

吴门三黄汤对高尿酸血症大鼠黄嘌呤氧化酶活性及其蛋白表达的影响

马奇翰¹, 尤君怡¹, 梁国强²

1. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009; 2. 苏州市吴门医派研究院, 江苏 苏州 215003

[摘要] 目的: 观察吴门三黄汤对高尿酸血症 (Hyperuricemia, HUA) 大鼠血清尿酸 (Serum uric acid, SUA)、黄嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase, XO) 活性及肝脏中黄嘌呤脱氢酶 (Xanthine dehydrogenase, XDH) 蛋白表达水平的抑制作用。方法: 将 80 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、别嘌醇组和吴门三黄汤组, 每组 20 只。除空白组外以氧嗪酸钾制备 HUA 模型, 造模第 1 天开始给药, 别嘌醇组和吴门三黄汤组分别按 27 mg/kg 混悬液和含生药 6.3 g/kg 汤剂的剂量给药, 空白组和模型组给予等体积的双蒸水, 连续 28 天。分别于第 14 天、28 天各组随机取 10 只大鼠, 用酶联免疫吸附试验法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 SUA 含量及血清和肝脏组织中 XO 活性; 对肾脏进行组织病理学苏木精-伊红 (Hematoxylin-eosin staining, HE) 染色观察, 采用免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC) 法检测肝脏组织中 XDH 蛋白的表达。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠 14 天、28 天 SUA 及血清和肝脏组织中 XO 活性均显著升高, 肝脏组织中 XDH 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 肾脏组织功能损伤明显。与模型组比较, 别嘌醇组和吴门三黄汤组第 14 天、28 天 SUA 含量及血清和肝脏组织中 XO 活性显著降低, 肾脏组织 XDH 蛋白表达也同步降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 肾脏组织病变改善。结论: 吴门三黄汤可能通过调控 HUA 大鼠肝脏组织中 XDH 蛋白的正向表达, 来抑制 XO 的活性, 从而降低 SUA 及防止靶器官损害。

[关键词] 高尿酸血症 (HUA); 吴门三黄汤; 血清尿酸 (SUA); 黄嘌呤氧化酶 (XO); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 05-0031-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.05.008

Wumen Sanhuang Tang Has Effect on Activity and Protein Expression of Xanthine Oxidase in Rats with Hyperuricemia

MA Qihan, YOU Junyi, LIANG Guoqiang

Abstract: **Objective:** To observe the inhibition of Wumen Sanhuang tang on serum uric acid (SUA), the activity of xanthine oxidase (XO) and the protein expression level of xanthine dehydrogenase (XDH) in the liver in rats with hyperuricemia (HUA). **Methods:** A total of 80 SD rats were randomly divided into the blank group, the model group, the allopurinol group and the Wumen Sanhuang tang group, 20 rats in each group. Except for the blank group, HUA models were established by potassium oxonate. On the first day of modeling, the drugs began to be administered. The allopurinol group and the Wumen Sanhuang tang group were respectively administered with 27 mg/kg suspension and decoction containing crude drug of 6.3 g/kg, and the blank group and the model group were given double distilled water of equal volume. All groups were given continuous treatment of 28 days. Ten rats were randomly selected from each group respectively on the 14 and 28 day. The content of SUA and the activity of XO in serum and the liver tissue were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the kidneys were observed by histopathological hematoxylin-eosin staining (HE) and the protein expression of XDH in the liver tissue was observed by immunohistochemistry (IHC). **Results:** Compared with the blank group, the content of SUA and the activity of XO in serum and the liver tissue in the model group on the 14 and 28 day were significantly increased, and the protein expression of XDH in the liver tissue in the model group on the 14 and 28 day was significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the function of the kidney tissue was injured significantly. Compared with the model group, the content of SUA and the activity of XO in serum and the liver tissue in the allopurinol group and the Wumen Sanhuang tang group on the 14 and 28 day were significantly decreased, and the protein expression of XDH in the kidney tissue was decreased synchronously ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the pathological changes in the kidney were improved. **Conclusion:** Wumen Sanhuang tang may inhibit the activity of XO by regulating the positive protein expression of XDH in the

[收稿日期] 2018-10-23

[基金项目] 江苏省青年医学重点人才培养依托项目 (QNRC2016252); 江苏省苏州市产业技术创新项目 (SYSD2017127)

[作者简介] 马奇翰 (1977-), 男, 主任中医师, 研究方向: 中西医治疗脊柱和四肢骨折及骨关节炎等疾病。

[通信作者] 梁国强, E-mail: 616250366@qq.com.

liver tissue of HUA rats, thus reducing the content of SUA and preventing target organ damage.

