

虎杖-桂枝药对配伍对大鼠慢性高尿酸血症和肾、肠尿酸转运体表达的影响

施琬, 李钟, 顾祖莲, 黄惠珠, 胡旭光, 韩彬*
(广东药学院 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究虎杖-桂枝药对配伍对大鼠高尿酸血症的防治作用及对尿酸盐阴离子转运体 1 (URAT1), 有机阴离子转运蛋白 3 (OAT3), 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 2 (ABCG2) 表达的影响。**方法:**84 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组, 模型组, 苯溴马隆组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 痛风定组 ($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和虎桂低、中、高剂量组 ($3.5, 7, 14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。以皮下注射氧嗪酸钾 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 *ig* 次黄嘌呤 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和乙胺丁醇 ($250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的方法, 建立高尿酸血症大鼠模型。第 4 天开始各组大鼠 *ig* 给予相应药物, 每天 1 次, 连续 2 周, 测定血尿酸 (SUA), 尿酸浓度 (UUA), 肌酐 (Cr), 尿素氮 (BUN), 谷丙转氨酶 (GPT) 水平; 以 RT-PCR 方法测定大鼠肾脏 URAT1 和 OAT3 和小肠 ABCG2 的 mRNA 表达水平, 以 Western blot 方法测定大鼠肾脏 URAT1 和 OAT3 的蛋白表达水平; 以免疫组化方法测定大鼠小肠 ABCG2 的蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较, 模型组大鼠血尿酸水平显著升高, 尿酸排泄减少, 肾脏 URAT1 mRNA 和蛋白高表达, 肾 OAT3 和小肠 ABCG2 mRNA 和蛋白低表达, 具有明显统计学差异 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 虎桂药对高中剂量组能显著降低血尿酸和尿素氮水平, 增加 24 h 尿酸排泄量; 虎桂药对高中剂量组能显著降低肾脏 URAT1 mRNA 和蛋白表达量水平, 升高肾脏 OAT3 和小肠 ABCG2 mRNA 和蛋白的表达量水平, 均具有明显统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**虎桂药对有明显的抗高尿酸血症作用, 可能是通过下调大鼠肾脏 URAT1 的表达, 并上调大鼠肾脏 OAT3 和小肠 ABCG2 的表达而减少尿酸的重吸收并增加其排泄。

[关键词] 虎杖-桂枝药对; 高尿酸血症; 尿酸盐阴离子转运体 1 (URAT1); 有机阴离子转运蛋白 3 (OAT3); 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 2 (ABCG2)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0107-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020107

Effect of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix-Cinnamomi Ramulus on Chronic Hyperuricemia and Expressions of Renal and Intestinal Uric Acid Transporters in Rats

SHI Wan, LI Zhong, GU Zu-lian, HUANG Hui-zhu, HU Xu-guang, HAN Bin*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the preventive and therapeutic effects of the combination of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix and Cinnamomi Ramulus (PC) on hyperuricemia, and its effect on urate-anion transporter 1 (URAT1), organic anion transporters 3 (OAT3) and ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2) in rats. **Method:** Eighty four male SD rats were randomly divided into 7 groups: the normal group, the model group, the benzbromarone ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, the Tongfengding capsule ($160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group and PC compatibility low-, medium- and high-dose ($3.5, 7, 14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, with 10 rats in each group. The hyperuricemia model in rats was established through *ip* injection of potassium oxonate ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), *ig* administration of hypoxanthine ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and ethambutol ($250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Since the fourth day, all the rats were intragastrically administered with drugs for 2 weeks, once a day, in order to determine their serum uric acid

[收稿日期] 20150918(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173194)

