

穿山龙复方水煎液对痛风性关节炎合并高尿酸血症诱导痛风性肾病大鼠肾脏的保护作用

徐晓敏¹, 李姗姗², 卢芳^{3*}

1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 黑龙江省卫生健康管理服务评价中心, 黑龙江 哈尔滨 150040
3. 黑龙江中医药大学 继续教育学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 探讨穿山龙复方水煎液对痛风性关节炎(GA)合并高尿酸血症(HUA)诱导痛风性肾病(GN)大鼠肾脏的保护作用。方法 将48只雄性SD大鼠分为6组:对照组、模型组、秋水仙碱(阳性对照, 0.03 mg·kg⁻¹)组及穿山龙复方水煎液高、中、低剂量(6.300、3.150、1.575 mg·kg⁻¹)组。各给药组连续7 d ig 10 mL·kg⁻¹相应药液;对照、模型组各ig生理盐水10 mL·kg⁻¹。给药过程中,除对照组外,其余建立GA合并HUA诱导的GN模型:每天2次ip 3%的氧嗪酸钾溶液(10 mL·kg⁻¹),连续1周;在大鼠右侧踝关节后侧沿跟腱内侧以30°~40°方向插入至关节腔,将0.2 mL尿酸钠溶液(25 mg·mL⁻¹)注入到关节腔内,以关节囊对侧鼓起为注入标准,饲养过程中给予10%酵母饲料。称双侧肾脏质量,计算肾脏系数;HE染色后观察肾脏组织病理学变化;自动生化分析仪检测大鼠血尿酸(SUA)、血肌酐(SCr)、血清尿素氮(BUN)水平以及尿液尿酸(UUA)、尿肌酐(UCr)水平;试剂盒法检测血清中巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、环氧合酶-2(COX-2)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -Mg)及尿液中 β_2 -Mg水平;以实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法测定大鼠肾脏尿酸转运蛋白1(URAT1)、有机阴离子转运体1(OAT1)、有机阴离子转运体3(OAT3)、葡萄糖转运体9(GLUT9)、ABC转运蛋白G家族成员2(ABCG2)mRNA表达。结果 与模型组比较,穿山龙复方水煎液各剂量组和秋水仙碱组的肾脏系数显著降低($P<0.01$),肾损伤明显减轻;穿山龙复方水煎液各剂量组及秋水仙碱组血清SUA、SCr、BUN、MCP-1、COX-2、 β_2 -Mg水平及尿液 β_2 -Mg水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01),UUA和UCr水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01);肾脏URAT1、GLUT9 mRNA表达显著降低($P<0.05$ 、 0.01),OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA表达显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。结论 穿山龙复方水煎液改善GN大鼠肾损伤,作用机制与抗炎,上调OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA水平,促进UA排泄,下调URAT1、GLUT9 mRNA水平抑制UA重吸收相关。

关键词: 穿山龙复方水煎液;巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1);环氧合酶-2(COX-2); β_2 -微球蛋白(β_2 -Mg);尿酸转运蛋白
中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)04-0663-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.04.008

Study on mechanism of Diostrodia Compound Decoction on gouty arthritis combined with hyperuricemia induced gouty nephropathy

XU Xiaomin¹, LI Shanshan², LU Fang³

1. Institute of Traditional Chinese Medicine of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China
2. Heilongjiang Provincial Health Management Service Evaluation Center, Harbin 150040, China
3. School of Continuing Education of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of diostrodia compound decoction (DCD) on the kidney of gout arthritis (GA) & hyperuricemia (HU) -induced gout nephropathy (GN) rats. **Methods** Forty-eight male SD rats were divided into six groups, namely control, model, colchicine (positive controls, 0.03 mg·kg⁻¹) and DCD high, medium and low dose (6.300, 3.150, and 1.575 mg·kg⁻¹) groups. While moulding with sodium urine acid, potassium oxyzine, and high-fat diet, the corresponding drugs were gavaged, respectively. Kidney histopathology was observed after 7 d, Kidney index was calculated, The serum uric acid (SUA),

收稿日期: 2021-09-14

基金项目: 黑龙江中医药大学科研基金(杰出青年培育基金)项目(2019JC02)

第一作者: 徐晓敏 E-mail: 2381236162@qq.com

*通信作者: 卢芳 E-mail: xxm17344990810@163.com

creatinine (SCr), urea nitrogen (BUN) levels, as well as the serum levels of MCP-1, COX-2, and β_2 -Mg, were measured in rats, Urine uric acid (UUA), urinary creatinine (UCr) levels, as well as urine β_2 -Mg levels in rats, The mRNA expression of rat kidney uric acid transporter 1 (URAT1), organic anion transporter (OAT), glucose transporter, ABC transporter 9 (GLUT9), and G family members 2 (ABCG2) was determined by the Real-time PCR(qRT-PCR) assay. **Results** Compared with model group, the kidney index was decreased in both the dose group and the colchicine groups ($P < 0.01$). The levels of serum SUA, SCr, BUN, MCP-1, COX-2 and β_2 -Mg and urine β_2 -Mg in DCD groups and colchicine groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the levels of UUA and UCr were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The mRNA expressions of URAT1 and GLUT9 in kidney were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the mRNA expressions of OAT1, OAT3 and ABCG2 were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** DCD improved kidney injury in GN rats, and the mechanism was related to anti-inflammatory, up-regulating OAT1, OAT3 and ABCG2 levels to promote UA excretion, down-regulating URAT1 and GLUT9 levels to inhibit UA reabsorption.

