

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.08.007

## 降浊四妙散通过降低血尿酸水平及抑制 NLRP3 炎症小体 对大鼠高尿酸血症及其肾损伤的改善作用研究 \*

魏文静<sup>1</sup> 高欣<sup>2Δ</sup> 雷烨<sup>1</sup> 杨薪博<sup>2</sup> 惠瑜瑜<sup>1</sup>

(陕西中医药大学第二附属医院 1 内分泌代谢科;2 肾病科 陕西 西安 712000)

**摘要 目的:**探究降浊四妙散通过降低血尿酸水平及抑制 NLRP3 炎症小体对大鼠高尿酸血症及其肾损伤的改善作用。**方法:**将 28 只 SD 大鼠随机分为对照组、尿酸钾(OA)模型组、OA+SMS 组、OA+ 别嘌醇组,其中,SMS 的剂量基于实验动物物质管理标准(每公斤体重成人剂量的 10 倍);别嘌醇溶解在 OA+ 别嘌醇组的饮水水中(浓度,150 mg/L);对照组和 OA 组给予等量的蒸馏水(胃内容量控制在 2 mL/d),持续 7 周。探讨 SMS 对肾线粒体活性氧(ROS)和氧化应激(OS)产物、NLRP3-ASC-caspase-1 轴的蛋白表达。**结果:**(1)对照组、OA 模型和治疗组的数据存在显著差异( $P<0.05$ )。在第 7 周结束时,模型组总尿酸排泄量显著高于对照组( $P<0.05$ ),SZF 组和别嘌醇组显著高于 OA 组( $P<0.05$ )。(2)与对照组相比,OA 组的 BUN 和 Scr 水平显著升高( $P<0.05$ ),而接受 SMS 和别嘌醇治疗大鼠的 BUN 和 Scr 水平下降( $P<0.05$ )。(3)肾组织结构中,对于 OA+SZF 和 OA+ 别嘌醇组,肾近端肾小管上皮细胞肿胀、空泡变性和炎性细胞浸润减少。(4)OA 诱导的高尿酸血症大鼠肾组织中氧化应激指标均升高( $P<0.05$ );即超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶之间存在显著的不平衡,而 SMS 和别嘌醇干预可显著回复以上氧化应激反应指标的动态平衡( $P<0.05$ )。(5)OA 组大鼠肾组织中 TXNIP mRNA 和蛋白表达显著高于其他组( $P<0.05$ ),而 SMS 和别嘌醇有效抑制 TXNIP mRNA 和蛋白表达( $P<0.05$ );高尿酸血症大鼠 NLRP3-ASC-caspase-1 轴中的 mRNA 和蛋白质表达升高( $P<0.05$ )。SMS 干预后组 NLRP3-ASC-caspase-1 轴的激活显著被抑制( $P<0.05$ )。**结论:**SMS 通过降低高尿酸血症实验大鼠肾脏中血尿酸水平,进而减轻肾损害,同时其可抑制线粒体 ROS 触发的 NLRP3 炎性体激活来减轻肾小管损伤和炎症浸润。

**关键词:**降浊四妙散;尿酸;NLRP3 炎症小体;高尿酸血症;肾损伤

**中图分类号:**R-33;R587.2;R243 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)08-1436-06

## Protective Effect of Oxymatrine on Myocardial Injury in Septic Shock Rats through TGF- $\beta$ 1/Smads Signaling Pathway\*

WEI Wen-jing<sup>1</sup>, GAO Xin<sup>2Δ</sup>, LEI Ye<sup>1</sup>, YANG Xin-bo<sup>2</sup>, HUI Yu-yu<sup>1</sup>

(1 Department of Endocrinology and Metabolism; 2 Department of Nephrology, The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, 712000, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the improvement effect of Jiangzhuo Simiao Powder on hyperuricemia and renal injury in rats by reducing serum uric acid level and inhibiting NLRP3 inflammasome. **Methods:** Twenty-eight SD rats were randomly divided into control group, potassium oxyacid (OA) model group, OA+SMS group, and OA+allopurinol group, among them, the dose of SMS is based on laboratory animal substance management standards (10 times the adult dose per kilogram of body weight); Allopurinol was dissolved in the drinking water of the OA + allopurinol group (concentration, 150 mg/L); The control group and the OA group were given the same amount of distilled water (the intragastric volume was controlled at 2 mL/d) for 7 weeks. To investigate the mediating effect of SMS on renal mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress (OS) products, protein expression of NLRP3-ASC-caspase-1 axis. **Results:** (1) The data of control group, OA model and treatment group were significantly different ( $P<0.05$ ). At the end of the 7th week, the total uric acid excretion in the model group was significantly higher than that in the control group ( $P<0.05$ ), and the SZF group and allopurinol group were significantly higher than those in the OA group ( $P<0.05$ ). (2) Compared with the control group, the levels of BUN and Scr in the OA group were significantly increased ( $P<0.05$ ), while the levels of BUN and Scr in the rats treated with SMS and allopurinol decreased ( $P<0.05$ ). (3) In renal tissue structure, for the OA+SZF and OA+allopurinol groups, the epithelial cell swelling, vacuolar degeneration and inflammatory cell infiltration in the proximal renal tubules were reduced. (4) The oxidative stress indexes in renal tissue of OA-induced hyperuricemia rats were all increased ( $P<0.05$ ); namely, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione. There was a significant imbalance between peroxidases, while SMS and allopurinol intervention could significantly restore the dynamic balance of the above oxidative stress response indicators ( $P<0.05$ ). (5) The expression of TXNIP mRNA and protein in kidney

