

## 痛风性关节炎大鼠的制备及三种关节肿胀度检测方法的比较

Establishment of a rat gouty arthritis model and comparison of 3 methods for measuring joint swelling degree

徐权毅, 管云枫, 徐添颖, 缪朝玉\*

(第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**制备痛风性关节炎大鼠模型,比较大鼠足踝关节肿胀度3种检测方法的优缺点。**方法:**将尿酸钠注射入大鼠右后足踝关节腔内制备痛风性关节炎模型,分设吲哚美辛、中药复方及溶剂对照组。用周长、直径、重量3种检测方法测量足踝肿胀度。最后对3种检测法的优缺点进行比较,确定最优检测方法。**结果:**浓度为5%尿酸钠溶液50  $\mu\text{l}$ 造模较浓度为1.3%效果好;造模前大鼠双侧足踝直径和周长没有显著性差异,非造模侧上下午大鼠足踝直径和周长没有显著性差异;药效测定敏感性以周长法最佳。**结论:**选用浓度为5%尿酸钠溶液造模较合适;选择大鼠左足或右足,选择上午或下午不影响痛风性关节炎大鼠足踝肿胀度的测定;在3种检测方法中,从方便性、误差大小、敏感性、时间过程等各项指标综合考虑,周长法为最佳。

**[关键词]** 关节炎, 痛风性; 周长; 直径; 重量; 足肿胀; 消炎药**[中图分类号]** R 589.7 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0906-03

痛风正日益成为威胁我国人民健康的常见病。建立经济稳定的痛风动物模型,确定科学的评价指标对痛风的研究和寻找新的抗痛风药物意义重大。目前,研究痛风的动物模型主要有两类:即痛风性急性关节炎动物模型和动物高尿酸血症模型<sup>[1]</sup>,其中微晶尿酸钠致大鼠痛风性关节炎模型是一种常用模型<sup>[2]</sup>。通常采用尿酸钠混悬液注射入大鼠足踝的踝关节腔致足肿胀<sup>[3]</sup>。本研究主要探讨痛风性关节炎大鼠的模型制备,并比较周长法、直径法和重量法3种检测足肿胀度方法的优缺点,为相关的药理学评价提供参考。

## 1 材料和方法

1.1 动物 雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体质量 160~200 g,由上海 SIPPR/BK 实验动物中心提供。

1.2 试剂和药品 尿酸钠(美国 Sigma 公司产品),批号 120K5305;聚乙烯吡咯烷酮(PVP),含量 95%,中国医药集团上海化学试剂公司生产,批号 F20020131,用蒸馏水配成 30%的混悬液;中药复方,第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室提供,用 30%PVP 配成 10%的混悬液;吲哚美辛,含量 99%,批号 20060925,上海厚诚精细化工有限公司生产,用 30%PVP 配成 0.05%的溶液。

1.3 痛风性关节炎大鼠模型的制备 称取 0.2 g 尿酸钠,充分研细,加入 4 ml 无菌生理盐水,配成 5%尿酸钠混悬液,参照文献<sup>[4-5]</sup>的方法改良进行。以无菌操作方法,用 4 号注射针头,将 5%尿酸钠溶液 50  $\mu\text{l}$  注入各组大鼠右后足内踝的踝关节腔内,每个动物仅注射 1 次。

1.4 肿胀度的测定<sup>[6]</sup> 分别用皮尺(所用皮尺的宽度是 5 mm,最小刻度是 0.5 mm)和游标卡尺测量各组大鼠左右后足踝关节下 0.5 mm 处的周长和直径值。造模前测量左右足踝作为 0 h 测量值,造模后 1~5 h 内每小时测量各组大鼠右足踝(造模侧)的直径和周长值。造模后 6 h 再次测量左右足踝的直径和周长值。测完将大鼠处死,自踝关节处剪下左右后足用分析天平(可精确到 0.001 g)称质量。肿胀度用右后足(造模侧)相对于左后足(非造模侧)的周长、直径及重

量的增加值和增加百分比表示。如果观察右后足(造模侧)关节炎发生发展的时间过程,则肿胀度计算采用以下公式:造模后不同时间右后足周长增加值=(造模后不同时间周长值-造模前周长值);造模后不同时间右后足周长增加百分比=造模后不同时间右后足周长增加值/造模前周长值 $\times$ 100%,直径法计算与此类似。

1.5 药效观察 将大鼠分为 3 组,分别灌胃给予有明确抗炎作用的吲哚美辛(剂量为 5 mg/kg),可能有抗炎作用的待测中药复方(剂量为 1 g/kg),及 30%PVP 溶剂,均按大鼠每 100 g 体质量灌胃给药 1 ml,每天 2 次,连续 3 d。第 4 天再灌胃一次,灌胃后测量造模前后足踝周长和直径,然后制备痛风性关节炎模型,再用周长法、直径法<sup>[7]</sup>、重量法测定造模后不同时间点的足踝肿胀度,比较 3 种测量方法对药效检测的敏感性。

