

泄浊除痹方对高尿酸血症小鼠尿酸及 URAT1 的影响

张娴娴, 孙维峰*, 徐伟, 王天

(广州军区广州总医院中医科, 广州 510010)

[摘要] **目的:** 观察泄浊除痹方对高尿酸血症小鼠尿酸及人尿酸盐阴离子交换器 1 (URAT1) 的影响, 探讨该方的作用机制。**方法:** 60 只 SPF 级昆明种雄性小鼠随机分成泄浊除痹方高、中、低剂量组、苯溴马隆组、造模组、空白对照组, 应用酵母法联合尿酸酶抑制法制备高尿酸血症模型, 造模开始后第 7 天, 药物治疗组分别给予泄浊除痹方颗粒 ($37.5, 18.75, 9.375 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、苯溴马隆片 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 每日 1 次 ig, 共 15 d, 测定血尿酸并应用荧光定量 PCR 法测定 URAT1 基因表达量。**结果:** 泄浊除痹方高、中、低剂量组均可降低小鼠血尿酸, 分别为 (209.00 ± 24.54), (234.50 ± 31.38), (273.88 ± 25.04) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与模型组比 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖关系; 高、中剂量组疗效与苯溴马隆 (208.70 ± 33.70) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当; 泄浊除痹方对 URAT1 有一定抑制作用 ($P < 0.05$)。**结论:** 泄浊除痹方可有效降低模型小鼠血尿酸, 可能通过下调 URAT1 基因的表达, 抑制尿酸盐重吸收过程而达到促进尿酸排泄作用。

[关键词] 高尿酸血症; 泄浊除痹方; 尿酸盐阴离子交换器 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0144-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111116.1424.006 **[网络出版时间]** 2011-11-16 14:24

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111116.1424.006.html>

Study on Influence of Xiezhuo Chubi Decoction on Uric Acid and URAT1 in Hyperuricemia Mice

ZHANG Xian-xian, SUN Wei-feng*, XU Wei, WANG Tian

(Department of Traditional Chinese Medicine, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Xiezhuo Chubi decoction on uric acid and urate transporter 1 (URAT1) gene in hyperuricemia mice, that to search for the mechanism of reducing uric acid. **Method:** Sixty Kunming male mice of SPF grade were randomly divided into high-, medium-, low-dose Xiezhuo Chubi decoction group, Benzbromarone group, model group and control group. All mice were established with yeast method combined with uricase inhibition method to build hyperuricemia model except control group. The corresponding drugs were administrated at the 7th day (Xiezhuo Chubi decoction $37.5, 18.75, 9.375 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, benzbromarone $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig, once per day for 15 days). The blood was obtained to detect uric acid levels. Simultaneously, the kidneys were removed to detect mRNA expressions of URAT1 with fluorescence quantitative PCR. **Result:** Imposed by different factors to each group, oral administration of Xiezhuo Chubi decoction could significantly reduce the uric acid in mice in a dose-dependent manner (209.00 ± 24.54), (234.50 ± 31.38), (273.88 ± 25.04) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). The effects of high-and medium-dose Xiezhuo Chubi decoction group were similar with benzbromarone group (208.70 ± 33.70) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The mRNA expressions of URAT1 were

[收稿日期] 20110619(004)

[基金项目] 全军“十一五”计划专项基金(2006062004); 广东省科技计划项目(2009B030801277); 广州市科技计划项目(2010GN-E00221)

[第一作者] 张娴娴, 医师, 硕士研究生, 从事中西医结合风湿免疫研究, Tel:020-36653518, E-mail: zh_xxian@163.com

[通讯作者] * 孙维峰, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合风湿免疫研究, Tel:020-36653520, E-mail: sunwf3@sina.com

decreased significantly in Xiezhuo Chubi decoction group than that in model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xiezhuo Chubi decoction could reduce the uric acid effectively. Its mechanism might be the action of inhibition to the mRNA expressions of URAT1 in kidney.

[**Key words**] hyperuricemia; Xiezhuo Chubi decoction; URAT1

高尿酸血症(hyperuricemia)是一种极具隐匿性的危害人类健康的代谢性疾病,是由于嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄减少引起的细胞外液尿酸盐超饱和状态。尿酸主要通过肾脏排泄,人尿酸盐阴离子交换器1(URAT1)是已被证实的与尿酸盐重吸收密切相关的转运蛋白,其表达对尿酸排泄有重要影响。经验方泄浊除痹方在广州军区广州总医院已有多年临床应用,该方部分组成药物已被证实具有促进尿酸排泄作用,可用于治疗高尿酸血症。本实验旨在通过观察该方对高尿酸血症小鼠模型血尿酸及 URAT1 的影响,证明其有效性,并探讨其可能的降尿酸作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级昆明种雄性小鼠 60 只,体重(28 ± 2)g,合格证号 SCXK(军)2007-033,由广州军区广州总医院动物实验中心提供,整个实验过程中动物自然饮水和供给食物。

