

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.14.012

高尿酸血症湿浊内蕴证小鼠模型的构建与评价

张悦¹, 李翔宇¹, 杨璇¹, 王莘智², 樊新荣¹✉

1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 湖南中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 构建符合中医湿浊内蕴证特点的高尿酸血症(HUA)小鼠模型, 并对其进行评价。**方法** 36 只 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组、化模组、化模高脂劳倦组, 24 只尿酸氧化酶基因敲除(UOX^{-/-})小鼠随机分为 UOX^{-/-}组和 UOX^{-/-}高脂劳倦组, 每组 12 只。化模组和化模高脂劳倦组采用氧嗪酸钾联合腺嘌呤灌胃构建 HUA 模型; 化模高脂劳倦组和 UOX^{-/-}高脂劳倦组采用高脂饲料结合负重力竭游泳构建 HUA 湿浊内蕴证模型。于造模第 1、7、14、21、28 天观察各组小鼠湿浊内蕴证候积分; 造模第 1、28 天进行负重力竭游泳实验, 记录负重力竭游泳时间; 造模第 28 天, 计算肝脏、肾脏指数, 采用 HE 染色法观察肝脏、肾脏病理损伤形态, 采用生化法检测血清尿酸(UA)、黄嘌呤脱氢酶(XDH)、黄嘌呤氧化酶(XOD)和尿素氮(BUN)水平, 采用 ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平, 采用免疫组化法检测肾脏组织有机阴离子转运蛋白 1(OAT1)和葡萄糖转运体(GLUT9)蛋白表达, 采用实时荧光定量 PCR 法检测肾脏组织三磷酸腺苷结合转运蛋白 G2(ABCG2)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、尿酸盐阴离子转运体 1(URAT1)、OAT1 和 GLUT9 mRNA 表达。**结果** 造模第 14 天, 与空白组比较, 化模高脂劳倦组、UOX^{-/-}高脂劳倦组小鼠湿浊内蕴证候积分升高($P<0.05$); 第 28 天, 两组湿浊内蕴证候积分明显增加且负重力竭游泳时间缩短($P<0.01$), 提示湿浊内蕴证候模型制备成功。与空白组比较, 其余各组小鼠肾脏指数及血清 UA、XDH、XOD、BUN、TNF- α 和 IL-1 β 水平升高, 肾脏组织 HIF-1 α 、URAT1、OAT1 和 GLUT9 mRNA 表达升高, ABCG2 mRNA 表达降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与化模组和 UOX^{-/-}组比较, 化模高脂劳倦组和 UOX^{-/-}高脂劳倦组可见更为明显的肾脏病理损伤, 血清 UA 水平降低, BUN、TNF- α 水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 肾脏组织 OAT1 和 GLUT9 蛋白表达增加。**结论** 化学诱导和基因敲除两种方法, 叠加高脂饮食和负重力竭游泳, 均可成功制备 HUA 湿浊内蕴证小鼠模型。其中, 化学诱导法操作简单、成本低, 适合短期药效筛选; UOX 基因敲除使血尿酸水平自发升高, 不依赖药物造模, 可更好模拟人类代谢特征。

[关键词] 高尿酸血症; 湿浊内蕴证; 动物模型构建; 病证结合

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是临床常见的代谢性疾病, 且呈年轻化趋势。HUA 与痛风性关节炎等疾病存在因果关系, 也是心血管疾病、慢性肾病等疾病的独立危险因素, 可导致心、肾等多器官损害^[1]。HUA 临床症状隐匿, 仅血尿酸升高, 患者多素体肥胖, 痰湿内盛, 且嗜食肥甘厚腻致脾失健运、停滞为湿, 湿浊内蕴证是 HUA 主要证型^[2]。中医病证结合模型将中医证候理论与现代实验技术相结合, 旨在制备符合中医临床病证特

点、可重复且稳定的实验模型, 对阐明 HUA 发病与防治机制具有重要作用^[3]。现有 HUA 模型多采用腹腔注射酵母膏、氧嗪酸钾等单一因素, 或腺嘌呤联合氧嗪酸钾、次黄嘌呤联合氧嗪酸钾等复合造模方法^[4], 同一证候模型构建与评价方法多样, 但部分模型脱离中医理论、证候判别困难。因此, 建立 HUA 中医证候动物模型的标准化方法尤为重要。

《脾胃论》记载“劳倦则脾先病, 不能为胃行气而后病”, 提示劳倦过度耗伤脾气。高脂饮食肥甘厚腻亦损伤脾胃。二者协同, 致湿浊内蕴。本研究基于“饮食不节+劳倦过度”复合病因, 在化学诱导或基因编辑制备 HUA 模型小鼠的基础上(病理)叠加高脂饮食联合负重力竭游泳(病因), 构

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程中医证候模型“揭榜挂帅”专项(ZHMX2025009); 中国中医科学院科技创新工程中医药实验能力提升专项(NLTS2025001)

✉ 通信作者: fxr1973@126.com

建符合湿浊内蕴中医病机的 HUA 小鼠模型, 通过疾病相关指标、组织病理学指标和血清学指标进行模型评价, 以期 HUA 药物研发及药物作用机制研究提供可靠的实验载体。本实验通过中国中医科学院医学实验中心动物伦理委员会审查 (批准文号: ERCCACMS21-2507-01)。

