

基于UPLC-Q-TOF/MS结合网络药理学探讨降尿酸方对尿酸性肾病的保护作用

张栩铭, 周嘉宝, 杨枫, 吴志远, 高建东*

(上海中医药大学附属曙光医院肾病科, 上海中医药大学中医肾病研究所, 上海中医药大学肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203)

摘要: **目的** 探讨降尿酸方对尿酸性肾病的作用机制。**方法** 6只健康SD雄性大鼠分为空白血清组(生理盐水)和含药血清组(72 g/kg降尿酸方浓缩液), 给予相应药物, 每天2次, 连续3 d。采用UPLC-Q-TOF/MS法分析含药血清。通过PubChem和SciFinder数据库获取化合物结构, Swiss Target Prediction数据库以确定靶点, 以“Uric acid nephropathy”为关键词在OMIM、DisGeNET、GeneCards数据库检索获得作用靶点, 通过Venny2.1.0平台得到“药物-疾病”交集基因, 上传至DAVID库进行GO和KEGG分析, 并对结果进行分子对接验证。40只雄性SD大鼠随机分为正常组、正常+降尿酸方组、模型组、降尿酸方组、非布司他组, 每组8只, 除前2组外, 后3组大鼠灌胃给予氧嗪酸钾(1 500 mg/kg)和腺嘌呤(50 mg/kg)进行造模; 6 h后, 降尿酸方组、非布司他组分别灌胃给予360 mg/kg降尿酸方和3.6 mg/kg非布司他, 正常组和模型组灌胃给予等量生理盐水, 每天1次, 连续6周, 检测血清SUA、Scr、BUN水平, 观察肾脏病理学改变, Western blot法检测靶蛋白表达。**结果** 共得到22个原型成分、378个药物靶点、1 587个疾病靶点、126个“药物-疾病”共同靶点, STAT3、SRC、VEGFA等是最可能的作用靶点。GO富集获取470条BP通路、68条CC表达过程、112条MF相关过程。KEGG富集获取信号通路124条。分子对接结果显示最可能的靶点和活性成分结合性良好。与模型组比较, 非布司他组和降尿酸方组肾组织病理学改善, Scr、BUN、SUA水平降低($P<0.05$, $P<0.01$), p-STAT3、p-SRC、VEGFA蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 降尿酸方可能通过多靶点、多通路降低尿酸性肾病大鼠模型SUA水平, 减轻肾组织病理损伤, 改善肾功能。

关键词: 降尿酸方; 尿酸性肾病; 网络药理学; UPLC-Q-TOF/MS

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)03-1006-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.03.048

尿酸性肾病是一种由高尿酸血症或痛风引发肾损伤的疾病^[1]。随着经济水平的提升, 居民饮食结构发生改变, 高尿酸血症和痛风发病率呈逐年增长趋势, 且发病年龄提前。尿酸盐结晶在肾脏中累积会引起氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等, 加重肾脏损害^[2]。近年来传统中药成为研究热点, 因其多靶点、安全性高、疗效显著的特点, 在调节尿酸水平及发挥抗炎作用的方面显示出了独特优势, 因此进一步探寻其治疗尿酸性肾病的作用机制具有重要意义。

降尿酸方是基于上海市名中医郑平东教授“化痰祛湿、活血化瘀”理论并经过长期临床实践形成的, 用于治疗尿酸性肾病的经验方, 荣获国家知识产权局颁发的发明专利(ZL200510026468.9)。初步临床研究证实, 该方剂能有效调节尿酸性肾病患者的血尿酸水平, 显著改善肾功能^[3-4], 但其具体机制仍待进一步探索。本研究通过UPLC-

Q-TOF/MS技术分析鉴定降尿酸方的有效入血成分, 结合网络药理学探究其干预尿酸性肾病的可能机制, 并采用动物实验进行验证。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠46只, 体质量180~220 g, 购自上海必凯科翼生物科技有限公司[实验动物生产许可证号SYXK(沪)2018-0026], 饲养于上海中医药大学实验动物中心, 环境温度25℃, 相对湿度45%, 自由摄食饮水, 适应性喂养7 d。研究经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审查编号PZSHUTCM2302040003)。

1.2 试剂与药物 炒车前子(批号181127, 产地江西)、炒王不留行子(批号181129, 产地河北)、炒芥子(批号180907, 产地浙江)、威灵仙(批号181009, 产地安徽)、粉萆薢(批号180915, 产地浙江)、制大黄(批号181121,

收稿日期: 2024-05-28

基金项目: 国家自然科学基金(81874437, 82274415); 上海市科学技术委员会科研计划项目(20Y21901800)

作者简介: 张栩铭(1996—), 女, 硕士生, 中医师, 研究方向为中医药防治慢性肾脏病。Tel: (021) 20256382, E-mail: v1996z@126.com

*通信作者: 高建东(1967—), 男, 博士, 博士生导师, 主任医师, 研究方向为中医药防治慢性肾脏病。Tel: (021) 20256382, E-mail: jiangong.gao@shutcm.edu.cn

产地甘肃)、生山楂(批号181031,产地浙江),均购自上海中医药大学附属曙光医院,经上海中医药大学附属曙光医院沈杰主任药师鉴定为正品后,委托上海中药制药技术有限公司制备干粉。非布司他片(江苏恒瑞医药股份有限公司,40 mg/片,批号H20130081);氧嗪酸钾、羧甲基纤维素钠(上海麦克林生化科技有限公司,批号P831461、C10097951);腺嘌呤[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号A600013-0025];尿酸钠盐(美国Sigma公司,批号u2875-5g);STAT3, SRC, VEGFA, α -Tubulin抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号A22424、A19119、A5708、AC012);Phospho-STAT3, Phospho-SRC抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号ET1603-40、ET1609-15);HRP标记山羊抗小鼠IgG、HRP标记山羊抗兔IgG(上海碧云天生物技术有限公司,批号A0216、A0208);PAGE凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号PG112);PVDF膜(美国Millipore公司,批号IPVH00005)。甲酸(质谱纯,德国CNW科技公司,批号Y6170039);乙腈、甲醇(质谱纯,德国Merck公司,批号I1133829105、I1139035113);纯净水(广州屈臣氏食品饮料有限公司,批号20220415C)。

