

saRNA 激活 *ABCG2* 表达增强肾和肠细胞排泄尿酸的研究

贾少平¹, 葛科立², 杨柳¹, 张志霞^{1,3}, 张金玉¹, 葛银林^{1*} (1. 青岛大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学基础医学院免疫学系, 山东 青岛 266011; 3. 山东商业职业技术学院, 济南 250103)

摘要:目的 筛选、研究小激活 RNA (small activating RNA, saRNA) 增强 *ABCG2* 基因表达对肾、肠细胞排泄尿酸 (uric acid, UA) 的影响, 探索促进 UA 排泄的全新一类治疗机制药物。方法 设计靶向小鼠和人 *ABCG2* 基因的 saRNA, 转染小鼠肾小管上皮细胞 (TCMK-1) 和人肾小管上皮细胞 (HK-2) 细胞, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 和 Western Blot 筛选强激活效果的 saRNA; 检测强激活 saRNA 增强 TCMK-1 和 HK-2 细胞排泄 UA 的作用。筛选的 saRNA 通过尾静脉注射高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 模型小鼠, 检测血尿酸 (serum uric acid, SUA)、尿酸 (urine uric acid, UUA)、肠道 UA、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 含量, 以及肝脏黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD) 活性, 验证所选 saRNA 促进 UA 排泄的作用。苏木精-伊红染色法 (H&E) 染色观察小鼠肾脏和小肠病理改变。RT-qPCR, Western blot 和免疫组化分析肾脏和小肠 *ABCG2* 基因表达水平。结果 筛选到小鼠和人 *ABCG2* saRNA 各 2 条, 分别命名为 saRNA-1/2 和 hsaRNA-1/2, 能够提高 TCMK-1 和 HK-2 细胞 *ABCG2* 基因的表达 ($P < 0.05$), 促进胞内 UA 排泄 ($P < 0.05$)。saRNA-1/2 能够提高 HUA 模型小鼠 UUA 和肠道 UA 含量 ($P < 0.05$), 降低 SUA, BUN 和 SCr 的含量 ($P < 0.05$), 改善 HUA 对肾脏和小肠的损伤。saRNA-1/2 促进了小鼠肾脏和小肠中 *ABCG2* 基因的表达, 但对小鼠肝脏中 XOD 的活性没有明显影响 ($P > 0.05$)。结论 所筛选的 saRNA 能够提高 *ABCG2* 基因的表达, 并促进细胞内和小鼠体内 UA 的排泄, 降低 SUA 水平。

关键词: 高尿酸血症; 尿酸; 小激活 RNA; *ABCG2*; 基因表达

doi: 10.11669/cpj.2024.08.007 中图分类号: R34; R966 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)08-0713-11

Enhanced Expression of *ABCG2* by saRNA increases Uric Acid Excretion of Renal and Intestinal Cells in Mice

JIA Shaoping¹, GE Keli², YANG Liu¹, ZHANG Zhixia^{1,3}, ZHANG Jinyu¹, GE Yinlin^{1*} (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. Department of Immunology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266011, China; 3. Shandong Institute of Commerce and Technology, Jinan 250103, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To screen and study the effects of small activating RNA (saRNA) enhancing the expression of *ABCG2* gene on renal and intestinal cell excretion of uric acid (UA) to explore a new type of therapeutic mechanism drugs to promote UA excretion. **METHODS** saRNAs targeting mice and human *ABCG2* genes were designed and screened by real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) and Western blot in mice TCMK-1 and human HK-2 cells. The effect of the selected saRNA on the excretion of UA was examined in TCMK-1 and HK-2 cells. The mice saRNA was injected into the tail vein of hyperuricemia (HUA) model mice. The levels of serum uric acid (SUA), urinary uric acid (UUA), intestinal uric acid, blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr), and the activity of liver xanthine oxidase (XOD) in the mice were detected to verify the ability of selected saRNA to promote UA excretion. The pathological changes of kidney and small intestine were analyzed through H&E. The expression of *ABCG2* in kidney and small intestine was analyzed by RT-qPCR, Western blot and immunohistochemistry. **RESULTS** Four saRNAs targeting *ABCG2* were selected, 2 for mice and 2 for human, named saRNA-1/2 and hsaRNA-1/2 respectively, which increased the expression of *ABCG2* in TCMK-1 and HK-2 cells ($P < 0.05$), and promoted the extracellular excretion of UA ($P < 0.05$). In HUA model mice, saRNA-1/2 increased the levels of UUA and intestinal UA ($P < 0.05$), reduced the levels of SUA, BUN, and SCr ($P < 0.05$), decreased the damage of HUA to kidney and small intestine, and enhanced the expression of *ABCG2* in kidney and small intestine, but did not show significant effect on the activity of liver XOD ($P > 0.05$). **CONCLUSION** The selected saRNAs could enhance the expression of *ABCG2* and promote the excretion of UA in cells and mice, reducing SUA level.

KEY WORDS: hyperuricemia; uric acid; saRNA; *ABCG2*; gene expression

基金项目: 山东省科技计划资助(2014GGH218023); 山东省重点研发项目资助(2017GSF218084); 青岛市应用基础研究项目资助(19-6-2-31-cg)

作者简介: 贾少平, 男, 硕士 研究方向: 基因治疗 * 通讯作者: 葛银林, 男, 博士, 教授 研究方向: 基因治疗 Tel: 13780659749

尿酸(uric acid, UA)是嘌呤代谢的终产物,由肝脏中的黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)催化产生的,主要以单钠尿酸盐的形式通过血浆中的血红蛋白进行运输^[1-2]。当机体 UA 产生过多或者 UA 排泄障碍时,会导致高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)的发生。血清尿酸(serum uric acid, SUA)浓度超过其饱和浓度,会以单钠尿酸盐的形式沉积于关节和关节周围软组织,造成痛风(gout)^[3]。别嘌呤醇(allopurinol)、非布司他(februxostat)、苯溴马隆(benzbromarone)是临床上用于降低 SUA 的几种常用药物。这些小分子化学药物或靶向 XOD、或靶向肾小管尿酸转运蛋白-1(urate transporter 1, URAT1),都有不同的毒副作用^[4]。亟需寻找具有新的治疗机制、更安全的药物。

肾脏和小肠是 UA 排泄的主要器官,人体中约有 2/3 的 UA 从肾脏排泄,约 1/3 的 UA 从肠道排泄^[5]。UA 排泄不足是导致 HUA 的主要因素^[6]。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)是一种高容量的尿酸盐转运蛋白^[7],主要在肾脏和小肠中表达^[8-9],对尿酸盐的排泄至关重要。理论上提高 ABCG2 基因的表达,可以降低 SUA,但是如何提高 ABCG2 基因的表达还没有有效的办法。

利用小分子双链 RNA 提高目的基因的转录,从而提高对应蛋白的表达。这种现象被称为 RNA 激活(RNAa)^[10],这种小 RNA 被称为 small activating RNA(saRNA)。

在本研究中,为了探索治疗 HUA 的新型药物及其机制,本研究分别设计了靶向小鼠和人 ABCG2 基因启动子序列的 saRNA,转染小鼠肾小管上皮细胞(TCMK-1)和人肾小管上皮细胞(HK-2),增强 ABCG2 基因的表达,检测对 TCMK-1 和 HK-2 细胞排泄 UA 的作用,以及对 HUA 模型小鼠 UA 含量的影响,分析小鼠肾脏组织和小肠组织的病理学变化,以验证 ABCG2 基因作为治疗痛风病靶点的可行性,为开发新的痛风药物奠定实验基础。

