

# 牡丹花总黄酮对痛风性肾病大鼠NLRP3炎症小体及炎症因子表达的影响

白莉, 刘广运, 魏湘萍, 李宁, 张晓萍, 苗明三\*  
(河南中医药大学, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:探究牡丹花总黄酮对大鼠痛风性肾病模型保护作用的可能机制。为治疗痛风性肾病的药物研究提供科研数据支撑。方法:使用腺嘌呤合并乙胺丁醇复制大鼠痛风性肾病模型,大鼠随机每12只分为空白组、模型组、别嘌醇组( $42\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、阳性药痛风舒片组( $600\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、牡丹花总黄酮高、中、低剂量组(TFPF, 260、130、65  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ );酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-18(IL-18)含量,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠肾脏组织匀浆中转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、IL-1 $\beta$ 含量;苏木素-伊红(HE)染色观察肾脏组织细胞形态变化;原位末端标记法(TUNEL)观察肾脏组织细胞DNA损伤情况;免疫组化法观察肾脏NOD样受体蛋白3(NLRP3)、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)、IL-1 $\beta$ 蛋白表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾脏组织中NLRP3、Caspase-1、核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)蛋白的表达量。结果:与空白组比较,模型组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18含量均显著增加( $P<0.01$ ),模型组大鼠肾脏NLRP3、Caspase-1、NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 表达量均显著升高( $P<0.01$ ),肾组织细胞呈现胞质肿胀、细胞膜破裂,细胞核固缩断裂数量增加,模型组大鼠肾组织细胞TUNEL染色阳性率显著升高( $P<0.01$ ),大鼠肾组织匀浆中IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta_1$ 的含量均显著上升( $P<0.01$ );与模型组比较,牡丹花总黄酮高、中剂量组可不同程度的降低大鼠血清中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18含量( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),牡丹花总黄酮高剂量组MCP-1含量明显降低( $P<0.01$ ),牡丹花总黄酮高、中剂量组明显降低肾组织匀浆中TGF- $\beta_1$ 含量( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),牡丹花总黄酮中剂量组肾组织匀浆中IL-1 $\beta$ 含量显著降低( $P<0.01$ );HE染色显示牡丹花总黄酮各剂量组可不同程度的改善肾小管上皮细胞状态,减轻胞质肿胀,细胞核固缩的数量;降低肾组织细胞TUNEL染色阳性率( $P<0.01$ ),肾脏细胞DNA损伤减少;抑制肾脏组织细胞中NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B蛋白的表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:牡丹花总黄酮对痛风性肾病模型大鼠的肾脏保护作用与抑制炎症因子分泌相关,其抗炎作用机制可能是通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路与NLRP3/Caspase-1通路的活化,从而下调IL-1 $\beta$ 、IL-18等炎症因子表达、成熟及释放,遏制肾脏细胞程序性死亡的初始阶段细胞焦亡的发生,从而逆转痛风性肾病肾脏的炎症损伤。

**[关键词]** 痛风性肾病;牡丹花总黄酮;NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体;胱天蛋白酶-1(Caspase-1);细胞焦亡

**[中图分类号]** R2-0;R33;R289;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0043-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220939

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220314.0905.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-15 9:04

## Total Flavonoids of Peony Flower Regulate NLRP3 Inflammasome and Expression of Inflammatory Cytokines in Gouty Nephropathy Rats

BAI Li, LIU Guang-yun, WEI Xiang-ping, LI Ning, ZHANG Xiao-ping, MIAO Ming-san\*  
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the possible mechanism of total flavonoids of peony flower (TFPF)

**[收稿日期]** 2021-11-22

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(80274038);河南省药品监督管理局科技计划项目(2020DB135);河南省高等教育教学改革研究与实践项目(2019SJGLX305);河南省高等学校重点科研项目(21A360016);河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2020GGJS110)

**[第一作者]** 白莉,博士,副教授,从事中药药理研究,E-mail:baili64@163.com

**[通信作者]** \*苗明三,博士,教授,博士生导师,从事中药药理研究,E-mail:miaomingsan@163.com

in protecting rats from gouty nephropathy and provide data support for the pharmaceutical research on the treatment of gouty nephropathy. **Method:** Gouty nephropathy rat model was established by adenine combined with ethambutol. Rats were randomly assigned into blank control group, model group, allopurinol ( $42 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) group, Tongfengshu tablets ( $600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , positive control) group, and TFPF ( $260$ ,  $130$ , and  $65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) groups. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), and interleukin-18 (IL-18) in rat serum and those of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) and IL- $1\beta$  in renal homogenate. Hematoxylin-eosin (HE) staining was carried out for observation of the morphological changes of renal cells. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) was conducted for observation of the DNA damage in renal cells. The expression of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), cysteine aspartic acid protease (Caspase)-1 and IL- $1\beta$  were observed by immunohistochemistry. The expression levels of NLRP3, Caspase-1 and nuclear transcription factor - $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) in renal tissues were detected by Western blot. **Result:** Compared with blank group, the contents of TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL- $1\beta$ , IL-18, and TGF- $\beta_1$  in serum of model group were significantly increased ( $P<0.01$ ), and the expressions of NLRP3, Caspase-1, NF- $\kappa\text{B}$  and IL- $1\beta$  in kidney of model group were significantly increased ( $P<0.01$ ). The renal tissue cells showed cytoplasmic swelling, cell membrane rupture, and the number of nuclear pyknotic fracture increased. The positive rate of TUNEL staining was significantly increased in model group ( $P<0.01$ ), and the contents of IL- $1\beta$  and TGF- $\beta_1$  in renal tissue homogenate were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the contents of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$  and IL-18 in serum of rats in TFPF high- and medium-dose groups could be decreased to different degrees ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while the content of MCP-1 in TFPF high-dose group was significantly decreased ( $P<0.01$ ). The content of TGF- $\beta_1$  in renal tissue homogenate in TFPF high- and medium-dose groups was significantly decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the content of IL- $1\beta$  in renal tissue homogenate in TFPF medium-dose group was significantly decreased ( $P<0.01$ ). HE staining showed that each dose group of TFPF could improve the status of renal tubular epithelial cells, reduce cytoplasmic swelling and the number of nuclear pyknosis to varying degrees. The positive rate of TUNEL staining was decreased ( $P<0.01$ ) and DNA damage was decreased. The expression of NLRP3, Caspase-1, IL- $1\beta$  and NF- $\kappa\text{B}$  protein in renal tissue cells was inhibited ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** TFPF protects rats from gouty nephropathy by inhibiting the secretion of inflammatory cytokines. Specifically, it may inhibit the activation of NF- $\kappa\text{B}$  and NLRP3/Caspase-1 pathways to reduce the expression, maturation, and release of inflammatory cytokines such as IL- $1\beta$  and IL-18 and further inhibit pyroptosis, thereby reversing the inflammatory injury of kidney in gouty nephropathy.

