

基于分子对接技术的藤茶总黄酮对高尿酸血症肾功能损伤保护机制研究

李佳川, 李思颖

西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 探讨藤茶总黄酮(total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata*, AGTF)对高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)肾功能损伤的保护机制。方法 利用分子对接技术,将藤茶总黄酮主要活性成分与HUA相关靶点蛋白尿酸重吸收转运体1(uric acid reabsorption transporter 1, URAT1)、葡萄糖转运蛋白9(glucose transporter 9, GLUT9)、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G2(adenosine triphosphate binding cassette transporter G2, ABCG2)、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)和腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)进行分子对接。采用腺嘌呤联合乙胺丁醇复合方法制备HUA肾功能损伤大鼠模型,以AGTF进行干预,检测大鼠血清中尿酸代谢酶XOD和ADA活性、尿酸以及肾功能生化指标肌酐和尿素氮的水平;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肾脏组织病理变化;Western blotting法检测大鼠肾组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)蛋白的表达;免疫组化法检测大鼠肾组织中URAT1、GLUT9和ABCG2蛋白的表达。结果 分子对接结果表明,AGTF主要活性成分二氢杨梅素、杨梅素、槲皮素和藤茶素与疾病相关靶点对接得分均较高,提示AGTF可能通过干预URAT1、GLUT9、ABCG2、ADA和XOD发挥抗HUA肾功能损伤的作用。AGTF能显著降低HUA肾功能损伤模型大鼠血清中XOD和ADA的活性以及尿酸、肌酐、尿素氮的水平($P < 0.05, 0.01$)。HE染色结果显示,AGTF能缓解模型大鼠肾小球基底膜增厚,减轻肾小管排列紊乱及坏死,抑制病变区域内纤维组织增生。Western blotting和免疫组化结果显示,AGTF能显著降低大鼠肾组织中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、TGF- β 蛋白和尿酸盐重吸收相关蛋白URAT1、GLUT9的表达($P < 0.05, 0.01$),显著升高尿酸盐排泄相关蛋白ABCG2的表达($P < 0.05, 0.01$)。结论 AGTF对HUA肾功能损伤大鼠具有较好的保护作用,其作用机制可能与降低TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和TGF- β 表达,抑制炎症反应,并调节尿酸盐转运蛋白URAT1、GLUT9和ABCG2的表达,促进尿酸代谢有关,与分子对接预测结果一致。

关键词: 藤茶总黄酮; 二氢杨梅素; 杨梅素; 槲皮素; 藤茶素; 分子对接; 高尿酸血症; 肾功能保护

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)03-0727-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.015

Protective effect and mechanism of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* on renal function injury of hyperuricemia based on molecular docking technology

LI Jia-chuan, LI Si-ying

School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To explore the protective mechanism of the total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* (AGTF) on renal function injury of hyperuricemia (HUA). **Methods** Main active components of AGTF were connected with HUA related target proteins uric acid reabsorption transporter 1 (URAT1), glucose transporter 9 (GLUT9), adenosine triphosphate binding cassette transporter G2 (ABCG2), xanthine oxidase (XOD), and adenosine deaminase (ADA) by using molecular docking technology. Renal injury rats model of HUA was prepared by adenine combined with ethambutol, and AGTF was used for intervention. Activities of urate metabolizing enzyme such as XOD and ADA, levels of uric acid, renal function biochemical indicators such as creatinine and urea nitrogen in serum were detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of rat kidney. Expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and transforming growth factor- β (TGF- β) in renal tissues were determined by Western blotting. Expression of URAT1, GLUT9, and ABCG2 were detected by immunohistochemistry. **Results** Molecular docking results showed that the main components of AGTF of dihydromyricetin, myricetin, quercetin, and grossedentatatin

收稿日期: 2020-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81302912); 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(2017NZYQN35)

作者简介: 李佳川(1984—), 男, 副教授, 博士后, 研究方向为中药及民族药药效与毒理。Tel: 13060003213 E-mail: ligat@163.com

all had higher docking scores with disease-related targets, suggesting that AGTF may prevent and treat HUA renal function injury by acting on URAT1, GLUT9, ABCG2, ADA and XOD. AGTF significantly reduced the activities of XOD and ADA, levels of uric acid, creatinine and urea nitrogen in serum of HUA renal injury rats ($P < 0.05, 0.01$). AGTF alleviated the thickening of glomerular basement membrane in model rats, reduced the disorder and necrosis of renal tubular arrangement, and inhibited the proliferation of fibrous tissue in lesion area. Western blotting and immunohistochemistry results showed that AGTF significantly reduced the expressions of inflammatory factors such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , and urate reabsorption related proteins such as URAT1 and GLUT9 ($P < 0.05, 0.01$), significantly increased the expression of urate excretion related protein such as ABCG2 in renal tissue ($P < 0.05, 0.01$).

Conclusion AGTF has a good protective effect on renal function injury of HUA. AGTF could inhibit the expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and TGF- β to alleviate inflammatory pathway reactions, and regulate the expressions of urate transporter related proteins such as URAT1, GLUT9, and ABCG2 to promote metabolism of uric acid, which are consistency with predicted results of molecular docking.