\* 基金项目:陕西省中医管理局科研项目(LCMS051);中西医结合治疗糖尿病血管病变创新团队项目(2020XKTD-C01)

作者简介:魏文静(1991-),硕士,主治医师,研究方向:内分泌代谢疾病的中西医结合诊疗进展,E-mail:wwjj853@163.com

Δ 通讯作者:高欣(1992-),硕士,主治医师,研究方向:IgA 肾病的中西医诊疗进展,E-mail:yylove992@163.com

(收稿日期:2022-08-10 接受日期:2022-08-30)

tissue of rats in OA group was significantly higher than that in other groups ( $P<0.05$ ), while SMS and allopurinol effectively inhibited the expression of TXNIP mRNA and protein ( $P<0.05$ ); mRNA and protein expression in the murine NLRP3-ASC-caspase-1 axis was elevated ( $P<0.05$ ). The activation of NLRP3-ASC-caspase-1 axis in the SMS group was significantly inhibited ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** SMS attenuated tubular damage and inflammatory infiltration by reducing blood uric acid levels in reducing renal damage, while inhibiting the NLRP3 inflammasome activation triggered by mitochondrial ROS.

**Key words:** Jiangzhuo Simiao powder; Uric acid; NLRP3 inflammasome; Hyperuricemia; Kidney injury

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R587.2; R243 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2023)08-1436-06

## 前言

随着我国国民饮食习惯发生显著变化,高尿酸血症及因高尿酸血症引起的肾损伤的患病率显著增加,流行病学调查和实验研究结果表明,高尿酸血症与痛风、糖尿病、代谢综合征、慢性心力衰竭和神经系统疾病密切相关,且 UA 轻微升高可能导致高血压、视网膜血管疾病和肾损伤<sup>[1-3]</sup>。最近的研究发现,可溶性 UA 和 UA 晶体激活 NLRP3 炎性体,导致 IL-1 等促炎细胞因子成熟并触发先天性免疫防御,抵御感染和感染等危险信号<sup>[4,5]</sup>。NLRP3 受体蛋白可以识别病原体相关分子模式和损伤相关分子模式,其存在于身体的各种成分中,例如受损组织和组织坏死释放的物质。ROS 的释放导致硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)从氧化的硫氧还蛋白-1(Trx-1)蛋白中分离出来,并与 NLRP3 受体蛋白的富含亮氨酸的重复结构域结合,从而激活 NLRP3 炎性体<sup>[6,7]</sup>。因此,ROS-TXNIP 通路成为激活 NLRP3-ASC-caspase-1 炎症通路的先决条件。最近的研究表明,一旦 NLRP3-ASC-caspase-1 轴被激活,由 caspase-1 介导的炎症反应会引发一种程序性细胞死亡:细胞焦亡<sup>[8]</sup>。祖国医学治疗此类疾病有着悠久历史,四妙散乃传统经方,是清热燥湿方剂中代表方之一,临床运用广泛,常用于治疗高尿酸血症、痛风,降浊四妙散(SMS)是根据现代临床患者特征,在四妙散基础上进行加味,在清热燥湿同时加强除痹降浊之效,方由黄柏、苍术、牛膝、木通、荷叶和薏苡仁等组成<sup>[9,10]</sup>。为了经验性地阐明 SMS 对肾功能影响的潜在机制,使用 SMS 治疗轻度高尿酸血症大鼠,然后检查 SMS 对其肾脏 NLRP3 信号通路的干扰。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

氧酸钾盐(OA)购自 Sigma,制备含有 2% OA 的标准饲料。广州中一药业生产的 SMS 干粉溶解于蒸馏水中,制成相当于生药浓度 2.68 g/kg,灌胃给药。别嘌醇片购自北京燕京药业股份有限公司。SMS 包括:黄柏 12 g,薏苡仁 30 g,苍术 10 g,牛膝 12 g,木通 10 g,金钱草 12 g,生山楂 15 g,红曲 10 g,荷叶 12 g,威灵仙 12 g,土茯苓 12 g,泽泻 12 g,川芎 10 g,炙甘草 9 g。尿酸(UA)检测试剂盒、肌酐检测试剂盒、尿素氮检测试剂盒、线粒体取样及检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒、MDA 检测试剂盒、SOD 检测试剂盒、CAT 检测试剂盒购自索莱宝。大鼠 ROS、IL-18 和 IL-1 ELISA 试剂盒购自科诺迪生物科技有限公司。兔抗大鼠 IL-18 和 ASC 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology。兔抗大鼠 3-NT、IgG IL-1、caspase-1、TXNIP 和 4-HNE 购自 Abcam。兔抗鼠 IgG NLRP3 购自 NOVUS。即用型