1.2 造模剂和试剂 酵母膏购自北京奥博星生物技术有限责任公司,批号 20070906。97% 氧嗪酸钾盐购自 Sigma-Aldrich (Shanghai) Trading Co., Ltd.,批号 10726BH。尿酸试剂盒购自上海科华东菱诊断用品有限公司,批号 2400379。荧光染料 SYBR® Premix Ex Taq™ (DRR041S)购自 TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.,批号 BK8806。反转录试剂盒购自广州莱德尔生物科技有限公司,批号 286135。

1.3 药物 泄浊除痹方颗粒(由土茯苓 35 g,萆薢 18 g,山慈菇 15 g,王不留行 10 g,牛膝 10 g 组成,均采用颗粒剂,购自广东一方制药有限公司,上述 5 种药物颗粒按剂量配制为 1 剂)。苯溴马隆片(立加利仙)购自昆山龙灯瑞迪制药有限公司。

1.4 仪器 日立 H7170 型全自动生化分析仪,日本日立公司出品。Rotor-Gene® Q 实时荧光定量 PCR 仪,德国 QIAGEN 出品。

2 方法

2.1 分组 SPF 级昆明种雄性小鼠 60 只随机分为 6 组,分别为泄浊除痹方高、中、低剂量组、苯溴马隆组、造模组、空白对照组。每组 10 只。

2.2 造模及给药 除空白对照组外,其余各组根据

参考文献[1-2],用酵母法联合尿酸酶抑制法建立高尿酸血症模型。模型组用酵母膏按 30 g·kg⁻¹·d⁻¹,97% 氧嗪酸钾盐按 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量 ig,空白对照组用等体积生理盐水 ig,每日 1 次,造模周期 21 d。泄浊除痹方高、中、低剂量组药物按 37.5, 18.75, 9.375 g·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量 ig,苯溴马隆组药物 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量 ig。于造模开始后第 7 天,按组别分别 ig 给予相应药物,造模组及空白对照组给予等体积生理盐水 ig,每日 1 次,周期 15 d。实验第 22 天摘除小鼠眼球采血,摘取肾脏,送检。

2.3 血尿酸检测 小鼠血液标本以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,小心汲取澄清上清液,以日立 H7170 型全自动生化分析仪按氧化酶法测定血清尿酸值。

2.4 检测小鼠肾脏 URAT1 基因表达量

2.4.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 液氮研磨组织,采用 Trizol 试剂一步法提取组织总 RNA,紫外分光光度计测定吸光度(A),逆转录合成 cDNA。反应体系:总 RNA 1.0 μg,DEPC 水补至 12 μL,65 °C 保温 5 min;Oligo(dT) 0.5 μL,Random primer 0.5 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTP Mix 2.0 μL,RNase inhibitor 0.5 μL,5 × M-MLV RT Buffer 4.0 μL, M-MLV 0.5 μL;将上述 20 μL 反应溶液 30 °C 保温 10 min,42 °C 保温 60 min,72 °C 保温 10 min。

2.4.2 定量 PCR 由英潍捷基(上海)贸易有限公司设计并合成 URAT1 SLC22A12 基因(序列见表 1)。反应体系:cDNA 5.0 μL,Left primier 0.5 μL,Right primier 0.5 μL,2 × SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL,dH₂O 4.0 μL。反应条件 95 °C 预变性 10 min,变性 95 °C 15 s,退火 60 °C 15 s,延伸 72 °C 30 s,40 cycles;终延伸 72 °C 5 min,4 °C 保存 10 min,读板。熔解曲线分析:温度 60 ~ 95 °C,每 0.4 °C 读 1 次,每个样本重复 3 次。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
SLC22A12	GGCCTCCAGATTACCACAGA	86
	TGAGTCACAGCCAGTCAAGG	

2.5 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析,组间比较方差齐时选

择 LSD 法,方差不齐时选择 Dunnett's T3 法;相关关系用 Pearson 相关分析;应用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 高尿酸血症模型建立及药物对小鼠血尿酸的影响 实验过程中死亡小鼠 4 只,实际完成实验 56 只。经方差分析,造模组与空白对照组相比血尿酸水平明显增高($P < 0.05$),比较有统计学差异,说明造模获得成功。泄浊除痹方高剂量组、苯溴马隆组血尿酸水平较造模组低($P < 0.05$),且与空白对照组比较无统计学差异,说明高剂量泄浊除痹方、苯溴马隆可将小鼠血尿酸水平降低至接近正常水平;而泄浊除痹方中、低剂量组血尿酸水平比空白对照组高,但比造模组低($P < 0.05$),说明中、低剂量组仍可有效降低小鼠血尿酸水平;在泄浊除痹方 3 个剂量组中,高、中剂量组与苯溴马隆组比较无统计学差异,说明其作用与苯溴马隆相当(表 2)。中药剂量与小鼠血尿酸水平进行 Pearson 相关分析, $r = -0.668$, $P < 0.05$,剂量与尿酸水平为负相关关系。

