

蠲痹历节清方对高尿酸血症大鼠肾脏中部分尿酸转运蛋白的影响

康佩芝^{1,2} 苏新平¹ 郭玉星^{1△} 朱方晓³ 邵先舫⁴ 熊辉³ 刘永利⁴ 毛果¹

[摘要] 目的:探讨肾脏尿酸盐转运子 1(Urate Transporter 1, URAT1)、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2(ATP-binding Cassette Superfamily G Member 2, ABCG2)、葡萄糖转运蛋白 9(Glucose Transporter 9, GLUT9)等尿酸转运蛋白在蠲痹历节清方降低血尿酸(Serum Uric Acid, SUA)中的机制。方法:将雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、苯溴马隆组(5 mg/kg)及蠲痹历节清方低、中、高剂量组(11, 22, 44 g/kg)。除空白组外,其余各组均建立高尿酸血症模型;苯溴马隆组和蠲痹历节清方组分别予相应浓度混悬液进行灌胃干预。最后收集大鼠腹主动脉血和双肾组织,采用全自动生化仪检测各组大鼠腹主动脉中血尿酸含量,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测各组大鼠肾脏中 URAT1、GLUT9、ABCG2 mRNA 和蛋白的表达。结果:与空白组相比,模型组血尿酸水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);空白组与模型组血尿酸水平存在明显差异,提示造模成功。与空白组比较,模型组 URAT1 及 GLUT9 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);ABCG2 的 mRNA 和蛋白的表达则显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,蠲痹历节清方各剂量组和苯溴马隆组 URAT1 及 GLUT9 的 mRNA 和蛋白表达均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);ABCG2 的 mRNA 和蛋白的表达则显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与蠲痹历节清方高剂量组比较,中、低剂量组 URAT1 及 GLUT9 的 mRNA 和蛋白表达均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);ABCG2 的 mRNA 和蛋白的表达则明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:蠲痹历节清方可通过抑制肾脏中 URAT1、GLUT9 mRNA 及蛋白表达,促进 ABCG2 的 mRNA 和蛋白的表达,来调节尿酸的分泌,减少尿酸的重吸收,增加尿酸的排泄,进而降低血尿酸水平,且随着剂量的升高,其降尿酸的作用逐渐增强。

[关键词] 尿酸;肾脏尿酸盐转运子 1;三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2;葡萄糖转运蛋白 9;蠲痹历节清方

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)01-0007-06

DOI: 10. 20085/j. cnki. issn1005-0205. 240102

Effect of Juanbilijieqing Recipe on the Partial Uric Acid Transporters in the Kidneys of Rat with Hyperuricemia

KANG Peizhi^{1,2} SU Xinping¹ GUO Yuxing^{1△} ZHU Fangxiao³

SHAO Xianfang⁴ XIONG Hui³ LIU Yongli⁴ MAO Guo¹

¹ Affiliated Hospital of Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China;

² Hunan Provincial People's Government Organ Hospital, Changsha 410004, China;

³ Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

⁴ Changde First Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changde 415100, Hunan China.

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81574005)

长沙市科技计划项目(kq2004057)

湖南省中医药研究院院级重点课题(202128)

¹ 湖南省中医药研究院附属医院(长沙, 410006)

² 湖南省人民政府机关医院

³ 湖南中医药大学

⁴ 常德市第一中医医院

△通信作者 E-mail: 459673129@qq.com

Abstract Objective: To study the mechanism of Juanbilijieqing recipe in reducing serum uric acid (SUA) from the uric acid transporters such as renal URAT1 (urate transporter 1), ABCG2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2) and GLUT9 (glucose transporter 9). **Methods:** SD male rats were randomly divided into control group, mod-

