

黄葵四物方对尿毒素分子硫酸对甲酚在宿主细胞内代谢通路及转运环节的影响

陆静波^{1,2}, 王颖异^{1,2}, 彭 印^{1,2}, 徐雪君^{1,2}, 陈晨凯^{1,2}, 段金庵^{1,2}, 郭建明^{1,2*}

1. 南京中医药大学 江苏省方剂高技术重点实验室, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 探讨黄葵四物方对尿毒素分子硫酸对甲酚(*p*-cresyl sulfate, PCS)在宿主细胞内的代谢通路及转运环节的影响,并初步探讨其作用机制。方法 采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱仪(ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole/mass spectrometry, UPLC-TQ/MS)检测黄葵四物方干预后血浆及脏器内 PCS 水平的变化。采用酶活法检测肝脏内 PCS 合成酶磺基转移酶的活力。采用 qRT-PCR 及 Western blotting 检测结肠和肝脏中磺基转移酶及肾脏中有机阴离子转运体的基因转录和蛋白表达水平。结果 黄葵四物方可降低动物血浆或肝脏中 PCS 水平。黄葵四物方显著下调肝脏内磺基转移酶基因转录和蛋白表达水平($P < 0.05$),抑制肝脏中对甲酚向 PCS 转化,从而抑制宿主体内尿毒素分子 PCS 的合成。黄葵四物方不影响肾脏中有机阴离子转运体的基因转录和蛋白表达水平,不影响 PCS 由血液向肾脏中的转运过程。结论 黄葵四物方可通过调控宿主细胞内 PCS 的合成途径,抑制 PCS 体内合成,减少尿毒素蓄积,从而延缓慢性肾病进程。

关键词: 慢性肾病; 尿毒素; 硫酸对甲酚; 黄葵四物方; 磺基转移酶; 有机阴离子转运体

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)01-0176-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.021

Effect of Huangkui Siwu Formula on metabolism and transportation pathway of urotoxin *p*-cresyl sulfate *in vivo*

LU Jing-bo^{1,2}, WANG Ying-yi^{1,2}, PENG Yin^{1,2}, XU Xue-jun^{1,2}, CHEN Chen-kai^{1,2}, DUAN Jin-ao^{1,2}, GUO Jian-ming^{1,2}

1. Jiangsu Key Laboratory of High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of action of Huangkui Siwu Formula (HKSWF, 黄葵四物方) on synthesis and transport pathways of urotoxin *p*-cresyl sulfate (PCS) *in vivo*. **Methods** The concentration of PCS in plasma and organs interfered by HKSWF were determined by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole/mass spectrometry (UPLC-TQ/MS). Enzyme activity method was used to detect the activity of sulfotransferase1a1 (SULT1A1). The gene transcription and protein expression of SULT1A1, organic anion transporter 1 (OAT1), and organic anion transporter 3 (OAT3) were tested by qRT-PCR and Western blotting. **Results** HKSWF could inhibit the conversion of *p*-cresol to PCS in the liver by significantly down-regulating SULT1A1 gene transcription and protein expression levels ($P < 0.05$), thereby interfering the synthesis of PCS in the host cell. The gene transcription and protein expression levels of organic anion transporters in the kidney were not affected by HKSWF, and HKSWF did not affect the transportation of PCS into the kidney. **Conclusion** HKSWF can inhibit the formation of harmful urotoxin PCS by modulating the synthesis pathway of PCS *in vivo* and thereby delaying chronic kidney disease (CKD) progression.

Key words: chronic kidney disease; uremic toxins; *p*-cresyl sulfate; Huangkui Siwu Formula; sulfotransferase; organic anion transporter

收稿日期: 2020-05-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81773983); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX19_1315)

作者简介: 陆静波(1995—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 15951878507@163.com

*通信作者: 郭建明(1979—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药理学。E-mail: njguo@njucm.edu.cn

慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 是一个世界性的公共卫生问题, 全球发病率约为 10%, 其中 20%~30% 的患者将会发展为终末期肾病, 造成巨大的社会和经济负担^[1-2]。全球疾病负担研究表明, 预计到 2040 年, CKD 将成为导致人类死亡的第 5 大原因^[3]。随着 CKD 进展, 肾功能不断衰竭, 体内代谢产生的氮质废物不能及时排出体外, 在体内不断堆积形成的对机体有毒性的物质称作尿毒素。按照相对分子质量及物理化学特性, 可以将尿毒素分为小分子质量尿毒素 (如肌酐/尿素氮) 和中分子质量尿毒素 (如甲状旁腺素) 和蛋白结合型尿毒素^[4]。其中, 蛋白结合型尿毒素因与血浆蛋白结合率高而命名, 其相对分子质量大, 临床透析治疗不能将其去除, 在终末期肾病患者体内大量堆积, 极大地降低了 CKD 患者的生活质量和存活率^[5]。

硫酸对甲酚 (*p*-cresol sulfate, PCS) 是蛋白结合率高达 95% 的蛋白结合型尿毒素, 终末期肾病患者体内 PCS 含量超出正常人 10 倍^[6]。过量的 PCS 在 CKD 患者体内蓄积, 进一步加剧肾脏和心血管的损伤, 加快 CKD 的进展。PCS 具有肾毒性, 可诱导肾脏纤维化, 加剧肾脏炎症反应^[7], 诱导肾小管细胞及肾小管近端细胞的凋亡, 增加 CKD 患者的发病率和死亡率^[8]。在心血管系统, PCS 可刺激血管内皮微粒子释放, 诱导血管内皮细胞损伤, 同时, 可诱导内皮细胞和血管平滑肌细胞的氧化应激, 加剧 CKD 患者的血管损伤^[9]。

中药被认为是一种成本低、效益高的治疗手段, 几十年来, 中药治疗慢性重大疾病的有效性和安全性研究取得了很大的进展, 越来越多的患者受益于中药。本课题组在临床治疗 CKD 药物黄葵胶囊的基础上, 进一步优化得到中药复方黄葵四物方。该复方是由黄葵、黄芪、虎杖和姜黄 4 味中药配伍而成。组方具有清利活血、通淋消肿、补泻同施、标本兼顾之功。本课题组前期研究发现, 黄葵四物方可显著减轻 CKD 模型大鼠的肾脏炎症及纤维化水平; 显著抑制 CKD 模型大鼠血浆、肝脏和肾脏中尿毒素分子 PCS 的蓄积^[10], 提示黄葵四物方保护 CKD 的作用可能与其抑制体内 PCS 蓄积相关。

PCS 在宿主体内合成及转运过程主要包括 2 个环节。PCS 的合成环节: 食物中的酪氨酸被肠道菌群分解产生对甲酚, 对甲酚可在结肠和肝脏内被磺基转移酶 (sulfotransferase1a1, SULT1A1) 代谢合成 PCS; PCS 的转运环节: 血浆中的 PCS 经由肾脏