1 材料

SPF 级 KM 小鼠,雄性,4 周龄,体质量 18~20 g [济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证号:SYXK(鲁)20200009];小鼠 TCMK-1 细胞(湖南丰晖生物科技有限公司);人 HK-2 细胞(青岛大学附属医院肾内科赠予)。

胎牛血清(Gibico,美国);胰蛋白酶-EDTA 消

化液、电泳液、电转液、细胞培养瓶、6 孔板、蛋白预染 Marker、化学发光试剂盒、MonScript™ RT III Super Mix with dsDNase (Two-Step)、MonAmp™ Fast SYBR® Green qPCR Mix(莫纳生物科技有限公司);UA、尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、XOD 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司);Trizol(北京诺贝莱生物科技有限公司);Entranster™-R4000、Entranster™-in vivo(北京英格恩生物科技有限公司);重组 anti-BCRP/ABCG2 抗体(abcam,英国);苯溴马隆(Excella GmbH,昆山龙灯瑞迪制药有限公司);氧喹酸钾与羧甲基纤维素钠(上海麦克林生化科技有限公司)。

2 方法

2.1 saRNA 设计

从美国国家生物信息中心(NCBI)查得小鼠和人 ABCG2 基因的 DNA 序列,在小鼠 ABCG2 基因启动子上游 200~800 bp 内,设计 9 个 saRNA 序列,命名为 saRNA(1~9);在人 ABCG2 基因启动子上游 200~1 000 bp 内设计 3 个 saRNA 序列,命名为 hsaRNA(1~3)。委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成 saRNA 序列及阴性对照序列。序列信息见表 1~2。

表 1 小鼠小激活 RNA(saRNA)序列

Tab.1 Mice saRNA sequence

Number	Sequence
saRNA-1	5'-UGUCUGUGUGUUCACAGCACdTdT-3' 5'-GUGCUGUGAACACACAGACAdTdT-3'
saRNA-2	5'-CCACAGAAACUUGGUUAAGGdTdT-3' 5'-CCUUAACCAAGUUUCUGUGGdTdT-3'
saRNA-3	5'-AGCCAGGAAGACAUUUCAGCAdTdT-3' 5'-GCUGAAAUGUCUUCUGGCUdTdT-3'
saRNA-4	5'-GGCCTCCTCTCTGACATdTdT-3' 5'-AUGUGCAGAAGAGGAGCCdTdT-3'
saRNA-5	5'-ACTACTGTTTGAGACCCAAdTdT-3' 5'-UUGGGUCUCAAACACUAGUdTdT-3'
saRNA-6	5'-TCACCAACCTCAAATCCAAdTdT-3' 5'-UUGGAUUUGAGGUUGGUGAdTdT-3'
saRNA-7	5'-GACUCUGAUUCUCUGUAGAAAdTdT-3' 5'-UUUCUACAGAGAAUCAGAGUCdTdT-3'
saRNA-8	5'-UUAUACCCACCAAGUCCACAAdTdT-3' 5'-UUGUGGACUUGGGGUUAUAAdTdT-3'
saRNA-9	5'-GGCAGGAAGAGGAUACUUUAAdTdT-3' 5'-UUAAGUAUCCUCUUCUGCCdTdT-3'
ncRNA	5'-UUCUCCGACGUGUCACCGUdTdT-3' 5'-ACGUGACACGUUCGAGAAAdTdT-3'

2.2 细胞培养及转染

将 TCMK-1 和 HK-2 细胞以每孔 1×10^5 个,接种于 6 孔板中。当细胞汇合度达到 40%~60%时,按照

表2 人 saRNA 序列

Tab.2 Human saRNA sequence

Number	Sequence
hsaRNA-1	5'-CAAGCAUCCACUUUCUCAGdTdT-3' 5'-CUGAGAAAGUGGAUGCUUGdTdT-3'
hsaRNA-2	5'-AGACGAGGUACUGAUCAGCdTdT-3' 5'-GCUGAUCAGUACCUCGUCUdTdT-3'
hsaRNA-3	5'-CAGGACACGUGUGCGCUUdTdT-3' 5'-AAAGCGCACACGUGUCCUGdTdT-3'
ncRNA	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3' 5'-ACGUGACACGUUCCGAGAAdTdT-3'

RNA 转染试剂 Entranster™-R4000 说明书,转染 saRNA 序列及阴性对照序列(终浓度 100 nmol · L⁻¹)。不做任何处理的空白孔作对照。

2.3 RT-qPCR 检测 ABCG2 mRNA 的转录

用 1 mL Trizol 试剂从 6 孔板或组织中提取总 RNA。按照 MonScript™ RT III Super Mix with dsD-Nase (Two-Step)说明书,将 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。按照 MonAmp™ Fast SYBR® Green qPCR Mix 试剂说明书,通过 RT-qPCR 检测细胞或组织中 ABCG2 mRNA 的表达量。以 GAPDH 作为内参。引物序列设计见表 3。

表3 RT-qPCR 引物序列。

Tab.3 RT-qPCR primer sequence.

Number	Sequence
Hum ABCG2	Forward: 5'-GAAACCTGGTCTCAACGCCA-3' Reverse: 5'-GGTCGCGGTGCTCCATTAT-3'
Hum GAPDH	Forward: 5'-GGTTGTCTCTCCGACTTCA-3' Reverse: 5'-TGCTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'
Mus ABCG2	Forward: 5'-ACTGAAGAAGACGCTGGATGCT-3' Reverse: 5'-GTTGTCCGTTACATTGAATCCTGG-3'
Mus GAPDH	Forward: 5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3' Reverse: 5'-TGAGGTCAATGAAGGGTCTG-3'

2.4 Western blot 检测 ABCG2 蛋白的表达

加入 200 μL 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液,从细胞或组织中提取总蛋白,BCA 测定上清中蛋白浓度。利用质量分数 10% 丙烯酰胺凝胶进行 Western blot 实验,每孔上样 20 ~ 30 μg 总蛋白。以 β-actin 为内参。分析细胞或组织中 ABCG2 蛋白的表达情况。

2.5 细胞水平排泄 UA 实验

将细胞种于 6 孔板中,TCMK-1 细胞分为空白组(BCG)、UA 组(UA)、UA + saRNA-1 组(UA + saRNA-1)、UA + saRNA-2 组(UA + saRNA-2)及

UA + saRNA 联合应用组(UA + saRNA-1 + 2, saRNA-1 和 saRNA-2 各 50 nmol · L⁻¹);HK-2 细胞分为空白组(BCG)、UA 组(UA)、UA + hsaRNA-1 组(UA + hsaRNA-1)、UA + hsaRNA-2 组(UA + hsaRNA-2)及 UA + hsaRNA 联合应用组(UA + hsaRNA-1 + 2, hsaRNA-1 和 hsaRNA-2 各 50 nmol · L⁻¹)。细胞转染 saRNA 96 h 后,将 6 孔板中的完全培养基替换为含有 400 μmol · L⁻¹ UA 的完全培养基,而空白孔仍为不含 UA 的完全培养基,再继续培养 24 h。利用胰酶消化并收集细胞,用 PBS 将细胞反复离心清洗 3 次后,计数相同数量的细胞(约 20 万个)离心取沉淀,加入 30 μL 纯水,热休克法破碎细胞。12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min 取上清。利用 UA 检测试剂盒,检测上清中 UA 的含量,同时检测培养基中 UA 含量。