表 2 泄浊除痹方对小鼠血尿酸的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	血尿酸 /μmol·L ⁻¹
泄浊除痹方	37.5	9	209.00 ± 24.54 ²⁾
	18.75	10	234.50 ± 31.38 ^{1,2)}
	9.375	8	273.88 ± 25.04 ^{1,2)}
苯溴马隆	20 × 10 ⁻³	10	208.70 ± 33.70 ²⁾
造模	-	9	330.00 ± 16.48 ¹⁾
空白对照	-	10	207.30 ± 20.90

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与造模组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对小鼠肾脏 URAT1 表达的影响 应用荧光定量 PCR 法检测小鼠肾脏标本,重复测量 3 次,实验结果显示,URAT1 基因在各组小鼠肾脏组织中均有表达。计算相对样品模板量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)并进行组间比较,经方差分析,空白对照组 URAT1 基因表达量较其余 5 组低;泄浊除痹方高、中、低剂量组、苯溴马隆组表达量低于造模组;泄浊除痹方高、中、低剂量组表达量较苯溴马隆组高, $P < 0.05$,组间比较有统计学差异(表 3)。小鼠血尿酸水平与 URAT1 基因表达量进行 Pearson 相关分析, $r = 0.714$, $P < 0.05$,尿酸水平与 URAT1 基因表达量为正相关关系。

表 3 泄浊除痹方对小鼠肾脏 URAT1 基因表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	URAT1 表达水平 /Ct	18S 表达水平 /Ct	URAT1 相对表达水平		
					ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
泄浊除痹方	37.5	9	22.12 ± 0.18	8.60 ± 0.15	13.52 ± 0.13	-2.51 ± 0.13	5.72 ± 0.53 ^{1,2,3)}
	18.75	10	21.74 ± 0.13	8.48 ± 0.03	13.26 ± 0.13	-2.77 ± 0.13	6.83 ± 0.63 ^{1,2,3)}
	9.375	8	21.54 ± 0.14	8.43 ± 0.10	13.11 ± 0.14	-2.92 ± 0.14	7.61 ± 0.75 ^{1,2,3)}
苯溴马隆	20 × 10 ⁻³	10	22.53 ± 0.26	8.69 ± 0.17	13.84 ± 0.21	-2.19 ± 0.21	4.62 ± 0.66 ^{1,2)}
造模	-	9	21.47 ± 0.16	8.50 ± 0.10	12.97 ± 0.17	-3.06 ± 0.17	8.39 ± 0.95 ¹⁾
空白对照	-	10	23.69 ± 0.86	8.92 ± 0.48	14.77 ± 0.69	-1.26 ± 0.69	2.61 ± 0.97

注:① $\Delta Ct =$ 目的基因 Ct - 内参 Ct; $\Delta\Delta Ct =$ 待测样品中目的基因 ΔCt - 参照样品中目的基因 ΔCt (若无参照样品则选择 ΔCt 最大的样品为参照进行计算);当 PCR 的扩增效率接近 100%,相对样品模板量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$;②与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与造模组比较²⁾ $P < 0.05$;与苯溴马隆组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

人类体内并无尿酸酶,而啮齿类动物体内存在的尿酸酶极易将尿酸分解为尿囊素排出体外,高尿酸血症动物模型的制备比较困难。为使造模方法类似于人类的发病机制,并消除人类尿酸代谢途径与啮齿类动物之间的差异,作者选用了酵母法联合尿酸酶抑制法诱导高尿酸血症动物模型^[1-2]。实验结果表明,造模组小鼠血尿酸水平与空白对照组相比有统计学差异,说明造模成功。经口灌服高、中、低剂量泄浊除痹方均可使小鼠血尿酸浓度明显降低,与造模组比较有统计学差异,且呈剂量依赖关系,其中,高、中剂量组与苯溴马隆组比较无统计学

差异,其治疗效果与苯溴马隆相当。而泄浊除痹方高剂量组、苯溴马隆组血尿酸水平与空白对照组比较无统计学差异,说明经高剂量泄浊除痹方或苯溴马隆治疗可将高尿酸血症小鼠的血尿酸水平降至接近正常水平,疗效显著。

泄浊除痹方为孙维峰教授的经验方,该方根据前人的研究结果及临床治疗经验总结^[3-4],以泄浊祛邪,化湿清热,活血化痰为法拟成。现代药理学研究表明,方中君药土茯苓^[5]中提取分离到的成分落新妇苷,可明显增强肾血流量,同时还具有抗炎、镇痛作用,是治疗痛风性关节炎的有效中药;臣药萆薢^[6]提取物萆薢总皂苷可以增加尿酸排泄;佐药山

