

萆苈祛痛方对糖尿病痛风大鼠骨骼肌组织 SIRT3 蛋白表达及 URAT1 mRNA 的影响

李中南^{1*}, 邢艳阳², 周媛媛², 马淑红², 邢宇婷², 窦德梅², 方朝晖¹

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031;

2. 安徽中医药大学研究生院, 合肥 230038)

[摘要] **目的:**探讨萆苈祛痛方对糖尿病痛风大鼠骨骼肌组织去乙酰化酶 3(SIRT3)蛋白表达及尿酸盐转运体 1(URAT1)mRNA 的影响。**方法:**选择健康雄性大鼠 40 只,除正常组外,其余组予高脂饲料喂养并联合小剂量链脲佐菌素(STZ)溶液 40 mg·kg⁻¹腹腔注射 1 次,以血糖≥16.7 mmol·L⁻¹为糖尿病模型。4 d 后关节腔注射 5% 尿酸钠溶液 1 次,诱导痛风模型,模型成功后,分为萆苈祛痛方组(萆苈组,10 g·kg⁻¹),吡咯美辛组(5 mg·kg⁻¹),吡格列酮组(10 mg·kg⁻¹),均连续给药 21 d,正常组、模型组予等量生理盐水;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定骨骼肌组织 SIRT3 蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测骨骼肌组织 URAT1 mRNA 表达,并进行病理检查,取血测定血糖(GLU),尿酸(UA)及 C 反应蛋白(CRP)含量。**结果:**与正常组比较,模型组 GLU,UA 及 CRP 明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,萆苈组、吡格列酮组血糖下降($P < 0.05$);各药物组 UA 及 CRP 明显下降($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组骨骼肌 SIRT3 蛋白表达量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,萆苈组骨骼肌 SIRT3 蛋白表达量显著提高($P < 0.01$),与西药组比较无明显差异;条带图的结果同样显示,与正常组比较,模型组表达亮度明显减弱,药物组表达亮度明显增强;与正常组比较,模型组关节组织 URAT1 mRNA 相对表达量明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,各药物组 URAT1 mRNA 相对表达量显著下调($P < 0.01$)。电泳图同样提示,正常组表达亮度减弱,模型组表达亮度显著增强,萆苈组、西药组表达亮度明显减弱。关节病理提示,与正常组比较,模型组大鼠关节病理损伤严重,可见大量炎细胞浸润及纤维增生,滑膜细胞变性、坏死。与模型组比较,萆苈祛痛方关节病变程度明显减低,见少量炎细胞浸润,滑膜上皮轻度增生。**结论:**具有泻浊解毒通络作用的萆苈祛痛方可显著提高糖尿病痛风大鼠骨骼肌组织 SIRT3 的蛋白表达量,下调 URAT1 mRNA 的表达量,减轻骨骼肌组织病理损伤,减低血清炎症因子 CRP 的含量,降低模型大鼠的血糖、尿酸水平,有保护关节功能的作用。

[关键词] 萆苈祛痛方;糖尿病痛风大鼠;骨骼肌组织;去乙酰化酶 3(SIRT3);尿酸盐转运体 1(URAT1)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)21-0025-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191903

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190617.1341.021.html>

[网络出版时间] 2019-06-19 10:10

Effect of Biling Qutong Prescription on SIRT3 Protein Expression and URAT1 mRNA in Skeletal Muscle of Diabetic Gout Rats

LI Zhong-nan^{1*}, XING Yan-yang², ZHOU Yuan-yuan², MA Shu-hong², XING Yu-ting²,
DOU De-mei², FANG Zhao-hui¹

(1. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

2. Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of phlegm and blood stasis on the expressions of sirtuin 3(SIRT3) protein and urate transporter 1(URAT1)mRNA in skeletal muscle of diabetic rats with gout. **Method:** The 40 healthy rats, excepting the normal group, the remaining groups were fed with high-fat diet combined with

[收稿日期] 20190218(001)

[基金项目] 国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2012004);安徽省自然科学基金项目(1708085QH213)