2.6 高尿酸血症小鼠模型的建立及治疗

4 周龄 KM 小鼠适应性喂养 1 周后,将 25 只 SPF 级 KM 小鼠随机分为 5 组。分别为空白组(BCG)、模型组(MG)、saRNA-2 组(saRNA-2)、saRNA 联合应用组(saRNA-1 + 2)、苯溴马隆组(BEN),每组 5 只。空白组小鼠正常饲料饮食,并每日灌胃与其他组等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。模型组、saRNA-2 组、saRNA-1 + 2 组、BEN 组造模饲料饮食(含有 10% 酵母 + 10% 果糖 + 80% 基础饲料),并每日以 250 mg · kg⁻¹ 氧嗪酸钾溶液灌胃。BEN 组每日灌胃苯溴马隆,用量为 6.5 mg · kg⁻¹。saRNA 组将 saRNA 封装至体内转染试剂(Entranster™-in vivo)中后,以 2 mg · kg⁻¹ 用量通过尾静脉注射给药,每 3 天注射 1 次,共注射 6 次。边造模边治疗,持续 30 d。期间观察小鼠的生长状态,并记录体质量。

2.7 样本的采集

在造模结束后,小鼠禁水禁食 10 h,然后通过眼眶取血收集血清;通过刺激小鼠膀胱排尿,采集小鼠尿液。小鼠处死后,立即摘取小鼠小肠(从十二指肠至回肠部分),从十二指肠上端注入 1 mL 生理盐水,并在回肠末端收集小肠内容物。取小鼠肾脏和回肠,一部分置于 4% 多聚甲醛中,常温固定(避光);一部分置于 -80 °C 保存。取小鼠肝脏,置于 -80 °C 保存。

2.8 生化指标的检测

取得的血液,4 °C 静置 2 h 后,2 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,以分离血清。小肠内容物和小鼠尿液以 5 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,收集上清。检测 SUA、

尿酸(UUA)、肠道UA、BUN、SCr等指标。

2.9 小鼠肾脏和小肠组织病理学观察

小鼠处死后,取小鼠肾脏和回肠,用4%多聚甲醛固定后,石蜡包埋,5 μm连续切片。石蜡切片经过脱蜡、复水、苏木精染色、反蓝、伊红染色、脱水、封片等过程,以进行苏木精-伊红(H&E)染色。利用Caseviewer 2.3软件观察组织学变化。

2.10 小鼠肾脏和小肠组织免疫组织化学检查

上述石蜡切片经过脱蜡、封闭内源性过氧化物酶、抗原修复后,利用血清封闭。用ABCG2一抗(1:4 000)常温孵育1 h后,4℃过夜。于次日孵育二抗。二氨基联苯胺四盐酸(DAB)显色后加入苏木精复染,经脱水后封片。利用Image-Pro Plus 6.0进行免疫组化灰度分析。

2.11 肝脏黄嘌呤氧化酶活性检测

准确称取小鼠肝脏组织1 g,加入9 mL生理盐水,利用组织研磨仪在4℃条件下,充分匀浆,制备成10%的匀浆液。3 000 r·min⁻¹离心15 min,收集

上清,测定肝脏组织XOD活性。

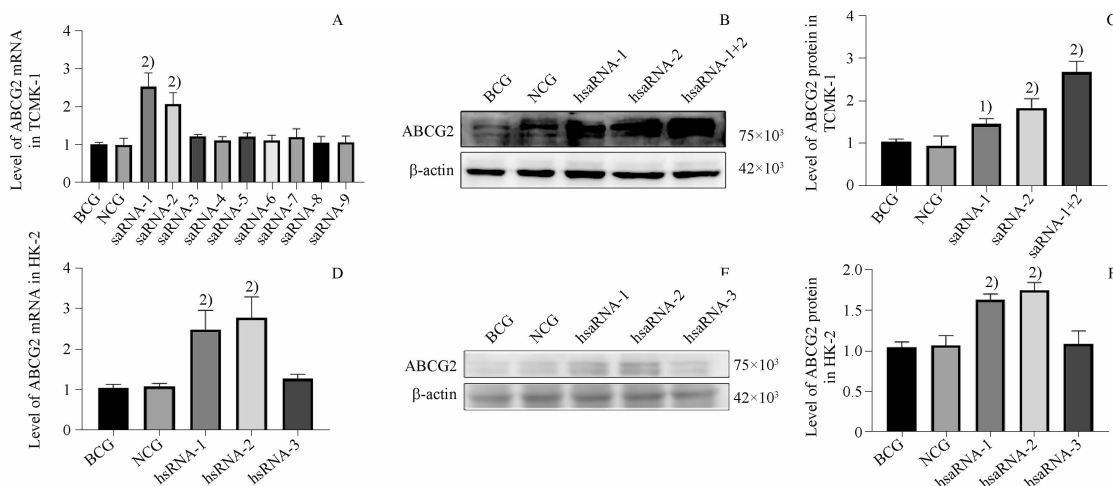
2.12 统计学处理

利用SPSS 26.0统计软件进行数据分析,结果表示为($\bar{x} \pm s$)。采用单因素方差分析进行多组间比较,采用LSD-*t*检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 有效激活ABCG2基因表达的saRNA筛选

利用RT-qPCR和Western blot对所设计的靶向小鼠和人ABCG2基因的saRNA进行了筛选,结果见图1。图1A~C所示为小鼠saRNA筛选结果。saRNA-1组、saRNA-2组ABCG2 mRNA ($P < 0.01$, $P < 0.01$)和蛋白($P < 0.05$, $P < 0.01$)的表达量明显升高,saRNA-1+2提高ABCG2蛋白表达的能力更强($P < 0.01$)。图1D~F为人hsaRNA筛选结果。hsaRNA-1组和hsaRNA-2组ABCG2 mRNA和蛋白表达量明显提高($P < 0.01$)。



A~C - 小鼠ABCG2基因saRNA的筛选结果;D~F - 人ABCG2基因saRNA的筛选结果;BCG - 空白对照组;NCG - 阴性对照组。与NCG相比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。
A~C - screening results of mouse ABCG2 gene saRNA; D~F - screening results of human ABCG2 gene saRNA; BCG - blank control group; NCG - negative control group.
¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$, vs NCG.

图1 ABCG2基因在小鼠肾小管上皮细胞(TCMK-1)和人肾小管上皮细胞(HK-2)中的表达情况。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Expression of ABCG2 gene in TCMK-1 cells and HK-2 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

