

· 药理 ·

车前子水煎液对痛风性肾病大鼠的肾保护作用及机制

赵宏^{1,2}, 柴桂芳³, 刘颖斐¹, 李洋¹, 肖洪彬¹, 匡海学^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学 中药学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040;

2. 佳木斯大学 药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 3. 天津港口医院, 天津 300450)

[摘要] **目的:**观察车前子水煎液对痛风性肾病大鼠的药效学指标及对肾组织半胱氨酸蛋白酶-1(cysteine-aspartic acid protease-1, Caspase-1), Nod样受体蛋白3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3)和凋亡相关点样蛋白(fapoptosis-associated speck-like protein, ASC)表达的影响,探讨车前子水煎液对痛风性肾病大鼠的肾保护作用 and 初步机制。**方法:**60只SD大鼠随机分为6组,分别为正常组,模型组,阳性药组(别嘌醇,50 mg·kg⁻¹),车前子水煎液高、中、低剂量组(1.62, 0.81, 0.27 g·kg⁻¹),除正常组外,其余各组采用腺嘌呤和酵母联用的方法制作痛风性肾病大鼠模型,给予车前子水煎液,观察肾脏特征;计算肾重指数;检测大鼠血清中尿酸(uric acid, UA),尿素氮(blood urea nitrogen, BUN),肌酐(creatinine, SCr),丙氨酸氨基转移酶(cereal third transaminase, ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP);采用光镜观察肾脏病理形态学变化;蛋白免疫印迹法(Western bolt)和免疫组化法(immunohistochemical methods)测定肾组织中NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达量。**结果:**与模型组比较,别嘌醇组和车前子水煎液各剂量组的肾脏体积减小,别嘌醇组和车前子中剂量组肾重指数降低,车前子高剂量组肾重指数降低明显,别嘌醇组和车前子水煎液各剂量组血清UA, BUN, SCr, ALT, AST, ALP明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),肾组织病变程度均有一定减轻,其中车前子高、中剂量组最好,别嘌醇组和车前子水煎液高剂量组中NLRP3, ASC和Caspase-1蛋白的表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),车前子水煎液中剂量组中NLRP3蛋白的表达降低($P < 0.05$)。**结论:**车前子对痛风性肾病大鼠具有较好肾保护作用,可能与其下调肾组织中NLRP3, ASC和Caspase-1蛋白表达,抑制下游炎症细胞因子释放有关。

[关键词] 车前子; 痛风性肾病; Nod样受体蛋白3(NLRP3); 肾保护; 机制

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0108-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182035

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180726.1622.007.html>

[网络出版时间] 2018-07-27 16:04

Renal Protective Effect and Preliminary Mechanism of Water Decoction from Plantaginis Semen on Rats with Gouty Nephropathy

ZHAO Hong^{1,2}, CHAI Gui-fang³, LIU Ying-fei¹, LI Yang¹,
XIAO Hong-bin¹, KUANG Hai-xue^{1*}

(1. Key Laboratory for Chinese Materia Medica Under Education Ministry of China, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Pharmacy College, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China;

3. Port Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China)

[Abstract] **Objective:** To observe pharmacodynamics index and effect of water decoction from Plantaginis

[收稿日期] 20180424(016)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531801);中国博士后科学基金面上项目(2015M571454);黑龙江省博士后科学基金面上项目(LBH-Z14204);黑龙江省科学基金青年项目(QC2018119);黑龙江省教育厅青年创新人才项目(UNPYSCT-2016095);佳木斯大学青年创新人才培养计划项目(22Zq201501)

[第一作者] 赵宏,博士,副教授,从事中药活性成分的结构和药性研究, Tel:0454-8600758, E-mail:0316zh@163.com

[通信作者] *匡海学,博士,博士生导师,教授,从事中药及复方药效物质基础的化学研究, Tel:0451-82193001, E-mail:hxkuang@hotmail.com

