

健脾渗湿方对高尿酸血症模型大鼠的防治作用及机制初步研究*

杨会军¹, 彭江云^{2△}, 万春平², 李兆福², 吴生元², 李玲玉¹

(1. 云南中医学院, 云南昆明 650500; 2. 云南省中医医院, 云南昆明 650021)

摘要: **目的** 探讨健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠模型的降尿酸作用及对生电型的尿酸盐转运体(urate transporter, UAT)蛋白的调控作用,揭示“健脾渗湿,化痰通络”法治疗痛风的现代生物学特征及规律。**方法** 48 只 SD 大鼠按尿酸水平平均分为正常对照组、病理模型组、苯溴马隆组、健脾渗湿方低、中、高 3 个剂量组。采用酵母饲料加腺嘌呤诱导高尿酸血症大鼠模型,灌胃给药 14 d 后检测各组大鼠血清尿酸、肌酐和尿素氮水平;Western blot 法检测健脾渗湿方含药血清对 HK-2 肾小管上皮细胞 UAT 蛋白表达情况。**结果** 健脾渗湿方低、中、高 3 个剂量组不仅能显著降低高尿酸血症模型大鼠的尿酸水平($P<0.05$),而且显著减少血清尿素氮和肌酐产生水平($P<0.05, P<0.01$);健脾渗湿方含药血清显著上调尿酸盐转运蛋白 UAT 的表达。**结论** 健脾渗湿方具有显著的降尿酸作用,且对肾脏功能损伤具有保护作用,其作用机制可能与上调尿酸盐转运蛋白 UAT 的表达有关。

关键词: 健脾渗湿方;高尿酸血症;尿酸;肌酐;尿素氮;生电型的尿酸盐转运体

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2013)01-0001-04

健脾渗湿方(七君颗粒)是以“健脾渗湿,化痰通络”为法,由党参、茯苓、白术、三七、金钱草等 10 余味中药为组方制成的制剂。前期临床及实验研究表明,健脾渗湿方(七君颗粒)明显改善痛风及高尿酸血症的临床症状,总有效率达 90.0%,显著减低高尿酸血症大鼠模型的尿酸水平^[1-3]。然而其对肾脏功能的保护及治疗痛风、高尿酸血症作用机制尚未阐明,本研究拟通过建立高尿酸血症大鼠模型及 HK-2 细胞培养,探讨健脾渗湿方对肾脏功能的保护及其治疗痛风(Gout)、高尿酸血症(hyperuricemia, HUM)的分子机制,为健脾渗湿方治疗 Gout 及 HUM 提供理论依据,丰富中医药防治 Gout 理论。

1 实验材料

1.1 实验动物

来源,种系,品系:SD 大鼠,SPF 级,雌雄各半,7~8 周龄,体重(200±20)g,购自昆明医科大学实验中心。动物合格证编号:SCXK(滇)2011-0004。动物饲养于云南省中医医院中心实验室动物实验室 IVC 屏障系统,至少饲养 1 周后使用。温度(22±1)℃,湿度(55±5)%,12 h 光暗循环。饲料和水均由动物自由摄

取,所有笼具、饲料和饮水均经过 121℃蒸汽灭菌处理。所有实验均严格按照实验动物有关条例进行。

1.2 主要药物与试剂

健脾渗湿方浸膏每克含生药量为 4.74 g,由云南省中医医院制剂中心提供;酵母干粉,美国 Amresco 公司;腺嘌呤,美国 Amresco 公司;苯溴马隆片(立加利仙),德国赫曼大药厂(Excelsa GmbH),昆山龙灯瑞迪制药有限公司分装,分装批号:1208/06;肝素钠注射液(2mL:1250 单位),江苏万邦生化医药股份有限公司;尿酸检测试剂盒(尿酸酶—过氧化物酶法),深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;肌酐检测试剂盒(酶比色法),德国罗氏诊断有限公司;尿素试剂盒(液体)(紫外—谷氨酸脱氢酶法),上海科华生物工程股份有限公司。DMEM 培养基购自 GibcoBRL 公司(life Technologies, Grandisland, NY, USA);胎牛血清(fetal bovine serum)购自 Hyclone 公司(Logan, Utah, USA);肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)来源于中国科学院昆明动物所;兔抗人 UAT 蛋白、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 均购自 Sigma 公司;Immobilon-P Transfer Membrane,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(NO:30960476)

