



草苈祛痛方对糖尿病痛风模型大鼠肾脏HMGB1及FOXO3的影响

解为慈

引用本文:

解为慈. 草苈祛痛方对糖尿病痛风模型大鼠肾脏HMGB1及FOXO3的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(2): 170–173.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.009>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大豆异黄酮和法舒地尔联合应用对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

Protective effects of soybean isoflavones combined with fasudil on cerebral ischemia reperfusion injury in rats
蚌埠医学院学报. 2016, 41(6): 712–716 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.06.003>

吡格列酮对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗和胰岛功能的影响

Effect of pioglitazone on the insulin resistance and function of pancreatic islet in Type 2 diabetes rat
蚌埠医学院学报. 2018, 43(2): 156–159 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.02.005>

2型糖尿病肾病患者代谢指标变化研究

Analysis of the metabolic index in type 2 diabetic nephropathy patients
蚌埠医学院学报. 2016, 41(9): 1158–1160 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.09.013>

糖尿病大鼠心肌纤维化的发生及基质金属蛋白酶-14的表达

The occurrence of myocardial fibrosis and the expression of MMP-14 in diabetic rats
蚌埠医学院学报. 2017, 42(12): 1576–1580 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.12.002>

2种建立慢性肾脏衰竭合并肾性贫血大鼠模型的方法比较

Comparison of two kinds of methods establishing the rat model of chronic renal failure complicated with renal anemia
蚌埠医学院学报. 2017, 42(10): 1293–1297,1301 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.001>

萆苈祛痛方对糖尿病痛风模型大鼠肾脏 HMGB1 及 FOXO3 的影响

解为慈

[摘要] 目的:观察萆苈祛痛方(萆苈方)对糖尿病痛风模型大鼠肾脏高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)及 FOXO3 的影响。**方法:**选取健康雄性大鼠,分为正常对照组、模型组、萆苈组、吡咯美辛组和吡格列酮组,各 8 只。除正常对照组外,其他各组予高脂饲料喂养,联合小剂量链脲佐菌素 35 mg/kg 腹腔注射 1 次,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为成功建立糖尿病模型。4 d 后关节腔注射 5% 尿酸钠溶液 1 次,诱导痛风模型。建模成功后萆苈组、吡咯美辛组和吡格列酮组继续给予相应药物 21 d,正常对照组和模型组给予等量 0.9% 氯化钠溶液。21 d 后,各组大鼠取血测定血糖、血脂、血尿酸,并取大鼠肾脏,测定 HMGB1 及 FOXO3 表达量。**结果:**与正常对照组比较,模型组大鼠血糖、血尿酸、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平均明显升高($P < 0.01$),肾组织 HMGB1、FOXO3 表达量均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,萆苈方组、吡格列酮组和吡咯美辛组大鼠血糖、血尿酸水平均下降($P < 0.05 \sim P < 0.01$),肾组织 HMGB1、FOXO3 相对表达量均明显降低($P < 0.01$),萆苈方组和吡格列酮组 TG、TC、LDL-C 亦均下降($P < 0.05 \sim P < 0.01$),吡咯美辛组 TC、LDL-C 均下降($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。**结论:**萆苈方具有良好的降糖、调脂、降低血尿酸的作用,其作用机制可能与干预糖尿病痛风大鼠肾脏 HMGB1 及 FOXO3 的高表达有关,其对糖尿病痛风引起的肾脏病防治有重要意义。

[关键词] 糖尿病痛风;萆苈祛痛方;FOXO3;高迁移率族蛋白 B1;大鼠

[中图分类号] R 285.5 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.009

Effect of Biling Qutong prescription on the levels of HMGB1 and FOXO3 in kidney of diabetic gout model rats

XIE Wei-ci

(Department of Endocrinology, The First People's Hospital of Tianmen, Tianmen Hubei 431700, China)