el group, benzbromarone group (5 mg/kg), low, medium and high dose groups (11, 22, 44 g/kg) of Juanbilijieqing recipe. Except for the blank group, hyperuricemia models were established in all other groups. Benzbromarone group and Juanbilijieqing recipe group were given corresponding concentrations of suspension by intragastric administration to intervene. Finally, the blood of abdominal aorta and kidney tissue of rats were collected. The content of serum uric acid was detected by automatic biochemical instrument technology. The expressions of URAT1, GLUT9, ABCG2 mRNA and protein in the kidneys of rats were detected by real-time PCR and Western Blot. **Results:** Compared with the blank group, the SUA level in the model group increased significantly ($P < 0.05$). There was a significant difference in SUA level between the blank group and the model group, indicating that the modeling was successful. Compared with the control group, the expression of URAT1, GLUT9 mRNA and protein increased significantly ($P < 0.05$), while the expression of ABCG2 mRNA and protein decreased significantly in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of URAT1, GLUT9 mRNA and protein in each dose of Juanbilijieqing recipe group and benzbromarone group decreased significantly ($P < 0.05$), and the expression of ABCG2 mRNA and protein increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the Juanbilijieqing recipe high dose group, the expression of URAT1, GLUT9 mRNA and protein increased significantly ($P < 0.05$), while the expression of ABCG2 mRNA and protein decreased significantly in the middle and low dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Juanbilijieqing recipe can inhibit the expression of URAT1, GLUT9 mRNA and protein in kidney, promote the expression of ABCG2 mRNA and protein, reduce the secretion and reabsorption of uric acid, increase the excretion of uric acid, and then reduce the level of serum uric acid. And with the increase of dose, its effect of reducing uric acid gradually strengthened.

Keywords: uric acid; urate transporter 1 (URAT1); ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2); glucose transporter 9 (GLUT9); Juanbilijieqing recipe

痛风是一种以反复发作的急性关节炎为临床表现的慢性疾病, 主要以高尿酸血症为病理特点。流行病学研究表明目前有 1%~6% 的成年人遭受着痛风影响^[1], 而且发病年龄也呈现了逐渐年轻化的趋势^[2]。经过多年临床验证及基础研究证实蠲痹历节清方是一种可降低血尿酸的复合良药^[3-8]。基于肾脏尿酸盐转运子 1 (Urate Transporter 1, URAT1)、葡萄糖转运蛋白 9 (Glucose Transporter 9, GLUT9)、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 (ATP-binding Cassette Superfamily G Member 2, ABCG2) 在尿酸转运作用中的前沿研究动态及项目前期研究, 本研究通过实验验证蠲痹历节清方在高尿酸血症动物模型中通过调控尿酸转运蛋白 (URAT1, GLUT9, ABCG2) 实现降尿酸作用的机制, 为蠲痹历节清方治疗痛风的推广及其剂量的选择提供实验依据, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

2 个月龄健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 体重为 (200±20) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物许可证号为 SCXK(湘)2019-0004, 饲养于湖南省中医药研究院动物实验室(许可证为 SYXK(湘)2015-0008), 实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准(编号为 2020-0029)。

1.2 实验药物

蠲痹历节清方由苍术 20 g、黄柏 10 g、黄芩 10 g、土茯苓 15 g、茵陈 15 g、防己 10 g、泽泻 10 g、白术

10 g、当归 15 g、甘草 6 g 等药物组成。根据人与动物体表面积换算公式 ($D_{鼠} = D_{人} \times R_{鼠} / R_{人}$, D 为所需剂量, R 为动物与人体表面积比值) 计算出大鼠用药常规剂量为 11 g/kg。中药由湖南省中医药研究院附属医院药剂科提供, 由煎药室按既定工艺熬煎浓缩至含生药量 4.4 g/mL 的药液, 用前加蒸馏水配成所需浓度。苯溴马隆片 50 mg/片 (批号为 H19990335, 常州康普药业有限公司), 将其研成细粉末溶于蒸馏水, 配置成 1 mg/mL 的苯溴马隆溶液。次黄嘌呤 (批号为 J1925144, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 配置成 100 mg/mL 浓度的次黄嘌呤溶液。氧嗪酸钾 (批号为 C1915007, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 配置成 20 mg/mL 浓度的氧嗪酸钾溶液。以上溶液置于 4℃ 冰箱冷藏备用。

