

痛风康宁片对高尿酸血症的预防作用及机制研究

姜 溪^{1, 2, 3, 4}, 只德广^{1, 2, 3, 4*}, 赵秀义⁵, 陈芙蓉^{1, 2, 3, 4}, 董坚强⁵, 岳 南^{1, 2, 3, 4}

1. 天津天诚新药评价有限公司, 天津 300462

2. 天津市药代动力学和药效动力学重点实验室, 天津 300462

3. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300462

4. 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300462

5. 天津市凯文生物科技有限公司, 天津 300384

摘 要: **目的** 采用多种实验模型评价痛风康宁片(TKT)对高尿酸血症的预防作用并研究其作用机制。**方法** 采用ig酵母膏联合ip氧嗪酸钾法制备大鼠高尿酸血症模型, 酵母膏($20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)连续ig 7 d, 且于ig酵母膏第5天开始给药, 设置对照组、模型组和TKT低、中、高(0.58 、 1.15 、 $2.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和苯溴马隆 $27\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 对照及模型组给予等容量 0.5% CMC-Na, 每天ig给药1次, 给药第3天(即ig酵母膏第7天), ip注射氧嗪酸钾 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 造模。检测注射氧嗪酸钾后2、4 h的血清尿酸浓度、尿量、尿液中尿酸排出量及肾脏中尿酸盐转运体1(URAT1)、有机阴离子转运体1(OAT1)、OAT3抗体表达, 评价TKT对大鼠高尿酸血症的预防作用; 采用次黄嘌呤诱导小鼠高尿酸血症模型, 设置对照组、模型组和TKT低、中、高剂量(0.83 、 1.66 、 $3.33\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组及苯溴马隆 $39\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 每天ig给药1次, 连续给药5 d, 对照及模型组给予等容量 0.5% CMC-Na, 检测血尿酸、尿酸酶及黄嘌呤氧化酶(XOD)含量, 评价TKT对小鼠高尿酸血症的预防作用; 采用大鼠水负荷模型, 设置对照组和TKT低、中、高(0.58 、 1.15 、 $2.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组及氢氯噻嗪 $27\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 每天ig给药1次, 连续给药3 d, 对照组给予等容量 0.5% CMC-Na, 通过检测给药后1、2、3、4、5 h的尿量及给药后5 h内总尿量, 评价TKT对大鼠的利尿作用。**结果** 与模型组比较, TKT(0.58 、 1.15 、 $2.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)能明显降低大鼠血清尿酸浓度($P<0.05$ 、 0.01), 明显增加尿酸排出量($P<0.05$ 、 0.01), 明显增加肾脏OAT1的表达($P<0.05$ 、 0.01), 1.15 、 $2.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 能明显减少肾脏URAT1的表达($P<0.05$ 、 0.01); TKT(1.66 、 $3.33\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)能明显降低小鼠血清尿酸浓度($P<0.05$ 、 0.01), TKT(0.83 、 1.66 、 $3.33\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)能明显增加尿酸酶含量($P<0.05$ 、 0.01); TKT(0.58 、 1.15 、 $2.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)能明显增加给药后不同时间点的尿量($P<0.05$ 、 0.01), 明显增加给药后5 h总尿量($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** TKT通过促进尿酸分泌、抑制尿酸重吸收及利尿作用, 使血清尿酸浓度明显降低、尿酸排出量明显增加, 显示对实验性高尿酸血症有明显的预防作用。**关键词:** 痛风康宁片; 高尿酸血症; 尿酸; 尿酸盐转运体1; 有机阴离子转运体1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)07-1595-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.018

Study on prophylactic effects and mechanism of Tongfeng Kangning Tables on hyperuricemia

JIANG Xi^{1, 2, 3, 4}, ZHI Deguang^{1, 2, 3, 4}, ZHAO Xiuyi⁵, CHEN Furong^{1, 2, 3, 4}, DONG Jianqiang⁵, YUE Nan^{1, 2, 3, 4}

1. Tianjin Tiancheng Drug Assessment Co., Ltd., Tianjin 300462, China

2. Tianjin Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300462, China

4. State Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin 300462, China

5. Tianjin Kaiwen Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300384, China

Abstract: **Objective** To evaluate of Tongfeng Kangning Tables (TKT) in the prophylactic effect and mechanism study of hyperuricemia in various experimental models. **Methods** A rat model of hyperuricemia was established using ig administration

收稿日期: 2024-01-03

第一作者: 姜 溪, 女, 副研究员, 主要从事药物临床前药效学研究。E-mail: jiangx@tjipr.com

*通信作者: 只德广, 男, 副研究员, 主要从事药物临床前药效学研究。E-mail: zhidg@tjipr.com

yeast extract in combination with ip potassium oxonate. Yeast extract ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) was ig administered for seven consecutive days, and drug administration initiated on the 5th d of yeast extract gavage, groups included a control group, a model group, low, medium, and high dose TKT groups ($0.58, 1.15, 2.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and a benzbromarone $27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group, the control and model groups received an equal volume of 0.5% CMC-Na daily via ig administration. On the 3rd d of drug administration (the 7th d of ig yeast extract), potassium oxonate at $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ was ip injected to induce the model. The preventive effect and mechanism of action of TKT on rat hyperuricemia were evaluated by measuring serum uric acid concentrations, urine volume, uric acid excretion in urine, at 2 h and 4 h post-injection of potassium oxonate, and the expression of URAT1, OAT1, and OAT3 antibodies in the kidneys on the 4th d of drug administration. A mice model of hyperuricemia was induced with hypoxanthine, groups consisted of control group, model group, low-, mid-, and high- dose TKT groups ($0.83, 1.66, 3.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and a benzbromarone $39 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group. These were orally administered once daily for 5 d, with control and model groups receiving an equivalent volume of 0.5% CMC-Na, the preventive effect of TKT against hyperuricemia in mice was assessed through measurements of blood uric acid levels, uricase, and XOD content. A water load model in rats was employed with groups including a control group, low, medium, and high dose TKT groups ($0.58, 1.15, 2.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and hydrochlorothiazide $27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group. Each group was administered their respective treatments orally once daily for 3 d, while the control group received an equal volume of 0.5% CMC-Na. The diuretic effect of TKT in rats was evaluated by measuring urine volume at 1, 2, 3, 4, and 5 h post-administration, as well as the total urine output within the first 5 h.