阴离子转运体 (organic anion transporter, OAT) 转运进入肾脏细胞并最终通过尿液排泄^[8]。最新研究表明, 中药通过干预肠道菌群可有效改善 CKD、心血管疾病等多种慢性疾病^[11-14]。本课题组前期研究发现黄葵四物方可作用于肠道菌群, 调控肠道菌群中 PCS 前体分子对甲酚的合成途径, 抑制肠道菌群中对甲酚的合成。然而, 黄葵四物方是否影响 PCS 在宿主细胞中的合成环节以及向肾脏内的转运环节尚不清楚。因此, 本研究进一步探究黄葵四物方对尿毒素 PCS 在宿主细胞内的合成及转运环节的影响。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ChemiDocXRS 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司); 7500 Real Time PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用 (Ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole/mass spectrometry, UPLC-TQ/MS) 和高效液相色谱-紫外-荧光检测器 (high performance liquid chromatography-ultraviolet/fluorescence detector, HPLC-UV-FLD) 均购自美国 Waters 公司; Microcl 21R 常温低速离心机 (Thermo 公司)。

1.2 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 体质量 18~25 g 和 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 180~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (北京) 2015-0001, 动物合格号: NO.201807103。动物饲养在室温 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 光照约 12 h 明暗交替的屏障环境动物房。每日提供符合标准的动物饲料及饮用水, 供动物自由摄食和饮水。动物研究遵循南京中医药大学动物伦理委员会的指导方针 (伦理审核号 201805A002)。

1.3 药物及试剂

黄葵 (批号 180901)、黄芪 (批号 180401)、虎杖 (批号 180501)、姜黄 (批号 180201) 均购于安徽省万生中药饮片有限公司, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定, 符合《中国药典》规定, 均为正品。对甲酚 (批号 BCBP6678V)、PCS (批号 3233-58-7) 和腺苷-3'-磷酸-5'-磷酸硫酸锂盐合物 (adenosine-3'-phosphate-5'-phosphate lithium phosphate, PAPS, 批号 101154-201001) 均购于美国 Sigma-Aldrich 公司。氯霉素 (批号 F1805109)、苯巴比妥

钠(批号 2015062)购于中国材料研究中心。生理盐水购于山东齐都药业有限公司。Trizol 试剂和引物购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 和 TransStart Top Green qPCR SuperMix 购于北京全式金生物技术有限公司。抗体购于美国 Proteintech 公司。质谱级乙腈购于德国 Merck 公司。质谱级甲酸购于天津科密欧有限公司。

2 方法

2.1 黄葵四物方溶液的制备

称取适量黄葵、黄芪、虎杖、姜黄粉末,按照 3.5:5:1.5:1 的比例混匀,60%乙醇提取 3 次,每次 1.5 h,提取液合并进行浓缩,浓缩后生药量 2 g/mL,其中主要药效成分质量分数分别为毛蕊异黄酮苷 0.35 mg/g、虎杖苷 2.54 mg/g、金丝桃苷 3.90

mg/g、异槲皮苷 2.56 mg/g、槲皮苷 0.29 mg/g、杨梅素 0.85 mg/g、白藜芦醇 13.42 mg/g、毛蕊异黄酮 0.22 mg/g、槲皮素 0.06 mg/g、姜黄素 1.25 mg/g、大黄素 0.54 mg/g。

2.2 PCS 的 UHPLC-TQ/MS 分析

2.2.1 色谱条件 采用 Acquity UHPLC™ 系统、Acquity UHPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)进行色谱分析。流动相为 0.1%甲酸水(A)和乙腈(B),具体色谱参数见表 1。

2.2.2 质谱条件 采用 Xevo Triple Quadrupole Mass Spectrometer (TQ/MS)、选择性反应检测法进行质谱分析。检测参数:毛细管电压为 3.0 kV,离子源温度为 150 °C,脱溶剂温度为 550 °C,锥孔气流速度为 50 L/h,脱溶剂气体积流量为 1000 L/h。PCS 质谱检测条件见表 2。

表 1 UPLC-TQ/MS 检测 PCS 的色谱条件

Table 1 Chromatographic conditions for detection of PCS by UPLC-TQ/MS

时间/min	A/%	B/%	体积流量/(mL·min ⁻¹)	进样体积/μL	温度/°C	
					自动取样器	色谱柱
0	86	14	0.4	2	4	35
1	79	21	0.4	2	4	35
4	60	40	0.4	2	4	35
4.2	5	95	0.4	2	4	35
5	5	95	0.4	2	4	35
5.2	86	14	0.4	2	4	35
5.5	86	14	0.4	2	4	35

表 2 UPLC-TQ/MS 检测 PCS 的质谱条件

Table 2 Optimal detection conditions for PCS by UPLC-TQ/MS

化合物	离子模式	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞能/eV	保留时间/min
PCS	ESI ⁻	187.031 9	107.046 1	24	22	2.47
氯霉素	ESI ⁻	321.095 8	151.798 1	24	18	3.38

2.3 黄葵四物方对宿主体内 PCS 合成的影响

2.3.1 黄葵四物方对小鼠体内 PCS 含量的影响 将 10 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 2 组,分别为正常组和黄葵四物方组,每组 5 只。对照组小鼠 ig 无菌超纯水,黄葵四物方组小鼠 ig 黄葵四物方水溶液(2.5 g/kg^[10]),连续 ig 28 d。第 28 天,对照组和黄葵四物方组小鼠 ig 对甲酚(80 mg/kg),2 h 后进行眼眶取血。实验结束后,将小鼠用苯巴比妥钠(0.1 mL/10 g)麻醉,采集小鼠结肠和肝脏,脱颈椎处死小鼠。

将血液样品 4000 r/min 离心 10 min,离心后取上清即得血浆。称取脏器样品于 EP 管内,每克样

品加入 1 mL PBS 溶液,60 Hz,90 s 匀浆后,13 000 r/min 离心 10 min,取上清。所有样品以 10:1 比例加入 200 μg/mL 氯霉素作为内标物,再以 1:3 比例加入乙腈,充分混匀,13 000 r/min 离心 10 min,取上清至进样小瓶中,置于冰上。按照“2.2”项的方法测定 PCS 含量。

2.3.2 黄葵四物方对小鼠肝脏中 SULT1A1 活性的影响 实验分组和给药同“2.3.1”项。称取各组小鼠肝脏,按 1:4 (mg/L)的比例加缓冲溶液(将 5 mmol/L 的 MgCl₂·6H₂O 溶解在 100 mmol/L pH 7.4 的 Tris-HCl 中),2 颗钢珠,60 Hz、90 s 匀浆,4 °C,