1.3 仪器 H-Class超高效液相色谱仪(美国Waters公司);AB Sciex Triple TOF[®] 4600高分辨质谱(美国SCIEX公司);ME104电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ-300 BD超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);SIGMA 3K15高速离心机(美国SIGMA公司);Tanon-5200凝胶成像系统(上海天能生命科学有限公司);KD-BM生物组织冷冻包埋机、KD-H烘片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);JY-24组织匀浆机(上海净信环境科技有限公司);Synergy 2酶标仪(美国BioTek公司);CX33显微镜(日本奥林巴斯公司)。

表1 流动相梯度

t/min	A 乙腈/%	B 水(含0.1%甲酸)/%
0~5	0	100
5~10	0~7	100~93
10~25	7~10	93~90
25~40	10~15	90~85
40~50	15~25	85~75
50~65	25~35	75~65
65~70	35~95	65~5
70~72	95	5
72~72.1	95~0	5~100
72.1~75	0	100

1.4 数据库与软件 SciFinder (<https://scifinder-n.cas.org>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), OMIM (<https://omim.org/>), DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>), David (<https://david.ncicrf.gov/>), STRING (<https://string-db.org/>), Venny2.1.0

(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), Cytoscape3.9.1软件, R4.2.1软件, Analyst TF 1.7.1软件, Peakview 1.2软件。

2 方法

2.1 降尿酸方干粉制备 降尿酸方组方药材炒车前子15 g、炒王不留行子10 g、炒芥子10 g、威灵仙15 g、粉萆薢10 g、制大黄10 g、生山楂10 g,按组方比例称取640 g,加入10倍量蒸馏水浸泡2 h,武火煮沸,文火煎煮1 h,过滤;滤渣加入8倍量蒸馏水浸泡1 h,加热回流提取2次;提取液合并,真空冷冻干燥后得到32 g冻干粉。

2.2 降尿酸方含药血清制备 6只SD雄性大鼠分为空白血清组和含药血清组,每组3只,含药血清组大鼠灌胃给予降尿酸方浓缩液,空白血清组灌胃给予等量生理盐水,每天2次,连续3 d。考虑到分析用血清样本需最大给药剂量,以尽可能检测到全部微量成分,故将给药剂量扩大20倍,即72 g/kg冻干粉(相当于1 440 g/kg生药)。末次灌胃前禁食12 h,给药后0.5 h、1 h时分别眼眶采血约300 μ L,置于同一促凝管中,末次灌胃后2 h,2.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,采集腹主动脉全血5 mL,4 $^{\circ}$ C静置过夜,3 000 r/min离心10 min,取上清,56 $^{\circ}$ C水浴加热30 min,0.2 μ m一次性滤器过滤除菌,-80 $^{\circ}$ C储存备用。

2.3 UPLC-Q-TOF/MS分析

2.3.1 供试品溶液制备 吸取2.6 mL空白血清和8.3 mL含药血清,分别加入3倍体积甲醇沉淀蛋白,涡旋混匀5 min,4 $^{\circ}$ C静置20 min,12 000 r/min离心15 min,取上清,浓缩干燥,-80 $^{\circ}$ C保存。分析前加入100 μ L 50%甲醇将残渣复溶,涡旋混匀3 min,12 000 r/min离心15 min,取上清液,即得。

2.3.2 色谱条件 Agilent ZORBAX RRHD SB-Aq(2.1 mm \times 100 mm,1.8 μ m)色谱柱;流动相乙腈(A)-水(含0.1%甲酸)(B),梯度见表1;体积流量0.3 mL/min;柱温30 $^{\circ}$ C;检测波长190~400 nm;进样量5 μ L。

2.3.3 质谱条件 电喷雾离子源,正负离子扫描,其他参数见表2。

表2 主要质谱参数

MS	参数	MS/MS	参数
扫描范围 m/z	50~1 700	扫描范围 m/z	50~1 250
离子源气体1/psi	50	解簇电压/V	100
离子源气体2/psi	50	碰撞能量/eV	\pm 40
帘气/psi	35	碰撞能量扩散/eV	20
离子喷雾电压浮动/V	-4 500/5 000	离子释放延迟/ms	30
离子源温度/ $^{\circ}$ C	500	离子释放宽度/ms	15
解簇电压/V	100		
碰撞能量/eV	10		

注:1 psi=6.895 kPa。

2.4 基于网络药理学的降尿酸方对尿酸性肾病作用机制研究

2.4.1 降尿酸方对尿酸性肾病的潜在作用靶点筛选 利用PubChem和SciFinder数据库检索入血成分结构信息,随后

通过 Swiss Target Prediction 数据库进行分析, 筛选预测得分超过 0 分的靶点, 并去除重复项以获得最终的药物靶点列表。设置关键词“Uric acid nephropathy”, 在 OMIM、DisGeNET、GeneCards 数据库中检索, 以识别与该疾病相关的潜在作用靶点。随后, 使用 Venny2.1.0 平台对成分靶点和疾病靶点进行交叉映射, 确定两者的共同靶点。

2.4.2 降尿酸方干预尿酸性肾病差异表达基因的蛋白质互作网络 (PPI) 构建 检索 STRING 中的“药物-疾病”共同靶点, 物种选择“Homo sapiens”, 最低互作阈值 0.7, 然后将数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行处理, 构建 PPI 网络图。通过 NetworkAnalyzer 工具进行拓扑分析, 并依据 Degree 值筛选核心靶点。最后, 使用 R4.2.1 软件对排名前 10 的靶点进行可视化展示。

