

痛风宁含药血清对尿酸诱导 HK-2 中尿酸盐转运体的影响

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

(1. 福建中医药大学 中医学院, 康复医学院, 福州 350122;

2. 福建卫生职业技术学院, 福州 350101; 3. 福建医科大学 医学技术与工程学院, 福州 350004)

[摘要] **目的:** 从肾脏尿酸盐转运体角度探讨痛风宁降低血尿酸的机制。**方法:** 将人肾小管上皮细胞(HK-2)随机分为正常组,模型组,痛风宁低、中、高剂量组(7.65,15.3,30.6 g·kg⁻¹),苯溴马隆组(50 μmol·L⁻¹),分别予不同培养液进行干预。于干预 24 h 后收集 HK-2 及上清液,采用蛋白免疫印迹法(Western blot),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组 HK-2 中尿酸盐转运蛋白 1 (URAT1),葡萄糖转运体 9 (GLUT9),有机阴离子转运体 1 (OAT1),有机阴离子转运体 3 (OAT3)和三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 (ABCG2)蛋白及 mRNA 的表达。**结果:** 与正常组比较,模型组 URAT1, GLUT9 蛋白及 mRNA 表达显著升高($P < 0.01$), ABCG2 蛋白及 mRNA 表达显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,痛风宁各剂量组和苯溴马隆组 URAT1, GLUT9 蛋白及 mRNA 表达均明显下降($P < 0.01$),且痛风宁各剂量组优于苯溴马隆组,痛风宁各剂量组 ABCG2 蛋白及 mRNA 表达显著升高($P < 0.01$);与痛风宁中剂量组比较,痛风宁低、高剂量组 URAT1, GLUT9 蛋白及 mRNA 表达明显升高, ABCG2 蛋白及 mRNA 表达明显下降($P < 0.01$)。OAT1 和 OAT3 蛋白及 mRNA 于各组均无表达。**结论:** 痛风宁可通过下调 HK-2 中 URAT1, GLUT9 蛋白及 mRNA 表达,上调 ABCG2 蛋白及 mRNA 表达,调节肾小管对尿酸的重吸收和分泌,促进尿酸在肾脏的排泄,降低血尿酸水平。提示对肾脏尿酸转运体蛋白的调节可能是痛风宁发挥利湿排浊功效而降低血尿酸的具体机制之一, OAT1 和 OAT3 蛋白及 mRNA 在体外培养的 HK-2 中无表达。

[关键词] 痛风宁含药血清; 尿酸盐; 人肾小管上皮细胞 (HK-2); 尿酸盐转运体

[中图分类号] R2-0; R285; R289; R334 + .1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)21-0053-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192139

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190717.1701.013.html>

[网络出版时间] 2019-07-18 13:20

Effect of Tongfengning Serum Containing on Expression of Urate Transporter in HK-2 Induced by Uric Acid

LI Bao-lin¹, WANG Jian-hui¹, CAI Tang-yan², GUO Jie-mei^{1,2}, TENG Fang-zhou¹, ZHU Ya-ju¹,
LIN Jian-ping³, MAO Xiao¹, XIAO Yan¹, SU You-xin^{1,2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), College of Rehabilitation Medicine,
Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China;

2. Fujian Health College, Fuzhou 350101, China;

3. College of Medical Technology and Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

[Abstract] **Objective:** Study on the mechanism of Tongfengning in reducing serum uric acid from the perspective of renal urate transporter. **Method:** The human renal tubular epithelial cells (HK-2) was randomly divided into normal group, model group, Tongfengning low, medium and high dose group (7.65, 15.3, 30.6 g·kg⁻¹) and benzbromarone group (50 μmol·L⁻¹), different culture media were given for intervention.