Keywords: Hyperuricemia (HUA); Wumen Sanhuang tang; Serum uric acid (SUA); Xanthine oxidase (XO); Animal experiment; Rats

高尿酸血症(Hyperuricemia, HUA)由体内尿酸生成过多和(或)排泄过少所致,可分为原发性和继发性两大类,一般人都认为HUA是痛风的关键生化基础,殊不知只有5%~12%的HUA人群会转归为痛风。尿酸是嘌呤在人体的代谢终产物,高尿酸对人体多个组织器官都有危害性或潜在的风险^[1]。这种严重影响公共健康的疾病,其防治工作正逐步受到重视,对“HUA的正向转归”调控亦足以引起中医药人的高度关注。本研究在前期临床和实验研究的基础上,建立尿酸分解酶抑制剂诱导的HUA大鼠模型,以吴门医派验方“吴门三黄汤”进行干预和持续性转归效应观察^[2-3]。检测HUA大鼠黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XO)活性和肝组织中黄嘌呤脱氢酶(Xanthine dehydrogenase, XDH)蛋白的表达。探讨吴门三黄汤调控XDH蛋白表达、抑制XO活性的相关机制,为临床试验研究吴门三黄汤调控HUA正向转归提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级健康SD雄性大鼠80只,体质量(200±20)g,购于江苏省苏州市新区昭衍新药研究中心有限公司,动物许可证号:SCXK(苏)2013-0003。大鼠常规标准饲料喂养于苏州市吴门医派研究院基础实验室动物房,每天光暗各12h,室温控制在(24±2)℃,相对湿度40%~70%。

1.2 实验药物 炒黄柏、炒黄芩、熟地黄、生大黄、防己、土茯苓、山慈姑,以上中药饮片购自苏州市春晖堂药业有限公司;别嘌醇购自昆山龙灯瑞迪制药有限公司;氧嗪酸钾购自合肥博美生物科技有限责任公司。

1.3 试剂和仪器 血清尿酸(Serum uric acid, SUA)酶联免疫法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)测定试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司);XO ELISA测定试剂盒(上海邦奕生物技术有限公司);XDH抗体(Abcam公司);352型酶标仪(芬兰Labsystems Multiskan MS公司);CX41正置显微镜(OLYMPUS公司);恒温烘箱(上海恒一科学仪器有限公司);SQ2125石蜡切片机、PPTHK-21B摊片机(徕克公司);HI1210水浴锅(Leica公司);D5100数码相机(Nikon公司);Tanon-5200成像系统(Tanon公司)。

1.4 动物分组、造模及给药 80只SD大鼠随机取20只作为空白组,其余大鼠均造模,分为模型组、别嘌醇组(27 mg/kg)^[4]、吴门三黄汤组(根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算得出大鼠实验灌胃给药剂量为6.3 g/kg,以中药计)^[5],每组20只。参考文献[6]以10 mL/kg的剂量灌胃10 mg/mL的氧嗪酸钾溶液诱导HUA,每天上午1次,第14天为HUA效应对照模型,诱模剂停止持续至第28天实验结束为HUA转

归模型。别嘌醇组和吴门三黄汤组以10 mL/kg的体积分别灌胃2.7 mg/mL别嘌醇混悬液和含生药0.63 g/mL的吴门三黄汤,每天下午1次,空白组和模型组对应时间给予等体积双蒸水。第14天,每组随机取10只大鼠麻醉取材待测。继以诱模剂停止,所有受试药物继续干预至第28天后其余大鼠麻醉取材待测。