Semen on Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), fapoptosis-associated speck-like protein (ASC) and cysteine-aspartic acid protease-1 (Caspase-1) of kidneys of rats with gouty nephropathy (GN), in order to investigate its renal protective effect and preliminary mechanism. **Method:** Adenine and yeast were used to make rat models of GN. The therapeutic effect and mechanism of water decoction from Plantaginis Semen on GN were studied by detecting the kidney characteristics and weight index; the levels of serum uric acid (UA), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (SCr), cereal third transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkalinephosphatase (ALP); renal histopathological reduced under light microscope; the expressions of NLRP3, ASC, Caspase-1 were detected by Western blot and immunohistochemical methods. **Result:** Compared with the model group, the volumes of kidneys in allopurinol group and water decoction from Plantaginis Semen groups were smaller; the kidney weight index in allopurinol group and middle-dose water decoction from Plantaginis Semen group were lower, and the figure was significantly lower in high-dose group; the expression levels of UA, BUN, SCr, ALT, AST, ALP in serum in allopurinol group and water decoction from Plantaginis Semen groups were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the pathological changes in renal tissues in GN model rats were relieved, especially in high and middle-dose water decoction from Plantaginis Semen groups. Compared with the model group, the protein expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 in kidney tissues in allopurinol group and high-dose water decoction from Plantaginis Semen group were down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), only the protein expression level of NLRP3 was down-regulated in middle-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Water decoction from Plantaginis Semen may protect rats with GN by down-regulating the protein expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1 and inhibiting release of downstream inflammatory factors.

[**Key words**] Plantaginis Semen; gouty nephropathy; Nod-like receptor protein 3 (NLRP3); renal protection; mechanism

痛风性肾病 (gouty nephropathy, GN) 是痛风患者的常见病证, 主要由嘌呤代谢紊乱或肾脏排泄减少, 血尿酸升高, 尿酸盐结晶在肾小管及肾间质沉积而引起炎症反应和肾组织破坏^[1-2]。经 Meta 分析, 高尿酸血症可使新发慢性肾病的风险提高 3.91 倍^[3], GN 作为高尿酸血症病程中最严重的情况, 治疗与预防至关重要, 目前治疗西药有极大副作用, 如中国人使用别嘌醇时易发生致命过敏反应^[4], 临床用药较为受限。中医药在治疗 GN 上虽有独到经验和优势^[5], 以提高 GN 的疗效, 延缓病情发展等为主, 多为健脾益肾、温肾健脾及清热利湿补肾等中药复方^[6]。车前子具有清热利尿, 渗湿通淋, 止咳祛痰等功效, 临床治疗 GN 时常以车前子组方^[7], 如杜仲、萆薢、车前子等配合别嘌醇治疗 GN, 总有效率达 86.7%; 以清热利湿补肾法治疗 GN, 在控制饮食和西药对证治疗基础上加用清热利湿补肾中药车前子等, 使血尿酸、肾功能、临床症状明显改善; 清利瘀结方 (车前子、牛膝、苍术等) 能提高 GN 患者的内生肌酐清除率, 降低血清肌酐 (SCr) 和 24 h 尿蛋白; 采用健脾补肾、祛湿通络、降逆泄浊之法治疗 GN, 方中佐以车前子等可明显改善患者症状, 如有下肢水肿者, 可加入车前子等利尿消肿药物^[8]。但是中

药复方组分复杂, 质量难控, 难以在临床大范围推广, 因此抗 GN 单一中药的系统研究是研发治疗该病新药的重要途径。

前期笔者通过对车前子的物质结构和药理活性进行研究, 已证实车前子水煎液及其多糖等成分具有较强的免疫调节、抗炎、降尿酸、抗氧化作用, 对膜性肾病、痛风肾病有较好调节作用^[9-10]。本文采用尿酸前体物质 (腺嘌呤和酵母) 制备 GN 大鼠模型, 考察车前子水煎液对模型大鼠的肾保护作用, 初步验证车前子作用于 Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3)-凋亡相关点样蛋白 (ASC)-半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase-1) 炎性轴而发挥抗 GN 作用, 为车前子抗 GN 的物质基础和分子机制深入研究奠定基础, 为寻找低毒、有效的中药类新药提供基础研究数据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康 10 周龄 SD 雄性大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 由黑龙江中医药大学动物实验中心提供, 合格证号为 SCXK (黑) 2013-0004。实验动物的开展取得了黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准, 实验动物伦理审查批准编号 DWLL20161012003。