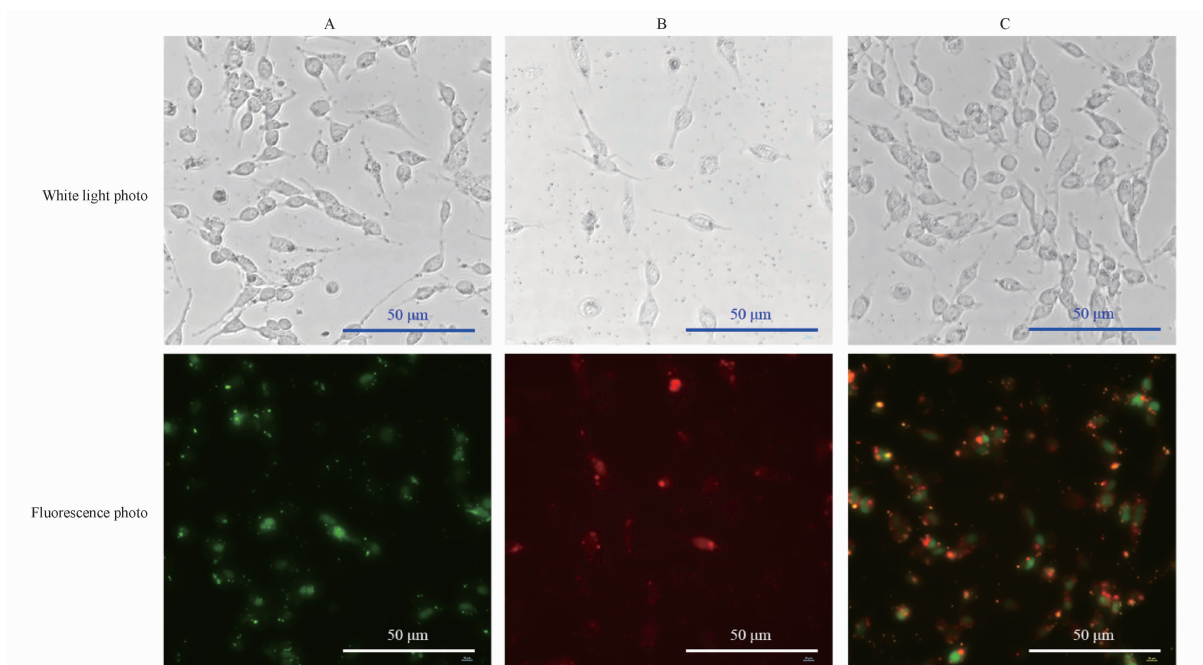
3.2 saRNA可同时进入细胞核内

将两个带有荧光标签的saRNA转染TCMK-1细胞。结果见图2。结果显示,联合转染的两个saRNA互不干扰,并且能够共定位于细胞中。细胞核中荧光强度比细胞质中更亮,说明saRNA经转运到达细胞核内。

3.3 saRNA促进肾小管上皮细胞外排UA

利用UA检测试剂盒对TCMK-1和HK-2细胞内、细胞外培养基中的UA进行分析,结果见图3。

图3A、C为细胞内UA含量。小鼠saRNA(saRNA-1, saRNA-2)和人hsaRNA(hsaRNA-1, hsaRNA-2)分别能显著降低TCMK-1和HK-2细胞内UA含量(所有 $P < 0.05$)。saRNA联合应用(saRNA-1+2, hsaRNA-1+2),其降低TCMK-1和HK-2内UA含量的能力更强(所有 $P < 0.01$)。图3B、D为细胞外(培养基)UA含量。除空白组外都含有充足的UA,因细胞内外体积差异巨大,培养基中UA含量没有检测到差异。

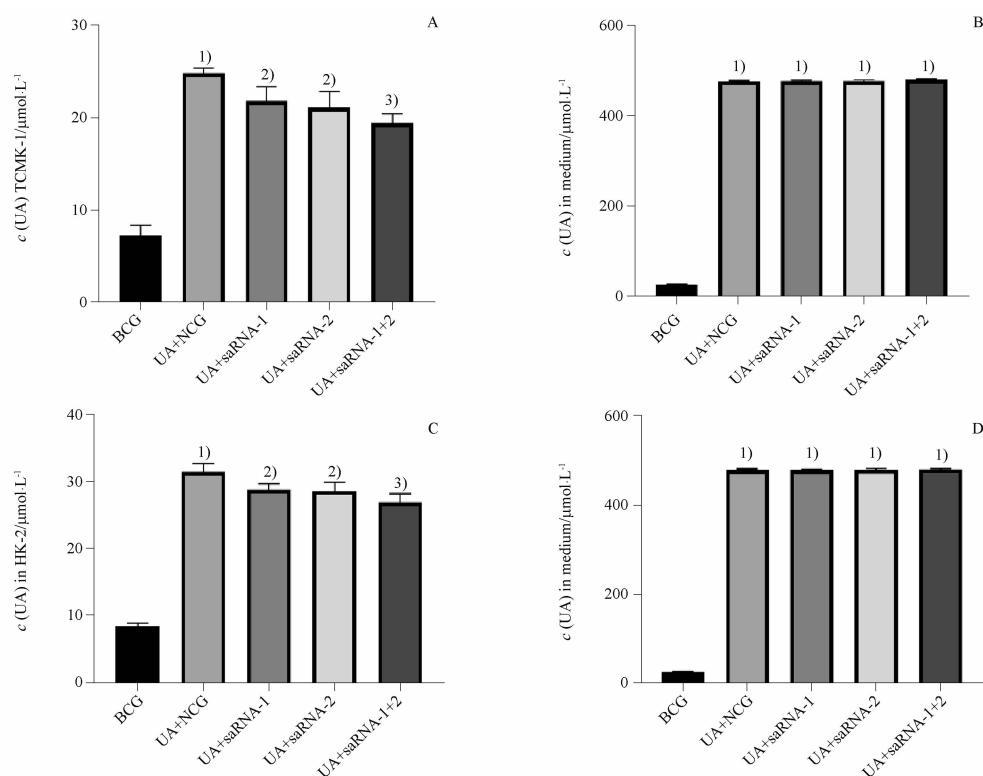


A - 荧光 saRNA-1 在细胞中的定位; B - 荧光 saRNA-2 在细胞中的定位; C - 荧光 saRNA-1 和 saRNA-2 在细胞中的共定位。

A - location of fluorescent saRNA-1; B - location of fluorescent saRNA-2; C - locations of fluorescent saRNA-1 and saRNA-2 with co-transfection of saRNA-1/2.

图2 荧光 saRNA-1/2 转染 TCMK-1 后在细胞内的定位

Fig. 2 Location of fluorescent saRNA-1/2 in TCMK-1 cell



A - 不同处理组 TCMK-1 细胞内 UA 含量; B - 不同处理组 TCMK-1 细胞外培养基中 UA 含量; C - 不同处理组 HK-2 细胞内 UA 含量; D - 不同处理组 HK-2 细胞外培养基中 UA 含量; 与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 UA + 阴性对照组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

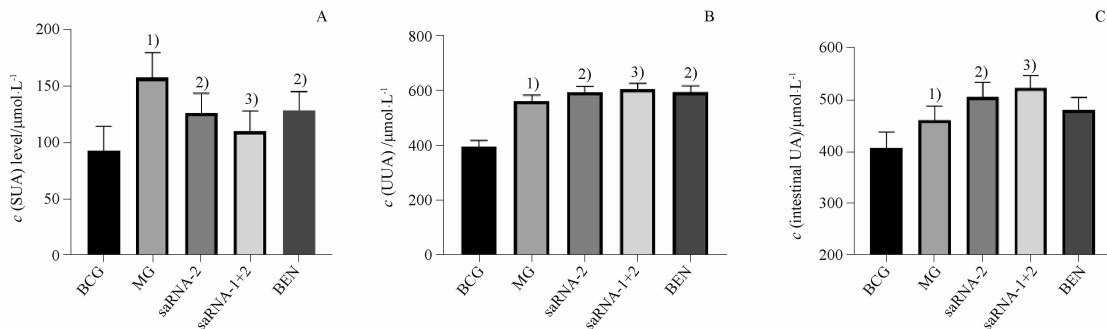
A - intracellular UA content of different treated TCMK-1 cells; B - UA content in extracellular medium of different treated TCMK-1 cells; C - intracellular UA content of different treated HK-2 cells; D - UA content in extracellular medium of different treated HK-2 cells; ¹⁾ $P < 0.01$, vs BCG; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, vs UA + NCG.

图3 TCMK-1 和 HK-2 细胞内和细胞外培养基中的尿酸 (UA) 含量. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Intracellular and extracellular uric acid contents in TCMK-1 cells and HK-2 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.4 saRNA 增强 HUA 模型小鼠排泄 UA

利用 UA 试剂盒检测了小鼠的 SUA、UUA 以及肠道 UA。结果见表 4, 图 4。与空白组相比, 模型组 SUA ($P < 0.01$)、UUA ($P < 0.01$) 和肠道 UA ($P < 0.05$) 含量明显升高, 说明 HUA 小鼠造模成功。saRNA 组 (saRNA-2 组、saRNA-1 + 2 组, 下同) SUA ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 明显降低, UUA ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 和肠道 UA ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 明显升高。与 saRNA-2 组相比, saRNA-1 + 2 组 SUA 含量更低, UUA 和肠道 UA 含量更高。说明 saRNA 能够增强肾脏和肠道的 UA 排泄, 从而降低 SUA。测量结果见表 4。



A - 各组小鼠 SUA 含量; B - 各组小鼠 UUA 含量; C - 各组小鼠肠道内容物 UA 含量; 与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。
A - SUA content of each group mice; B - UUA content of each group mice; C - UA content in intestinal contents of each group mice; ¹⁾ $P < 0.01$, vs BCG; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, vs MG.

