

健脾渗湿方对尿酸酶基因缺失高尿酸血症模式动物肾损伤及肠道微生态干预的研究*

殷娜, 李小丝, 刘维超, 祁燕, 李兆福, 段为钢, 彭江云[△], 万春平[△]

(云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 研究健脾渗湿方对尿酸酶基因缺失高尿酸血症模式动物肾损伤保护效应及肠道菌群的调控作用,为健脾渗湿方临床应用提供科学依据。**方法** 采用 CRISPR/Cas9 技术获取尿酸酶基因缺失($Uox^{-/-}$)高尿酸血症模式动物模型,分为尿酸酶缺失($Uox^{-/-}$)高尿酸血症组和健脾渗湿方(JPSSF)给药组($12.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),另设野生型 SD 大鼠(WT)对照组。药物干预后,全自动生化分析仪检测血清尿酸、尿素氮、肌酐含量;考马斯亮蓝法检测 24 h 尿中微量白蛋白含量;HE 染色检测模式动物肾脏病理损伤程度;磷钨酸法测定肠组织尿酸含量;荧光定量 PCR 法检测肾脏组织尿酸盐转运蛋白基因 mRNA 的表达;16S rRNA V4 区检测肠道菌群微生态结构多样性。**结果** 健脾渗湿方能有效降低 $Uox^{-/-}$ 高尿酸血症大鼠肾功能指标,包括尿酸、尿素氮、肌酐含量,减少 $Uox^{-/-}$ 高尿酸血症大鼠肾小管及间质部位尿酸盐结晶沉积,改善肾脏组织炎细胞浸润,下调尿酸盐转运蛋白 URAT1 mRNA 表达($P<0.05$);PCoA 和 NMDS 分析及 Shannon、Simpson 指数结果表明,高尿酸血症给肠道菌群造成紊乱,而健脾渗湿方干预后对肠道菌群无明显重建作用($P>0.05$);在属水平,与模型组比较,健脾渗湿方组大鼠肠道 *Lactobacillus*, *Proteus*, *Prevotellaceae NK3B31 group* 有一定增加,而 *Clostridium sensu stricto 1*, *Bifidobacterium* 具有减少趋势,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 健脾渗湿方对尿酸晶体沉积于肾组织引起肾脏损害具有较好的保护效应,对尿酸肠代谢及肠道微生态紊乱无明显的影响。

关键词: 健脾渗湿方;高尿酸血症;尿酸酶;肾损伤;肠道菌群;16S 测序

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)04-0009-08

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.04.002

Study on Effect of Jianpi Shenshi Formula on Kidney Damage and Intestinal Microecology Intervention in the Uricase Deficient Hyperuricemia Model Rats

YIN Na, LI Xiaosi, LIU Weichao, QI Yan, LI ZhaoFu, DUAN Weigang, PENG Jiangyun, WAN Chunping
(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effect of Jianpi Shenshi Formula preprotecting kidney damage and regulating intestinal flora in uricase-deficient ($Uox^{-/-}$) hyperuricemia rats, and to provide a scientific basis for the clinical application for Jianpi Shenshi Formula. **Methods** An animal model of uricase-deficient ($Uox^{-/-}$) hyperuricemia was established by using of CRISPR/Cas9 technique, dividing into uricase-deficient hyperuricemia group ($Uox^{-/-}$) and JPSSF group ($12.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), wild-type SD rats (WT) were used as the control group. All animals were treated orally for 60 days. Renal function indexes (UA, UREA, CREA) from serum were detected by an automatic biochemical analyzer; Coomassie brilliant blue method was used to assess urinary protein for 24 h; HE staining was applied to assess kidney histopathological damage; Level of Uric acid from intestinal tissue was determined by phosphotungstic acid method; The qPCR was used to detect the expression levels of urate transporter gene; The microecological diversity of intestinal flora was determined by 16S rRNA V4

收稿日期: 2021-06-23

* **基金项目:** 国家自然科学基金(30960476);云南省教育厅科学研究基金项目(2021Y463);国家中医药管理局国家中医(类风湿关节炎)临床研究基地建设项目(国中医药科技函[2018]131号);民族医药防治重大疾病诊疗方案及经典方剂安全性有效性评价研究(2017YFC1704005);云南省中医(风湿病)临床医学研究中心项目(202102AA310006)

第一作者简介: 殷娜(1994-)女,在读硕士研究生,研究方向:天然药物作用及机制。

△通信作者: 万春平, E-mail: wanchunping1012@163.com; 彭江云, E-mail: pengjiangyun@126.com

region sequencing. **Results** Here, we showed that Jianpi Shenshi Formula significantly decreased renal function indexes (UA, UREA, CREA) and alleviated renal lesions damage. However, no significant influence on uric acid from the colonic tissue ($P>0.05$). Down-regulated urate transporter URAT1 mRNA expression in JPSSF group. The PCoA and NMDS analysis have showed that the hyperuricemia causes disorders to the intestinal flora, while the Jianpi Shenshi Formula showed little effect on reconstruction of the intestinal flora ($P>0.05$). At the genus level, compared with the $Uox^{-/-}$ group, there were certain increase in *Lactobacillus*, *Proteus*, *Prevotellaceae NK3B31* group in JPSSF group, *Clostridium sensu stricto 1* and *Bifidobacterium* were decreased in JPSSF group. However, there were no significant differences between $Uox^{-/-}$ group and JPSSF group ($P>0.05$). **Conclusion** Our results indicated that Jianpi Shenshi Formula notably ameliorated hyperuricemia and related renal damage caused by the deposition of uric acid crystals, while has no obvious effect on the intestinal uric acid metabolism and intestinal microecological disorders.

