

# 秋菊丸化学成分鉴定及靶向 GLUT9-OAT3 尿酸转运体介导慢性高尿酸血症大鼠尿酸代谢和肾保护的机制研究

努尔玛娜提·胡安别克<sup>1</sup>, 周子虔<sup>1</sup>, 王 春<sup>2, 5</sup>, 麦丽克姆·麦图如孜<sup>1</sup>, 哈木拉提·哈斯木<sup>3</sup>, 都田芳<sup>2</sup>, 祖力皮卡尔·吾斯曼<sup>1</sup>, 蔡晓霞<sup>1</sup>, 霍仕霞<sup>2, 4</sup>, 李治建<sup>2, 4\*</sup>, 斯拉甫·艾白<sup>2\*</sup>

1. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011

3. 新疆维吾尔自治区药物研究所 药理研究室, 新疆 乌鲁木齐 830011

4. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 新疆 乌鲁木齐 830049

5. 湖北天勤生物科技有限公司武汉分公司, 湖北 武汉 430075

**摘要:** 目的 初步明确秋菊丸化学成分, 研究秋菊丸对慢性高尿酸血症(HUA)模型大鼠尿酸(UA)升高及肾脏损伤的治疗作用及机制。方法 借助超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)技术, 初步鉴定秋菊丸的化学成分。48只雄性SD大鼠随机分成对照组、模型组、苯溴马隆(5.45 mg·kg<sup>-1</sup>, 阳性药)组和秋菊丸低、中、高剂量(1.31、2.62、5.24 g·kg<sup>-1</sup>)组, 除对照组外, 通过ig腺嘌呤和乙胺丁醇制备大鼠慢性HUA模型, 造模同时每天ig给药1次, 连续28 d。使用全自动生化仪测定大鼠血清UA、肌酐(CRE)、尿素氮(BUN)水平; HE及Masson染色观察肾脏组织病理学变化; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测肾脏组织中葡萄糖转运蛋白9(GLUT9)、有机阴离子转运体家族蛋白3(OAT3)、ATP结合盒亚家族G成员2(ABCG2)、转化生长因子-β(TGF-β1)、SMAD蛋白3(Smad3)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的mRNA水平。结果 秋菊丸中共鉴定出41个成分, 包括黄酮类(9个)、有机酸类(5个)、生物碱类(3个)、苯丙素类(7个)、香豆素类(1个)、酚类(3个)、呋喃类(2个)、脂肪酰类(6个)、醌类(2个)、萜类(1个)、内酯类(1个)、脂肪酸类(1个)。给药28 d后, HE染色结果表明, 与模型组比较, 各给药组肾损伤的病理学改变明显恢复, 减轻了肾小球萎缩、肾小管扩张、肾纤维化及肾间质炎性细胞浸润等病理改变, 其中秋菊丸高剂量组及苯溴马隆组肾脏损伤最轻。与模型组比较, 秋菊丸高剂量组的CRE、UA水平均显著降低( $P<0.01$ ), 各剂量组BUN水平有降低趋势, 但无显著性差异; 高、中剂量组肾脏组织中肾小管上皮细胞中胶原蛋白的含量显著降低( $P<0.05, 0.01$ ); 高剂量组GLUT9 mRNA表达量显著减少( $P<0.05, 0.01$ ), 各剂量组OAT3、ABCG2的mRNA表达量均显著增加( $P<0.05, 0.01$ ); 中、高剂量α-SMA mRNA表达量显著减少( $P<0.05, 0.01$ ), 高剂量组TGF-β1 mRNA表达量显著减少( $P<0.01$ ), 各给药组Smad3的mRNA表达量有减少趋势, 但无显著性差异。结论 初步明确秋菊丸化成分, 秋菊丸具有增强UA代谢、减轻HUA所致肾脏损伤及肾纤维化的作用, 其机制可能与调控GLUT9-OAT3尿酸转运体相关。

**关键词:** 秋菊丸; 成分; 黄酮类; 有机酸类; 生物碱类; 苯丙素类; 尿酸; 高尿酸血症; 肾损伤; 转运体

中图分类号: R284.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)06-1201-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.06.006

## Identification of chemical constituents of Qiuju Wan and study on mechanism of targeting GLUT9-OAT3 uric acid transporter mediating uric acid metabolism and renal protection in chronic hyperuricemia rats

HUANBIEKE Nuermanati<sup>1</sup>, ZHOU Ziqian<sup>1</sup>, WANG Chun<sup>2, 5</sup>, MATTURUZI Malikam<sup>1</sup>, HASIMU Hamulati<sup>3</sup>, DU Tianfang<sup>2</sup>, WUSIMAN Zulipikaer<sup>1</sup>, CAI Xiaoxia<sup>1</sup>, HUO Shixia<sup>2, 4</sup>, LI Zhijian<sup>2, 4</sup>, AIBAI Silafu<sup>2</sup>

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 国家中医药管理局古代经典名方目录定制(第二批民族医药专题 GZY-KJS-2019-011); 天山英才项目(2022TSYCCX0021, 2022TSYCLJ009); 中医药传承与创新“百千万”人才工程-青年岐黄学者

第一作者: 努尔玛娜提·胡安别克(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 1836163304@qq.com

\*共同通信作者: 李治建(1982—), 男, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为药理毒理学。E-mail: lizhijian0220@sina.com

斯拉甫·艾白(1960—), 男, 教授, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为药理毒理学。E-mail: aibai1960@sina.com

1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Uygur Medical Research Institute, Urumqi 830011, China
3. Department of Pharmacology, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830011, China
4. Xinjiang Uygur Autonomous Region Uygur Hospital, Urumqi 830049, China
5. Hubei Topgene Biotechnology Co., Ltd., Wuhan Branch, Wuhan 430075, China

**Abstract: Objective** To preliminarily clarify the chemical composition of Qiuju Wan, and to study the therapeutic effect and mechanism of Qiuju Wan on the elevation of uric acid (UA) and kidney damage in chronic hyperuricemia (HUA) model rats.

**Methods** Ultra-performance liquid chromatography tandem quadrupole electrostatic field, orbital well mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS) technology was used to preliminarily identify the chemical composition of Qiuju Wan. Forty-eight SD rats (males) were randomly divided into control group, model group, benzbromarone ( $5.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and QJW low, medium, high dose ( $1.31, 2.62, \text{ and } 5.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group. Except for control group, the rat chronic HUA model was prepared by adenine and ethambutol intragastrically, which was simultaneously given intragastrically once a day for consecutive 28 days. Biochemical parameters such as UA, creatinine (CRE) and urea nitrogen (BUN) were determined, and histopathological changes of kidney were observed by HE and Masson staining. Gene levels of *GLUT9*, *OAT3*, *ABCG2*, *TGF- $\beta$ 1*, *Smad3* and  $\alpha$ -*SMA* in kidney tissue were detected by qRT-PCR.

**Results** A total of 41 components were identified in Qiuju Wan, including flavonoids (9), organic acids (5), alkaloids (3), phenylpropanoids (7), coumarins (1), phenols (3), furans (2), fatty acyls (6), quinones (2), terpenoids (1), lactones (1), and fatty acids (1). After 28 days of administration, HE staining results showed that compared with the model group, the pathological changes of renal damage in each treatment group significantly recovered, reducing pathological changes such as glomerular atrophy, renal tubular dilation, renal fibrosis, and interstitial inflammatory cell infiltration. Among them, the high-dose group of Qiuju Wan and the group of benzbromarone had the least renal damage. Compared with model group, the CRE and UA levels in the high-dose group of Qiuju Wan were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and the BUN levels in each dose group showed a decreasing trend, but there was no significant difference. Compared with model group, the content of collagen in renal tubular epithelial cells in high and medium dose groups significantly decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ). Compared with model group, the expression level of *GLUT9* mRNA was significantly reduced in the high-dose group ( $P < 0.05, 0.01$ ), while the mRNA expression levels of *OAT3* and *ABCG2* were significantly increased in each dose group ( $P < 0.05, 0.01$ ). Compared with model group, the  $\alpha$ -*SMA* mRNA expression levels of medium and high-dose group were significantly reduced ( $P < 0.05, 0.01$ ), while the *TGF- $\beta$ 1* mRNA expression was significantly reduced ( $P < 0.01$ ) in high-dose group. The mRNA expression levels of *Smad3* in each treatment group showed a decreasing trend, but there was no significant difference. **Conclusion** Qiuju Wan can regulate uric acid transporters, thereby enhancing uric acid metabolism and alleviating kidney damage and renal fibrosis caused by high uric acid, and its mechanism may be related to regulation of GLUT9-OAT3 uric acid transporter.

