

樱桃果汁冻干粉通过调控尿酸转运蛋白减轻高尿酸性肾损伤

余惠凡¹, 周洁^{1,2}, 黄林生³, 桂利利¹, 吴正坤¹, 李飞^{1*}

(1. 湖北医药学院药学院, 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北十堰 442000)

(2. 谷城县人民医院药剂科, 湖北襄阳 441000) (3. 十堰市太和医院肝胆胰外科, 湖北十堰 442000)

摘要: 采用氧嗪酸钾连续腹腔注射 7 d 建立高尿酸血症 (Hyperuricemia, HUA) 小鼠模型, 灌胃樱桃果汁冻干粉 (Cherry Juice Freeze-Dried Powder, CJP)、苯溴马隆和别嘌醇干预 HUA, 试剂盒检测血清尿酸 (Uric Acid, UA)、肌酐 (Creatinine, Cr)、尿素氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN); 苏木素-伊红染色观察肝脏、肾脏病理改变; Western Blot 和免疫组化检测小鼠肾脏尿酸转运蛋白的表达水平。探究 CJP 通过调控尿酸转运蛋白减轻高尿酸性肾损伤作用。结果显示: CJP 高剂量组小鼠 UA 水平由 191.99 $\mu\text{mol/L}$ 降低至 113.12 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.01$) 但仍高于正常水平 25%, 而 Cr 水平由 16.09 $\mu\text{mol/L}$ 降低至 7.40 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.01$), BUN 水平由 8.24 mmol/L 降低至 4.73 mmol/L ($P<0.01$) 均达到正常水平。肾脏组织损伤改善明显。CJP 下调了尿酸重吸收蛋白尿酸盐转运体 1 (Urate Transporter 1, URAT1) 和葡萄糖转运蛋白 9 (Glucose Transporter 9, GLUT9), 上调了尿酸分泌蛋白三磷酸腺苷结合盒转运体成员 2 (ATP-Binding Cassette Superfamily G Member 2, ABCG2)、阴离子转运蛋白-1 (Anion Transporter 1, OAT1)、阴离子转运蛋白-3 (Anion Transporter 1, OAT3) 表达, 对肝脏无明显毒性。因此, CJP 可通过调控尿酸转运蛋白减轻高尿酸性肾损伤。该研究可为樱桃开发为防治尿酸性肾病的健康产品提供科学依据。

关键词: 樱桃果汁冻干粉; 高尿酸血症; 尿酸转运蛋白; 高尿酸性肾损伤; 肾保护

文章编号: 1673-9078(2025)03-72-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0017

Alleviation of Hyperuricemic Renal Injury Using Freeze-dried Cherry Juice Powder to Regulate Uric Acid Transporters

YU Huifan¹, ZHOU Jie^{1,2}, HUANG Linsheng³, GUI Lili¹, WU Zhengkun¹, LI Fei^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China) (2. Department of Pharmacy, Gucheng County People's Hospital, Xiangyang 441000, China) (3. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

Abstract: A hyperuricemia (HUA) mouse model was developed through intraperitoneal injection of potassium oxonate

引文格式:

余惠凡,周洁,黄林生,等. 樱桃果汁冻干粉通过调控尿酸转运蛋白减轻高尿酸性肾损伤[J]. 现代食品科技, 2025, 41(3):72-79.

YU Huifan, ZHOU Jie, HUANG Linsheng, et al. Alleviation of hyperuricemic renal injury using freeze-dried cherry juice powder to regulate uric acid transporters [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 72-79.

收稿日期: 2024-01-04

基金项目: 湖北省卫生健康委青年人才项目 (WJ2021Q010); “十四五”湖北省高等学校优势特色学科群 (生物与医药) 项目 (2022BMXXQT1)

作者简介: 余惠凡 (1993-), 男, 硕士, 实验师, 研究方向: 功能性食品研究与开发, E-mail: 20180523@hbm.edu.cn

通讯作者: 李飞 (1983-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 代谢性肾病药理学研究, E-mail: piaopodexinlifei@163.com

for 7 days to investigate the potential of CJP in alleviating hyperuricemic renal injury by regulating uric acid transporters. After intervention in the HUA model using freeze-dried cherry juice powder (CJP), benzbromarone, and allopurinol, serum uric acid (UA), creatinine (Cr), and blood urea nitrogen (BUN) were detected using commercially available kits. Pathological changes in the liver and kidney were determined using hematoxylin-eosin (HE) staining. Expression of uric acid transporters in mouse kidney was assessed using western blot and immunohistochemistry. The UA level in the high-dose CJP group decreased from 191.99 to 113.12 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.01$), remaining 25% higher than the normal level, whereas the Cr level decreased from 16.09 to 7.40 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.01$), and the BUN level decreased from 8.24 to 4.73 mmol/L ($P<0.01$). The latter two indicators reached normal levels, demonstrating a substantial alleviation of renal tissue injury. CJP downregulated the expression of two uric acid-reabsorbing proteins, urate transporter 1 and glucose transporter 9, while upregulating the protein expression of three uric acid-secreting proteins, ATP-binding cassette superfamily G member 2, anion transporter 1, and anion transporter 3, with no obvious liver toxicity. CJP thus alleviates hyperuricemic renal injury by regulating uric acid transporters. This study can serve as a scientific basis for the development of health products derived from cherry for preventing and treating hyperuricemic renal injury.