KEY WORDS: Jianpi Shenshi Formula; hyperuricemia; uricase; kidney damage; intestinal flora; 16S sequencing

痛风(Gout)是一种嘌呤代谢紊乱所致的疾病。临床流行病学提示,我国高尿酸血症的患病率急剧攀升,成为仅次于糖尿病的第2大代谢性疾病^[1]。痛风危害最大的是肾脏损害和骨质破坏。慢性尿酸性肾病,即痛风性肾病,是指在长期高尿酸血症状态下,尿酸盐晶体沉积于肾组织导致肾脏病变^[2]。痛风患者大多都有不同程度的肾功能受损。痛风性肾病,多隐匿发病,早期症状不典型,进展缓慢,不易引起重视,一旦出现明显症状已到肾损害期,甚至发展到肾衰竭期导致死亡^[3]。因此,治疗和控制高尿酸血症及痛风性肾病已经成为一个亟待解决的公共卫生问题。

中医学认为“先天不足,正气亏虚,经脉失养;湿浊排泄减少,留滞经脉;脾胃失司,痰浊凝滞关节;感受外邪,邪痹经脉,气血运行不畅”是痛风发病的基本病机。云南吴氏学派吴生元教授提出“三期六型辨证论治”理论,针对间歇期(脾虚湿阻证)痛风患者,运用“健脾化痰,渗湿通络”治法^[4],提出健脾渗湿方,该方由党参、白术、茯苓、猫须草等十余味药组成,具有脾渗湿、化痰逐瘀、通络除痹之功,临床主要用于高尿酸血症的治疗,适用于痛风的间歇期、慢性痛风石病变期及肾脏病变。前期临床及基础研究显示,健脾渗湿方降尿酸疗效显著,明显改善痛风及高尿酸血症的临床症状,显著降低高尿酸血症大鼠模型血尿酸水平,其作用机制可能主要与调节尿酸盐转运蛋白有关。前期课题组团队采用 CRISPR/Cas9 技术敲除 Uox 基因,获得遗传性状稳定的尿酸酶基因缺失大鼠,该模式动物表型明显,体内尿酸水平明显高于野生型,肾功能异常且肾脏存在损伤,为高尿酸血症和痛风的研究提供与人类尿酸代谢规律最接近的模型大鼠。研究已证实,人体内超过一半的血尿酸经肾脏排出体外,1/3 的血尿酸从消化道排出^[5]。目前有关健脾渗湿方治疗痛风的研究主要聚焦酵母喂养型高尿酸血症模

型肾脏尿酸代谢,而对尿酸酶缺失高尿酸血症模式动物消化道尿酸代谢及肠道菌群尚未明确,有必要进一步深入研究。

本研究在尿酸酶基因缺失高尿酸血症大鼠模式动物上,从肾脏和肠道尿酸代谢、肠道菌群变化3个维度,明确健脾渗湿方干预尿酸代谢的效应途径,解析中医浊毒“脾肾亏虚,痰湿瘀阻”基本病机现代生物学内涵,为健脾渗湿方临床应用治疗痛风及相关并发症提供科学基础,传承创新云南吴氏学术思想。

1 材料与方法

1.1 实验动物 尿酸酶基因缺失高尿酸血症大鼠($Uox^{-/-}$)16只,野生型SD大鼠(WT)8只,体质量180~200 g,雄性。由云南中医药大学段为钢教授课题组提供。动物饲养在云南中医药大学第一附属医院中心实验室屏障系统,饲料和水消毒后,给予实验动物自由摄取。实验方案通过云南中医药大学第一附属医院医学伦理委员会审查。

1.2 主要药物与试剂 健脾渗湿方主要由党参、白术、法半夏、三七粉、土茯苓等十余味中药组成,煎煮2次,浓缩成浸膏,4℃备用;尿酸检测试剂盒、尿素氮检测试剂盒、肌酐检测试剂盒(罗氏诊断公司,货号:03183807190;04460715190;03263991190);尿酸测试盒(南京建成生物工程公司,货号:C012-1-1);蛋白染色试剂(伯乐生命医学产品(上海)有限公司,货号:#500-0006);BSA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P0012S);Zymo Research BIOMICS DNA Microprep Kit(北京天漠科技有限公司,货号:D4301);KOD-Plus-Neo DNA Polymerase(东洋纺(上海)生物科技有限公司,货号:KOD-401B);NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina(NEB(北京)有限公司,货号:E7645L);Hiseq Rapid SBS Kit v2(因美纳(中国)科学器材有限公司)。

