

四妙丸上调高尿酸血症大鼠小肠 ABCG2 表达 促进肠道尿酸排泄的作用

张永琪^{1,2}, 陈杰伟¹, 叶博闻², 郝泽瀚¹, 戴号^{2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203;

2. 上海中医药大学附属光华医院, 上海 200052)

[摘要] 目的:研究四妙丸对高尿酸血症大鼠小肠三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G2(ABCG2)表达和肠道尿酸排泄的影响。方法:48只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、苯溴马隆组(4.7 mg·kg⁻¹)和四妙丸高、中、低剂量组(2 260.6、1 130.3、565.2 mg·kg⁻¹),每组8只。以氧嗪酸钾和次黄嘌呤制备高尿酸血症模型,连续21 d。第8天予相应药物干预,1次/d,持续14 d。第21天处死大鼠,检测血尿酸、肠道尿酸、血肌酐、血尿素氮等指标,以蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠小肠 ABCG2 蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小肠 ABCG2 mRNA 表达,免疫组化法检测小肠 ABCG2 蛋白表达和定位。结果:与正常组比较,模型组血尿酸、血肌酐、血尿素氮显著升高($P<0.01$);与模型组比较,四妙丸各剂量组和苯溴马隆组大鼠血尿酸水平均显著降低($P<0.01$),四妙丸中、低剂量组肠道尿酸明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),苯溴马隆组血肌酐显著升高($P<0.01$),低剂量组血尿素氮明显降低($P<0.05$),四妙丸低剂量组与苯溴马隆组血尿酸比较差异无统计学意义。Western blot结果显示,与正常组比较,模型组 ABCG2 蛋白表达明显下降($P<0.05$);与模型组比较,四妙丸中、低剂量组 ABCG2 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),四妙丸高剂量组及苯溴马隆组升高但差异无统计学意义。Real-time PCR 分析显示,与正常组比较,模型组 ABCG2 mRNA 表达差异无统计学意义;与模型组比较,四妙丸中、低剂量组 ABCG2 mRNA 表达明显升高($P<0.05$)。免疫组化显示,ABCG2 蛋白主要分布于肠绒毛,与正常组比较,模型组 ABCG2 蛋白表达差异无统计学意义;与模型组比较,四妙丸各剂量组 ABCG2 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。结论:四妙丸可显著降低高尿酸血症大鼠血尿酸,其中低剂量四妙丸具有与苯溴马隆等效的降尿酸作用,同时可保护肾功能,其机制可能与上调肠道 ABCG2 表达促进肠道尿酸排泄有关。

[关键词] 四妙丸; 高尿酸血症; 肠道尿酸; 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G2(ABCG2)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0033-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221601

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220802.1801.002.html>

[网络出版日期] 2022-08-03 15:36

Simiaowan Up-regulates Intestinal ABCG2 Expression to Promote Intestinal Uric Acid Excretion in Hyperuricemia Rats

ZHANG Yongqi^{1,2}, CHEN Jiewei¹, YE Bowen², HAO Zehan¹, DAI Hao^{2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;

2. Guanghua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200052, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Simiaowan on the intestinal ATP-binding cassette superfamily G (White) member 2 (ABCG2) expression and the intestinal uric acid excretion in hyperuricemia rats. **Method:** A total of 48 SD male rats were randomized into the normal, model, benzbromarone (4.7 mg·kg⁻¹), and high-, medium-, low-dose Simiaowan groups (2 260.6, 1 130.3, 565.2 mg·kg⁻¹, respectively), with 8 rats in each group. Potassium oxonate and hypoxanthine was employed to induce

[收稿日期] 2022-04-25

[基金项目] 上海市长宁区医疗卫生科研专项基金项目(CNKW2020Y17);上海市卫生健康委员会青年项目基金项目(20194Y0432)

