· 基础研究 ·

复方青秦液对尿酸性肾病大鼠肾组织血管紧张素Ⅱ及环氧化酶-2影响的研究

商学征[1] 马卫国[2] 周 鹃[3] 陈 祎[2] 陆 妍[2] 王亚南[2]
徐玉梅[1] 谭 玲[4] 顾 文[5] 林子超[2] 孟凤仙[2]

摘要 **目的** 探讨复方青秦液对尿酸性肾病大鼠肾组织中血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,AngⅡ)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2) mRNA 转录及蛋白表达水平的影响。**方法** 将 SD 大鼠按照编号随机取码原则随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组、中药大、中、小剂量组,用腺嘌呤灌胃伴饲酵母造模。空白对照组及模型组每日灌胃蒸馏水;阳性对照组每日灌胃别嘌醇 9.33 mg/kg;中药大、中、小剂量组每日给予复方青秦液 3.77、1.89、0.09 g/kg 灌胃,连续 6 周。在 4 周时每组随机部分大鼠(空白组 3 只,其余每组 6 只),6 周时处死剩余大鼠,取肾组织采用 RT-PCR 扩容 AngⅡ 和 COX-2 mRNA 转录水平,采用 ELISA 测定 AngⅡ蛋白表达水平,采用 Western blot 电泳技术及免疫组化测定 COX-2 蛋白表达水平。**结果** 与空白对照组比较,模型组除 4 周 AngⅡ mRNA 表达,4、6 周时 AngⅡ、COX-2 mRNA 及蛋白表达均明显升高($P<0.01$,$P<0.05$)。4 周时,中药大、中剂量组 COX-2 蛋白表达明显低于模型组及中药小剂量组($P<0.05$),阳性对照组 COX-2 蛋白平均积分光密度值也明显低于模型组($P<0.01$)。6 周时,与模型组比较,除中药大剂量组 AngⅡ mRNA 表达外,阳性对照组及中药各剂量组 AngⅡ mRNA 及蛋白表达均降低($P<0.05$, $P<0.01$),其中中药大、中剂量组效果优于阳性对照组及中药小剂量组($P<0.05$, $P<0.01$);另外,阳性对照组及中药各剂量组 COX-2 mRNA 表达、平均积分光密度值以及阳性对照组、中药大、中剂量组 COX-2 蛋白表达均明显低于模型组($P<0.05$),其中中药中剂量组 COX-2 mRNA 表达优于阳性对照组($P<0.05$),中药大剂量组 COX-2 蛋白表达优于中药小剂量组($P<0.05$)。**结论** 复方青秦液可以下调尿酸性肾病大鼠肾脏 AngⅡ、COX-2 mRNA 转录及蛋白表达水平,从而抑制肾组织炎性病理损伤。

关键词 复方青秦液;尿酸性肾病;血管紧张素Ⅱ;环氧化酶-2

Effect of Compound Qingqin Liquid on the Expression Levels of AngⅡ and COX-2 mRNA Transcription and Protein Expression in the Renal Tissue of Uric Acid Nephropathy Rats: an Experimental Study

SHANG Xue-zheng[1], MA Wei-guo[2], ZHOU Kun[3], CHEN Yi[2], LU Yan[2], WANG Ya-nan[2], XU Yu-mei[1], TAN Ling[4], GU Wen[5], LIN Zi-chao[2], and MENG Feng-xian[2]

1 Endocrinology Department of Dongfang Hospital, Second Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078), China; 2 Rheumatology Department of Dongfang Hospital, Second Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078), China; 3 Research Department of Dongfang Hospital, Second Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078), China; 4 Department of Internal Medicine, Changping Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing (102208), China; 5 Department of Internal Medicine, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing (100010), China

基金项目:国家自然科学基金资助项目课题(No. 30973918)

作者单位:1.北京中医药大学东方医院内分泌科(北京 100078);2. 北京中医药大学东方医院风湿科(北京 100078);3. 北京中医药大学东方医院科研处(北京 100078);4.北京市昌平区中西医结合医院内科(北京 102208);5.首都医科大学附属北京中医医院内科(北京 100010)
通讯作者:孟凤仙, Tel:010-67689656,E-mail:dfyysxz@yahoo.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0819

