

金雀花根水提物和乙醇提取物对小鼠高尿酸血症的影响[△]

赵俊杰^{1,2*}, 张金娟³, 张春雷¹, 朱勤凤¹, 廖尚高^{1#} (1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学附属医院药剂科, 贵阳 550002; 3. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)14-1694-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.14.06



摘要 目的 探讨金雀花根水提物(WCS)和乙醇提取物(ECS)对小鼠高尿酸血症(HUA)的影响。方法 将昆明种小鼠随机分为正常对照组、模型组、别嘌醇组(阳性对照, 5 mg/kg)、苯溴马隆组(阳性对照, 7.8 mg/kg)和WCS低、中、高剂量组(38、75、150 mg/kg)以及ECS低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg), 每组10只。除正常对照组外, 其余小鼠连续7 d腹腔注射氧嗪酸钾联合灌胃次黄嘌呤建立HUA模型。于建模第3天, 各给药组小鼠灌胃相应药物, 正常对照组和模型组灌胃等体积生理盐水, 每日1次, 连续5 d。称定给药期间小鼠的体质量; 末次给药1 h后, 计算肝、肾、脾的脏器指数, 测定血清尿酸(SUA)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCR)含量以及血清和肝组织中黄嘌呤氧化酶(XOD)活性; 检测肝组织中XOD mRNA和蛋白的相对表达量以及肾组织中葡萄糖转运蛋白9(GLUT9)、尿酸转运蛋白1(URAT1)、有机阴离子转运蛋白1(OAT1)的相对表达量; 观察肾脏组织的病理变化。**结果** 各组小鼠肝脏指数和脾脏指数差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常对照组比较, 除别嘌醇组外的各给药组小鼠的体质量和BUN、SCR含量差异无统计学意义($P>0.05$); 模型组和别嘌醇组小鼠的肾脏指数、SUA含量均显著升高($P<0.05$); 模型组小鼠血清和肝组织中XOD活性、肝组织中XOD mRNA和蛋白的相对表达量、肾组织中GLUT9和URAT1蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.05$), 肾组织中OAT1蛋白的相对表达量显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, WCS和ECS各剂量组小鼠的肾脏指数均显著降低($P<0.05$), 肾组织病理损伤明显改善; 各给药组小鼠的SUA含量、血清和肝组织中XOD活性、肝组织中XOD mRNA和蛋白的相对表达量、肾组织中URAT1蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.05$); 苯溴马隆组和ECS高剂量组小鼠肾组织中GLUT9蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.05$); 苯溴马隆组和WCS低、高剂量组以及ECS低剂量组小鼠肾组织中OAT1蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。**结论** WCS和ECS能够显著降低HUA模型小鼠SUA含量, 改善其肾脏的病理状态, 其作用机制可能与抑制XOD活性和尿酸重吸收、下调XOD蛋白和mRNA表达有关。

关键词 金雀花根; 高尿酸血症; 水提物; 乙醇提取物; 黄嘌呤氧化酶; 尿酸转运体; 肌酐

Effects of water extract and ethanol extract from the root of *Caragana sinica* on hyperuricemia in mice

ZHAO Junjie^{1,2}, ZHANG Jinjuan³, ZHANG Chunlei¹, ZHU Qinfeng¹, LIAO Shanggao¹ (1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550002, China; 3. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of water extract (WCS) and ethanol extract (ECS) from the root of *Caragana sinica* on hyperuricemia (HUA) in mice. **METHODS** Kunming mice were randomly divided into normal control group, model group, allopurinol group (positive control, 5 mg/kg), benzbromarone group (positive control, 7.8 mg/kg), WCS low-dose, medium-dose and high-dose groups (38, 75, 150 mg/kg), ECS low-dose, medium-dose and high-dose groups (50, 100, 200 mg/kg), with 10 mice in each group. Except for the normal control group, the other mice were given potassium oxazinate intraperitoneally and hypoxanthine intragastrically for consecutive 7 d to establish HUA model. On the third day of modeling, mice in each administration group were given corresponding drugs intragastrically, and normal control group and model group were given equal volume of normal saline once a day for 5 consecutive days. The body weight of mice were weighted during administration; one hour after the last administration, the organ indexes of liver, kidney and spleen were calculated; the contents of serum uric acid (SUA), blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCR); the activity of xanthine oxidase (XOD) in serum and liver tissue were determined. Relative mRNA and protein expressions of XOD in liver tissue, relative expressions of GLUT9, URAT1 and OAT1 in renal tissue were all detected; and the pathological changes of renal tissue were observed. **RESULTS** There were no significant differences in liver index and spleen index in each group ($P>0.05$). Compared with normal control group, except for allopurinol group, there were no significant differences in the body weight and the contents of BUN and SCR in mice of other administration groups ($P>0.05$); the renal index and SUA content of mice in the model group and