Key words: Diostrodia Compound Decoction; macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1); cyclooxygenase-2 (COX-2); β_2 -microglobulin (β_2 -Mg); uric acid transporter

高尿酸血症(HUA)是指体内嘌呤代谢障碍或尿酸(UA)排泄下降导致血清中UA增高的疾病^[1]。UA分泌增加、肾UA排泄受损或两者结合都可导致HUA产生,而HUA会增加急性肾损伤的风险^[2]。由于血尿酸(SUA)升高,UA盐沉积在关节囊、滑膜、软骨、骨质等关节组织,刺激关节而引起的关节滑膜、周围组织病损及炎症反应的疾病称为尿酸性关节炎,亦称痛风性关节炎(GA),其可以导致肾脏不同程度病理改变。以HUA合并GA诱导的肾脏病理损伤为痛风性肾病(gouty nephropathy, GN),也称慢性尿酸性肾病。

GN是痛风患者的常见病症,主要是由于嘌呤代谢紊乱或肾脏排泄减少,SUA升高,尿酸盐结晶在肾小管及肾间质沉积而引起炎症反应和肾组织破坏^[3]。肾脏病变的发生是长期HUA发展的结果,HUA患者肾脏病理检查几乎均有不同程度的损害^[4]。HUA的发病机制分为UA增多或UA排泄减少,UA的排泄有2种方式,1/3的UA通过肠道,由肠道中的细菌降解排出;2/3通过UA转运蛋白转移到血液通过肾脏排除。多种位于肾小管上皮细胞的UA转运蛋白共同完成肾脏的UA排泄,如尿酸转运蛋白1(URAT1)、有机阴离子转运体(OAT)、葡萄糖转运体9(GLUT9)、ABC转运蛋白G家族成员2(ABCG2)等。GN作为HUA病程中最严重的情况,治疗与预防至关重要,目前化学药治疗有极大副作用,如中国人使用别嘌醇时易发生致命过敏反应^[5],临床用药较为受限。中医药在治疗GN上有独特的经验和优势^[6],以提高疗效,延缓病情发展等为主,多为健脾益肾、温肾健脾及清热利湿补肾等中药复方^[7]。

穿山龙复方由穿山龙、车前子、山慈菇3味中药

配伍而成^[8],穿山龙祛风除湿、舒筋通络、活血止痛,归肝、肾、肺经,应用于风湿痹病、关节肿胀、疼痛麻木、跌打损伤等,现代药理学研究表明穿山龙具有抗炎和镇痛的作用,被广泛应用于炎症疾病的治疗^[9]。本课题组前期研究^[10-11]证明穿山龙总皂苷具有抗炎、镇痛、促进UA排泄的作用,其能回调HUA大鼠ABCG2的mRNA和蛋白水平。山慈菇清热解毒、化痰散结,归肝、脾经,临床常用于治疗哮喘、支气管炎、痛风等^[12]。相关研究发现,其所含的活性成分秋水仙碱^[13]具有显著的抗炎作用,可减缓GA等HUA并发症^[14]。车前子^[15]具有清热利尿、渗湿通淋、明目、祛痰的功效,归肝、肾、小肠经,临床治疗GN常以车前子组方。赵宏等^[3]研究表明,车前子水煎液及其多糖等成分具有较强的免疫调节、抗炎、降UA、抗氧化的作用,对GN具有较好的调节作用;其可通过减轻肾脏充血和水肿现象,显著降低肾脏系数及降低模型大鼠的SUA、尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP),从而调节GN大鼠的肾功能和肝功能;HE染色后的病理也显示,经车前子治疗的模型大鼠的肾组织病变程度有一定减轻。穿山龙复方可能通过清热解毒、利湿泄浊、通络止痛等来降低UA,从而缓解GA症状、减缓肾脏的损伤。本研究探讨穿山龙复方水煎液对GA合并HUA诱导GN模型大鼠的肾脏保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,7周龄,体质量(180±20)g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(黑)2018-007。大鼠饲

养环境温度(25±1)°C,湿度(50±5)%,12 h/12 h光暗周期交替。获得黑龙江中医药大学伦理委员会批准,批准编号DXLL2019081601。

1.2 药材与主要试剂

穿山龙(批号:黑20160185)、车前子(批号:黑20160185)、山慈菇(批号:黑20160185),均购自黑龙江修生堂药业有限公司;经黑龙江中医药大学中药资源教研室王振月教授鉴定,均符合《中国药典》2020年版的相关要求;氧嗪酸钾(批号H2017152)、尿酸钠(批号H2026116),均购自上海阿拉丁公司;秋水仙碱(西双版纳版纳药业有限责任公司,批号H53021369);生理盐水(哈尔滨三联药业股份有限公司,批号H23020611);聚山梨酯80(天津市博迪化工有限公司,批号:津Q/HG.3020-99);酵母饲料(广东环凯生物科技有限公司);大鼠血清巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1)检测试剂盒(批号20210601)、大鼠环氧合酶-2(COX-2)检测试剂盒(批号20210601)、大鼠血清 β_2 -微球蛋白(β_2 -Mg)检测试剂盒(批号20210601),均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器

电子天平(中国天马股份有限公司);离心机(美国Thermo公司);G240自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);冻干机(德国Marin Christ公司);-80 °C冰箱(Haier公司);酶标仪(美国Thermo公司);MyiQTM Optics Module单色实时PCR检测系统(美国BioRad公司)。

2 方法

2.1 穿山龙复方水煎液的制备与主要试剂的配制

2.1.1 穿山龙复方水煎液的制备 称取穿山龙15 g、车前子10 g、山慈菇10 g,加入10倍量蒸馏水,加热回流3次,每次2 h,合并滤液,滤液浓缩至0.5 g·mL⁻¹。采用高效液相色谱法(HPLC)对穿山龙中的薯蓣皂苷元、车前子中的毛蕊花糖苷进行含量测定,薯蓣皂苷质量分数不少于1.3%;毛蕊花糖苷质量分数不少于0.40%。

2.1.2 主要试剂的配制 取适量氧嗪酸钾粉末,生理盐水配制为浓度为3%的氧嗪酸钾溶液;取秋水仙碱片,研磨为粉末,生理盐水配制为0.03 mg·mL⁻¹的秋水仙碱溶液;取尿酸钠粉末1.25 g,加入5 mL聚山梨酯80及45 mL生理盐水,配制质量浓度为0.025 g·mL⁻¹的尿酸钠溶液。

