

# 高尿酸血症细胞模型的构建及其在降尿酸肽筛选中的应用

刘丹<sup>1</sup>, 任娇艳<sup>1</sup>, 梁明<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665)

**摘要:** 高尿酸血症是由于嘌呤代谢紊乱使尿酸生成增加和(或)排泄减少所致的代谢性疾病, 是引起痛风的重要生化基础。本文建立了一种高尿酸血症肝细胞模型, 并研究了乳清蛋白肽的降尿酸活性。具体步骤为: 将肝细胞铺板, 分为空白对照组和模型组, 48 h后, 模型组给予一定浓度的腺苷溶液, 空白对照组给予基础培养基, 36 h后, 加入黄嘌呤氧化酶继续孵育 12 h, 收集细胞上清液, 高效液相测定尿酸含量。结果显示模型组尿酸含量显著高于空白对照组, 且腺苷的最佳诱导浓度、细胞铺板密度及诱导时间分别为 2.5 mmol/L、 $10^5$  个/mL、36 h。采用最佳建模条件, 将非布索坦和乳清蛋白肽用于该模型, 结果显示相对于模型组, 非布索坦组尿酸含量显著降低, 并呈一定的浓度剂量效应, 该结果进一步表明高尿酸血症模型构建成功。采用乳清蛋白酶解液孵育肝细胞后, 当乳清蛋白肽达到一定浓度时, 相对于模型组其尿酸生成量显著降低, 表明乳清蛋白酶解物具有一定的降尿酸活性。

**关键词:** 高尿酸血症; 尿酸; 腺苷; 乳清蛋白肽

文章编号: 1673-9078(2017)8-72-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.012

## Establishment of the Cell Model of Hyperuricemia and Its Application in Screening Food-derived Anti-hyperuricemic Peptides

LIU Dan<sup>1</sup>, REN Jiao-yan<sup>1</sup>, LIANG Ming<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Infinitus Company Limited, Guangzhou 510665, China)

**Abstract:** Hyperuricemia is a metabolic disease caused by purine metabolic disorders that lead to the overproduction and (or) reduced excretion of uric acid, and is an important biochemical basis for gout. In the present study, a cell model of hyperuricemia was established and the anti-hyperuricemic activity of whey protein-derived peptides was studied. The hepatic (LO<sub>2</sub>) cells were seeded into a 24-well plate and divided into two groups—normal control and model groups. After 48 h of incubation, the model group was incubated with adenosine-containing medium, while the control group was incubated with fresh basal medium. After further incubation for 36 h, xanthine oxidase was added and the incubation was continued for another 12 h. Finally, the cell culture supernatants were collected and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) assays. The results demonstrated that the uric acid level of model group was significantly higher than the normal control group, and the optimal adenosine concentration for incubation, cell plating density, and optimal incubation time were 2.5 mmol/L,  $10^5$  cell/mL, and 36 h, respectively. Under the best conditions for model construction, febuxostat and whey protein hydrolysate were used to evaluate the anti-hyperuricemic activity of the model, and the results showed that the uric acid content of febuxostat group was markedly decreased in a dose-dependent manner, further suggesting that the hyperuricemia model was successfully established. After hepatic cells were incubated with whey protein hydrolysate, when whey protein-derived proteins reached a certain concentration, the level of uric acid decreased significantly compared with that of model group, indicating that whey protein hydrolysates exhibited anti-hyperuricemic activity.

**Key words:** hyperuricemia; uric acid; adenosine; whey protein-derived peptides

收稿日期: 2017-02-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671804); 广东省自然科学基金杰出青年基金项目(S2013050013954); 教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-13-0213); “广东特支计划”科技青年拔尖人才项目(2014TQ01N645)

作者简介: 刘丹(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与健康

通讯作者: 任娇艳(1980-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品营养与健康

高尿酸血症是嘌呤合成代谢增强和(或)尿酸排泄减少所致的一种代谢性疾病<sup>[1,2]</sup>。高尿酸血症不仅是引起痛风的重要生化基础,而且与高血压、高血脂、肥胖和胰岛素抵抗等代谢综合征的发生和发展密切相关,故高尿酸血症已成为威胁人类健康的重要疾病<sup>[3-7]</sup>。因此,对高尿酸血症及痛风的防治研究日益重要。

目前治疗高尿酸血症主要有三类药物:抑制尿酸生成药物、促进尿酸排泄药物以及促进尿酸分解药物<sup>[8-11]</sup>。抑制尿酸生成的药物主要指黄嘌呤氧化酶抑制剂,常见的有别嘌呤醇和非布索坦<sup>[12-14]</sup>。虽然这类药物疗效显著,但是副作用明显,主要是对肝功能、肾功能和心肌功能的损伤<sup>[15,16]</sup>。促进尿酸排泄的药物是通过抑制肾小管对尿酸的重吸收,增加尿酸的排泄来降低体内的尿酸含量,主要包括丙磺舒、苯磺唑酮和苯溴马隆,但是对肾功能有一定损害<sup>[17-19]</sup>。促进尿酸排泄的药物主要是尿酸酶及其修饰物,例如拉布立酶,其作用是催化尿酸生成尿酸囊素,疗效显著,但易引起超敏反应,且价格昂贵,不利于临床应用<sup>[20,21]</sup>。因此寻找安全、有效、经济的降尿酸药物对高尿酸血症的预防和治疗有着重要的意义。目前筛选降尿酸药物多采用高尿酸血症动物模型进行体内筛选或者在体外筛选黄嘌呤氧化酶<sup>[22-24]</sup>。采用高尿酸血症细胞模型筛选降尿酸药物的报道比较少见,因此本研究拟构建高尿酸血症细胞模型用于高尿酸血症药物的筛选。近年来有研究显示,奶及奶制品的摄入对痛风有预防作用<sup>[25]</sup>,特别是酪蛋白和乳清蛋白含量高的奶制品。因此以乳清蛋白为原料,寻找到具有降尿酸作用的乳清蛋白肽,可以作为治疗高尿酸血症的潜力药物。