[第一作者] 张永琪,在读硕士,从事痛风、高尿酸血症研究,E-mail:z18638253379@163.com

[通信作者] *戴号,硕士,副主任医师,从事痛风、高尿酸血症、足踝、创伤疾病,E-mail:13564799291@163.com

hyperuricemia in rats (21 days). On the 8th day, administration began (once a day for 14 days). Rats were killed on the 21st day, and serum uric acid, serum creatinine, blood urea nitrogen, and intestinal uric acid were detected. The protein expression of ABCG2 in the small intestine was detected by Western blot. The ABCG2 protein expression and localization in intestinal tissues were determined by immunohistochemistry. The ABCG2 mRNA expression in small intestine was measured by quantitative real-time PCR. **Result:** The levels of serum uric acid, serum creatinine, and blood urea nitrogen in the model group were higher than those in the normal group ($P<0.01$). Low level of serum uric acid in the three Simiaowan groups and benzbromarone group ($P<0.01$), high level of intestinal uric acid in medium-dose and low-dose Simiaowan groups ($P<0.05$, $P<0.01$), high level of serum creatinine in benzbromarone group ($P<0.01$), and low level of blood urea nitrogen in low-dose Simiaowan group ($P<0.05$) were observed as compared with those in the model group. Serum uric acid showed insignificant difference between the low-dose Simiaowan group and benzbromarone group. The expression of ABCG2 protein in the model group was lower than that in the normal group ($P<0.05$). The expression of ABCG2 protein in the medium-dose and low-dose Simiaowan groups ($P<0.05$, $P<0.01$), the high-dose Simiaowan group, and benzbromarone group increased as compared with that in the model group. ABCG2 mRNA expression was insignificantly different between the model group and the normal group, while the expression in the medium-dose and low-dose Simiaowan groups was higher than that in the model group ($P<0.05$). ABCG2 protein was mainly distributed in intestinal villi, and ABCG2 protein expression demonstrated no significant difference between the model group and the normal group. The ABCG2 protein expression in the three Simiaowan groups increased as compared with that in the model group ($P<0.05$). **Conclusion:** Simiaowan can significantly reduce the serum uric acid level in hyperuricemia rats. Particularly, the low-dose Simiaowan shows similar efficacy to benzbromarone in lowering uric acid and protects renal function. The mechanism is the likelihood that it up-regulates intestinal ABCG2 expression to promote intestinal excretion of uric acid.

[Keywords] Simiaowan; hyperuricemia; intestinal uric acid; ATP-binding cassette superfamily G (White) member 2 (ABCG2)

高尿酸血症(HUA)是指体内嘌呤代谢紊乱,尿酸水平持续升高(男性 $>420\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,女性 $>360\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的一种常见代谢性疾病。尿酸浓度增高,不仅可形成尿酸盐晶体诱发痛风,晶体沉积还可导致尿石症、尿酸性肾病^[1]。高尿酸血症亦是高血压、脑卒中、糖尿病等疾病的独立致病因素^[2-4]。目前我国高尿酸血症患病率达8.4%~13.3%,呈高流行、年轻化趋势^[5],成为危害人类健康的第二大代谢性疾病。

尿酸生成和排泄的动态平衡是机体维持尿酸稳态的关键因素。90%以上的HUA源于尿酸排泄不足^[6]。体内多余的尿酸2/3经肾脏排泄,1/3经肠道排泄。基因编码的尿酸转运蛋白表达异常是尿酸排泄障碍的重要原因^[7],如肾脏近端小管上皮细胞中的尿酸阴离子转运体1(URAT1/SLC22A12)、葡萄糖转运体9(GLUT9/SLC2A9)等尿酸转运蛋白主要调控肾脏对尿酸的重吸收和分泌过程^[8]。肠道三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G(ABCG2)是调控肠道尿酸排泄的重要转运蛋白^[9]。ABCG2基因突变,

蛋白功能异常,与高尿酸血症密切相关^[10-11]。肠道尿酸排泄不足,使肾脏代偿性排泄增加,导致“肾脏超载型”HUA^[12],肾脏更易受损^[13]。

促进肾脏尿酸排泄是目前治疗高尿酸血症的主要手段。苯溴马隆、丙磺舒等药物通过抑制肾脏URAT1和GLUT9表达,减少尿酸重吸收,达到促进尿酸排泄的目的。然而,肾脏尿酸排泄增加,肾小管尿酸浓度过高导致的尿酸盐结晶沉积可损伤肾脏。尿酸性肾病也限制了该类药物的应用。促进肠道尿酸排泄成为治疗高尿酸血症的新途径^[14]。以肠道ABCG2为靶点,通过上调该基因表达,促进肠道尿酸排泄不仅可降低血尿酸水平,更可以减轻肾脏尿酸排泄负荷达到保护肾功能的目的。

四妙丸源自清代《成方便读》,为现代中医治疗高尿酸血症及痛风的常用方剂,由苍术、黄柏、牛膝、薏苡仁组成,具有清热祛湿、逐瘀通经之功。现代药理学研究发现,四妙丸既可通过抑制肾脏URAT1、GLUT9表达,减少尿酸重吸收^[15],也可上