2.2 动物造模、分组及给药

适应性喂养1周后,将48只SD雄性大鼠随机

分为6组:对照组、模型组、秋水仙碱(阳性对照,0.03 mg·kg⁻¹)组及穿山龙复方水煎液高、中、低剂量(6.300、3.150、1.575 mg·kg⁻¹)组,中剂量为人体等效剂量,每组8只。给药组连续7 d ig 10 mL·kg⁻¹相应药液;对照、模型组各ig生理盐水10 mL·kg⁻¹。给药过程中,除对照组外,其余各组参照文献方法^[16]建立GA合并HUA诱导的GN模型。使用4号注射器,将3%的氧嗪酸钾溶液摇匀后,ip 10 mL·kg⁻¹,每天2次,连续1周。使用6号注射器在大鼠右侧踝关节后侧沿跟腱内侧以30°~40°方向插入至关节腔,将0.2 mL尿酸钠溶液(质量浓度25 mg·mL⁻¹)注入到关节腔内,以关节囊对侧鼓起为注入标准,饲养过程中给予10%酵母饲料,复制GA合并HUA大鼠模型,与对照组比较,模型组大鼠的SUA升高,踝关节肿胀度增加,差异具有统计学意义,视为造模成功^[17]。对照组大鼠于同一部位ip生理盐水及关节腔注射生理盐水。

2.3 样本采集及肾脏系数的测定

给药结束后,于当日晚上7时至次日晚上7时将大鼠置于代谢笼中,采集此期间的尿液,于4 °C、13 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液置于-80 °C保存备用;10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉采血,室温下自然凝血1 h,3 500 r·min⁻¹常温离心10 min分离血清;大鼠腹主动脉采血完毕后,冰台上迅速摘取双侧肾脏,滤纸吸干后用电子分析天平称双侧肾脏质量,并计算肾脏系数;右侧肾组织经10%多聚甲醛固定后备用,左侧肾组织储存于冻存管,置于-80 °C保存备用。

$$\text{肾脏系数} = \frac{\text{双肾质量}}{\text{体质量}}$$

2.4 苏木素-伊红(HE)染色法检测肾组织病理学变化

肾组织经10%多聚甲醛固定后常规石蜡包埋、切片(4 μ m),进行HE染色,光学显微镜($\times 400$)下观察肾组织病理变化。

2.5 大鼠SUA、SCr、血清BUN水平测定

血清分离后,取50 μ L,用自动生化分析仪测定SUA、SCr、BUN水平,剩余血清存于-80 °C超低温冰箱用于试剂盒指标的检测。

2.6 大鼠尿液尿酸(UUA)、尿肌酐(UCr)水平测定

将冻存在-80 °C超低温冰箱的尿液上清液室温复融,4 °C、13 000 r·min⁻¹离心15 min,取50 μ L,用自动生化分析仪测定UUA、UCr水平。

2.7 大鼠血清MCP-1、COX-2、 β_2 -Mg以及尿液中 β_2 -Mg水平测定

将冻存在-80 °C超低温冰箱的血清、尿液样本

室温复融,复融后 3 500 r·min⁻¹ 常温离心 10 min,取上清液 50 μL,按试剂盒操作说明书操作。使用 ELISAcalc 进行计算浓度,拟合模型选用 Logistic 曲线(四参数)。

2.8 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测各组大鼠肾组织中 URAT1、OAT1、OAT3、GLUT9、ABCG2 mRNA 表达

2.8.1 RNA 的提取

将超低温冻结的左侧肾组织称量后迅速转移至用液氮预冷的研钵中,用研杵研磨组织,其间不断加入液氮,直至研磨至粉末状。然后向研钵中加入 2 mL RNAisoPlus,将研磨成粉末状的样品完全覆盖。室温静置,直至样品完全融化,再用研杵继续研磨至裂解液呈透明状,将匀浆液转移至离心管中,室温静置 5 min,4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。吸取上清液,向其中加入 RNAisoPlus 1/5 体积量的氯仿,用手剧烈振荡 15 s。待溶液充分乳化(无分层现象)后,再室温静置 5 min,4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。吸取上清液(切忌吸出白色中间层),向上清液中加入等体积的异丙醇,上下颠倒离心管充分混匀后,在 15~30 °C 下静置 10 min。4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,小心弃去上清液,缓慢地沿离心管壁加入 75% 的乙醇 1 mL(切勿触及沉淀),轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁,4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后小心弃去乙醇。室温干燥沉淀 2~5 min,加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀。

2.8.2 cDNA 的合成

依据反转录试剂盒说明书操作,使用由大连宝生物公司合成的引物(表 1)进行 PCR 扩增。加入 5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μL、gDNA Eraser 1.0 μL、Total RNA 2.0 μL 和 RNase Free dH₂O 5 μL 配制成混合液,42 °C 水浴反应 2 min。进而向其反应体系中分别加入 5×Prime Script Buffer 2(for Real Time) 4.0 μL、Prime Script RT Enzyme Mix I 1.0 μL、RT Primer Mix×4 1.0 μL 和 RNase Free dH₂O 4 μL,在 37 °C 条件下反应 15 min,85 °C 条件下反应 5 s。

2.8.3 qRT-PCR 反应

取“2.8.2”项所得 cDNA 模板 2.0 μL,加入 SYBR Premix Ex TaqTMII(×2) 12.5 μL、PCR Forward Primer (10 μmol·L⁻¹) 1 μL、PCR Reverse Primer (10 μmol·L⁻¹) 1 μL、dH₂O 8.5 μL 配制成 PCR 反应液,加入到 96 孔板中,每孔反应液体积为 25 μL。各组均以 GAPDH 基因为内参,以单孔扩增单基因的方法分别对各组大鼠肾组织内 OAT1、OAT3、URAT1、ABCG2、GLUT9 基因进行 PCR 扩增反应。扩增反应条件为:95 °C 预热 30 s,

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	正向 GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG
	反向 ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
URAT1	正向 CTGCATTGCTGCTGCCTGA
	反向 GGAGCTTACAACCGGGCAGA
GLUT9	正向 TCCTACTGCTTCCTCGTCTT
	反向 TGGGTTCTGTCTTGGTCTCT
OAT1	正向 GGCACCTTGATTGGCTATGT
	反向 CCACAGCATGGAGAGACAGA
OAT3	正向 GCCTATGCCATTCTCAGTG
	反向 TCCTCCTTCTTGCCGTTGA
ABCG2	正向 AAAGGACAAGCATAGGGATGGA
	反向 TCAGGAGCAAAAGGACAGCA