[Abstract] Objective: To observe the effects of Biling Qutong prescription (Biling prescription) on the levels of high mobility group B1 (HMGB1) and FOXO3 in kidney of diabetic gout model rats. **Methods:** Forty healthy rats were divided into the normal control group, model group, Biling group, indomethacin group and pioglitazone group (8 rats in each group). Except the normal control group, the other groups were fed with high-fat diet combined with low-dose streptozotocin 35 mg/kg once a day, and the blood glucose ≥ 16.7 mmol/L was set as the standard of the diabetes model. After 4 days, the 0.9% sodium chloride solution was injected into the joint cavity of rats to establish the gout model. After the model was successfully established, the Biling group, indomethacin and pioglitazone group were continuously treated with relative drug for 21 days. The normal control group and model group were given the same amount of 0.9% sodium chloride solution. After 21 days, the levels of blood glucose, uric acid and blood uric acid, and expression levels of HMGB1 and FOXO3 in kidney were detected. **Results:** Compared with the normal control group, the levels of blood glucose, serum uric acid, triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) significantly increased ($P < 0.01$), and the expression levels of HMGB1 and FOXO3 in kidney significantly increased in model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of blood glucose and serum uric acid decreased, and the expression levels of HMGB1 and FOXO3 in kidney significantly decreased in Biling group, indomethacin and pioglitazone group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of TG, TC and LDL-C in Biling group and pioglitazone group decreased ($P < 0.05$ to $P < 0.01$), and the levels of TC and LDL-C in indomethacin group decreased ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusions:** Biling prescription has good effects

[收稿日期] 2018-09-17 [修回日期] 2019-06-09

[作者单位] 湖北省天门市第一人民医院 内分泌科, 431700

[作者简介] 解为慈(1971-),女,副主任医师。

- [10] MIYATA R, VAN EEDEN SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 257(2): 209.
- [11] CHANG JS, HUGGETT JF, DHEDA K, et al. Mycobacterium tuberculosis induces selective up-regulation of TLRs in the mononuclear leukocytes of patients with active pulmonary

- tuberculosis[J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 3010.
- [12] LAMBETH JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen [J]. *Nature Rev Immunol*, 2004, 4(3): 181.
- [13] SECREST MH, SCHAUER JJ, CARTER EM, et al. The oxidative potential of PM2.5 exposures from indoor and outdoor sources in rural China [J]. *Sci Total Environ*, 2016, 571(11): 1477.

(本文编辑 卢玉清)

in lowering blood glucose, regulating lipid and lowering blood uric acid, the action mechanism of which may be related to the intervention of the high expression of HMGB1 and FOXO3 in kidney of diabetic gout rats, and which is of great significance for the prevention and treatment of kidney disease induced by diabetic gout.

[Key words] diabetic gout; Biling Qutong prescription; high mobility group B1; FOXO3; rat

糖尿病与痛风都是体内代谢异常引起的疾病,两者有共同的发病基础。据不完全统计^[1-2],糖尿病病人中伴有痛风者占 3%~35%,而伴有高尿酸血症者约占 25%,二病并存加重了对肾脏的损害,最终可导致肾衰竭。炎症因子在糖尿病与痛风的发病机制中起重要的介导作用。高迁移率簇蛋白 B1 (HMGB1) 是强大的炎细胞因子,其可诱导单核及巨噬细胞产生多种细胞因子,并能显著上调巨噬细胞/单核细胞表达。在炎症的级联反应中, HMGB1 起重要作用^[3]。转录因子 FOXO3 在肥胖和胰岛素抵抗糖尿病之间起重要连接作用,参与多种生理活动,包括细胞周期的调节和葡萄糖内环境的稳定,而高血糖可促进 FOXO3a 的表达,对糖尿病导致的其他器官损害有一定影响^[4]。本研究探讨草薺祛痛方(草薺方)对糖尿病痛风大鼠肾脏中 HMGB1 及 FOXO3 表达的影响,分析其作用机制。现作报道。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选取清洁级健康 SD 雄性大鼠 50 只,体质量(200±20)g,购于武汉大学动物实验中心,SCXK(鄂)2008-0004。大鼠饮食、活动正常,皮毛光泽,反应灵敏。适应性喂养 1 周,室内温度保持在 25℃左右。

1.2 主要药物与试剂 草薺方由安徽中医药大学第一附属医院药物制剂中心提供,方剂组成:草薺、土茯苓、黄柏、怀牛膝、泽泻、车前草、当归、威灵仙、虎杖、苍术、全蝎等。盐酸吡格列酮(江苏德源药业股份有限公司,批号:H20110048);吡格列酮片(上海新黄河制药有限公司,批号:H31020148);HMGB1 (CSJ 公司,批号:000013);FOXO3a (Bioworld 公司,批号:AA66135);尿酸钠(上海源叶生物科技有限公司,批号:S16N8146625);吐温 80(上海源叶生物科技有限公司,批号:M19A6K2526);链脲佐菌素(STZ)(美国 Sigma 公司,批号:20160805426)。

1.3 仪器 血糖监测仪(美国强生公司,稳豪型);特定蛋白仪(日本西门子公司,BN ProSpec System);电泳仪(上海天能科技有限公司,EPS300 型);高速台式冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司,JW-3021HR 型);微量移液器(德国艾本德股份公司,

