用降低 AA 代谢,但后续仍需深入探究。

参考文献:

[1] Jatuworapruk K, Louthrenoo W. Emerging therapeutic options for refractory gout [J]. Nat Rev Rheumatol, 2024, 20(2): 73-74.

[2] He Q, Mok T N, Sin T H, et al. Global, regional, and national prevalence of gout from 1990 to 2019: age-period-cohort analysis with future burden prediction [J]. JMIR Public Health Surveill, 2023, 9: e45943.

[3] 徐东, 朱小霞, 邹和建, 等. 痛风诊疗规范 [J]. 中华内科杂志, 2023, 62(9): 1068-1076.
Xu D, Zhu X X, Zou H J, et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of gout in China [J]. Chin J Intern Med, 2023, 62(9): 1068-1076.

[4] Singh J A, Gaffo A. Gout epidemiology and comorbidities [J]. Semin Arthritis Rheum, 2020, 50(3): S11-S16.

[5] Keller S F, Mandell B F. Management and cure of gouty arthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2022, 48(2): 479-492.

[6] Xiao Q, Luo L, Zhu X, et al. Formononetin alleviates ulcerative colitis via reshaping the balance of M1/M2 macrophage polarization in a gut microbiota-dependent manner [J]. Phytomedicine, 2024, 135: 156153.

[7] So A K, Martinon F. Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(11): 639-647.

[8] Murray P J, Allen J E, Biswas S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. Immunity, 2014, 41(1): 14-20.

[9] Bai X, Guo Y R, Zhao Z M, et al. Macrophage polarization in cancer and beyond: from inflammatory signaling pathways to potential therapeutic strategies [J]. Cancer Lett, 2025, 625: 217772.

[10] Zhao L, Ye W, Zhu Y, et al. Distinct macrophage polarization in acute and chronic gout [J]. Lab Investig, 2022, 102(10): 1054-1063.

[11] Peng Y, Zhou M, Yang H, et al. Regulatory mechanism of M1/M2 macrophage polarization in the development of autoimmune diseases [J]. Mediat Inflamm, 2023, 2023: 8821610.

[12] Calder P C. Eicosanoids [J]. Essays Biochem, 2020, 64(3): 423-441.

[13] Vassiliou E, Farias-Pereira R. Impact of lipid metabolism on macrophage polarization: implications for inflammation and tumor immunity [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(15): 12032.

[14] Liu Y, Tang H, Liu X, et al. Frontline Science: Reprogramming COX-2, 5-LOX, and CYP4A-mediated arachidonic acid metabolism in macrophages by salidroside alleviates gouty arthritis [J]. J Leukoc Biol, 2018, 105(1): 11-24.

[15] 杜明瑞, 赵哲, 李华燕, 等. 基于 NLRP3/IL-1β 信号通路探讨清热利湿化浊法(加味四妙散)对湿热痹阻型慢性痛风性关节炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(11): 133-140.
Du M R, Zhao Z, Li H Y, et al. Mechanism of Qingre Lishi Huazhuo method (modified simiaosan) on chronic gouty arthritis of dampness-heat obstruction syndrome based on NLRP3/IL-1β signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(11): 133-140.

[16] 范围, 孟庆良, 郑福增, 等. 痛风汤含药血清通过调控 PI3K/Akt 介导的 M1 巨噬细胞极化减轻痛风性关节炎 [J]. 中药材, 2025, 48(3): 719-725.
Fan W, Meng Q L, Zheng F Z, et al. Effect of serum containing Tongfeng decoction on reducing gouty arthritis by regulating PI3K/Akt-mediated M1 macrophage polarization [J]. J Chin Med Mater, 2025, 48(3): 719-725.

[17] 张先恒, 刘健, 韩琦, 等. 黄芩清热除痹胶囊通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路改善痛风性关节炎大鼠的炎症反应及尿酸、脂质代谢失衡 [J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(8): 1450-1458.
Zhang X H, Liu J, Han Q, et al. Huangqin Qingrechubi Capsule alleviates inflammation and uric acid and lipid metabolism imbalance in rats with gouty arthritis by inhibiting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. J South Med Univ, 2024, 44(8): 1450-1458.

[18] 李欣, 毛霞, 马旺明, 等. 从 Wnt/β-catenin 串扰轴探究湿热痹颗粒治疗痛风性关节炎湿热证的作用机制 [J]. 药学学报, 2023, 58(8): 2424-2433.
Li X, Mao X, Ma W M, et al. Investigation on the pharmacological mechanisms of Shirebi granules in treating gouty arthritis with damp-heat syndrome based on crosstalk of Wnt/β-catenin signaling [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(8): 2424-2433.