1.3 主要仪器 罗氏 cobas c311 全自动生化分析仪(罗氏诊断产品(上海)有限公司),SpectraMax i3x 型多功能酶标仪(美谷分子仪器(上海)有限公司),Heidolph 旋转蒸发仪(德祥科技有限公司),ASP 300S 全自动脱水机、EG 1150H 组织包埋机、CM 1950 冷冻台、RM2235 切片机、HI1210 烘片机、DM2500 正置显微镜和图文系统(均为德国莱卡仪器有限公司),Qubit@ 2.0 Fluorometer DNA 定量仪(赛默飞世尔科技有限公司),9700 PCR 仪(美国应用生物系统公司),Hiseq 2500 测序仪(因美纳(中国)科学器材有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 测定 $Uox^{-/-}$ 大鼠血清尿酸,按尿酸平均值相近随机分为高尿酸组($Uox^{-/-}$)、健脾渗湿方组(JPSSF),野生型 SD 大鼠为对照组(WT),每组 8 只。动物自由饮水、进食 1 周后开始实验。JPSSF 组给予健脾渗湿方中药液 12.50 g/(kg·d)灌胃,高尿酸组和对照组给予相同体积的生理盐水灌胃,连续给药 60 d。

2.2 肾功能检测 末次给药后,10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,眼眶静脉丛取血,3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,采用全自动生化分析仪测定血清尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)水平。

2.3 尿蛋白的测定 给药结束后,大鼠禁食、不禁水,收集 24 h 尿量并记录。取 1 mL 收集的尿液,离心去除沉淀,参照考马斯亮蓝 G-250 法测定尿蛋白。简言之,将标准品和离心后尿液加入 96 孔板中,各孔再加入 200 μ L 稀释后的染色液,室温放置 5 min,酶标仪 595 nm 测定 OD 值,计算各组大鼠 1 d 尿蛋白含量。

2.4 HE 检测高尿酸血症模式动物肾脏病理损伤程度 水合氯醛麻醉大鼠,取肾脏固定于 10%福尔马林中,75%、85%、95%、100%浓度梯度乙醇依次对标本进行脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切成 4 μ m 薄片,二甲苯、浓度梯度乙醇脱蜡到水,苏木素-伊红(HE)染色,中性树胶封片,光镜下观察肾脏组织病理损伤程度。

2.5 磷钨酸法测定肠组织尿酸含量 精密称取适量肠组织,加入 9 倍体积的 PBS 缓冲液冰上匀浆,4 000 r/min 室温离心 10 min,取上清转移至新的离心管,采用 BSA 蛋白测定试剂盒将肠组织蛋白含量调一致,接着按照尿酸测试盒说明书测定肠组织尿酸含量,酶标仪 690 nm 测定 OD 值,计算各组大鼠肠组织尿酸含量。

2.6 荧光定量 PCR(q-PCR)检测肾脏组织尿酸盐转运蛋白相关基因的表达 精密称取肾组织,加入 RZ 裂解液,冰上匀浆,15~30℃放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离,应用 Trizol 试剂盒提取总 RNA。取总 RNA 含量 4 μ g 按 Takara 逆转录试剂盒合成 cDNA。以合成的 cDNA 第 1 链为模板,按 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书进行 q-PCR 扩增,检测尿酸盐转运蛋白基因:URAT1,UAT,OAT1 的表达。设置 GAPDH 为内参对照,目的基因表达的相对差异量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行统计分析。特异基因引物序列如下。

URAT1:

(Forward)5'-CCAGGATCCAGGGAATCTTT-3'

(Reverse)5'-AGTTCACACCCTGGCAACTC-3'

UAT:

(Forward)5'-GGACTTCAGATCACCTCCA-3'

(Reverse)5'-ACCAGGAAGCAAAGCTCAAA-3'

OAT1:

(Forward)5'-ACGTAAGAGTCAGGGCTCCA-3'

(Reverse)5'-CTGCAGCTGACTGACTCCTG-3'

GAPDH:

(Forward)5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'

(Reverse)5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'

2.7 16S rRNA V4 区检测肠道菌群微生态结构多样性 健脾渗湿方干预治疗结束后,将大鼠置代谢笼内,采集大鼠自然排出的新鲜粪便。每组随机选出 5 只大鼠粪便,采用 Zymo Research BIOMICS DNA Microprep Kit 试剂盒纯化粪便样本 gDNA。以每个样品提取的 DNA 为模板,引物序列:Primer 5'-3':515F(5'-GT-GYCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R(5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增 16S rDNA 基因 V4 区,琼脂糖凝胶进行目的片段电泳检测、纯化,按照每个样品的测序量要求,进行相应比例的混合。NEB-Next Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina 试剂盒建库,Hiseq Rapid SBS Kit v2 试剂盒上机高通量测序,测序方式为 PE250。在数据分析上:QIIME 进行质控过滤掉不符合要求的序列,应用 UPARSE 算法在 97%一致性水平上进行 OTU 聚类,用 UCLUST 分类法与 SILVA 数据库注释分析,R 语言分析群落组成成分。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,所有实验数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,正态分布采用单因素方差分析,非正态分布资料采用非参

