

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20240621004

# 四妙丸抑制 IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B 通路上调肠道 ABCG2 表达促进肠道尿酸排泄的机制

郝泽瀚<sup>1,2</sup>, 张 远<sup>1,2</sup>, 张钟友<sup>1,2</sup>, 王凌椿<sup>2</sup>, 叶博闻<sup>2</sup>, 戴 号<sup>1,2</sup>

1. 上海中医药大学光华临床医学院(上海 201203); 2. 上海中医药大学附属光华医院骨科(上海 200052)

**【摘要】** 目的 基于白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )/核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路探讨四妙丸(SMW)抑制高尿酸血症(HUA)大鼠肠道炎症反应、促进尿酸肠道排泄的机制。方法 将40只SD大鼠随机分为空白对照(CON)组、模型(MOD)组、SMW组、依托考昔(ETO)组和吡咯烷二硫代甲酸铵(PDTC)组( $n=8$ )。除CON组外,其余各组大鼠予以氧嗪酸钾100 mg/(kg·d)腹腔注射联合次黄嘌呤500 mg/(kg·d)灌胃处理建立HUA模型。从造模后第8天起,MOD组灌胃给予10 mL/(kg·d)氯化钠溶液(9 g/L),SMW组灌胃给予1 130.3 mg/(kg·d) SMW, ETO组灌胃给予5.4 mg/(kg·d) ETO, PDTC组灌胃给予100 mg/(kg·d) PDTC。连续干预14 d后,全自动生化分析仪分析大鼠血尿酸变化;苏木精-伊红(HE)染色检测肠道组织病理变化;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清IL-1 $\beta$ ;聚合酶链式反应(PCR)法检测大鼠回肠IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65及ATP结合盒亚家族G成员2(ABCG2)的mRNA表达水平;Western blot法检测大鼠回肠IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65、磷酸化NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)及ABCG2的蛋白表达水平;免疫组织化学染色(IHC)法检测大鼠回肠ABCG2蛋白表达水平。结果 ①HUA大鼠模型成功建立,表现为血清尿酸水平显著增加( $P<0.05$ );SMW、ETO及PDTC能显著降低HUA大鼠血清尿酸水平( $P<0.05$ )。②SMW能显著减少HUA大鼠回肠绒毛破坏、减轻细胞脱落及降低中性粒细胞浸润;ETO和PDTC能减少HUA大鼠回肠绒毛的破坏、减轻细胞脱落及降低中性粒细胞浸润,但改善效果不明显。③SMW、ETO和PDTC能显著降低HUA大鼠血清中IL-1 $\beta$ 水平( $P<0.05$ )。④SMW和ETO能显著降低大鼠回肠IL-1 $\beta$ 和NF- $\kappa$ B p65的蛋白及mRNA表达( $P<0.05$ );PDTC能显著降低大鼠回肠IL-1 $\beta$ 和NF- $\kappa$ B p65的蛋白表达( $P<0.05$ )。⑤SMW能显著增加ABCG2的蛋白及mRNA表达( $P<0.05$ ),而ETO及PDTC只能增加ABCG2蛋白表达( $P<0.05$ ),且效果不如SMW。结论 SMW能有效降低血尿酸而改善HUA,其机制可能是通过抑制回肠IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B通路上调回肠ABCG2表达。

**【关键词】** 高尿酸血症;痛风性关节炎;四妙丸;尿酸;炎症;大鼠模型;中药研究

## Mechanism of Simiao Pill inhibiting IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B to up-regulate intestinal ABCG2 expression and promote uric acid excretion in intestine

HAO Zehan<sup>1,2</sup>, ZHANG Yuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhongyou<sup>1,2</sup>, WANG Lingchun<sup>2</sup>, YE Bowen<sup>2</sup>, DAI Hao<sup>1,2</sup>

1. Guanghua School of Clinical Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Orthopedic, Guanghua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200052, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of Simiao Pill (SMW) inhibiting intestinal inflammation and promoting the intestinal excretion of uric acid in hyperuricemia (HUA) rats based on the interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into blank control (CON) group, model (MOD) group, SMW group, etoricoxib (ETO) group, and pyrrolidinedithiocarbamate ammonium (PDTC) group ( $n=8$ ). Except CON group, rats in other groups were given intraperitoneal injection of potassium oxazinate at 100 mg/(kg·d) and intragastric administration of hypoxanthine at 500 mg/(kg·d) to establish HUA model. From the eighth day after modeling, MOD group was given

10 mL/(kg·d) sodium chloride solution (9 g/L) by gavage, SMW group was given 1 130.3 mg/(kg·d) SMW by gavage, ETO group was given 5.4 mg/(kg·d) ETO by gavage, and PDTC group was given 100 mg/(kg·d) PDTC by intragastric administration. After 14 d of continuous intervention, serum uric acid levels were detected using an automatic biochemistry analyzer. Intestinal histopathology was examined using hematoxylin and eosin (HE) staining. Serum IL-1 $\beta$  levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, and ABCG2

[基金项目] 上海市卫健委科研计划项目(202140164);上海市卫健委科研课题(20194Y0432);上海市长宁区医疗卫生科研专项基金(CNKW2020Y17);上海市长宁区卫健委医学重点(特色)专科计划项目(20232003)

[作者简介] 郝泽瀚,男,硕士研究生,主要从事中医药防治骨伤及代谢疾病的机制研究工作

[通信作者] 戴号,副主任医师,硕士研究生导师;

E-mail:13564799291@163.com

in the rat ileum were assessed by polymerase chain reaction (PCR). The protein expressions of IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, phosphorylated NF- $\kappa$ B p65 (p-NF- $\kappa$ B p65), and ABCG2 in the rat ileum were analyzed by Western blot. The protein expression of ABCG2 in the rat ileum was evaluated by immunohistochemical (IHC) staining. **Results** ① HUA rat model was established successfully, characterized by a significant increase in serum uric acid levels ( $P<0.05$ ). SMW, ETO, and PDTC could significantly reduce serum uric acid levels in HUA rats. ② SMW could significantly reduce the damage to the intestinal villi, alleviate cell shedding, and decrease neutrophil infiltration in the ileum of HUA rats. ETO and PDTC could reduce the damage to the ileal villi, alleviate the cell shedding, and decrease the neutrophil infiltration, but the improvement effect was not obvious. ③ SMW, ETO, and PDTC could significantly reduce the serum IL-1 $\beta$  levels in HUA rats ( $P<0.05$ ). ④ SMW and ETO could significantly reduce the protein and mRNA expressions of IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B p65 in the ileum of the rats ( $P<0.05$ ); And PDTC could significantly reduce the protein expression of IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B p65 in the ileum ( $P<0.05$ ). ⑤ SMW could significantly increase the protein and mRNA expressions of ABCG2 ( $P<0.05$ ). However, ETO and PDTC could only increase the ABCG2 protein expression ( $P<0.05$ ), and the effect was worse than that of SMW. **Conclusions** SMW can effectively reduce the serum uric acid level and improve HUA. The mechanism may involve up-regulating ABCG2 expression by inhibiting the IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B pathway in the ileum.