图 4 各组小鼠血清、尿液以及肠道内容物中的 UA 含量。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 UA content in serum, urine, and intestinal content of each group mice. $n = 5, \bar{x} \pm s$

3.5 saRNA 降低 HUA 小鼠 BUN 和 SCr

利用 BUN 和 SCR 试剂盒检测了各组小鼠血清中 BUN、SCR 的含量, 结果见表 5, 图 5。saRNA 组 BUN ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 和 SCr ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 含量明显低于模型组。与 saRNA-2 组相比, saRNA-1 + 2 组 BUN 和 SCr 含量更低。说明 saRNA 能够促进 BUN 和 SCr 的排泄。与模型组相比, BEN 组 BUN 和 SCr 含量没有下降。测量结果见表 5。

表 5 各组小鼠血清 BUN 和 SCr 的含量。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 5 The content of BUN and SCr of each group mice. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Group	c(BUN) / mmol · L ⁻¹	c(SCr) / μmol · L ⁻¹
BCG	6.72 ± 0.35	30.14 ± 2.64
MG	8.36 ± 0.35 ¹⁾	40.62 ± 2.22 ¹⁾
saRNA-2	7.76 ± 0.28 ²⁾	37.57 ± 1.83 ²⁾
saRNA-1 + 2	7.42 ± 0.40 ³⁾	35.41 ± 2.00 ³⁾
BEN	8.30 ± 0.42	41.26 ± 1.41

注: 与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Note: ¹⁾ $P < 0.01$, vs BCG; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, vs MG.

表 4 各组小鼠血清、尿液以及肠道内容物中的 UA 含量。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 4 UA content in serum, urine, and intestinal content of each group mice. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Group	c(SUA) / μmol · L ⁻¹	c(UUA) / μmol · L ⁻¹	c(Intestinal UA) / μmol · L ⁻¹
BCG	92.14 ± 21.70	392.52 ± 23.96	405.2 ± 30.98
MG	156.94 ± 22.54 ¹⁾	559.07 ± 27.74 ¹⁾	459.12 ± 27.4 ¹⁾
saRNA-2	125.98 ± 17.02 ²⁾	590.93 ± 20.66 ²⁾	503.53 ± 29.63 ²⁾
saRNA-1 + 2	109.66 ± 17.77 ³⁾	600.96 ± 21.87 ³⁾	521.82 ± 23.5 ³⁾
BEN	127.84 ± 16.68 ²⁾	591.39 ± 23.05 ²⁾	468.90 ± 25.36

注: 与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

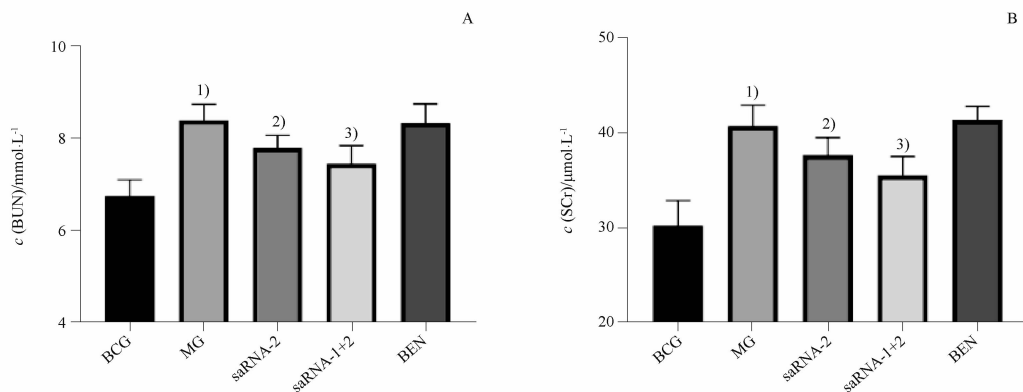
Note: ¹⁾ $P < 0.01$, vs BCG; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, vs MG.

3.6 saRNA 改善模型小鼠的生理状态

在实验过程中记录各组小鼠的体质量和生长状态, 以研究 saRNA 对小鼠的影响。结果见表 6 与图 6。实验结束后, 模型组小鼠体质量增长高于其他组, 并且明显高于空白组小鼠 ($P < 0.05$)。BEN 组小鼠在实验结束时, 小鼠表现出精神萎靡, 食欲减退, 毛色粗糙暗淡, 体质量持续下降, 体质量明显低于空白组 ($P < 0.05$) 和模型组 ($P < 0.01$) 小鼠。saRNA 组小鼠体质量与空白组和模型组相比差异无统计学意义, 且精神状态良好, 毛色顺滑光亮, 饮食正常。测量结果见表 6。

3.7 saRNA 改善模型小鼠的肾脏和小肠组织病理损伤

为了进一步观察 HUA 对小鼠肾脏和小肠的影响, 各组小鼠肾脏和小肠组织石蜡切片进行了 H&E 染色。与空白组相比, 模型组小鼠肾小管上皮细胞排列紊乱, 肾小囊腔狭窄并伴有渗出,



A - 各组小鼠 BUN 含量; B - 各组小鼠 SCr 含量; 与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。
A - the BUN content of each group of mice; B - the SCr content of each group of mice; ¹⁾ $P < 0.01$, vs BCG; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, vs MG.

图5 各组小鼠血清 BUN 和 SCr 的含量. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 The content of BUN and SCr of each group mice. $n = 5, \bar{x} \pm s$

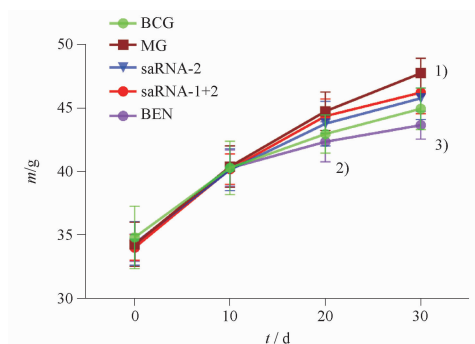
表6 药物处理过程中各组小鼠的体质量变化. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 6 Body weight changes of mice in each group during treatment. $n = 5, \bar{x} \pm s$

t/d	m(BCG)/g	m(MG)/g	m(saRNA-2)/g	m(saRNA-1+2)/g	m(BEN)/g
0	34.84 ± 2.49	34.30 ± 1.75	34.04 ± 1.01	34.36 ± 1.74	34.02 ± 1.09
10	40.36 ± 2.11	40.46 ± 1.65	40.26 ± 1.19	40.20 ± 1.67	40.34 ± 1.43
20	43.04 ± 1.52	44.84 ± 1.52	44.46 ± 1.36	43.86 ± 1.78	42.42 ± 1.59 ²⁾
30	45.04 ± 1.64	47.86 ± 1.18 ¹⁾	46.32 ± 1.67	45.88 ± 1.69	43.74 ± 1.10 ³⁾

注:与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, vs BCG; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, vs MG.



与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, vs BCG; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$, vs MG.