Results Compared with the model group, TKT groups were significantly reduced serum uric acid ($P < 0.05, 0.01$), increased the excretion of uric acid in urine, significantly increased the expression of organic anion transporter 1 (OAT1) and decreased urate transporter 1 (URAT1) in rats kidney ($P < 0.05, 0.01$). TKT 1.66 and $3.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ could significantly reduce serum uric acid ($P < 0.05, 0.01$), $0.83, 1.66$ and $3.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ increased the uricase level in mice ($P < 0.05, 0.01$). TKT $0.58, 1.15$, and $2.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ could obviously increase the urine volume at different time points and the total urine volume from 1 to 5 h after administration ($P < 0.05, 0.01$).

Conclusion TKT reduced the concentration of serum uric acid and increased the excretion of urinary uric acid by promoted the excretion of uric acid, inhibited its reabsorption, and diuretic actions, which demonstrated significant prophylactic efficacy in experimental hyperuricemia.

Key words: Tongfeng Kangning Tables; hyperuricemia; blood uric acid; urinary uric acid; URAT1; OAT1

随着时代的发展和现代生活的多样性,人们的饮食结构发生了较大改变,我国高尿酸血症患者数量逐年增加,已成为仅次于糖尿病的第2大代谢性疾病^[1]。越来越多的研究发现,高尿酸血症作为一种慢性疾病,累及多个靶器官,与痛风、慢性肾病、糖尿病、心脑血管疾病有明显的因果关系,减损预期寿命,应定期监测血尿酸(UA)水平并及时就医^[2-3]。高尿酸血症是体内UA水平长期处于超阈值状态引起的疾病^[4]。UA的来源有外源性(饮食)和内源性,是人类嘌呤代谢的最终产物,主要存在于肝脏、肠、肾脏和血管内皮细胞中。在嘌呤的合成与代谢过程中,因酶异常或其他因素导致的代谢紊乱,使UA的合成增加或(和)排出减少,均可引起高尿酸血症^[5]。因此,研究UA在体内的代谢机制对于了解相关疾病的发展和治理至关重要。

现有治疗高尿酸血症的药物如别嘌呤醇可减少UA生成,苯溴马隆可抑制肾近端小管的UA重吸收,普瑞凯希促进UA分解,但上述药物因存在皮疹、肝转氨酶升高、胃肠道反应等不良反应,且长期使用会产生肝肾毒性^[1],临床使用受限。因此,研制疗效好、不良反应小,并能长期使用的高尿酸血症

治疗药物具有重要的现实意义。中医药源远流长,痛风康宁片(TKT)是就《素问·痹论》相关论述,经创立者多年临床摸索,结合实践将“三妙散”“防风汤”“风灵汤”等各组方化裁成一个治疗高尿酸血症的经验方,由秦皮、炙乌梅、车前草、金钱草、生薏仁、茯苓、虎杖、穿山龙、忍冬藤、威灵仙、炒白术组成,经多年的临床应用,显示服用安全,疗效显著。

本实验采用多种动物模型,评估TKT对高尿酸血症的预防作用,并研究其作用机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性昆明种小鼠,体质量 $25 \sim 28 \text{ g}$,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号SCXK(京)2012-0001,饲养于天津天诚新药评价有限公司动物实验楼屏障环境中(伦理批准号2014082801)。

SPF级雄性Wistar大鼠,体质量 $110 \sim 130 \text{ g}$,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号SCXK(京)2012-0001,饲养于天津天诚新药评价有限公司动物实验楼屏障环境中(伦理批准

号2014091003)。

SPF级雄性SD大鼠,体质量280~300 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号SCXK(京)2012-0001,饲养于天津天诚新药评价有限公司动物实验楼屏障环境中(伦理批准号2015061202)。

1.2 药品与主要试剂

TKT浸膏粉,每克相当于4.14 g生药,棕黄色粉末,批号20140801,由秦皮、炙乌梅、忍冬藤、茯苓、虎杖、薏苡仁、炒白术等组成;将中药冲洗浸泡后,水提2次,合并提取液后进行浓缩,再加入70%乙醇溶液进行醇沉,收集上层溶液干燥后得浸膏粉,并以秦皮甲素和秦皮乙素为标志成分进行质量控制;临床拟用量为每人每日12.79 g生药(换算成大鼠临床等效用量为生药1.15 g·kg⁻¹,换算成小鼠临床等效用量为生药1.66 g·kg⁻¹),天津市凯文生物科技有限公司提供;苯溴马隆片(每片50 mg,批号1208247,德国赫曼大药厂);氢氯噻嗪(批号1203007,每片25 mg,天津力生制药股份有限公司);次黄嘌呤(批号305A042, Solarbio公司);氧嗪酸钾(批号705B021, Solarbio公司);酵母(批号20140313,天津市英博生化试剂有限公司);二甲苯(分析纯,批号20150610,天津市化学试剂供销公司);乙醇(分析纯,批号20150311,天津市化学试剂供销公司);0.9%氯化钠溶液(批号E14030801,河北天成药业股份有限公司);羧甲基纤维素钠(分析纯,批号20110520,上海科丰化学试剂有限公司)。