1.2 药物及试剂 车前子采自黑龙江省五常市,经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为车前科植物车前 *Plantago depressa* 的干燥种子,符合 2015 年版《中国药典》规定。现样品保存于黑龙江中医药大学药学院(批号 20140701)。别嘌醇片(临汾奇林药业有限公司,批号 H14020549);腺嘌呤(美国 Sigma Alorich 公司,批号 73-24-5);酵母干粉[诚信生物科技有限公司,批号 2015(0068)];尿蛋白定量试剂盒、考马斯亮蓝染液(南京建成生物工程研究所,批号分别为 C035-2, 20160308);尿酸(UA),尿素氮(BUN),SCr,丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(中生北控生物科技有限公司,批号分别为 2401135, 2401136, 2401129, 2401158, 2401157, 2401128);组织蛋白抽提试剂盒,BCA 蛋白定量试剂盒,配胶试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 CW0891, CW0014, PP0012A);5 × 上样缓冲液(碧云天生物工程研究所,批号 PP0015);Tris-base, Glycine, SDS(美国 Amresco 公司,批号分别为 77-85-1, 56-40-6, 151-21-3);封闭用蛋白粉(美国 BD 公司,批号 232100);NLRP3 抗体(武汉博士德生物公司,批号分别为 PB0121);Caspase-1, ASC 抗体(美国 CST 公司,批号分别为 2225, 67824); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京中杉金桥生物技术公司,批号 TA-09);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(美国 Santa 公司,批号为 ZS-2301),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(Solarbio 公司,批号 G1120)。

1.3 仪器 AB265-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);HZQ-C 型空气浴振荡器(中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司);2-16P 型低温离心机(德国 Sigma 公司);FSH-2A 型可调高速匀浆机(常州汉彩仪器制造有限公司);Evolution 220 型紫外分光光度计(美国 T 公司),Power Pac 系列电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 车前子水煎液的制备 取干燥车前子,加水浸泡 40 min,煎煮 2 h,共 3 次,合并滤液,浓缩,得车前子水煎液。

2.2 GN 大鼠模型的制备、分组及给药

2.2.1 模型制作^[11] 将腺嘌呤制成 0.5% 的羧甲基纤维素钠混悬液。模型组大鼠每日上午定点灌胃给予腺嘌呤混悬液,剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,给药体积为 $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,同时喂食拌有酵母干粉普

通饲料,质量分数为 10%,控制酵母每日摄入量为 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;正常组大鼠每天灌胃给予同体积 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,喂食普通饲料。连续 18 d 后测定 UA, SCr, BUN 均明显上升,为模型制备成功。

2.2.2 动物分组及给药 适应性喂养后将 60 只大鼠随机分为 6 组,分别为正常组、模型组、阳性药组、车前子水煎液组(按人使用生药量的 6, 3, 1 倍等效剂量折算),每组 10 只。造模开始时,各给药组大鼠每天下午定点灌胃给予水煎液 $1.62, 0.81, 0.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,阳性药组给予别嘌醇 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,模型组和正常组灌胃给予同体积蒸馏水,连续给药 28 d。

2.3 样本采集与检测

2.3.1 24 h 尿蛋白定量检测 分别于实验前和实验第 7, 14, 21, 28 天,代谢笼法收集 24 h 尿液,采用尿蛋白定量测试盒(CBB)测定 24 h 尿蛋白含量。

2.3.2 血生化检测 各组大鼠在第 27 天给药 24 h 后,20% 乌拉坦麻醉,腹主动脉取血, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min 分离血清,采用全自动生化分析仪测定血清中 UA, BUN, Cr, ALT, AST, ALP。

2.3.3 肾表观特征和肾指数计算 第 28 天取血后立即处死大鼠,快速取大鼠双肾,观察表观特征,计算肾重指数。肾重指数 = 双肾质量/大鼠体质量 $\times 100\%$ 。