13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液。将上清液在 37 °C 中孵育 3 min, 取 240 μ L 上清液加 10 μ L 250 mol/L PAPS (3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸, 底物, 为对甲酚提供硫酸基团, 促进对甲酚合成 PCS), 37 °C 孵育 0、5、30、60 min, 孵育完成后, 加 0.3 mL 甲醇终止反应。涡旋后离心 (12 000 r/min、10 min), 取上清液至进样小瓶。通过 HPLC-UV-FLD 分析上清液中 PCS 含量, 采用 C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, Alltima, 美国), 柱温为 35 °C, 进样时间为 5.5 min, 波长为 260~300 nm, 流动相为乙酸铵-乙腈 (75:25)。通过计算单位时间内 PCS 生成量反映小鼠肝脏中 SULT1A1 的酶活性。

2.3.3 黄葵四物方对小鼠结肠和肝脏中 SULT1A1 mRNA 和蛋白表达的影响 实验分组和给药同“2.3.1”。将小鼠结肠、肝脏组织置于 Trizol 试剂中进行研磨裂解, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清, 加入氯仿萃取静置分层, 12 000 $\times g$ 离心 15 min, 取最上层溶液, 加入异丙醇充分混匀, 静置, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 弃上层液体, 加入 75%乙醇涡旋, 7500 $\times g$ 离心 5 min, 取上清, 3 次, 弃去液体, 倒扣晾干, 加入 DEPC 水复溶 mRNA, 并按照逆转录试剂盒说明书获得互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。使用 PCR 基因扩增仪进行扩增。PCR 反应每个样品进行 3 次重复实验, PCR 扩增反应条件为 94 °C 预变性 30 s, 然后进入循环阶段, 每个循环包括 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 45 个循环。最终以目的基因与甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的含量比值表示目的基因的表达水平。使用的引物序列见表 3。扩增数据按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行数据处理。

将小鼠的结肠、肝脏组织用 RIPA 裂解液以及蛋白酶抑制剂 Cocktail 进行裂解, 蛋白浓度用 BCA 试剂盒 (Pierce Protein Biology, Rockford, IL, 美国) 进行检测。配制浓缩胶和 10% 的分离胶, 并加入相同蛋白含量的样品进行样品分离, 用 PVDF 膜转膜。5%牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 h, 封闭后用 SULT1A1 抗体 (1:1000) 稀释, 4 °C 过夜孵育, 然后用对应的二抗进行孵育, 曝光, 获得目的蛋白及内参蛋白 (α -tubulin) 的灰度值。

2.3.4 黄葵四物方对大鼠体内 PCS 合成环节的影响 将 15 只 SD 雄性大鼠随机分为 3 组, 分别为对照组、对甲酚组和黄葵四物方组, 每组 5 只。对照

表 3 大鼠和小鼠的靶基因引物

Table 3 Primers for target genes in mice and rats

基因	引物 (5'-3')
SULT1A1-小鼠	正向: AGGTGATCTACGTTGCCCGA 反向: CCATAGGACACTTTCCCATCC
OAT1-小鼠	正向: ATTCACACCCGTGCCTATGT 反向: AGCCTTCCAGAGGAGGAGTA
OAT1-大鼠	正向: TCAACTGCATGACACTAAATGTG 反向: AGCCTTCCTGAGGAGGAGTA
OAT3-小鼠	正向: TCCAACGTGTGGCTACCTTC 反向: GGCAAAGCCAGTAGCAAACC
OAT3-大鼠	正向: CAGCATCTCGGGCATTCTCTC 反向: TACCCACCAGGACAACAAGG
GAPDH-小鼠	正向: ATCATCTCCGCCCTTCTG 反向: GTGATGGCATGGACTGTGG
GAPDH-大鼠	正向: TGCCGCTGGAGAAACCTGC 反向: AGCAATGCCAGCCCCAGCAT

组大鼠每日上午 ig 生理盐水 1 次, 对甲酚组及黄葵四物方组大鼠每日上午 ig 对甲酚水溶液 (40 mg/kg) 1 次, 此外, 黄葵四物方组大鼠每日下午 ig 黄葵四物方水溶液 (1.25 g/kg^[10]) 1 次, 连续 ig 10 d。第 11 天, ig 对甲酚 5 min 后, 黄葵四物方组 ig 黄葵四物方, 1 h 后眼眶取血, 采集的血液置于含有 15 g/L EDTA 水溶液的 EP 管中。取血后, ip 2.0% 苯巴比妥钠溶液 (30 mg/kg) 麻醉大鼠。用 4 °C 的 PBS 作为灌流液灌注。实验结束后, 大鼠已经死亡。采集大鼠结肠、肝脏和肾脏。血液和脏器样品处理同“2.3.1”项, 按照“2.2”项的方法测定 PCS 含量。

2.4 黄葵四物方对宿主体内 PCS 转运的影响

2.4.1 黄葵四物方对小鼠体内 PCS 转运进入肾脏的影响 取 C57BL/6 雄性小鼠 9 只, 随机分为 2 组, 对照组为 4 只, 黄葵四物方组为 5 只。对照组每日 ig 生理盐水 1 次; 黄葵四物方组 ig 黄葵四物方水溶液 (2.5 g/kg), 连续 ig 28 d。第 28 天, 对照组和黄葵四物方组小鼠 ip PCS (20 mg/kg), 0.5 h 后眼眶取血。实验结束后, 用 2.0% 苯巴比妥钠 (0.1 mL/10 g) 麻醉小鼠, 采集小鼠肾脏, 脱颈椎处死小鼠。血液和脏器样品处理同“2.3.1”项, 按照“2.2”项的方法测定 PCS 含量。

2.4.2 黄葵四物方对小鼠肾脏中机阴离子转运体 OAT1/3 mRNA 和蛋白表达的影响 实验分组和给药同“2.4.1”项。取小鼠肾脏组织加入 2 颗钢珠并

用 Trizol 试剂进行研磨裂解, $12\,000\times g$ 离心 10 min, 取上清, 加入氯仿萃取静置分层, $12\,000\times g$ 离心 15 min, 取最上层溶液, 加入异丙醇充分混匀, 静置, $12\,000\times g$ 离心 10 min, 弃上层液体, 加入 75%乙醇涡旋, $7500\times g$ 离心 5 min, 取上清, 3 次, 弃去液体, 倒扣晾干, 加入 DEPC 水复溶 RNA, 仪器检测。并按照逆转录试剂盒说明书转录得到互补的 cDNA, 最终使用 PCR 基因扩增仪进行扩增。PCR 反应每个样品进行 3 次重复实验, PCR 扩增反应条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 然后进入循环阶段, 每个循环包括 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 45 个循环。最后以目的基因与 GAPDH 的含量比值表示目的基因的表达水平。使用的引物序列见表 3。扩增数据按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行数据处理。