DAB染色液(批号20150619)、苏木素染液(批号20150121)、中性树胶(批号605B029),均购自Solarbio公司;SP-9001免疫组化试剂盒(批号15155A06,北京中杉金桥生物技术有限公司产品);尿酸盐转运体1抗体(Rabbit Anti-SLC22A11/URAT1,批号20140305)、有机阴离子转运体1抗体(Rabbit Anti-SLC22A6/OAT1,批号20070512)、有机阴离子转运体3抗体(Rabbit Anti-OAT-3/OAT3),批号20130802),均购自北京博奥森生物技术有限公司;UA测定试剂盒(批号20140818)、黄嘌呤氧化酶(XOD)测定试剂盒(批号20140821),均购自南京建成生物工程研究所;小鼠尿酸酶(Uricase)酶联免疫试剂盒(批号201408),购自武汉基因美生物工程有限公司。

1.3 主要仪器

RT-6100酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);TS-100ECLIPSE显微镜(日本Nikon公

司);病理图像采集与分析系统(北京航空航天大学图像中心);FA1104型电子天平(上海天平仪器厂);BP310S型电子天平(Sartorius公司)。

2 方法

2.1 TKT对高尿酸血症模型大鼠的预防作用及机制研究^[6-13]

选用健康雄性SD大鼠60只,按体质量区组分为6组,即对照组、模型组、苯溴马隆27 mg·kg⁻¹组、TKT(生药0.58、1.15、2.30 g·kg⁻¹)组,每组10只。除对照组ig等容量蒸馏水外,其余大鼠均ig酵母膏20 g·kg⁻¹,每天1次,连续7 d,ig容积为20 mL·kg⁻¹。给予酵母膏第5天开始ig给药,每天1次,连续3 d,ig容积均为5 mL·kg⁻¹,对照组及模型组给予等容量0.5% CMC-Na。给药第3天(即ig酵母膏第7天),除对照组ip等容积的0.9%氯化钠溶液外,其他各组均立即ip氧嗪酸钾200 mg·kg⁻¹造模,随即放入大鼠代谢笼中。分别于ip注射氧嗪酸钾后2、4 h,大鼠异氟烷麻醉,眼眶取血,同时收集尿液并记录尿量,测定血清UA浓度、尿液UA排出量,观察对高尿酸血症的预防作用。

给药第4天,除对照组ip给予等容量0.9%氯化钠溶液外,各剂量组再次ip给予氧嗪酸钾200 mg·kg⁻¹,2 h后处死,摘取右肾脏,放入11%福尔马林中固定,脱水,包埋。制作石蜡切片,脱蜡至水后进行抗原修复,3% H₂O₂孵育10 min, PBS冲洗3 min×3次,滴加封闭液室温孵育15 min,滴加一抗(URAT1、OAT1、OAT3抗体,抗体稀释比例分别为1:1 000、1:2 000、1:1 000)后4℃过夜, PBS冲洗3 min×3次,滴加二抗孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次,使用DAB显色剂染色,流水冲洗后进行复染、脱水、透明、封片,显微镜下任选3个视野,计算抗体表达面积。

2.2 TKT对高尿酸血症模型小鼠的预防作用^[14]

选用健康雄性KM小鼠60只,随机分为6组,即对照组、模型组、苯溴马隆39 mg·kg⁻¹组、TKT(0.83、1.66、3.33 g·kg⁻¹)组,每组10只。ig给药,每天1次,连续5 d,ig容积均为20 mL·kg⁻¹,对照组及模型组给予等容量0.5% CMC-Na。末次给药后30 min,除对照组ip等容量0.9%氯化钠溶液外,其余各组均ip次黄嘌呤1 g·kg⁻¹(20 mL·kg⁻¹),30 min后取血,测定血清中UA、尿酸酶及XOD浓度,观察对小鼠高尿酸血症的预防作用。

2.3 TKT对水负荷模型大鼠的利尿作用^[15]

选用健康雄性 Wistar 种大鼠 110 只,实验前禁食不禁水 18 h,应用 Aston 利尿筛选法,按体质量 ig 给予蒸馏水 0.022 mL·g⁻¹,立即放于代谢笼中收集 ig 后 2 h 的尿液,筛选出尿量超过 40% 水负荷的大鼠进行后续实验。

筛选出的 50 只合格动物按 2 h 的排尿量区组随机分为 5 组,即对照组、氢氯噻嗪 27 mg·kg⁻¹ 组、TKT (0.58、1.15、2.30 g·kg⁻¹) 组,每组 10 只。ig 给药,每天 1 次,连续 3 d,给药容积均为 10 mL·kg⁻¹,对照组给予等容量 0.5% CMC-Na,第 3 次给药前禁食不禁水 18 h,给药组 ig 给予 1% 氯化钠溶液配制的药液 0.05 mL·g⁻¹,对照组 ig 给予等容量 0.9% 氯化钠溶液,给药后轻压下腹使膀胱排空,在大鼠代谢笼中收集给药后 1、2、3、4、5 h 的尿液,记录各时间点尿量,计算给药后 5 h 总尿量,观察 TKT 的利尿作用。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件分析数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 TKT对高尿酸血症模型大鼠的预防作用

3.1.1 TKT对大鼠血 UA 浓度的影响 表 1 结果显示,与对照组比较,模型组血 UA 浓度明显升高,表明已造成大鼠高尿酸血症,造模成功($P < 0.01$)。与

表1 TKT对高尿酸血症大鼠血清 UA 浓度的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of TKT on serum UA in rats with hyperuricemic ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血清 UA/(mg·L ⁻¹)	
		造模后 2 h	造模后 4 h
对照	—	19.95±2.73	17.59±2.88
模型	—	37.84±2.76 ^{##}	27.64±3.23 ^{##}
TKT	0.580	34.34±3.96*	25.89±5.24
	1.150	33.35±2.71**	25.36±4.32
	2.300	31.68±4.10**	24.44±1.91*
苯溴马隆	0.027	29.92±2.78**	20.86±3.92**