Key words: total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata*; dihydromyricetin; myricetin; quercetin; grossedentatin; molecular docking; hyperuricemia; renal function protection

肾功能损伤是高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 临床最常见并发症之一, 体内血尿酸产生过多或肾脏排泄尿酸减少, 尿酸盐达过饱和状态而沉积于肾间质和输尿管, 从而引起肾脏病变^[1]。HUA 肾功能损伤主要病理学改变为慢性肾间质、肾小管病变, 并伴有局部炎症反应发生^[2]。近年来, HUA 并发的肾功能损伤发病率呈升高趋势, 男性患者多于女性, 其发病隐匿, 早期无明显临床症状。临床上常用的化学药物多为别嘌醇、非布司他和苯溴马隆等^[3], 通过抑制尿酸生成和促进尿酸排泄来改善尿酸代谢, 但对并发的肾功能损伤尚无确切疗效。糖尿病、HUA 等代谢性疾病是中医药防治的优势病种, 中医药及少数民族医药对其相关并发症具有较好的临床治疗优势。

藤茶, 又称莓茶、龙须茶、客家白茶, 由显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand. -Mazz.) W. T. Wang 的嫩枝叶加工而成, 具有清热解毒、活血通络的功效^[4], 主要分布于四川、贵州、湖南、湖北、广西等少数民族地区^[5-6], 具有药食同源之性。藤茶含有黄酮类^[7]、多糖类^[8]、酚类^[9]、氨基酸^[10]等多种活性成分, 其黄酮类成分含量最为丰富, 主要有二氢杨梅素、藤茶素、槲皮素、杨梅素等, 其中二氢杨梅素的质量分数高达 35%, 被认为是藤茶发挥保健功效的重要药效物质基础^[11-12]。现代药理学研究表明, 藤茶及其总黄酮部位具有抗氧化^[13]、降血压^[14]、调血脂^[15]、抗动脉粥样硬化^[16]、心血管保护^[17]、抗肝癌^[18]等药理作用。课题组前期通过对藤茶民族习用地区大量走访和临床实践反馈后发现, 藤茶作为药食两用植物, 在多个少数民族地区均有治疗痛风和慢性肾炎的民间习用和文献记载情况^[19], 但其治疗 HUA 肾功能损伤的作用机制相

关研究较少。因此, 本研究采用分子对接技术, 综合藤茶总黄酮中代表性活性成分, 深入探讨药物组分与尿酸生成和排泄相关蛋白靶点的相互作用, 并建立腺嘌呤联合乙胺丁醇致 HUA 肾功能损伤大鼠模型进行验证, 系统探讨藤茶总黄酮提取物对 HUA 肾功能损伤的保护作用, 以期为少数民族地区药食资源藤茶的进一步保健开发提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Wister 大鼠 50 只, 7 周龄, 体重 200~220 g, 购于四川省成都达硕实验动物研究中心, 许可证号 SCXK (川) 2015-030。动物饲养于西南民族大学药学院 SPF 级动物实验室, 温度 (24 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (55 \pm 5) %, 每 12 小时昼夜间断性照明, 适应性饲养 1 周。动物实验经西南大学药学院实验动物伦理委员会批准 (批准号 2019-05)。

1.2 药材

藤茶药材市售, 产地湖南省张家界市, 经西南民族大学顾健教授鉴定为葡萄科植物显齿蛇葡萄 *A. grossedentata* (Hand. -Mazz.) W. T. Wang 的干燥嫩枝叶。藤茶粉碎后过 40 目筛, 称取适量干燥藤茶, 按 1:10 加入蒸馏水, 于 100 $^{\circ}$ C 回流提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压蒸发浓缩得浸膏。将浸膏用 D-101 大孔树脂吸附, 水洗近无色后, 用 95% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇, 得纯化物, 干燥即得藤茶总黄酮 (total flavonoids from *A. grossedentata*, AGTF)。以二氢杨梅素为对照品, 采用 AlCl_3 比色法测定 AGTF 质量分数为 84.16%。

1.3 药品与试剂

别嘌醇片 (批号 20181206, 国药准字 H34021248, 规格 0.1 g/片) 购自合肥九联制药有限公司; 二氢杨

梅素对照品(批号 MUST-14013108, 质量分数 $\geq 98\%$)购自成都曼思特生物科技有限公司; 腺嘌呤(批号 D1915072, 质量分数 $\geq 99.5\%$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 盐酸乙胺丁醇片(批号 T19B030, 规格 0.25 g/片)购自杭州民生药业有限公司; 尿酸试剂盒(批号 20190407)、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)试剂盒(批号 20190330)、腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)试剂盒(批号 20190403)、肌酐试剂盒(批号 20191021)、尿素氮试剂盒(批号 20191022)均购自南京建成生物工程研究所; 尿酸重吸收转运体 1(uric acid reabsorption transporter 1, URAT1)抗体(批号 bs-10357R)、葡萄糖转运蛋白 9(glucose transporter 9, GLUT9)抗体(批号 bs-13388R)、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2(adenosine triphosphate binding cassette transporter G2, ABCG2)抗体(批号 bs-0662R)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体(批号 bs10802R)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)抗体(批号 bs0812R)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)抗体(批号 bs23660R)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)抗体(批号 bs0086R)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(批号 bs0295G-HRP)均购自北京博奥森生物技术有限公司; 苏木素染液(批号 G1005-1)、伊红染液(批号 G1001)购自武汉赛维尔生物技术有限公司; β -actin 抗体(批号 00083126)购自美国 Proteintech 公司; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.4 仪器

CYT5M 型多功能全波长酶标仪(美国 BioTek 公司); H165-W 型高速微量离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); Mini-Sub Cell GT Cell 型水平电泳系统、ChemiDoc 免染蛋白印迹系统(美国 Bio-Rad 公司); BMJ-III型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂); PHY-III型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司); BA400 型数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