兔 IgG-SABC 免疫组化和 SABC-AP(小鼠 IgG)检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自博斯东。GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology。HRP 二抗由 Jackson ImmunoResearch Laboratories 提供。mRNA 采样检测试剂盒购自天根生物科技有限公司。逆转录试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq TM 检测试剂盒由宝生物科技有限公司提供。

### 1.2 实验动物

自上海实验动物中心购买 28 只体重(200±20)g 的健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(SPF 级)。本研究按照安全动物试验规范进行,环境温度 25℃(相对湿度 45%),人工光照下昼夜循环 12/12 h,自由饮水。经过 1 周的适应期后,开始规划饮食和介入治疗。所有动物试验均严格按照国际动物伦理指南要求开展。

### 1.3 高尿酸大鼠模型构建

28 只雄性大鼠按体重随机分为对照组、OA 组、OA+别嘌醇组、OA+SMS 组 4 组(n=7)。从第 1 天开始,对照组大鼠给予标准饲料,其余大鼠给予 2% OA 饲料,制作高尿酸血症模型。所有大鼠随意饮水,饮食维持 7 周。2 个治疗组从第 1 天开始接受各自的干预。SMS 的剂量基于实验动物物质管理标准(每公斤体重成人剂量的 10 倍)。别嘌醇溶解在 OA+别嘌醇组的饮用水中(浓度,150 mg/L)。对照组和 OA 组给予等量的蒸馏水(胃内容量控制在 2 mL/d),持续 7 周。

### 1.4 生化指标检测

在 OA 诱导前以及诱导后每隔 2 周记录大鼠的体重和血清尿酸(Sua)水平。尾静脉采血,置于抗凝管中,4℃条件下 3000 转离心 5 min,得到血清。在药物治疗期间,每隔 2 周用代谢笼收集尿液样本,3000 转离心 5 min 去除杂质。样品储存在 -20℃冰箱备用。使用商业试剂盒检测血清和尿液 UA、血清肌酐和血尿素氮水平。24 h 尿液尿酸(Uua)的计算公式如下:Uua=尿 UA 浓度(mol/L)×24 小时尿量(L)。

在药物干预结束时,所有动物禁止饮食,第二天早上禁止饮水。用戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉大鼠,通过腹主动脉收集血样。解剖获取肾脏。来自左肾的部分皮质组织立即在液氮中冷冻。从肾组织中提取总细胞蛋白和 RNA。将分离的血清和其他部分左肾组织储存在 -80℃冰箱,用于测量 MDA、GSH-PX、SOD、CAT 和 ROS 水平。使用线粒体分离试剂盒从肾脏皮层组织中提取线粒体。使用市售试剂盒测量肾皮质组织样品中的 SOD、CAT、GSH-PX 活性和 MDA 水平。

### 1.5 组织病理学

右肾组织在室温下用 90%乙醇固定 1 天。肾活检用一系列分级酒精脱水并包埋在石蜡中。在旋转切片机上将样品切成

3  $\mu\text{m}$  厚的切片,并安装在涂有 APES 的载玻片上。每个切片在二甲苯中脱蜡,在水中降低浓度的酒精中再水合,并用 HE 染色。

#### 1.6 RT-PCR 分析

使用商业试剂盒从个体大鼠肾脏中分离总 RNA,用于评估 NLRP3 炎症性轴相关基因 (rTXNIP、rNLRP3、rASC、rCaspase-1) 和甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (rGAPDH) 的 mRNA 表达。使

用 Super-Script 第一链合成试剂盒获得逆转录的 cDNA。使用的引物总结在表 1 中。所有引物序列都在 GenBank 中进行了检查,以避免无意的序列同源性。由 Sangon Biotechnology 设计和合成。使用 SYBR Green PCR master mix 在 BioRadCyclerIQ 检测系统中进行反应。作为内部对照,rGAPDH 水平与靶基因平行定量。使用 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$  (T) 方法计算每个基因的标准化和倍数变化。使用的引物是如表 1 所示。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

| Primer name | Forward                     | Reverse                     | Length (bp) |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| TXNIP       | 5'-GGCTTTTCTCGATCGTCCCA-3'  | 5'-AGAGGCAGAAAGCGTTGAGT-3'  | 20/20       |
| NLRP3       | 5'-ACGGCAAGTTCGAAAAAGGC-3'  | 5'-AGACCTCGGCAGAAGCTAGA-3'  | 20/20       |
| ASC         | 5'-AGACATGGGCATACAGGAGC-3'  | 5'-GCAATGAGTGCTTGCCCTGTG-3' | 20/20       |
| Caspase-1   | 5'-AAGAAGGTGGCGCATTTTCCT-3' | 5'-GACGTGTACGAGTGGGTGTT-3'  | 20/20       |
| GAPDH       | 5'-TGTGAACGGATTGGCCGTA-3'   | 5'-GATGGTGATGGGTTTCCCGT-3'  | 21/22       |