**Key words:** Qiuju Wan; ingredients; flavonoids; organic acids; alkaloids; phenylpropanoids; uric acid; hyperuricemia; renal injury; transporter

高尿酸血症(HUA)是由于人体内尿酸(UA)代谢紊乱,肝脏合成增加,肾脏排出减少,从而导致UA在血液中过度沉积<sup>[1]</sup>。若不积极控制,HUA会进一步引起尿酸性肾病(HN)、痛风性关节炎(AGA)等疾病。近年来,随着社会的快速发展、人们生活节奏的加快以及饮食习惯的变化,患HUA和痛风的病人数目呈现逐年递增的趋势<sup>[2]</sup>。中国HUA的发病率因各地饮食差异在5.46%~19.30%,总体趋于年轻化,已逐渐发展为一种严重危害人类健康的代谢类疾病<sup>[3]</sup>。临床上用于HUA的药物虽然作用靶点清晰并且降UA作用明确,但不良反应较严重,常见有超敏反应综合征(AHS)、骨髓造血功能抑制、肝肾功能受损等<sup>[4-5]</sup>,且大多药物只能暂

缓患者症状,远期疗效欠佳。比较而言,少数民族医药在治疗慢性代谢疾病方面具有一定优势,近年来研究者对中医诊治越发重视<sup>[6]</sup>。

秋菊丸是维医学经典名方,由秋水仙、菊苣根、菊苣子、芦荟、诃子5味药材组方。方中秋水仙、菊苣为主药,芦荟、菊苣子为辅助药,诃子为调节药。秋水仙可生干生热,祛风止痛,消炎退肿,主治湿寒性或黏液质性关节炎、风湿及类风湿性疾病,有防治痛风的临床基础<sup>[7]</sup>。菊苣调节异常胆液质,利尿清肾,消炎退肿<sup>[8]</sup>,用于胆液质性关节痛。芦荟提高免疫力、镇痛<sup>[9]</sup>,清除脑、关节中异常改变的物质。菊苣子利尿消肿,开通阻塞,增强主药的功效。诃子清除异常胆液质和黏液质<sup>[10]</sup>。根据维医学基础

理论,在异常体液质排出体外之前,需经成熟剂调节异常体液质的黏稠度,调节体内环境,为异常体液清除体外创造条件。秋菊丸诸药合用通过异常黏液质和异常胆液质的成熟清除疗法,祛风止痛,消炎退肿,利尿清肾;起到治疗大小关节疼痛、痛风性关节炎、痛风引起的肾损伤等病症的作用。

本课题组前期研究发现<sup>[11]</sup>,秋菊丸具有显著的镇痛作用,对急性炎症有明显的抑制作用,但其降UA的药效及作用机制尚未明确,本研究首次基于超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)技术初步鉴定秋菊丸的化学成分,为研究秋菊丸的药效物质基础和质量控制指标奠定实验基础;采用腺嘌呤联合UA排泄抑制药物乙胺丁醇建立大鼠慢性HUA模型的同时给予秋菊丸,以苯溴马隆作为阳性药,从药效、组织病理学和基因水平,探讨秋菊丸降UA作用及可能机制,为抗HUA民族药开发及临床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药材与主要试剂

菊苣子药材购自新疆麦迪森制药有限公司(批号Z30276825);菊苣根、芦荟、诃子、秋水仙药材购自新疆仁誉中药饮片有限公司(批号21052001、21091701、20110904、21040601)。菊苣子、菊苣根、芦荟、诃子、秋水仙药材经新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所副研究员库尔班尼沙鉴定分别为菊苣 *Cichorium intybus* L. 的种子和根、好望角芦荟 *Aloe ferox* Miller 的植物叶的汁液浓缩干燥物、使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 的干燥成熟果实、秋水仙 *Colchicum autumnale* L. 的干燥鳞茎。

苯溴马隆片(批号2002785,德国赫曼大药厂);甲醇、乙腈(LC-MS级,CNW Technologies);甲酸(LC-MS级,Sigma-Aldrich公司);L-2-氯苯丙氨酸(批号10366-89-3,上海恒柏生物科技有限公司);芦丁(HPLC级,批号wkq22010602,四川省维克奇生物科技有限公司);无水三氯化铝[分析纯,批号20230201,福晨(天津)化学试剂有限公司];盐酸乙胺丁醇片(杭州民生药业股份有限公司,批号T22A065);腺嘌呤(批号20270207)、Masson三色染色试剂盒(批号20221116),均购自北京索莱宝科技有限公司;肌酐(CRE)肌氨酸氧化酶法测定试剂盒(批号141122008)、尿素氮(BUN)紫外-谷氨酸脱氢酶法测定试剂盒(批号141322003)、尿酸(UA)尿酸酶-过氧化物酶法测定试剂盒(批号141222001)

均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;TRIzol™ Reagent[维百奥(北京)生物科技有限公司,批号15596026];All-In-One 5X RT Master Mix(ABM公司,货号G592);EvaGreen Express 2×qPCR MasterMix-Low Rox(ABM公司)。

### 1.2 主要仪器

RE-501型旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限公司);Tecan InfiniteF50型酶标仪(瑞士帝肯公司);BS-480型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);D3024R型台式高速冷冻型微量离心机(美国Scilogex公司);DM3000型显微镜(德国LEICA公司);TL2010S高通量组织研磨仪(北京鼎昊源科技有限公司);Nano-100型微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司);BG-Power600i型常规电泳仪电源(北京百晶生物技术有限公司);DYCZ-21型电泳槽(北京市六一仪器厂);2500型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);MyCycler Thermal Cycler型PCR仪(Bio-Rad公司);7500 Fast型RT PCR instrument(ABI公司)。

### 1.3 实验动物

48只SPF级健康大鼠(雄性),体质量为(200±20)g,由新疆医科大学动物实验中心提供,实验动物使用许可证号SYXK(新)2018-0003。实验动物在实验前环境适应性饲养5d,每天进食、饮水自由,每天持续照明12h,室温保持23~26℃。本实验经新疆维吾尔自治区药物研究所伦理委员会批准,批准文号为XJIMM--20220710。

## 2 方法

### 2.1 秋菊丸制备方法

按处方量称取秋水仙、菊苣根、菊苣子、芦荟、诃子,粉碎,过筛,加入8倍量水,加热回流提取2次,每次1h,合并2次滤液,静止放置,将滤过液浓缩成与水的相对密度为1.15~1.20(60℃)的浸膏。真空干燥,粉碎,过筛,得秋菊丸提取物。以芦丁为对照品,紫外法检测秋菊丸中总黄酮质量分数为6.734%。

### 2.2 秋菊丸化学成分分析

**2.2.1 供试品溶液制备** 称取“2.1”项下的秋菊丸样品100mg,加入500μL的提取液[甲醇:水=4:1,内标物(2-氯苯丙氨酸)质量浓度为10μg·mL<sup>-1</sup>];在45Hz下匀浆4min,在冰水浴条件下超声1h;-40℃冰箱中静置1h后,4℃、12000r·min<sup>-1</sup>离心15min;上清液用0.22μm的微孔滤膜滤过后待分析。

**2.2.2 色谱及质谱条件** 色谱条件:使用 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 体积流量为0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积为5 μL, 流动相为0.1% 甲酸(A)-含0.1% 甲酸的乙腈(B)。梯度洗脱:0~11 min, 85%~25%A; 11~12 min, 25%~2%A; 12~14 min, 2%A; 14.0~14.1 min, 2%~85%A; 14.1~15.0 min, 85%A; 15~16 min, 85%A。

质谱条件:鞘气流量45 Arb, 辅助气流量15 Arb, 毛细管的温度是400 °C, Full ms 的分辨率是70 000, MS/MS 的分辨率是17 500, NCE 模式下的碰撞能量是15、30、45 eV, 喷雾电压为4.0 kV(正离子)或者-4.0 kV(负离子)。

## 2.3 动物分组、造模及给药

48 只雄性 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、苯溴马隆(5.45 mg·kg<sup>-1</sup>, 阳性药)组和秋菊丸低、中、高剂量(1.31、2.62、5.24 g·kg<sup>-1</sup>)组, 每组8只。

参考《药理实验方法学》(第4版)及预试验结果确定造模方法。除对照组外(给予纯净水), 其余各组动物每天上午ig 腺嘌呤(100 mg·kg<sup>-1</sup>)和乙胺丁醇(250 mg·kg<sup>-1</sup>)造模。同期各给药组动物ig 给药, 对照组及模型组给予纯净水, 给药体积10 mL·kg<sup>-1</sup>, 每天1次, 连续28 d。

## 2.4 标本采集

**2.4.1 血液标本收集** 实验第14天大鼠内眦采血约1 mL, 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min 取血清。实验第28天, ip 戊巴比妥钠40 mg·kg<sup>-1</sup>麻醉大鼠, 腹主动脉采集血液后, 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min 取上清。

**2.4.2 肾组织取材** 取大鼠双侧肾脏, 一侧置于10%多聚甲醛溶液中固定用于病理学检查, 另一侧用液氮速冻, -80 °C保存。

## 2.5 组织病理学观察

**2.5.1 HE 染色** 将“2.4”项固定好的肾脏组织取出, 脱水、包埋、切片、脱蜡、HE 染色、封片, 最后用电子显微镜观察。

**2.5.2 Masson 染色** 将“2.4”项中的切片用配制好的 Weigert 铁苏木素染色液染色, 酸性乙醇分化液分化, 水洗后用 Masson 蓝化液返蓝。蒸馏水洗, 丽春红品红染色液染色, 弱酸工作液洗后磷钼酸溶液洗, 放入苯胺蓝染色液中染色。95% 乙醇快速脱水, 无水乙醇脱水3次, 二甲苯透明3次, 中性树脂封固后用电子显微镜观察。采用 Image J 软件计算 Masson 染色中胶原纤维的面积来评价各组肾脏纤维化程度。