2 方法

2.1 AGTF 主要活性成分与疾病相关靶点的分子对接

尿酸代谢涉及尿酸生成(即嘌呤分解代谢)与尿酸排泄等多个途径。XOD 和 ADA 是尿酸生成途径中的重要靶蛋白, 也是抗 HUA 药物设计的关键

靶点; URAT1、GLUT9 和 ABCG2 是促尿酸排泄药物作用的靶点^[20-22]。以上靶点对 AGTF 潜在药效物质的筛选及临床诊断、治疗具有重要意义。根据文献报道^[11-23], 将藤茶总黄酮提取物中发挥药理作用的主要活性成分二氢杨梅素、杨梅素、槲皮素和藤茶素作为配体, 以 URAT1、GLUT9、ABCG2、XOD 和 ADA 蛋白为受体, 分别进行分子对接, 并以临床上降尿酸首选药物黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌醇作为阳性对照^[24]。

2.1.1 化合物的处理 运用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载或 Chemdraw 软件绘制二氢杨梅素、杨梅素、槲皮素和藤茶素的 2D 结构, 采用 PyRx 软件对化合物分子进行能量最小化, 保存为 pdb 格式, 作为配体备用。

2.1.2 蛋白结构的预测与筛选 在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中分别检索 URAT1、GLUT9、ABCG2、XOD 和 ADA 的蛋白质序列, 并利用 SWISS-MODEL 同源建模平台(<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测所有蛋白质序列的三维蛋白结构。通过 SAVES v5.0 在线平台(<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>) 对预测出的三维蛋白结构进行评分, 根据 Verify 分析和 Ramachandran 图立体化学质量评估的数据, 筛选出评分高的模型作为预测的靶蛋白结构。

2.1.3 受体蛋白的准备 利用 AutoDock Tools 软件, 对筛选出的靶蛋白除水、加氢、添加原子电荷、设置原子类型, 存为 pdbqt 格式, 作为受体备用。

2.1.4 分子对接 运用 PyRx 软件中的 AutoDock Vina 将化合物与受体蛋白分别进行分子对接, 并对对接结果进行分析。

2.2 动物实验验证

2.2.1 分组、造模和给药 根据前期预实验结果, 大鼠随机分成对照组、模型组、别嘌醇(50 mg/kg, 别嘌醇溶于蒸馏水配制成 0.5%溶液)组和 AGTF(0.25、0.50 g/kg, AGTF 溶于蒸馏水分别配成质量浓度为 25、50 mg/mL 的溶液)组, 每组 10 只。腺嘌呤和盐酸乙胺丁醇溶于蒸馏水配制成 1%腺嘌呤、2.5%盐酸乙胺丁醇的混悬液, 除对照组 ig 等体积生理盐水外, 其余各组 ig 混悬液(10 mL/kg)^[25], 1 次/d, 连续 14 d。于造模第 8 天, 各给药组 ig 药物(10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 14 d。

2.2.2 AGTF 对大鼠血清中 XOD、ADA 活性和尿酸、肌酐、尿素氮水平的影响 大鼠禁食不禁水 24 h, 末次给药 1 h 后 ip 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,

腹主动脉取血, 分离血清, 按试剂盒说明书检测血清中 XOD 和 ADA 活性和尿酸、肌酐、尿素氮水平。

2.2.3 AGTF 对大鼠肾脏组织病理变化的影响 大鼠脱颈椎处死, 分离大鼠肾脏组织, 用冰生理盐水冲洗, 滤纸拭干后称定质量, 计算肾脏指数; 取部分肾脏组织以 4% 多聚甲醛固定, 脱水、修剪、包埋、切片、苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察肾脏组织的病理变化。

2.2.4 AGTF 对大鼠肾脏组织 URAT1、GLUT9、ABCG2、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 TGF- β 蛋白表达的影响 采用免疫组化法检测肾脏组织 URAT1、GLUT9、ABCG2 蛋白表达^[26]; 取剩余肾脏组织于液氮中冻存, 采用 Western blotting 法检测肾脏组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 TGF- β 蛋白的表达^[27]。

2.3 统计学方法

实验结果采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,

采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据用单因方差分析进行组间比较。

3 结果

3.1 AGTF 主要活性成分与疾病相关靶点的分子对接结果

结合能小于 0 则配体与受体可以自由结合, 结合能越低表明受体与配体间的亲和力越大, 二者发生相互作用的可能性越高。如表 1 所示, 二氢杨梅素、杨梅素、槲皮素、藤茶素和别嘌醇与抗 HUA 靶点蛋白的对接结合能均小于 0, 表明 AGTF 主要活性成分均与 URAT1、GLUT9、ABCG2、ADA、XOD 受体蛋白有较好的结合活性, 能较稳定地自发结合, 且结合作用优于别嘌醇。AGTF 中含量最高的二氢杨梅素与各靶蛋白的对接模式如图 1、2 所示, 二氢杨梅素与各受体蛋白通过范德华力、氢键等多个价键结合, 表明二氢杨梅素与受体蛋白的结合具有较高的稳定性。

表 1 藤茶总黄酮主要活性成分和别嘌醇与疾病蛋白靶点的分子对接结果

Table 1 Molecular docking of allopurinol and main active components of AGTF with disease protein targets

配体分子	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
	URAT1	GLUT9	ABCG2	ADA	XOD
二氢杨梅素	-30.125	-33.890	-37.238	-29.706	-40.166
杨梅素	-30.962	-30.962	-37.656	-30.962	-40.166
槲皮素	-30.125	-30.543	-35.564	-30.962	-35.564
藤茶素	-39.330	-36.401	-46.024	-33.890	-38.493
别嘌醇	-21.338	-19.665	-19.246	-20.502	-24.267