2.3.4 苏木素-伊红(HE)染色法检测肾组织病理学变化 肾组织经 10% 甲醛固定后常规石蜡包埋,切片($4 \text{ }\mu\text{m}$),进行 HE 染色,光学显微镜($\times 400$)下观察肾组织病理变化。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western bolt)法测定肾组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达 取肾组织置于研钵中,液氮研磨成粉末,加入预冷的蛋白抽提试剂工作液[$1 \text{ g}:(10 \text{ mL})$],冰上孵育 20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $1 \text{ 万 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液。以小牛血清蛋白做对照品。蛋白统一稀释(1:200)后在沸水中煮 5 min,备用。采用三明治法湿法转膜,5% 封闭蛋白粉中室温封闭 2 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,在 NLRP3, ASC, Caspase-1 不同的一抗中孵育过夜,与 HRP 标记的二抗(1:2 000)进行反应,膜上加 TMB 显色液,采用 odyssey 双色红外激光成像仪扫描,分析每个特异条带的灰度值。

2.3.6 免疫组化法(PV 二步法)检测肾组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 的表达 切片经脱蜡、孵育后,入枸橼酸盐缓冲液(pH 6),微波炉加热,冷至室温,依次滴加一抗(1:1 000)和二抗, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育,显色,

常规脱水透明,封片,光学显微镜下观察。采用 motic 3000 显微摄影成像系统于 400 倍下摄片,Image-pro plus6.0 病理图像分析系统对阳性表达进行定量分析,以积分吸光度 IA 代表基因和蛋白的相对表达量,IA = 平均吸光度 × 阳性面积,随机分析 3 个不同高倍镜视野,取其平均值代表相对表达量。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间参数资料经

LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 GN 大鼠的 24 h 尿蛋白影响 与正常组比较,模型组大鼠 24 h 尿蛋白随时间延长不断升高,14 d 后呈显著差异($P < 0.01$);与模型组比较,别嘌醇组第 28 天呈明显降低($P < 0.05$),车前子水煎液高、中剂量组均于第 21 天开始明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 车前子水煎液对 GN 大鼠 24 h 尿蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of water decoction from Plantaginis Semen on 24-hour urinary protein of GN rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 0 d | 7 d | 14 d | 21 d | 28 d |
|-----|-----------------------|---------------|---------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常 | - | 29.99 ± 13.38 | 30.42 ± 14.48 | 31.62 ± 9.98 | 34.01 ± 11.23 | 32.24 ± 12.84 |
| 模型 | - | 32.63 ± 14.43 | 51.38 ± 15.71 | 96.06 ± 15.65 ²⁾ | 139.95 ± 38.68 ²⁾ | 147.60 ± 41.90 ²⁾ |
| 别嘌醇 | 0.05 | 31.38 ± 12.75 | 31.66 ± 11.87 | 75.69 ± 38.27 | 104.16 ± 49.77 | 82.38 ± 53.74 ³⁾ |
| 车前子 | 1.62 | 32.99 ± 11.23 | 39.09 ± 12.12 | 75.37 ± 19.52 | 84.75 ± 18.74 ³⁾ | 78.16 ± 28.06 ³⁾ |
| | 0.81 | 33.99 ± 10.38 | 42.53 ± 16.72 | 78.45 ± 26.52 | 86.45 ± 20.65 ³⁾ | 80.12 ± 12.98 ³⁾ |
| | 0.27 | 31.12 ± 2.08 | 44.39 ± 12.52 | 80.41 ± 19.04 | 109.12 ± 18.09 | 118.13 ± 17.88 |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 对 GN 大鼠血清生化指标影响 与正常组比较,模型组大鼠血 UA 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,别嘌醇组和车前子高、中剂量组血 UA 显著降低($P < 0.01$),车前子水煎液低剂量组血 UA 明显降低($P < 0.05$)。见表 2。与正常组比较,模型组大鼠血清中 BUN 和 SCr 的含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,别嘌醇组和车前子水煎液高剂量组的 BUN

和 SCr 呈显著降低($P < 0.01$),车前子水煎液中剂量组可明显降低 BUN 和 SCr($P < 0.05$)。见表 2。与正常组比较,模型组大鼠的血清 ALT,AST,ALP 含量明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,别嘌醇组和车前子水煎液高、中剂量组可降低大鼠血清中 ALT 的水平($P < 0.05$),别嘌醇组和车前子水煎液高剂量组可降低大鼠血清中 AST,ALP 的水平($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 车前子水煎液对 GN 大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of water decoction from Plantaginis Semen on biochemical indices of GN rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