[通信作者] *李中南,主任医师,硕士生导师,从事内分泌代谢病研究,Tel:0551-62850012,E-mail:lzn5151307@sohu.com

low-dose streptozotocin solution ($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) once a day, with blood glucose " $16.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ " as the criterion for the diabetes model. After 4 days, the 5% sodium urate solution was injected into the joint cavity once to induce the gout model. After the successful modeling, the Biling group ($10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), the indomethacin group ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the pioglitazone group ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) continued to be administered for 21 days. The normal group and the model group were given the same amount of normal saline. The expression of SIRT3 protein in skeletal muscle tissue was determined by Western blot, URAT1 mRNA expression in bone tissue was detected by quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR), and blood was collected to measure blood glucose (GLU), blood uric acid (UA) and C-reactive protein (CRP). **Result:** Compared with the normal group, GLU, UA and CRP in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, GLU in the Biling group and the pioglitazone group were decreased, and UA and CRP in the medicine group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the normal group, the expression of SIRT3 protein in the skeletal muscle of the model group was significantly decreased ($P < 0.01$), while the expression of SIRT3 protein in the skeletal muscle of the Biling group was significantly increased after administration ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of SIRT3 protein in the skeletal muscle of the sputum group was significantly increased ($P < 0.01$), with no significant difference from the western medicine group. The results of the strip chart also showed that compared with the model group, the expression brightness of the model group was significantly weakened, while the expression brightness of the drug group was significantly enhanced. Compared with the normal group, the relative expression of joint URAT1 mRNA in the model group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the relative expression of URAT1 mRNA in each drug group was significantly down-regulated ($P < 0.01$). The results of the strip chart also showed that expression brightness of the normal group was the weakest, while that of the model group was the highest, and the expression brightness of the Biling group and the western medicine group was significantly weakened. Joint pathology suggested that compared with the normal group, the pathological damage of the joints in the model group was severe, with a large number of inflammatory cell infiltration and fibrosis, synovial cell degeneration and necrosis. Compared with the model group, the degree of joint disease was significantly reduced after treatment with Biling Qutong prescription, with only a small amount of inflammatory cell infiltration and mild hyperplasia in synovial epithelium. **Conclusion:** Biling Qutong prescription with effects in purging turbidity, detoxifying and dredging collaterals can significantly reduce the content of serum inflammatory factor CRP, significantly increase the protein expression of SIRT3 in skeletal muscle tissue of model rats, lower the content of URAT1 mRNA, reduce the blood glucose and blood uric acid levels in diabetic gout rats, and protect joints.

[**Key words**] Biling Qutong prescription; diabetic gout rats; skeletal muscle tissue; sirtuin 3 (SIRT3); urate transporter 1 (URAT1)

近几年,随着生活水平的提高,糖尿病痛风的发病率在逐年提高,该病以高发病率、高复发率为特点,越来越受到社会的重视。有文献报道,我国痛风患病率在一般人群中达 0.86% ~ 2.20% 不等,高尿酸血症者占 5.46% ~ 19.30%,合并糖尿病占 10%^[1]。寻找有效的防治措施,是医务工作者面临的重要课题。

已有动物及临床研究表明氧化应激在 2 型糖尿病并发症发生发展中起了非同小可的作用,参与了糖尿病的发病过程^[2]。去乙酰化酶 3(SIRT3)是一种线粒体蛋白,通过去乙酰基酶活性减少细胞内活

性氧(ROS)水平,降低细胞自由基水平和增强抗氧化应激能力。在糖尿病骨骼肌病变中发挥重要作用^[3]。SIRT3 在高尿酸血症中也有表达,高尿酸可下调 SIRT3 的表达,减少 ROS 的蓄积,并参与多种物质的代谢^[4]。尿酸在肾脏中的重吸收和分泌异常是痛风高尿酸血症的发病基础,在尿酸代谢途径中,尿酸转运蛋白对防治高尿酸血症、痛风的发生有重要意义。尿酸盐转运体 1(URAT1)是第一个被发现与肾脏尿酸转运的相关蛋白,属于有机阴离子转运蛋白(OAT)家族,与糖尿病密切相关^[5]。研究认为湿毒互结的痛风发病诱因,脾虚是发病的基础,瘀

