

酸脂清胶囊对尿酸性肾病大鼠肾功能及 $\text{TNF}-\alpha$ 的影响

张元 文绍敦

(青海大学医学院中医系, 西宁, 810001)

摘要 目的: 观察酸脂清胶囊对尿酸性肾病大鼠肾功能及 $\text{TNF}-\alpha$ 的影响, 探讨其作用的机理。方法: 将 6 周龄 SD 雄性大鼠分为 5 组, 分别为正常组、模型组、生理盐水组、酸脂清治疗组、别嘌醇治疗组。后 4 组用腺嘌呤、乙胺丁醇造模, 成功后分别给予生理盐水、酸脂清、别嘌醇灌胃给药, 3 周后检测各组大鼠血中尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、尿酸 (UA), 同时用酶联反应法 (Elisa 法) 测量各组肾脏组织中肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF}-\alpha$) 的含量。结果: 1) 造模 2 周后, 与正常组比较, 模型组大鼠血中 BUN、Cr、UA 均明显升高 ($P < 0.05$), 证实造模成功。2) 治疗 3 周后, 与生理盐水组相比, 酸脂清治疗组、别嘌醇治疗组大鼠血中 BUN、UA 均明显下降 ($P < 0.05$), 酸脂清治疗组和别嘌醇治疗组 Cr 均有下降, 但只有酸脂清治疗组有统计学意义 ($P < 0.05$)。3) 酸脂清治疗组和别嘌醇治疗组血中 BUN、Cr、UA 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4) Elisa 法测定各组 $\text{TNF}-\alpha$ 的浓度, 与正常组相比, 生理盐水组 $\text{TNF}-\alpha$ 明显升高 ($P < 0.05$); 与生理盐水组相比, 酸脂清治疗组、别嘌醇治疗组 $\text{TNF}-\alpha$ 含量明显减少 ($P < 0.05$); 5) 肾组织病理切片显示: 与模型组相比, 酸脂清治疗组、别嘌醇治疗组尿酸盐结晶沉积、炎性细胞浸润均明显减少, 肾小管扩张改善。结论: 酸脂清胶囊能够降低尿酸性肾病大鼠血中 BUN、Cr、UA 的含量, 减少尿酸盐结晶在肾小管中沉积及炎性细胞浸润, 降低 $\text{TNF}-\alpha$ 在肾组织中的含量, 从而达到治疗的作用。

关键词 酸脂清胶囊; 尿酸性肾病; 肾功能; 肿瘤坏死因子 α

Effect of Suanzhiqing Capsule on Renal Function and $\text{TNF}-\alpha$ level in Nephropathy Rats with Uric Acid

Zhang Yuan, Wen Shaodun

(Department of TCM, Medicine School of Qinghai University, Xining 810001, China)

Abstract Objective: To observe the effect and explore the mechanism of Suanzhiqing capsule on renal function and $\text{TNF}-\alpha$ level in Nephropathy Rats with Uric Acid. **Methods:** Male SD rats were divided into five groups including normal group, model group, sodium chloride group, suanzhiqing capsule treatment group, and allopurinol treatment group. Nephropathy rat with uric acid were established by giving adenine and ethambutol. Then model rats were administered intragastrically with sodium chloride, suanzhiqing capsule, or allopurinol for three weeks. The blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), uric acid (UA) in blood and tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF}-\alpha$) in renal tissue were determined. **Results:** (1) Compared with the normal group, the levels of BUN, Cr, and UA in blood in model group significantly increased ($P < 0.05$). (2) Compared with the sodium chloride group, the levels of BUN, and UA in blood in suanzhiqing capsule treatment group and allopurinol treatment group significantly decreased ($P < 0.05$). Although the levels of Cr in allopurinol treated group decreased, only in suanzhiqing capsule treated group were significantly. (3) Comparing the levels of BUN, Cr, and UA in suanzhiqing capsule treatment group with those in allopurinol treatment group, there was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). (4) The optical density value of $\text{TNF}-\alpha$ in renal tissue of the sodium chloride group was significantly higher than that in normal group ($P < 0.05$). The optical density value of $\text{TNF}-\alpha$ in renal tissue of suanzhiqing capsule treatment group and allopurinol treatment group were significantly lower than that in sodium chloride group ($P < 0.05$). (5) Compared with the model group, uric acid crystallization and inflammatory cell infiltration were significantly reduced, and tubular expansion had been relieved in both suanzhiqing capsule treatment group and allopurinol treatment group. **Conclusion:** Suanzhiqing capsule could reduce the levels of BUN, Cr, and UA in blood of nephropathy rats with uric acid, decrease uric acid crystallization and inflammatory cell infiltration, and lower $\text{TNF}-\alpha$ level in renal tissue, thus it could have a beneficial effect on uric acid nephropathy rats.