2.4.3 GO 富集分析 利用 David 数据库对潜在的靶点进行 GO 功能富集分析。筛选条件设定为 $P < 0.01$ 、最小计数 3 及富集因子大于 1.5, 再从生物过程 (BP)、细胞成分 (CC)、分子功能 (MF) 中选取排名前 10 的 GO 条目, 使用 R 语言进行可视化处理。

2.4.4 KEGG 富集分析 利用 David 数据库, 设定筛选条件为 $P < 0.01$ 、最小计数 3、富集因子大于 1.5, 对潜在靶点执行 KEGG 富集分析, 采用 R 语言对富集分析的前 20 的条目进行可视化展示。

2.5 分子对接验证 选取排名前三的 Degree 值成分作为核心成分, 从 PubChem 数据库中下载相应化合物的二维结构; 选取排名前三的靶点作为潜在的核心靶点, 从 Protein Data Bank 数据库中下载蛋白三维结构, 使用 Autodock vina 1.1.2 软件分析配体和受体具有最低结合能的构象, 并进行可视化展示。

2.6 验证实验

2.6.1 分组、造模及给药 40 只健康的 SD 雄性大鼠随机分为正常组、正常+降尿酸方组、模型组、降尿酸方组、非布司他组, 每组 8 只。除了正常组和正常+降尿酸方组外, 其他各组大鼠灌胃给予氧嗪酸钾 1 500 mg/kg 和腺嘌呤 50 mg/kg, 构建尿酸性肾病大鼠模型; 6 h 后, 正常+降尿酸方组和降尿酸方组灌胃给予 360 mg/kg 的降尿酸方干粉溶液, 非布司他组灌胃给予 3.6 mg/kg 非布司他, 其他组灌胃给予等量生理盐水, 每天 1 次, 持续 6 周。

2.6.2 样本收集 给药完成后, 日内眇采血, 委托上海中医药大学附属曙光医院检验科检测大鼠血肌酐 (SCr)、血尿素氮 (BUN)、血尿酸 (SUA) 水平; 大鼠经腹腔注射 2.5% 戊巴比妥钠麻醉, 处死后摘取双侧肾脏。

2.6.3 组织病理学观察 取大鼠肾组织, 90% 乙醇固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 浸蜡, 石蜡包埋, 切片 (3 μm), 脱蜡后行 HE、Masson、PAS 染色, 中性树脂封片, 光学显微镜下观察。

2.6.4 Western blot 法检测靶蛋白表达 采用 Western blot 法验证 Degree 值排名前三的核心靶点。使用 RIPA 裂解液对大鼠肾脏组织进行裂解, BCA 法测定蛋白浓度后, 将蛋

白样品进行电泳分离, 转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 随后加入目标蛋白的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (1 : 1 000)、山羊抗兔 IgG (1 : 1 000) 二抗, 室温孵育 1 h, PBST 洗膜, ECL 化学发光液显影, 凝胶成像系统成像, 以 α -Tubulin 为内参, 计算目的蛋白相对表达量。

2.7 统计学方法 通过 SPSS25.0 与 GraphPad Prism 9.4.1 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若数据服从正态分布, 多组间比较采用方差分析法, 组间两两比较时若方差齐, 采用最小显著性差异法进行检验; 若数据不服从正态分布, 多组间比较采用非参数检验, 组间两两比较采用成对多重比较法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 降尿酸方入血成分鉴定 采用 UPLC-Q-TOF/MS 对降尿酸方含药血清样品进行分析, 离子流图见图 1~4。根据样品多级质谱信息, 结合对照品及化学成分库进行化学成分表征, 从降尿酸方含药血清样品中鉴定出 22 个原型成分, 见表 3。

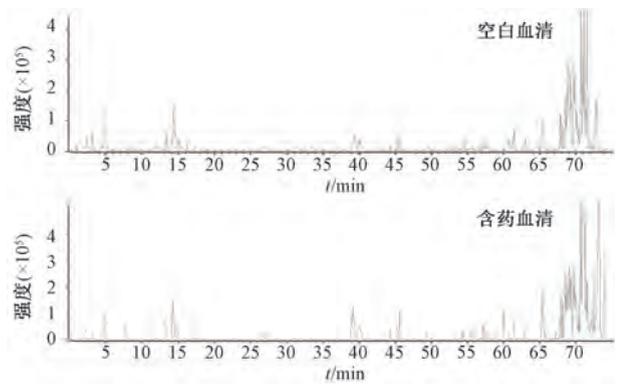


图 1 各组血清基峰离子流图 (负离子)

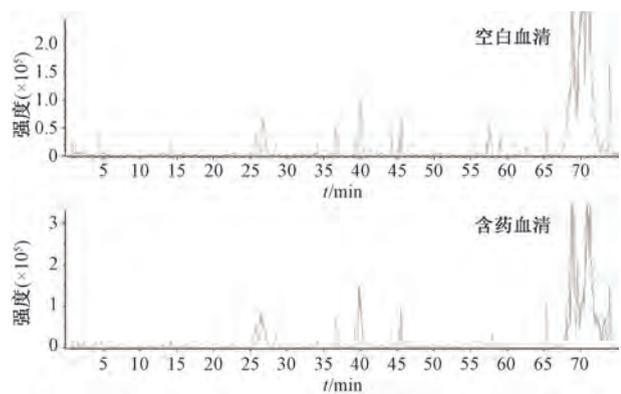


图 2 各组血清基峰离子流图 (正离子)