[19] 李华南, 贾蒙, 彭伟雄, 等. 邓运明教授固中清消法治疗痛风学术思想研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1493-1495.
Li H N, Jia M, Peng W X, et al. Research on professor Deng Yunming's academic thought of treating gout by strengthening the middle-energizer and eliminating the method [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(6): 1493-1495.

[20] Yan Y, Yu L, Chen B, et al. Mastoparan M suppressed NLRP3 inflammasome activation by inhibiting MAPK/NF-κB and oxidative stress in gouty arthritis [J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 6179-6193.

[21] Dalbeth N, Merriman T R, Stamp L K. Gout [J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2039-2052.

[22] Ashiq K, Bajwa M A, Tanveer S, et al. A comprehensive review on gout: the epidemiological trends, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and treatment [J]. J Pak Med Assoc, 2021: 71(4): 1234-1238.

[23] Scuiller A, Pascart T, Bernard A, et al. La maladie goutteuse [J]. La Rev De Médecine Interne, 2020, 41(6): 396-403.

[24] 李文馨, 杨永生, 邹德高, 等. 基于脾胃湿热理论探讨痛风性关节炎的病因与治法 [J]. 中医药临床杂志, 2025, 37(6): 1054-1058.
Li W X, Yang Y S, Zou D G, et al. Research on etiology and treatment of gouty arthritis based on the theory of dampness-heat in spleen and stomach [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2025, 37(6): 1054-1058.

[25] 章晓云, 曾浩, 李华南, 等. 痛风性关节炎的发病机制及中医药治疗研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11): 256-267.
Zhang X Y, Zeng H, Li H N, et al. Pathogenesis of gouty arthritis and intervention with Chinese medicines: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(11):

256-267.

[26] Xu M, Wang X, Li Y, et al. Arachidonic acid metabolism controls macrophage alternative activation through regulating oxidative phosphorylation in PPARγ dependent manner [J]. Front Immunol, 2021, 12: 618501.

[27] Shaw O M, Steiger S, Liu X, et al. Brief report: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor drives monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammatory macrophage differentiation and NLRP3 inflammasome up-regulation in an *in vivo* mouse model [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(9): 2423-2428.

[28] 贾萍, 陈刚, 杨娟, 等. 四妙丸对大鼠痛风性关节炎发展的影响及调控巨噬细胞极化研究 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3498-3502.
Jia P, Chen G, Yang J, et al. Study on the effect of Simiao Pills on inflammation development and regulation of macrophage polarization in rats with gouty arthritis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(6): 3498-3502.

[29] 周琦, 孙慧娟, 刘树民. 穿山龙总皂苷调控巨噬细胞 M1/M2 极化治疗痛风性关节炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24): 92-99.
Zhou Q, Sun H J, Liu S M. Mechanism of total saponins from dioscoreae nipponicae rhizoma to treat gouty arthritis by regulating M1/M2 polarization of macrophages [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(24): 92-99.

[30] Burns J L, Nakamura M T, Ma D W L. Differentiating the biological effects of linoleic acid from arachidonic acid in health and disease [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids, 2018, 135: 1-4.

[31] Luo Y, Wang L, Peng A, et al. Metabolic profiling of human plasma reveals the activation of 5-lipoxygenase in the acute attack of gouty arthritis [J]. Rheumatology, 2019, 58(2): 345-351.

[32] Zhao X, Sun Y, Yang L, et al. Fatty acid metabolism in gouty arthritis: mechanisms to therapeutic targeting [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1671548.

[33] Dalli J, Serhan C. Macrophage proresolving mediators—the when and where [J]. Microbiol Spectr, 2016, 4(3): 367-383.

[34] Cui L, Liu R, Han S, et al. Targeting arachidonic acid metabolism enhances immunotherapy efficacy in ARID1A-deficient colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2025, 85(5): 925-941.

[35] Boutanquoi P M, Khan A S, Cabeza L, et al. A novel fatty acid analogue triggers CD36-GPR120 interaction and exerts anti-inflammatory action in endotoxemia [J]. Cell Mol Life Sci, 2024, 81(1): 176.

[36] Tsai C F, Chen G W, Chen Y C, et al. Regulatory effects of quercetin on M1/M2 macrophage polarization and oxidative/antioxidative balance [J]. Nutrients, 2022, 14(1): 67.

[37] Zec K, Schonfeldova B, Ai Z, et al. Macrophages in the synovial lining niche initiate neutrophil recruitment and articular inflammation [J]. J Exp Med, 2023, 220(8): e20220595.

[38] Mathiessen A, Conaghan P G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 18.

[39] Xu H, Zhang B, Chen Y, et al. Type Ⅱ collagen facilitates gouty arthritis by regulating MSU crystallisation and inflammatory cell recruitment [J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(3): 416-427.

〔收稿日期〕2025-12-21