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

模型组比较, ip 给药氧嗪酸钾后 2 h, TKT (0.58、1.15、2.30 g·kg⁻¹) 组能明显降低血清 UA 浓度($P < 0.05$ 、 0.01); 氧嗪酸钾注射后 4 h, TKT 2.30 g·kg⁻¹ 能明显降低血清 UA 浓度($P < 0.05$)。阳性药苯溴马隆也有明显作用($P < 0.01$)。

3.1.2 TKT对大鼠排出量的影响 表 2 结果显示,与对照组比较,模型组尿 UA 浓度和 UA 排出量均明显增加,表明已造成大鼠高尿酸血症,造模成功($P < 0.01$)。与模型组比较, ip 氧嗪酸钾后 0~2 h、0~4 h, TKT (0.58、1.15、2.30 g·kg⁻¹) 均能明显增加 UA 排出量($P < 0.05$ 、 0.01) 和 UA 排出总量($P < 0.05$ 、

表2 TKT对高尿酸血症大鼠尿 UA 浓度、尿量、UA 排出量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of TKT on concentration and excretion of UA and urine volume in rats with hyperuricemic ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	氧嗪酸钾注射后 0~2 h		
		尿 UA 浓度/(mg·L ⁻¹)	尿量/mL	UA 排出量/mg
对照	—	173.96±27.36	2.36±0.81	0.41±0.15
模型	—	428.13±72.58 ^{##}	2.77±0.70	1.15±0.20 ^{##}
TKT	0.580	572.92±100.39 ^{**}	2.94±0.78	1.67±0.52 [*]
	1.150	614.58±100.15 ^{**}	3.19±0.92	1.93±0.58 ^{**}
	2.300	626.04±131.99 ^{**}	3.14±0.69	1.94±0.46 ^{**}
苯溴马隆	0.027	713.54±105.80 ^{**}	2.88±0.65	2.02±0.35 ^{**}

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	氧嗪酸钾注射后 2~4 h		氧嗪酸钾注射后 0~4 h	
		尿 UA 浓度/(mg·L ⁻¹)	尿量/mL	UA 排出量/mg	尿酸排出总量/mg
对照	—	236.46±27.80	2.03±0.81	0.49±0.23	0.90±0.30
模型	—	501.04±125.24 ^{##}	2.15±0.77	1.08±0.51 ^{##}	2.23±0.41 ^{##}
TKT	0.580	587.50±95.24	1.95±0.73	1.17±0.55	2.84±0.64 [*]
	1.150	648.96±120.79 [*]	2.92±1.21	1.92±0.91 [*]	3.85±1.21 ^{**}
	2.300	701.04±136.79 ^{**}	2.65±1.05	1.90±0.89 [*]	3.84±1.08 ^{**}
苯溴马隆	0.027	665.63±126.10 ^{**}	2.81±1.14	1.76±0.51 ^{**}	3.78±0.54 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

0.01);注射后2~4 h,TKT(1.15、2.30 g·kg⁻¹)均能明显增加UA排出量($P<0.05$)。苯溴马隆也有明显作用($P<0.01$)。

3.1.3 TKT对大鼠抗体表达的影响 表3及图1~3结果显示,与对照组相比,模型组肾脏URAT1表达明显增加,OAT1表达明显降低,表明UA在肾小管的重吸收明显增多,分泌明显减少,造模成功($P<0.01$)。与模型组比较,TKT 1.15、2.30g·kg⁻¹组均能明显减少肾脏URAT1的表达($P<0.05$ 、0.01);TKT 0.58、1.15、2.30 g·kg⁻¹能明显增加肾脏OAT1的表达($P<0.05$ 、0.01)。苯溴马隆也有明显作用($P<0.01$)。

3.2 TKT对高尿酸血症小鼠模型的预防作用

表4结果显示,与对照组相比,模型组血清UA浓度明显升高,造模成功($P<0.01$)。与模型组比

较,TKT 1.66、3.33 g·kg⁻¹能明显降低血清UA浓度($P<0.05$ 、0.01);0.83、1.66、3.33 g·kg⁻¹能明显增加小鼠血清UA酶浓度($P<0.05$ 、0.01),对XOD无明显作用,表明TKT不是通过XOD来降低血清UA浓度。苯溴马隆 39 mg·kg⁻¹明显降低血清UA浓度($P<0.01$)。

3.3 TKT对水负荷大鼠的利尿作用

表5结果显示,与对照组比较,TKT 0.58 g·kg⁻¹在给药后1~2 h,1.15 g·kg⁻¹在给药后1~2 h、2~3 h、4~5 h,2.30 g·kg⁻¹在给药后0~1 h、1~2 h、2~3 h尿量均明显增加($P<0.05$ 、0.01);TKT各剂量组均明显增加给药后5 h的总尿量($P<0.05$ 、0.01)。阳性药氢氯噻嗪也有明显利尿作用($P<0.01$)。

表3 TKT对高尿酸血症大鼠肾脏抗体表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 3 Effect of TKT on renal antibody expression in rats with hyperuricemic ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	抗体表达面积/ μm^2		
		URAT1	OAT1	OAT3
对照	—	1 509.43±431.35	4 267.56±1 109.62	2 212.27±1 372.48
模型	—	7 405.12±2 626.15 ^{##}	2 111.73±9 18.56 ^{##}	1 694.21±1 000.96
TKT	0.580	6 104.06±2 546.81	3 985.57±1 424.49 ^{**}	2 368.52±1 191.14
	1.150	4 818.81±2 284.94 [*]	3 427.27±1 454.48 [*]	2 488.25±1 366.37
	2.300	3 631.53±1 616.63 ^{**}	3 233.92±978.89 [*]	2 247.24±995.34
苯溴马隆	0.027	2 828.74±1 138.64 ^{**}	4 147.17±1 808.73 ^{**}	2 301.29±1 899.54

与对照组比较:## $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group.