Research plus);全自动生化分析仪(日本株式会社,日立 7600 型)。

1.4 方 法

1.4.1 糖尿病模型制作 大鼠 50 只适应性喂养 1 周后,随机选取正常对照组 8 只,不做处理,正常饲养。其他大鼠进行实验造模,造模前禁食 12 h,给予高脂饲料进食(蛋白质 15%,脂肪 20%,碳水化合物 50%,胆固醇 5%,猪油 10%),喂养 4 周后,禁食 10 h,一次性腹腔注射 STZ 35 mg/kg(临用前以 pH 4.5 的 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液新鲜配制),72 h 后尾静脉取血测血糖,以血糖≥16.7 mmol/L 为糖尿病大鼠造模成功。造模不成功大鼠追加三分之一 STZ 量。观察大鼠进食、饮水量和精神状态、体形毛色,期间剔除造模不成功大鼠。

1.4.2 痛风关节模型制作 取 250 mg 尿酸钠加入 0.9% 氯化钠溶液 45 mL,再加入 5 mL 聚山梨酯-80,加热搅拌配成 50 g/L 尿酸钠溶液。糖尿病造模成功后第 4 天,除正常对照组外,每只大鼠均以右踝关节外侧后方为穿刺点,针口斜面超前上方与胫骨成 45°角穿入踝关节腔,以 4 号针头向关节腔注入 0.2 mL 尿酸钠溶液,以关节鼓起为注入标准,诱导痛风模型。剔除造模不成功大鼠。

1.4.3 动物分组及给药 将造模成功的大鼠按照数字表法随机分为模型组、草薺方组、吡格列酮组和吡格列酮组,各 8 只。草薺方组按 10 g/kg 灌胃给予草薺方,吡格列酮组按 15 mg/kg 灌胃给予盐酸吡格列酮,吡格列酮组按 10 mg/kg 灌胃给予吡格列酮;正常对照组和模型组灌胃等量 0.9% 氯化钠溶液,每天 1 次,连续给药 21 d。

1.5 观察指标 大鼠连续给药 21 d 后,禁食 10 h。腹主动脉采血,测定血糖、尿酸、血脂。以 3% 戊巴比妥钠 10 mg/kg 腹腔注射麻醉,迅速开腹,取出肾脏,放置-80℃液化氮中保存,采用 Western blotting 法检测大鼠肾脏 HMGB1 及 FOXO3 蛋白表达,计算蛋白相对表达量。

剪取大鼠肾脏组织,每个样品约 100 mg,加入 RIPA 细胞裂解液 1 mL 进行裂解,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。按照 SDS-PAGE 凝胶配制样品处理,严格按照说明书操作。转膜完成后,立即

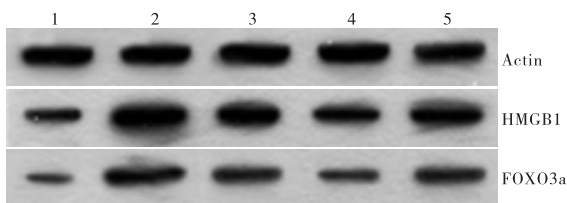
将 PVDF 膜放置到预先准备好的 Western 洗涤液中,漂洗 5 min,洗去转膜液。加入 Western 封闭液,在摇床上缓慢摇动,室温封闭 2 h。用一抗稀释液进行稀释, HMGB1 抗体属性为兔抗 1:1 000 稀释(10%分离胶), FOXO3a 抗体属性为兔抗 1:500 稀释(10%分离胶), 4 ℃ 缓慢摇动孵育过夜。加入洗涤液 PBST,每次洗涤 10 min,共洗涤 3 次。按照 1:15 000 比例用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育 2 h。加入洗涤液 PBST,每次洗涤 10 min,洗涤 3 次。蛋白检测参考说明书,使用 ECL 超敏发光试剂盒检测。图片灰度值分析采用北京科创锐新生物凝胶成像系统进行胶片条带分析。

表 1 各组大鼠血糖、血脂及血尿酸水平比较($\bar{x} \pm s; n=8$)