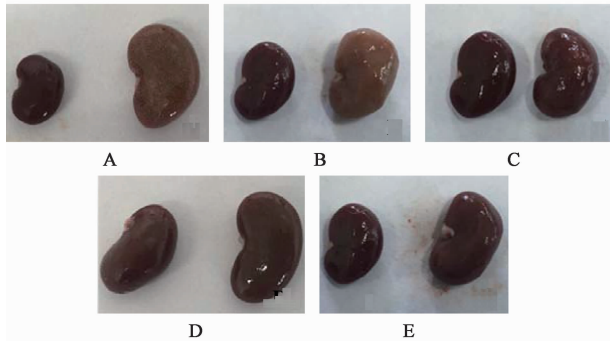
| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | UA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | SCr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | ALT/U·L ⁻¹ | AST/U·L ⁻¹ | ALP/U·L ⁻¹ |
|-----|-----------------------|---|--|--|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 正常 | - | 63.68 ± 12.50 | 7.16 ± 1.37 | 57.65 ± 5.89 | 40.96 ± 8.06 | 124.73 ± 19.36 | 31.20 ± 5.13 |
| 模型 | - | 140.42 ± 40.10 ²⁾ | 15.43 ± 3.99 ²⁾ | 68.58 ± 7.60 ²⁾ | 45.07 ± 10.56 ¹⁾ | 144.31 ± 22.21 ¹⁾ | 33.53 ± 3.58 ¹⁾ |
| 别嘌醇 | 0.05 | 68.91 ± 33.08 ⁴⁾ | 9.23 ± 2.31 ⁴⁾ | 57.24 ± 7.09 ⁴⁾ | 65.69 ± 14.76 ³⁾ | 168.71 ± 40.96 ³⁾ | 39.27 ± 7.35 ³⁾ |
| 车前子 | 1.62 | 71.42 ± 11.35 ⁴⁾ | 9.21 ± 1.19 ⁴⁾ | 58.27 ± 8.09 ⁴⁾ | 39.81 ± 9.81 ³⁾ | 130.67 ± 28.09 ³⁾ | 31.70 ± 4.57 ³⁾ |
| | 0.81 | 82.89 ± 21.37 ⁴⁾ | 11.09 ± 2.81 ³⁾ | 60.92 ± 6.85 ³⁾ | 40.61 ± 8.15 ³⁾ | 136.39 ± 24.27 | 34.70 ± 5.56 |
| | 0.27 | 97.11 ± 17.24 ³⁾ | 14.06 ± 2.03 | 68.08 ± 6.31 | 45.27 ± 6.27 | 149.12 ± 27.04 | 34.23 ± 3.76 |

3.3 对 GN 大鼠肾表观的影响 经肾表观特征观察,正常大鼠肾组织呈红褐色,表明平滑未见异常,模型组肾脏体积显著增大,表面可见十分密集的小白点,伴有充血和水肿,别嘌醇组肾脏体积略大,表面有充血和水肿,未见小白点,车前子水煎液肾脏体积略微增大,可见稀疏小白点,有轻微水肿,其中高剂量组水肿和充血现象较轻,较光滑。见图 1(各

图左侧肾脏为正常)。

3.4 对 GN 大鼠肾重指数影响 与正常组比较,模型组大鼠肾重指数显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,车前子水煎液高剂量组肾重指数显著降低($P < 0.01$),别嘌醇组和车前子中剂量组肾重指数明显降低($P < 0.05$)。见表 3。

3.5 对 GN 大鼠肾组织形态影响 正常组大鼠肾



A. 模型组; B. 别嘌醇组; C~E. 车前子水煎液高、中、低剂量组

图 1 车前子水煎液对 GN 大鼠肾表现特征的影响

Fig.1 Effect of water decoction from Plantagin Semen on renal apparent characteristics of GN rats