**[Keywords]** gouty nephropathy; total flavonoids of peony flower; NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome; cysteine aspartic acid protease (Caspase)-1; pyroptosis

痛风性肾病(GN)是由嘌呤代谢紊乱及肾组织因此损伤的肾脏疾病。肾脏病变的发生是长期高尿酸血症发展的结果,高尿酸血症患者肾脏病理检查几乎均有不同程度的损伤<sup>[1-4]</sup>。尿酸盐结晶可刺激诱导NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体装配完成,并激活胱天蛋白酶-1(Caspase-1)信号通路,继而诱导多种炎症因子如白细胞介素(IL)- $1\beta$ 、IL-18的释放。NLRP3炎症小体在痛风性关节炎、GN的炎症反应中起着关键性作用<sup>[5]</sup>。

别嘌醇是临床治疗痛风性疾病的代表性药物,

该类药物可在较短时间内降低尿酸水平,但停药后易反复,且肾脏保护作用较弱。中医药对治疗痛风性肾病具独特经验和优势<sup>[6]</sup>,临床多使用具有健脾益肾、温肾健脾及清热利湿补肾功效的中药及复方<sup>[7]</sup>。牡丹花是毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* 的花。传统中药材常使用牡丹干燥的根皮——牡丹皮入药。牡丹皮是河南传统豫药之一,也是经典名方六味地黄丸的主要组成。牡丹全株均有药用价值,并且牡丹花花期较长,采收加工较易,可以作为研究的重点部分。现代研究表明,牡

丹花中多酚、黄酮类成分具有杀菌、活血、抗氧化等多种生物作用<sup>[8-12]</sup>。课题组前期研究显示,牡丹花总黄酮(TFPF)能抑制多种GN动物模型尿酸的升高,促进尿酸的排泄,同时也能抑制多种炎症因子的分泌,对GN模型动物肾脏具有保护作用。本项目拟从NLRP3炎症小体介导的炎症反应探究其可能的保护机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性SD大鼠84只,体质量190~210 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,合格证号SCXK(鲁)2019-0003。经河南中医药大学伦理委员会批准,批号DWLL201903009,河南中医药大学动物实验中心许可证号SYXK(豫)2020-0004。动物在SPF级条件下饲养,饲养于河南中医药大学动物实验中心。饲养条件为温度(21±2)℃,湿度(60±10)%,12 h/12 h光照黑暗循环。

**1.2 药物与试剂** TFPF由河南中医药大学药理实验室制备,以芦丁为对照品(纯度>98%),紫外分光光度计法测定含量为53.2%,并且配置成高、中、低3个剂量(260、130、65 mg·kg<sup>-1</sup>),配置方法(按照紫外分光光度计含量测定结果,称量所需质量加入对应浓度所需一级水,超声处理);腺嘌呤、聚山梨酯-20、SDS、甘氨酸(北京Solarbio公司,批号分别为1014G051、1121S017、723T032、20260323);乙胺丁醇(上海上药信谊药厂有限公司,国药准字H31021140,批号063180757);别嘌醇缓释胶囊(黑龙江澳利达奈德制药有限公司,批号19070907);痛风舒片(山西仁源堂药业有限公司,批号20180706);氯化钠注射液(CMC-Na,津市光复精细化工研究所,批号20160728B);辣根过氧化物酶(HRP)标记免疫球蛋白(Ig)G(万类生物科技有限公司,批号21A109);核转录因子-κB(NF-κB)抗体(北京Bioss公司,批号AE070118);兔Caspase-1抗体(美国Proteintech公司,批号00085989);NLRP3抗体(武汉Boster公司,批号BOS3539BP342);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0105S、C1091);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号AH11286487);肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、IL-18、IL-1β、转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司,批号均为E2020101A)。