[第一作者] 施琬, 在读硕士, 从事中药药理研究, Tel:15017560900, E-mail:376075842@qq.com

[通讯作者] * 韩彬, 硕士, 教授, 从事中药复方药理和毒理方向研究, Tel:020-39352182, E-mail:hbhz99@21cn.com

(SUA), creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), as well as urinary uric acid (UUA) levels. The RT-PCR method was used to measure the mRNA levels of renal URAT1, OAT3 and intestinal ABCG2 in rats. Renal URAT1 and OAT3 protein expressions in rats were determined by Western blotting method. Intestinal ABCG2 protein expression in rats was assayed by immunohistochemistry method. **Result:** Compared to the normal group, SUA levels of the model group increased significantly and excretion of UUA decreased, with high expressions of renal URAT1 mRNA and protein, low expressions of renal OAT3 and intestinal ABCG2 mRNA and protein expression. The results between the normal group and the model group showed significant statistical differences ($P < 0.01$). Compared to the model group, PC medium-dose and high-dose groups showed significantly reduction in SUA and BUN levels, and increase in 24 h excretion of uric acid. PC medium-dose and high-dose groups showed inhibition in renal URAT1 mRNA and protein levels, and increase in renal OAT3 and intestinal ABCG2 mRNA and protein levels. The results between the two groups showed significant statistical differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** PC has an obvious effect of anti-hyperuricemia. It may down-regulate the expression of renal URAT1 and up-regulate the expressions of renal OAT3 and intestinal ABCG2 in rats to reduce re-absorption of uric acid and increase the excretion of uric acid.

[**Key words**] combination of *Polygonum cuspidatum* and *Ramulus cinnamomi*; hyperuricemia; urate-anion transporter 1; organic anion transporters 3; ATP-binding cassette subfamily G member 2

目前高尿酸血症(HUA)和痛风的发病率明显增高,且日趋年轻化。高尿酸血症与高血压、心血管疾病、糖尿病等密切相关,HUA加重代谢综合征并与其互为因果,严重影响健康,越来越受到人们的关注^[1-2]。

HUA产生的因素包括生成尿酸过多和/或排泄障碍。研究表明,约90%原发性高尿酸血症是因尿酸排泄减少所致,人体内的尿酸约2/3经肾脏排泄,1/3通过肠道排泄^[3]。肾近端小管上皮细胞分布有多种尿酸分泌和重吸收的转运体,参与肾脏对尿酸的排泄的调控,其对尿酸的重吸收增加和/或分泌减少均可致血尿酸升高。其中尿酸转运体1(urate transporter 1, URAT1)主要介导尿酸的重吸收,有机阴离子转运体3(OAT3)有利于尿酸盐的分泌;三磷酸腺苷结合盒转运蛋白2(ABCG2)则在肾脏、小肠和大肠内都发挥重要的排泄尿酸作用^[4-6]。目前,尿酸相关转运机制仍不完全明确,中医药降尿酸作用的分子机制研究不够深入,关于中药以ABCG2为靶点对高尿酸血症的治疗尚无报道。

中药虎杖药性苦寒,可清热利湿解毒;桂枝辛温,辛可通络,温可反佐以制苦寒伤阳凝瘀。笔者前期研究两药合用具有显著的抗炎、镇痛和降尿酸作用,这些作用可能与虎杖桂枝的相反相成配伍有关^[7]。本研究拟通过观察虎杖-桂枝配伍对肾脏及小肠相关尿酸转运蛋白的调控,深入探讨该药对降低血尿酸水平的可能机制和作用靶点,从而力求揭示该药对治疗痛风病的分子作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,雄性,体重180~220g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2013-0034。饲养于广东药学院实验动物中心,实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