ABSTRACT　Objective　To investigate the effect of Compound Qingqin Liquid (CQL) on the expression level of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) and COX-2 mRNA transcription and protein expression in the renal tissue of rats with uric acid nephropathy. Methods　SD rats were randomly divided into the blank control group, the model group, the positive drug group, the high, moderate, and low dose CQL group according to number randomization principle. The model was established by gastrogavage of adenine, accompanied with yeast feeding. Distilled water was given by gastrogavage to rats in the blank control group and the model group. Allopurinol at the daily dose of 9.33 mg/kg was given by gastrogavage to rats of the positive control group. CQL at the daily dose of 3.77 g/kg, 1.89 g/kg, and 0.09 g/kg was respectively given by gastrogavage to rats in the high, moderate, and low dose CQL groups. All treatment lasted for 6 weeks. Rats were randomly divided at week 4 (3 in the blank control group, and 6 in the rest groups), and the rest rats were killed at week 6. The renal tissue was extracted. The expression level of Ang Ⅱ and COX-2 mRNA transcription were detected by RT-PCR. The expression level of Ang Ⅱ was detected by ELISA. The expression level of COX-2 protein was detected by Western blot and immunohistochemical assay. Results　Compared with the blank control group, except the mRNA expression of Ang Ⅱ at week 4, the mRNA and protein expression of Ang Ⅱ and COX-2 obviously increased at week 4 and 6 in the model group ($P<0.01$, $P<0.05$). The COX-2 protein expression at week 4 was obviously lower in the high and moderate dose CQL groups than in the model group and the low dose CQL group ($P<0.05$); the average integral of optical density value was obviously lower in the positive control group than in the model group. Except the mRNA expression of Ang Ⅱ in the high dose CQL group at week 6, the mRNA and protein expression of Ang Ⅱ obviously decreased in the positive control group and each dose CQL group ($P<0.01$, $P<0.05$). Of them, the effects were better in the high and moderate dose CQL groups than in the positive control group and the low dose CQL group ($P<0.05$, $P<0.01$). Besides, the mRNA expression of COX-2, the average integral of optical density value were obviously lower in the positive control group and each dose CQL group than in the model group ($P<0.05$). The protein expression of COX-2 was obviously lower in the high and moderate dose CQL groups than in the model group ($P<0.05$). Of them, the mRNA expression of COX-2 was better in the moderate dose CQL group than in the positive control group ($P<0.05$); the protein expression of COX-2 was better in the high dose CQL group than in the low dose CQL group ($P<0.05$). Conclusion　CQL was capable of lowering the expression level of Ang Ⅱ, COX-2 mRNA transcription and protein expression, thus suppressing the inflammatory pathological injury of the renal tissue.

KEYWORDS　Compound Qingqin liquid; uric acid nephropathy; angiotensin Ⅱ; cyclooxygenase-2

尿酸性肾病(uric acid nephropathy, UAN)是高尿酸血症的常见并发症之一,其可造成肾功能损伤甚至衰竭,严重危害人类健康,研究 UAN 发病机制及治疗方法是目前的研究热点[1]。UNA 肾损害是多种因素相互作用,共同积累的过程,UA 介导的血管炎性反应,是其中的重要环节。UA 激活肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS),血浆肾素升高,使得肾脏局部的血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)高表达[2],进而活化炎性因子环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)[3],使入球动脉压升高、入球小动脉增厚和血管壁巨噬细胞浸润,肾小球前血管病变,导致肾小球及球后循环缺血而引起肾损害[4]。复方青秦液是孟凤仙教授治疗 UAN 的经验方,由青蒿、秦艽、山萸肉、土茯苓、川萆薢、秦皮、车前子、苏木组成。针对尿酸性肾病邪浊久留,热毒内盛的病机特点,治以清热毒,化瘀浊,取祛邪以扶正,邪去正自安之意。研究表明该方能抗氧化、降血脂[5],促进 UA、尿素氮排泄,抑制免疫反应、抑制炎性因子基因表达,改善肾功能[6]。病理学研究显示其能明显减轻痛风大鼠肾小管萎缩,尿酸盐结晶和炎症细胞浸润等病变[7]。本研究拟通过观察复方青秦液对 UAN 大鼠肾组织局部 Ang Ⅱ及 COX-2 mRNA 转录及蛋白表达的影响,探讨其可能作用机制。

材料与方法

1　动物　健康雄性 SD 大鼠 55 只,体重(250 ±

50)g;购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2006 - 0009。SD 大鼠级别:SPF/VAF。