**1.3 仪器** PowerPac™型电泳仪(上海伯乐生命医学产品有限公司);Scientz08-III型非接触式超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);FLuorchem E型超灵敏化学发光成像系统(美国Protein Simple公司);BX61型电动显微镜(日本Olympus公司);680680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);Forma 900系列超低温冰箱(美国Thermo Fisher公司);KDC-160HR型高速冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司);UV1901型紫外-可见分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与给药** 84只大鼠自由进食和饮水,光照12 h/d。动物适应性饲养3 d后随机分为7组,分别为空白组、模型组、别嘌醇组(42 mg·kg<sup>-1</sup>)、痛风舒片组(600 mg·kg<sup>-1</sup>)、TFPF高、中、低剂量组(参照预实验结果以及前期成果设计给药剂量依次为260、130、65 mg·kg<sup>-1</sup>),每组12只。实验期间,除空白组外其余各组大鼠每天灌胃腺嘌呤(100 mg·kg<sup>-1</sup>)和乙胺丁醇(250 mg·kg<sup>-1</sup>)混悬液(0.5% CMC-Na),空白组给予同体积0.5% CMC-Na溶液,连续23 d,复制大鼠痛风性肾病模型<sup>[13-16]</sup>。造模第5天开始给予药物,各组灌胃给予药物,空白组、模型组每天给予同体积纯水。给药体积均为10 mL·kg<sup>-1</sup>。

**2.2 大鼠一般情况观察** 实验期间每天观察各组大鼠毛色、神态、摄食量、进水量、尿量、行为活动等一般情况,每5 d称量大鼠体质量1次,包括分组时及取材前大鼠的体质量。

**2.3 ELISA检测大鼠血清中TNF-α、MCP-1、IL-1β、IL-18含量** 末次给药2 h后,大鼠称质量麻醉后进行腹主动脉取血。静置0.5 h后,4℃、3 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径6 cm),取上清液,存于-40℃备用。按照各试剂盒说明书进行含量测定,ELISA检测大鼠血清中TNF-α、MCP-1、IL-1β、IL-18含量。

**2.4 ELISA检测大鼠肾脏组织匀浆中TGF-β<sub>1</sub>、IL-1β含量** 将大鼠右侧肾脏取出,称量后制备肾组织匀浆。通过ELISA对肾脏组织匀浆中TGF-β<sub>1</sub>、IL-1β含量进行测定。

**2.5 大鼠肾脏HE、TUNEL染色** 大鼠肾脏组织固定于10%甲醛溶液中,进行石蜡包埋及切片后,HE染色,在光镜下观察各脏器组织形态学变化。显微镜下观察:正常细胞核显蓝色,TUNEL阳性细胞核染棕黄色。400倍光镜下,每组选取互不连接的10个视野,统计TUNEL阳性细胞,计算阳性率。阳性率=TUNEL阳性细胞数/细胞总数×100%。

**2.6 免疫组化法检测大鼠肾脏组织中NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 蛋白表达** 将大鼠左侧肾脏迅速取出后,在冰上切取约1/2左右用10%甲醛固定,免疫组化法对肾脏组织中NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 蛋白的表达量进行测定,即采用Image Pro Plus 6.0软件分析其阳性表达的吸光度A。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾脏组织NLRP3、Caspase-1、NF- $\kappa$ B蛋白的表达** 每组随机取3只大鼠,取肾,提取肾组织细胞蛋白,使用BCA法测定蛋白浓度,采用RIPA裂解液将各样本质量浓度调至2 g·L<sup>-1</sup>。按照PAGE凝胶试剂盒(10.0%)说明书制备凝胶并按顺序上样10  $\mu$ L,其中Marker每孔上样量3  $\mu$ L,其余各样本组织各上样10  $\mu$ L,保证样本组每孔上样量为20  $\mu$ g。开始电泳,后转膜。加入脱脂牛奶(浓度5%,1 $\times$ TBST配制)封闭后裁剪,在依次按时加入一抗,稀释倍数分别为NLRP3(1:2 000)、Caspase-1(1:2 500)、NF- $\kappa$ B(1:2 000),

内参兔抗 $\beta$ -actin(1:2 000)。之后采用二抗孵育1 h(1:5 000),洗膜,最终进行显色,采用Image J进行结果分析。

**2.8 统计学处理** 运用SPSS 21.0统计软件对实验数据进行分析、处理和统计,各组间比较采用单因素方差分析,方差齐则用最小显著性差异法(LSD),方差不齐则用Games-Howell法检验,两独立样本比较用t检验,以P<0.05表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠血清TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18含量的影响** 与空白组比较,模型组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18的含量均显著增加(P<0.01);与模型组比较,别嘌醇组、痛风舒片组、TFPF高、中剂量组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18的含量均明显降低(P<0.05, P<0.01),痛风舒片组、别嘌醇组、TFPF高剂量组大鼠血清中MCP-1的含量明显降低(P<0.05, P<0.01)。见表1。

表1 TFPF对大鼠血清TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18含量的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	MCP-1	IL-1 $\beta$	IL-18
空白组	12		270.98 $\pm$ 19.60	612.68 $\pm$ 47.22	22.15 $\pm$ 3.18	124.69 $\pm$ 10.80
模型组	10		325.82 $\pm$ 26.74 <sup>2)</sup>	743.91 $\pm$ 68.60 <sup>2)</sup>	31.86 $\pm$ 3.42 <sup>2)</sup>	160.11 $\pm$ 15.06 <sup>2)</sup>
别嘌醇组	11	42	303.84 $\pm$ 19.90 <sup>3)</sup>	664.43 $\pm$ 61.91 <sup>3)</sup>	28.51 $\pm$ 1.94 <sup>3)</sup>	144.39 $\pm$ 14.89 <sup>3)</sup>
痛风舒片组	12	600	284.24 $\pm$ 16.28 <sup>4)</sup>	649.46 $\pm$ 53.07 <sup>4)</sup>	24.66 $\pm$ 2.41 <sup>4)</sup>	140.24 $\pm$ 11.61 <sup>4)</sup>
TFPF高剂量组	11	260	305.58 $\pm$ 15.57 <sup>3)</sup>	678.26 $\pm$ 53.59 <sup>3)</sup>	28.31 $\pm$ 2.47 <sup>3)</sup>	140.89 $\pm$ 17.45 <sup>3)</sup>
TFPF中剂量组	12	130	296.21 $\pm$ 23.00 <sup>3)</sup>	706.52 $\pm$ 43.29	25.46 $\pm$ 2.34 <sup>4)</sup>	142.37 $\pm$ 15.27 <sup>3)</sup>
TFPF低剂量组	12	65	309.47 $\pm$ 16.01	718.12 $\pm$ 50.63	29.51 $\pm$ 1.87	151.69 $\pm$ 15.57