人体内嘌呤主要经肝脏代谢生成尿酸,经肾脏代谢随尿液排出体外,因此本研究以人肝细胞为基础,以尿酸生成的前体物质腺苷为诱导物构建一种体外高尿酸血症细胞模型,并对诱导物浓度、细胞密度和诱导时间等因素进行了优化,并将临床治疗高尿酸血症药物非布索坦运用于该模型,研究发现非布索坦具有明显的降尿酸作用,并呈一定的浓度剂量关系。此外,本文将乳清蛋白肽用于该模型,发现当乳清蛋白肽达到一定的浓度时,具有显著的降尿酸活性。若后期对该乳清蛋白肽进行分离纯化,很可能开发出治疗高尿酸血症和痛风的高效活性肽。因此,高尿酸血症细胞模型构建可为后期筛选食源性降尿酸因子提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

LO<sub>2</sub>细胞,中山大学医学院提供。

RMPI1640 培养基、胎牛血清、PBS、0.25%胰蛋白酶,美国 Gibco 公司;黄嘌呤氧化酶,美国 Sigma 公司;磷酸二氢钾,广东光华科技股份有限公司;乙腈,永华化学科技(江苏)有限公司;戊烷磺酸钠、次黄嘌呤,上海瑞永生物科技有限公司;腺嘌呤、腺苷、肌苷,北京博奥拓达科技有限公司;黄嘌呤、尿酸、别嘌呤醇,国药集团化学试剂有限公司;非布索坦,江苏万邦生化医药股份有限公司;WPC80 浓缩乳清蛋白粉,产地为美国哥伦比亚,广州市比灵天然配料有限公司;碱性蛋白酶,南宁庞博生物工程有限公司。

### 1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪,日本岛津公司;BioTek 酶标仪,美国 BioTek 公司;分析天平,上海民桥精密科学仪器有限公司;倒置显微镜,德国 Leica 公司;CO<sub>2</sub> 培养箱,美国 Thermo Scientific 公司;自动高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂;精密 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 乳清蛋白肽的制备及蛋白质回收率的测定

称取乳清蛋白粉,按比例加入去离子水,使底物浓度为 6%,混匀后置于 50 °C 摇床中温育 30 min,加入碱性蛋白酶,加酶量为 4%,在 50 °C 和 pH 8.0 (酶解过程中用 0.1 mol/L 的氢氧化钠维持 pH 8.0)的条件下,酶解 4 h。酶解结束后于 100 °C 煮沸 10 min 灭酶,然后于 4 °C、3000 r/min 下离心 25 min,过滤,收集上清液,冻干保存。称取乳清蛋白酶解液冻干粉,用完全培养基配制成 10、5、2.5、1.25 和 0.625 mg/mL 酶解液。

参照 GB 5009.5-85,采用凯氏定氮法分别测定原料蛋白、酶解液蛋白含量(%)以及酶解后上清液的质量,按照下列公式计算蛋白质回收率:

$$\text{蛋白质回收率(\%)}=100\times C\times M/m$$

式中: C 表示酶解液蛋白质含量,%; M 表示酶解离心过滤后上清液的质量, g; m 表示原料蛋白质的含量, g。

#### 1.3.2 反相高效液相色谱法测定细胞上清液中尿酸的含量

色谱柱: Varian Microsorb-MV C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A: 0.2 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.52 mmol/L 戊烷磺酸钠(pH 4.0);流动相 B: 0.2 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.52 mmol/L 戊烷磺酸钠, 10%乙腈(pH 4.0);柱温 35 °C,检测波长 254 nm,进样量 20 μL,流速 1

mL/min。

取细胞上清液 1 mL, 过膜 (0.22  $\mu\text{m}$ ), HPLC 分析上清液中物质的含量, 用尿酸标曲定量。

### 1.3.3 诱导物的筛选

取对数生长期的 LO<sub>2</sub> 细胞以 10<sup>5</sup> 个/mL 密度接种于 24 孔板上, 设为 2 组, 分别为空白对照组, 模型组, 每组 3 孔, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后, 去除培养基, 空白对照组加基础培养基, 模型组加 1 mmol/L 的诱导物 (腺嘌呤、腺苷) 溶液继续孵育 24 h 后取出细胞上清液, 高效液相分析细胞上清液中各物质的含量。

### 1.3.4 诱导物浓度、细胞密度和诱导时间的优化

取对数生长期的 LO<sub>2</sub> 细胞以 10<sup>5</sup> 个/mL 的密度接种于 24 孔板上, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后, 去除培养液, 分别加入不同浓度的腺苷溶液 (0.1~10 mmol/L), 每个浓度设置 3 个平行孔, 继续培养 24 h 后取出细胞上清液, 高效液相分析, 筛选出最佳诱导物腺苷浓度。

