

复方青秦液对尿酸性肾病大鼠肾组织 Toll 样受体表达的影响

陈 伟¹ 陆 妍² 王亚南² 林子超² 顾 文³ 谭 玲⁴
马卫国² 刘 慧² 张春艳² 孟凤仙²

摘要 **目的** 观察复方青秦液对尿酸性肾病大鼠肾组织 Toll 样受体 TLR2、TLR4 基因及蛋白表达的影响,探讨其肾脏保护的机制。**方法** 将 55 只 SD 大鼠随机分为正常组 5 只;模型组、阳性药组及中药大、中、小剂量组,每组各 10 只,用腺嘌呤灌胃伴饲酵母造模。正常组及模型组每日灌胃蒸馏水 10 mL/kg,阳性药组每日灌胃别嘌醇 9.33 mg/kg,中药大、中、小剂量组每日灌胃复方青秦液 3.77、1.89、0.94 g/kg,连续 6 周。4 周和 6 周时分别处死部分大鼠,留取肾脏组织,RT-PCR 检测 TLR2、TLR4 mRNA 转录水平,Western blot 测定 TLR2、TLR4 蛋白表达水平,免疫组化测定 TLR4 蛋白表达水平。**结果** 与正常组同期比较,4、6 周模型组大鼠肾组织 TLR4 mRNA 转录水平、TLR2、TLR4 蛋白表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组同期比较,4、6 周复方青秦液各剂量组 TLR2、TLR4 mRNA 转录水平差异均无统计学意义($P > 0.05$),6 周复方青秦液各剂量组 TLR2、TLR4 蛋白表达水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 复方青秦液可通过降低 TLR2、TLR4 蛋白表达以抑制肾组织炎性病理损伤。

关键词 尿酸性肾病;Toll 样受体;复方青秦液

Effect of Compound Qingqin Liquid on the Expression of Toll-like Receptor in the Renal Tissue of Rats with Urate Nephropathy CHEN Yi¹, LU Yan², WANG Ya-nan², LIN Zi-chao², GU Wen³, TAN Ling⁴, MA Wei-guo², LIU Hui², ZHANG Chun-yan², and MENG Feng-xian² 1 Doctoral Student of Dongfang Hospital, Second Clinical Medical College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078), China; 2 Department of Rheumatology, Dongfang Hospital, Second Clinical Medical College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078), China; 3 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Clinical Medical College of Capital Medical University, Beijing (100010), China; 4 Department of Encephalopathy, Changping Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing (102208), China

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of Compound Qingqin Liquid (CQL) on Toll-like receptor 2 (TLR2) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in rats with urate nephropathy, and to explore its renal protection mechanism. **Methods** Totally 55 SD rats were randomly divided into 5 groups, i.e., the normal control group ($n=5$), the model group ($n=10$), the positive drug group ($n=10$), and the high-, medium-, low-dose CQL groups ($n=10$) respectively. The urate nephropathy model was induced by intragastrically administering adenine and feeding yeast. Distilled water was intragastrically administered at the daily dose of 10 mL/kg to rats in the normal control group and the model group. Allopurinol was intragastrically administered at the daily dose of 9.33 mg/kg to rats in the positive control group. CQL was intragastrically administered at the daily dose of 3.77, 1.89, 0.94 g/kg to rats in the high-, medium-, and low-dose CQL groups. Rats of each group were executed in batches at the 4th and 6th week respectively.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30973918)

作者单位 1. 北京中医药大学东方医院(北京 100078); 2. 北京中医药大学东方医院风湿科(北京 100078); 3. 首都医科大学附属北京中医医院(北京 100010); 4. 北京市昌平区中西医结合医院脑病科(北京 102208)

通讯作者:孟凤仙, Tel: 010-67689656, E-mail: chenyl86321@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.06.0722

Their kidney tissues were taken out to determine the mRNA transcription level of TLR2 and TLR4 by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expression level of TLR2 and TLR4 were determined by Western blot. The protein expression level of TLR4 was also detected by immunohistochemical assay. Results At week 4 and 6, the protein expression of TLR2 and TLR4 as well as the mRNA transcription of TLR4 increased in the model group, when compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, there was no statistical difference in the transcription level of TLR2 mRNA or TLR4mRNA among the 3 CQL groups ($P > 0.05$) at week 4 and 6. Additionally, at week 6, the protein expression of TLR4 and TLR2 could be reduced by CQL ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion CQL might protect kidney tissue against inflammatory injury by inhibiting the protein expression levels of TLR2 and TLR4.

