

· 经典名方 ·

萆薢分清丸通过调控尿酸盐转运蛋白表达水平干预 高尿酸血症大鼠的作用机制

张明昊, 杜婧雯, 张童, 郭申, 俎兆轩, 赵绅, 王瑾瑾*
(河南中医药大学医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:通过观察萆薢分清丸对高尿酸血症(HUA)模型大鼠肾脏尿酸盐转运蛋白及mRNA水平的影响,探讨该方对HUA大鼠的干预作用机制。**方法:**60只雄性SD大鼠随机为正常组、模型组、别嘌醇组(0.03 g·kg⁻¹)和萆薢分清丸低、中、高剂量组(0.8、1.6、3.2 g·kg⁻¹)。除正常组外,其余各组大鼠每天灌胃氧嗪酸钾1.5 g·kg⁻¹和腺嘌呤0.1 g·kg⁻¹以建立HUA模型,连续28 d,以血尿酸(SUA)水平升高为标准。造模成功后依据组别给予相应药物干预,1次/d,连续28 d。末次给药24 h后,采集大鼠尿液和血液,采用酶比色法测定尿酸(UUA)、SUA、尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)水平;取大鼠双侧肾脏,称重,计算肾脏系数;苏木素-伊红(HE)染色法观察肾脏病理变化;免疫组化(IHC)检测肾脏组织中尿酸转运体1(URAT1)、葡萄糖转运体9(GLUT9)、有机阴离子转运体1(OAT1)、有机阴离子转运体3(OAT3)、ATP结合盒转运蛋白G2(ABCG2)蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测URAT1、GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠肾脏系数明显增加($P<0.05$);SUA、BUN和SCr水平明显升高($P<0.05$),UUA水平明显降低($P<0.05$);肾小管代偿性扩张,管内可见尿酸盐结晶和蛋白管型;肾脏组织中URAT1、GLUT9蛋白表达水平及mRNA水平明显升高($P<0.05$),OAT1、OAT3和ABCG2蛋白表达水平及mRNA水平明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,各给药干预组大鼠肾脏系数明显减小($P<0.05$);SUA、BUN和SCr水平明显降低($P<0.05$),UUA水平明显升高($P<0.05$);肾脏组织病变明显减轻,URAT1、GLUT9蛋白表达水平及mRNA水平明显降低($P<0.05$),OAT1、OAT3和ABCG2蛋白表达水平及mRNA水平明显升高($P<0.05$)。**结论:**萆薢分清丸可通过调节尿酸盐转运蛋白表达水平来实现其对HUA的干预作用。

[关键词] 萆薢分清丸;高尿酸血症;尿酸盐转运蛋白;大鼠

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)03-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221708

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220830.1555.024.html>

[网络出版日期] 2022-08-31 10:16:00

Intervention Effect of Bixie Fenqingwan on Hyperuricemia Rats by Regulating Urate Transporters

ZHANG Minghao, DU Jingwen, ZHANG Tong, GUO Shen, ZU Zhaoxuan, ZHAO Shen, WANG Jinjin*
(School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the intervention effect of Bixie Fenqingwan on hyperuricemia (HUA) rats by regulating urate transporters. **Method:** Sixty healthy rats were randomly divided into normal, model, allopurinol (0.03 g·kg⁻¹), and Bixie Fenqingwan low-, medium- and high-dose (0.8, 1.6, 3.2 g·kg⁻¹) groups, 10 in each group. Except the normal group, the other rats were given potassium oxonate 1.5 g·kg⁻¹ and adenine 0.1 g·kg⁻¹ for 28 consecutive days to establish the HUA rat model, and rats with increased serum uric acid

[收稿日期] 2022-07-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82104748);河南省自然科学基金项目(202300410253);河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2020GGJS109);河南中医药大学科研苗圃工程项目(MP2022-109)

[第一作者] 张明昊,硕士,高级实验师,从事基础药理学研究,E-mail:zhangminghao@hactcm.edu.cn

[通信作者] *王瑾瑾,博士,副教授,从事预防医学研究,E-mail:wangjinjin@hactcm.edu.cn

(SUA) were considered successfully modeled. After modeling, corresponding drugs were given to the groups, once per day. Urine and blood was collected after 24 h of the final administration. The levels of urine uric acid (UUA), SUA, blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) were measured by enzymatic colorimetry. The rat kidneys were taken and weighed to calculate the kidney index. The pathological changes of kidney tissue were observed by haematoxylin-eosin (HE) staining. The protein and mRNA expressions of urate transporter 1 (URAT1), glucose transporter 9 (GLUT9), adenosine triphosphate-binding cassette transporter protein G2 (ABCG2), organic anion transporter 1 (OAT1) and organic anion 3 transporter (OAT3) in kidney tissue were detected by immunohistochemistry and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), respectively. **Result:** Compared with the conditions in the normal group, the kidney index, levels of SUA, BUN and SCr, and protein and mRNA expressions of URAT1 and GLUT9 in kidney tissue were increased ($P<0.05$), while the UUA level and protein and mRNA expressions of OAT1, OAT3 and ABCG2 were decreased in the model group ($P<0.05$). In addition, there was compensatory dilatation with urate crystals and protein casts in renal tubules in the model group. Compared with the model group, the intervention groups had lowered kidney index ($P<0.05$), reduced levels of SUA, BUN and SCr ($P<0.05$), down-regulated protein and mRNA expressions of URAT1 and GLUT9 ($P<0.05$), elevated UUA level ($P<0.05$) and up-regulated protein and mRNA expressions of OAT1, OAT3 and ABCG2 ($P<0.05$), and the kidney tissue lesions were alleviated ($P<0.05$). **Conclusion:** Bixie Fenqingwan has intervention effect on HUA, and its mechanism may be related to regulating urate transporters.