**Keywords:** hyperuricemia; gouty arthritis; Simiao Pill; uric acid; inflammation; rat model; traditional Chinese medicine research

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是指成人正常嘌呤饮食情况下,血清尿酸水平超过正常范围<sup>[1]</sup>。近年来,我国HUA的患病率逐年升高,已成为仅次于糖尿病的第二大代谢性疾病<sup>[2]</sup>。尿酸排泄障碍是HUA的主要病因<sup>[3]</sup>,人体2/3的尿酸经肾脏排泄,1/3的尿酸经肠道排泄。目前,促进尿酸排泄的药物均以肾脏作为靶器官,通过调控肾脏尿酸转运蛋白增加尿酸排泄以达到降尿酸作用。但肾脏尿酸排泄负荷的增加不仅增加尿酸性肾病的发生概率,且对合并肾病的患者作用有限。肠道也是排泄尿酸的重要器官,尤其是在伴有慢性肾脏疾病导致肾脏排泄尿酸发生障碍时<sup>[4]</sup>。然而,目前肠道排泄尿酸的机制尚不明确,探索新的尿酸排泄机制并开发安全有效的肠道降尿酸药物作为HUA等疾病的补充治疗药物,已成为现阶段的研究热点。

四妙丸(SMW)源自清代《成方便读》,由苍术、黄柏、牛膝、薏苡仁组成,具有清热祛湿、逐瘀通经之效,并有多靶点、疗效持久、不良反应少等优势,是临床治疗高尿酸血症的常用方剂之一<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[6-7]</sup>表明,SMW可用于湿热蕴结型痛风性关节炎。本课题组前期研究<sup>[8-9]</sup>发现,SMW可以通过上调肠道尿酸转运蛋白ATP结合盒亚家族G成员2(ABCG2)的表达,促进肠道尿酸排泄,从而达到降低血尿酸的功效,并发现SMW对ABCG2的调控效果在回肠中最为显著。然而,SMW促进ABCG2表达的机制尚不明确。

ABCG2是一种高容量尿酸转运蛋白,在正常小肠中高表达,是肠道排泄尿酸的主要转运蛋白<sup>[4]</sup>。可溶性尿酸盐是强力的致炎物质,在体内可激活白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )及核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)炎症通路<sup>[10-11]</sup>。研究发现,ABCG2表达可受到炎症反应调控<sup>[12]</sup>,IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B炎症信号通路对ABCG2的调控效应尤为明显,IL-1 $\beta$ 不仅能直接降低ABCG2表达,还可以通过活化NF- $\kappa$ B降低ABCG2的表达<sup>[13-15]</sup>。

网络药理学研究<sup>[5,16-17]</sup>发现,SMW中多种有效成分(包括小檗碱、槲皮素、苍术素、芦丁等)可通过抑制IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B及趋化因子信号通路等多途径发挥抗炎、抗氧化应激等作用。另有研究<sup>[18]</sup>表明,槲皮素能抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体的激活和IL-1 $\beta$ 的产生而发挥抗炎作用。

有研究<sup>[19]</sup>表明,SMW中槲皮素能上调ABCG2表达抑制尿酸肾脏重吸收缓解HUA,但其机制不详。因此我们推测,SMW可能通过其抗炎作用,抑制IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B信号通路,从而上调ABCG2表达,达到促进肠道尿酸排泄的作用。本研究基于IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B信号通路探讨SMW促进肠道尿酸排泄的作用机制,以期为SMW治疗HUA提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 40只SPF级SD大鼠,6周龄,雄性,体重200~220g,购于上海必凯科翼生物科技有限责任公司。动物饲养于SPF级饲养室,温度20~25℃,湿度40%~70%,环境灯光明暗各12h,自由进食饮水。本研究实验方案经过上海中医药大学动物伦理委员会审核并批准(伦理审批号:PZSHUTCM2304170009)。

1.1.2 药物与试剂 根据《中华人民共和国药典(2020年版):四部》<sup>[20]</sup>,SMW由黄柏250g、苍术125g、薏苡仁250g和牛膝125g组成(批号分别为191201、200201、191202、191101),购自上海同济堂药业有限公司,由上海中医药大学附属光华医院药剂科订购并鉴定。SMW浸膏制备:将上述药物碾碎,混合后以适量蒸馏水浸泡、煎煮,过滤收集药液;再次添加适量蒸馏水煎煮,过滤收集溶液;混合2次中药溶液,旋转蒸发、减压浓缩、真空干燥,研磨至细粉状,即制备获得浸膏粉261.62g,提取率为34.88%,浸膏粉密封后置于-20℃保存。根据课题组前期研究<sup>[8-9]</sup>结果,选用1130.3mg/(kg·d)为SMW