1.3 实验试剂

兔抗 URAT1 多克隆抗体 (批号为 14937-1-AP)、鼠抗 GLUT9 多克隆抗体 (批号为 67530-1-Ig)、兔抗 ABCG2 多克隆抗体 (批号为 27286-1-AP)、鼠抗 β -actin 抗体 (批号为 66009-1-Ig) 均购自美国 Proteintech Group 公司; mRNA 逆转录试剂盒 (批号为 CW2569)、Ultra SYBR Mixture (批号为 CW2601)、DM2000 Plus DNA Marker (批号为 CW0632) 均购自北京康为世纪生物科技有限公司; Tris (批号为 V900483, 美国 Sigma 公司)、Trizol (批号为 15596026, 美国 Thermo 公司)、脱脂奶粉 (批号为 P1622)、蛋白磷酸酶抑制剂 (批号为 P1260) 均购自北

京普利莱基因技术有限公司;蛋白酶抑制剂(批号为 583794)购自北京金泰宏达生物科技有限公司。

1.4 实验仪器

摇床(型号为 TS-1)、旋涡混合器(型号为 GL-88B)均购自江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;荧光定量 RCP 仪(型号为 PIKOREAL96)、荧光 PCR 板(型号为 SPL0960)均购自美国 Thermo 公司;电泳仪(型号为 DYY-6C)、电泳槽(型号为 DYCZ-24DN)、转膜仪(型号为 DYCZ-40D)均购自北京六一生物科技有限公司;台式冷冻离心机(型号为 H1650R)购自湖南湘仪动力测试仪器有限公司;磁力搅拌器(型号为 JB-13)、精密 pH 计(型号为 PHS-3C)购自上海雷磁仪器厂;电子天平(型号为 JJ224BC)购自美国双杰集团有限公司;生物样品均质仪(型号为 BioPrep-24)购自杭州奥盛仪器有限公司。

1.5 方法

1.5.1 分组与造模 查阅相关文献,参考吕军等^[9]的高尿酸血症模型造模及实验方法和郭玉星等^[10]的实验治疗组剂量比例关系。将 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,按随机数字表法随机分成 6 组,即空白组、模型组、苯溴马隆组、蠲痹历节清方低剂量组(常规剂量组)、蠲痹历节清方中剂量组(2 倍剂量组)、蠲痹历节清方高剂量组(4 倍剂量组),每组 10 只;除空白组外,其余各组均给予氧嗪酸钾 100 mg/kg 腹腔注射和次黄嘌呤 500 mg/kg 灌胃造模,空白组予以等体积生理盐水腹腔注射+灌胃,给药 1 次/d,共实验 8 d。

1.5.2 实验与干预 从实验第 4 天开始,每日造模 30 min 后,蠲痹历节清方低、中、高剂量组分别予以 11,22,44 g/kg 浓度中药灌胃,苯溴马隆组以 5 mg/kg 剂量用苯溴马隆溶液灌胃,模型组与空白组仅予等体积生理盐水灌胃,治疗 1 次/d,共治疗 5 d。

1.5.3 血尿酸检测 实验第 7 天给药治疗 3 h 后开始禁食,实验第 8 天给药治疗 3 h 后,以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,麻醉成功后腹主动脉采血 3 mL、抗凝管保存,采用全自动生化仪检测,测定血尿酸含量。取双肾组织,-80℃干冰保存备用。

