

铁皮石斛四妙方对高尿酸血症模型大鼠的降尿酸作用及机制研究

沈倩¹, 李贺¹, 雷珊珊¹, 江石平¹, 李波¹, 郑祥², 颜美秋³, 吕圭源^{3*}, 陈素红^{1*} (1.浙江工业大学, 杭州 310014; 2.温州医科大学, 浙江 温州 325000; 3.浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究铁皮石斛四妙方(*Dendrobium candidum* Simiao prescription, DSP)对腺嘌呤合乙胺丁醇致高尿酸血症模型大鼠的降尿酸作用, 并从尿酸合成/排泄等途径探讨其作用机制。方法 将 60 只 SD 大鼠, ♂, 随机分为正常对照组、模型对照组、别嘌醇组、DSP 高、中、低剂量组(1.2, 2.4, 4.8 g·kg⁻¹)。采用腺嘌呤合乙胺丁醇灌胃制备高尿酸血症模型, 每周测定血清尿酸(SUA)。给药第 3 周测定 SUA、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、尿液体积(UV)、尿酸(UUA)、尿肌酐(UCr), 计算尿酸排泄指数。末次给药后, 测定血清腺苷脱氨酶(ADA)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量; 测定肝脏鸟嘌呤脱氨酶(GDA)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)的含量; 观察肾脏组织病理变化, 免疫组化测定三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 2(ABCG2)、尿酸盐阴离子转运体 1(URAT1)、葡萄糖转运体 9(GLUT9)在大鼠肾脏的蛋白表达水平。结果 与模型对照组比, 2.4 g·kg⁻¹ DSP 能显著降低高尿酸血症大鼠 SUA 水平($P<0.01$), 在第 2 周下降 23%、第 3 周下降高达 32%。机制研究表明 2.4 g·kg⁻¹ DSP 能显著降低 XOD、GDA 含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 明显升高尿酸排泄指数($P<0.05$), 显著升高肾脏 ABCG2 蛋白表达水平($P<0.01$), 显著降低 URAT1、GLUT9 蛋白表达($P<0.01$), 降低血清炎症因子 IL-6、TNF-α 含量($P<0.05$), 可改善肾脏组织病理变化。结论 DSP 可降低模型大鼠体内尿酸水平, 可能与以下机制有关: 通过降低 XOD、GDA 含量, 减少尿酸生成; 抑制 URAT1、GLUT9 蛋白表达, 增加 ABCG2 表达水平, 促进尿酸排泄; 抑制炎症因子 IL-6、TNF-α 异常分泌, 减少肾脏病变, 从而发挥降尿酸作用。

关键词: 铁皮石斛四妙方; 高尿酸血症; 尿酸合成酶; 尿酸转运体; 炎症因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)02-0157-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.006

引用本文: 沈倩, 李贺, 雷珊珊, 等. 铁皮石斛四妙方对高尿酸血症模型大鼠的降尿酸作用及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 157-163.

Study on Anti-trioxypurine Effect and Mechanism of *Dendrobium Candidum* Simiao Prescription on Hyperuricemia Rats

SHEN Qian¹, LI He¹, LEI Shanshan¹, JIANG Shiping¹, LI Bo¹, ZHENG Xiang², YAN Meiqiu³, LYU Guiyuan^{3*}, CHEN Suhong^{1*} (1. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 3. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of *Dendrobium candidum* Simiao Prescription(DSP) on hyperuricemia rats induced by adenine and ethambutol and explore its mechanism. **METHODS** Sixty male SD rats were randomly divided into normal control group, model control group, allopurinol group, and DSP low, middle, high dose groups(1.2, 2.4, 4.8 g·kg⁻¹). Hyperuricemia model was prepared by intragastric adenine and ethambutol, and serum urine uric acid (SUA) was measured weekly. At the third week of administration, SUA, serum creatinine(SCr), blood urea nitrogen(BUN), urine volume(UV), urine uric acid(UUA), and urine creatinine(UCr) were measured, and the uric acid excretion index was calculated. After the last administration, the contents of adenosine deaminase(ADA), xanthine oxidase(XOD), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor-α(TNF-α) in serum were measured. Besides, the content of guanine deaminase(GDA) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase(HGPRT) in the liver were measured. The pathological changes of renal tissues were observed, and the protein expression levels of adenosine triphosphate binding cassette transporter 2(ABCG2), urate anion transporter 1(URAT1) and glucose transporter 9(GLUT9) in rat kidney were determined by immunohistochemistry. **RESULTS** Compared with the model control group, 2.4 g·kg⁻¹ DSP significantly decreased the SUA level in hyperuricemia rats($P<0.01$), which decreased by 23% in the second week and by 32% in the third week. The mechanism study showed that 2.4 g·kg⁻¹ DSP could significantly