将小鼠的肾脏组织用 RIPA 裂解液以及蛋白酶抑制剂 Cocktail 进行裂解, 蛋白浓度用 BCA 试剂盒进行检测。配制浓缩胶和 10% 的分离胶, 并加入相同蛋白含量的样品进行样品分离, 用 PVDF 膜转膜。5% 的牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 h, 封闭后用 OAT1、OAT3 抗体 (1:1000) 稀释, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, 然后用相应的二抗进行孵育, 曝光, 获得目的蛋白及内参蛋白 GAPDH 的灰度值。

2.4.3 黄葵四物方对大鼠体内 PCS 转运进入肾脏的影响 取 SD 雄性大鼠 16 只, 随机分为 2 组, 分别为正常组和黄葵四物方组, 每组 8 只。对照组 ig 生理盐水, 黄葵四物方组 ig 黄葵四物方 (1.25 g/kg), 连续 ig 28 d。第 28 天, 对照组和黄葵四物方组大鼠 ip PCS (10 mg/kg), 0.5 h 后眼眶取血; 取血后, ip 2.0% 苯巴比妥钠溶液 (30 mg/kg) 麻醉大鼠, 在 ip PCS 1 h 后, 对大鼠进行腹主动脉取血, 后用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 作为灌流液灌注。实验结束后, 大鼠已经死亡, 采集大鼠肾脏。血液和脏器样品处理同“2.3.1”, 按照“2.2”项的方法测定 PCS 含量。对大鼠肾脏中机阴离子转运体 OAT1/3 mRNA 和蛋白表达量的测定同“2.4.2”项方法。

2.4.4 黄葵四物方对 CKD 模型大鼠肾脏中 OAT1 和 OAT3 mRNA 表达的影响 将 18 只 SD 雄性大鼠随机分为 2 组, 模型组和黄葵四物方组各 9 只。制备 CKD 模型: 两组大鼠每日 ig 腺嘌呤溶液 (200 mg/kg), 连续 ig 2 周。造模结束后, 各组大鼠静养 1 周。1 周后开始给药, 模型组每日 ig 超纯水, 黄葵四物方组每日 ig 黄葵四物方 (1.25 g/kg), 连续 ig 56 d。实验结束后, 用 2.0% 苯巴比妥钠溶液 (30 mg/kg) 麻醉大鼠, 用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 作为灌流液灌注。

实验结束后, 大鼠已经死亡。采集大鼠肾脏。大鼠肾脏中机阴离子转运体 OAT1 和 OAT3 mRNA 表达量的测定同“2.4.2”项方法。

2.5 统计学方法

采用 GraphPad Prism version 7.0 软件进行数据统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n \geq 3$)。采用 Nonparametric Mann-Whitney Test 进行组间差异性分析。

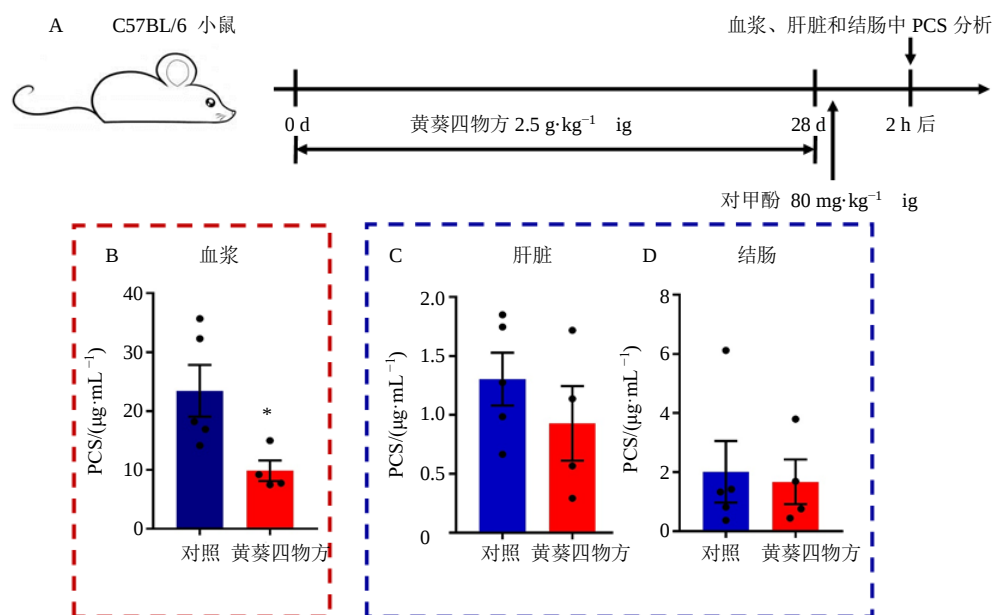
3 结果

3.1 黄葵四物方对宿主细胞内 PCS 合成的影响

本课题组前期研究发现黄葵四物方可降低慢性肾病模型大鼠血浆、肝脏及肾脏中 PCS 的含量, 但尚不明确黄葵四物方是干预了 PCS 的合成环节和/或抑制 PCS 向肾脏内的转运环节, 从而抑制宿主体内 PCS 蓄积。因此, 本研究首先针对结肠和肝脏内 PCS 的合成环节, 探讨黄葵四物方对宿主细胞内 PCS 合成的影响。

对甲酚 ig 给予小鼠后可被肠黏膜和肝脏中 SULT1A1 代谢生成 PCS, 小鼠血浆及肾脏内 PCS 水平也相应增加^[4], 可进一步观察黄葵四物方对 PCS 合成环节的影响。黄葵四物方预给药 28 d 后, 各组小鼠 ig 对甲酚 2 h 后, 利用 UPLC-TQ/MS 检测小鼠血浆、结肠及肝脏内 PCS 含量 (图 1-A)。结果发现, 与对照组相比, 黄葵四物方可显著降低小鼠血浆中 PCS 的含量 (图 1-B), 表明黄葵四物方可干预对甲酚向 PCS 转化的过程。结肠和肝脏是对甲酚向 PCS 转化的关键部位, 检测结肠和肝脏中 PCS 含量, 结果发现, 黄葵四物方对肝脏中 PCS 的蓄积具有一定的抑制趋势 (图 1-C), 不影响肠道中 PCS 蓄积 (图 1-D), 以上结果提示黄葵四物方可能通过干预小鼠肝脏中 PCS 的合成, 从而减少宿主体内 PCS 蓄积。

