

复方芪苓配方颗粒治疗大鼠高尿酸血症的作用机制研究

张媛, 徐红* (杭州市中医院, 杭州 310007)

摘要: 目的 研究复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠的降尿酸作用, 并从尿酸排泄途径探讨其作用机制。方法 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、苯溴马隆组、复方芪苓配方颗粒高、中、低剂量组(9.6, 4.8, 2.4 g·kg⁻¹), 通过腺嘌呤灌胃及氧嗪酸钾皮下注射建立高尿酸血症模型, 连续给药 14 d。分别测定血清尿酸、肌酐、尿素、尿酸水平, 计算肾脏尿酸清除率。采用 RT-PCR 分别测定动物肾脏中相关转运体的表达水平; 观察肾组织病理改变。结果 与模型组比较, 复方芪苓配方颗粒组高尿酸血症大鼠的血清尿酸、肌酐、尿素水平显著降低, 其肾脏尿酸清除率显著升高; 其肾组织病理改变显示, 肾小管内尿酸盐结晶减少, 肾小管-间质损伤较轻。复方芪苓配方颗粒可以显著下调肾脏尿酸盐转运体 1、葡萄糖转运蛋白 9 mRNA 的表达, 上调有机阴离子转运体 1 mRNA 的表达。结论 复方芪苓配方颗粒能降低高尿酸血症大鼠的血清尿酸水平并减轻肾组织病理损害, 其作用机制可能是通过调节尿酸转运体的表达水平, 以降低肾脏尿酸盐重吸收能力、增加尿酸盐分泌, 从而促进尿酸排泄。

关键词: 复方芪苓配方颗粒; 高尿酸血症; 肾脏转运体

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)15-1825-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.005

引用本文: 张媛, 徐红. 复方芪苓配方颗粒治疗大鼠高尿酸血症的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1825-1829.

Study on Mechanism of Compound Qiling Formula Granules in Treatment of Hyperuricemia in Rats

ZHANG Yuan, XU Hong* (Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of Compound Qiling Formula granules in treatment of hyperuricemia in rats, and to explore its mechanism from the excretion pathway of uric acid. **METHODS** The SD rats were randomly divided into normal group, model group, benzbromarone group and high, medium and low dose group of Compound Qiling Formula granules(9.6, 4.8, 2.4 g·kg⁻¹). Establish the hyperuricemia model by adenine gavage and subcutaneous injection of potassium oxalate for 14 consecutive days. The levels of serum uric acid, creatinine, urea and urine uric acid were tested respectively, the clearance rates of uric acid in kidney were calculated. The expression of related transporters in kidney of animals was measured by RT-PCR. The pathological changes in kidney were observed. **RESULTS** Compared with model group, the levels of serum uric acid, creatinine and urea of the hyperuricemia rats in Compound Qiling Formula granules groups were significantly reduced, the clearance rates of uric acid in kidney were significantly increased; their pathological changes of kidney tissue showed that they had less urate crystals of renal tubules and less renal tubule-interstitial damage. Compound Qiling Formula granules could significantly down-regulate the mRNA expression of uric acid transporter 1, glucose transporter 9 and up-regulate the mRNA expression of organic anion transporter 1. **CONCLUSION** Compound Qiling Formula granules can reduce uric acid level and alleviate renal pathological damage in rats with hyperuricemia. Its mechanism of action may be related to the regulation of the expression level of uric acid transporters, so as to reduce the reabsorption capacity of renal uric acid salt, increase the secretion of uric acid salt, thus promoting the excretion of uric acid.