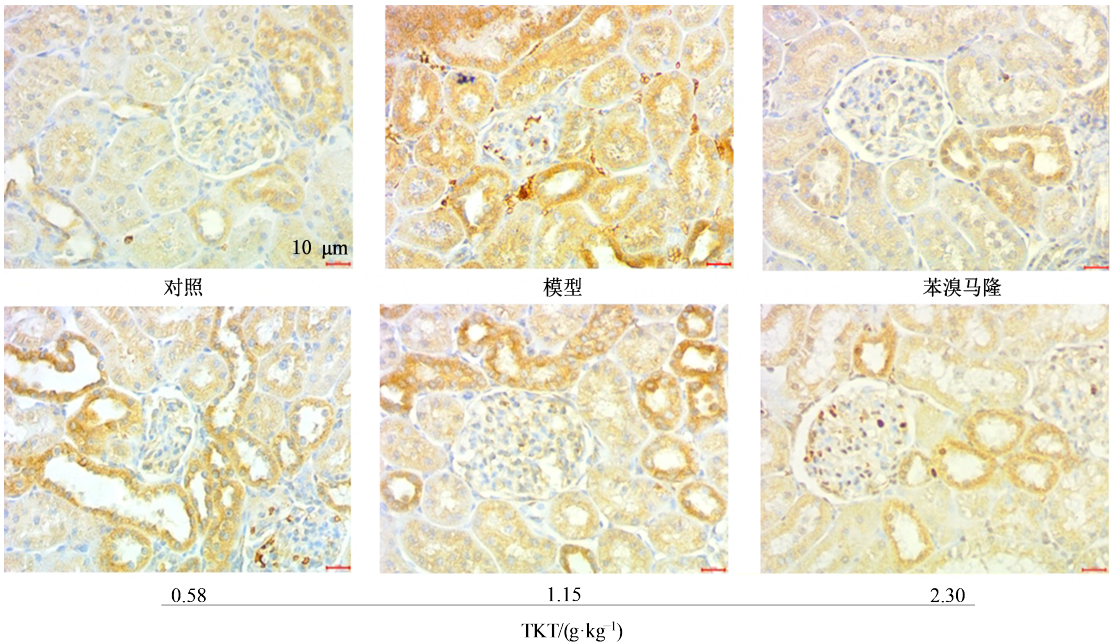


图1 TKT对高尿酸血症大鼠肾脏URAT1抗体表达的影响(×10)
Fig. 1 Effect of TKT on expression of URAT1 antibody in kidney of hyperuricemic rats (×10)

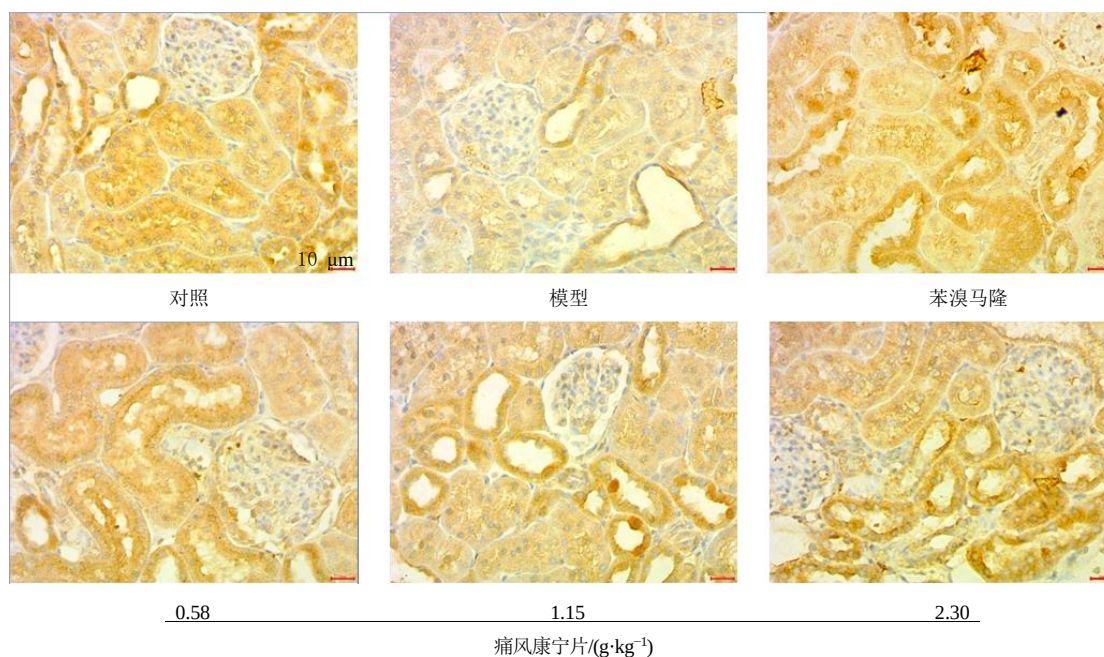


图2 TKT对高尿酸血症大鼠肾脏OAT1抗体表达的影响(×10)
Fig. 2 Effect of TKT on expression of OAT1 antibody in kidney of hyperuricemic rats (×10)

