

基于分子对接技术的桑白皮总黄酮对高脂血症并高尿酸血症大鼠肾保护作用研究

党院霞, 梁丹灵, 周欣欣, 秦 阳, 高 英, 李卫民*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 511400

摘要: **目的** 探讨桑白皮总黄酮改善高脂血症并高尿酸血症相关肾病的作用机制。**方法** 选取桑白皮总黄酮提取物(TFMC)中有效成分桑辛素及尿酸相关基因, 将桑辛素与同源建模所得的 URAT1 蛋白结构进行分子对接。将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、TFMC 组(1.0 g/kg)和苯溴马隆组(6.25 mg/kg)。采用高脂饲料喂养联合 ig 腺嘌呤加乙胺丁醇的方法制备高脂血症并高尿酸血症模型。各给药组大鼠 ig 给药 16 周后, 检测大鼠血清中血糖(Glu)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、尿酸(UA)、肌酐(CRE)、尿素氮(BUN)水平; 苏木素-伊红染色观察肾脏病理改变; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测肾脏组织白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、尿酸盐阴离子交换转运体 1(URAT1)、有机阴离子转运体 1(OAT1) mRNA 的表达。**结果** TFMC 主要成分桑辛素与 URAT1 对接打分较高, 提示桑辛素可能是 TFMC 中改善高脂血症并高尿酸血症相关肾病的主要活性成分。药物干预 16 周后, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 Glu、TC、TG、LDL-C、UA、CRE、BUN 水平均显著升高, HDL-C 水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, TFMC 组大鼠和苯溴马隆组 Glu、TC、TG、LDL-C、UA、CRE、BUN 水平均显著下降, HDL-C 水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。HE 染色结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾小管上皮细胞发生肿胀及坏死, 肾小管中可见明显的蛋白管型。TFMC 组部分肾小管上皮细胞有轻微肿胀, 周围未见炎性细胞浸润。苯溴马隆组大鼠肾皮质、髓质结构清晰, 肾小球未见增生或萎缩, 管腔中未见管型, 肾间质未见炎性细胞浸润。qRT-PCR 结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾脏组织 IL-6、TNF- α 、URAT1 mRNA 表达水平均显著升高, OAT1 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较, TFMC 组大鼠肾脏组织 IL-6、TNF- α 、URAT1 mRNA 表达水平显著降低, OAT1 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** TFMC 改善高脂血症并高尿酸血症相关肾病可能与其调节 IL-6、TNF- α 、URAT1、OAT1 mRNA 等有关, URAT1 可能是其潜在靶点, 分子虚拟对接和动物实验结果具有一定的相似性, 为进一步探讨 TFMC 改善高脂血症并高尿酸血症相关肾病提供理论基础, 为后续分子机制深入研究提供参考。

关键词: 桑白皮; 桑辛素; 分子对接; 高脂血症; 高尿酸血症; URAT1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1175-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.022

Protective effect of *Mori Cortex* on kidney in rats with hyperlipidemia and hyperuricemia based on molecular docking technique

DANG Yuan-xia, LIANG Dan-ling, ZHOU Xin-xin, QIN Yang, GAO Ying, LI Wei-min

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of total flavonoids of *Mori Cortex* (TFMC) in improving hyperlipidemia and hyperuricemia related nephropathy. **Methods** The molecular structure of URAT1 protein and structure of *Mori Cortex* total flavonoids extract were docked by selecting the effective components of total flavonoids extract of *Mori Cortex* and related genes of uric acid. Forty SD rats were randomly divided into four groups: normal group, model group, TFMC group (1.0 g/kg) and benzbromarone group (6.25 mg/kg). The hyperlipidemia and hyperuricemia model was established by feeding with high fat diet plus adenine and ethylamine butanol. After 16 weeks, the levels of blood glucose and blood lipids in serum, uric acid (UA), creatinine (CRE), and urea nitrogen (BUN) of rats in each group were compared. The renal pathological changes were observed by hematoxylin

收稿日期: 2018-07-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373775)