1.6 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,显著性检验先采用方差分析,然后采用非配对 *t* 检验进行组间比较。

## 2 结果

2.1 基本数据 将 4 批大鼠左、右后足的测量值作比较,可知大鼠左右侧足踝直径、周长和重量没有显著性差异。将 3 批大鼠上午 9 时和下午 17 时这 2 个时间点的左后足测量值作比较,可知上下午大鼠足踝直径和周长没有显著性差异,说明上下午不同时间不影响测量值。

2.2 尿酸钠不同浓度的影响 预实验时采用浓度为 1.3%的尿酸钠溶液 50  $\mu\text{l}$  注射发现肿胀度不够。由图 1 可知,尿酸钠浓度为 1.3%时足踝肿胀呈现波动,造模 3 h 后肿胀自然消退,不稳定,另外,关节炎程度轻微,足踝周长最多平均增加 1.9 mm,增加百分比为 7.9%(造模 2 h),这样的模型不适合于药效实验。后又采用 5%尿酸钠 50  $\mu\text{l}$  注射,足踝肿胀度在造模后 1~6 h 一直维持在较高水平,相当稳定,足踝周长最多平均增加 3.8 mm,增加百分比为 15.9%(造模 6

[作者简介] 徐权毅,硕士生. E-mail: xuquanyi@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: cymial@citiz.net

h)。图 2 为大鼠右后足内踝的胫跗关节腔内注射 5% 尿酸钠 50  $\mu$ l 8 h 后足肿胀实物照片。因此, 从评价药效的角度看, 选用浓度为 5% 的尿酸钠溶液 50  $\mu$ l 注入关节腔比较合适。后面的实验均采用 5% 尿酸钠溶液 50  $\mu$ l 注射造模。

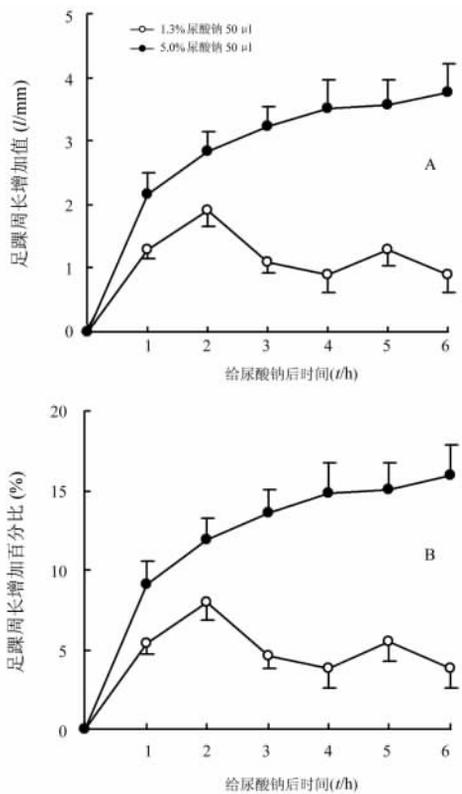


图 1 大鼠痛性关节炎严重程度与尿酸钠剂量关系  
 $n=9, \bar{x} \pm s$

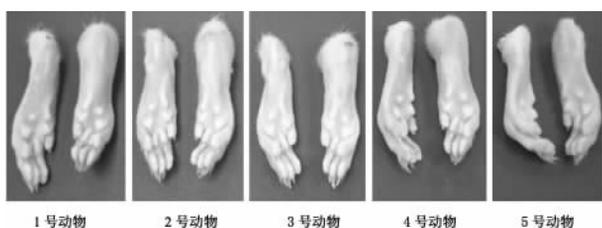


图 2 大鼠右后足内踝的胫跗关节腔内注射 5% 尿酸钠 50  $\mu$ l 8 h 后足肿胀照片  
左后足未造模, 作为正常对照

2.3 3 种测量方法检测造模效果的比较 采用直径法、周长法和重量法检测了 3 批动物造模后 6 h 的关节炎严重程度。由表 1 可知周长法和重量法检测 3 批动物的关节炎严重程度趋势一致, 即关节炎严重程度依次为: 第二批 > 第三批 > 第一批。而直径法所得的结果与周长法和重量法不一致, 即直径法检测关节炎严重程度依次为: 第三批 > 第二批 > 第一批。造成此差异的主要原因是直径法只测一处直径, 反映的是该局部直径变化, 而且足踝也不全是圆形, 多是椭圆形, 因此测量误差较大。比较周长法和重量法, 显而易见, 重量法只能检测处死后一个时间点的足肿胀度, 有一定的局限性, 而周长法可以全程检测, 显示其优越性。