## 2.6 血清肾功能生化指标检测

使用全自动生化仪测定大鼠血清 UA、CRE、BUN 水平。

## 2.7 实时荧光定量 PCR(荧光定量 PCR)实验

提取肾脏组织总 RNA, 反转录为 cDNA 后作为模板进行扩增, 检测葡萄糖转运蛋白9(GLUT9)、有机阴离子转运体家族蛋白3(OAT3)、ATP 结合盒亚家族 G 成员2(ABCG2)、转化生长因子-β1(TGF-β1)、SMAD 蛋白3(Smad3)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的 mRNA 表达变化, 引物序列见表1。

表1 引物信息

Table 1 Primer information

| 引物名称      | 序列(5'→3')             | 产物大小/bp |
|-----------|-----------------------|---------|
| GLUT9-F   | ATACATGACACCACTGGCCC  | 193     |
| GLUT9-R   | AGGCCTTGATATACGGCGTG  |         |
| OAT3-F    | CCCAAGCAGTACCCTTCTGG  | 144     |
| OAT3-R    | TGGGTTGTAGGCTATGGTGG  |         |
| ABCG2-F   | TAGGTCGGTGTGCGAGTCA   | 184     |
| ABCG2-R   | TAGCACATCTCCCTCTGCGA  |         |
| α-SMA-F   | GGATCAGCGCCTTCAGTTCT  | 107     |
| α-SMA-R   | AGGGCTAGAAGGGTAGCACA  |         |
| TGFβ1-F   | GACTCTCCACCTGCAAGACC  | 100     |
| TGFβ1-R   | GGACTGGCGAGCCTTAGTTT  |         |
| Smad3-F   | CAACTGCAGTGCCGCTATCC  | 279     |
| Smad3-R   | TTCACCAAGCTCTTGACCGC  |         |
| β-actin-F | CCCATCTATGAGGGTTACGC  | 150     |
| β-actin-R | TTTAATGTCACGCACGATTTC |         |

## 2.8 统计学方法

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 23.0 软件进行数据统计与分析, 两组比较采用单因素方差分析, 方差齐时用 LSD 法, 方差不齐时用秩和检验。使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘制成图。

## 3 结果

### 3.1 秋菊丸的化学成分

图1为秋菊丸在负、正离子模式下的质谱图。通过对二级碎片离子峰数据的分析结合相关的文献对比, 初步鉴定出秋菊丸中41个化学成分, 结果见表2, 包括黄酮类(9个)、机酸类(5个)、生物碱类(3个)、苯丙素类(7个)、香豆素类(1个)、酚类(3个)、呋喃类(2个)、脂肪酰类(6个)、醌类(2个)、萜类(1个)、内酯类(1个)、脂肪酸类(1个)。

### 3.2 秋菊丸中化合物的裂解规律推断

秋菊丸中共鉴定出9个黄酮类成分, 以化合物

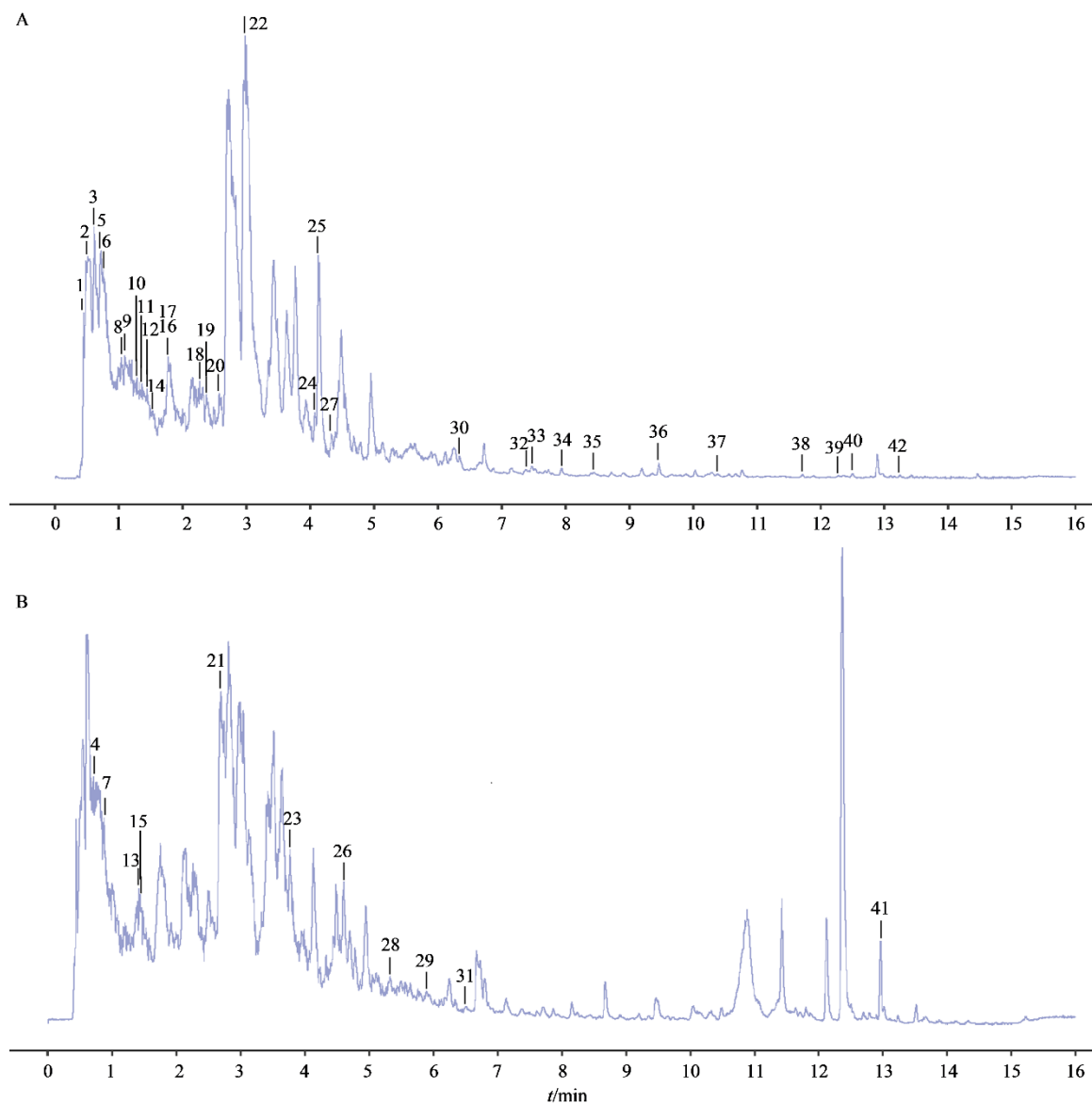


图1 秋菊丸负(A)、正(B)离子模式色谱图

Fig. 1 Chromatogram of negative (A) and positive (B) ion modes of Qiuju Wan

表2 秋菊丸的UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS成分鉴定结果

Table 2 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS component identification results of Qiuju Wan

| 序号 | $t_R/\text{min}$ | 化合物                                | 类别   | 分子式                                              | 模式                      | 实测 $m/z$ | 碎片离子                                   | 来源 |
|----|------------------|------------------------------------|------|--------------------------------------------------|-------------------------|----------|----------------------------------------|----|
| 1  | 0.54             | 苹果酸                                | 有机酸类 | $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$                 | $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 133.014  | 115.004、71.014、133.014、72.993、89.025   | 菊苣 |
| 2  | 0.73             | 莽草酸                                | 有机酸类 | $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$              | $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 173.045  | 111.009、93.034、85.029、73.030、83.050    | 诃子 |
| 3  | 0.88             | (S)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶[3,4-b]吡啶-3-羧酸 | 生物碱类 | $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ | $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 217.097  | 144.081、74.023、217.098、171.092、173.107 | 菊苣 |
| 4  | 0.91             | 3,4-二羟基肉桂酸                         | 苯丙素类 | $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$                 | $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 179.035  | 135.044、179.035、59.014、71.014、89.025   | 菊苣 |
| 5  | 0.93             | 秦皮乙素                               | 香豆素类 | $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$                 | $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 177.019  | 177.019、133.03、105.035、89.041、149.025  | 菊苣 |

