

痛风宁对高尿酸血症模型大鼠肾脏尿酸盐转运体表达的影响

蔡唐彦¹, 肖艳², 郭洁梅^{1,2}, 毛骁², 王建辉², 李保林², 滕方舟³, 林建平⁴, 苏友新^{2*}

(1. 福建卫生职业技术学院, 福州 350101; 2. 福建中医药大学, 福州 350122;

3. 复旦大学附属华山医院, 上海 200040; 4. 福建医科大学, 福州 350004)

[摘要] 目的:通过观察痛风宁对高尿酸血症(HUA)模型大鼠肾脏尿酸盐转运体蛋白及mRNA表达的影响,探讨该方促进尿酸排泄的机制。方法:将80只SD大鼠随机分为空白组20只和造模组60只。造模组行腹腔注射氧嗪酸钾(OAPS)联合盐酸乙胺丁醇(EMB)灌胃造模,于第21天时鉴定模型,确定造模成功后将60只造模大鼠随机分为模型组、痛风宁组和苯溴马隆组,每组20只。痛风宁组和苯溴马隆组分别予15.3 g·kg⁻¹·d⁻¹痛风宁药液及5.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹苯溴马隆混悬液灌胃,空白组和模型组予等量生理盐水灌胃,于干预第14,21天分批采集大鼠尿液、血液、肾脏组织。采用酶比色法检测血尿酸(SUA),尿酸(UUA)含量,脲酶法检测血尿素氮(BUN)含量,肌氨酸氧化酶法检测肌酐(CRE)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测肾脏尿酸盐转运体蛋白和mRNA表达。结果:药物干预第14,21天,与空白组比较,模型组SUA,CRE,BUN升高,UUA显著降低($P<0.01$),尿酸盐转运体1(URAT1),葡萄糖转运体9(GLUT9)蛋白与mRNA表达明显升高($P<0.05$),三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G2(ABCG2),有机阴离子1(OAT1),有机阴离子3(OAT3)蛋白与mRNA表达明显下降($P<0.05$);与模型组比较,痛风宁组及苯溴马隆组SUA,CRE,BUN明显降低,UUA明显升高($P<0.05$),URAT1, GLUT9蛋白与mRNA表达明显下降($P<0.05$),ABCG2,OAT1,OAT3蛋白与mRNA表达明显升高($P<0.05$),痛风宁组CRE, BUN明显降低($P<0.05, P<0.01$),且明显优于苯溴马隆组($P<0.05$);干预第21天痛风宁组,除BUN外,其余指标改善趋势均更明显。结论:腹腔注射OAPS联合EMB灌胃可致HUA,并伴有肾功能异常;痛风宁可促进尿酸排泄,降低血尿酸,并下调肾脏URAT1, GLUT9表达,上调ABCG2,OAT1,OAT3表达,这可能是其促进尿酸排泄而降尿酸的作用机制之一;痛风宁对肾功能具有一定的保护作用。

[关键词] 痛风宁; 高尿酸血症; 肾脏; 尿酸盐转运体; 大鼠

[中图分类号] R2-0;R289;R334+.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)16-0079-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201637

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200611.1432.001.html>

[网络出版日期] 2020-6-12 09:37

Effect of Tongfengning on Expression of Renal Urate Transporter in Hyperuricemia Rats

CAI Tang-yan¹, XIAO Yan², GUO Jie-mei^{1,2}, MAO Xiao², WANG Jian-hui², LI Bao-lin²,

TENG Fang-zhou³, LIN Jian-ping⁴, SU You-xin^{2*}

(1. Fujian Health College, Fuzhou 350101, China; 2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine,

Fuzhou 350122, China; 3. Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China;

4. Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

[Abstract] **Objective:** Study on the mechanism of Tongfengning in promoting uric acid excretion from the perspective of urate transporter and mRNA in renal of hyperuricemia (HUA) model rats. **Method:** The 80 sprague-dawley rats were randomly divided into two groups, the blank group with 20 rats and the model group with 60 rats. Rats in model group were established as hyperuricemia (HUA) models by intraperitoneal injection

[收稿日期] 20200420(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473495)

