杨星莹, 胡昌雄, 杨叶眉, 等. 基于网络药理学和体外降尿酸试验探究桑叶治疗高尿酸血症的作用机制 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(11): 433−444. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060184

YANG Xingying, HU Changxiong, YANG Yemei, et al. Exploring the Mechanism of Mulberry Leaves in the Treatment of Hyperuricemia Based on Network Pharmacology and *in Vitro* Uric Acid Lowering Test[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(11): 433−444. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060184

·营养与保健·

基于网络药理学和体外降尿酸试验探究桑叶治疗高尿酸血症的作用机制

杨星莹, 胡昌雄, 杨叶眉, 李　莎, 李金见, 杨　文, 李平平*

（云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 云南蒙自 661101）

摘　要: 为探究药食同源桑叶治疗高尿酸血症的活性成分和作用机制，基于网络药理学和分子对接技术，系统评估桑叶治疗高尿酸血症的主要成分及靶点与通路，并构建体外实验进一步分析桑叶治疗高尿酸血症的成分与机制。结果表明，从 269 个桑叶有效成分中筛选出氧化血根碱（Oxysanguinarine）、桑辛素 D（Moracin D）、红厚壳（种）内酯（Inophyllum E）等 16 个活性成分，得到与高尿酸血症相关的靶点 80 个，进一步筛选出 3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）、肿瘤坏死因子（TNF）、雌激素受体 1（ESR1）等 15 个核心靶点。基因本体（Gene ontology，GO）分析共获得 321 条生物进程条目、46 条细胞组分条目、108 条分子功能条目，京都基因和基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）分析获取到 97 条与高尿酸血症相关的信号通路，其中代谢通路与核酸代谢通路等发挥抗高尿酸血症作用。分子对接显示桑叶关键成分与前 6 的核心靶点结合能均≤−6 kcal/mol，其中 Oxysanguinarine 与 ESR1、CASP3、PTGS2 三个核心靶蛋白结合能最高。进一步在体外开展 Oxysanguinarine 治疗高尿酸血症的机制探究，Oxysanguinarine 可以降低黄嘌呤氧化酶活性，通过调控尿酸盐转运蛋白 1（URAT1）、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2（ABCG2）等蛋白，增强 HK-2 和 HEK-293T 细胞尿酸排泄能力。本研究揭示了桑叶通过多靶点、多通路治疗高尿酸血症，为开展动物实验和桑叶开发降尿酸食品提供科学依据。

关键词: 桑叶, 高尿酸血症, 网络药理学, 分子对接, 细胞实验, 作用机制

中图分类号: R151　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)11−0433−12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060184　　本文网刊:

Exploring the Mechanism of Mulberry Leaves in the Treatment of Hyperuricemia Based on Network Pharmacology and *in Vitro* Uric Acid Lowering Test

YANG Xingying, HU Changxiong, YANG Yemei, LI Sha, LI Jinjian, YANG Wen, LI Pingping*

（Sericulture and Apicultural Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China）

Abstract: Through network pharmacology and molecular docking technology, this study investigated the active components and mechanism of mulberry leaves, a food-medicine homologous plant, in treatment of hyperuricemia. The primary components, targets and pathways underwent systematic evaluation, moreover *in vitro* experiments were constructed to further analyze. The results demonstrated that a total of 16 active components associated with hyperuricemia, including Oxysanguinarine, Moricin D and Inophyllum E were identified through the screening of 269 active components derived from mulberry leaves. Subsequently, 80 targets related to hyperuricemia were identified. Furthermore, 15 core targets were screened out, respectively glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (GAPDH), tumor necrosis factor (TNF), estrogen re-

收稿日期: 2025−06−18

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项（CARS-18）; 向仲怀院士工作站（No.202305AF150166）; 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所青年创新基金（QC2024002）。

作者简介: 杨星莹（1995−）, 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 天然产物挖掘与机制研究, E-mail: yangxy950823@163.com。

*** 通信作者:** 李平平（1986−）, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 桑树资源评价与利用, E-mail: liping-1200@163.com。

ceptor 1 (ESR1), etc. A total of 321 biological process entries, 46 cell components entries and 108 molecular function entries were received by conducting gene ontology (GO) analysis. Ninety-seven signal pathways related to hyperuricemia were obtained through kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis, among which metabolic pathways and nucleic acid metabolic pathways played an anti-hyperuricemia role. Molecular docking indicated that the binding energies of the key components of mulberry leaves to the top 6 core targets were less than or equal to −6 kcal/mol, and the binding energies of Oxysanguinarine to the three core target proteins ESR1, CASP3 and PTGS2 were found to be the highest. Further research on the mechanism of Oxysanguinarine in treating hyperuricemia *in vitro* presented that this substance could reduce the activity of xanthine oxidase, and enhance the uric acid excretion ability of HK-2 and HEK-293T cells by regulating the proteins such as urate transporter 1 (URAT1) and adenosine triphosphate binding cassette transporter G2 (ABCG2). In summary, present investigation reveals that mulberry leaves are efficacious in the treatment of hyperuricemia through a multi-targets and multi-channels, which provides scientific basis for animal experiments and development of uric acid-reducing foods from mulberry leaves.

Key words: mulberry (*Morus alba* L.) leaf; hyperuricemia; network pharmacology; molecular docking; cell experiment; mechanisms of action

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是一种由人体内嘌呤代谢异常导致人体内尿酸水平升高引起的疾病,高尿酸血症还与糖尿病和高血压等疾病相关[1]。近年来,HUA 已成为仅次于 2 型糖尿病的第二大常见代谢性疾病,是痛风最重要的危险因素[2]。HUA 主要存在两种发病机制,一是尿酸生成过量,二是尿酸排泄能力降低,导致体内尿酸升高。此外,还有研究显示机体患有较多炎症反应也会增加高尿酸血症的患病概率[3]。HUA 会引起水溶性尿酸盐饱和,进而形成尿酸单体钠析出,在肾小管中形成肾结石,在关节中积累引发痛风[4]。此外,HUA 与高血压、糖尿病、慢性肾病和心血管疾病的发展密切相关,是一种涉及多学科、多种疾病的复杂疾病[5−6]。高尿酸血症的治疗药物主要分为黄嘌呤氧化酶抑制剂、尿酸氧化酶类似物和尿酸盐转运蛋白 1(URAT1)抑制剂。这三类药物主要是通过促进尿酸排泄和降低尿酸生成来治疗 HUA,但这些药物均存在一定的副作用,在中医医学和食品研究方面也在积极开发治疗或辅助治疗高尿酸血症的药物和食品。

桑叶(*Morus alba* L.)是一种药食同源的食品,含有多种活性物质,具有抗炎、降脂、降糖、抗菌等功效[7]。桑树种植面积广、来源丰富,如今随着养蚕业规模的缩减,大部分桑叶用于食品、药品原材料的加工。桑叶中含有大量多酚、黄酮、生物碱类物质,具有较高食用和营养价值[7]。已有研究显示,利用高效液相色谱二极管检测法指纹图谱鉴定并定量了桑叶的已知生物活性成分,通过实验验证了桑叶抗高尿酸血症的活性,但实验中并未探明桑叶治疗高尿酸血症的物质和机制[8]。桑叶及其提取物在多种代谢疾病治疗中的生物活性已得到证实,但关于桑叶治疗高尿酸血症及其降低尿酸的作用报道较少。随着“食品精准营养”概念的提出,食品中的营养因子被逐渐发掘,网络药理学在功能食品开发中的应用也逐渐深入。网络药理学依托系统生物学框架,通过对生物网络的拓扑学分析,在食品与药品的疾病干预研究中应用日趋深入。根据关键信号节点设计多靶点配体,是食品、中药、植物关键成分筛选、药效研究的重要手段,有效节省研发成本。本实验整合网络药理学与分子对接技术,解析桑叶治疗高尿酸血症的作用机制,并结合体外实验探讨桑叶降尿酸作用及其对尿酸代谢靶点的调控,以期为降尿酸功能食品开发提供理论支撑,同时也为挖掘桑叶新的药理作用提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

氧化血根碱(Oxysanguinarine, Oxy,纯度大于 97%)、黄嘌呤氧化酶、尿酸(Uric acid, UA)、别嘌醇、苯溴马隆(Benzbromarone, Ben)、噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、脱脂奶粉 上海源叶生物科技有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 北京索莱宝科技有限公司;HK-2、HEK-293T 细胞 上海博尔森生物科技有限公司;DMEM 高糖培养基 武汉赛维尔生物科技有限公司;尿酸含量检测试剂盒 北京盒子生工科技有限公司;GAPDH 抗体、抗兔免疫球蛋白、抗鼠免疫球蛋白 Affinity Biosciences;URAT1、ABCG2、OAT4、OCT1、OCT2 抗体 Cell Signaling Technology。

HF90 二氧化碳气体培养箱 力康生物医疗科技控股有限公司;SW-CJ-1FD-II 无菌超净台 苏州安泰空气技术有限公司;xMark 全波长微孔板酶标读数仪 伯乐生命医学产品(上海)有限公司;Tanon-ESP 600 垂直电泳仪、Tanon-5200Multi 全自动化学发光仪 上海天能生命科学有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桑叶化合物筛选及靶点筛选 在 TCMSP 平台(https://www.tcmsp-e.com/)搜索“桑叶”有效成分,以口服利用度(OB)≥30、类药性(DL)≥0.18 为条件进行筛选。再用 PubChem(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)获取化合物 SMILES 号,将化合物 SMILES 号导入 SwissADME(http://www.swissadme.ch/index.php)平台进行胃肠道吸收(GI absorption)和类药性(Druglikeness)评估,以 GI 得分为“high”并且