血阻络是发病的关键。萆薢祛痛方为安徽省名老中医王正雨主任医师的经验方,该方由四妙丸加味而成。四妙丸来自元代朱震亨《丹溪心法》一书,由苍术、怀牛膝、黄柏、薏苡仁组成,具有祛湿清热的功能,常用于治疗热痹,如痛风、高尿酸血症等。萆薢祛痛方在此基础上加强了清热解毒、通络止痛之功^[6]。萆薢祛痛方能否通过促进 SIRT3 表达,增加机体抗氧化应激能力,降低尿酸转运蛋白,从而改善高血糖、高尿酸的代谢,保护受损脏器是本研究关注的重点。本研究试图通过对糖尿病痛风动物模型的观察,探讨萆薢祛痛方对模型大鼠骨骼肌组织 SIRT3 蛋白表达的影响及对骨骼肌 URAT1 的干预,分析其作用机制。

1 材料

1.1 动物 取清洁级健康 SD 雄性大鼠 40 只,体质量 180~200 g,购自于安徽医科大学动物实验中心,合格证号 SCXK(皖)2017-001。室温保持在 20~25℃,室内通风良好,大鼠饮食、活动正常,皮毛光泽,反应灵敏。动物实验符合安徽中医药大学第一附属医院动物伦理委员会的要求,伦理审查批件号为 2018AH-28。

1.2 药物与试剂 萆薢祛痛方由萆薢 15 g,土茯苓 20 g,黄柏 10 g,怀牛膝 15 g,泽泻 15 g,车前草 15 g,当归 10 g,威灵仙 15 g,虎杖 15 g,苍术 10 g,土鳖虫 10 g 组成,所有药材由安徽中医药大学第一附属医院韩光磊副主任中药师鉴定均为正品,中药由医院药物制剂中心提供;盐酸吡格列酮(江苏德源药业股份有限公司,批号 H20110048);吡嗪美辛片(上海新黄河制药有限公司,批号 01717004);尿酸钠,聚山梨酯-80(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 S16N8146625, M19A6K2526);链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 20160805426);SIRT3(美国 Bioass 公司,批号 AG07186332);QuantiNova SyBr Green PCR kit(德国 Qiagen 公司,批号 154045739);三氯甲烷,无水乙醇,异丙醇(上海苏懿化学试剂有限公司,批号分别为 20161013, 20160806, 20160614);逆转录试剂盒,trizol(美国 Thermo 公司,批号分别为 K1622, 90803);一抗二抗去除液(美国 Beyotime 公司,批号 011918180129);苏木素,伊红(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别为 716092, 716101)。

1.3 仪器 稳豪型血糖监测仪(美国强生公司), AF-10 型自动制冰机(意大利 Scotsman 公司), EPS300 型电泳仪(上海天能科技有限公司), VE180

型电泳槽(上海民仪电子有限公司), JW-3021HR 型高速台式冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司), Research plus 型微量移液器(德国艾本德股份公司), 7600 型全自动生化分析仪(日本株式会社), K8160 型凝胶成像分析系统(北京科创锐新生物公司), TS1000 型水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), PIKOREAL 96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Thermo 公司), K960 型普通 PCR 仪(杭州晶格科学仪器有限公司), MINI-P25 型微孔板迷你离心机(杭州奥盛仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组造模与给药 取清洁级健康 Wistar 雄性大鼠 40 只,适应性喂养 1 周,分为正常组及模型组。造模前禁食 12 h。随机选出 8 只作为正常组,予普通饲料喂养。其余为实验模型组,给予高脂饲料进食(蛋白质 16%,脂肪 20%,碳水化合物 50%,胆固醇 4%,猪油 10%)。喂养 4 周后,禁食 10 h,模型组一次性腹腔注射 STZ(40 mg·kg⁻¹),用前以 pH 4.5 的 0.1 mol·L⁻¹柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液新鲜配制,72 h 后尾静脉取血测血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹为糖尿病大鼠造模成功^[7]。

另取尿酸钠结晶 250 mg,加 0.9%氯化钠注射液 45 mL,再加聚山梨酯-80 5 mL,加热混匀配成 5%尿酸钠溶液。糖尿病成模大鼠第 4 天,每只实验鼠均选右踝关节外侧后方为穿刺点,向关节腔注入尿酸钠溶液 0.2 mL,以关节鼓起为注入标准,诱导痛风模型^[8-9]。

将造模成功的大鼠按数字表法随机分为模型组、萆薢祛痛方组、吡嗪美辛组、吡格列酮组。正常组和模型组灌胃等量生理盐水。分别按萆薢祛痛方 10 g·kg⁻¹·d⁻¹,吡格列酮组 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹,吡嗪美辛组 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹给药,给药剂量按人与动物千克体质量换算,每天 1 次,连续给药 21 d。