分组	血糖/(mmol/L)	血尿酸/(μ mol/L)	TG/(mg/d)	TC/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)
正常对照组	5.76 ± 0.80	73.2 ± 7.31	0.43 ± 0.12	1.87 ± 0.25	0.54 ± 0.11
模型组	17.05 ± 3.14 **	144.20 ± 25.35 **	2.16 ± 1.10 **	3.10 ± 1.10 **	1.15 ± 0.74 **
萆苓方组	13.88 ± 2.51 ** #	90.18 ± 22.04 ##	1.54 ± 1.06 ##	1.64 ± 0.24 ##	0.51 ± 0.07 ##
吡格列酮组	12.71 ± 2.18 ** #	96.38 ± 14.20 ##	0.97 ± 0.29 ##	1.42 ± 0.26 ##	0.45 ± 0.14 ##
吡喹美辛组	15.19 ± 1.28 ** #	92.86 ± 17.25 ##	2.18 ± 1.67	1.96 ± 0.46 #	0.63 ± 0.25 ##
<i>F</i>	42.859	36.875	44.028	52.754	4.98
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	0.685	0.724	0.669	0.112	0.129

q 检验:与正常对照组比较 * $P < 0.01$;与模型组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 各组大鼠 HMGB1 和 FOXO3 相对表达量比较
与正常对照组比较,模型组、萆苓方组、吡格列酮组和吡喹美辛组大鼠肾组织 HMGB1、FOXO3 表达量均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,萆苓方组、吡格列酮组和吡喹美辛组 HMGB1、FOXO3 相对表达量均明显降低($P < 0.01$);吡格列酮组 HMGB1、FOXO3 表达量亦均低于萆苓组和吡喹美辛组($P < 0.05$),而萆苓组和吡喹美辛组 HMGB1、FOXO3 表达量差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见图 1、表 2)。



1: 正常组; 2: 模型组; 3: 萆苓组; 4: 吡格列酮组; 5: 吡喹美辛组

图 1 各组大鼠 HMGB1 和 FOXO3 相对表达量

1.6 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖、血脂及尿酸水平比较 与正常对照组比较,模型组大鼠血糖、血尿酸和三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,萆苓方组、吡格列酮组和吡喹美辛组大鼠血糖、血尿酸均下降($P < 0.05 \sim P < 0.01$),萆苓方组和吡格列酮组 TG、TC、LDL-C 亦均下降($P < 0.05 \sim P < 0.01$),吡喹美辛组 TC、LDL-C 均下降($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)(见表 1)。

表 2 各组大鼠 HMGB1 和 FOXO3 相对表达量比较($\bar{x} \pm s; n=8$)

分组	HMGB1	FOXO3
正常对照组	0.42 ± 0.03	0.32 ± 0.02
模型组	1.11 ± 0.04 **	1.05 ± 0.05 **
萆苓方组	0.74 ± 0.04 ** ## Δ	0.72 ± 0.03 ** ## Δ
吡格列酮组	0.59 ± 0.06 ** ##	0.49 ± 0.01 ** ##
吡喹美辛组	0.76 ± 0.04 ** ## Δ	0.74 ± 0.03 ** ## Δ
<i>F</i>	56.328	47.889
<i>P</i>	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	0.251	0.168

q 检验:与正常对照组比较 * $P < 0.01$;与模型组比较 # $P < 0.01$;与吡格列酮组比较 Δ $P < 0.05$

3 讨论

目前糖尿病合并痛风的患病率不断上升,探寻其发病机制,研究中药解决糖尿病痛风及并发症问题一直是医学工作者研究的重点课题^[1-2]。HMGB1 在人体内广泛分布,正常情况下存在于细胞

核中,但在某些特殊条件下, HMGB1 能通过活化的巨噬细胞和单核细胞等炎症细胞的主动分泌和坏死细胞的被动释放转移至细胞外,参与多种疾病及炎症的发生发展。近年来有报道^[3]认为 HMGB1 可能是导致肾脏损害的潜在因素,它主要表达于肾脏组织的系膜细胞、血管内皮细胞核肾小管上皮细胞的胞核内。还有学者^[4]观察到在新诊断 2 型糖尿病病人中 HMGB1 活性上调,提示 HMGB1 的炎症作用在糖尿病初期已显现。本研究结果显示,造模后模型组大鼠 HMGB1 较正常对照组显著升高,予草苈方后,上述指标明显下降。提示 HMGB1 参与糖尿病痛风的发病过程,是重要的炎症介质,草苈方可显著降低 HMGB1 的高表达,此可能为其治疗糖尿病痛风的机理之一。

FOXO3a 属于叉头蛋白 FOXO 家族成员,在调节机体多种病理生理过程,如血管生成、活性氧代谢、免疫反应及转录活性、调控下游基因等方面有重要作用。而高血糖、高血脂可以促进 FOXO3a 的过表达,并在其他器官损害中也发挥作用^[5-9]。本研究结果显示,糖尿病痛风模型大鼠肾组织 FOXO3a 蛋白表达水平较正常对照组明显升高,用药 8 周后,草苈组 FOXO3a 表达明显下降,提示 FOXO3a 参与糖尿病痛风的发病过程,而草苈方可显著干预上述过程。