KEYWORDS Compound Qingqin Liquid; urate nephropathy; Toll-like receptor

尿酸性肾病 (Urate Nephropathy, UN) 是高尿酸血症 (Hyperuricemia, HUA) 最常见并发症之一, 最终可导致肾功能衰竭, 影响人类生命健康。探讨病理机制及寻找有效治疗靶点成为当今研究的热点。近年来 UN 炎症学说备受关注。已有实验表明, 轻度的 HUA 就可恶化肾损害或导致肾功能障碍, 并证实其机制可能与促炎途径有关^[1]。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是机体炎症反应链的启动蛋白, 参与多种肾脏炎症疾病的发生^[2,3], 而其是否参与了 HUA 肾损伤发生发展的过程, 目前国内外鲜有研究。复方青秦液是孟凤仙教授临床经验方, 具有清热解毒、化瘀止痛的功效, 治疗 HUA 肾损害有良好效果。相关动物实验证实复方青秦液能降低 UN 大鼠血尿酸水平^[4], 并减轻 UN 大鼠肾小管萎缩、尿酸盐结晶和炎症细胞浸润等病变^[5], 并可下调 COX-2、Ang II、NF- κ B、MCP-1、ICAM-1 等炎性细胞因子 mRNA 转录及蛋白高表达, 对 UN 大鼠肾功能损伤具有保护作用。本实验通过观察 UN 模型大鼠肾组织 TLR2、TLR4 基因蛋白表达及复方青秦液对其的影响, 探讨 UN 的发病机制及复方青秦液对肾组织炎性损伤的抑制作用。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SD 大鼠 55 只, 体重 (250 ± 50) g, SPF/AAF 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物批号: SCXK (京) 2006-2009。

2 药物 复方青秦液免煎颗粒剂 (组方: 青蒿 15 g 秦艽 15 g 山萸肉 10 g 土茯苓 15 g 川草薢 10 g 车前子 15 g 秦皮 10 g 苏木 8 g 等共 10 味药) 由北京中医药大学东方医院药剂科提供, 实验前蒸馏水配制成 3.77、1.89、0.94 g/kg 3 种浓度溶液。别嘌醇片 (0.1 mg/片, 北京优华药业有限公司,

批号: 109112)。腺嘌呤 (美国 sigma, 批号: 20100516)。羧甲基纤维素钠 (北京科海荣京生物科技有限公司, 批号: 20100807)。酵母饲料 (中国医学科学院实验动物中心, 批号: 20101218)。

3 主要试剂与仪器 Tris、APS、SDS、TEMED、Tween-20、丙烯酰胺、甘氨酸: Sigma 公司生产。ECLTM 发光液: GE 公司生产。一抗为 ACTIN 抗体 (美国 SANTA 公司, 批号: sc-47778)、TLR2 (abcam 公司, 批号: ab13855)、TLR4 抗体 (abcam 公司, 批号: ab30667), 二抗为羊抗鼠 IgG (中杉金桥公司, 批号: ZB-2302)、羊抗兔 IgG (中杉金桥公司, 批号: ZB-2301)。Trizol 提取总 RNA 试剂 (Invitrogen 公司, 批号: 51941204)。GAPDH、H1N1 上下游引物: 美国 invitrogen (上海) 英骏生物技术有限公司合成。One Step SYBR RT-PCR Kit (Takara 公司生产, 批号: DRR086A)。BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司产品, 批号: P0012)。Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪: 美国应用生物系统 (ABI) 公司。TC-96/G/H (b) 梯度 PCR 仪: 博日科技有限公司。自动光学照相生物显微镜: 日本 Olympus X71。HC-3018R 高速冷冻离心机: 中科中佳公。AR1140 动物脏器电子天平: 美国 OHAUS。紫外分光光度计 UV-2000: 尤尼柯上海仪器有限公司。

