DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20251009.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20251009.0948.002

泄浊通络方调控尿酸防治痛风的药效及其机制研究

陈烁宇,丁 鹏,张巧玉,张嘉琪,丁 静,周玲玲✉
(南京中医药大学药学院,江苏 南京 210000)

[摘要] **目的**:探讨泄浊通络方调控尿酸防治痛风及作用机制。**方法**:采用氧嗪酸钾联合次黄嘌呤诱导建立高尿酸血症(hyperuricemia,HUA)小鼠模型,动物分模型组、别嘌醇(10 mg/kg)组及泄浊通络方低(14.93 g/kg)、中(29.86 g/kg)、高剂量(59.72 g/kg)组,另设正常对照组。检测血清尿酸、肌酐、尿素氮水平;测定肝脏腺苷脱氨酶(adenosine deaminase,ADA)和黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XOD)活性;Western blot及RT-qPCR检测肾脏尿酸转运蛋白URAT1、GLUT9、ABCG2表达水平。体外培养人肾小管上皮细胞HK-2,以3.2 μmol/L的尿酸诱导细胞损伤,CCK-8法评估泄浊通络方含药血清(2.5%、5.0%、10.0%)对细胞活力的影响,并检测尿酸转运蛋白表达水平变化。**结果**:泄浊通络方明显降低HUA小鼠血清尿酸、肌酐、尿素氮水平($P<0.001$),抑制肝脏ADA、XOD活性($P<0.001$),下调肾脏URAT1、GLUT9蛋白及mRNA表达($P<0.01$),同时上调ABCG2表达($P<0.05$)。体外实验显示,含药血清可减轻尿酸诱导的HK-2细胞损伤,明显抑制URAT1、GLUT9表达($P<0.05$),促进ABCG2表达($P<0.01$)。**结论**:泄浊通络方通过减少尿酸生成和促进尿酸排泄双重机制发挥降尿酸作用:抑制ADA、XOD活性减少尿酸生成,调控肾脏URAT1、GLUT9重吸收及ABCG2外排功能平衡促进尿酸排泄,为痛风治疗提供了药理学依据。

[关键词] 痛风;泄浊通络方;尿酸生成;尿酸排泄;尿酸转运体
[中图分类号] R392 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)20-1532-09

Pharmacological efficacy and mechanism of Xiezhuo Tongluo Formula in the prevention and treatment of gout *via* uric acid regulation

CHEN Shuoyu, DING Peng, ZHANG Qiaoyu, ZHANG Jiaqi, DING Jing, ZHOU Lingling✉
(*School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing* 210000, *China*)

[*Foundation Project*]:*This study was supported by the National Natural Science Foundation of China* (82174306)
[*Author*]:*CHEN Shuoyu, E-mail*: 15295238416@163.*com.*
[*Correspondence to*]:*ZHOU Lingling, Ph.D., Professor, Doctoral Supervisor, E-mail*: *zhoulingling@njucm.edu.cn.*
Received: 2025-06-03 *Revised*: 2025-09-19 *JHMU*, 2026;32(20):1532-1540

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To explore the mechanism of Xiezhuo Tongluo Formula (XZTLF) in regulating uric acid for gout prevention and treatment. **Methods**: A hyperuricemia (HUA) mouse model was established using potassium oxonate combined with hypoxanthine. The mice were divided into the model, allopurinol (10 mg/kg), XZTLF low- (14.93 g/kg), medium- (29.86 g/kg), and high-dose (59.72 g/kg) groups. Additionally, a normal control group was established. Serum levels of uric acid, creatinine, and urea nitrogen were measured. Hepatic adenosine deaminase (ADA) and xanthine oxidase (XOD) activities were assessed. Protein expression levels of the renal urate transporters (URAT1, GLUT9, and ABCG2) were analyzed *via* Western blot and RT-qPCR. Human renal tubular epithelial HK-2 cells were cultured *in vitro*. Cell injury was induced using 3.2 μmol/L uric acid. The CCK-8 assay was employed to assess the effects of XZTLF-containing serum (2.5%, 5.0%, and 10.0%) on cell viability. Additionally, changes in the expression of the urate transporters were detected. **Results**: XZTLF significantly reduced serum uric acid, creatinine, and urea nitrogen levels in HUA mice ($P<0.001$), suppressed hepatic ADA and XOD activities ($P<0.001$), downregulated renal URAT1 and GLUT9 protein and mRNA expressions ($P<0.01$), and upregulated ABCG2 expressions ($P<0.05$).

[基金项目] 国家自然科学基金(82174306)
[作者简介] 陈烁宇,E-mail:15295238416@163.com。
[通讯作者] 周玲玲,博士,教授,博士生导师,E-mail:zhoulingling@njucm.edu.cn。
[收稿日期] 2025-06-03 [修回日期] 2025-09-19 网络出版时间:2025-10-09 11:47:56

In vitro experiment results revealed that XZTLF-containing serum alleviated uric acid-induced HK-2 cell injury, significantly inhibited URAT1 and GLUT9 expression ($P<0.05$), and enhanced ABCG2 expression ($P<0.01$). **Conclusion**: XZTLF exerts its uric acid-lowering effect through the dual mechanism of reducing uric acid production and promoting uric acid excretion: inhibiting ADA and XOD activities to reduce UA production, as well as regulating the balance of renal URAT1/GLUT9 reabsorption and ABCG2 efflux function to promote UA excretion, which provides a pharmacological basis for the treatment of gout.

