

## • 药理与临床 •

## 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾脏 NLRP3 和 TLRs 表达的影响

胡庆华, 缪明星, 卢 国, 季 晖\*

中国药科大学 天然药物组分和药效重点实验室, 江苏 南京 210009

**摘要:** 目的 研究槲皮素对尿酸性肾病大鼠模型的干预作用及其分子机制。方法 设对照组, 模型组, 槲皮素低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组和别嘌醇(5 mg/kg)阳性对照组。除对照组外, 其他组大鼠每天 ig 给予腺嘌呤 100 mg/kg+乙胺丁醇 250 mg/kg 1次, 连续给予3周造模。每天给予造模药物后1 h, 槲皮素组和别嘌醇组 ig 相应药物1次, 连续给药3周。观察大鼠肾脏组织病理学变化, 检测血清和尿液中尿酸(Sur 和 Uur)及肌酐(Scr 和 Ucr)的水平, 检测血清尿素氮(BUN)水平, 计算分级尿酸排泄系数(FEUA); RT-PCR 和 Western blotting 法检测肾脏 NOD 样受体蛋白3(NLRP3)炎症体各组分 NLRP3、细胞凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、Caspase-1 和 TLRs 信号通路关键因子 Toll 样受体2(TLR2)、TLR4 基因和蛋白表达。结果 与模型组比较, 槲皮素各剂量组和别嘌醇组大鼠血清中 Sur、Scr 水平显著降低, 24 h 的 Uur、Ucr 排泄量升高, 并能恢复 FEUA。模型组大鼠肾脏中 NLRP3、ASC、Caspase-1、TLR2、TLR4 基因和蛋白表达显著上调, 而槲皮素和别嘌醇能够逆转上述指标的改变。结论 NLRP3 炎症体和 TLRs 信号通路的激活参与尿酸性肾病的发病过程, 槲皮素可通过对其的调控缓解尿酸性肾病。

**关键词:** 槲皮素; 尿酸性肾病; 尿酸; 肌酐; NOD 样受体蛋白3; Toll 样受体蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)24-3496-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.013

## Effects of quercetin on expression of renal NLRP3 and TLRs in rats with uric acid nephropathy

HU Qing-hua, MIAO Ming-xing, LU Guo, JI Hui

State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract: Objective** To investigate the intervention of quercetin on rats with uric acid nephropathy (UAN) and its molecular mechanisms. **Methods** Rats were divided into six groups including normal, model, quercetin (25, 50, and 100 mg/kg)-treated, and allopurinol (5 mg/kg)-treated groups. Adenine (100 mg/kg) and ethambutol (250 mg/kg) were ig given to rats once daily for consecutive three weeks to establish UAN model. Quercetin (25, 50, and 100 mg/kg) and allopurinol (5 mg/kg) were initially ig given to UAN rats 1 h after adenine and ethambutol had been given. Rat renal histopathological changes were observed; The levels of uric acid (Sur and Uur), creatinine (Scr and Ucr), and blood urea nitrogen (BUN) in serum and urine were detected; The fractional excretion of uric acid (FEUA) was calculated. Simultaneously, mRNA and protein levels of components of NOD like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasomes (NLRP3, ASC, and Caspase-1) and key factors in Toll like receptors (TLRs) signaling pathways (TLR2 and TLR4) were analyzed by RT-PCR and Western blotting methods, respectively. **Results** Compared with the model group, quercetin and allopurinol reduced Sur and Scr levels significantly, increased Uur and Ucr excretion in 24 h, and recovered FEUA in UAN rats. Moreover, the mRNA and protein expression of NLRP3, ASC, Caspase-1, TLR2, and TLR4 was up-regulated in UAN rat kidneys, which could be reversed by the treatment of quercetin and allopurinol. **Conclusion** These findings suggest that the activated NLRP3 inflammasomes and TLRs signaling pathways could play the causal roles in UAN pathogenesis. Quercetin could ameliorate UAN by regulating NLRP3 inflammasomes and TLRs signaling pathways.