2.2 观察指标 3 周后大鼠禁食 10 h 后,处死前以 3%戊巴比妥钠按 30 mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉,立即取腹主动脉血,送安徽省中医院生化室检测血糖(GLU),血尿酸(UA),C 反应蛋白(CRP)指标。迅速取出骨骼肌,冰上快速分离,放置 -80℃氮化液中保存。另取右侧踝关节组织,脱钙后取 10%甲醛溶液固定,做病理切片,观察病理形态学变化。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定骨骼肌 SIRT3 蛋白表达 取骨骼肌组织 100 mg,打碎离心,加入 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解,离心收集上清

液,提取细胞蛋白。BCA 法测定细胞总蛋白浓度,各孔取 10~20 mL 蛋白样,于 30% 聚丙烯酰胺凝胶,电泳进行蛋白分离,将分离后的蛋白电转移(300 mA 恒电流转膜,SIRT3 转膜 30 min,将 PVDF 膜放置到预先准备好的 Western 洗涤液中,加入 Western 封闭液,摇床上缓慢摇动,封闭 2 h。按照合适的比例用一抗稀释液进行稀释(SIRT3 抗体属性为兔抗 1:300 稀释(10% 的分离胶),4 °C 缓慢摇动孵育过夜。加入洗涤液(PBST),每次洗涤 10 min,3 次。按照相应比例 1:2 万用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗。室温孵育 2 h。加入洗涤液(PBST),10 min,3 次。参考相关说明书,使用 ECL 超敏发光试剂盒来检测蛋白。利用 Image J 软件对条带进行灰度值分析。按 ECL 试剂盒说明进行显影。采用北京科创锐新生物凝胶图成像系统的分析系统进行分析。

2.4 Real-time PCR 法检测大鼠关节组织 URAT1 mRNA 表达 大鼠麻醉后取右侧踝关节,立即放入 -80 °C 液氮中冻存。按照 trizol 试剂说明书提取大鼠关节组织总 RNA。在 0.2 mL 离心管中,加入总 RNA(质量为 1 μg),10 μmol·L⁻¹ Oligo(dT) 1 μL,DEPC 水补足至 12 μL,轻轻混匀、点动离心。PCR 仪上 65 °C 加热 5 min,立即冰浴 3 min。在上述离心管中加入 Reaction Buffer 4.0 μL,10 mM dNTP Mix 2 μL, Ribolock™ Rnase inhibitor 1 μL, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μL。42 °C 60 min,70 °C 5 min。取出上述反应液,即为 cDNA,-80 °C 保存备用。PCR 反应体系(10 μL): 2×SYBR Green mixture 5 μL,上下游引物各 1 μL,cDNA 1 μL,RNase Free water 2 μL;反应条件为 95 °C 2 min,95 °C 5 s,60 °C 15 s,进行 40 个 PCR 循环,循环后行溶解曲线实验,观察扩增产物有无非特异性扩增及扩增片段长度。PCR 使用引物序列见表 1。采用相对定量法 2^{-ΔΔC_t},比较各组 mRNA 表达差异。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游 TTTAATGTCAACGCACGATTTTC	
musclin	上游 AGGAGAAGGAGAGGGAGAGG	142
	下游 CATGCAGAGGTCAGAGGACT	

2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察骨骼肌组织病理学变化 采用 10% 甲醛溶液将骨骼肌组织固定

48 h,石蜡包埋,置于 4 °C 环境下冷藏,常规病理切片,HE 染色,光学显微镜下(×200)观察各组骨骼肌组织病理变化。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理,计量资料的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对糖尿病痛风模型大鼠血清 GLU,UA,CRP 的影响 与正常组比较,模型组 GLU,UA 及 CRP 显著升高(*P* < 0.01);与模型组比较,萆苓祛痛方组、吡格列酮组 GLU 明显下降(*P* < 0.05),各药物组的 UA,CRP 显著下降(*P* < 0.01);组间比较,萆苓祛痛方组及吡格列酮组血糖降低程度优于吡格列酮组(*P* < 0.05);吡格列酮组 CRP 的下降程度优于萆苓祛痛方组(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 萆苓祛痛方对糖尿病痛风模型大鼠血清 GLU,UA,CRP 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Biling Qutong prescription on serum GLU, UA and CRP in diabetic gout model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GLU /mmol·L ⁻¹	UA /μmol·L ⁻¹	CRP /mg·L ⁻¹
正常	-	5.76 ± 0.80	73.20 ± 7.31	39.31 ± 10.01
模型	-	17.05 ± 3.14 ²⁾	144.20 ± 25.35 ²⁾	60.21 ± 20.01 ²⁾
萆苓祛痛方	10	12.88 ± 2.51 ^{3,5)}	90.18 ± 22.04 ⁴⁾	30.10 ± 19.58 ^{4,5)}
吡格列酮	0.01	12.71 ± 2.18 ^{3,5)}	96.38 ± 14.20 ⁴⁾	20.10 ± 10.21 ⁴⁾
吡格列酮	0.005	15.19 ± 1.28	92.86 ± 17.25 ⁴⁾	18.91 ± 10.11 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;与吡格列酮组比较⁵⁾ *P* < 0.05(表 3,4 同)。