[Keywords] Bixie Fenqingwan; hyperuricemia; urate transporters; rats

高尿酸血症(HUA)是一种由嘌呤代谢异常引起的代谢性疾病,以尿酸生成过多和排泄过少为主要病理特征。血液中尿酸水平过高会使大量尿酸盐晶体沉积于关节和肾脏中,故HUA是痛风性关节炎、急性尿酸肾病发生的直接生化基础,也是心血管疾病,特别是高血压的主要危险因素^[1-2]。目前西医治疗常用别嘌呤醇、非布司他等黄嘌呤氧化酶(XO)抑制剂来抑制尿酸生成,再配合丙磺舒、苯溴马隆和雷西那德等尿酸转运体抑制剂来促进尿酸排泄,这些药物因存在皮疹、肝转氨酶升高、胃肠道反应等不良反应,临床应用受到一定限制^[3-4]。中医古籍无HUA记载,依据临床表现可将HUA归为“痛风”“历节”“热痹”范畴,认为“脾失健运,湿浊内生,血瘀阻络”为其主要病机,故中医治疗多从分清降浊、化湿通络入手,疗效明显^[5-6]。

萆薢分清丸始载于《丹溪心法》,由萆薢、石菖蒲、甘草、乌药、益智仁组成,具有温肾补脾,分清泌浊之功效^[7-8],且已见有治疗HUA的临床报道^[9],但此方面实验研究较少,作用机制亦不明确。本研究考虑到萆薢分清丸分清泌浊作用符合HUA的中医治疗思路,故选用萆薢分清丸对HUA大鼠进行干预,以别嘌呤醇为阳性药物,观察萆薢分清丸对尿酸水平、肾脏功能及肾脏病理变化的影响。尿酸盐转运蛋白在尿酸分泌与肾小管对尿酸重吸收过程中

具有重要作用,且已有关于HUA“湿浊内生”与肾脏尿酸盐转运蛋白水平相关性的研究报道^[10]。基于以上研究基础,考虑到中药具有作用于多靶点的特点,本研究将基于尿酸盐转运蛋白调控来探讨萆薢分清丸对HUA的干预作用机制。

1 材料

1.1 动物 60只健康SPF级雄性SD大鼠,8周龄,体质量180~200g,由郑州市惠济区华兴实验动物养殖场提供,合格证号SCXK(豫)2019-0002。所有大鼠分笼饲养于河南中医药大学医学院实验室,室温20~22℃,相对湿度为55%~60%,正常光照,大鼠自由饮水采食。本实验获河南中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号DWLL202201010。

1.2 药物与试剂 萆薢分清丸(广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂,批号4220002,0.05g/粒);别嘌呤片(合肥久联制药有限公司,批号20210305,规格0.1g/片);氧嗪酸钾、腺嘌呤(上海麦克林生化科技有限公司,批号分别为C13002056、C12996536);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号20160704);氨基甲酸乙酯(天津市光复科技发展有限公司,批号20210902);苏木素染色液、伊红染色液(福州飞净生物科技有限公司,批号分别为190805、20211009);尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)测定试剂盒(南

京建成生物工程研究所,批号分别为C012-1-1、C013-1-1、C011-2-1);兔SP试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为SP-9001、ZLI-9018);兔抗大鼠尿酸转运体1(URAT1)、有机阴离子转运体1(OAT1)抗体、TriQuick总RNA提取试剂、cDNA合成试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)扩增试剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB111847、GB113690、R1100、G3330、G3320);兔抗大鼠葡萄糖转运体9(GLUT9)、有机阴离子转运体3(OAT3)、ATP结合盒转运蛋白G2(ABCG2)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-4241R、bs-0609R、bs-0662R)。

1.3 仪器 BS110S型电子天平(北京塞多利斯天平公司);MR-96TB型酶标仪[骋克仪器(上海)有限公司];RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司);D3024R型台式高速冷冻型微量离心机[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];YD-6D型组织包埋机、YD-A型组织摊片机、YD-B型组织烤片机(金华市科迪仪器设备有限公司);CX23型光学显微镜(日本奥林巴斯公司);Stepone plus型Real-time PCR仪(美国ABI公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 氧嗪酸钾、腺嘌呤、萆薢分清丸、别嘌醇片均溶于0.1% CMC-Na制成混悬液。60只8周龄SD雄性大鼠,适应性饲养1周后,随机选取10只为正常组,其余大鼠分别按 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃氧嗪酸钾和腺嘌呤溶液,1次/d,连续28 d,正常组灌胃等体积0.1% CMC-Na溶液,参考文献资料^[10]及课题组前期预实验结果,以血尿酸(SUA)水平升高为HUA建模成功标准。将成模大鼠随机分为模型组、别嘌醇组和萆薢分清丸低、中、高剂量组,每组10只。萆薢分清丸、别嘌醇成人用量分别为 $18 \text{ g} \cdot (70 \text{ kg})^{-1}$ 、 $0.3 \text{ g} \cdot (70 \text{ kg})^{-1}$,根据人鼠换算公式 $S_{\text{大鼠}/200 \text{ g}} = 0.018 \times S_{\text{人}/70 \text{ kg}}$,得萆薢分清丸、别嘌醇大鼠用量分别为 1.6 、 $0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。故本实验以折算剂量 $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为萆薢分清丸中剂量;以 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (折算剂量的1/2倍)为萆薢分清丸低剂量;以 $3.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (折算剂量的2倍)为萆薢分清丸高剂量;以 $0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为别嘌醇剂量,以上药物均灌胃给药,灌胃体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;正常组和模型组大鼠灌胃等体积0.1% CMC-Na溶液,1次/d,连续28 d。