[收稿日期] 20190601(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473495)

[第一作者] 李保林,在读硕士,从事骨与关节疾病防治与康复的基础与临床工作, E-mail:847093590@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

HK-2 and cell supernatant were collected after 24 h of intervention. The expressions of urate transporter 1 (URAT1), glucose transporter 9 (GLUT9), organic anion transporter 1 (OAT1), organic anion transporter 3 (OAT3), and ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2) protein and mRNA were detected in HK-2 of all groups by Western blot and Real-time PCR. **Result:** Compared with normal group, the expression of URAT1, GLUT9 protein and mRNA was significantly increased ($P < 0.01$), while the expression of ABCG2 protein and mRNA was significantly decreased in model group ($P < 0.01$). Compared with model group, the expression of URAT1, GLUT9 protein and mRNA in each dose of Tongfengning group and benzbromarone group were decreased ($P < 0.01$), and each doses of Tongfengning group was superior to the benzbromarone group. The expression of ABCG2 protein and mRNA was increased in each dose of Tongfengning group ($P < 0.01$). Compared with Tongfengning medium dose group, the expression of URAT1, GLUT9 protein and mRNA increased, while the expression of ABCG2 protein and mRNA decreased in the low and Tongfengning high dose groups ($P < 0.01$). OAT1 and OAT3 were not expressed in all groups. **Conclusion:** Tongfengning can regulate the reabsorption and secretion of uric acid in renal tubules, promote the excretion of uric acid in kidney and reduce the level of serum uric acid by down-regulating the expression of URAT1, GLUT9 protein and mRNA in HK-2 and up-regulating the expression of ABCG2 protein and mRNA. It is suggested that the regulation of renal uric acid transporter protein may be one of the specific mechanisms of Tongfengning to reduce serum uric acid by promoting dampness and turbid removal. OAT1, OAT3 protein and mRNA were not expressed in HK-2 cultured *in vitro*.

[**Key words**] Tongfengning serum containing; urate; human renal tubular epithelial cells (HK-2); urate transporter

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是人体内尿酸生成增多和/或排泄减少引起的代谢性疾病,除引发痛风之外,还是慢性肾脏疾病、心血管疾病、代谢综合征等疾病的重要危险因素^[1],严重影响人们的身体健康。研究表明肾脏尿酸排泄减少是 HUA 发病的主要原因之一^[2],尿酸在肾脏代谢过程包括肾小球滤过、肾小管的重吸收和分泌及分泌后的重吸收等,但除肾小球滤过外,其他环节均需肾小管上皮细胞中的尿酸盐转运体协助完成。尿酸盐转运蛋白 1 (URAT1) 和葡萄糖转运体 9 (GLUT9) 负责对尿酸的重吸收,URAT1 先将尿酸从肾小管管腔重吸收至肾小管上皮细胞内,然后由 GLUT9 将尿酸转运至肾间质,完成重吸收过程,增加血尿酸水平,最终导致 HUA 发生发展;有机阴离子转运体 1 (OAT1),有机阴离子转运体 3 (OAT3) 和三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 (ABCG2) 主要参与尿酸的分泌,OAT1 和 OAT3 先将尿酸从肾间质中转运到肾小管上皮细胞内,再由 ABCG2 转运到肾小管管腔,经尿液排出体外^[3-5],进而降低血尿酸水平。

人肾小管上皮细胞 HK-2 中分布着丰富的尿酸盐转运体,在尿酸刺激后其活性和增殖能力受到抑制,已被广泛用于体外研究肾脏尿酸代谢的细胞模型^[6-7]。此外,其他尿酸转运体如有机阴离子转运体 4,磷酸盐转运蛋白和骨架蛋白等,虽也与尿酸转

运存在关联性,但其转运能力较弱或机制尚不完全明确^[8]。故本实验选取 HK-2 中的 URAT1, GLUT9 和 OAT1, OAT3 与 ABCG2 作为观察指标。