Key Words Suanzhiqing capsule; Uric acid nephropathy; Renal function; Tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF}-\alpha$)

中图分类号: R243; R256.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.01.027

尿酸是人体细胞代谢及饮食中嘌呤代谢的终末产物。痛风是由于嘌呤代谢异常和或体内尿酸浓度持续性升高而引起的以关节和肾脏损害为主要表现的代谢性疾病, 严重者可能发展为肾功能衰竭而危及生命。

尿酸性肾病也称为痛风性肾病, 是由于尿酸盐在血中呈现过饱和状态后沉积在肾组织、特别是肾髓质和椎体部而导致的慢性间质性肾炎^[1]。随着我国人民生活水平的改善和饮食结构的改变, 特别是富含蛋白质和

嘌呤的食物摄入增加,本病的发病率也在逐年提高。流行病学资料显示痛风的发病率在世界范围内呈逐年上升趋势^[2]。由于肾脏既是排泄尿酸的重要器官,也是高尿酸血症的靶器官,有文献报道^[3]长期痛风有显著肾损害者占41%,25%死于肾衰竭,痛风尸检几乎都有肾损害。酸脂清胶囊是文绍敦教授治疗痛风的名方,治则以“清热祛湿,化瘀祛浊”为主,主要药物有大黄、姜黄、土茯苓。本实验采用酸脂清胶囊治疗尿酸性肾病大鼠,观察其临床疗效同时探讨其作用机理,以寻找一种疗效好、不良反应小、特别是能保护肾功能的有效的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 44只健康SPF级雄性SD大鼠,体重(180±20)g,由甘肃中医学院动物实验中心提供,许可证号:SCXK(甘)2011-0001。饲养于青海大学医学院机能实验室动物房,正常饮食,自由饮水,适应性饲养1周后用于实验。

1.1.2 主要药物与试剂 腺嘌呤,Amresco公司分装产品,购于北京研威恒达科技有限公司;盐酸乙胺丁醇片,沈阳红旗制药有限公司生产,批号为21022349;别嘌醇片,合肥久联制药有限公司生产,批号为34021248;酸脂清胶囊,青海医学院中药实验室提供;TNF-α ELISA试剂盒,美国R&D公司分装,购自北京研威恒达科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模型的建立与分组 将44只雄性SD大鼠适应性喂养1周,然后随机分为5组,即正常组、模型组、生理盐水组、酸脂清治疗组、别嘌醇治疗组。正常组每天给予生理盐水2 mL灌胃,其余4组以腺嘌呤(200 mg/kg)、乙胺丁醇(250 mg/kg)灌胃给药造模^[4-5],连续14 d后,通过测量正常组与模型组BUN、Cr、UA的水平来确定造模成功。然后生理盐水组每日以生理盐

水2 mL灌胃、酸脂清治疗组以酸脂清浸膏以1.83 g/(kg·d)加生理盐水制成2 mL液体灌胃、别嘌醇治疗组^[6]以别嘌醇20.833 mg/(kg·d)加生理盐水制成2 mL液体灌胃,各组均持续给药21 d。

1.2.2 实验指标的检测 模型组造模2周后,生理盐水组、酸脂清治疗组、别嘌醇治疗组治疗3周后,每组大鼠均按体重腹腔注射20%乌拉坦麻醉,经腹腔静脉采血,检测大鼠血BUN、Cr、UA水平。酶联反应法测定肾组织中TNF-α的吸光度(OD值)。取肾脏组织,固定,包埋,切片,HE染色,显微镜下观察肾脏组织病理改变。

1.3 统计学方法 使用SPSS 17.0统计学分析软件进行统计分析,数据结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用t检验,组间比较采用单因素方差分析,以P<0.05表示为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 正常组大鼠体重增长明显,状态良好,活动自如,体毛光泽;模型组大鼠体重明显减轻,多尿、多饮、逐渐出现食少,精神萎靡、畏寒蜷缩、活动减少,稀便,体毛大片脱落,尾巴湿冷,外阴周围湿毛现象;酸脂清组和别嘌醇组以上症状明显改善,体重逐渐恢复,大便成形。