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01,与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表2-表5同)

**3.2 对大鼠肾组织匀浆中IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ <sub>1</sub>含量的影响** 与空白组比较,模型组大鼠肾组织中IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ <sub>1</sub>的含量增加,差异具有显著统计学意义(P<0.01);与模型组比较,别嘌醇组、痛风舒片组、TFPF

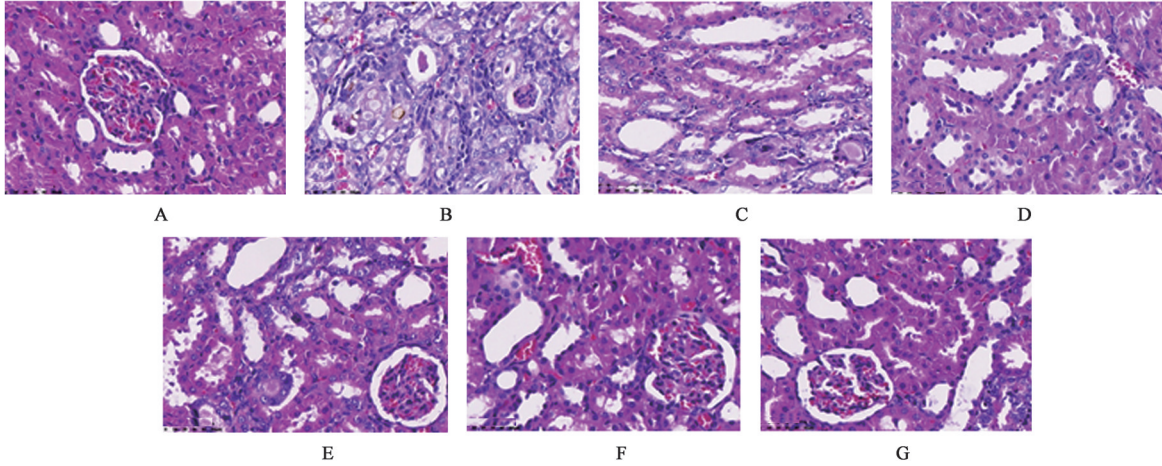
中剂量组大鼠肾组织中IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ <sub>1</sub>的含量均有不同程度的降低(P<0.05, P<0.01),TFPF高剂量组TGF- $\beta$ <sub>1</sub>的含量显著降低,差异具有显著统计学意义(P<0.01)。见表2。

表2 TFPF对大鼠肾匀浆IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ <sub>1</sub>水平的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>	TGF- $\beta$ <sub>1</sub> / $\mu$ g·L <sup>-1</sup>
空白组	12		338.06 $\pm$ 24.50	870.34 $\pm$ 56.77
模型组	10		387.52 $\pm$ 19.54 <sup>2)</sup>	947.77 $\pm$ 47.97 <sup>2)</sup>
别嘌醇组	11	42	351.76 $\pm$ 17.32 <sup>4)</sup>	798.87 $\pm$ 44.01 <sup>4)</sup>
痛风舒片组	12	600	350.13 $\pm$ 18.84 <sup>4)</sup>	841.25 $\pm$ 52.45 <sup>4)</sup>
TFPF高剂量组	11	260	369.33 $\pm$ 22.00	849.50 $\pm$ 50.85 <sup>4)</sup>
TFPF中剂量组	12	130	347.59 $\pm$ 19.47 <sup>4)</sup>	883.75 $\pm$ 63.47 <sup>3)</sup>
TFPF低剂量组	12	65	376.63 $\pm$ 22.72	936.96 $\pm$ 41.54

3.3 对大鼠肾脏组织病理形态学变化的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾脏组织细胞呈现胞质肿胀、细胞膜破裂,细胞核固缩断裂数量增加;与模型

组比较,TFPF各剂量组大鼠肾小管上皮细胞细胞形态较为完整,细胞核固缩、断裂的数量明显减少。见图1。



注:A. 空白组;B. 模型组;C. 别嘌醇组;D. 痛风舒片组;E. TFPF高剂量组;F. TFPF中剂量组;G. TFPF低剂量组(图2-图6同)

图1 TFPF对大鼠肾组织细胞形态的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of TFPF on cells of rat kidney tissue (HE,×400)

3.4 对大鼠肾组织细胞DNA损伤的影响 TUNEL染色显示,空白组仅见少量阳性细胞,与空白组比较,模型组大鼠肾组织细胞阳性率显著升高,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,别嘌醇组、痛风舒片组、TFPF高、中、低剂量组大鼠肾组织细胞阳性率均显著降低( $P<0.01$ ),表示TFPF各剂量组大鼠DNA断裂损伤细胞数量降低。见表3、图2。

表3 TFPF对大鼠GN模型肾组织细胞阳性率的影响( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

Table 3 Effect of TFPF on positive rate of kidney cells in GN model rats ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	阳性率/%
空白组		4.62±0.90
模型组		25.41±1.42 <sup>2)</sup>
别嘌醇组	42	18.61±1.64 <sup>4)</sup>
痛风舒片组	600	17.08±1.33 <sup>4)</sup>
TFPF高剂量组	260	17.18±1.67 <sup>4)</sup>
TFPF中剂量组	130	17.03±1.66 <sup>4)</sup>
TFPF低剂量组	65	17.80±1.11 <sup>4)</sup>