Key words: freeze-dried cherry juice powder; hyperuricemia; uric acid transporter; hyperuricemic renal injury; renoprotection

高尿酸血症 (Hyperuricemia, HUA) 是嘌呤碱代谢紊乱, 尿酸产生增加和 / 或排泄减少, 导致血尿酸水平异常升高的一种代谢性疾病。HUA 是痛风等疾病的重要生化基础^[1], HUA 已成为全球公共卫生问题, 被认为是与高血压等密切相关的独立危险因素^[2]。据 2021 年数据显示, 我国大陆 HUA 患病率为 16.4%, 并且呈现年轻化趋势^[3]。

尿酸在黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, XO) 的作用下由嘌呤核苷及嘌呤转化而来, XO 是尿酸生成的关键催化酶^[4]。尿酸经肾脏排泄量占机体尿酸排泄总量的 70%。临床研究显示, 排泄不良型 HUA 占原发性 HUA 的 90%^[5]。多种转运蛋白介导了肾小管对尿酸盐的重吸收和分泌, 其中包括葡萄糖转运蛋白 9 (Glucose Transporter 9, GLUT9) 和尿酸盐阴离子转运体 1 (Urate Anion Transporter 1, URAT1) 重吸收尿酸进入体循环^[6,7], 三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 (ATP-Binding Cassette Superfamily G Member 2, ABCG2) 和有机阴离子转运体 (Organic Anion Transporters, OATs) 家族中的 OAT3、OAT1 蛋白转运尿酸进入尿液^[8,9], 最终排出体外。

目前, 治疗 HUA 的药物主要有苯溴马隆 (Benzbromarone, Ben)、别嘌呤醇 (Allopurinol, AP) 和非布司他 (Febuxostat, Feb) 等, 但是长期应用这些药物会引起严重的肝、肾损伤^[10-12]; 现有的痛风治疗药物均存在严重的毒副作用和长期用药的安全性风险, 市场缺乏疗效佳、毒性低、病人可以长期

使用的抗痛风药物^[13]。因此, 在化学合成药之外, 从天然产物 (包括水果等) 中寻找、开发具有降尿酸、抗痛风活性和较少不良反应的安全有效的健康产品成为该领域研究热点之一。

樱桃 (Cherry, *Prunus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don) 为蔷薇科、李属、樱桃亚属、乔木型果树^[14]。我国樱桃栽培历史悠久, 种质资源丰富, 目前果树产业栽培的有甜樱桃 (*Prunus avium*)、酸樱桃 (*Prunus cerasus*)、中国樱桃 (*Prunus pseudocerasus*) 和毛樱桃 (*Prunus tomentosa*)^[15]。中国樱桃是传统的可食用水果, 果实色泽鲜艳, 体积偏小, 肉质较软, 果皮薄, 酸甜可口^[16]。中国樱桃活性成分主要为多酚类和黄酮类化合物如羟基肉桂酸、阿魏酸、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、木犀草苷等^[17,18], 这些黄酮类化合物大多具有较好的有抗炎^[17]、抗氧化^[18]作用。研究证实欧洲酸樱桃的摄入和痛风发作风险降低之间有相关性, 能明显降低血清尿酸水平和炎症反应^[19-21]。樱桃果实有降尿酸作用, 可缓解因痛风、关节炎所引起的不适^[22]。中国樱桃黄酮组分及其 6 种黄酮类单体成分可通过抑制高尿酸血症小鼠血清 XO 活性和肝脏 XO 的 mRNA 表达水平而抑制尿酸的生成, 还有抗氧化、抗炎作用^[23]。但是, 目前尚无中国樱桃通过调控尿酸转运蛋白减轻高尿酸性肾损伤的报道。鄂西北秦巴山区盛产的樱桃酸甜可口, 深受大众喜爱, 但是樱桃的开发利用远远不够^[24]。因此本研究通过腹腔注射氧嗪酸钾建立 HUA 小鼠模型, 探究樱桃果汁冻干粉 (Cherry Juice Freeze-

Dried Powder, CJP) 调控尿酸转运蛋白减轻高尿酸性肾损伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂

樱桃果汁冻干粉 (Cherry Juice Freeze-Dried Powder, CJP) 由实验室自制; 氧嗪酸钾 (156124), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 别嘌呤醇 (1322000988), 广州白云山制药股份有限公司; 苯溴马隆 (1800624), 宜昌东阳光药业股份有限公司; 血清尿酸 (Uric Acid, UA)、肌酐 (Creatinine, Cr)、尿素氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN) 水平检测试剂盒 (C012-2、C011-1、C013-2), 南京建成生物工程研究所; 苏木素-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 和二氨基联苯胺 (3,3'-Diaminobenzidine, DAB) 染色试剂盒 (C0105S、P0203), 上海碧云天生物技术股份有限公司; BCA 试剂盒 (PL212739), 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 蛋白 Marker、ECL 超敏发光液 (P1103、P1050), 北京普利莱基因技术有限公司; RIPA 裂解液 (9806S), 美国 Cell Signaling Technology 公司; Cocktail 蛋白酶抑制剂 (3235C020), 美国 Amresco 公司; 一抗: β -actin (4970S), 美国 Cell Signaling Technology 公司; GLUT9 (PA5-22966), 赛默飞世尔科技有限公司; URAT1 (250521), 美国 Abbiotec 公司; ABCG2、OAT3 (bs-0662R, bs-0609R), 北京博奥森生物技术有限公司及 OAT1 (ab135924), 英国 Abcam 公司; 二抗: 山羊抗兔抗体 (ab97051), 英国 Abcam 公司; 山羊抗小鼠抗体 (ab97023), 英国 Abcam 公司。

1.1.2 主要仪器

Elmasonic X-tra Basic 型超声机, 德国埃尔玛 (Elma) 公司; FreeZone 型真空冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; Spectra Max 190 型全自动酶联免疫检测仪, 美国 Molecular Devices 公司; RM2016 型石蜡切片机, 德国徕卡 (Leica) 公司; Mini-PowerPace Basic 通用型垂直电泳仪, 美国伯乐 (BioRad) 公司; TU-1900 型紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; ImageQuant LAS 4000 型凝胶成像系统, 美国通用电气 (GE) 公司; BX53 型正置生物显微镜, 奥林巴斯 (中国) 有限公司。

1.1.3 实验动物

雄性 ICR 小鼠 (体质量 18~22 g, SPF 级, 北京维通利华实验动物技术有限公司) 饲养于湖北医药学院实验动物中心, 合格证号: SCXK (京) 2016-0006。饲养过程中保证充足的水和饲料供应, 环境温度维持在 25 ± 2 °C, 相对湿度 50%~70%, 12 h 明暗交替。

1.2 实验方法

1.2.1 樱桃果汁冻干粉的制备

樱桃采于湖北省十堰市郧阳区, 经湖北医药学院附属人民医院中药资源学专家-张晓燕主任药师鉴定为蔷薇科, 李属, 樱桃亚属植中国樱桃 [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don]。超声提取方法参考文献^[25]。经挑选、去梗后, 称取鲜樱桃 600 g, 去核, 1:1 (m/V) 加入超纯水, 匀浆 20 min, 超声 (参数: 1 000 W、60 °C、25 kHz) 提取 20 min, 纱布过滤, 2 500 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 在 -80 °C、0.12 mbar 条件下经冷冻干燥 48 h 制得樱桃果汁冻干粉 (Cherry Juice Freeze-Dried Powder, CJP) 67.8 g, 得率为 11.3 g/100 g 鲜果, 与文献报道数据接近, 中国樱桃可溶性固形物量约 13.39 g/100 g 鲜果^[18]。冻干粉呈粉末状, 无凝结物, 无肉眼可见外来杂质, -80 °C 存放, 备用。

1.2.2 HUA 动物模型建立、分组及给药

参考文献方法^[26], ICR 小鼠 (SPF 级雄性) 56 只, 随机分为 Control、HUA、HUA+CJP 125 mg/kg、HUA+CJP 250 mg/kg、HUA+CJP 500 mg/kg、HUA+苯溴马隆 (20 mg/kg)、HUA+别嘌呤醇 (20 mg/kg) 共 7 个组, 8 只/组。Control 组腹腔注射 0.5% 羧甲基纤维素钠 (Sodium Carboxymethyl Cellulose, CMC-Na) 溶液 (质量分数), 另外 6 组腹腔注射 250 mg/kg 氧嗪酸钾, 1 h 后, 各组再灌胃相应治疗药物, 其中, Control 组和 HUA 组灌胃生理盐水, 连续 7 d。在取材前 12 h 禁食不禁水, 在末次给药 2 h 后, 取血, 离心收集血清, 冰箱中保存备用。切取部分肝组织中间部分置质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定。取一肾剥外膜, 置 4% 多聚甲醛溶液中保存, 另外一肾置 -80 °C 冰箱保存。上述所有取材操作均在冰上进行, 各组灌胃、腹腔注射给药均按照 0.4 mL/20 g 进行。

1.2.3 生化指标检测

按试剂盒说明书方法及要求进行小鼠血清 UA、

Cr、BUN 水平检测。

1.2.4 肾、肝组织HE染色

取浸泡于 4 wt.% 多聚甲醛溶液的肾、肝组织块，对其进行脱水、浸蜡包埋、切片，其中切片厚度为 4 μm ，按试剂盒说明书方法及要求对切片进行染色，显微镜观察并记录肾、肝组织病理形态。