干预 HUA 大鼠的剂量。

尿酸测定试剂盒(批号:AUZ2305),美国 Beckman Coulter 公司;IL-1 $\beta$  的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:MM-0047R1),武汉酶免生物科技有限公司;兔抗 NF- $\kappa$ B p65 多克隆抗体、兔抗磷酸化 NF- $\kappa$ B p65 (p-NF- $\kappa$ B p65)重组抗体、兔抗 IL-1 $\beta$  多克隆抗体、兔抗 ABCG2 多克隆抗体(批号分别为 107451AP、823351RR、168061AP、272861AP),美国 Proteintech 公司;兔抗  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)多克隆抗体(批号:4970T),美国 Cell Signaling Technology 公司;山羊抗兔 IgG-HRP、Omni-ECL™ 增强型化学发光检测试剂盒(批号:LF102、SQ101L),上海雅酶生物医药科技有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit、TB Green® Premix Ex Taq™ II(批号分别为 RR037A、RR820A),宝日医生生物技术(北京)有限公司;TRIeasy Total RNA Extraction Reagent(批号:19202ES60),翌圣生物科技(上海)股份有限公司;氧嗪酸钾、次黄嘌呤(批号分别为 C14819669、C15450876),上海麦克林生化科技股份有限公司;依托考昔(ETO,批号:H20193272),齐鲁制药有限公司;吡咯烷二硫代甲酸铵(PDTC,批号:5108963),上海源叶生物科技有限公司;异氟烷(批号:20082602),深圳瑞沃德生命科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 组织匀浆机(型号:TL-2010S),北京鼎昊源科技有限公司;全波长酶标仪(型号:Mutiskan™ GO),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;电泳仪(型号:165-8001),美国 Bio-Rad 公司;小型 Trans-Blot 转印槽(型号:170-3930),美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统(型号:GIS-1600),上海天能生命科学有限公司;台式高速冷冻离心机(型号:Fresco21),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;梯度 PCR 仪(型号:Veriti DX),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;荧光定量 PCR 仪(型号:Roche480 II Real Time PCR System),瑞士 Roche 公司;扫描仪(型号:Aperio AT2),德国 Leica 公司;全自动生化分析仪(型号:BECKMAN AU5800),美国 Beckman Coulter 公司;LED 生物显微镜(型号:DM2000),德国 Leica 公司;小动物麻醉机(型号:ABS-4A),上海玉研科学仪器公司。

1.2 分组、造模与干预 大鼠适应性喂养 7 d 后,完全随机分为空白对照(CON)组、模型(MOD)组、SMW 组、ETO 组和 PDTC 组,每组 8 只。除 CON 组外,其余各组大鼠予以氧嗪酸钾 100 mg/(kg·d)腹腔注射联合次黄嘌呤 500 mg/(kg·d)灌胃处理,连续处理 21 d,以建立和维持 HUA 模型。造模 7 d 后检测血尿酸水平,其升高超过 CON 组 20% 则认为造模成功<sup>[21]</sup>,否则予以剔除。

从造模后第 8 天开始,MOD 组给予 10 mL/(kg·d)氯化

钠溶液(9 g/L)灌胃处理,SMW 组给予 1 130.3 mg/(kg·d) SMW 灌胃处理,ETO 组给予 5.4 mg/(kg·d) ETO 灌胃处理,PDTC 组给予 100 mg/(kg·d) PDTC 灌胃处理,连续干预 14 d。

### 1.3 检测指标与方法

1.3.1 血清尿酸水平的检测 大鼠采用异氟烷麻醉后,眼内眦静脉取血(第 7 天)或腹主动脉取血(第 21 天),3 000 r/min、15 min 离心后取上清液(血清)。按照尿酸测定试剂盒说明书步骤,使用全自动生化分析仪分析各样本尿酸浓度。

1.3.2 苏木精-伊红(HE)染色法检测回肠组织结构 大鼠回肠组织用多聚甲醛溶液(40 g/L)固定并包裹于石蜡中。回肠组织切片,脱蜡水化,苏木精染色液孵育 5~10 min,蒸馏水冲洗 5 min,伊红染色液重染 3 min,蒸馏水冲洗 5 min。切片在浓度递增的乙醇中浸泡 2 min,二甲苯浸泡 2 min,封片,在显微镜下观察组织显色效果并采集图像。

1.3.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-1 $\beta$  水平 按“1.3.1”项下方法取大鼠血清,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤,加入 100  $\mu$ L 辣根过氧化物酶标记的 IL-1 $\beta$  抗体,37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min。加入底物 A 和 B 各 50  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min。终止反应后,采用全波长酶标仪检测 450 nm 下各样本吸光度(A)值,先得出标准曲线,再根据 A 值计算出样本中 IL-1 $\beta$  的水平。

1.3.4 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测相关 mRNA 表达 使用总 RNA 提取试剂盒提取各组大鼠回肠总 RNA,检测各样本的纯度和浓度,使用逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。反应条件:95  $^{\circ}$ C、30 s,循环 1 次;95  $^{\circ}$ C、5 s,60  $^{\circ}$ C、30 s,循环 40 次;95  $^{\circ}$ C、15 s,60  $^{\circ}$ C、60 s,95  $^{\circ}$ C、1 s,循环 1 次。每组均设 3 个复孔。反应结束后确认反应孔扩增曲线和溶解曲线,以  $\beta$ -actin 为内参,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算目标基因的相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物长度/bp
NF- $\kappa$ B p65	上游:5'-CAACATCCCTCAGCACCATCAAC-3'	347
	下游:5'-TGCCAGTCTGTGAACACTCC-3'	
IL-1 $\beta$	上游:5'-CGTGCTGTCTGACCCATGTGAG-3'	371
	下游:5'-TGTCCCGACCATGTGCTGTTTC-3'	
ABCG2	上游:5'-ACCCACAGCGGAGGCAAG-3'	203
	下游:5'-GGCGAAGAGCTGCTGAGAAGT-3'	
$\beta$ -actin	上游:5'-TGTTCCTGTATGCTCTGG-3'	350
	下游:5'-GAACCGCTCATTGCCGATAGT-3'	

注:NF- $\kappa$ B p65 为核因子- $\kappa$ B p65 基因,IL-1 $\beta$  为白细胞介素-1 $\beta$  基因,ABCG2 为 ATP 结合盒亚家族 G 成员 2 基因, $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白基因。

1.3.5 Western blot 法检测相关蛋白表达 取大鼠回肠组织打碎离心,用 RIPA 裂解液提取大鼠回肠总蛋白,二辛可酸(BCA)法测定细胞总蛋白浓度。各孔取 10  $\mu$ L 蛋白上样,用体积分数 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离(浓缩胶 80 V, 30 min;分离胶 120 V, 150 min),并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上(100 V, 60 min)。用无蛋白快速封闭液封闭后,加入 5 mL 一抗[兔抗 NF- $\kappa$ B p65 多克隆抗体(1:2 500),兔抗 p-NF- $\kappa$ B p65(Ser468)重组抗体(1:3 000),兔抗 IL-1 $\beta$  多克隆抗体(1:2 000),兔抗 ABCG2 多克隆抗体(1:1 000),兔抗  $\beta$ -actin 多克隆抗体(1:5 000)] 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入山羊抗兔 IgG-HRP 二抗(1:10 000)室温孵育 2 h。按 ECL 试剂盒说明进行显影,采用 ImageJ 软件对蛋白条带灰度值进行分析。