目前降尿酸的西药如别嘌醇、非布司他、苯溴马隆等,虽疗效较为显著,但普遍存在长期应用不良反应大、患者低耐受等不足。中医药防治 HUA 能被患者广泛接受,且具有整体调节、标本兼治的优势,并在临床取得了显著成效。痛风宁是课题组基于痛风“内湿致痹”发病机制,经临床实践的不断调整与完善总结出通过“利湿排浊、消肿止痛”之功效治疗痛风的效验方。前期研究证实该方可通过“利湿排浊”降低患者的血尿酸水平,通过“消肿止痛”功效调控核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NALP3) 炎性体及白细胞介素-1 β (IL-1 β), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子抑制关节炎症反应^[9-12],但其降尿酸的具体机制尚不明了。因此,本研究拟从尿酸盐转运体层面,采用尿酸刺激体外培养的 HK-2,观察痛风宁含药血清对 HK-2 中 URAT1, GLUT9 和 OAT1, OAT3 与 ABCG2 蛋白及 mRNA 表达的影响,从细胞水平明确该方降尿酸的确切作用机制,为其推广应用奠定基础。

1 材料

1.1 动物 60 只 SPF 级 4 月龄雄性 SD 大鼠, 体重 (280 \pm 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饲养,实验动物使用许可证号 SYXK(闽)2014-0006。本实验符合福建中医药大学伦理委员会标准。

1.2 药物 痛风宁全方由土茯苓、苍术、黄柏、川牛膝、草薢、秦艽、金钱草、泽泻、肿节风、丹参等组成,各占比例为 10:3:2:4:5:3:7:5:5:5。所有药材均由福建中医药大学附属国医堂提供,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室黄泽豪副教授鉴定。按既定工艺浓缩成生药质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 试剂 RPMI 1640,胎牛血清(FBS),Trypsin 1:250(美国 Hyclone 公司,货号分别为 SH30809.01B,SH30068.03,SH30042.01);尿酸(美国 Sigma 公司,货号 U2625-25G);兔抗 URAT1 多克隆抗体, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Proteintech Group 公司,货号分别为 14937-1-AP,66009-1-Ig);兔抗 GLUT9 多克隆抗体(美国 Abcam 公司,货号 ab190929);兔抗 ABCG2 多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号 4477s);鼠抗 OAT1, OAT3 单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,货号分别为 sc-161977,sc-293264);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G,HRP 标记羊抗兔 IgG(美国 EarthOx LLC 公司,批号分别为 E030110-01,E030120-01);trizol,HiScript[®] Q RT SuperMix for qPCR(+g DNA wiper),ChamQ SYBR qPCR 反应混合物(南京诺唯赞生物科技有限公司,货号分别为 R401-01,R123-01,Q311-02);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物科技研究所,货号分别为 P0010,P0015F)。

1.4 仪器 DM4000B-LED 型光学显微镜(德国 Leica 公司);TDZ4A-WS 型低速离心机(湖南湘仪仪器有限公司);JS-400A 型恒温金属浴(德国 Eppendorf 公司);E163302 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);PowerPacTM 型电泳仪,690BR006827 型半干转印系统-新型快速,ChemiDocXRS 型化发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司);64R 型低温高速离心机(美国 Beckman 公司);9700 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪,7500 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 痛风宁含药血清的制备 将 60 只 SD 大鼠随机分为 4 组,即空白组,痛风宁低、中、高剂量组,每

组 15 只。根据前期研究并参照人与动物体表面积换算^[13-14],痛风宁低、中、高剂量组每天分别给予 $7.65,15.3,30.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃,空白组采用等体积生理盐水灌胃,2 次/d,连续 3 d,于末次灌胃后 1 h,用 10% 水合氯醛 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 行腹腔注射麻醉后进行腹主动脉采血, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上层血清,于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min,采用 $0.2\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜无菌过滤后,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.2 细胞培养 将购自深圳市百恩维生物科技有限公司的 HK-2 接种于培养瓶,待其长满瓶底 80% 进行传代,吸弃培养基,加入 PBS 2 mL,晃动培养瓶清洗细胞表面,吸弃 PBS,加入胰酶 1 mL,摇晃均匀后放入 CO_2 培养箱消化,待于显微镜下观察细胞变小、变圆出现独立悬浮即消化完毕。加入完全培养基 5 mL 终止消化,将细胞全部轻轻吹打下来,并将细胞悬液移至 10 mL 离心管中, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min。弃上清液,10% FBS 重悬。按 1:2 传代,补充培养基 5 mL/瓶。于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。