“Druglikeness”通过 2 个“Yes”为筛选标准[9]。将筛选后的桑叶化合物通过 PubChem 获取化合物的 2D 结构 SDF 格式的文件。为准确获取化合物靶点信息，将化合物 SMILES 号分别导入 SwissTarget Prediction 数据库，获取化合物靶点信息，选取 Probability*≥0.1 的靶点[10]。将化合物靶点输入 UniProt 数据库（https://www.uniprot.org/），得到人源基因的 Gene Symbol。

1.2.2　高尿酸血症相关靶点筛选　以“hyperuricemia”为关键词，在 GeneCards（https://www.genecards.org/）、OMIM（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim）、Disgenet（https://www.disgenet.org/）数据库中获取与高尿酸血症相关的基因，将结果合并、去重，得到高尿酸血症相关靶点数据库。

1.2.3　核心靶点筛选及蛋白-蛋白相互作用（PPI）网络的构建　将桑叶化合物与 hyperuricemia 的相关靶点输入微生信平台（http://www.bioinformatics.com.cn/），绘制 Venn 图数据得到交集靶点基因。将以上交集基因导入 STRING（https://string-db.org/）数据库，以“Homo sapiens”为筛选条件，将结果保存为 TSV 文件并导入 Cytoscape 3.8.0，利用 CentiScape 2.2 工具进行分析筛选绘制 PPI 网络，以 Degree、Closeness 和 Betweenness 的阈值为筛选条件得到核心靶点，阈值分别为 14.8101265822784、0.00640848075585291、82.759493670886。用节点（Node）大小和颜色反映度值（Degree）大小，边（Edge）粗细反映结合分数大小，得到 PPI 网络图。

1.2.4　交集靶点的 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析　将桑叶化合物和高尿酸血症的交集靶点导入 DAVID 网站（http://david.ncifcrf.gov/），限定物种为“Homo sapiens”进行基因本体（Gene ontology，GO）[生物进程（Biological process，BP）、细胞组分（Cellular component，CC）和分子功能（Molecular function，MF）] 富集分析以及京都基因和基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析，通过微生信平台进行可视化处理。

1.2.5　“成分-靶点-疾病-通路”网络图构建　将桑叶有效成分、交集靶点基因、疾病及富集基因数前 20 的通路基因导入 Cytoscape 3.8.0，构建桑叶治疗高尿酸血症的“成分-靶点-疾病-通路”网络图，利用 Network Analyzer 工具筛选出与疾病靶点相互作用的化合物。

1.2.6　分子对接验证　将交集靶点中的核心靶点作为受体，采用 Autodock Vina（v 1.5.7）对桑叶化合物和治疗高尿酸血症的关键靶点进行分子对接验证。通过 RCSB 数据库（RCSB PDB，http://www.rcsb.org/）下载靶蛋白的 PDB 文件，在 Autodock Tools 1.5.7（ADT）中对蛋白质进行去水、加氢，制备 PDBQT 文件。在 PubChem 数据库下载桑叶化合物的 2D 结构，导入 ADT 中加氢处理后得到 PDBQT 文件。在 ADT 中设置对接口袋，通过 Autodock Vina 将遗传算法设置为 50 次进行运行，选取结合能最低的构象作为结果，再使用 Pymol 2.6.0 将对接结果可视化[11]。

1.2.7　体外酶活实验　尿酸是人体代谢的终产物，查阅文献得知尿酸在 295 nm 波长处有最大吸光度，结合文献报道[12] 本反应体系进行细微调整。本反应体系共 200 μL，分别由 10 U/L 的黄嘌呤氧化酶（Xanthine oxidase，XOD）、0.1 mmol/L 的黄嘌呤（Xanthine）、不同浓度的化合物和 pH7.6 的 PBS 组成。整个反应体系在 96 孔板中混匀，以 XOD 的加入启动反应。将反应体系置于 37 ℃ 下，持续监测 20 min（XOD 在 15 min 内具有较高酶活性）反应体系的光密度。该反应体系酶活性（U）是用反应体系中 1 min 内 XOD 催化 1 μmol 黄嘌呤转化为尿酸所需的酶量表示，实验中以别嘌醇（Allopurinol）为参考，用以评价化合物对 XOD 活性的影响。反应需制作尿酸在 290 nm 处的标准曲线，将不同浓度尿酸稀释后检测吸光度，得到标准曲线公式（1），标准曲线决定系数 R^2=0.9998。将酶活反应体系所得吸光度代入公式（2）计算得到 XOD 酶活性，进而根据公式（3）得到 XOD 抑制率。

$$Y = 7.02X + 0.66 \quad \text{式（1）}$$

$$E = \frac{A_2 - A_1 - 0.66}{7.02 \times t} \quad \text{式（2）}$$

$$I = \frac{E_2 - E_1}{E_2} \times 100 \quad \text{式（3）}$$

式中，Y 为标准曲线在 295 nm 的吸光度，X 为尿酸浓度，单位为 mmol/L，7.02 和 0.66 为方程反应系数；E 代表 XOD 酶活性，单位为 U/L，A_1 为反应前的吸光值，A_2 为反应后的吸光值，t为 A_2 吸光值所对应的时间，单位为 min；I 代表 XOD酶活抑制率，单位为 %，E_1 为检测孔的酶活，E_2 为标准孔的酶活。

1.2.8　细胞活力测试　参照 Huang 等[13] 的方法进行细胞活力测试，将 HK2 细胞和 HEK-293T 细胞调整为 2×10^4 个/孔，用无血清培养基接种于 96 孔板中 37 ℃ 恒温培养 24 h。24 h 后弃上清，用 PBS 溶液润洗两次，加入含有药物的无血清培养基 37 ℃ 恒温培养 24 h，每孔加入 MTT（5 mg/mL）溶液 20 μL，37 ℃ 避光孵育 4 h，弃上清，每孔加入 200 μL DMSO，振荡 15 min 混匀，在 492 nm 处检测吸光度评价细胞活力。

1.2.9　尿酸排泄细胞诱导　该尿酸排泄细胞模型参照孙可欣[14] 的方法优化后进行实验。将复苏且稳定传代 3 代以上的 HK2 和 HEK-293T 细胞调整细胞浓度为 20 万个/mL，向 60 mm 培养皿中接入 5 mL 即 100 万个/皿，37 ℃ 恒温培养 24 h。将细胞分为正常组、模型组（200 mg/L UA）、低剂量阳性对照组（200 mg/L UA+5 μmol/L Ben）、高剂量阳性

对照组(200 mg/L UA+10 μmol/L Ben)、低剂量组(200 mg/L UA+1 μmol/L Oxy)、中剂量组(200 mg/L UA+5 μmol/L Oxy)、高剂量组(200 mg/L UA+10 μmol/L Oxy),培养 24 h 后收集上清检测尿酸含量,收集细胞蛋白进行免疫印迹实验。

1.2.10 细胞尿酸排泄能力检测 参照孙泽锐[15]的实验方法进行细胞上清尿酸含量检测。培养结束后收集 HK2 细胞上清液,使用尿酸含量检测试剂盒进行尿酸含量检测,尿酸含量需立即检测。为保证实验准确性,本实验所用标曲均现做。

1.2.11 蛋白免疫印迹(western blot)实验 样品准备:将弃去上清液的细胞,正常组、模型组(200 mg/L UA)、高剂量阳性对照组(200 mg/L UA+10 μmol/L Ben)、中剂量组(200 mg/L UA+5 μmol/L Oxy)、高剂量组(200 mg/L UA+10 μmol/L Oxy)备用。由于尿酸排泄能力测试发现低剂量组尿酸排泄能力较差,因此选择中、高剂量组进行 western blot 实验。

蛋白免疫印迹主要步骤为:蛋白提取-BCA 定量-蛋白制样-电泳-转膜-化学发光。蛋白提取:将弃上清的细胞用冰磷酸缓冲盐溶液(PBS)润洗 2 遍,加入 150 μL 高效 RIPA 裂解液(含 2% 蛋白酶抑制剂、1%PMSF、1%cocktail),冰上裂解 30 min,4 ℃离心,收集上清于−80 ℃冰箱保存。BCA 定量:用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量,并计算蛋白浓度。蛋白制样:蛋白上样量 30 μg,按照蛋白∶5×上样缓冲液为 4∶1 进行制样。混匀、离心后放入 95 ℃金属浴 10 min,待样品降至室温后可上样或于−80 ℃冰箱保存。电泳:配制 8% 分离胶和 4% 浓缩胶放置一夜,按顺序上样进行电泳。转膜:将分离胶与激活的 PVDF 膜贴合,放入转膜槽进行转膜。化学发光:将含蛋白的 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉封闭液中室温封闭 1 h,用 1×TBST 洗膜 3 次。铺一抗,4 ℃摇床孵育 16 h。回收一抗,用 1×TBST 洗膜 3 次。二抗室温孵育 1 h,1×TBST 洗膜 3 次。进行化学发光显影,以 GAPDH 为对照,用 Image J 软件进行灰度分析。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行显著性分析 [平均值±标准差(mean±SEM),one-way ANOVA],*P<0.05 为差异显著,**P<0.01 为差异明显显著,***P<0.001 为差异极显著。使用 GraphPad Prism 8.0.2 对实验数据进行可视化处理。使用 Adobe Illustrator 进行图形组合。每个实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 桑叶有效成分靶点及高尿酸血症疾病靶点筛选