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1702200); 国家自然科学基金项目(81673638, 81874352); 国家自然科学基金青年基金项目(81703772)

作者简介: 沈倩, 女, 硕士 Tel: 15068757441 E-mail: shenqian145@163.com *通信作者: 陈素红, 女, 博士, 研究员 Tel: (0571)88871593 E-mail: chensuhong@aliyun.com 吕圭源, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)86613601 E-mail: lv.gy@263.net

reduce the content of XOD and GDA($P<0.05$ or $P<0.01$), significantly increase the uric acid excretion index($P<0.05$) and the expression of ABCG2 protein in the kidney($P<0.01$), while significantly reduced the expression of URAT1, GLUT9($P<0.01$) and decreased the content of inflammatory factors IL-6, TNF- α ($P<0.05$) in serum. In addition, it could improve the pathological changes in kidney tissue. **CONCLUSION** DSP can reduce the level of uric acid in model rats, which may be related to the following mechanisms: reduce uric acid production by decreasing the content of XOD and GDA, inhibiting the protein expression of URAT1, GLUT9, increasing the level of ABCG2, promoting uric acid excretion. Besides, it can inhibit the abnormal secretion of inflammatory factors IL-6 and TNF- α , reduce renal pathological changes.

KEYWORDS: *Dendrobium candidum* Simiao prescription; hyperuricemia; uric acid synthase; uric acid transporter; inflammatory factors

高尿酸血症是一组以遗传性和(或)获得性引起尿酸排泄减少和(或)体内嘌呤代谢障碍,导致血尿酸增高的一种疾病^[1]。随着生活水平提高,高嘌呤、高蛋白等饮食导致高尿酸血症发病率逐年上升(已>10%)^[2]。模拟高嘌呤等人类不良饮食方式,建立接近人类病症的高尿酸血症动物模型具有现实意义。

铁皮石斛为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimum et Migo 的干燥茎,前期研究表明,铁皮石斛具有降尿酸作用^[3]。四妙丸出自《成方便读》,用于湿热下注所致的痹病。本实验在经典方四妙丸基础上进行加减组成铁皮石斛四妙方(*Dendrobium candidum* Simiao Prescription, DSP),全方以铁皮石斛、牛膝、苍术等中药行补益肝肾、利尿通淋、健脾燥湿之功效。课题组采用腺嘌呤复合乙胺丁醇制备高尿酸血症模型,模拟人类过食高嘌呤食物,观察 DSP 对高尿酸血症模型大鼠的影响,并对其作用机制进行初步探讨。

1 动物与材料

1.1 动物

健康 SD 大鼠,♂,60 只,体质量(450±20)g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002,动物质量合格证号:2015000537593。保持饲养房通风良好,灯光照明 12 h·d⁻¹,温度 22~25 °C,湿度 60%~70%。

1.2 药物及试剂

DSP:自制,分别配成含生药量 0.12, 0.24, 0.48 g·mL⁻¹ 的溶液,低温保存备用。腺嘌呤(上海源叶生物有限公司,批号:Y20F8C29492);乙胺丁醇片(杭州民生药业有限公司,批号:T17A014);别嘌醇(世贸天阶制药有限责任公司,批号:201610261)。

尿酸试剂盒(批号:17050302)、尿素氮(BUN)试剂盒(批号:17051501)、肌酐(Cr)试剂盒(批号:17021301)、腺苷脱氨酶(ADA)试剂盒(批号:

17012201)均购于宁波美康生物科技股份有限公司。苏木素伊红(H&E)染色液(批号:J05J8Y39286)、Masson 染液(批号:L17N8G48192)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)试剂盒(批号:E20180301A)均购于上海源叶生物科技股份有限公司。戊巴比妥钠(中国华东师范大学化工厂,批号:20041224);黄嘌呤氧化酶(XOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20170907);柠檬酸钠抗原修复液(碧云天生物技术有限公司,批号:P0083);封闭缓冲液 BSA(BBI Life Scie 正常对照组 es,批号:DC05FA0004);三磷酸腺苷结合盒转运体 G2(ATP binding cassette transporter G2, ABCG2)抗体(Cell Signaling Technology 公司,批号:4477);尿酸盐阴离子交换器(URAT1)抗体(Affinity 公司,批号:DF6843);葡萄糖转运体 9 (GLUT9)抗体(Absin 公司,批号:Abs143592);兔二步法试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:K172415D);DAB 显色试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20171110)。