1.5.4 Western Blot 检测各组大鼠肾脏中 URAT1、GLUT9、ABCG2 的蛋白表达 取 0.025 g 组织,清洗研磨,加入 250 μL 放射免疫沉淀法(RIPA)裂解缓冲液冰上裂解 10 min,12 000 r/min,4℃离心 15 min,取 1.5 mL 上清总蛋白。取 160 μL 蛋白上清,加入 40 μL 5 倍上样缓冲液混匀,沸水煮 5 min 变性。每孔按 10 μL 蛋白上样,加标记物 2.8 μL,以恒定电压 75 V 电泳 130 min,待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。切取目的蛋白胶条,准备与胶同样大小的滤纸和 NC 膜,按照滤纸-NC 膜-胶-滤纸的顺序依次放好,以

300 mA 恒定电流进行转膜,URAT1、ABCG2 约 90 min, GLUT9 约 80 min,β-actin 约 60 min。转膜后,先放入 1×PBST(磷酸盐缓冲液)中清洗,再用 1×PBST 配制 5%脱脂奶粉浸入封闭。用 1×PBST 将一抗按照一定比例稀释,URAT1(1:500)、GLUT9(1:5 000)、ABCG2(1:500)、β-actin(1:5 000),将膜与一抗一起室温孵育 90 min,孵育结束,1×PBST 反复洗涤 3 次,每次 15 min。用 1×PBST 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,HRP 山羊抗鼠抗体 IgG(1:5 000)、HRP 山羊抗兔抗体 IgG(1:6 000),将稀释后的二抗与膜共同室温孵育 90 min,孵育结束,1×PBST 反复洗涤 3 次,每次 10 min。增强型化学发光(ECL)显色曝光,显影冲洗。

1.5.5 实时 PCR 检测各组大鼠肾脏中 URAT1、GLUT9、ABCG2 的 mRNA 表达 严格按照 Trizol 试剂盒提取组织总 RNA,紫外分光光度计测定浓度和纯度,浓度在 100~200 ng/μL,纯度在 1.8~2.0 之间均可。反转录以 dNTP 混合物 2.5 mmol/L(4 μL)、混合引物(2 μL)、RNA 模板(7 μL)、5×逆转录酶(RTase)缓冲液(4 μL)、二硫苏糖醇(DTT)0.1 mol/L(2 μL)、HiFiScript 200 U/μL(1 μL)的反应体系涡旋振荡混匀,短暂离心,使管壁上的溶液收集到管底,50℃孵育 50 min,85℃孵育 5 min。反应结束后,短暂离心,置于冰上冷却。在美国国家生物技术信息中心(NCBI)上搜索目的基因 URAT1、GLUT9、ABCG2、β-actin 的序列,采用 primer 5 软件设计引物,由上海生工合成引物(引物序列号见表 1)。实时定量聚合酶链式反应(每个样本每个指标 3 个孔,共 30 μL 体系,每孔 10 μL),30 μL 体系为反转录产物(2 μL)、反向引物 10 μmol/L(1 μL)、正向引物 10 μmol/L(1 μL)、ddH₂O(11 μL)、2×SYBR Green PCR Master Mix(15 μL),定量 PCR 扩增程序为 95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s,60~95℃熔解曲线分析。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
R-actin	F ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	R TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	
R-URAT1	F AACAGGAGAAAGGCAGAGGC	116
	R GGTGTGTGGAGTAGAGTGCC	
R-GLUT9	F CCATCATTGCCTCGTTTCTGC	145
	R AAAAGGAGCCCTACAACGAAG	
R-ABCG2	F AGCCTGTATATGTTACCTCGTT	140
	R AAGGGCACCAATAATCAGTCC	

1.6 统计学方法

数据采用 SPSS 23.0 软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,整体比较采用单因素方差分

析;同一组别的比较采用单因素方差分析,同一时间点不同组别的比较若满足正态性及方差齐性采用 One-Way ANOVA 进行分析,用 LSD 法对各组数据进行多重比较;若方差不齐则采用 Games-Howell 方法进行两两比较,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠血尿酸水平