2.3 HK-2 的干预 取第 3 代 HK-2 随机分为正常组,模型组,痛风宁低、中、高剂量组及苯溴马隆组,正常组用含 10% 空白血清的培养基培养,模型组用含 10% 空白血清 + $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿酸的培养基培养,痛风宁低、中、高剂量组 ($7.65,15.3,30.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 用含 10% 含药血清 + $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿酸的培养基培养,苯溴马隆组用含 10% 空白血清 + $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯溴马隆^[15] + $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿酸的培养基培养。干预 24 h 后收集细胞及上清液。

2.4 指标检测

2.4.1 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 URAT1, GLUT9, ABCG2 和 OAT1, OAT3 蛋白的表达

取对数生长且状态良好的 HK-2,吸取胰酶 1 mL 消化细胞。按每 1×10^6 个细胞加裂解液 $200\ \mu\text{L}$,于冰上静置 20 min, $15\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,取上清得总蛋白。根据 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒计算蛋白浓度后,混匀后金属浴变性 5 min。每孔按 $40\ \mu\text{g}$ 蛋白上样,各孔加 Marker $2\ \mu\text{L}$ 后,进行凝胶电泳,电泳条件为 20 V 10 min,80 V 30 min,100 V 80 min。将 PVDF 膜于甲醇中活化 5 min 后与滤纸浸泡于转膜液中 10 min,切取所需目的蛋白胶条,按滤纸-PVDF 膜-胶-滤纸的顺序放置进行半干转膜。转膜完成后, TBST 洗涤 5 min,封闭液中孵育 2 h。取出 PVDF 膜用 TBST 反复漂洗 3 次,每次 10 min 后,一抗严格参考说明书稀释比例调整,

URAT1 抗体 1 : 5 000, GLUT9 1 : 1 000, ABCG2 1 : 1 000, β -actin 1 : 5 000, OAT1, OAT3 参考说明书及文献[16-17], 从 1:100 到 1:3 000 进行调试, 4 °C 于摇床上孵育过夜; 取出 PVDF 膜 TBST 反复洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 1:1 万, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 1:1 万, 室温孵育 1 h。取出 PVDF 膜用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。显影液显影。设置 Image Lab 软件对条带进行成像记录, 以目的蛋白/内参蛋白的灰度值来表示目的蛋白的相对表达量。

2.4.2 Real-time PCR 检测 URAT1, GLUT9, ABCG2 和 OAT1, OAT3 mRNA 的表达 总 RNA 的提取严格按照 trizol 法试剂盒说明书上的操作方式进行, 于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。RNA 逆转录: 取 RNA 样本于冰上解冻后混匀, 4 °C 13 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 加入各组离心管中, 用 ddH₂O 定容至 18 μ L, 每管加 4 \times gDNA wiper Mix 6 μ L, 混匀后放入 PCR 仪(42 °C 2 min), 去除 DNA 干扰后行逆转录。取出离心管, 每管加 5 \times RT SuperMix II 6 μ L, 混匀后放入 PCR 仪(50 °C 15 min, 85 °C 2 min) 行逆转录得 cDNA。实时荧光定量 PCR 检测: 从 Gene bank 中查找 URAT1, GLUT9, ABCG2, OAT1, OAT3 目的基因的 CDS 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 并委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行引物合成, 引物序列见表 1。每管加入 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (2 \times) 10 μ L, PCR Forward Primer 10 μ mol, PCR Reverse Primer 10 μ mol 和 ROX Reference Dye II(50 \times) 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 定容至 20 μ L 配制反应体系后, 进行 PCR 扩增流程, 设置条件为 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 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, 多组均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