1.3 仪器

HITACHI-7020 全自动生化分析仪(日本日立公司);HWS-26 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);JJ5000Y 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);BSA124S 型电子天平(赛多利斯有限公司);Legend Micro17 离心机(德国 Thermo);紫外分光光度计(UV-1800);显微镜(Olympus BX43);Power Wave 340 酶标仪(美国 Bio-TEK);水平脱色摇床(华利达)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

60 只大鼠,♂,适应性喂养 7 d 后,随机分为 6 组:正常组、模型组、别嘌醇组(10.5 mg·kg⁻¹)、DSP 低、中、高剂量组(1.2, 2.4, 4.8 g·kg⁻¹),每组 10 只。除正常组外,其余各组每天上午,用腺

嘌呤 100 mg·kg⁻¹+乙胺丁醇 250 mg·kg⁻¹灌胃制备高尿酸血症模型^[4]; 每天下午正常组与模型组给予等体积蒸馏水, 其余各组给予相应药物。灌胃容积按照体质量换算都为 10 mL·kg⁻¹。连续 3 周, 实验期间自由饮食。

2.2 药效学观察及指标检测

2.2.1 药效学观察

2.2.1.1 行为学观察 日常观察大鼠一般体征(毛色、精神状态等), 观察并记录。每周称重, 记录体质量变化情况。

2.2.1.2 血清生化指标测定 造模后每周大鼠眼底静脉丛取血(取血前 12 h 禁食不禁水), 3 500 r·min⁻¹离心 10 min, 分离血清, 全自动生化分析仪检测血尿酸(SUA)。给药第 3 周, 全自动生化分析仪检测 SUA、血肌酐(SCr)、BUN。

2.2.2 机制探讨

2.2.2.1 尿酸排泄指标测定 给药第 3 周, 代谢笼收集大鼠 24 h 尿液, 记录尿液体积(UV)。尿液稀释 10 倍后, 用全自动生化分析仪测定尿尿酸(UUA)、尿肌酐(UCr)。计算尿酸排泄分数(FEUA)=UUA×SCr/(SUA×UCr)×100%, 尿酸清除率(CUr)=UV×UUA/(SUA×1 440), 单位肾小球滤过尿酸排泄(EurGF)=(UUA×SCr)/UCr。

2.2.2.2 尿酸合成酶及炎症因子测定 末次给药后, 腹腔注射 3%戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血, 3 500 r·min⁻¹离心 10 min, 分离血清。全自动生化测血清 ADA; 比色法测定血清 XOD; 酶联免疫法(ELISA)检测血清 IL-6、TNF-α。取肝组织约 0.1 g, 分别加入生理盐水, 用预冷的匀浆机充分研碎, 制备成 10%肝匀浆, 3 500 r·min⁻¹, 离心 10 min, 吸取上清液, 按 1:9 生理盐水稀释成 1%肝组织匀浆。ELISA 法检测肝脏 GDA、HGPR。

2.2.2.3 肾脏组织病理学观察 末次给药后, 取大鼠同侧肾脏组织, 横向取材, 组织标本置于 4%甲醛溶液中固定 48 h, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋, 常规制片, H&E、Masson 染色, 光学显微镜观察病理组织变化。

2.2.2.4 免疫组化测定肾脏尿酸转运蛋白表达水平 按“2.2.2.3”项下方法常规制片, 经烤片、脱蜡、水化; 经柠檬酸缓冲液中微波高温修复抗原, 3%过氧化氢液灭活内源性过氧化氢酶, 5% BSA 室温封闭后, 加 ABCG2、URAT1、GLUT9 一抗(1:200, PBS 稀释)(PBS 为阴性对照), 相应二抗 37 ℃

10 min, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 风干后封片。显微镜下采集图像, 各切片取 6 个互不重叠的视野。以 Imagine Pro-Plus 6.0 图像分析系统对免疫组化图片进行半定量分析, 结果以平均光密度值表示。

2.3 统计学处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计学软件对实验数据进行分析, 组间差异做两样本均数比较的 *t* 检验, 以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 药效学观察

3.1.1 行为学观察 正常组大鼠体质量持续稳定增长, 毛发正常, 精神良好, 活动自如。与正常组比, 模型组大鼠随着造模时间增加, 出现体质量显著下降(第 3 周时, 下降 30.3%)(*P*<0.01), 并表现多饮、多尿、弓背蜷缩、皮毛干枯易脱落、精神萎靡等体征。与模型组比, DSP 各给药组大鼠体质量下降、多饮、多尿、精神萎靡等体征均有改善, 其中 DSP 4.8, 2.4, 1.2 g·kg⁻¹组大鼠体质量分别回升 3.7%, 12.1%, 11.5%。结果见表 1。

表 1 DSP 对高尿酸血症大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$, *n*=10)
Tab. 1 Effect of DSP on weight of hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s$, *n*=10)