续表2

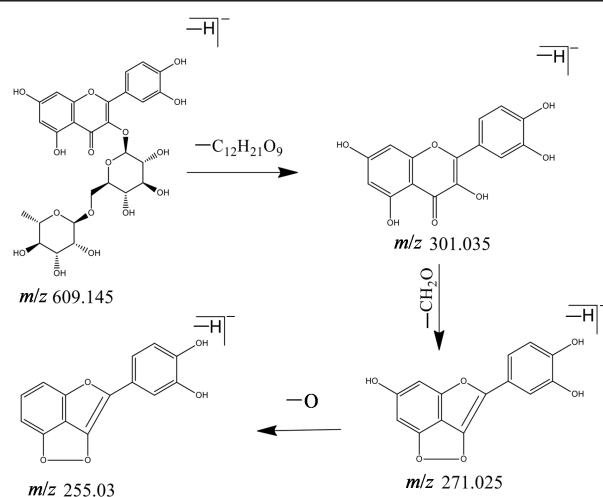
| 序号 | $t_R/\text{min}$ | 化合物                                                                                        | 类别   | 分子式                                       | 模式                         | 实测 $m/z$ | 碎片离子                                    | 来源    |
|----|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------------|-------|
| 6  | 0.99             | 5-羟基-8-(4-羟基苯基)-2,2-二甲基-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -苯并[1,2- <i>b</i> :5,4- <i>b'</i> ]二吡喃-6-酮) | 黄酮类  | $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5$    | $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ | 354.133  | 354.128、217.05、189.054、259.098、96.044   | 芦荟    |
| 7  | 1.19             | 鞣花酸                                                                                        | 苯丙素类 | $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$       | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 300.999  | 301.001、92.687、229.015、283.997、299.988  | 诃子    |
| 8  | 1.20             | 柠檬酸                                                                                        | 有机酸类 | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$          | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 191.020  | 111.009、87.008、85.029、191.019、57.035    | 菊苣、芦荟 |
| 9  | 1.34             | 没食子酸                                                                                       | 酚类   | $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$          | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 169.014  | 125.025、169.015、92.682、81.034、69.035    | 诃子    |
| 10 | 1.38             | 反式对羟基肉桂酸                                                                                   | 苯丙素类 | $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$          | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 163.040  | 119.050、163.040、93.034、120.054、53.512   | 芦荟    |
| 11 | 1.38             | 槲皮素-3- <i>O</i> -芸香糖苷                                                                      | 黄酮类  | $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 609.145  | 300.027、609.149、301.035、271.025、255.030 | 芦荟    |
| 12 | 1.55             | 2-乙酰基呋喃                                                                                    | 呋喃类  | $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$          | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 111.044  | 111.044、55.054、83.048、65.038、53.039     | 诃子    |
| 13 | 1.58             | 没食子酸乙酯                                                                                     | 酚类   | $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$       | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 197.046  | 197.046、169.015、125.025、178.999、168.007 | 诃子    |
| 14 | 1.65             | 5-羟甲基-2-糠醛                                                                                 | 呋喃类  | $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$          | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 127.039  | 109.028、81.034、127.039、53.039、71.049    | 菊苣    |
| 15 | 1.99             | 绿原酸                                                                                        | 苯丙素类 | $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$    | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 353.087  | 191.056、111.009、179.035、135.046、353.091 | 菊苣    |
| 16 | 1.99             | 1,3-二咖啡酰奎宁酸                                                                                | 苯丙素类 | $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 515.119  | 191.056、353.09、179.035、515.121、173.045  | 菊苣    |
| 17 | 2.43             | 芥子酸                                                                                        | 苯丙素类 | $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$    | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 223.061  | 223.060、179.072、92.687、164.047、151.076  | 诃子    |
| 18 | 2.54             | 壬二酸                                                                                        | 脂肪酰类 | $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$       | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 187.097  | 125.098、187.097、97.066、57.035、169.088   | 菊苣    |
| 19 | 2.95             | 异阿魏酸                                                                                       | 苯丙素类 | $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$    | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 193.051  | 193.050、149.061、92.687、105.071、107.051  | 菊苣    |
| 20 | 3.08             | 木犀草素                                                                                       | 黄酮类  | $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$    | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 287.054  | 269.041、213.053、287.051、270.07、55.002   | 菊苣、诃子 |
| 21 | 3.23             | 对羟基苯乙酸                                                                                     | 酚类   | $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$          | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 151.040  | 107.051、151.041、123.045、92.685、89.025   | 菊苣    |
| 22 | 3.81             | 芹菜素                                                                                        | 黄酮类  | $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$    | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 261.111  | 261.110、243.102、191.069、71.049、215.070  | 菊苣    |
| 23 | 4.13             | 3-羟基黄酮                                                                                     | 黄酮类  | $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$    | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 239.070  | 239.069、211.076、165.069、193.066、221.059 | 菊苣    |
| 24 | 4.17             | 槲皮素-3-甲醚                                                                                   | 黄酮类  | $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$    | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 315.051  | 271.063、315.054、227.072、243.066、215.070 | 芦荟    |
| 25 | 4.61             | 秋水仙碱                                                                                       | 生物碱类 | $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_6$   | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 400.175  | 341.135、282.123、285.113、267.101、298.121 | 秋水仙   |
| 26 | 4.91             | 松属素                                                                                        | 黄酮类  | $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$    | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 255.067  | 255.065、225.054、209.061、92.682、237.056  | 诃子    |
| 27 | 5.28             | 11-甲氧基仰光宁                                                                                  | 内酯   | $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$    | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 275.091  | 147.044、119.048、275.128、107.049、91.054  | 菊苣    |

续表2

| 序号 | $t_R/\text{min}$ | 化合物               | 类别   | 分子式                                     | 模式                         | 实测 $m/z$ | 碎片离子                                        | 来源        |
|----|------------------|-------------------|------|-----------------------------------------|----------------------------|----------|---------------------------------------------|-----------|
| 28 | 5.76             | 脱癸秋水仙碱            | 生物碱类 | $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 372.180  | 313.141、282.123、<br>285.113、267.101、298.121 | 秋水仙       |
| 29 | 6.43             | 山柰酚               | 黄酮类  | $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 285.040  | 285.040、256.038、<br>239.035、267.029、114.092 | 菊苣        |
| 30 | 6.63             | 十九酸               | 有机酸类 | $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$  | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 271.274  | 240.230、271.273、<br>225.055、253.050、57.070  | 芦荟        |
| 31 | 7.46             | 棕榈酸甲酯             | 脂肪酰类 | $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$  | $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ | 315.254  | 315.255、297.243、<br>313.237、185.118、92.685  | 诃子        |
| 32 | 7.53             | 芦荟大黄素             | 醌类   | $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 269.046  | 269.047、240.044、89.025、<br>59.572、74.958    | 芦荟        |
| 33 | 8.20             | 大黄素               | 醌类   | $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 269.046  | 269.047、240.044、56.993、<br>89.025、60.020    | 芦荟        |
| 34 | 8.44             | 十六碳二酸             | 脂肪酰类 | $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_4$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 285.207  | 285.209、223.206、<br>267.198、53.961、81.330   | 诃子        |
| 35 | 9.48             | 黄芩素               | 黄酮类  | $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 269.046  | 269.047、240.044、61.446、<br>64.763、64.460    | 芦荟        |
| 36 | 10.37            | 9-羟基-10,12-十八碳二烯酸 | 脂肪酰类 | $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_3$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 295.227  | 295.226、92.685、73.897、<br>58.289、66.024     | 诃子        |
| 37 | 11.27            | 棕榈酸               | 脂肪酰类 | $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 255.233  | 255.236、219.844、92.682、<br>53.274、64.942    | 诃子、<br>芦荟 |
| 38 | 12.24            | $\alpha$ -亚麻酸     | 脂肪酰类 | $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$  | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 279.232  | 67.054、81.070、95.085、<br>279.23、149.024     | 芦荟        |
| 39 | 12.52            | 亚油酸               | 脂肪酸类 | $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 279.233  | 279.233、60.055、76.702、<br>63.782、86.786     | 诃子、<br>芦荟 |
| 40 | 12.96            | 顺-6-十八碳烯酸         | 有机酸类 | $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$  | $[\text{M}+\text{H}]^+$    | 283.263  | 283.264、284.294、57.070、<br>71.085、88.075    | 诃子        |
| 41 | 13.11            | 山楂酸               | 萜类   | $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$  | $[\text{M}-\text{H}]^-$    | 471.348  | 471.345、92.682、52.374、<br>409.347、393.317   | 诃子        |

11 槲皮素-3-*O*-芸香糖苷为例,进行其质谱裂解规律推导。槲皮素-3-*O*-芸香糖苷在负离子模式下的质谱响应较好,色谱保留时间为1.38 min,准分子离子峰为  $m/z$  609.145  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,产生的二级离子碎片有: $m/z$  301.035  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_9]^-$ 为槲皮素-3-*O*-芸香糖苷脱去1个葡萄糖和1个甘露糖后形成的槲皮素的离子碎片, $m/z$  271.025  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_9-\text{CH}_2\text{O}]^-$ 为  $m/z$  301.035 脱去1个环内甲氧基的碎片离子, $m/z$  255.03  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_9-\text{CH}_2\text{O}-\text{O}]^-$ 为  $m/z$  271.025 脱去1个氧的碎片离子,其可能的裂解途径如图2。

秋菊丸中共鉴定出7个苯丙素类成分,以化合物15绿原酸为例,进行其质谱裂解规律推导。绿原酸是由咖啡酸与奎尼酸组成的缩酚酸,在负离子模式下的质谱响应较好,色谱保留时间为1.99 min,准分子离子峰为  $m/z$  353.087  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,产生的二级离子碎片有: $m/z$  191.056  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4]^-$ 为绿原酸

