

引用:陶慧,覃媛媛,蒙健军,林发全. 抑酸复合茶对高尿酸血症模型大鼠肾功能的影响及降尿酸作用机制研究[J]. 湖南中医杂志,2020,36(8):160-162,176.

抑酸复合茶对高尿酸血症模型大鼠肾功能的影响及降尿酸作用机制研究

陶 慧^{1,2},覃媛媛¹,蒙健军¹,林发全¹

(1. 广西医科大学第一附属医院,广西 南宁, 530021;

2. 广西卫生职业技术学院,广西 南宁, 530021)

[摘要] 目的:采用高尿酸血症模型大鼠研究抑酸复合茶对高尿酸血症的防治作用,并探讨其降尿酸的作用机制。方法:大鼠适应性饲养1周后根据随机分组原则分为正常对照组、模型组、别嘌醇组及抑酸复合茶高、低剂量组,每组各12只。除正常对照组外,其余各组均采用腺嘌呤联合氧嗪酸钾连续灌胃3周以建立高尿酸血症模型,建模同时给予药物干预,观察各组大鼠给药前后血尿酸(UA)及给药后尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、胱抑素C(CysC)、一氧化氮(NO)的变化。采用Western blot法检测抑酸复合茶对HEK293细胞URAT1和GLUT9表达的影响。结果:给药后,与模型组比较,抑酸复合茶高剂量组UA、BUN、Scr、CysC均降低,NO升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);低剂量组UA、BUN降低,NO升高,差异亦有统计学意义($P < 0.05$);与别嘌醇组比较,抑酸复合茶高剂量组CysC下降,NO升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);抑酸复合茶还可使HEK293细胞中URAT1和GLUT9的表达量降低。结论:抑酸复合茶对高尿酸血症大鼠降尿酸作用明显,且对血管内皮细胞和肾功能具有一定的保护作用;其作用机制可能是通过下调肾脏URAT1和GLUT9蛋白表达而发挥。

[关键词] 高尿酸血症;大鼠;抑酸复合茶;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.08.061

Effect of Yi - Suan - Cha on renal function and its mechanism of action in reducing uric acid in a rat model of hyperuricemia

TAO Hui^{1,2}, QIN Yuanyuan¹, MENG Jianjun¹, LIN Faquan¹

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China;

2. Guangxi Medical College, Nanning 530021, Guangxi, China)

[Abstract] Objective: To investigate the role of Yi - Suan - Cha in the prevention and treatment of hyperuricemia and its mechanism of action in reducing uric acid (UA) in a rat model of hyperuricemia. Methods: After one week of adaptive feeding, the rats were randomly divided into normal control group, model group, allopurinol group, and high - and low - dose Yi - Suan - Cha groups, with 12 rats in each group. All rats except those in the normal control group were given adenine combined with oteracil potassium by gavage for 3 consecutive weeks to establish a model of hyperuricemia, and drug intervention was given at the same time of modeling. Blood UA, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), cystatin C (CysC), and nitric oxide (NO) were observed before and after administration. Western blot was used to evaluate the effect of Yi - Suan - Cha on the expression of URAT1 and GLUT9 in HEK293 cells. Results: Compared with the model group after administration, the high - dose Yi - Suan - Cha group had a significant reduction in UA, BUN, Scr, and CysC and a significant increase in NO ($P < 0.05$), and the low - dose Yi - suan - Cha group had a significant reduction in UA and BUN and a significant increase in NO ($P < 0.05$). Compared with the allopurinol group, the high - dose Yi - Suan - Cha group had a significant reduc-

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金项目(2017GXNSFAA198150)

第一作者:陶慧,女,主管技师,研究方向:临床检验诊断学

通讯作者:林发全,男,教授,硕士研究生导师,研究方向:临床检验诊断学, E-mail: fqlin1998@163.com

tion in CysC and a significant increase in NO ($P < 0.05$). Yi - Suan - Cha reduced the expression of URAT1 and GLUT9. Conclusion: Yi - Suan - Cha has a marked effect in reducing UA in rats with hyperuricemia and can exert a certain protective effect on vascular endothelial cells and renal function, possibly by downregulating the protein expression of URAT1 and GLUT9 in the kidney.