组别	0 周	3 周	体质量差 g
正常组	429.28±31.77	489.95±26.53	60.67±42.71
模型组	412.91±30.83	341.72±47.19 ¹⁾	-74.84±53.10 ¹⁾
别嘌醇组	409.84±26.60	366.54±23.96	-43.30±18.76
4.8 g·kg ⁻¹ DSP	410.48±19.23	354.53±18.81	-57.87±22.24
2.4 g·kg ⁻¹ DSP	419.03±27.48	383.13±17.91 ²⁾	-27.48±30.07 ²⁾
1.2 g·kg ⁻¹ DSP	420.81±19.82	380.90±20.66 ²⁾	-39.91±16.98

注: 与正常组比较, ¹⁾*P*<0.01; 与模型组比较, ²⁾*P*<0.01。

Note: Compared with normal group, ¹⁾*P*<0.01; compared with model group, ²⁾*P*<0.01.

3.1.2 DSP 对高尿酸血症大鼠血清尿酸的影响 与正常组比, 模型组大鼠在造模第 1, 2, 3 周的 SUA 均出现显著升高(*P*<0.01), 提示造模成功, 且随着时间延长, 尿酸升高幅度越大。与模型组比, 2.4 g·kg⁻¹ DSP 组大鼠在给药第 2 周时 SUA 明显下降(*P*<0.01)(下降 23.1%), 给药第 3 周时继续下降(*P*<0.01), 下降比例高达 32.5%。提示 DSP 具有降低血尿酸作用的较佳剂量是 2.4 g·kg⁻¹。结果见表 2。

表 2 DSP 对高尿酸血症大鼠血清尿酸水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 2 Effect of DSP on the level of SUA in hyperuricemia rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	0 周	1 周	2 周	3 周
正常组	68.20±19.63	57.80±11.49	53.30±4.57	41.30±3.20
模型组	72.67±16.54	73.50±12.39 ¹⁾	67.30±12.18 ¹⁾	103.00±36.91 ¹⁾
别嘌醇组	72.89±15.83	66.00±16.37	54.11±11.21 ²⁾	34.67±11.21 ³⁾
4.8 g·kg ⁻¹ DSP	71.50±13.37	75.44±14.34	76.50±15.94	98.83±21.52
2.4 g·kg ⁻¹ DSP	71.70±13.13	78.00±14.22	51.78±8.71 ³⁾	69.57±11.47 ³⁾
1.2 g·kg ⁻¹ DSP	71.20±9.16	78.50±13.86	71.10±16.23	101.00±14.72

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

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.1.3 DSP 对高尿酸血症大鼠肾功能的影响 与正常组比, 给药第 3 周, 模型组大鼠血清 SCr、BUN 显著升高($P<0.01$), 提示该模型大鼠在引起尿酸升高的同时, 可能具有一定的肾功能损伤。与模型组比, 2.4 g·kg⁻¹ DSP 给药组大鼠的 SCr、BUN 虽无统计学差异, 但有降低趋势。结果见表 3。

表 3 DSP 对高尿酸血症大鼠肾功能的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 3 Effect of DSP on the renal function of hyperuricemia rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	SCr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常组	60.69±5.89	6.05±0.80
模型组	193.88±59.43 ¹⁾	39.53±12.77 ¹⁾
别嘌醇组	178.19±49.15	33.45±11.64
4.8 g·kg ⁻¹ DSP	194.76±45.22	39.79±10.04
2.4 g·kg ⁻¹ DSP	183.84±36.12	36.38±9.05
1.2 g·kg ⁻¹ DSP	189.76±44.45	36.55±11.15

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$.

3.2 机制研究

根据药效学结果, 发现 DSP 2.4 g·kg⁻¹ 剂量组具有良好的降尿酸作用, 所以本部分实验从尿酸合成、尿酸排泄等途径探讨其作用机制。

3.2.1 DSP 对血清 ADA、XOD 活性的影响 与正常组比, 模型组大鼠给药 3 周后的血清 ADA、XOD 均显著升高(分别升高 83.2%, 55.0%)($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 提示造模成功; 与模型组比, 2.4 g·kg⁻¹ DSP 组大鼠血清 XOD 活性明显降低(下降 15.2%)($P<0.01$), ADA 活性有下降 8.2%, 但无显著性差异。提示 2.4 g·kg⁻¹ DSP 可能通过降低 XOD 酶活性, 抑制尿酸合成, 从而减少体内尿酸含量。结果见表 4。

表 4 DSP 对高尿酸血症大鼠血清 ADA、XOD 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 4 Effect of DSP on the level of ADA and XOD in hyperuricemia rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	ADA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	XOD/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常组	2.80±0.63	22.20±2.60
模型组	5.13±2.17 ¹⁾	34.41±5.88 ²⁾
别嘌醇组	4.67±3.00	27.19±3.93 ³⁾
2.4 g·kg ⁻¹ DSP	4.71±2.21	29.19±1.38 ³⁾

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

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.01$.