1.2.5 Western Blot检测蛋白表达水平

取 30 mg 肾组织加入裂解液，经剪碎、匀浆、超声破碎后，在冰上静置裂解 30 min 后，经 12 000 r/min，离心 15 min，留取上清，即得总蛋白溶液。BCA 法测定总蛋白浓度，并根据结果稀释成同一浓度的样品，加入含有溴酚蓝和 β -巯基乙醇的蛋白上样缓冲液，煮沸 10 min，即得蛋白样品溶液。取等体积蛋白样品溶液经凝胶电泳，转膜，脱脂牛奶封闭，孵育一抗，洗膜，孵育辣根过氧化物酶偶联的二抗，洗膜，ECL 显色，凝胶成像分析系统检测、拍照、印迹灰度值分析。URAT1、GLUT9、ABCG2、OAT3、OAT1 和 β -actin，一抗均按 1:2 000 稀释，二抗均按 1:5 000 稀释。

1.2.6 免疫组化检测ABCG2、URAT1和GLUT9蛋白表达水平

取 1.2.2 中处理后的肾组织切片，经脱蜡、水化、血清封闭，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗 2 h，PBS 清洗 3 次，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育二抗，1 h，DAB 显色，苏木素染色，中性树胶封片，显微镜观察并记录 ABCG2、URAT1 和 GLUT9 的蛋白表达水平和定位。

1.2.7 统计学分析

数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析，多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)， $P < 0.05$ 时，组间有显著性差异。 $P < 0.01$ 时，组间有极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 樱桃果汁冻干粉能明显降低HUA小鼠血清尿酸、肌酐、尿素氮水平

人体内没有尿酸氧化酶，而小鼠体内有尿酸氧化酶，尿酸氧化酶可将尿酸 (Uric Acid, UA) 转化为水溶性尿囊素从尿液中排出，小鼠在自然情况下不会患 HUA。氧嗪酸钾为尿酸氧化酶抑制剂，抑制 UA 在小鼠体内分解为水溶性尿囊素，增加 UA 在小鼠体内的蓄积，建立 HUA 小鼠模型^[27]。为了评价樱桃果汁冻干粉 (Cherry Juice Freeze-Dried

Powder, CJP) 的降尿酸效果，本课题组选择临床常用的降尿酸药物—苯溴马隆和别嘌醇作为阳性对照药物来进行比较。苯溴马隆主要通过抑制肾小管上皮细胞的 URAT1 蛋白的表达，阻断肾小管对 UA 的重吸收，进而降低血 UA 水平^[28]，但对肝、肾有一定损伤。别嘌醇是一种口服黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, XO) 抑制剂，通过抑制 XO 活性，使 UA 生成减少而降低血 UA 水平^[29]，但容易导致严重过敏反应。血 UA 在体内具有双重作用，正常生理浓度的血 UA 具有抗氧化和抑制 DNA 损伤作用，当 UA 浓度低于正常水平时，体内抗氧化能力急剧下降可引起血管内皮细胞炎症反应和功能紊乱^[30]。血清肌酐 (Creatinine, Cr)、尿素氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN) 水平能反映肾脏功能。与 Control 组比较，HUA 组血清 UA 水平显著升高 ($P < 0.01$)，由 83.87 $\mu\text{mol/L}$ 升高至 191.99 $\mu\text{mol/L}$ ，约为 Control 组的 2.3 倍，说明小鼠 HUA 模型建立成功。HUA 组小鼠血清 Cr、BUN 水平明显升高 ($P < 0.01$)，Cr 水平由 10.35 $\mu\text{mol/L}$ 升高到 16.09 $\mu\text{mol/L}$ ，升高了 55.45%，BUN 水平由 4.13 mmol/L 升高到 8.24 mmol/L，升高了 99.51%，说明 HUA 引起了小鼠明显的肾损伤。与 HUA 组比较，樱桃果汁冻干粉低、中、高剂量组均能降低 HUA 小鼠 UA、Cr、BUN 水平，其中樱桃果汁冻干粉高剂量组小鼠 UA 水平由 191.99 $\mu\text{mol/L}$ 降低至 113.12 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$)，而 Cr 水平由 16.09 $\mu\text{mol/L}$ 降低至 7.40 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$)，BUN 水平由 8.24 mmol/L 降低至 4.73 mmol/L ($P < 0.01$) 达到正常水平。尽管 CJP 降尿酸效果比较显著。但是，尿酸水平仍高于正常水平 25%，后续我们可以继续加大 CJP 的摄入量，探究 CJP 能否将尿酸水平降到正常水平，这有待后续进一步研究。美国《关节炎与风湿病》杂志的一项研究报道，与不吃樱桃的痛风患者相比，每两天吃 3 份新鲜樱桃 (1 份大约 10~12 个樱桃) 或者摄入樱桃提取液的痛风患者痛风发作风险降低 35%^[31]。小鼠剂量为 500 mg/kg，根据小鼠与成人剂量换算系数为 0.11，成人剂量为 55 mg/kg，60 kg 成人每天 CJP 摄入量为 3.3 g。根据提取率 11.3 g/100 g 鲜果，换算成鲜果约为 29.2 g，中国樱桃单颗鲜果质量约为 2 g，约需要吃 15 颗，该研究可为痛风患者每日摄入樱桃量提供参考。本研究发现 20 mg/kg 别嘌醇将小鼠的血清尿酸水平降到了正常范围以下，有可能会引起血管内皮细胞炎症反应和功能紊乱，结果见表 1。