2.2 各组生化检测情况及体重、肾重、肾平均重量变化情况 造模2周后,与正常组比较,模型组大鼠血中BUN、Cr、UA均明显升高(P<0.05或P<0.01),体重明显减轻(P<0.05),肾平均重量明显增大(P<0.05),证实造模成功。详见表1。治疗后,与生理盐水组相比,酸脂清治疗组、别嘌醇治疗组大鼠血中BUN、UA均明显下降(P<0.05或P<0.01),但是其中酸脂清组和别嘌醇组Cr虽均下降,只有酸脂清组有统计学意义(P<0.05),体重的增加和肾脏平均重量的减轻只有西药组有意义(P<0.05)。酸脂清治疗组和别嘌醇治疗组血中BUN、Cr、UA等相比,差异无统计学意义(P>0.05)。详见表2。

表1 造模前后肾功能、体重及肾脏变化的比较

组别	只数	BUN(mmol/L)	CR(μmol/L)	UA(μmol/L)	体重(g)	肾重(g)	肾平均重量(%)
正常组	6	7.00±0.46	38.67±2.42	75.17±18.80	241.83±19.91	1.74±0.20	0.71±0.07
模型组	6	20.90±9.18*	64.33±10.35**	117.33±20.52*	145.17±25.67*	2.25±0.51	1.78±0.49**

注:与正常组相比,*P<0.05,**P<0.01。

表2 生理盐水组与治疗组肾功能、体重及肾脏变化的比较

组别	只数	BUN(mmol/L)	CR(μmol/L)	UA(μmol/L)	体重(g)	肾重(g)	肾平均重量(%)
生理盐水组	8	12.39±2.63	53.13±5.61	129.25±43.16	207.06±14.06	2.61±0.34	1.26±0.17
酸脂清治疗组	8	8.94±1.44**	45.25±8.45*	92.25±15.73*	220.13±17.38	2.61±0.23	1.19±0.13
别嘌醇治疗组	8	8.50±1.47**	48.24±7.50	69.88±40.19**	239.89±14.71*	2.35±0.26*	0.98±0.15*

注:与生理盐水组相比,*P<0.05,**P<0.01。

2.3 各组 $\text{TNF}-\alpha$ 测量结果(OD 值表示) 与正常组相比,生理盐水组 $\text{TNF}-\alpha$ 明显升高($P < 0.05$);与生理盐水组相比,酸脂清组、别嘌醇组 $\text{TNF}-\alpha$ 含量明显减少($P < 0.05$),酸脂清、别嘌醇组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组 $\text{TNF}-\alpha$ 在肾组织中 OD 值的比较

组别	只数	OD 值
正常组	6	0.233 ± 0.016
生理盐水组	8	$0.274 \pm 0.038^*$
酸脂清组	8	$0.222 \pm 0.040^\Delta$
别嘌醇组	8	$0.216 \pm 0.029^\Delta$

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与生理盐水组比较, $^\Delta P < 0.05$ 。

2.4 大鼠肾脏病理改变

2.4.1 肉眼观 正常组大鼠肾脏呈红褐色,表面光滑,无异常表现。模型组肾脏体积明显增大、充血,颜色变深,表面可见弥漫分散在白色小点,切面皮质变薄、髓质和锥体内可见放射状白线。酸脂清组和别嘌醇组肾脏颜色明显变白,体积仍较大,白色小点分布减少。

2.4.2 镜下观 显微镜下观察正常大鼠肾组织结构正常,无尿酸盐结晶;模型组肾小球毛细血管闭锁、无充盈,肾小管扩张,肾小管可见淡黄色不规则针状尿酸盐结晶沉积,多分布在近曲小管,同时伴有大量炎性细胞浸润;生理盐水组肾小球毛细血管充盈,部分包曼氏囊扩张,肾小管扩张,有尿酸盐结晶沉积、炎症细胞浸润;酸脂清组、别嘌醇组尿酸盐结晶、炎症细胞浸润均明显减少,肾小管扩张改善,别嘌醇组肾小管周围淋巴细胞浸润。见图 1。