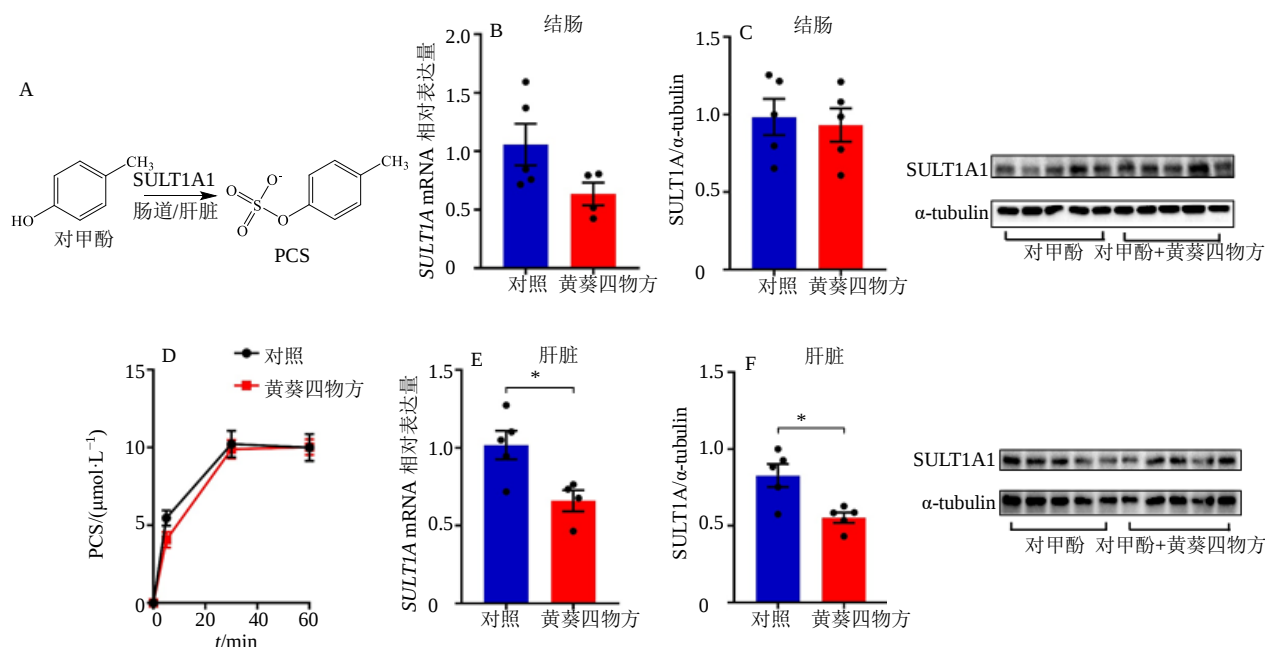
文献报道 PCS 主要由肠黏膜和肝脏内 SULT1A1 代谢对甲酚生成^[4]。因此, 本研究进一步分析黄葵四物方对肠道和肝脏中 SULT1A1 的影响 (图 2-A)。利用 Western blotting 和 PCR 方法检测结肠和肝脏中 SULT1A1 基因和蛋白的表达水平, 结果发现, 与对照组相比, 黄葵四物方对结肠内 SULT1A1 基因的表达水平存在抑制趋势 (图 2-B), 但不影响其蛋白水平的表达 (图 2-C), 提示黄葵四物方可能不影响肠道内对甲酚向 PCS 转化过程。黄葵四物方可显著抑制肝脏内 SULT1A1 基因和蛋白的表达水平 (图 2-E、F); 此外, 酶活力检测结果发现, 黄葵四物方不影响肝脏内 SULT1A1 的酶活力 (图 2-D)。以上结果表明, 黄葵四物方抑制小鼠体内 PCS 蓄积可能与调控肝脏内 SULT1A1 水平有关。



A-C57BL/6 小鼠实验设计方案 B~D-黄葵四物方 ig 28 d 后小鼠血浆、肝脏和结肠内 PCS 含量变化 与对照组较: **P*<0.05

A-scheme of C57BL/6 mice experimental design B—D-PCS concentration in mice after ig with HKSWF for 28 d in plasma, liver and colon
**P* < 0.05 vs control group

图 1 黄葵四物方对小鼠体内 PCS 蓄积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 1 Effect of Huangkui Siwu Formula on accumulation of PCS in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



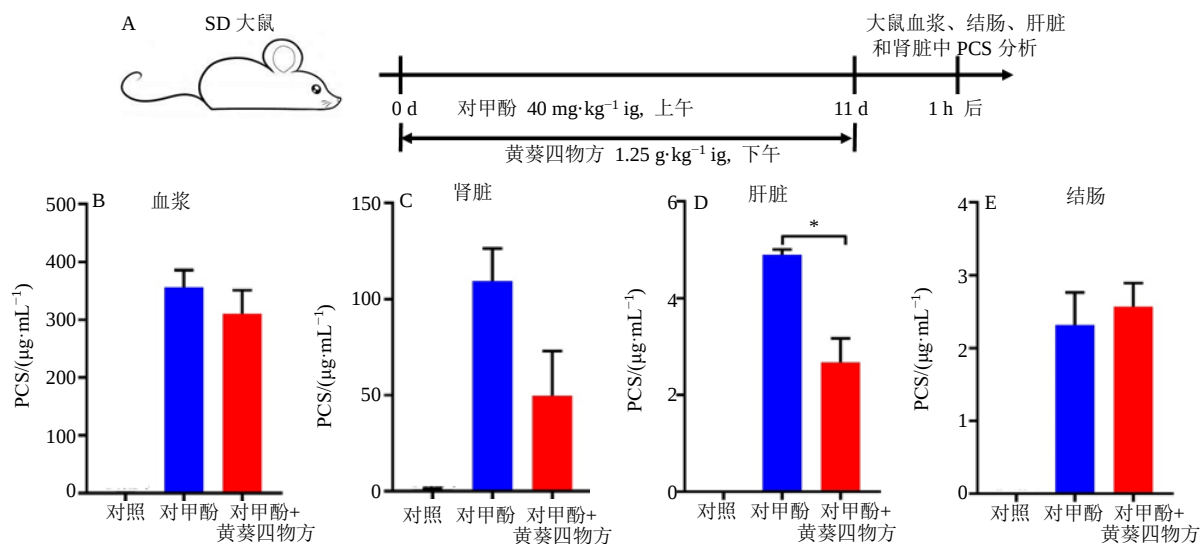
A-宿主体内对甲酚转化为 PCS 的示意图 B、C-黄葵四物方对小鼠结肠中 SULT1A mRNA/蛋白质表达水平的影响 D-黄葵四物方对小鼠肝脏中 SULT1A 活性的影响 E、F-黄葵四物方对小鼠肝脏中 SULT1A mRNA/蛋白质表达水平的影响 与对照组比较: **P*<0.05