表 1 CJP对HUA小鼠血清尿酸、肌酐、尿素氮水平的影响

Table 1 The effect of CJP on the serum UA, Cr and BUN levels in HUA mice ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量 /(mg/kg)	UA/($\mu\text{mol/L}$)	Cr/($\mu\text{mol/L}$)	BUN/(mmol/L)
Control 组	—	83.87 $\pm$ 13.78	10.35 $\pm$ 1.08	4.13 $\pm$ 0.57
HUA 组	—	191.99 $\pm$ 20.39**	16.09 $\pm$ 2.18**	8.24 $\pm$ 0.25**
HUA+CJP 低剂量组	125	124.95 $\pm$ 16.75 [#]	10.01 $\pm$ 1.73 [#]	6.99 $\pm$ 0.18 [#]
HUA+CJP 中剂量组	250	121.09 $\pm$ 18.02 ^{##}	8.06 $\pm$ 1.40 ^{##}	6.44 $\pm$ 0.24 ^{##}
HUA+CJP 高剂量组	500	113.12 $\pm$ 10.64 ^{##}	7.40 $\pm$ 1.80 ^{##}	4.73 $\pm$ 0.21 ^{##}
HUA+ 苯溴马隆组	20	107.70 $\pm$ 14.69 ^{##}	7.20 $\pm$ 1.66 ^{##}	5.16 $\pm$ 0.29 ^{##}
HUA+ 别嘌呤醇组	20	6.56 $\pm$ 2.48 ^{##}	8.16 $\pm$ 1.21 ^{##}	4.39 $\pm$ 0.36 ^{##}

注：与正常对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

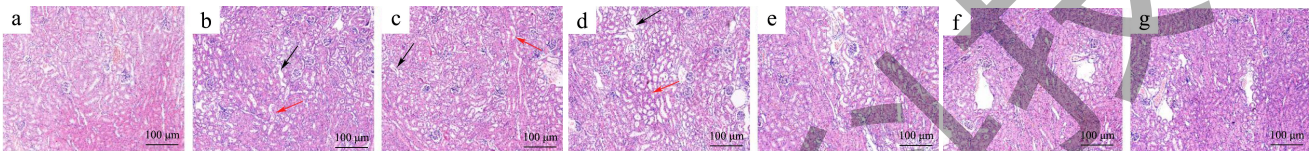


图 1 CJP 对 HUA 小鼠肾脏组织病理学的影响 (100 $\times$)

Fig.1 The effect of CJP on histopathology of kidney in mice with hyperuricemia (100 $\times$)

注：a 为 Control，b 为 HUA+Vehicle，c 为 HUA+Ben (20 mg/kg)，d 为 HUA+AP (20 mg/kg)，e 为 HUA+CJP (125 mg/kg)，f 为 HUA+CJP (250 mg/kg)，g 为 HUA+CJP (500 mg/kg)。图 2 同。

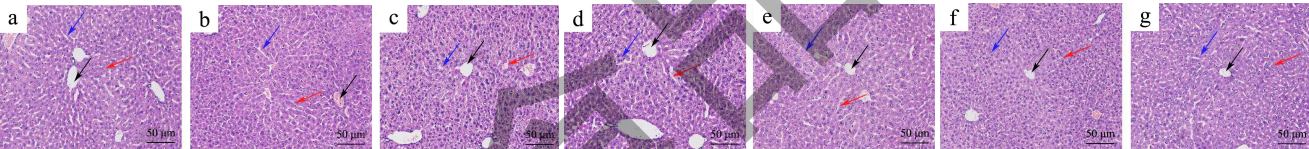


图 2 CJP 对 HUA 小鼠肝脏组织病理学的影响 (200 $\times$)

Fig.2 The effect of CJP on liver histopathology in HUA mice (200 $\times$)