图6 药物处理过程中各组小鼠的体质量变化. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Body weight changes of mice in each group during treatment. $n = 5, \bar{x} \pm s$

肾小球肿胀,肾小管水肿渗出,见图7A。与空白组相比,模型组小鼠小肠绒毛上皮细胞排列紊乱,小肠绒毛肿胀、渗出,见图7B;与模型组相比,saRNA组小鼠肾脏和小肠组织损伤得到明显改善;BEN组与模型组小鼠相比,肾脏和小肠组织的损伤更加严重。

3.8 saRNA 提高小鼠肾脏与小肠 ABCG2 基因的表达

利用 RT-qPCR、Western blot 和免疫组化检测各

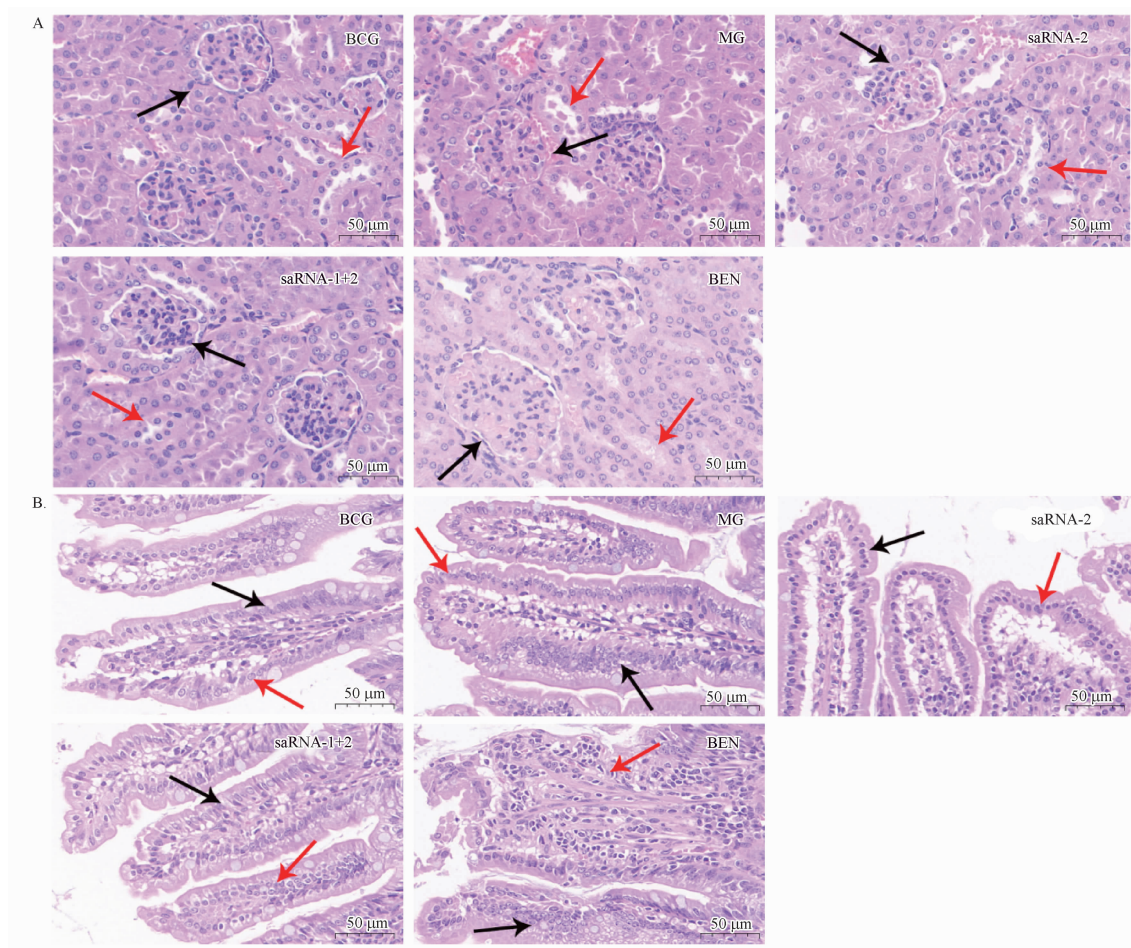
组小鼠肾脏和小肠中 ABCG2 mRNA 和蛋白表达水平,结果见图8。与模型组相比,在小鼠肾脏(图8A~C)和小肠(图8D~F)中,saRNA-2组和saRNA-1+2组 ABCG2 mRNA 和蛋白表达水平明显升高。在肾脏中,ABCG2 蛋白主要表达于近端肾小管上皮细胞刷状缘膜(图8G)。在小肠中,ABCG2 蛋白主要表达于小肠上皮细胞的微绒毛刷状缘(图8H)。定量分析表明(图8I、J),saRNA 明显增强了肾脏和小肠中 ABCG2 蛋白的表达。这与 Western blot 的结果一致。

3.9 saRNA 不影响小鼠肝脏 XOD 活性

由于 UA 主要由肝脏中 XOD 催化产生,利用 XOD 测试盒检测各组小鼠肝脏中 XOD 的活性,以检测 saRNA 对 XOD 活性的影响。结果见表7,图9。与空白组相比,模型组($P < 0.05$)小鼠肝脏中 XOD 活性明显升高,这与模型组 SUA 含量升高相一致。saRNA 组与模型组相比,小鼠肝脏 XOD 活性差异无统计学意义。说明 saRNA 和 BEN 对小鼠肝脏 XOD 活性没有影响。测量结果见表7。

4 讨论

长期的 HUA 会导致多种疾病发生,典型的是



A - 各组小鼠肾脏组织 H&E 染色结果;黑色箭头 - 肾小球;红色箭头 - 肾小管;B - 各组小肠组织 H&E 染色结果;黑色箭头 - 小肠绒毛;红色箭头 - 小肠绒毛上皮细胞。

A - H&E staining results of kidney tissue in each group of mice; the black arrow - the glomerulus; the red arrow - the renal tubules; B - H&E staining results of small intestine tissues in each group of mice; the black arrow - the small intestine villi; the red arrow - the small intestinal villous epithelial cells.