[**Keywords**] hyperuricemia; rat; Yi - Suan - Cha; experimental study

研究发现,尿酸升高与血脂异常密切相关,且可能促进血栓形成,与急性心肌梗死的发生、发展有关^[1-2],这与尿酸促进氧化应激、炎症反应损伤血管内皮细胞等有一定关系。尿酸过高对血管内皮细胞及肾脏的影响,已得到一些学者的认同。尿酸盐结晶可沉积,直接作用影响血管和肾小管,还可激活肾素-血管紧张素系统、启动炎症反应、损伤血管内皮细胞等,通过以上机制诱发心血管疾病和引起各种肾脏疾病的发生^[3-4]。临床上用于降尿酸的常用药物别嘌醇(减少尿酸生成)、苯溴马隆(促进尿酸排泄)、碳酸氢钠(碱化尿液,增加尿酸溶解度促进排泄),存在不同程度的毒副作用。本次研究对象抑酸复合茶以中药山楂叶、黄芪、槐花制成。本实验旨在研究抑酸复合茶对高尿酸血症模型大鼠的降尿酸效果,并观察其在保护肾功能及血管内皮细胞方面的作用,且通过细胞培养、Western blot 技术探讨其降尿酸的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只,6~8 周龄,体重 180~220 g,购自广西医科大学实验动物中心,动物合格证编号 SCXK(桂)2014-0002,饲养于广西医科大学实验动物中心 SPF 级动物实验室。动物实验遵循动物伦理原则,经广西医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物 抑酸复合茶:山楂叶、黄芪、槐花购于市内正规大药房,按 2:1:1 的比例经浸泡蒸煮、过滤、浓缩后调制而成,高剂量浓度为含生药量 0.4 g/ml,低剂量浓度为含生药量 0.2 g/ml;别嘌醇片(上海信谊万象药业股份有限公司,规格 0.1 g/s,批准文号:国药准字 H31020334);腺嘌呤、氧嗪酸钾(上海楷洋生物技术有限公司,批号:Z0007,K0124)。

1.3 细胞 HEK293 细胞,广西医科大学实验中心提供。

1.4 主要试剂与仪器 DMEM 培养基(武汉博士德生物工程有限公司,批号:20170611);Western blot 兔抗鼠尿酸盐阴离子交换体 1(URAT1)多克隆抗体、兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(Cell Signaling Technology,货号 009964A,009957C);兔抗鼠葡萄糖转运体 9(GLUT9)多克隆抗体(美国 Thermo 公司,货号 AP-10051);UA、BUN、Scr 试剂盒(上海执诚生物科技股份有限公司,批号:1439201,1449601,1409501),CysC 试剂盒(上海朗顿生物技术有限公司,批号:150322),NO 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号:CSB-E13034r)。EL-S 电子天平(常州市天之平仪器设备有限公司);BSA323S-CW 电子分析天平

(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);7600 型自动生化分析仪(日立公司);Elx-808 酶标分析仪(美国 Bio Tek 公司);LI-COR Odyssey CLx 红外荧光扫描成像系统(美国 LI-COR 公司)。

2 实验方法

2.1 分组、造模与给药 大鼠适应性饲养 1 周后根据随机分组原则分为正常对照组、模型组、别嘌醇组及抑酸复合茶高、低剂量组,每组各 12 只。除正常对照组外,各组参考文献[5],给予腺嘌呤 25 mg/kg、氧嗪酸钾 300 mg/kg 进行造模,每天 1 次,连续灌胃 3 周。血尿酸升高提示造模成功。从诱导模型时开始给药治疗,别嘌醇组按别嘌醇 20 mg/kg 剂量灌胃;抑酸复合茶高、低剂量组分别按 4 g/kg、2 g/kg 剂量灌胃;正常对照组和模型组则给予相同剂量蒸馏水灌胃;每天 1 次,连续 3 周。

2.2 观察指标

2.2.1 血清血尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、肌肝(Scr)、胱抑素 C(CysC)、一氧化氮(NO) 给药前后,大鼠眼眶后静脉丛采血约 1.5 ml,25°C 室温自然凝血 1 h,2500r/min 离心 5 min,分离血清测定 UA、BUN、Scr、CysC、NO。

2.2.2 细胞培养检测蛋白表达 HEK293 细胞分为 2 组接种在 60 mm 培养皿中培养 24 h 至贴壁,吸走旧培养基,分别加入新的完全培养基和抑酸复合茶继续培养 24 h。按照试剂盒说明书提取细胞总蛋白,应用 BCA 法测定蛋白含量。热变性后,取 40 μg 总蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,恒流 120 mA 转膜 1.5 h。室温下 5% 脱脂奶粉匀速摇晃封闭 1 h 后,1 抗 URAT1(浓度稀释比例为 1:500),GLUT9(浓度稀释比例为 1:500),GAPDH(浓度稀释比例为 1:1000),4°C 孵育过夜。TBST 洗膜后用对应种属的荧光 II 抗室温下孵育 2 h。以目的蛋白和内参蛋白 GAPDH 的比值反映目的蛋白相对表达量。