A-schematic diagram of PC converting to PCS in the host B, C-effect of HKSWF on sulfotransferase mRNA/protein expression levels in the mouse colon D-effect of HKSWF on sulfotransferase enzyme activity in mouse liver E, F-effect of HKSWF on sulfotransferase mRNA/protein expression levels in the mouse liver **P* < 0.05 vs control group

图 2 黄葵四物方对小鼠结肠和肝脏内对甲酚向 PCS 转化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 2 Effect of Huangkui Siwu Formula on converting PC to PCS in mouse colon and liver ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

为了对以上结果进行验证,进一步观察了黄葵四物方对大鼠体内 PCS 合成环节的影响。大鼠 ig 对甲酚及黄葵四物方后,利用 UPLC-TQ/MS 检测血浆、结肠、肝脏和肾脏内 PCS 含量(图 3-A)。结果发现,与对照组(未给予对甲酚)相比,对甲酚 ig 可显著升高 PCS 在血浆和肾脏内的含量,给予黄葵四物方后,大鼠血浆和肾脏内 PCS 含量存在降低趋势(图 3-B、C)。在结肠和肝脏的检

测结果中发现,与对照组相比,对甲酚 ig 后可显著增加大鼠结肠和肝脏内 PCS 浓度,黄葵四物方可显著降低肝脏内 PCS 含量($P<0.05$,图 3-D),但对结肠内 PCS 含量无显著影响(图 3-E)。以上结果表明,黄葵四物方不影响大鼠肠道中 PCS 的合成环节,但可抑制大鼠肝脏 PCS 的合成环节。黄葵四物方可干预对甲酚向 PCS 转化的过程,减少体内 PCS 蓄积。



A-SD 大鼠实验设计方案 B~E-黄葵四物方和对甲酚 ig 11 d 后大鼠血浆、肾脏、肝脏和结肠内 PCS 含量变化 与对甲酚组比较: * $P<0.05$
A-scheme of SD rats experimental design B~E-PCS concentration in rats after ig with HKS and PC for 11 d in plasma, kidney, liver and colon * $P<0.05$ vs PC group

图 3 黄葵四物方对大鼠体内 PCS 蓄积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Effect of Huangkui Siwu Formula on PCS accumulation in rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.2 黄葵四物方对宿主细胞内 PCS 转运的影响

为了观察黄葵四物方对宿主体内 PCS 转运环节的影响,检测小鼠 ip PCS 后,血浆及肾脏中 PCS 含量,从而直接反映黄葵四物方对 PCS 由血液向肾脏内转运过程的影响。小鼠 ig 给予黄葵四物方 28 d 后,ip PCS 0.5 h 后收集血浆及肾脏,利用 UPLC-TQ/MS 检测其中 PCS 含量(图 4-A)。结果发现,与对照组相比,黄葵四物含量度(图 4-B、C),提示黄葵四物方可能不影响 PCS 转运进入肾脏的环节。

文献研究发现,血浆中的 PCS 可通过肾脏内有机阴离子转运体 OAT1/3 转运进入肾脏^[4]。因此,进一步观察了黄葵四物方对肾脏 OAT1/3 转运体的影响。结果发现,与对照组相比,黄葵四物方对 OAT3 的基因转录存在抑制趋势(图 4-E),但不影响其蛋白的表达水平(图 4-G)。同时发现,黄葵四物方可显著抑制 OAT1 基因和蛋白的表达水平(图 4-D、F),

提示黄葵四物方虽然可以抑制 OAT1 基因和蛋白的表达水平,但对 PCS 的肾脏转运环节并无显著影响。为了明确黄葵四物方对 PCS 转运环节的影响,本研究在正常 SD 大鼠体内进行了验证实验。

将正常大鼠进行黄葵四物方预给药 28 d 后,各组大鼠 ip PCS,利用 UPLC-TQ/MS 检测血浆及肾脏内 PCS 含量(图 5-A)。结果发现,与对照组相比,黄葵四物方不影响血浆及肾脏内 PCS 的含量(图 5-B~D)。大鼠肾脏转运体 OAT1/3 的检测结果同样发现,黄葵四物方不影响大鼠肾脏 OAT1/3 的基因转录及蛋白表达水平(图 5-E~G),提示黄葵四物方不影响正常大鼠体内 PCS 转运进入肾脏。此外,本实验进一步观察了黄葵四物方对 CKD 模型大鼠体内 PCS 转运进入肾脏的影响(图 5-H)。结果同样发现,黄葵四物方不影响 CKD 模型大鼠肾脏中 OAT1/3 的基因转录水平(图 5-I、J)。

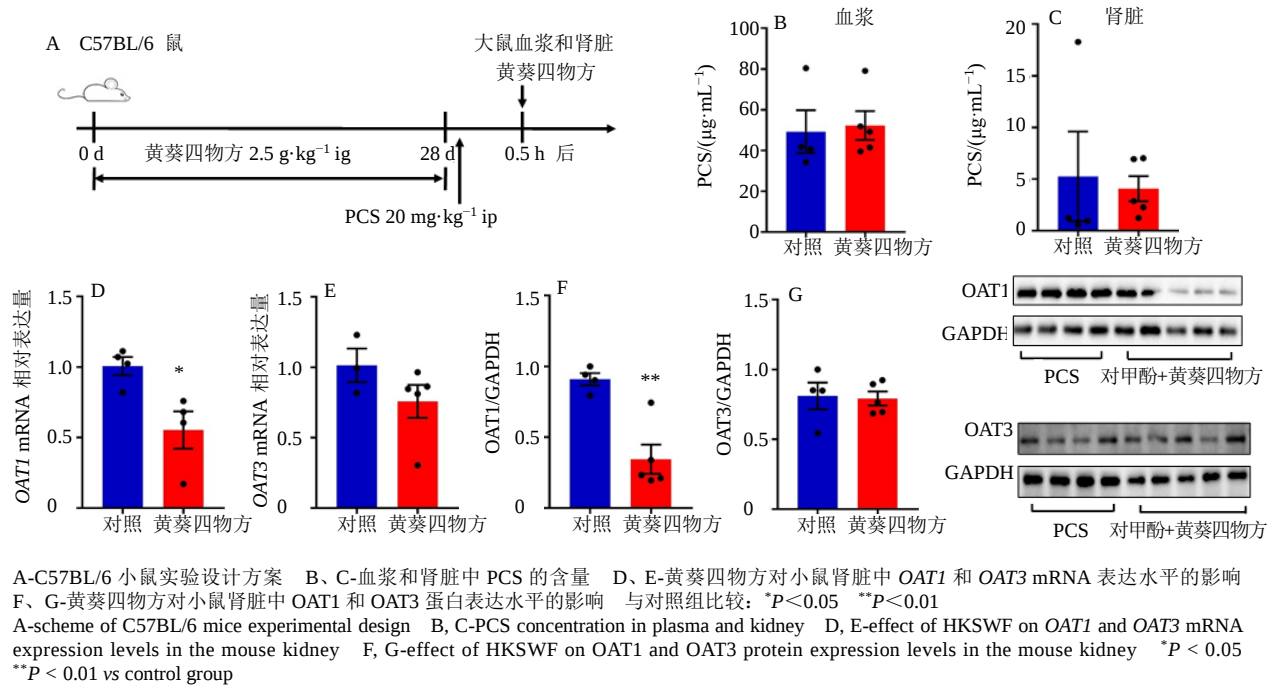


图 4 黄葵四物方对小鼠体内 PCS 转运进入肾脏的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Effect of Huangkui Siwu Formula on converting PCS to kidney in mice ($\bar{x} \pm s$)