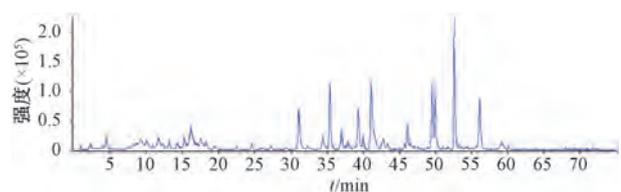


图 3 降尿酸方含药血清提取离子流图 (负离子)

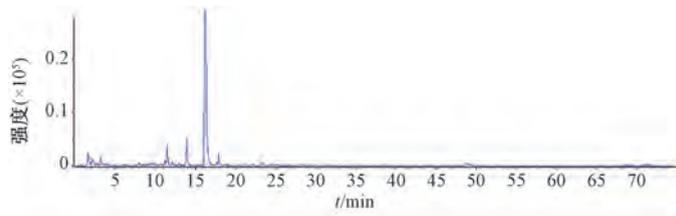


图4 降尿酸方含药血清提取离子流图(正离子)

表3 降尿酸方含药血清中原型成分鉴定

编号	t/min	加合离子	m/z 实际值	m/z 理论值	误差(10 ⁻⁶)	分子式	分子量	中文名	来源
P1	2.10	[M+H] ⁺	180.089 2	180.086 6	14.2	C ₆ H ₁₃ NO ₅	179.08	半乳糖胺	—
P2	3.17	[M+H] ⁺	382.171 1	382.172 1	-2.6	C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₆	381.16	玉米素 7-N-葡萄糖苷	白芥子
P3	3.34	[M-H] ⁻	424.037 1	424.037 8	-1.6	C ₁₄ H ₁₉ NO ₁₀ S ₂	425.05	白芥子苷	白芥子
P4	3.80	[M-H] ⁻	169.014 3	169.014 2	0.3	C ₇ H ₆ O ₅	170.02	没食子酸	制大黄
P5	4.55	[M-H] ⁻	255.050 7	255.051 0	-1.3	C ₁₁ H ₁₂ O ₇	256.06	番石榴酸	生山楂
P6	10.05	[M-H] ⁻	153.019 4	153.019 3	0.4	C ₇ H ₆ O ₄	154.03	原儿茶酸	生山楂
P7	10.89	[M-H] ⁻	373.113 0	373.114 0	-2.7	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	374.12	京尼平苷酸	车前子
P8	11.82	[M-H] ⁻	329.089 9	329.087 8	6.7	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	330.10	香草酸-葡萄糖苷	生山楂
P9	16.20	[M+H] ⁺	226.155 1	226.155 0	0.4	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₂	225.15	车前素	车前子
P10	17.87	[M+H] ⁺	314.207 6	314.207 4	0.5	C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O ₄	313.20	—	车前子
P11	20.30	M ⁺	310.165 5	310.164 9	1.9	C ₁₆ H ₂₄ NO ₅ ⁺	310.17	芥子碱	白芥子
P12	24.39	M ⁺	342.169 8	342.170 0	-0.5	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	342.17	木兰花碱	威灵仙
P13	35.85	[M-H] ⁻	563.140 3	563.140 6	-0.6	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	564.15	异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷	王不留行
P14	36.56	[M-H] ⁻	431.097 1	431.098 4	-2.9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.11	芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷	制大黄
P15	49.07	[M-H] ⁻	415.102 0	415.103 5	-3.5	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416.11	大黄酚-8-O-葡萄糖苷	制大黄
P16	49.59	[M-H] ⁻	415.103 6	415.103 5	-4.7	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416.11	大黄酚-1-O-葡萄糖苷	制大黄
P17	56.07	[M-H] ⁻	253.050 6	253.050 6	0.0	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.06	大黄酚	制大黄
P18	56.11	[M-H] ⁻	297.039 8	297.040 5	-2.2	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298.05	3,8-二羟基-1-甲基蒽醌-2-羧酸	制大黄
P19	57.60	[M-H] ⁻	269.045 2	269.045 5	-1.3	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.05	芦荟大黄素	制大黄
P20	60.50	[M-H] ⁻	283.024 2	283.024 8	-2.2	C ₁₅ H ₈ O ₆	284.03	大黄酸	制大黄
P21	67.98	[M-H] ⁻	269.044 6	269.045 5	-3.5	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.05	大黄素	制大黄
P22	68.01	[M+FA-H] ⁻	913.480 8	913.480 2	0.6	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	868.48	薯蓣皂苷	粉萆薢

3.2 “药物-疾病”共同靶点 筛选得到 378 个药物靶点和 1 587 个疾病靶点, 取交集得到 126 个共同靶点, 见图 5。

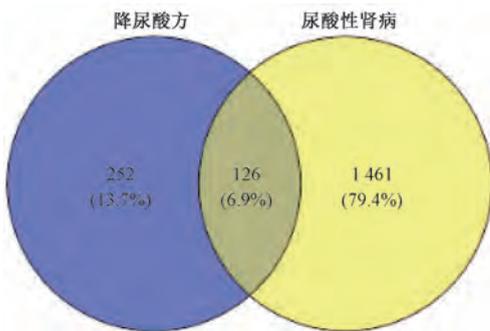
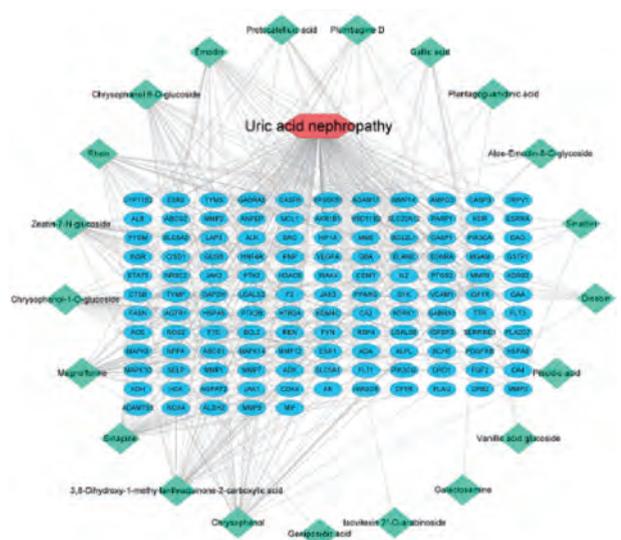