[△] **基金项目** 国家自然科学基金资助项目(No.81860690); 贵州省高层次创新型百层次人才项目(No.黔科合平台人才[2020]6011); 贵州省中药、民族药活性物质筛选新技术开发应用科技创新人才团队项目(No.黔科合平台人才[2020]5006)

* **第一作者** 主管药师, 硕士研究生。研究方向: 药效物质基础及作用机制。E-mail: 83316075@qq.com

通信作者 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中草药药效物质基础及药物开发。E-mail: lshangg@163.com

allopurinol group were significantly increased ($P<0.05$); in the model group, the XOD activity in serum and liver tissue, the relative mRNA and protein expression of XOD in liver tissue, the relative expressions of GLUT9 and URAT1 protein in renal tissue were significantly increased ($P<0.05$), and the relative expression of OAT1 protein in renal tissue was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with model group, renal indexes of mice were decreased significantly in WCS and ECS groups ($P<0.05$), and the pathological damage of renal tissue was significantly improved; SUA content, XOD activity in serum and liver tissue, the relative mRNA and protein expression of XOD in liver tissue, and the relative expression of URAT1 protein in renal tissue were decreased significantly in administration groups ($P<0.05$). The relative expression of GLUT9 protein in renal tissue of mice in benzbromarone group and ECS high-dose group decreased significantly ($P<0.05$); relative expression of OAT1 protein in renal tissue of mice in benzbromarone group, WCS low-dose and high-dose groups, ECS low-dose group were increased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** WCS and ECS can significantly decrease the contents of SUA in HUA model mice, and improve pathological state of renal tissue, the mechanism of which may be associated with inhibiting XOD activity and uric acid reabsorption, and down-regulating protein and mRNA expression of XOD.

KEYWORDS root of *Caragana sinica*; hyperuricemia; water extract; ethanol extract; xanthine oxidase; uric acid transporter; creatinine

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是由于体内尿酸分泌过多或排泄不足而引起的, 现已证实是引起痛风、肾功能不全、高血压、高脂血症、糖尿病和肥胖等症的关键因素^[1]。早期预防和治疗HUA对上述疾病的预防具有重要意义。尿酸是黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)氧化黄嘌呤和次黄嘌呤产生的代谢产物。XOD长期过量产生尿酸和/或肾脏排泄尿酸不足可能导致HUA和尿酸钠晶体沉积。目前治疗HUA的化学药主要有2类:一类是减少尿酸过量生成类药物,如别嘌醇和非布索坦等;另一类是促进尿酸排泄类药物,如苯溴马隆和丙磺舒等^[2]。这2类药物虽疗效尚可,但靶点较单一、副作用较大,患者的耐受性、依从性均较差^[3-4]。

金雀花根又名锦鸡儿根、阳雀花根,是豆科植物锦鸡儿 *Caragana sinica* (Buc'hoz)Rehd.的根,主要分布在我国河北、陕西、江苏、四川、云南等地,具有补肺健脾、活血祛风的功效,临床上主要用于风湿骨痛、痛风、肺虚、久咳等症的治疗^[5]。本课题组前期考察了27种中草药的醇提物和水提物对XOD的抑制活性,发现金雀花根水提物(water extract of *C. sinica*, WCS)及乙醇提取物(ethanol extract of *C. sinica*, ECS)具有显著的XOD抑制活性^[6]。本研究采用氧嗉酸钾联合次黄嘌呤建立HUA小鼠模型,研究WCS及ECS对HUA模型小鼠尿酸生成和排泄的影响,初步探讨其可能机制,以期为抗HUA药物的研发提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ELX815型全波长扫描式多功能读数仪(美国Bio-Tek公司)、5200型全自动化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司)、P50002F型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)、BS223S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、KQ5200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、ZYCGF-

II-10T型超纯水机(四川卓越水处理设备有限公司)、TGL16M型台式低速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)、DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂)、ECLIPSE E100型正置光学显微镜(日本Nikon公司)等。