4 动物分组及造模 参照文献^[6]方法, 将雄性 SD 大鼠随机分为模型组、阳性药组及中药大、中、小剂量组, 每组 10 只, 同时设正常组 5 只。除正常组予每日蒸馏水 10 mL/kg 灌胃外, 余各组将腺嘌呤溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液中, 以 100 mg/(kg·d) 灌胃, 同时予质量分数 10% 的酵母饲料 100 g/(kg·d) 喂养, 连续 18 天。18 天后行眼眶内眦取血, 测定血尿酸水平, 高于 82.50 μ mol/L^[7], 与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明

HUA 模型大鼠造模成功。同时测定尿蛋白浓度明显高于正常组($P < 0.05$),提示肾脏受损,高尿酸肾损伤造模成功^[4,5]。造模过程中模型组、阳性药组各有 1 只大鼠死亡。

5 干预方法 正常组及模型组每日予蒸馏水 10 mL/kg 灌胃,阳性药组每日予别嘌醇 9.33 mg/kg 灌胃,相当于临床成人用量的 5.6 倍,中药大、中、小剂量组每日分别予复方青秦液 3.77、1.89、0.94 g/kg 灌胃,相当于临床成人用量的 11.2、5.6、2.8 倍。各组大鼠给药每天 1 次,连续 6 周。

6 标本采集 分别于灌胃 4 周和 6 周时随机抽取各组部分大鼠麻醉取血后处死,左侧肾脏固定于 10% 中性福尔马林溶液备用,取右侧肾脏置于液氮罐保存。

7 观察指标与检测方法

采用 RT-PCR 扩增 TLR2、TLR4 mRNA 转录水平。Western blot 电泳技术测定 TLR2、TLR4 蛋白表达水平。免疫组化测定 TLR4 蛋白表达水平。

7.1 各组大鼠肾组织 TLR2、TLR4 mRNA 转录水平 采用 RT-PCR 扩增。引物设计与合成 TLR2 基因序列的上下游引物分别是:5'-CGCTTCCT-GAACTTGTC-3'和 5'-GGTTGTACCTGCTTCCA-3';TLR4 基因序列的上下游引物分别是:5'-CTAT-CATCAGTGTATCGGTG-3'和 5'-CAGTCCTCAT-TCTGGCTC-3';针对看家基因 ACTIN 基因序列的引物分别是:5'-CCCATCTATGAGGGTACGC-3'和 5'-TTTAATGTACGCACGATTTC-3'。Real-time RT-PCR 扩增 使用 Trizol 试剂提取肾组织中的 RNA 后,分别用上述引物进行一步法实时荧光 PCR 反应,反应体积为 20 μ L,反应体系含样本 RNA 2 μ L,One Step SYBR RT-PCR Kit 17.2 μ L,10 μ mol 引物各 0.8 μ L。反应条件为:42℃ 灭活 5 min,95℃ 变性 10 s,95℃ 退火 5 sec,60℃ 延伸 34 sec,共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析,以鉴定 PCR 产物的特异性。使用 Sequence Detection System 软件分析 PCR 过程各检测样本的 Ct (Threshold of cycle) 值。

7.2 各组大鼠肾组织 TLR2、TLR4 蛋白表达水平 采用 Western blot 检测方法。称取肾组织需要量(约 50 mg),加入 200 μ L 蛋白裂解液,彻底混匀。冰上匀浆 15 min。匀浆后,4℃,12 000 r/pm 离心 10 min。取上清,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,将各样本蛋白浓度调整至相同,加载样缓冲液后,煮沸 5 min 使其变性备用。采用 SDS 聚丙烯凝胶电