[**Key words**] Gout; Xiezhuo Tongluo Formula; Uric acid production; Uric acid excretion; Urate transporters

痛风是一种由尿酸代谢紊乱引发的代谢性疾病，其病理特征为尿酸盐（monosodium urate，MSU）晶体在关节沉积并激活固有免疫系统，导致急性炎症反应[1,2]。尿酸稳态涉及两大核心机制：一方面，肝脏中腺苷脱氨酶（adenosine deaminase，ADA）与黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase，XOD）通过调控嘌呤代谢途径主导尿酸合成；另一方面，肾脏尿酸转运蛋白URAT1、GLUT9（与重吸收相关）和ABCG2（与尿酸排泄功能相关的）调控尿酸排泄[3-5]。尽管现有药物如非布司他、苯溴马隆可通过抑制XOD或调节转运蛋白从而降低血尿酸水平，但其肝肾毒性及多种不良反应明显限制其长期应用[6,7]。

在中医理论中，痛风属“浊瘀痹”范畴，“脾肾亏虚，湿热痰瘀”是其核心病机。泄浊通络方（Xiezhuo Tongluo Formula，XZTLF）是中医治疗痛风的经典复方，其组方基于“泄浊化瘀、通络止痛”的治则，针对痛风“湿热浊瘀痹阻经络”的核心病机。方中土茯苓、萆薢、车前草等药味以甘淡渗湿、苦降泄浊为主，归经肝、肾、脾，通过多靶点协同调节尿酸代谢：一方面抑制XOD活性及嘌呤代谢异常，减少尿酸生成；另一方面调控肾脏URAT1、OAT1及肠道ABCG2等转运蛋白表达，促进尿酸排泄。此外，豨莶草、海桐皮等配伍成分可缓解MSU结晶诱发的关节炎症。全方兼具“泄浊”以降低血尿酸水平、“通络”以改善局部病理微环境的效应，体现了中药复方“多成分-多靶点-多通路”整合调控的特点，为痛风的中西医结合治疗提供了理论依据。课题组前期已进行了泄浊通络方治疗痛风的临床实验，在江苏省中医院临床观察泄浊通络方治疗痛风患者的治疗组数十例，研究结果表明：该方治疗痛风的临床有效率为47.06%，临床治愈率17.65%，总有效率94.12%；药物安全性观察也提示，患者服药后未见明显副作用。该方的临床研究证实其治疗痛风安全有效，已申报并获得国家发明专利（专利号：ZL202111554185.7）。

本研究通过体内、外模型系统解析泄浊通络方对尿酸生成酶（ADA、XOD）及肾脏转运蛋白（URAT1、GLUT9、ABCG2）的调控作用，旨在阐释其“抑制合成-促进排泄”的双重药效机制，为痛风的优化治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选用80只6～8周龄的SPF级ICR雄性小鼠及20只6～8周龄SPF级的雄性SD大鼠作为实验对象。小鼠购自南京青龙山，生产许可证号：SCXK（苏）2023-0008；大鼠购自杭州医学院，生产许可证号：SCXK（浙）2024-0002。在南京中医药大学实验动物中心屏障环境内饲养，实验全过程严格遵守南京中医药大学实验动物伦理委员会审批的实验方案，并遵循实验动物“3R”原则（替代、减少、优化）进行操作，伦理批号：202402A010。

1.2 实验细胞

人肾小管上皮细胞HK-2细胞，购自中国科学院细胞库。

1.3 药物与试剂

泄浊通络方浸膏：土茯苓、萆薢、豨莶草、海桐皮、菝葜、车前草、鬼箭羽、陈胆星、皂角刺、川牛膝按40∶25∶30∶15∶25∶15∶15∶12∶10∶20比例组成。由江苏省中医院牛首院区中药制剂研发中心制备成浸膏，符合2020年版《中华人民共和国药典》规范。浓度为每毫升1 g生药，使用时稀释或浓缩致所需浓度。次黄嘌呤（hypoxanthine，HX）（上海源叶，批号：S18025）；氧嗪酸钾（potassium oxonate，PO）（上海麦克林，批号：P831461）；羧甲基纤维素钠（Sigma，批号：9004-32-4）；别嘌醇（合肥久联制药，批号：国药准字H34021248）；尿酸测试盒、肌酐测试盒、尿素氮测试盒（南京建成，批号：C012-2-1、C011-2-1、C013-2-1）；XOD测试盒、ADA测试盒（南京建成，批号：A002-1-1、A048-2-1）；尿酸（Sigma，批号：U2625）；苯溴马隆（上海源叶，批号：S24722）；Cell Counting Kit-8（CCK-8）（APExbio公司，批号：K1018）；DMEM/F12培养基（Gibco，批号：8122506）；胎牛血清（上海翌圣，批号：40130）；青霉素-链霉素、胰蛋白酶、无血清细胞冻存液、BCA蛋白定量试剂盒（新赛美，批号：C100C5、C100C1、C40050、WB6501B）；RIPA裂解液、蛋白酶/磷酸酶抑制剂（碧云天，批号：P0013B、P1045）；超敏ECL发光液（亚科因，批号：BMU102）；Trizol裂解液（美国赛默飞，批号：15596026）；HiFiScript

All-in-one RT Master Mix for qPCR、SuperStar Universal SYBR Master Mix(康为世纪,批号:CW3371、CW3360);URAT1抗体、β-actin抗体(Affinity,批号:DF12340、AF7018);GLUT9抗体、ABCG2抗体(Abclonal,批号:A14606、A5661);HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)(北京中杉金桥,批号:ZB-2301)。

1.4 主要仪器

低温匀浆机(武汉赛维尔生物科技有限公司);垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司);凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);Nano-Drop浓度测定仪(美国DeNovix公司);LightCycler® 96型荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司);超净工作台(浙江苏净净化设备有限公司);CO_2恒温细胞培养箱(日本SANYO电气有限公司);5920R台式低温离心机(德国Eppendorf公司);倒置显微镜(日本OLYMPUS公司);低温高速离心机(德国Eppendorf公司);37 ℃恒温烘箱(上海跃进医疗器械厂);M200Pro酶标仪(瑞士TECAN公司);HFU486超低温冰箱(美国赛默飞世尔科技公司);044BR8277型蛋白电泳及转印装置(美国Bio-Rad公司)。