作者简介: 党院霞, 硕士研究生, 主要从事中药学研究。Tel: 13726748662 E-mail: 13726748662@139.com

*通信作者 李卫民, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新药研究与开发。Tel: (020)39358290 E-mail: 13925023915@139.com

eosin staining. The expressions of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), uric acid anion exchange transporter 1 (URAT1) and organic anion transporter 1 (OAT1) were detected by qRT-PCR. **Results** The main component of moracin of total flavonoids of *Mori Cortex* was the high target of the genes related to uric acid, suggesting that the moracin might be the main active component in the improvement of hyperlipidemia and hyperuricemia related nephropathy. After 16 weeks of drug intervention, the serum levels of Glu, TC, TG, LDL-C, UA, CRE and BUN in the model group were significantly higher than those in the normal group, and the level of HDL-C in the model group was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the above biochemical indexes in the TFMC group and the benzbromarone group were significantly decreased and HDL-C was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The results of HE staining showed that the epithelial cells of renal tubules in the model group were swollen and necrotized, and the protein tubules could be seen in the renal tubules. In the TFMC group, some renal tubular epithelial cells were slightly swollen, and no inflammatory cells infiltrated around them. The structures of renal cortex and medullary were clear, and no hyperplasia or atrophy in glomerular were found, no tubular type and inflammatory cell infiltration in renal interstitial tissue of rats in benzbromarone group were observed. The results of qRT-PCR showed that, compared with the normal group, the content of IL-6, TNF- α , and URAT1 mRNA was significantly increased, the content of OAT1 mRNA was significantly decreased in the model group; The content of above indicators was decreased and OAT1 was increased after drug intervention, ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The improvement of hyperlipidemia and hyperuricemia associated nephropathy may be related to the regulation of IL-6, TNF- α , URAT1, and OAT1 mRNA. *Mori Cortex* has obvious influence on the key factor of hyperlipidemia and hyperuricemia with URAT1 as its potential target, and the results of molecular virtual docking and animal experiments are similar. It provides a theoretical basis for further study on the improvement of hyperlipidemia and hyperuricemia related nephropathy and provides a reference for the further molecular mechanism.

Key words: *Mori Cortex*; moracin; molecular docking; hyperlipidemia; hyperuricemia; URAT1

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 和高脂血症 (hyperlipemia, HLP) 均为代谢性疾病。HUA 通常由尿酸 (UA) 合成增加或 (和) UA 排泄减少引起^[1], 是指在正常嘌呤饮食状态下, 非同日 2 次空腹血 UA 水平男性高于 420 $\mu\text{mol/L}$, 女性高于 360 $\mu\text{mol/L}$ ^[2]。HLP 也是一种全身代谢性疾病, 表现为脂肪代谢或运转异常使血浆中 1 种或多种脂质高于正常, 血中总胆固醇 (TC) 和 (或) 三酰甘油 (TG) 过高或高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 过低^[3]。体内血 UA 水平升高对人体造成很大的危害, 不仅导致痛风、结石和急慢性肾衰, 还常与高血压病、糖尿病、HLP、脑梗死、冠心病等疾病密切相关, 体内 UA 过高本身对心血管系统和肾脏有直接的损伤作用, 是心血管疾病和肾脏疾病的独立危险因素^[4-5]。HUA 不仅导致肾功能不全, 而且与终末期肾脏疾病的关系密切^[6]。UA 也是免疫球蛋白 A (IgA) 肾病肾功能进展的独立危险因素^[7]。

桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮, 味甘、微苦。桑白皮的主要化学成分是黄酮类化合物, 其中大多为异戊烯基黄酮, 其特点是在黄酮类化合物的骨架上存在异戊烯基侧链。其中桑辛素为桑白皮总黄酮提取物 (total flavonoids of *Mori Cortex*, TFMC) 中典型的异戊烯基黄酮。现代药理研究表明桑白皮中所含的黄酮类成分主要有降血

压、降血糖、抗炎、利尿、镇静镇痛及抑制血小板聚集等药理作用^[8]。桑辛素、桑根酮 C、D 等具有显著的抗肿瘤^[9]和降血糖^[10]等作用。

分子对接是依据 Fisher 于 1894 年提出的配体与受体作用的“锁-钥匙模型”^[11], 模拟小分子配体与受体生物大分子相互作用, 配体与受体在空间立体结构、静电作用、范德华力、氢键及疏水作用等方面互补匹配, 通过计算可以预测二者之间的结合模式和亲和力, 计算结果可用来评判受体和配体的结合程度。