数检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

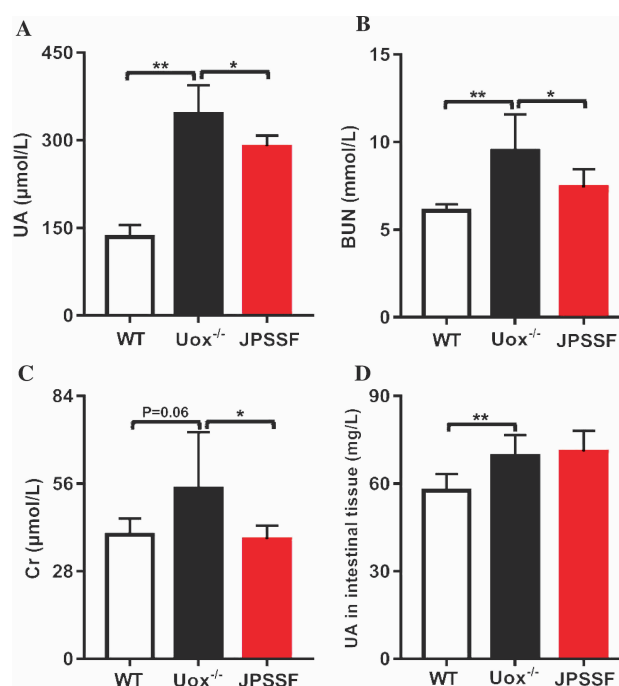
3 结果

3.1 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠肾功能的影响

肾功能检测结果显示,与 WT 组相比, $Uox^{-/-}$ 组血清尿酸含量显著升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);与 $Uox^{-/-}$ 组相比,健脾渗湿方干预后能有效降低血清尿酸水平 ($P < 0.05$),结果见图 1A。 $Uox^{-/-}$ 组血清尿素氮和肌酐水平显著高于 WT 组,其中血清尿素氮差异具有显著性意义 ($P < 0.01$);JPSSF 组尿素氮、肌酐水均低于 $Uox^{-/-}$ 组,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),结果见图 1B-C。这些结果提示,健脾渗湿方对高尿酸血症肾功能损伤具有显著的保护作用。检测肠组织尿酸含量,发现 $Uox^{-/-}$ 组尿酸水平显著高于 WT 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),健脾渗湿方干预后,对肠组织尿酸水平无显著性影响 ($P > 0.05$),结果见图 1D。

3.2 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠肾脏病理损伤及蛋白尿的影响

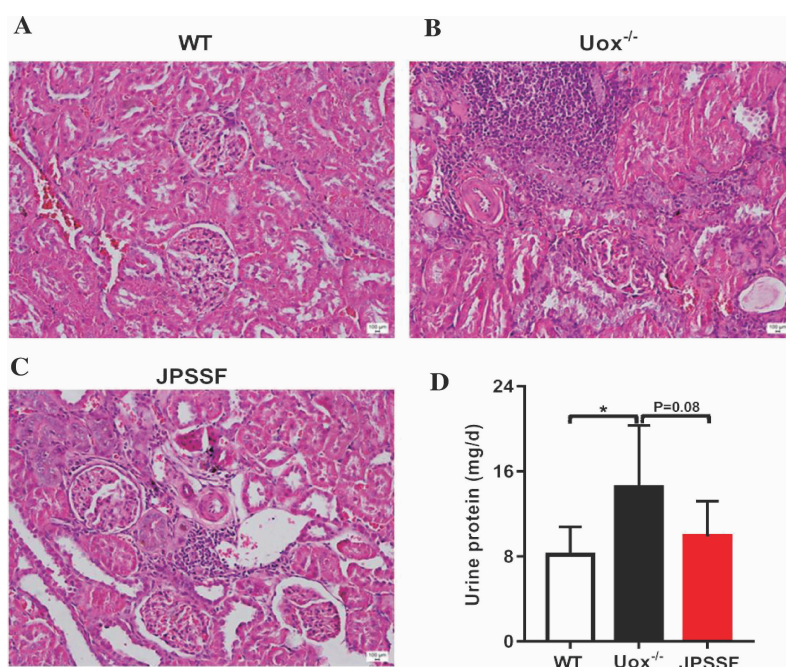
肾脏是尿酸排泄的主要器官,也是最主要的受累器官。HE 染色结果如图 2A-C 所示,WT 组大鼠肾脏组织结构正常,肾小球及周围肾小管、肾皮质、髓质结构清晰。与 WT 组相比, $Uox^{-/-}$ 组大鼠肾小球结构紊乱甚至萎缩,出现大面积的炎细胞浸润,有尿酸钠结晶析出;健脾渗湿方组大鼠肾小球结构相对较完整,尿酸钠结晶、炎症反应均显著减轻。尿蛋白常作为预测肾病的指标之一,检测结果如图 2D 所



注:A. 大鼠血清尿酸(UA)含量,B. 大鼠血清尿素氮(BUN)含量,C. 大鼠血清肌酐(Cr)含量,D. 大鼠肠组织尿酸含量;**表示 $P < 0.01$; *表示 $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠肾功能及肠组织尿酸的变化

示,与 WT 组相比, $Uox^{-/-}$ 组日尿蛋白量显著增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);健脾渗湿方干预后,JPSSF 组日尿蛋白量低于 $Uox^{-/-}$ 组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