1.5 实验动物分组、模型构建、给药与样本制备

选取60只SPF级雄性ICR小鼠(18~22 g),随机分为6组(n=10):正常对照(Control)组、模型(Model)组、阳性药别嘌醇(Allopurinol,10 mg/kg)组及泄浊通络方低剂量(XZTLF 14.93 g/kg)组、中剂量(XZTLF 29.86 g/kg)组、高剂量(XZTLF 59.72 g/kg)组。参照文献[8]方法建立高尿酸血症(hyperuricemia,HUA)模型,除Control组外,其余各组于药物干预前1 h进行造模:腹腔注射PO(600 mg/kg)联合灌胃HX(500 mg/kg)。PO与HX均新鲜悬浮于0.5% CMC-Na溶液中(终浓度分别为60 mg/mL与50 mg/mL),Control组同步给予等体积CMC-Na溶剂。造模1 h后,各给药组灌胃相应药物(体积10 mL/kg),每日1次,连续干预7 d。末次给药60 min后经眼球取血,室温静置1~2 h,3 000 r/min离心15 min分离血清。颈椎脱臼处死动物后,迅速摘取肝、肾组织置于液氮速冻,-80 ℃保存备用。其中血清样本用于检测尿酸水平、肾功能水平(肌酐、尿素氮);肝组织用于检测尿酸生成酶(ADA、XOD);肾组织用于检测尿酸排泄相关的转运蛋白(URAT1、GLUT9、ABCG2)。

1.6 泄浊通络方含药血清的制备

SPF级SD大鼠20只,雄性,分为Control组和XZTLF组,每组10只。适应性喂养3 d后,开始灌胃给药泄浊通络方(14.93 g/kg),Control组接受等量无菌生理盐水经口灌服,持续给药周期为7 d。末次干预后60 min,通过经腹主动脉实施采血操作。采集的全血样本于常温条件下静置1~2 h后,离心分离收集上层血清。该血清样本经56 ℃水浴条件下进行30 min热灭活处理,再经无菌滤膜过滤处理,最终分装冻存于-20 ℃环境备用。

1.7 血清尿酸、肌酐、尿素氮水平检测

离心分离血清样本后,依据试剂盒制造商提供的标准操作流程建立比色法检测体系。待生化反应终止后,采用多功能酶标仪于特定波长下测定光密度值,绘制标准曲线,通过回归方程计算目标物质的定量浓度。

1.8 肝组织XOD活性测定

采用精密称量法测定肝脏组织样本质量后,依据质量体积比1∶9的比例加入冰预冷的生理盐水。在低温控制条件下进行机械破碎处理,制备10%组织匀浆体系。随后以2 500~3 000 r/min的离心参数进行10 min低温离心,得上清液。按说明书操作,测吸光度值。根据吸光度计算XOD活力。

1.9 肝组织ADA活性测定

按“1.8项”方法制备10%的匀浆液,按操作说明加入各试剂,混匀,孵育,再加入试剂,混匀,孵育,波长546 nm,读吸光度A1;120 s后读取吸光度A2。计算△A/min=(A2-A1)/2。根据2次吸光度计算ADA活力。

1.10 细胞培养与处理

HK-2细胞系为贴壁细胞,采用DMEM/F12培养基培养基(其中含10%血清和1%双抗)在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。使用时,添加胰酶消化使细胞脱落,随后按实验设计接种至特定规格细胞培养板。实验细胞分为对照(Control)组、模型(Model)组、苯溴马隆(Benzbromarone)组、泄浊通络方含药血清(XZTLF-containing serum)低剂量(2.5%)组、中剂量(5.0%)组、高剂量(10.0%)组。使用3 200 nmol/L尿酸刺激24 h HK-2细胞系构建高尿酸环境模型。不同药物或含药血清干预后,各组细胞分别提取蛋白或RNA用于细胞尿酸转运体蛋白(URAT1、GLUT9、ABCG2)的指标检测。

1.11 CCK-8检测泄浊通络方含药血清对尿酸刺激后HK-2细胞活力的影响

将HK2细胞均匀铺板于96孔培养板,待24 h贴壁稳定后,使用3 200 nmol/L尿酸刺激24 h,接着分别加入苯溴马隆和不同浓度的泄浊通络方含药血清(2.5%、5.0%、10.0%)干预24 h和(或)48 h后,每孔加入总体积10%的CCK-8溶液,孵育1~4 h。

酶标仪于450 nm波长处测定OD值，基于光信号强度进行细胞增殖活性定量分析。

1.12 Western blot检测URAT1、GLUT9和ABCG2蛋白表达

组织样本（20 mg）采用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液低温研磨（45 s/次，循环5次，间隔15 s）和超声破碎（15 s），冰浴裂解30 min后离心（12 000×*g*，15 min）取上清；细胞样本（6孔板经尿酸/含药血清处理）经PBS清洗后，加入裂解液刮取收集，超声裂解并离心获取蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度（562 nm吸光度），样本与5×上样缓冲液（1∶4）混合煮沸变性10 min，经12% SDS-PAGE凝胶电泳（150 V，60 min）分离后转至甲醇活化的PVDF膜（半干转膜，400 mA，40 min）。快速封闭液封闭15 min，分别应用URAT1、GLUT9、ABCG2和β-actin作为一抗4℃孵育过夜，加入对应二抗室温孵育1.5 h，ECL化学发光显影，ImageJ分析条带灰度值。

1.13 RT-qPCR分析*URAT1*、*GLUT9*和*ABCG2* mRNA表达

组织样本（20 mg）与Trizol低温研磨（5×45 s循环）、氯仿萃取及异丙醇沉淀提取RNA；细胞样本经Trizol裂解后同步处理，RNA经NanoDrop定量后合成cDNA。LightCycler® 96 SW 1.1运行样本，得出数据分析。