图2 槲皮素-3-*O*-芸香糖苷可能的裂解规律Fig. 2 Possible cleavage of quercetin-3-*O*-rutinoside

脱去咖啡酸后形成的离子碎片, $m/z$  111.009  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4-\text{CO}_2\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^-$ 为  $m/z$  191.019 脱去1个羧基和2个水后的碎片离子, $m/z$  179.035  $[\text{M}-\text{H}-$

$C_7H_{12}O_6$ ] $^-$ 为  $m/z$  353.087 脱去奎尼酸后的碎片离子,  $m/z$  135.046 [ $M-HC_7H_{12}O_6$ ] $^-$ 为  $m/z$  179.035 脱去 1 个羧基后的碎片离子,其可能的裂解途径见图3。

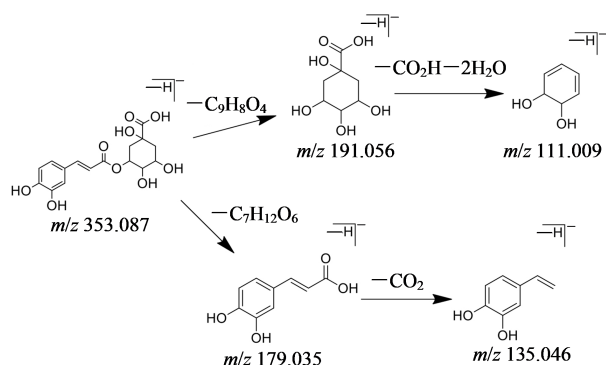


图3 绿原酸可能的裂解规律

Fig. 3 Possible cleavage of chlorogenic acid

秋菊丸中共鉴定出 5 个有机酸类成分,以化合物 8 柠檬酸为例,进行其质谱裂解规律推导。柠檬酸在负离子模式下的质谱响应较好,色谱保留时间为 1.20 min,分子离子峰为  $m/z$  191.019 [ $M-H$ ] $^-$ ,产生的二级离子碎片有:  $m/z$  111.009 [ $M-H-C_1H_4O_4$ ] $^+$ 为柠檬酸脱去 1 个羧基、1 个水后,其中还剩下的 2 个羧基进行脱去 1 个水环合,从而形成稳定的五元环刚性平面结构;  $m/z$  85.029 [ $M-H-C_2H_2O_5$ ] $^-$ 为  $m/z$  191.019 脱去 2 个羧基和 1 个水后的碎片离子;  $m/z$  57.035 [ $M-H-C_2H_2O_5-CO$ ] $^-$ 为  $m/z$  85.029 离子碎片继续脱去 1 个羧基后的碎片离子;  $m/z$  87.008 [ $M-H-C_3H_4O_4$ ] $^-$ 为  $m/z$  191.019 脱去 1 个羧基、1 个亚甲基和 2 个水后的碎片离子,其可能的裂解途径见图4。

秋菊丸中共鉴定出 3 个生物碱类成分,以化合物 25 秋水仙碱为例,进行其质谱裂解规律推导。秋水仙碱在正离子模式下的质谱响应较好,色谱保留时间为 4.61 min,分子离子峰为  $m/z$  400.175 [ $M$ ] $^+$ ,产生的二级离子碎片有:  $m/z$  341.135 [ $M+H-C_2H_5NO$ ] $^+$ 为秋水仙碱脱去 1 个乙酰胺基和 1 个氢后的碎片离子,  $m/z$  267.101 [ $M+H-C_2H_5NO_2-CH_3O-CH_2$ ] $^+$ 为  $m/z$  341.135 离子碎片继续脱去 2 个甲氧基和 1 个亚甲基后的碎片离子,  $m/z$  285.111 [ $M+H-C_2H_5NO-CH=CH$ ] $^+$ 为  $m/z$  341.135 离子碎片继续脱去 1 个环内乙烯基后的碎片离子;  $m/z$  298.121 [ $M+H-C_4H_6O_2-CH_2$ ] $^+$ 为  $m/z$  400.175 [ $M$ ] $^+$ 经苯环碎裂脱去 1 个  $C_4H_6O_2$  和 1 个亚甲基后的碎片离子,  $m/z$  282.123 [ $M+H-C_4H_6O_2-CH_2-O$ ] $^+$ 为  $m/z$  282.123 脱去 1 个氧后的碎片离子,其可能的裂解途径见图5。

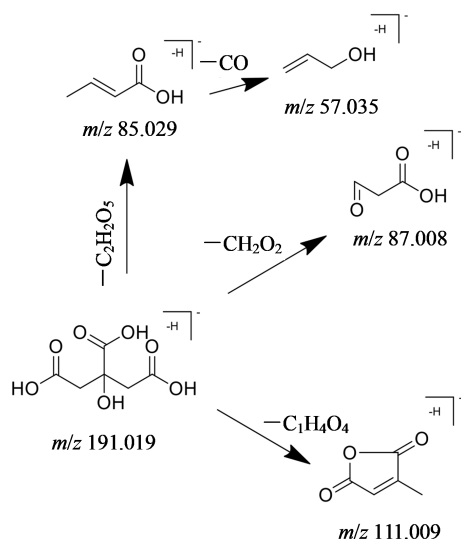


图4 柠檬酸可能的裂解规律

Fig. 4 Possible cleavage of citric acid

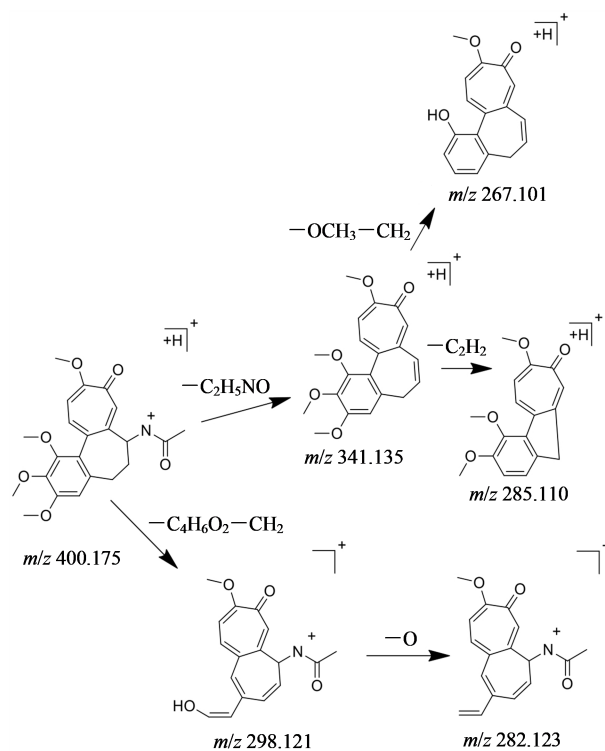
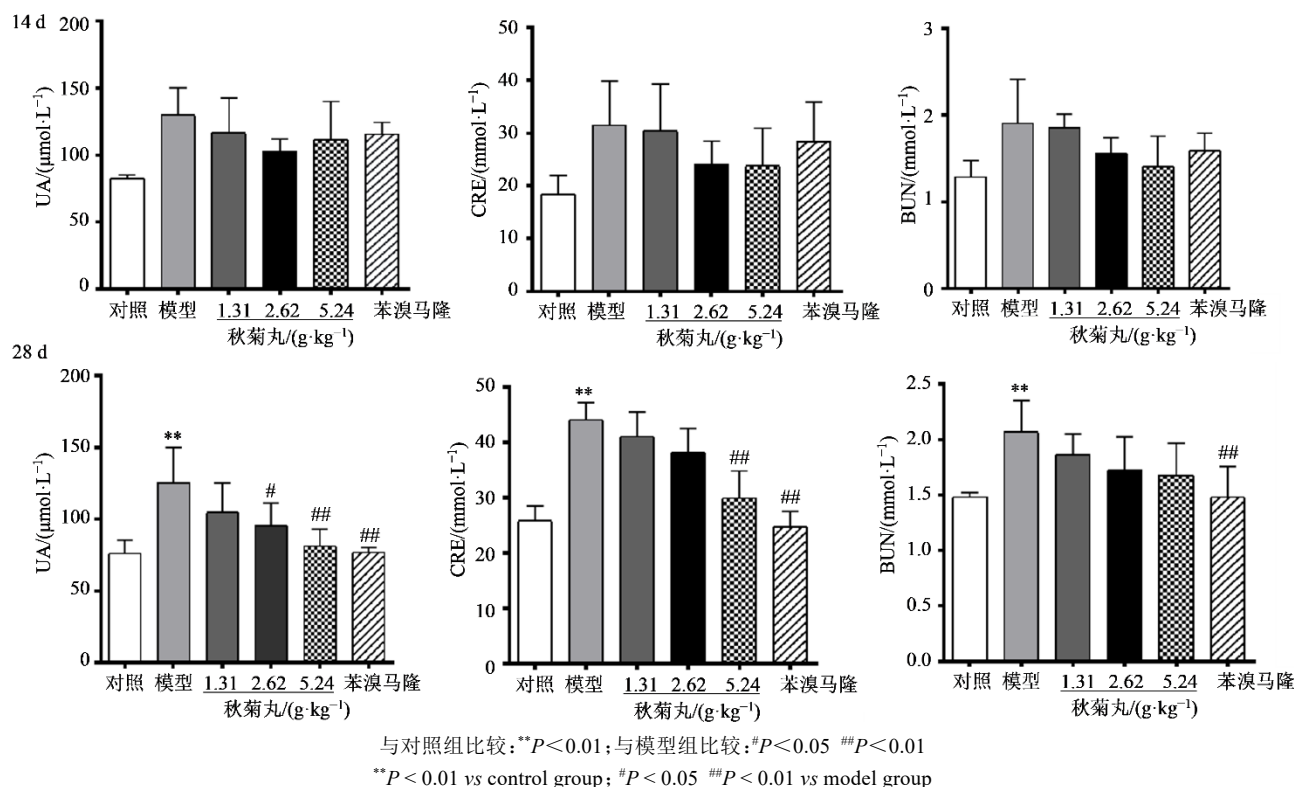