与空白组相比,模型组血尿酸水平明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$);空白组与模型组血尿酸水平存在明显差异,提示造模成功。与模型组相比,苯溴马隆组、蠲痹历节清方各剂量组血尿酸水平均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。蠲痹历节清方低、中、高剂量组相互比较,随着剂量的增高,血尿酸水平逐步降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠血尿酸水平($\bar{x}\pm s, n=10, \mu\text{mol/L}$)

组别	血尿酸
空白组	107.16±41.65
模型组	510.36±44.31 ¹⁾
苯溴马隆组	179.46±21.93 ¹⁾²⁾
蠲痹历节清方低剂量组	381.08±22.43 ¹⁾²⁾³⁾
蠲痹历节清方中剂量组	320.41±14.59 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
蠲痹历节清方高剂量组	262.84±18.03 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾

注:1)与空白组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与苯溴马隆组相比, $P<0.05$;4)与蠲痹历节清方低剂量组相比, $P<0.05$;5)与蠲痹历节清方中剂量组相比, $P<0.05$ 。

表 3 URAT1、GLUT9、ABCG2、 β -actin 的基因表达水平($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	URAT1	GLUT9	ABCG2
空白组	1.008 0±0.152 5	0.006 2±0.133 5	1.391 7±0.176 1
模型组	3.799 0±0.616 1 ¹⁾	3.122 6±0.502 2 ¹⁾	0.170 9±0.078 0 ¹⁾
苯溴马隆组	1.226 3±0.215 6 ¹⁾²⁾	1.519 9±0.191 6 ¹⁾²⁾	0.962 8±0.195 1 ¹⁾²⁾
蠲痹历节清方低剂量组	2.215 1±0.322 9 ¹⁾²⁾³⁾	2.178 4±0.249 1 ¹⁾²⁾³⁾	0.465 3±0.034 7 ¹⁾²⁾³⁾
蠲痹历节清方中剂量组	1.955 4±0.080 2 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1.751 8±0.368 2 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.521 5±0.020 4 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
蠲痹历节清方高剂量组	1.420 9±0.166 0 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	1.201 7±0.126 1 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	0.914 3±0.132 7 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾

注:1)与空白组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与苯溴马隆组相比, $P<0.05$;4)与蠲痹历节清方低剂量组相比, $P<0.05$;5)与蠲痹历节清方中剂量组相比, $P<0.05$ 。

溴马隆组优于蠲痹历节清方各剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与蠲痹历节清方高剂量组比较,中、低剂量组 URAT1、GLUT9 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);ABCG2 蛋白表达明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。URAT1、GLUT9、ABCG2、 β -actin 的蛋白表达水平同样随着剂量的升高,作用逐渐增强,如图 1 及表 4 所示。

3 讨论

原发性高尿酸血症的主要病因是尿酸排泄的减少和/或生成的增加,尿酸生成的增加则主要是因为嘌呤代谢过程中关键酶的缺陷所导致嘌呤利用障碍和/或嘌呤氧化酶活性增强所引起的,尿酸排泄的减少则主要因为尿酸的重吸收增加和/或分泌减少所导致。尿

2.2 肾脏组织中 URAT1、GLUT9、ABCG2 的 mRNA 表达水平

与空白组比较,模型组 URAT1、GLUT9 mRNA 表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);ABCG2 mRNA 表达显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,蠲痹历节清方各剂量组和苯溴马隆组 URAT1、GLUT9 mRNA 表达均明显下降($P<0.05$),ABCG2 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);且苯溴马隆组优于蠲痹历节清方各剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与蠲痹历节清方高剂量组比较,中、低剂量组 URAT1、GLUT9 mRNA 表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);ABCG2 mRNA 表达明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);可见随着剂量的升高,作用逐渐增强,见表 3。