**Key words:** quercetin; uric acid nephropathy; uric acid; creatinine; NOD like receptor protein 3; Toll like receptors

收稿日期: 2013-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(NSFC 81202573); 中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室开放课题(SKLNMF201319)

作者简介: 胡庆华(1985—), 男, 讲师, 研究方向为药理学。Tel/Fax: (025)83271414 E-mail: huqh@cpu.edu.cn

\*通信作者 季 晖 Tel/Fax: (025)83271414 E-mail: huijicpu@163.com

尿酸性肾病是指由于高尿酸血症引起尿酸盐沉积于肾脏所引起的肾脏损伤<sup>[1]</sup>。近年来该病因发病率呈日益升高的趋势而受到关注,然而目前国内外尚无理想的治疗药物。

尿酸性肾病是一种免疫相关性疾病,尿酸盐结晶诱发的炎症反应在发病中起至关重要的作用<sup>[2]</sup>。NOD样受体蛋白3(NOD like receptor protein 3, NLRP3)是NOD样受体(NOD like receptor, NLR)家族成员之一,包括NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和Caspase-1。NLRP3与ASC相互作用,可激活Caspase-1,进而对白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和IL-18等炎症因子的前体形式进行切割,使其成熟并释放到细胞外,从而引起炎症反应<sup>[3-4]</sup>。NLRP3炎症体在非尿酸性肾病中起关键作用,遭受破坏的肾脏组织或细胞释放的尿酸、尿酸盐晶体可激活NLRP3炎症体<sup>[5-6]</sup>。Toll样受体(Toll like receptors, TLRs)是一类跨膜蛋白质和模式识别受体(PRR)<sup>[7]</sup>。Liu-Bryan等<sup>[8]</sup>在TLR2、TLR4敲除的小鼠背部造囊并注射尿酸钠结晶模拟急性痛风性炎症,结果尿酸钠诱发的IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )高表达被显著下调。Scott等<sup>[7]</sup>发现尿酸盐结晶与可溶性CD14(sCD14)相互作用,可使尿酸钠结晶作用的巨噬细胞诱导IL-1 $\beta$ 产生的能力增强。Batsford等<sup>[9]</sup>研究表明,TLR2和TLR4及其介导的炎症信号通路在人类肾脏疾病中起重要作用。

NLRP3和TLRs均可被尿酸盐晶体所激活,且二者间存在交互作用和互相调节作用<sup>[10]</sup>。NLRP3、TLR2、TLR4作为尿酸盐结晶介导的炎症反应通路的上游蛋白,其介导的信号通路在尿酸性肾病炎症反应启动中起十分重要的作用,信号通路中任一环节被抑制均能缓解炎症反应。但目前少有关于NLRP3炎症体和TLRs在尿酸性肾病模型中作用的报道。

槲皮素是一种广泛存在于植物中的天然黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗癌等药理作用<sup>[11-12]</sup>。近年有研究表明,槲皮素能够显著降低氧嗉酸钾盐诱导的高尿酸血症合并肾损伤模型大鼠血清尿酸(Sur)水平、改善肾功能、减轻肾脏病变<sup>[13]</sup>。本实验采用腺嘌呤和乙胺丁醇联合给药建立大鼠尿酸性肾病模型,研究NLRP3炎症体和TLRs介导的信号通路在模型大鼠炎症反应中的作用,探讨槲皮素干预尿酸性肾病的分子机制,为进一步探究治疗尿酸性肾病新的分子靶点、槲皮素干预尿酸性肾病可能

的分子机制及研发治疗尿酸性肾病的高效低毒的天然药物提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

槲皮素,泽朗生物科技有限公司,经HPLC测定质量分数 $\geq 95\%$ ;别嘌呤醇(批号A8003,经HPLC测定质量分数 $\geq 98\%$ )、腺嘌呤(批号A8626,经HPLC测定质量分数 $\geq 98\%$ )、盐酸乙胺丁醇(批号E4630)、大鼠GAPDH单克隆抗体(批号101M4777),Sigma公司;肌酐(cr)、血尿素氮(BUN)和蛋白检测试剂盒,南京建成生物科技有限公司;IL-1 $\beta$ 、IL-18检测试剂盒,拜傲斯生物科技有限公司;Trizol试剂、反转录试剂盒,Invitrogen公司。所有引物由捷瑞生物科技有限公司设计合成;大鼠NLRP3、TLR2抗体,Epitomics公司;大鼠Caspase-1、ASC、TLR4抗体,Abcam公司;羊抗兔IgG-HRP, Santa Cruz公司。

### 1.2 动物

雄性SD大鼠,体质量(180 $\pm$ 20)g,购于南京江宁青龙山实验动物中心,使用许可证号:SCXK(苏)2007-0008。

### 1.3 仪器

XHF-D高速分散器,宁波新芝生物科技股份有限公司;5810R型台式高速冷冻离心机,美国Eppendorf公司;754型紫外分光光度计,上海菁华仪器有限责任公司;EON全波长酶标仪,美国Biotek公司;9700PCR扩增仪、7500实时定量PCR扩增仪,美国ABI公司;ChemDoc XRS化学发光成像系统,美国Bio-Rad公司。