3.2 对糖尿病痛风模型大鼠骨骼肌组织 SIRT3 相对表达量的影响 与正常组比较,模型组的 SIRT3 蛋白相对表达显著降低(*P* < 0.01);与模型组比较,予萆苓祛痛方后 SIRT3 的蛋白表达显著升高(*P* < 0.01),吡格列酮、吡格列酮组 SIRT3 的表达量明显升高(*P* < 0.01);药物组间比较吡格列酮组上调优于吡格列酮组(*P* < 0.05)。见图 1,表 3。

3.3 对糖尿病痛风模型大鼠关节组织 URAT1 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组关节 URAT1 mRNA 相对表达量显著升高(*P* < 0.01);与模型组比较,萆苓祛痛方组 URAT1 mRNA 相对表达量显著下调(*P* < 0.01)。组间比较吡格列酮组下调水平优于吡格列酮组(*P* < 0.05)。见表 4。

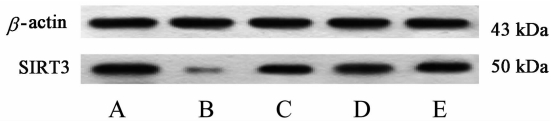


图 1 大鼠骨骼肌组织 SIRT3 蛋白表达电泳
A. 正常组; B. 模型组; C. 萆苓祛痛方组; D. 吡格列酮组; E. 吡喹美辛组(图 2 同)

图 1 大鼠骨骼肌组织 SIRT3 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of expression of SIRT3 protein in rats

表 3 萆苓祛痛方对糖尿病痛风模型大鼠骨骼肌组织 SIRT3 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Biling Qutong prescription on relative expression of SIRT3 in skeletal muscle of diabetic gout model rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SIRT3
正常	-	1.37 ± 0.05
模型	-	0.36 ± 0.02 ²⁾
萆苓祛痛方	10	0.98 ± 0.06 ⁴⁾
吡格列酮	0.01	1.11 ± 0.02 ^{4,5)}
吡喹美辛	0.005	0.86 ± 0.07 ⁴⁾

3.4 对糖尿病痛风模型大鼠关节病理的影响 正常

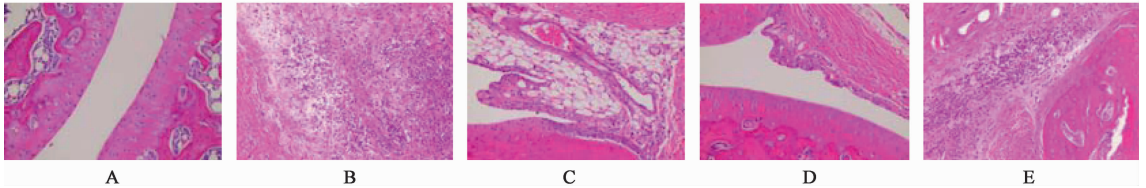


图 2 萆苓祛痛方对糖尿病痛风模型大鼠关节病理的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Biling Qutong prescription on joint pathology in diabetic gout model rats (HE, ×200)