3.5 对大鼠肾脏中炎症小体相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾脏NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 表达量均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,TFPF高、中、低剂量组大鼠肾脏NLRP3表达量均明显降低( $P<0.05$ );TFPF高、中剂量组大鼠肾脏

Caspase-1表达量均明显降低( $P<0.05$ ),IL-1 $\beta$ 表达量明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见图3-图5、表4。

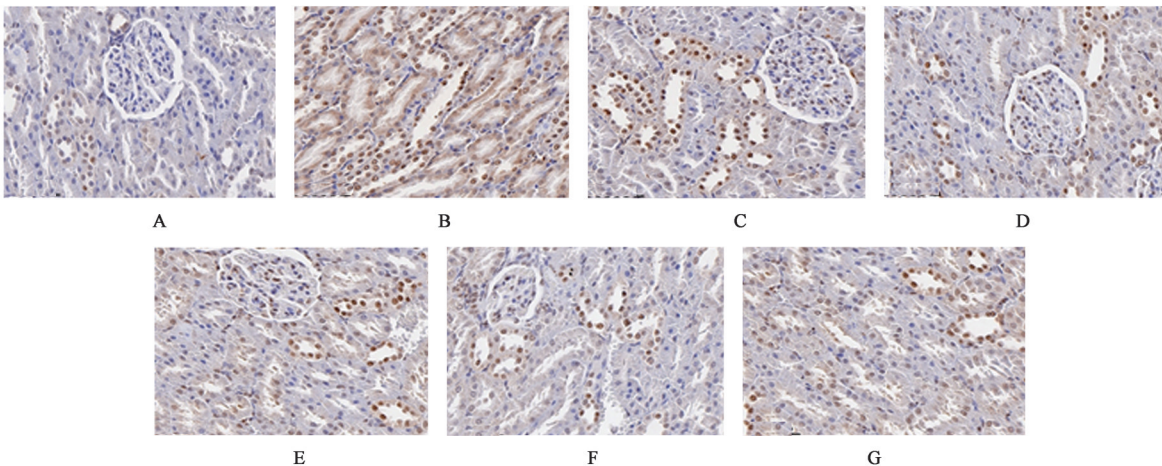


图2 TFPF对大鼠肾组织细胞DNA损伤的影响(TUNEL,×400)

Fig. 2 Effect of TFPF on the DNA damage of rats kidney cells (TUNEL,×400)

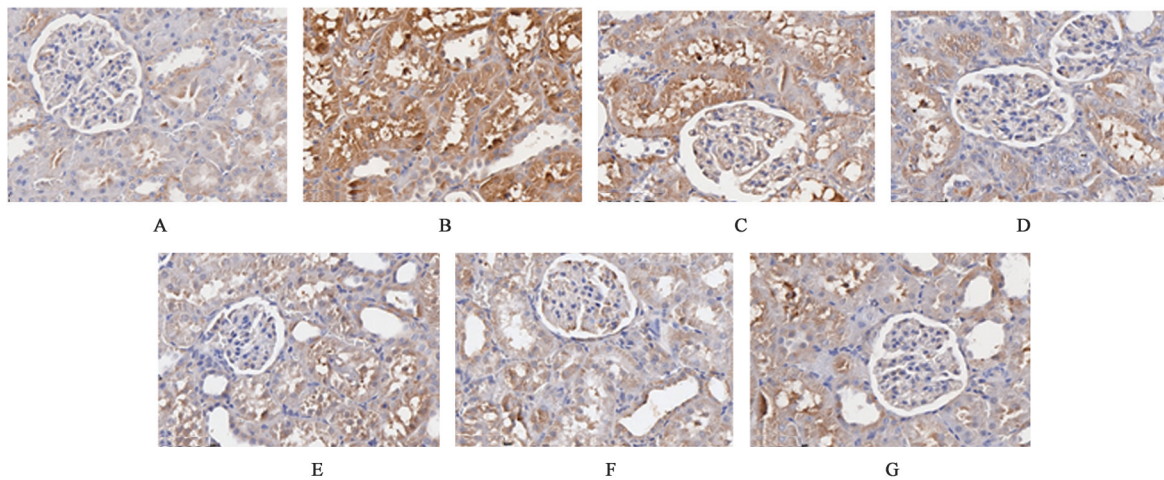


图3 TFPF对大鼠肾脏NLRP3蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of TFPF on NLRP3 protein expression in rats kidney (IHC,×400)