表 1 3 种方法检测造模后 6 h 关节炎严重程度的比较

指标	$(\bar{x} \pm s)$		
	第一批 ( $n=9$ )	第二批 ( $n=10$ )	第三批 ( $n=8$ )
足踝周长			
增加值( $l/mm$ )	3.50 $\pm$ 0.34	4.45 $\pm$ 0.31	3.56 $\pm$ 0.48
增加百分比(%)	14.60 $\pm$ 1.4	18.50 $\pm$ 1.3	15.00 $\pm$ 2.1
足踝直径			
增加值( $l/mm$ )	0.80 $\pm$ 0.12	1.53 $\pm$ 0.10	1.85 $\pm$ 0.13
增加百分比(%)	14.90 $\pm$ 2.3	28.10 $\pm$ 1.8	34.40 $\pm$ 2.7
足重量			
增加值( $m/g$ )	0.321 $\pm$ 0.047	0.412 $\pm$ 0.04	0.362 $\pm$ 0.034
增加百分比(%)	18.400 $\pm$ 2.7	26.700 $\pm$ 2.9	23.000 $\pm$ 2.4

2.4 3 种测量方法检测药效敏感性及其优缺点的比较 采用直径法、周长法和重量法对溶剂对照组、吲哚美辛组、中药复方组造模后 6 h 关节炎严重程度进行测定和比较。由表 2 可知, 3 种检测方法均能检测出吲哚美辛组足肿胀度有非常明显的减轻, 而中药复方组未检测出差异, 说明吲哚美辛有持续强大的抗炎作用, 而中药复方在造模后 6 h 这一时间点上观察不到抗炎作用。然而, 中药复方是否真的没有任何抗炎作用呢? 为了回答这一问题, 实验同时采用了周长法和直径法进行全程检测, 并对此两种方法检测药效敏感性进行了比较。

表 2 3 种方法检测造模后 6 h 不同给药组疗效

指标	$(\bar{x} \pm s)$		
	溶剂 ( $n=10$ )	吲哚美辛 ( $n=8$ )	中药复方 ( $n=11$ )
足踝周长			
增加值( $l/mm$ )	4.45 $\pm$ 0.31	0.81 $\pm$ 0.21**	4.45 $\pm$ 0.30
增加百分比(%)	18.50 $\pm$ 1.3	3.60 $\pm$ 0.9**	19.00 $\pm$ 1.3
足踝直径			
增加值( $l/mm$ )	1.53 $\pm$ 0.10	0.17 $\pm$ 0.09**	1.47 $\pm$ 0.14
增加百分比(%)	28.10 $\pm$ 1.8	3.30 $\pm$ 1.7**	27.70 $\pm$ 2.7
足重量			
增加值( $m/g$ )	0.412 $\pm$ 0.04	0.045 $\pm$ 0.023**	0.463 $\pm$ 0.054
增加百分比(%)	26.700 $\pm$ 2.9	3.400 $\pm$ 1.7**	33.800 $\pm$ 4.4

\*\*  $P < 0.01$  与溶剂组比较

从图 3 可知, 对于吲哚美辛组, 周长法和直径法均显示在造模后 1~6 h 持续有强大的抗炎作用。但对中药复方组, 周长法显示在造模后 1~3 h 有明显的抗炎作用, 而直径法仅显示在造模后 1 h 有抗炎作用。上述结果说明, 检测抗炎药效仅观察一个时间点是不足的, 因此希望检测方法可以最大程度实施全程监测(如周长法和直径法), 而不是只能测量一次(如重量法); 与直径法比较, 周长法检测药效的敏感性较高, 对药效差异有更好的区分度。周长法、直径法、重量法 3 种测量方法各有优缺点, 以 3 种测量法的方便性、检测时间过程、敏感性、误差大小为定性指标进行分析比较, 总结如表 3。直径法和周长法都能全程检测, 但直径法只反映局部肿胀度, 测量值较小、误差大, 为减小误差常需多点测量, 不够简便。重量法和周长法都能反映整体肿胀度且操作简单, 但重量法只能检测一个时间点, 无法全程检测。总之, 周