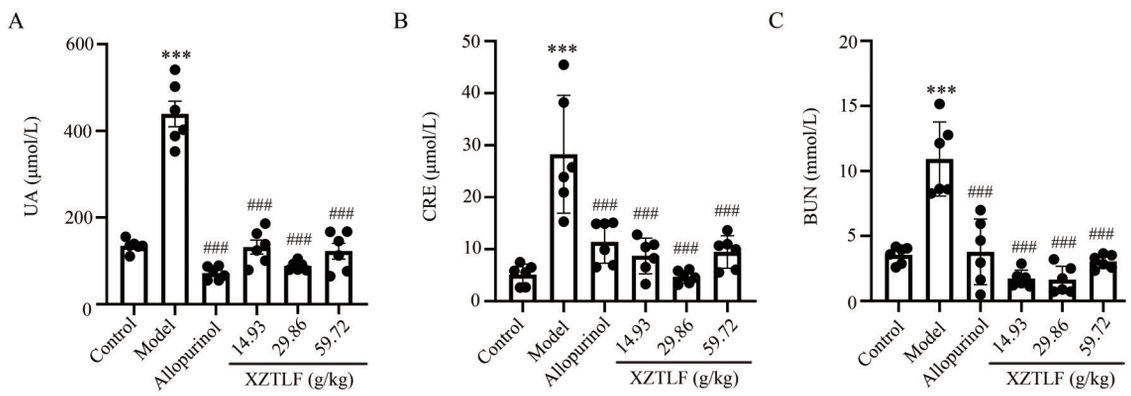
1.14 统计学处理

本研究采用GraphPad Prism 9.0.0统计软件对实验数据进行处理，计量数据采用$\bar{x} \pm s$表示。在进行多组数据对比时，选择单因素方差分析；对于2组间的差异性评估，则应用LSD法*t*检验进行验证。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 泄浊通络方对HUA小鼠血清中尿酸、肌酐、尿素氮的影响

采用尿酸检测试剂盒检测各组小鼠血清中的尿酸。与Model组比较，泄浊通络方低、中、高剂量明显降低了小鼠血清中的尿酸水平（$P<0.001$），见图1A。由于HUA通常还伴随着肾脏损伤，因此检测了血清中肌酐和尿素氮的水平。泄浊通络方也明显降低了小鼠血清中的肌酐和尿素氮水平（$P<0.001$），见图1B、C。上述结果提示：泄浊通络方具有较好的降尿酸作用，同时还能改善肾功能。



A：尿酸（UA）；B：肌酐（CRE）；C：尿素氮（BUN）；与Control组比较，$^{***}P<0.001$，与Model组比较，$^{\#\#\#}P<0.001$

图1 泄浊通络方对小鼠血清中尿酸、肌酐、尿素氮的影响

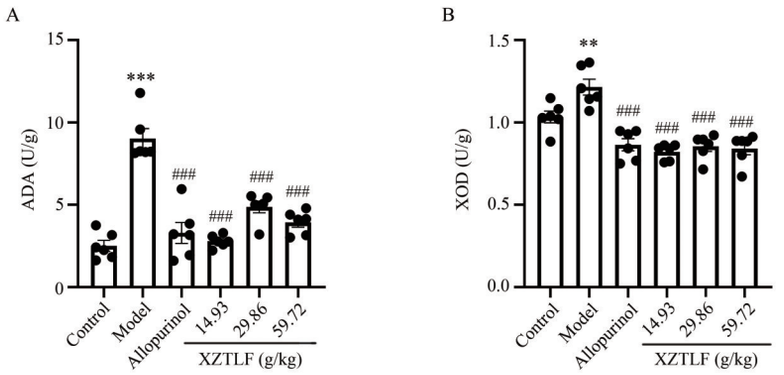
Fig 1 Effects of Xiezhuo Tongluo Formula on uric acid, creatinine, and urea nitrogen in mouse serum

2.2 泄浊通络方对HUA小鼠肝脏中ADA和XOD的影响

为了观察小鼠肝脏中ADA和XOD的活性，采用ADA和XOD检测盒对肝组织匀浆液进行检测。与Control组比较，Model组小鼠肝脏中的ADA和XOD活性明显升高（$P<0.01$），而Allopurinol组和泄浊通络方低、中、高剂量组干预后二者活性明显降低（$P<0.001$），见图2A、B。上述结果提示：泄浊通络方能够有效降低HUA小鼠肝脏中ADA和XOD的活性，从而减少尿酸的生成。

2.3 泄浊通络方对HUA小鼠肾脏尿酸转运体蛋白的影响

URAT1、GLUT9和ABCG2是肾脏中调节尿酸排泄的关键蛋白，采用Western blot检测三者的蛋白表达水平。与Control组比较，Model组动物肾组织中URAT1、GLUT9的蛋白表达水平明显升高（$P<0.05$），ABCG2的蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$）；与Model组比较，Allopurinol组和泄浊通络方低、中、高剂量组HUA小鼠肾组织中URAT1和GLUT9的蛋白表达水平明显降低（$P<0.01$），

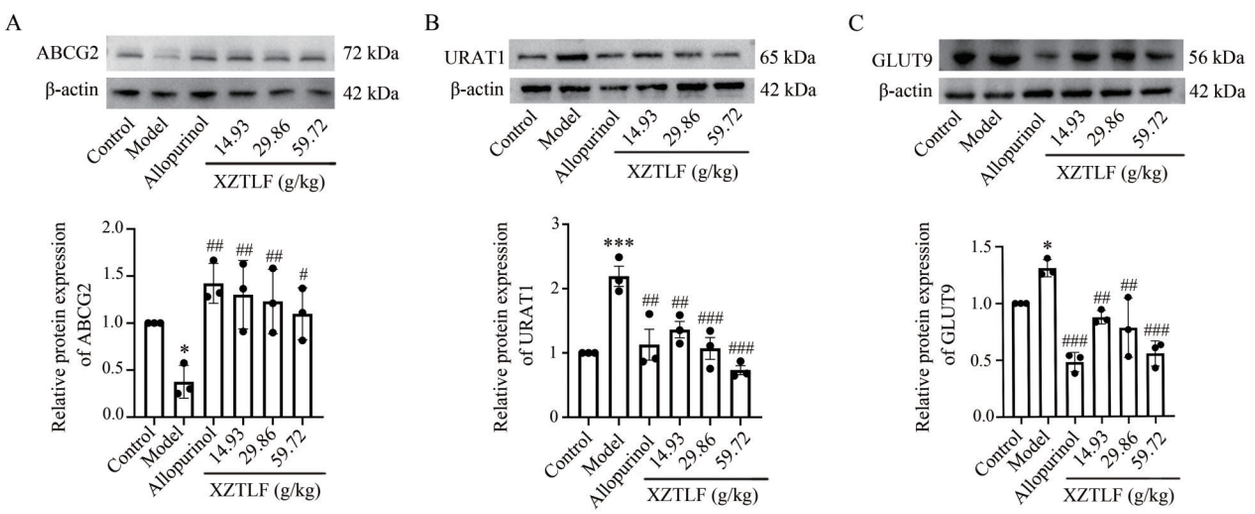


A：ADA；B：XOD；与Control组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，与Model组比较，$^{###}P<0.001$