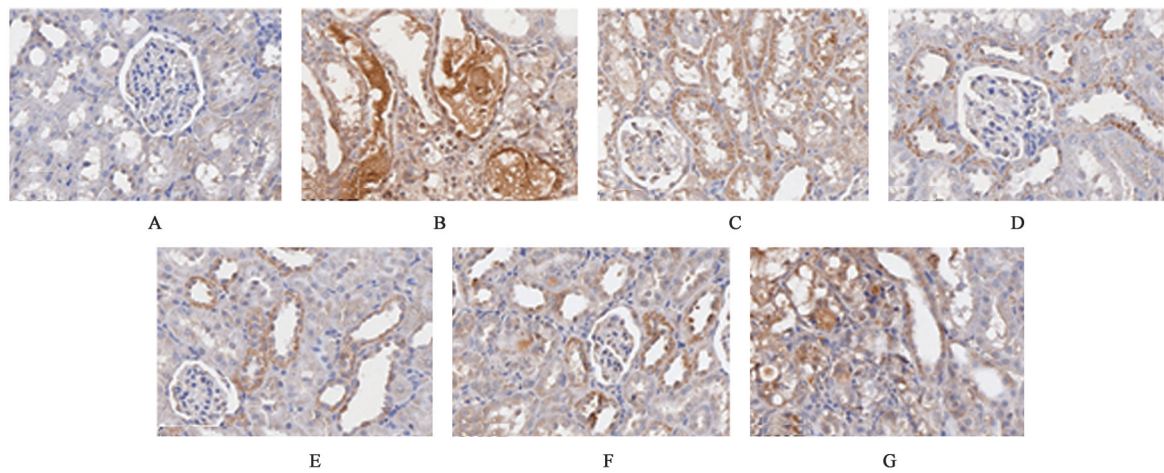


图4 TFPF对大鼠肾脏IL-1β蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of TFPF on IL-1β protein expression in rats kidney (IHC,×400)

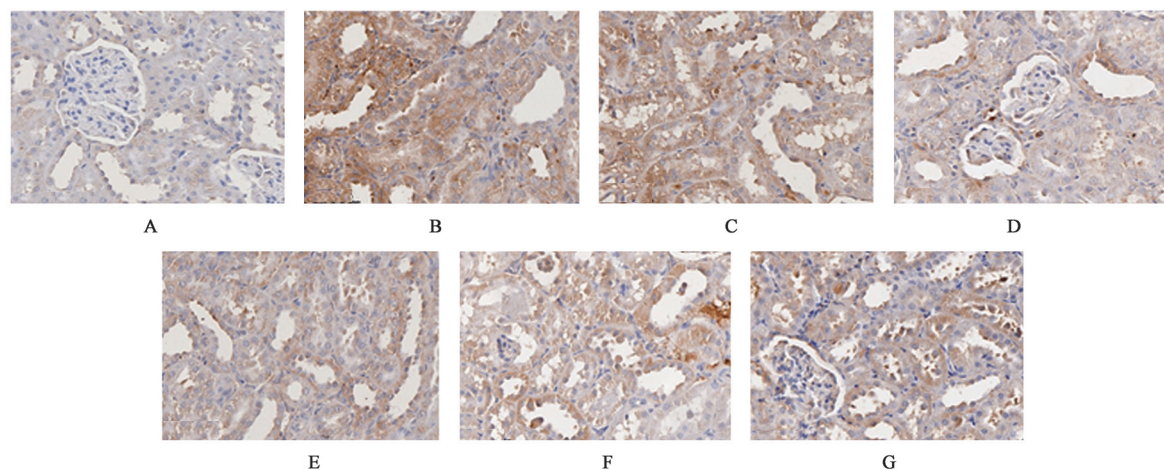


图5 TFPF对大鼠肾脏Caspase-1蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of TFPF on Caspase-1 protein expression in rats kidney (IHC,×400)

3.6 对大鼠肾脏组织NLRP3炎症小体相关信号通路的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾脏NLRP3、Caspase-1、NF-κB表达量均显著升高( $P <$

0.01);与模型组比较,TFPF高、中剂量组大鼠肾脏NLRP3、NF-κB、Caspase-1蛋白表达均有不同程度降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表5、图6。

表4 TFPF对大鼠肾脏中NLRP3、IL-1 $\beta$ 、Caspase-1蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Effect of TFPF on NLRP3, IL-1 $\beta$  and Caspase-1 protein expression in rats kidney ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	NLRP3	IL-1 $\beta$	Caspase-1
空白组	12		18.77 $\pm$ 3.56	23.50 $\pm$ 3.62	22.07 $\pm$ 4.89
模型组	10		36.70 $\pm$ 3.70 <sup>2)</sup>	31.20 $\pm$ 2.91 <sup>2)</sup>	37.53 $\pm$ 3.39 <sup>2)</sup>
别嘌醇组	11	42	34.13 $\pm$ 3.13	28.55 $\pm$ 3.61	35.16 $\pm$ 3.94
痛风舒片组	12	600	32.51 $\pm$ 4.06 <sup>3)</sup>	27.86 $\pm$ 3.73 <sup>3)</sup>	33.77 $\pm$ 3.87 <sup>3)</sup>
TFPF高剂量组	11	260	32.02 $\pm$ 3.97 <sup>3)</sup>	26.60 $\pm$ 2.38 <sup>4)</sup>	33.42 $\pm$ 4.02 <sup>3)</sup>
TFPF中剂量组	12	130	32.54 $\pm$ 3.50 <sup>3)</sup>	28.12 $\pm$ 3.00 <sup>3)</sup>	33.44 $\pm$ 4.00 <sup>3)</sup>
TFPF低剂量组	12	65	33.03 $\pm$ 3.89 <sup>3)</sup>	28.50 $\pm$ 4.43	34.78 $\pm$ 3.06

表5 TFPF对大鼠肾脏中NLRP3、NF- $\kappa$ B、Caspase-1蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of TFPF on NLRP3, IL-1 $\beta$  and Caspase-1 protein expression in rats kidney ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	NLRP3/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin	Caspase-1/ $\beta$ -actin
空白组		0.52 $\pm$ 0.11	0.76 $\pm$ 0.15	0.33 $\pm$ 0.06
模型组		0.91 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>	1.65 $\pm$ 0.27 <sup>2)</sup>	1.16 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>
别嘌醇组	42	0.67 $\pm$ 0.12	1.17 $\pm$ 0.24	0.92 $\pm$ 0.11
痛风舒片组	600	0.60 $\pm$ 0.13 <sup>3)</sup>	0.99 $\pm$ 0.15 <sup>3)</sup>	0.95 $\pm$ 0.12
TFPF高剂量组	260	0.52 $\pm$ 0.10 <sup>4)</sup>	1.11 $\pm$ 0.18 <sup>3)</sup>	0.89 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup>
TFPF中剂量组	130	0.58 $\pm$ 0.10 <sup>3)</sup>	1.15 $\pm$ 0.14 <sup>3)</sup>	0.65 $\pm$ 0.10 <sup>4)</sup>
TFPF低剂量组	65	0.64 $\pm$ 0.14	1.24 $\pm$ 0.20	0.91 $\pm$ 0.12