2.3 肾脏组织中 URAT1、GLUT9、ABCG2 的蛋白表达水平

肾脏组织中 URAT1、GLUT9、ABCG2 的蛋白表达水平与基因表达水平保持一致,与空白组比较,模型组 URAT1、GLUT9 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);ABCG2 蛋白表达显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,蠲痹历节清方各剂量组和苯溴马隆组 URAT1、GLUT9 蛋白表达均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);ABCG2 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);苯

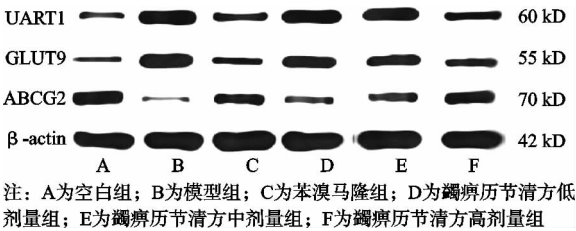


图 1 URAT1、GLUT9、ABCG2、 β -actin 的蛋白表达水平

酸在肾脏中的排泄是一个复杂的过程,研究者将其分为四个步骤,称之为经典四部件模式^[11],即肾小球的滤过、分泌前的重吸收(S1 段)、肾小管的分泌(S2 段)和分泌后重吸收(S3 段)。尿酸因其极性分子的性质,无法自由通过细胞膜脂质双分子层,因此肾小管对尿酸的排泄需要依赖一系列转运蛋白参与的离子通道,

表 4 URAT1、GLUT9、ABCG2、β-actin 的蛋白表达水平(目的蛋白光密度/内参蛋白光密度, $\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	URAT1/β-actin	GLUT9/β-actin	ABCG2/β-actin
空白组	0.181±0.016	0.192±0.011	0.413±0.013
模型组	0.623±0.013 ¹⁾	0.622±0.037 ¹⁾	0.082±0.002 ¹⁾
苯溴马隆组	0.292±0.026 ¹⁾²⁾	0.264±0.007 ¹⁾²⁾	0.274±0.013 ¹⁾²⁾
蠲痹历节清方低剂量组	0.604±0.028 ¹⁾²⁾³⁾	0.495±0.002 ¹⁾²⁾³⁾	0.163±0.006 ¹⁾²⁾³⁾
蠲痹历节清方中剂量组	0.484±0.003 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.423±0.018 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.213±0.009 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
蠲痹历节清方高剂量组	0.361±0.017 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	0.364±0.004 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	0.362±0.015 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾

注:1)与空白组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与苯溴马隆组相比, $P<0.05$;4)与蠲痹历节清方低剂量组相比, $P<0.05$;5)与蠲痹历节清方中剂量组相比, $P<0.05$ 。

尿酸盐转运体蛋白就是这一系列转运蛋白之一,其在肾脏对尿酸的重吸收和分泌过程中不可或缺。URAT1作为维持人类血尿酸水平的关键离子通道,也作为有机阴离子(如尿酸、乳酸等)与无机阴离子(如氯等)交换的媒介,可以在肾小管内将尿酸从管腔重吸收入上皮细胞内^[12],URAT1也是促尿酸药(如苯溴马隆、丙磺舒等)和抗尿酸排泄药物(如烟酸、吡嗪酰胺等)作用的靶点。研究表明苯溴马隆降低血尿酸的过程,主要是作用在近端肾小管刷状缘的URAT1上,因其抑制了尿酸盐的重吸收,并通过排尿促进尿酸排泄,以此达到目的^[13]。GLUT9^[14-15]位于肾小管上皮细胞顶膜和基底外侧面,作为一种高容量、高亲和性的尿酸盐转运体,在尿酸盐重吸收过程中与URAT1共同作用,在以URAT1作为媒介,将尿酸盐重吸收到肾小管上皮细胞内之后,再以GLUT9作为媒介将其重吸收回血液^[16-17]。ABCG2是ATP结合盒转运蛋白超家族成员之一,同样参与尿酸代谢,研究表明ABCG2功能的障碍会减少尿酸的排出,也从大量实验中得到ABCG2能促进尿酸排泄的结论^[18-20]。