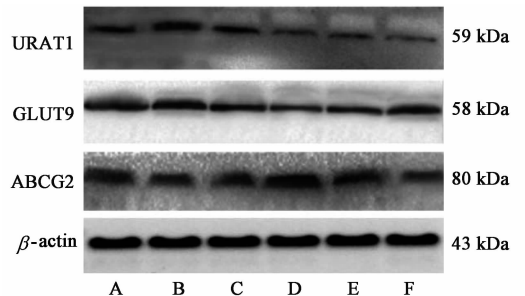
3.1 对 HK-2 中 URAT1, GLUT9, ABCG2 和 OAT1, OAT3 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 URAT1, GLUT9 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), ABCG2 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 痛风宁各剂量组 URAT1, GLUT9 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), ABCG2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), 苯溴马隆组 URAT1, GLUT9 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$); 与痛风宁中剂量组比较, 痛风宁低、

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|-------|----------------------------|-------|
| URAT1 | 上游 CGCTTGCTGTTACCTGTC | 162 |
| | 下游 GAGAGGCCATAGCTGAGGTG | |
| GLUT9 | 上游 CAGTGTTCCGATCCCTGTCC | 260 |
| | 下游 CGATACTCGGCTGCTCTGTC | |
| ABCG2 | 上游 TCTTCCTGACGACCAACCA | 307 |
| | 下游 ACACTCTGACCTGCTGTAT | |
| OAT1 | 上游 CAGCCTTCGCACCCAACTTC | 77 |
| | 下游 GAGGGAGATGCCAGCCAGAG | |
| OAT3 | 上游 CATGGGCCAAATGGGAAGC | 86 |
| | 下游 TGGCCCTCTGGGTGTCAATTG | |
| GAPDH | 上游 GGAAGGTGAAGCTCGGACTCA | 230 |
| | 下游 CTGGAAGATGCTGATGGGATTTC | |

高剂量组 URAT1, GLUT9 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), ABCG2 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$); OAT1 和 OAT3 蛋白于各组均无表达。见图 1, 表 2。



A. 正常组; B. 模型组; C~E. 痛风宁低、中、高剂量组; F. 苯溴马隆组
图 1 各组 HK-2 中 URAT1, GLUT9, ABCG2 蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of URAT1, GLUT9 and ABCG2 protein in HK-2 of each group

3.2 对 HK-2 中 URAT1, GLUT9, ABCG2 和 OAT1, OAT3 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 URAT1, GLUT9 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), ABCG2 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 痛风宁各剂量组 URAT1, GLUT9 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$), ABCG2 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$), 苯溴马隆组 URAT1, GLUT9 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$); 与痛风宁中剂量组比较, 痛风宁低、高剂量组 URAT1, GLUT9 mRNA 表达显著升高, ABCG2 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$); OAT1 和 OAT3 mRNA 于各组均无表达。见表 3。

表 2 痛风宁对 HK-2 中 URAT1, GLUT9, ABCG2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Tongfengning on expression of URAT1, GLUT9, ABCG2 protein in HK-2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | URAT1/ β -actin | GLUT9/ β -actin | ABCG2/ β -actin |
|------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常 | - | 0.390 ± 0.141 | 0.780 ± 0.192 | 0.470 ± 0.022 |
| 模型 | - | 1.520 ± 0.390 ¹⁾ | 2.520 ± 0.273 ¹⁾ | 0.100 ± 0.025 ¹⁾ |
| 痛风宁 | 7.65 | 1.280 ± 0.072 ^{3,4,6)} | 1.650 ± 0.220 ^{3,4,6)} | 0.167 ± 0.024 ^{3,4,7)} |
| | 15.3 | 1.120 ± 0.003 ^{3,5)} | 1.260 ± 0.156 ^{3,5)} | 0.260 ± 0.030 ^{3,5)} |
| | 30.6 | 1.274 ± 0.001 ^{3,4,6)} | 1.628 ± 0.181 ^{3,4,6)} | 0.171 ± 0.029 ^{3,4,7)} |
| 苯溴马隆 | 50 ⁸⁾ | 1.400 ± 0.009 ²⁾ | 2.020 ± 0.192 ²⁾ | 0.120 ± 0.021 |