本研究结果亦显示,模型组大鼠血糖、血脂和尿酸水平均较正常对照组明显升高,而草苈方组大鼠上述指标均较模型组明显降低,提示草苈方有良好的降糖降脂、降低血尿酸作用,可通过多途径、多靶点发挥降糖、降尿酸作用,与我们以往的研究结论一致^[10]。同步治疗,多靶点、多途径干预炎症因子,对降糖降脂、降低尿酸及延缓并发症有重要作用。

笔者从长期的临床实践中注意到糖尿病痛风并存的病机特点是湿浊毒瘀互结致病情反复,治疗上强调祛湿泻浊解毒,化痰通络止痛,草苈方正是在祛湿解毒的基础上加强活血通络药。方中土茯苓、萆薢、泽泻、薏苡仁利湿泻浊;黄柏、苍术、清热燥湿解毒;虎杖活血解毒定痛;威灵仙祛风湿、通经络、止疼痛;当归、牛膝、全蝎活血止痛,引湿下行,共奏泻浊解毒,活血化瘀,通络止痛之功。药理研究^[11]证实当归提取物抑制脂多糖诱导的单核巨噬细胞释放 HMGB1,并呈剂量依赖性,部分可通过干扰 HMGB1 的细胞质的转位实现。还有学者^[12]报道,从虎杖中

分离提取的大黄 6-O-B-D 葡萄糖苷,可抑制脓毒症小鼠 HMGB1 的释放,提示某些中药可抑制 HMGB1 的过度释放。此外,牛膝、土茯苓、薏苡仁、泽泻、车前草均有抗炎利尿,消炎抑菌,促进尿酸排泄之功。威灵仙、虎杖、黄柏有消炎抗菌之效,土茯苓、虎杖能够抑制黄嘌呤氧化酶的活性;当归、全蝎不仅有扩血管、降血小板聚集、抗血栓形成左右,还有消炎镇痛的作用;苍术、薏仁则有良好的降血糖疗效,并有增强免疫功能的作用^[13]。

综上,草苈方可能通过干预糖尿病痛风大鼠肾脏 HMGB1 及 FOXOL 的高表达,有效控制炎症因子,从而发挥了良好的降糖、降脂和降尿酸作用,延缓肾脏损伤。

[参 考 文 献]

- [1] 彭彩碧,崔少国,李雪峰,等. 痛风合并糖代谢异常的危险因素分析[J]. 鄱阳医学院学报,2009,28(6):618.
- [2] 赵华,李中南. 糖尿病合并痛风的中西医研究进展[J]. 河南中医,2011,31(12):1460.
- [3] 赵树山,唐兰花,李毅锋,等. 高迁移率族蛋白 B1 的研究进展[J]. 中国感染控制杂志,2010,9(1):63.
- [4] 姚迪,陆卫平,周莉,等. 高迁移率族蛋白 B1 在糖尿病肾病中的表达及意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(1):60.
- [5] 陈娟,李伟,孙子林. 叉头转录因子与糖尿病及其并发症的相关研究进展[J]. 中国糖尿病杂志 2015,23(10):946.
- [6] 李玉秀,曾静波,孙琦,等. 罗格列酮和二甲基胍对小鼠脂肪组织转录因子 FoxO3a 蛋白表达的影响[J]. 基础医学与临床,2008,28(3):260.
- [7] 傅永锦,夏雪怡,张小牧,等. 川芎嗪对糖尿病肾病大鼠下调 HMGB1 表达及降低 RAGEs 作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2017,22(8):846.
- [8] 陈锦文,王卓飞,铁璐,等. 转录因子 FoxO1 在糖尿病中的作用研究[J]. 生理科学进展,2014,45(1):55.
- [9] 杜萌萌,王庆祝,秦贵军,等. 叉头状转录因子 O1 对高糖环境下小鼠足细胞上皮间质转化的影响及机制研究[J]. 中华内分泌代谢杂志,2016,32(9):767.
- [10] 李中南,石国斌,刘剑等. 草苈祛痛方治疗 2 型糖尿病合并痛风临床观察[J]. 中国中医急症,2010,19(9):1489.
- [11] 沈丽娟,陆曙. 高迁移率族蛋白 B1 及其中药抑制剂治疗心血管疾病的研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(1):176.
- [12] 曹小燕,谢勇,傅颖璐等重要单体抑制高迁移率族蛋白 B1 致炎活性的研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版),2016,56(4):76.
- [13] 黄春林,朱晓新. 中药药理与临床手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2006.