通过 TCMSP 平台搜索桑叶中化合物,共获取到 269 个桑叶成分,经过筛选后选择符合条件的 29 个成分进行后续实验(附表 1,详见本刊官网 https://www.spgykj.com/文章的网络版),通过 SwissADME 平台筛选后得到 16 种桑叶有效成分 Inophyllum E(红厚壳(种)内酯)、Moracin B(桑辛素 B)、Moracin C(桑辛素 C)、Moracin D(桑辛素 D)、Moracin E(桑辛素 E)、Moracin F(桑辛素 F)、Moracin G(桑辛素 G)、Moracin H(桑辛素 H)、4-Prenylresveratrol、Oxysanguinarine(氧化血根碱)、Quercetin(槲皮素)、Kaempferol(山柰酚)、Iristectorigenin A(鸢尾甲黄素 A)、Norartocarpetin、Tetramethoxyluteolin、Skimmin(8CI)(茵芋甙)。将 16 种有效成分导入 SwissTarget Prediction 数据库共获得 860 个对应靶点,去重合并后得到 383 个靶点。以“hyperuricemia”为关键词在 GeneCards 数据库中获取到 1384 个相关疾病靶点,在 OMIM 数据库中获取到 3 个相关疾病靶点,在 Disgenet 数据库中获取到 16 个相关疾病靶点。将 3 个数据库的靶点合并、去重后得到 1387 个靶点。

2.2 桑叶-高尿酸血症共同靶点分析及 PPI 网络构建

将结果 2.1 中桑叶有效成分和高尿酸血症相关靶点导入微生信平台,绘制 Venn 图(图 1A),共得到 80 个交集靶点(附表 2,详见本刊官网 https://www.spgykj.com/文章的网络版)。通过 CentiScape 2.2 工具以 Degree、Closeness 和 Betweenness 的阈值进行可视化分析,从 80 个交集靶点中筛选出核心靶点(图 1B),最终共得到 15 个核心靶点(图 1C),由核心靶点 PPI 图(图 1D)可知,*GAPDH*、*TNF*、*PPARG*、*CASP3*、*ESR1*、*PTGS2* 等靶点在治疗高尿酸血症中或许存在关键作用,核心靶点信息见表 1。其中 3-磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*)是糖酵解途径的关键酶,*GAPDH* 主要通过糖酵解途径调控嘌呤合成和氧化应激途径参与高尿酸血症(HUA)的发病机制[16]。肿

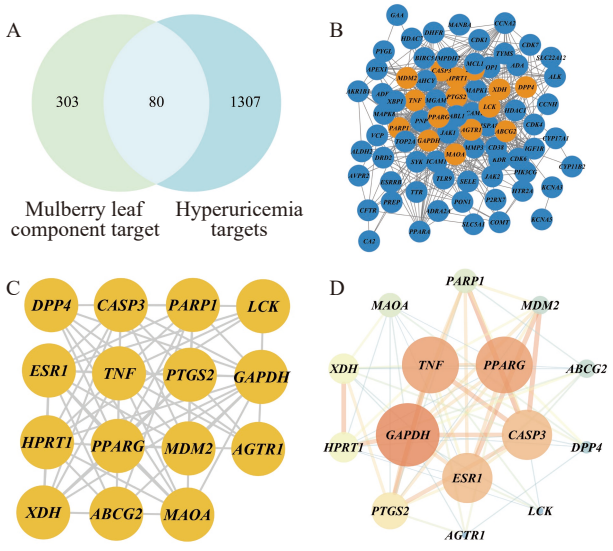


图 1 桑叶-高尿酸血症共同靶点及核心靶点筛选

Fig.1 Screening of common targets and core targets of mulberry leaves-hyperuricemia

注:A:桑叶-高尿酸血症交集靶点的 Venn 图;B:桑叶治疗高尿酸血症的 PPI 网络图;C:桑叶治疗高尿酸血症的核心靶点图;D:桑叶治疗高尿酸血症的核心靶点 PPI 网络图。

表 1　桑叶治疗高尿酸血症核心靶点信息

Table 1　Information on core targets of mulberry leaves in the treatment of hyperuricemia

靶基因	靶蛋白名称	度值
GAPDH	3-磷酸甘油醛脱氢酶	59
TNF	肿瘤坏死因子	44
ESR1	雌激素受体1	41
CASP3	半胱氨酸蛋白酶-3	40
PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体γ	33
PTGS2	山羊前列腺素G/H合酶2	32
PARP1	多聚ADP核糖聚合酶	32
MDM2	鼠双微体2	29
XDH	黄嘌呤脱氢酶	21
ABCG2	ATP结合转运蛋白G超家族成员2	18
AGTR1	1型血管紧张素Ⅱ受体	16
MAOA	单胺氧化酶A	16
HPRT1	次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶1	16
DPP4	二肽基肽酶-4	15
LCK	Src家族酪氨酸激酶	15

瘤坏死因子(*TNF*)在炎症反应和代谢调控中发挥重要作用，*TNF* 通过 NF-κB 激活产生 *NLRP3* 基因表达增强肾脏炎症表达，加剧高尿酸血症的进程[17]。*PTGS2* 也同样参与炎症反应，通过调控 KF-κB 通路、ROS/JNK 信号和 TNF-α 来上调 URAT1 和 GLUT9 表达、下调 ABCG2 表达，造成体内尿酸水平升高进而导致高尿酸血症[18]。*CASP3* 基因是人 4 号染色体上的重要基因，主要调控细胞凋亡过程，与多种疾病机制相关，同时已有体外实验证明 CASP3、BCL2 等凋亡相关蛋白能够靶向 ERK1/2 信号通路抑制肾小管上皮细胞凋亡来降低高尿酸血症诱导的肾损伤[19]。*ESR1* 基因主要与人体多癌症疾病进程相关，*ESR1* 可参与 MAPK 以及 PI3K/Akt 代谢途径[20]。*PPARG* 基因过度表达和活化会造成人体糖尿病、肥胖症、癌症、动脉粥样硬化等疾病，已有研究通过 *PPARG* 调节肠道菌群促进肠道尿酸排泄来改善高尿酸血症[21]。综上所述，核心靶点中前 6 个靶点主要参与糖酵解途径、细胞凋亡、抗氧化应激、炎症反应、调节肠道菌群等过程，说明桑叶有效成分通过多靶点、多途径调节高尿酸血症。

2.3　交集靶点 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析

将桑叶有效成分治疗高尿酸血症的 80 个潜在靶点进行 GO 富集分析以确定潜在机制，共得到 475 条 GO 功能数据，其中 321 条与 BP 相关、46 条与 CC 相关、108 条与 MF 相关，将以上数据以富集分数(Enrichment)降序排列获取富集数前 10 的条目进行可视化处理(图 2)。从 BP 分析，桑叶主要通过参与对外源性刺激的反应(response to xenobiotic stimulus)、RNA 聚合酶转录的正负调节(positive regulation of transcription by RNA polymerase Ⅱ 和 negative regulation of transcription by RNA polymerase Ⅱ)、凋亡过程及其负调节(apoptotic process 和 negative regulation of apoptotic process)以及基因反应正调控(positive regulation of gene expression)等生物过程治疗高尿酸血症。从 CC 富集分析可看出桑叶治疗高尿酸血症潜在靶点主要富集在细胞质基质(cytosol)、细胞膜(plasma membrane)、细胞质(cytoplasm)、细胞核(nucleus)以及细胞外囊泡(extracellular exosome)等。从 MF 富集分析可以看出桑叶治疗高尿酸血症潜在分子功能主要富集在蛋白质结合(protein bind-

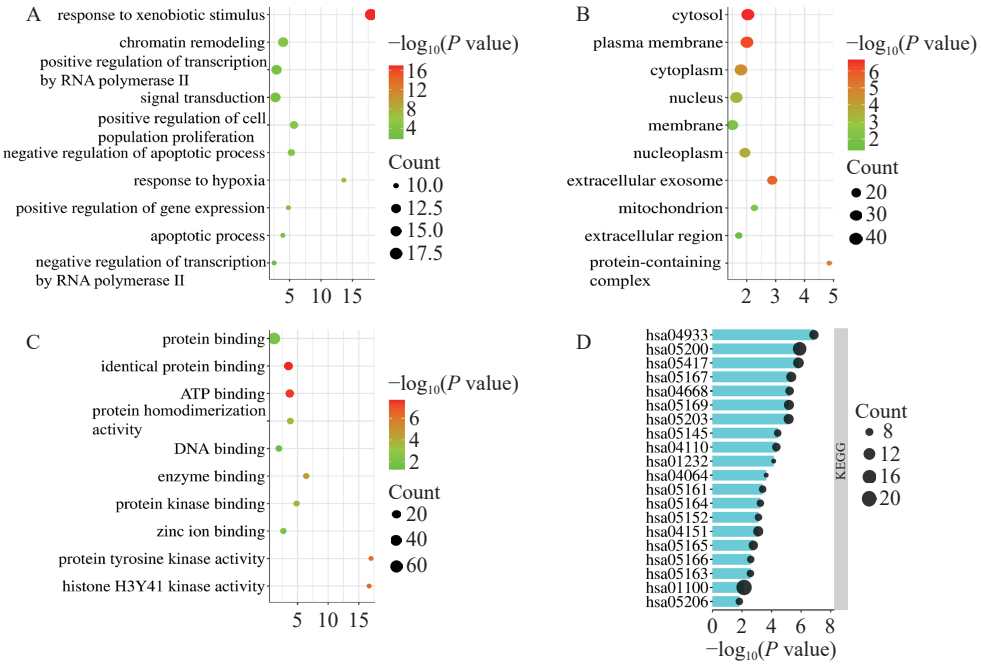


图 2　桑叶治疗高尿酸血症 GO 分析和 KEGG 通路富集分析

Fig.2　GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis of mulberry leaf treatment for hyperuricemia