注:与正常组比较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⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$;与痛风宁中剂量组比较⁶⁾ $P < 0.05$, ⁷⁾ $P < 0.01$ (表 3 同);⁸⁾ 浓度单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 3 痛风宁对 HK-2 中 URAT1, GLUT9, ABCG2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Tongfengning on expression of URAT1, GLUT9, ABCG2 mRNA in HK-2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | URAT1 | GLUT9 | ABCG2 |
|------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常 | - | 1.000 ± 0.116 | 1.000 ± 0.037 | 1.000 ± 0.065 |
| 模型 | - | 3.650 ± 0.546 ¹⁾ | 3.450 ± 0.145 ¹⁾ | 0.237 ± 0.047 ¹⁾ |
| 痛风宁 | 7.65 | 2.430 ± 0.062 ^{3,4,7)} | 2.790 ± 0.022 ^{3,4,7)} | 0.680 ± 0.031 ^{3,5,7)} |
| | 15.3 | 1.965 ± 0.212 ^{3,5)} | 2.590 ± 0.067 ^{3,5)} | 0.830 ± 0.026 ^{3,5)} |
| | 30.6 | 2.421 ± 0.058 ^{3,4,7)} | 2.760 ± 0.044 ^{3,4,7)} | 0.700 ± 0.022 ^{3,5,7)} |
| 苯溴马隆 | 50 ⁸⁾ | 2.890 ± 0.101 ³⁾ | 2.917 ± 0.017 ³⁾ | 0.306 ± 0.032 |

4 讨论

尿酸在肾脏的代谢过程主要包括肾小球滤过、肾小管的重吸收和分泌及分泌后的重吸收等,且除肾小球滤过外,其他环节均需依赖尿酸盐转运体蛋白参与完成。若这些转运蛋白表达异常,则引起肾小管重吸收增加或分泌减少,使血尿酸水平升高,除导致 HUA 外,还增加了痛风发作的危险性。课题组认为 HUA 属“内生湿浊”范畴,痛风属于“内湿致痹”,常因素体肥胖,痰湿内盛,加上饮食不节、嗜食肥甘厚味,日久伤脾,脾失健运,运化失司,水液不化,聚而成湿,积而成水,水湿内停,酿生湿浊,湿浊留于血脉,即产生 HUA。若湿浊日久不去,滞于脉络肢节,血气凝结,不通则痛,发为痛痹,并认为利湿排浊在此治疗中至关重要。痛风宁是课题组经多年临床实践总结出的通过降尿酸治疗痛风的效验方,主要由苍术、黄柏、川牛膝、土茯苓、萆薢、金钱草等药物组成。方中苍术燥湿健脾,黄柏清湿热,川牛膝引药下行,导湿外出,三药合为“三妙丸”,可健脾除湿清热排浊,针对 HUA“内生湿浊”之特点;土茯苓、萆薢化湿泄浊、通利关节,加强分清祛浊功效;秦艽清湿热,金钱草利尿通淋,配合川牛膝引热、水下行,使泄水如洪而湿热之邪自出;泽泻利水渗湿,杜绝生湿之源。诸药合用,共奏利湿排浊之功。现代研究

也表明,方中土茯苓、萆薢、泽泻等有效成分可下调模型鼠肾脏 URAT1 表达减少尿酸的重吸收,降低血尿酸水平^[18-20]。苍术、黄柏、牛膝等药物提取物可下调 HUA 模型鼠肾脏 URAT1, GLUT9 表达,降低血尿酸^[21]。肿节风中的香豆素类化合物可下调 HUA 模型鼠肾脏组织 URAT1 和 GLUT9 蛋白及 mRNA 表达,促进尿酸排泄^[22]。