## 2 方法

### 2.1 模型制备、分组与给药

大鼠适应性饲养7d后随机分成6组(每组10只):对照组,模型组,槲皮素低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组,别嘌呤醇(5 mg/kg)阳性对照组。除对照组外,其他组大鼠每天ig腺嘌呤100 mg/kg+盐酸乙胺丁醇250 mg/kg,连续给予3周造模。造模同时槲皮素组和别嘌呤醇组大鼠每天ig相应药物[溶剂为0.9%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)],对照组大鼠ig等量CMC-Na,连续给药3周。

### 2.2 样本采集

末次给予造模剂前24h,将大鼠放入代谢笼中,收集24h尿液,2000 $\times$ g离心10min,去除微粒子污染物,记录尿液体积。末次给药后1h,眼眶后静

脉丛采血, 10 000×g 离心 5 min 获取血清样本。尿液和血清样本于-20 °C 保存待测。随后, 大鼠断头处死, 在冰台上迅速仔细地分离肾脏组织, 于-70 °C 保存待测。

**2.3 磷钨酸法测定血清和尿液中尿酸(ur)水平**

向 3 mL 磷钨酸中加入 100 μL 待测血清或尿液, 混匀, 室温静置 15 min。3 000×g 离心 10 min, 将上清液移入干净试管, 加入 10% 碳酸钠溶液 1 mL, 混匀后, 室温下静置 15 min, 测定 700 nm 处吸光度(A)值, 计算血清和尿液中尿酸(Sur 和 Uur)质量浓度, 并计算 24 h 的 Sur 排泄量(24 h 尿液体积×Uur)。

**2.4 苦味酸比色法测定血清和尿液中 cr 水平**

按照试剂盒测量说明书操作, 测定血清和尿液中肌酐(Scr 和 Ucr)水平。计算 24 h 的 Ucr 排泄量(24 h 尿液体积×Ucr)。计算分级尿酸排泄系数(FEUA)。

$$FEUA = (Uur \times Scr) / (Sur \times Ucr)$$

**2.5 尿素酶紫外法测定 BUN 水平**

按照试剂盒测量说明书操作。

**2.6 酶联免疫法测定肾脏组织中炎症因子的量**

大鼠肾脏组织置 10 倍体积的磷酸盐缓冲液(PBS)中匀浆, 4 °C 下 12 000×g 离心 15 min, 取上清液, 按照试剂盒方法测定 IL-1β、IL-18 的量。

**2.7 RT-PCR 法测定相关基因表达**

Trizol 法提取肾脏组织中总 RNA。取 1 μg 总 RNA, 加入 oligdT18 引物 2 μL 与反转录体系

(M-MLV 反转录酶 1 μL、5×反转录缓冲液 5 μL、dNTP 1.25 μL、RNA 酶抑制剂 0.625 μL、双蒸水 10.125 μL) 后合成 cDNA。采用基因特异性引物(NLRP3、Caspase-1、ASC、TLR2、TLR4)对 cDNA 模板进行 RT-PCR 扩增。引物序列、反应条件见表 1。RT-PCR 反应体系 20 μL(SYBR Green Master Mix 10 μL, 正反向引物各 0.5 μL, cDNA 模板 4 μL, ddH<sub>2</sub>O 5 μL)。反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 20 s, 退火 56 °C、30 s, 共 35 循环。RT-PCR 检测得到相对量的 <sup>ΔΔ</sup>Ct 值, 以内参 rGAPDH 作为参照对相关基因进行相对定量。

**2.8 Western blotting 法检测相关蛋白表达**

将大鼠肾脏组织置 RIPA 裂解液 1 mL 中匀浆, 4 °C 下 3 000×g 离心 15 min, 取上清, 4 °C 下 12 000×g 离心 20 min, 取上清备用。

采用 Bradford 法测定上清中蛋白的量, 以小牛血清蛋白作为对照品。蛋白统一稀释后在沸水中煮 5 min, 备用。上述提取的蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 在 NLRP3、ASC、Caspase-1、TLR2、TLR4 不同的一抗中孵育过夜, 与 HRP 标记的二抗进行反应。最终在膜上加 TMB 显色液, 显示的带扫描后在凝胶影像分析仪上分析条带。

**2.9 数据分析**

数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 LSD 法进行组间差异的统计学分析, 用 GraphPad Prism 5 软件作图。