图5 秋水仙碱可能的裂解规律

Fig. 5 Possible cleavage of colchicine

### 3.3 秋菊丸对 HUA 大鼠血清生化指标的影响

与对照组比较,实验第 14 天模型组大鼠血清 BUN、CRE、UA 水平升高但无显著性差异,实验第 28 天模型组大鼠血清 BUN、CRE、UA 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,实验第 28 天,秋菊丸高剂量组、苯溴马隆组的 CRE、UA 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ),苯溴马隆组 BUN 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),秋菊丸各剂量组 BUN 水平有相对降低趋势,但无显著性差异,结果见图6。

图6 秋菊丸对HUA大鼠血清生化指标水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )Fig. 6 Effects of Qiuju Wan on content of biochemical indexes of HUA rat ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

### 3.4 秋菊丸对HUA大鼠肾组织病理学的影响

**3.4.1 HE染色结果** 在组织病理学结果中,与对照组比较,模型组肾组织出现明显的病理改变,包括肾小管扩张、肾小球萎缩、肾小管结构不清、间质炎性细胞浸润;形成严重的肾小管-间质病变,包括肾小管变性、坏死、萎缩、嗜碱性变和肾间质纤维化。与模型组比较,各给药组肾损害的病理学改变明显恢复,肾小球萎缩、肾小管扩张、肾纤维化及肾间质炎性细胞浸润等病理改变均减轻,其中秋菊丸高剂量组及苯溴马隆组肾脏损伤最轻,结果见图7。

**3.4.2 Masson染色结果** 如图8、9所示,与对照组比较,模型组肾脏小管内有大量的胶原纤维沉淀( $P < 0.05$ );与模型组比较,秋菊丸高、中剂量组和苯溴马隆组肾组织中肾小管上皮细胞中胶原蛋白的含量显著降低( $P < 0.05, 0.01$ ),秋菊丸高剂量组与苯溴马隆组相当。结果提示,秋菊丸能显著减轻HUA大鼠肾脏纤维化病变。

### 3.5 秋菊丸对HUA大鼠尿酸转运体相关基因表达的影响

与对照组比较,模型组 *GLUT9* mRNA 表达量显著增加( $P < 0.01$ ), *OAT3*、*ABCG2* mRNA 表达量显

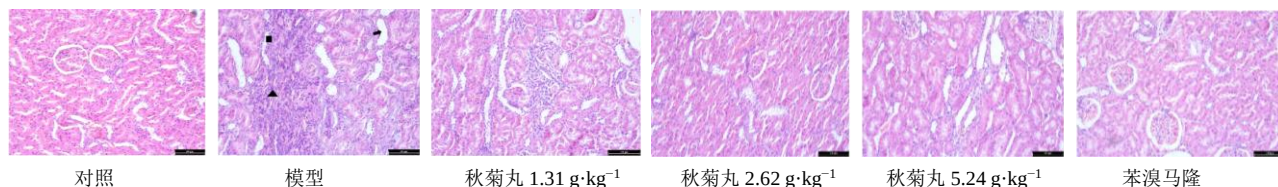


图7 各组大鼠肾组织病理变化(HE染色, ×100)

Fig. 7 Pathological changes in kidney tissue in rats in each group (HE staining, ×100)

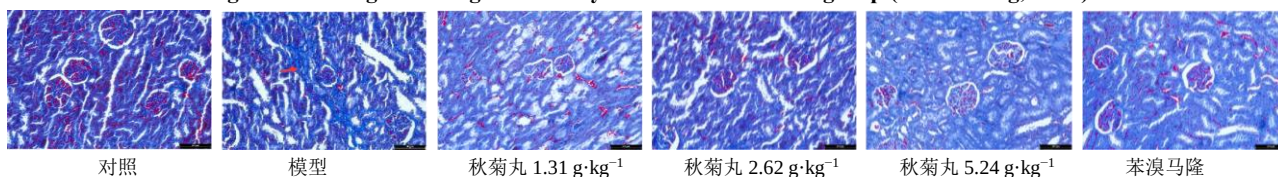
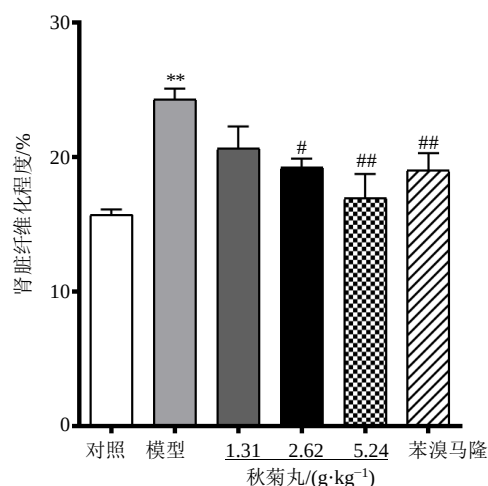


图8 大鼠肾组织纤维化程度(Masson染色, ×100)

Fig. 8 Degree of fibrosis of kidney tissue in rats (Masson staining, ×100)

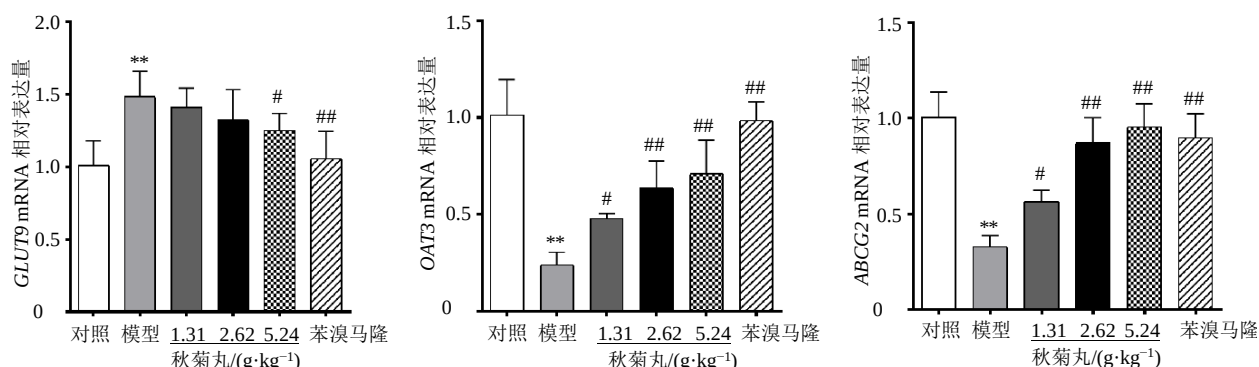


与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$   
 \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

图9 Masson染色评价各组肾脏纤维化程度( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 9 Degree of renal fibrosis in each group evaluated by Masson staining ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

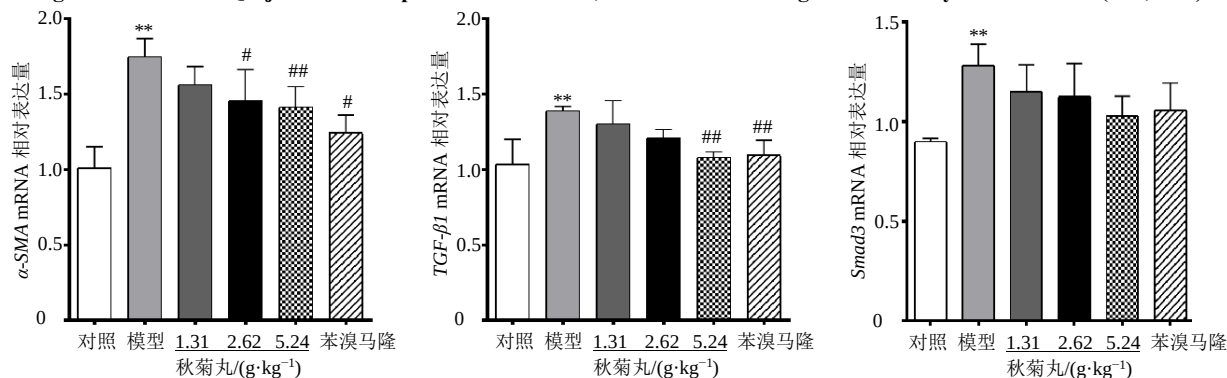
著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,秋菊丸各剂量组 *GLUT9* mRNA 表达量均有减少趋势,秋菊丸高剂量组及苯溴马隆组 *GLUT9* mRNA 表达量显著减