[第一作者] 蔡唐彦, 硕士, 助教, 从事骨与关节病的中医康复治疗研究, E-mail: 790503018@qq.com

[通信作者] * 苏友新, 博士, 教授, 从事骨与关节疾病防治与康复的基础与临床工作, E-mail: suyouxin777@hotmail.com

of oxonic acid potassium salt (OAPS) and intragastric administration ethambutol hydrochloride (EMB) once a day for 21 days. After successful modeling, rats in the model group were divided into the model group, Tongfengning group and benzbromarone group, with 20 rats per group. Tongfengning solution ($15.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was administered to the Tongfengning group by gavage feeding. Rats in benzbromarone group were administered $5.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ benzbromarone suspension, whereas those in the blank group and the model group were administered the equivalent amount of normal saline for 21 days. On days 14th and 21st following intervention, urine, blood, and kidney were collected from rats, serum uric acid (SUA) and urinary uric acid (UUA) levels, blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) levels and the expression of urate transporter proteins and their mRNAs of all rats were detected by enzyme-colorimetric method, urease method, sarcosine oxidase method, Western blot and Real-time quantitative PCR (Real-time PCR), respectively. **Result:** On days 14th and 21st following intervention, compared with blank group, SUA, CRE and BUN levels, and urate transporter 1 (URAT1), glucose transporter 9 (GLUT9) expression increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), whereas UUA level, and adenosine triphosphate-binding cassette transporter protein G2 (ABCG2), organic anion 1 (OAT1), organic anion 3 (OAT3) expression decreased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, SUA, CRE and BUN levels, and URAT1, GLUT9 expression decreased in Tongfengning group and the benzbromarone group ($P < 0.05$), whereas UUA level, and ABCG2, OAT1, OAT3 expression increased ($P < 0.05$). Creatinine and BUN levels decreased in the Tongfengning group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with the trend much better than the benzbromarone group ($P < 0.05$). On day 21st, except for the BUN level did not change much compared with day 14th, all the rest indicators got improved obviously. **Conclusion:** Intraperitoneal injection of OAPS and intragastric administration of EMB can cause HUA models with renal dysfunction. Tongfengning reduced URAT1, GLUT9 mRNA and protein expression, and upregulated ABCG2, OAT1, OAT3 mRNA and protein expression in the rat kidney, which may be one of the mechanisms of promoting uric acid excretion. Tongfengning has a certain protective effect on renal function.

[Key words] Tongfengning; hyperuricemia; kidney; urate transporter; rats

高尿酸血症(HUA)是由于血尿酸(SUA)产生过多或排泄不足而导致的一种嘌呤代谢性疾病^[1],可诱发痛风,并与高血压、脑梗死、肾脏损害等疾病关系密切。人体60%~70%尿酸经肾脏排泄,主要包括4个过程:肾小球滤过、近端小管重吸收、分泌及分泌后再吸收^[2]。98%的尿酸在肾小球滤过后被近端肾小管重吸收,50%重吸收的尿酸被分泌到肾小管腔内,40%~44%肾小管腔内的尿酸又被重吸收,最后只有6%~10%尿酸排出。现代研究已证实^[3],尿酸盐转运体1(URAT1),葡萄糖转运体9(GLUT9),三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G2(ABCG2),有机阴离子1(OAT1),有机阴离子3(OAT3)参与尿酸重吸收和分泌过程。促进尿酸排泄是治疗HUA及预防痛风的主要方法,目前临床上促进尿酸盐排泄的主要药物苯溴马隆等,效果较明显,但存在胃肠道不适、易造成肝功能损害等不良反应,在服药期间需定期监测肝功能及尿尿酸(UUA)含量,不适用于有肝功能异常,UUA过高及尿路结石病史的患者,因此急需寻求理想的促尿酸

排泄药物。

课题组经过20余年的研究与实践,总结出具有利湿排浊、消肿止痛之功效的“痛风宁”效验方^[4]。前期临床研究证实,痛风宁能显著降低痛风性关节炎患者SUA含量,疗效确切^[5-6];动物实验研究也表明,该方能促进HUA模型动物尿酸排泄,降低SUA含量^[7-8]。痛风宁促尿酸排泄是否涉及对尿酸盐转运体的调控,基于此,笔者拟通过采用痛风宁干预HUA模型大鼠,观察干预第14,21天大鼠SUA,UUA,血尿素氮(BUN),血肌酐(CRE)含量以及肾脏URAT1, GLUT9, ABCG2, OAT1, OAT3蛋白及mRNA表达情况,进一步阐明该方促尿酸排泄的作用机制并明确其合适干预时间,为其推广应用奠定基础。

1 材料

1.1 动物 80只SPF级健康3月龄雄性SD大鼠,体质量(200 ± 20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号SCXK(沪)2012-0002。委托福建中医药大学实验动物中心代购并且饲养,饲养

条件为室温(24±2)℃,相对湿度45%~55%,光暗周期(12 h/12 h),分笼饲养,自由饮食,实验动物使用许可证号SYXK(闽)2014-0006。本实验经福建中医药大学动物伦理委员会批准(福中医[2019]伦理审字第017号)。

1.2 药物 痛风宁全方由苍术、土茯苓、黄柏、川牛膝、草薢、丹参、秦艽、肿节风、泽泻、金钱草组成,各占比例为3:10:2:4:5:5:3:5:5:7。以上药材均由福建中医药大学国医堂提供,经由福建中医药大学药学院中药鉴定教研室杨成梓教授鉴定。痛风宁药液制备:将上述中药放入药罐中,加水量超过药面2~3 cm,浸泡30 min;先用大火煮沸,再用小火煎煮30 min,至药液剩余约250 mL倒出;加温水适量,浸过药面即可。大火煮沸,再用小火煎煮30 min,至药液剩余约250 mL倒出;采用旋转蒸发器,将水提液浓缩至含生药2 g·mL⁻¹的药液,于4℃保存备用;盐酸乙胺丁醇(EMB)片(杭州民生药业有限公司,批号T13H603),EMB溶液制备:取羧甲基纤维素钠(CMC,浓度8 g·L⁻¹)溶液100 mL加入EMB粉末400 mg混匀,配制成浓度为4 g·L⁻¹的溶液;苯溴马隆片(德国赫曼大药厂,批号1409867),苯溴马隆溶液制备:取CMC(8 g·L⁻¹)溶液100 mL加入苯溴马隆粉末200 mg混匀,配制成质量浓度为2 g·L⁻¹的溶液。