95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 31 s、40 个循环,95 °C 扩增 15 s。目的基因的检测:每个待测样本需要做 3 个复孔,结果通过 2^{-ΔΔCt} 公式进行相对定量。

2.9 数据处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 软件处理,多组间计量资料比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 穿山龙复方水煎液对 GN 大鼠肾脏系数的影响

肾脏系数是反映肾功能的主要指标之一,如表 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠肾脏系数显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,穿山龙复方水煎液高、中、低剂量组大鼠肾脏系数显著降低($P < 0.01$)。

3.2 穿山龙复方水煎液对 GN 大鼠肾脏组织形态的影响

如图 1 所示,对照组大鼠肾组织结构正常,肾小

表 2 穿山龙复方水煎液对 GN 大鼠肾脏系数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of DCD on renal index in rats with GN ($\bar{x} \pm s, n=8$)		
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肾脏系数/(g·kg ⁻¹)
对照	—	0.075 6±0.002 9
模型	—	0.086 3±0.002 3 ^{##}
秋水仙碱	0.030	0.080 1±0.002 9 ^{**}
穿山龙复方水煎液	6.300	0.076 1±0.007 5 ^{**}
	3.150	0.077 0±0.002 2 ^{**}
	1.575	0.079 3±0.004 1 ^{**}

与对照组比较:^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

球分布均匀,肾小球中细胞及基质均匀,肾小管上皮细胞圆润、饱满,间质无明显增生,未见明显的炎性改变;模型组少量的血管瘀血,少量的肾小管上皮细胞坏死、脱落,肾小球萎缩,肾小管扩张,可见大量尿酸盐结晶沉积,大量的血管周围可见少量的淋巴细胞浸润;穿山龙复方水煎液各剂量组大鼠均无肾脏尿酸结晶,肾组织炎性细胞浸润明显减轻,肾小管扩张和间质纤维化有所改善;秋水仙碱组大鼠虽无肾脏尿酸盐结晶,但肾组织的炎性细胞浸

润、肾小管扩张、间质纤维等症仍较为严重,与模型组比较改善较小。

3.3 穿山龙复方水煎液对大鼠 SUA、SCr、血清 BUN 水平的影响

如表 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠 SUA、SCr、血清 BUN 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,穿山龙复方水煎液高、中、低剂量组及秋水仙碱组 SUA、SCr、BUN 水平显著降低($P < 0.05、0.01$)。

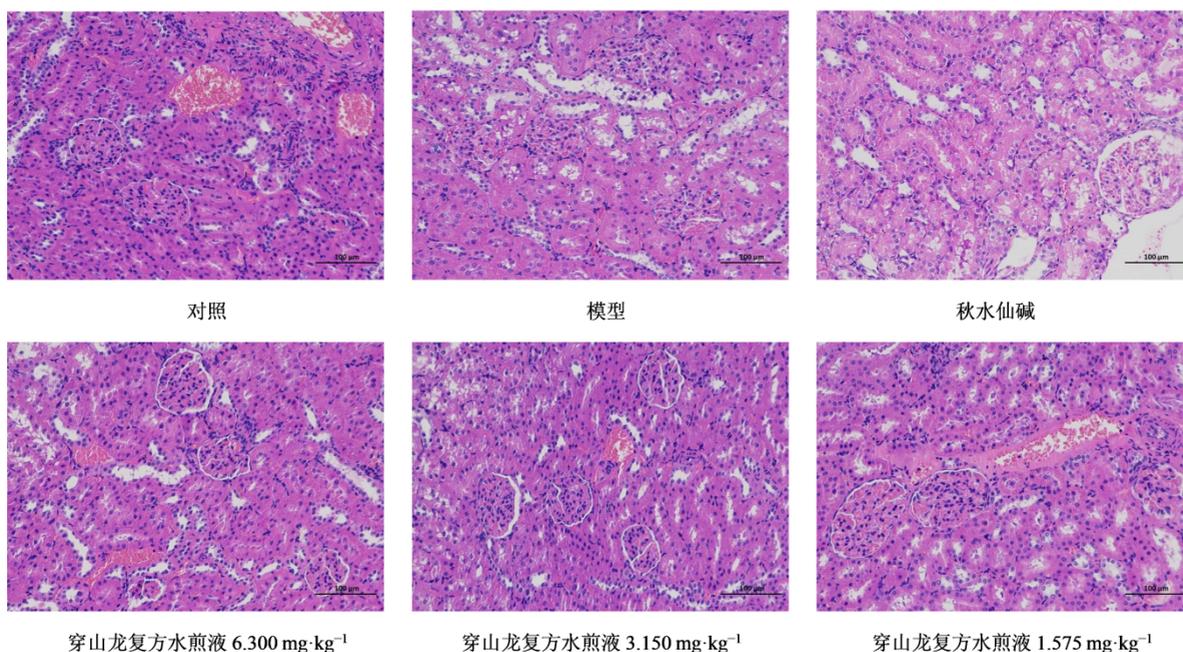


图 1 各组大鼠肾脏的病理形态学改变(HE, ×200)
Fig. 1 Histopathological changes of kidney in each group (HE, ×200)

表 3 穿山龙复方水煎液对 GN 大鼠 SUA、SCr、血清 BUN 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of DCD on SUA, SCr, and serum BUN level in GN rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SUA/(mmol·L ⁻¹)	SCr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	0.032 7±0.010 4	38.68±2.85	5.30±1.46
模型	—	0.110 4±0.089 8 ^{##}	51.64±10.11 ^{##}	8.12±0.11 ^{##}
秋水仙碱	0.030	0.035 3±0.005 0 ^{**}	38.43±8.73 ^{**}	5.47±0.50 ^{**}
穿山龙复方	6.300	0.038 6±0.029 7 ^{**}	40.64±5.61 ^{**}	5.77±1.15 ^{**}
水煎液	3.150	0.045 3±0.031 3 ^{**}	40.74±3.90 ^{**}	6.01±0.58 ^{**}
	1.575	0.047 1±0.012 5 ^{**}	43.50±2.25 [*]	6.49±0.40 [*]