本课题组前期对 TFMC 中各成分进行了含量测定和基础药效研究, 发现桑辛素为 TFMC 中的主要成分, 并且研究发现 TFMC 对肥胖大鼠具有降低体重及改善非酒精性脂肪肝的作用^[12-13]。尿酸盐转运蛋白 1 (URAT1) 是已被证实的与尿酸盐重吸收密切相关的转运蛋白, 其表达对 UA 排泄有重要影响。在此基础上, 本研究采用 Maestro 11.0 软件模拟预测桑白皮中桑辛素成分与 URAT1 的相互作用, 探讨 TFMC 改善 HLP 并 HUA 大鼠肾损伤的作用机制, 进一步寻找降 UA 安全有效的中药。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠 40 只, SPF 级, 体质量 (190 $\pm$ 20) g, 购于广东省医学实验动物中心, 合格证号

SCXK(粤)2013-0002。饲养于广东药科大学实验动物中心 SPF 级动物实验室,许可证号 SYXK(粤)2012-0125。

1.2 仪器

BX51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);1-15k 型冷冻离心机(美国 Sigma 公司);BMJ-A 型病理组织包埋冷冻台(常州市威电子仪器有限公司);RT-2100C 型自动酶标仪(德国上海创奕科教设备有限公司);CFX96TM 型实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)仪(美国伯乐公司)。

1.3 药品与试剂

TFMC,棕褐色粉末,由河北省邯郸市晨光生物科技集团股份有限公司按本课题组提供的提取工艺程序制备^[14];桑白皮药材由广州中医药大学李卫民教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮;阿拉伯树胶粉(天津市大茂化学试剂厂,批号 20160512);葡萄糖(Glu)、TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、HDL-C 试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司);UA、肌酐(CRE)、尿素氮(BUN)试剂盒(南京建成生物工程研究所);罗康全活力型血糖试纸(德国罗氏诊断有限公司);总 RNA Trizol 提取试剂盒、逆转录试剂盒、扩增试剂盒(日本 Takara 公司);大鼠白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、URAT1、有机阴离子转运体 1(OAT1)和 GAPDH 的引物自行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 饲料

高脂饲料配方:蛋白 20%、碳水化合物 20%、脂肪 60%,由广东省医学实验动物中心加工,基础饲料由广东药科大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 序列比对和同源建模

使用 Yong 等^[15]所建立的建模方法 Discovery Studio 2.5 的 CDOCKER 模块上来建立的 URAT1,通过对模板蛋白叠合确定结合口袋位点。本实验所有计算研究均在 Meastro 11.0 软件上完成。从 pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281671>, ID: 5281671) 获取桑辛素的三维分子结构,再通过 LigPre 模块应用 MMFFs 立场进行分子构象优化。URAT1 蛋白结构使用 OPLS_2005 以 0.3 nm 进行能量最小化处理。使用 Meastro 的 receptor grid generation 功能生成活性口袋。最后使用 Glide 模块进行精准模式(glide extra-precision)的柔性

对接。

2.2 分组、模型制备及给药

SD 大鼠适应性喂养 1 周,禁食不禁水 12 h,乙醚麻醉,眼眶取血,测定空腹血糖、TC、TG 作为基础血液指标。称定大鼠体质量,根据基础血液指标及体质量将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别为对照组、模型组、TFMC 组、苯溴马隆组。采用高脂饲料喂养加 ig 腺嘌呤和乙胺丁醇的方法制备 HLP 及 HUA 大鼠模型。造模 8 周后,大鼠禁食不禁水 12 h,乙醚麻醉,眼眶取血,测定各血液指标,对照组与模型组出现统计学差异,即为造模成功。对照组与模型组大鼠 ig 0.5%阿拉伯胶溶液(溶媒),TFMC 组和苯溴马隆组分别 ig TFMC 和苯溴马隆。每日 1 次,连续给药 16 周。根据《中国药典》2015 年版及课题组前期研究^[16],按临床生药量计,以人体质量(60 kg)折算大鼠的临床等效剂量分别为 TFMC 1.0 g/kg,苯溴马隆 6.25 mg/kg,对照组和模型组溶媒为 10 mL/kg。