3.2.2 DSP 对肝脏 HGPRT、GDA 活性的影响 与正常组比, 模型组大鼠给药 3 周后的肝脏 GDA 明显升高(上升 31.3%)($P<0.05$), 肝脏 HGPRT 明显降低(下降 14.5%)($P<0.05$), 提示造模成功; 与模型组比, 2.4 g·kg⁻¹ DSP 组大鼠肝脏 GDA 活性明显降低(降低 10.2%)($P<0.05$), HGPRT 上升 6.7%, 但无显著性差异。提示 2.4 g·kg⁻¹ DSP 可能通过降低肝脏 GDA 活性, 抑制尿酸合成, 从而降低体内尿酸水平。结果见表 5。

表 5 DSP 对高尿酸血症大鼠肝脏 GDA、HGPRT 活性的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effect of DSP on the level of GDA and HGPRT in hyperuricemia rats($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	GDA/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	HGPRT/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常组	1.57±0.75	1.73±0.23
模型组	2.06±0.20 ¹⁾	1.48±0.19 ¹⁾
别嘌醇组	1.85±0.18 ²⁾	1.62±0.13 ²⁾
2.4 g·kg ⁻¹ DSP	1.85±0.19 ²⁾	1.58±0.14

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

3.2.3 DSP 对高尿酸血症大鼠肾脏尿酸排泄指标的影响 与正常对照组比, 给药 3 周模型对照组大鼠 C_{Ur} 显著降低(降低 69.2%)($P<0.01$); 与模型对照组比, 2.4 g·kg⁻¹DSP 组大鼠 FEUA、EurGF 均明显升高($P<0.05$)(分别升高 61.6%, 37.0%), C_{Ur} 上升 37.5%, 但无统计学差异。提示 2.4 g·kg⁻¹ DSP 可能通过促进尿酸排泄, 从而降低体内尿酸水平。结果见表 6。

表 6 DSP 对高尿酸血症大鼠肾脏尿酸排泄指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 6 Effect of DSP on kidney uric acid excretion in hyperuricemia rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	FEUA/%	C _{Ur} /mL·min ⁻¹	EurGF/ μ mol·L ⁻¹
正常组	14.64±0.57	0.26±0.06	8.16±0.55
模型组	16.39±6.34	0.08±0.03 ¹⁾	9.92±2.10
别嘌醇组	20.04±4.88	0.12±0.03 ²⁾	10.51±1.89
2.4 g·kg ⁻¹ DSP	26.48±11.53 ²⁾	0.11±0.05	13.59±3.38 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

3.2.4 DSP 对高尿酸血症大鼠血清炎症因子的影响 IL-6、TNF- α 是主要的促炎细胞因子。与正常对照组比, 模型对照组大鼠 IL-6、TNF- α 均显著上升($P<0.05$), 分别上升 85%, 36.4%, 提示该模型出现炎症反应; 与模型对照组比, 2.4 g·kg⁻¹ DSP 组 IL-6、TNF- α 含量均明显下降($P<0.05$), 分别下降 38.4%, 28.0%。结果见表 7。

3.2.5 DSP 对高尿酸血症大鼠肾脏病理组织学的影响 H&E 染色结果表明, 正常对照组大鼠肾脏

组织结构正常, 肾小球、肾小管结构清晰, 未见炎症浸润、尿酸盐结晶。与正常对照组比, 模型对照组大鼠肾脏出现大量尿酸盐结晶(↑a), 伴局部炎症浸润(↑b), 肾小球萎缩、硬化(↑c), 肾小管扩张、排列紊乱(↑d)等肾脏病变。与模型对照组比, 2.4 g·kg⁻¹ DSP 组大鼠肾脏病变减轻, 尿酸盐结晶减少, 炎症浸润和肾小球萎缩减少。Masson 染色表明, 正常对照组大鼠肾脏血管及周围有轻度的胶原沉积(↑e); 模型对照组大鼠肾间质出现较多胶原沉积; 与模型对照组比, 2.4 g·kg⁻¹ DSP 组肾间质胶原沉积明显改善。结果见图 1。