1.2 主要药品与试剂

金雀花根药材于2020年9月采自河北省保定市定州市,经贵州医科大学标本馆馆长龙庆德教授鉴定为豆科植物锦鸡儿 *C. sinica* (Buc'hoz)Rehd.的根,标本存放在贵州医科大学天然药物化学教研室(标本号202009)。别嘌醇、苯溴马隆、次黄嘌呤、氧嗉酸钾(批号分别为L2001089、L2010564、L2007066、D0901A,纯度均大于98%)和高效RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳制备试剂盒、彩虹180广谱蛋白Marker、HRP Substrate Peroxide Solution超敏发光液、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(批号分别为R0010、PC0020、P1200、PR1910、PE0010、G202117)均购自北京索莱宝科技有限公司;XOD测定试剂盒(比色法)、血清尿酸(serum uric acid, SUA)测定试剂盒(微板法)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)测定试剂盒(微板法)、肌酐测定试剂盒(微板法)(批号分别为A002-1-1、20191011、20190907、20190916)均购自南京建成生物工程研究所;小鼠源葡萄糖转运蛋白9(glucose transporter 9, GLUT9)、尿酸盐转运蛋白1(urate transporter 1, URAT1)、有机阴离子转运蛋白1(organic anion transporter 1, OAT1)单克隆抗体(批号分别为14937-1-AP、NBP1-05054、ab135924)均购自上海优宁维生物科技股份有限公司;小鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(批号T0004)购自美国Affinity公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(批号P2938)购自德国Merck公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 动物

SPF级雄性昆明种小鼠,100只,体质量18~22 g,由贵州医科大学实验动物中心提供,生产许可证号为SCXK(黔)2018-0001。小鼠饲养环境通风良好,温度18~25℃,相对湿度40%~70%,12 h/12 h光照昼夜循环。本实验通过贵州医科大学实验动物伦理委员会审批(编号2000069)。

2 方法

2.1 WCS与ECS的制备

分别称取金雀花根2 kg,加16 L水煎煮提取或16 L 75%乙醇回流提取,均提取2 h,再同法提取1 h,过滤,合并相应的滤液,减压浓缩为浸膏,得WCS 400 g、ECS 519 g,备用。

2.2 分组、建模与给药

小鼠适应性饲养1周后,按体质量随机分为正常对照组、模型组、别嘌醇组(阳性对照,5 mg/kg^[7])、苯溴马隆组(阳性对照,7.8 mg/kg^[8])和WCS低、中、高剂量组(38、75、150 mg/kg,根据临床常用剂量的0.5、1、2倍换算)以及ECS低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg,根据临床常用剂量的0.5、1、2倍换算),每组10只。除正常对照组小鼠腹腔注射和灌胃等体积生理盐水外,其余各组小鼠于每天早上9:00腹腔注射氧嗪酸钾100 mg/kg联合灌胃次黄嘌呤500 mg/kg,连续7 d,建立HUA模型^[7]。从建模第3天起,各给药组小鼠于建模给药后1 h分别灌胃相应药物,正常对照组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水,每日1次,连续5 d。

2.3 取样与体质量、脏器指数分析

分别称定各组小鼠建模给药第1、3、5、7天的体质量。末次给药前,禁食不禁水24 h,末次给药1 h后小鼠眼眶取血,室温静置2 h,以3 500 r/min离心15 min,取血清,于-20℃中保存备用。采血后脱颈椎处死小鼠,剖取内脏,称定质量,计算肝、肾和脾的脏器指数[脏器指数=脏器质量(g)/体质量(g)×100%]。然后快速将一部分肾组织固定于4%多聚甲醛中保存备用,另一部分肾组织与肝组织于-80℃中保存备用。

2.4 血清中生化指标和肝组织中XOD活性检测

取各组小鼠血清适量,按照试剂盒说明书操作,检测XOD活性和SUA、BUN、血肌酐(serum creatinine, SCR)含量。另取各组小鼠肝组织100 mg,加入生理盐水制成10%的匀浆液,以2 500 r/min离心10 min,取上清液,按照试剂盒说明书操作,检测XOD活性。

2.5 肝组织中XOD mRNA表达检测

采用实时定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)法检测。取各组3只小鼠的冻存肝组织,研磨后,转移至1.5 mL预冷的EP管中,裂解组织后,抽