2.2 观察指标及方法 末次给药24 h后,各组大鼠称重后腹腔注射 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氨基甲酸乙酯麻醉,腹主动

脉取血, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径10 cm),取上清液于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存。然后解剖取肾脏,去除周围组织,生理盐水洗涤,滤纸吸尽脏器表面液体后用电子天平称量记录,然后将肾脏组织一分为二,其中一份用4%多聚甲醛固定,另一份用液氮速冻后于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存。

2.2.1 酶比色法检测尿酸(UUA)、SUA、BUN、SCr水平 取2.2项下制备的血清,室温溶解,按照试剂盒说明书操作,采用酶标仪在510 nm波长处测定各孔吸光度A,并依据标准曲线计算UUA、SUA、BUN、SCr含量。

2.2.2 计算肾脏系数 统计各组大鼠肾脏质量与体质量,计算肾脏系数(肾脏系数=肾脏质量/体质量),以此来评价肾脏病变程度。

2.2.3 苏木素-伊红(HE)染色法观察肾脏组织形态 取2.2项下固定的肾脏组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、 $4 \mu\text{m}$ 切片等过程制作病理切片,切片经二甲苯脱蜡,HE染色,梯度乙醇脱水后,中性树胶封片,光学显微镜下观察肾脏组织形态变化并于400倍镜采集图像。

2.2.4 免疫组化法检测肾脏组织中URAT1、GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2蛋白表达水平 取2.2.3项下制备的组织切片,经二甲苯脱蜡、水化后,用柠檬酸盐缓冲液热修复8 min,待温度降至室温后切片依次用 H_2O_2 孵育10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗,山羊血清孵育30 min,然后滴加URAT1、GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2(1:2 000)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日切片复温至 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 后滴加生物素标记的羊抗兔二抗孵育20 min,PBS浸洗,DAB显色10 min,自来水冲洗终止。后苏木素复染3 min,盐酸乙醇分化,自来水再次冲洗,切片经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后镜检。每只大鼠肾脏切片在400倍镜下随机选取1个视野,以棕黄色为阳性染色,采用Image-Pro Plus 6.0测定每个视野中积分吸光度IA进行统计分析。

2.2.5 Real-time PCR检测肾脏组织中URAT1、GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA水平 采用DNASar软件包的PrimerSelect程序设计特异性引物,并由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。取肾脏组织100 mg,加入TriQuick试剂1 mL充分研磨匀浆后提取总RNA,检测RNA浓度及纯度。在 $20 \mu\text{L}$ 反应体系内合成cDNA,逆转录条件为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,5 min; $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$,30 min; $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$,5 s;再以 $2 \mu\text{L}$ cDNA为模板,加入靶基因上下游引物于 $15 \mu\text{L}$ 反应体系内进行

PCR扩增,扩增条件为95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共进行40个循环。根据扩增曲线及溶解曲线判断PCR反应特异性。所得结果以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达水平并进行统计分析。PCR引物序列见表1。

2.3 统计学方法 采用SPSS 22.0进行统计分析,计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对HUA大鼠肾脏系数的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量明显减小($P<0.05$),肾脏系数明显增加($P<0.05$),大鼠肾脏质量明显增加($P<0.05$);与模型组比较,别嘌醇组和草薢分清丸中、高剂量组大鼠肾脏质量明显减小($P<0.05$),别嘌醇组和草薢分清丸低、中、高剂量组大鼠肾脏系数明显

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
URAT1	上游 TGTATGGAGTGGTGCCAGTGTT	116
	下游 CACTTCTTCACTGACTGTTTCTGG	
GLUT9	上游 CCAACTATGTGGACTCAATGCGA	100
	下游 GGTGCTCAGGGTGATGTATGG	
OAT1	上游 ACAAGCAAGGACAACCCGAAT	170
	下游 AAGGTTCCACTCAGTCACGATG	
OAT3	上游 CTCTGAGCACCGTTATCTTGAATG	169
	下游 AAGAAGGGAGCAGACGAGGTTA	
ABCG2	上游 TAGGACTGAAGAGGACGGTGGA	242
	下游 GCCATATCGAGGAATGCTAAAGTA	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