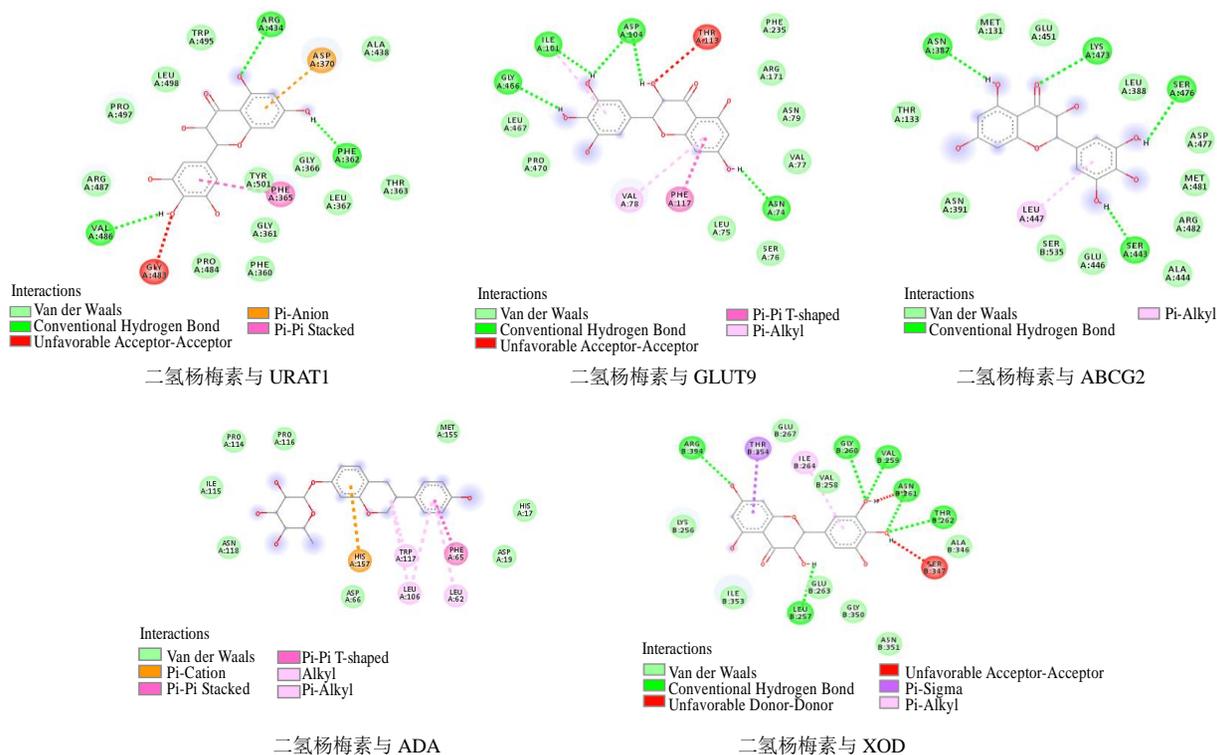


图 1 二氢杨梅素与受体蛋白的活性结合位点

Fig. 1 Active binding sites of dihydromyricetin with receptor protein

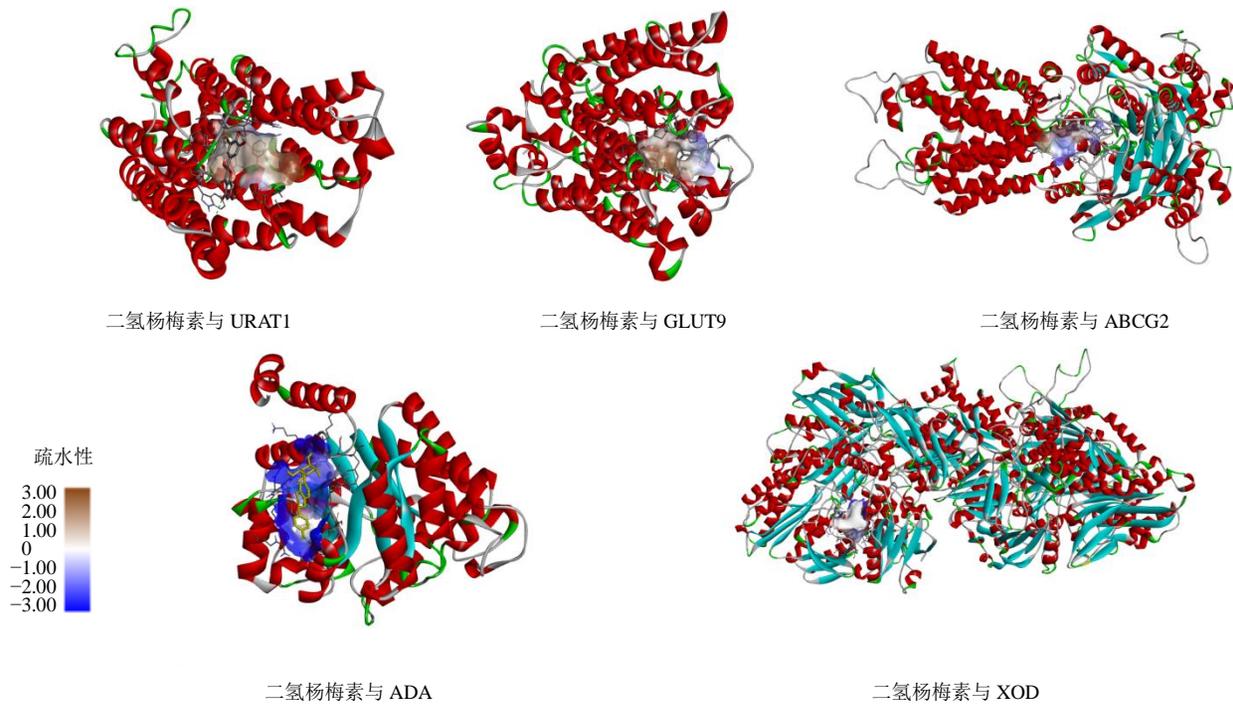


图2 二氢杨梅素与疾病相关靶点的分子对接模式

Fig. 2 Molecular docking patterns of dihydromyricetin and disease-related targets