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

3.4 穿山龙复方水煎液对大鼠 UUA、UCr、尿液 β₂-Mg 水平的影响

如表 4 所示,与对照组比较,模型组 UUA、UCr 水平显著降低($P < 0.01$);尿液 β₂-Mg 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,穿山龙复方水煎液高、中、

低剂量组及秋水仙碱组 UUA、UCr 水平显著升高($P < 0.05、0.01$);尿液 β₂-Mg 水平显著降低($P < 0.05、0.01$)。

3.5 穿山龙复方水煎液对大鼠血清 MCP-1、COX-2、β₂-Mg 水平的影响

如表 5 所示,与对照组比较,模型组血清 MCP-1、

表4 穿山龙复方水煎液对GN大鼠UUA、UCr、尿液 β_2 -Mg水平影响($\bar{x}\pm s, n=8$)Table 4 Effects of DCD on UUA, UCr and urine β_2 -Mg levels in GN rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	UUA/(mmol·L ⁻¹)	UCr/(μ mol·L ⁻¹)	β_2 -Mg/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	0.17±0.10	582.86±45.84	843.60±27.87
模型	—	0.04±0.02 ^{##}	450.47±42.02 ^{##}	915.87±14.40 ^{##}
秋水仙碱	0.030	0.07±0.02 ^{**}	485.25±41.12 ^{**}	858.01±41.97 ^{**}
穿山龙复方	6.300	0.08±0.06 ^{**}	490.54±42.05 ^{**}	861.57±31.14 ^{**}
水煎液	3.150	0.08±0.04 ^{**}	498.12±32.56 ^{**}	864.56±15.65 ^{**}
	1.575	0.09±0.06 [*]	512.33±36.06 [*]	878.52±17.91 [*]

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表5 穿山龙复方水煎液对GN大鼠血清MCP-1、COX-2、 β_2 -Mg水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)Table 5 Effects of DCD on serum levels of MCP-1, COX-2 and β_2 -Mg in GN rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MCP-1/(ng·L ⁻¹)	COX-2/(ng·mL ⁻¹)	β_2 -Mg/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	110.98±30.56	2.97±0.20	1 075.38±281.14
模型	—	152.16±25.03 ^{##}	4.66±0.59 ^{##}	1 811.86±631.62 ^{##}
秋水仙碱	0.030	111.40±11.49 ^{**}	3.46±0.43 ^{**}	1 101.73±200.52 ^{**}
穿山龙复方	6.300	113.42±14.88 ^{**}	3.60±0.57 ^{**}	1 202.10±69.94 ^{**}
水煎液	3.150	116.74±11.28 [*]	3.71±0.47 [*]	1 210.40±187.45 [*]
	1.575	128.07±14.37 [*]	4.01±0.62 [*]	1 369.55±83.34 [*]

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

COX-2、 β_2 -Mg水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,穿山龙复方水煎液高、中、低剂量组及秋水仙碱组血清MCP-1、COX-2、 β_2 -Mg水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。

3.6 穿山龙复方水煎液对GN大鼠肾组织中URAT1、OAT1、OAT3、GLUT9、ABCG2 mRNA表达的影响

结果图2所示,与对照组比较,模型组大鼠肾组织URAT1、GLUT9 mRNA表达显著升高($P<0.01$),OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,穿山龙复方水煎液高、中、低剂量组大鼠肾脏组织URAT1、GLUT9 mRNA表达显著降低($P<0.05$ 、 0.01),OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA表达显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

治疗痛风的化学药有较多的不良反应,如秋水仙碱可引起恶心、腹泻等不良反应;非甾体抗炎药会导致肾损伤、胃肠道溃疡和出血等,白细胞介素-1 β (IL-1 β)抑制剂有加重痛风症状的危险。由于以上不良反应,临床上治疗痛风时会遇到对各种药物使用的限制问题^[18]。传统中医药在治疗痛风方面具有标本兼治的特点,且中药复方联合用药具有增

效和减毒的优势^[19]。

应用GA合并HUA诱导GN大鼠模型,ig给予穿山龙复方水煎液后大鼠肾脏系数与模型组比较显著降低。同时,光镜的病理结果显示,穿山龙复方水煎液各剂量组均可减少肾组织内的尿酸结晶沉积,并且减轻肾脏组织的炎性细胞浸润及局部病灶纤维化程度,高剂量组作用优于秋水仙碱组。

血中UA过饱和后析出尿酸盐晶体,沉积于关节、软组织,诱导局部单核巨噬细胞、中性粒细胞释放多种炎性因子和炎性介质^[20]。MCP-1的表达可影响肾组织的损伤程度,抑制MCP-1的表达可延缓肾脏损伤,保护肾脏功能。MCP-1是新近明确的对单核/巨噬细胞具有趋化、激活作用的细胞因子,在肾小球肾炎肾脏固有的细胞及浸润炎性细胞均可表达,MCP-1通过趋化激活单核细胞并促其分泌转化生长因子- β (TGF- β)等致纤维化的细胞因子,导致细胞外基质在肾小球和肾小管中堆积、肾间质纤维化,促进肾小球硬化,最终造成肾衰竭,MCP-1可体外诱导肾小管上皮细胞分化,作为独立因素参与肾间质纤维化的发展^[21]。本研究发现,穿山龙复方