4 讨论

大量临床研究证实,痛风、高尿酸血症、糖尿病与高血压、冠心病、肾病等多种疾病的预后密切相关。而高尿酸血症导致的各种病理改变,取决于尿酸盐结晶沉积导致的组织损伤^[1-3]。有研究表明,2 型糖尿病并发症的发展过程中伴随氧化应激,高血糖和脂肪酸刺激 ROS 的产生,提高代谢组织对胰岛素的抵抗性,使 B 细胞功能衰退,最终诱发糖尿病^[2]。痛风与糖尿病并存,使体内氧化应激水平显著升高,而氧化应激可直接致炎症因子增加,组织损伤加重。SIRT3 在骨骼肌、心肌、肝脏等代谢活动的组织中均有高表达,是一种主要在线粒体产生且依赖 DAN 的去乙酰化酶。已有研究证实糖尿病患者骨骼肌存在胰岛素抵抗,它的下降或活性改变可能与肥胖、痛风等发病因素有关^[1-3]。研究还发现高尿酸可下调 SIRT3 的表达,猜测 SIRT3 可能作为 ROS 的清除介导者,在转分化进程中发挥重要

表 4 萆苓祛痛方对糖尿病痛风模型大鼠骨骼肌组织 URAT1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Biling Qutong prescription on relative expression of URAT1 mRNA in skeletal muscle of diabetic gout model rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	URAT1
正常	-	1.00 ± 0.14
模型	-	4.10 ± 0.52 ²⁾
萆苓祛痛方	10	2.53 ± 0.27 ⁴⁾
吡格列酮	0.01	1.30 ± 0.15 ^{4,5)}
吡喹美辛	0.005	2.54 ± 0.39 ⁴⁾

组关节腔光滑,软骨及骨质细胞形态规则、结构清晰,未见炎细胞浸润;模型组大鼠关节病理损伤严重,关节结构不清晰,见大量炎细胞浸润及纤维增生,滑膜细胞变性、坏死;萆苓祛痛方组、吡喹美辛组病变程度明显减低,关节滑膜组织结构尚平整,可见少量炎细胞浸润,滑膜上皮轻度增生,间质轻度充血。吡格列酮组关节滑膜细胞排列不规则,见滑膜组织增生及中度炎性细胞浸润,但较模型组减轻。见图 2。

作用^[4]。

本研究注意到,模型组的 SIRT3 显著降低,再次提示炎症状态下 SIRT3 蛋白含量是下降的,它参与了糖尿病痛风的发病过程。给予萆苓祛痛方后大鼠骨骼肌组织 SIRT3 的蛋白含量明显增加,表明本方可上调骨骼肌组织中 SIRT3 的表达量,应对氧化应激水平,控制炎症因子的高表达,提高胰岛素敏感性,此可能是本方治疗糖尿病痛风的有效机制之一。

URAT1 是维持血尿酸水平的关键离子通道,抑制尿酸转运蛋白的高表达是控制尿酸排泄的主要手段,也是设计新型降尿酸药物的重要靶点。由于 URAT1 易受环境因素的干预,推测糖尿病痛风及代谢综合征时引起的机体内环境紊乱,极有可能会引起 URAT1 的表达变化,进而影响其对尿酸代谢^[5]。本次实验结果证实模型组 URAT1 mRNA 的表达量明显升高,萆苓组 URAT1 mRNA 表达量显著降低。关节组织 URAT1 mRNA 电泳图表达结果同样提示

模型组表达最亮, 草苓组表达量亮度明显减弱。提示本方可能通过多途径、多靶点抑制尿酸转运蛋白的表达, 发挥降糖, 降尿酸作用, 进而延缓糖尿病痛风的发生发展。

关节病理证实, 与正常组比较, 模型组大鼠关节病理损伤严重, 见大量炎细胞浸润及纤维增生, 滑膜细胞变性、坏死。证实糖尿病合并痛风存在氧化应激的加重, 炎症因子的增加。予草苓祛痛方后关节病变程度明显减低, 见少量炎细胞浸润, 滑膜上皮轻度增生, 间质轻度充血。表明草苓祛痛方有消除炎症、修复受损关节细胞的作用。推测本方可能通过控制炎症因子过度表达, 消除氧化应激状态, 调节 SIRT3 表达, 减低 URAT1 的表达量而发挥作用的。