注：A. BP 富集分析；B. CC 富集分析；C. MF 富集分析；D. KEGG 通路富集分析。

ing)、相同蛋白结合(identical protein binding)、ATP 结合(ATP binding)、蛋白质同源二聚体化活性(protein homodimerization activity)、DNA 结合(DNA binding)和酶结合(enzyme binding)等过程。以上结果显示桑叶有效成分可参与多种生物过程来调节高尿酸血症。

将桑叶治疗高尿酸血症的潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析,共获取到 97 条信号通路,选取富集分数(Count)前 20 的通路进行可视化分析(图 2D),通路详细信息见表 2。桑叶主要通过代谢途径(Metabolic pathways)、癌症途径(Pathways in cancer)、脂质与动脉粥样硬化通路(Lipid and atherosclerosis)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、核酸代谢途径(Nucleotide metabolism)以及 NF-κB 信号通路(NF-κB signaling pathway)等治疗高尿酸血症。

2.4 桑叶主要化合物治疗高尿酸血症的“成分-靶点-疾病-通路”网络构建

将桑叶的 16 个有效成分及其 383 个靶点、高尿酸血症 KEGG 富集分析的前 20 条通路及其 205 个靶点导入 Cyt3.8.0 软件构建“成分-靶点-疾病-通路”网络图(图 3)。此网络经分析后由 421 个节点、1101 条边组成,其中桑叶化合物与高尿酸血症相关通路存在 57 个共同靶点。结合表 2 可知,其中代谢途径(Metabolic pathways)共涉及 23 个共同基因,与高尿酸血症直接相关的有 *XDH*(黄嘌呤脱氢酶)、*HPRT1*(次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1)、*ADA*(腺苷脱氢酶)。*XDH* 催化次黄嘌呤生成黄嘌呤进而产生尿酸,是嘌呤代谢的最后两步,直接参与嘌呤代谢,是尿酸生成关键酶[22];*HPRT1* 在嘌呤代谢中参与嘌呤回收工作,若 HPRT 缺乏不仅会增强内源性嘌呤合成,还会导致生成过量和积累[22];*ADA* 能够催化腺苷不可逆水解脱氨生成肌苷,并最终生成尿酸严重影响尿酸代谢,因此抑制 ADA 酶活性是降低尿酸水平的有效方法[23]。代谢途径中部分基因间接参与高尿酸血症,PNP(嘌呤核苷磷酸化酶)间接参与体内嘌呤分解代谢,PNP 催化嘌呤核糖核苷(如腺苷、鸟苷)和脱氧核糖核苷(如脱氧腺苷、脱氧鸟苷)的分解反应,生成核糖磷酸/脱氧核糖磷酸和游离的嘌呤碱基(如腺嘌呤、鸟嘌呤),抑制 PNP 可以减少次黄嘌呤释放,从而有效降低尿酸盐生成[24];ALDH2(乙醛脱氢酶 2)是体内乙醇代谢的关键酶,ALDH2 将乙醇代谢为乙醛,随后被氧化为乙酸盐,乙酸盐代谢为乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环转化为 ATP 和 AMP,最终代谢为 UA,是高尿酸血症的主要诱因[25]。癌症途径(Pathways in cancer)共涉及 18 个共同基因,其中 *JAK1*、*JAK2*、*CDK4*、*CDK6*、*CASP3* 基因是细胞周期、细胞凋亡的关键基因,这些基因通过直接或间接调控细胞周期

表 2 KEGG 通路富集分析相关信息

Table 2 Information related to KEGG pathway enrichment analysis

代码	通路名称	相关基因	富集数
hsa01100	Metabolic pathways	*MGAM*, *AHCY*, *MAOA*, *GAA*, *ADK*, *AKR1B1*, *PYGL*, *COMT*, *TYMS*, *PTGS2*, *PIK3CG*, *CYP17A1*, *DHFR*, *PNP*, *ALDH2*, *CYP11B2*, *CA2*, *IMPDH2*, *CD38*, *HPRT1*, *GAPDH*, *XDH*, *ADA*	23
hsa05200	Pathways in cancer	*ALK*, *HDAC1*, *PTGS2*, *ESR1*, *IGF1R*, *CCNA2*, *MAPK8*, *CDK6*, *CDK4*, *CASP3*, *MDM2*, *ABL1*, *AGTR1*, *BIRC5*, *MAPK1*, *PPARG*, *JAK2*, *JAK1*	18
hsa05417	Lipid and atherosclerosis	*HSPA8*, *XBP1*, *MAPK8*, *VCAM1*, *CASP3*, *MMP3*, *MAPK1*, *PPARG*, *JAK2*, *SELE*, *TNF*, *ICAM1*	12
hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	*MAPK8*, *CDK6*, *SYK*, *CDK4*, *CASP3*, *MAPK1*, *JAK2*, *PTGS2*, *PIK3CG*, *JAK1*, *ICAM1*	11
hsa05169	Epstein-Barr virus infection	*CCNA2*, *MAPK8*, *CDK6*, *SYK*, *HDAC1*, *CDK4*, *CASP3*, *MDM2*, *TNF*, *JAK1*, *ICAM1*	11
hsa05203	Viral carcinogenesis	*CCNA2*, *CDK6*, *SYK*, *HDAC1*, *CDK4*, *CASP3*, *MDM2*, *CDK1*, *MAPK1*, *JAK1*, *HDAC7*	11
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	*CDK6*, *SYK*, *CDK4*, *MDM2*, *KDR*, *MAPK1*, *JAK2*, *PIK3CG*, *JAK1*, *IGF1R*, *MCL1*	11
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	*MAPK8*, *VCAM1*, *CDK4*, *CASP3*, *AGTR1*, *MAPK1*, *JAK2*, *SELE*, *TNF*, *ICAM1*	10
hsa05165	Human papillomavirus infection	*CCNA2*, *CDK6*, *HDAC1*, *CDK4*, *CASP3*, *MDM2*, *MAPK1*, *PTGS2*, *TNF*, *JAK1*	10
hsa04668	TNF signaling pathway	*MAPK8*, *VCAM1*, *CASP3*, *MMP3*, *MAPK1*, *PTGS2*, *SELE*, *TNF*, *ICAM1*	9
hsa04110	Cell cycle	*CCNA2*, *CDK7*, *CDK6*, *CCNH*, *HDAC1*, *CDK4*, *MDM2*, *CDK1*, *ABL1*	9
hsa05145	Toxoplasmosis	*HSPA8*, *MAPK8*, *CASP3*, *MAPK1*, *JAK2*, *TNF*, *PIK3CG*, *JAK1*	8
hsa05161	Hepatitis B	*CCNA2*, *MAPK8*, *CASP3*, *MAPK1*, *BIRC5*, *JAK2*, *TNF*, *JAK1*	8
hsa05164	Influenza A	*CDK6*, *CDK4*, *CASP3*, *MAPK1*, *JAK2*, *TNF*, *JAK1*, *ICAM1*	8
hsa05152	Tuberculosis	*MAPK8*, *SYK*, *CASP3*, *TLR9*, *MAPK1*, *JAK2*, *TNF*, *JAK1*	8
hsa05166	Human T-cell leukemia virus 1 infection	*CCNA2*, *MAPK8*, *CDK4*, *LCK*, *MAPK1*, *TNF*, *JAK1*, *ICAM1*	8
hsa05163	Human cytomegalovirus infection	*CDK6*, *CDK4*, *CASP3*, *MDM2*, *MAPK1*, *PTGS2*, *TNF*, *JAK1*	8
hsa05206	MicroRNAs in cancer	*CDK6*, *HDAC1*, *CASP3*, *MDM2*, *ABL1*, *MAPK1*, *PTGS2*, *MCL1*	8
hsa01232	Nucleotide metabolism	*PNP*, *IMPDH2*, *ADK*, *HPRT1*, *TYMS*, *XDH*, *ADA*	7
hsa04064	NF-κB signaling pathway	*VCAM1*, *SYK*, *PARP1*, *LCK*, *PTGS2*, *TNF*, *ICAM1*	7

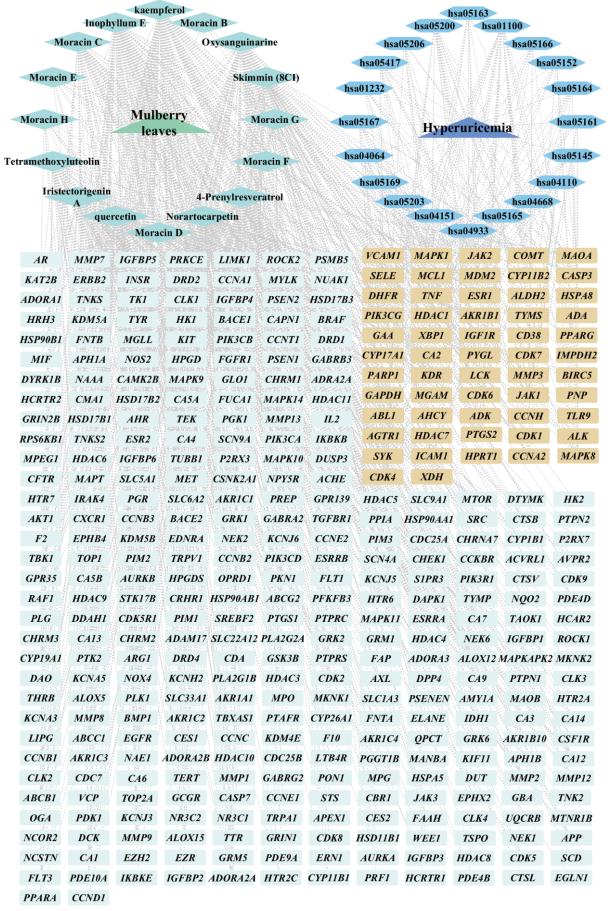


图 3　桑叶治疗高尿酸血症“成分-靶点-疾病-通路”网络图

Fig.3　Network diagram of "component-target-disease-pathway" for mulberry leaf treatment of hyperuricemia