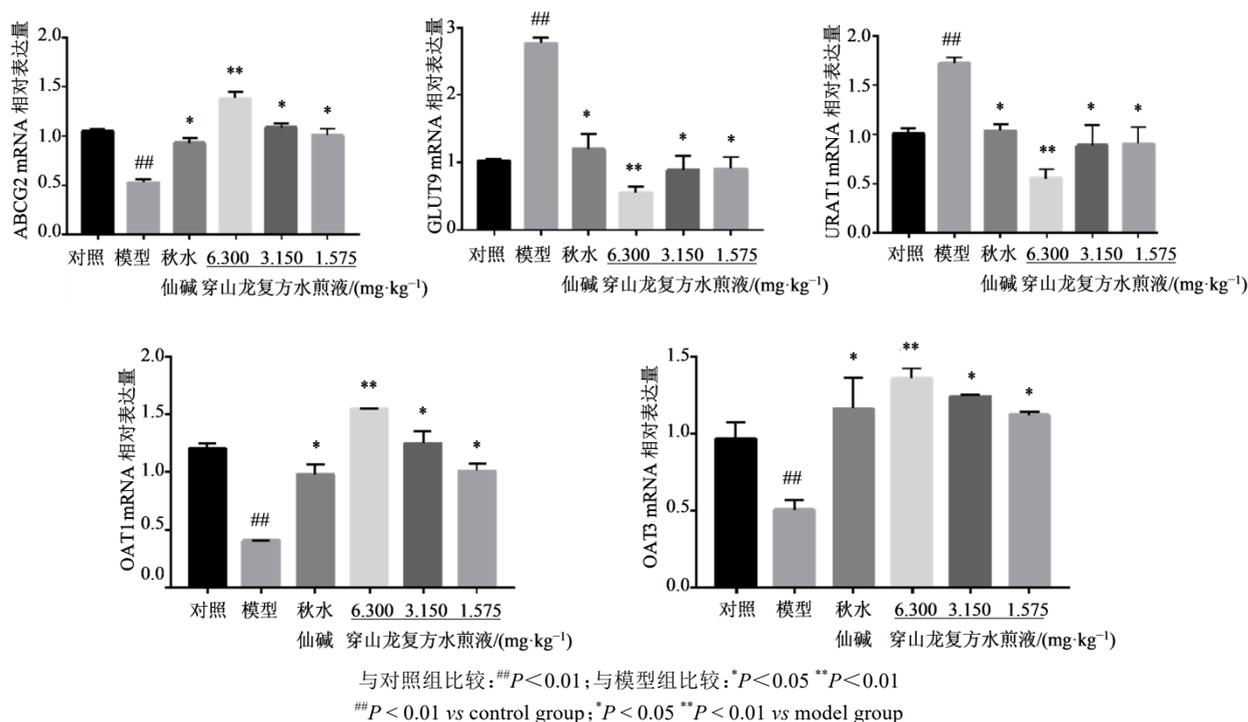


图2 穿山龙水煎液对GN大鼠肾组织UA转运蛋白mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of DCD on mRNA expression of UA transporter in renal tissue of GN rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

水煎液能明显降低大鼠血清MCP-1的含量,对肾脏具有一定的保护作用。

COX-2是一种诱导酶,其在正常状态下几乎不表达,在组织损伤、炎症反应时高表达^[22],其广泛参与前列腺素合成,能够有效调节血小板聚集,促进前列腺素合成进而加重机体炎症反应水平及红肿热痛症状。另一方面,COX-2作为前列腺素E₂(PGE₂)的限速酶,与PGE₂有交互作用,它催化花生四烯酸转化为PGE₂,诱导炎症反应^[23]。研究表明,抑制COX-2可减轻肾损伤^[24]。本研究结果表明,与对照组比较,模型组COX-2的表达显著升高,给药后,高、中剂量组COX-2水平明显降低。说明穿山龙复方可通过抑制COX-2的高表达,缓解炎症反应,缓解GA症状,达到降尿酸的作用。

β_2 -Mg是一种小分子球蛋白,广泛存在于血浆、尿液、脑脊液、唾液以及初乳中,正常人 β_2 -Mg的合成率及从细胞膜上的释放量相当恒定, β_2 -Mg可以从肾小球自由滤过,99.9%在近端肾小管吸收,并在肾小管上皮细胞中分解破坏;故而正常情况下 β_2 微球蛋白的排出是很微量的,当肾小管功能损伤时,肾小管重吸收功能降低, β_2 -Mg可以游离形式释放于血液中,进而造成该指标水平明显升高,可作为肾小管近端小管重吸收功能及肾小球滤过率的敏感标志物^[25]。本研究结果显示,与对照组比较,模型

组 β_2 -Mg水平显著升高;与模型组比较,穿山龙复方水煎液高、中、低剂量组 β_2 -Mg水平显著降低。

SCr含量反映肾小球过滤速度和肾脏机能,可作为肾脏机能判断依据。BUN为人体蛋白质分解代谢的产物,90%以上通过肾脏排泄,其余的则由肠道和皮肤排出。当肾脏发生急性损伤时,正常的排泄功能遭到破坏时,即引起SCr浓度升高。SCr的含量是肾功能变化的一项重要指标^[26]。BUN是体内氨基酸分解代谢的终产物,可经肾小球滤过。各种肾病患者所致的肾小球病变都可见BUN的升高,常与SCr综合测定来判断肾小球的滤过功能,是检测肾功能的敏感指标^[27-28]。本研究发现,与模型组比较,穿山龙复方水煎液高、中、低剂量组UUA、UCr、SUA、SCr、BUN水平显著降低,说明穿山龙复方水煎液通过降UA等机制来达到肾脏的保护作用。

多种尿酸盐转运蛋白在肾小管重吸收和尿酸盐分泌中起作用,帮助调节体内UA平衡,并将其水平维持在一定范围内。目前,确认的UA主要转运蛋白有GLUT9、URAT1、OAT、ABCG2^[29-30]。URAT1、GLUT9负责UA的重吸收;OAT1、OAT3、ABCG2主导UA的排泄。OAT1位于肾小管上皮细胞基底侧膜,负责将UA从肾小管毛细血管运输至肾小管上皮细胞内,在肾脏中起到分泌UA的作用;

URAT1在近曲小管上皮细胞表面表达,参与UA从肾脏转运至血液,是调节SUA水平的重要机制^[31]; ABCG2是一种ATP结合转运蛋白,广泛分布在具有分泌和排泄功能的组织,其功能异常可能导致UA排泄能力下降^[9]。OAT3主要分布于近曲小管基底侧膜,参与外周小管对UA的摄取,即参与UA的分泌。GLUT9既是葡萄糖转运蛋白也是UA转运蛋白,负责肾脏近曲小管顶膜尿酸盐的重吸收^[32]。本研究结果显示,与模型组比较,穿山龙复方水煎液高、中剂量组大鼠肾脏URAT1、GLUT9 mRNA表达显著降低,OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA表达显著升高,结果提示,穿山龙复方水煎液各剂量组可能通过下调URAT1、GLUT9 mRNA表达和上调OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA表达,进而促进UA排泄和降低SUA水平,发挥肾脏保护作用。