泳,电泳时依次配制 12% 分离胶,5% 浓缩胶,加样,电泳,浓缩胶 80V,分离胶 120V,待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。湿法电转移至 PVDF 膜,约 120 min,放入 TBST 中洗 1 次,5 min。将 PVDF 膜放入封闭袋中,根据膜面积以 0.1 mL/cm² 量加入封闭液 TBST (含 5% 脱脂奶粉),将膜浸入后,在水平摇床上缓缓摇动,室温 2 h。用封闭液将一抗按照 1:1 000 比例稀释,与膜共同孵育,4℃ 过夜。孵育结束,TBST 洗 3 次,每次 10 min。用封闭液稀释辣根过氧化物标记的二抗,稀释比例 1:5 000,将稀释后的二抗与膜共同孵育 2 h。孵育结束,TBST 洗 4 次,每次 10 min。ECL 曝光:使用 ECL 化学发光显色液。采用凝胶图像分析系统对 Western blotting 蛋白杂交条带进行扫描,并用 AlphaView SA 软件对图像进行灰度分析。相对含量的变化 = 目的蛋白灰度 / Actin 灰度。

7.3 各组大鼠左肾 TLR4 蛋白表达强度 采用免疫组化方法。大鼠左肾固定后于北京雪邦科技有限公司进行检测。石蜡切片常规脱蜡脱水,微波热修复抗原,双氧水封闭内源性过氧化物酶,山羊血清封闭非特异性抗原,PBS 稀释一抗 1:12 000 滴加,37℃ 孵育 90 min,滴加二抗进 37℃ 温箱 20 min,滴加三抗(试剂 SABC)后置于 37℃ 20 min,DAB 显色,苏木精复染后中性树胶封片。用自动光学照相生物显微镜,以胞浆内棕黄色颗粒为阳性,不着色为阴性。每张切片于阳性表达区随机选取 3 个视野(40×10),使用 IPP 6.0 真彩色图像分析系统,测定免疫组化切片 3 个视野内阳性表达区平均积分光密度值,每张切片选择 3 个视野测定,结果取均值。平均积分光密度值反映照片上免疫反应物的表达强度。

8 统计方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 RT-PCR 检测各组大鼠肾组织 TLR2、TLR4 mRNA 转录水平比较(表 1) 4、6 周时,正常组大鼠肾组织 TLR2 mRNA 低表达,未检测出 TLR4 mRNA 表达。与正常组同期比较,4、6 周模型组 TLR2 mRNA 转录水平差异均无统计学意义($P > 0.05$),TLR4 mRNA 表达均上调($P < 0.05$)。与模型组同期比较,阳性药及中药各剂量组 4、6 周 TLR2 mRNA、4 周时 TLR4 mRNA 转录水平差异无统计学意义($P > 0.05$),6 周时阳性药组 TLR4 mRNA 表达下调($P < 0.05$),中药大、中、小剂量组 TLR4 mRNA 转录水平

差异无统计学意义($P > 0.05$)。与阳性药组同期比较,6 周时,中药大、中剂量组 TLR2 mRNA 表达下调($P < 0.01$),中药大、中、小剂量组 TLR4 mRNA 表达上调($P < 0.01, P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠灌胃 4、6 周后肾组织 TLR2、TLR4 mRNA 转录水平比较 (cpm, $\bar{x} \pm s$)				
组别	时间	<i>n</i>	TLR2 mRNA	TLR4 mRNA
正常	4 周	3	91.20 $\pm$ 12.45	—
	6 周	2	91.20 $\pm$ 12.45	—
模型	4 周	6	55.63 $\pm$ 0.15	104.03 $\pm$ 5.70 *
	6 周	3	580.70 $\pm$ 228.90	2 487.53 $\pm$ 464.60 *
阳性药	4 周	6	187.79 $\pm$ 149.41	390.85 $\pm$ 55.00
	6 周	3	153.07 $\pm$ 6.36	396.40 $\pm$ 96.78 Δ
中药大剂量	4 周	6	204.41 $\pm$ 70.13	383.47 $\pm$ 135.91
	6 周	4	2.67 $\pm$ 3.75 $\Delta\Delta$	2 071.72 $\pm$ 333.44 Δ
中药中剂量	4 周	6	75.60 $\pm$ 60.00	305.45 $\pm$ 306.73
	6 周	4	10.01 $\pm$ 1.43 $\Delta\Delta$	2 078.33 $\pm$ 112.30 $\Delta\Delta$
中药小剂量	4 周	6	124.68 $\pm$ 127.12	440.69 $\pm$ 12.87
	6 周	4	331.74 $\pm$ 147.06	2 492.32 $\pm$ 442.12 Δ