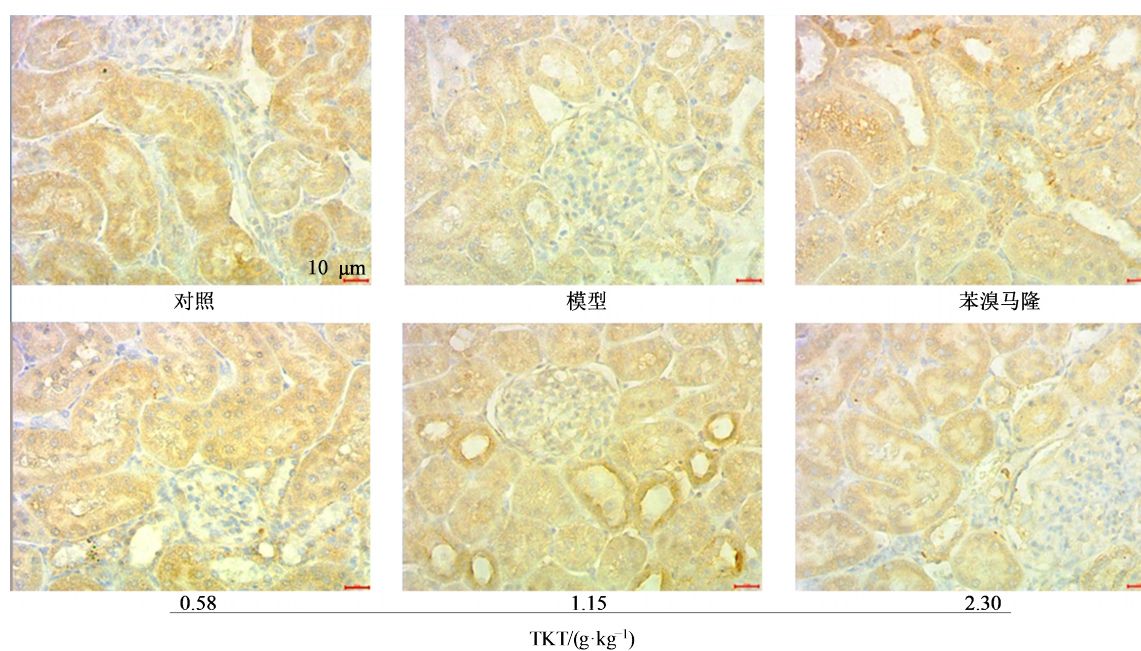


图3 TKT对高尿酸血症大鼠肾脏OAT3抗体表达的影响(×10)
Fig. 3 Effect of TKT on expression of OAT3 antibody in kidney of hyperuricemic rats (×10)

4 讨论

目前研究高尿酸血症模型的思路基本为增加来源,减少去路。增加UA的来源途径可以通过直接补充UA或UA前体物质实现,次黄嘌呤是UA生成的前体物质,在XOD的作用下经过一系列酶促反应生成UA,但动物体内由于尿酸酶的存在,使血清高UA无法长期维持,需要增加尿酸酶抑制剂共同作用,才能形成稳定的高尿酸血症模型。摄入过

量酵母会在体内产生大量嘌呤碱和嘧啶碱等,引起嘌呤代谢紊乱,增加UA生成。氧嗪酸钾作为尿酸酶抑制剂,可竞争性与尿酸酶结合,抑制UA的分解,使体内血清UA水平升高,但因其体内易被分解代谢,无法长期单独使用。因此,氧嗪酸钾与酵母联合使用,通过增加UA生成,抑制UA分解,形成稳定的高尿酸血症模型,已广泛应用于高尿酸血症动物筛选模型^[16]。

表 4 TKT 预防给药对高尿酸血症小鼠血清尿酸、尿酸酶及 XOD 浓度的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 4 Prophylactic effect of TKT on serum uric and uricase and XOD in mice with hyperuricemic ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血 UA/(mg·L ⁻¹)	尿酸酶/(pg·mL ⁻¹)	XOD/(U·L ⁻¹)
对照	—	27.81±4.34	20.67±5.82	19.04±2.95
模型	—	127.76±15.75 ^{##}	37.11±7.20 ^{##}	21.87±3.99
TKT	0.830	112.96±17.00	45.28±6.63 [*]	21.62±3.24
	1.660	108.21±17.79 [*]	48.72±9.75 ^{**}	20.40±2.82
	3.330	95.82±17.61 ^{**}	53.22±9.04 ^{**}	21.62±3.44
苯溴马隆	0.039	98.06±16.09 ^{**}	37.85±7.28	20.07±3.69

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group.

表 5 TKT 对水负荷大鼠尿量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 5 Effect of TKT on urine output in rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	给药后不同时间段尿量/mL					
		0~1 h	1~2 h	2~3 h	3~4 h	4~5 h	0~5 h
对照	—	0.87±0.25	2.38±0.25	1.20±0.49	0.81±0.15	0.48±0.24	5.74±0.64
TKT	0.580	0.77±0.34	3.08±0.78 [*]	1.54±0.47	0.74±0.18	0.54±0.23	6.66±1.04 [*]
	1.150	1.17±0.44	3.02±0.69 [*]	1.64±0.37 [*]	0.87±0.26	0.74±0.18 [*]	7.43±1.34 ^{**}
	2.300	1.43±0.53 [*]	3.06±0.62 ^{**}	1.82±0.47 ^{**}	0.80±0.18	0.50±0.21	7.61±1.39 ^{**}
氢氯噻嗪	0.027	1.28±0.28 ^{**}	3.23±0.73 ^{**}	1.98±0.62 ^{**}	0.95±0.33	0.57±0.14	8.02±1.14 ^{**}

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ 。

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs control group.