长法有误差小、敏感性适中、能反映整体肿胀度和可全程检测的优点,因此是较好的检测方法。

表3 3种检测方法综合评价

指标	周长法	直径法	重量法
方便性	优秀	良好	优秀
时间过程监测	优秀	优秀	较差
敏感性	优秀	良好	优秀
误差小	良好	较差	良好

3 讨论

尿酸钠的浓度会影响造模的程度,实验显示浓度为5%的尿酸钠注射较为合理。同时,注射体积也会影响足肿胀度,从大鼠足踝距关节腔的容积考虑,50 μl的注射量较为合理。另外,在尿酸钠溶液的制备过程中我们发现如果不将尿酸钠颗粒研细或研磨不均匀,配制的溶液有分层现象,注射后引起的大鼠足肿胀度差异很大,甚至个别大鼠足部没有肿胀。因此在配制尿酸钠溶液前必须充分研磨尿酸钠至均匀细粉状。

检测足肿胀度的方法有多种,如周长法、直径法、重量法、体积法[8]等。尿酸钠注射部位固定,关节肿胀主要局限在注射部位周围,对整个足部体积影响不是很大,采用体积法较难检测到肿胀程度的差异;同时体积法测定过程中须依据腿部刻度线将鼠足浸入水槽,这一位置不易准确把握。由于以上原因,且体积法需要专用仪器,故未在本实验中采用。

痛风性关节炎大鼠制备作为一个常用的模型,看似简单,但其要注意的环节很多。有关此种模型制备的影响因素报道不多,多种检测方法的比较更未见报道。本文观察了尿酸钠制备痛风性关节炎大鼠的模型特点和影响因素,并比较了3种关节肿胀程度检测方法的优缺点,为痛风病的研究和药效学评价提供了有益的参考。

[参考文献]

[1] Osada Y, Tsuchimoto M, Fukushima H, et al. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents[J]. Eur J Pharmacol, 1993, 241:183-188.

[2] 时乐,徐立. 痛风性关节炎动物模型的研究现状与展望[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14:71-74.

[3] 金红兰,郭瑞新. 复方白虎加桂枝汤防治大鼠痛风模型的实验观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 2005, 15:199-201.

[4] 陈文照,关士良,顾瑞生,等. 防己黄芪汤对急性痛风外周神经递质的影响[J]. 中国医药学报, 1997, 12:25-26.

[5] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. Pain, 1987, 28:379-393.

[6] 张白嘉,刘亚欧,刘榴,等. 土茯苓及落新妇苷抗炎、镇痛、利尿作用研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20:11-12.

[7] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2001:911.

[8] 鲁澄宇,覃冬云,王海燕. 数字化压力容积法测定大鼠足容积[J]. 现代医药卫生, 2004, 20:1360.

[收稿日期] 2007-03-06

[修回日期] 2007-06-09

[本文编辑] 尹茶

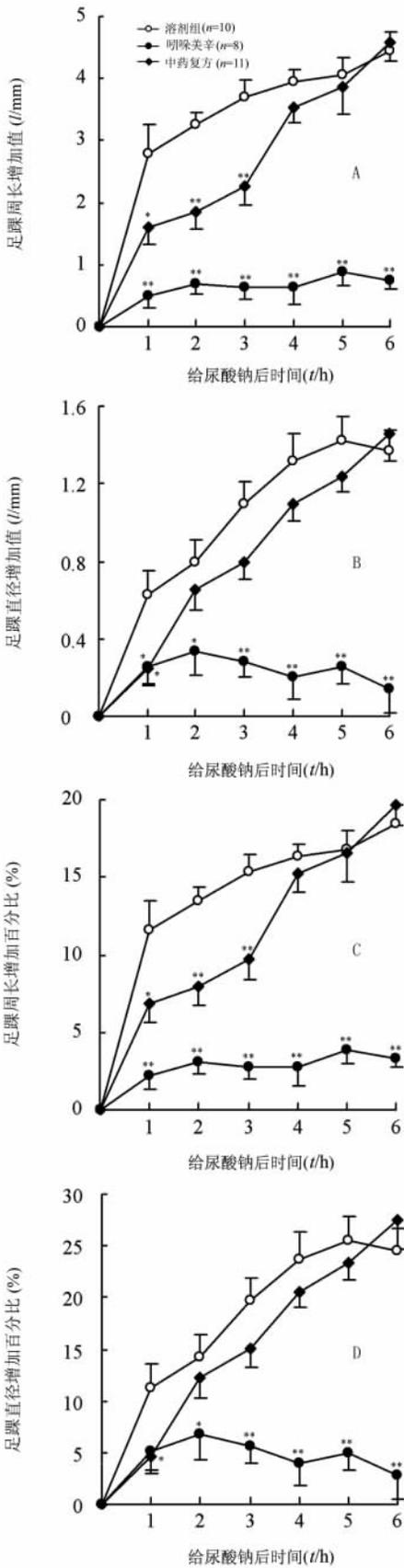


图3 周长法和直径法检测药物疗效的敏感性比较

\* P<0.05, \*\* P<0.01 与溶剂组比较;A,C,周长法;B,D,直径法; $\bar{x} \pm s$