图5 降尿酸方对尿酸性肾病的作用靶点韦恩图

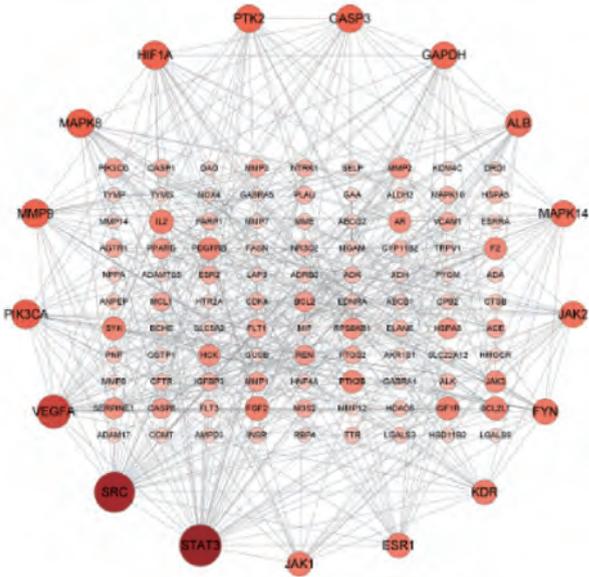
3.3 PPI 网络构建及核心靶点分析 采用 Cytoscape 软件筛选降尿酸方潜在活性成分、“药物-疾病”共同靶点, 删除与尿酸性肾病靶点无交集的芦荟大黄素, 最终以 21 种成分与 126 个靶点构建“成分-靶点-疾病”网络图, 见图 6; 构建降尿酸方干预尿酸性肾病差异表达基因的 PPI, 见图 7; 为 STAT3、SRC、VEGFA Degree 值排名前 20 的靶点绘制条形图, 见图 8。



注: 绿色表示降尿酸方中 21 种定性成分, 蓝色表示 126 个共同靶点; 共 148 个节点, 413 条边。

图6 “中药-成分-靶点-疾病”网络图

3.4 GO 富集分析 由图 9 可知, 经过交集基因分析, 共



注：节点的大小、颜色深浅依据 Degree 值大小改变，最外圈为 Degree 值>15 的靶点；共 116 节点，437 条边。

图 7 降尿酸方干预尿酸性肾病差异表达基因的 PPI 网络图

识别出 650 条显著富集的通路，其中涉及 BP 的通路 470 条，CC 相关通路 68 条，MF 相关通路 112 条。在 BP 方面，

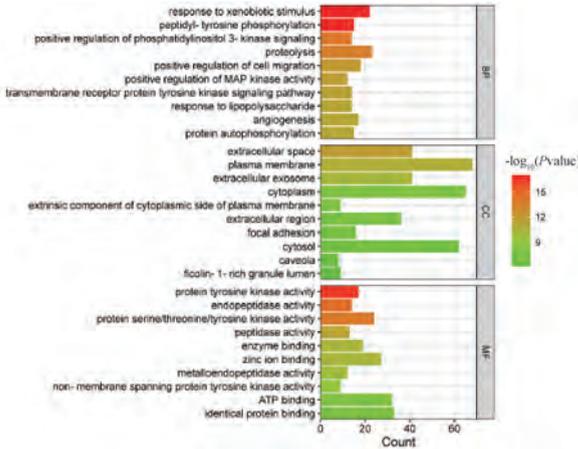


图 9 降尿酸方对尿酸性肾病作用的 GO 功能富集分析

3.5 KEGG 富集分析 通过 David 数据库进行 KEGG 富集分析，得到 124 条 KEGG 通路，选取癌症通路、脂质和动

主要富集的通路包括对外源性刺激的反应、蛋白质水解过程、磷酸化作用、细胞迁移、血管生成等；CC 方面，主要涉及的通路包括细胞外间隙、细胞质膜、外泌体、细胞质、质膜细胞质侧的外源性成分等；MF 方面，富集的通路包括蛋白酪氨酸激酶活性、内肽酶活性、酶结合、锌离子结合等。综合分析结果提示，降尿酸方案可能通过降低炎症反应、保护肾脏内皮功能等机制，对尿酸性肾病发挥治疗作用。