2.3 样本采集与指标检测

于给药 16 周时,进行口服葡萄糖耐量实验(OGTT)。于大鼠尾尖取血,滴于 pH 试纸,用血计进行测定,分别于口服前及口服后 20、60、90、120 min 读数。

大鼠末次给药禁食不禁水 12 h,经腹主动脉取血约 5 mL,分离血清,保存于-80 °C 冰箱中,待检测血清中 Glu、TC、TG、LDL-C、HDL-C、UA、CRE、BUN 水平,分离大鼠肾脏,称取肾脏质量并记录,计算大鼠肾脏指数。无酶冻存管装肾脏保存备用,按试剂说明书提取肾脏组织总 RNA,另取部分肾脏用于苏木素-伊红(HE)染色使用。

肾脏指数=肾脏质量/体质量

2.4 qRT-PCR 检测大鼠肾组织 IL-6、TNF- α 、URAT1、OAT1 mRNA 表达

用 Trizol 提取肾脏组织总 RNA,微量紫外分光光度计测定其浓度及纯度,逆转录 cDNA。所用引物分别为 GAPDH:上游 5'-TGATTCTACCCACGG-CAAGT-3',下游 5'-AGCATCACCCCATTTGATGT-3',其扩增产物长度为 92 bp;IL-6:上游 5'-AA-GCCAGAGTCATTTCAGAGCAATACTG-3',下游 5'-GATGAGTTGGATGGTCTTGGTCCTTAG-3',其扩增产物长度为 167 bp;TNF- α :上游 5'-TC-CAGAACTCCAGGCGGTGTC-3',下游 5'-GTTCA-GTAGACAGAAGAGCGTGGTG-3',其扩增产物长

度为 86 bp; URAT1: 上游 5'-GCTGCTGCCTGAGA-CCAAGAAC-3', 下游 5'-GCCGCCTGCTATGTCATGTGTC-3', 其扩增产物长度为 97 bp; OAT1: 上游 5'-GGCATCTGCATCCTGGTGAATGG-3', 下游 5'-GCCTGTCTGCCGAATCACTGTG-3', 其扩增产物长度为 156 bp。反应体系为 cDNA 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L, SYBR[®] Premix ExTaqII (Tli RNaseH Plus) 12.5 μ L, 无 RNase 水 8.5 μ L; 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 54.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 39 次循环, 最后 72 $^{\circ}$ C、10 min 终止反应。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因进行相对定量分析。

2.5 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件对结果进行分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析检验 (One-Way ANOVA)。若方差齐, 用 LSD-*t* test 法; 若方差不齐, 用 Bonferroni's T3 test 法。

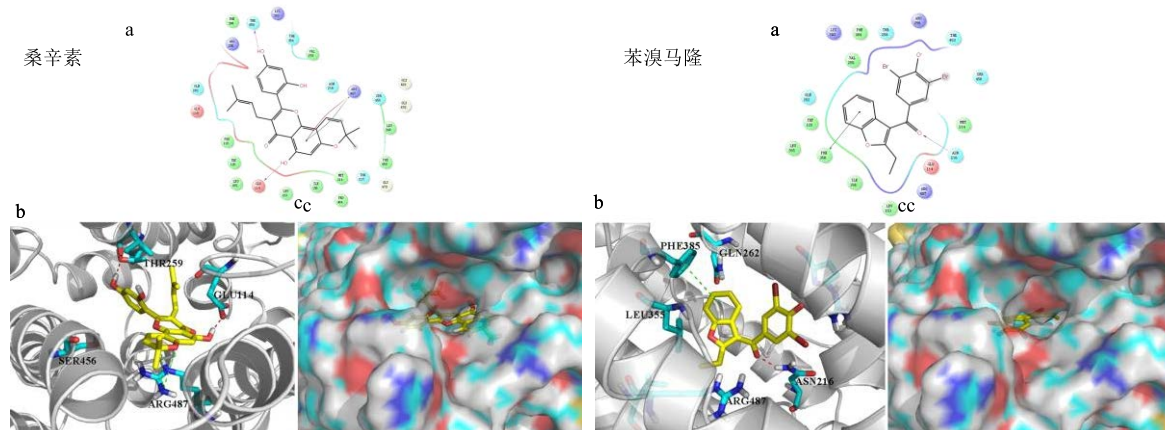


图 1 桑辛素、苯溴马隆与 URAT1 在活性口袋位点上结合的 2D (a) 和 3D (b、c) 模式图

Fig. 1 2D (a) and 3D (b, c) binding modes of morusin and benzbromarone bound to URAT1