KEYWORDS: Compound Qiling Formula granules; hyperuricemia; kidney transporter

高尿酸血症是引起痛风、尿酸性肾病的生化基础, 更是冠心病、高脂血症、糖尿病等疾病发生的高危因素, 并能增加心血管疾病和糖尿病患者的死亡率。据统计, 痛风的发病率为每 1 000 人 0.06~2.68^[1], 并有逐年递增且发病年龄逐渐低龄化的趋势, 故控制高尿酸血症具有重要意义。运用

西药治疗高尿酸血症虽有确切的疗效, 但停药后复发率较高, 且有一定的毒性和不良反应^[2], 对肾功能异常的患者具有很大的局限性, 大部分患者不能坚持治疗。目前中医药治疗高尿酸血症已取得显著疗效, 已有多个研究证明许多中药具有降低尿酸的功效^[3-4], 且中药复方制剂具有增效减毒

基金项目: 杭州市科技计划引导项目(2015KJ12); 全国名老中医药专家传承工作室建设项目[国中医药人教发(2016)42 号]

作者简介: 张媛, 女, 硕士, 主治医师 Tel: (0571)85827719 E-mail: xiamo0405@msn.com *通信作者: 徐红, 女, 主任中医师 Tel: (0571)85827937 E-mail: xuhong@vip.163.com

的优势,不良反应较少,故开展中药防治高尿酸血症的药效及作用机制研究具有重要的学术价值和临床应用价值。

复方芪苓配方颗粒由山慈菇、土茯苓、桑寄生、丹参、黄芪、薏苡仁等组方而成,具有健脾益肾、化瘀泄浊的功能。本课题组在高尿酸血症大鼠上初步证实,复方芪苓配方颗粒具有降低血清尿酸的作用^[5],但其调控尿酸失衡和改善肾功能的作用机制尚需探索。本研究基于前期工作,重点研究其对大鼠肾组织病理、肾脏转运体表达的影响,探讨其降尿酸的作用机制,为其干预高尿酸血症和肾功能异常提供参考。

1 材料

1.1 试剂与药物

氧嗪酸钾(日本 TCI 公司,批号:2207-75-2);戊巴比妥(美国 Sigma 公司,批号:57-33-0);腺嘌呤(美国 Sigma 公司,批号:73-24-5);复方芪苓配方颗粒(杭州市中医院制剂室);苯溴马隆片(德国赫曼大药厂,批号:JX20120328;规格:每片 50 mg);尿酸测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号:160551);肌酐测定试剂盒(日本世诺临床诊断制品株式会社,批号:C948);尿素测定试剂盒(宁波赛克生物技术有限公司,批号:20170527);引物合成(杭州嘉朗生物技术有限公司)。

1.2 动物

SD 清洁级大鼠,♂,10 周龄,体质量(150±20)g 左右,购于浙江中医药大学实验动物中心,饲养于浙江中医药大学动物实验中心全屏障清洁级动物房内,标准颗粒饲料,自由饮水。实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2013-0184。

2 方法

2.1 分组与造模

大鼠适应性饲养 7 d 后随机分成正常组、模型组、复方芪苓配方颗粒高、中、低剂量组及苯溴马隆组,每组 10 只。正常组实验过程中普通饲料饲养,其余各组用 10%的酵母粉饲料饲喂,上午给予 0.1 g·kg⁻¹ 腺嘌呤灌胃,并以 0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹ 氧嗪酸钾分 2 次腹部皮下注射,下午各治疗组分别灌胃给予复方芪苓配方颗粒,其中高剂量组为 9.6 g·kg⁻¹,中剂量组为 4.8 g·kg⁻¹,低剂量组为 2.4 g·kg⁻¹,阳性对照组予苯溴马隆 20 mg·kg⁻¹,正

常组及模型组予蒸馏水灌胃,连续 14 d。以上给药体积均为 20 mL·kg⁻¹。

2.2 取材

末次给药后,大鼠放入代谢笼中禁食不禁水,收集 24 h 尿液,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离上清,用于测定尿尿酸,并计算尿酸清除率(尿酸清除率=尿尿酸/血尿酸×每分钟尿量)。次日称重后腹腔注射戊二醛麻醉,从大鼠腹主动脉采血,离心机 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 分离血清,将血清置于 4 ℃ 保存,用于生化指标检测。然后在冰台上快速分取肾脏组织,置于-80 ℃ 条件冰箱保存,用于 RT-PCR 分析。同时取出另一部分肾脏组织置于 10%的甲醛溶液中固定 24 h,用于病理检测。