调肾脏 ABCG2 表达,促进尿酸排泄^[16]。四妙丸是否能上调肠道 ABCG2 表达促进肠道尿酸排泄尚无相关研究。本研究旨在观察四妙丸对高尿酸血症大鼠血尿酸、肠道尿酸、小肠 ABCG2 蛋白和 mRNA 表达的影响,进一步探讨四妙丸降低尿酸的机制。

1 材料

1.1 实验动物 SPF 级 5~6 周龄雄性 SD 大鼠 48 只,体质量 140~160 g,购买于斯莱克实验动物公司,饲养于上海中医药大学动物实验中心[许可证号 SYXK(沪)2020-0009]。大鼠分笼饲养,自由进食及饮水。室温维持 26℃,湿度 50%。本研究经上海中医药大学动物福利与伦理委员会批准(伦理编号 PZSHUTCM191122001)。

1.2 药品与试剂 中药方剂由四妙丸由苍术、黄柏、薏苡仁、牛膝组成。购买于上海同济堂药业,批号分别为 200201、191201、191101、191202。根据 2020 年版《中华人民共和国药典》四妙丸制备方法,由上海中医药大学附属光华医院购进,称取苍术(125 g)、黄柏(250 g)、薏苡仁(250 g)、牛膝(125 g)。将全部中药饮片混合碾碎,加水煎煮,过滤收集药液;将药渣再次加水煎煮,收集药液。混合 2 次药液,减压浓缩蒸发、真空干燥,得浸膏粉 261.62 g,提取率为 34.88%(W/W),冷冻备用。

苯溴马隆片(宜昌东阳光长江药业,批号 H20040348),氧嗪酸钾、次黄嘌呤(美国 Sigma 公司,批号分别为 H9733、156124),异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号 20082602),TRIZOL 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596018),ABCG2 兔单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 42078S),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国 Proteintech 公司,批号 60004-1-Ig),DyLight 800 山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G 荧光二抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠/兔二抗、柱式法组织总蛋白提取试剂盒、抗原修复液(20×)乙二胺四乙酸(EDTA) pH 9.0、免疫组化(IHC)抗体稀释剂(美国 Immunoway 公司,批号分别为 RS23910、RS0011、RS0024、YS0004、YS0001、K1622),强效实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)预混液(美国 Thermo Scientific 公司,批号 4368577),显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 PV-8000),NC 膜(美国 Millipore 公司,批号 HATF00010)。

1.3 仪器 ADVIA2400 型全自动生化分析仪(德国西门子公司),TDL-5000CR 型冷冻离心机(上海

安亭科学仪器),PTHW5000ML 型恒温电热套(郑州科泰实验设备),F-114 型旋转蒸发仪套(瑞士 Buchi 公司);DZF-6210 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器),ViiA 7 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司),Odyssey 型红外荧光成像系统(美国 Licor 公司),DM2500 型显微镜荧光拍照系统(德国 Lecia 公司);SpectraMax M5E 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),trans-blot SD Cell 型半干转仪、Mini Trans-Blo 型电泳转膜槽、Mini-Protean 型垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司),HY-BM1150 型包埋机(金华惠友仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模方法与给药 48 只雄性 SD 大鼠适应性喂养后随机分为正常组、模型组、苯溴马隆组(4.7 mg·kg⁻¹)、四妙丸高、中、低剂量组(2 260.6、1 130.3、565.2 mg·kg⁻¹),每组 8 只。除正常组外,以氧嗪酸钾(100 mg·kg⁻¹,腹腔注射)联合次黄嘌呤(500 mg·kg⁻¹,灌胃)造模,每日 1 次,连续 21 d,复制 HUA 模型。第 8 天予相应药物灌胃干预,每天 1 次,持续 14 d,正常组和模型组予等容积溶媒。

2.2 样本采集和检测指标 实验第 7 天给药后 2 h,以眼眶取血采集血样 1.5 mL,检测血尿酸以判断模型是否成功。实验第 21 天给药后 2 h 再次以眼眶取血采集血样 1.5 mL,检测血尿酸、血肌酐、尿素氮。