减小($P<0.05$)。见表2。

表2 草薢分清丸对HUA大鼠肾脏系数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Bixie Fenqingwan on renal tissue of HUA rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	体质量/g	肾脏质量/mg	肾脏系数/ $mg\cdot g^{-1}$
正常组		265.58±27.12	2 142.10±253.59	8.07±0.44
模型组		177.25±22.76 ¹⁾	3 021.32±442.86 ¹⁾	17.02±0.71 ¹⁾
别嘌醇组	0.03	178.46±19.73	2 474.00±332.99 ²⁾	13.85±0.81 ²⁾
草薢分清丸低剂量组	0.8	186.36±15.72	2 769.90±313.99	14.86±1.15 ²⁾
草薢分清丸中剂量组	1.6	172.83±13.27	2 444.23±250.93 ²⁾	14.21±0.99 ²⁾
草薢分清丸高剂量组	3.2	173.71±14.62	2 415.20±221.76 ²⁾	13.92±0.90 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$

3.2 对HUA大鼠UUA、SUA、BUN、SCr水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠UUA水平明显降低($P<0.05$),SUA、BUN、SCr水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,别嘌醇组和草薢分清丸低、中、高剂量组大鼠UUA水平明显升高($P<0.05$),SUA、

BUN、SCr水平明显降低($P<0.05$);与别嘌醇组比较,草薢分清丸低、中剂量组大鼠SUA水平明显升高($P<0.05$);与草薢分清丸低剂量组比较,草薢分清丸高剂量组大鼠SUA水平明显降低($P<0.05$)。见表3。

表3 草薢分清丸对HUA大鼠UUA、SUA、BUN、SCr水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Bixie Fenqingwan on levels of UUA, SUA, BUN, SCr of HUA rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	UUA/ $\mu mol\cdot L^{-1}$	SUA/ $\mu mol\cdot L^{-1}$	BUN/ $mmol\cdot L^{-1}$	SCr/ $\mu mol\cdot L^{-1}$
正常组		1 986.67±279.62	277.78±67.22	36.87±8.44	226.07±74.01
模型组		863.33±229.58 ¹⁾	777.78±71.23 ¹⁾	68.89±9.56 ¹⁾	644.64±58.93 ¹⁾
别嘌醇组	0.03	2 000.00±288.44 ²⁾	283.33±94.28 ²⁾	34.80±6.82 ²⁾	212.77±94.56 ²⁾
草薢分清丸低剂量组	0.8	1 916.67±369.95 ²⁾	500.00±58.69 ^{2,3)}	40.55±2.94 ²⁾	223.32±106.80 ²⁾
草薢分清丸中剂量组	1.6	1 973.33±421.17 ²⁾	405.56±107.32 ^{2,3)}	39.14±7.55 ²⁾	270.53±115.29 ²⁾
草薢分清丸高剂量组	3.2	2 003.33±407.41 ²⁾	333.34±71.49 ^{2,4)}	36.62±8.48 ²⁾	206.01±87.14 ²⁾

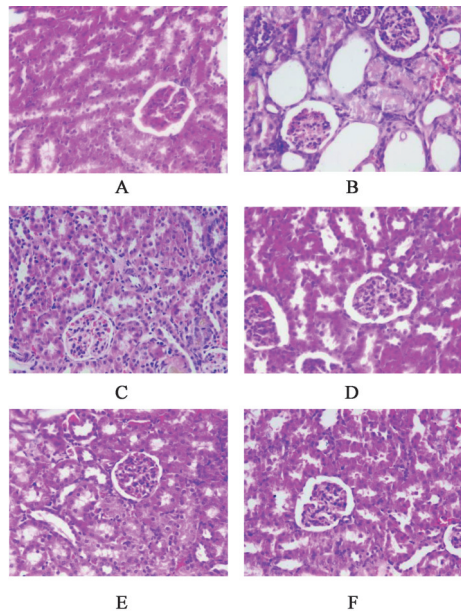
注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与别嘌醇组比较³⁾ $P<0.05$;与草薢分清丸低剂量组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表4和表5同)

3.3 对HUA大鼠肾脏组织形态的影响 正常组大鼠肾小球形态规则,肾小管结构排列整齐,未见尿

酸盐结晶和炎性细胞浸润;模型组大鼠肾小球局部硬化、萎缩,肾小管代偿性扩张,管内可见尿酸盐结

晶及出现蛋白管型,部分肾小管有炎性细胞浸润;别嘌醇组和萆薢分清丸高剂量组大鼠肾小球、肾小管病变明显改善;萆薢分清丸低、中剂量组大鼠肾小球、肾小管病变呈现出改善趋势。见图1。

3.4 对HUA大鼠肾脏组织中URAT1、GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏组织中有大量URAT1、GLUT9蛋白表达,其阳性表达IA均明显增加($P<0.05$),有少量OAT1、OAT3、ABCG2蛋白表达,其阳性表达IA均明显减小($P<0.05$)。与模型组比较,别嘌醇组和萆薢分清丸低、中、高剂量组大鼠肾脏组织中有少量URAT1、GLUT9蛋白表达,其阳性表达IA均明显减小($P<0.05$),有大量OAT1、OAT3、ABCG2蛋白表达,其阳性表达IA均明显增加($P<0.05$)。与别嘌醇组比较,萆薢分清丸低剂量组大鼠肾脏组织中有大量URAT1蛋白表达,其阳性表达IA均明显增加($P<0.05$),有少量OAT3蛋白表达,其阳性表达IA均明显减小($P<0.05$)。与萆薢分清丸低剂量组比较,萆薢分清丸高剂量组大鼠肾脏组织中有少量URAT1蛋白表达,其阳性表达IA均明显减小($P<0.05$);萆薢分清丸中、高剂量组大鼠肾脏组织