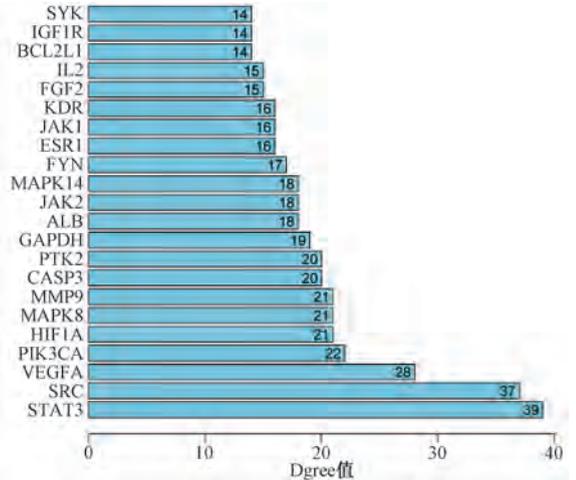


图 8 核心靶点排序

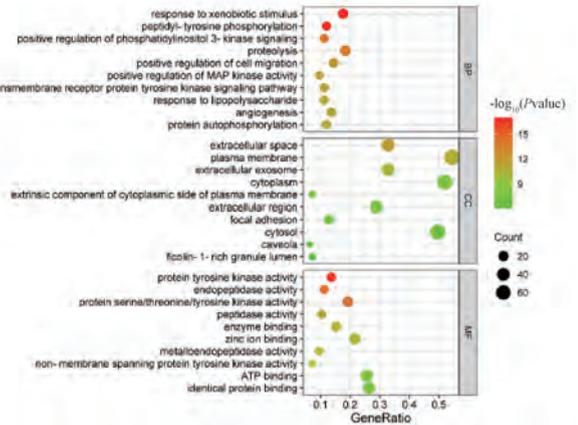
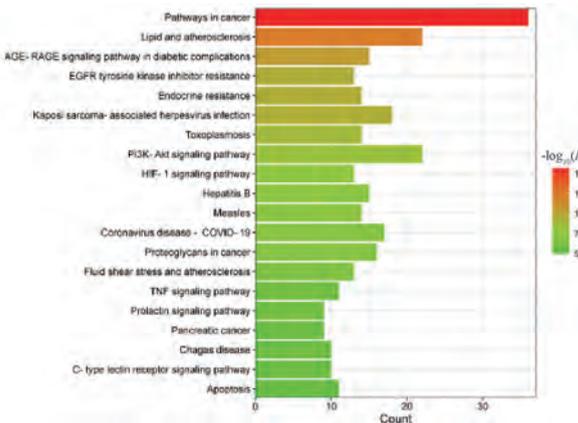


图 10 降尿酸方对尿酸性肾病作用的 KEGG 通路富集分析

脉粥样硬化、低氧诱导因子-1 通路等排名前 20 的通路绘制条形图和气泡图，见图 10。



3.6 分子对接 通过分子对接技术,将活性成分与潜在的核心靶点进行结合,并计算相应的结合能,见图11。当结合能 ≤ -5.0 kcal/mol时,表明该结合具有良好的亲和力,且结合能数值越小,相互作用力越强。选取结合能低于 -8.0 kcal/mol的4组进行可视化,结果靶点SRC、STAT3与活性成分3,8-dihydroxy-1-methy lanthraquinone-2-carboxylic acid、chrysophanol均结合良好,见图12。

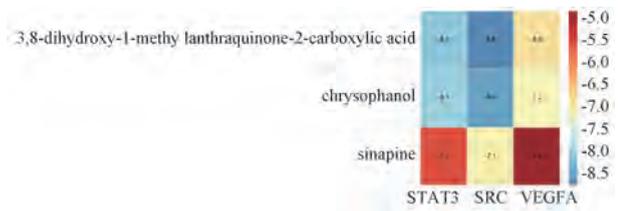


图11 分子对接结合能热图

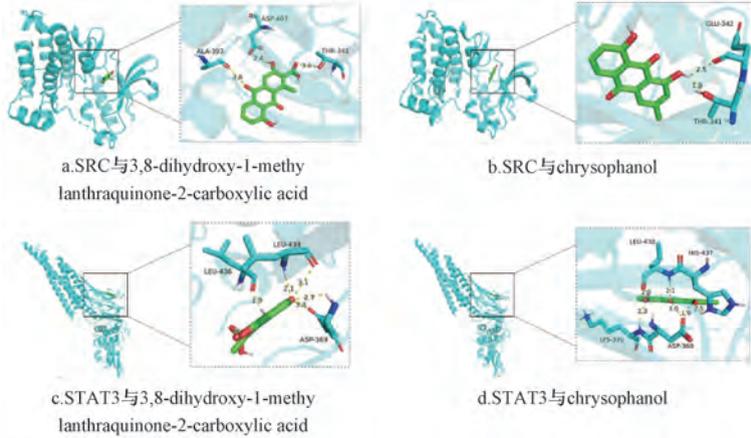


图12 分子对接模式图

3.7 降尿酸方对模型大鼠肾功能的影响 与正常组比较, $P < 0.01$); 与模型组比较, 非布司他组和降尿酸方组模型组大鼠 SCr、BUN 和 SUA 水平升高 ($P < 0.05$, SCr、BUN和SUA水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表4。

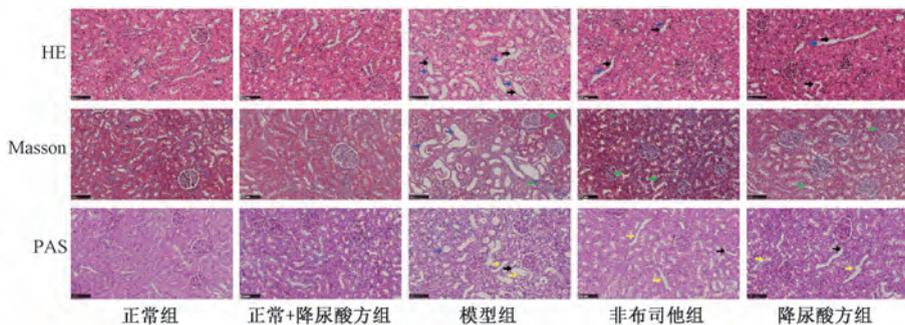
表4 降尿酸方对大鼠肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	SCr/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	BUN/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	SUA/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
正常组	21.20 \pm 1.17	6.42 \pm 0.18	108.00 \pm 12.88
正常+降尿酸方组	21.00 \pm 0.63	6.34 \pm 0.44	116.20 \pm 21.25
模型组	97.00 \pm 4.00**	6.98 \pm 0.44*	283.00 \pm 40.32**
非布司他组	56.00 \pm 5.83##	5.02 \pm 1.14#	112.00 \pm 16.31##
降尿酸方	26.00 \pm 3.74##	4.70 \pm 1.03##	73.00 \pm 11.66##