蠲痹历节清方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,由四妙丸和当归拈痛汤基础上化裁而成,包括苍术 20 g、黄柏 10 g、白术 10 g、茵陈 15 g、当归 15 g、黄芩 10 g、防己 10 g、泽泻 10 g、土茯苓 15 g、甘草 6 g 等药物。方中黄柏、黄芩有清热之功效,黄柏更有燥湿坚阴之能,土茯苓、茵陈主清利湿热,苍术、白术合而醒脾化湿,防己、泽泻利水,当归养血活血,甘草缓急止痛,全方共奏“清热、利湿、化痰”之功效,其在临床运用良久,疗效可靠,且无明显不良反应。前期课题组从多方面对痛风以及中成药治疗痛风的机制与疗效进行了研究与探讨,例如通过 Meta 分析得出痛风的治疗应注重中成药与常规口服化学药的联合应用^[21],也从蛋白层面分析了水通道蛋白-2(AQP2)和热休克蛋白 70(HSP70)在判断风湿热蕴结证中有重要意义^[22],更对TLR4/NF-κB信号通路、NLRP3 炎症体系等多个通路进行研究,证实该方可能通过抑制该通路,从而下调TNF-α、IL-1β、

IL-6 的蛋白表达,以此降低痛风模型的血尿酸水平,抑制其关节滑膜组织的炎症反应等^[23-26]。

本研究则在课题组前期研究的基础上,从尿酸转运蛋白(URAT1、GLUT9、ABCG2)的角度,探讨了蠲痹历节清方在高尿酸血症动物模型中降尿酸作用的机制。实验结果表明,蠲痹历节清方对于URAT1、GLUT9的基因表达和蛋白表达有显著下调作用,对于ABCG2的基因和蛋白表达则具有上调作用。结合前期理论及实验研究,阐明了蠲痹历节清方的治疗效应途径,即通过下调URAT1、GLUT9基因和蛋白的表达,减少尿酸的重吸收;通过上调ABCG2基因和蛋白的表达,增加尿酸的排泄。进而降低血尿酸、血肌酐(SCr)和血尿素氮(BUN)含量,改善肾脏组织病理变化,以此达到有效治疗高尿酸血症、痛风等疾病的目的,也再一次确定了URAT1、GLUT9、ABCG2在尿酸代谢中的重要作用。同时,通过不同剂量的比较,发现随着蠲痹历节清方剂量的升高,对于URAT1和GLUT9基因和蛋白表达下调、ABCG2表达上调的作用逐渐增强,这则证实了剂量的选择对于临床疗效具有重要影响。目前本实验中,苯溴马隆组降尿酸的作用是优于蠲痹历节清方各剂量组的,随着剂量的进一步升高,其降尿酸的作用是否可能超过苯溴马隆,或者在某一剂量值时达到平台期甚至作用开始下降,这是进一步的研究内容。

参考文献

[1] ROBINSON P C, HORSBURGH S. Gout: joints and beyond, epidemiology, clinical features, treatment and comorbidities[J]. Maturitas, 2014, 78(4): 245-251.

[2] 谷丽梅. 非布司他治疗痛风伴高尿酸血症疗效观察[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(7): 106-107.

[3] 伍浩, 熊辉, 方菁, 等. 蠲痹历节清方治疗痛风性关节炎热阻滞证 31 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(6): 12-15.

[4] 方菁, 熊辉, 陆小龙, 等. 蠲痹历节清方联合正清风痛宁经皮透药治疗急性痛风性关节炎 30 例[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(6): 62-64.