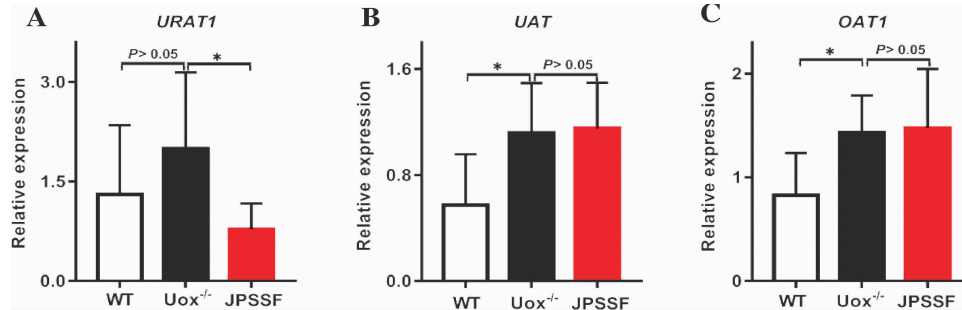


注:A. WT 对照组,B. $Uox^{-/-}$ 高尿酸组,C. JPSSF 组,D. 各组大鼠日尿蛋白量;*表示 $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠肾脏形态学改变(HE 染色, $\times 20$)及日尿蛋白量

3.3 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠肾脏组织尿酸盐转运蛋白的影响 位于肾小管顶膜、基底膜的4种尿酸盐转运蛋白(UAT、URAT1、OAT1、OAT3)参与了人近曲肾小管对尿酸盐的转运,进而促进尿酸的代谢。结果显示:Uox^{-/-}组 URAT1、UAT、OAT1 基因转录表

达水平高于 WT 组 ($P<0.05$),JPSSF 组 URAT1 转录水平低于 Uox^{-/-} 高尿酸血症组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),UAT、OAT1 转录水平没有变化。提示健脾渗湿方干预能抑制肾近曲小管对尿酸盐的重吸收,结果见图 3A-C。

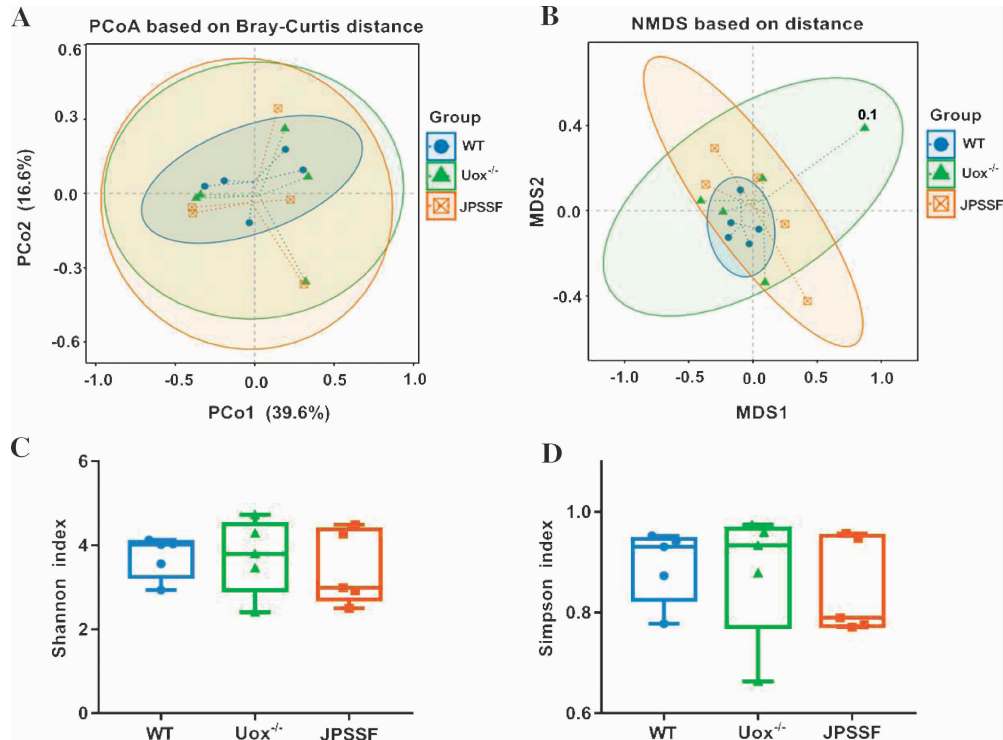


注:4 μ g 的 RNA 逆转成 cDNA,以 GAPDH 为内参,计算各组尿酸盐转运蛋白基因的相对表达量。所有数据结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $n=8$, * 表示 $P<0.05$, WT vs. Uox^{-/-}, Uox^{-/-} vs. JPSSF。

图3 各组大鼠肾脏组织在转录组水平尿酸盐转运蛋白相关基因 mRNA 表达

3.4 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠肠道菌群多样性的影响 采用主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度分析(NMDS)法考察大鼠肠道菌群样本间的差异程度以及差异变化规律。PCoA 结果显示,WT 组菌组成比较相似,Uox^{-/-} 组点间距离比较远,表明高尿酸血

症引起肠道菌群紊乱,而 JPSSF 组组内点间距离和 Uox^{-/-} 组相近,提示健脾渗湿方药物干预后对高尿酸血症大鼠肠道菌群无明显的影响,结果见图 4A。NMDS 分析结果显示,Uox^{-/-} 组菌群间波动较大,而健脾渗湿方干预后,高尿酸血症大鼠肠道菌群波动变