图2 泄浊通络方对高尿酸血症小鼠肝脏中腺苷脱氨酶与黄嘌呤氧化酶的影响

Fig 2 Effects of Xiezhuo Tongluo Formula on adenosine deaminase and xanthine oxidase in the liver of hyperuricemia mice

ABCG2的蛋白表达水平明显升高（$P<0.05$）。上述结果提示：泄浊通络方能够有效抑制URAT1、GLUT9蛋白的表达，同时上调ABCG2蛋白的表达，从而增加尿酸的排泄，见图3A～C。



A：ABCG2蛋白；B：URAT1蛋白；C：GLUT9蛋白；与Control组比较，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$，与Model组比较，$^{#}P<0.05$，$^{##}P<0.01$，$^{###}P<0.001$

图3 泄浊通络方对高尿酸血症小鼠肾脏中尿酸转运蛋白ABCG2、URAT1、GLUT9表达的影响

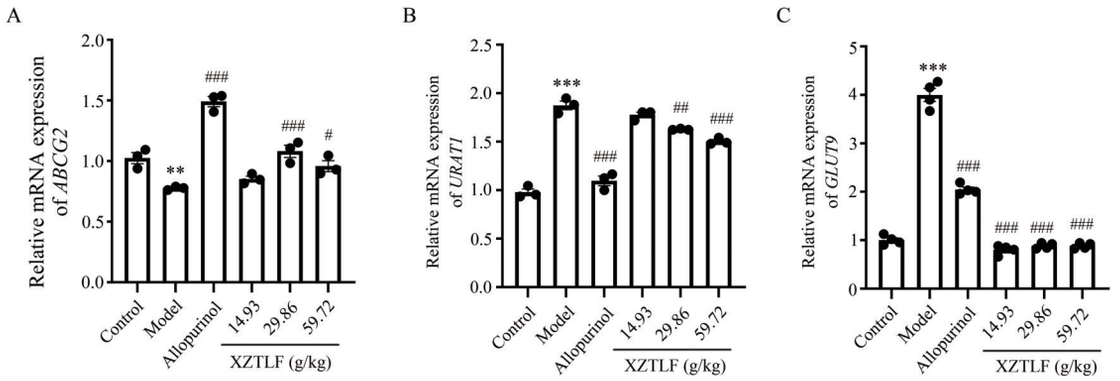
Fig 3 Effects of Xiezhuo Tongluo Formula on the expression of urate transporters ABCG2, URAT1, and GLUT9 in the kidneys of hyperuricemia mice

2.4 泄浊通络方对HUA小鼠肾脏尿酸转运体mRNA的影响

采用RT-qPCR检测泄浊通络方对肾脏尿酸转运体基因的影响。与Control组比较，Model组小鼠*URAT1*、*GLUT9*的mRNA表达水平明显升高（$P<0.001$），而*ABCG2*的mRNA表达水平明显降低（$P<0.01$）。与Model组比较，Allopurinol组和泄浊通络方中、高剂量组的*URAT1*和*GLUT9*的mRNA表达水平明显降低（$P<0.01$），同时*ABCG2*的mRNA表达水平明显升高（$P<0.05$），见图4A～C。以上结果表明，泄浊通络方能够在基因水平抑制*URAT1*、*GLUT9*的表达，促进*ABCG2*的表达。

2.5 泄浊通络方对HK-2细胞活力的影响

采用CCK-8法检测尿酸对HK-2细胞活力的影响。尿酸在400 nmol/L浓度及以下时对细胞活力无明显影响（$P>0.05$），而800、1 600、3 200 nmol/L时产生了剂量依赖性的细胞活力抑制（$P<0.01$）。本部分采用尿酸刺激对HK-2细胞产生一定程度的肾损伤，因此选择3 200 nmol/L作为刺激浓度。尿酸刺激24 h结果与48 h类似，因此刺激时间选择24 h，见图5A、B。尿酸联合药物共同给予细胞后，与Control组比较，尿酸明显降低了Model组细胞活力（$P<0.001$）；与Model组比较，Benzbromarone组和2.5%、5%、10% XZTLF-containing serum组明显

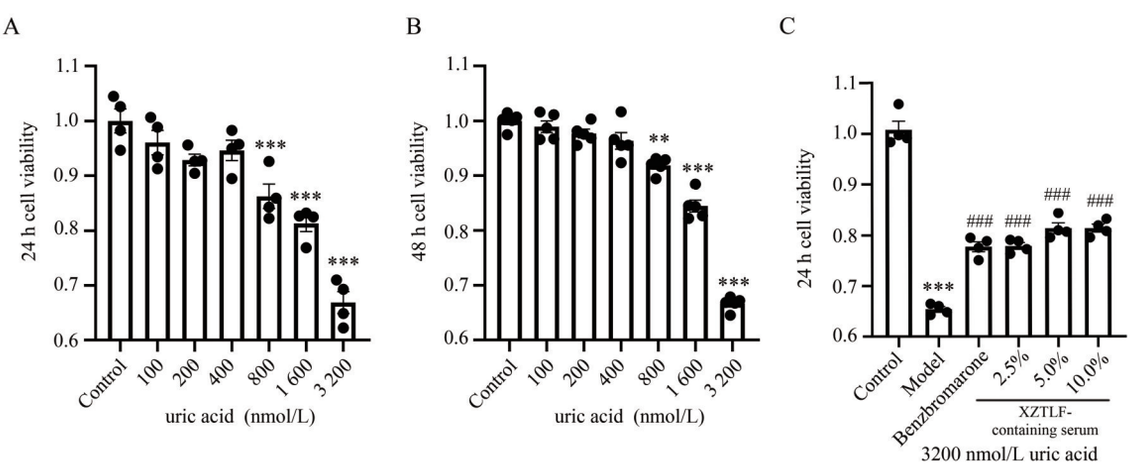


A:*ABCG2* mRNA;B:*URAT1* mRNA ;C:*GLUT9* mRNA;与Control组比较,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$,与Model组比较,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.001$