注:A.正常组;B.模型组;C.别嘌醇组;D.萆薢分清丸低剂量组;E.萆薢分清丸中剂量组;F.萆薢分清丸高剂量组(图2-图6同)

图1 萆薢分清丸对HUA大鼠肾脏组织形态的影响(HE, ×400)
Fig. 1 Effect of Bixie Fenqingwan on pathological structures of renal tissue in HUA rats (HE, ×400)

中有大量OAT3蛋白表达,其阳性表达IA均明显增加($P<0.05$)。见表4、图2-图6。

表4 萆薢分清丸对HUA大鼠肾脏组织中URAT1、GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Bixie Fenqingwan on expression of URAT1, GLUT9, OAT1, OAT3, ABCG2 of renal tissue in HUA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	URAT1/×10 ³	GLUT9/×10 ³	OAT1/×10 ³	OAT3/×10 ³	ABCG2/×10 ³
正常组		174.79±25.80	172.56±28.31	498.33±56.28	478.64±60.03	413.58±55.00
模型组		466.93±41.68 ¹⁾	766.35±77.65 ¹⁾	121.73±15.63 ¹⁾	138.99±40.99 ¹⁾	122.91±36.63 ¹⁾
别嘌醇组	0.03	164.72±10.97 ²⁾	123.70±26.95 ²⁾	482.42±63.62 ²⁾	537.96±47.12 ²⁾	499.69±62.11 ²⁾
萆薢分清丸低剂量组	0.8	231.07±36.05 ^{2,3)}	125.39±15.80 ²⁾	422.11±76.47 ²⁾	315.88±52.09 ^{2,3)}	473.85±36.42 ²⁾
萆薢分清丸中剂量组	1.6	193.10±32.79 ²⁾	145.52±42.46 ²⁾	481.84±55.19 ²⁾	540.62±72.39 ^{2,4)}	449.85±39.39 ²⁾
萆薢分清丸高剂量组	3.2	178.08±38.61 ^{2,4)}	148.77±44.62 ²⁾	510.42±68.75 ²⁾	535.61±79.38 ^{2,4)}	491.47±87.12 ²⁾

3.5 对HUA大鼠肾脏组织中URAT1、GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏组织URAT1 mRNA水平明显升高($P<0.05$),GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,别嘌醇组和萆薢分清丸低、中、高剂量组大鼠肾脏组织URAT1、GLUT9 mRNA水平均明显降低($P<0.05$),OAT1、ABCG2 mRNA水平明显升高($P<0.05$);别嘌醇组和萆薢分清丸高剂量组大鼠肾脏组织OAT3 mRNA水平明显升高($P<0.05$)。与别嘌醇组比较,萆薢分清丸低、中、高剂量组大鼠肾脏组织URAT1 mRNA水平明显升高($P<0.05$),ABCG2 mRNA水平明显降低($P<0.05$);萆薢分清丸低、中剂量组大鼠肾脏组

织GLUT9 mRNA水平明显升高($P<0.05$),OAT3 mRNA水平明显降低($P<0.05$);萆薢分清丸低剂量组大鼠肾脏组织OAT1水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与萆薢分清丸低剂量组比较,萆薢分清丸中、高剂量组大鼠肾脏组织URAT1 mRNA水平明显降低($P<0.05$),ABCG2 mRNA水平明显升高($P<0.05$);萆薢分清丸高剂量组大鼠肾脏组织GLUT9 mRNA水平明显降低($P<0.05$),OAT3 mRNA水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表5。

4 讨论

机体内嘌呤代谢产生尿酸,被尿酸酶降解为尿酸素后随尿液排出,使SUA维持在正常水平,而高

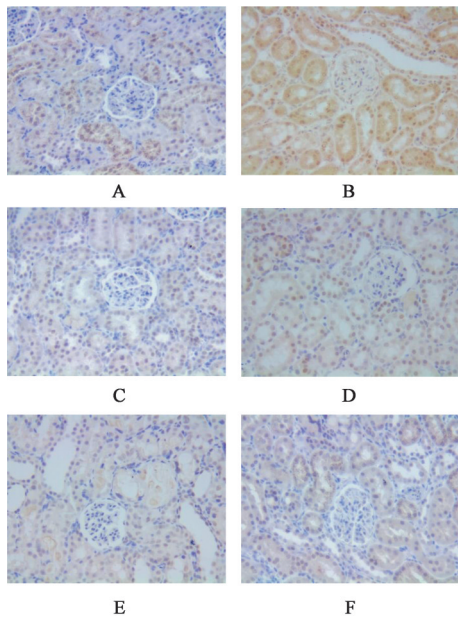


图2 萆薢分清丸对HUA大鼠肾脏组织中URAT1蛋白表达水平的影响(免疫组化,×400)

Fig. 2 Effect of Bixie Fenqingwan on expression of URAT1 of renal tissue in HUA rats (IHC, ×400)