慈菇有效成分秋水仙碱,可明显减少炎症反应;王不留行^[7]有舒张血管、改善微循环的作用;牛膝^[8]提取物有舒张血管、降低血小板聚积性、改善微循环、抗炎消肿、促进尿酸排泄的作用。以上研究均为泄浊除痹方的降尿酸作用提供了科学依据。实验结果表明,各组小鼠肾脏 URAT1 基因表达量与小鼠血尿酸水平呈正相关,说明 URAT1 基因的表达对尿酸排泄有着重要的影响。通过对相对样品模板量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)的比较可见,应用酵母法联合尿酸酶抑制法制备的高尿酸血症小鼠肾脏的 URAT1 基因表达量均高于未灌服造模剂的空白对照组,说明高尿酸血症小鼠体内 URAT1 有所升高。目前,URAT1 可影响血尿酸水平是已被证实的,尿酸对 URAT1 基因表达的影响尚未见详细文献报道,但可见多个研究^[9-10]证实不同的尿酸转运蛋白可受多种因素影响,而在 Wang X^[11]等的实验研究中亦发现,高尿酸血症模型小鼠 URAT1 基因表达量较正常小鼠高,与本研究结果一致。故可推测,尿酸可能对 URAT1 基因有上调作用。苯溴马隆是目前公认较好的促进尿酸排泄的化学药物,已被证实其为 URAT1 抑制剂。实验结果表明,泄浊除痹方高、中、低剂量组、苯溴马隆组与造模组比较,URAT1 基因表达量均有所下降,组间比较有统计学差异,说明泄浊除痹方的降尿酸作用靶点可能在 URAT1,该方或可通过下调 URAT1 基因的表达,抑制 URAT1 而促进尿酸排泄;但泄浊除痹方各个剂量组 URAT1 基因表达量与苯溴马隆组相比较却均有统计学差异,说明该方对 URAT1 的抑制作用并不与苯溴马隆相当。无论是临床观察还是动物实验,血尿酸水平的检测均提示泄浊除痹方的降尿酸效果接近于苯溴马隆,由于中药有效成分多样,作用机制较为复杂,并不能通过单一的作用靶点和途径证明中药复方的疗效及机制,泄浊除痹方作为一个有效的降尿酸方剂,可能存在除了 URAT1 以外的作用靶点和途径。

经验方泄浊除痹方在治疗无症状高尿酸血症或痛风缓解期高尿酸血症中已取得了良好的临床疗效。本研究通过动物实验进一步验证了泄浊除痹方

治疗高尿酸血症的有效性,并通过 URAT1 基因表达量的检测探讨其作用机制,初步证明了泄浊除痹方对 URAT1 的抑制作用。但该方为复方制剂,作用机制复杂,起抑制作用的具体有效成分的分析、该方是否与尿酸之间存在竞争机制等问题尚未解决,还有待进一步发掘。

[参考文献]

- [1] 陈光亮,张清林,马晓芹,等. 酵母致小鼠高尿酸血症模型[J]. 中国药理学通报,2003,19(4):467.
- [2] 覃秀川. 埃他卡林对高尿酸血症所致高血压和肾脏损伤的影响及其血管内皮功能保护作用的研究[D]. 北京:中国人民解放军军医进修学院,2006:14.
- [3] 王先敏,马丽. 高尿酸血症用药规律的计量学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):221.
- [4] 李新强,王丽英. 中医药治疗高尿酸血症的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):226.
- [5] 李强. 土茯苓现代研究概述[J]. 中国药业,2008,17(14):76.
- [6] 陈光亮,刘海鹏,韩茹,等. 草薢总皂苷合用牛膝总皂苷降血尿酸和抗炎作用的组方合理性研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(11):1467.
- [7] 敬华娥,牛彩琴,胡建民,等. 王不留行对家兔离体主动脉舒张作用的研究[J]. 四川中医,2007,25(8):13.
- [8] 周军. 牛膝中化学成分和药理作用研究进展[J]. 天津药学,2009,21(3):66.
- [9] 王蓓,袁鹰,李长贵,等. 高脂血症对 OLETF 大鼠肾小管上皮细胞尿酸盐阴离子交换器表达的影响[J]. 实用医学杂志,2007,23(20):3160.
- [10] 付正菊,王霞,李长贵,等. 尿酸对肾小管上皮细胞人尿酸盐转运子基因表达的影响[J]. 中国免疫学杂志,2009,25(6):560.
- [11] Wang X, Wang C P, Hu Q H, et al. The dual actions of Sanmiao wan as a hypouricemic agent: down-regulation of hepatic XOD and renal mURAT1 in hyperuricemic mice [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128(1):107.

[责任编辑 聂淑琴]