提RNA,逆转录合成cDNA,然后取1 μL逆转录产物进行PCR检测。PCR的反应体系为Takara SYBR Premix Ex Tap 10 μL,上下游引物(20 μmol/L)各0.2 μL, cDNA 2 μL,用ddH₂O补至20 μL。反应条件如下:95℃预变性2 min;95℃变性5 s,55℃退火30 s,72℃延伸60 s,共40个循环。以GAPDH为参照,采用2^{-ΔΔCt}法计算各组小鼠肝组织中XOD mRNA的相对表达量。引物序列和产物长度见表1。

表1 PCR引物序列和产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
XOD	上游引物:5'-GGAGACAGTAACGCCAACAGC-3'	219
	下游引物:5'-CCTCACGGACCAGGATTACAG-3'	
GAPDH	上游引物:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	219
	下游引物:5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	

2.6 肝组织中XOD蛋白和肾组织中GLUT9、URAT1、OAT1蛋白表达检测

采用Western blot法检测。分别称取各组3只小鼠的冻存肝组织与肾组织样本各100 mg,加RIPA组织裂解液1 mL,于冰上研磨成匀浆,于4℃以12 000 r/min离心10 min,取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。取蛋白终浓度为1 μg/μL的样本上样15 μL,加入5×蛋白上样缓冲液,于100℃加热5 min变性,然后进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,80 V电泳至Marker红色条带出现,转换电压120 V至电泳结束。采用湿转法将蛋白转到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉将膜在室温下封闭1.5 h,用TBST缓冲液清洗3次,每次10 min,分别加入XOD、GLUT9、URAT1、OAT1、GAPDH一抗(目标蛋白稀释比例均为1:1 000,内参蛋白稀释比例均为1:3 000),4℃孵育过夜;用TBST缓冲液清洗3次,每次10 min,加入二抗(稀释比例为1:3 000),室温孵育1 h,用TBST缓冲液清洗3次,每次10 min,显影成像。采用Image J 1.8.0软件分析条带的灰度值,以目标蛋白灰度值与内参蛋白(GAPDH)灰度值的比值评价蛋白的相对表达量。

2.7 肾组织病理学观察

取4%多聚甲醛固定的肾组织,乙醇脱水、石蜡包埋、切片,经苏木精-伊红染色后,于正置光学显微镜下观察肾组织的病理学变化。

2.8 统计学分析

所有数据均用SPSS 19.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 WCS和ECS对HUA模型小鼠体质量的影响

如表2所示,与正常对照组比较,别嘌醇组小鼠建模给药第3、5、7天的体质量均显著降低($P<0.01$),其余各

给药组小鼠体质量的差异无统计学意义($P>0.05$),表明别嘌醇可抑制小鼠体质量的自然增长,WCS和ECS对小鼠体质量的生长没有影响。

表2 WCS和ECS对HUA模型小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=10, g$)

组别	建模给药第1天	建模给药第3天	建模给药第5天	建模给药第7天
正常对照组	31.13±1.67	33.00±1.38	34.63±1.23	34.50±0.77
模型组	30.13±1.00	30.13±1.24	31.13±1.00	32.00±1.15
别嘌醇组	30.38±0.98	29.38±1.32 ^a	30.25±1.39 ^a	29.75±1.54 ^a
苯溴马隆组	30.75±0.99	30.38±1.23	31.13±1.20	31.63±1.19
WCS低剂量组	30.63±1.22	30.38±1.16	32.25±0.92	32.38±0.80
WCS中剂量组	30.25±1.22	30.38±1.29	31.50±1.08	32.63±1.22
WCS高剂量组	30.88±0.63	30.88±0.63	31.00±1.16	32.00±0.92
ECS低剂量组	30.50±1.33	30.88±1.54	32.25±1.03	33.25±1.22
ECS中剂量组	31.00±1.26	30.63±1.14	32.25±1.14	32.50±1.01
ECS高剂量组	30.63±1.69	31.50±1.28	32.13±1.14	33.38±1.23

a: 与正常对照组比较, $P<0.05$

3.2 WCS和ECS对HUA模型小鼠脏器指数的影响

如表3所示,各组小鼠的肝脏指数和脾脏指数的差异均无统计学意义($P>0.05$),表明WCS和ECS对小鼠肝脏和脾脏无明显影响。与正常对照组比较,模型组和别嘌醇组小鼠的肾脏指数均显著升高($P<0.05$),表明建模剂(氧嗉酸钾、次黄嘌呤)以及阳性药物别嘌醇对小鼠肾脏有毒副作用。与模型组比较,WCS和ECS各剂量组小鼠的肾脏指数均显著降低($P<0.05$),表明WCS和ECS能减轻由建模剂引起的肾损伤。