2.3 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和 LSD 进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠给药前后血尿酸比较 给药前各组血尿酸比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。给药后,模型组较正常对照组血尿酸水平升高,提示造模成功。与模型组比较,别嘌醇组和抑酸复合茶高、低剂量组血尿酸明显降低,差异有统计学意义。(见表 1)

表 1 各组大鼠给药前后血尿酸的比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	只数	剂量	给药前	给药后
正常对照组	12	-	39.92 ± 12.23	40.08 ± 6.19 ^a
模型组	12	-	39.42 ± 11.25	61.92 ± 18.00
别嘌醇组	12	20 mg/kg	40.58 ± 11.17	36.67 ± 12.08 ^a
抑酸复合茶高剂量组	12	4 g/kg	32.83 ± 13.59	45.75 ± 9.93 ^a
抑酸复合茶低剂量组	12	2 g/kg	39.08 ± 9.90	45.67 ± 8.43 ^a

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$ 。

3.2 各组大鼠给药后 BUN、Scr、CysC、NO 的比较 与模型组比较,抑酸复合茶高剂量组 BUN、Scr、CysC 下降,NO 水平升高,抑酸复合茶低剂量组 BUN 水平下降,NO 水平上升;与别嘌醇组比较,抑酸复合茶高剂量组 CysC 下降,NO 升高,差异均有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组大鼠给药后 BUN、Scr、CysC、NO 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量	BUN(mmole/L)	Scr($\mu\text{mol/L}$)	CysC(mg/L)	NO(pg/L)
正常对照组	12	-	6.46 ± 0.62 ^a	20.00 ± 3.74 ^a	1.18 ± 0.37 ^a	504.6 ± 90.2 ^a
模型组	12	-	10.83 ± 1.24	30.42 ± 2.39	2.46 ± 0.59	325.0 ± 63.7
别嘌醇组	12	20 mg/kg	7.62 ± 0.67 ^a	25.00 ± 2.22 ^a	2.22 ± 0.64	378.4 ± 64.6
抑酸复合茶高剂量组	12	4 g/kg	7.10 ± 0.68 ^a	26.67 ± 3.94 ^a	1.42 ± 0.48 ^{ab}	440.6 ± 62.4 ^{ab}
抑酸复合茶低剂量组	12	2 g/kg	7.93 ± 0.69 ^a	28.42 ± 4.94	1.95 ± 0.93	406.2 ± 51.5 ^a

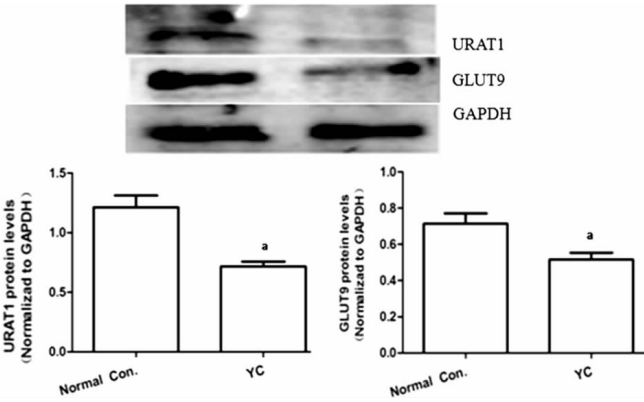
注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与别嘌醇组比较,^b $P < 0.05$ 。

3.3 抑酸复合茶对 HEK293 细胞 URAT1 和 GLUT9 蛋白表达的影响 抑酸复合茶作用 HEK293 细胞 24 h 后,与正常对照组相比,抑酸复合茶组(YC)URAT1 和 GLUT9 的表达量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(见表 3、图 1)

表 3 抑酸复合茶对 HEK293 细胞 URAT1 和 GLUT9 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	URAT1	GLUT9
正常对照组	1.23 ± 0.14	0.72 ± 0.08
抑酸复合茶组	0.68 ± 0.07 ^a	0.53 ± 0.03 ^a