表 1 基因特异性 PCR 引物序列、产物大小和退火温度

Table 1 Gene-specific PCR primer sequences, product fragments, and appropriate annealing temperature

基因	基因库编号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	产物片段 / bp	退火温度 / °C	循环数
NLRP3	NM_001191642	AGCCTCAGGGCACCAAA	GGGATGAAGCACATAGTAAACA	443	56	35
ASC	NM_172322	CTGACGCTCTTGAAAACCT	CAATGAGTGCTTGCCCTGTG	340	56	35
Caspase-1	NM_012762	AAACTCCGAAGAGGGATTCT	GTCCTGGGAAGAGGTAGAAA	308	56	35
TLR2	NM_198769	TGGAGGTGTTGGATGTTAGT	GGAGCAGATGAAATGGTTGT	239	56	35
TLR4	NM_019178	ATCATCAGTGTATCGGTGGT	ACCACCACAATAACTTTCCG	314	56	35
GAPDH	NM_008084	TGAGGCCGGTGTGAGTATGT	CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	299	56	35

**3 结果**

**3.1 对尿酸性肾病大鼠肾功能指标的影响**

与对照组相比, 模型组大鼠 Sur、Scr 和血清 BUN 水平显著升高 (P<0.001), 24 h Uur 排泄量、FEUA 均显著降低 (P<0.01、0.001), 表明尿酸性肾病模型制备成功。

与模型组比较, 槲皮素各剂量组和别嘌呤醇组

大鼠 Sur、Scr 和血清 BUN 水平显著降低 (P<0.05、0.01、0.001), 24 h Uur 排泄量和 FEUA 不同程度增加 (P<0.05、0.01、0.001)。槲皮素 50、100 mg/kg 组和别嘌呤醇组大鼠降低的 Ucr 排泄量得到恢复 (P<0.05、0.001)。表明槲皮素可降低尿酸性肾病大鼠的 Sur、增加肾脏尿酸排泄和改善肾功能。结果见表 2。

表 2 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾功能指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of quercetin on renal function indexes in rats with UAN ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / (mg·kg <sup>-1</sup> )	Sur / (mg·L <sup>-1</sup> )	Scr / (mg·L <sup>-1</sup> )	血清 BUN / (mmol·L <sup>-1</sup> )	24 h Uur 排泄 量 / mg	24 h Ucr 排泄 量 / mg	FEUA
对照	—	28.8 ± 1.4 <sup>###</sup>	9.6 ± 0.5 <sup>###</sup>	4.20 ± 0.11 <sup>###</sup>	11.25 ± 0.67 <sup>###</sup>	28.22 ± 2.39 <sup>###</sup>	17.94 ± 2.28 <sup>**</sup>
模型	—	43.1 ± 2.1 <sup>###</sup>	12.1 ± 0.6 <sup>###</sup>	5.68 ± 0.09 <sup>###</sup>	7.60 ± 0.41 <sup>###</sup>	16.50 ± 1.23 <sup>###</sup>	14.05 ± 3.26 <sup>##</sup>
槲皮素	25	35.6 ± 1.5 <sup>**</sup>	11.1 ± 0.7 <sup>*</sup>	4.88 ± 0.14 <sup>**</sup>	9.38 ± 1.32 <sup>*</sup>	17.46 ± 1.87	14.39 ± 1.76
	50	32.0 ± 1.3 <sup>###</sup>	10.5 ± 0.9 <sup>**</sup>	4.42 ± 0.22 <sup>**</sup>	9.91 ± 1.16 <sup>**</sup>	21.52 ± 3.04 <sup>*</sup>	16.58 ± 2.54 <sup>*</sup>
	100	30.1 ± 1.8 <sup>###</sup>	9.3 ± 0.8 <sup>###</sup>	4.16 ± 0.17 <sup>###</sup>	10.98 ± 0.81 <sup>###</sup>	26.95 ± 2.27 <sup>###</sup>	18.12 ± 2.05 <sup>**</sup>
别嘌呤醇	5	25.8 ± 1.4 <sup>###</sup>	10.2 ± 1.5 <sup>**</sup>	4.53 ± 0.29 <sup>**</sup>	9.69 ± 1.68 <sup>*</sup>	19.62 ± 1.13 <sup>*</sup>	17.05 ± 3.98 <sup>*</sup>

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 下同  
<sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group; same as below