表 3 车前子水煎液对 GN 大鼠肾重指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

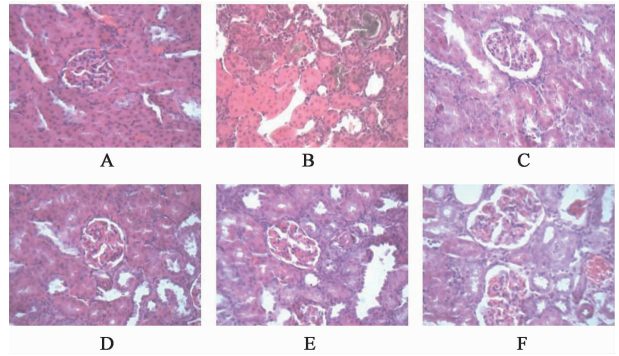
Table 3 Effect of water decoction from Plantagin Semen on kidney weight of GN rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 肾重指数/% |
|-----|-------------------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 0.61 ± 0.07 |
| 模型 | - | 1.42 ± 0.26 ²⁾ |
| 别嘌醇 | 0.05 | 1.13 ± 0.16 ³⁾ |
| 车前子 | 1.62 | 0.89 ± 0.16 ⁴⁾ |
| | 0.81 | 1.12 ± 0.13 ³⁾ |
| | 0.27 | 1.24 ± 0.13 |

组织结构正常,肾小球形态正常,肾小管上皮细胞排列整齐,大小均一,无炎症细胞浸润;模型组大鼠肾组织肾小球数目减少、血管萎缩甚至消失,肾小管上皮细胞水肿明显,可见明显的黄褐色尿酸盐结晶,肾间质伴有大量的炎症细胞浸润,出现肾间质纤维化;与模型组比较,各治疗组大鼠肾组织病变程度均有一定减轻,肾小管黄褐色尿酸盐结晶减少,有较少的炎症细胞浸润,肾间质纤维化程度轻微,其中车前子高剂量组最好、中剂量组次之。见图 2。

3.6 对 GN 大鼠肾组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白的相对表达量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,别嘌醇组和车前子水煎液高剂量组中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白的相对表达量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),中剂量组仅对 NLRP3 蛋白的相对表达量有降低作用 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 3。

3.7 对 GN 大鼠肾组织 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 表达 IA 的影响 与正常组比较,模型组 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 的 IA 均显著增高 ($P < 0.01$);与



A. 正常组; B. 模型组; C. 别嘌醇组; D~F. 车前子水煎液高、中、低剂量组(图 3,4 同)

图 2 车前子水煎液对 GN 大鼠肾脏组织形态影响 (HE, ×400)

Fig.2 Effect of water decoction from Plantagin Semen on renal tissue of GN rats(HE, ×400)

表 4 车前子水煎液对 GN 大鼠肾脏 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白水平影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of water decoction from Plantagin Semen on protein lever of NLRP3, ASC, Caspase-1 on renal tissue of GN rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | NLRP3/ β -actin | ASC/ β -actin | Caspase-1/ β -actin |
|-----|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 0.599 ± 0.055 | 0.890 ± 0.034 | 0.500 ± 0.009 |
| 模型 | - | 0.906 ± 0.001 ²⁾ | 1.953 ± 0.020 ²⁾ | 1.753 ± 0.001 ²⁾ |
| 别嘌醇 | 0.01 | 0.602 ± 0.022 ⁴⁾ | 1.105 ± 0.031 ⁴⁾ | 1.285 ± 0.018 ³⁾ |
| 车前子 | 1.62 | 0.616 ± 0.015 ⁴⁾ | 1.121 ± 0.009 ⁴⁾ | 1.121 ± 0.002 ⁴⁾ |
| | 0.81 | 0.754 ± 0.018 ³⁾ | 1.585 ± 0.026 | 1.496 ± 0.014 |
| | 0.27 | 0.941 ± 0.018 | 1.578 ± 0.012 | 1.515 ± 0.032 |

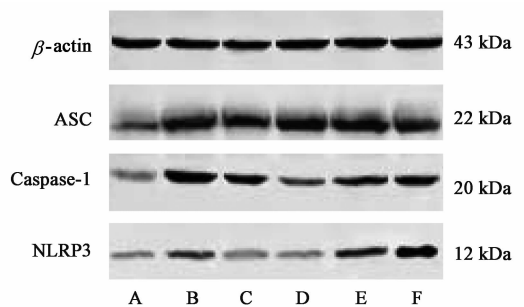


图 3 大鼠肾脏 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 水平表达电泳

Fig.3 Expression lever of NLRP3, ASC, Caspase-1 on renal tissues of rats

模型组比较, NLRP3 在别嘌醇组和水煎液高、中剂量组表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), Caspase-1, ASC 仅在别嘌醇组和水煎液高剂量组表达明显降低 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 4。