1.3.6 免疫组织化学(IHC)法检测回肠 ABCG2 表达 按“1.3.2”项下方法制备大鼠回肠组织切片。组织切片脱蜡水化,抗原修复后灭活内源性酶,加入一抗[兔抗 ABCG2 多克隆抗体(1:350),以磷酸盐缓冲液(PBS)为一抗阴性对照],4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入生物素标记山羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000),室温孵育 50 min。加入辣根酶标记链霉卵白素,室温孵育 15 min 后,二氨基联苯胺(DAB)显色。显微镜观察显色效果并采集图像,经 ImageJ 软件分析蛋白表达面积和积分光密度(IOD)值。

1.4 统计学方法 实验数据采用 SPSS 24.0 和 GraphPad Prism 8 软件分析、处理。所有体外和体内实验都至少重复 3 次,每次至少取 3 个样本。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组数据比较采用 *t* 检验;多组间数据比较采用单因素方差分析,采用 LSD-*t* 检验进行组间成对比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HUA 大鼠模型评价 造模期间,各组大鼠体质量正常增长,各阶段组间无显著差异( $P > 0.05$ ),见表 2。各组大鼠血清尿酸水平基线一致。造模第 7 天时,与本组第 1 天相比,除 CON 组外,其余各组大鼠血清尿酸水平显著升高( $P < 0.05$ );与同组第 7 天相比,SMW 组、ETO 组和 PDTTC 组大鼠第 21 天血清尿酸水平显著降低( $P < 0.05$ ),见表 3。

2.2 对大鼠回肠组织病理的影响 HE 结果显示,CON 组大鼠回肠组织结构正常。与 CON 组相比,MOD 组大鼠肠道基底层改变,肠绒毛破坏以及细胞脱落,并伴有大量中性粒细胞浸润,提示 HUA 大鼠出现肠道炎症反应。与 MOD 组相比,SMW 组大鼠回肠绒毛的破坏、细胞脱落明显改善,中性粒细胞浸润明显减轻,提示 SMW 可改善大鼠回肠炎症。与 MOD 组相比,ETO 组和 PDTTC 组大鼠中性粒细胞浸润减轻,肠道基底层较完

表 2 大鼠造模期间体质量变化(g)

组别	第 1 天	第 7 天	第 21 天
CON 组	250.13 $\pm$ 9.05	280.49 $\pm$ 14.12 <sup>*</sup>	333.95 $\pm$ 27.22 <sup>*#</sup>
MOD 组	253.85 $\pm$ 19.83	247.23 $\pm$ 14.51	286.15 $\pm$ 20.54 <sup>*#</sup>
SMW 组	250.09 $\pm$ 8.19	254.46 $\pm$ 8.45	291.18 $\pm$ 15.95 <sup>*#</sup>
ETO 组	244.68 $\pm$ 7.46	246.66 $\pm$ 9.58	296.16 $\pm$ 17.63 <sup>*#</sup>
PDTTC 组	245.68 $\pm$ 10.88	251.50 $\pm$ 16.52	289.35 $\pm$ 33.52 <sup>*#</sup>

注:CON 为空白对照,MOD 为模型,SMW 为四妙丸,ETO 为依托考昔,PDTTC 为吡咯烷二硫代甲酸铵。与本组第 1 天相比,\* $P < 0.05$ ;与本组第 7 天相比,# $P < 0.05$ ;n=8, $\bar{x} \pm s$ 。

表 3 各组大鼠造模期间血尿酸水平变化( $\mu$ mol/L)

组别	第 1 天	第 7 天	第 21 天
CON 组	184.01 $\pm$ 38.25	180.71 $\pm$ 47.77	254.48 $\pm$ 105.85 <sup>#</sup>
MOD 组	167.43 $\pm$ 6.45	614.98 $\pm$ 172.90 <sup>*</sup>	573.00 $\pm$ 169.85 <sup>*</sup>
SMW 组	150.46 $\pm$ 19.15	621.10 $\pm$ 89.40 <sup>*</sup>	183.25 $\pm$ 89.77 <sup>#</sup>
ETO 组	170.71 $\pm$ 16.88	752.90 $\pm$ 316.23 <sup>*</sup>	209.79 $\pm$ 59.36 <sup>#</sup>
PDTTC 组	163.31 $\pm$ 39.90	657.45 $\pm$ 244.29 <sup>*</sup>	174.24 $\pm$ 56.17 <sup>#</sup>

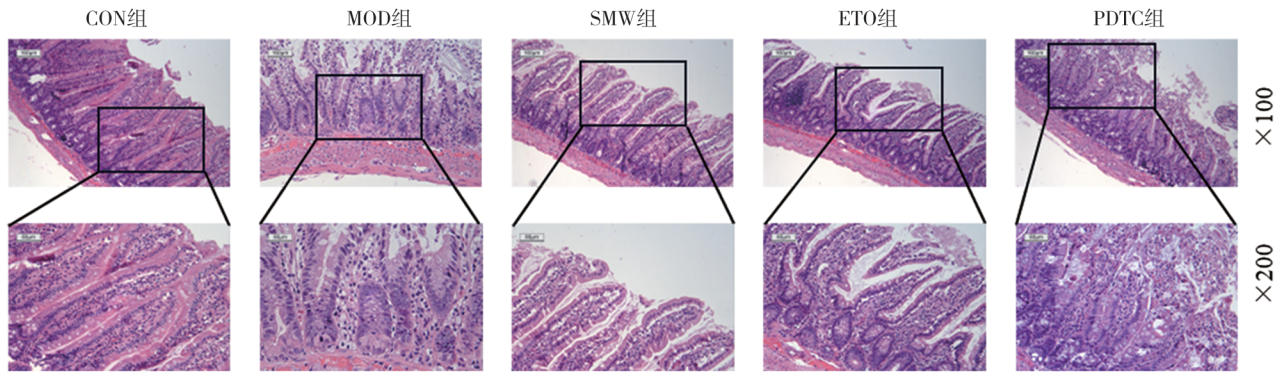
注:CON 为空白对照,MOD 为模型,SMW 为四妙丸,ETO 为依托考昔,PDTTC 为吡咯烷二硫代甲酸铵。与本组第 1 天相比,\* $P < 0.05$ ;与本组第 7 天相比,# $P < 0.05$ ;n=8, $\bar{x} \pm s$ 。