3.2.6 DSP 对高尿酸血症大鼠肾组织中转运蛋白表达的影响 免疫组化结果表明, ABCG2、URAT1、GLUT9 主要分别表达于肾组织细胞膜、近曲小管管腔侧、肾脏近曲小管顶膜, 蛋白表达强弱可结合平均光密度半定量分析其结果。

表 7 DSP 对高尿酸血症大鼠血清炎症因子的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 7 Effect of DSP on serum inflammatory factors in hyperuricemia rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	IL-6/pg·mL ⁻¹	TNF- α /pg·mL ⁻¹
正常组	12.20±2.98	53.56±6.01
模型组	22.57±13.04 ¹⁾	73.06±28.46 ¹⁾
别嘌醇组	14.42±2.54	54.38±10.89 ²⁾
2.4 g·kg ⁻¹ DSP	13.90±3.70 ²⁾	52.62±13.10 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

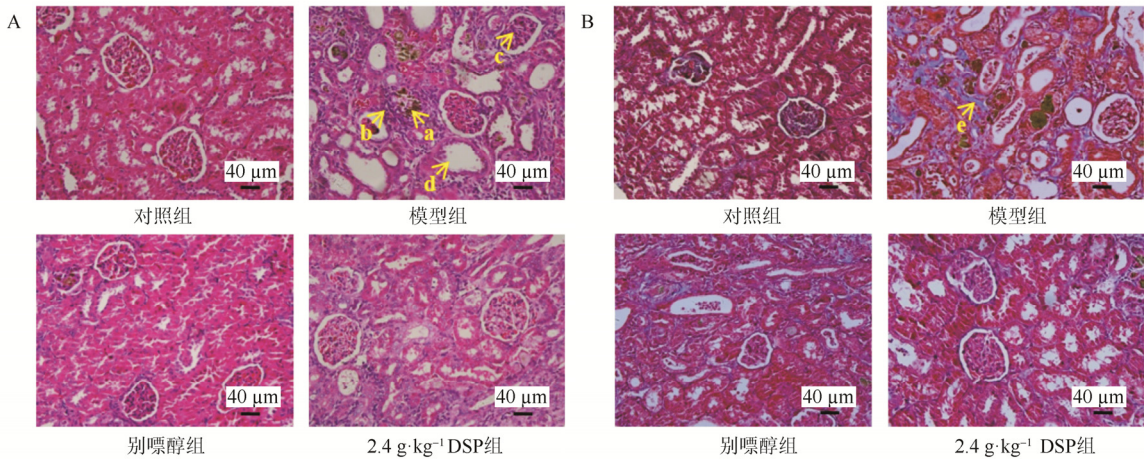


图 1 DSP 对高尿酸血症大鼠肾脏病理的影响(400×)

A-肾脏 H&E 染色代表性显微图片; B-肾脏 Masson 染色代表性显微图片; a-尿酸盐结晶; b-炎症浸润; c-肾小球萎缩、硬化; d-肾小管扩张、排列紊乱; e-胶原沉积。

Fig. 1 Effect of DSP on kidney pathology in hyperuricemia rats(400×)

A-representative microscopic picture of kidney H&E staining; B-representative microscopic picture of kidney Masson staining; a-uric acid crystals; b-inflammation infiltration; c-glomerular atrophy and hardening; d-tubulular expansion and disorder; e-collagen deposition.

正常对照组大鼠肾组织 ABCG2 蛋白呈强阳性表达, 平均光密度高; 与正常对照组比, 模型对照组 ABCG2 表达减弱, 平均光密度明显降低 ($P<0.01$); 与模型对照组比, $2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DSP 组表达增强, 平均光密度明显升高 ($P<0.01$)。提示 DSP 可增加 ABCG2 的表达, 促进尿酸排泄。结果见图 2A, 2D。

正常对照组大鼠肾脏组织 URAT1、GLUT9 表达弱, 平均光密度低; 与正常对照组比, 模型对照组表达呈强阳性, 平均光密度显著升高 ($P<0.01$); 与模型对照组比, $2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DSP 组表达减弱, 平均光密度显著降低 ($P<0.01$)。提示 DSP 可降低 URAT1、GLUT9 蛋白表达, 减少尿酸重吸收。结果见图 2B, 2C, 2E, 2F。

4 讨论

人们摄入过量的海鲜、啤酒、动物内脏等含嘌呤过高的食物, 会使肝脏尿酸合成酶活性异常增加, 代谢产生过多的尿酸^[5]。本实验模拟高嘌呤饮食且尿酸排泄障碍所引起的高尿酸血症, 给予模型大鼠大量腺嘌呤和乙胺丁醇, 引起大鼠体内嘌呤分解酶活性增加、尿酸合成加速^[6], 同时乙胺丁醇竞争性抑制肾脏尿酸分泌, 最终使得模型大鼠体内尿酸升高。