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

3.8 降尿酸方对模型大鼠肾组织病理形态的影响 与正常组比较,正常+降尿酸方组大鼠肾组织结构清晰,肾小球、肾小管形态正常,细胞排列整齐,未见异常改变;模型组大鼠中肾脏组织形态出现异常,表现为结构松散,肾小管

腔体扩大,肾小管上皮细胞出现脱落现象,同时肾间质的炎症细胞浸润和纤维化现象显著。与模型组比较,非布司他组和降尿酸方组的肾脏结构较清晰,肾小管腔体仅轻微扩张,纤维组织的增生也有所减轻,见图13。

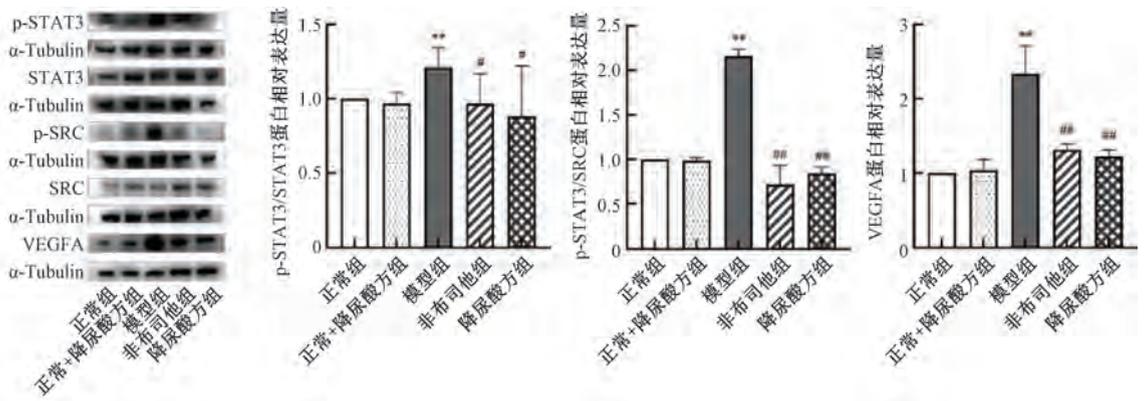


注:黑色箭头指示肾小管上皮细胞脱落,蓝色箭头指示肾小管管腔扩张,绿色箭头指示肾间质胶原沉积,黄色箭头指示肾小管刷状缘消失。

图13 各组大鼠肾组织病理变化 (HE、Masson、PAS染色, $\times 200$)

3.9 降尿酸方对模型大鼠肾组织 STAT3、SRC、VEGFA 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 p-STAT3、p-SRC、VEGFA 蛋白表达升高 ($P < 0.01$);与模

型组比较,非布司他组和降尿酸方组肾组织 p-STAT3、p-SRC、VEGFA 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图14。



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 14 各组大鼠肾组织 pSTAT3/STAT3、PSRC/SRC、VEGFA 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

4 讨论

尿酸过度累积引发肾损伤是尿酸性肾病的主要原因^[5]。持续高水平尿酸析出的尿酸盐结晶在肾脏累积后，会激活一系列炎症反应，最终发展为尿酸性肾病^[6-7]。降尿酸方是治疗尿酸性肾病的经验方，能有效降低尿酸性肾病患者SUA，改善肾功能。中药复方配伍多样，因其君、臣、佐、使的配伍特点，各组间可能存在相互作用，因此药物血清中原型成分和代谢产物的鉴定对探讨降尿酸方的作用机制具有重要意义。

本研究建立了尿酸性肾病大鼠模型，并给予降尿酸方水煎液干预，发现其能够降低模型大鼠的尿酸水平，改善肾功能，减轻肾组织病理损伤。为进一步探索其作用机制，采用UPLC-Q-TOF/MS技术，确定了22种降尿酸方原型成分，并结合网络药理学筛选出STAT3、SRC、VEGFA等126个作用靶点，其可能通过调节癌症通路、脂质和动脉粥样硬化、低氧诱导因子-1通路等发挥尿酸性肾病的保护作用。

缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 是细胞缺氧反应中的重要转录因子，由受O₂调节的α亚基和组成性表达的β亚基构成，其中HIF-1α表达最普遍。STAT3是HIF-1信号通路的靶点，该通路介导肾脏损伤期间的缺氧适应，并且与炎症反应、上皮-间质转化和细胞外间质沉积有关，促进肾脏纤维化改变^[8-9]。上调STAT3表达能够加重细胞坏死和炎症反应，加剧急性肾损伤大鼠的肾损伤^[10]。抑制STAT3表达能够降低高尿酸血症小鼠SUA水平，减轻肾脏损伤^[11]，还能减轻肾脏氧化应激和炎症反应，减缓单侧输尿管梗阻肾间质纤维化^[12]。此外，有报道称STAT3激活是高尿酸血症诱导肾纤维化的重要分子基础^[13]。降尿酸方中的威灵仙总苷通过抑制JAK2/STAT3途径抗炎、镇痛^[14]。大黄是被广泛使用的具有肾脏保护活性的中草药之一，Chen等^[15]认为，大黄酸通过抑制STAT3的磷酸化减轻单侧输尿管梗阻(UUO)小鼠肾小管细胞凋亡以及肾纤维化。SRC是肾间质成纤维细胞活化、增殖和诱导肾纤维化的重要介质，UUO诱导的肾损伤能够提高SRC/STAT3表达^[16]。抑制SRC/STAT3的激活能够降低尿酸性肾病小鼠模型的SUA水平，