### 3.2 对尿酸性肾病大鼠肾脏炎症的影响

**3.2.1 对尿酸性肾病大鼠肾脏组织炎症因子的影响**  
 与对照组比较, 模型组大鼠肾脏中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 显著升高 ( $P < 0.01$ 、0.001)。与模型组比较, 槲皮素 50、100 mg/kg 组和别嘌呤醇组大鼠肾脏中 IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ 、0.01)、IL-18 显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001); 而槲皮素 25 mg/kg 组大鼠肾脏中 IL-18 的量无显著变化, IL-1 $\beta$  的量显著降低 ( $P < 0.05$ )。结果见图 1。

**3.2.2 对尿酸性肾病大鼠肾脏组织病理学的影响**  
 观察可见, 模型组大鼠肾脏中部分肾小管完全破坏并有炎性细胞浸润, 且存在少量尿酸盐结晶。槲皮素 50、100 mg/kg 组和别嘌呤醇组大鼠肾脏中间质炎症反应明显缓解, 槲皮素 25 mg/kg 组大鼠肾脏中间质炎症反应几乎未缓解。结果见图 2。

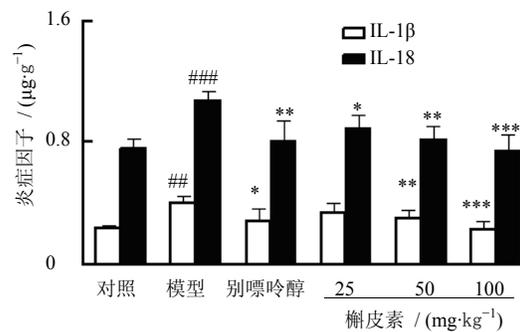


图 1 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾脏组织炎症因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effects of quercetin on inflammatory factors in kidney of rats with UAN ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

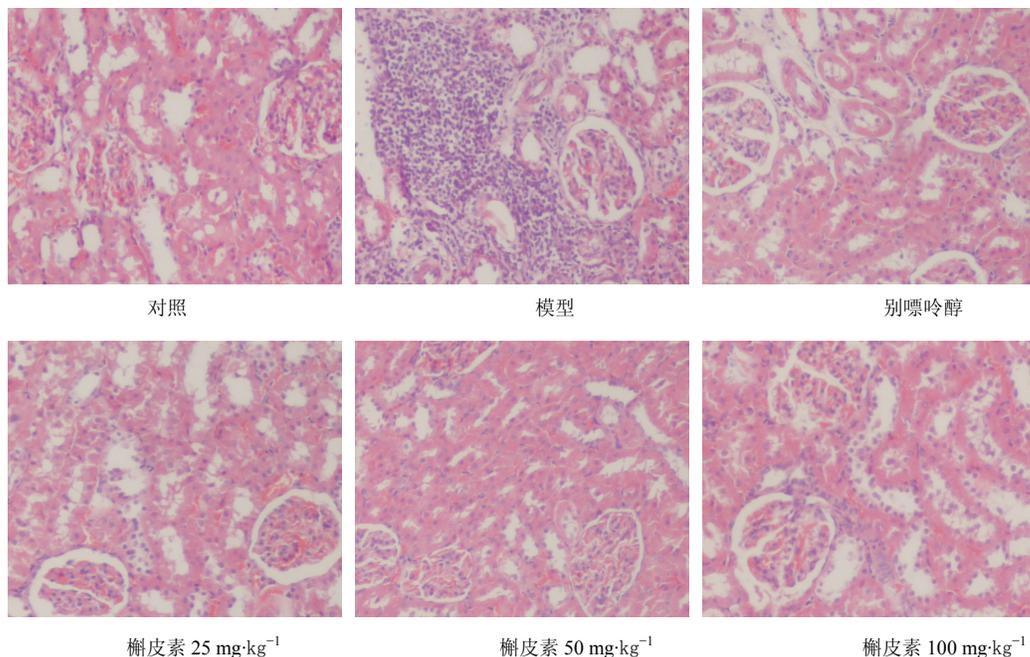


图 2 各组大鼠肾脏组织病理学观察

Fig. 2 Histopathological observation on kidney of rats in each group

### 3.3 对尿酸性肾病大鼠 NLRP3 炎症体的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肾脏中 NLRP3、ASC、caspase-1 基因表达水平均显著上调 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 槲皮素 50、100 mg/kg 组大鼠肾脏中上述基因表达显著下调 ( $P < 0.01$ 、0.001), 并呈剂量相关性; 25 mg/kg 剂量组大鼠肾脏中 NLRP3 基因表达显著下调 ( $P < 0.05$ ), 但 ASC、caspase-1 基因表达水平无显著改变。别嘌呤醇组大鼠肾脏中 NLRP3、ASC、caspase-1 基因表达也显著下调 ( $P < 0.01$ 、0.001)。结果见图 3。