外源性高尿酸血症患者长期大量摄入高嘌呤、高蛋白、高糖等食物, 使得脾失健运、肝肾亏虚、痰浊瘀阻。基于以上病机, DSP 以石斛为君药益胃润肺补肾, 牛膝为臣药共行补益肝肾之效, 苍术亦为臣药健脾, 以利水渗湿药佐之^[7], 各药相配共奏养胃益肾、利水健脾、燥湿化痰之功效。药效学观察发现, $2.4, 4.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DSP 组大鼠 SDA 水平分别下降 32.5%, 4.0%, 其中 $2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DSP 组出现显著性差异 ($P<0.01$), 考虑可能由于 $4.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DSP 药液较为黏稠, 动物在给药期间依从性不好而导致其药效不明显。 $2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DSP 为降尿酸较佳剂量组, 故进一步从尿酸合成/排泄途径研究其作用机制。

人体内嘌呤经分解代谢最终生成尿酸, 整个过程需要大量酶催化, 主要包括①促进尿酸合成的酶 ADA、XOD、GDA 等; ②抑制尿酸合成的酶: HGPRT。当摄入过多嘌呤类食物, ADA、XOD、GDA 水平均有可能异常升高, 使尿酸生成增多^[8]。HGPRT 是嘌呤合成补救途径的关键酶, 刘景芳等^[9]研究发现, 部分 HGPRT 活性下降, 将产生大量尿酸, 引起高尿酸血症。 $2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DSP 明显降低 XOD、GDA, 对 ADA、HGPRT 无明显作用。提示其可能通过降低 XOD、GDA, 产生降尿酸作用。

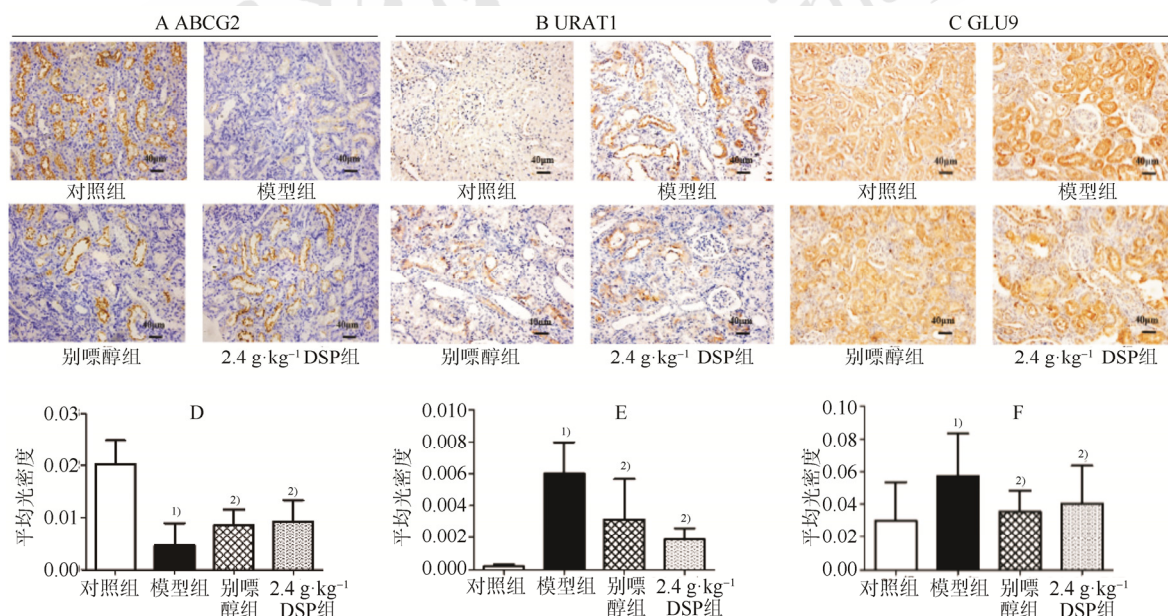


图 2 DSP 对高尿酸血症大鼠肾脏组织中尿酸转运蛋白表达的影响

A、B、C-肾脏 ABCG2/URAT1/GLUT9 免疫组化 DAB 显色代表性显微图片(400 $\times$); D、E、F-肾脏 ABCG2/URAT1/GLUT9 免疫组化平均光密度统计图。与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of DSP on uric acid transporter expression in renal tissue of hyperuricemia rats

A, B, C-representative micrographs of renal ABCG2/URAT1/GLUT9 immunohistochemistry (400 $\times$); D, E, F-average optical densities of renal ABCG2/URAT1/GLUT9 immunohistochemistry. Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