3.2 AGTF对HUA大鼠一般情况及肾脏指数的影响

对照组大鼠体态正常、精神状态良好、活动自如、行动敏捷,无不良症状。模型组大鼠排尿增多、毛色较暗且粗糙、体形明显消瘦,部分大鼠死亡。各给药组大鼠表现介于对照组和模型组之间。如表2所示,与对照组比较,模型组大鼠的肾脏指数明显增加 ($P < 0.01$),肾脏指数升高93.71%,表明腺嘌呤联用乙胺丁醇可成功诱导大鼠肾功能损伤。与模型组比较,AGTF能够明显降低HUA大鼠的肾脏指数 ($P < 0.01$),表明AGTF对HUA大鼠具有一定保护作用。

3.3 AGTF对HUA大鼠血清中尿酸水平、XOD和ADA活性的影响

如表3所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中尿酸水平、XOD和ADA活性均明显升高 ($P < 0.01$),表明模型大鼠尿酸代谢异常。与模型组比较,AGTF组大鼠血清尿酸水平、XOD和ADA活性均

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

Table 2 Effect of AGTF on renal index in HUA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肾脏指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	7.90 ± 0.18
模型	—	15.30 ± 0.94**
别嘌醇	0.05	15.72 ± 0.46
AGTF	0.50	11.60 ± 0.36##
	0.25	10.51 ± 0.44##

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as belows

明显降低 ($P < 0.05, 0.01$),表明AGTF具有改善尿酸代谢和抗HUA作用。

3.4 AGTF对HUA大鼠血清中肌酐和尿素氮水平的影响

如表4所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中肌酐和尿素氮水平均明显升高 ($P < 0.01$),表明

表3 AGTF对HUA大鼠血清中尿酸水平、XOD和ADA活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of AGTF on uric acid level, XOD and ADA activities in serum of HUA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	尿酸/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	XOD/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	ADA/($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	—	40.87 ± 4.64	12.97 ± 0.15	15.06 ± 0.44
模型	—	112.08 ± 6.09**	21.13 ± 0.42**	19.59 ± 1.04**
别嘌醇	0.05	55.28 ± 5.60##	14.08 ± 0.20##	16.45 ± 0.65##
AGTF	0.50	66.87 ± 4.85##	16.30 ± 0.39##	17.22 ± 0.50##
	0.25	74.37 ± 4.02##	16.79 ± 0.38##	17.86 ± 0.54#

表 4 AGTF 对 HUA 大鼠血清中肌酐和尿素氮水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of AGTF on creatinine and urea nitrogen levels in serum of HUA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肌酐/ (μmol·L ⁻¹)	尿素氮/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	31.20±3.39	6.30±0.12
模型	—	63.21±5.38**	11.09±0.29**
别嘌醇	0.05	60.78±2.68	10.53±0.21#
AGTF	0.50	33.86±5.67##	8.24±0.22##
	0.25	38.49±6.50##	9.38±0.33##

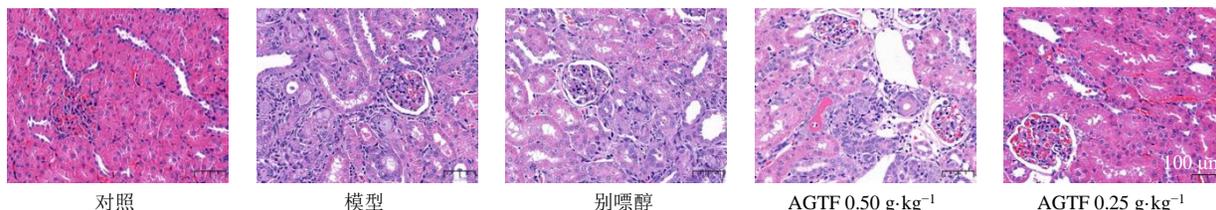


图 3 AGTF 对 HUA 大鼠肾脏组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 3 Effect of AGTF on pathological change of renal tissue in HUA rats (HE, × 100)

肾小管上皮细胞变性、坏死的情况相较于模型组较少，偶见肾小管管腔内少量中性粒细胞渗出，病变区域间质内纤维组织增生的情况有所减少，病变程度较模型组轻。

3.6 AGTF 对 HUA 大鼠肾脏组织相关炎症因子蛋白表达的影响

如图 4 和表 5 所示，与对照组比较，模型组大鼠肾脏组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 TGF-β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)，表明 HUA 伴有局部炎症反应。与模型组比较，AGTF 组大鼠肾脏组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 TGF-β 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，表明 AGTF 能抑制促炎症因子合成与释放，减少肾脏间质纤维化的形成，有效保护肾脏组织。

表 5 AGTF 对 HUA 大鼠肾脏组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 TGF-β 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of AGTF on expressions of TNF-α, IL-1β, IL-6, and TGF-β in kidney of HUA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		TNF-α	IL-1β	IL-6	TGF-β
对照	—	0.34±0.07	0.21±0.06	0.32±0.06	0.43±0.05
模型	—	1.00±0**	1.00±0**	1.00±0**	1.00±0**
别嘌醇	0.05	0.57±0.11##	0.48±0.08##	0.57±0.11##	0.63±0.13##
AGTF	0.50	0.39±0.09##	0.35±0.13##	0.36±0.12##	0.53±0.08##
	0.25	0.82±0.06#	0.64±0.14##	0.70±0.09##	0.76±0.12##