表 5 车前子水煎液对 GN 大鼠肾脏 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 IA 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of water decoction from Plantaginis Semen on IA of NLRP3, ASC, Caspase-1 on renal tissue of GN rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | NLRP3 | ASC | Caspase-1 |
|-----|-------------------------------------|--|--|--|
| 正常 | - | 8 599.73 \pm 1 550.12 | 10 890.44 \pm 2 091.60 | 9 500.29 \pm 900.87 |
| 模型 | - | 32 105.92 \pm 2 091.00 ²⁾ | 45 319.21 \pm 4 981.36 ²⁾ | 39 853.28 \pm 1 089.29 ²⁾ |
| 别嘌醇 | 0.01 | 16 021.42 \pm 2 210.91 ⁴⁾ | 20 404.72 \pm 3 091.22 ⁴⁾ | 12 284.66 \pm 4 180.38 ³⁾ |
| 车前子 | 1.62 | 19 162.11 \pm 1 540.53 ⁴⁾ | 28 094.35 \pm 2 990.11 ⁴⁾ | 22 141.41 \pm 2 981.24 ⁴⁾ |
| | 0.81 | 22 753.90 \pm 1 874.52 ³⁾ | 39 084.62 \pm 2 891.10 | 32 906.21 \pm 1 409.89 |
| | 0.27 | 29 911.08 \pm 1 809.09 | 42 580.01 \pm 2 209.13 | 35 752.71 \pm 3 209.01 |

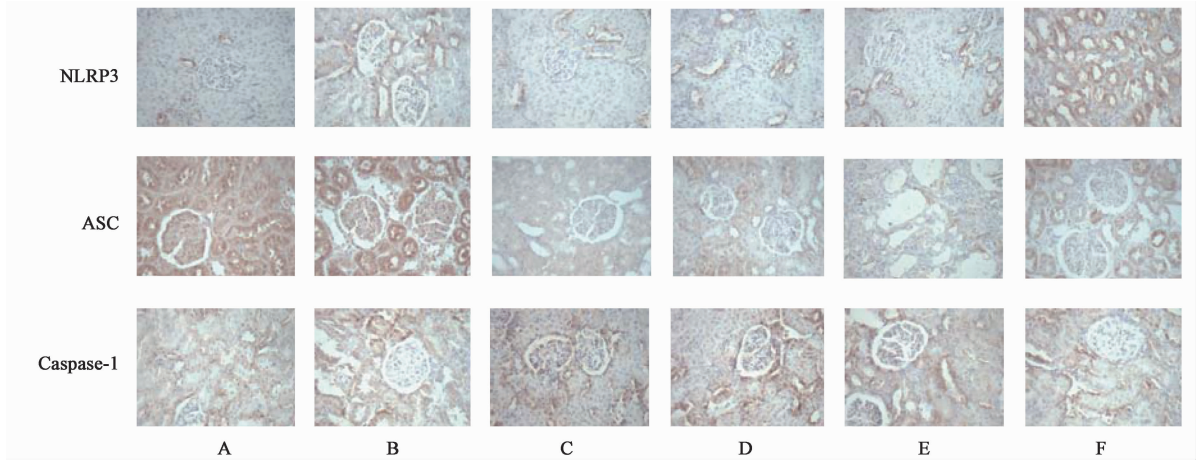


图 4 车前子水煎液对 GN 大鼠肾脏 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 阳性表达比较 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 4 Effect of water decoction from Plantaginis Semen on NLRP3, ASC, Caspase-1 expression of renal tissue of GN rats (IHC, $\times 400$)