表3 WCS和ECS对HUA模型小鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10, \%$)

组别	肝脏指数	肾脏指数	脾脏指数
正常对照组	5.19±0.22	1.26±0.05	0.41±0.03
模型组	5.13±0.25	1.45±0.04 ^a	0.42±0.02
别嘌醇组	4.95±0.17	1.53±0.10 ^a	0.47±0.08
苯溴马隆组	5.28±0.19	1.38±0.11	0.46±0.03
WCS低剂量组	5.18±0.06	1.33±0.05 ^b	0.38±0.02
WCS中剂量组	5.10±0.29	1.26±0.07 ^b	0.46±0.07
WCS高剂量组	5.06±0.18	1.29±0.05 ^b	0.51±0.05
ECS低剂量组	5.56±0.11	1.30±0.03 ^b	0.49±0.08
ECS中剂量组	5.29±0.14	1.32±0.06 ^b	0.45±0.04
ECS高剂量组	4.90±0.26	1.29±0.05 ^b	0.42±0.02

a: 与正常对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

3.3 WCS和ECS对HUA模型小鼠SUA、BUN、SCR含量的影响

如表4所示,与正常对照组比较,模型组小鼠SUA含量显著升高($P<0.05$),表明HUA小鼠模型建立成功。与模型组比较,各给药组小鼠SUA含量均显著降低($P<0.05$),表明WCS和ECS均具有抗HUA活性。与正常对照组比较,别嘌醇组小鼠BUN、SCR含量均显著升高($P<0.05$),其余各给药组小鼠BUN、SCR含量差异均无统计学意义($P>0.05$),表明别嘌醇可能会损伤肾功能,WCS和ECS对小鼠肾功能无明显影响。

表4 WCS和ECS对HUA模型小鼠SUA、BUN、SCR含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SUA/($\mu\text{mol/L}$)	BUN/(mmol/L)	SCR/($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	151.00±9.88	8.00±1.09	57.93±6.96
模型组	262.70±13.63 ^a	6.85±0.75	59.98±4.86
别嘌醇组	84.26±10.50 ^{ab}	13.04±0.98 ^a	86.57±4.07 ^a
苯溴马隆组	172.90±24.54 ^b	9.39±0.88	57.38±6.27
WCS低剂量组	187.30±16.47 ^b	8.32±0.57	58.44±1.87
WCS中剂量组	171.60±14.48 ^b	9.28±0.87	51.52±2.92
WCS高剂量组	136.40±9.47 ^b	9.26±0.97	67.70±3.09
ECS低剂量组	193.70±22.56 ^b	9.92±0.37	60.99±3.60
ECS中剂量组	178.20±5.00 ^b	9.00±0.61	63.36±2.74
ECS高剂量组	142.80±13.67 ^b	8.83±0.52	70.37±4.00

a: 与正常对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

3.4 WCS和ECS对HUA模型小鼠血清和肝组织中XOD活性的影响

如表5所示,与正常对照组比较,模型组小鼠血清和肝组织中XOD活性均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠血清、肝组织中XOD活性均显著降低($P<0.05$),表明WCS和ECS能抑制HUA模型小鼠血清和肝组织中XOD活性。

表5 WCS和ECS对HUA模型小鼠血清和肝组织中XOD活性的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	血清中XOD活性/(U/L)	肝组织中XOD活性/(U/g pro)
正常对照组	6.94±0.63	18.20±1.58
模型组	10.97±0.79 ^a	35.65±2.38 ^a
别嘌醇组	5.57±0.79 ^b	13.55±1.82 ^b
苯溴马隆组	9.58±1.63 ^b	24.94±3.77 ^b
WCS低剂量组	9.19±0.37 ^b	23.55±1.12 ^b
WCS中剂量组	9.00±0.70 ^b	20.31±2.86 ^b
WCS高剂量组	8.46±0.45 ^b	18.40±1.90 ^b
ECS低剂量组	10.80±0.85 ^b	27.69±3.62 ^b
ECS中剂量组	9.14±0.50 ^b	27.41±1.61 ^b
ECS高剂量组	8.82±0.69 ^b	19.85±2.76 ^b

a: 与正常对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

3.5 WCS和ECS对HUA模型小鼠肝组织中XOD mRNA和蛋白表达的影响

如图1和表6所示,与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中XOD mRNA和蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠肝组织中XOD mRNA、蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.05$),表明WCS和ECS可能通过下调XOD的表达来发挥抗HUA作用。