与对照组比较, 模型组大鼠肾脏中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 槲皮素 50、100 mg/kg 组大鼠肾脏中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001); 槲皮素 25 mg/kg 剂量组仅能显著降低 ASC 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 而对 NLRP3、Caspase-1 蛋白的表达无显著影响。别嘌呤醇组大鼠肾脏中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白的过度表达可得到显著缓解 ( $P < 0.01$ )。结果见图 4。

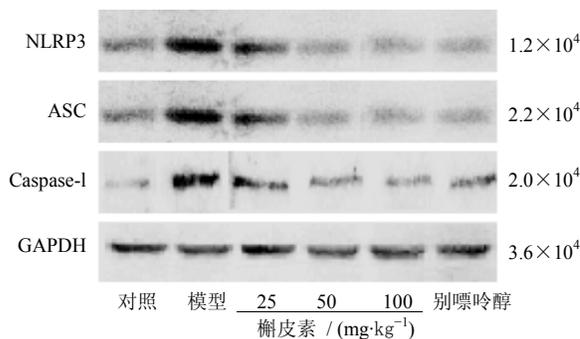


图 4 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾脏 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 4 Effects of quercetin on protein expression of NLRP3, ASC, and Caspase-1 in kidney of rats with UAN ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

并呈剂量相关性; 25 mg/kg 组 TLR4 基因表达也显著下调 ( $P < 0.05$ ), 但对 TLR2 基因表达仅有轻微下调作用, 且与模型组比较无显著差异。别嘌呤醇组大鼠肾脏中 TLR2、TLR4 基因表达异常也得到显著改善 ( $P < 0.01$ )。结果见图 5。

与对照组比较, 模型组大鼠肾脏 TLR2 和 TLR4 的蛋白表达显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 槲皮素 50、100 mg/kg 剂量组 TLR2、TLR4 蛋白的表达显著下调 ( $P < 0.01$ 、0.001); 25 mg/kg 剂量组 TLR2、TLR4 蛋白的表达虽有下调趋势, 但无显著差异。别嘌呤醇组大鼠肾脏中 TLR2、TLR4 蛋白的过度表达得到显著缓解 ( $P < 0.01$ 、0.001)。结果见图 6。

### 3.4 对尿酸性肾病大鼠肾脏 TLRs 通路的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肾脏中 TLR2、TLR4 基因表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、0.001)。与模型组比较, 槲皮素 50、100 mg/kg 剂量组 TLR2、TLR4 基因表达水平显著下调 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001),

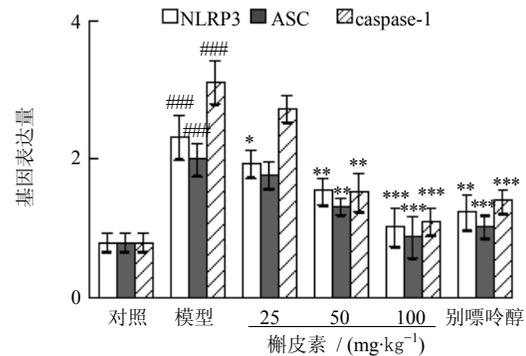


图 3 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾脏 NLRP3、ASC 和 caspase-1 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 3 Effects of quercetin on mRNA expression of NLRP3, ASC, and caspase-1 in kidney of rats with UAN ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

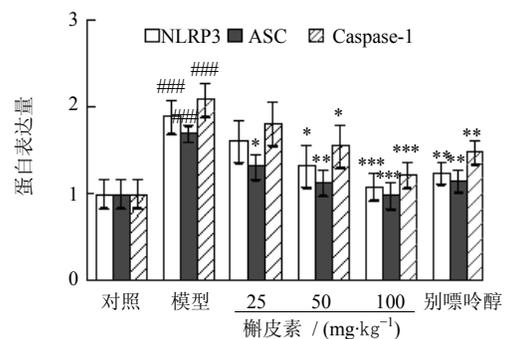


图 4 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾脏 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 4 Effects of quercetin on protein expression of NLRP3, ASC, and Caspase-1 in kidney of rats with UAN ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