保护肾功能，减缓肾脏纤维化进展^[17]。肾脏内皮功能障碍在尿酸性肾病发病机制中起重要作用。高水平SUA与内皮功能障碍的患病率呈正相关^[18]。降尿酸方中的王不留行含有的黄酮苷具有广泛的生物效应，包括预防内皮细胞损伤、促进血管生成、伤口愈合和保护肝脏^[19]。氧化低密度脂蛋白诱导的内皮细胞中观察到王不留行黄酮苷可抑制炎症、内皮细胞间质转分化和细胞凋亡^[20]。血管内皮生长因子VEGF的表达与多种肾脏疾病相关，其中VEGFA诱导的血管通透性改变在肾脏生理、病理进程中至关重要^[21-22]。在急性肾损伤进展过程中，肾脏内VEGFA表达的2个峰值出现在早期阶段和向慢性肾脏病转变期间，慢性肾脏病早期上调VEGFA表达能够通过保留肾脏微血管结构、减轻继发性肾小管缺氧损伤来防止肾损伤，而发展至慢性肾脏病末期抑制VEGFA表达能够减轻肾纤维化进展^[23]。

综上所述，本研究成功建立尿酸性肾病大鼠模型，并以降尿酸方干预，初步验证了降尿酸方对其具有良好的治疗作用；应用网络药理学预测作用机制，系统阐释了降尿酸方治疗尿酸性肾病的多组分、多通路、多靶点的作用特点；经Western blot法验证降尿酸方可能通过下调STAT3、SRC、VEGFA蛋白表达降低尿酸性肾病大鼠模型SUA水平，改善肾功能，其更完善的作用机制还需要进一步验证。

参考文献:

- [1] Singh J A, Cleveland J D. Gout is associated with a higher risk of chronic renal disease in older adults; a retrospective cohort study of U. S. medicare population[J]. *BMC Nephrol*, 2019, 20(1): 93.
- [2] Yang L J, Chang B C, Guo Y L, et al. The role of oxidative stress-mediated apoptosis in the pathogenesis of uric acid nephropathy[J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 616-622.
- [3] 王毅兴, 王维淳, 高建东, 等. 降尿酸方联合别嘌醇治疗尿酸性肾病的临床研究[J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52(8): 44-46; 57.
- [4] 辛家东, 高建东. 降尿酸方治疗慢性尿酸性肾病痰浊瘀阻证随机对照研究[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(3): 657-660.
- [5] Aslan G, Afsar B, Sag A A, et al. The effect of urine pH and

- urinary uric acid levels on the development of contrast nephropathy[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2020, 45(1): 131-141.
- [6] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, *et al.* Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. *Nature*, 2006, 440(7081): 237-241.
- [7] Xu X L, Wang H F, Guo D D, *et al.* Curcumin modulates gut microbiota and improves renal function in rats with uric acid nephropathy[J]. *Ren Fail*, 2021, 43(1): 1063-1075.
- [8] Moore C, Bellomo R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury[J]. *Ann Intensive Care*, 2011, 1(1): 3.
- [9] Chen W, Yuan H, Cao W, *et al.* Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation[J]. *Theranostics*, 2019, 9(14): 3980-3991.
- [10] Ma P Y, Zhang C M, Huo P F, *et al.* A novel role of the miR-152-3p/ERRF1/STAT3 pathway modulates the apoptosis and inflammatory response after acute kidney injury[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(9): e22540.
- [11] Liu T Y, Gao H M, Zhang Y Y, *et al.* Apigenin ameliorates hyperuricemia and renal injury through regulation of uric acid metabolism and JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(11): 1442.
- [12] Hassan N M E, Said E, Shehatou G S G. Nifuroxazide suppresses UUO-induced renal fibrosis in rats *via* inhibiting STAT-3/NF- κ B signaling, oxidative stress and inflammation[J]. *Life Sci*, 2021, 272: 119241.
- [13] Pan J, Shi M, Guo F, *et al.* Pharmacologic inhibiting STAT3 delays the progression of kidney fibrosis in hyperuricemia-induced chronic kidney disease[J]. *Life Sci*, 2021, 285: 119946.
- [14] 邓龙飞, 汪永忠, 韩燕全, 等. 威灵仙总皂苷抑制佐剂性关节炎大鼠 JAK2/STAT3 信号通路[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(2): 153-158.
- [15] Chen Y K, Mu L, Xing L L, *et al.* Rhein alleviates renal interstitial fibrosis by inhibiting tubular cell apoptosis in rats[J]. *Biol Res*, 2019, 52(1): 50.
- [16] Yan Y L, Ma L, Zhou X X, *et al.* Src inhibition blocks renal interstitial fibroblast activation and ameliorates renal fibrosis[J]. *Kidney Int*, 2016, 89(1): 68-81.
- [17] Pan J, Shi M, Li L Z, *et al.* Pterostilbene, a bioactive component of blueberries, alleviates renal fibrosis in a severe mouse model of hyperuricemic nephropathy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1802-1808.
- [18] Tang J Y, Liu K Y, Eshak E S, *et al.* Association between serum uric acid and impaired endothelial function: The circulatory risk in communities study[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2022, 29(10): 1534-1546.
- [19] Sun J N, Yu X Y, Hou B, *et al.* Vaccarin enhances intestinal barrier function in type 2 diabetic mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 908: 174375.
- [20] Gong L L, Lei Y Y, Liu Y X, *et al.* Vaccarin prevents ox-LDL-induced HUVEC EndMT, inflammation and apoptosis by suppressing ROS/p38 MAPK signaling[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2140-2154.
- [21] Zheng W W, Qian C, Xu F M, *et al.* Fuxin Granules ameliorate diabetic nephropathy in db/db mice through TGF- β 1/Smad and VEGF/VEGFR2 signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111806.
- [22] Apte R S, Chen D S, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [23] Huang M J, Ji Y W, Chen J W, *et al.* Targeted VEGFA therapy in regulating early acute kidney injury and late fibrosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(9): 1815-1825.