将生长状态良好的 LO<sub>2</sub> 细胞以不同密度接种于 24 孔板上, 每组设置 3 个平行孔, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后, 去除培养液, 添加一定浓度的腺苷溶液, 继续培养 24 h 后取出细胞上清液, 高效液相分析, 筛选出细胞最佳铺板密度。

将 LO<sub>2</sub> 细胞以一定的密度接种于 24 孔板上, 于培养箱中培养 48 h 后, 去除培养液, 加腺苷溶液, 继续培养, 每隔 6 h 取出一组细胞上清液, 高效液相分析, 筛选出最优诱导时间。

### 1.3.5 细胞毒性实验 (MTT 实验)

LO<sub>2</sub> 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (青霉素、链霉素) 的 RPMI1640 培养基 (pH 7.2) 培养, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。细胞消化液为含 0.25% 胰蛋白酶, 每 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

将生长状态良好的肝细胞以 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/mL 的密度接种于 96 孔板上, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 共设 5 组, 分别为正常对照组, 模型组, 非布索坦低、中、高剂量组, 每组 5 孔, 于细胞培养箱中培养 24 h 后, 去除培养液, 正常对照组和模型组加入新鲜的培养基, 非布索坦低、中、高剂量组分别加入 0.02、0.2、2 mmol/L 的非布索坦溶液孵育 24 h, 乳清蛋白肽组分别加不同浓度的多肽溶液孵育 24 h, 去除上清, PBS 清洗 3 次, 空白对照组加完全培养基, 模型组、阳性药物和乳清蛋白肽组加 2.5 mmol/L 腺苷溶液, 继续培养 36 h, 然后每孔加入 20  $\mu\text{L}$ 、5 mg/mL MTT 溶液孵育 4 h, 去除上清,

每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 振荡 15 min 后用酶标仪测定各孔在波长 490 nm 处的吸光值。

### 1.3.6 高尿酸血症细胞模型的构建和乳清蛋白肽降尿酸活性的研究

将生长状态良好的肝细胞制成细胞悬液, 铺板, 设为 3 组, 分别为空白对照组、模型组、阳性药物组和乳清蛋白肽组, 贴壁生长 24 h 后, 空白对照组和模型组加入完全培养基, 阳性药物组加入不同浓度的非

布索坦溶液, 乳清蛋白肽组加入不同浓度的乳清蛋白酶解液孵育 24 h 后, 去除上清液, PBS 清洗三次, 空白对照组加入完全培养基, 模型组、阳性药物组和乳清蛋白多肽组加入腺苷溶液继续孵育 36 h, 加入黄嘌呤氧化酶使浓度为 0.005 U/mg, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中反应 12 h 后取出, 高效液相测定细胞上清液中尿酸含量。

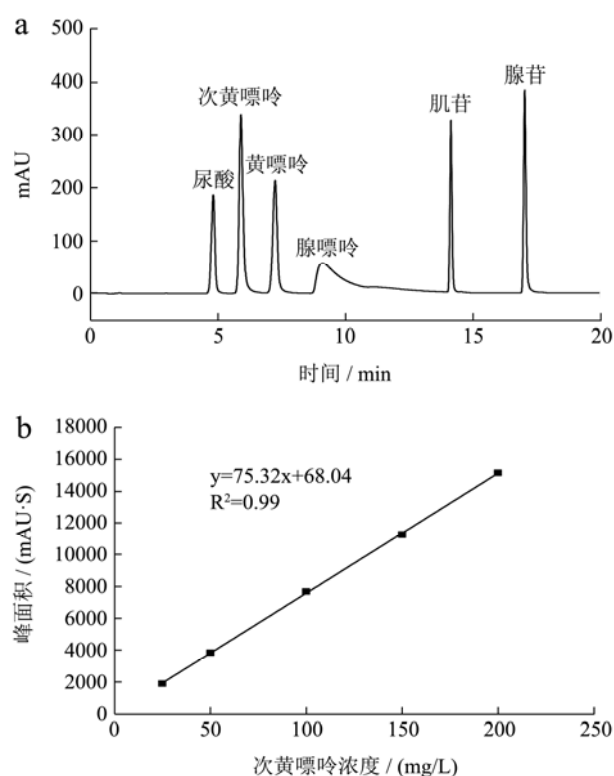
### 1.3.7 数据分析

实验结果均用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示。采用美国 IBM 公司的 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。以  $p < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效液相法测定细胞上清液中尿酸含量