注:图 A 和 B 分别为物种组成相似性组间差异的 PCoA 和 NMDS 分析,图 C 为 Shannon 指数,图 D 为 Simpson 指数。

图4 各组大鼠 Beta 多样性和 Alpha 多样性分析

小,菌群稳态,结果见图 4B。采用 Alpha 多样性指数评价组内菌群的多样性。Shannon 指数和 Simpson 指数结果显示,WT 组、Uox^{-/-} 组之间菌群多样性无明显变化,JPSSF 组菌群多样性较 Uox^{-/-} 组有下降趋势($P>0.05$),结果见图 4C-D。

3.5 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠肠道菌群门水平的影响 物种相对丰度结果显示,在门水平上厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、螺旋菌(*Spirochaetes*)为优势物种,结果见图 5A。与 WT 组大鼠相比,Uox^{-/-} 模型组大鼠肠道微生物 *Firmicutes* 明

显减少,*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Spirochaetes*、*Patescibacteria* 大量增加;与 Uox^{-/-} 组相比,健脾渗湿方干预后 *Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 持续增加,而 *Actinobacteria*、*Spirochaetes*、*Patescibacteria* 占比下降且具有一定向 WT 组恢复趋势,但差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表 1。聚类热图结果显示,WT 组和 JPSSF 组的物种组成相似性大于 WT 组和 Uox^{-/-} 组,结果见图 5B。这些结果提示,高尿酸血症改变了大鼠肠道菌群的组成,而健脾渗湿方药物干预后,在门水平上改善肠道菌群变化的作用有限。

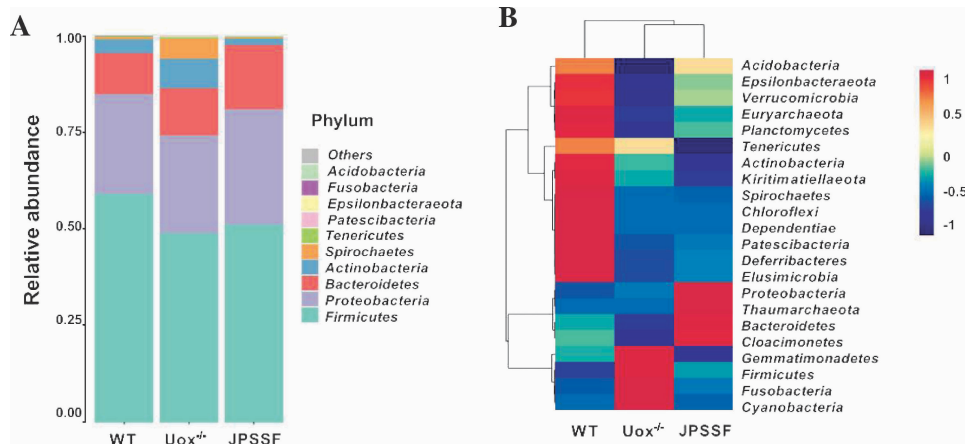


图 5 各组大鼠门水平上物种的相对丰度(A)和聚类热图(B)

表 1 健脾渗湿方对门水平占比较高物种的影响			
(x̄±s,n=5,%)			
Phylum	WT group	Uox ^{-/-} group	JPSSF group
Firmicutes	59.00±21.99	48.80±17.94	51.08±28.20
Proteobacteria	25.78±23.58	25.37±32.59	29.93±36.92
Bacteroidetes	10.82±5.87	12.32±17.82	16.65±19.65
Actinobacteria	3.44±1.52	7.64±5.24	1.50±1.06
Spirochaetes	0.55±0.48	5.16±7.92	0.46±0.32
Patescibacteria	0.07±0.05	0.28±0.42	0.09±0.10

注:Uox^{-/-} 组与 WT 组比较, $P>0.05$;JPSSF 组与 Uox^{-/-} 组比较, $P>0.05$ 。

3.6 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠肠道菌群属水平的影响 统计丰度排名前 10 的物种,在属水平上埃希氏菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、梭菌属

(*Clostridium sensu stricto 1*) 为优势物种,结果见图 6A。Uox^{-/-} 组丰度前 10 的物种总量占比明显低于 WT 组,其中 *Escherichia-Shigella*、*Clostridium sensu stricto 1*、*Prevotellaceae NK3B31 group*、*Aerococcus* 占比大量减少,*Proteus*、*Bifidobacterium* 占比明显增加,*Lactobacillus*、*Enterococcus* 无明显变化,差异均无显著性意义($P>0.05$);与 Uox^{-/-} 组相比,JPSSF 组大鼠肠道菌群 *Lactobacillus*、*Proteus*、*Prevotellaceae NK3B31 group* 大量增加且 *Prevotellaceae NK3B31 group* 占比接近 WT 组,*Clostridium sensu stricto 1*、*Bifidobacterium* 占比减少且 *Bifidobacterium* 有向 WT 组恢复趋势,而 *Escherichia-Shigella*、*Aerococcus*、*Bacteroides* 无明显变化,差异均无显著性意义($P>0.05$),结果与属水平聚类热图一致,见表 2 和图 6B。这些结果表明,健脾渗湿方对高尿酸血症诱导的肠道菌群失调有一定恢复的趋势,但作用并不显著。