1.3 试剂 氧嗪酸钾,CMC(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号分别为C1503044,H1528011);尿酸测定试剂盒,CRE测试盒,BUN试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为C012-2-1,C011-2-1,C013-2-1);URAT1抗体(中国武汉三鹰生物技术有限公司,批号14937-1-AP),GLUT9抗体(英国Abcam公司,批号ab190929);OAT1抗体,OAT3抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号分别为sc-161977,sc-293264);ABCG2抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号4477s);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国Proteintech Group公司,批号66009-1-Ig);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,HRP羊抗鼠IgG(美国EarthOx公司,批号分别为E030120-01,E030110-01);trizol总RNA提取试剂盒,逆转录试剂盒,ChamQ SYBR qPCR反应混合物(中国南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为15596026,R123-01,Q311-02)。

1.4 仪器 RE-52AA型旋转蒸发器(中国上海亚荣生化仪器厂);5417R型高速离心机(德国Eppendorf公司);ELX800型全自动酶标仪(美国

BioTek公司);9700型基因扩增仪(美国Applied Biosystems公司);PowerPac™型电泳仪,690BR0068 27型半干转印系统-新型快速,ChemiDocXRS型化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物造模、鉴定及干预 采用随机数字表法将80只雄性SD大鼠随机分为空白大鼠20只和造模大鼠60只。造模大鼠以200 mg·kg⁻¹氧嗪酸钾溶液(OAPS,浓度为25 g·L⁻¹)腹腔注射和250 mg·kg⁻¹ EMB混悬液灌胃,每天1次,建立HUA模型^[9]。于第21天时,予大鼠眼眶采血检测SUA进行模型鉴定。参考文献资料^[9-10]及课题组前期预实验结果,以SUA升高作为造模成功标准。造模成功后,随机分为模型组、痛风宁组和苯溴马隆组,每组各20只。痛风宁组予15.3 g·kg⁻¹·d⁻¹痛风宁药液灌胃,苯溴马隆组予5.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹苯溴马隆混悬液灌胃,空白组和模型组给等量生理盐水。每天2次,上、下午各1次,连续21 d。为维持稳定的高尿酸状态,除空白组外,其余组在给药干预的同时,均继续给予200 mg·kg⁻¹ OAPS腹腔注射和250 mg·kg⁻¹ EMB混悬液灌胃。

2.2 标本采集 于干预第14,21天用代谢笼采集各组大鼠尿液,并各组随机取10只大鼠,用3 mL·kg⁻¹ 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,行腹主动脉采血,3 000 r·min⁻¹离心20 min后分装血清,-80℃保存;于冰上快速获取肾脏,去除膜,用生理盐水冲洗干净,经液氮冷冻后转入-80℃保存。

2.3 酶比色法检测大鼠SUA,UUA含量 采用多功能酶标仪,按照酶比色法检测造模大鼠SUA及干预后各组大鼠SUA,UUA含量,具体操作均根据试剂盒说明书进行。

2.4 脲酶法检测大鼠血BUN含量 采用多功能酶标仪,按照脲酶法检测干预后各组大鼠血BUN含量,具体操作均根据试剂盒说明书进行。

2.5 肌氨酸氧化酶法检测大鼠CRE含量 采用多功能酶标仪,按照肌氨酸氧化酶法检测干预后各组大鼠CRE含量,具体操作均根据试剂盒说明书进行。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾脏URAT1, GLUT9, OAT1, OAT3, ABCG2蛋白的表达 于液氮中研磨肾脏组织,取100 mg肾脏组织加入RIPA裂解液1 mL,冰上裂解30 min;于4℃15 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清即得总蛋白;根据BCA试剂盒说明书进行蛋白定量后进行蛋白变性;

每孔按 30 μg 蛋白上样,进行凝胶电泳。转膜后,用 TBST 洗涤 PVDF 膜后置于封闭液中,室温孵育 2 h;封闭后,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,放入一抗工作液 (URAT1 1:5 000, OAT1 1:200, OAT3 1:200, GLUT9 1:1 000, ABCG2 1:1 000, β-actin 1:5 000) 中,4 °C 孵育过夜;后用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,将膜置于二抗工作液 (HRP 羊抗兔 IgG 1:1 万,HRP 羊抗鼠 IgG 1:1 万) 中,室温孵育 1 h;后用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜置于化学发光成像仪上,加显影液,避光反应 1 min。设置 Image Lab 软件程序对条带进行成像记录,对比各目的条带灰度值。

2.7 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测大鼠肾脏 URAT1, GLUT9, OAT1, OAT3, ABCG2 mRNA 的表达 按照 trizol 试剂盒说明书上的操作方式进行总 RNA 提取;取各组 RNA 样本于冰上解冻、振荡混匀,4 °C 13 000 r·min⁻¹ 离心 1 min 后依次加入各组离心管中,用 ddH₂O 定容至 18 μL,加 4×g DNA wiper Mix 6 μL,混匀放入 Real-time PCR 仪,42 °C, 2 min;取出离心管,每管加 5×RT Master Mix II 6 μL 混匀,50 °C 15 min,85 °C 2 min 进行 RNA 逆转录,结束后每管加 ddH₂O 30 μL,混匀后于 -20 °C 保存;按试剂说明书配制 Real-time PCR 反应体系,放入 PCR 扩增仪中,反应条件为 94 °C 5 min,94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 20 s,共 30 个循环;琼脂糖凝胶电泳鉴定:取 1×TAE 80 mL 溶解 0.8 g 琼脂糖,煮沸后加入 gelred 核酸染料 10 μL,取 1×TAE 10 μL 倒入电泳槽中;待琼脂糖溶液冷却至温热时,倒入电泳板中,胶凝固后,拔出梳子,放入电泳槽;120 V 电泳 30 min 后,进行凝胶成像检测。引物委托福建尚