图4　泄浊通络方对高尿酸血症小鼠肾脏中尿酸转运体*ABCG2*、*URAT1*、*GLUT9* mRNA表达的影响

Fig 4　Effects of Xiezhuo Tongluo Formula on the mRNA expression of urate transporters *ABCG2*, *URAT1*, and *GLUT9* in the kidneys of hyperuricemia mice

提升了细胞活力($P<0.001$),见图5C。上述结果为体外细胞实验筛选出了合适的给药浓度,同时证明了泄浊通络方能够一定程度上缓解尿酸刺激导致的细胞活力下降。



A:24 h细胞活力;B:48 h细胞活力;C:给药后细胞活力;与Control组比较,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$,与Model组比较,$^{\#\#\#}P<0.001$

图5　尿酸在24、48 h及尿酸联合含药血清和尿酸联合苯溴马隆共同给药对HK-2细胞活力的影响

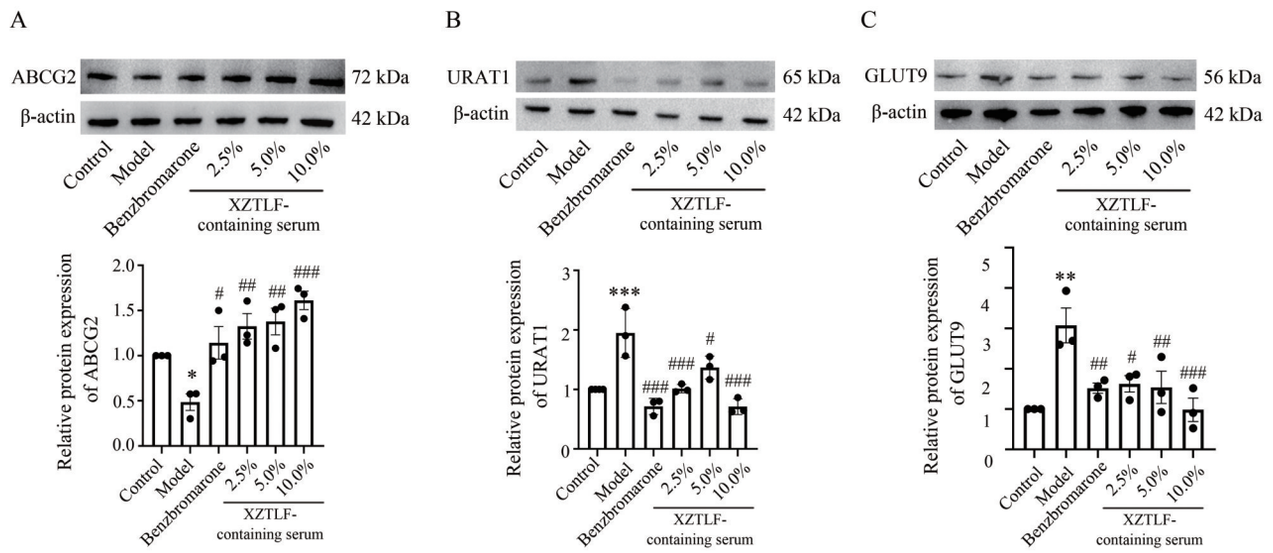
Fig 5　Effects of uric acid on the viability of HK-2 cells at 24 and 48 hours and after co-administration of uric acid with drug-containing serum and uric acid with benzbromarone

2.6　泄浊通络方对HK-2细胞尿酸转运体蛋白的影响

为了在体外验证泄浊通络方对尿酸转运体蛋白的影响,采用含药血清干预细胞,Western blot检测细胞中URAT1、GLUT9和ABCG2的蛋白表达。与Control组相比,尿酸刺激明显上调了Model组URAT1、GLUT9蛋白的表达($P<0.01$),下调了ABCG2蛋白的表达($P<0.05$);与Model组相比,Benzbromarone组和XZTLF-containing serum组URAT1和GLUT9蛋白表达明显降低($P<0.05$),ABCG2蛋白表达明显升高($P<0.05$),见图6A～C。上述结果提示泄浊通络方能够抑制HK-2细胞中的URAT1和GLUT9,增强ABCG2的蛋白表达,从而增加尿酸的排泄。

2.7　泄浊通络方对HK-2细胞尿酸转运体mRNA的影响

为了在体外进一步验证泄浊通络方对尿酸转运体基因的影响,本研究采用RT-qPCR法检测细胞中*URAT1*,*GLUT9*和*ABCG2*的mRNA表达。与Control组比较,尿酸刺激明显上调了Model组*URAT1*、*GLUT9*的mRNA表达($P<0.05$),下调了*ABCG2*的mRNA表达($P<0.001$);与Model组相

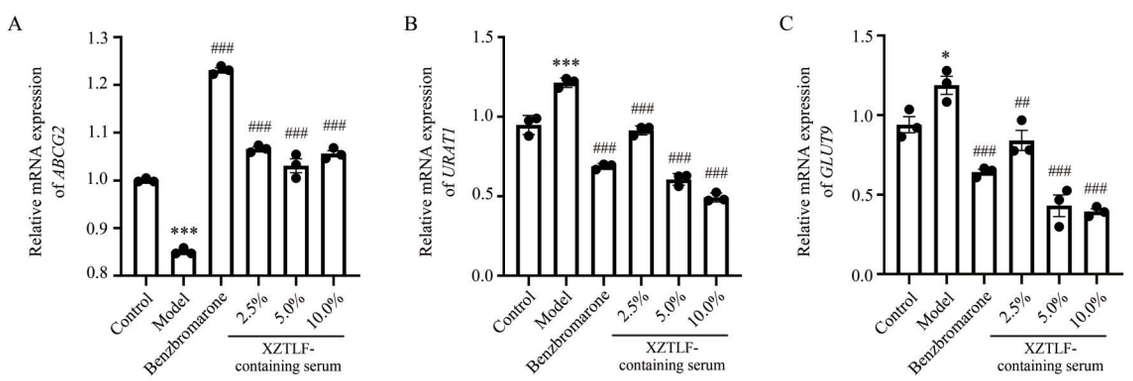


A：ABCG2蛋白；B：URAT1蛋白；C：GLUT9蛋白；与Control组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，与Model组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$