2.2 樱桃果汁冻干粉可逆转HUA小鼠肾脏组织病理形态的异常且对肝脏组织形态无影响

董渭雪^[23]建立炎症小鼠模型，樱桃黄酮组分及 6 种黄酮类单体可以有效抗氧化、抗炎，即樱桃中的黄酮类化合物可以缓解炎症反应。但是，目前尚无中国樱桃通过调控尿酸转运蛋白减轻高尿酸性肾损伤的报道。因此本研究采用苏木素-伊红染色来探究樱桃果汁冻干粉对 HUA 小鼠肾脏和肝脏组织形态的影响。目前，治疗 HUA 的药物主要有苯溴马隆 (Benzbromarone, Ben)、别嘌呤醇 (Allopurinol, AP) 和非布司他 (Febuxostat, Feb) 等，本研究采用 Ben 和 AP 作为阳性对照药物治疗 HUA。苏木素-伊红染色是组织学最常用的染色方法之一。细胞核被苏木素染成的蓝紫色，细胞浆、肌纤维、胶原纤维等被伊红染成红色。与 Control 组比较，HUA 组、HUA+Ben 组、HUA+AP 组肾组织均出现肾小管扩

张 (黑色箭头)，管壁变薄和肾小管上皮萎缩 (红色箭头)，而 HUA+CJP 250 mg/kg，HUA+CJP 500 mg/kg 组没有明显异常，提示 CJP 可逆转 HUA 小鼠肾组织病理形态的异常，见图 1。各组肝脏组织的中央静脉 (黑色箭头) 位于肝小叶中央。正常组小鼠肝细胞排列有序，肝细胞索 (蓝色箭头) 和肝血窦 (红色箭头) 结构清晰、完整形态。与 Control 组比较，HUA 组肝细胞排列有序，结构清晰、完整，形态无明显异常。而 HUA+ 苯溴马隆组和 HUA+ 别嘌呤醇组出现肝血窦扩张，肝索排列紊乱，结构不清、不完整等异常改变。HUA+CJP 各组肝细胞排列有序，结构清晰、完整，也未见明显异常，见图 2。本课题组前期预实验发现，该地区樱桃果核提取物可致小鼠肝细胞水肿，可能与其果核中存在大量的氰苷类有毒物质有关^[32]，因此，本研究在样本处理过程中去除了樱桃核。

2.3 樱桃果汁冻干粉能显著下调HUA小鼠肾脏GLUT9、URAT1，上调ABCG2、OAT1和OAT3蛋白表达水平

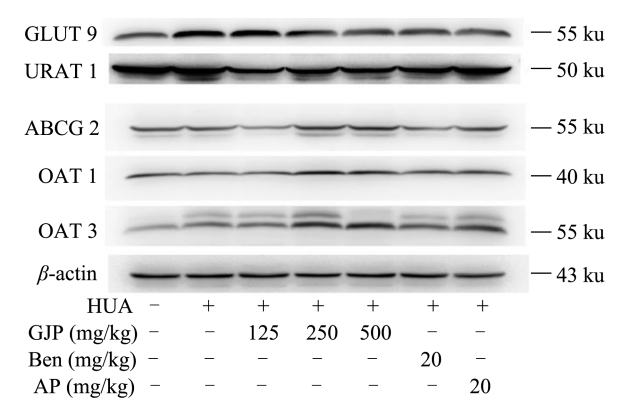


图 3 CJP 对 HUA 小鼠尿酸转运相关蛋白表达的影响
Fig.3 Effect of CJP on the expression of uric acid transport related proteins of HUA mice (n=3)

董渭雪^[23]建立高尿酸血症小鼠模型，并发现樱桃黄酮组分及 6 种黄酮类单体都可以抑制黄嘌呤氧化酶活性及其 mRNA 水平，降低尿酸水平，同时还可以缓解由高尿酸引起的机体过氧化和炎症，具有很好的治疗高尿酸血症的功效。但是，目前尚无中国樱桃通过调控尿酸转运蛋白减轻高尿酸性肾损伤的报道。另外，临床上，90% 的原发性 HUA 是由于尿酸排泄障碍，尿酸在体内蓄积所致。因此本研

究采用免疫印迹法来探究樱桃果汁冻干粉对 HUA 小鼠肾脏尿酸转运蛋白表达的影响。尿酸的排泄大部分通过肾脏排泄，并且主要受肾脏上的尿酸转运蛋白的调控，其中包括 GLUT9 和 URAT1 重吸收进入体循环，OAT1、OAT3 和 ABCG2 转运尿酸进入尿液。与 HUA 组比较，CJP 低、中、高剂量均能明显下调 HUA 小鼠肾组织 URAT1 和 GLUT9 蛋白表达水平。中、高剂量 CJP 可显著上调 HUA 小鼠肾组织 ABCG2、OAT1 和 OAT3 蛋白表达水平，并呈现剂量依耐性。结果说明 CJP 可抑制尿酸重吸收，促进尿酸分泌，发挥降血尿酸作用。见图 3。