整、肠绒毛的破坏以及细胞脱落减少,但改善不明显。与 ETO 组和 PDTTC 组相比,SMW 组大鼠肠道基底层较完整,肠绒毛的破坏以及细胞脱落减少。以上结果提示,SMW 不仅可抑制肠道炎症细胞反应,还能修复肠道物理屏障。见图 1。

2.3 对血清 IL-1 $\beta$  水平的影响 ELISA 检测结果显示,与本组第 1 天相比,MOD 组造模第 7 天和第 21 天大鼠的血清 IL-1 $\beta$  水平显著增加( $P < 0.05$ ),提示 HUA 大鼠可能存在全身炎症状态。与本组第 7 天相比,SMW 组、ETO 组和 PDTTC 组大鼠第 21 天血清 IL-1 $\beta$  水平显著降低( $P < 0.05$ ),提示 SMW、ETO 和 PDTTC 能抑制全身炎症。见表 4。

2.4 对回肠组织 IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65 及 p-NF- $\kappa$ B p65 表达水平的影响 RT-qPCR 结果显示,与 CON 组相比,MOD 组大鼠回肠 IL-1 $\beta$  及 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 表达水平显著增加( $P < 0.05$ );与 MOD 组相比,SMW 组和 ETO 组大鼠回肠 IL-1 $\beta$  及 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),PDTTC 组大鼠回肠 IL-1 $\beta$  及 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 表达水平无明显差异( $P > 0.05$ );与 PDTTC 组相比,SMW 组大鼠回肠 IL-1 $\beta$  及 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。以上结果提示,SMW 和 ETO 可抑制 HUA 大鼠回肠 IL-1 $\beta$  和 NF- $\kappa$ B p65 的 mRNA 表达水平。见图 2。

Western blot 结果显示,与 CON 组相比,MOD 组大鼠回肠组织的 IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65 及 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平显著增加( $P < 0.05$ );与 MOD 组相比,SMW 组、ETO 组和 PDTTC 组大鼠回肠组织 IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65 及



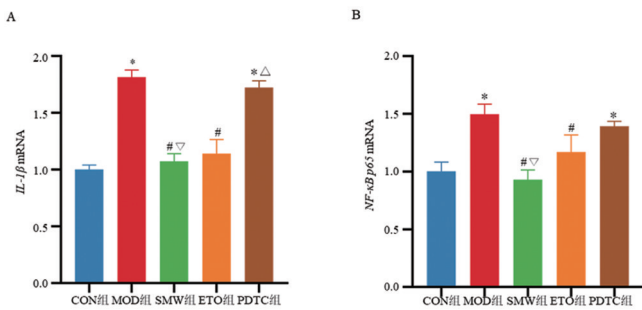
注:CON为空白对照,MOD为模型,SMW为四妙丸,ETO为依托考昔,PDTC为吡咯烷二硫代甲酸铵。

图1 各组大鼠回肠组织病理图(苏木精-伊红染色)

表4 各组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平变化( $\mu\text{g/L}$ )

组别	第1天	第7天	第21天
CON组	819.61 $\pm$ 36.78	840.88 $\pm$ 67.11	821.32 $\pm$ 45.02
MOD组	784.64 $\pm$ 52.65	939.71 $\pm$ 76.19*	929.81 $\pm$ 56.62*
SMW组	737.09 $\pm$ 47.40	903.19 $\pm$ 73.05*	750.83 $\pm$ 28.95#
ETO组	642.22 $\pm$ 57.52	829.04 $\pm$ 27.62*	679.72 $\pm$ 40.33#
PDTC组	752.82 $\pm$ 69.08	835.32 $\pm$ 68.41*	792.04 $\pm$ 68.30#

注:CON为空白对照,MOD为模型,SMW为四妙丸,ETO为依托考昔,PDTC为吡咯烷二硫代甲酸铵,IL-1 $\beta$ 为白细胞介素-1 $\beta$ 。与本组第1天相比,\* $P < 0.05$ ;与本组第7天相比,# $P < 0.05$ ;  $n=8, \bar{x} \pm s$ 。



注:A为回肠IL-1 $\beta$  mRNA表达水平,B为回肠NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达水平。CON为空白对照,MOD为模型,SMW为四妙丸,ETO为依托考昔,PDTC为吡咯烷二硫代甲酸铵,IL-1 $\beta$ 为白细胞介素-1 $\beta$ 基因,NF- $\kappa$ B p65为核因子- $\kappa$ B p65基因。与CON组相比,\* $P < 0.05$ ;与MOD组相比,# $P < 0.05$ ;与ETO组相比, $\Delta P < 0.05$ ;与PDTC组相比, $\nabla P < 0.05$ ;  $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图2 各组大鼠回肠组织IL-1 $\beta$ 和NF- $\kappa$ B p65的mRNA表达水平

p-NF- $\kappa$ B p65的蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与ETO组相比,SMW组大鼠回肠组织IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65及p-NF- $\kappa$ B p65的蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与PDTC组相比,SMW组大鼠回肠组织IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65的蛋白水平显著降低( $P < 0.05$ )。以上结果提示,SMW、ETO和PDTC均可抑制HUA大鼠回肠的炎症因子IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65及p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达,并且SMW的效果优于ETO和PDTC。见图3。