1.2 药物及试剂 虎杖(批号130701,广东和翔制药有限公司),桂枝(批号28113011,广东省药材公司中药饮片厂,以上药材经广东药学院李钟副教授鉴定为虎杖*Polygonum cuspidatum*的干燥根茎、桂枝*Cinnamomum cassia*的干燥嫩枝),盐酸乙胺丁醇片(批号130102,广州白云山明兴制药有限公司),次黄嘌呤(批号ZY131028,上海紫一试剂厂),氧嗪酸钾(批号131015,瀚渤贸易有限公司),痛风定胶囊(黄柏、车前子等,成都中汇制药有限公司,批号030101),苯溴马隆片(批号1208247,昆山龙灯瑞迪制药有限公司),血尿酸(SUA)测定试剂盒(批号131091),尿素氮(BUN)测定试剂盒(批号131081),肌酐测定试剂盒(批号D1311123),丙氨酸转氨酶测定试剂盒(批号132181),中生北控生物科技股份有限公司;Premix Taq(日本TaKaRa公司,批号A1601A),PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser(批号AK2104,日本TaKaRa公司),Lowry蛋白浓度测定试剂盒(批号20130827,美国Solarbio公司),免疫组化试剂盒(一抗美国Santa Cruz公司,批号sc-11356),山羊抗兔鼠通用二抗(DAB显色试剂盒,丹麦DAKO公司,批号K5007)。

1.3 仪器 AMS-18型全自动生化分析仪(北京奥

普森生物科技有限公司), ABI ViiA™ 7 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems), NANODROP2000 微量紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司), AS 图像分析系统 (德国 Kontron Elektronik 公司), MC-1180 型显微镜 (广州粤显光学仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 中药制备 虎桂药对低剂量、中剂量、高剂量水提取物制备: 虎杖 500 g, 桂枝 84 g 分别用水浸泡 20 min, 第 1 次用 10 倍体积的水煎煮, 虎杖先煎, 沸腾后 10 min 加入桂枝, 共煮 45 min; 第 2 次用 5 倍体积的水煎煮 30 min, 2 次药液过滤后合并, 分别浓缩至 0.35, 0.7, 1.4 g·mL⁻¹, 分装灭菌, 放置于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 模型建立、分组和给药 SD 大鼠 84 只, 单一雄性, 随机分成 7 组, 每组 12 只, 分别为正常组、模型组、虎杖-桂枝 (Polyonum Cuspidatum and Ramulus Cinnamomi) 低、中、高剂量组 (3.5, 7, 14 g·kg⁻¹, 给药剂量均按生药量计算)、痛风定对照组 (给药剂量 160 mg·kg⁻¹) 和苯溴马隆阳性药组 (10 mg·kg⁻¹)。除正常组外, 其余 7 组均以 *ig* 次黄嘌呤 50 mg·kg⁻¹ 和乙胺丁醇 250 mg·kg⁻¹, 皮下注射氧嗪酸钾 200 mg·kg⁻¹, 连续造模 17 d。第 4 天开始, 在造模前 1 h *ig* 给药, 大鼠按 10 mL·kg⁻¹ *ig*, 正常组、模型组大鼠 *ig* 等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 2 周。

2.3 生化指标的测定 于第 3 天造模后 6 h, 各组大鼠眼眶后静脉丛取血, 以自动生化仪检测血尿酸 (SUA) 水平。于第 16 天造模后, 各组大鼠置于代谢笼中, 收集 24 h 尿液, 第 17 天造模后 6 h 眼眶后静脉丛取血, 自动生化仪检测 SUA, 肌酐 (Cr), BUN, 丙氨酸转氨酶 (GPT), 尿酸浓度 (UUA) 水平, 并计算 24 h 尿酸排泄量。

2.4 RT-PCR 测定肾 URAT1, OAT3 和小肠 ABCG2 的 mRNA 表达水平 分别取各组 0.1 g 肾皮质和小肠组织, 用 Trizol 提取 RNA, 测定 RNA 浓度。根据 TAKARA 试剂盒合成 cDNA, 以 β -actin 为内参, PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳, 检测反转录后的 cDNA 质量完整。由宝生物工程 (大连) 有限公司设计合成引物, 引物序列如下: β -actin (上游 5'-TGAGACCT-TCAACACCCC-3', 下游 5'-GCCATCTCTTGCTCGAA-GTC-3'); URAT1 (上游 5'-AACGGCCAGCAGGCAG-ATAC-3', 下游 5'-ACTTTATAGAGGCTGGCCAG-GAC-3'); OAT3 (上游 5'-GTTTACATCCCAGC-CAAGTT-3', 下游 5'-CTGCATTTCTGAAGGCACAA-3'); ABCG2 (上游 5'-TTTGGACTCAAGCACAG-