3.2 对 HLP 并 HUA 大鼠一般情况的影响

对照组大鼠毛色光滑, 活泼好动。模型组大鼠造模期间增长速度较对照组快, 毛色粗糙, 光泽晦暗, 精神较萎靡, 饮水量增加, 排尿量增加。各给药组大鼠体质量增长缓慢, 大便稀松。

3.3 对 HLP 并 HUA 大鼠肾脏指数的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肾脏指数增大 ($P < 0.05$), 提示 HLP 并 HUA 大鼠模型出现“大白肾”, 即肾脏变大, 呈现花斑样, 髓质辐射线出现白色斑点, 说明模型组大鼠的肾脏受到损伤。各给药组大鼠肾脏白色斑点减小。见表 2。

3.4 对 HLP 并 HUA 大鼠各血液指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 Glu、TC、

3 结果

3.1 分子对接结果

对接打分结果如表 1 所示, Docking Score、XP Gscore 和 Glide Emodel 打分均表现出桑辛素对 URAT1 的抑制作用优于苯溴马隆。桑辛素-URAT1 的结合构象如图 1 所示, 桑辛素酚羟基和黄酮羟基分别和 URAT1 上的 GLU114 和 THR512 的氧原子结合各形成氢键, 其芳香环与 ARG487 形成 2 个 Pi-Pi 共轭键。苯溴马隆与 URAT1 对接结果 (图 1) 表明, 苯溴马隆的羰基氧能与 ASN216 产生氢键结合, 其咪唑环和 PHE385 形成 Pi-Pi 共轭。

表 1 桑辛素和苯溴马隆与 URAT1 的对接得分

Table 1 Docking results of morusin and benzbromarone bound to URAT1

配体小分子	Docking Score	XP Gscore	Glide Emodel
桑辛素	-5.845	-5.845	-69.576
苯溴马隆	-4.756	-4.761	-51.841

表 2 TFMC 对 HLP 并 HUA 大鼠肾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of TFMC on kidney hypertrophy index of rats with hyperlipidemia and hyperuricemia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肾脏指数
对照	—	3.34 $\pm$ 0.31
模型	—	4.44 $\pm$ 0.63*
TFMC	1.0	3.81 $\pm$ 0.35
苯溴马隆	0.006 25	3.68 $\pm$ 0.20 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

TG、LDL-C、UA、CRE、BUN 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), HDL-C 水平降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TFMC 可降低大鼠血清中 Glu、TC、

TG、LDL-C、UA、CRE、BUN 水平 ($P<0.05$ 、 0.01)，升高 HDL-C 水平 ($P<0.05$)。见表 3。

3.5 对 HLP 并 HUA 大鼠 OGTT 的影响

与对照组比较，模型组大鼠空腹血糖及 ig Glu 后 20、60、90、120 min 时血糖均显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，TFMC 组在 60、90 min 时降糖作用显著 ($P<0.05$)。见表 4。

3.6 对 HLP 并 HUA 大鼠肾脏组织形态的影响

显微镜下观察，与对照组比较，模型组大鼠肾小管扩张，可见蛋白管型，肾小管上皮细胞坏死，肾间质炎性细胞浸润伴间质纤维化。与模型组比较，TFMC 组大鼠肾皮质部分肾小管上皮细胞轻微肿胀，核未见溶解，周围未见炎性细胞浸润，肾小球

结构清晰未见明显病理改变，肾脏损伤减轻。苯溴马隆组大鼠肾皮、髓质结构清晰，肾小球未见增生或萎缩，肾小球毛细血管未见坏死，管壁未见增厚，肾小管上皮细胞未见肿胀、变性坏死，管腔中未见管型，肾间质未见炎性细胞浸润。见图 4。