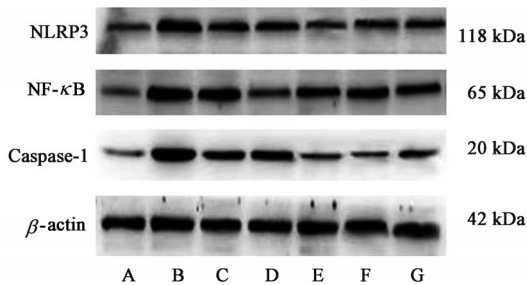


图6 大鼠肾脏NLRP3、Caspase-1、NF- $\kappa$ B蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-1, NF- $\kappa$ B protein expression in kidney of rats

#### 4 讨论

GN是由严重的高尿酸血症导致的肾损害疾病。其发病往往是因为尿酸的高生成低排泄,尿酸盐结晶大量堆积在肾脏中而造成肾脏组织损伤。本实验中选用腺嘌呤和乙胺丁醇联合模拟痛风性肾病模型,腺嘌呤代谢终产物即为尿酸可以模拟体内高尿酸水平;乙胺丁醇可抑制RNA的合成,可降低因大量摄入腺嘌呤引起细菌繁殖导致的样本死亡率。通过查阅文献及对临床上治疗痛风性肾病的药物进行分析筛选,选择黄嘌呤氧化酶(XO)抑制剂代表药物——别嘌醇,以及临床常用中成药痛风舒片作为阳性组。

GN的发病机制与代谢、免疫和炎症密切相关,

炎症细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IL-6等能够活化NF- $\kappa$ B并激活炎症和凋亡通路<sup>[17-18]</sup>。NF- $\kappa$ B信号通路激活后又可释放IL-1 $\beta$ 、IL-18、MCP-1等炎症因子表达,扩大炎症级联反应<sup>[19]</sup>。DIWAN等<sup>[20]</sup>对腺嘌呤诱导高尿酸血症模型大鼠组织检测,发现其肾脏出现纤维化,且程度与TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及氧化标记物的水平升高有关。在人体细胞实验中也发现类似的结果,即可溶性尿酸可刺激人近曲小管上皮细胞进而产生IL-18、MCP-1,而MCP-1通过迁移聚集于肾间质中,释放ROS和各种炎症因子及促纤维化因子,如IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 等,进而介导肾脏损伤<sup>[21-22]</sup>。本课题前期研究表明,TFPF具有较好的降低尿酸水平和肾脏保护作用。本实验复制了大鼠GN模型,TFPF可抑制多种炎症因子的表达与释放,显著降低大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平,降低肾组织细胞中IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta_1$ 含量,这提示TFPF很可能通过抑制炎症反应,减轻肾脏炎性损伤。TFPF抑制的炎症因子中,IL-1 $\beta$ 、IL-18的释放需要经Caspase-1剪切活化后才能完成,TFPF对其成熟释放是通过何种途径产生调节作用?课题组对其调节机制继续研究。

NLRP3炎性小体在肾脏疾病的炎症反应中有着十分重要的作用。ZHANG等<sup>[23]</sup>发现,和健康人

相比,GN患者外周血单核细胞中NLRP3炎性小体的表达上调、血浆中IL-1 $\beta$ 和IL-18的水平更高。CHEN等<sup>[24]</sup>研究揭示了NLRP3的激活在免疫和炎症信号通路中独特而重要的功能,其过度活化可导致多种疾病的发生。NF- $\kappa$ B信号通路活化及损伤相关分子模式(PAMPs)可为NLRP3提供激活信号,NLRP3与前体(pro)-Caspase-1通过接头蛋白ASC结合成为高分子复合物,即炎症小体。Caspase-1活化同时剪切pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18为成熟的炎症因子。GN模型大鼠肾组织中NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 的蛋白表达显著增高,且NF- $\kappa$ B蛋白上调趋势与之一致,这验证了GN模型中NLRP3炎症小体/Caspase-1信号通路与NF- $\kappa$ B信号通路之间相互影响。TFPF可有效下调NF- $\kappa$ B的表达,笔者推测TFPF通过抑制NF- $\kappa$ B活化,使得NLRP3炎症小体活化第一信号无法完成相关分子的量变积累,从而抑制NLRP3/Caspase-1信号通路,减少IL-1 $\beta$ 、IL-18的释放。实验结果与推测一致,TFPF可以显著下调肾脏组织中NLRP3、Caspase-1蛋白的表达,同时IL-1 $\beta$ 蛋白表达与血清释放也显著下降。这表明TFPF可能通过阻断NF- $\kappa$ B通路与NLRP3炎症小体信号通路之间的级联扩大效应,有效减轻炎症损伤。