由图 1a 的高效液相图谱可知在该条件下, 可以将混合标准样品完全分离, 因此可以采用该条件对细胞上清液中的尿酸及嘌呤物质进行定性及定量分析。



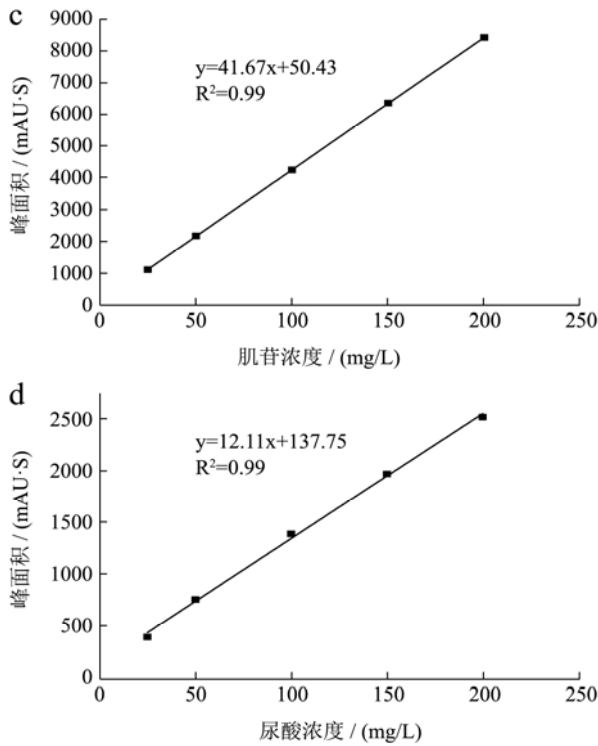


图1 混标高效液相色谱图 (a)、次黄嘌呤标准曲线 (b)、肌苷标准曲线 (c) 和尿酸标准曲线 (c)

Fig.1 Chromatogram of 100 mg/L standards of purine bases (a), standard curve of hypoxanthine (b), inosine (c), and uric acid

(d)

2.2 诱导物的筛选

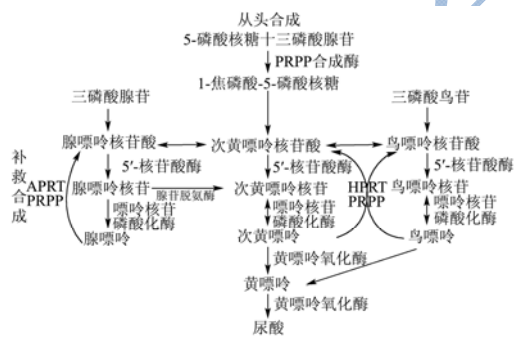


图2 尿酸代谢途径

Fig.2 Metabolic pathway of uric acid synthesis

图2为尿酸代谢途径<sup>[26]</sup>,从图中可知,腺嘌呤和腺苷是尿酸生成途径中的中间产物,因此本实验选择以腺嘌呤和腺苷为诱导物,检测其在肝细胞中能否代谢生成尿酸。

由图3a知,当腺嘌呤为诱导物时,细胞上清液中腺嘌呤未发生变化,肝细胞无法将腺嘌呤转化为其他物质,可能是因为肝细胞缺少相应酶或者转运体将腺嘌呤进一步转化生成其他物质。但当诱导物为腺苷时,肝细胞可将腺苷进一步转为肌苷和次黄嘌呤(图3b),因此选择腺苷为诱导物构建高尿酸血症细胞模型。

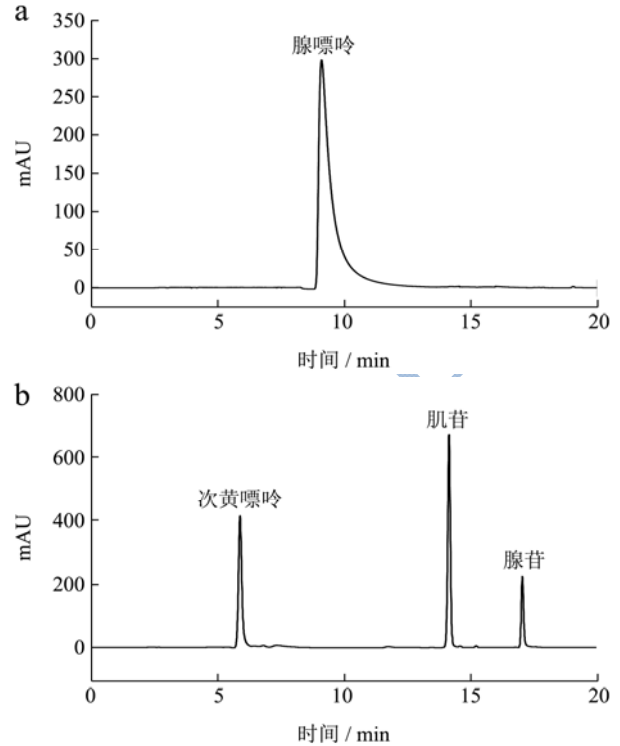
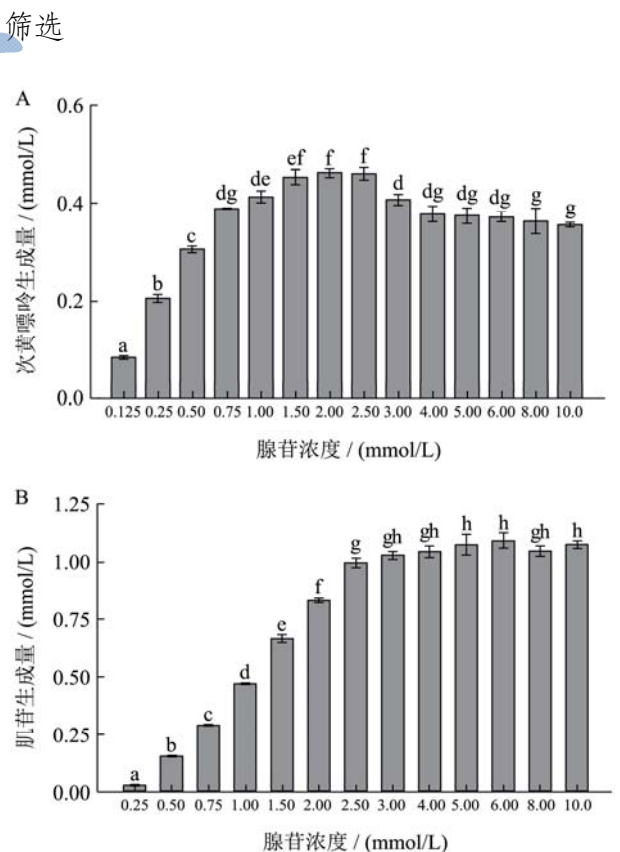