最新研究显示尿酸/阴离子转运体蛋白 URAT1,可通过有机阴离子和无机阴离子在上皮细胞与肾小管管腔之间产生的浓度差或电化学梯度,将尿酸从肾小管管腔内重吸收入细胞内,完成重吸收的第一步^[8];GLUT9 对尿酸具有较强的亲和力,可将管腔内的尿酸重吸收入细胞内和将细胞内的尿酸转运至肾间质,完成吸收入血^[8,23]。OAT1 和 OAT3 作为 OTA 家族中分泌尿酸的主要成员,可逆化学梯度将尿酸从肾间质中转运至肾小管上皮细胞内,而 ABCG2 为高容量尿酸分泌蛋白,可将尿酸转运至肾小管管腔,经尿液排出体外^[24]。基因组学研究证实^[25-27],当 URAT1, GLUT9 或 OAT1, OAT3 与 ABCG2 表达异常时可导致 HUA 发生^[28-29];较健康人而言,HUA 患者中 URAT1, GLUT9 蛋白及 mRNA 表达较高,而 OAT1, OAT3 与 ABCG2 蛋白及 mRNA 表达较低。可见,这些尿酸盐转运体在肾脏尿酸排

泄过程中发挥着重要作用,而通过良性调控这些转运蛋白可有效促进肾脏尿酸排泄,降低血尿酸。

本实验结果表明,苯溴马隆组 URAT1, GLUT9 蛋白及 mRNA 表达下降,但 ABCG2 蛋白及 mRNA 表达与模型组无显著性差异,说明苯溴马隆可通过抑制 URAT1, GLUT9 蛋白和基因表达减少尿酸在肾小管的重吸收,而对 ABCG2 蛋白和基因无明显调节作用,这也与目前该药的药理研究结果相符。各剂量痛风宁含药血清均可明显抑制 URAT1, GLUT9 蛋白及 mRNA 表达,促进 ABCG2 蛋白及 mRNA 表达,表明痛风宁可通过上调肾小管上皮细胞中的 ABCG2 来促进肾脏对尿酸的排泄;同时下调 URAT1, GLUT9 来抑制肾脏对尿酸的重吸收,最终达到降低血尿酸水平的作用。这也体现了痛风宁的多靶点治疗作用,在 HUA 的治疗中显示出独特优势。此外,笔者发现中剂量痛风宁含药血清下调 HK-2 中 URAT1 和 GLUT9 蛋白及 mRNA 表达,上调 ABCG2 蛋白及 mRNA 表达的作用优于低、高剂量痛风宁含药血清。笔者猜测这可能与细胞膜上的载体蛋白对血清含药成分的转运有关。低剂量痛风宁含药血清可能因所含药物成分不足而对 URAT1, GLUT9 和 ABCG2 蛋白及 mRNA 的调节作用较弱;高剂量痛风宁含药血清可能因所含药物浓度过高,细胞对药物转运呈饱和状态,且相互之间存在竞争抑制,故表现出对尿酸盐转运体蛋白的调节作用反而偏弱。中剂量痛风宁含药血清浓度适宜,细胞对药物转运率相对较高,故表现出对上述尿酸盐转运体蛋白较强地调节作用。在本研究中还发现 OAT1 和 OAT3 蛋白及 mRNA 在各组均无表达。笔者推测其原因可能是 HK-2 为永生化后的肾小管上皮细胞株,经长时间体外培养,并多次传代后可能发生了基因突变而失去了 OAT1 和 OAT3 表达,这有待我们进一步深入研究。

综上,本实验证实了痛风宁可通过调控肾脏中 URAT1, GLUT9 和 ABCG2 等尿酸盐转运体的蛋白及 mRNA 表达,进而减少肾小管对尿酸的重吸收而促进分泌,最终增加肾脏尿酸排泄量,降低血尿酸水平。

[参考文献]

[1] 袁宁,刘雅.高尿酸血症与心血管疾病及其危险因素相关性研究进展[J].四川医学,2016,37(3):335-338.
[2] 许超,张芳.肾小管上皮细胞尿酸相关转运蛋白的研究进展[J].中华风湿病学杂志,2013,17(3):

202-204.