2.5 对回肠组织ABCG2蛋白和mRNA表达的影响 RT-qPCR结果显示,与CON组相比,MOD组大鼠回肠

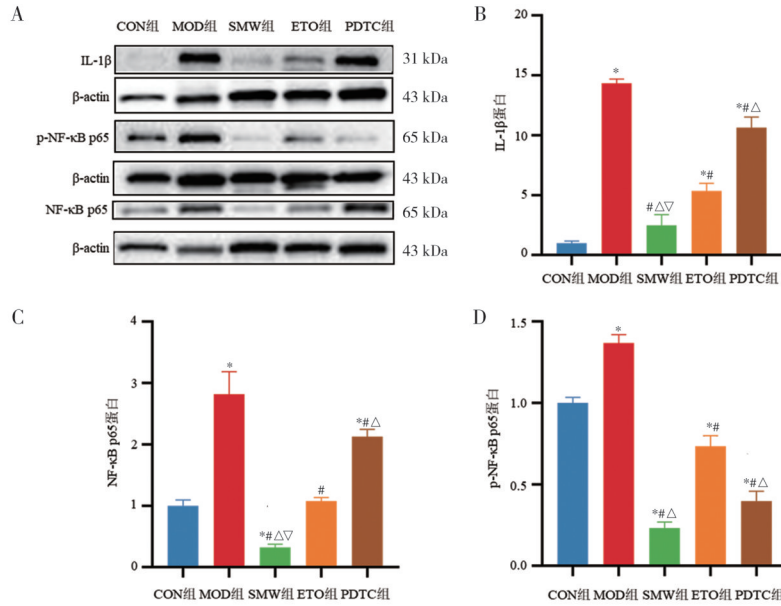
组织ABCG2的mRNA表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与MOD组相比,ETO组和PDTC组大鼠回肠组织ABCG2的mRNA表达水平升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),SMW组大鼠回肠组织ABCG2的mRNA表达水平显著升高( $P < 0.05$ );与ETO组和PDTC组相比,SMW组大鼠回肠组织ABCG2的mRNA表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。以上结果提示,SMW可上调HUA大鼠回肠尿酸转运蛋白ABCG2的mRNA表达水平。见图4。

Western blot结果显示,与CON组相比,MOD组大鼠回肠ABCG2的蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与MOD组相比,SMW组、ETO组和PDTC组大鼠ABCG2的蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ );与ETO组和PDTC组相比,SMW组大鼠ABCG2的蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。以上结果提示,SMW、ETO和PDTC均可上调HUA大鼠回肠尿酸转运蛋白ABCG2的蛋白表达水平。见图5。

2.6 对肠道ABCG2表达及分布的影响 IHC检测结果显示,与CON组相比,MOD组大鼠回肠中ABCG2的表达面积和IOD值(蛋白阳性表达水平)显著降低( $P < 0.05$ );与MOD组相比,SMW组大鼠回肠中ABCG2的表达面积和IOD值显著升高( $P < 0.05$ );与ETO组和PDTC组相比,SMW组大鼠回肠中ABCG2的表达面积和IOD值显著升高( $P < 0.05$ )。以上结果提示,SMW比起ETO、PDTC可增加HUA大鼠回肠尿酸转运蛋白ABCG2的蛋白表达水平。见图6。

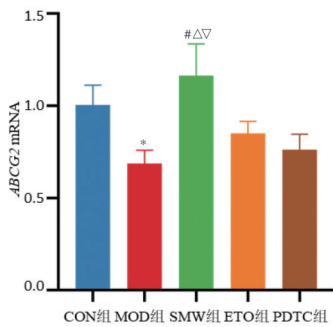
### 3 讨论

HUA是常见的代谢性疾病。有研究<sup>[22]</sup>表明,HUA状态即使没有导致痛风也会伴随炎症反应。本研究发现,MOD组大鼠高尿酸状态下肠道基底层改变,肠绒毛破坏以及细胞脱落,并伴有大量中性粒细胞浸润。与此同时,血清IL-1 $\beta$ 水平升高,回肠组织IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65及p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平升高。这些提示HUA能诱导IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B通路激活并导致全身及肠



注:A为各组相关蛋白表达条带图,B、C、D分别为各组相关蛋白表达水平。CON为空白对照,MOD为模型,SMW为四妙丸,ETO为依托考昔,PDTC为吡咯烷二硫代甲酸铵,IL-1β为白细胞介素-1β,NF-κB p65为核因子-κB p65,p-NF-κB p65为磷酸化核因子-κB p65,β-actin为β-肌动蛋白。与CON组相比,\* $P < 0.05$ ;与MOD组相比,# $P < 0.05$ ;与ETO组相比,Δ $P < 0.05$ ;与PDTC组相比,∇ $P < 0.05$ ;n=3,  $\bar{x} \pm s$ 。

图3 各组大鼠回肠组织IL-1β、NF-κB p65及p-NF-κB p65的蛋白表达水平



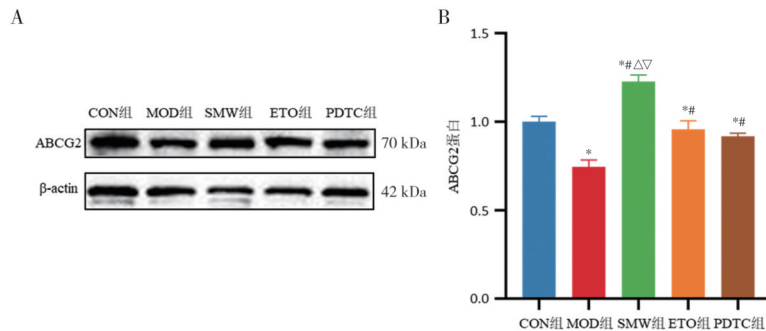
注:CON为空白对照,MOD为模型,SMW为四妙丸,ETO为依托考昔,PDTC为吡咯烷二硫代甲酸铵,ABCG2为ATP结合盒亚家族G成员2基因。与CON组相比,\* $P < 0.05$ ;与MOD组相比,# $P < 0.05$ ;与ETO组相比,Δ $P < 0.05$ ;与PDTC组相比,∇ $P < 0.05$ ;n=3,  $\bar{x} \pm s$ 。