2.3 肾脏转运体表达的 RT-PCR 测定

分别取各组冻存后的大鼠肾脏,切取皮质组织 100 mg,按照试剂盒说明书方法提取总 RNA,鉴定其纯度和完整性后取总 RNA 原液 5 μL,加入 Oligo(dT)18 引物及反转录体系进行反转录,合成 cDNA 保存于-20 ℃。用 Primer premier 5.0 软件设计 PCR 引物,选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因。肾脏尿酸盐转运体 1(uric acid transporter 1, URAT1)的上游引物序列为 5'-GCTACCAGAATCGGCACGCT-3',下游引物序列为 5'-CACCGGGAAGTCCACAATCC-3';葡萄糖转运蛋白 9(glucose transporter 9, GLUT9)的上游引物序列为 5'-GAGATGCTCATTGTGGGACG-3',下游引物序列为 5'-GTGCTACTTCGTCCTCGGT-3';有机阴离子转运体 1(organic anion transporter1, OAT1)的上游引物序列为 5'-ACGGGAAACAAGAAGAGGG-3',下游引物序列为 5'-AAGAGAGGTA TGGAGGGGTAG-3';GAPDH 的上游引物序列为 5'-GAGAAGATTTGGCACCACAC-3',下游引物序列为 5'-CATCACAATGCCAGTGGTAC-3'。扩增条件为 95 ℃ 预变性 5 min、72 ℃ 延伸 10 min。各序列扩增步骤为 94 ℃ 变性 30 s、58 ℃ 退火 35 s、72 ℃ 延伸 45 s,其中 URAT1 和 GLUT9 进行 30 次循环, OAT1 进行 29 次循环, GAPDH 进行 35 次循环。各组 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭显色后,结果在凝胶影像分析仪成像后作吸收度分析。通过计算目的基因

与 GAPDH 的比值,从而得到目的基因表达的相对值。

2.4 统计学方法

数据处理及统计采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠血清尿酸及肾功能的影响

与正常组相比,模型组血清尿酸、肌酐、尿素水平明显升高。与模型组相比,复方芪苓配方颗粒各剂量组及苯溴马隆组血清尿酸、肌酐明显降低,且随着中药剂量增大,降尿酸效果越明显。复方芪苓配方颗粒高、中剂量组血清尿素有明显降低,其低剂量组及苯溴马隆组血清尿素未见明显改变,结果见图 1。

3.2 复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠尿酸排泄的影响

与正常组相比,模型组 24 h 尿量及尿酸清除率显著减少。与模型组相比,各治疗组尿尿酸无明显差异,复方芪苓配方颗粒高、中剂量组及苯溴马隆组 24 h 尿量和尿酸清除率均显著提高,结果见表 1。

3.3 复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠肾脏病理组织学的影响

正常组肾脏组织结构正常,肾小管上皮细胞无水肿,排列整齐,结构清晰完整;模型组大鼠肾小管上皮细胞水肿明显,肾小管扩张,可见管

型细胞及尿酸盐结晶,部分肾小球萎缩,肾间质大量炎性细胞浸润,局灶性肾间质纤维化;与模型组相比,复方芪苓配方颗粒高、中剂量组及苯溴马隆组肾间质炎性细胞浸润有不同程度减轻,肾小管内尿酸盐结晶显著减少,肾小管萎缩明显减轻,而复方芪苓配方颗粒低剂量组改善不明显,结果见图 2。

表 1 复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠尿酸排泄的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Effect of Compound Qiling Formula granules on the excretion of uric acid in rats with hyperuricemia($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	尿酸/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h 尿量/ mL	尿酸清除率/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
正常组	1.07 ± 0.12	10.45 ± 2.69	0.13 ± 0.04
模型组	1.83 ± 0.15	$6.20 \pm 1.03^{1)}$	$0.05 \pm 0.01^{1)}$
苯溴马隆组	1.83 ± 0.11	$8.45 \pm 1.66^{2)}$	$0.11 \pm 0.02^{2)}$
复方芪苓配方颗粒			
高剂量组	1.93 ± 0.12	$9.25 \pm 1.67^{2)}$	$0.12 \pm 0.03^{2)}$
中剂量组	1.74 ± 0.08	$8.70 \pm 1.30^{2)}$	$0.09 \pm 0.02^{2)}$
低剂量组	1.59 ± 0.11	7.60 ± 1.24	0.07 ± 0.01

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, $^{2)}P < 0.01$.