3.7 AGTF 对 HUA 大鼠肾脏组织 URAT1、GLUT9 和 ABCG2 蛋白表达的影响

由图 5~7 和表 6 所示，与对照组比较，模型组大鼠肾脏组织尿酸盐重吸收相关蛋白 URAT1、GLUT9 表达显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，促进尿酸

模型大鼠肾功能异常。与模型组比较，AGTF 组大鼠血清中肌酐和尿素氮水平均明显降低 ($P < 0.01$)，表明 AGTF 能有效改善 HUA 大鼠肾功能损伤，保护肾脏。

3.5 AGTF 对 HUA 大鼠肾脏组织病理变化的影响

如图 3 所示，模型组大鼠肾小球基底膜增厚，肾小管结构坏死，间质内纤维组织增生。AGTF 组大鼠肾脏组织被膜较为完整，皮质和髓质分界较为清晰，肾小球结构基本正常，肾小管排列较为整齐，

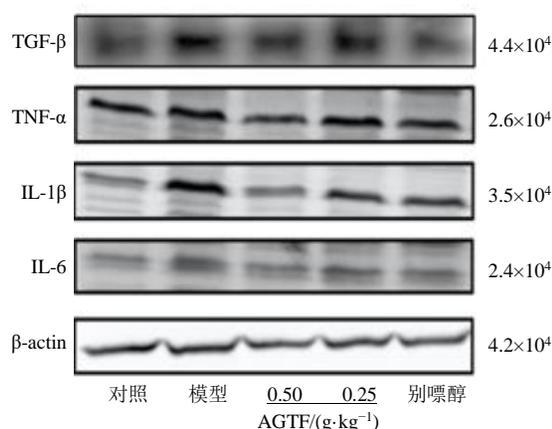


图 4 AGTF 对 HUA 大鼠肾脏组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 TGF-β 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of AGTF on expressions of TNF-α, IL-1β, IL-6, and TGF-β in HUA rats

盐排泄相关蛋白 ABCG2 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，AGTF 组大鼠肾脏组织 URAT1、GLUT9 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，ABCG2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，表明 AGTF 能够通过抑制尿酸盐在肾脏的重吸收，促进尿酸排

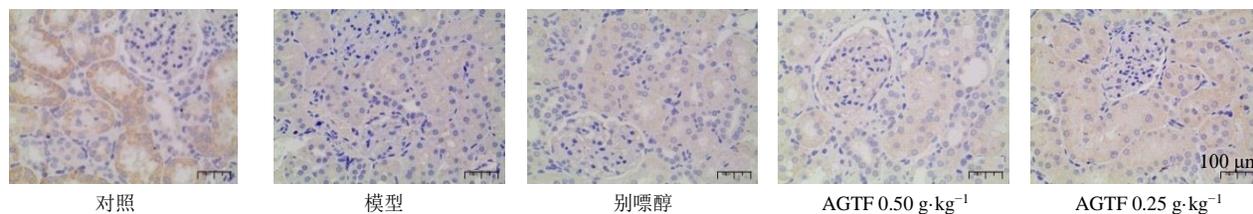


图5 AGTF对HUA大鼠肾脏组织URAT1蛋白表达的影响(×400)

Fig. 5 Effect of AGTF on expression of URAT1 in kidney of HUA rats (× 400)

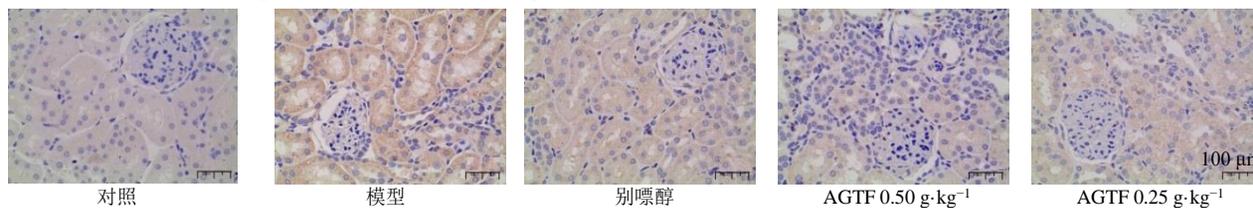


图6 AGTF对HUA大鼠肾脏组织GLUT9蛋白表达的影响(×400)

Fig. 6 Effect of AGTF on expression of GLUT9 in kidney of HUA rats (× 400)

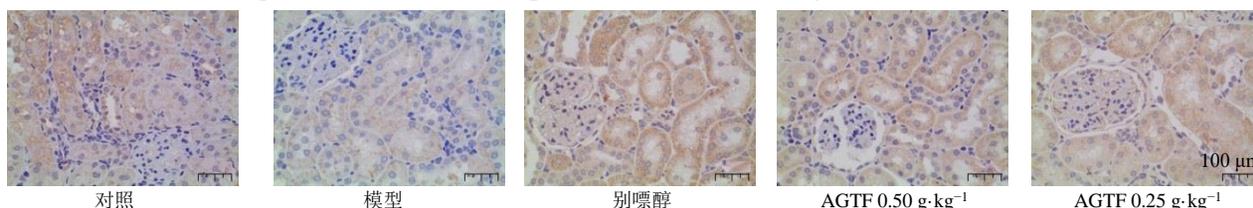


图7 AGTF对HUA大鼠肾脏组织ABCG2蛋白表达的影响(×400)

Fig. 7 Effect of AGTF on expression of ABCG2 in kidney of HUA rats (× 400)