#### 1.7 蛋白质印迹分析

将大约 100 mg 冷冻的大鼠肾组织在 1 mL RIPA 缓冲液中匀浆,10,000 转离心 20 min。根据 Bradford 方法测量上清液的蛋白质浓度。总蛋白在沸水中变性 5 min。将等量的总蛋白分离到 6%-12% SDS-PAGE 上,并电泳转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜,该膜在转移缓冲液中用甲醇预活化。用 5% 脱脂牛奶封闭膜 2 小时,然后用特异性一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。使用 HRP 缀合的山羊抗兔 IgG 作为二抗 (1:5000) 检测免疫反应条带。使用光辣根过氧化物酶蛋白质印迹检测系统观察免疫反应条带,并使用 Molecular Analyst 通过光密度测定法进行量化。一抗包括针对 rTXNIP、rNLRP3、rASC、rCaspase-1、rpro-IL-1、rIL-1、pro-IL-18 和 rIL-18 的兔多克隆抗体 (均为 1:1000)。

#### 1.8 统计学分析

采用 SPSS20.0 对本研究数据进行分析,计量资料结果表示为至少 3 个独立实验的平均值 $\pm$  SEM,数据通过单向方差分析和 t 检验进行分析比较。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 各组不同时间点的血清尿酸水平

对照组、OA 模型和治疗组的数据存在显著差异 ( $P<0.05$ )。在第 7 周结束时,模型组大鼠的 Sua 水平约为对照组的 1.8 倍,符合血清尿酸轻度升高的临床特征。两个治疗组之间的比较显示无显著的统计学差异 ( $P>0.05$ ),模型组总尿酸排泄量显著高于对照组 ( $P<0.05$ ),SZF 组和别嘌醇组显著高于 OA 组 ( $P<0.05$ )。见表 2 和表 3。

表 2 各组不同时间点的血清尿酸水平 (mol/L)  
Table 2 Serum uric acid levels (mol/L) at different time points

| Groups                 | n | Week 0                        | Week 3                          | Week 5                          | Week 7                           |
|------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Control group          | 7 | 89.56 $\pm$ 4.18*             | 104.35 $\pm$ 12.49*             | 128.56 $\pm$ 23.96*             | 121.38 $\pm$ 12.66*              |
| OA group               | 7 | 91.69 $\pm$ 9.31 <sup>#</sup> | 226.45 $\pm$ 46.26 <sup>#</sup> | 224.80 $\pm$ 30.59 <sup>#</sup> | 222.30 $\pm$ 102.41 <sup>#</sup> |
| OA + allopurinol group | 7 | 81.47 $\pm$ 6.17*             | 119.93 $\pm$ 32.24*             | 179.01 $\pm$ 58.23*             | 137.57 $\pm$ 22.71*              |
| OA+SMS group           | 7 | 72.95 $\pm$ 5.57*             | 183.96 $\pm$ 52.93*             | 210.65 $\pm$ 34.39              | 167.26 $\pm$ 22.94*              |
| F                      |   | 12.005                        | 21.562                          | 32.927                          | 55.571                           |
| P                      |   | <0.001                        | <0.001                          | <0.001                          | <0.001                           |

Note: \* $P<0.05$  vs. OA group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs. OA+allopurinol group. Same below.

#### 2.2 各组大鼠血尿素氮和血肌酐水平比较

与对照组相比,OA 组的 BUN 和 Scr 水平显著升高 ( $P<0.05$ ),而接受 SMS 和别嘌醇治疗大鼠的 BUN 和 Scr 水平下降 ( $P<0.05$ )。见表 4。

#### 2.3 各组大鼠肾组织 H&E 染色结果比较

对照组的肾组织结构相对正常;模型组肾近端肾小管上皮细胞局部肿胀,空泡变性和炎性细胞浸润明显增多。此外,一小部分肾小管上皮细胞由于空泡变性表现出上皮细胞核脱落增加。对于 OA+SZF 和 OA+ 别嘌醇组,肾近端肾小管上皮细胞肿胀、空泡变性和炎性细胞浸润减少。见图 1。

表 3 各组总尿酸排泄量  
Table 3 Total uric acid excretion in each group

| Groups               | n | UPD(L/24 h)               | Uua(μmol/L)                   | Uua(μmol/24 L)              |
|----------------------|---|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Control group        | 7 | 0.036± 0.01 <sup>#</sup>  | 1969.34± 80.21 <sup>**</sup>  | 64.00± 20.78 <sup>**</sup>  |
| OA group             | 7 | 0.034± 0.01               | 4271.16± 149.50               | 124.39± 29.39 <sup>#</sup>  |
| OA+allopurinol group | 7 | 0.051± 0.00 <sup>*</sup>  | 4102.00± 156.09 <sup>*</sup>  | 211.91± 28.69 <sup>*</sup>  |
| OA+SMS group         | 7 | 0.045± 0.02 <sup>**</sup> | 3254.30± 196.99 <sup>**</sup> | 186.51± 24.72 <sup>**</sup> |
| F                    |   | 25.667                    | 95.127                        | 56.285                      |
| P                    |   | <0.001                    | <0.001                        | <0.001                      |