注：图中三角形为桑叶和疾病名称；菱形为桑叶化合物名称；椭圆形为高尿酸血症富集前 20 的通路；方形为潜在靶点，其中橙色为疾病通路与桑叶化合物的交集靶点。

进程，参与高尿酸血症的发展[26−27]；*PTGS2* 在多种炎症反应中存在调控作用，通过 p53/SLC7A11 信号通路介导氧化损伤从而抑制细胞铁死亡[28]，一项研究显示在高尿酸血症小鼠中 *PTGS2* 表达增强，是小鼠痛风诱发的主要因素[29]，在痛风患者中发现 *PTGS2* 显著高于对照组，而 *CASP8* 和 *CD274* 的 mRNA 表达显著低于对照组[30]。KEGG 富集的前 20 条通路中，癌症途径（Pathways in cancer）和脂质与动脉粥样硬化通路（Lipid and atherosclerosis）都涉及 *PPARG*（过氧化物酶体增殖物激活受体 γ）基因，它是调控脂质代谢、胰岛素敏感性和炎症反应的关键基因，在胰岛素抵抗患者中抑制 *PPARG* 活性能改善胰岛素抵抗并减少肾小管尿酸重吸收，进而降低血清尿酸水平[31]。PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）在促进肾小管上皮细胞的分化的同时，还能调控高尿酸血症引起的代谢异常以及炎症反应，PI3K-Akt 信号通路还能影响胰岛素代谢造成高尿酸血症伴发的 2 型糖尿病[32]。其中 *NFKBIA* 基因涉及 14 个高尿酸血症相关通路，该基因是 NF-κB 信号通路中的关键基因，可以促进炎症因子的产生和免疫细胞的活化，炎症会影响尿酸排泄是造成高尿酸血症的主要原因，尿酸排泄受阻导致血清尿酸浓度升高，使机体长期处于炎症状态，从而形成恶性循环[17]，有研究显示通过调节 NF-κB 信号通路能缓解小鼠关节内微晶型尿酸钠导致的痛风症状[33]。综上所述，高尿酸血症是涉及多通路的疾病，病理机制复杂，桑叶有效成分通过多途径、多通路治疗高尿酸血症。

2.5　分子对接技术预测桑叶主要化合物与关键靶点结合能力

以核心靶点 PPI 网络图中排名前 6 的关键靶蛋白为受体，以 16 种桑叶有效成分为配体，采用 AutoDock Vina 进行分子对接，通过结合能评价成分与靶蛋白的结合能力，具体结合信息见表 3。根据结合自由能越低、受体与配体结合作用越强的原则[34]，选取与靶蛋白自由结合能最低的化合物进行相互作用分析，靶蛋白与有效成分对接口袋和配体相互作用关系见图 4 和附图 1（详见本刊官网 https://www.spgykj.com/文章的网络版）。其中 Quercetin 与 GAPDH 的结合能达到−10.2 kcal/mol，Moracin D 与 TNF 的结合能达到−8.4 kcal/mol，Inophyllum E 与 PPARG 的结合能达到−9.7 kcal/mol。在结果分析时发现，Oxysanguinarine 分别与核心靶蛋白中的 ESR1、CASP3、PTGS2 作用力最强，均能形成氢键作用力，结合能达到−8.9、−9.8 和−10.3 kcal/mol。这种强有力的结合作用是由于 Oxysanguinarine 的羰基和羟基与 ESR1 的配体结合域中的残基 ARG-515 和 LYS-520 形成氢键，芳香环与 ESR1 之间存在 pi-pi 作用。Oxysanguinarine 的羟基团与 CASP3 和 PTGS2 分别在 TYR-197 和 GLN-327 形成氢键稳定结构，且 Oxysanguinarine 与 PTGS2 形成氢键后竞争性抑制花生四烯酸的结合。上述的分子间作用力，对维持 Oxysanguinarine 与靶蛋白结合的稳定起关键作用。

表 3　桑叶化合物与关键靶点的分子对接结合能（kcal/mol）

Table 3　Molecular docking binding energy of mulberry leaf compounds with key targets (kcal/mol)

化合物	GAPDH	TNF	ESR1	CASP3	PPARG	PTGS2
Inophyllum E	−10.1	−8.3	−8.8	−9.7	**−9.7**	−10.2
Moracin B	−7.7	−6.0	−7.0	−7.0	−6.6	−8.9
Moracin C	−9.7	−7.4	−7.4	−8.0	−7.2	−10.1
Moracin D	−9.3	**−8.4**	−8.2	−8.4	−8.3	−9.4
Moracin E	−8.2	−7.6	−7.9	−8.5	−8.1	−9.1
Moracin F	−8.6	−7.1	−7.3	−7.5	−7.1	−8.5
Moracin G	−7.7	−7.4	−8.4	−8.5	−7.8	−8.6
Moracin H	−7.7	−7.5	−7.8	−7.6	−7.6	−9.3
4-Prenylresveratrol	−8.9	−7.0	−7.6	−7.5	−6.9	−9.0
Oxysanguinarine	−9.1	−8.1	**−8.9**	**−9.8**	−8.4	**−10.3**
Quercetin	**−10.2**	−7.7	−7.5	−7.8	−7.8	−8.7
Kaempferol	−9.2	−7.6	−7.6	−7.4	−7.6	−9.1
Iristectorigenin A	−8.8	−7.1	−7.8	−7.8	−6.8	−8.6
Norartocarpetin	−10.0	−7.4	−7.3	−7.5	−7.6	−9.2
Tetramethoxyluteolin	−8.8	−7.5	−7.4	−8.2	−7.0	−8.7
Skimmin（8CI）	−9.7	−7.0	−8.3	−7.4	−7.3	−8.6

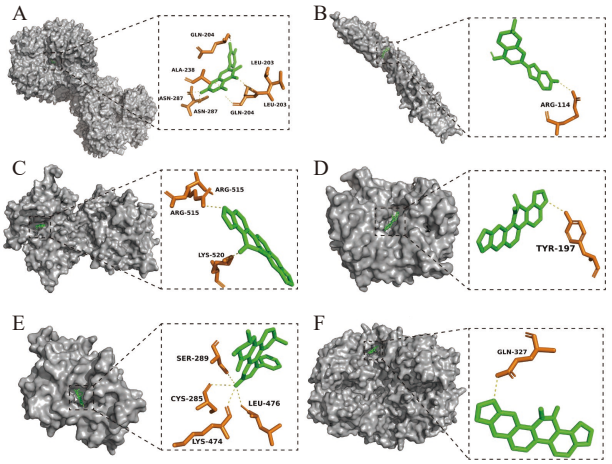


图 4 桑叶化合物与关键靶点分子对接模式图

Fig.4 Molecular docking pattern diagram of mulberry leaf compounds and key target

注：A. Quercetin 与 GAPDH 最佳对接构象；B. Moracin D 与 TNF 最佳对接构象；C. Oxysanguinarine 与 ESR1 最佳对接构象；D. Oxysanguinarine 与 CASP3 最佳对接构象；E. Inophyllum E 与 PPARG 最佳对接构象；F. Oxysanguinarine 与 PTGS2 最佳对接构象。

2.6 Oxysanguinarine 体外抑制黄嘌呤氧化酶活性

黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XOD)催化次黄嘌呤(Hypoxanthine)生成黄嘌呤(Xanthine, Xan)，进而将黄嘌呤转化为尿酸(Uric Acid, UA)。XOD 与代谢通路中 XDH 是同一种蛋白酶的不同构象，XDH 主要存在于植物中，XOD 主要存在于动物体内，二者均是嘌呤代谢的关键酶[35]。通过抑制 XOD 活性减少尿酸生成，进而降低体内尿酸水平，是治疗 HUA 的重要手段。由分子对接实验显示 Oxysanguinarine(Oxy)与核心靶蛋白中的 ESR1、CASP3、PTGS2 有较强的结合作用，因此选择 Oxy 为实验对象。通过体外酶活实验显示，Oxy 能够显著抑制 XOD 酶活性。由图 5A 可知，XOD 酶活性随着 Oxy 浓度的增加逐渐极显著降低(P<0.001)，由图 5B 可知，XOD 抑制率极显著增强(P<0.001)，并呈剂量依赖性增加。本实验还设置了别嘌醇(Allopurinol)作为参照，由图 5C、图 5D 可知，随着别嘌醇浓度增加，XOD 酶活性逐渐降低并在别嘌醇浓度为 0.01 mmol/L 时有极显著差异(P<0.001)，抑制率随浓度增加而增强。由此可见，本实验设置的体外抑制黄嘌呤氧化酶活性体系是可靠的。在实验结果中还发现，Oxy 在 2 mmol/L 时对 XOD 酶活性抑制率达到 100%，与一线药物别嘌醇 1 mmol/L 时的抑制率相同。因此 Oxy 具有抑制 XOD 酶活性的能力，是治疗高尿酸血症的潜在药物。

2.7 Oxysanguinarine 促进 HK-2 细胞尿酸排泄

尿酸排泄不足是高尿酸血症的主要发病原因，因此检测 Oxy 对细胞尿酸的排泄能力，用 UA 诱导 HK-2 细胞进行尿酸排泄。为排除药物对细胞的毒性作用，采用 MTT 法检测细胞活力。由图 6 可知，