2 药物 复方青秦液组方为:青蒿 15 g 秦艽 15 g 山萸肉 10 g 土茯苓 15 g 川萆薢 10 g 秦皮 10 g 车前子 15 g 苏木 8 g。上述中药材由北京中医药大学东方医院药剂科提供免煎颗粒配成 2.2 g 生药/mL,4 ℃储存备用。别嘌醇片(0.1 mg,北京优华药业有限公司,批号:109112)实验前取出片剂研磨成细粉,用蒸馏水配制成浓度为 1.87 mg/mL 的溶液。

3 试剂与仪器 腺嘌呤(10 mg)美国 Sigma 公司,批号 20100516。羧甲基纤维素钠(CMC-Na),北京科海荣京生物科技有限公司,批号 20100807。将固体腺嘌呤溶于 0.5% 的羧甲基纤维素钠中,使腺嘌呤浓度为 10 mg/mL。酵母饲料,中国医学科学院实验动物中心。大鼠血管紧张素Ⅱ(ANGⅡ)酶联反应试剂盒,美国 R&D 公司产品,生产批号:12/2011。Tris、APS、SDS、TEMED、Tween-20、丙烯酰胺、甘氨酸均购自美国 Sigma 公司。一抗:ACTIN 抗体(美国,SANTA 公司,批号:sc-47778),COX-2 抗体(Abcam 公司,批号:ab1591),二抗: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)。One Step SYBR RT-PCR Kit(Takara 公司生产,批号:DRR086A)。BCA 蛋白定量试剂盒(SUNBIO 公司,批号:P0012),Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),TC—96/G/H(b)梯度 PCR 仪(博日科技有限公司),酶标仪(Rayto 公司产品,型号 RT-6000),gel-pro 软件(美国,Media Cybernetics 公司),Sequence Detection System(SDS)2.0 软件(美国 ABI 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:中科中佳公司;紫外分光光度计 UV-2000:尤尼柯(上海)仪器有限公司。凝胶成像系统(型号:FC3):Thermo 公司。AlphaView SA(Version:3.4.0)软件:ProteinSimple。

4 分组及造模 将 55 只雄性 SD 大鼠按照编号随机取码原则随机分为模型组、阳性对照组及中药大、中、小剂量组(每组 10 只),以及空白对照组(5 只)。空白对照组每日给予去离子水,以 10 mL/kg 灌胃,余各组将腺嘌呤溶于 0.5 % CMC-Na 溶液中,以每日 100 mg/kg 的剂量灌胃,同时伴酵母饲料喂养连续 18 天。喂养 18 天后每只大鼠行眼眶内眦取血 0.5 mL,测定血尿酸高于 82.50 μmol/L,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[8]。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。造模过程中模型组、阳性药组各有 1 只大鼠死亡。余鼠均造模成功入组。

5 给药方法 造模成功后空白对照组及模型组每日蒸馏水 10 mL/kg 灌胃;阳性对照组每日阳性药物别嘌醇片水溶液 9.33 mg/kg 灌胃(相当于成人 1 kg体重用量的 5.6 倍);中药大、中、小剂量组给予灌胃复方青秦液每日 3.77、1.89、0.94 g/kg 灌胃,分别相当于成人 1 kg 体重用量的 11.2、5.6、2.8 倍。连续 6 周用药。

6 标本处理 灌胃治疗 4 周后,对各组部分大鼠进行取材(空白组 3 只,其余每组 6 只),10% 水和氯醛麻醉后,腹主动脉取血用于理化指标检测,摘取双肾,剥离多余结缔组织,左侧肾脏固定于 10% 中性福尔马林溶液备免疫组化检测,右侧肾脏置于液氮保存备用。6 周后对剩余大鼠进行取材,方法同前。

7 观察指标及方法 采用 RT-PCR 扩容 AngⅡ和 COX-2 mRNA 转录水平。采用 ELISA 测定 AngⅡ蛋白表达水平,采用 Western blot 电泳技术及免疫组化测定 COX-2 蛋白表达水平。

7.1 AngⅡ和 COX-2 mRNA 水平检测 取 20 μg右肾组织,使用 Trizol 试剂提取 RNA 后,进行一步法 RT-PCR 反应,检测 AngⅡ和 COX-2 mRNA 表达水平。反应体积为 20 μL,反应体系含样本 RNA 2 μL, One Step SYBR RT-PCR Kit17.2 μL, 10 pmol引物各 0.8 μL。AngⅡ基因序列上下游引物分别是:5′-GCCAGATACTGCGAAAGCATGA-3′和 5′-GCTTCCATTCGCACCACAGA-3′。COX-2 基因序列上下游引物分别是:5′-TGCTACCATCTGGCTTCG-3′和 5′-GGAACAGTCGCTCGTCAT-3′。针对看家基因 Actin 基因序列引物分别是:5′-CCCATCTATGAGGGTTACGC- 3′ 和 5′-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3′。扩增条件为:42 ℃灭活 5 min,95 ℃变性 10 s,95 ℃ 退火 5 s,60 ℃延伸 34 s,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 SDS 软件分析 RT-PCR 过程各检测样本的 Ct(Threshold of cycle)值。