有研究证实 CRP 与糖尿病痛风密切相关, 是两病最强的炎症预测因子。CRP 通过调节核转录因子- κ B 介导的炎症反应, 加重胰岛素抵抗, 造成内皮功能紊乱, 促进转移抑制因子的产生, 促使糖尿病及其并发症发生和发展^[10]。CRP 还直接参与了多种病的炎症过程。痛风反复发作与体内产生的尿酸盐沉积密切相关^[11]。本次实验中笔者注意到模型组大鼠 CRP 明显升高, 证实 CRP 促进炎症介质的释放。予草苓祛痛方后 CRP 水平显著降低, 说明草苓祛痛方有良好的抗炎症因子的作用。提示两病既是代谢病, 又是一种炎症性疾病, 同时存在于体内易加重炎症因子聚集, 加重对关节的影响, 故降糖、降尿酸同时必须注意抗炎症因子治疗。

已知吡格列酮属于胰岛素增敏剂, 可有效减少肝脏及外周血液的胰岛素抵抗, 改善 β 细胞功能, 减少肝糖的输出^[12], 从而达到控制血糖的目的。吡格列酮可有效预防 β 细胞的减少, 降低体内胆固醇和游离脂肪酸水平, 减轻胰岛细胞的脂毒性。近年研究发现吡格列酮还能够显著降低血尿酸水平, 减轻炎症因子的刺激, 这可能与吡格列酮降低血糖、改善胰岛素抵抗有关, 也可能与其独立于降糖作用外的抗氧化应激作用有关^[13]。笔者以往的临床观察证实草苓祛痛方有降糖降尿酸的作用^[14-15]。本实验结果再次提示, 与正常组比较, 模型组血糖显著升高, 与模型组比较, 丹蛭组、吡格列酮组血糖明显下降, 与笔者以往临床结果报道一致。查阅文献得知大鼠血尿酸正常值在 $58 \sim 106 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[16]。本次所测定大鼠正常组血尿酸在 $73 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 造模后模型组尿酸显著升高达 $144.2 \mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 提示模型成功, 予草苓祛痛方后血尿酸明显下降, 与吡格列酮组近似。说明草苓祛痛方确有降糖、降尿酸疗效,

也证实吡格列酮有降尿酸作用。

临床实践中笔者注意到, 糖尿病合并痛风的病机特点是本虚标实。本虚为脾胃亏虚, 标实乃痰瘀毒阻滞, 而痰瘀互结又贯穿疾病始终。方中土茯苓、泽泻、萆薢、薏苡仁健脾利湿泻浊, 滑利关节; 威灵仙祛风湿、通经络、止疼痛; 黄柏、苍术、虎杖清热燥湿解毒; 当归、土鳖虫活血定痛; 怀牛膝补肝肾、强筋骨。全方配伍精当, 共奏活血化瘀, 消炎止痛, 通利泻浊之功。药理研究证实, 萆薢总皂苷能剂量依赖性地降低高尿酸血症大鼠血清尿酸水平, 增加尿酸排泄量、肌酐排泄量等, 提高机体抗炎作用^[17]。土茯苓能显著降低高尿酸血症小鼠尿酸、肌酐、尿素氮、胆固醇、甘油三酯水平, 减轻由高尿酸血症引起的过氧化氢酶活性增强的氧化应激反应, 发挥抗炎镇痛作用^[18]; 泽泻多糖能够调节糖尿病大鼠的糖脂代谢^[19]; 虎杖能提高体内 SIRT3 蛋白的表达。通过抗炎抗氧化等方式, 发挥其防护作用^[20]; 该药还有抑制血小板聚集, 降血糖、降血脂的疗效。虎杖、土茯苓、萆薢合用有抑制 URAT1 的高表达, 降尿酸的疗效^[21]。苍术、薏苡仁能增强免疫、消炎抗菌, 并有良好的降血糖疗效^[22]; 黄柏树皮含有小檗碱, 有降血糖, 降血压, 抗菌消炎, 镇痛作用; 同时可抑制血小板聚集^[23]; 土鳖虫含蛋白质、氨基酸、脂肪酸、微量元素等多种化学成分, 具有抗血栓、抗肿瘤、抗氧化、调节血脂、调节免疫、镇痛、抑菌等药理作用, 可降低糖尿病大鼠血糖、血脂, 提高免疫球蛋白 (Ig) A, 补体 CH50 含量^[24]。

综上, 草苓祛痛方可能通过抗氧化应激反应, 提高糖尿病痛风大鼠骨骼肌 SIRT3 的蛋白含量, 下调 URAT1 的水平, 减轻关节的病理损伤, 减低炎症因子 CRP 含量, 降低高血糖、高尿酸水平, 从而延缓关节病变的发展。