CAAATG-3', 下游 5'-TGGAATACCGAGGCTGGT-GAA-3')。RT-PCR 20 μ L 体系: 上下游引物各 1 μ L, Rox Reference Dye (50 \times) 为 0.4 μ L, dH₂O 为 6.6 μ L, SYBR Premix Ex Taq II 为 10 μ L, cDNA 为 1 μ L。反应条件: 95 °C, 3 min; 95 °C, 30 s, 60 °C, 30 s, 共 40 个循环。数据由荧光定量 PCR 仪自动收集, 每个样本重复 3 次荧光定量 PCR, 取平均值为 C_t 值, 通过公式计算获得 mRNA 表达的相对水平。

2.5 Western blotting 测定肾 URAT1 和 OAT3 的蛋白表达水平 取肾皮质组织以含 PMSF 的裂解液 RIPA 提取蛋白, 再以 Lowry 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度。上述蛋白进行经 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离后, 在 200 mA 条件下转移到 PVDF 膜上 (2 h), 以 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h 后, 一抗 URAT1 (1: 1 000), OAT3 (1: 1 000) 和内参 β -actin (1: 5 000), 4 °C 孵育过夜。再以 HRP 标记二抗 (1: 5 000) 孵育 1 h, 显色后采用 WO-9413B 型凝胶成像系统软件 Gelpro32 分析胶片中的 Western blot 蛋白条带中的灰度值。

2.6 免疫组化测定肠 ABCG2 的蛋白表达水平 小肠组织以 10% 福尔马林固定、脱水、透明、浸蜡和包埋后, 切片。将组织切片脱蜡和水化后, 滴加 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 室温 10 min。再高温修复 5 min, 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min。滴加一抗, 4 °C 过夜后滴加相应的二抗, 37 °C, 20 min。滴加 SABC 试剂, DAB 显色, 苏木素复染。以 Image pro-plus 6.0 软件分析免疫组化图片方法: 每组内每张切片随机挑选 3 个 200 倍视野进行拍照, 分析得出每张照片阳性的积分吸光度 IA 。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理和分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 虎桂药对对高尿酸血症大鼠血清尿酸水平的影响 与正常组比较, 造模后的大鼠血清尿酸水平显著性升高 ($P < 0.01$), 表明 *ig* 次黄嘌呤和乙胺丁醇, 皮下注射氧嗪酸钾的方法可以成功建立高尿酸血症模型。与模型组比较, 治疗后各给药组大鼠血清尿酸水平均明显降低, 有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 虎桂药对组降低血尿酸值随剂量加大而有增加趋势, 但作用未呈现明确的量效关系。见表 1。

表 1 虎桂药对 (PR) 对慢性高尿酸血症大鼠 SUA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of PR on SUA level in chronic hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	μmol·L ⁻¹	
			给药前	给药后
正常	-	12	99.3 ± 20.7	108.0 ± 17.7
模型	-	12	246.8 ± 45.1 ¹⁾	249.3 ± 48.5 ¹⁾
苯溴马隆	0.001	12	243.9 ± 56.3 ¹⁾	158.1 ± 27.4 ³⁾
痛风定	0.16	11	242.3 ± 45.9 ¹⁾	169.0 ± 35.1 ³⁾
PR	3.5	12	245.6 ± 56.5 ¹⁾	177.9 ± 40.3 ²⁾
	7.0	12	238.0 ± 50.3 ¹⁾	162.6 ± 38.1 ³⁾
	14.0	10	247.6 ± 59.4 ¹⁾	163.2 ± 45.9 ³⁾