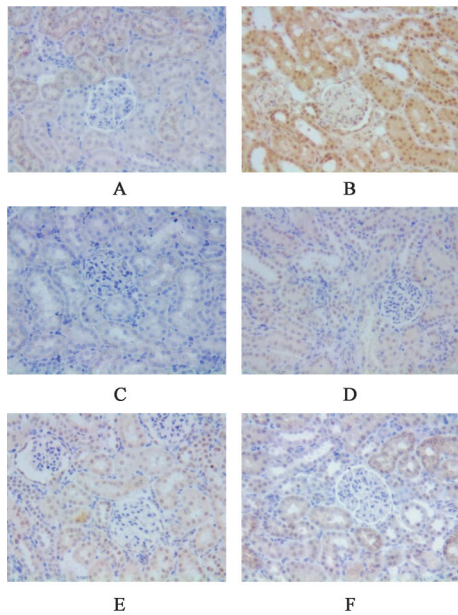


图3 萆薢分清丸对HUA大鼠肾脏组织中GLUT9蛋白表达水平的影响(免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of Bixie Fenqingwan on expression of GLUT9 of renal tissue in HUA rats (IHC, ×400)

嘌呤、高脂肪饮食、药物、饮酒等因素均有可能导致机体内尿酸水平升高或尿酸排泄障碍,引发高尿酸症。目前国内外尚无公认的HUA动物模型,本实验参考以往文献,采用氧嗪酸钾联合腺嘌呤的方式复制了HUA大鼠模型,其中腺嘌呤为尿酸前体,可转化为黄嘌呤沉积于肾小管,引发肾损伤;氧嗪酸钾为尿酸酶抑制剂,抑制尿酸分解为尿囊素,阻碍尿

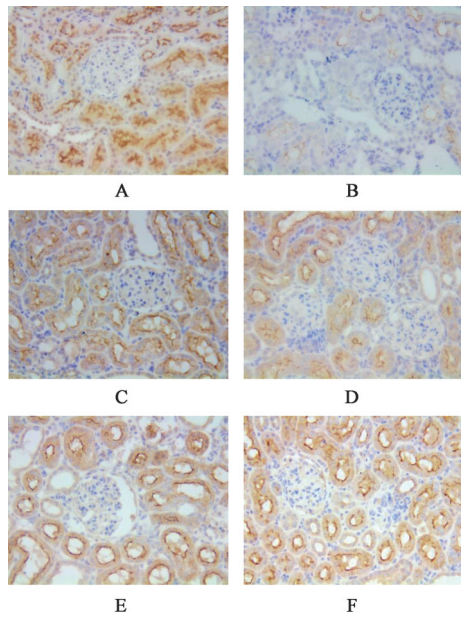


图4 萆薢分清丸对HUA大鼠肾脏组织中OAT1蛋白表达水平的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of Bixie Fenqingwan on expression of OAT1 of renal tissue in HUA rats (IHC, ×400)

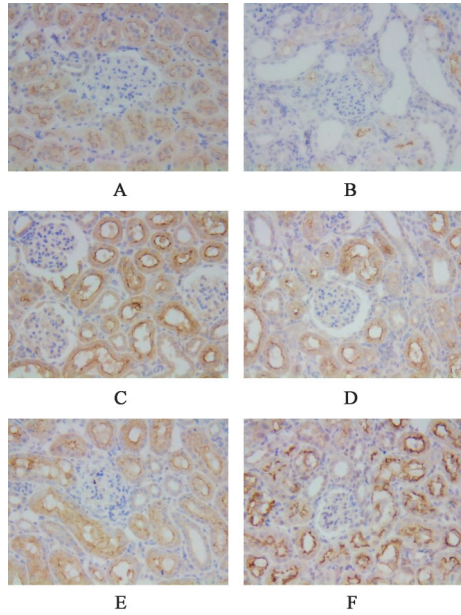


图5 萆薢分清丸对HUA大鼠肾脏组织中OAT3蛋白表达水平的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of Bixie Fenqingwan on expression of OAT3 of renal tissue in HUA rats (IHC, ×400)

酸排泄,两药合用既增加了尿酸来源,又阻碍了尿酸排泄,且由此复制的HUA模型与临床上人HUA病理特征较为一致,可用于HUA发病机制研究及药物筛选^[11-12]。此外,尿酸长期偏高,还会使尿酸盐沉积于肾脏引发尿酸性肾损伤,这一损伤常以肾功能相关指标来加以判断。肾脏系数反映肾脏状态,其增加时则提示肾脏可能出现了肿胀、肥大、充血、水

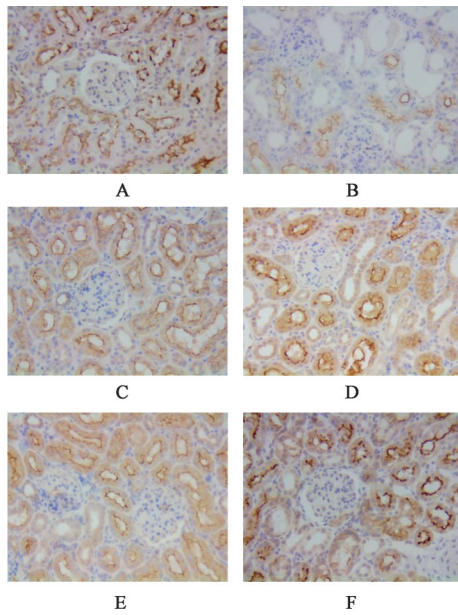


图6 萆薢分清丸对HUA大鼠肾脏组织中ABCG2蛋白表达水平的影响(免疫组化,×400)