7.2 AngⅡ蛋白表达水平检测 取 50 mg 右肾组织,采用 ELISA 法测定 AngⅡ蛋白表达水平,方法严格按照说明书进行。先用预冷的 PBS(0.02 mmol/L,pH:7.0 ~7.2)清洗肾组织后称重,

取 0.5 g 加入 5 mL PBS，在冰上的玻璃器皿内研碎，用反复冻融的方法裂解细胞膜，5 000 r/min 离心 15 min后取上清。大鼠 Ang Ⅱ酶联反应试剂盒室温（20 ~25 ℃）放置 30 min 后，取出酶标板，按照标准品的次序分别加入 100 μL 的标准品溶液于空白微孔中。然后空白微孔中加入 100 μL 样品，空白对照加入100 μL PBS。在各孔中加入 50 μL 酶标记液（不含空白对照孔）。将酶标板用封板膜密封后，37 ℃孵育反应 1 h。充分清洗酶标板 5 次后，用吸水纸彻底拍干。各孔加入显色剂 A 50 μL，然后再加入显色剂 B 50 μL，37 ℃下避光反应 10 min，各孔加入 50 μL 终止液，终止反应。放入酶标仪中检测。

7.3　COX-2 蛋白表达水平检测　取肾组织约 50 mg，加入200 μL 蛋白裂解液，彻底混匀，冰上匀浆 15 min。匀浆后，4 ℃，12 000 r/min，离心 10 min。取上清，用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后，将各样本蛋白浓度调整至相同，将定量好的各样本按 1∶1比例加入 2 × loading buffer 混匀，煮沸变性 5 min后，保存于 -20 ℃备用。配置 12% 分离胶，5% 浓缩胶，加入定量后蛋白样本，电泳，浓缩胶 80 V，分离胶 120 V，待溴酚蓝电泳至胶底时终止电泳。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/cm^2 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，室温下 2 h。用封闭液将一抗按比例（1∶100）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酶（Horse Reddish Peroxidase，HRP）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。使用 ECL 化学发光显色液曝光。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 gel-pro 软件对图像进行灰度分析。COX-2 相对含量的变化 = 目的蛋白灰度/Actin 灰度。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，滴加一抗 COX-2 抗体（PBS 1∶12 000 稀释），37 ℃孵育 90 min，滴加二抗后置于 37 ℃ 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。采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，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　统计学方法　采用 SPSS 18.0 统计软件分析数据，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