亚生物工程有限公司进行设计与合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
URAT1	上游 GGTGGTGGAGTACAGTGAGAT	112
	下游 GAACGGCACAGTGAAGAAGT	
GLUT9	上游 GCAGGTCATCACTGTCGTTATC	218
	下游 AGCCACCAATGAGGAGAGGT	
OAT1	上游 GAACTTCACTGCCGCTATCC	194
	下游 CTGTGACTCTGGTGCCATTG	
OAT3	上游 GCCTATGCCATTCTCAGTG	179
	下游 TCCTCCTTCTTGCCGTTGA	
ABCG2	上游 AGCCTGTATATGTTACCTCGTCTCT	413
	下游 CACCGTCCTTTCAGTCCTAA	
GAPDH	上游 ACGGCAAGTTCAACGGCACAG	124
	下游 GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC	

2.8 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采取单因素方差分析,组间比较方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时应用 Tamhane's T2 法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对高尿酸血症模型大鼠 SUA, UUA 含量的影响 干预第 14, 21 天,与空白组比较,模型组 SUA 升高,UUA 显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,痛风宁组及苯溴马隆组 SUA 降低,UUA 显著升高 ($P < 0.01$),且痛风宁组优于苯溴马隆组 ($P < 0.01$);与干预第 14 天比较,干预第 21 天的痛风宁组、苯溴马隆组的 SUA 含量均明显降低,UUA 含量明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 痛风宁对大鼠干预第 14, 21 天 SUA, UUA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Tongfengning on contents of SUA and UUA on 14th and 21st days of intervention in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=10$) μmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SUA		UUA	
		第 14 天	第 21 天	第 14 天	第 21 天
空白	-	115.00±11.53	118.20±4.51	1371.59±32.57	1367.55±15.88
模型	-	268.67±12.96 ¹⁾	262.00±9.81 ¹⁾	1002.69±4.23 ¹⁾	981.70±2.81 ¹⁾
痛风宁	15.3	154.33±2.32 ^{2,3)}	143.33±4.43 ^{2,3,4)}	1193.80±31.22 ^{2,3)}	1214.43±30.77 ^{2,3,5)}
苯溴马隆	5.2×10 ⁻³	186.00±1.46 ²⁾	185.11±36.42 ^{2,4)}	1148.89±1.09 ²⁾	1196.89±29.78 ^{2,5)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与苯溴马隆组比较³⁾ $P < 0.01$;与本组第 14 天比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对高尿酸血症模型大鼠 CRE, BUN 含量的影响 干预第 14 天,与空白组比较,模型组 CRE, BUN 显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,痛风宁组 CRE, BUN 含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),苯溴马隆组

BUN, CRE 与模型组无显著性差异;与苯溴马隆组比较,痛风宁组 CRE, BUN 显著降低 ($P < 0.01$);干预第 21 天,与空白组比较,模型组 CRE, BUN 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,痛风宁组 CRE,

BUN明显降低($P<0.05$, $P<0.01$); 苯溴马隆组 CRE 含量明显升高($P<0.05$), 但 BUN 与模型组无显著性差异; 与苯溴马隆组比较, 痛风宁组 CRE, BUN 含量

显著降低($P<0.01$); 与干预第14天比较, 干预第21天痛风宁组 CRE 含量显著降低($P<0.01$); 苯溴马隆组的 BUN, CRE 含量显著升高($P<0.01$)。见表3。

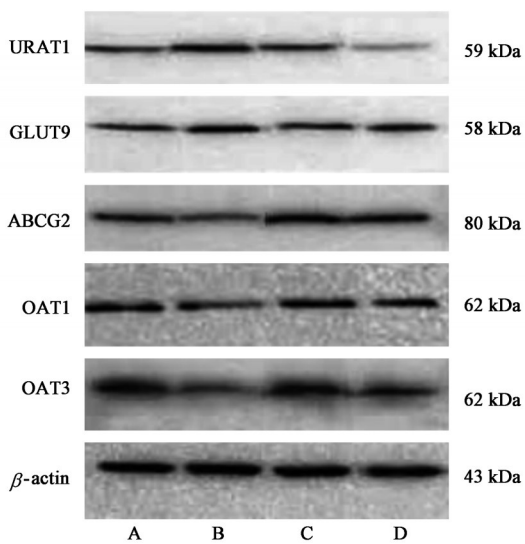
表3 痛风宁对各组大鼠干预第14, 21天 BUN, CRE 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of Tongfengning on contents of BUN and CRE on 14th and 21st days of intervention in rats of each group($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	BUN/ $mmol\cdot L^{-1}$		CRE/ $\mu mol\cdot L^{-1}$	
		第14天	第21天	第14天	第21天
空白	-	7.17±0.21	7.19±0.18	32.26±3.62	35.25±2.80
模型	-	11.87±0.58 ¹⁾	13.19±0.60 ¹⁾	57.33±12.75 ¹⁾	62.06±7.16 ¹⁾
痛风宁	15.3	8.36±0.18 ^{2,4)}	8.31±0.09 ^{3,4)}	36.85±11.40 ^{2,4)}	31.24±6.44 ^{3,4,5)}
苯溴马隆	5.2×10^{-3}	12.20±0.45	13.87±0.44 ⁶⁾	60.92±9.30	73.38±8.98 ^{2,5)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与苯溴马隆组比较⁴⁾ $P<0.01$; 与本组第14天比较⁵⁾ $P<0.01$ 。