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

3.2 对高尿酸血症大鼠尿量, UUA 浓度, 24 h 尿酸排泄量的影响 与正常组比较, 模型组尿量没有显著性差异, UUA 显著性降低, 24 h 尿酸排泄量显著减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 苯溴马隆组, PR 高、中剂量组 24 h 尿酸排泄量显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果表明, PR 具有促进高尿酸血症大鼠肾脏尿酸排泄的作用。见表 2。

表 2 PR 对慢性高尿酸血症大鼠尿量, UUA, 24 h 尿酸排泄量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of PR on urine output, UUA, and 24-hour excretion of uric acid in chronic hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	尿量 /mL	UUA /mmol·L ⁻¹	24 hUUA /μmol
正常	-	12	18.1 ± 6.6	2.22 ± 0.55	38.8 ± 11.4
模型	-	12	17.0 ± 5.0	1.50 ± 0.43 ¹⁾	25.5 ± 5.6 ¹⁾
苯溴马隆	0.001	12	18.2 ± 4.9	2.04 ± 0.46 ³⁾	36.7 ± 6.8 ³⁾
痛风定	0.16	11	17.7 ± 5.2	1.81 ± 0.47 ²⁾	32.2 ± 5.6 ²⁾
PR	3.5	12	18.6 ± 4.4	1.66 ± 0.74	30.8 ± 7.2 ²⁾
	7.0	12	19.6 ± 3.8	1.80 ± 0.45 ²⁾	35.2 ± 6.5 ³⁾
	14.0	10	19.2 ± 4.0	1.79 ± 0.42 ²⁾	35.0 ± 10.3 ³⁾

3.3 对高尿酸血症大鼠 Cr, BUN, GPT 的影响 与正常组比较, 模型组 Cr 和 GPT 没有显著性差异, BUN 显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组 Cr 和 GPT 没有显著性差异, 其余各给药组 BUN 显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, 该高尿酸血症大鼠造模方法未对肝脏造成影响, 大鼠肾脏因尿酸增高出现继发性轻度损害。PR 具有改善高尿酸血症大鼠肾功能的作用, 见表 3。

3.4 对高尿酸血症大鼠肾脏组织 URAT1 及 OAT3

表 3 PR 对高尿酸血症大鼠 Cr, BUN, GPT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of PR on Cr, BUN, GPT level in chronic hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	Cr /μmol·L ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	GPT /U·L ⁻¹
正常	-	12	43.2 ± 3.2	6.2 ± 0.3	24.0 ± 7.0
模型	-	12	47.7 ± 7.4	10.5 ± 2.5 ¹⁾	24.0 ± 7.2
苯溴马隆	0.001	12	47.3 ± 4.9	7.5 ± 1.9 ²⁾	26.0 ± 4.5
痛风定	0.16	11	47.1 ± 4.1	7.5 ± 2.0 ²⁾	24.0 ± 4.6
PR	3.5	12	46.8 ± 4.8	7.6 ± 1.1 ²⁾	25.7 ± 8.0
	7.0	12	45.7 ± 4.7	6.5 ± 1.6 ³⁾	25.3 ± 6.2
	14.0	10	48.5 ± 7.9	7.2 ± 1.4 ²⁾	25.3 ± 10.1

mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾脏组织 URAT1 mRNA 的表达显著增高 ($P < 0.01$), 肾 OAT3 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各个给药组可下调肾 URAT1 mRNA 表达, 并上调肾 OAT3 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4。

表 4 PR 对高尿酸血症大鼠肾脏 URAT1, OAT3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of PR on renal tissue URAT1, OAT3 mRNA expression in hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	URAT1	OAT3
正常	-	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.17
模型	-	2.64 ± 0.55 ¹⁾	0.44 ± 0.09 ²⁾
苯溴马隆	0.001	1.30 ± 0.19 ³⁾	1.20 ± 0.23 ⁴⁾
痛风定	0.16	1.60 ± 0.30 ³⁾	1.10 ± 0.09 ⁴⁾
PR	3.5	1.79 ± 0.37	0.81 ± 0.12 ⁴⁾
	7.0	1.33 ± 0.29 ³⁾	1.15 ± 0.11 ⁴⁾
	14.0	1.49 ± 0.44 ³⁾	1.47 ± 0.31 ^{1, 4)}