人体每天产生的 UA 中约有 70% 由肾脏排出, 其余 30% 通过肠道排出^[17]。UA 经肾小球滤过、近端肾小管重吸收、分泌和分泌后再吸收, 剩余部分从尿液中排出。肾脏中有许多跨膜转运蛋白, 常见有葡萄糖转运蛋白 9 (GLUT9)、尿酸盐转运体 1 (URAT1)、三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 (ABCG2) 和有机阴离子转运体 1、3 (OAT1、OAT3) 等, 均对 UA 的重吸收和分泌起重要作用^[18]。

URAT1 高度表达于近端肾小管上皮细胞膜, 将 UA 从肾脏转运至血液, 介导 UA 的重吸收, 是调节血 UA 水平的重要靶点^[19-20]; OAT1、OAT3 位于肾小管上皮细胞基底侧膜, 参与 UA 从肾小管毛细血管运输至肾小管上皮细胞内, 进一步排至肾小管管腔, 是调节 UA 分泌的重要转运蛋白^[21-23]。

TKT 主要由秦皮、乌梅、虎杖、穿山龙、忍冬藤等多味中药组成, 现代药理学研究已证实具有降 UA、利尿、抗氧化等作用, 可提高机体免疫力。其中, 以秦皮、乌梅共为君药, 秦皮味苦、涩、性寒, 主清热燥湿, 能通过多种途径促进 UA 排泄, 并兴奋小鼠交感神经系统, 从而抑制肾脏对 UA 的重吸收, 以维持体内 UA 动态平衡^[24]; 乌梅性平, 味酸涩, 富含以枸橼酸、苹果酸为主的多种有机酸, 通过参与体

内新陈代谢起到促进 UA 排泄的作用^[25]。乌梅与秦皮配合, 在促进 UA 排泄的作用上殊途同归, 共奏君药之功。方中以车前草、金钱草、生薏仁、茯苓这一组通利渗湿药为臣药, 辅助君药利尿排酸, 减轻肾脏负担, 增加尿量, 促进 UA 持续性排泄^[26-29]。虎杖、穿山龙、忍冬藤、威灵仙为佐药, 祛湿除痹, 通腑化瘀, 抑制嘌呤过多过快合成, 缓解关节红肿热痛, 防止尿酸盐沉积对骨质的破坏, 改善痛风症的症状^[30-32]。白术为使药, 补脾益胃, 燥湿和中, 与茯苓、生薏仁协同作用, 复原脾之正气, 杜绝痛风病反复发作^[33]。

TKT 能明显减少大鼠肾脏中 URAT1 的表达、增加 OAT1 的表达, 表明能明显减少 UA 在肾小管的重吸收、增加肾小管对 UA 的分泌, 使血 UA 浓度降低, 同时有着明显利尿作用, 减轻肾脏负担。综上, TKT 通过促进 UA 分泌、抑制 UA 重吸收及利尿作用, 使血清 UA 浓度明显降低、尿 UA 排出量明显增加, 显示对实验性高尿酸血症有明显的预防作用。针对 TKT 的后续研究, 将进一步探索 TKT 中具体活性成分及其作用机制, 特别是如何精确调控 UA 转运蛋白 (如 URAT1、OAT1) 的表达, 以及这些调控过程中的信号通路和分子机制; 研究 TKT 与现行标准治疗

药物(如非布司他、苯溴马隆)联用时的相互作用及效果,探索潜在的协同或拮抗效应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] 中国民族卫生协会重症代谢疾病分会高尿酸血症相关疾病诊疗多学科共识专家组. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识(2023年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2023, 43(6): 461-480.
- Multidisciplinary Consensus Expert Group on the Diagnosis and Treatment of Hyperuricemia-related Diseases, Branch of Critical Metabolic Diseases, Chinese National Health Association. Multidisciplinary Expert Consensus on the Diagnosis and Treatment of Hyperuricemia-related Diseases in China (2023 Edition) [J]. Chin J Practical Intern Med, 2023, 43(6): 461-480.
- [2] 中华医学会内分泌学分会. 中国高尿酸血症与痛风诊疗指南(2019) [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36(1): 1-13.
- Chinese Society of Endocrinology. Guideline for the diagnosis and management of hyperuricemia and gout in China (2019) [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2020, 36(1): 1-13.
- [3] Dehlin M, Jacobsson L, Roddy E. Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(7): 380-390.
- [4] Major T J, Dalbeth N, Stahl E A, et al. An update on the genetics of hyperuricaemia and gout [J]. Nat Rev Rheumatol, 2018, 14(6): 341-353.
- [5] Sun X, Yang L, Sun H, et al. TCM and related active compounds in the treatment of gout: The regulation of signaling pathway and urate transporter [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1275974.
- [6] 陈光亮, 段玉光, 李莉, 等. 加味四妙汤对高尿酸血症和痛风性关节炎防治作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 48-52.
- Chen G L, Duan Y G, Li L, et al. Experimental study of the protective effects and mechanisms of additional Si-Miao Decoction on acute gouty arthritis and hyperuricemia [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2008, 14(3): 48-52.
- [7] 徐立, 时乐. 灌服与喂饲次黄嘌呤复制大鼠持续性高尿酸血症模型方法初探 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1671-1673.
- Xu L, Shi L. A preliminary study on the replication of continuity hyperuricemia rat model by administration and fed with hypoxanthine [J]. Chin Pharmacol Bull, 2008, 24(12): 1671-1673.
- [8] 黄修献, 吴新华, 李利华, 等. 持续高尿酸血症对大鼠血管内皮细胞功能影响的实验研究 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(1): 206-208.
- Huang X X, Wu X H, Li L H, et al. Experimental study on the effect of persistent hyperuricemia on the function of vascular endothelial cells in rats [J]. Chin J Clin Electron Ed, 2011, 5(1): 206-208.
- [9] 王莉, 马玲, 姚华, 等. 单纯酵母喂饲和氧嗪酸联合酵母暴露高尿酸血症肾病大鼠模型的建立及其抗氧化活力变化的比较研究 [J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(7): 612-614.
- Wang L, Ma L, Yao H, et al. Hyperuricemic renal impairment model in rats established by yeast feeding and potassium oxonate joint yeast and comparison of the anti-oxidant activities [J]. J Environ Health, 2012, 29(7): 612-614.
- [10] Sato M, Wakayama T, Mamada H, et al. Identification and functional characterization of uric acid transporter Urat1 (Slc22a12) in rats [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1808(6): 1441-1447.
- [11] 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, 2084.
- Yang H J, Li Z F, Wan C P, et al. Study overview of urate transporter proteins in primary gout and hyperuricemia [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2013, 31(9): 1891-1894, 2084.
- [12] 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.
- Zhu L R, Chen G L. Progress in uric acid transporters [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2012, 17(11): 1289-1294.
- [13] Terkeltaub R. Gout. Novel therapies for treatment of gout and hyperuricemia [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(4): 236.
- [14] 唐灿, 杨奎. 高尿酸血症动物模型初探 [J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(5): 292-294, 321.
- Tang C, Yang K. A preliminary study on the establishment of animal model with hyperuricemia [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2000, 11(5): 292-294, 321.
- [15] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- Xu S Y. Pharmacological Experimental Methodology [M]. 3rd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [16] 吴芃, 王亮, 李海涛, 等. 高尿酸血症模型的建立及降尿酸药物的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(7): 1283-1294.
- Wu P, Wang L, Li H T, et al. Progress in hyperuricemia model establishment and uric acid-lowering drugs [J].