3.3 对肾脏 URAT1, GLUT9, ABCG2, OAT1, OAT3 蛋白表达的影响 干预第14, 21天, 与空白组比较, 模型组 URAT1, GLUT9 蛋白表达明显升高($P<0.05$), ABCG2, OAT1, OAT3 蛋白表达明显下降($P<0.05$); 与模型组比较, 痛风宁组与苯溴马隆组 URAT1, GLUT9 蛋白表达明显下降($P<0.05$), ABCG2, OAT1, OAT3 蛋白表达明显升高($P<0.05$), 且痛风宁组优于苯溴马隆组($P<0.05$); 与干预第14天比较, 干预第21天痛风宁组, 苯溴马隆组的 URAT1, GLUT9 蛋白表达明显下降($P<0.05$), ABCG2, OAT1, OAT3 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见图1, 2, 表4。



A. 空白组; B. 模型组; C. 痛风宁组; D. 苯溴马隆组(图2~4同)

图1 各组干预第14天尿酸盐转运体蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of urate transporter protein expression on 14th day of intervention

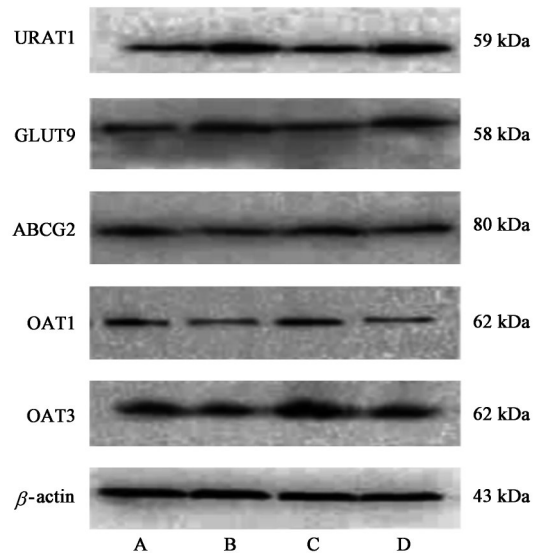


图2 各组第21天尿酸盐转运体蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of urate transporter protein expression on 21st day of intervention

3.4 对肾脏 URAT1, GLUT9, ABCG2, OAT1, OAT3 mRNA 表达的影响 干预第14, 21天, 与空白组比较, 模型组 URAT1, GLUT9 mRNA 表达明显升高($P<0.05$), ABCG2, OAT1, OAT3 mRNA 表达明显下降($P<0.05$); 与模型组比较, 痛风宁组与苯溴马隆组 URAT1, GLUT9 mRNA 表达明显下降($P<0.05$), ABCG2, OAT1, OAT3 mRNA 表达明显升高($P<0.05$), 且痛风宁组优于苯溴马隆组($P<0.05$); 与干预第14天比较, 干预第21天痛风宁组, 苯溴马隆组的 URAT1, GLUT9 mRNA 表达明显下降($P<0.05$), ABCG2, OAT1, OAT3 mRNA 表达明显升高($P<0.05$)。见图3, 4, 表5。

表4 痛风宁对各组干预第14,21天URAT1, GLUT9, ABCG2, OAT1, OAT3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Tongfengning on expression of URAT1, GLUT9, ABCG2, OAT1, OAT3 protein on 14th and 21st days of intervention in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	URAT1/ β -actin		GLUT9/ β -actin		ABCG2/ β -actin
		第14天	第21天	第14天	第21天	第14天
空白	-	0.21±0.06	0.23±0.04	0.27±0.06	0.32±0.05	0.75±0.08
模型	-	0.73±0.08 ¹⁾	0.77±0.08 ¹⁾	0.69±0.05 ¹⁾	0.71±0.05 ¹⁾	0.26±0.07 ¹⁾
痛风宁	15.3	0.31±0.07 ^{2,3)}	0.27±0.08 ^{2,3,4)}	0.39±0.05 ^{2,3)}	0.34±0.06 ^{2,3,4)}	0.52±0.06 ^{2,3)}
苯溴马隆	5.2×10 ⁻³	0.59±0.07 ²⁾	0.48±0.08 ^{2,4)}	0.55±0.04 ²⁾	0.48±0.07 ^{2,4)}	0.32±0.06 ²⁾