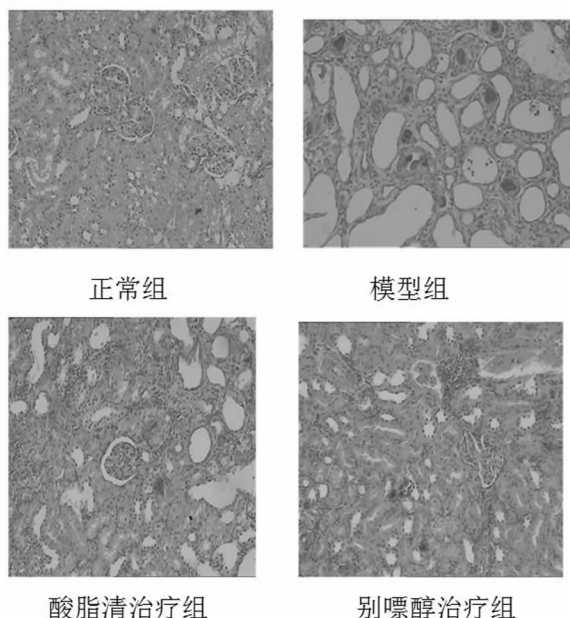


图 1

3 讨论

$\text{TNF}-\alpha$ 是机体免疫应答的重要调节因子,同时也被认为是炎症细胞因子链锁中的第 1 个细胞因子^[7],激活 T 细胞,促进 $\text{IL}-1$ 、 $\text{IL}-2$ 、 $\text{IL}-6$ 的产生及分泌,诱发炎症反应,也可以激活的单核-巨噬细胞产生的一种具有多种生物活性的多肽细胞因子,因此与炎症反应密切相关。同时 $\text{TNF}-\alpha$ 也是高效的细胞因子代表,在多数炎症、感染和免疫性疾病中细胞因子的表达是紊乱的^[8]。目前认为心、肝、肺、肾是 $\text{TNF}-\alpha$ 的生物合成场所^[9-10],同时在多种肾脏疾病患者血、尿及肾脏组织中 $\text{TNF}-\alpha$ 水平明显高于正常^[11],因此它在肾脏疾病的发病机制中的作用日益受到重视^[12]。而且 $\text{TNF}-\alpha$ 又与尿酸盐密切相关。尿酸在血液中物理溶解度很低,高尿酸血症时,尿酸盐结晶容易析出,沉积于血管壁,损伤血管内膜,造成慢性炎性损害,损伤的动脉内有大量的单核细胞黏附于内膜上,它可释放 $\text{TNF}-\alpha$,使血液中 $\text{TNF}-\alpha$ 水平增加^[137]。也有研究表明尿酸盐本身作为启动白细胞释放炎症因子的始动因素^[14],可能不仅引起炎性损伤,还参与炎性损伤的发生、发展。同时尿酸也可刺激内皮细胞释放 $\text{TNF}-\alpha$, $\text{TNF}-\alpha$ 对血管内皮细胞具有直接细胞毒作用,引起内皮细胞的损伤,促进炎性细胞聚集,最终引起炎症反应的级联放大,形成损伤血管内皮^[15]。说明 $\text{TNF}-\alpha$ 是尿酸性肾病的一个重要影响因子。

实验发现,尿酸性肾病大鼠血中 BUN、Cr、UA 明显升高,光镜下可见肾小管以近曲小管为主有大量尿酸盐结晶的沉积、同时伴有炎症细胞浸润,肾组织中 $\text{TNF}-\alpha$ 含量明显增加。酸脂清药物治疗后,大鼠血中 BUN、Cr、UA 明显下降,特别是降 Cr 水平较别嘌醇组明显,肾脏病理改变减轻,尿酸盐沉积减少,肾组织中 $\text{TNF}-\alpha$ 水平降低。由此可见,酸脂清胶囊对尿酸性肾有治疗作用,其机制与其降低血尿酸,减少尿酸盐在肾小管沉积,同时降低肾组织 $\text{TNF}-\alpha$ 的水平,减少相关的炎性反应,从而减轻肾脏损害有关,从而达到治疗尿酸性肾病的目的。

参考文献

- [1] 黎磊石,刘志红. 肾脏病临床集锦[M]. 北京:科学技术出版社, 2005:326-327.
- [2] Weaver AL. Epidemiology of gout. Cleve Clin J Med, 2008, 75(Suppl5):S9-12.
- [3] 蒋季杰,钱桐荪. 尿酸肾病[J]. 国外医学:内科学分册, 1981, 8(7): 293.
- [4] 熊湘明,曲竹秋. 大鼠高尿酸血症模型建立[J]. 天津中医学院学报, 2001, 20(4): 28-29.

1Ra 能特异性地抑制 T 细胞表面 IL-1R 与 IL-1 结合^[13],可抑制关节软骨细胞凋亡^[14],在关节炎中起重要的关节保护作用。本实验结果显示痛风模型组 IL-1Ra 和 IL-10 浓度较其余各组显著降低,说明痛风性关节炎发作时软骨保护机制降低。酸脂清胶囊提取物可显著升高血 IL-1Ra 和 IL-10 的浓度,Zhang 等^[15]使用基因转染的手段把 IL-1Ra 基因注射到兔膝关节,使 IL-1Ra 的表达量增多,结果观察到了关节软骨损伤的减轻,故说明酸脂清胶囊有良好的关节软骨保护作用,其中水提物作用较为明显。