注:与正常组同期比较,* $P < 0.05$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$;与阳性药组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

2 Western blot 检测各组大鼠肾组织 TLR2、TLR4 蛋白表达水平比较(表 2,图 1) 4、6 周时,正常组大鼠肾组织未检测出 TLR4 蛋白表达。与正常组同期比较,模型组 4、6 周 TLR2、TLR4 蛋白表达水平均升高($P < 0.01, P < 0.05$),6 周时表达更高。与模型组同期比较,4 周时阳性药组、中药各剂量组 TLR2、TLR4 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),6 周时阳性药组、中药各剂量组 TLR2 蛋白表达水平降低($P < 0.01, P < 0.05$),阳性药组、中药大、中剂量组 TLR4 蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。与阳性药组同期比较,6 周时中药中、小剂量组 TLR2 蛋白表达水平升高($P < 0.05$),中药大剂量组 TLR4 蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。

3 免疫组化检测各组大鼠肾组织 TLR4 蛋白表

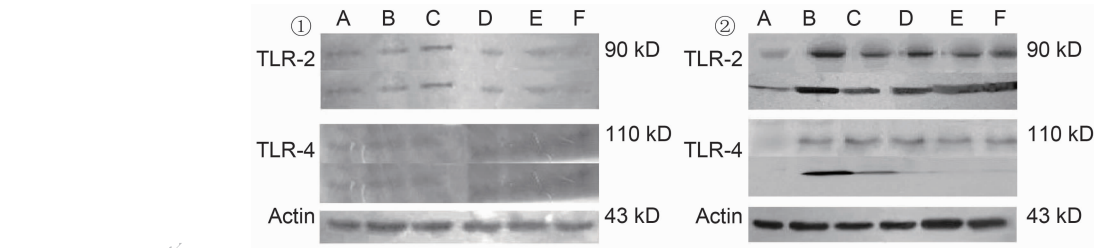
表 2 各组大鼠灌胃 4、6 周后肾组织 TLR2、TLR4 蛋白表达比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)				
组别	时间	<i>n</i>	TLR2 蛋白	TLR4 蛋白
正常	4 周	3	0.16 $\pm$ 0.00	—
	6 周	2	0.16 $\pm$ 0.00	—
模型	4 周	6	0.24 $\pm$ 0.02 *	0.18 $\pm$ 0.03 *
	6 周	3	0.47 $\pm$ 0.02 **	0.58 $\pm$ 0.06 **
阳性药	4 周	6	0.27 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.03
	6 周	3	0.22 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	0.41 $\pm$ 0.01 Δ
中药大剂量	4 周	6	0.23 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.01
	6 周	4	0.24 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	0.29 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta\Delta$
中药中剂量	4 周	6	0.19 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.01
	6 周	4	0.27 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta\Delta$	0.35 $\pm$ 0.04 Δ
中药小剂量	4 周	6	0.21 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02
	6 周	4	0.34 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$	0.41 $\pm$ 0.05

注:与正常组同期比较,* $P < 0.05, ** P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$;与阳性药组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

达强度比较(表 3、图 2,3) TLR4 染色分布于细胞质中,免疫组化染色阳性部位呈棕黄色颗粒,正常组样本中 TLR4 呈现极低表达。与正常组同期比较,模型组 4、6 周平均积分光密度值均升高($P < 0.01$);与模型