2.4 樱桃果汁冻干粉能显著下调HUA小鼠肾脏GLUT9、URAT1，上调ABCG2表达

免疫组织化学染色法是组织学中对目标蛋白进行定位、定性及定量的研究最常用的染色方法之一。细胞核被苏木素染成的蓝紫色，目标蛋白被标记成棕黄色。ABCG2、URAT1 表达在肾脏近端小管顶膜（蓝色箭头），GLUT9 同时在肾脏近端小管基底膜（绿色箭头）和顶膜（蓝色箭头）表达。与正常对照组比较，HUA 组可明显上调（棕色变深）HUA 小鼠肾脏 URAT1 和 GLUT9 蛋白表达水平，而明显下调（棕色变浅）ABCG2 蛋白表达，CJP 干预 HUA 后可逆转 HUA 所致的改变，与蛋白免疫印迹结果一致。见图 4。

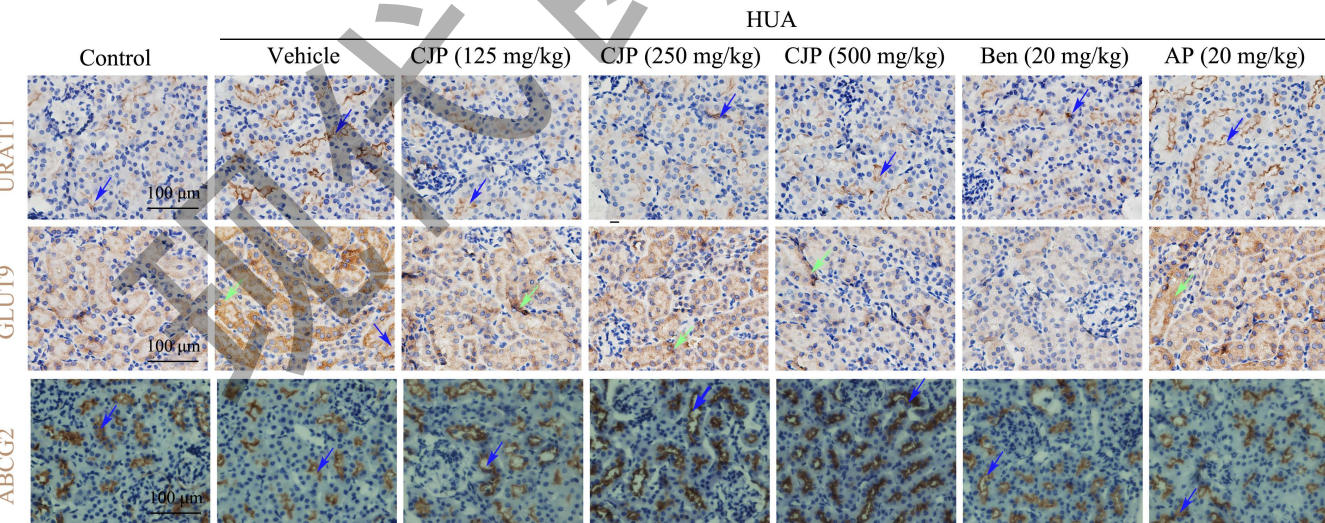


图 4 CJP 对 HUA 小鼠肾脏 URAT1、GLUT9 和 ABCG2 蛋白表达的影响 (400 ×)
Fig.4 The effect of CJP on the expression of URAT1, GLUT9 and ABCG2 protein in HUA mouse kidney (400×)

3 结论

我国樱桃栽培历史悠久,种质资源丰富,中国樱桃的果实品质、物质组成、抗氧化、抗炎、降尿酸、抑制黄嘌呤氧化酶的活性已经明确。本课题组首次发现樱桃果汁冻干粉可通过下调 HUA 小鼠肾脏尿酸重吸收蛋白,上调尿酸分泌蛋白表达水平而发挥降尿酸作用。更令人惊喜的是,樱桃果汁冻干粉在具有良好的降尿酸治疗作用下,还可逆转 HUA 小鼠肾脏组织病理形态的异常且对肝脏组织形态无影响。樱桃果汁冻干粉具有安全性高、副作用更小的优势,这为开发以中国樱桃为原料的降尿酸,抗高尿酸肾病、抗痛风健康产品提供了理论依据。本研究的不足之处在于,尽管 500 mg/kg 樱桃果汁冻干粉降尿酸效果比较显著。但是,尿酸水平仍高于正常水平 34.87%,后续可以继续加大樱桃果汁冻干粉的摄入量,探究樱桃果汁冻干粉能否将尿酸降到正常水平。正常浓度的尿酸对维持人体氧化-还原反应体系、维持血压等有重要作用,因此还需设立樱桃提取物高剂量组对正常小鼠血尿酸影响的实验组进行对照,如果樱桃对正常血 UA 水平有降低作用,这将是樱桃的潜在不良反应,这些都有待于后续进一步研究。