3.7 对 HLP 并 HUA 大鼠肾组织 IL-6、TNF- α 、URAT1、OAT1 mRNA 表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠肾组织 IL-6、TNF- α 、URAT1 mRNA 表达显著上调 ($P<0.05$ 、 0.01)，OAT1 表达显著下调 ($P<0.05$)。与模型组比较，TFMC 组和苯溴马隆组大鼠肾组织 IL-6、TNF- α 、GLUT9 mRNA 表达均下调 ($P<0.05$ 、 0.01)，OAT1 表达上调 ($P<0.05$)。见表 5。

表 3 TFMC 对 HLP 并 HUA 大鼠血清各指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of TFMC on serum indexes of rats with hyperlipidemia and hyperuricemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Glu/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	5.82±0.59	1.85±0.41	0.59±0.07	0.53±0.09
模型	—	8.28±0.28**	2.69±0.79*	0.96±0.08**	0.81±0.06*
TFMC	1.0	6.82±0.56 [#]	2.07±0.52 [#]	0.72±0.07 [#]	0.46±0.11 [#]
苯溴马隆	0.006 25	6.09±0.67 [#]	1.95±0.58 [#]	0.61±0.05 [#]	0.50±0.09 [#]

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	UA/(μmol·L ⁻¹)	CRE/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.56±0.52	95.56±0.98	34.56±1.05	5.87±1.20
模型	—	0.65±0.48**	130.90±0.72*	39.22±0.90*	9.10±0.63**
TFMC	1.0	1.26±1.09 [#]	118.46±0.93 [#]	35.09±0.82 ^{##}	6.74±0.83 [#]
苯溴马隆	0.006 25	1.49±0.86 ^{##}	107.90±0.82 [#]	34.68±1.06 ^{##}	6.08±0.47 [#]

与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与模型组比较：[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ，下同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group, same as below

表 4 TFMC 对 HLP 并 HUA 大鼠 OGTT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of TFMC on OGTT in hyperlipidemia and hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)				
		空腹	20 min	60 min	90 min	120 min
对照	—	4.24±0.32	6.50±0.29	5.52±0.50	5.21±1.28	4.46±0.35
模型	—	5.08±0.34*	8.34±1.05*	9.68±0.39*	7.15±0.75*	5.87±0.59*
TFMC	1.0	4.73±0.33 [#]	7.05±1.26	6.65±0.39 [#]	5.95±0.85 [#]	5.30±0.54
苯溴马隆	0.006 25	4.55±0.30 [#]	6.53±1.22 [#]	5.88±0.83 [#]	5.75±0.28 [#]	4.74±0.73 [#]

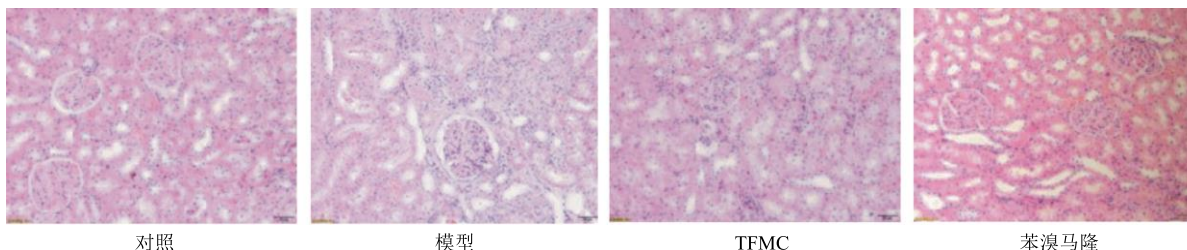


图 4 TFMC 对 HLP 并 HUA 肾脏组织形态改变的影响 ($\times 200$, HE)

Fig. 4 Effect of TFMC on renal histomorphology in hyperlipidemia and hyperuricemia rats ($\times 200$, HE)