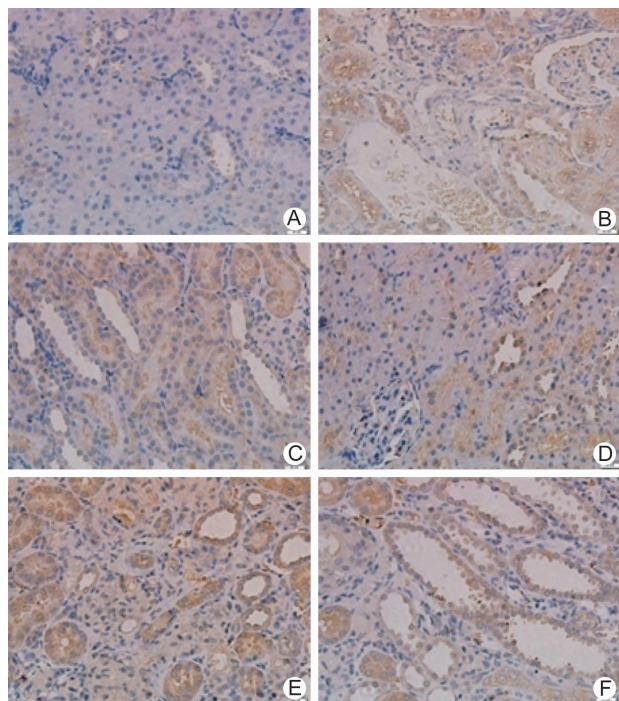
表 3 各组大鼠灌胃 4、6 周后肾组织 TLR4 蛋白表达强度比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	时间	<i>n</i>	平均积分光密度
正常	4 周	3	491.22 $\pm$ 0.00
	6 周	2	491.22 $\pm$ 0.00
模型	4 周	6	6 230.36 $\pm$ 476.70 *
	6 周	3	6 936.82 $\pm$ 304.57 *
阳性药	4 周	6	5 452.82 $\pm$ 393.77
	6 周	3	5 459.62 $\pm$ 322.92 Δ
中药大剂量	4 周	6	6 105.22 $\pm$ 236.19
	6 周	4	5 537.74 $\pm$ 199.81 Δ
中药中剂量	4 周	6	7 031.86 $\pm$ 396.78
	6 周	4	5 305.50 $\pm$ 251.22 Δ
中药小剂量	4 周	6	4 314.52 $\pm$ 279.72 Δ
	6 周	4	4 507.79 $\pm$ 337.62 Δ

注:与正常组同期比较,* $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$



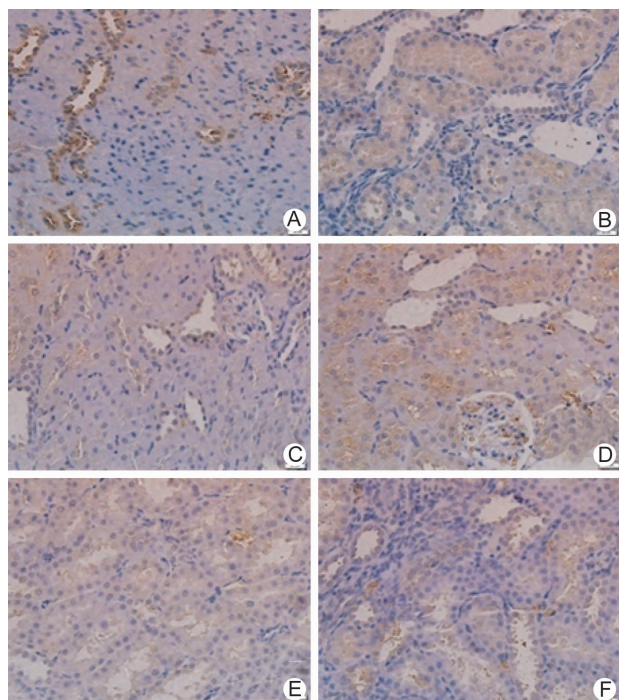
注:①、②分别为 4、6 周蛋白印迹图;A 为正常组;B 为模型组;C 为阳性药组;D 为中药大剂量组;E 为中药中剂量组;F 为中药小剂量组