图4 各组大鼠回肠组织ABCG2的mRNA表达水平  
道炎症的发生。

ABCG2是一种在肠黏膜上表达的高容量尿酸盐转

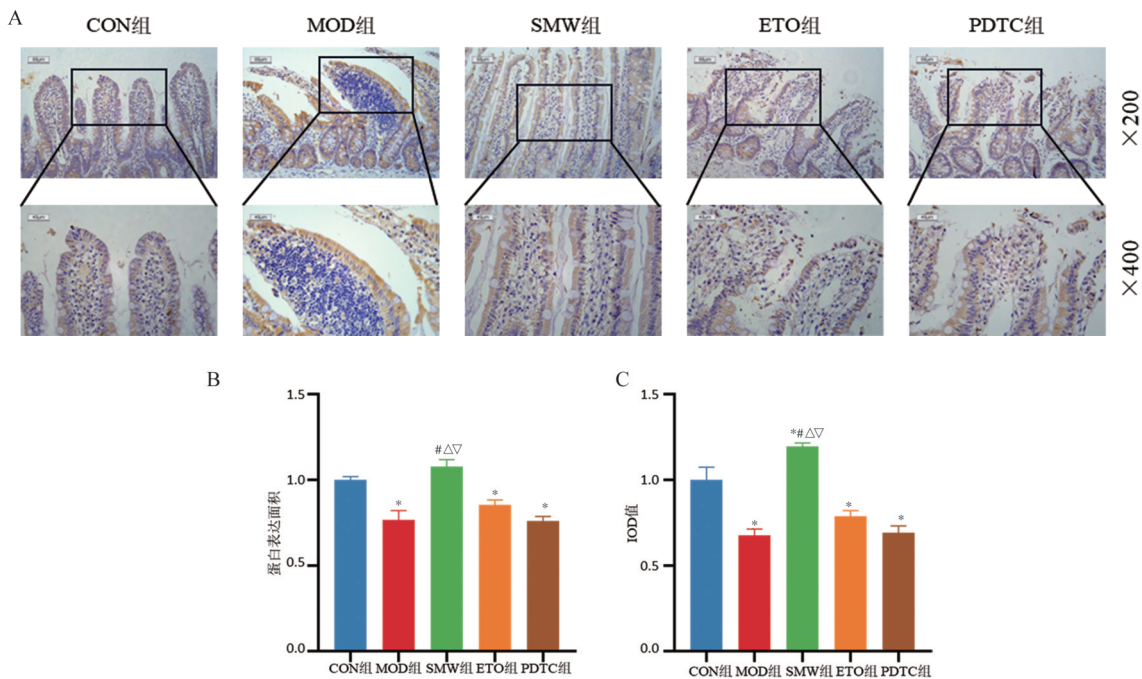
运蛋白,是尿酸肠道排泄的主要蛋白。有研究<sup>[15]</sup>表明,IL-1β可通过激活NF-κB降低PDZ结构域蛋白1(PDZK1)的表达,从而降低受PDZK1依赖的可溶性尿酸盐诱导的ABCG2表达水平<sup>[23]</sup>。本研究发现,MOD组大鼠高血尿酸状态诱发的肠道炎症期间,回肠组织IL-1β、NF-κB p65及p-NF-κB p65的蛋白表达水平升高,IL-1β、NF-κB p65的mRNA表达水平升高,而ABCG2蛋白及mRNA表达水平降低。这些提示IL-1β/NF-κB通路的激活能抑制回肠ABCG2蛋白及mRNA表达。

可溶性尿酸盐能活化IL-1β/NF-κB炎症通路<sup>[4, 24-25]</sup>。ETO为临床上用于治疗HUA炎症反应的代表性药物之一,是一种选择性环氧合酶-2(COX-2)抑制剂,通过抑制COX-2来发挥抗炎、镇痛和解热作用,而COX-2和NF-κB表达呈正相关<sup>[26]</sup>。此外,PTDC是



注:A为各组ABCG2蛋白条带图,B为各组ABCG2蛋白表达水平。CON为空白对照,MOD为模型,SMW为四妙丸,ETO为依托考昔,PDTC为吡咯烷二硫代甲酸铵,ABCG2为ATP结合盒亚家族G成员2。与CON组相比,\* $P < 0.05$ ;与MOD组相比,# $P < 0.05$ ;与ETO组相比,Δ $P < 0.05$ ;与PDTC组相比,∇ $P < 0.05$ ;n=3,  $\bar{x} \pm s$ 。

图5 各组大鼠回肠组织ABCG2的蛋白表达水平



注:A为免疫组织化学法检测 ABCG2 蛋白表达,B为 ABCG2 的蛋白表达水平的面积变化量化图,C为 ABCG2 蛋白表达水平的积分光密度(IOD)值变化量化图。CON 为空白对照,MOD 为模型,SMW 为四妙丸,ETO 为依托昔,PDTC 为吡咯烷二硫化甲磺酸铵,ABCG2 为 ATP 结合盒亚家族 G 成员 2。与 CON 组相比,\* $P < 0.05$ ;与 MOD 组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 ETO 组相比,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ;与 PDTC 组相比,<sup>∇</sup> $P < 0.05$ ;n=3, $\bar{x} \pm s$ 。

图 6 各组大鼠回肠 ABCG2 阳性表达的比较

NF-κB 的一种有效抑制剂,能抑制 NF-κB 磷酸化、阻止 NF-κB 易位入核,并减少下游细胞因子的表达<sup>[27]</sup>。

在本研究中,我们发现 SMW 组大鼠血清 IL-1β 水平较 MOD 组显著降低,且回肠组织中 IL-1β 的蛋白及 mRNA 表达水平较 MOD 组显著降低,优于 ETO 组和 PDTC 组,基本达到 CON 组水平,提示 SMW 能有效抑制 IL-1β 的表达,疗效优于单用消炎止痛药。NF-κB p65 的检测发现,SMW 干预后大鼠回肠组织中 NF-κB p65 的蛋白及 mRNA 表达水平较 MOD 组显著降低,优于 ETO 组和 PDTC 组,基本达到 CON 组水平,而 ETO 组又优于 PDTC 组。ETO 是 COX-2 抑制剂,通常位于 NF-κB 的下游。PDTC 是 NF-κB 复合体磷酸化抑制剂,可通过减少磷酸化入核的二聚体诱发级联反应<sup>[28]</sup>。ETO 和 PDTC 处于通路的相对下游,而 SMW 抑制 NF-κB p65 的效应优于二者,这可能与 SMW 能够多靶点抑制炎症通路有关。SMW 干预后大鼠回肠 p-NF-κB p65 蛋白表达水平较 MOD 组显著降低,并优于 ETO 组和 PDTC 组,基本达到 CON 组水平,这可能与 SMW 同时抑制炎症上游通路有关;PDTC 组优于 ETO 组,如前所述,可能由于 PDTC 主要抑制复合体磷酸化,因此其效果强于 ETO。SMW 干预后,大鼠回肠 ABCG2 蛋白及 mRNA 表达水平较 MOD 组显著升高,优于 ETO 组和 PDTC 组,这提示 SMW 能有效上调回肠组织尿酸盐转运蛋白 ABCG2 的表达水平,促进尿酸的肠道排泄,且其效果优于 ETO 和