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 5~6 同)。

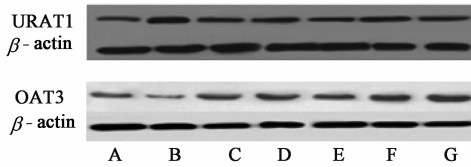
3.5 对高尿酸血症大鼠肾脏组织中 URAT1 及 OAT3 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾脏组织 URAT1 蛋白的表达显著增高 ($P < 0.01$), 肾 OAT3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各个给药组肾 URAT1 蛋白表达不同程度下降, 肾 OAT3 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。见表 5, 图 1。

3.6 对高尿酸血症大鼠小肠组织 ABCG2 mRNA 及蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠的小肠 ABCG2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各个给药组小肠 ABCG2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。各组大鼠小肠组织绒毛

表 5 PR 对高尿酸血症大鼠肾 URAT1 和 OAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of PR on protein expression of renal URAT1 and OAT3 of hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	URAT1	OAT3
正常	-	0.396 ± 0.036	0.413 ± 0.017
模型	-	0.851 ± 0.052 ²⁾	0.175 ± 0.009 ²⁾
苯溴马隆	0.001	0.566 ± 0.045 ^{2,4)}	0.528 ± 0.045 ^{1,4)}
痛风定	0.16	0.575 ± 0.068 ^{1,4)}	0.504 ± 0.064 ⁴⁾
PR	3.5	0.404 ± 0.044 ⁴⁾	0.631 ± 0.055 ^{2,4)}
	7.0	0.542 ± 0.044 ^{1,4)}	0.709 ± 0.086 ^{2,4)}
	14.0	0.450 ± 0.043 ⁴⁾	0.782 ± 0.047 ^{2,4)}



A. 正常组; B. 模型组; C. 苯溴马隆组; D. 痛风定组; E. 虎杖-桂枝 3.5 g·kg⁻¹组; F. 虎杖-桂枝 7.0 g·kg⁻¹组; G. 虎杖-桂枝 14.0 g·kg⁻¹组 (图 2 同)

图 1 PR 对高尿酸血症大鼠肾 URAT1 和 OAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of PR on protein expression of renal URAT1 and OAT3 of hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

上皮细胞内 ABCG2 蛋白呈现棕黄色, 模型组可见少量棕黄色物质, 与正常组比较, 模型组蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各个给药组蛋白表达升高, 具有显著性差异, PR 中、高剂量组棕黄色物质多而亮, IA 值增高, 提示上调 ABCG2 蛋白表达效应作用较强 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 6, 图 2。

表 6 PR 对高尿酸血症大鼠 ABCG2 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of PR on mRNA and protein expression of hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ABCG2 /mRNA	ABCG2 /protein
正常	-	1.00 ± 0.13	9 365 ± 1 247
模型	-	0.58 ± 0.18 ²⁾	4 892 ± 781 ²⁾
苯溴马隆	0.001	1.12 ± 0.18 ³⁾	13 480 ± 4 006 ³⁾
痛风定	0.16	1.17 ± 0.13 ³⁾	10 007 ± 1 427 ⁴⁾
PR	3.5	1.18 ± 0.14 ³⁾	11 119 ± 1 757 ⁴⁾
	7.0	1.37 ± 0.41 ³⁾	15 299 ± 1 865 ^{1,4)}
	14.0	1.79 ± 0.32 ^{1,4)}	24 036 ± 6 438 ^{1,4)}