图 1 各组大鼠肾组织 TLR2、TLR4 蛋白印迹图



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为阳性药组;D 为中药大剂量组;E 为中药中剂量组;F 为中药小剂量组

图2 各组大鼠 4 周肾组织 TLR4 表达
(免疫组化染色, ×400)



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为阳性药组;D 为中药大剂量组;E 为中药中剂量组;F 为中药小剂量组

图3 各组大鼠 6 周肾组织 TLR4 表达
(免疫组化染色, ×400)

($P < 0.05$), 6 周时阳性药、中药各剂量组平均积分光密度值均减低($P < 0.05$)。

讨 论

长期血尿酸升高可引起肾功能损害。除尿酸盐形成肾结石导致急性肾损伤外,血尿酸升高在肾功能下降中是否发挥病因性作用尚无定论。近年来已有研究开始探讨慢性 UN 可能的发病机制^[8],并建立慢性痛风肾病模型^[6]。由于大鼠本身尿囊素可影响 UA 代谢,一般认为 HUA 大鼠的肾组织病理损害只能维持 4 周。课题组通过此次实验发现,6 周时 HUA 对肾脏损伤仍进行性加重,且促炎因子 TLRs 在 HUA 大鼠肾组织中出现异常表达。

Toll 样家族是天然免疫系统中的跨膜受体,可非特异的与病原相关分子结合,启动信号转导,最终导致核因子 NF- κ B 激活,诱发炎症介质表达,因而成为联系天然免疫和获得性免疫的纽带,可能在一系列免疫性疾病中发挥作用。肾小管上皮细胞为非免疫细胞,但表达 TLR1、2、3、4、6 型受体,其中 TLR 2、4 活化可特异性激活 NF- κ B 途径,促使 C-C 趋化因子释放,巨噬细胞浸润,诱导肾小管免疫应答损伤^[9]。TLRs 还可参与免疫应答介导的肾小管间质损伤^[10]。

HUA 时,尿酸盐结晶沉积于肾小管细胞,活化白细胞后,刺激肾小管上皮细胞 TLR2、4 高表达,并识别相关配体,通过髓样细胞分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖机制和 MyD88 非依赖机制,最终激活 NF- κ B 途径^[11],诱导肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、黏附分子(cell adhesion molecules, CAM)、IL 等炎症因子表达,造成肾脏局部炎症浸润和组织损伤。同时,组织损伤暴露出的大量 TLR4 配体如纤维蛋白原、硫酸乙酰肝素、纤维连接蛋白等可诱导 TLR4 的表达和活化,进一步激活 NF- κ B 而导致爆发性炎症反应^[12],最终导致炎症持续及肾组织纤维化的形成。因此 TLR2、4/NF- κ B 被证实是炎症反应的起始信号通路之一,在诱导肾脏免疫炎症反应中起重要作用。本次实验发现,TLR2 表达 4 周时与正常组比较变化不大,至 6 周时出现升高,TLR4 造模后 6 周持续高表达。证实 HUA 大鼠肾组织存在持续性炎症状态。

孟凤仙教授通过多年临床观察,认为 HUA 肾损伤的中医病机多为脾肾亏虚,湿热瘀浊阻滞,并据此拟复方青秦液。该方由青蒿、秦艽、山萸肉、土茯苓、川萆薢、车前子、秦皮、苏木等药物组成,具有益肾降浊、利湿清热化瘀的功效。方中山萸肉滋阴益肾、固摄精微,