表 4 各组大鼠血尿素氮和血肌酐水平比较  
Table 4 Comparison of blood urea nitrogen and blood creatinine levels in each group of rats

| Groups               | n | BUN (mmol/L)             | Scr (μmol/L)             |
|----------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| Control group        | 7 | 4.40 ± 0.56 <sup>*</sup> | 12.45± 1.43 <sup>*</sup> |
| OA group             | 7 | 5.58± 1.30               | 19.54± 2.94              |
| OA+allopurinol group | 7 | 3.99± 0.82 <sup>*</sup>  | 12.93± 3.15 <sup>*</sup> |
| OA+SMS group         | 7 | 4.57± 0.40 <sup>**</sup> | 15.79± 2.17 <sup>#</sup> |
| F                    |   | 28.105                   | 16.922                   |
| P                    |   | <0.001                   | <0.001                   |

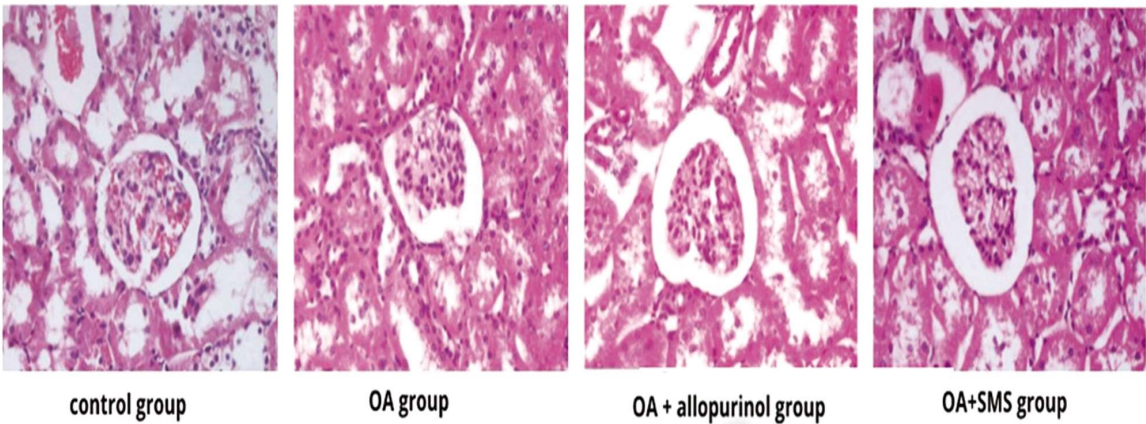


图 1 肾组织的 H&E 染色结果(400 倍)  
Fig.1 H & E staining results of renal tissue (400 times)

2.4 各组大鼠肾脏氧化应激反应指标水平比较

OA 诱导的高尿酸血症大鼠肾组织中氧化应激指标均升高 ( $P<0.05$ );即超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷

胱甘肽过氧化物酶之间存在显著的不平衡,而 SMS 和别嘌醇干预可显著回复以上氧化应激反应指标的动态平衡 ( $P<0.05$ )。结果如表 5 所示。

表 5 各组大鼠肾脏氧化应激反应指标水平比较  
Table 5 Comparison of renal oxidative stress response index levels in each group of rats

| Groups               | n | ROS(U/mL)                | SOD(U/mgprot)               | GSH-PX(U/mgprot)           | MDA(nmol/mgprot)         |
|----------------------|---|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Control group        | 7 | 8.36± 3.25 <sup>#</sup>  | 118.34± 16.96 <sup>**</sup> | 63.18± 13.56 <sup>**</sup> | 1.48± 0.35 <sup>**</sup> |
| OA group             | 7 | 12.98± 5.39 <sup>#</sup> | 52.52± 18.17                | 29.29± 23.83               | 2.76± 0.39               |
| OA+allopurinol group | 7 | 9.08± 3.57               | 83.46± 22.34 <sup>*</sup>   | 52.44± 14.37 <sup>*</sup>  | 1.59± 0.42 <sup>*</sup>  |
| OA+SMS group         | 7 | 8.99± 3.84 <sup>#</sup>  | 68.15± 19.62 <sup>**</sup>  | 51.29± 16.61 <sup>**</sup> | 1.57± 0.45 <sup>**</sup> |
| F                    |   | 14.569                   | 36.482                      | 22.175                     | 11.605                   |
| P                    |   | <0.001                   | <0.001                      | <0.001                     | <0.001                   |

## 2.5 SMS 通过抑制 TXNIP 抑制 NLRP3-ASC-Caspase-1 轴的激活

OA 组大鼠肾组织中 TXNIP mRNA 和蛋白表达显著高于其他组 ( $P<0.05$ ), 而 SMS 和别嘌呤醇有效抑制 TXNIP mRNA 和蛋白表达 ( $P<0.05$ )。高尿酸血症大鼠 NLRP3-ASC-caspase-1 轴中的 mRNA 和蛋白质表达升高 ( $P<0.05$ )。SMS 干预后组 NLRP3-ASC-caspase-1 轴的激活显著被抑制 ( $P<0.05$ )。