[5] 吴海金, 尤卓, 陈媛, 等. 关节镜清理工联合蠲痹历节清方

- 治疗湿热蕴结型急性痛风性关节炎 34 例[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(2): 68-69.
- [6] 郭玉星, 熊辉, 陆小龙, 等. 蠲痹历节清方治疗急性痛风性关节炎的临床研究[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(1): 81-84.
- [7] 尤卓, 熊辉, 吴海金, 等. 蠲痹历节清方对急性痛风性关节炎大鼠的影响及其作用机制[J]. 中医正骨, 2018, 30(2): 1-6.
- [8] 郭玉星, 熊辉, 易法银, 等. 蠲痹历节清方对痛风细胞模型中 PPAR γ 、TLR4、NF- κ B 的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(12): 2825-2830.
- [9] 吕军, 吕芳, 方和金, 等. 高尿酸血症并急性痛风性关节炎大鼠模型的建立[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(27): 11-16.
- [10] 郭玉星, 熊辉, 易法银, 等. 蠲痹历节清方对改良痛风性关节炎模型大鼠滑膜的 TLR4、NF- κ B、PPAR γ 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 126-133.
- [11] RAFFEY M A, LIPKOWITZ M S, LEAL-PINTO E, et al. Uric acid transport[J]. Current Opinion in Nephrology Hypertension, 2003, 12(5): 511-516.
- [12] SHIBASAKI K, KIMURA M, IKARASHI R, et al. Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia[J]. Metabolomics, 2012, 8: 484-491.
- [13] ENOMOTO A, KIMURA H, CHAIROUNGDU A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels[J]. Nature, 2002, 417(6887): 447-452.
- [14] 刘璐, 青玉凤, 周京国. 葡萄糖转运蛋白 9 及其编码基因在痛风发病中的作用研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2015, 12(5): 42-45.
- [15] 杨会军, 李兆福, 万春平, 等. 尿酸盐转运蛋白在原发性痛风及高尿酸血症中的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(9): 1891-1894.
- [16] 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.
- [17] NAKANISHI T, OHYA K, SHIMADA S, et al. Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATv1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate[J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 28(3): 603-611.
- [18] 徐象威, 刘旭. 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 转运体与尿酸代谢研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2014, 41(2): 169-171.
- [19] 文钟, 青玉凤, 周京国, 等. 原发性痛风性关节炎患者外周血单个核细胞三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 变化情况及其意义研究[J]. 中国全科医学, 2019, 22(15): 1789-1793.
- [20] PHIPPS-GREEN A J, HOLLIS-MOFFATT J E, DALBETH N, et al. A strong role for the ABCG2 gene in susceptibility to gout in New Zealand Pacific Island and Caucasian, but not Maori, case and control sample sets[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(24): 4813-4819.
- [21] 李树冬, 谢芳, 刘永利, 等. 口服中成药治疗痛风性关节炎的网状 Meta 分析[J]. 中草药, 2021, 52(13): 3980-3993.
- [22] 郭玉星, 朱珊莹, 康佩芝, 等. AQP2、HSP70 在痛风湿热蕴结证模型中表达的意义[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(11): 3894-3899.
- [23] 郭玉星, 朱珊莹, 康佩芝, 等. 痛风清热方对急性痛风性关节炎大鼠滑膜组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(5): 673-677.
- [24] 康佩芝, 苏新平, 郭玉星, 等. 基于 P2X7R/NLRP3 信号通道研究痛风清热方对急性痛风性关节炎大鼠局部组织中炎症信号表达的影响[J]. 中药材, 2021(6): 1486-1490.
- [25] 王宇, 熊辉, 肖文仲, 等. 蠲痹历节清方对高尿酸血症模型大鼠干预作用的实验研究[J]. 湖南中医杂志, 2022, 38(5): 178-181.
- [26] 赵远航, 余晓愉, 贵鹏, 等. 蠲痹历节清方抑制 NLRP3 炎症体抗大鼠急性痛风性关节炎机制研究[J]. 中国中医急症, 2022, 31(1): 76-79.

(收稿日期: 2023-06-05)