4 讨论

虎杖与桂枝是宋《太平圣惠方》卷二十二虎杖散中的核心药对, 虎杖散主治白虎风, 血脉结滞, 骨

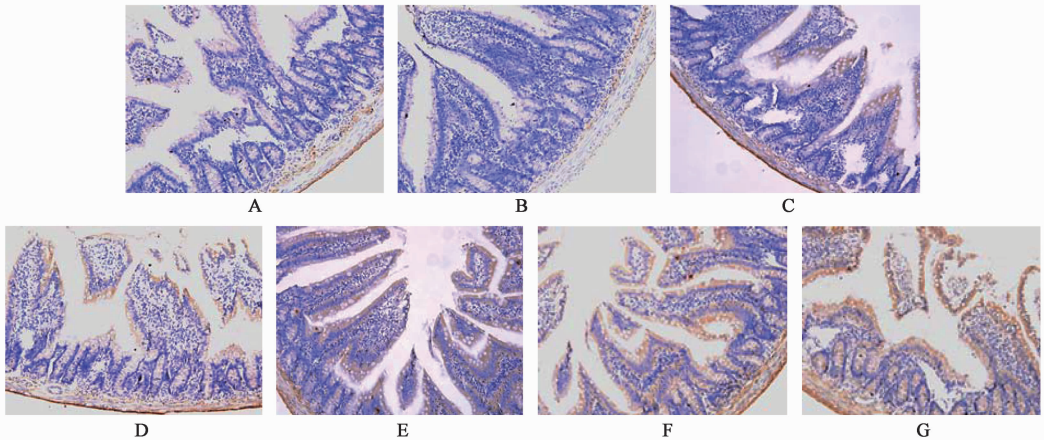


图 2 PR 对高尿酸血症大鼠小肠中 ABCG2 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of PR on protein expression of intestinal ABCG2 in hyperuricemia rats (IHC, ×200)

髓疼痛, 发作无时。该药对以具寒温两种药性的药物分主次组合为特点, 清宣并进, 寒热兼调, 在痛风病治法上另辟蹊径, 两药相反相成, 继承和发扬了中医配伍理论和传统古方之精髓, 正如《本草纲目》所言“一冷一热, 一阴一阳, 阴阳相济, 最得制方之妙”。目前国内外尚未见两药合用对痛风及高尿酸血症的深入报道。

关于大鼠高尿酸血症模型, 根据既往报道, 现有造模方法虽可使大鼠血尿酸较快升高, 但高尿酸水平维持时间较短, 很难观察到药物降尿酸的全程作用以及用于药物作用机制的研究^[8-10], 且大部分实验显示大鼠肾脏损害出现早并且较重, 与人类发病过程不符。故目前尚无公认标准的大鼠高尿酸血症动物模型^[11]。本次实验动物造模, 笔者首次以皮下

注射氧嗪酸钾,联合 *ig* 次黄嘌呤和乙胺丁醇的方法,抑制大鼠体内对尿酸的分解、增加其尿酸的生成、抑制其尿酸的排泄,使更多的尿酸在大鼠体内蓄积,从而建立相对持续稳定的高尿酸血症大鼠模型,该模型较好的模拟了人类高尿酸血症病理状态,适合于作为高尿酸血症治疗药物药效及作用机制的筛选的研究工具,为痛风研究提供真实有效技术平台。

实验结果表明,与正常组比较,模型组大鼠血尿酸显著升高,实验周期内持续且稳定,BUN 有所增高,但 Cr,GPT 没有显著变化,表明本实验采用的造模方法没有对大鼠肾脏和肝脏造成严重损害。

给药治疗后,各给药组与模型组比较,可显著降低血尿酸,同时 24 h 尿酸排泄量有很大的升高,虎桂配伍组显示一定的量效关系,但达到一定剂量阈后作用不再提高。与模型组比较,虎桂配伍还能显著降低尿素氮水平,保护肾功能。