参考文献

- [1] DANVE A, SEHRA S T, NEOGI T, et al. The role of diet in hyperuricemia and gout [J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2021, 33(2): 135-144.
- [2] 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]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17): 9221-9240.
- [3] LI Y, SHEN Z Y, ZHU B W, et al. Demographic, regional and temporal trends of hyperuricemia epidemics in mainland China from 2000 to 2019: a systematic review and meta-analysis [J]. *Global Health Action*, 2021, 14(1): 1874652.
- [4] OJHA R, SINGH J, OJHA A, SINGH H, et al. An updated patent review: xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia and gout (2011-2015) [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2017, 27(3): 311-345.
- [5] ICHIDA K, MATSUO H, TAKADA T, et al. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia [J]. *Nature Communications*, 2012, 3(1): 764.
- [6] SAKURAI H. Urate transporters in the genomic era [J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2013, 22(5): 545-550.
- [7] WILLIAMS S E, REED A A, GALVANOVSKIS J, et al. Uromodulin mutations causing familial juvenile hyperuricaemic nephropathy lead to protein maturation defects and retention in the endoplasmic reticulum [J]. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18(16): 2963-2974.
- [8] HUANG J Q, WANG S W, ZHU M Z, et al. Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(9): 1943-1947.
- [9] KOMAZAWA H, YAMAGUCHI H, HIDAKA K, et al. Renal uptake of substrates for organic anion transporters OAT1 and OAT3 and organic cation transporters OCT1 and OCT2 is altered in rats with adenine-induced chronic renal failure [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 102(3): 1086-1094.
- [10] 刘杨从,李妍,张耕.18例苯溴马隆不良反应/事件分析[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(6): 507-510.
- [11] 谢建翔,别嘌醇严重不良反应19例分析[J]. *药学与临床研究*, 2013, 21(1): 94-95.
- [12] 胡磊,郭珩,赵瑛,等.非布司他致不良反应文献分析[J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(13): 1595-1600.
- [13] 赵彤.靶向URAT1的新型稠杂环类抗痛风先导化合物及候选药物的发现[D]. 济南:山东大学, 2022.
- [14] 李玉生,程和禾,陈龙,等.中国樱桃与甜樱桃种质资源在我国的分布[J]. *河北果树*, 2019, 2: 3-4, 7.
- [15] 刘馨娜,贾丽娜,苑宁,等.樱桃的研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(4): 17-19.
- [16] 贾海慧,张小燕,陈学森,等.甜樱桃和中国樱桃果实性状的比较[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2007, 2: 193-195, 202.
- [17] 付全娟,魏国芹,孙杨,等.樱桃次生成分及生物活性研究进展[J]. *北方园艺*, 2016, 7: 198-201.
- [18] 曹锦萍.樱桃果肉中抗氧化和免疫调节活性物质的分离与结构鉴定[D]. 杭州:浙江大学, 2015.
- [19] ZHOU Z, NAIR M G, CLAYCOMBE K J. Synergistic inhibition of interleukin-6 production in adipose stem cells by tart cherry anthocyanins and atorvastatin [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(10): 878-881.
- [20] HILLMAN A R, UHRANOWSKY K. Acute ingestion of montmorency tart cherry reduces serum uric acid but has no impact on high sensitivity c-reactive protein or

- oxidative capacity [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2021, 76: 83-89.
- [21] LAMB K L, LYNN A, RUSSELL J, et al. Effect of tart cherry juice on risk of gout attacks: protocol for a randomised controlled trial [J]. *BMJ Open*, 2020, 10(3): 81-88.
- [22] 李本波.百果第一枝 樱桃[J].*中国果菜*,2014,34(3):8-15.
- [23] 董渭雪.樱桃黄酮组分及降尿酸作用研究[D].汉中:陕西理工大学,2020.
- [24] 朱先波,柯艳,肖丽,等.十堰市樱桃产业发展的思考[J].*湖北农业科学*,2016,55(24):6464-6466.
- [25] 金丹莉,段文慧,朱郑裕,等.玉米须水提物的抗氧化及降尿酸活性[J].*现代食品科技*,2023,39(7):16-23.
- [26] 余惠凡,黄林生,韩俊祥,等.木犀草素对高尿酸血症小鼠降尿酸作用及其机制研究[J].*时珍国医国药*,2021,32(5): 1071-1074.
- [27] 王琳,沈嘉艳,谢招虎,等.高尿酸血症动物模型研究进展[J].*中国实验动物学报*,2023,31(1):112-119.
- [28] 周启蒙,赵晓悦,梁宇,等.治疗高尿酸血症相关药物研究新进展[J].*中国新药杂志*,2021,30(10):929-936.
- [29] 康敬敬,郭二呢,王文静,等.非布司他与别嘌醇治疗慢性肾脏病合并高尿酸血症患者对比分析[J].*内科*,2021, 16(6):726-729.
- [30] AMES B N, CATHCART R, SCHWIERS E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, 78(11): 6858-6862.
- [31] ZHANG Y Q, TUHINA N, CLARA C, et al. Cherry consumption and decreased risk of recurrent gout attacks [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2012, 64(12): 4004-4011.
- [32] 郭忠,张文德.食品中的氰化物来源及其安全性的研究进展[J].*中国食品卫生杂志*,2014,26(4):404-408.