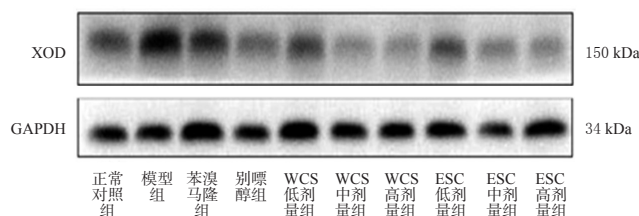


图1 各组小鼠肝组织中XOD蛋白表达的电泳图

表6 WCS和ECS对HUA模型小鼠肝组织中XOD mRNA和蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	XOD mRNA	XOD蛋白	组别	XOD mRNA	XOD蛋白
正常对照组	1.02 ± 0.15	0.88 ± 0.06	WCS中剂量组	1.41 ± 0.32 ^b	0.86 ± 0.07 ^b
模型组	2.78 ± 0.28 ^a	1.45 ± 0.07 ^a	WCS高剂量组	1.11 ± 0.32 ^b	0.83 ± 0.07 ^b
别嘌醇组	1.29 ± 0.32 ^b	0.81 ± 0.07 ^b	ECS低剂量组	1.68 ± 0.19 ^b	0.92 ± 0.07 ^b
苯溴马隆组	2.27 ± 0.15 ^b	1.23 ± 0.06 ^b	ECS中剂量组	1.36 ± 0.29 ^b	0.91 ± 0.09 ^b
WCS低剂量组	1.75 ± 0.21 ^b	1.26 ± 0.05 ^b	ECS高剂量组	1.27 ± 0.23 ^b	0.82 ± 0.08 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$

3.6 WCS和ECS对HUA模型小鼠肾组织中GLUT9、URAT1、OAT1蛋白表达的影响

如图2和表7所示,与正常对照组比较,模型组小鼠肾组织中GLUT9、URAT1蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$),OAT1蛋白的相对表达量显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,苯溴马隆组和ECS高剂量组小鼠肾组织中GLUT9蛋白的相对表达量以及各给药组小鼠肾组织中URAT1蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$),苯溴马隆组和WCS低、高剂量组以及ECS低剂量组小鼠肾组织中OAT1蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$),表明WCS和ECS抗HUA作用的机制可能与下调URAT1表达有关。

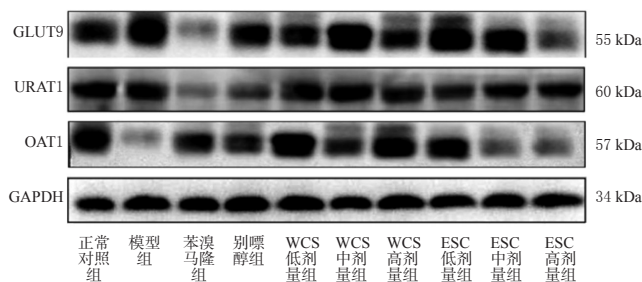


图2 各组小鼠肾组织中GLUT9、URAT1、OAT1蛋白表达的电泳图

表7 WCS和ECS对HUA模型小鼠肾组织中GLUT9、URAT1、OAT1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GLUT9	URAT1	OAT1
正常对照组	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02
模型组	0.59 ± 0.01 ^a	0.46 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.01 ^a
别嘌醇组	0.49 ± 0.01	0.39 ± 0.01 ^b	0.30 ± 0.02
苯溴马隆组	0.31 ± 0.01 ^b	0.37 ± 0.01 ^b	0.33 ± 0.03 ^b
WCS低剂量组	0.48 ± 0.01	0.37 ± 0.01 ^b	0.37 ± 0.01 ^b
WCS中剂量组	0.60 ± 0.02	0.34 ± 0.03 ^b	0.28 ± 0.01
WCS高剂量组	0.47 ± 0.02	0.38 ± 0.01 ^b	0.35 ± 0.01 ^b
ECS低剂量组	0.54 ± 0.02	0.37 ± 0.02 ^b	0.32 ± 0.01 ^b
ECS中剂量组	0.54 ± 0.01	0.37 ± 0.03 ^b	0.23 ± 0.01
ECS高剂量组	0.35 ± 0.01 ^b	0.41 ± 0.01 ^b	0.24 ± 0.01