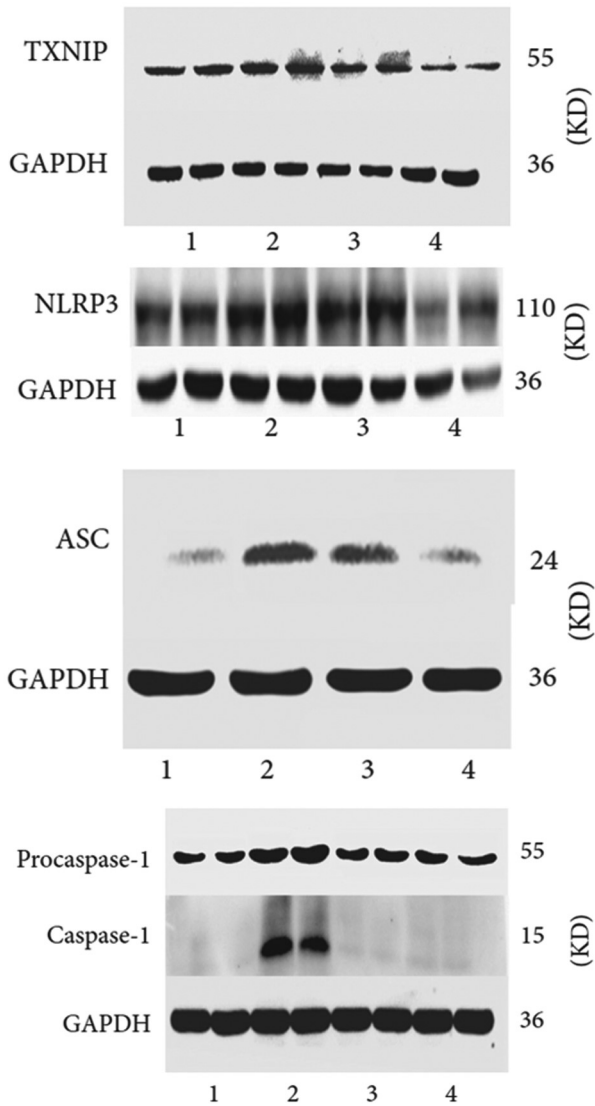


图2 SMS 通过抑制 TXNIP 抑制 NLRP3-ASC-Caspase-1 轴的激活  
Fig.2 The SMS inhibits the activation of the NLRP3-ASC-Caspase-1 axis by inhibiting the TXNIP

## 3 讨论

越来越多的证据表明,UA 诱导的炎症反应是高尿酸血症啮齿动物肾小管损伤的主要机制<sup>[11,12]</sup>。另外,NLRP3 的激活及其对炎症反应的介导作用在各种肾脏疾病中起关键作用<sup>[13,14]</sup>。Wen 等<sup>[15]</sup>发现 OA 引起的长期高尿酸血症促进了肾皮质的 OS,损伤了线粒体,并降低了 ATP 水平。王瑾等人<sup>[16]</sup>提出了线粒体损伤的动力学,解释了有缺陷的线粒体裂变增强了 NLRP3 炎症小体的激活并触发了异常的炎症反应,证实了 NLRP3 的激活和 NLRP3 介导的炎症反应显著影响肾间质的炎症。已有研究证实,线粒体 ROS 通过 TXNIP 激活 NLRP3 炎症小体,引

发快速的肾脏炎症反应,作为细胞氧化还原的敏感信号复合物调节剂,Trx/TXNIP 已成为连接氧化还原调节与疾病的关键点<sup>[17,18]</sup>。在细胞静止期间,TXNIP 和 Trx-1 结合并保持失活。Trx-1 控制细胞中的 ROS 水平并抑制 OS。当处于 OS 状态的细胞中存在高水平的 ROS 时,TXNIP 与 Trx-1 分离并与 NLRP3 结合以激活炎症体并调节炎症信号<sup>[20,21]</sup>。本研究中,在 UA 升高的条件下,肾组织中线粒体 ROS 和 TXNIP 的高表达引发了 NLRP3 过表达和肾脏炎症,而 ROS 被别嘌呤醇和 SMS 干预抑制,进而抑制 OS 并维持 TXNIP-Trx 键,并进一步抑制了 TXNIP 活性并阻止其与 NLRP3 结合,从而防止炎症体轴的激活并改善肾脏炎症和损伤<sup>[19]</sup>。