3.4 复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠肾脏转运体 mRNA 表达的影响

与正常组相比,模型组肾脏 URAT1 和 GLUT9 mRNA 的表达显著升高,OAT1 mRNA 表达显著下降。与模型组相比,复方芪苓配方颗粒各剂量组 URAT1 和 GLUT9 mRNA 表达均有下降,其中高、中剂量组有显著性差异,复方芪苓配方颗粒高剂量组 OAT1 mRNA 表达显著上升;与模型组相比,苯溴马隆组 URAT1 和 GLUT9 mRNA 的表达显著下降,OAT1 mRNA 表达显著上升,结果见图 3。

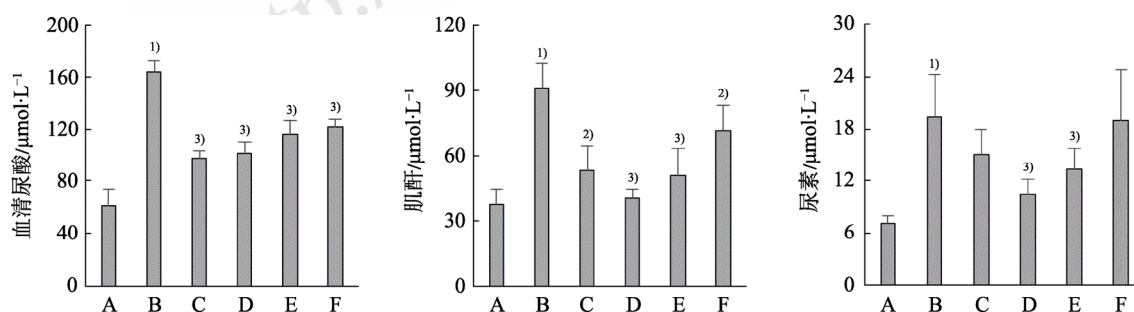


图 1 复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠血清尿酸、肌酐、尿素的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-正常组; B-模型组; C-苯溴马隆组; D-复方芪苓配方颗粒高剂量组; E-复方芪苓配方颗粒中剂量组; F-复方芪苓配方颗粒低剂量组; 与正常组比较, $^{1)}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{2)}P < 0.05$, $^{3)}P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of Compound Qiling Formula granules on serum uric acid, creatinine and urea in rats with hyperuricemia($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-normal group; B-model group; C-benzbromarone group; D-Compound Qiling Formula granules high dose group; E-Compound Qiling Formula granules medium dose group; F-Compound Qiling Formula granules low dose group; compared with normal group, $^{1)}P < 0.01$; compared with model group, $^{2)}P < 0.05$, $^{3)}P < 0.01$.

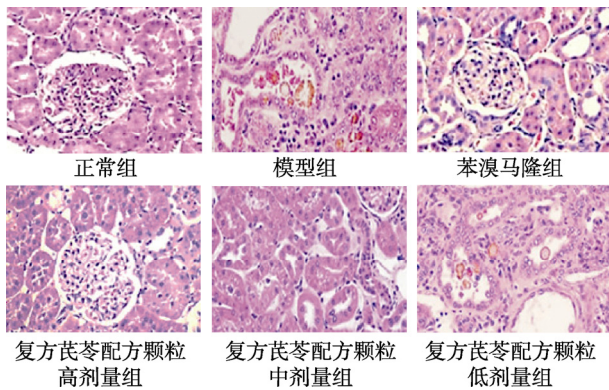


图 2 复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠肾脏病理的影响(HE, 400×)

Fig. 2 Effect of Compound Qiling Formula granules on renal pathology of hyperuricemia rats (HE, 400×)