图 7 H&E 染色观察肾脏和小肠组织病理改变

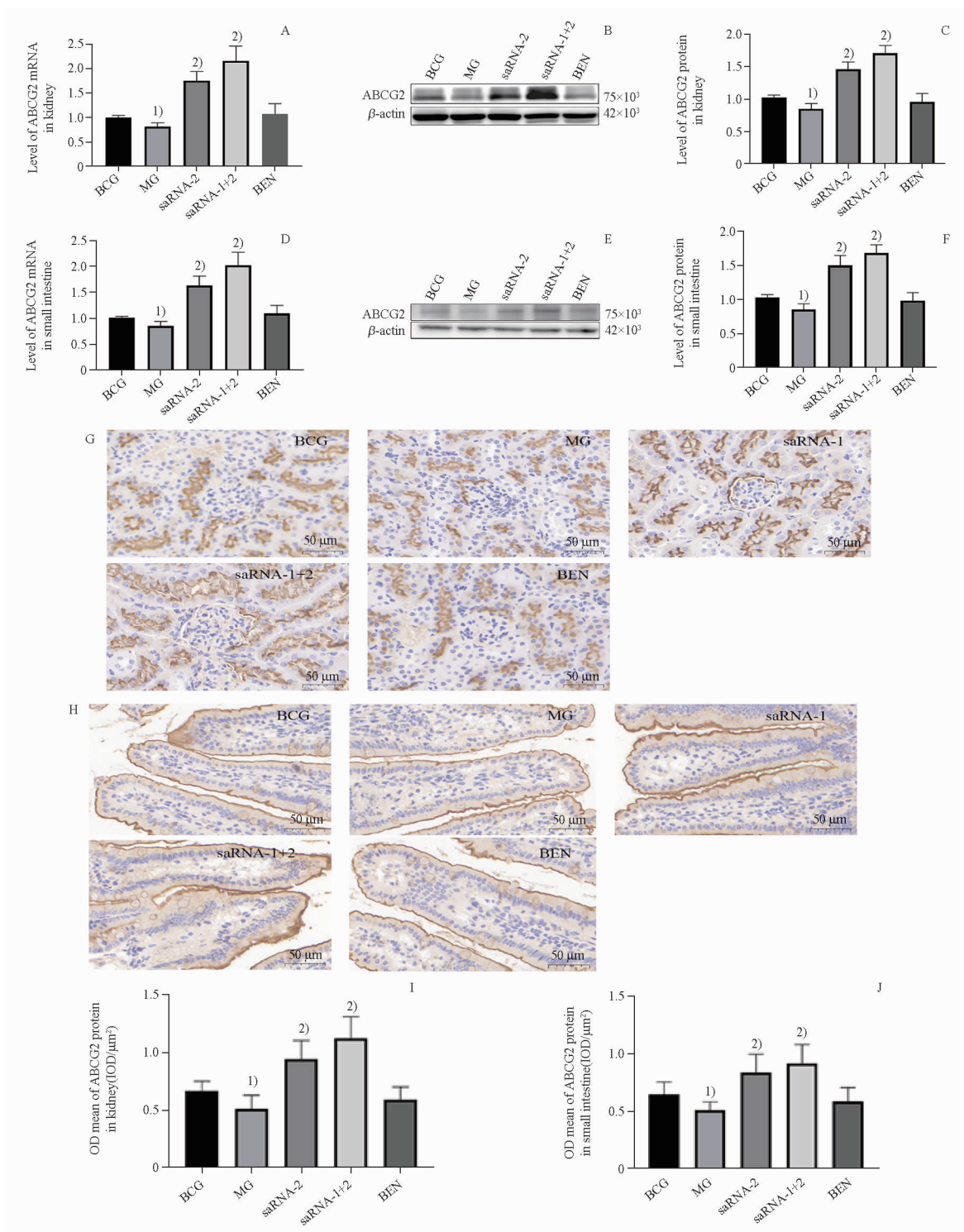
Fig. 7 H&E staining observation of pathological changes in kidney and small intestine tissues

导致痛风^[1,3,11-13]。目前降 UA 治疗痛风的常用药物如别嘌醇、非布司他、苯溴马隆等小分子化学药物,均具有肝、肾毒副作用以及致敏等问题^[4,14-16]。因此,目前对于高效低毒降 UA 治疗痛风的新方法尤为期待。为此,我们进行了 HUA 的全新一类治疗机制药物的探索。

增强或过表达 1 个基因,常将携带该基因的过表达载体导入目标细胞,以表达该基因。但这种方法构建表达载体费时,且 DNA 载体必须进入细胞核,更重要的是目的基因的表达量无法控制。近年来,将目的基因的 mRNA 导入目标细胞以表达该基因受到追捧^[17-18]。但在体外合成 mRNA 较为昂贵和复杂,且 mRNA 易于降解。利用靶向基因启动子的小双链 RNA,也可增强基因的表达,称为小激活 RNA (saRNA)。该法合成简单,费用较低,易于控制。saRNA

在灵长类动物间是保守的。然而人类和啮齿类动物的启动子序列存在显著差异,在啮齿类动物中起作用的 saRNA 可能在人类细胞中不活跃^[19]。这与我们早期的验证实验结果相似。我们将人 *ABCG2* 的 saRNA 应用于小鼠的 TCMK-1 细胞中,但是并没有检测到小鼠 *ABCG2* 基因表达的提高。因此重新设计了小鼠的 *ABCG2* 基因 saRNA。本研究设计筛选到靶向小鼠和人 *ABCG2* 基因的 saRNA 序列各 2 条,能够在体外增强 TCMK-1 和 HK-2 细胞中 *ABCG2* 基因的表达;在 HUA 模型小鼠体内,小鼠 saRNA 能够提高肾脏和小肠 *ABCG2* 基因的表达。且两个 saRNA 的联合应用提高 *ABCG2* 基因表达的能力更强。

HUA 发病机制的研究证明,UA 在肾脏和小肠的排出影响了 SUA 的含量。肾脏和小肠是调节 SUA 的主要器官,其机制是由多种转运蛋白通过



A ~ C - 各组小鼠肾脏中 *ABCG2* mRNA 和蛋白的表达水平; D ~ F - 各组小鼠小肠中 *ABCG2* mRNA 和蛋白的表达水平; G - 各组小鼠肾脏中 *ABCG2* 蛋白的表达水平和定位; H - 各组小鼠小肠中 *ABCG2* 蛋白的表达水平和定位; I - 各组小鼠相同视野下肾脏组织 *ABCG2* 蛋白的平均光密度; J - 各组小鼠相同视野下小肠组织 *ABCG2* 蛋白的平均光密度; 与空白对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

A ~ C - the *ABCG2* mRNA and protein levels of renal tissues in each group mice; D ~ F - the *ABCG2* mRNA and protein levels of small intestine tissues in each group mice; G - the expression level and localization of *ABCG2* protein in the kidney of mice in each group; H - the expression level and localization of *ABCG2* protein in the small intestine of mice in each group; I - the mean optical density of *ABCG2* protein in kidney tissue of mice in each group under the same field; J - the mean optical density of *ABCG2* protein in small intestine tissue of mice in each group under the same field; ¹⁾ $P < 0.05$, vs BCG; ²⁾ $P < 0.01$, vs MG.

图 8 RT-qPCR、Western blot、免疫组化检测小鼠肾脏组织和小肠组织中的 *ABCG2* 基因 mRNA 和蛋白的表达量。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig 8 RT-qPCR, Western blot, and immunohistochemical detection of *ABCG2* gene mRNA and protein expression in mouse kidney and small intestine tissues. $n = 5, \bar{x} \pm s$

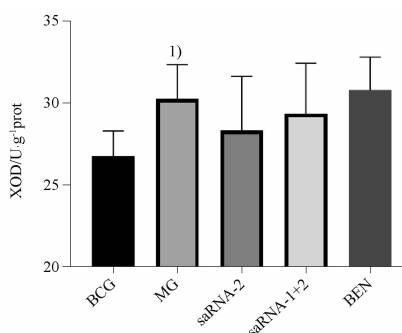
表7 各组小鼠肝脏中黄嘌呤氧化酶(XOD)活性检测结果. $n=5, \bar{x} \pm s$

Tab.7 XOD activity analysis results of liver in each group mice. $n=5, \bar{x} \pm s$

Group	XOD/U · g ⁻¹ prot
BCG	26.77 ± 1.53
MG	31.26 ± 2.30 ¹⁾
saRNA-2	28.33 ± 1.97
saRNA-1+2	29.15 ± 3.38
BEN	30.81 ± 2.01

注:与空白对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$

Note:¹⁾ $P < 0.05$, vs BCG



与空白对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, vs BCG.