图6 泄浊通络方对HK-2细胞中尿酸转运蛋白ABCG2、URAT1、GLUT9表达的影响

Fig 6 Effects of Xiezhuo Tongluo Formula on the expression of uric acid transporters ABCG2, URAT1, and GLUT9 in HK-2 cells

比，Benzbromarone组和XZTLF-containing serum组*URAT1*和*GLUT9* mRNA表达明显降低（$P<0.01$），*ABCG2* mRNA表达明显升高（$P<0.001$），见图7A～C。上述结果证实了泄浊通络方能够抑制HK-2细胞中的*URAT1*和*GLUT9*，增强*ABCG2*的mRNA表达。



A：*ABCG2* mRNA；B：*URAT1* mRNA；C：*GLUT9* mRNA；与Control组比较，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$，与Model组比较，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$

图7 泄浊通络方对HK-2细胞中尿酸转运体*ABCG2*、*URAT1*、*GLUT9* mRNA表达的影响

Fig 7 Effects of Xiezhuo Tongluo Formula on the mRNA expression of urate transporters *ABCG2*, *URAT1*, and *GLUT9* in HK-2 cells

3 讨论

较高水平的尿酸作为痛风发生、发展的关键病理生理基础，其有效控制已成为痛风临床治疗的核心策略之一。痛风的本质是MSU晶体触发的天然免疫炎症反应，涉及中性粒细胞、巨噬细胞等炎性细胞的剧烈浸润和大量炎症因子的释放[9]。研究表明，ICR小鼠相较于某些近交系小鼠（如C57BL/6），其免疫系统对炎症刺激反应更为强烈和迅速。与人类疾病表型相似度高。而最常用的近交系C57BL/6小鼠在某些炎症模型中表现不佳，因此ICR小鼠相较于其他品类小鼠更适合作为痛风模型首选[10]。

痛风的直接病因就是HUA，即血液中的尿酸浓度＞420 μmol/L，降尿酸治疗是痛风治疗的核心。此外，长期的HUA不仅会形成痛风石，MSU结晶也可能沉积在肾脏中，导致尿酸性肾结石和痛

风性肾病。肾脏是排泄尿酸的主要器官,当肾功能下降时,尿酸排泄受阻,会进一步导致血尿酸水平升高,肌酐和尿素氮是评估痛风严重程度的重要指标[11]。本研究采用了化学造模法中的联合造模,采用腹腔注射PO联合灌胃HX,连续1周。结果显示,Model组血清中的尿酸水平较Control组明显升高,这证明成功构建了HUA模型。给药干预后,各给药组尿酸水平都明显下降,说明泄浊通络方具有良好的降尿酸作用,同时检测肌酐和尿素氮水平,结果证明泄浊通络方还可以改善肾脏功能。通过构建HUA小鼠模型,证实了泄浊通络方具有良好的降尿酸和保护肾脏功能。

当前临床调控血尿酸浓度的策略主要围绕2个核心机制展开:(1)靶向抑制尿酸生物合成途径以降低其生成量;(2)通过调控肾脏对尿酸的转运功能以促进其排泄[12]。XOD是尿酸生成路径上的最关键的限速酶,负责将HX转化为黄嘌呤,再将黄嘌呤转化为尿酸。XOD活性越高,尿酸生成速度就越快。在临床应用上,抑制XOD的活性是减少尿酸生成的最直接、最有效手段。目前临床一线降尿酸药物如别嘌醇和非布司他,是经典的XOD抑制剂[13]。ADA是嘌呤代谢补救合成途径中的一个重要酶,催化腺苷脱氨生成肌苷,而肌苷会进一步代谢为HX、黄嘌呤,并最终由XOD转化为尿酸。ADA活性异常升高通常与细胞大量破坏或增殖旺盛的疾病状态相关,其活性可作为继发性HUA的重要指标。在临床上,ADA与XOD共同构成对尿酸生成来源的全面评估[14]。因此,为了探究泄浊通络方对尿酸生成过程的影响,本研究检测了痛风模型小鼠肝脏组织中的ADA和XOD活性,结果显示泄浊通络方能够明显抑制ADA和XOD的活性,从而减少尿酸的生成。

与重吸收相关转运蛋白URAT1是最主要的尿酸重吸收转运体,位于肾脏近曲小管顶膜(管腔面),负责将尿液中90%的尿酸重新吸收回血液中[15],其功能过强是导致HUA的最常见原因之一。抑制URAT1的功能,可以强力阻断尿酸的重吸收,明显促进尿酸从尿液排出。此外,转运蛋白GLUT9负责将细胞内的尿酸转运至血液中,GLUT9对尿酸具有很高的亲和力和运输能力,其转运效率非常高,是基底膜侧最主要的尿酸转运体[16],也是尿酸重吸收的最后一道关卡。GLUT9功能被抑制后,尿酸就会堵塞在细胞内,无法完成重吸收的全过程[17,18]。同时针对这2个靶点,可以实现对肾脏尿酸重吸收通路更彻底、更有效的抑制。排泄功能相关转运蛋白ABCG2是一种位于肠道和肾脏近曲小管顶膜的多药耐药转运蛋白,负责将尿酸直接从血液分泌到肠腔和尿液中[19]。*ABCG2*基因功能丧失型突变是亚洲人群HUA和痛风的常见且重要的危险因素之一。突变导致ABCG2蛋白表达量减少或功能缺陷,使得肠道和肾脏的尿酸排泄能力大幅下降,从而诱发痛风。因此,维持*ABCG2*基因功能对于防治痛风至关重要[20,21]。本部分研究采用Western blot和RT-qPCR对HUA小鼠肾组织进行检测,结果发现,应用泄浊通络方后能够有效地抑制肾组织中URAT1和GLUT9的蛋白以及mRNA的表达,同时增强ABCG2的蛋白以及mRNA的表达。这些结果证实了泄浊通络方能够通过抑制尿酸的重吸收和促进尿酸的排泄来发挥降尿酸的作用。