PDTC。

在 HE 染色实验中,我们发现模型大鼠发生的肠道炎症反应及肠组织破坏经 SMW 干预后,炎症反应明显减轻,肠组织破坏明显改善,而 ETO 组和 PDTC 组大鼠仅炎症细胞浸润有所缓解,但组织破坏改善不明显,说明 SMW 不仅能抑制炎症反应引起的靶器官损伤,还具有肠上皮修复效应,具体机制尚需进一步研究。

SMW 是治疗痛风及 HUA 的经典方剂,但其作用机制尚不明确。现代基础医学研究致力于传承中医方剂的精华,并基于传统中医药理论,从炎症通路和病理产物的角度深入研究 SMW 清热祛湿的药理作用,以丰富和创新中医药理论。本研究发现,SMW 可通过抑制 IL-1β/NF-κB 炎症通路,发挥抗炎和清热的功效;SMW 通过上调肠道尿酸盐转运蛋白 ABCG2 表达,从而促进尿酸排泄,这一发现部分阐述了小肠泌别清浊的物质基础。在未来的研究中,我们将更加系统和深入地研究 IL-1β/NF-κB 通路调控 ABCG2 表达的机制以及 SMW 抑制 IL-1β/NF-κB 炎症通路的机制;同时,我们也会更加细化地研究 SMW 中的相关成分(如小檗碱、槲皮素、苍术素、芦丁等)对 ABCG2 表达的影响,以及进一步验证这些成分通过 IL-1β/NF-κB 通路调控 ABCG2 表达,从而降低血清尿酸改善 HUA 的机制。此外,中药复方具有多成分、多靶点、多效应的特点。本研究发现,SMW 在抑制炎症反应的过程中还有修复肠道上皮的作

用,但其具体机制尚待进一步研究。此外,对 SMW 有效成分及其现代药理作用的研究也需进一步深入,对 SMW 中医经典理论及中药药理学的现代解释和阐述需要更多基础和临床研究来进一步丰富和拓展。

### 参考文献:

- [ 1 ] MAIUOLO J, OPPEDISANO F, GRATTERI S, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 213:8-14.
- [ 2 ] 方宁远,吕力为,吕晓希,等.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.
- [ 3 ] KEENAN R T. The biology of urate [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2020, 50(3S):S2-S10.
- [ 4 ] YIN H, LIU N, CHEN J. The role of the intestine in the development of hyperuricemia[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:845684.
- [ 5 ] 吴越,刘维.基于网络药理学探讨四妙丸治疗痛风及高尿酸血症作用机制[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(9): 94-100.
- [ 6 ] 李萍,王银洁,曹义.四妙散加减对比秋水仙碱治疗痛风疗效和安全性的Meta分析[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(3): 449-452.
- [ 7 ] 吴水平.加味四妙散治疗湿热蕴结型痛风性关节炎临床观察[J]. *内蒙古中医药*, 2023, 42(5): 63-64.
- [ 8 ] 张永琪,陈杰伟,叶博闻,等.四妙丸上调高尿酸血症大鼠小肠 ABCG2 表达促进肠道尿酸排泄的作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(22): 33-39.
- [ 9 ] 陈杰伟,戴号,叶博闻,等.四妙丸对高尿酸血症大鼠肠道尿酸排泄影响的研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(3): 375-378.
- [ 10 ] ANDIA I, ABATE M. Hyperuricemia in tendons[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 920:123-132.
- [ 11 ] LIU P, MA G, WANG Y, et al. Therapeutic effects of traditional Chinese medicine on gouty nephropathy: Based on NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158:114199.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] VON WEDEL-PARLOW M, WÖLTE P, GALLA H J. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier *in vitro*[J]. *J Neurochem*, 2009, 111(1): 111-118.
- [ 14 ] EVSEENKO D A, PAXTON J W, KEELAN J A. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(4):595-601.
- [ 15 ] LU X, CHEN M, SHEN J, et al. IL-1 $\beta$  functionally attenuates ABCG2 and PDZK1 expression in HK-2 cells partially through NF- $\kappa$ B activation[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(3):279-289.
- [ 16 ] 张燕.基于网络药理学探究四妙丸治疗痛风的有效成分和作用机制[D]. 石家庄:河北大学, 2020.
- [ 17 ] FENG X, SUREDA A, JAFARI S, et al. Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: from mechanisms to therapeutics [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1923-1951.
- [ 18 ] NUTMAKUL T. A review on benefits of quercetin in hyperuricemia and gouty arthritis[J]. *Saudi Pharm J*, 2022, 30(7):918-926.
- [ 19 ] LI W, CHEN X, LI F, et al. Quercetin ameliorates hyperuricemic nephropathy by repressing uric acid synthesis and reabsorption in mice and cells[J]. *Efood*, 2024, 5(2): e139.
- [ 20 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版):四部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 282.
- [ 21 ] 吴丽.利湿活血方对高尿酸血症大鼠尿酸作用及对尿酸转运体的影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.
- [ 22 ] JOOSTEN L A B, CRIŞAN T O, BJORNSTAD P, et al. Asymptomatic hyperuricaemia: a silent activator of the innate immune system[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(2): 75-86.
- [ 23 ] CHEN M, LU X, LU C, et al. Soluble uric acid increases PDZK1 and ABCG2 expression in human intestinal cell lines via the TLR4-NLRP3 inflammasome and PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 20.
- [ 24 ] YIP K, COHEN R E, PILLINGER M H. Pillinger Asymptomatic hyperuricemia: is it really asymptomatic? [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2020, 32(1): 71-79.
- [ 25 ] YU M A, SÁNCHEZ-LOZADA L G, JOHNSON R J, et al. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(6): 1234-1242.
- [ 26 ] 刘华,陈纪伟.胃癌中 COX-2 基因的表达及其与 NF- $\kappa$ B 的相关性 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2007, 28(3): 369-372.
- [ 27 ] QIN J D, CAO Z H, LI X F, et al. Effect of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on NF- $\kappa$ B activation and CYP2E1 content of rats with immunological liver injury[J]. *Pharm Biol*, 2014, 52(11): 1460-1466.
- [ 28 ] KHANNA D, KHANNA P P, FITZGERALD J D, et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 2: therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64(10): 1447-1461.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2024-06-25