参考文献

- [1] Hedhom E, Hause HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis; the role of inflammation[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(1): 45-53.
- [2] 李风雷. 白细胞介素-10 和急性肺损伤[J]. 国外医学·呼吸系统分册, 2001, 21(2): 57-58.
- [3] Silvestri T, Pullstelli L, Dolzani P, et al. In vivo expression of inflammatory cytokine receptors in the joint compartments of patients with arthritis[J]. Rheumatol Int, 2006, 26(4): 360-368.
- [4] Galich AL, Domiciano DS, Fuller R, et al. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment[J]. Clin Rheumatol, 2010, 29(5): 451-460.
- [5] Minicuci N, Noale M, Bardage C, et al. Cross-national determinants of quality of life from six longitudinal studies on aging: the CLEAS project[J]. Aging Clin Exp Res, 2003, 15(3): 187-202.
- [6] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology[J]. Biorheology, 2002, 39(1-2): 237-246.
- [7] Malemud CJ, Islam N, Haqqi TM. Pathophysiological mechanisms in os-

teoarthritis lead to novel therapeutic strategies[J]. Cells Tissues Organs, 2003, 174(1-2): 34-48.

- [8] 李刚. 骨关节炎的病因及中医药治疗研究进展[J]. 河北中医, 2010, 32(10): 1585-1586.
- [9] Yueqing Wang, Siqian Lou. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro[J]. Chinese Medical Journal, 2001, 14(4): 723.
- [10] ERIK LUBBERTS, LEO A B, JOOSTEN. MARTINE CHABAUD, et al. IL-10 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion[J]. J Clin Invest, 2000, 6, 15, 105(12): 1697-1710.
- [11] Jongensen C, Apparally F, Couret I, et al. Interleukin-4 and interleukin-10 are chondroprotective and decrease mononuclear cell recruitment in human rheumatoid synovium in vivo[J]. Immunology, 1998, 93(4): 518-523.
- [12] Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, et al. Interleukin-10 (IL-10), not IL-4 or interferon-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol, 2001, 28(9): 1960-1966.
- [13] Naghmeh R, Eline S. Association of the risk of osteoarthritis with high innate production of interleukin-1 β and low innate production of interleukin-10 ex vivo, upon lipopolysaccharide stimulation[J]. Arthritis & Rheumatism, 2005, 52(5): 1443-1450.
- [14] 马丽, 郭万首, 潘林, 等. 白细胞介素-1 受体拮抗蛋白间接体内转基因对骨关节炎软骨细胞凋亡的抑制作用[J]. 中华风湿病学杂志, 2004, 5(8): 284-287.
- [15] Zhang X, Mao Z, Yu C. Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10[J]. J Orthop Res, 2004, 22(4): 742-750.

(2013-05-22 收稿 责任编辑: 徐晖)

(上接第 77 页)

- [5] 孔锡容, 张光荣, 杨曦. 尿酸性肾病动物模型十年研究概况[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 9(8): 557-558.
- [6] 胡晓玲, 陈玉敏. 别嘌醇在尿酸性肾病中的疗效分析[J]. 西部医学, 2012, 5(24): 962-963.
- [7] 桑莉. 贺氏温通法治疗急性痛风性关节炎机理探讨[J]. 光明中医, 2011, 26(12): 2499-2500.
- [8] 李明坤, 董冀平, 刘志广. 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和超敏 C 反应蛋白 2 型糖尿病胰岛素抵抗的关系[J]. 中国基层医药, 2012, 7(19): 1034-1035.
- [9] 李玲, 邹万忠. 肾小管损伤时内皮素-1、肿瘤坏死因子 α 的表达及对离体肾间质成纤维细胞的影响[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(6): 445-449.
- [10] Kapadia S, Lee J, Torre2Amione g, et al. Tumor necrosis factor α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin admin-

istration[J]. J Clin Invest, 1995, 96(2): 1042-1052.

- [11] Yokoyama T. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart[J]. J Clin Invest, 1993, 92: 2303-2312.
- [12] 陈以平. 尿酸性肾病的治疗进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2(5): 249-250.
- [13] Kerm PA, Saghizadeh M, Ong JM, et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. J Clin Invest, 1995, 95: 2111-2119.
- [14] Jaramillo M, godbout M, Naccache PH, et al. Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals. J Biol Chem, 2004, 279: 52797-52805.
- [15] 肖祖容, 苏筠霞, 李建华. 氯沙坦对尿酸性肾病大鼠肾组织 MCP-1 和 ICAM-1 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 5(13): 406-409.

(2013-05-24 收稿 责任编辑: 徐颖)