扶正为君。秦艽、土茯苓、萆薢健脾利湿,泄浊清热,佐以苏木、车前子等活血化瘀,利尿渗湿之品,祛邪外出。全方相合,益肾降浊,清热利湿,化瘀通络,补虚泻实,标本兼顾,具有良好临床疗效。课题组已有相关研究围绕复方青秦液治疗 HUA 肾损害的临床及分子机制方面展开,并取得满意效果。研究证明^[4],该方对 HUA 肾损害模型大鼠血尿酸水平、血肌酐、尿素氮及尿蛋白等指标有显著改善作用。结合既往^[13,14]及本次实验研究结果显示:大鼠尿酸水平与血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ, AngⅡ)、环氧化酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)、核转录因子(nuclear factor kappa B, NF-κB)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、TLR2、TLR4 的 mRNA 转录及蛋白表达水平呈正相关。提示:高尿酸致肾组织损伤的机制之一是由尿酸盐刺激,活化及启动 AngⅡ、COX-2 相关的免疫炎症反应通路,AngⅡ诱导 TLR2、TLR4 表达上调,刺激 NF-κB 抑制蛋白 I-κB 磷酸化降解, NF-κB 释放活化入核,启动相应基因转录,激活介导众多炎症因子表达,参与 HUA 肾组织炎症损伤过程。

复方青秦液抑制 HUA 肾损害的分子机制:(1)可能与其下调 TLR2、TLR4 的高表达,抑制 NF-κB 等炎症因子介导的免疫炎症反应,从而改善肾组织病理损伤相关。(2)可能与别嘌呤醇作用途径相同。本实验选用减少尿酸生成的经典药物黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇为阳性对照药。实验结果显示:别嘌呤醇组 TLR2、TLR4 表达较模型组显著下调,推测其机制可能由于别嘌呤醇抑制尿酸生成,减少肾组织局部尿酸盐结晶沉积,从而降低了炎症因子被激活的几率,降低了炎症损伤的风险。所以别嘌呤醇组 TLR2、TLR4 表达较模型组下调。故推论:复方青秦液通过降低尿酸水平及抑制 HUA-TLR2、4/NF-κB 免疫炎症损伤途径的多靶点调节机制,达到保护高尿酸性肾损害的目的。而别嘌呤醇有无特异性调节 TLR2、TLR4 的机制未见相关报道,有待于进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Roncal CA, Mu W, Croker B, et al. Effect of elevated serum uric acid on cisplatin-induced acute renal failure [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(1): F116-F122.
- [2] Huiling W, Gang C, Kate R, et al. TLR4 activation

mediates kidney ischemia/reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10): 2847-2859.

- [3] Verma A, Prasad KN, Gupta RK, et al. Toll like receptor 4 polymorphism and its association with symptomatic neurocysticercosis [J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(8): 1219-1225.
- [4] 商学征,马卫国,白羽,等. 复方青秦液对尿酸性肾病大鼠肾功能的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(9): 31-36.
- [5] 高双荣,马卫国,商学征,等. 复方青秦对痛风性肾病大鼠肾组织病理学的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 183-186.
- [6] 邢儒伶,孟冬梅,任伟,等. 建立痛风性肾病并发慢性肾功能衰竭动物模型方法的探讨 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(10): 1409-1413.
- [7] 王冬平,曾林,尚世臣,等. 实验动物血液生理生化参考手册 [M]. 北京:科学出版社, 2011: 129.
- [8] 张晓敏,刘宏,刘必成. 高尿酸血症与慢性肾脏病发生发展关系的研究进展 [J]. *东南大学学报(医学版)*, 2013, 32(1): 114-117.
- [9] Wolfs TG, Buurman WA, Van SA, et al. *In vivo* expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation [J]. *J Immunol*, 2002, 168(3): 1286-1293.
- [10] 洪英礼,金英顺,崔镇花,等. TLR 活化参与环孢素 A 诱发的慢性肾小管间质损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(3): 555-559.
- [11] Abreu MT. Immunologic regulation of Toll-like receptor in gut epithelium [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2003, 19(6): 559-564.
- [12] Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, et al. Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis [J]. *Immunology*, 2003, 109(3): 426-431.
- [13] 刘博. 复方青秦液修复高尿酸血症肾组织免疫病理损伤的临床及实验研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2013.
- [14] 陆妍. 复方青秦液对尿酸性肾病肾损伤及大鼠 RAS, COX-2 系统的影响机制研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2012.

(收稿:2013-12-08 修回:2014-02-28)