Fig. 6 Effect of Bixie Fenqingwan on expression of ABCG2 of renal tissue in HUA rats (IHC, ×400)

肿、增生等病理变化。SCr是肌酸代谢的最终产物,由肾小管排泄;BUN是血液中除蛋白质外的一种含氮化合物,由肾小球滤过而排出体外,二者均是临床上检测肾脏功能的重要指标,其水平升高则提示

肾功能受损^[13-15]。本实验以肾脏系数、UUA、SUA、BUN、SCr为指标,结合肾脏病理变化,来考量HUA大鼠的建模过程及高尿酸对肾脏功能的影响,结果发现HUA大鼠肾脏系数增加,SUA、BUN和SCr水平升高,UUA水平降低,肾小球局部硬化萎缩,肾小管代偿性扩张,管内可见尿酸盐结晶和蛋白管型,表明造模成功。

萆薢分清丸由萆薢、益智仁、石菖蒲、乌药、甘草5味中药,粉碎成粉,过筛混匀,用水泛丸,干燥即成,主治肾不化气,清浊不分所致的小便频数与白浊,为治疗泌尿系统疾病的经典验方。整方以萆薢为君,善泻阳明、祛风利湿、去浊分清;以益智仁为臣,暖肾缩溲,补脾益气;以石菖蒲为佐,益气逐痰,祛邪化湿;以乌药、甘草为使,温肾暖脾,君臣配合,诸药并用,共行温肾利湿,固本清源之功效。现代药理学研究也证实萆薢分清丸具有较好的抗菌、消炎、利尿、除湿通淋功效^[7-9]。本实验选择了萆薢分清丸为HUA的干预药物加以研究,以临床上常用于HUA治疗的别嘌醇为阳性药,以考量萆薢分清丸对HUA的干预作用,结果发现萆薢分清丸可减小HUA大鼠肾脏系数,降低SUA、BUN和SCr水平,升高UUA水平,改善肾小球、肾小管病变,表明萆薢分清丸对HUA大鼠具有较好地干预作用。

表5 萆薢分清丸对HUA大鼠肾脏组织中URAT1、GLUT9、OAT1、OAT3、ABCG2 mRNA水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Bixie Fenqingwan on mRNA of URAT1, GLUT9, OAT1, OAT3, ABCG2 of renal tissue in HUA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	URAT1	GLUT9	OAT1	OAT3	ABCG2
正常组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		6.86±1.43 ¹⁾	3.86±0.53 ¹⁾	0.31±0.11 ¹⁾	0.47±0.20 ¹⁾	0.37±0.12 ¹⁾
别嘌醇组	0.03	1.05±0.20 ²⁾	1.45±0.22 ²⁾	3.92±1.68 ²⁾	1.82±0.71 ²⁾	3.77±0.63 ²⁾
萆薢分清丸低剂量组	0.8	6.10±0.90 ³⁾	2.56±0.38 ^{2,3)}	2.54±0.75 ^{2,3)}	0.41±0.18 ³⁾	1.45±0.22 ^{2,3)}
萆薢分清丸中剂量组	1.6	4.63±0.79 ^{2,3,4)}	2.19±0.47 ^{2,3)}	3.03±0.93 ²⁾	0.39±0.31 ³⁾	1.99±0.26 ^{2,3,4)}
萆薢分清丸高剂量组	3.2	2.19±0.32 ^{2,3,4)}	1.48±0.31 ^{2,4)}	3.21±1.50 ²⁾	1.52±0.63 ^{2,4)}	2.57±0.19 ^{2,3,4)}

尿酸在肾脏中的代谢主要涉及到滤过、再吸收、分泌和分泌后再吸收4个过程,除滤过外,其余过程均有尿酸盐转运蛋白的参与。URAT1为尿酸阴离子交换体,可将肾小管上皮细胞内阴离子与尿液中尿酸进行交换,使尿酸从肾小球滤液中重新回到血液,如其表达上调则会使尿酸重吸收增强,引起SUA水平升高,故URAT1为促尿酸排泄药物的重要靶点^[16-17]。GLUT9既是葡萄糖转运蛋白又是尿酸转运蛋白,可通过转运葡萄糖来加速对尿酸的重吸收,是近年来发现治疗HUA又一靶点。OAT1和OAT3是OATs家族中调节尿酸排泄的重要转运蛋白,可利用Na⁺-二羧酸盐共转运蛋白建立的外向

二羧酸梯度,以交换方式将尿酸从肾小管周毛细血管转运到肾小管上皮细胞内,完成尿酸分泌的第一步^[18-20]。ABCG2是一种高容量尿酸分泌蛋白,参与尿酸排泄过程,其表达降低可使肠道排泄尿酸减少,肾脏尿酸负荷增大^[21-22]。本实验结果发现HUA大鼠肾脏组织中URAT1、GLUT9蛋白表达水平及mRNA水平升高,OAT1、OAT3和ABCG2蛋白表达水平及mRNA水平降低;萆薢分清丸可以下调URAT1、GLUT9蛋白表达水平及mRNA水平,上调OAT1、OAT3和ABCG2蛋白表达水平及mRNA水平,即通过调控尿酸盐转运蛋白表达水平发挥其对HUA的干预作用。本实验基于尿酸代谢途径初步