图3 腺嘌呤诱导组 (a) 和腺苷诱导组 (b)

Fig.3 Chromatograms of cell culture medium after incubation for 24 h in the presence of 1 mmol/L adenine (a) and adenosine (b)

2.3 诱导物腺苷浓度、细胞密度和诱导时间的筛选



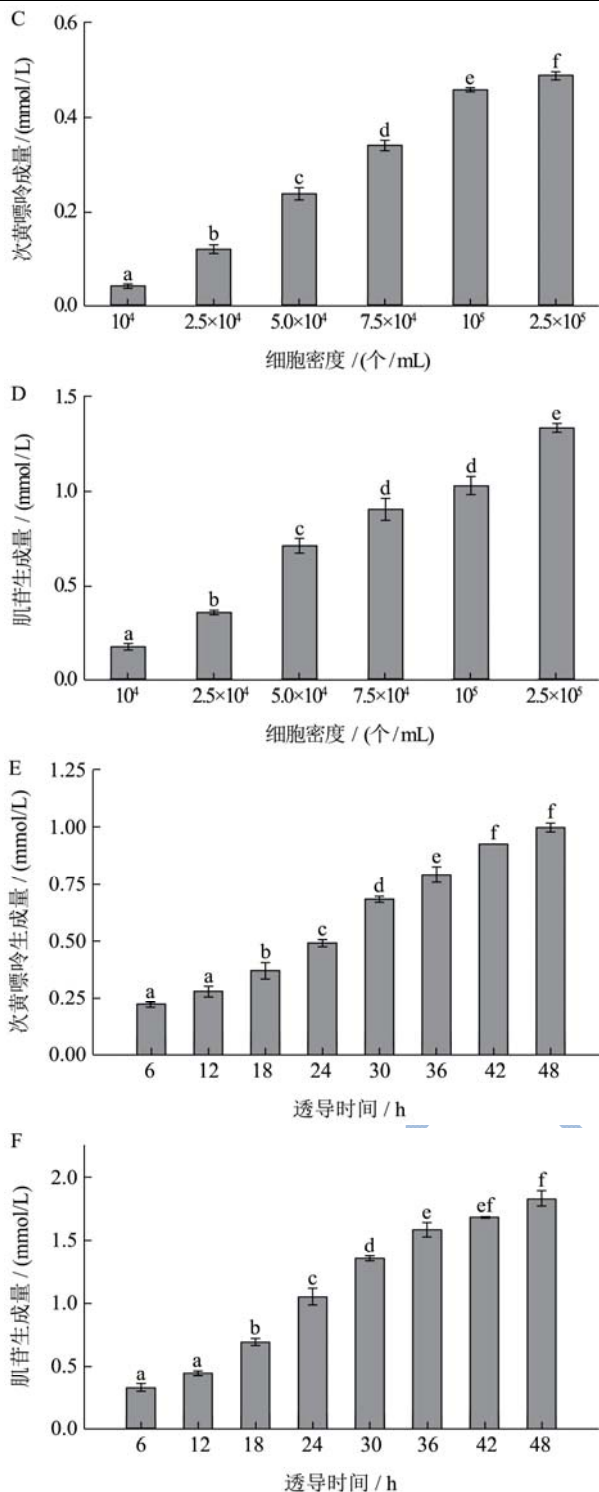


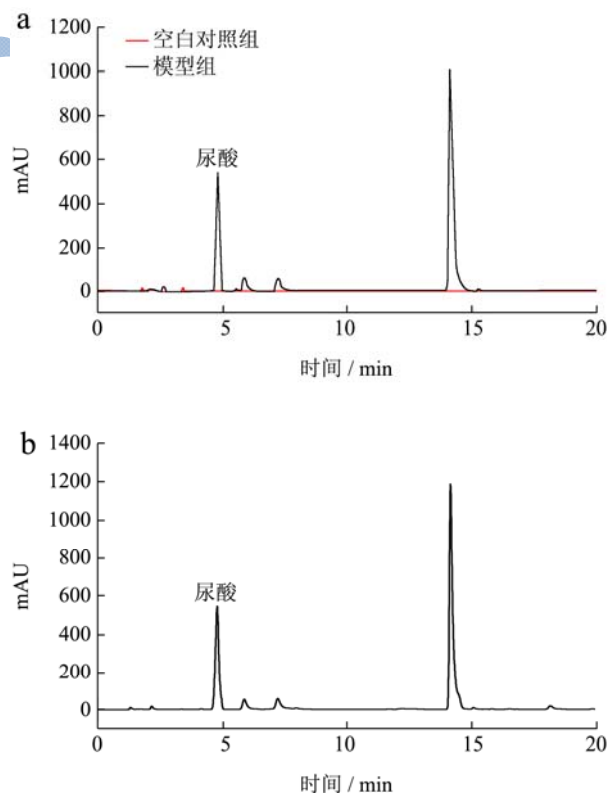
图4 不同腺苷浓度下次黄嘌呤(A)和肌苷(B)生成量;不同细胞密度下次黄嘌呤(C)和肌苷(D)生成量;不同诱导时间下次黄嘌呤(E)和肌苷(F)生成量