HK-2细胞是体外研究药物调控转运体最常用的细胞之一[22],而中药复方的体外给药目前常采用含药血清。本部分研究采用尿酸刺激HK-2细胞,含药血清干预治疗,观察了细胞活力以及尿酸转运体URAT1、GLUT9和ABCG2的蛋白及mRNA表达。结果显示,泄浊通络方含药血清能够明显逆转尿酸所致的细胞活力下降,同时抑制URAT1和GLUT9,上调ABCG2的蛋白及mRNA表达。以上结果证实,泄浊通络方能够在体外抑制尿酸转运体URAT1、GLUT9的表达,同时上调ABCG2的表达来发挥降尿酸效应。

通过观察ICR小鼠和HK-2细胞的尿酸转运体的表达,本研究证实了泄浊通络方能够通过增加尿酸排泄发挥降尿酸作用;同时观察小鼠肝脏尿酸代谢关键酶,证实了泄浊通络方能够通过抑制尿酸的产生发挥降尿酸作用。综上所述,泄浊通络方可以通过抑制尿酸生成和促进尿酸排泄两方面综合发挥降尿酸作用。在未来的研究中,本课题组将进一步从这两方面深入挖掘泄浊通络方抗HUA的机制,为其临床应用提供理论依据。

作者贡献度说明:

陈烁宇:进行实验、数据分析、论文撰写;丁鹏:处理数据;张巧玉:收集数据、数据分析;张嘉琪:实验验证;丁静:收集数据;周玲玲:提出研究构思、资金获取、项目管理。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Dalbeth N, Gosling AL, Gaffo A, et al. Gout[J]. Lancet, 2021, 397(10287): 1843-1855.

2 Yip K, Berman J. What is gout?[J]. JAMA, 2021, 326(24): 2541.

3 方珈文, 冯天元, 周志衡, 等. 1990—2019年中国痛风疾病负担趋势及未来十年预测研究[J]. 中国全科医学, 2024, 27(2): 245-252.
Fang JW, Feng TY, Zhou ZH, et al. Trend analysis of gout burden in China from 1990 to 2019 and prediction for the next ten years[J]. Chin Gen Pract, 2024, 27(2): 245-252.

4 Nian Y, You C. Susceptibility genes of hyperuricemia and gout[J]. Hereditas, 2022, 159(1): 30.

5 范琢玉, 葛胜宇, 沈光海, 等. 中药防治高尿酸血症作用机制的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(5): 375-377.
Fan ZY, Ge SY, Shen GH, et al. Research progress on the mechanism of traditional Chinese medicine in preventing and treating hyperuricemia[J]. J Jilin Med Univ, 2022, 43(5): 375-377.

6 Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion[J]. Int J Cardiol, 2016, 213: 8-14.

7 Jiang L, Gong X, Ji M, et al. Bioactive compounds from plant-based functional foods: A promising choice for the prevention and management of hyperuricemia[J]. Foods, 2020, 9(8): 973.

8 谭文彬, 李佳. 不同造模方法建立高尿酸血症动物模型的述评[J]. 解放军医学院学报, 2024, 45(1): 12-17.
Tan WB, Li J. Evaluation of different modeling methods to establish hyperuricemia animal models [J]. Acad J Chin PLA Med School, 2024, 45(1): 12-17.

9 Johnson RJ, Mandell BF, Schlesinger N, et al. Controversies and practical management of patients with gout and chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2024, 106(4): 573-582.

10 Lee SY, Cho SS, Han KM, et al. Korean red ginseng ameliorates the level of serum uric acid *via* downregulating URAT1 and upregulating OAT1 and OAT3[J]. Biol Pharm Bull, 2024, 47(11): 1876-1882.

11 Wang Y, Dalbeth N, Terkeltaub R, et al. Target serum urate achievement and chronic kidney disease progression in patients with gout and kidney disease[J]. JAMA Intern Med, 2025, 185(1): 74-82.

12 Terkeltaub R. Emerging urate-lowering drugs and pharmacologic treatment strategies for gout: A narrative review[J]. Drugs, 2023, 83(16): 1501-1521.

13 Guo Y, Yu Y, Li H, et al. Inulin supplementation ameliorates hyperuricemia and modulates gut microbiota in Uox-knockout mice[J]. Eur J Nutr, 2021, 60(4): 2217-2230.

14 Stewart S, Gamble G, Taylor W, et al. Development of gout in people with asymptomatic hyperuricemia: Study protocol for a 5-year prospective cohort[J]. BMJ Open, 2024, 14(11): e090415.

15 Dai Y, Lee CH. Transport mechanism and structural pharmacology of human urate transporter URAT1[J]. Cell Res, 2024, 34(11):776-787.

16 Keenan RT. The biology of urate[J]. Semin Arthritis Rheum, 2020, 50(3S): S2-S10.

17 Yanai H, Adachi H, Hakoshima M, et al. Molecular biological and clinical understanding of the pathophysiology and treatments of hyperuricemia and its association with metabolic syndrome, cardiovascular diseases and chronic kidney disease[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9221.

18 Yang J, Jiang T, Lu X, et al. METTL14 downregulates GLUT9 through m6A methylation and attenuates hyperuricemia-induced fibrosis in mouse renal tubular epithelial cells[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 143(1): 113308.

19 Eckenstaler R, Benndorf RA. The role of ABCG2 in the pathogenesis of primary hyperuricemia and gout - An update[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6678.

20 Sarkadi B, Homolya L, Hegedűs T. The ABCG2/BCRP transporter and its variants - From structure to pathology[J]. FEBS Lett, 2020, 594(23):4012-4034.

21 Kukal S, Guin D, Rawat C, et al. Multidrug efflux transporter ABCG2: Expression and regulation[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(21-22): 6887-6939.

22 Zhang Y, Tan X, Lin Z, et al. Fucoidan from *Laminaria japonica* inhibits expression of GLUT9 and URAT1 *via* PI3K/Akt, JNK and NF-κB pathways in uric acid-exposed HK-2 cells[J]. Mar Drugs, 2021, 19(5): 238.

[本文编辑] 陈思润