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$   
 \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

图10 秋菊丸对HUA大鼠肾脏 *GLUT9*、*OAT3*、*ABCG2*基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 10 Effects of Qiuju Wan on expression of *GLUT9*, *OAT3* and *ABCG2* genes in kidneys of HUA rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$   
 \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

图11 秋菊丸对HUA大鼠肾脏  $\alpha$ -SMA、*TGF-β1*、*Smad3*基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 11 Effects of Qiuju Wan on gene expression of  $\alpha$ -SMA, *TGF-β1* and *Smad3* in kidneys of HUA rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

少( $P < 0.05, 0.01$ ),秋菊丸各剂量组及苯溴马隆组的 *OAT3*、*ABCG2* mRNA 表达量均显著增加( $P < 0.05, 0.01$ )。结果见图10。

### 3.6 秋菊丸对HUA大鼠肾纤维化相关基因表达的影响

与对照组比较,模型组 *TGF-β1*、*Smad3* 及  $\alpha$ -SMA 的 mRNA 表达量显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,秋菊丸中、高剂量及苯溴马隆组  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量显著减少( $P < 0.05, 0.01$ ),秋菊丸高剂量及苯溴马隆组 *TGF-β1* mRNA 表达量显著减少( $P < 0.01$ ),各给药组 *Smad3* mRNA 表达量有减少趋势,但无显著性差异,见图11。

## 4 讨论

经典名方具有疗效确切、应用广泛、有明显特色与优势等特点<sup>[12]</sup>。本研究使用的秋菊丸在临床使用数十年,患者回馈效果极佳,本课题组前期研究已表明其有显著的抗炎镇痛作用。中药复方的化学成分极其复杂、而且物质基础不明确,在一定范围内限制了复方制剂的临床用药安全<sup>[13]</sup>,因

此,阐明其物质基础以及作用机制是其临床应用的重要前提。近年来液质联用技术在中药成分分析研究中应用广泛,具有广泛的分析范围、较强的分离能力、结果稳定可靠、全程高自动化等优点<sup>[14]</sup>,在复方研究中具有重要意义。本实验通过液质联用技术获得化合物的结构信息,结合文献报道<sup>[7-10,15-20]</sup>对秋菊丸的成分进行鉴定,在检测到的成分中包括有机酸类、生物碱类、苯丙素类、香豆素类、黄酮类、酚类、呋喃类、脂肪酰类、醌类、萜类等共41个成分。

HUA发病机制与体内UA的生成过多、排泄减少有关。UA在尿液中的排泄主要取决于肾近端肾小管上皮细胞的顶端膜或基底膜中的UA转运相关蛋白<sup>[21]</sup>,UA转运体被认为是调节HUA的重要靶点。此外,研究表明HUA与肾脏疾病的发生和发展有关<sup>[22]</sup>,长期HUA会进一步导致肾脏纤维化,引起肾脏功能受损,是慢性肾脏疾病(CKD)患病率增加的关键因素<sup>[23]</sup>。基于此建立腺嘌呤-乙胺丁醇HUA模型,腺嘌呤能促进UA的快速生成,并在血液中产生高浓度晶体,并在肾脏间、骨髓中沉淀,诱发肾脏小管-间质炎症和纤维化。乙胺丁醇会对UA的排泄产生影响,从而导致UA在体内的积累增多<sup>[24]</sup>。BUN、CRE、UA是评估肾功能最直观的、临床应用最广泛的指标,反映肾滤过与重吸收功能<sup>[25]</sup>。

在肾脏排泄途径中,UA转运体对UA的重吸收和分泌起着重要作用<sup>[26]</sup>。UA重吸收转运蛋白GLUT9负责调节UA返回血液。OAT3于肾脏基底膜外侧表达,将尿酸盐从血液输送到近端肾小管细胞,负责UA的排泄<sup>[27]</sup>。另一方面,ABCG2表达于近曲小管管腔膜侧,通过转运UA来调节UA水平<sup>[28]</sup>,ABCG2表达量减少会引起肾中的尿酸盐排出降低,从而使血浆中UA升高<sup>[29]</sup>。因此,本研究以尿酸盐转运蛋白GLUT9、OAT3、ABCG2为靶点,研究秋菊丸降UA的机制。结果提示,当UA浓度增高时,与对照组比较,模型组GLUT9的mRNA表达量明显增加,OAT3、ABCG2的mRNA表达量明显减少。与模型组比较,秋菊丸高剂量组GLUT9的mRNA表达量明显减少,OAT3、ABCG2的mRNA表达量明显增加。故推测秋菊丸可能通过下调GLUT9的表达,上调OAT3、ABCG2的表达来发挥降UA作用。

HUA导致的肾脏组织损伤也不可忽视,UA的持续增高可诱导TGF- $\beta$ 信号转导,使肾小管纤维化、肾小球硬化,肾功和肾脏组织受损<sup>[30]</sup>,是各种肾脏疾病的最终结果,导致慢性器官衰竭和死亡<sup>[31]</sup>。Masson是一种最常见的结缔组织着色方法,是对胶

原纤维进行着色的代表性技术<sup>[32-33]</sup>。TGF- $\beta$ 1在肺、肝、肾纤维化中高表达<sup>[34]</sup>,是肾纤维化的中枢介质,对细胞进程及细胞外基质(ECM)的调控起着关键作用<sup>[35]</sup>。Smad依赖的信号通路在肾脏疾病的发病机制中起关键作用<sup>[36]</sup>。TGF- $\beta$ 1的高表达通过TGF- $\beta$ 1/smad信号途径来引起ECM的过量积聚,进而造成了肾脏纤维化的出现<sup>[37]</sup>。 $\alpha$ -SMA已被认为是一个关键的纤维化因子,在肾纤维化的进展中起着至关重要的作用,研究表明 $\alpha$ -SMA在HUA大鼠肾脏中的表达增强<sup>[38]</sup>。本实验通过Masson三色染色检测肾组织的胶原含量,以评估组织纤维化的程度。本研究中与模型组比较,给予秋菊丸后 $\alpha$ -SMA的mRNA表达量显著减少且呈剂量相关性,秋菊丸各剂量组TGF- $\beta$ 1的mRNA表达量有相对降低趋势,秋菊丸高剂量组显著降低,各给药组Smad3的mRNA表达量有减少趋势并呈一定的剂量相关性,但无显著性差异。这一结论得到了组织病理学的验证,模型组大鼠肾组织形成严重的肾小管-间质病变,包括肾小管变性、坏死、萎缩、嗜碱性变和轻微的肾间质纤维化。秋菊丸能有效改善肾损害,其中秋菊丸高剂量组对肾脏的修复作用最强。结果显示,秋菊丸能显著减轻HUA大鼠肾脏纤维化病变。

本研究首次借助液质联用技术初步鉴定了秋菊丸中的41个成分,初步明确秋菊丸化学成分。动物实验结果提示,秋菊丸在降低HUA大鼠UA水平的同时起到肾脏保护作用,其机制可能与下调GLUT9、TGF- $\beta$ 1、smad3及 $\alpha$ -SMA的mRNA表达,上调OAT3、ABCG2的mRNA表达,进而改善病理学损伤和肾功能参数、减轻肾纤维化程度有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国医师协会中西医结合医师分会内分泌与代谢病学专业委员会. 高尿酸血症和痛风病证结合诊疗指南(2021-01-20) [J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 183-189. Endocrine and Metabolic Disease Professional Committee of the Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Branch of the Chinese Medical Doctor Association. Guidelines for diagnosis and treatment of hyperuricemia combined with gout (January 20, 2021) [J]. World Chin Med, 2021, 16(2): 183-189.
- [2] 华敏慧, 谈文峰, 张缪佳. 东亚原发性高尿酸血症及痛风分子遗传学研究进展 [J]. 中华风湿病学杂志, 2015, 19(3): 199-203. Hua M H, Tan W F, Zhang M J. Advances in molecular genetics of primary hyperuricemia and gout in East Asia