[3] 王洁敏,顾乐怡.尿酸转运蛋白的基因组学及临床实验研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2014,15(7):650-653.
[4] 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.
[5] 李发双,李玲,高丽辉.有机阴离子转运蛋白研究进展[J].国际药学研究杂志,2017,44(10):931-934.
[6] 付正菊,王霞,李长贵,等.尿酸对肾小管上皮细胞人尿酸盐转运子基因表达的影响[J].中国免疫学杂志,2009,25(6):560-562.
[7] 王华杰,张国华,邹震,等.四妙散加味方对人肾小管上皮细胞 UAT 和 URAT1 基因表达的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(9):972-977.
[8] 张冰清,张昀,曾学军.尿酸转运蛋白是治疗高尿酸血症的新靶点[J].基础医学与临床,2014,34(11):1582-1585.
[9] 滕方舟,蔡唐彦,郭洁梅,等.痛风宁对急性痛风性关节炎模型大鼠 IL-1 β , TNF- α 及 NALP3 炎症体的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(17):120-125.
[10] 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):16-18.
[11] 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.
[12] 陈伟宏,苏友新,许书亮,等.痛风宁冲剂治疗急性痛风性关节炎 104 例临床观察[J].福建中医学院学报,2001,11(3):26-28.
[13] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:1168-1170.
[14] 苏友新,滕方舟,蔡唐彦,等.痛风宁含药血清对尿酸盐诱导 THP-1 中 NALP3 炎症体相关蛋白及炎症因子表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2019,39(3):323-329.
[15] 臧路平,吴新荣.小鼠肾脏近端小管上皮细胞原代培养条件优化及功能测试[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(50):9358-9360.
[16] 王抚梦,卢燕,孔令东.半夏厚朴汤及君臣配伍对小鼠肝脏 CYP450 和肾脏离子转运子的影响[J].中国中药杂志,2011,36(1):60-65.
[17] 梁少瑜,曾永长,俞励平,等.基于尿酸转运蛋白的四妙散改良方降尿酸作用及机理探讨[J].中药材,2016,39(11):2610-2614.
[18] 陈光亮,朱立然,那莎,等.草蓆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.
- [19] 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.
- [20] KONG L D, YANG C, GE F, et al. A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 93 (2): 325-330.
- [21] HU Q H, JIAO R Q, WANG X, et al. Simiao pill ameliorates urate underexcretion and renal dysfunction in hyperuricemic mice [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128 (3):685-692.
- [22] 周宏星,陈玉胜. 岩白菜素抗高尿酸血症的活性及机制研究[J]. 安徽医科大学学报,2014,49(1):63-67.
- [23] 刘璐,青玉凤,周京国. 尿酸盐转运蛋白 1 在高尿酸血症/痛风中的研究进展 [J]. 医学综述,2016, 22 (6):1070-1073.
- [24] 刘伟,刘志刚,罗明琍,等. 肾脏有机阴离子转运体在尿酸转运中的作用研究进展 [J]. 安徽医药,2013,17 (3):361-364.
- [25] Cheong H I, KANG J H, Lee J H, et al. Mutational analysis of idiopathic renal hypouricemia in Korea [J]. Pediatr Nephrol, 2005, 20 (7): 886-890.
- [26] Anzai N, Jutabha P, Endou H. Renal solute transporters and their relevance to serum urate disorder [J]. Curr Hypertens Rev, 2010, 6 (3): 148-154.
- [27] Naohiko A, Promsuk J, Torr K, et al. Urate transport: regulators of serum urate levels in humans [J]. Curr Rheumatol Rev, 2011, 7 (2): 123-131.
- [28] 李智娟,成志锋. 新型促尿酸排泄药物的研究进展 [J]. 医学综述,2018,24(15):3045-3049.
- [29] LIU N, WANG L, YANG T, et al. EGF receptor inhibition alleviates hyperuricemic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26 (11): 2716.

[责任编辑 孙丛丛]