表6 AGTF对HUA大鼠肾脏组织URAT1、GLUT9和ABCG2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of AGTF on expressions of URAT1, GLUT9, and ABCG2 in kidney of HUA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	吸光度值		
		URAT1	GLUT9	ABCG2
对照	—	0.248 9 ± 0.004 5	0.232 0 ± 0.003 4	0.244 2 ± 0.003 7
模型	—	0.259 2 ± 0.004 6*	0.246 4 ± 0.004 8**	0.237 1 ± 0.005 6**
别嘌醇	0.05	0.241 6 ± 0.002 0 [#]	0.235 8 ± 0.001 7 [#]	0.251 8 ± 0.007 6 [#]
AGTF	0.50	0.245 9 ± 0.003 0 [#]	0.238 0 ± 0.003 0 [#]	0.250 0 ± 0.005 2 [#]
	0.25	0.249 0 ± 0.003 5 [#]	0.237 8 ± 0.006 0 [#]	0.251 8 ± 0.005 6 [#]

泄,从而减轻尿酸盐沉积对肾脏组织的损伤,起到保护肾脏组织的作用。

4 讨论

近年来,由于饮食习惯和生活条件的改变,人们大量摄入高嘌呤食物,HUA患病率逐年增加,成为仅次于糖尿病严重危害人类健康的“第四高”。肾功能损伤是HUA临床最常见并发症之一,尿酸是嘌呤代谢的最终产物^[28],尿酸的生成与排泄之间的失衡是直接诱导HUA肾功能损伤的主要原因,维持正常的血尿酸水平对预防肾脏疾病的发生发展具有重要的临床意义。藤茶作为多民族地区药食保健资源具有丰富的活性成分,其开发价值较大。

XOD和ADA是尿酸生成途径中的重要靶蛋白,在嘌呤分解代谢过程中发挥着重要作用,抑制其活性可以有效控制血清尿酸水平。肾脏是尿酸排

泄的主要器官^[29-30],由于尿酸不能自由通过细胞膜,肾小管上皮细胞上的尿酸转运蛋白URAT1、GLUT9和ABCG2参与尿酸盐的分泌与重吸收,为肾脏调节尿酸代谢的重要靶点^[31]。本研究将AGTF主要活性成分与HUA的5个潜在治疗靶点(URAT1、GLUT9、ABCG2、XOD、ADA)进行分子对接模拟,结果显示AGTF中主要活性成分二氢杨梅素、杨梅素、槲皮素和藤茶素与疾病相关靶点均具有较好的结合活性,表明这些成分可能是AGTF中改善HUA及其肾功能损伤的潜在药效物质。其中,藤茶素的对接得分最高,其次是二氢杨梅素,目前对藤茶素的药理活性研究较少,而二氢杨梅素作为AGTF的主要活性成分,除了在降血糖、调血脂、抑菌、抗炎、镇痛、抗氧化、抗肿瘤、保肝护肝、免疫调节等方面具有较好的药理活性^[32-33],

还能够显著降低小鼠血清中尿酸水平,具有保护和治疗肾脏损伤的作用^[34]。对接结果还发现,别嘌醇与5个受体蛋白都能自由结合,其中与XOD靶点的结合能最小,表明别嘌醇与XOD的相互作用最强,与其能够抑制XOD从而减少尿酸产生的报道一致^[35]。与别嘌醇的对接结果相比,AGTF的主要活性成分与5个受体蛋白发生相互作用的可能性均高于别嘌醇,提示AGTF在抗HUA及其肾功能损伤方面具有潜在的临床应用价值,AGTF可能通过二氢杨梅素、杨梅素、槲皮素和藤茶素等活性成分作用于URAT1、GLUT9、ABCG2、ADA和XOD靶点,发挥治疗HUA肾功能损伤的药效作用,体现了中药多成分、多靶点的特点。

基于分子对接结果,本研究采用腺嘌呤和乙醇胺复合建立大鼠HUA肾功能损伤模型,通过体内实验进一步探讨了AGTF对HUA肾功能损伤的保护作用及机制。结果表明,AGTF组大鼠血清中XOD、ADA活性和尿酸、肌酐、尿素氮水平均显著降低,肾脏组织病理学改变明显减轻,表明AGTF具有较好的降低血尿酸水平、改善尿酸代谢、减轻高尿酸盐沉积对肾脏组织损伤的作用,其作用机制可能与调节尿酸盐转运蛋白URAT1、GLUT9和ABCG2表达,抑制炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和TGF- β 蛋白表达等途径有关。AGTF一方面能明显抑制URAT1、GLUT9转运蛋白的表达,阻碍肾近曲小管尿酸盐的重吸收;另一方面通过上调ABCG2转运蛋白的表达,增强肾近曲小管外侧膜上的尿酸盐转运速率,促进肾脏尿酸盐的排泄,协同降低尿酸水平、减少尿酸盐在肾小管的沉积,从而减轻肾功能损伤。过多的尿酸盐在肾脏的堆积会刺激肾小管上皮细胞,促进局部炎症反应,导致肾间质纤维化,AGTF能够显著降低大鼠肾脏中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和TGF- β 的蛋白表达,抑制炎症反应,保护肾功能,延缓肾脏间质纤维化。