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$ 。



注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

图 1 抑酸复合茶对 HEK293 细胞 URAT1 和 GLUT9 表达的影响

4 讨 论

高尿酸血症在中医学中没有相对应的病名,不同学者对其属于何种证候有不同的看法,但总体认为应从泄浊排毒、舒经通络、清热化痰、利湿利尿的角度进行治疗。抑酸复合茶的成分山楂叶、黄芪有健脾渗湿、活血通络、利水利尿的效果,槐花有凉血清肝毒的作用,能达到降尿酸的目的。国内文献报道山楂叶、黄芪用于降尿酸效果明显^[6-7]。高尿酸对肾功能的损伤不容忽视,血清 BUN、Scr、CysC 是衡量肾功能的指标。其中 CysC 是一种分泌性低分子量蛋白质,对诊断早期肾功能损伤具有较高的灵敏度和特异性^[8]。本研究在用药治疗后,别嘌醇组和抑酸复合茶高剂量组的 Scr 和 BUN 均有不同程度改善,但抑酸复合茶高剂量组 CysC 较别嘌醇组下降更明显($P < 0.05$)。可见高剂量的抑酸复合茶可改善肾损伤,对肾脏具有一定的保护作用,对肾功能的恢复较别嘌醇佳。其次,尿酸可能通过诱导内皮细胞的抗增殖作用减少产生 NO^[9],也可能直接与 NO 发生快速及不可逆的反应,生成氨基尿嘧啶,导致 NO 下降,使血管内皮细胞功能受损^[10],NO 水平的降低,可能是血管内皮细胞功能障碍的标志。实验发现抑酸复合茶高、低剂量组 NO 水平均显著升高($P < 0.05$),并且,抑酸复合茶高剂量组与别嘌醇组比较,升高程度更明显($P < 0.05$),提示抑酸复合茶对血管内皮细胞也有一定的保护作用。

体内形成的尿酸约 2/3 经肾脏随尿液排出,但由于尿酸盐为极性阴离子,不能自由通过细胞膜,在近曲小管重吸收和分泌过程中必须依赖尿酸运载蛋白,URAT1 和 GLUT9 在肾脏重吸收尿酸盐过程中起主要作用^[11-12]。本研究结果显示,抑酸复合茶可下调 HEK293 细胞中 URAT1 和 GLUT9 蛋白表达,其可能通过影响尿酸运载蛋白,减少尿酸重吸收,从而促进尿酸排泄。

综上所述,抑酸复合茶不仅能降低高尿酸血症模型大鼠血尿酸水平,对其肾脏功能及血管内皮细胞具有一定的保护作用,其降尿酸机制可能是通过下调肾脏 URAT1 和 GLUT9 蛋白表达,促进尿酸排泄发挥降尿酸作用。这为抑酸复合茶用于降尿酸治疗提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] 闫婕,陶慧,蒙健军,等. 广西省南宁市地区一常规体检人群高尿酸血症患病率调查及与血脂相关性的研究[J]. 中华内分泌代谢杂志,2014,30(5):411-414.

[2] 陶慧,闫婕,林发全. 急性心肌梗死合并高尿酸血症患者血浆纤溶酶原激活抑制物-1 和蛋白 Z 的变化及意义[J]. 中国急救医学,2014,34(2):153-155.

[3] YU MA, SÁNCHEZ-LOZADA LG, JOHNSON RJ, et al. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction[J]. J Hypertens, 2010, 28(6):1234-1242.

(下转第 176 页)