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ABCG2/ β -actin	OAT1/ β -actin		OAT3/ β -actin	
		第21天	第14天	第21天	第14天	第21天
空白	-	0.68±0.07	0.70±0.09	0.74±0.08	0.72±0.09	0.69±0.09
模型	-	0.28±0.08 ¹⁾	0.29±0.08 ¹⁾	0.27±0.06 ¹⁾	0.32±0.05 ¹⁾	0.31±0.07 ¹⁾
痛风宁	15.3	0.58±0.06 ^{2,3,4)}	0.56±0.05 ^{2,3)}	0.64±0.06 ^{2,3,4)}	0.59±0.07 ^{2,3)}	0.62±0.06 ^{2,3,4)}
苯溴马隆	5.2×10 ⁻³	0.40±0.06 ^{2,4)}	0.38±0.06 ²⁾	0.45±0.06 ^{2,4)}	0.38±0.07 ²⁾	0.42±0.07 ^{2,4)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05;与苯溴马隆组比较³⁾P<0.05;与本组第14天比较⁴⁾P<0.05(表5同)。

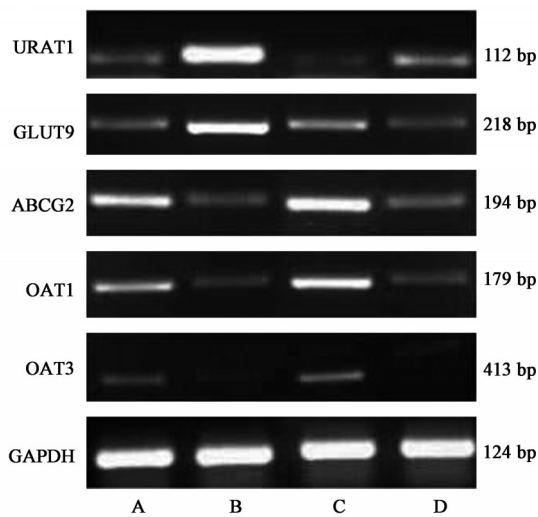


图3 各组干预第14天尿酸盐转运体 mRNA 表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of urate transporter mRNA expression on 14th day of intervention groups

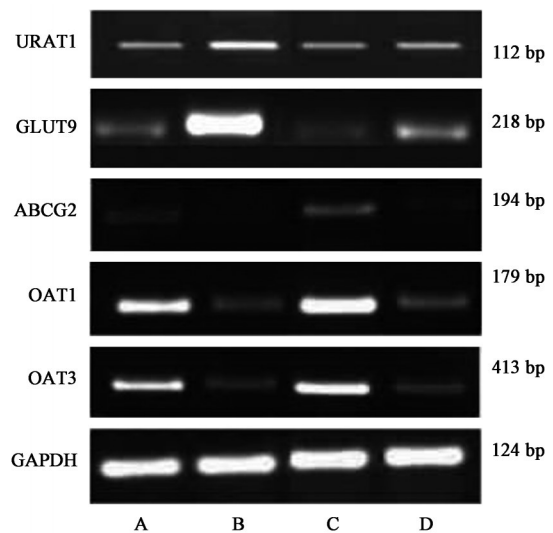


图4 各组干预第21天尿酸盐转运体 mRNA 表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of urate transporter mRNA expression on 21st day of intervention groups

4 讨论

课题组认为高尿酸属“内生湿浊”范畴,痛风属于“内湿致痹”^[4]。并认为这种认识始于《黄帝内经》,《黄帝内经·灵枢·贼风》篇曰:“夫子言贼风邪气之伤人也,令人病焉,今有其不离屏蔽,不出室穴之中,卒然病者……此皆尝有所伤于湿气,藏于血脉之中,分肉之间,久而不去,若有所堕坠……喜怒不节,饮食不适,寒温不时,腠理闭而不通,其开而遇风寒,则血气凝结,与故邪相袭,则为寒痹。”说明在《黄帝内经》时代人们就认识到有一类卒然发作的以疼痛为主的痹症,并不是因为感受风寒湿之邪而发病,而是先“伤于湿气”,这种“湿气”久留不

去,加上“有所堕坠……喜怒不节,饮食不适,寒温不时”,导致“血气凝结”而发病。痛风的西医发病机制是由于长期血尿酸升高,尿酸盐沉积体内,在外伤、外感、精神紧张及高嘌呤饮食等情况下诱发急性关节炎。因此,将“伤于湿气”并久留不去看作高尿酸血症状态、将“寒痹”(即痛痹,以疼痛为主)看作急性痛风性关节炎并没有牵强附会;将“有所堕坠……喜怒不节,饮食不适,寒温不时”作为急性痛风性关节炎发作诱因,与现代医学的认识也完全相符。课题组还认为“伤于湿气”主要是湿浊内生停滞,多因素体肥胖,痰湿内盛,加上嗜食肥甘厚腻,日久伤脾,津液输布障碍,水湿痰浊蓄积而成。