综上所述,本研究通过分子对接技术结合体内实验,发现AGTF不仅能够调节尿酸盐转运蛋白URAT1、GLUT9和ABCG2的表达,降低大鼠血清中尿酸代谢相关指标水平,有效改善HUA和肾脏病理反应,同时还能抑制肾脏炎症反应,发挥对HUA肾功能损伤的保护作用。与分子对接结果一致,AGTF能够直接作用于XOD、ADA、URAT1、GLUT9、ABCG2关键靶蛋白,从而发挥其治疗作用,表明分子对接结果具有可靠性和合理性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李宇轩,李笑,于学成,等. 当归拈痛汤对高尿酸血症性肾病小鼠肾脏保护作用的研究 [J]. 陕西中医, 2019, 40(9): 1155-1157.
- [2] 谭德敏. 高尿酸血症对足细胞及相关分子podocalyxin、podocin的影响及刺五加水煎液对其保护作用的研究 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2017.
- [3] 郭永平,汪年松. 高尿酸血症肾脏损害的药物治疗进展 [J]. 世界临床药物, 2018, 39(10): 649-654.
- [4] 奉艳花,覃洁萍,王淼,等. 不同干燥方法对藤茶主要活性成分二氢杨梅素的影响研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(8): 1483-1487.
- [5] 刘建兰,郑红岩,于华忠,等. 双波长分光光度法检测藤茶中的总黄酮 [J]. 分析科学学报, 2013, 29(6): 876-878.
- [6] 刘慧颖,崔秀明,刘迪秋,等. 显齿蛇葡萄的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(27): 135-138.
- [7] 冯淳,张妮,周大颖,等. HPLC测定显齿蛇葡萄叶中4种黄酮类化合物的含量 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 240-245.
- [8] Xiao H, Zheng X J. Response surface analysis for optimization of comprehensive extraction of flavonoid and polysaccharide in fermented *Ampelopsis grossedentata* [J]. *J Chin Mater Med*, 2013, 36(12): 2028-2033.
- [9] 白秀秀,夏广萍,赵娜夏,等. 张家界产莓茶中的酚性化学成分 [J]. 中药材, 2013, 36(1): 65-67.
- [10] 杨天友,李刚凤,熊冬华,等. 梵净山野生藤茶营养成分分析 [J]. 食品工业, 2017, 38(4): 278-280.
- [11] 李自强,覃丽,牛丽,等. 藤茶对心血管保护作用的研究进展 [J]. 食品科技, 2019, 44(5): 97-101.
- [12] Fan L, Qu X, Yi T, et al. Metabolomics of the protective effect of *Ampelopsis grossedentata* and its major active compound dihydromyricetin on the liver of high-fat diet hamster [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2020, 2020: 3472578.
- [13] Zheng X J, Xiao H, Zeng Z, et al. Composition and serum antioxidation of the main flavonoids from fermented vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) [J]. *J Funct Foods*, 2014, 9: 290-294.
- [14] 廖寅平,王硕,安丰轩,等. 藤茶降血压作用研究 [J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(17): 229-230.
- [15] 陈玉琼,倪德江,程倩,等. 藤茶总黄酮及二氢杨梅素降血脂作用研究 [J]. 茶叶科学, 2007, 27(3): 221-225.
- [16] 曾宪彪,韦桂宁,何飞,等. 藤茶总黄酮对动脉粥样硬化

- 化大鼠血脂及血液流变学的影响 [J]. 重庆医学, 2014, 43(5): 518-520.
- [17] 谭胜蓝, 陈磊, 何桂霞, 等. 二氢杨梅素心血管保护作用的研究进展 [J]. 中南药学, 2017, 15(3): 339-343.
- [18] Liu J, Shu Y, Zhang Q, *et al.* Dihydromyricetin induces apoptosis and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4): 1645-1651.
- [19] 卢忠英, 郁建平, 陈仕学, 等. 藤茶提取物中二氢杨梅素对大鼠急性痛风性关节炎模型的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(4): 396-399.
- [20] 王雪洁. 菊苣治疗高尿酸血症多靶点作用机制的分子对接研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [21] 尹志刚. 靶向 hURAT1 药物筛选模型的构建及初步应用 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [22] 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, 28(3): 603-611.
- [23] 冯涵, 李娜, 王华林, 等. 藤茶中黄酮类成分的药效研究进展 [J]. 公共卫生与预防医学, 2018, 29(1): 82-86.
- [24] 杜格, 蒋雨彤, 古洁若. 降尿酸药物研究进展 [J]. 新医学, 2017, 48(6): 369-374.
- [25] 何敏婉. 加味五苓散对实验性高尿酸血症大鼠肾损害的防治研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2011.
- [26] 徐萌. 基于“肠道菌群-宿主”交互的助脾散精法对 DGP 大鼠胰岛损伤修复影响的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [27] 陶梦敏. “酒蒸黄连-石菖蒲”组分抗糖尿病认知功能障碍配伍规律研究 [D]. 成都: 西南民族大学, 2019.
- [28] 张璐, 杨定位. 高尿酸血症肾病的诊治进展 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2019, 13(6): 457-462.
- [29] 党院霞, 梁丹灵, 周欣欣, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1175-1181.
- [30] So A, Thorens B. Uric acid transport and disease [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6): 1791-1799.
- [31] 覃媛媛. 抑酸复合茶对高尿酸血症大鼠的防治作用及机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [32] 卢忠英, 方可, 陈仕学. 藤茶中二氢杨梅素的药理作用研究进展 [J]. 广州化工, 2015, 43(7): 16-17.
- [33] 方静, 王元霞, 刘传梦, 等. 藤茶中双氢杨梅树皮素药理作用的研究进展 [J]. 广西医学, 2020, 42(12): 1577-1581.
- [34] 李广枝, 卢忠英, 徐敬友, 等. 藤茶二氢杨梅素对小鼠高尿酸血症模型的降尿酸作用 [J]. 山地农业生物学报, 2014, 33(4): 40-42.
- [35] 刘永贵, 赵丽嘉, 崔艳丽, 等. 抗高尿酸血症药物研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(3): 345-350.

[责任编辑 李亚楠]