4 讨论

NLRP3 炎性小体是 NOD 样受体之一, NLRP 蛋白家族中的一个典型代表, 是固有免疫系统识别病原体的一类重要感受器, 可引起相应的炎症反应。NLRP3 炎症小体主要由 NLRP3, ASC, Caspase-1 组成^[12], 当 NLRP3 识别的配体直接或间接地结合后, NLRP3 被活化而且构象发生变化, NLRP3 可以和 ASC 相互作用, 激活 Caspase-1, 形成复杂的复合物即 NLRP3 炎性体, 对前体炎症因子进行切割, 使其成熟并释放到细胞外, 进而引起炎症反应。

痛风性肾病的病理损害多由尿酸盐沉积于肾脏组织, 并刺激组织产生炎症细胞因子所致, 作为一种具有特征性的自身炎症性疾病, 其与 NLRP3 炎症小体密切相关。痛风患者肾脏所沉积的尿酸盐晶体 (MSU) 依赖的中性粒细胞募集取决于 ASC 和 Caspase-1, 并激活 NLRP3 炎症小体引起炎症因子释放和炎症反应^[13-15], 因此, NLRP3 炎症小体可能为痛风性疾病的治疗提供新的靶点。

实验证明, 车前子水煎液可减轻肾脏充血和水肿现象, 使其光滑, 肾重指数显著降低; 显著降低模

型大鼠的血 UA; 降低 BUN, Cr, ALT, AST, ALP, 可良好调节 GN 大鼠的肾功能和肝功能; HE 染色后的病理显示, 经车前子治疗的模型大鼠的肾组织病变程度有一定减轻, 综合药效结果可知, 车前子可用于治疗 GN, 尤其在 1.62, 0.81 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下活性最好, 可以为寻找高效低毒的中药成分用于抗 GN 提供新物质来源, 基于此可继续开展活性成分的筛选和结构表征等。

车前子水煎液组中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白的相对表达量明显降低, 此结果说明车前子水煎液可降低大鼠肾组织中 NLRP3 炎性小体信号通路蛋白表达起到抗 GN 作用, 未来研究可以此信号通路作为重点机制, 继续探讨车前子对其上游信号和下游炎症因子的表达影响, 深入阐述分子机制, 在明确有效物质结构特征基础上, 总结结构效关系, 为科学开发和利用车前子用于治疗痛风性肾病奠定坚实基础, 具有重要的科研意义和社会价值。

[参考文献]

[1] Mulay S 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 Transplant*, 2014, 29(3):507-514.
- [2] Roddy E, Hyon K. Epidemiology of gout [J]. *Rheum Dis Clin N Am*, 2014, 40(2):155-175.
- [3] 鄂静, 郑亚莉, 曹丽, 等. 高尿酸血症引起慢性肾脏病的 Meta 分析 [J]. *宁夏医学杂志*, 2015, 37(3): 229-231.
- [4] 李丹, 张剑勇. 痛风现代流行病学及降尿酸药物研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2016, 5(4):73-76.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 张向伟, 柳红芳, 胡济源, 等. 痛风性肾病的辨机论治 [J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(9): 790-792.
- [8] 吴博文, 田雪秋. 中西医结合治疗痛风性肾病 30 例 [J]. *中国医药导报*, 2006, 3(5):76.
- [9] ZHAO H, WANG Q H, SUN Y P, et al. Purification, characterization and immunomodulatory effects of *Plantago depressa* polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 112(1):63-72.
- [10] 刘颖斐, 王秋红, 赵宏, 等. 车前子多糖治疗大鼠膜性肾病的实验探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(22): 103-107.
- [11] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(3):210-215.
- [12] 高双荣, 马卫国, 商学征, 等. 复方青秦对痛风性肾病大鼠肾组织病理学的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 183-186.
- [13] WU H, ZHOU M Z, LU G, et al. Emodinol ameliorates urate nephropathy by regulating renal organic ion transporters and inhibiting immune inflammatory responses in rats [J]. *Biome Pharmacother*, 2017, 96: 727-735.
- [14] MA C H, KANG L L, REN H M, et al. Simiao pill ameliorates renal glomerular injury via increasing Sirt1 expression and suppressing NF- κ B/NLRP3 inflammasome activation in high fructose-fed rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172:108-117.
- [15] 金晓敏, 张晓熙, 郭璐, 等. 基于 NLRP3 炎性体轴土茯苓总黄酮对痛风性关节炎的作用和机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4):90-95.

[责任编辑 周冰冰]