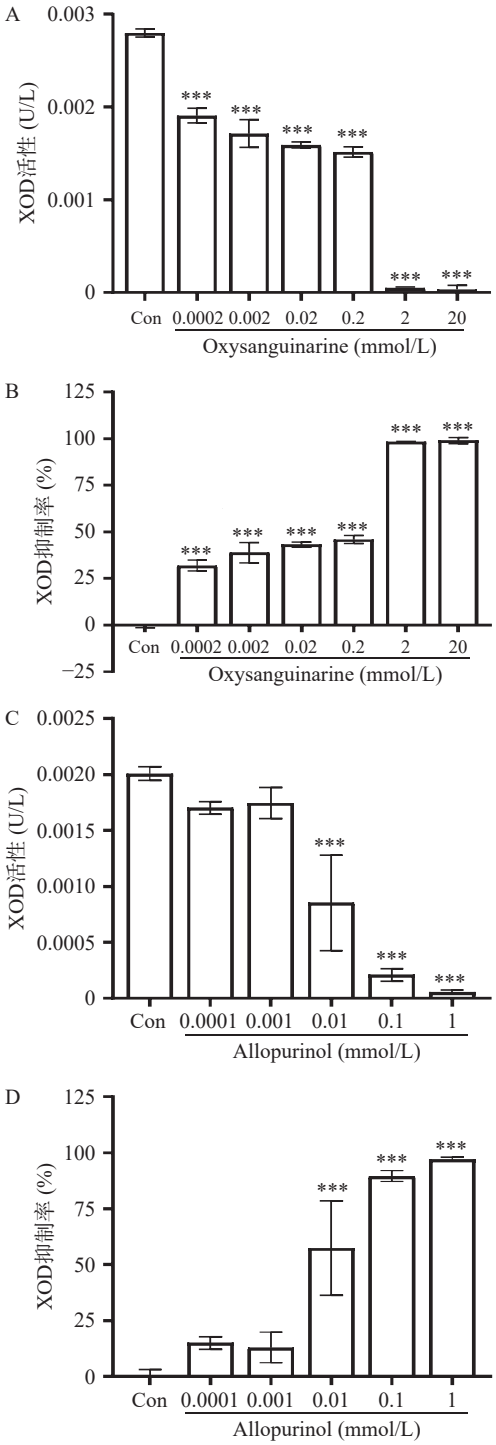


图 5 Oxysanguinarine 体外抑制 XOD 活性

Fig.5 Oxysangnanine inhibits XOD activity *in vitro*

注：A. Oxy 对 XOD 活性的影响；B. Oxy 对 XOD 的抑制率；C. Allopurinol 对 XOD 活性的影响；D. Allopurinol 对 XOD 的抑制率；*与 Con 相比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

与 DMSO 组相比，苯溴马隆和 Oxy 在浓度 0.5、1、2.5、5、10 μmol/L 时，对 HK-2 细胞无毒性，因此选择 5、10 μmol/L 进行后续实验。如图 7A 所示，Oxy 能增加 HK-2 细胞上清液中的 UA 含量，且当浓度达到 10 μmol/L 时细胞上清中 UA 与模型组存在极显著差异(P<0.001)。同时 Ben 作为阳性对照也有同样的效果，因此 HK-2 细胞的尿酸排泄模型构建成功，且能证明 Oxy 促进 HK-2 细胞 UA 排泄作用。

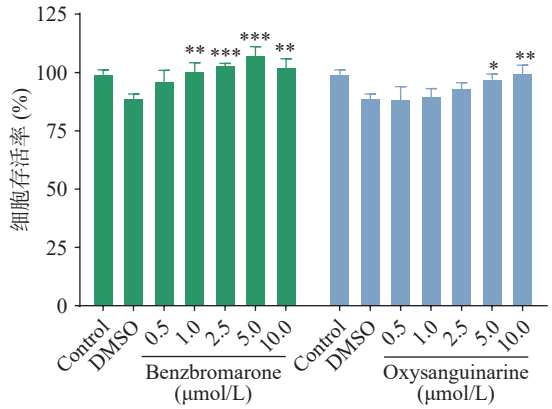


图 6　不同浓度 Ben 和 Oxy 对 HK-2 细胞活性影响

Fig.6　Effects of different concentrations of Ben and Oxy on the activity of HK-2 cells

注：*与 DMSO 相比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

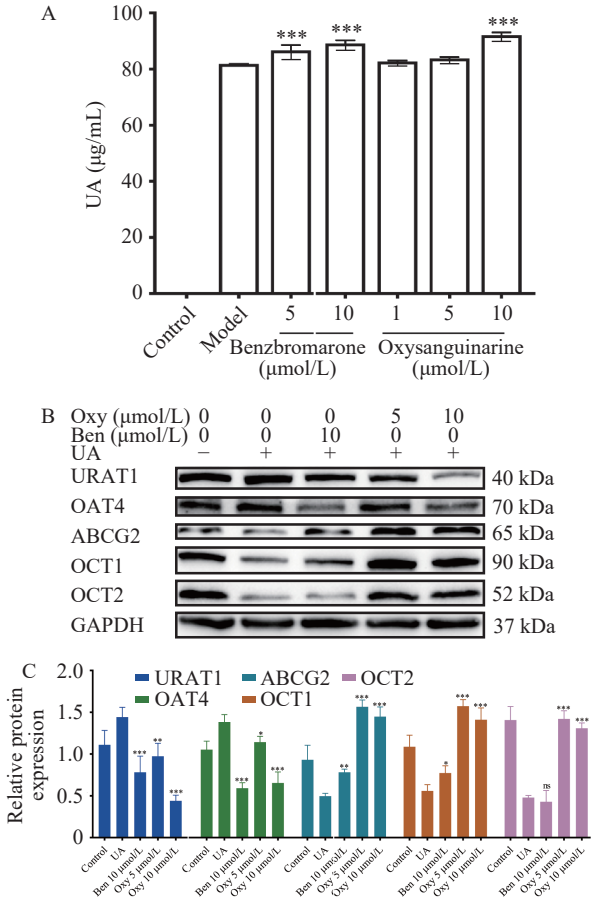


图 7　Oxysanguinarine 调控 HK-2 细胞尿酸转运蛋白

Fig.7　Oxysanguinarine regulates uric acid transporter in HK-2 cells

注：A. Ben 和 Oxy 对 HK-2 细胞尿酸排泄能力检测；B. Oxy 对 HK-2 细胞尿酸转运蛋白表达的影响；C. Oxy 对 HK-2 细胞尿酸转运蛋白表达灰度分析；A 中*与 Model 相比，C 中*与 UA 相比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

由 Western blot 实验（图 7B）可明显看出 URAT1、OAT4、ABCG2、OCT1、OCT2 蛋白的表达趋势，蛋白灰度分析见图 7C。与正常组相比，加入 UA 诱导剂后，尿酸重吸收蛋白 OAT4（P<0.05）和尿酸盐转运体 URAT1 的表达增强，尿酸排泄蛋白 ABCG2（P<0.05）、OCT1（P<0.01）、OCT2（P<0.01）的表达显著降低。加入 Oxy 后显著降低了 URAT1 和 OAT4 表达（P<0.05），同时对 ABCG2、OCT1、OCT2 表达极显著增强（P<0.001）。因此 Oxy 可以通过抑制 URAT1 表达，减少 UA 重吸收作用，进而增强 ABCG2 的 UA 排泄效果，有效调节 HK-2 细胞尿酸排泄功能。

2.8　Oxysanguinarine 调控 HEK-293T 细胞尿酸转运体的表达

为了更全面地探究肾脏不同部位细胞尿酸排泄情况，从而更全面地模拟肾脏排泄，本文也对 HEK-293T 细胞的尿酸转运体的表达进行探究。由细胞毒性实验（图 8）可知，Ben 和 Oxy 对 HEK-293T 细胞无毒性作用（P>0.05），选择 5、10 μmol/L 进行实验。通过 Western blot 实验（图 9A）可明显看出 URAT1、OAT4、ABCG2、OCT1 蛋白的表达趋势，蛋白灰度分析见图 9B。实验发现不同浓度的 Oxy 可极显

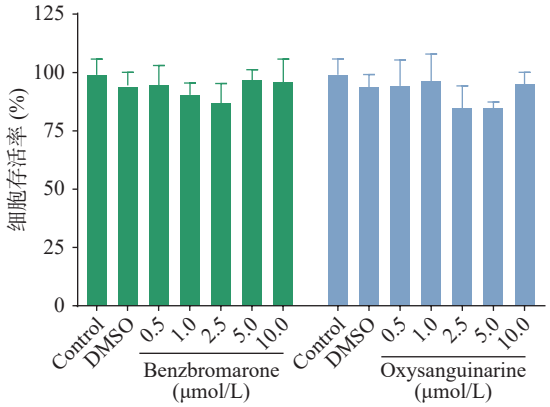


图 8　不同浓度 Ben 和 Oxy 对 HEK-293T 细胞活性影响

Fig.8　Effects of different concentrations of Ben and Oxy on the activity of HEK-293T cells