收稿日期:2013-01-02 修回日期:2013-01-17

作者简介:杨会军(1985~),男,甘肃渭源人,硕士研究生在读,研究方向为中医药防治风湿病。

△通信作者:彭江云, E-mail: pengjiangyun@126.com

IPVH00010, 0.45 μ m, 美国 MILLIPORE 公司。

1.3 主要仪器

电子秤, 上海友声衡器有限公司; 分析天平, METTLER TOLEDO 公司; 玻璃毛细管, 四川成都华西医科大学仪器厂生产; AU640 全自动生化分析仪, 日本奥林帕斯 OLYMPUS; Biofuge Primo R 离心机, 德国 Thermo Scientific Heraeus 公司。二氧化碳培养箱 3111, 美国 Thermo-fisher 公司; Biorad Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System Mp4, 美国 Bio-rad 公司。

2 实验方法

2.1 酵母颗粒饲料的制备

酵母干粉均匀拌入粉碎的大鼠颗粒饲料中, 充分混匀, 重新压粒成型, 控制其在饲料中的质量分数为 10%。

2.2 高尿酸血症模型的诱导、实验分组及给药

70 只 SD 大鼠每组动物自由饮水进食 1 周后开始实验。实验前通过其眼眶后静脉丛采血检测血清尿酸水平, 选取血清尿酸水平在 30–55 μ mol/L 范围的大鼠(48 只)为实验动物, 按照尿酸水平平均分为 6 组: 正常对照组、病理模型组、阳性药苯溴马隆组和健脾渗湿方低、中、高剂量组, 每组 8 只, 雌雄各半。参考文献方法[4]造模, 模型组、阳性药苯溴马隆组、健脾渗湿方低、中、高剂量组给予 10% 酵母饲料饲喂, 并于每天上午 9 点灌胃腺嘌呤 100mg/kg, 每天 1 次, 连续 14 d, 以制备高尿酸血症模型。正常对照组饲予普通大鼠颗粒饲料, 并给予同体积的蒸馏水。模型组、阳性药苯溴马隆组分别给予溶剂对照和苯溴马隆 20 mg/kg, 健脾渗湿方低、中、高剂量组分别灌胃给予健脾渗湿方浸膏 1.15 g/kg(相当于生药 5.55 g/kg), 3.50 g/kg(相当于生药 16.65 g/kg)、10.05 g/kg(相当于生药 49.95 g/kg)。

2.3 标本采集

实验给药第 14 天采血, 制备血清。末次给药后 2 h, 用玻璃毛细管从大鼠眼眶后静脉丛采血, 待血液凝固后, 置离心机于 4℃, 5000 r, 10min 离心后分装血清, -20℃保存, 用于指标检测。

2.4 生化指标检测

在全自动生化分析仪上测定血清尿酸、肌酐、尿素氮水平。

2.5 含药血清的制备

SD 大鼠 12 只, 随机分为 2 组, 即健脾渗湿方

组, 生理盐水对照组, 每组 6 只, 雌雄各半。按血清药理学常规给药方法: 3d(day)–2t(time)–1h(hour) 模式, 即健脾渗湿方以 10.05g/kg 剂量灌胃大鼠, 给药量按照实验动物与人用药量的换算公式计算得出。正常对照组灌以等剂量生理盐水, 2 次/d, 连续 3 d, 末次给药后 1 h 腹主动脉采血, 两组均为无菌采血, 在室温下放置 3h, 使血液凝固, 然后移至 4℃ 冰箱中过夜, 使血清充分析出。次日, 在 3000r/min 离心 15min, 使血清析在上层, 吸取另装, 56℃ 灭活 30min, 然后 0.2 μ m 微孔滤膜过滤, 尔后 56℃ 30 min 灭活后分装, 置 -80℃ 冰箱冷冻备用。

2.6 HK-2 细胞的培养和分组

细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 取汇合达 90% 的细胞经胰酶/EDTA 消化制成细胞悬液, 继续培养 24h, 使细胞生长达汇合, 弃去含血清的培养液, 用 PBS 清洗 3 遍后换无血清培养液, 继续培养 24h, 使细胞同步处于 G0 期。取培养后同步处于 G0 期的 HK-2 细胞, 按继续培养条件的不同分为 4 组: ① 5% 生理盐水血清对照组; ② 10% 生理盐水血清对照组; ③ 5% 健脾渗湿含药血清组; ④ 10% 健脾渗湿含药血清组。

2.7 Western blot 检测 UAT 蛋白表达水平

培养结束后, 收集细胞于 Eppendorf 管中, RIPA 细胞裂解液裂解 10min, 离心收集上清, BCA 蛋白定量试剂调成统一浓度, 加入 SDS sample buffer 上样缓冲液。

垂直电泳分离、转膜、封闭, 加入抗 UAT 的一抗, 4℃ 过夜, 加入相应的二抗, 曝光、定影、拍照。

2.8 统计学方法

所有实验数据均采用统计学方法处理。方差齐, 均值间差异比较采用 *t* 检验或单因素方差分析, 方差不齐, 均值间差异比较采用校正 *t* 检验, 数据统计均以平均值 $\pm$ 标准差表示, 以 $P < 0.05$ 为显著水平。数据统计分析采用 SPSS17.0 统计软件包。