表5 痛风宁对各组干预第14,21天URAT1, GLUT9, ABCG2, OAT1, OAT3 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Tongfengning on expression of URAT1, GLUT9, ABCG2, OAT1, OAT3 mRNA on 14th and 21st days of intervention($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	URAT1/GAPDH		GLUT9/GAPDH		ABCG2/GAPDH
		第14天	第21天	第14天	第21天	第14天
空白	-	0.13±0.09	0.14±0.09	0.25±0.10	0.27±0.09	0.82±0.12
模型	-	0.79±0.14 ¹⁾	0.71±0.15 ¹⁾	0.85±0.11 ¹⁾	0.82±0.17 ¹⁾	0.33±0.12 ¹⁾
痛风宁	15.3	0.29±0.11 ^{2,3)}	0.21±0.10 ^{2,3,4)}	0.34±0.07 ^{2,3)}	0.31±0.10 ^{2,3,4)}	0.72±0.13 ^{2,3)}
苯溴马隆	5.2×10 ⁻³	0.41±0.12 ³⁾	0.37±0.09 ⁴⁾	0.57±0.07	0.55±0.11 ⁴⁾	0.42±0.11

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ABCG2/GAPDH	OAT1/GAPDH		OAT3/GAPDH	
		第21天	第14天	第21天	第14天	第21天
空白	-	0.84±0.03	0.87±0.14	0.86±0.08	0.64±0.07	0.65±0.08
模型	-	0.31±0.01 ¹⁾	0.36±0.08 ¹⁾	0.34±0.06 ¹⁾	0.26±0.06 ¹⁾	0.23±0.07 ¹⁾
痛风宁	15.3	0.77±0.02 ^{2,3,4)}	0.71±0.07 ^{2,3)}	0.76±0.12 ^{2,3,4)}	0.51±0.10 ^{2,3)}	0.59±0.08 ^{2,3,4)}
苯溴马隆	5.2×10 ⁻³	0.50±0.03 ⁴⁾	0.42±0.09	0.47±0.04 ⁴⁾	0.34±0.06	0.40±0.06 ⁴⁾

因而,治疗痛风及高尿酸血症均应注重利湿排浊。

现代医学研究已明确,尿酸盐转运体在肾小管重吸收和分泌尿酸的过程中至关重要。其中,URAT1为尿酸阴离子交换体,在重吸收尿酸时可使有机阴离子从肾小管上皮细胞排到肾小管管腔^[11];GLUT9既是葡萄糖转运蛋白也是尿酸转运蛋白,负责肾脏近曲小管顶膜尿酸盐的重吸收^[12-13];OAT1在肾脏主要分布于近曲小管的基底膜,在尿酸从管周间隙摄取入肾小管的过程中起重要的作用^[14-15];OAT3是尿酸盐转运蛋白,主要分布于近曲小管基底侧膜,参与外周小管对尿酸的摄取,即参与尿酸的分泌^[16];ABCG2是三磷酸腺苷结合转运蛋白,大量存在于肾近曲小管刷状缘膜上,参与尿酸的排泄^[17-19]。当机体处于高血尿酸状态时,URAT1, GLUT9蛋白与mRNA表达升高,ABCG2, OAT1, OAT3蛋白与mRNA表达降低。

综上所述,课题组认为高尿酸血症“湿浊内生”的中医病机状态与肾脏尿酸盐转运体URAT1, GLUT9蛋白与mRNA表达升高及ABCG2, OAT1, OAT3蛋白与mRNA表达降低的异常之间必然存在着内在的关联性。

本研究结果表明,与空白组比较,模型组大鼠SUA升高,UUA降低,肾脏URAT1, GLUT9蛋白与mRNA表达升高,ABCG2, OAT1, OAT3蛋白与mRNA表达降低,表明HUA模型大鼠SUA升高可能与肾脏URAT1, GLUT9过表达致尿酸的重吸收增加及肾脏ABCG2, OAT1, OAT3过低表达致尿酸分泌减少有关。经痛风宁干预第14,21天,痛风宁

组大鼠SUA, CRE, BUN降低, UUA升高,肾脏URAT1, GLUT9蛋白与mRNA表达降低,ABCG2, OAT1, OAT3蛋白与mRNA表达升高,表明痛风宁可通过下调URAT1, GLUT9蛋白与mRNA表达,上调OAT1, OAT3, ABCG2蛋白与mRNA表达,从而抑制尿酸重吸收,促进尿酸排泄,而发挥降尿酸的作用。痛风宁干预第21天优于第14天,说明在一定时间范围内,随着干预时间的延长,更有利于促进大鼠体内尿酸代谢,这提示临床上选用中药治疗HUA时,需坚持服药一段时间后效果会更好。且值得一提的是,模型组大鼠较空白组CRE, BUN升高,说明腹腔注射氧嗪酸钾联合盐酸乙胺丁醇灌胃建立HUA模型可出现一定程度的肾损害,而痛风宁干预后出现CRE, BUN降低,也说明了该方具有一定保护肾功能的作用。

从痛风宁组方药物功效分析,该方利湿排浊力专效宏。方中土茯苓擅除湿浊,《本草正义》记载“土茯苓,利湿去热,能入络,搜剔湿热之蕴毒”;黄柏与苍术,川牛膝合为三妙丸,除湿泻浊而不伤脾;萆薢能分清泌浊,金钱草可利尿通淋,两者配伍皆可使湿邪自小便排出;泽泻可利水渗湿,促进水液代谢,杜绝生湿之源;秦艽可祛风除湿,《神农本草经》有云其具有“下水,小便利”的作用。全方共奏利湿排浊之功,使人体水液输布恢复正常,湿浊之气祛除,肿痛自消。且现代药理学研究也表明,本方多味中药具有促进尿酸排泄作用,可降低HUA模型动物SUA含量。例如土茯苓水煎浓缩液可下调大鼠肾脏URAT1 mRNA表达^[20],萆薢总皂苷可抑