表 5 TFMC 对 HLP 并 HUA 大鼠肾组织 IL-6、TNF- α 、URAT1、OAT1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Effect of TFMC on expression of IL-6, TNF- α , URAT1, OAT1 mRNA in kidney of rats with hyperlipidemia and hyperuricemia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量			
		IL-6	TNF- α	URAT1	OAT1
对照	—	0.52 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.09	0.14 $\pm$ 0.08	0.63 $\pm$ 0.11
模型	—	0.76 $\pm$ 0.06*	1.34 $\pm$ 0.30*	0.52 $\pm$ 0.17**	0.38 $\pm$ 0.07*
TFMC	1.0	0.66 $\pm$ 0.02 [#]	0.40 $\pm$ 0.08 [#]	0.21 $\pm$ 0.04 [#]	0.49 $\pm$ 0.12 [#]
苯溴马隆	0.006 25	0.59 $\pm$ 0.01 [#]	0.39 $\pm$ 0.09 ^{##}	0.15 $\pm$ 0.02 ^{##}	0.52 $\pm$ 0.14 [#]

4 讨论

HLP 并 HUA 是临床常见疾病, 临床表现以血 UA 含量升高、痛风等为主^[17]。体内 UA 过高导致肾脏内尿酸盐微结晶沉积, 引起间质炎症反应, 肾间质和肾小管内出现尿酸盐沉积, 引起肾病疾病的发生^[18]。

URAT1 是近年来发现的 HUA 和痛风治疗的新靶点, 位于肾脏的近曲小管上, 负责肾脏中大部分 (约 90%) UA 的重吸收^[19]。URAT1 是促 UA 排泄药物作用的靶点, 而苯溴马隆是 URAT1 的特异性底物, 因此将其选为阳性对照药。本实验利用分子对接技术, 将 TFMC 主要成分桑辛素和苯溴马隆分别与 URAT1 进行分子对接打分, 结果显示桑辛素打分较高, 提示其可能是 TFMC 中改善 HLP 并 HUA 相关肾病的主要活性成分, 并且桑辛素对 URAT1 的抑制作用优于苯溴马隆。根据分子对接结果, 进一步结合体内实验探讨其降 UA 机制。

本实验采用高脂饲料联合 ig 腺嘌呤加乙胺丁醇的方法诱导 HUA 并 HLP 模型大鼠^[20]。与对照组比较, 模型组大鼠血糖、血脂及血 UA 明显升高, HE 染色显示肾脏病变严重。TFMC 能降低大鼠血糖、血脂及血 UA 水平, HE 染色显示肾脏病变程度减轻, 进一步提示其具有改善肾脏炎症的作用。通过对分子水平的研究, 发现 TFMC 可下调 URAT1、IL-6 和 TNF- α 的表达, 上调 OAT1 的表达。人体内 UA 为嘌呤代谢物, 约 2/3 经肾脏滤过和重吸收, UA 过多时沉积在肾小管间质等部位, 引起炎症反应, 造成肾损害, 引起 IL-6、TNF- α 等含量的升高^[21]。肾小管上皮细胞存在多种 UA 转运蛋白, 这些 UA 转运蛋白的基因缺陷造成了嘌呤代谢的紊乱, 进而影响了 UA 排泄平衡。URAT1 是促 UA 排泄药物作用的靶点, OAT1 为有机阴离子转运体, 编码基因为 SLC22A6, 存在于近曲小管的基底膜,

能促进 UA 的排泄^[22]。TFMC 对 HLP 并 HUA 大鼠肾的保护作用可能与其促进 UA 排泄及降低炎症因子有关。

目前降 UA 的药物主要有 2 类, 一类是抑制 UA 形成, 主要有别嘌醇等, 但易引起皮疹、红斑等不良反应; 另一类药物是促进 UA 排泄, 如苯溴马隆等, 但易造成肾衰竭等不良反应, 对于尿酸盐结晶所造成的炎症因子没有拮抗作用^[23]。探索具有降 UA 和抑制炎症因子双重作用的中药对于治疗 HUA 肾病有重要意义。本研究基于中医药基础理论, 结合现代分子生物学技术, 辅助分子对接技术, 在前期对 TFMC 各成分含量分析及活性研究的基础上, 通过大鼠体内实验, 发现 TFMC 在调脂的同时, 能降低大鼠体内 UA 含量, 并能改善肾脏炎症反应。为临床用药提供了理论基础, 扩大了临床用药选择性。同时, HUA 与血脂代谢密切相关的机制至今尚未完全明了, 有待进一步研究。对于 TFMC 中其他成分降 UA 的机制也有待进一步研究。