所有大鼠处死前禁食 24 h。第 21 天以异氟烷呼吸麻醉安乐死大鼠,剖开腹腔,于小肠中段切取长约 20 cm 的肠段。肠液样本收集参考文献方法^[17]。切取前先用组织钳夹住肠段两端以防肠液流失,肠段取出后以生理盐水 10 mL 冲洗肠道内壁,收集冲洗液即肠液样本,检测肠道尿酸水平。最后将所取小肠段周围肠系膜及脂肪组织清理,小肠组织分别标本置于液氮和 4% 多聚甲醛保存待后续检测。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠小肠组织 ABCG2 蛋白表达 蛋白提取按组织蛋白提取试剂盒说明书进行。采用 BCA 法测定蛋白浓度。配制 10% 分离胶,5% 浓缩胶,浓缩胶 70 V 恒压,至溴芬蓝进入分离胶后改 110 V 恒压,电泳至溴芬蓝刚出凝胶下端。200 mA 恒流转膜 90 min。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 2 h, TBST 洗膜 5 min, 3 次。孵育一抗 ABCG2(用含 5% 脱脂牛奶 TBST 按 1:1 000 稀释)和内参 GAPDH(用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 按 1:5 000 稀释),4℃ 孵育过夜,第 2 天室温

孵育 20 min, TBST 洗膜 5 min, 3 次。加入 5% 脱脂牛奶 TBST 稀释的二抗山羊抗小鼠 IgG (1:1 万), 37 °C 孵育 2 h, TBST 洗膜 5 min, 3 次。ECL 显影反应 2 min, Odyssey 双色激光成像系统扫描成像。Image J 软件测定条带灰度值, 以 GAPDH 为内参对照, 计算 ABCG2/GAPDH 值。

2.4 Real-time PCR 检测大鼠小肠组织 ABCG2 mRNA 表达 肠组织总 RNA 提取采用 TRIzol 法。去除基因组 DNA, 加入 gDNA Eraser Buffer (5×) 2.0 μL, gDNA Erase 1.0 μL, RNA 150 ng, 无核酸酶的 dH₂O 补至 10 μL, 混匀, 42 °C 反应 2 min。根据反转录试剂盒说明书进行反转录, 加入上一步的反应液 10 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL, RT Primer Mix 1.0 μL, PrimeScript Buffer 2 (5×) 4.0 μL, RNase Free dH₂O 4.0 μL, 混匀, 37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 s。引物的设计与合成由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。ABCG2 上游引物 5'-T CATCAGCTCAGATGGATTG-3', 下游引物 5'-GGC AAGAACCTCATAGGTAG-3', 片段长度 333 bp; GAPDH 上游引物 5'-CCCATTCTTCCACCTTTGAT-3', 下游引物 5'-CAACTGAGGGCCTCTCTCT-3', 片段长度 200 bp。Real-time PCR 反应体系为 20 μL, 包含 SYBR Green Premix (2×) 10 μL, 上游引物 (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL, 下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL, cDNA 模板 1.0 μL, 无核酸酶 dH₂O 补至 20 μL。扩增条件为 94 °C 预变性 5 min, 1 循环; 95 °C 变性 3 s, 60 °C 退火/延伸 30 s, 40 循环。Real-time PCR 结果用 2^{-ΔΔC_t} 计算, 以相对值表示。

2.5 免疫组化法检测大鼠小肠组织 ABCG2 蛋白表达和定位 将石蜡包埋的小肠组织切成 4 μm 厚组织切片。切片在 60 °C 下烘烤 1 h, 二甲苯脱蜡、水化。PBS 洗涤 5 min×3 次, 用 TRIS-EDTA of pH 9.0 以高压法修复抗原 3 min, 自然冷却 20 min。PBS

洗涤 5 min×3 次, 在暗匣中用 3% H₂O₂-甲醇溶液阻断内源性过氧化物酶活性 10 min。PBS 洗涤 5 min×3 次, 加入 5% 山羊血清封闭室温 30 min。滴加一抗 ABCG2 (1:100), 室温孵育 60 min。PBS 洗涤 5 min×3 次, 滴加二抗山羊抗兔/小鼠多克隆抗体 HRP (1:1 000), 室温湿孵 30 min。PBS 洗涤 5 min×3 次, DAB 显色, 室温湿盒显色 3 min 后终止显色。苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。Lecia 显微镜荧光拍照系统下采集图像, 各组织切片随机选取 5 个互不重叠的视野拍摄。Image Pro Plus 6.0 分析免疫组化染色结果分析, 测定阳性颗粒积分吸光度 IA 和阳性表达面积 (Area)。