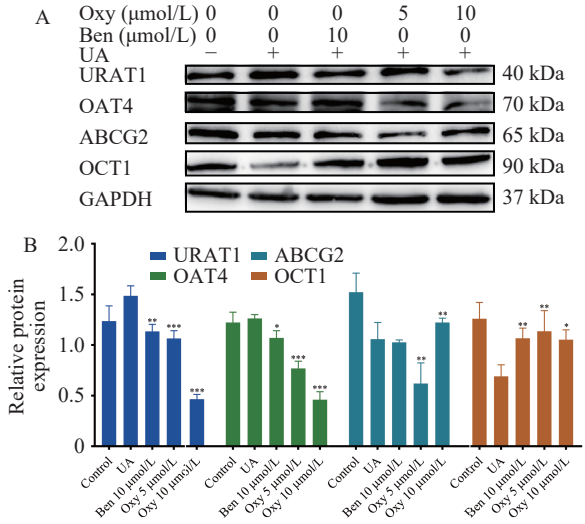


图 9　Oxysanguinarine 调控 HEK-293T 细胞尿酸转运蛋白

Fig.9　Oxysanguinarine regulates uric acid transporter in HEK-293T cells

注：A. Oxy 对 HEK-293T 细胞尿酸转运蛋白表达的影响；B. Oxy 对 HEK-293T 细胞尿酸转运蛋白表达灰度分析；B 中*与 UA 相比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

著下调 URAT1 和 OAT4 的表达（P<0.001），上调 OCT1 表达（P<0.05）。HEK-293T 细胞中 ABCG2 表达呈现 Oxy 浓度为 5 μmol/L 时，ABCG2 蛋白表达降低，但 Oxy 浓度提升至 10 μmol/L 时 ABCG2 表达增强。因此高浓度 Oxy 可以通过抑制 URAT1 和 OAT4 表达，增强 ABCG2 和 OCT1 表达（P<0.05）来调控 HEK-293T 细胞尿酸代谢。

3 讨论与结论

HUA 是一种体内尿酸代谢紊乱引发的疾病，随着生活水平的提高，人体摄入的高嘌呤类食物增多，例如肉汤、海产品、动物内脏、菌类、豆类制品等，长期摄入会增加患高尿酸血症的风险[2]。由于人类缺乏尿酸酶，不能将尿酸（Uric Acid，UA）直接转化为尿囊素，因此 UA 是人体嘌呤代谢的最终产物。桑叶是一种药食两用植物，不仅安全性极高，还富含蛋白质、多糖、多酚、黄酮及碱类等物质而具有较高食用价值[36−37]。在传统中医治疗领域，桑叶通常被用作治疗糖尿病、关节炎及风湿等疾病。现代医学研究显示，1-脱氧野尻霉素（1-DNJ）是最早在桑叶中定位的有效物质，对 α 糖苷酶有强烈抑制效果，能降低糖尿病患者餐后血糖[38]。桑叶在治疗糖脂代谢、抗氧化、抗炎等方面有较好预防与治疗效果，但在治疗 HUA 方面机制不明确。

通过网络药理学实验，从 TCMSP 数据库中获取的桑叶有效成分中，有 16 个符合本实验筛选条件。经过分析共得到桑叶有效成分和 HUA 的 80 个交集靶点，分析交集靶点和富集通路后得出桑叶关键靶蛋白包括 GAPDH、TNF、PPARG、CASP3、ESR1、PTGS2 等，通过代谢途径、核酸代谢途径、癌症途径、TNF 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、NF-κB 信号通路等通路治疗 HUA。代谢通路和核酸代谢通路是治疗 HUA 的关键通路，这两条通路的中 XDH 是黄嘌呤脱氢酶，植物中的 XDH 结构与动物中的 XOD 是同分异构体具有相同作用[35]。XOD 仅存在于哺乳动物中，因此文本在筛选关键靶点时仅在代谢通路和核酸代谢通路中筛选到了 XDH，在体外实验时，对人体内 XOD 的酶活性进行测定[39]。

根据分子对接情况选择与关键靶蛋白结合力最强的物质 Oxy 进行体外实验。HUA 发病机制是由尿酸生成过多和尿酸排泄不足引发的，因此本文对 Oxy 治疗高尿酸血症的通路机制进行检测。首先建立了 XOD 酶活体系，实验显示 Oxy 可以抑制 XOD 活性。随后为了全面讨论桑叶的降尿酸机制，本实验在现有研究基础上，改进了体外尿酸排泄细胞模型，将外源尿酸浓度降低至不损伤细胞活性，能更准确地分析桑叶降尿酸机制。最后探究 Oxy 对细胞的尿酸排泄效果和尿酸转运蛋白的表达，在细胞水平更进一步证明桑叶有效成分的降尿酸作用。体内尿酸排泄需多蛋白协同作用，尿酸转运蛋白是一类在体内对尿酸进行转运、排泄、重吸收的蛋白家族[22]。尿酸转运蛋白家族中，OAT1 和 OAT3 蛋白参与 UA 从血液到肾小管的转运，在肾小管又通过 URAT1 和 OAT4 进行 UA 重吸收，极大增加 UA 排泄负担，最后由 ABCG2 将 UA 运输至肾小管及肠道进行排泄[22]。Oxy 通过降低 URAT1 和 OAT4 蛋白表达，同时增强 ABCG2 蛋白表达，实现促进尿酸排泄效果。其中 URAT1（尿酸转运体 1，由 *SLC22A12* 基因编码）能介导肾脏 90% UA 重吸收和分泌后重吸收[40]，因此多种尿酸排泄药物以 URAT1 为治疗靶点。HEK-293T 细胞是人肾上皮细胞，HK-2 细胞是人肾小管上皮细胞，保留了肾脏上皮和近端肾小管上皮功能，因此采用两种不同的肾脏细胞 HK-2 和 HEK-293T 对肾脏不同部位的细胞进行探究。已有前人用 HK-2 细胞构建并进行实验，具有较强的体内实验指导意义[15]。本实验通过构建体外尿酸排泄细胞，经过 Oxy 处理后两个细胞系对尿酸细胞有不同程度的促尿酸排泄作用。以上结果证明桑叶的降尿酸效果，但本实验仅进行了体外治疗 HUA 的机制探讨，尚未在动物体内进行验证。因此后续计划利用高尿酸血症小鼠继续评估桑叶治疗高尿酸血症的机制，为桑叶的开发与利用提供更全面的依据。本文的工作对桑叶开发降尿酸食品具有指导意义，为后期开展体内动物实验提供数据支撑。

综上所述，本文通过网络药理学对桑叶治疗高尿酸血症的潜在成分、靶点、通路进行筛选，筛选出了 *GAPDH*、*TNF*、*ESR1*、*CASP3* 等 15 个核心靶点，桑叶能通过代谢通路和核酸代谢通路等机制调控 HUA。结合分子对接技术验证主要核心成分与疾病靶点的作用，筛选出了桑叶治疗高尿酸血症的关键成分 Oxysanguinarine，并且对其开展了体外实验。实验结果显示，桑叶具有多靶点、多途径治疗高尿酸血症的作用，并且证明了桑叶有效成分 Oxysanguinarine 可以抑制体外黄嘌呤氧化酶活性，通过调控尿酸排泄蛋白表达，减少尿酸重吸收进而增加尿酸排泄效果，证明桑叶治疗高尿酸血症的潜在作用。本研究通过网络药理学与体外实验相结合，阐明桑叶治疗高尿酸血症的机制，为后期开展体内实验奠定基础，为桑叶开发为降尿酸食品提供理论依据同时增加了桑叶“老药新用”的价值。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] HUANG Bo, LI Xin, ZHANG Xinxin, et al. Fractional excretion of urate is positively associated with type 2 diabetes in HUA patients: A cross-sectional study[J]. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 2024, 17: 1701−1713.

[2] WANG Yanbo, JIN Changzhong. Roles of traditional Chinese medicine extracts in hyperuricemia and gout treatment: Mechanisms and clinical applications[J]. World Journal of Gastroenterology,