肾脏的尿酸排泄主要包括肾小球滤过、肾小管、集合管重吸收以及重吸收后的再分泌^[10]。其中,尿酸转运蛋白在尿酸排泄过程中起着至关重要的作用。URAT1 和 GLUT9 是人体内重要的尿酸重吸收蛋白。URAT1 在近曲小管内重吸收尿酸的量高达 50%左右^[11],人体内尿酸浓度变化的 1.7%~5.3%与 GLUT9 有关^[12],两者功能异常时将导致尿酸重吸收增强。ABCG2 在肾脏中表达于近曲小管上皮细胞刷状缘侧,其功能异常可导致尿酸排泄能力下降^[13]。2.4 g·kg⁻¹ DSP 组 URAT1、GLUT9 表达量显著降低,ABCG2 显著升高,且尿酸排泄指标 FEUA、EurGF 明显升高,提示其可能通过减少尿酸重吸收,促进尿酸排泄,产生降尿酸作用。

TNF- α 、IL-6 是重要的炎症介质,参与机体的炎症反应,当两者分泌量增加将引起其他各种炎症因子大量释放,加重组织细胞损伤。高尿酸血症患者 TNF- α 、IL-6 水平明显高于正常对照者,可能由于尿酸盐结晶在血管壁和肾脏沉积,造成慢性炎症损害释放大量炎症因子,又加重肾小管和间质损伤^[14],使得尿酸排泄障碍。实验结果表明,2.4 g·kg⁻¹ DSP 组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平明显降低,且 H&E 和 Masson 染色观察发现大鼠肾脏组织尿酸结晶、局部炎症浸润、间质纤维化等病变均有不同程度的改善,提示复方铁皮石斛可能通过降低炎症反应,改善肾脏病变,促进尿酸排泄,发挥降尿酸作用。

综上所述,腺嘌呤合乙胺丁醇可建立较稳定的高尿酸血症大鼠模型,DSP 对该模型具有较明显的降尿酸作用,可能与以下作用机制相关:①降低 XOD、GDA 活性,抑制尿酸生成;②增强 ABCG2 表达,降低 URAT1 和 GLUT9 过度表达,促进尿酸排泄;③抑制炎症因子 IL-6、TNF- α 异常分泌,减轻肾脏病变,从而发挥降尿酸作用。

REFERENCES

[1] REMEDIOS C, SHAH M, BHASKER A G, et al.

Hyperuricemia: a Reality in the Indian Obese [J]. *Obes Surg*, 2012, 22(6): 945-948.

[2] CHEN T, LI W, WANG Y, et al. Prevalence of hyperuricemia and relation of serum uric acid with cardiovascular risk factors [J]. *Chin J Clin(中华临床医师杂志)*, 2012, 6(13): 49-52.

[3] 吕圭源, 陈素红, 胡秀, 等. 一种具有降尿酸作用的铁皮石斛叶提取物及用途: CN104740335A. [P]2015.

[4] ZHU L, DONG Y, NA S, et al. Sasponins extracted from *Dioscorea collettii* rhizomes regulate the expression of urate transporters in chronic hyperuricemia rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(93): 88-94.

[5] CAI Z B, ZHAO X, ZHAO P J, et al. establishment of rat model of hyperuricemia combined with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2017, 34(9): 1234-1238.

[6] ZHANG Q, LV G Y, XIA C Q, et al. A novel hypertensive rat model induced by long-term high-purine diet [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med(中药药理与临床)*, 2013, 29(1): 159-162.

[7] ZHOU Z D, WANG J P, QIAN Y, et al. Study on the hypouricemic effect of extracts from *Dioscorea Nipponicae* Rhizoma and extracting process of its ethanol extract [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2014, 31(6): 699-702.

[8] PANG M, FANG Y, CHEN S, et al. Gypenosides inhibits xanthine oxidoreductase and ameliorates urate excretion in hyperuricemic rats induced by high cholesterol and high fat food (lipid emulsion) [J]. *Med Sci Monit*, 2017(23): 1129-1140.

[9] LIU J F, SHAO C H, ZHANG J Y, et al. Relationship between serum uric acid and levels of HGPRT and VitC in serum in hyperuricemia patients [J]. *Chin J Clin Med(中国临床医学)*, 2018, 25(1): 22-26.

[10] LIPKOWITZ M S. Regulation of uric acid excretion by the kidney [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2012; 14(2): 179-188.

[11] ENOMOTO A, ENDOU H. Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2005; 9(3): 195-205.

[12] VITART V, RUDAN I, HAYWARD C, et al. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(4): 437-442.

[13] CLEOPHAS M C, JOOSTEN L A, STAMP L K, et al. ABCG2 polymorphisms in gout: insights into disease susceptibility and treatment approaches [J]. *Pharmacogenomics Pers Med*, 2017(10): 129-142.

[14] 贺斐, 高建东, 何立群. 中医药减轻尿酸性肾病炎症损伤的机制研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(12): 1110-1112.

收稿日期: 2018-05-23

(本文责编: 曹粤锋)