2.6 统计学方法 采用 Prism 8.2.1 软件处理数据, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐者采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较, 组间两两比较采用 Tukey 检验, 方差不齐者采用 Brown-Forsythe and Welch ANOVA 比较, 组间两两比较采用 Dunnett's T3 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HUA 大鼠血尿酸、肠道尿酸、肾功能水平的影响 造模 7 d, 与正常组比较, 模型组血尿酸显著升高 (P<0.01); 与模型组比较, 苯溴马隆组、四妙丸各剂量组血尿酸水平差异无统计学意义; 干预后 21 d, 与正常组比较, 模型组血尿酸、血肌酐、血尿素氮显著升高, 差异有显著统计学意义 (P<0.01); 与模型组比较, 四妙丸各剂量组和苯溴马隆组大鼠血尿酸水平均显著降低 (P<0.01), 四妙丸中、低剂量组肠道尿酸明显升高 (P<0.05, P<0.01), 苯溴马隆组血肌酐显著升高 (P<0.01), 四妙丸低剂量组血尿素氮明显降低, 差异有明显统计学意义 (P<0.05); 四妙丸低剂量组与苯溴马隆组血尿酸水平比较差异无统计学意义。见表 1。

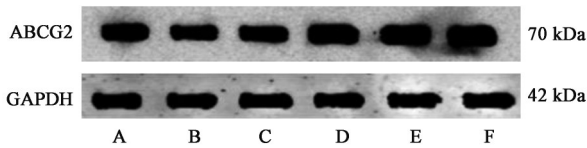
表 1 四妙丸对 HUA 大鼠血尿酸、肠道尿酸、肾功能水平影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Simiaowan (SMW) on serum uric acid, intestinal uric acid and renal function in HUA rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血尿酸/mol·L ⁻¹		肠道尿酸 /g	血肌酐 /mol·L ⁻¹	血尿素氮 /mmol·L ⁻¹
		7 d	21 d			
正常组		131.0±32.0	83.8±24.0	74.5±12.1	26.5±1.8	6.1±0.4
模型组		709.2±227.7 ²⁾	546.6±196.3 ²⁾	67.9±11.6	31.9±3.3 ²⁾	14.4±5.9 ²⁾
苯溴马隆组	4.7	794.2±92.8 ²⁾	261.1±112.2 ⁴⁾	68.4±4.4	38.2±2.3 ⁴⁾	11.7±2.0
四妙丸高剂量组	2 260.6	892.5±196.3 ²⁾	290.6±109.5 ⁴⁾	72.5±12.4	30.6±3.5	10.7±2.1
四妙丸中剂量组	1 130.3	830.4±180.9 ²⁾	290.5±123.8 ⁴⁾	87.9±13.0 ³⁾	32.3±3.0	10.5±2.0
四妙丸低剂量组	565.2	887.9±112.3 ²⁾	210.9±133.6 ⁴⁾	97.8±16.1 ⁴⁾	29.4±3.4	9.3±1.0 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与模型组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01 (表 2-表 4 同)

3.2 对HUA大鼠小肠组织ABCG2蛋白的表达的影响 与正常组比较,模型组ABCG2蛋白表达显著下降($P<0.05$)。与模型组比较,四妙丸中、低剂量组能够提高HUA大鼠小肠组织ABCG2蛋白表达水平($P<0.05, P<0.01$),四妙丸高剂量组及苯溴马隆组呈升高趋势,但差异无统计学意义。见图1、表2。



注:A.正常组;B.模型组;C.苯溴马隆组;D.四妙丸高剂量组;E.四妙丸中剂量组;F.四妙丸低剂量组(图2同)

图1 大鼠小肠ABCG2蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of ABCG2 protein in intestine of rats

表2 四妙丸对HUA大鼠小肠ABCG2蛋白表达水平影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of SMW on ABCG2 protein expression levels of intestine in HUA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ABCG2/GAPDH
正常组		0.650±0.074
模型组		0.255±0.048 ¹⁾
苯溴马隆组	4.7	0.534±0.144
四妙丸高剂量组	2 260.6	0.538±0.193
四妙丸中剂量组	1 130.3	0.607±0.124 ³⁾
四妙丸低剂量组	565.2	0.775±0.060 ⁴⁾