- Chin J Pathophysiol, 2021, 37(7): 1283-1294.
- [17] Li D L, Yuan S Y, Deng Y Y, et al. The dysregulation of immune cells induced by uric acid: Mechanisms of inflammation associated with hyperuricemia and its complications [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1282890.
- [18] 郭亚芳, 甘静, 李东东, 等. 中草药对尿酸转运体的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(9): 839-842.
- Guo Y F, Gan J, Li D D, et al. Effect of Chinese herbal medicine on uric acid transporter [J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol, 2020, 21(9): 839-842.
- [19] 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(3): 484-491.
- [20] Li Q P, Huang ZW, Liu D F, et al. Effect of berberine on hyperuricemia and kidney injury: A network pharmacology analysis and experimental validation in a mouse model [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3241-3254.
- [21] 孙雪影, 刘李. 疾病状态下有机阴离子转运体表达和功能的变化及其机制研究进展 [J]. 药学进展, 2023, 47(7): 532-541.
- Sun X Y, Liu L. Research progress of changes in expression and function of organic anion transporters and their mechanisms in disease states [J]. Prog Pharm Sci, 2023, 47(7): 532-541.
- [22] Zhao X, Wang J, Tang L Y, et al. Withaferin A protects against hyperuricemia induced kidney injury and its possible mechanisms [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 589-600.
- [23] 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.
- [24] 方莲花, 吕扬, 杜冠华. 秦皮的药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2732-2736.
- Fang L H, Lv Y, Du G H. Progress in study of pharmacological effect of *Cortex Fraxini* [J]. China J Chin Mater Med, 2008, 33(23): 2732-2736.
- [25] 张小琼, 侯晓军, 杨敏, 等. 乌梅的药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3567-3570.
- Zhang X Q, Hou X J, Yang M, et al. Research progress on pharmacological action of *Mume Fructus* [J]. Chin Pharm, 2016, 27(25): 3567-3570.
- [26] 曾金祥, 毕莹, 魏娟, 等. 车前草提取物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机理研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(09): 2064-2066.
- Zeng J X, Bi Y, Wei Juan, et al. Research on the effect and mechanism of plantain extract in lowering serum uric acid levels in mice with acute hyperuricemia [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2013, 24(09): 2064-2066.
- [27] 李军, 蔡泓, 王君明, 等. 金钱草化学成分、药理作用及临床应用 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6262-6264.
- Li J, Cai H, Wang J M, et al. Chemical constituents, pharmacological effects, and clinical applications of *Herba Lysimachiae* [J]. Chi J of Gerontol, 2017, 37(24): 6262-6264.
- [28] 李晓凯, 顾坤, 梁慕文, 等. 薏苡仁化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5645-5657.
- Li X K, Gu K, Liang M W, et al. Advances in the chemical constituents and pharmacological activities of *Coix Seed* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(21): 5645-5657.
- [29] 邓桃妹, 彭代银, 俞年军, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2703-2717.
- Deng T M, Peng D Y, Yu N J, et al. Advances in the chemical constituents, pharmacological effects, and predictive analysis of quality markers of *Poria* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(10): 2703-2717.
- [30] 时圣明, 潘明佳, 王文倩, 等. 虎杖的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 9(02): 317-321.
- Shi S M, Pan M J, Wang W Q, et al. Advances in the chemical constituents and pharmacological actions of *Polygonum cuspidatum* [J]. Drug Eval Res, 2016, 9(02): 317-321.
- [31] 张宁, 于栋华, 周琦, 等. 穿山龙药理作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2015, 26(04): 547-550.
- Zhang N, Yu D H, Zhou Q, et al. Advances in the pharmacological effects of *Dioscorea nipponica* [J]. J China Pharm, 2015, 26(04): 547-550.
- [32] 鲁思爱. 忍冬藤的化学成分及其药理应用研究进展 [J]. 临沂大学学报, 2012, 34(3): 132-134.
- Lu S A. The chemical composition of the *Caulis Lonicerae* and pharmacological application research progress [J]. J Linyi Univ, 2012, 34(3): 132-134.
- [33] 阳柳平. 研究白术的化学成分及药理作用概况 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(21): 607-609.
- Yang L P. An Overview of the chemical constituents and pharmacological effects of *Atractylodes Macrocephala* [J]. Guide China Med, 2012, 10(21): 607-609.

[责任编辑 齐静雯]