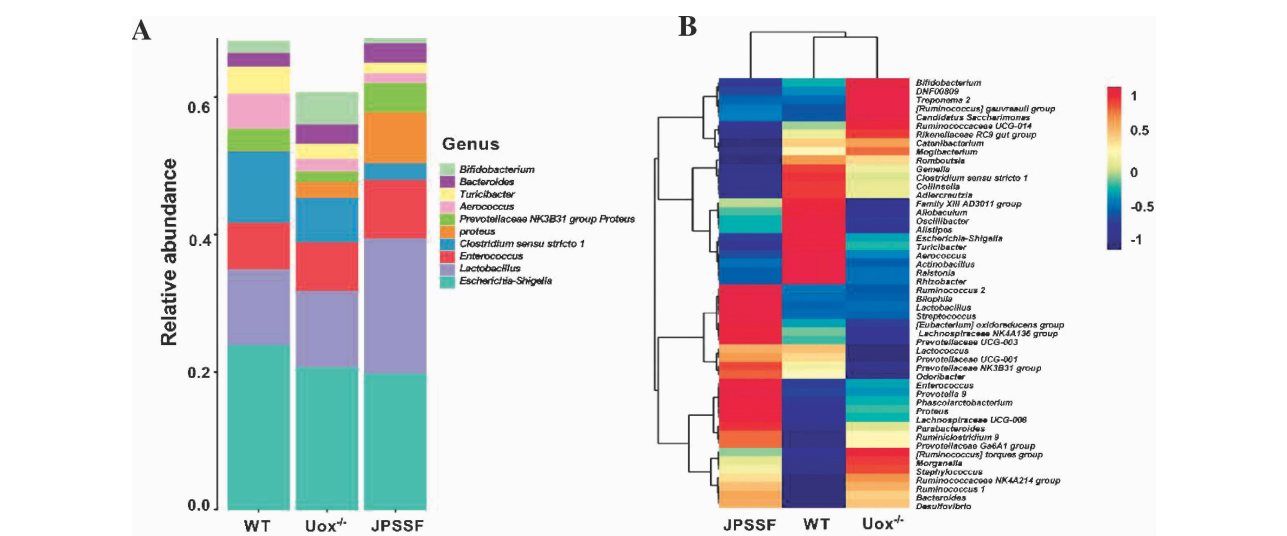


图 6 各组大鼠属水平上物种的相对丰度(图 A)和聚类热图(图 B)

表 2 健脾渗湿方对属水平占比较高物种的影响
($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

Genus	WT group	Uox ^{-/-} group	JPSSF group
<i>Escherichia-Shigella</i>	23.86±23.16	20.61± 28.51	19.71±26.82
<i>Lactobacillus</i>	11.13±7.62	11.20±7.91	19.66±17.56
<i>Enterococcus</i>	6.67±5.35	7.08±6.62	8.57±6.16
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	10.47±7.84	6.36±4.88	2.30±2.02
<i>Proteus</i>	0.07±0.05	2.38±5.24	7.47±11.97
<i>Bacteroides</i>	1.96±1.47	2.74±5.64	2.83±5.02
<i>Prevotellaceae NK3B31 group</i>	3.10±2.76	1.44±2.37	4.32±6.62
<i>Aerococcus</i>	5.18±8.08	1.87±2.31	1.36±1.62
<i>Bifidobacterium</i>	1.74±1.25	4.74±4.85	0.71±0.91

注:Uox^{-/-}组与 WT 组比较, $P>0.05$;JPSSF 组与 Uox^{-/-}组比较, $P>0.05$ 。

4 讨论

动物体内的外源性或内源性嘌呤物质会代谢成黄嘌呤,黄嘌呤在黄嘌呤脱氢酶(Xdh)的催化下生成溶解度较低的尿酸,尿酸在尿酸酶(Uox)的催化下可以进一步转化成溶解度较高的尿囊素^[6]。课题组采用 CRISPR/Cas9 技术敲除 Uox 基因,获得遗传性状稳定的尿酸酶基因缺失大鼠,该模式动物表型明显,体内尿酸水平明显高于野生型,肾功能异常且肾脏存在损伤^[7],为高尿酸血症和痛风的研究提供与人类尿酸代谢规律最接近的模型大鼠。

肾脏是尿酸排泄的主要器官,也是尿酸损伤的重要靶器官,尿酸盐结晶沉积肾脏引起的直接、间接损伤,使肾脏的结构与功能发生病变,导致终末期肾脏疾病的发生^[8]。痛风性肾病常以尿酸性肾结石、慢性间质性肾炎和纤维化为特征^[9]。在尿酸酶基因缺失高尿酸血症模式动物上,发现肾功能指标包括尿酸及尿素氮显著高于野生对照组,肾小球及肾小管具有显著的病理损伤,而健脾渗湿方药物干预后显著降低尿酸酶基因缺失大鼠血清尿酸和尿素氮水平,减少尿酸钠结晶沉积于肾脏及诱导炎症反应,对尿酸酶基因缺失高尿酸血症模式动物肾损伤具有较好的保护作用。课题组前期在酵母喂养型高尿酸血症模型中,发现健脾渗湿方上调肾小管尿酸盐转运蛋白 UAT、OAT3,下调 URAT1,从而促进尿酸排泄^[10];同时显著改善模型大鼠肾间质纤维化程度,下调大鼠肾脏内 COX-2、TNF- α 、TGF- β 1 表达,从而发挥对肾脏的保护作用^[11],上述研究结果与前期的文献报道一致,进一步证明健脾渗湿方对尿酸晶体沉积于肾组织引起肾脏损害及纤维化具有较好的保护效应。