Fig.4 Effect of adenosine concentration on the generation of hypoxanthine (A) and inosine (B) in LO<sub>2</sub> cells; effect of cell density on the generation of hypoxanthine (C) and inosine (D) in LO<sub>2</sub> cells; effect of incubation time on the generation of hypoxanthine (E) and inosine (F) in LO<sub>2</sub> cells

由图4A和4B可知,不同浓度的腺苷溶液作用于肝细胞24h后,肝细胞生成的肌苷和次黄嘌呤的含量不同,随着腺苷浓度的增加,次黄嘌呤和肌苷的生成量均先显著增加,达到一定浓度后,再继续增加诱导物腺苷浓度,次黄嘌呤和肌苷生成量基本不再增加,因为一定细胞密度下每孔腺苷代谢生成次黄嘌呤和肌苷的酶的含量一定,在一定的时间内,转化腺苷的量一定,当腺苷达到一定浓度后,继续添加腺苷也没法生成更多的肌苷和次黄嘌呤。为了得到较多的次黄嘌呤和肌苷,选择2.5 mmol/L为最佳诱导浓度。

由图4C和4D可知,随着细胞铺板密度的增加,腺苷转化生成次黄嘌呤和肌苷的含量均增加,可能是因为每孔细胞数增加,所含的腺苷转化生产次黄嘌呤和肌苷的酶增加,所以生成量增加。但是当细胞密度达到5×10<sup>5</sup>个/mL时,由于细胞密度过大,48h后孔板中细胞细胞大片脱落,基本检测不到肌苷和次黄嘌呤的生成。考虑到后期还需添加黄嘌呤氧化酶继续孵育一段时间,因此选择10<sup>5</sup>个/mL作为细胞铺板密度进行下一步实验。

由图4E和4F可知,在一定的腺苷浓度和细胞密度下,随着腺苷诱导时间的延长,肌苷和次黄嘌呤的生成量呈增加趋势。为了最终生成的肌苷和次黄嘌呤较多而整个实验过程不至于太长,选择36h作为最佳诱导时间。



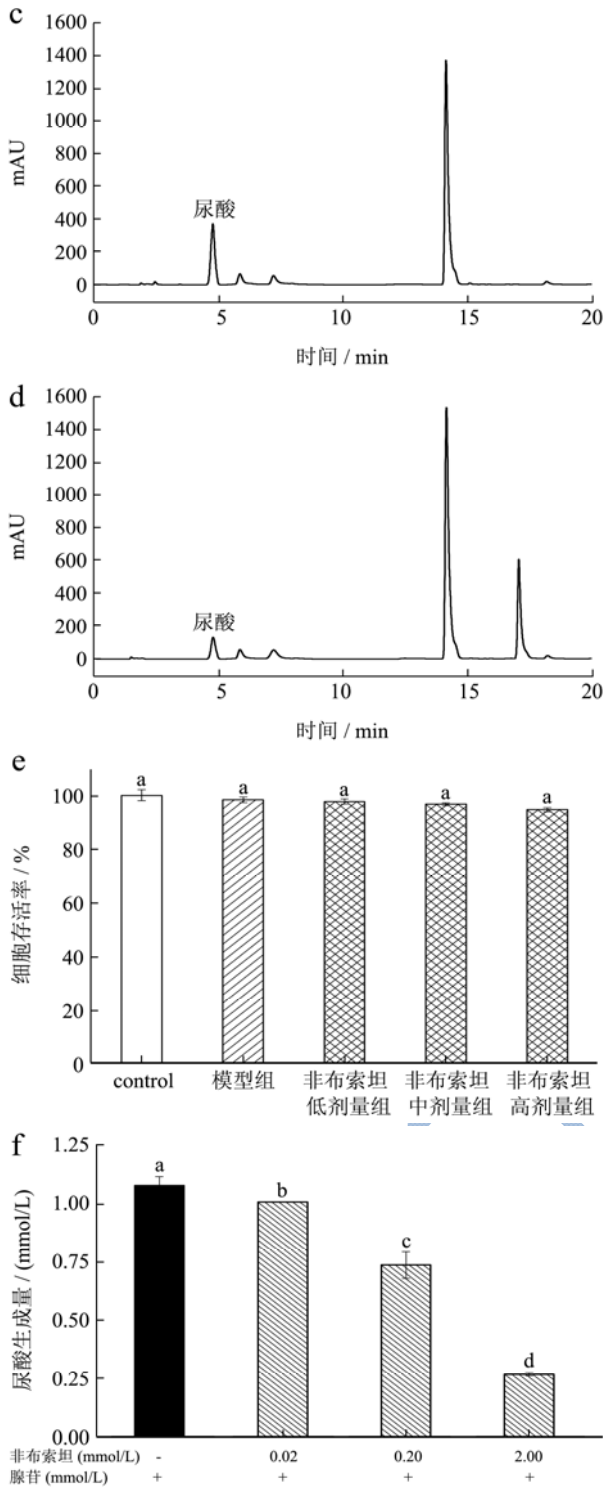


图5 模型组(a)和0.02 mmol/L(b)、0.2 mmol/L(c)、2 mmol/L(d)非布索坦组高效液相图;非布索坦对肝细胞存活率的影响(e);不同浓度非布索坦对尿酸生成量的影响(f)