NLRP3炎性小体/Caspase-1信号通路活化不仅能够诱发炎症因子的释放,同时也是一种最近发现的细胞程序性死亡方式——细胞焦亡的重要激活通路<sup>[25]</sup>。细胞焦亡(pyroptosis)是一种伴随着炎症反应的细胞程序性死亡,兼具凋亡和坏死的细胞特征。细胞焦亡时,细胞膜形成凸出物,并形成空隙,细胞膜失去完整性同时细胞核固缩,DNA断裂<sup>[26-27]</sup>。LUDWIG-PORTUGALL等<sup>[28]</sup>研究表明NLRP3炎性小体介导的细胞焦亡会加重肾结石患者肾脏组织的病理损害,抑制这一过程能够降低其损害程度,并起到保护肾脏组织的作用。与模型组相比,TFPF使肾脏组织细胞TUNEL染色阳性率下降,减轻DNA断裂损伤。HE染色虽不能观察到膜孔的形成,但大鼠肾小管上皮细胞中胞质肿胀、胞膜破裂及部分细胞核固缩减少,这提示TFPF也可能通过抑制NLRP3炎性小体/Caspase-1信号通路减少细胞焦亡的发生。但是TFPF对细胞焦亡特征性分子的调控作用还需要进一步深入的研究。

综上所述,TFPF的肾脏保护作用可能其减轻炎症反应有关。初步机制研究显示,其抗炎机制可能通过阻断NLRP3炎性小体/Caspase-1信号通路与

NF- $\kappa$ B通路之间的相互作用,减轻炎症因子的合成与释放,遏制肾脏细胞程序性死亡的初始阶段细胞焦亡的发生,从而降低GN肾脏的炎症损伤。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] MULAY SHRIKANT R, EVAN A, ANDERS H J. Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2014, 29 (3) : 507-514.
- [2] 陈松鹤,俞鸿晖,方芝媛,等. 中医药治疗痛风性肾脏病的进展概述[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(10): 1877-1880.
- [3] 康乐,苗明三,刘慧娟,等. 基于痛风病临床病症特点的动物模型分析[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(22): 4547-4552.
- [4] 杨婷,林志健,王雨,等. 痛风相关模型研究进展及痛风病建模思考[J]. *世界中医药*, 2021, 16(1): 46-51.
- [5] ZHANG Y Z, SUI X L, XU Y P, et al. Association between Nod-like receptor protein 3 inflammasome and gouty nephropathy [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20 (1): 195-204.
- [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.
- [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.
- [8] HUANG W S, MAO S Q, ZHANG L Q, et al. Phenolic compounds, antioxidant potential and antiproliferative potential of 10 common edible flowers from China assessed using a simulated *in vitro* digestion-dialysis process combined with cellular assays [J]. *J Sci Food Agr*, 2017, 97(14): 4760-4769.
- [9] ZHANG H F, LI X F, WU K, et al. Antioxidant activities and chemical constituents of flavonoids from the flower of *Paeonia ostii* [J]. *Molecules*, 2017, 22 (1): 5-20.
- [10] WANG S L, XUE J Q, ZHANG S F, et al. Composition of peony petal fatty acids and flavonoids and their effect on *Caenorhabditis elegans* lifespan [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 155: 11-12.
- [11] LI C C, JIANG C Y, JING H J, et al. Separation of phenolics from peony flowers and their inhibitory activities and action mechanism on bacterial biofilm [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2020, 104(10): 4321-4332.
- [12] 窦勇博. 牡丹花黄酮的抗氧化活性研究[J]. *中国果*

- 菜, 2016, 36(4): 23-26.
- [13] 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, 892.
- [14] 律广富, 仇志凯, 常诗卓, 等. 玉米须总黄酮提取物对痛风性肾病大鼠肾脏尿酸排泄的影响[J]. 中成药, 2018, 40(6): 1373-1376.
- [15] 颜彦, 薛逢贵, 韩敏. 别嘌醇对尿酸性肾病大鼠肾功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(21): 2747-2750.
- [16] 李宇轩, 宋林, 于学成, 等. 苍术白虎汤对高尿酸血症性肾病小鼠作用机制的研究[J]. 四川中医, 2019, 37(2): 44-47.
- [17] 李佳川, 李思颖. 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[J]. 中草药, 2021, 52(3): 727-735.
- [18] THAKUR P, NEHRU B. Anti-inflammatory properties rather than anti-oxidant capability is the major mechanism of neuroprotection by sodium salicylate in a chronic rotenone model of Parkinson's disease [J]. *Neuroscience*, 2013, 231: 420-431.
- [19] 刘莉娟, 林梅. 尿酸盐晶体和尿酸与痛风性肾病关系研究进展[J]. 微循环学杂志, 2020, 30(1): 78-81.
- [20] DIWAN V, MISTRY A, GOBE G, et al. Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats [J]. *J Pharm Toxicol Methods*, 2013, 68(2): 197-207.
- [21] 陈园园, 易扬, 覃廖缓, 等. 自噬在可溶性尿酸诱导肾小管上皮细胞炎症反应中的作用[J]. 广西医科大学学报, 2018, 35(6): 756-761.
- [22] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis [J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 450-462.
- [23] ZHANG Y Z, SUI X L, XU Y P, et al. NLRP3 inflammasome and lipid metabolism analysis based on UPLC-Q-TOF-MS in gouty nephropathy [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(1): 172-184.
- [24] CHEN J, CHEN Z J. Ptdins4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 564: 71-76.
- [25] 伊宏煜, 王涛, 谷孙泽栋, 等. 细胞焦亡与临床疾病及其相关信号通路[J]. 中国免疫学杂志, 2019(16): 2038-2042.
- [26] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory Caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660.
- [27] DING J, WANG K, WANG L, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 111.
- [28] LUDWIG-PORTUGALL I, BARTOK E, DHANA E, et al. An NLRP3-specific inflammasome inhibitor attenuates Crystal-induced kidney fibrosis in mice [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(3): 525-539.

[责任编辑 孙丛丛]