揭示了萆薢分清丸对HUA大鼠的干预作用机制,今后将以研究为基础,采用药物诱导、基因敲除等多种手段调节尿酸代谢与转运途径,来深入研究萆薢分清丸对HUA大鼠的干预作用机制与尿酸代谢与转运的相关性,为萆薢分清丸在HUA治疗方面的深入开发利用提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 尤杨,夏岳,戚国庆,等. 非布司他对高尿酸血症模型大鼠血清尿酸水平和肾组织中NLRP3蛋白表达水平的影响[J]. 吉林大学学报:医学版,2019,45(6):1367-1372.
- [2] PETRESKI T, EKART R, HOJS R, et al. Hyperuricemia, the heart, and the kidneys-to treat or not to treat?[J]. Ren Fail, 2020,42(1):978-986.
- [3] 吴芑,王亮,李海涛,等. 高尿酸血症模型的建立及降尿酸药物的研究进展[J]. 中国病理生理杂志,2021,37(7):1283-1294.
- [4] 章晓云,曾浩,李华南,等. 痛风性关节炎的发病机制及中医药治疗研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(11):256-267.
- [5] 丁坤,曹文富,张永越,等. 祛湿涤浊汤对高尿酸血症大鼠尿酸转运蛋白的影响[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(8):1514-1520.
- [6] WEN X Y, TANG X Y, HE D, et al. Research progress on anti-hyperuricemia effects and mechanisms of Chinese medicines based on regulation of intestinal flora and metabolites[J]. Chin J Chin Mat Med, 2021,46(24):6387-6394.
- [7] 张卓君,孙颖,杨晓凌,等. 萆薢分清丸联合别嘌醇治疗痛风患者高尿酸血症的临床疗效和安全性[J]. 复旦学报:医学版,2020,47(2):245-250.
- [8] 郁超,何晓锋,陈磊,等. 萆薢分清丸治疗中年男性ⅢA型前列腺炎临床观察[J]. 中成药,2012,34(6):998-1000.
- [9] 朱文宏,白金山. 萆薢分清丸治疗高尿酸血症30例疗效观察[J]. 临床合理用药,2017,10(3):45-46.
- [10] 蔡唐彦,肖艳,郭洁梅,等. 痛风宁对高尿酸血症模型大鼠肾脏尿酸盐转运体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(16):79-86.
- [11] 刘冬恋,郭秋鸿,夏阳森,等. 慢性高尿酸血症肾损害

- 大鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报,2021,29(3):364-370
- [12] 魏瑶,吴珍,杨玉姣,等. 加味四妙丸对高尿酸血症小鼠的降尿酸及肾脏保护作用研究[J]. 中药材,2021,44(9):2184-2188
- [13] 张明昊,高一盈,赵盈盈,等. 复方丹参片通过调控TGF- β_1 /Smad通路及基质金属蛋白酶水平对肾纤维化大鼠的作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2022,33(3):300-306.
- [14] 张明昊,高一盈,董文霞,等. 复方丹参片对高脂血症模型大鼠血脂水平的改善及肾功能保护作用机制研究[J]. 中国药房,2022,33(7):819-824.
- [15] 张明昊,高一盈,赵盈盈,等. 桃核承气汤对肾纤维化大鼠的保护作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2021,37(17):2324-2334.
- [16] 胡庆华,张宪,王钰,等. 芒果苷促进高尿酸血症小鼠尿酸排泄和肾功能改善以及调节相关肾脏转运体的作用[J]. 药学学报,2010,45(10):1239-1246.
- [17] LI Q, HUANG Z, LIU D, et al. Effect of berberine on hyperuricemia and kidney injury: A network pharmacology analysis and experimental validation in a mouse model[J]. Drug Des Devel Ther, 2021,15(7):3241-3254.
- [18] 吴林秀,梁红,赵应学,等. 水蛭素对高尿酸血症大鼠尿酸盐转运体OAT1、URAT1、GLUT9表达的影响[J]. 中草药,2020,51(22):5776-5780.
- [19] NIE Q, LIU M, ZHANG Z, et al. The effects of hyperuricemia on endothelial cells are mediated via GLUT9 and the JAK2/STAT3 pathway[J]. Mol Biol Rep, 2021,48(12):8023-8032.
- [20] CHEN J, XU L, JIANG L, et al. Sonneratia apetala seed oil attenuates potassium oxonate/hypoxanthine-induced hyperuricemia and renal injury in mice[J]. Food Funct, 2021,12(19):9416-9431.
- [21] 符静泉,戴莉琳,韦曼莉,等. 猫须草水提物对痛风性肾病大鼠的肾脏保护作用[J]. 中药材,2020,43(11):2784-2788.
- [22] LU Y H, CHANG Y P, LI T, et al. Empagliflozin attenuates hyperuricemia by upregulation of ABCG2 via AMPK/Akt/CREB signaling pathway in type 2 diabetic mice[J]. Int J Biol Sci, 2020,16(3):529-542.

[责任编辑 周冰冰]