UA 促进 NLRP3 炎症体中下游 caspase-1 的激活,为促炎因子的激活和释放创造了一个关键平台<sup>[22,23]</sup>。由炎症细胞聚集和浸润引起的成肌细胞的形成以及炎症和促炎因子的激活是肾纤维化的重要因素,在这种情况下,CKD 进展为 ESRD<sup>[24,25]</sup>。赵等人<sup>[26]</sup>喂食含 2% OA 的大鼠标准饲料 6 周,分析发现 UA 促进了大鼠肾小管上皮细胞的上皮间质转化,而高尿酸血症诱导的 EMT 发生在肾间质纤维化之前,E-cadherin 表达的减少和  $\alpha$ -SMA 表达的增加表明 UA 诱导的肾小管上皮细胞表型转化;Snail 和 Slug 转录因子的激活减少了 E-cadherin 的合成,增加了泛素对 E-cadherin 的降解,从而促进了肾小管上皮细胞的表型转化。张薇等人<sup>[27]</sup>分析了患有 OA 诱导的高尿酸血症的实验大鼠,并证实高尿酸血症会引发系统性高血压和缺血性肾损伤,且在肾小管和间质区域观察到胶原沉积、巨噬细胞浸润和骨桥蛋白表达增加,表明 UA 参与肾脏炎症并引发肾小管和间质纤维化,而在本研究中则证实了 UA 水平升高可通过激活 NLRP3 炎症体引起肾脏炎症和间质纤维化,而 SMS 抑制这种激活,从而抑制肾间质炎症并减轻肾纤维化,与上述研究<sup>[26,27]</sup>结论一致。结合中医分析可知:祖国医学常将高尿酸血症归为“湿浊”“痹症”等范畴,是一组本虚标实、虚实夹杂的疾病,患者常由于先天禀赋不足,后天饮食不节,过食肥甘厚味,脾胃运化失司,久病痰浊瘀滞,湿浊之邪重浊腻滞,留滞脏腑,阻滞气机,导致气机升降失调,痰浊排泄不利、留滞经络、损害脏腑,故病初常无明显症状,久病则出现痛性关节炎及肾损伤。而本文使用 SMS 中,以四妙散加味而成,四妙散最早记载于清朝张秉成所著《成方便读》中,苍术、黄柏清热祛湿,牛膝活血祛瘀、补肝肾、引血下行,薏苡仁健脾利湿,加威灵仙祛风除湿、通络止痛,加土茯苓清热解毒、利水渗湿、消肿止痛,木通、泽泻清热泄浊通淋,山楂、红曲、荷叶并用以健脾益肾、祛痰降浊,川芎活血行气止痛,炙甘草调和诸药,诸药合用共奏清热除痹、燥湿降浊之效。

NLRP3 控制 caspase-1 的激活,并通过典型的炎症体途径导致细胞焦亡,典型的炎症通路 caspase-1-GSDMD 在细胞焦亡中起决定性作用<sup>[28]</sup>。除了纤维化、自噬、细胞凋亡和细胞焦亡等几种病理变化外,肾梗死侧的肾小管和间质炎症浸润<sup>[29]</sup>。Nrf-2 激动剂儿茶素治疗的应用有效保护了线粒体功能,改善了肾血流,并显著降低 UUO 肾脏的 OS、炎症、纤维化和三种程序性细胞死亡<sup>[30]</sup>。本结果表明,SMS 有效抑制了 NLRP3-ASC-caspase-1 轴的激活,降低了 caspase-1 蛋白的表达并阻止它们切割 GSDMD,结合上述研究<sup>[28,29]</sup>结果分析其原因在于:SMS 抑

制的整个过程过程阻碍了细胞焦亡途径,保护细胞膜的完整性并确保正常的细胞功能。

总之,通过抑制高尿酸血症实验大鼠肾脏中的线粒体ROS,SMS可抑制NLRP3炎症小体的活化,从而减轻肾小管炎症、细胞焦亡和肾间质纤维化。SMFF在减少Sua、保护肾功能、改善肾脏炎症和纤维化方面表现出优异的性能,另外,与治疗高水平UA的经典药物别嘌醇相比,SMS不会引起过敏反应,对肝脏或肾脏无毒。