1.5 检测指标 实验第14天、28天,末次给药后2h,各組动物用戊巴比妥钠麻醉后,腹主动脉取血,分离血清,4℃,3 000 r/min离心10 min, -80℃保存待测,同步分离肾脏和肝脏组织。冰生理盐水洗净血液,滤纸吸干水分称重, PBS按1:5冰浴下匀浆,3 000 r/min离心5 min, -80℃保存待测,按ELISA试剂盒说明书测定SUA含量及血清和肝脏组织中XO活性。另每组随机取5个样本的部分肝脏组织用40 g/L多聚甲醛固定,免疫组化(Immunohistochemistry, IHC)法测定肝脏组织中XDH蛋白表达,每组随机取5张切片,每张切片随机取5个视野拍照,用成像系统进行半定量分析,结果以平均光密度值(IOD)×100表示;肾脏组织用40 g/L多聚甲醛固定,组织石蜡切片,HE染色,光学显微镜观察大鼠肾组织的病理改变及病理形态学变化。

1.6 统计学方法 采用统计软件SPSS20.0进行统计分析,定量数据用($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布资料用单因素方差分析检验,如不满足上述条件则用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠SUA含量及血清和肝组织XO活性检测结果比较 见表1。与空白组比较,模型组第14天和28天SUA含量及血清和肝组织中XO活性明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,别嘌醇组、吴门三黄汤组SUA含量及血清和肝组织中XO活性降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与别嘌醇组比较,第14天吴门三黄汤组SUA含量及血清和肝组织中XO活性高,其中SUA含量和肝组织中XO活性差异有统计学意义($P < 0.05$),第28天吴门三黄汤组SUA含量及血清和肝组织中XO活性高,仅SUA含量差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠肾组织病理形态学比较 见图1。HE染色结果显示,与空白组比较,模型组大鼠肾小管萎缩、扩张,小管上皮细胞坏死、脱落,肾间质炎性细胞浸润伴间质纤维化,肾小球系膜增生,炎症细胞浸润;与模型组比较,别嘌醇组大鼠肾小管可见中度扩张,肾间质可见炎性细胞浸润,可见一定量的胶原纤维;吴门三黄汤组大鼠肾小管轻度扩张,上皮细胞部分空泡变性,小管基膜完整,肾间质少量炎细胞浸润,少量胶原纤维,肾小球轻度硬化。

表1 各组大鼠 SUA 含量及血清和肝组织 XO 活性检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SUA($\mu\text{mol/L}$)		血清 XO 活性(U/L)		肝组织 XO 活性(U/L)	
		14 d	28 d	14 d	28 d	14 d	28 d
空白组	10	100.2 ± 9.8	99.1 ± 10.4	18.5 ± 1.2	19.3 ± 2.2	2.10 ± 0.34	2.18 ± 0.27
模型组	10	226.4 ± 23.6 ^①	216.1 ± 15.4 ^①	30.1 ± 3.0 ^①	27.1 ± 2.6 ^①	4.54 ± 0.41 ^①	4.28 ± 0.26 ^①
别嘌醇组	10	183.4 ± 24.7 ^②	165.2 ± 12.7 ^③	25.0 ± 2.9 ^③	22.8 ± 2.3 ^③	2.86 ± 0.32 ^③	2.80 ± 0.40 ^③
吴门三黄汤组	10	205.6 ± 15.1 ^{③④}	179.3 ± 10.8 ^{③④}	26.7 ± 2.5 ^②	24.4 ± 2.1 ^②	3.39 ± 0.53 ^{③④}	3.09 ± 0.56 ^③

与空白组比较, ① $P < 0.01$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$; 与别嘌醇组比较, ④ $P < 0.05$

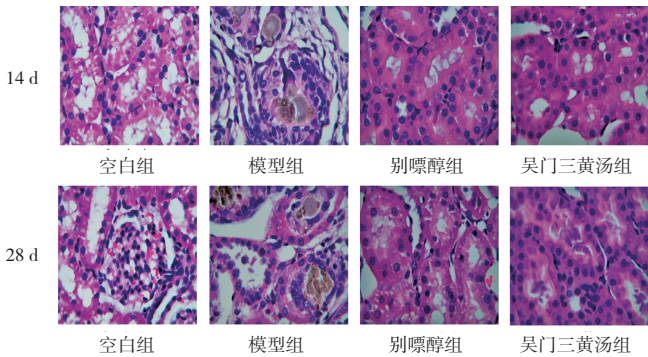


图1 各组大鼠肾组织病理形态学比较 (×400)