肾脏排泄尿酸需多种位于肾小管上皮细胞的尿酸转运蛋白共同协调完成,是肾脏调节和保持体内尿酸水平稳定的关键,也是多种内源性和外源性物质的作用靶点。URAT1 位于肾小管上皮细胞的刷状缘,具有重吸收尿酸的功能;OAT3 位于肾小管的基底外侧膜上,具有分泌尿酸的功能;ABCG2 除了在肾脏表达,还表达于小肠黏膜上,可调节尿酸排泄^[12]。

已有研究表明,虎杖苷能降低尿酸,其能够抑制 URAT1 的表达,促进 OAT1 和 OAT3 的表达^[13-14];本实验结果显示,虎桂配伍可通过抑制肾脏重吸收的转运蛋白 URAT1 mRNA 和蛋白的过度表达而减少了尿酸重吸收,促进肾脏分泌的转运蛋白 OAT3 mRNA 和蛋白和小肠 ABCG2 的表达而增加了尿酸分泌。

综合实验结果显示,虎桂药对大鼠高尿酸血症有明确的治疗作用,其促进高尿酸血症大鼠肾脏及肠道尿酸排泄以降低血清尿酸水平的作用机制与其调节有机阴离子转运体表达密切相关,尤其对于小肠促进尿酸分泌阴离子转运体 ABCG2 的影响是实验中新的发现,结果体现了中药多靶点发挥作用的的优势,URAT1,ABCG2 和 OAT3 可作为虎桂药对干预高尿酸血症的作用靶点。

高尿酸血症及痛风发病机制复杂,属多基因变异代谢性疾病,有多种尿酸盐转运体参与肾近端小管上皮细胞对尿酸的重吸收和分泌,对其发病机制及治疗的研究还应综合多种相关基因及其表达活性进行进一步研究。中医寒热并用治法确有其独

特作用,通过现代药理学对寒热并用对药的深入研究,有利于发掘和提高传统中药配伍形式,对提高临床疗效有重要意义。

[参考文献]

[1] Doherty M, Jansen T L, Nuki G, et al. Gout: why is this curable disease so seldom cured? [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(11):1765-1770.

[2] Grassi D, Ferri L, Desideri G, et al. Chronic hyperuricemia, uric acid deposit and cardiovascular risk [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(13):2432-2438.

[3] Terkeltaub R, Bushinsky D A, Becker M A. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8 (Suppl 1):S4.

[4] Nakanishi T, Ohya K, Shimada S, et al. 2013. Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATv1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2013, 28(3):603-611.

[5] Vallon V, Eraly S A, Rao S R, et al. A role for the organic anion transporter OAT3 in renal creatinine secretion in mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302(10):1293-1299.

[6] Woodward O M, Kottgen A, Kottgen M, et al. ABCG transporters and disease [J]. *FEBS J*, 2011, 278(18):3215-3225.

[7] 王颖芳, 韩彬, 贾真, 等. 痛风克方中寒热药对不同配比对大鼠痛风模型的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15):185-189.

[8] 徐立, 时乐, 赵芳, 等. 大鼠急性高尿酸血症模型的复制方法初探 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(7):976-978.

[9] 陈光亮, 武松, 那莎, 等. 萆薢总皂苷对慢性高尿酸血症大鼠尿酸排泄指标的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(1):75-80.

[10] 徐立, 时乐, 仲文欣. 尿酸酶抑制剂在大鼠急性高尿酸血症模型复制中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(3):142-146.

[11] 刘淑芬, 曾学军. 高尿酸血症动物模型研究进展 [J]. *基础医学与临床杂志*, 2011, 31(3):344-347.

[12] Takada T, Ichida K, Matsuo H, et al. ABCG2 dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2014, 33(4/6):275-281.

[13] 吴杲, 吴汉斌, 蒋红. 虎杖苷的降尿酸作用及其机制研究 [J]. *药学学报*, 2014, 49(12):1739-1742.

[14] 闫云霞, 杨中林, 萧伟, 等. 虎杖降尿酸作用初步研究 [J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(8):7-9.

[责任编辑 周冰冰]