- 中国针灸,2008,28(4):251-253.
- [5] To - Yi Lam. A pilot randomized controlled trial of acupuncture at the Si Guan Xue for cancer pain[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine,2017(17):335.
 - [6] 王伟,张骁. 艾灸治疗经尿道膀胱肿瘤电切术后膀胱痉挛疗效观察[J]. 新中医,2016,48(11):56-57.
 - [7] Jinsoo Lee. Efficacy and safety of moxibustion for relieving pain in patients with metastatic cancer: A pilot, randomized, single - blind, sham - controlled Trial [J]. Integrative cancer therapies, 2014,13(3):211-216.
 - [8] 韩济生. 疼痛、药物成瘾和神经退行性疾病最新研究进展——北京大学神经科学研究所透视[J]. 北京大学学报:医学版,2009,41(3):249-254.
 - [9] ZHANG R, LAO L, REN K, et al. Mechanisms of acupuncture - electroacupuncture on persistent pain [J]. Anesthesiology, 2014, 120(2):482-503.
 - [10] CHEN H. Electroacupuncture treatment for pancreatic cancer pain: a randomized controlled trial[J]. Pancreatology, 2013,13(6):594.
 - [11] LI XA. Electro - acupuncture decrease postoperative pain and improves recovery in patients undergoing a supratentorial craniotomy [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2014, 42(5):1099-1100.
 - [12] 骆嘉华. 吗啡足三里穴位注射治疗重度癌痛的临床观察[J]. 中国民族民间医药,2016,25(17):113-115.
 - [13] 陈毓雯,徐静,杨丽华. 耳穴贴压结合时间疗法干预胃癌疼痛的效果评价[J]. 护理研究,2017,31(4):471-473.
 - [14] YEH CH. Pilot Randomized controlled trial of auricular point acupressure to manage aymptom clusters of pain, fatigue, and disturbed sleep in breast cancer patients[J]. Cancer nursing, 2016, 39(5):402-410.
 - [15] 王芳,胡岗,林麟,等. 腕踝针治疗癌症疼痛效果观察[J]. 人民军医,2017,60(1):56-57.
 - [16] ZENG K. Wrist - ankle acupuncture for pain after transcatheter arterial chemoembolization in patients with liver cancer: a randomized controlled trial [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2014,42(2):289-302.
 - [17] 顾亚娇,权春分,陈欣菊. 针刺联合消癌痛贴治疗瘀血停滞型癌性疼痛临床研究[J]. 中医学报,2017,32(12):2307-2310.
 - [18] XIAO YH. Acupuncture combined with methylcobalamin for the treatment of chemotherapy - induced peripheral neuropathy in patients with multiple myeloma [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1):40.
 - [19] TING BAO, MD. The analgesic effect of magnetic acupressure in cancer patients undergoing bone marrow aspiration and biopsy: A randomized, blinded, controlled trial [J]. Journal of pain and symptom management, 2011,41(6):995-1002.
 - [20] DENG G. Randomized controlled trial of a special acupuncture technique for pain after thoracotomy[J]. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2008,136(6):1464-1465.
 - [21] PATRICIA SANTOANTIOA GIRON. Effectiveness of acupuncture in rehabilitation of physical and functional disorders of women undergoing breast cancer surgery [J]. Support Care Cancer, 2016,24(6):2491-2496.
 - [22] FAN XN. Dynamic observation on therapeutic features of thalamic pain by mind calming, blood activating and pain relief acupuncture and carbamazepine[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional & Western Medline, 2011,31(6):741-744.
 - [23] 许晓洲. 针灸治疗恶性肿瘤的临床研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育,2016,14(7):146-148.
 - [24] THOMPSON LM. Patient - reported outcomes of acupuncture for symptom control in cancer[J]. Journal of acupuncture and meridarian studies, 2015,8(3):127-133.
 - [25] DENG G. A phase II, randomized, controlled trial of acupuncture for reduction of Postcolectomy Ileus[J]. Annals of Surgical Oncology, 2013,20(4):1164-9.
 - [26] EDUARDO D' ALESSANDRO. Evaluation of acupuncture for cancer symptoms in a cancer institute in Brazil[J]. Acupuncture in Medicine, 2013(31):23-26.

(收稿日期:2019-07-22)

(上接第162页)

- [4] SÁNCHEZ - LOZADA LG. The Pathophysiology of Uric Acid on Renal Diseases[J]. Contrib Nephrolo, 2018,192:17-24.
- [5] 于雪峰,李登宇,潘志华,等. 高嘌呤饮食联合尿酸酶抑制制备大鼠高尿酸血症肾损害模型[J]. 中华中医药学刊,2010,28(8):1573-1575.
- [6] 张知贵,杨华. 山楂叶总黄酮对高尿酸血症大鼠血尿酸及血管内皮细胞功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):259-261.
- [7] 刘贺,李志刚,张培影. 黄芪保心汤治疗慢性心力衰竭合并高尿酸血症临床观察[J]. 中国中医急症,2017,26(9):1651-1654.
- [8] 张毕明,肖帅,吴意. 胱抑素 C 诊断早期急性肾损伤价值的 Meta 分析[J]. 检验医学与临床,2018,15(23):3485-3487,3491.
- [9] YOU JIN CHOI, YUJIN YOON, KANG YI LEE, et al. Uric acid induces endothelial dysfunction by vascular insulin resistance associated with the impairment of nitric oxide synthesis[J]. FASEB J, 2014,28(7):3197-3204.
- [10] GERSCH C, PALII SP, KIM KM, et al. Inactivation of nitric oxide by uric acid[J]. Nucleotides Nucleotides Nucleic Acids, 2008,27(8):967-978.
- [11] AHN SO, OHTOMO S, KIYOKAWA J, et al. Stronger uicosuric effects of the novel selective URAT1 Inhibitor UR - 1102 lowered plasma urate in tufted capuchin monkeys to a greater extent than benzbromarone[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2016,357(1):157-166.
- [12] ZHOU YL, ZHANG XG, LI C, et al. Research on the pharmacodynamics and mechanism of fraxini cortex on hyperuricemia based on the regulation of URAT1 and GLUT9[J]. Biomed Pharmacother, 2018,106:434-442.

(收稿日期:2019-10-17)