Fig.5 Chromatograms of model group (a) and 0.02 mmol/L (b), 0.2 mmol/L (c), 2 mmol/L (d) februxostat group; effect of different concentrations of februxostat on the cell viability of LO<sub>2</sub> cells; effect of februxostat on the generation of uric acid in LO<sub>2</sub> cells (f)

## 2.4 高尿酸血症细胞模型的构建及阳性药物的筛选

由图 5a 可知细胞以 10<sup>5</sup> 个/mL 铺板 48 h 后,添加 2.5 mmol/L 的腺苷继续孵育 36 h,添加黄嘌呤氧化酶使其浓度为 0.005 U/mg,继续孵育 12 h,模型组尿酸生成量显著增高,空白对照组基本无尿酸生成,表明高尿酸血症模型基本构建成功。当加入不同浓度的非布索坦预孵育细胞时,通过 MTT 细胞毒性实验发现,非布索坦在所测定的 3 个浓度梯度(0.02、0.2、2 mmol/L)下均对细胞存活率无显著影响。这些结果证明非布索坦在一定的浓度范围内对肝细胞无明显的细胞毒性,且相比于模型组,加非布索坦预孵育的阳性药物组尿酸最终生成量显著降低,并呈一定的浓度剂量关系(图 5),表明该模型或许可用于筛选具有抗高尿酸血症的药物。

## 2.5 乳清蛋白肽降尿酸活性的研究

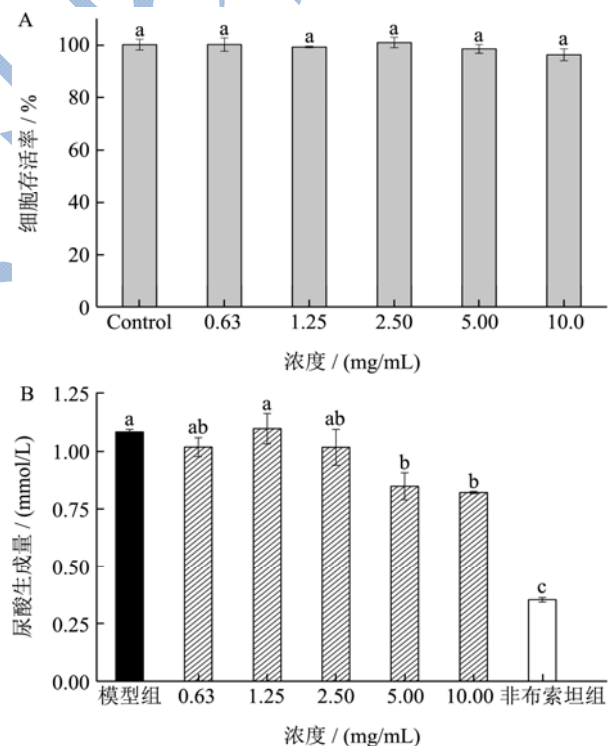


图6 乳清蛋白肽对肝细胞存活率的影响(A)和不同浓度乳清蛋白肽对尿酸生成量的影响(B)

Fig.6 Effect of different concentrations of whey protein-derived proteins on the cell viability (A) and generation of uric acid in LO<sub>2</sub> cells (B)

乳清蛋白粉选用碱性蛋白酶在上述酶解条件下得到的蛋白回收率较高,为 86.42±0.54%。如图 6A 所示,

通过 MTT 细胞毒性实验发现, 乳清蛋白酶解液在 0.625~10 mg/mL 浓度范围内对细胞存活率无显著影响, 表明乳清蛋白酶解物在一定的浓度范围内对肝细胞无明显的细胞毒性。由图 6B 可知, 当乳清蛋白酶解物达到一定浓度时, 其尿酸生成量显著降低, 表明乳清蛋白肽有一定的降尿酸效果 (阳性药物组非布索坦的浓度为 0.63 mg/mL)。

### 3 讨论

本实验构建了体外高尿酸血症细胞模型, 在 2.5 mmol/L 的腺苷浓度下, 作用时间 36 h, 后添加一定浓度的黄嘌呤氧化酶孵育 12 h, 模型组细胞上清液中尿酸含量显著高于空白对照组, 加入不同浓度的非布索坦预孵育肝细胞, 最终尿酸生成量显著低于模型组, 并呈一定的浓度剂量效应, 表明该模型基本构建成功。将不同浓度的乳清蛋白肽孵育肝细胞, 当乳清蛋白肽达到一定浓度时, 最终尿酸生成量相对于模型组显著降低, 表明乳清蛋白肽具有降尿酸的效果。后期可以采用 DEAE-52 层析柱和 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析柱对乳清蛋白酶解液进一步分离纯化, 寻找到具有高效降尿酸活性的组分, 为高尿酸血症的治疗提供新的方法。该高尿酸血症细胞模型的构建, 可为后期筛选具有降尿酸功效食源性分子提供新的思路与方法。