3.3 对HUA大鼠小肠组织ABCG2蛋白的表达组织病理学影响 定位免疫组化染色显示,阴性对照切片无免疫反应,阳性对照切片可见肠组织内金棕色阳性染色颗粒。ABCG2主要分布于肠绒毛,部分可见绒毛顶端强阳染,肠腺周围少量分布,在肠绒毛中主要位于绒毛的肠上皮细胞膜和细胞核周围。半定量分析结果显示,与正常组比较,模型组ABCG2蛋白表达的Area和IA呈下降趋势,但差异无统计学意义。与模型组比较,四妙丸高、中、低剂量组ABCG2蛋白的Area明显增加($P<0.05, P<0.01$),IA明显增加($P<0.05, P<0.01$)。见图2、表3。

3.4 对HUA大鼠小肠组织ABCG2 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组、苯溴马隆组ABCG2 mRNA表达呈下降趋势,但差异无统计学意义。与模型组比较,四妙丸中、低剂量组ABCG2 mRNA表达明显升高($P<0.05$)。见表4。

4 讨论

四妙丸可降低HUA大鼠血尿酸,改善肾功能。氧嗪酸钾联合次黄嘌呤复制HUA大鼠模型是常用

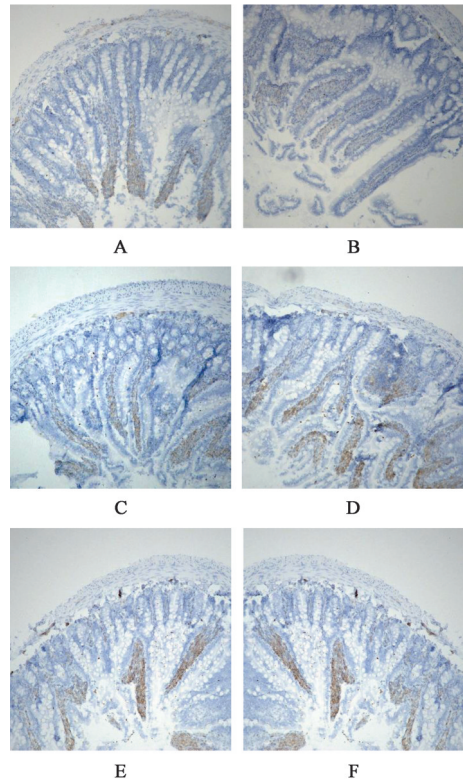


图2 四妙丸对HUA大鼠小肠ABCG2蛋白表达的影响(免疫组化,×100)

Fig. 2 Effect of SMW on ABCG2 protein expression levels of intestine in HUA rats (IHC, ×100)

表3 四妙丸对HUA大鼠小肠ABCG2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of SMW on ABCG2 protein expression levels of intestine in HUA rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Area(×10 ⁵)	IA(×10 ⁴)
正常组		1.59±0.38	5.65±2.05
模型组		0.74±0.17	1.89±0.86
苯溴马隆组	4.7	1.00±0.16	2.73±0.45
四妙丸高剂量组	2 260.6	1.84±0.37 ¹⁾	7.84±1.84 ¹⁾
四妙丸中剂量组	1 130.3	2.30±0.42 ²⁾	8.34±2.07 ²⁾
四妙丸低剂量组	565.2	2.17±0.54 ²⁾	7.38±2.65 ¹⁾

表4 四妙丸对HUA大鼠小肠ABCG2 mRNA表达水平影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of SMW on level of ABCG2 mRNA expression levels of intestine in HUA rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ABCG2
正常组		0.62±0.32
模型组		0.41±0.15
苯溴马隆组	4.7	0.45±0.19
四妙丸高剂量组	2 260.6	0.82±0.29
四妙丸中剂量组	1 130.3	1.01±0.44 ¹⁾
四妙丸低剂量组	565.2	1.05±0.33 ¹⁾

的造模方法,具有成功率高、模型稳定的优点。造模后,除正常组大鼠外,其余各组大鼠血尿酸显著升高。干预后,苯溴马隆组和四妙丸各剂量组血尿酸显著下降,干预有效,其中苯溴马隆组、四妙丸低剂量组与正常组比较,差异无统计学意义,提示低剂量四妙丸与苯溴马隆效果相当,可使血尿酸水平接近正常。苯溴马隆组血肌酐较模型组显著升高,肾功能进一步受损,可能与其促进肾脏尿酸排泄,肾脏尿酸负荷增加有关。四妙丸低剂量组血尿素氮显著低于模型组,提示四妙丸可能通过调控其他尿酸排泄途径以减少肾脏尿酸排泄负荷,达到保护肾功能的作用。魏瑶等^[18]采用氧嗪酸钾联合腺嘌呤灌胃建立高尿酸血症小鼠模型,给与加味四妙丸灌胃后,高尿酸血症大鼠尿酸、肌酐、尿素氮水平显著降低,并且组织切片显示其改善了高尿酸血症小鼠的肾脏及肠道组织病理变化,提示加味四妙丸可能通过改善肾脏与小肠功能促进尿酸的排泄。本实验证实,四妙丸低剂量组肠道尿酸排泄明显高于模型组和正常组,说明低剂量四妙丸能促进肠道尿酸排泄。四妙丸不仅能促进肾脏尿酸排泄,还可促进肠道尿酸排泄,体现了中医药多靶点多途径的优势。