参考文献

- [1] Shih M H, Lazo M, Liu S H, *et al.* Association between serum uric acid and nonalcoholic fatty liver disease in the US population [J]. *J Formos Med Assoc*, 2015, 114(4): 314-320.
- [2] Liu H, Zhang X M, Wang Y L, *et al.* Prevalence of hyperuricemia among Chinese adults: A national cross-sectional survey using multistage, stratified sampling [J]. *J Nephrol*, 2014, 27(6): 653-658.
- [3] 王 辉, 董万利, 方 琪, 等. 高尿酸血症合并高脂血症患者血小板活化功能的研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2014, 31(7): 633-635.
- [4] 刘晓玲. 高脂血症合并高尿酸血症与冠心病的相关性研究 [J]. *河北医药*, 2016, 38(22): 3437-3439.
- [5] 王 天, 孙维峰. 复方土茯苓颗粒对高尿酸血症肾病模型小鼠肾功能及 IL-1 β , IL-6 表达的影响 [J]. *中国实*

- 验方剂学杂志, 2012, 18(16): 191-194.
- [6] 吴卫刚, 毛培江, 杨毅, 等. 地榆对高尿酸血症肾病肾损害大鼠的保护作用 [J]. 浙江中医药杂志, 2014, 49(5): 323-324.
- [7] 郭文刚. 中西药联合治疗 IgA 肾病伴高尿酸血症疗效及对 TNF- α 、TGF- β 1 的影响 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(22): 25-27.
- [8] 苏新堯, 姜春丽, 许亚春, 等. 酶解桑白皮药渣产糖能力探究及优化 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(1): 86-91.
- [9] Kanis J A, Mc Closkey E V, Johansson H, *et al.* European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women [J]. *Osteoporosis Int*, 2013, 24(1): 23-57.
- [10] 杨茗, 季晖, 张树平, 等. 知母皂苷元对成骨细胞活性和破骨细胞分化及功能的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(6): 544-548.
- [11] Fischer E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme [J]. *Eur J Inorg Chem*, 2010, 27(3): 2985-2993..
- [12] 丁嘉华, 冯毅凡, 李卫民, 等. UPLC-Q-TOF-MS 对桑白皮总黄酮提取物的快速分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 78-84.
- [13] 秦阳, 高颖, 高英, 等. 桑白皮黄酮提取物对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病血管生成相关基因的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 144-148.
- [14] 齐翠翠. 桑白皮异戊烯基黄酮工艺、质控及药效初探 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [15] Yong T, Zhang D, Chen O, *et al.* Actions of water extract from *Cordyceps militaris* in hyperuricemic mice induced by potassium oxonate combined with hypoxanthine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194(24): 403-411.
- [16] 高颖, 高英, 李艳, 等. 桑白皮黄酮提取物对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 6(1): 831-835.
- [17] 孟平平, 申黎艳, 李慧, 等. 高尿酸血症并高脂血症病人颈动脉内膜中层厚度检测 [J]. 青岛大学医学院学报, 2018, 53(5): 537-540.
- [18] 蔡伟程, 韩蜀莲, 郭晓丹, 等. IgA 肾病合并高尿酸血症患者的临床病理分析 [J]. 临床肾脏病杂志, 2016, 16(3): 152-156.
- [19] Nakanishi T, Ohya K, Shimada S, *et al.* Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATv1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 24(1): 603-611.
- [20] 吕耀中, 胡庆华, 王星, 等. 二妙丸水提取物对高尿酸血症小鼠尿酸失衡及其相关基因和蛋白水平的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 418-423.
- [21] 安玉芳, 李义, 王浩, 等. 痛风汤对高尿酸血症模型大鼠肾脏功能的影响 [J]. 中国中医药科技, 2018, 25(1): 28-29.
- [22] Nindita Y, Hamada T, Bahrudin U, *et al.* Effect of losartan and benzbromarone on the level of human urate transporter 1 mRNA [J]. *Arzneimittel Forsch*, 2010, 60(4): 186-188.
- [23] Shahid H, Singh J A. Investigational drugs for hyperuricemia [J]. *Expert Opin Inv Drug*, 2015, 24(8): 1013-1030.