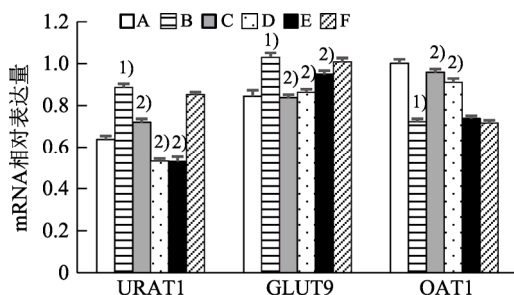


图 3 复方芪苓配方颗粒对高尿酸血症大鼠肾脏转运体 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-正常组; B-模型组; C-苯溴马隆组; D-复方芪苓配方颗粒高剂量组; E-复方芪苓配方颗粒中剂量组; F-复方芪苓配方颗粒低剂量组; 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of Compound Qiling Formula granules on kidney transporter mRNA expression in rats with hyperuricemia($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-normal group; B-model group; C-benzbromarone group; D-Compound Qiling Formula granules high dose group; E-Compound Qiling Formula granules medium dose group; F-Compound Qiling Formula granules low dose group; compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

高尿酸血症是尿酸代谢紊乱为主的代谢性疾病。中医学上高尿酸血症并无相应的病证名, 历代医家认为其当属湿浊、痰结、瘀血范畴, 究其病因病机为先天脾肾虚损, 又后天饮食不节, 过食肥甘厚味, 日久伤脾, 脾失健运, 肾失蒸腾, 气化失司, 痰湿内生, 湿性黏腻, 可致气机升降失常, 血行郁滞, 郁久则出现湿瘀蕴阻之证。故痰浊瘀滞脉中是引起高尿酸血症的重要因素, 正如《类证治裁·痹症》中提到痹症日久不愈时, “必有湿痰败血瘀滞经络。”故本病属本虚标实之证, 治疗时当宜健脾益肾、化痰泄浊、清热利湿, 标本兼顾。复方芪苓配方颗粒为徐红教授的经验方,

多年应用于临床, 有良好的疗效, 方中土茯苓祛风湿、利关节、分清浊、通络止痛, 有明显的降尿酸作用^[6]; 山慈菇利水解毒、消痈散结, 其所含秋水仙碱对急性痛风性关节炎有治疗作用^[7]; 秦艽祛风湿、舒筋络、清虚热, 有促进尿酸排泄作用^[8]; 生米仁、桑寄生既有滋补脾肾作用, 又有利湿降浊化痰之功, 补中有通, 寓通于补; 丹参具有祛瘀生新、益气行水、促进组织的修复和再生的作用; 黄芪健脾益气, 防上述祛湿化痰药攻伐太过。诸药共奏标本兼治之效。

尿酸盐主要通过肾脏排泄, 研究表明人体内约 2/3 的尿酸盐通过肾脏排泄^[9]。如果肾功能发生异常, 则尿酸排泄受限造成其在体内蓄积引发高尿酸血症。而高尿酸血症又能引起或者加重肾功能损害。本研究中复方芪苓配方颗粒可以显著降低高尿酸血症大鼠的血尿酸水平, 并发现其可使肾脏尿酸清除率增高, 提示其具有促进肾脏尿酸排泄的作用; 同时可以降低血肌酐水平, 减轻高尿酸血症大鼠肾组织病理损害, 说明其对肾脏有一定的保护作用。