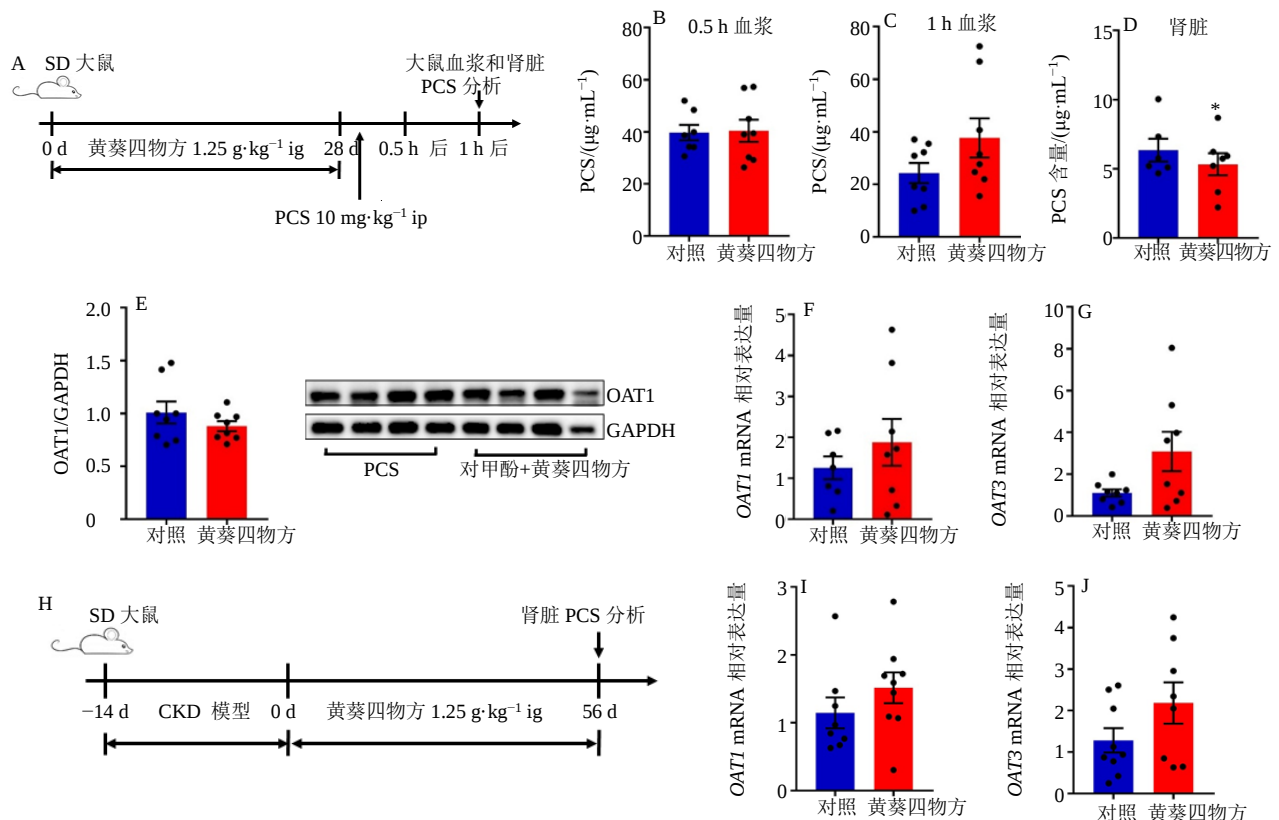


图 5 黄葵四物方对大鼠体内 PCS 转运进入肾脏的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Effect of Huangkui Siwu Formula on converting PCS to kidney in rats ($\bar{x} \pm s$)

以上结果提示,黄葵四物方不影响大鼠体内 PCS 转运进入肾脏。

4 讨论

CKD 是由各种原因引起肾脏结构和功能障碍的慢性疾病。根据肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 的水平将 CKD 分为了 5 个阶段。随着 CKD 进程发展,患者肾功能下降,尿毒素不能及时排出体外,体内大量蓄积的尿毒素会损伤患者肾功能,诱发心血管并发症,进一步加快 CKD 的进展^[15]。其中,PCS 是当前研究最多的尿毒素^[4]。实验研究证实,在人肾小管上皮细胞 HK-2 中,PCS 可激活烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶,促进活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成,降低细胞生存力,诱导炎症细胞因子 mRNA 水平升高和转化生长因子 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 蛋白分泌增加,最终导致肾脏损伤^[16]。在心血管系统,PCS 蓄积可增加尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 1 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1, Nox1)、Nox4 的基因表达,促进 ROS 的生成,刺激氧化应激反应,最终导致动脉粥样硬化^[17];PCS 还可直接激活胞外调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2),破坏胰岛素通路,诱发胰岛素抵抗^[18]。因此,探索有效抑制体内 PCS 生成和堆积的治疗策略,对于延缓 CKD 进展,降低 CKD 并发心血管事件具有重要意义。

黄葵四物方由黄葵、黄芪、虎杖和姜黄组成。

方中黄葵清热解毒,黄芪益气消肿,虎杖利湿退黄,姜黄破瘀止痛。前期研究发现黄葵四物方能够有效抑制 CKD 大鼠体内尿毒素 PCS 蓄积,降低其血浆、肝脏及肾脏内的 PCS 浓度。针对宿主细胞内 PCS 代谢通路的各个环节,本研究设计了不同动物实验相互验证,分析黄葵四物方对宿主细胞合成及转运 PCS 的影响。将对甲酚 ig 给予小鼠,观察黄葵四物方对小鼠体内对甲酚向 PCS 合成转化环节的影响。结果发现黄葵四物方可干预小鼠血浆及肝脏内 PCS 的蓄积,但不影响结肠内 PCS 含量。在肝脏特异性代谢酶的检测中发现,黄葵四物方可显著抑制肝脏内 SULT1A1 基因和蛋白水平的表达,从而抑制 SULT1A1 催化对甲酚生成 PCS。在大鼠体内进行验证,结果发现黄葵四物方可降低血浆、肝脏和肾脏内 PCS 含量,其中对肝脏的抑制作用尤为显著。以上结果说明,黄葵四物方抑制体内 PCS 蓄积可能与调控肝脏内 SULT1A1 有关。