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$

3.7 WCS和ECS对HUA模型小鼠肾组织病理变化的影响

如图3所示,正常对照组小鼠肾小管边界清晰,上皮细胞排列整齐;模型组小鼠出现肾小管间质病变,以肾小管扩张和轻度肾水肿为特征;别嘌醇组小鼠出现重度

肾水肿和肾小管严重扩张;苯溴马隆组小鼠出现肾小管轻度扩张和轻度肾水肿。与模型组小鼠比较,WCS和ECS各剂量组小鼠的肾小管扩张均有所减轻,肾水肿程度均明显减轻,其中WCS高剂量组和ECS高剂量组小鼠已恢复到正常水平,表明WCS和ECS可在不同程度上改善HUA模型小鼠的肾损伤状态。

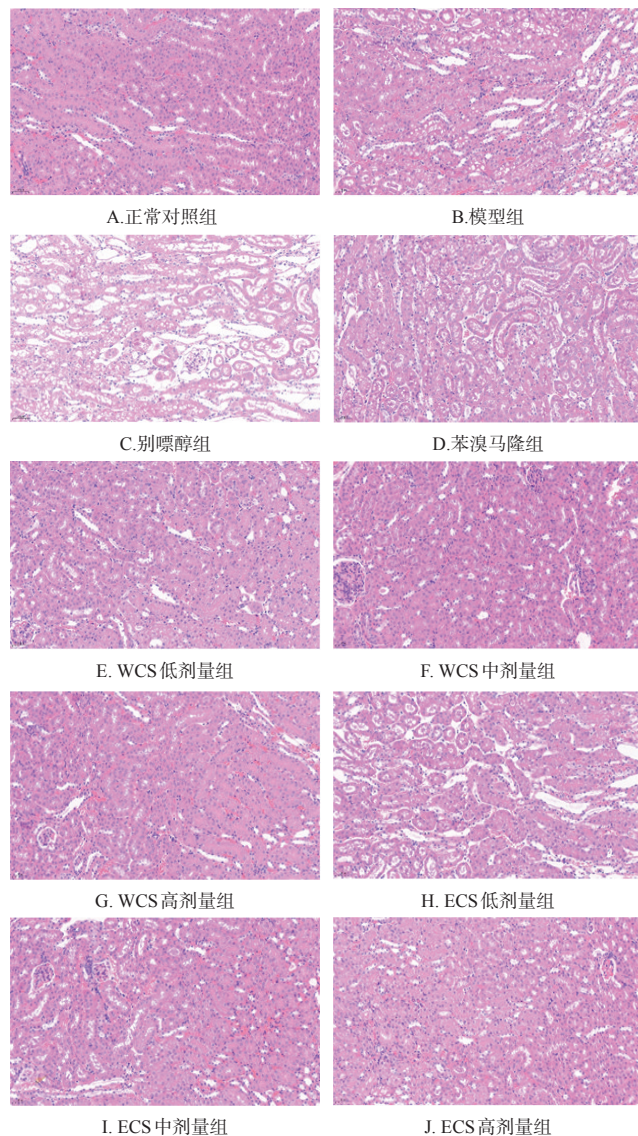


图3 WCS和ECS对HUA模型小鼠肾组织病理变化的影响($\times 200$)

4 讨论

氧嗪酸钾是选择性竞争性尿酸酶抑制剂,次黄嘌呤是尿酸代谢产物的前体。已有研究报道,上述2种药物联合使用可使小鼠体内尿酸含量上升并减少尿酸的排泄量^[9]。本研究通过腹腔注射氧嗪酸钾联合灌胃次黄嘌呤成功建立了HUA小鼠模型。

XOD是一种分布于脏器和血管的钼羟化酶,为还原酶的一种,能催化次黄嘌呤与黄嘌呤产生尿酸。当嘌呤代谢紊乱时,可使患者血清中XOD水平增加,进而导致

体内尿酸增加。正常机体中,尿酸多从肾脏排泄;当尿酸水平过高或肾功能低下时,易导致尿酸积聚在各脏腑和关节中,引发HUA或痛风性关节炎,因此抑制XOD活性或改善肾功能是治疗HUA的主要途径^[10]。本研究结果显示,与模型组比较,WCS和ECS各剂量组小鼠体内的SUA含量、XOD活性以及XOD mRNA和蛋白的相对表达量均明显降低,表明WCS和ECS通过抑制XOD的活性,下调其mRNA和蛋白的表达,从而降低HUA模型小鼠体内SUA含量。