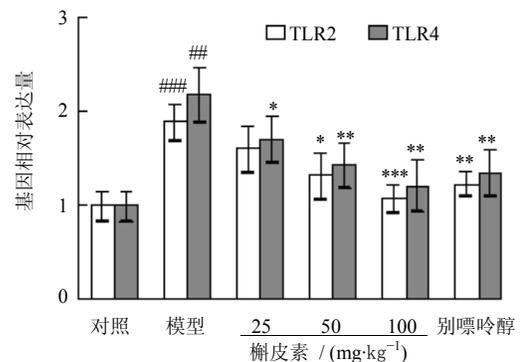


图 5 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾脏 TLR2 和 TLR4 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 5 Effects of quercetin on mRNA expression of TLR2 and TLR4 in kidney of rats with UAN ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

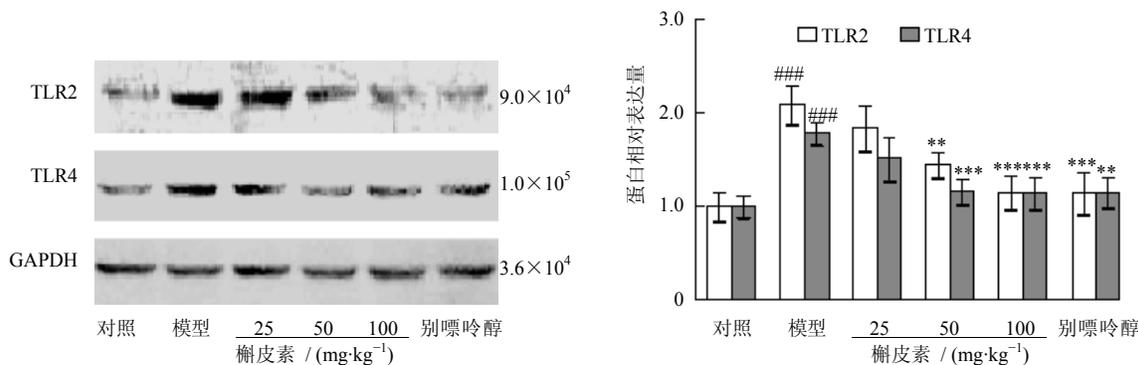


图 6 槲皮素对尿酸性肾病大鼠肾脏 TLR2 和 TLR4 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 6 Effects of quercetin on protein expression of TLR2 and TLR4 in kidney of rats with UAN ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

#### 4 讨论

槲皮素可明显缓解高果糖饮食或氧嗉酸钾盐诱导的高尿酸血症，并减轻肾损伤<sup>[14-15]</sup>。本实验采用乙胺丁醇联合腺嘌呤诱导建立大鼠尿酸性肾病模型，并用槲皮素进行干预，结果表明槲皮素能有效降低 Sur、Scr、BUN 水平，增加 24 h Uur 和 Ucr 排泄量，恢复 FEUA，从而有效缓解大鼠尿酸性肾病，改善肾功能。

NLRP3 作为胞内模式识别受体，可被细胞释放的尿酸等内源性危险信号或尿酸盐晶体激活，在炎症反应中起重要的调控作用<sup>[9]</sup>。槲皮素通过调节肾脏 NLRP3 炎症体各组分的表达，降低高果糖饮食致高尿酸血症大鼠血清及肾脏中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的量，进而起到缓解肾脏炎症及损伤的作用<sup>[16]</sup>。还有研究表明，槲皮素通过抑制 NLRP3 炎症体的激活，缓解链脲佐菌素致糖尿病大鼠的肾脏炎症反应<sup>[17]</sup>。长期给予槲皮素 50 mg/kg，能通过活性氧 (ROS) 介导的 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 通路下调肾脏中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子的水平，进而逆转肾脏铅损伤<sup>[18]</sup>。本实验结果表明，腺嘌呤和乙胺丁醇联合诱导的尿酸性肾病大鼠肾脏中 NLRP3、ASC、caspase-1 基因和蛋白表达显著上调，促进了肾脏中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的量显著增加，出现明显的肾脏炎症病变；槲皮素和别嘌醇能显著降低模型组大鼠肾脏中 NLRP3、ASC、caspase-1 的表达，并有效抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平的升高，改善肾脏炎症病变，提示 NLRP3 介导的肾脏炎症在尿酸性肾病模型中具有重要作用，NLRP3 可能作为治疗尿酸性肾病新的分子靶点。