图9 各组小鼠肝脏中 XOD 活性检测结果. $n=5, \bar{x} \pm s$

Fig.9 XOD activity analysis results of liver in each group mice. $n=5, \bar{x} \pm s$

复杂地分泌和再吸收来实现的,其中 ABCG2 蛋白发挥着重要作用。2008 年 Dehghan 等^[20]首次发现 ABCG2 基因与 SUA 浓度和痛风有关。ABCG2 蛋白功能异常可导致尿酸盐转运障碍,例如其单核苷酸多态性(SNP)之一的 Q141K,可导致 UA 转运降低达 53%。人体中约有 2/3 的 UA 从肾脏排泄,约 1/3 的 UA 从肠道排泄,而 ABCG2 蛋白在肾脏组织和小肠组织中均有表达,因此,理论上增强 ABCG2 蛋白表达可促进肾脏和小肠的 UA 排泄。在本研究中,利用 saRNA 提高 ABCG2 蛋白表达后,细胞内 UA 含量明显降低;HUA 模型小鼠体内 SUA 明显降低,UUA 和肠道 UA 明显升高。这些结果说明:高表达的 ABCG2 蛋白能够促进细胞内和小鼠体内 UA 的排泄。在小鼠体内,saRNA 提高了肾脏和小肠的 UA 排泄,从而降低 SUA,且两个 saRNA 的联合应用促进 UA 排泄的能力更强。

HUA 引起小鼠的肾脏和小肠组织损伤,并伴随 BUN 和 SCr 的升高,因此,BUN 和 SCr 的水平也反映了肾脏损伤的程度。本研究结果显示:与模型组

小鼠相比,saRNA 组小鼠肾脏和小肠损伤得到明显改善,BUN 和 SCr 含量也更低,说明 saRNA 能够通过促进 UA 排泄,起到对肾脏和小肠的保护作用,且 saRNA 组小鼠生长状态良好。

在降 UA 的常用药中,别嘌呤醇、非布司他均是通过抑制 XOD 的活性,减少 UA 合成,从而降低 SUA 水平;而 BEN 则通过抑制肾小管 URAT1,抑制肾小管 UA 重吸收而促进 UA 排泄,降低 SUA 水平^[4]。我们设计的 saRNA 是促进 ABCG2 表达,促进 SUA 转运至尿中,降低 SUA 水平,机制上与 BEN 类似。虽然 BEN 具有降 UA 的作用,但有严重的副作用,包括线粒体毒性、代谢产物的肝脏损伤及损伤细胞氧化防御功能等。因此,BEN 作为药物参照是合理的选择。

H&E 染色结果表明,BEN 组小鼠肾脏和小肠组织 H&E 染色结果与模型组小鼠相比没有改善,BUN 和 SCr 含量反而有所上升,体质量下降明显,说明 BEN 不能降低血清中 BUN 和 SCr 的含量,反而会对小鼠的肾脏和小肠组织造成损伤,影响小鼠的生长状态。对于 saRNA 而言,则没有这些现象。该结果印证了 BEN 具有毒副作用,并证实了 saRNA 有效且无毒副作用。

Wang 等^[21]利用菊苣提高小鼠肠道中 ABCG2 蛋白的表达,可以促进小鼠肠道中 UA 的排泄,降低 SUA。Sun 等^[22]将合成的小鼠 ABCG2 mRNA 通过尾静脉注射进入小鼠体内,表达 ABCG2 蛋白,可以促进肾脏 UA 的排泄。Lu 等^[23]利用 Empagliflozin (一种抗糖尿病药物),也可降低 HUA 小鼠的 SUA,其机制是通过 AMP 依赖蛋白激酶[adenosine monophosphate (AMP)-dependent protein kinase, AMPK]/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)信号通路,以 CREB 激活 ABCG2 基因启动子,从而提高肾脏和回肠细胞的 ABCG2 蛋白的表达,促进 UA 排泄。我们目前的 saRNA 结果与之相似。但 saRNA 制备方便,成本低,更容易进入细胞且安全有效,适合在动物体内应用。

总之,为探索 HUA 的全新一类治疗机制药物,本研究设计筛选了靶向 ABCG2 基因的 saRNA,将其转染进入细胞后,在细胞水平和动物水平实现了增强 ABCG2 基因表达,证明了所设计的 saRNAs 能够促进细胞和 HUA 模型小鼠向外排泄 UA,改善了 HUA 模型小鼠的肾脏和小肠功能,且没有 BEN 的副作用,对肝脏中 XOD 的活性没有影响。本研究结

果为以 *ABCG2* 基因为靶标治疗 HUA 的小核酸药物开发提供了实验基础,为 HUA 的治疗提供了新的策略。

REFERENCES

- [1] MAZZALI M, KANBAY M, SEGAL M S, *et al.* Uric acid and hypertension: cause or effect? [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2010, 12(2): 108-117.
- [2] TERKELTAUB R, BUSHINSKY D A, BECKER M A. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(Suppl. 1): S4. DOI: 10.1186/ar1909.
- [3] DALBETH N, GOSLING A L, GAFFO A, *et al.* Gout [J]. *Lancet*, 2021, 397(10287): 1843-1855.
- [4] XU D, ZHU X X, ZOU H J, *et al.* Recommendations for the diagnosis and treatment of gout in China [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 2023, 62(9): 1068-1076.
- [5] HOSOMI A, NAKANISHI T, FUJITA T, *et al.* Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30456. DOI: 10.1371/journal.pone.0030456.
- [6] NAKANISHI T, OHYA K, SHIMADA S, *et al.* Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATV1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(3): 603-611.
- [7] WOODWARD O M. ABCG2: the molecular mechanisms of urate secretion and gout [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 309(6): F485-F488.
- [8] WANG Y, LIN Z, ZHANG B, *et al.* Cichorium intybus L. promotes intestinal uric acid excretion by modulating ABCG2 in experimental hyperuricemia [J]. *Nutr Metab*, 2021, 18(1): 109. DOI: 10.1186/s12986-017-0190-6.
- [9] WOODWARD O M, KÖTTGEN A, CORESH J, *et al.* Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(25): 10338-10342.
- [10] LI L C, OKINO S T, ZHAO H, *et al.* Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(46): 17337-17342.
- [11] KODAMA S, SAITO K, YACHI Y, *et al.* Association between serum uric acid and development of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(9): 1737-1742.
- [12] 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]. *J Biol Chem*, 2012, 287(48): 40732-40744.
- [13] CICERCHI C, LI N, KRATZER J, *et al.* Uric acid-dependent inhibition of AMP kinase induces hepatic glucose production in diabetes and starvation: evolutionary implications of the uricase loss in hominids [J]. *FASEB J*, 2014, 28(8): 3339-3350.
- [14] STAMP L K, BARCLAY M L. How to prevent allopurinol hypersensitivity reactions? [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2018, 57(Suppl 1): i35-i41.
- [15] HORIUCHI H, OTA M, NISHIMURA S, *et al.* Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice [J]. *Life Sci*, 2000, 66(21): 2051-2070.
- [16] WANG H, PENG Y, ZHANG T, *et al.* Metabolic epoxidation is a critical step for the development of benzbromarone-induced hepatotoxicity [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45(12): 1354-1363.
- [17] KWON H, KIM M, SEO Y, *et al.* Emergence of synthetic mRNA: *in vitro* synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine [J]. *Biomaterials*, 2018, 156: 172-193.
- [18] POLACK F P, THOMAS S J, KITCHIN N, *et al.* Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [19] PORTNOY V, HUANG V, PLACE R F, *et al.* Small RNA and transcriptional upregulation [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011, 2(5): 748-760.
- [20] DEHGHAN A, KÖTTGEN A, YANG Q, *et al.* Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study [J]. *Lancet*, 2008, 372(9654): 1953-1961.
- [21] WANG Y, LIN Z, ZHANG B, *et al.* Cichorium intybus L. promotes intestinal uric acid excretion by modulating ABCG2 in experimental hyperuricemia [J]. *Nutr Metab*, 2017, 14: 38. DOI: 10.1186/s12986-017-0190-6.
- [22] SUN Z X, GE K L, ZHANG Z X, *et al.* The ABCG2 mRNA synthesized *in vitro* promoted uric acid excretion in mice [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2021, 37(8): 1100-1109.
- [23] LU Y H, CHANG Y P, LI T, *et al.* Empagliflozin attenuates hyperuricemia by upregulation of ABCG2 via AMPK/AKT/CREB signaling pathway in type 2 diabetic mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(3): 529-542.

(收稿日期:2023-09-28)