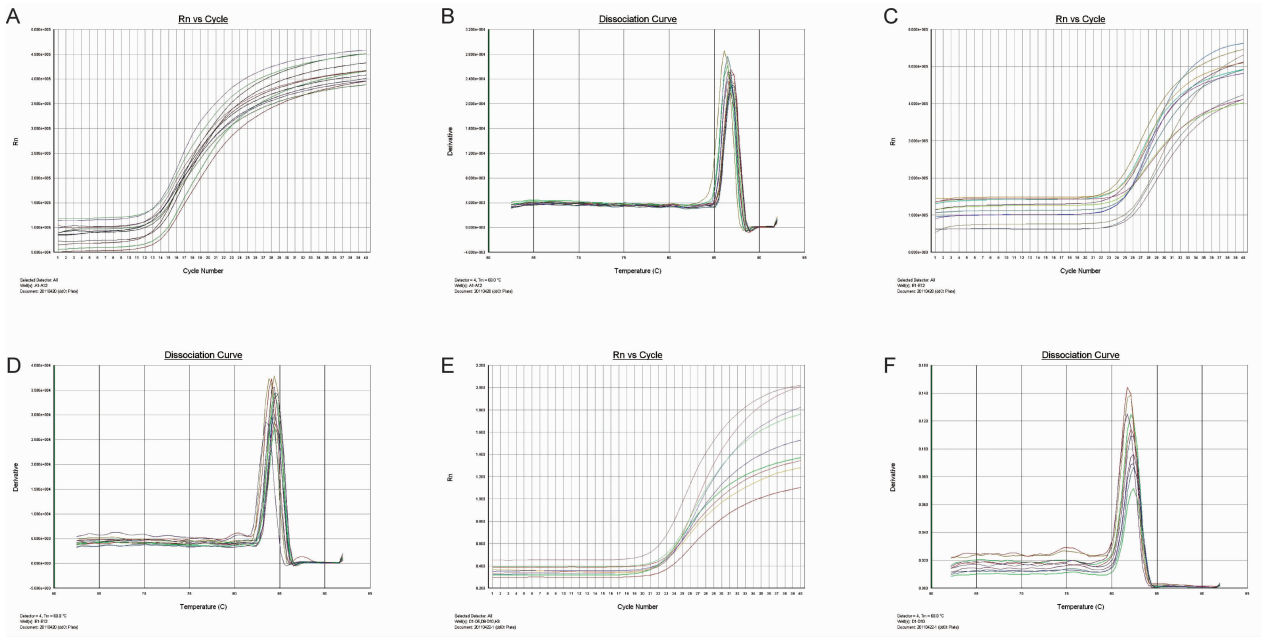
1　各组 Ang Ⅱ、COX-2 mRNA 转录水平比较（表 1，图 1）　4 周时，与空白对照组比较，模型组 Ang Ⅱ mRNA 表达明显降低，差异有统计学意义（$P < 0.01$）；而模型组 COX-2 mRNA 表达明显升高（$P < 0.05$）。6 周时，与空白对照组比较，模型组 Ang Ⅱ及 COX-2 mRNA 表达明显升高，差异有统计学意义（$P < 0.01$，$P < 0.05$）；与模型组比较，阳性对照组及中药中、小剂量组 Ang Ⅱ mRNA 表达明显降低（$P < 0.01$，$P < 0.05$），阳性对照组及中药各剂量组 COX-2 mRNA 表达降低，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。与阳性对照组比较，中剂量组 COX-2 mRNA 表达降低，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

2　各组 Ang Ⅱ蛋白表达水平比较（表 2）　4、6 周时，与空白对照组比较，模型组大鼠肾组织 Ang Ⅱ蛋白表达水平明显升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。6 周时，与模型组比较，阳性对照组及中药各剂量组 Ang Ⅱ蛋白表达水平明显降低（$P < 0.01$，$P < 0.05$）；中药大、中剂量组则明显低于阳性对照组及中药小剂量组（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

表 1　各组 Ang Ⅱ、COX-2 mRNA 转录水平比较　（cpm，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	Ang Ⅱ mRNA 表达量		COX-2 mRNA 表达量	
		4 周	6 周	4 周	6 周
空白对照	5	99.58 ± 0.59	99.58 ± 0.59	88.01 ± 16.95	88.01 ± 16.95
模型	9	64.98 ± 1.98 **	232.79 ± 21.27 **	212.44 ± 38.23 *	1951.52 ± 477.51 *
阳性对照	9	228.07 ± 81.67	128.74 ± 24.49 $^{\triangle}$	562.00 ± 415.44	541.46 ± 76.53 $^{\triangle}$
中药大剂量	10	133.26 ± 27.53	142.67 ± 52.26	395.52 ± 168.37	561.22 ± 180.13 $^{\triangle}$
中剂量	10	216.26 ± 151.32	122.60 ± 2.40 $^{\triangle\triangle}$	460.72 ± 177.20	314.14 ± 52.31 $^{\triangle\blacktriangle}$
小剂量	10	136.07 ± 18.53	167.67 ± 5.96 $^{\triangle}$	433.70 ± 2.80	342.77 ± 144.93 $^{\triangle}$

注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$；与阳性对照组比较，$^{\blacktriangle}P < 0.05$