TLR 识别特异性配体后，通过 TIR 结构域传递信号，激发下游的级联效应，刺激效应分子的表达，在炎症过程发挥至关重要的作用。本实验结果表明，

尿酸性肾病大鼠肾脏中 TLR2、TLR4 基因和蛋白表达显著上调，表明 TLRs 信号通路的激活参与该模型肾脏炎症的发生；而槲皮素显著抑制 TLRs 信号通路，从而缓解大鼠肾脏炎症反应。Byun 等<sup>[19]</sup>的研究表明，槲皮素通过负向调节脂多糖引起细胞中 TLR4 信号通路的激活，从而抑制细胞中 IL-1 $\beta$  等炎症因子的产生。Bhaskar 等<sup>[20]</sup>研究表明槲皮素也能显著抑制人外周血单个核细胞中氧化型低密度脂蛋白 (Ox-LDL)，从而引起 TLR2 和 TLR4 基因表达水平上调。这些研究结果都为槲皮素可介导 TLRs 信号通路参与炎症反应提供了有力的证据。因此推测槲皮素可能通过抑制 TLRs 信号通路缓解尿酸性肾病大鼠肾脏炎症反应，减轻肾损伤。

综上所述，本实验结果显示 NLRP3 炎症体和 TLRs 信号通路的激活可以共同介导大鼠尿酸性肾病的发病过程；而槲皮素可通过下调 NLRP3 炎症体各组分和 TLRs 信号通路中关键分子基因和蛋白水平，缓解肾脏炎症反应及减轻肾损伤。这为研究治疗尿酸性肾病的分子机制提供了可能的新靶点。

#### 参考文献

- [1] 汪德平, 付晓兵. 慢性尿酸性肾病的中医药研究进展 [J]. 江西中医药, 2012, 43(349): 67-68.
- [2] 隋淑梅, 徐梅秀. 肾康降酸颗粒对尿酸性肾病大鼠肾脏组织 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 表达的影响 [J]. 中医药信息, 2011, 28(3): 20-22.
- [3] Agostini L, Martinon F, Burns K. NALP3 forms an IL-1 beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder [J]. *Immunity*, 2004, 20(3): 319-325.
- [4] Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? [J]. *Science*, 2010, 327(5963): 296-300.

- [5] Vilaysane A, Chun J, Seamone M E, *et al.* The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(10): 1732-1744.
- [6] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, *et al.* Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. *Nature*, 2006, 440(7081): 237-241.
- [7] Scott P, Ma H, Viriyakosol S, *et al.* Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals [J]. *J Immunol*, 2006, 177(9): 6370-6378.
- [8] Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, *et al.* Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(9): 2936-2946.
- [9] Batsford S, Duermueller U, Seemayer C. Protein level expression of Toll-like receptors 2, 4 and 9 in renal disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(4): 1413-1416.
- [10] 李丽燕. Toll 样受体的研究进展 [J]. *临床医学工程*, 2011, 18(3): 467-469.
- [11] 郭瑞霞, 李力更, 霍长虹, 等. 槲皮素甲基化衍生物的半合成及构效关系 [J]. *中草药*, 2013, 44(3): 359-367.
- [12] 王 刚, 杜士明, 杨光义, 等. 槲皮素抗肿瘤的分子机制研究进展 [J]. *现代中药研究与实践*, 2011, 25(3): 322-324.
- [13] 王天然, 周 伟, 曾祥元. 槲皮素干预实验性慢性肾衰大鼠肾脏 SOD 与 LPO 变化 [J]. *成都中医药大学学报*, 2009, 32(4): 47-49.
- [14] Hu Q H, Wang C, Li J M, *et al.* Allopurinol, rutin, and quercetin attenuate hyperuricemia and renal dysfunction in rats induced by fructose intake: renal organic ion transporter involvement [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297(4): 1080-1091.
- [15] Hu Q H, Zhang X, Wang X, *et al.* Quercetin regulates organic ion transporter and UMOD expression and improves renal function in hyperuricemic mice [J]. *Eur J Nutr*, 2012, 51(5): 593-606.
- [16] Hu Q H, Zhang X, Pan Y, *et al.* Allopurinol, quercetin and rutin ameliorate renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation in fructose-fed rats [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(1): 113-125.
- [17] Wang C, Pan Y, Zhang Q Y, *et al.* Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38285.
- [18] Liu C M, Sun Y Z, Sun J M, *et al.* Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(10): 1693-1703.
- [19] Byun E B, Yang M S, Choi H G, *et al.* Quercetin negatively regulates TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide through Tollip expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(4): 698-705.
- [20] Bhaskar S, Salini V, Helen A. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Immunobiology*, 2011, 216(3): 367-373.