2024, 30(47): 5076−5080.
[3] NICHOLAS S A, BUBNOV V V, YASINSKA I M, et al. Involvement of xanthine oxidase and hypoxia-inducible factor 1 in Toll-like receptor 7/8-mediated activation of caspase 1 and interleukin-1β[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(1): 151−158.
[4] CHEN Nuoshi, LIU Dandan, HE Zelin, et al. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson vines ameliorates hyperuricemia by inhibiting synthesis and promoting excretion of uric acid through targeting NLRP3/caspase-1/IL-1β pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2025, 340: 119271.
[5] XIE Haitao, SHEN Le, YU Peng, et al. Associations of elevated cardiac biomarkers with hyperuricemia and mortality in US adults without prevalent cardiovascular disease[J]. Frontiers in Endocrinology, 2024, 15: 1432200.
[6] LI Xiaoqian, GU Yongqing, LING Yuanyuan, et al. Association between mitophagy and NLRP3 inflammasome in uric acid nephropathy[J]. Renal Failure, 2024, 46(2): 2438847.
[7] CHEN Ruhai, ZHOU Xin, DENG Qingfang, et al. Extraction, structural characterization and biological activities of polysaccharides from mulberry leaves: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 257: 128669.
[8] HUNYADI A, LIKTOR-BUSA E, MÁRKI A, et al. Metabolic effects of mulberry leaves: Exploring potential benefits in type 2 diabetes and hyperuricemia[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013: 948627.
[9] 孔苑琳, 张剑光, 苏宏娜, 等. UPLC-Q-Exactive-MS/MS 结合网络药理学分析五脉绿绒蒿的化学成分及其抗肝纤维化作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6097−6116. [KONG Yuanlin, ZHANG Jianguang, SU Hongna, et al. Chemical constituents and anti-liver fibrosis mechanism of *Meconopsis quintuplinervia* based on UPLC-Q-Exactive-MS/MS and network pharmacology[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(22): 6097−6116.]
[10] 楚邵璇, 王晓, 唐征, 等. 基于网络药理学及分子对接探究荷叶生物碱抗高尿酸血症的作用机制[J]. 食品工业科技, 2024, 45(17): 10−20. [CHU Shaoxuan, WANG Xiao, TANG Zheng, et al. Action mechanism of *Nelumbo nucifera* leaf alkaloids in the treatment of hyperuricemia based on network pharmacology and molecular docking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 10−20.]
[11] CUAN Xiangdan, YANG Xingying, WANG Jinxian, et al. Discovery of flavonoid-containing compound lupalbigenin as anti-NSCLC cancer agents via suppression of EGFR and ERK1/2 pathway[J]. Bioorganic Chemistry, 2024, 153: 107808.
[12] 张瑛毓, 普布多吉, 卢聪, 等. 基于黄嘌呤氧化酶活性抑制和斑马鱼高尿酸血症模型的降尿酸功效食药材筛选[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 334−339. [ZHANG Yingyu, PU Buduoji, LU Cong, et al. Screening of uric acid-lowering food and medicinal materials based on inhibiting xanthine oxidase activity and zebrafish hyperuricemia model[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 334−339.]
[13] HUANG Yanping, CUAN Xangdan, YANG Xingying, et al. Oxidized tea polyphenol (OTP-3) targets EGFR synergistic nimotuzumab at inhibition of non-small cell lung tumor growth[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 128: 106084.
[14] 孙可欣. 降尿酸药食同源材料筛选及活性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022. [SUN Kexin. Screening and activity study of medicine and food homologous on uric acid-lowering[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2022.]
[15] 孙泽锐. 鞣花酸调节高尿酸血症的作用机理研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2022. [SUN Zerui. Study on the mechanism of action of ellagic acid in regulating hyperuricemia[D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2022.]
[16] LANASPA M A, SANCHEZ-LOZADA L G, CHOI Y J, et al. Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress potential role in fructose-dependent and-independent fatty liver[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(48): 40732−40744.
[17] 吴选霞, 补娟, 叶勒丹·马汉, 等. 刺槐素通过调控尿酸转运蛋白和 NF-κB/NLRP3 信号通路改善高尿酸血症[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(1): 191−198. [WU Xuanxia, BU Juan, Yeledan·Mahan, et al. Acacetin ameliorates hyperuricemia by regulating uric acid transporter and NF-κB/NLRP3 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2026, 32(1): 191−198.]
[18] 梁景珍, 高映杰, 叶文倩, 等. 结合系统药理学与代谢组学探究黄芩素治疗高尿酸血症的作用机制[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 1−11. [LIANG Jingzhen, GAO Yingjie, YE Wenqian, et al. Combined with systematic pharmacology and metabonomics to explore the mechanism of baicalein in the treatment of hyperuricemia[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2024, 34(9): 1−11.]
[19] WU Zhiyuan, WANG Chuanxu, YANG Feng, et al. Network pharmacology, molecular docking, combined with experimental verification to explore the role and mechanism of Shizhifang decoction in the treatment of hyperuricemia[J]. Heliyon, 2024, 10(3): e24865.
[20] YANG Zhiguo, LYU Bo, MA Bin, et al. Screening of the effective sites of *Cichorium glandulosum* against hyperuricemia combined with hyperlipidemia and its network pharmacology analysis[J]. Computational Biology and Chemistry, 2024, 110: 108088.
[21] 徐楚, 田晔. 加味四妙勇安汤调节肠道菌群治疗高尿酸血症的网络药理学分析[J]. 中国微生态学杂志, 2024, 36(11): 1267−1275,1288. [XU Chu, TIAN Ye. Network pharmacological analysis of modified Simiao Yong'an Decoction in regulating gut microbiota for the treatment of hyperuricemia[J]. Chinese Journal of Microecology, 2024, 36(11): 1267−1275,1288.]
[22] DU Lin, ZONG Yao, LI Haorui, et al. Hyperuricemia and its related diseases: Mechanisms and advances in therapy[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9: 212.
[23] CHEN Yu, LUO Liyong, HU Shanshan, et al. The chemistry, processing, and preclinical anti-hyperuricemia potential of tea: A comprehensive review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(24): 7065−7090.
[24] JACOMELLI G, BALDINI E, MUGNAINI C, et al. Inhibiting PNP for the therapy of hyperuricemia in Lesch-Nyhan disease: Preliminary *in vitro* studies with analogues of immucillin-G[J]. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2019, 42(1): 178−185.
[25] JEE Y H, JUNG K J, PARK Y B, et al. Causal effect of alcohol consumption on hyperuricemia using a Mendelian randomization design[J]. International Journal of Rheumatic Diseases, 2019, 22(10): 1912−1919.
[26] 陈君洁, 黄传兵, 程丽丽, 等. 芪黄健脾滋肾颗粒调控 JAK1/STAT1 信号通路对 MRL/lpr 狼疮小鼠足细胞凋亡的影响[J]. 中成药, 2024, 46(12): 4145−4150. [CHEN Junjie, HUANG Chuanbing, CHENG Lili, et al. Effect of Qihuang Jianpi Zishen Granule on podocyte apoptosis in MRL/lpr lupus mice by regulating JAK1/STAT1 signaling pathway[J]. Chinese Traditional Patent Medicine,

2024, 46(12): 4145−4150.]
[27] 祝欣萍, 杨佳璐, 高志鹏, 等. 桔梗皂苷 D 对人骨肉瘤细胞活力、迁移、侵袭、凋亡和细胞周期的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(10): 1844−1853. [ZHU Xinping, YANG Jialu, GAO Zhipeng, et al. Effects of platycodin D on osteosarcoma cells *in vitro*[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2024, 40(10): 1844−1853.]
[28] 宋玮, 张钟艺, 张小波, 等. 茱萸丸调控 p53/SLC7A11 信号通路介导氧化损伤及铁死亡减轻动脉粥样硬化[J]. 中国中药杂志 , 2024, 49(15): 4118−4127. [SONG Wei, ZHANG Zhongyi, ZHANG Xiaobo, et al. Zhuyu Pills regulate p53/SLC7A11 signaling pathway-mediated oxidative damage and ferroptosis to treat atherosclerosis[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2024, 49(15): 4118−4127.]
[29] PENG Jie, GU Yawen, LIU Jiang, et al. Identification of SOCS3 and PTGS2 as new biomarkers for the diagnosis of gout by cross-species comprehensive analysis[J]. Heliyon, 2024, 10(9): e30020.
[30] BAI B, LIU Y Z, ABUDUKERIMU A, et al. Key genes associated with pyroptosis in gout and construction of a miRNA-mRNA regulatory network[J]. Cells, 2022, 11(20): 3269.
[31] WANG Yu, LIN Zhijian, HUANG Jing, et al. An integrated study of Shenling Baizhu San against hyperuricemia: Efficacy evaluation, core target identification and active component discovery[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 295: 115450.
[32] 王亚雯, 李凯, 蔡静, 等. 2 型糖尿病患者血清铁蛋白水平与血尿酸的关系[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(3): 284−289. [WANG Yawen, LI Kai, CAI Jing, et al. Relationship between serum ferritin level and serum uric acid in patients with type 2 diabetic mellitus[J]. Academic Journal of Naval Medical University, 2024, 45(3): 284−289.]
[33] 曹帆帆, 张登海, 杨哲军, 等. 雷公藤红素通过 NF-κB 阻断尿酸钠晶体诱导的痛风性关节炎大鼠炎性分子表达[J]. 同济大学学报(医学版), 2023, 44(2): 173−179. [CAO Fanfan, ZHANG Denghai, YANG Zhejun, et al. Celastrol blocks inflammatory molecule expression through NF-κB in rats with monosodium urate monohydrate crystal-induced gout arthritis[J]. Journal of Tongji University (Medical Science), 2023, 44(2): 173−179.]
[34] CHEN Caiyun, LIU Keyu, WANG Yishu, et al. *In vitro* colonic fermentation of fermented Radix Astragali by *Poria cocos* and anti-hyperuricemia mechanism based on network pharmacology and experiment verification[J]. Frontiers in Nutrition, 2024, 11: 1466702.
[35] BORTOLOTTI M, POLITO L, BATTELLI M G, et al. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks [J]. Redox Biology, 2021, 41: 101882.
[36] 王溢, 张晖, 陈平, 等. 干燥方式对脱水桑叶蛋白质组分的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(5): 285−293. [WANG Yi, ZHANG Hui, CHEN Ping, et al. Effect of drying methods on protein components of dried mulberry leaf[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(5): 285−293.]
[37] 许涵, 李梁, 柴涛, 等. 基于网络药理学探讨桑叶黄酮提取物对糖尿病脑病细胞模型保护作用机制[J]. 食品科学, 2025, 46(10): 167−177. [XU Han, LI Liang, CHAI Tao, et al. Exploring the mechanism underlying the protective effect of mulberry leaf flavonoid extract on a cellular model of diabetic encephalopathy using network pharmacology[J]. Food Science, 2025, 46(10): 167−177.]
[38] ABUDUREXITI A, ZHANG R, ZHONG Y W, et al. Identification of α-glucosidase inhibitors from mulberry using UF-UPLC-QTOF-MS/MS and molecular docking[J]. Journal of Functional Foods, 2023, 101: 105362.
[39] 徐江民, 刘之陶, 蒋丹莹, 等. 植物黄嘌呤脱氢酶参与代谢途径及其功能研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3321−3336. [XU Jiangmin, LIU Zhitao, JIANG Danying, et al. Research advances on the metabolic pathways and functions mediated by plant xanthine dehydrogenase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3321−3336.]
[40] WU Canrong, ZHANG Chao, JIN Sanshan, et al. Molecular mechanisms of urate transport by the native human URAT1 and its inhibition by anti-gout drugs[J]. Cell Discovery, 2025, 11: 33.