注:A、C、E 为扩增曲线;B、D、F 为溶解曲线;A、B 为内参基因 Actin;C、D 为 AngⅡ mRNA;E、F 为 COX-2 mRNA

图 1 AngⅡ、COX-2 mRNA 扩增曲线及溶解曲线

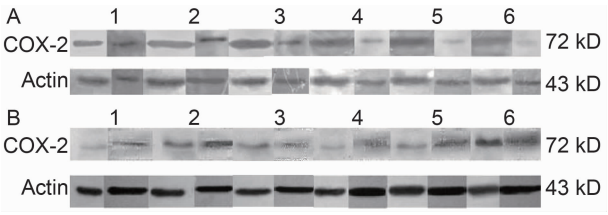
表 2 各组 AngⅡ、COX-2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AngⅡ蛋白表达量(ng/L)		COX-2 蛋白表达水平	
		4 周	6 周	4 周	6 周
空白对照	5	16.75 ± 0.87	16.75 ± 0.87	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.00
模型	9	39.72 ± 5.07 *	64.70 ± 5.13 **	0.47 ± 0.02 **	0.60 ± 0.04 **
阳性对照	9	31.82 ± 1.20	38.34 ± 0.88 △△	0.43 ± 0.05	0.43 ± 0.01 △
中药大剂量	10	33.43 ± 2.34	25.65 ± 0.93 △△▲▲○○	0.37 ± 0.02 △○	0.35 ± 0.04 △○
中剂量	10	42.87 ± 4.03	29.46 ± 2.37 △△▲○○	0.40 ± 0.01 △○	0.40 ± 0.05 △
小剂量	10	45.24 ± 5.13	53.30 ± 1.81 △	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.04

注:与空白对照组比较,*P < 0.05,**P < 0.01;与模型组比较,△P < 0.05,△△P < 0.01;与阳性对照组比较,▲P < 0.05,▲▲P < 0.01;与中药小剂量组比较,○P < 0.05,○○P < 0.01

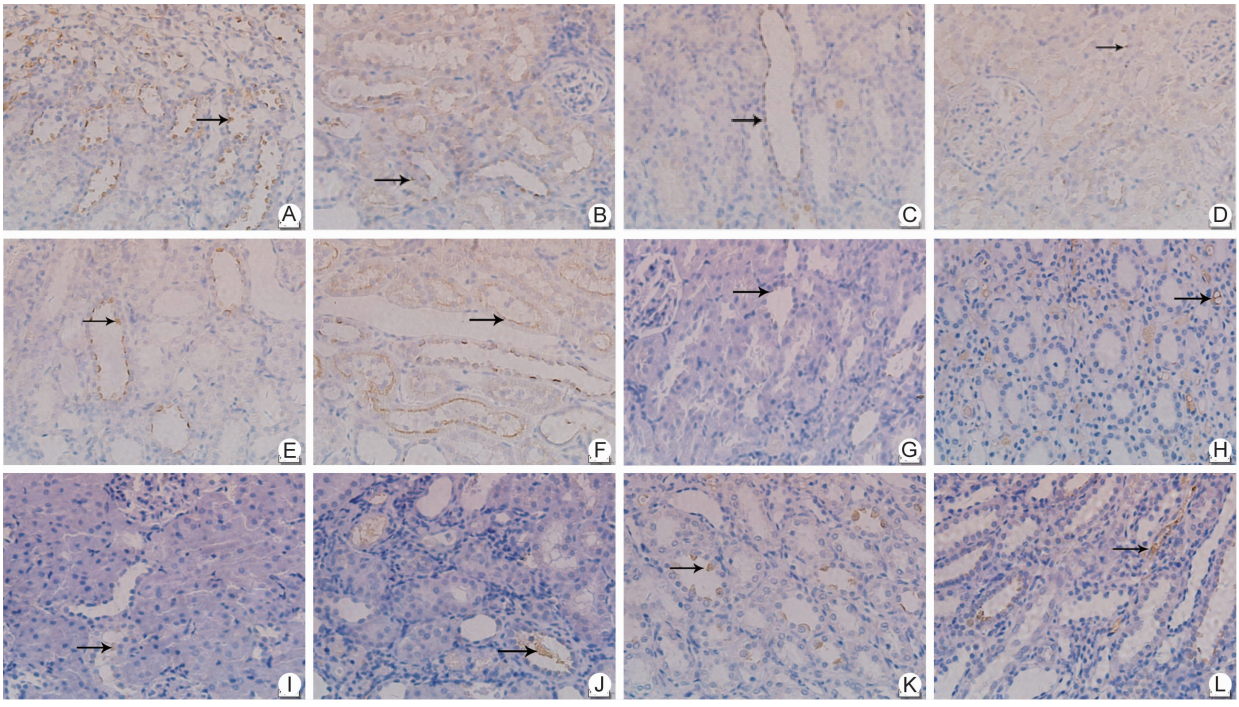
3 各组 COX-2 蛋白表达结果比较(表 2,图 2) 4 周时,与空白对照组比较,模型组 COX-2 蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义(P < 0.01);与模型组比较,中药大、中剂量组 COX-2 蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义(P < 0.05)。与中药小剂量组比较,中药大、中剂量组明显降低,差异有统计学意义(P < 0.05)。6 周时,与空白对照组比较,模型组 COX-2 蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义(P < 0.01),与模型组比较,阳性对照及中药大、中剂量组均明显降低,差异有统计学意义(P < 0.05)。与中药小剂量组比较,中药大剂量组明显降低,差异有统计学意义(P < 0.05)。