制肾脏 URAT1 蛋白表达^[8], 金钱草水提取物可促进小鼠尿酸排泄^[21-22], 秦艽醇提取物可下调大鼠肾脏 URAT1 蛋白, 上调 OAT1, OAT3 蛋白表达, 促进大鼠尿酸排泄^[23]。

本研究通过痛风宁对 HUA 模型大鼠 SUA, UUA 含量及肾脏尿酸盐转运体蛋白及 mRNA 表达影响的实验, 证实了痛风宁可通过下调肾脏 URAT1, GLUT9 表达, 上调 ABCG2, OAT1, OAT3 表达, 以促进尿酸排泄。但也存在一些不足之处, 如所运用的 HUA 大鼠模型尚不能完全模拟人类高尿酸血症尿酸代谢, 未对痛风宁是否通过抑制尿酸生成途径来降低 SUA 进行研究, 今后将进一步完善。

[参考文献]

[1] CHANG H Y, LEE P H, LEI C C, et al. Hyperuricemia is an independent risk factor for new onset microalbuminuria in a middle-aged and elderly population: a prospective cohort study in taiwan [J]. PLoS One, 2013, 8(4):61450.

[2] 朱立然, 陈光亮. 尿酸转运蛋白研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(11):1289-1294.

[3] LIPKOWITZ M S, LEALPINTO E, RAPPOPORT J Z, et al. Functional reconstitution, membrane targeting, genomic structure, and chromosomal localization of a human urate transporter[J]. J Clin Invest, 2001, 107(9):1103-1115.

[4] 陈秀明, 苏友新. 痛风“内湿致痹”浅识[J]. 福建中医药, 2011, 42(1):58-59.

[5] 苏友新, 陈伟宏, 陈凡, 等. 痛风宁颗粒对30例慢性痛风性关节炎患者血尿酸、血沉、血脂及血流变的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2005, 13(1):18-20.

[6] 苏友新, 陈伟宏, 陈凡, 等. 痛风宁颗粒治疗慢性痛风性关节炎30例临床研究[J]. 福建中医学院学报, 2003, 13(3):12-14.

[7] 苏友新, 赖震, 郑良朴, 等. 痛风宁颗粒对鸡痛风模型血清黄嘌呤氧化酶活性的影响[J]. 福建中医药, 2006, 37(2):41-42.

[8] 苏友新, 刘晓平, 郑良朴, 等. 痛风宁颗粒对实验性血尿酸升高大小鼠尿酸代谢的影响[J]. 福建中医药, 2008, 39(5):45-46.

[9] 陈光亮, 朱立然, 那莎, 等. 萆薢总皂苷对大鼠慢性高尿酸血症和肾小管尿酸转运体1表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14):2348-2353.

[10] 吴燕升, 万强, 史丽强, 等. 多种方法探索高尿酸血症大鼠模型的建立[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018, 19(1):7-10.

[11] HEDIGER M A, JOHNSON R J, MIYAZAKI H, et al. Molecular physiology of urate transport [J]. Physiology, 2005, 20(2):125-133.

[12] ANZAI N, ICHIDA K, JUTABHA P, et al. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans [J]. J Biol Chem, 2008, 283(40):26834-26838.

[13] 刘颖琬, 孙维峰. 尿酸转运相关蛋白 SLC2A9/GLUT9 的研究进展[J]. 广东医学, 2013, 34(14):2261-2263.

[14] KOJIMA R, SEKINE T, KAWACHI M, et al. Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2 and OAT3, in rat kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(4):848-857.

[15] BHATNAGAR V, RICHARD E L, WU W, et al. Analysis of ABCG2 and other urate transporters in uric acid homeostasis in chronic kidney disease: potential role of remote sensing and signaling[J]. Clin Kidney J, 2016, 9(3):444-453.

[16] BAKHIYA A, BAHN A, BURCKHARDT G, et al. Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux[J]. Cell Physiol Biochem, 2003, 13(5):249-256.

[17] MATSUO H, NAKAYAMA A, SAKIYAMA M, et al. ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload[J]. Sci Rep, 2014, 20(4):3755.

[18] WOODWARD O M, KOTTGEN A, CORESH J, et al. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(25):10338-10342.

[19] ZHANG L, SPENCER K L, VORUGANTI V S, et al. Association of functional polymorphism rs2231142 (Q141K) in the ABCG2 gene with serum uric acid and gout in 4 US populations: the PAGE study [J]. Am J Epidemiol, 2013, 177(9):923-932.

[20] 孙红, 王少明, 庄捷, 等. 土茯苓等中药抑制 URAT1 表达及降尿酸作用筛选研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(4):403-407.

[21] 刘艳, 孟兆青, 张春风, 等. 丹参降尿酸作用初步实验研究[J]. 海峡药学, 2013, 25(1):27-29.

[22] 王海东, 葛飞, 郭玉松, 等. 金钱草提取物对高尿酸血症小鼠的影响[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12):939-941.

[23] 刘颖, 郑立运, 崔立然. 秦艽抗大鼠高尿酸血症作用机制研究[J]. 中国医学创新, 2013, 10(22):143-144.

[责任编辑 孙丛丛]