穿山龙复方水煎液降低血清UA、Cr、BUN、 β_2 -Mg、COX-2、MCP-1、尿液 β_2 -Mg以及增加尿液UA、Cr水平,改善GN大鼠的肾脏损伤;通过上调OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA水平促进UA排泄,下调URAT1、GLUT9 mRNA水平抑制UA的重吸收,从而降低UA水平,发挥肾脏保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李焱. 高尿酸血症及痛风的治疗研究进展 [J]. 现代诊断与治疗, 2021, 32(7): 1033-1035.
Li Y. Research progress in the treatment of hyperuricemia and gout [J]. Mod Diagn Treat, 2021, 32(7): 1033-1035.
- [2] 孙泽锐, 王宣军, 盛军. 高尿酸血症研究进展 [J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2021, 30(2): 135-142, 156.
Sun Z R, Wang X J, Sheng J. Research progress in hyperuricemia [J]. J Yunnan Minzu Univ Nat Sci Ed, 2021, 30(2): 135-142, 156.
- [3] 赵宏, 柴桂芳, 刘颖斐, 等. 车前子水煎液对痛风性肾病大鼠的肾保护作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20): 108-114.
Zhao H, Chai G F, Liu Y F, et al. Renal protective effect and preliminary mechanism of water decoction from *Plantaginis Semen* on rats with gouty nephropathy [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(20): 108-114.
- [4] 符静泉, 戴莉琳, 韦曼莉, 等. 猫须草水提物对痛风性肾病大鼠的肾脏保护作用 [J]. 中药材, 2020, 43(11): 2784-2788.
Fu J Q, Dai L L, Wei M L, et al. Protective effect of water extract of *Herba serrata* on rats with gout nephropathy [J]. J Chin Med Mater, 2020, 43(11): 2784-2788.
- [5] 李丹, 张剑勇. 痛风现代流行病学及降尿酸药物研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(4): 73-76.
Li D, Zhang J Y. Modern epidemiology of gout and research progress of uric acid lowering drugs [J]. Rheum Arthritis, 2016, 5(4): 73-76.
- [6] 杨小梅, 张小玉, 杨海俊, 等. 舒惠荃教授治疗慢性尿酸性肾病的经验 [J]. 实用中西医结合临床, 2010, 10(3): 67, 94.
Yang X M, Zhang X Y, Yang H J, et al. Professor Shu Huiquan's experience in the treatment of chronic uric acid nephropathy [J]. Pract Clin J Integr Tradit Chin West Med, 2010, 10(3): 67, 94.
- [7] 杨斌. 清热利湿补肾法为主治疗痛风性肾病32例 [J]. 中医临床研究, 2011, 3(18): 84-85.
Yang B. Treating 32 cases of gouty nephropathy by Qingre Lishi Bushen therapy [J]. Clin J Chin Med, 2011, 3(18): 84-85.
- [8] 刘树民, 于栋华, 王宇, 等. 一种治疗高尿酸血症的配伍组合及其制备方法: 中国, CN112843178A [P]. 2021-05-28.
Liu S M, Yu D H, Wang Y, et al. A compatible combination for the treatment of hyperuricemia and its preparation method: China, CN112843178A [P]. 2021-05-28.
- [9] 程广民, 段一娜. 中药穿山龙治疗风湿病的研究进展 [J]. 医药与保健, 2014(9): 174-175.
Cheng G M, Duan Y N. Research progress in the treatment of rheumatism with *Rhizoma Dioscoreae Nipponicae* [J]. Med Health Care, 2014(9): 174-175.
- [10] 卢芳, 周琦, 张颖, 等. 基于痛风性关节炎ABCG2尿酸转运靶点的穿山龙调控机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(5): 1057-1061.
Lu F, Zhou Q, Zhang Y, et al. Regulatory mechanism of total saponins from *Rhizoma Dioscoreae Nipponicae* based on ABCG2 uric acid transfer in gouty arthritis [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(5): 1057-1061.
- [11] 林芳芳, 刘树民, 周琦, 等. 穿山龙总皂苷对痛风性关节炎大鼠血清生物标志物的影响 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(23): 2840-2845.
Lin F F, Liu S M, Zhou Q, et al. Effects of total saponins from *rhizoma Dioscorea nipponica* on biomarkers in serum of gouty arthritis rats [J]. Chin J New Drugs, 2017, 26(23): 2840-2845.
- [12] 刘婷婷, 于栋华, 刘树民. 山慈菇的本草考证及现代研究进展 [J]. 中国药房, 2020, 31(24): 3055-3059.
Liu T T, Yu D H, Liu S M. Textual research and modern research progress of *Pleurotus officinalis* [J]. China Pharm, 2020, 31(24): 3055-3059.
- [13] 朱聪, 谢典, 潘红波, 等. 山慈菇中生物碱的鉴别和含量测定 [J]. 江西科技师范大学学报, 2020(6): 76-79.