4 各组 COX-2 蛋白免疫组化结果比较(表 3,图 3) COX-2 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。4 周时,与空白对照组比较,模型组平均积分光密度值明显升高,差异有统计学意义(P < 0.01);与模型组比较,阳性对照组平均积分光密度值明显降低,差异有统计学意义(P < 0.01)。6 周时,与空白对照组比较,模型组平均积分光密度值明显升高,差异有统计学意义(P < 0.01);与模型组比较,阳性对照及中药大、中、小剂量组平均积分光密度值均



注:1 为空白对照组;2 为模型组;3 为阳性对照组;4 为中药大剂量组;5 为中药中剂量组;6 为中药小剂量组;A 为 4 周时 Western Blot 检测 COX-2 蛋白印迹图;B 为 6 周时 Western Blot 检测 COX-2 蛋白印迹图

图 2 各组 COX-2 蛋白 Western Blot 图



注：A～F 为 4 周 COX-2 蛋白免疫荧光图；G～L 为 6 周 COX-2 蛋白免疫荧光图；A、G 为空白对照组；B、H 为模型组；C、I 为阳性对照组；D、J 中药大剂量组；E、K 为中药中剂量组；F、L 为中药小剂量组；箭头所指为染色后的 COX-2

图 3　COX-2 免疫荧光染色图　（×400）

明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

表 3　各组 COX-2 蛋白免疫组化结果比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	COX-2 蛋白表达平均积分光密度	
		4 周	6 周
空白对照	5	516.24 ± 0.00	516.24 ± 0.00
模型	9	6611.90 ± 388.17 *	2827.09 ± 219.83 *
阳性对照	9	1154.10 ± 189.06 △△	1317.67 ± 83.78 △
中药大剂量	10	6081.18 ± 348.65	1174.77 ± 266.50 △
中剂量	10	6464.91 ± 511.60	1073.85 ± 284.99 △
小剂量	10	6264.46 ± 510.40	1206.30 ± 216.62 △

注：与空白对照组比较，*$P<0.01$；与模型组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$

讨　论

HUA 造成肾小动脉硬化，肾小动脉中层仍增生，主要不是经由高血压，而是通过 RAS 系统直接作用[9]。启动 RAS 后，AngⅡ引起血管内膜损伤，激活单核－巨噬细胞系统，释放多种炎症因子，导致白细胞黏附，血栓形成，单核细胞活化，还可诱导内皮细胞凋亡。这些病理生理机制启动肾脏微炎症反应，导致系膜细胞增殖硬化，局部肾小球肾小管缺血、功能损害，促进肾组织纤维化进程，最终导致慢性肾衰[10]。AngⅡ具有促进肾小球血管内皮细胞增殖，及球小管上皮细胞肥大，诱导细胞凋亡的作用，同时可促进肾小管间质纤维化，使成纤维细胞的表型变为成肌纤维细胞，这些被激活的成纤维细胞发生增殖，并侵入肾小球和肾小管周围的区域导致基质在小管间质区域集聚，并减少基质的降解，诱导肾脏纤维化[11－13]。另外 AngⅡ作为重要致炎因子，能够调节免疫和炎症细胞的化学趋化、增殖及单核细胞分化等反应。局部升高的AngⅡ激活核转录因子－κB（Nuclear factor-kappa B，NF-κB），导致 NF-κB 依赖的 MCP-1 和 RANTES 的显著上调，从而导致肾脏的炎症过程[10]。亦能通过激活 NF-κB 诱导 VSMC 分泌 IL-6 及炎性细胞浸润参与炎性反应[14]。

环氧化酶（cyclooxygenase，COX）存在 COX-1（又称 prostaglandin H synthase，PGHS-1）和 COX-2（又称 prostaglandin H synthase，PGHS-2）两种亚型。其中 COX-2 为诱导型酶，一般不表达或低表达，在受到各种刺激时，表达迅速上调，参与多种病理生理过程。其高表达与炎症的发生发展关系密切。AngⅡ及其受体可调节 COX-2 的表达，作为重要致炎因子，调节免疫和炎症细胞的化学趋化、增殖及单核细胞分化等反应[15,16]。AngⅡ参与 UA 诱导的血管平滑肌细胞（VSMC）增殖[17,18]。在 UA 刺激下，COX-2活化，从而使 TXA2 表达增加，促进 VSMC 增殖[19]，进而导致肾脏免疫和非免疫损伤[3,20]。实验性肾小球疾病 COX-1 和 COX-2 上调，而 COX-2 的表达