四妙丸上调肠道 ABCG2 表达促进肠道尿酸排泄。ABCG2 是一种腺苷三磷酸结合“半转运体”蛋白,广泛分布于全身各组织,尤以肾和小肠表达较高^[19-20]。作为一种保护性通道蛋白,ABCG2 可将尿酸排出体外。一项 5/6 肾脏切除术的大鼠实验研究发现,大鼠切除 5/6 肾脏后,尿酸、尿酸清除率等指标明显下降,但血尿酸水平并未升高,同时肠道 ABCG2 呈过表达状态^[21]。TAKADA 等^[22]在 ABCG2 mRNA 敲除小鼠的肠道中发现,尿酸转运蛋白数量明显减少,肠道尿酸水平下降,血尿酸显著升高。表明肠道 ABCG2 水平在尿酸排泄及代偿方面具有重要作用。张志明等^[23]发现高尿酸血症小鼠模型的回肠组织中 ABCG2 的水平显著降低,研究结果表明四妙散降低尿酸水平可能与上调回肠组织 ABCG2 的表达和抑制 GLUT9 的表达相关。在本实验中同样发现高尿酸血症小鼠的 ABCG2 蛋白表达呈下降趋势。Western blot 检测显示,四妙丸中、低剂量组大鼠 ABCG2 蛋白表达较模型组显著上调。Real-time PCR 检测 ABCG2 mRNA 表达结果与 Western blot 趋势一致。免疫组化蛋白半定量分析与 Western blot、Real-time PCR 检测结果在趋势上大致类似。上述结果提示,中、低剂量四妙丸可以

上调小肠 ABCG2 表达水平,促进肠道尿酸排泄。

研究发现,ABCG2 是促炎细胞因子的靶点,当促炎细胞因子刺激时,ABCG2 的表达和功能降低^[24]。VON WEDEL-PARLOW 等^[25]发现,白细胞介素-1 β (IL-1 β)能在 6 h 内迅速降低猪脑毛细血管内皮细胞中 ABCG2 mRNA 表达水平,并导致 ABCG2 蛋白表达持续下降。LU 等^[26]发现 IL-1 β 不仅能直接降低 ABCG2 的功能活性,还可以通过核转录因子- κ B(NF- κ B)活化部分降低 ABCG2 蛋白和 mRNA 表达水平。网络药理学发现,四妙丸可作用于 IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)等靶点,调控 NF- κ B、IL-17 等信号通路,从而发挥抗炎、抗氧化应激等作用^[27]。因此推测四妙丸可能通过其抗炎作用,抑制 IL-1 β 、NF- κ B 信号通路,从而上调人肠道细胞系 ABCG2 表达达到促进肠道尿酸排泄的作用。

本研究证明了四妙丸可以调控肠道尿酸转运蛋白 ABCG2 水平来促进肠道尿酸的排泄,同时可保护肾功能,进一步丰富了四妙丸降尿酸药的作用途径,也为研究以肠道作为降尿酸靶器官的药物研究提供了新思路。然而 ABCG2 表达受多种转录因子的调控,并且其转运活性也受多种因素影响。四妙丸调控肠道 ABCG2 表达的具体机制及对 ABCG2 的功能影响需要进一步研究,并且肠道尿酸排泄也会受到肠道菌群的影响,下一步可能会选择 ABCG2 基因敲除小鼠,基于信号通路、细胞水平、肠道菌群等方面进行研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 丁小强,冯哲,倪兆慧,等. 中国肾脏疾病高尿酸血症诊治的实践指南(2017版)[J]. 中华医学杂志,2017,97(25):1927-1936.
- [2] KUWABARA M, HISATOME I, NIWA K, et al. Uric acid is a strong risk marker for developing hypertension from prehypertension: A 5-year Japanese cohort study[J]. Hypertension,2018,71(1):78-86.
- [3] TAO M, PI X, MA X, et al. Relationship between serum uric acid and clustering of cardiovascular disease risk factors and renal disorders among Shanghai population: A multicentre and cross-sectional study[J]. BMJ Open,2019,9(3):e025453.
- [4] SHARAF E L, SALEM M M, ABDULAZIM D O. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: A review [J]. J Adv Res,2017,8(5):537-548.
- [5] 李林,朱小霞,戴宇翔,等. 中国高尿酸血症相关疾病