3 实验结果

3.1 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠血清尿酸水平的影响

实验前, 各组血清尿酸水平比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。给药第 14 天后, 模型组大鼠血清尿酸水平显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组相比, 阳性苯溴马隆组、健脾渗湿方低、中、高剂量组均能显著降低高尿酸血症大鼠模型的

血清尿酸水平($P<0.01$),见表1。

表1 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠血清尿酸水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	实验前尿酸 /μmol·L ⁻¹	给药 14 d 后 尿酸/μmol·L ⁻¹
正常对照组	—	41.98±9.80	62.90±8.25**
模型对照组	—	39.42±9.35	93.84±18.11
苯溴马隆组	0.02	41.67±9.93	48.53±10.06**
健脾渗湿方低剂量组	1.15	41.92±7.69	51.58±10.31**
健脾渗湿方中剂量组	3.50	41.18±7.64	50.33±11.65**
健脾渗湿方高剂量组	10.05	42.10±8.88	45.06±8.33**

注:与模型组比较,** $P<0.01$ 。

3.2 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠血清肌酐、尿素氮水平的影响

如表2所示:与正常对照组比较,模型组大鼠血清肌酐、尿素氮水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);健脾渗湿方中、高剂量组血清肌酐水平显著低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);健脾渗湿方低、中、高剂量组大鼠血清尿素氮显著低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表2 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠血清肌酐、尿素氮水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肌酐 /μmol·L ⁻¹	尿素氮 /mmol·L ⁻¹
正常对照组	—	29.75±0.92**	8.54±1.14**
模型组	—	44.52±5.61	16.62±5.38
苯溴马隆组	0.02	41.56±4.52	12.45±3.01*
健脾渗湿方低剂量组	1.15	38.85±6.45	10.73±1.23**
健脾渗湿方中剂量组	3.50	37.82±1.46*	9.82±1.45**
健脾渗湿方高剂量组	10.05	33.67±3.99**	9.41±2.70**

注:与模型组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$;

3.3 健脾渗湿方含药血清对 HK-2 肾小管上皮细胞 UAT 蛋白表达的影响

UAT 被认为在调节全身尿酸稳态中发挥重要作用。Western blot 结果表明,与 5%、10%生理盐水电清对照相比较,健脾渗湿方 5%、10%含药血清显著上调 HK-2 肾小管上皮细胞 UAT 蛋白表达,结果见图1。

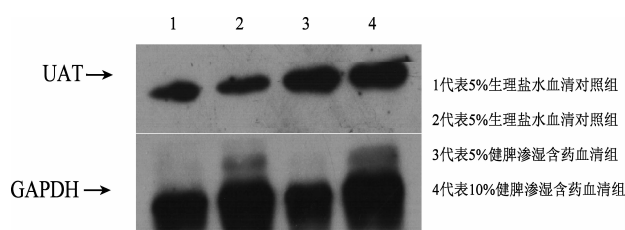


图1 UAT 蛋白的表达情况

4 讨论

痛风属于中医“痹证”范畴,而高尿酸血症属“浊毒”。脾虚湿盛,痰瘀痹阻是本病病机的关键所在。据此,我们以“健脾渗湿,化痰通络”为法,由党参、茯苓、白术、三七、金钱草等10余味中药为组方制成颗粒剂(七君颗粒),临床主要用于痛风及高尿酸血症(脾虚湿阻型)治疗,临床疗效显著。前期临床及实验研究表明,健脾渗湿方(七君颗粒)明显改善痛风及高尿酸血症的临床症状,总有效率达90.0%^[1-3],显著减低高尿酸血症大鼠模型的尿酸水平。然而其治疗痛风及高尿酸血症作用机制尚未阐明。本课题通过建立高尿酸血症大鼠模型及 HK-2 细胞培养,研究健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠模型的尿酸及肾功能的影响,并探讨其治疗痛风的分子机制。酵母饲料饲养同时灌胃腺嘌呤诱导的高尿酸血症大鼠模型,病理表现为尿酸大量的产生,导致肾小管和肾小球功能受损,肌酐及尿素氮水平升高^[5]。本研究结果表明,健脾渗湿方不仅显著降低高尿酸血症模型大鼠的血清尿酸水平,而且对血清尿素氮和肌酐水平具有显著的下调作用。提示该方对肾脏功能具有保护作用,临床宜用于高尿酸血症并发肾功能损伤的患者,且具有一定的安全性。