大多数哺乳动物体内的尿酸被尿酸酶催化为更易排出体外的尿囊素,而人类在进化过程中尿酸酶基因发生突变失去功能性,尿酸不能进一步分解^[5],使得尿酸的代谢与排泄只能依靠尿液、粪便排出或肠道微生物进一步分解代谢。对于人体来说,体内的尿酸约 2/3 经肾脏排泄,不到 1/3 经肠道排泄。尽管院内制剂健脾渗湿方疗效显著,然而课题组前期研究主要

聚焦肾脏尿酸代谢途径及相关的损伤,而对于尿酸肠道分解代谢途径,特别是肠道微生物研究较少,因此值得进一步深入研究。

肠道菌群及其构成的微生态环境对机体维持健康有重大意义,充分参与人体的生理、生化、病理和药理的全过程^[12]。有研究报道,机体 1/4 到 1/3 的尿酸可以在粪便中恢复,这表明胆道或(和)肠道的分泌是尿酸排泄的一个重要的替代途径,可能潜在地调节血清尿酸水平^[13]。大多数健康人肠道菌群由厚壁菌门、拟杆菌门 2 个优势类群组成^[14],本研究体系中各组大鼠的优势类群是厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门。与野生对照组相比,尿酸酶缺失高尿酸血症模型大鼠 *Firmicutes* 丰度减少, *Bacteroidetes* 丰度增加,这一结果与高脂饲料诱导高尿酸血症模型肠道菌群分布一致^[15]。厚壁菌门的代表性有益作用是产生丁酸盐,缓解肠道炎症反应^[16]。健脾渗湿方组大鼠肠道 *Lactobacillus*, *Proteus*, *Prevotellaceae NK3B31 group* 有一定增加,而 *Clostridium sensu stricto 1*, *Bifidobacterium* 具有减少趋势,但差异均无统计学意义($P>0.05$),提示健脾渗湿方对肠道微生物紊乱无明显的影响,其主要通过影响肾脏尿酸排泄途径,减少尿酸晶体沉积于肾组织,从而减轻痛风性肾损害。该方临床更适合具有肾功能损伤的痛风患者,该研究为健脾渗湿方临床应用治疗痛风及相关并发症提供科学依据。

参考文献:

- [1] MULTIDISCIPLINARY EXPERT TASK FORCE ON HYPERURICEMIA AND RELATED DISEASES. Chinese multidisciplinary expert consensus on the diagnosis and treatment of hyperuricemia and related diseases[J]. Chin Med J (Engl), 2017, 130(20):2473-2488.
- [2] WU X L, LIU L H, XIE H B, et al. Tanshinone IIA prevents uric acid nephropathy in rats through NF- κ B inhibition[J]. Planta Med, 2012, 78(9):866-873.
- [3] 张金焕, 张剑勇. 中医药治疗尿酸性肾病研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(15):33-36.
- [4] 陈艳林. 吴生元教授辨治痛风的学术思想及加味竹叶石膏汤抗炎作用及机制研究[D]. 昆明:云南中医学院, 2015.
- [5] 李醒, 褚夫江, 蒋诗林, 等. 桑黄乙醇提取物对大鼠尿酸代谢及肠道微生物影响的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(1):177-182.
- [6] SHARMA V, HILLER M. Losses of human disease-associated genes in placental mammals[J]. NAR Genom Bioinform, 2019, 2(1):lqz012.
- [7] YU Y, ZHANG N, DONG X X, et al. Uricase-deficient rat is generated with CRISPR/Cas9 technique[J]. PeerJ, 2020, 8:e8971.
- [8] 蓝伦礼. 肾茶对高尿酸血症及痛风性肾病肾损害的保护作用及机制研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2016.
- [9] WANG H J, CHEN X X, SONG R, et al. Qi-Zhu-Xie-Zhuo-Fang reduces serum uric acid levels and ameliorates renal fibrosis in hyperuricemic nephropathy rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91:358-365.
- [10] 杨会军. 健脾渗湿方对痛风尿酸盐转运蛋白调控作用研究[D]. 昆明:云南中医学院, 2014.
- [11] 李雁丹. 健脾渗湿方对痛风性肾病的保护作用机制研究[D]. 昆明:云南中医学院, 2016.
- [12] 申意伟, 李雪, 范桢亮, 等. 益和方对高脂饮食诱导小鼠肠壁通透性及肠道菌群和骨髓脂质功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(6):98-102.
- [13] HOSOMI A, NAKANISHI T, FUJITA T, et al. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e30456.
- [14] WEXLER A G, GOODMAN A L. An insider's perspective: bacteroides as a window into the microbiome[J]. Nat Microbiol, 2017, 2:17026.
- [15] YU Y R, LIU Q P, LI H C, et al. Alterations of the gut microbiome associated with the treatment of hyperuricaemia in male rats[J]. Front Microbiol, 2018, 9:2233.
- [16] PRYDE S E, DUNCAN S H, HOLD G L, et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon[J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 217(2):133-139.