- [J]. Chin J Rheumatol, 2015, 19(3): 199-203.
- [3] 申林强, 邓鑫杰, 章淑薇, 等. 高尿酸血症和痛风的发病机制及中医药干预作用 [J]. 中国民间疗法, 2021, 29(15): 120-125.  
Shen L Q, Deng X J, Zhang S W, et al. Pathogenesis of hyperuricemia and gout and intervention of traditional Chinese medicine [J]. China's Naturopathy, 2021, 29(15): 120-125.
- [4] 韦慧艳, 唐振柱, 熊润松, 等. 高尿酸血症发生痛风的相关危险因素研究 [J]. 应用预防医学, 2018, 24(2): 93-97.  
Wei H Y, Tang Z Z, Xiong R S, et al. Study on the risk factors of gout in adults with hyperuricemia [J]. J Appl Prev Med, 2018, 24(2): 93-97.
- [5] Li Q P, Huang Z W, Liu D F, et al. Effect of berberine on hyperuricemia and kidney injury: A network pharmacology analysis and experimental validation in a mouse model [J]. Drug Des Dev Ther, 2021, 15: 3241-3254.
- [6] 高尿酸血症相关疾病诊疗多学科共识专家组. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识 [J]. 中华内科杂志, 2017, 56(3): 235-248.  
Multidisciplinary Consensus Expert Group on Diagnosis and Treatment of Hyperuricemia Related Diseases. Chinese multi-disciplinary consensus on the diagnosis and treatment of hyperuricemia and its related diseases [J]. Chin J Intern Med, 2017, 56(3): 235-248.
- [7] 陈雪梅, 王涛, 宋金萍, 等. 秋水仙及其活性成分的研究进展 [J]. 新疆中医药, 2011, 29(3): 80-82  
Chen X M, Wang T, Song J P, et al. Research progress of colchicine and its active components [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med, 2011, 29(3): 80-82
- [8] 朱春胜, 张冰, 林志健, 等. 菊苣降尿酸有效成分及机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 957-961  
Zhu C S, Zhang B, Lin Z J, et al. Uric acid-lowering active ingredients and mechanism of *Cichorium intybus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(5): 957-961
- [9] 蔡蒋帆, 唐建红. 芦荟活性成分药理作用机制研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2018, 18(A2): 122-125.  
Cai J F, Tang J H. Research progress of pharmacological mechanism of active components in aloe [J]. World Lat Med Inf (Elect Vers), 2018, 18(A2): 122-125.
- [10] 李华爽, 刘永建, 杨洪柳, 等. 诃子化学成分、药理作用机制、质量控制及炮制研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(12): 2130-2141.  
Li H S, Liu Y J, Yang H L, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological mechanism, quality control and processing of *Terminalia chebula* [J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(12): 2130-2141.
- [11] 周子虔, 努尔玛娜提·胡安别克, 哈木拉提·哈斯木, 等. 秋菊丸对大鼠急性痛风性关节炎抗炎的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(4): 24-28.  
Zhou Z Q, Nurmanati J B, Hamratti H, et al. Anti-inflammatory effect of Qiuju Pills in acute gouty arthritis rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2023, 39(4): 24-28.
- [12] 高文雅. 经典名方清心莲子饮物质基础及其干预糖尿病肾病模型疗效评价研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2021: 1-97.  
Gao W Y. Study on the material basis of Qingxin Lianzi Decoction, a classic prescription, and its therapeutic effect evaluation on diabetic nephropathy model [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021: 1-97.
- [13] 王兰欣. 复方鲜竹沥液止咳化痰的物质基础及作用机制预测研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2022: 1-61.  
Wang L X. Study on the material basis and mechanism prediction of compound fresh bamboo juice for relieving cough and resolving phlegm [D]. Nanchang: Nanchang University, 2022: 1-61.
- [14] 王迪, 俞佳, 詹固, 等. 液质联用技术在中药研究中的应用进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 68-71.  
Wang D, Yu J, Zhan G, et al. Application progress of liquid chromatography-mass spectrometry in traditional Chinese medicine research [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(2): 68-71.
- [15] 崔雨, 董婉绒, 刘恬恬, 等. 毛诃子化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(1): 216-226.  
Cui Y, Dong W R, Liu T T, et al. Chemical composition and pharmacological activities of *Terminaliae Belliricae Fructus*: A review [J]. Mod Chin Med, 2023, 25(1): 216-226.
- [16] 周坤, 简平, 梁文仪, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析藏药诃子与毛诃子化学成分 [J]. 质谱学报, 2020, 41(3): 254-267.  
Zhou K, Jian P, Liang W Y, et al. Analysis on chemical constituents from *Terminalia chebula* Retz. and *Terminalia bellerica* (Gaertn.) Roxb. by UPLC-Q-exactive quadrupole-orbitrap mass spectrometry [J]. J Chin Mass Spectrom Soc, 2020, 41(3): 254-267.
- [17] 凡杭, 陈剑, 梁呈元, 等. 菊苣化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 680-688.  
Fan H, Chen J, Liang C Y, et al. Advance in studies on chemical constituents of *Cichorii Herba* and their pharmacological effects [J]. Acupunct Res, 2016, 47(4): 680-688.
- [18] 朱春胜, 林志健, 张冰, 等. 菊苣化学成分的 LC-MS/MS 定性分析与 HPLC 含量测定 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(3): 247-251  
Zhu C S, Lin Z J, Zhang B, et al. Qualitative and quantitative analysis of chicory root by LC/MS and

- HPLC [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2016, 39(3): 247-251.
- [19] 陈彤彤, 于猛, 李凤霞, 等. 芦荟药材化学成分鉴定及UPLC指纹图谱分析[J]. 中草药, 2022, 53(8): 2470-2479.
- Chen T T, Yu M, Li F X, et al. Chemical profile of herbal medicine aloe by UPLC-Q-TOF/MS and its UPLC fingerprinting [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(8): 2470-2479.
- [20] 陈彤彤. 中药芦荟化学成分表征及药代动力学研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2022: 1-93.
- Chen T T. Characterization and pharmacokinetics of chemical constituents of *Aloe vera* [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2022: 1-93.
- [21] 夏松辰. 李建民教授治疗慢性肾脏病合并高尿酸血症用药规律总结[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019: 1-68.
- Xia S C. Summary of professor Li Jianmin's medication rule in treating chronic kidney disease complicated with hyperuricemia [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019: 1-68.
- [22] Sánchez-Lozada Laura G, Edilia T, Rubén L M, et al. Effects of acute and chronic *L*-arginine treatment in experimental hyperuricemia [J]. Am J Physiol Ren Physiol, 2007, 292(4): F1238-F1244.
- [23] Jalal D I, Chonchol M, Chen W, et al. Uric acid as a target of therapy in CKD [J]. Am J Kidney Dis, 2013, 61(1): 134-146.
- [24] Jiang T W, Qian J P, Ding J R, et al. Metabolomic profiles delineate the effect of Sanmiao Wan on hyperuricemia in rats [J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(2): e3792.
- [25] 曹跃朋, 冯在亮, 杨玉涛, 等. 基于KIM-1等肾损伤标志物探讨苗药痛风停汤对尿酸性肾病的保护作用[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2022, 24(10): 3708-3717.
- Cao Y P, Feng Z L, Yang Y T, et al. Exploring the protective effect of Miao medicine tongfengting on uric acid nephropathy based on the KIM-1 and other kidney injury factors [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(10): 3708-3717.
- [26] Yang B D, Xin M L, Liang S F, et al. New insight into the management of renal excretion and hyperuricemia: Potential therapeutic strategies with natural bioactive compounds [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1026246.
- [27] Nakayama A, Nakaoka H, Yamamoto K, et al. GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes [J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76(5): 869-877.
- [28] Lu Y H, Chang Y P, Li T, et al. Empagliflozin attenuates hyperuricemia by upregulation of ABCG2 via AMPK/AKT/CREB signaling pathway in type 2 diabetic mice [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(3): 529-542.
- [29] Gorczyca L, Aleksunes L M. Transcription factor-mediated regulation of the BCRP/ABCG2 efflux transporter: A review across tissues and species [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020, 16(3): 239-253.
- [30] 丁佳洁. 益肾泄浊通络法治疗尿酸性肾病的数据挖掘与网络药理学研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2022: 1-82.
- Ding J J. Data mining and network pharmacology research on the treatment of uric acid nephropathy with yishen Xiezhuo Tongluo method [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2022: 1-82.
- [31] Zhou S J, Yin X K, Mayr M, et al. Proteomic landscape of TGF- $\beta$ 1-induced fibrogenesis in renal fibroblasts [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 19054.
- [32] 孙璟, 武芳芳. 特殊染色技术在肾活检病理中的运用[J]. 实用医药杂志, 2016, 33(5): 451.
- Sun J, Wu F F. Application of special staining technique in renal biopsy pathology [J]. Pract J Med Pharm, 2016, 33(5): 451.
- [33] 刘志红, 曾彩虹, 梁丹丹. 肾活检病理诊断报告模式专家共识[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37(9): 810-816.
- Liu Z H, Zeng C H, Liang D D. Expert consensus on the report mode of pathological diagnosis of renal biopsy [J]. Chin J Pract Intern Med, 2017, 37(9): 810-816.
- [34] Chen L, Yang T, Lu D W, et al. Central role of dysregulation of TGF- $\beta$ /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 670-681.
- [35] Eser P Ö, Jänne P A. TGF $\beta$  pathway inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. Pharmacol Ther, 2018, 184: 112-130.
- [36] Meng X M, Nikolic-Paterson D J, Lan H Y. TGF- $\beta$ : The master regulator of fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6): 325-338.
- [37] 张怡萍. 真武汤防治UUO大鼠肾纤维化的作用机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- Zhang Y P. Study on the mechanism of Zhenwu Decoction in preventing and treating renal fibrosis in UUO rats [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2020.
- [38] Chen J S, Wang M X, Wang M M, et al. Synthesis and biological evaluation of geniposide derivatives as inhibitors of hyperuricemia, inflammatory and fibrosis [J]. Eur J Med Chem, 2022, 237: 114379.

[责任编辑 兰新新]