### 参考文献

- [1] Puig J G, Beltran L, Chew C M, et al. Ultrasound in the diagnosis of asymptomatic hyperuricemia and gout [J]. *Revista Clínica Española (English Edition)*, 2016, 216(8): 445-450
- [2] Cesar D T, Nuria P H, Fernando P R. New medications in development for the treatment of hyperuricemia of gout [J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2015, 27(2): 164-169
- [3] Choi H K, Ford E S. Prevalence of the metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia [J]. *The American Journal of Medicine*, 2007, 120(5): 442-447
- [4] Su P, Hong L, Zhao Y, et al. Relationship between hyperuricemia and cardiovascular disease risk factors in a Chinese population: a cross-sectional study [J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2015, 21: 2707-2717
- [5] Chen J H, Chuang S Y, Chen H J, et al. Serum uric acid level as an independent risk factor for all-cause, cardiovascular, and ischemic stroke mortality: A chinese cohort study [J]. *Arthritis Care & Research*, 2009, 61(2): 225-232
- [6] See L C, Kuo C F, Chuang F H, et al. Hyperuricemia and metabolic syndrome: associations with chronic kidney disease [J]. *Clinical Rheumatology*, 2011, 30(3): 323-330
- [7] Kuwabara M. Hyperuricemia, cardiovascular disease, and hypertension [J]. *Pulse*, 2016, 3(3-4): 242-252
- [8] Rees F, Hui M, Doherty M. Optimizing current treatment of gout [J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2014, 10(5): 271-283
- [9] Tausche A K, Jansen T L, Schröder H E, et al. Gout-current diagnosis and treatment [J]. *Pathophysiology*, 2009, 106(34): 549-555
- [10] 刘佳,李玲.高尿酸血症的发病机制与药物治疗研究进展[J]. *国际药学研究杂志*,2010,37(1):24-28  
LIU Jia, LI Ling. Pathogenesis and pharmacotherapy of hyperuricemia: research advances [J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2010, 37(1): 24-28
- [11] 刘永贵,赵丽嘉,崔艳丽,等.抗高尿酸血症药物研究进展[J]. *现代药物与临床*,2015 30(3):345-350  
LIU Yong-gui, ZHAO Li-jia, CUI Yan-li, et al. Research progress on anti-hyperuricemic drugs [J]. *Drugs & Clinic*, 2015, 30(3): 345-350
- [12] 陈翔,蔡吓明,陈国勇.非布司他治疗痛风伴高尿酸血症疗效观察[J].*中外医学研究*,2015,13(34):34-36  
CHEN Xiang, CAI Xia-ming, CHEN Guo-yong. Efficacy of febuxostat in gout and hyperuricemia patients [J]. *Chinese and Foreign Medical Research*, 2015, 13(34): 34-36
- [13] Bruce S P. Febuxostat: a selective xanthine oxidase inhibitor for the treatment of hyperuricemia and gout [J]. *Annals of Pharmacotherapy*, 2006, 40(12): 2187-2194
- [14] Baker J F, Ralph S H. Update on gout and hyperuricemia [J]. *International Journal of Clinical Practice*, 2010, 64(3): 371-377
- [15] Calogiuri G, Nettis E, Dileo E, et al. Allopurinol hypersensitivity reactions: desensitization strategies and new therapeutic alternative molecules [J]. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 2013, 12(1): 19-28
- [16] Chohan S. Safety and efficacy of febuxostat treatment in subjects with gout and severe allopurinol adverse reactions [J]. *The Journal of Rheumatology*, 2011, 38(9): 1957-1959
- [17] Kojima S, Kojima S, Hifumi A, et al. Therapeutic strategy for efficient reduction of serum uric acid levels with allopurinol versus benzbromarone in hyperuricemic patients with essential hypertension-A randomized crossover study (terao study) [J]. *International Journal of Cardiology*, 2016, 224(1): 437-439

- [18] Gliozzi M, Malara N, Muscoli S, et al. The treatment of hyperuricemia [J]. *International Journal of Cardiology*, 2016, 213(1): 23-27
- [19] Shahid H, Singh J A. Investigational drugs for hyperuricemia [J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2015, 24(8): 1013-1030
- [20] Moolenburgh J D, Reinders M K, Jansen T. Rasburicase treatment in severe tophaceous gout: a novel therapeutic option [J]. *Clinical Rheumatology*, 2006, 25(5): 749-752
- [21] George J R L, Sundy J S. Pegloticase for treating refractory chronic gout [J]. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 2012, 48(7): 441-449
- [22] 金沈锐,秦旭华.痛风及高尿酸血症动物模型的研究现状和评价[J].*中国实验动物学报*,2005,13(1):55-58  
JIN Shen-rui, QIN Xu-hua. Overview of experimental animal model of gout and hyperuricemia [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2005, 13(1): 55-58
- [23] 张雪,俸婷婷,黄俊飞,等.降尿酸药物筛选方法学研究进展 [J].*亚太传统医药*,2015,11(6):48-49  
ZHANG Xue, FENG Ting-ting, HUANG Jun-fei, et al. Uric acid drug screening methodology research progress [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2015, 11(6): 48-49
- [24] Wei G N, Su Q B, Zeng X B. Screening and chemical component analysis of anti-hyperuricemic active fraction of ethanol extract from polyrhachisvicina roger in Guangxi in hyperuricemia model mice [J]. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.*, 2013, 27(4): 673-7
- [25] 田芳,邵春海,刘景芳.奶及奶制品摄入降低痛风患者尿酸水平[J].*上海医药*,2013,34(5):9-11  
TIAN Fang, SHAO Chun-hai, LIU Jing-fang. Intake of milk and dairy products reduces the serum uric acid level in gout patients [J]. *Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal*, 2013, 34(5): 9-11
- [26] Mandal A K, Mount D B. The molecular physiology of uric acid homeostasis [J]. *Annual Review of Physiology*, 2015, 77(1): 323-345