- 诊疗多学科专家共识[J]. 中华内科杂志, 2017, 56(3):235-248.
- [6] SO A, THORENS B. Uric acid transport and disease [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6):1791-1799.
- [7] 中国医师协会中西医结合医师分会内分泌与代谢病专业委员会. 高尿酸血症和痛风病证结合诊疗指南(2021-01-20) [J]. *世界中医药*, 2021, 16(2):183-189.
- [8] XU L, SHI Y, ZHUANG S, et al. Recent advances on uric acid transporters [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59):100852-100862.
- [9] XU X, LI C, ZHOU P, et al. Uric acid transporters hiding in the intestine [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(12):3151-3155.
- [10] TIN A, MARTEN J, HALPERIN KUHNS V L, et al. Target genes, variants, tissues and transcriptional pathways influencing human serum urate levels [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(10):1459-1474.
- [11] HOQUE K M, DIXON E E, LEWIS R M, et al. The ABCG2 Q141K hyperuricemia and gout associated variant illuminates the physiology of human urate excretion [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):2767.
- [12] ICHIDA K, MATSUO H, TAKADA T, et al. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia [J]. *Nat Commun*, 2012, 3:764.
- [13] YE X, WU J, TANG K, et al. Benzbromarone as a possible cause of acute kidney injury in patients with urolithiasis: Two case reports [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(15):e15214.
- [14] FUJITA K, ICHIDA K. ABCG2 as a therapeutic target candidate for gout [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(2):123-129.
- [15] HU Q H, JIAO R Q, WANG X, et al. Simiaowan ameliorates urate underexcretion and renal dysfunction in hyperuricemic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3):685-692.
- [16] 吴丽. 利湿活血方对高尿酸血症大鼠降尿酸作用及对尿酸转运体的影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2018:90-91.
- [17] YUN Y, YIN H, GAO Z, et al. Intestinal tract is an important organ for lowering serum uric acid in rats [J]. *PLoS One*, 2017, 12(12):e0190194.
- [18] 魏瑶, 吴珍, 杨玉姣, 等. 加味四妙丸对高尿酸血症小鼠的降尿酸及肾脏保护作用研究 [J]. *中药材*, 2021, 44(9):2184-2188.
- [19] CLEOPHAS M C, JOOSTEN L A, STAMP L K, et al. ABCG2 polymorphisms in gout: Insights into disease susceptibility and treatment approaches [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2017, 10:129-142.
- [20] 王星, 薛宁, 李洪雷, 等. 防己黄芪汤对高尿酸血症小鼠降尿酸及肾保护作用机制的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(21):5248-5255.
- [21] YANO H, TAMURA Y, KOBAYASHI K, et al. Uric acid transporter ABCG2 is increased in the intestine of the 5/6 nephrectomy rat model of chronic kidney disease [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2014, 18(1):50-55.
- [22] TAKADA T, ICHIDA K, MATSUO H, et al. ABCG2 dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2014, 33(4/6):275-281.
- [23] 张志明, 高碧珍, 齐张, 等. 基于肠道上皮细胞相关转运子探讨四妙散对高尿酸血症小鼠的祛湿机制 [J]. *风湿病与关节炎*, 2020, 9(1):1-4, 20.
- [24] CLEOPHAS M C, JOOSTEN L A, STAMP L K, et al. ABCG2 polymorphisms in gout: Insights into disease susceptibility and treatment approaches [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2017, 10:129-142.
- [25] VON WEDEL-PARLOW M, WÖLTE P, GALLA H J. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier *in vitro* [J]. *J Neurochem*, 2009, 111(1):111-118.
- [26] LU X, CHEN M, SHEN J, et al. IL-1 β functionally attenuates ABCG2 and PDZK1 expression in HK-2 cells partially through NF- κ B activation [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(3):279-289.
- [27] 曾丽莹, 邓伊健, 陈洁瑜, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨四妙丸治疗高尿酸血症的作用机制 [J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(4):579-587.

[责任编辑 周冰冰]