#### 参考文献(References)

- [1] Su HY, Yang C, Liang D, et al. Research Advances in the Mechanisms of Hyperuricemia-Induced Renal Injury [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 5817348
- [2] Yanai H, Adachi H, Hakoshima M, et al. Molecular Biological and Clinical Understanding of the Pathophysiology and Treatments of Hyperuricemia and Its Association with Metabolic Syndrome, Cardiovascular Diseases and Chronic Kidney Disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9221
- [3] Sellmayr M, Hernandez Petzsche MR, Ma Q, et al. Only Hyperuricemia with Crystalluria, but not Asymptomatic Hyperuricemia, Drives Progression of Chronic Kidney Disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(12): 2773-2792
- [4] Braga TT, Davanzo MR, Mendes D, et al. Sensing soluble uric acid by Naip1-Nlrp3 platform[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2): 158
- [5] Zhou X, Zhang B, Zhao X, et al. Chlorogenic acid supplementation ameliorates hyperuricemia, relieves renal inflammation, and modulates intestinal homeostasis [J]. Food Funct, 2021, 12 (12): 5637-5649
- [6] Zeng W, Wu D, Sun Y, et al. The selective NLRP3 inhibitor MCC950 hinders atherosclerosis development by attenuating inflammation and pyroptosis in macrophages[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 19305
- [7] Zhang X, Liu Y, Deng G, et al. A Purified Biflavonoid Extract From *Selaginella moellendorffii* Alleviates Gout Arthritis via NLRP3/ASC/Caspase-1 Axis Suppression[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 676297
- [8] Zhang J, Dai Y, Yang Y, et al. Calcitriol Alleviates Hyperosmotic Stress-Induced Corneal Epithelial Cell Damage via Inhibiting the NLRP3-ASC-Caspase-1-GSDMD Pyroptosis Pathway in Dry Eye Disease[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 2955-2962
- [9] 张志明,高碧珍,齐张,等. 基于肠道上皮细胞相关转运子探讨四妙散对高尿酸血症小鼠的祛湿机制[J]. 风湿病与关节炎, 2020, 9(1):5
- [10] 奉红梅. 四妙散加味治疗无症状性高尿酸血症疗效观察 [J]. 陕西中医, 2015, (3): 332-333
- [11] Chen MQ, Wang HY, Shi WR, et al. Estimate of prevalent hyperuricemia by systemic inflammation response index: results from a rural Chinese population[J]. Postgrad Med, 2021, 133(2): 242-249
- [12] Li H, Liu X, Lee MH, et al. Vitamin C alleviates hyperuricemia nephropathy by reducing inflammation and fibrosis [J]. J Food Sci, 2021, 86(7): 3265-3276
- [13] Kim SM, Lee SH, Kim YG, et al. Hyperuricemia-induced NLRP3 activation of macrophages contributes to the progression of diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308 (9): F993-F1003
- [14] Cui D, Liu S, Tang M, et al. Phloretin ameliorates hyperuricemia-induced chronic renal dysfunction through inhibiting NLRP3 inflammasome and uric acid reabsorption[J]. Phytomedicine, 2020, 66: 153111
- [15] Wen L, Yang H, Ma L, et al. The roles of NLRP3 inflammasome-mediated signaling pathways in hyperuricemic nephropathy[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(3): 1377-1386
- [16] 王瑾,王加强,邱洪,等. miR-223 通过调控 NLRP3 炎症小体减轻免疫球蛋白 A 肾病大鼠肾脏损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2020,36 (24): 6
- [17] Wu M, Ma Y, Chen X, et al. Hyperuricemia causes kidney damage by promoting autophagy and NLRP3-mediated inflammation in rats with urate oxidase deficiency [J]. Dis Model Mech, 2021, 14 (3): dmm048041
- [18] Liu P, Wang W, Li Q, et al. Methyl Gallate Improves Hyperuricemia Nephropathy Mice Through Inhibiting NLRP3 Pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 759040
- [19] Zhuang J, Zhou X, Liu T, et al. Astaxanthin attenuated hyperuricemia and kidney inflammation by inhibiting uric acid synthesis and the NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathways in potassium oxonate and hypoxanthine-induced hyperuricemia mice [J]. Pharmazie, 2021, 76 (11): 551-558
- [20] Lv H, Zhu C, Wei W, et al. Enhanced Keap1-Nrf2/Trx-1 axis by daphnetin protects against oxidative stress-driven hepatotoxicity via inhibiting ASK1/JNK and Txnip/NLRP3 inflammasome activation[J]. Phytomedicine, 2020, 71: 153241
- [21] Qiu H, Liu X. Echinacoside Improves Cognitive Impairment by Inhibiting A $\beta$  Deposition Through the PI3K/AKT/Nrf2/PPAR  $\gamma$  Signaling Pathways in APP/PS1 Mice[J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(8): 4987-4999
- [22] Cui D, Liu S, Tang M, et al. Phloretin ameliorates hyperuricemia-induced chronic renal dysfunction through inhibiting NLRP3 inflammasome and uric acid reabsorption[J]. Phytomedicine, 2020, 66: 153111
- [23] Shen S, He F, Cheng C, et al. Uric acid aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury via ROS/NLRP3 pyroptosis pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110990
- [24] Rapa SF, Di Iorio BR, Campiglia P, et al. Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease-Potential Therapeutic Role of Minerals, Vitamins and Plant-Derived Metabolites [J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 263
- [25] Henson JB, Sise ME. The association of hepatitis C infection with the onset of CKD and progression into ESRD [J]. Semin Dial, 2019, 32 (2): 108-118
- [26] Zhao L, Li C, Zhou B, et al. Crucial role of serum response factor in renal tubular epithelial cell epithelial-mesenchymal transition in hyperuricemic nephropathy [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(22): 10597-10609
- [27] 张薇,马开,周红艳,等. 真武汤调控 AVP/AQP2 通路改善自发性高血压大鼠肾损伤研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 5
- [28] 董婉茹,李寒,李云凤,等. 基于骨骼肌 NLRP3/caspase-1/IL-1 $\beta$ , IL-18 通路的黄连温胆汤改善 IGT 机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(17): 8
- [29] Jung SW, Kim SM, Kim YG, et al. Uric acid and inflammation in kidney disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 318 (6): F1327-F1340
- [30] Hejazian SM, Hosseiniyan Khatibi SM, Barzegari A, et al. Nrf-2 as a therapeutic target in acute kidney injury [J]. Life Sci, 2021, 264: 118581