[参考文献]

- [1] 梅长林, 葛均波, 邹和建, 等. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识 [J]. 中华内科杂志, 2017, 36 (3): 235-244.
- [2] 贺映侠, 朱虹. 黄芪多糖对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌氧化应激水平及 SIRT3 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38 (12): 3023-3025.
- [3] 刘安宁, 张高生, 黄晶, 等. 津力达颗粒对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌氧化应激水平以及 SIRT3 表达的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16 (4): 323-325.
- [4] 祝艳林, 甘华. SIRT3 在尿酸诱导的肾小球系膜细胞转分化中的表达变化及意义 [J]. 重庆医科大学学

- 报,2015,40(6):865-869.
- [5] 李懋. 尿酸转运蛋白表达变化与糖尿病患者合并高尿酸血症的关系及其机制研究[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2015.
- [6] 邢艳阳,李中南. 李中南从浊毒瘀论治痛风经验举隅[J]. 山西中医,2018,34(7):4-6.
- [7] 燕娟,郭巍伟,梁执群,等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其验证[J]. 临床和实验医学志,2009,8(4):5-6.
- [8] 徐权毅,管云枫,徐添颖,等. 痛风性关节炎大鼠的制备及三种关节肿胀度检测方法的比较[J]. 第二军医大学学报,2007,28(8):906-908.
- [9] 郭玉星,熊辉,易法银,等. 蠲痹历节清方对改良痛风性关节炎模型大鼠滑膜的 TLR4,NF- κ B,PPAR γ 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(23):126-133.
- [10] 左秀玲,朴金龙,薛丰田,等. 黄连素对 2 型糖尿病大鼠血脂调节作用及对 IL-6、IL-10 及 CRP 水平的影响[J]. 陕西中医,2018,39(8):1001-1003.
- [11] 李中南,石国彬,刘剑,等. 萹苈祛痛方治疗 2 型糖尿病合并痛风临床观察[J]. 中国中医急症,2010,19(9):1487,1507.
- [12] 黄思帆,宋海曲. 吡格列酮对早期 2 型糖尿病患者糖脂代谢及胰岛功能指标的影响[J]. 中外医疗,2017,36(33):120-121,124.
- [13] 彭湾湾,曾姣娥. 吡格列酮、胰岛素对初诊 2 型糖尿病患者血尿酸及 1,5-脱水葡萄糖醇的影响[J]. 长江大学学报:自然科学版,2016,13(12):5-7,3.
- [14] 汪俊,李中南,李莉,等. 萹苈祛痛方对糖尿病痛风模型大鼠血糖、血尿酸的影响及其抗炎作用的研究[J]. 中国中医药科技,2012,19(2):117-119.
- [15] 李中南,邢艳阳,邢宇婷,等. 泻浊解毒通络法对糖尿病痛风模型大鼠血清 FOXOL、VCAM-1 及肾脏病理的影响[J]. 上海中医药杂志,2018,52(11):75-79.
- [16] 王冬平,曾臣. 实验动物血液生理生化参考手册[M]. 北京:科学出版社,2011,35-36.
- [17] 刘金畅,王涛. 萹苈、土茯苓治疗高尿酸血症研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(1):79-81.
- [18] 孙红,王少明,庄捷,等. 土茯苓等中药抑制 URAT1 表达及降尿酸作用筛选研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2012,17(4):403-407.
- [19] 钱增堃,崔凡,凌云熹,等. 泽泻多糖对糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(11):117-125.
- [20] 马懿,阮云军,王玉筵,等. 白藜芦醇苷通过上调 SIRT1 抑制氧化低密度脂蛋白诱导的 THP-1 巨噬细胞增殖和炎性因子表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2018,34(3):193-198.
- [21] 黄春林,朱晓新. 中药药理与临床手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:423-425,565-566.
- [22] 陈光亮,朱立然,那莎,等. 萹苈总皂苷对大鼠慢性高尿酸血症和肾小管尿酸转运体 1 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2013,38(14):2348-2353.
- [23] 李嘉诚,吴岚,蔡同凯,等. 黄柏化学成分及其药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志,2018,36(5):389-391,398.
- [24] 吴福林,周柏松,董庆海,等. 土鳖虫的药理、药化及其临床的研究进展[J]. 特产研究,2018,40(3):67-74.

[责任编辑 周冰冰]