在 5/6 肾切除模型增加[21]。COX-2 抑制剂可减缓 5/6肾切除模型的肾损伤而不降低肾小球压力,提示其具有单纯抗炎效应[22]。

复方青秦液具有益肾降浊、利湿清热化瘀的功效。已有多项研究围绕复方青秦液治疗痛风性肾病的临床及分子机制方面展开,取得了满意的效果。临床方面,复方青秦液不仅能够明显改善下焦肾亏、湿热瘀浊型痛风性肾病患者的临床症状,而且能够降低尿酸性肾病大鼠 sUA 水平[5],降低蛋白尿、血肌酐、尿素氮等指标,改善肾功能,避免肾脏免疫炎性病理损害的进行性加重[6,7]。本次实验结果显示:复方青秦液抑制尿酸性肾病大鼠肾脏 AngⅡ基因转录及蛋白表达,进而降低 COX-2,从而抑制肾脏局部免疫炎性损伤,这可能是其保护肾功能延缓肾脏损害的机制之一。后续研究应该围绕该方对其他免疫炎性因子的影响进行,从而进一步揭示其作用机制。

参 考 文 献

[1] Johnson RJ, Segal MS, Srinivas T, et al. Essential hypertension, progressive renal disease, and uric acid: a pathogenetic link[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(7): 1909 -1919.

[2] Mazzali M, Kanellis J, Han L, et al. Hyperuricemia induces a primary renal arteriolopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(6): F991 -F997.

[3] 李铎. COX-2 在肾脏中的研究进展及与糖尿病肾病的关系[J]. 国外医学·泌尿系统分册, 2003, 23(5): 538 -543.

[4] Jin M, Yang F, Yang I, et al. Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases[J]. Frontiers Biosci, 2012, 17: 656 -669.

[5] 孟凤仙, 刘世菊,张继胜,等.青秦液对高尿酸血症大鼠尿酸代谢及相关酶活性的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(4): 33 -35.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 王冬平, 曾林, 尚世臣, 等主编. 实验动物血液生理生化参考手册[M]. 北京:科学出版社, 2011:129.

[9] Kimura S, Mullins JJ, Bunnemann B, et al. High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene[J]. EMBO J, 1992, 11(3): 821 -827.

[10] Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, et al. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy[J]. Kidney Int Suppl, 2003, (86): S64-S70.

[11] Muller DN, Bohlender J, Hilgers KF, et al. Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin Ⅱ[J]. Hypertension, 1997, 29(1 Pt 1): 98 -104.

[12] Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management[J]. Am J Hypertens, 1999, 12(12 Pt 3): 205S-213S.

[13] Huckle WR, Eapp HS. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin Ⅱ[J]. Prog Growth Factor Res, 1994, 5(2): 177 -194.

[14] 陈临溪, 秦旭平, 曾高峰主编. 肾素 -血管紧张素系统药理与临床[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2011:26.

[15] Kang DH, Han L, Ouyang X, et al. Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter[J]. Am J Nephrol, 2005, 25(5): 425 -433.

[16] Kang DH, Nakagawa T. Uric acid and chronic renal disease: possible implication of hyperuricemia on the progression of renal disease[J]. Semin Nephrol, 2005, 25(1): 43 -49.

[17] 苏军霞, 李建华. 高尿酸血症与慢性肾衰竭的研究进展[J]. 甘肃医药, 2011, (7): 401 -404.

[18] Hosoya T, Ohno I, Ichida K, et al. Gout and hyperuricemia in Japan: perspectives for international research on purines and pyrimidines in man[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2011, 30(12): 1001 -1010.

[19] Kanellis J, Watanabe S, LI JH, et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2[J]. Hypertension, 2003, 41(6): 1287 -1293.

[20] Kang DH, Nakagawa T, Feng L, et al. A role for uric acid in the progression of renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(12): 2888 -2897.

[21] Sanchez-Lozada LG, Tapie E, Lopez-Molina R, et al. Effects of acute and chronic L-arginine treatment in experimental hyperuricemia[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(4): F1238 -F1244.

[22] Nakagawa T, Kang DH, Ohashi R, et al. Tubulointerstitial disease: role of ischemia and microvascular disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, 12(3): 233 -241.

(收稿:2013 -12 -14 修回:2014 -03 -31)

中国中西医结合杂志