最新研究表明,UAT 蛋白表达水平过低是原发性高尿酸血症的重要发病机制^[6],UAT 广泛表达于人体组织,尤以肾脏和肠道最丰富,肾近端小管上皮细胞内的尿酸盐 50%由 UAT 介导分泌到管腔,经肾脏排出体外^[7]。肠道中的 30%的尿酸经肠黏膜上皮细胞 UAT 介导分泌至肠腔,再经细菌酶解后排出体外^[8]。高尿酸环境中,人肾小管上皮细胞 hUAT mRNA 水平明显上调,UAT 生成增多^[9]。UAT 被认为在调节全身尿酸稳态中发挥重要作用。本研究发现健脾渗湿方能健显著上调 HK-2 肾小管上皮细胞 UAT 蛋白表达水平,推测其可能通过该机制,促进肾小管对尿酸的分泌,进而降低血清尿酸水平。

参与近曲肾小管转运尿酸盐的蛋白还有电中

性的尿酸盐/阴离子交换蛋白(urate anion exchanger1, URAT1)、有机阴离子转运蛋白 OATs(organic anion transporter, 包括 OAT1、OAT3 和 OAT4)、葡萄糖转运蛋白 9(glucose transporter 9, GLUT9)等。因此,有必要进一步研究健脾渗湿方对其他相关蛋白的调控作用,更广泛深入揭示“健脾渗湿”之法治治疗高尿酸血症(脾虚湿阻型)理论的内在规律及现代生物学特征,发展和完善中医治疗高尿酸血症理论的科学内涵。

参考文献

- [1] 彭江云, 胡美兰. 健脾化痰通络渗湿法治治疗高尿酸血症 40 例疗效观察 [J]. 云南中医中药杂志, 2006, 27(3): 15-16.
- [2] 彭江云, 李兆福, 刘路明, 等. 七君颗粒对高尿酸血症大鼠的影响[J]. 光明中医, 2008, 23(12): 1900-1902.
- [3] 彭江云, 刘路明, 李兆福, 等. 七君颗粒治疗高尿酸血症的临床观察[J]. 中国中医风湿病杂志, 2005, 8(3-4): 129-131.
- [4] 邢儒伶, 孟冬梅, 任伟, 等. 建立痛风性肾病并慢性肾功
- 能衰竭动物模型方法的探讨 [J], 中国中西医结合杂志, 2011, 31(10): 1409-1413.
- [5] Philips FS, Thiersch JB, Bendich A. Adenine intoxication in relation to in vivo formation and deposition of 8-dioxyadenine in renal tubules [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1952, 104(1): 20-30.
- [6] Liu B R, Pritsker K, Firestein G S, et al. TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation [J]. Immunol, 2005, 174(8): 5016-5023.
- [7] Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels[J]. Nature, 2002, 417: 447-452.
- [8] Hoon DS, Wang Y, Dale PS, et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay[J]. J Clin Oncol, 1995, 13(8): 2109.
- [9] 叶德邵, 赵东宝. 尿酸盐转运体在原发性高尿酸血症中的研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2012, 16(4): 271-273.

(编辑:迟越)

Preliminary Study of the Role and Mechanism of Jian Pi Shen Shi Decoction on the Prevention and Treatment of Hyperuricemia in Rats Model

YANG Hui-jun¹, PENG Jiang-yun², WAN Chun-ping², LI Zhao-fu², WU Sheng-yuan², LI Ling-yu¹

(1. Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500;

2. Yunnan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650021)

ABSTRACT: **Objective** To explore the action of the Jian Pi Shen Shi Decoction lowers uric acid hyperuricemia in rat model and the regulation of urate transporter protein (UAT). To reveal the biological characteristics and the law of treatment of gout with “Jian Pi Shen Shi, Phlegm meridians”. **Methods** 48 rats were divided into 6 groups, the control group, the model group, the positive group(benzbromarone), Jian Pi Shen Shi Decoction low dose group, Jian Pi Shen Shi Decoction middle dose group, and Jian Pi Shen Shi Decoction high dose group. All the groups except the control group were fed with fodder yeast plus adenine to get the hyperuricemia rat model. Then after 14 days, test trioxypurine, creatinine, and urea nitrogen of the drenched rats and analysis the expression UAT protein in HK-2 tubular epithelial cells effected by the containing serum of Jian Pi Shen Shi Decoction with Western blot. **Results** Three dose groups of Jian Pi Shen Shi Decoction can effectively lower trioxypurine of the hyperuricemia rat model($P<0.05$), and also creatinine and urea nitrogen($P<0.05$, $P<0.01$). The containing serum of Jian Pi Shen Shi Decoction significantly raised the expression of urate transporter(UAT). **Conclusion** Jian Pi Shen Shi Decoction can effectively protect the renal function and lower the uric acid, the mechanism of action may be related to with raising the expression of urate transporter.

KEY WORDS: Jian Pi Shen Shi Decoction; hyperuricemia; trioxypurine; creatinine, urea nitrogen; urate transporter