肾脏在尿酸的排泄过程中对维持血浆尿酸水平起着主导作用, 近年来多项研究发现肾脏中存在多种与尿酸盐转运相关的转运蛋白参与尿酸排泄, 肾小球滤过的尿酸约 98% 被肾小管重吸收^[10], 故肾小管的重吸收作用在尿酸排泄过程中占重要地位。而肾小管主要经过重吸收蛋白 URAT1 和 GLUT9 重吸收尿酸入血, 由分泌蛋白 OAT1 再分泌入尿排出体外。Hosoyamada 等^[11]通过对小鼠敲除 URAT1 基因的研究显示其尿中尿酸/肌酐浓度比显著高于正常小鼠, 表明肾脏对尿酸的重吸收减弱, 故下调 URAT1 能够抑制肾小管对尿酸盐的重吸收作用。而 GLUT9 是唯一位于肾小管上皮细胞基底膜的重吸收蛋白, 研究表明当 GLUT9 突变时, 尿酸盐的重吸收几乎完全停止^[12]。OAT1 的肾脏中表达下调可以使肾脏产生炎症^[13], 从而减少肾脏的分泌和增加有机阴离子的积累, 而尿酸盐是主要在肾小管中通过 OAT1 转运的一种内源性有机阴离子。本研究设立苯溴马隆组作为阳性对照组, 苯溴马隆是典型的促尿酸排泄药物, 通过抑制肾小管重吸收尿酸发挥降尿酸作用。结果表明, 复方芪苓配方颗粒高、中剂量组及苯溴马隆组均可显著降低大鼠肾脏 URAT1 和 GLUT9 mRNA 的表达, 且复方芪苓配方颗粒高剂量组及

苯溴马隆组能显著升高大鼠肾脏 OAT1 mRNA 的表达。因此推断其降尿酸的作用机制可能与下调高尿酸血症大鼠肾脏 URAT1 及 GLUT9 水平及上调 OAT1 水平的表达,降低肾脏尿酸盐重吸收能力及增加尿酸盐的分泌相关。

综上所述,本研究证实复方芪苓配方颗粒是防治高尿酸血症大鼠合并肾功能不全的一种潜在药物,这为研究复方芪苓配方颗粒作用于高尿酸血症的研究提供了一定的理论基础。

REFERENCES

- [1] WIJNANDS J M A, VIECHTBAUER W, THEVISSSEN K, et al. Determinants of the prevalence of gout in the general population: A systematic review and meta-regression [J]. *Eur J Epidemiol*, 2015, 30(1): 19-33.
- [2] 杨媛, 李静, 甄健存, 等. 抗痛风药别嘌呤醇、苯溴马隆及秋水仙碱不良反应报告分析[J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(15): 1296-1297.
- [3] SHEN Q, LI H, LEI S S, et al. Study on anti-trioxypurine effect and mechanism of *Dendrobium candidum* simiao prescription on hyperuricemia rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2019, 36(2): 157-163.
- [4] ZHU F W, LOU Z H. Effects of folium mori on serum uric acid levels and gut microbiota in rats with hyperuricemia [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(8): 1084-1088.
- [5] XU H, CHEN J, LIU H L, et al. Clinical efficacy and safety evaluation of traditional Chinese medicine Niao Suan Li Xian formula granules in treatment of hyperuricemia [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2013, 31(10): 2285-2288.
- [6] DING R, HONG Q, GENG X D, et al. Mechanism of rhizoma smilacis glabrae in the treatment of hyperuricemia mouse model [J]. *Chin J Integr Tradit West Nephrol*(中国中西医结合肾病杂志), 2019, 20(2): 97-100.
- [7] GUAN L X, CHU Y P. Species textual research and study on colchicines content of Shancigu in Lijiang of Yunnan [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*(中药与临床), 2015, 6(3): 1-3.
- [8] 刘颖, 郑立运, 崔立然. 秦艽抗大鼠高尿酸血症作用机制研究[J]. *中国医学创新*, 2013, 10(22): 143-144.
- [9] ICHIDA K, MATSUO H, TAKADA T, et al. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia [J]. *Nat Commun*, 2012, 3(1): 764.
- [10] LIPKOWITZ M S. Regulation of uric acid excretion by the kidney [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2012, 14(2): 179-188.
- [11] HOSoyAMADA M, TAKIUE Y, MORISAKI H, et al. Establishment and analysis of SLC22A12 (URAT1) knockout mouse [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2010, 29(4/5/6): 314-320.
- [12] NAKANISHI T, OHYA K, SHIMADA S, et al. Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATv1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(3): 603-611.
- [13] MASEREEUW R, RUSSEL F G. Therapeutic implications of renal anionic drug transporters [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 126(2): 200-216.

收稿日期: 2019-08-06

(本文责编: 曹粤锋)