2.3 各组大鼠肝脏组织中 XDH 蛋白表达比较 见表2, 图2。空白组大鼠肝脏组织内 XDH 蛋白呈弱阳性表达, 肝脏组织胞质被染成棕黄色; 模型组大鼠肝脏组织中布满棕黄色物质。与空白组比较, 模型组第14天和28天的 XDH 蛋白表达增强 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与模型组比较, 别嘌醇组和吴门三黄汤组第14天和28天蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠肝脏组织中 XDH 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	14 d	28 d
空白组	10	0.195 ± 0.017	0.178 ± 0.007
模型组	10	0.258 ± 0.010 ^②	0.235 ± 0.015 ^①
别嘌醇组	10	0.215 ± 0.018 ^③	0.201 ± 0.013 ^③
吴门三黄汤组	10	0.224 ± 0.013 ^{①③}	0.197 ± 0.016 ^③

与空白组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$; 与模型组比较,

③ $P < 0.05$

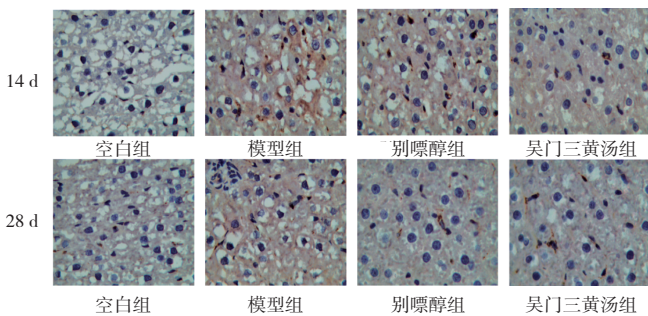


图2 各组大鼠肝脏组织中 XDH 蛋白表达比较 (×200)

3 讨论

原发性 HUA 与多基因遗传缺陷而导致酶缺乏或酶活性改

变最终引起血尿酸升高有关, XO 活性异常增高为发病的最后关键环节, 使其成为抗 HUA 药的良好靶点^⑦。目前临床治疗 HUA 的常用药物主要分为2类: ①促进尿酸排泄的苯溴马隆、丙磺舒、苯磺唑酮等; ②抑制尿酸生成为主的 XO 抑制剂如别嘌醇, 其在降尿酸的同时可产生皮肤过敏、肝损伤、威胁生命的超敏变态反应综合症等不良反应, 一定程度上限制了它的使用, 使患者难以持续服药^⑧。

进行动物实验研究和临床试验研究, 改善既往的治疗方案, 将是调控 HUA 正向转归的研究热点^⑨。吴门三黄汤是苏州市中医医院吴门医派名方制剂“山黄胶囊”和“三黄胶囊”在临床有效基础上, 结合传统中医药理论和吴门医派倡导的“治未病”思想及“络病理论”“百病湿为先”等关键技术和手段^{⑩-⑪}, 通过多年的临床应用经验总结而成的基本方。吴门医家马奇翰等认为 HUA 主要以湿热蕴结为基本病机, 因湿热病机容易引起血瘀, 多由嗜食高粱厚味, 脾虚不运, 湿热内蕴引起, 加之先天禀赋不足(体质因素), 或后天失养, 房事不节, 而肾精亏虚, 肾阴不足, 湿热易注于下焦。因此病机本在于脾气虚, 肾精亏, 也有肝火旺, 标在于湿、痰、热、瘀等。初期湿热壅阻, 逐渐有痰瘀之证, 日久脾肾亏虚为要, 下虚上实, 肝火上炎, 导致阴阳俱损。对本院体检中心发现的部分 HUA 患者进行调研和辨证治疗的积累下, 初步推断临床一般以初期阶段为主。基本方为炒黄柏 12 g, 炒黄芩、熟地黄各 10 g, 生大黄 5 g, 防己、山慈菇各 9 g, 土茯苓 15 g。方中黄柏、黄芩清热燥湿、泻火解毒为君药; 辅熟地黄、生大黄以滋阴补肾、逐瘀通经, 为臣药; 防己利水消肿、祛风除湿, 山慈菇、土茯苓消肿散结解毒, 三者共为佐使药。诸药合用, 有清热燥湿泻火、滋肾行瘀通络之效。临床上根据辨证进行有效的加减, 如阴虚血热, 去熟地黄加生地黄, 玄参加强凉血活血而又不伤血, 凉血不留瘀。若兼有脾虚湿甚, 可加陈皮、枳壳、砂仁、米仁之类的药物以醒脾健运, 进一步化湿清热。