- Zhu C, Xie D, Pan H B, et al. Identification and determination of total alkaloids in *Cremastrae Pseudobulbus* [J]. J Jiangxi Sci Technol Norm Univ, 2020 (6): 76-79.
- [14] 盛世争, 方 圆. 小剂量秋水仙碱联合复方倍他米松治疗痛风性关节炎急性期疗效分析 [J]. 中国基层医药, 2021, 28(2): 227-231.
- Sheng S Z, Fang Y. Efficacy of low-dose colchicine combined with compound betamethasone in the treatment of acute gouty arthritis [J]. Chin J Prim Med Pharm, 2021, 28(2): 227-231.
- [15] 王 燕, 周冰倩, 庞 龙, 等. 基于数据挖掘探讨中医药治疗年龄相关性黄斑变性的用药规律 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(4): 579-584.
- Wang Y, Zhou B Q, Pang L, et al. Study on the medication rules of traditional Chinese medicine treatment for age-related macular degeneration based on data mining [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2021, 32(4): 579-584.
- [16] 刘亚飞, 陈 哲, 涂胜豪. 加味四妙方对高尿酸血症合并急性痛风性关节炎模型大鼠踝关节组织NLRP3 mRNA及IL-1 β 、TNF- α 表达的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(14): 1268-1272.
- Liu Y F, Chen Z, Tu S H. Effect of Modified Simiaofang on NLRP3 mRNA and expression of IL-1 β and TNF- α in ankle joint of hyperuricemia combined with acute gout arthritis rats [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(14): 1268-1272.
- [17] 吕 军, 吕 芳, 方和金, 等. 高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的建立 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(27): 11-16.
- Lv J, Lv F, Fang H J, et al. Study of acute gouty arthritis and hyperuricemia rat model [J]. China J Mod Med, 2013, 23(27): 11-16.
- [18] 钟志华, 何宝区. 别嘌醇与秋水仙碱治疗痛风急性发作的疗效及不良反应 [J]. 吉林医学, 2018, 39(7): 1272-1273.
- Zhong Z H, He B Q. The effects and adverse reactions of allopurinol and colchicine in the treatment of gout in acute attack [J]. Jilin Med J, 2018, 39(7): 1272-1273.
- [19] 樊海瑞, 赵 岩, 傅警龙, 等. 痛风宁胶囊对痛风性肾病模型小鼠主要脏器病理损伤的改善作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2018, 44(4): 741-745.
- Fan H R, Zhao Y, Fu J L, et al. Improvement effects of Tongfengning Capsule on pathological injuries of major organs in gouty nephropathy model mice [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2018, 44(4): 741-745.
- [20] Löffler C, Sattler H, Löf fler U, et al. Size matters: Observations regarding the sonographic double contour sign in different joint sizes in acute gouty arthritis [J]. Zeitschrift Für Rheumatol, 2018, 77(9): 815-823.
- [21] 陈 燊, 张史昭, 唐国良. 痛风胶囊对实验性IgA肾病合并高尿酸血症大鼠血尿酸水平及肾组织MCP-1表达的影响 [J]. 中国中医药科技, 2009, 16(4): 258-259, 247.
- Chen S, Zhang S Z, Tang G L. Effects of Tongfeng capsule on serum trioxypurine level and renal mcp-1 expression of rats with Iga nephrosis combined hyperuricemia [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2009, 16(4): 258-259, 247.
- [22] 亓国锋, 楚天舒, 刘 谓, 等. 加味四妙汤辅助治疗痛风性关节炎对RAGE、COX-2水平变化研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 11-13.
- Qi G F, Chu T S, Liu W, et al. Study on changes of RAGE and COX-2 levels in the adjuvant treatment of gout arthritis with Modified Simiao Decoction [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(1): 11-13.
- [23] 周媛媛, 李中南. 萆薢方对糖尿病痛风模型大鼠PGE₂、COX-2水平的影响 [J]. 江西中医药大学学报, 2020, 32(1): 83-86.
- Zhou Y Y, Li Z N. Effect of Biling prescription on PGE₂ and COX-2 levels in diabetic gout model rats [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2020, 32(1): 83-86.
- [24] 宋敬锋, 刘 昊, 张 岩, 等. 祛风通络利湿中药治疗湿热痹阻证痛风性关节炎疗效及对MMP-3、COX-2的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(16): 1741-1744.
- Song J F, Liu H, Zhang Y, et al. Effect of Qufeng Tongluo Lishi Chinese medicine on gouty arthritis of heat-damp stasis syndrome and on MMP-3, COX-2 [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2017, 26(16): 1741-1744.
- [25] 陈浩全, 吴小珍, 雷仲平, 等. 血清淀粉样蛋白A、胱抑素C、 β_2 微球蛋白联合检测在早期痛风性肾病中的诊断价值 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(23): 2880-2881, 2885.
- Chen H Q, Wu X Z, Lei Z P, et al. The diagnostic value of serum amyloid A, cystatin C and β_2 microglobulin in early gout nephropathy [J]. Chin J Heal Lab Technol, 2020, 30(23): 2880-2881, 2885.
- [26] 谭 峰. 环氧合酶2在急性肾脏损伤小鼠中的作用机制研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(22): 2197-2201.
- Tan F. The role of COX-2 in acute kidney injury in mice [J]. J Clin Exp Med, 2016, 15(22): 2197-2201.
- [27] 袁俊蓉. 胱抑素C、肌酐和尿素氮在肾脏损害中的诊断价值 [J]. 中外医学研究, 2017, 15(18): 47-48.
- Yuan J R. Diagnostic value of cystatin C, creatinine and urea nitrogen in renal injury [J]. Chin Foreign Med Res, 2017, 15(18): 47-48.
- [28] Li H, Klett D E, Littleton R, et al. Role of insulin

- resistance in uric acid nephrolithiasis [J]. World J Nephrol, 2014, 3(4): 237-242.
- [29] Mandal A K, Mount D B. The molecular physiology of uric acid homeostasis [J]. Annu Rev Physiol, 2015, 77: 323-345.
- [30] 丁雪东, 彭成璐, 李曼曼, 等. 尿酸转运蛋白与血清尿酸平衡 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(9): 665-669.
Ding X D, Peng C L, Li M M, et al. Uric acid transporter and the balance of serum uric acid [J]. J Int Pharm Res, 2018, 45(9): 665-669.
- [31] 吴林秀, 梁红, 赵应学, 等. 水蛭素对高尿酸血症大鼠尿酸盐转运体 OAT1、URAT1、GLUT9 表达的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5776-5780.
Wu L X, Liang H, Zhao Y X, et al. Effect of hirudin on expressions of urate transporters OAT1, URAT1 and GLUT9 in hyperuricemia rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(22): 5776-5780.
- [32] 蔡唐彦, 肖艳, 郭洁梅, 等. 痛风宁对高尿酸血症模型大鼠肾脏尿酸盐转运体表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 79-86.
Cai T Y, Xiao Y, Guo J M, et al. Effect of Tongfengning on expression of renal urate transporter in hyperuricemia rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(16): 79-86.

[责任编辑 兰新新]