在 PCS 转运环节中,将 PCS ip 给予小鼠,研究黄葵四物方对 PCS 转运进入肾脏的影响。结果显示,黄葵四物方不影响小鼠血浆和肾脏内 PCS 的含量。在大鼠体内进行验证,同样发现黄葵四物方不影响其血浆和肾脏内 PCS 含量,且不影响肾脏内 OAT1/3 mRNA 和蛋白的表达,即黄葵四物方不影响 PCS 通过 OAT1/3 转运进入肾脏。

综上所述,黄葵四物方抑制对甲酚向 PCS 转化,并最终减少体内 PCS 蓄积这一作用可能与调控肝脏内 SULT1A1 有关,但不影响结肠内 PCS 的合成以及 PCS 向肾脏的转运 (图 6)。

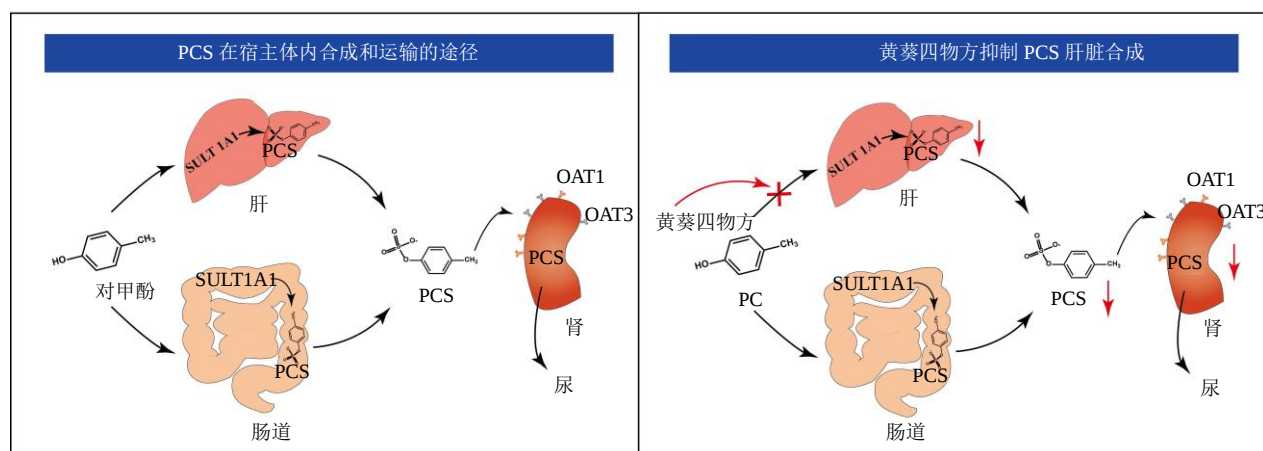


图 6 黄葵四物方对尿毒素分子硫酸对甲酚在宿主细胞内代谢通路及转运环节的影响

Fig. 6 Effect of Huangkui Siwu Formula on uremic toxin metabolism pathway and kidney transportation

近年来,通过抑制尿毒素生成和/或调控其转运环节减轻 CKD 肾脏损伤的治疗策略具有广阔发展前景,本研究以蛋白结合型尿毒素 PCS 的合成及转运为切入点,探讨黄葵四物方延 CKD 进展的作用机制,为寻找治疗 CKD 的新靶点,拓展治疗 CKD 的新思路提供研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Webster A C, Nagler E V, Morton R L, *et al.* Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2017, 389(10075): 1238-1252.
- [2] 宋建波, 廖晖, 李元平. 基于网络药理学探讨黄芪治疗糖尿病肾病作用机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(11): 2988-2996.
- [3] Foreman K J, Marquez N, Dolgert A, *et al.* Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: Reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 2052-2090.
- [4] Gryp T, Vanholder R, Vanechoutte M, *et al.* P-Cresyl sulfate [J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(2): E52.
- [5] Deltombe O, van Biesen W, Glorieux G, *et al.* Exploring protein binding of uremic toxins in patients with different stages of chronic kidney disease and during hemodialysis [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(10): 3933-3946.
- [6] Deltombe O, van Biesen W, Glorieux G, *et al.* Exploring protein binding of uremic toxins in patients with different stages of chronic kidney disease and during hemodialysis [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(10): 3933-3946.
- [7] Brocca A, Virzi G M, de Cal M, *et al.* Cytotoxic effects of p-cresol in renal epithelial tubular cells [J]. *Blood Purif*, 2013, 36(3/4): 219-225.
- [8] Lin H H, Huang C C, Lin T Y, *et al.* P-Cresol mediates autophagic cell death in renal proximal tubular cells [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 234(1): 20-29.
- [9] Gross P, Massy Z A, Henaut L, *et al.* Para-cresyl sulfate acutely impairs vascular reactivity and induces vascular remodeling [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(12): 2927-2935.
- [10] 刘阳. 黄葵四物方对慢性肾病的保护作用及机理研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [11] 孙英新, 黄洋, 曾妙, 等. 基于“肠道菌群-炎症”通路探讨丹萎片防治 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的作用及机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(9): 2492-2500.
- [12] 汤齐, 高霞, 耿婷, 等. 肠道菌群与中药相互作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3629-3635.
- [13] 王颖异, 李建萍, 陆静波, 等. 黄葵减轻慢性肾病模型大鼠体内尿毒素蓄积的作用及机制研究 [J]. *药学报*, 2019, 54(12): 2267-2276.
- [14] 陆静波, 王颖异, 张森, 等. 黄葵四物方调控肠道菌群中代谢通路干预尿毒素合成的作用机制研究 [J]. *药学报*, 2020, 55(6): 1229-1236.
- [15] Vanholder R, For the European Uremic Toxin Work Group (EUTox), de Smet R, *et al.* Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability [J]. *Kidney Int*, 2003, 63(5): 1934-1943.
- [16] Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, *et al.* P-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase [J]. *Kidney Int*, 2013, 83(4): 582-592.
- [17] Jing Y J, Ni J W, Ding F H, *et al.* P-Cresyl sulfate is associated with carotid arteriosclerosis in hemodialysis patients and promotes atherogenesis in apoE^{-/-} mice [J]. *Kidney Int*, 2016, 89(2): 439-449.
- [18] Koppe L, Pillon N J, Vella R E, *et al.* P-cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(1): 88-99.

[责任编辑 潘明佳]