肾脏指数、BUN和SCR是检测肾功能的灵敏指标^[11]。本研究结果显示,与模型组比较,WCS和ECS可降低小鼠肾脏指数和血清中SUA含量,改善肾小管间质病变,减轻肾小管扩张和肾水肿程度,表明WCS和ECS对HUA模型小鼠肾功能损伤具有一定的改善作用。

据研究报道,尿酸转运蛋白是促尿酸排泄药物的主要作用靶点,临床上约90%的HUA是由肾尿酸排泄不足而产生^[12]。GLUT9与URAT1是尿酸盐在肾小管重吸收的主要转运体;OAT1是尿酸排泄的转运体,其作用是将尿酸从血液吸收到细胞内肾小管细胞^[13-14]。抑制URAT1和GLUT9转运体的表达以及促进OAT1转运体的表达是降低体内尿酸的有效方式^[15-16]。本研究结果显示,与模型组比较,WCS和ECS对HUA模型小鼠肾组织中OAT1和GLUT9的表达影响不显著,但可明显下调URAT1的表达,表明WCS和ECS可能是通过减少肾脏对尿酸的重吸收来调节HUA模型小鼠体内的尿酸水平。

综上所述,WCS和ECS能够显著降低HUA模型小鼠SUA含量,改善其肾脏的病理状态,其作用机制可能与抑制XOD活性和尿酸重吸收、下调XOD蛋白和mRNA表达有关。本研究仅为WCS和ECS对HUA模型小鼠药效机制的初步验证,HUA的病理机制还与炎症因子、免疫等因素密切相关,本课题组将继续探究WCS和ECS对HUA干预的机制,为临床寻找新型降尿酸药提供有效的数据支撑。

参考文献

[1] STRILCHUK L, FOGACCI F, CICERO A F. Safety and tolerability of available urate-lowering drugs: a critical review[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2019, 18(4):261-271.

[2] PASCART T, RICHETTE P. Investigational drugs for hyperuricemia, an update on recent developments[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27(5):437-444.

[3] GRASSI D, PONTREMOLI R, BOCALE R, et al. Therapeutic approaches to chronic hyperuricemia and gout[J]. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2014, 21(4):243-250.

[4] KHANNA D, FITZGERALD J D, KHANNA P P, et al.

2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64(10):1431-1446.

[5] 贾月梅, 潘兰, 贾新岳, 等. 刺叶锦鸡儿根与地上部分化学成分初步研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2016, 39(10):1219-1222, 1225.

[6] 李芮, 马良会, 王栋, 等. 9种通络祛风中药提取物对黄嘌呤氧化酶的体外抑制活性研究[J]. *中国药房*, 2020, 31(6):677-682.

[7] MENG Z Q, YAN Y X, TANG Z H, et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of Rhein in hyperuricemic mice[J]. *Planta Med*, 2015, 81(4):279-285.

[8] PASCART T, RICHETTE P. Current and future therapies for gout[J]. *Expert Opin Pharmacol*, 2017, 18(12):1201-1213.

[9] YONG T Q, ZHANG M L, CHEN D L, et al. Actions of water extract from *Cordyceps militaris* in hyperuricemic mice induced by potassium oxonate combined with hypoxanthine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194:403-411.

[10] ZHANG C L, ZHANG J J, ZHU Q F, et al. Antihyperuricemia and antigouty arthritis effects of *Persicaria capitata* herba in mice[J]. *Phytomedicine*, 2021, 93:153765-153773.

[11] HORIUCHI H, OTA M, NISHIMURA S, et al. Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice[J]. *Life Sci*, 2000, 66(21):2051-2070.

[12] ICHIDA K, MATSUO H, TAKADA T, et al. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia[J]. *Nat Commun*, 2012, 3:764.

[13] WU X H, RUAN J L, ZHANG J, et al. Pallidifloside D, a saponin glycoside constituent from *Smilax riparia*, resist to hyperuricemia based on URAT1 and GLUT9 in hyperuricemic mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157:201-205.

[14] NIGAM S K, BUSH K T, BHATNAGAR V. Drug and toxicant handling by the OAT organic anion transporters in the kidney and other tissues[J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2007, 3(8):443-448.

[15] ANZAI N, JUTABHA P, ENDOU H. Renal solute transporters and their relevance to serum urate disorder[J]. *Curr Hypertens Rev*, 2010, 6(3):148-154.

[16] ENOMOTO A, KIMURA H, CHAIROUNGDU A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels[J]. *Nature*, 2002, 417(6887):447-452.

(收稿日期:2022-02-18 修回日期:2022-06-21)

(编辑:邹丽娟)