本实验观察了吴门三黄汤对氧嗪酸钾诱导的 HUA 大鼠的影响, 结果与空白组比较, 模型组第14天和28天 SUA 含量及血清和肝组织 XO 活性明显升高, HE 染色病理学检查也观察到肾脏病理性改变, 说明造模成功且造模后在实验周期内 HUA 相关指标和病理改变稳定, 提示此种方法可造成肝、肾功能的损害。与模型组比较, 2 药物组第14天和28天 SUA 含量及血清和肝组织 XO 活性降低, 肾组织病理形态学亦有明

显的改善,初步提示吴门三黄汤有一定的抑制 XO 活性和改善肾脏组织病理性改变的作用。XO 在尿酸生成过程中发挥着重要作用,非嘌呤类前体物质在体内经过一系列转化生成嘌呤类核苷酸,继续分解生成次黄嘌呤和黄嘌呤,最终经过 XO 的连续氧化而生成尿酸。因此, XO 直接调控着体内尿酸水平的高低^[12-13]。对于 XO 的生理功能,目前比较确切的是参与核酸代谢,作为一种非特异的需氧脱氢酶,可作用于多种底物,如嘌呤、嘧啶、嘌呤、杂环碱、醛类、脂肪酸及磷脂等,其中以黄嘌呤和次黄嘌呤为主,对其催化反应速度也最快^[14-15]。因此,可以从 XO 的变化入手探讨体内尿酸水平变化的原因及药物作用的机制。本实验与空白组比较,模型组第 14 天和 28 天的 XDH 蛋白表达增强,说明模型组大鼠在接受造模剂诱导后,肝脏组织 XDH 蛋白表达量明显增加且造模剂停止后至实验结束依然有高表达;与模型组比较,别嘌醇组和吴门三黄汤组第 14 天和 28 天 XDH 蛋白表达明显减少且吴门三黄汤组与别嘌醇组效应相近。综上,吴门三黄汤下调 HUA 大鼠肝组织中 XDH 高表达抑制 XO 活性可能是其降低 HUA 大鼠 SUA 水平而改善肾脏病变的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 刘程程,谢苗荣. 高尿酸血症和降尿酸治疗对慢性病影响的研究进展[J]. 中国全科医学, 2018, 21(5): 501-507.
- [2] 梁国强,尤君怡,江国荣,等. 吴门三黄汤联合西药治疗类风湿关节炎湿热痹阻证[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(3): 531-533.
- [3] 孟祥奇,朱利民,马奇翰,等. 山黄胶囊治疗急性痛风性关节炎 30 例[J]. 中医研究, 2006, 19(11): 26-27.
- [4] 陈刚,贾萍. 别嘌醇改善果糖诱导的大鼠高尿酸血症与调节肠道葡萄糖转运子表达的关系研究[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(4): 469-474.
- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [6] 朱明敏,师晓毅,孙维峰. 复方土茯苓颗粒对 HUA 大鼠 XO 活性及其 mRNA 的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 127-130.
- [7] 陆海波,鲁传华. 高尿酸血症治疗药物黄嘌呤氧化酶抑制剂的进展[J]. 安徽医药, 2016, 20(4): 626-630.
- [8] 马金魁,张宏斌. 高尿酸血症及治疗药物的研究进展[J]. 广东医学, 2018, 39(S2): 262-267.
- [9] 项洁琼,陈仁慈,陈洪宇. 高尿酸血症中医药治疗概述[J]. 新中医, 2016, 48(10): 188-190.
- [10] 葛惠男. 叶天士络病学说及其在内伤杂病中的应用[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(5): 409-412.
- [11] 葛惠男,欧阳八四. 吴门医派概要[J]. 江苏中医药, 2016, 48(10): 63-67.
- [12] 刘晓然,李泰明. 黄嘌呤氧化酶抑制剂在高尿酸血症治疗中的研究进展[J]. 轻工科技, 2017, 33(9): 20-21.
- [13] 王成华,邢新会. 黄嘌呤氧化酶的研究进展及其发展前景[J]. 广西科学, 2017, 24(1): 15-24.
- [14] 李葵花,李璐,许士奇,等. 无症状高尿酸血症大鼠血液流变学和氧化应激[J]. 医用生物力学, 2017, 32(1): 88-91.
- [15] 温雯,李月红. 肾脏疾病高尿酸血症诊治的实践指南解读[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(1): 71-72.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)