1 材料与方法

1.1 动物

7 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 36 只, 体质量 (20±2) g, 购于北京维通利华实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2022-0009。7 周龄雄性 SPF 级尿酸氧化酶基因敲除 (Urate Oxidase Knockout, UOX^{-/-}) 小鼠 (C57BL/6J 来源) 24 只, 体质量 (20±2) g, 购于广东南模生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (粤) 2022-0062。UOX^{-/-}小鼠缺乏将尿酸分解为尿囊素的尿酸氧化酶 (UOX), 可模拟临床嘌呤代谢途径, 是稳定的自发性 HUA 模型^[5]。

小鼠常规饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所 SPF 级动物房, 温度 (22±2) °C, 相对湿度 40%~60%, 12 h/12 h 明暗交替, 自由摄食和饮水。

1.2 主要试剂和仪器

戊巴比妥钠 (货号: 3G223G27), 南京生兴生物技术有限公司; 氧嗪酸钾 (货号: HY-17511), 美国 MCE 公司; 腺嘌呤 (货号: A108804), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 羧甲基纤维素钠 (批号: S14017), 上海源叶生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子-α (TNF-α, 货号: PT512)、白细胞介素-1β (IL-1β, 货号: P1305) ELISA 试剂盒, HRP 标记山羊抗兔 IgG (货号: A0352), 上海碧云天生物技术公司; 尿酸 (UA, 货号: C012-1-1)、黄嘌呤脱氢酶 (XDH, 货号: H520-1) 和血尿素氮 (BUN, 货号: C013-3-1) 生化试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 生化试剂盒 (货号: JL20379), 江莱生物科技有限公司; TRIzol 试剂 (货号: 15596026), 美国 Invitrogen 公司; 4% 多聚甲醛 (货号: AR1069), 武汉博士德生物工程有限公司; HE 染液套装 (货号: G1003), 武汉赛维尔生物科技有限公司; 超纯总 RNA 提取试剂盒 (货号: CW0581S), 江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 有机阴离子转运蛋白 1 (OAT1, 货号: 26574-1-AP) 多克隆抗体、葡萄糖转运体 9 (GLUT9, 货号: 67530-1-Ig) 多克隆抗体, 武汉三鹰生物技术有限公司; 高脂饲料 (45% 脂肪、20%

蛋白质、35% 碳水化合物, 货号: H10045)、标准饲料 (10% 脂肪、60% 碳水化合物、28% 蛋白质, 货号: H10010), 北京华阜康生物科技股份有限公司。

电子天平 (型号: BS423S), 北京赛多利斯科学仪器有限公司; 荧光定量 PCR 仪 (型号: ABI7500), 美国 Thermo 公司; 涡旋振荡仪 (型号: QL902), 海门其林贝尔仪器制造有限公司; 多功能酶标仪 (型号: Multiskan GO), 美国 BioTek 公司; 低温高速离心机 (型号: 5415D), 德国 Eppendorf 公司; 紫外分光光度计 (型号: DU800), 美国 Beckman 公司; 全自动包埋机 (型号: Histo-Core Arcadia C), 德国 Leica 公司; 水平脱色摇床 (型号: 9556A), 华利达实验设备有限公司; 石蜡切片机 (型号: RM2265), 德国 Leica 公司; 倒置荧光显微镜 (型号: Eclipse E100), 日本 Nikon 公司; 全自动生化分析仪 (型号: 7180), 日本 Hitachi 公司。

1.3 分组及造模方法

小鼠适应性喂养 7 天后, 将 36 只 C57BL/6J 小鼠采用随机数字表法分为空白组、化模组、化模高脂劳倦组, 将 24 只 UOX^{-/-}小鼠采用随机数字表法分为 UOX^{-/-}组和 UOX^{-/-}高脂劳倦组, 每组均为 12 只。

化模组和化模高脂劳倦组小鼠采用氧嗪酸钾联合腺嘌呤灌胃^[6]构建 HUA 模型, 将腺嘌呤 (100 mg/kg)、氧嗪酸钾 (500 mg/kg) 溶于 0.8% 羧甲基纤维素钠制备成悬浊液, 小鼠给予 0.1 ml/10 g 灌胃, 其余各组予生理盐水 0.1 ml/10 g 灌胃, 均每天 1 次, 连续 28 天。

HUA 湿浊内蕴病证结合造模: 化模高脂劳倦组、UOX^{-/-}高脂劳倦组小鼠予高脂饲料喂养, 同时每日予负重力竭游泳作为过劳因素, 持续 28 天。负重力竭游泳方法: 在小鼠尾部负重其 10% 体质量的铅丝, 随后将其置于水温 (25±0.5) °C、45 cm×35 cm×60 cm 透明长方体水槽中, 力竭判定为小鼠头部沉入水中并在 8 s 内未能浮出水面^[7]。空白组、化模组和 UOX^{-/-}组小鼠同时予标准饲料喂养。

模型成功判定综合标准^[7]: 1) 疾病模型指标: 血清 UA 水平达到空白组平均值的 2 倍及以上; 2) 证候模型指标: 湿浊内蕴证候积分≥11 分且持续升高; 3) 病理与功能指标: 肾脏病理损伤加重, 肾脏指数及 BUN 水平升高; 4) 炎症指标: 血清 TNF-α、IL-1β 水平升高。以上指标共同判定 HUA 湿浊内蕴证病证结合模型构建成功。

1.4 模型评价指标及检测方法

1.4.1 湿浊内蕴证候积分 参照文献 [8-9] 制定湿浊内蕴证候积分表, 于造模第 1、7、14、21、28 天

进行证候积分评定(第1天于负重力竭游泳前进行评定),包括大便黏滞度(正常1分、偏湿2分、湿烂3分、黏液便4分),体神态(正常1分、倦怠2分、弓背眯眼3分、蜷缩聚堆4分),毛色(正常1分、无光泽2分、竖毛蓬松3分、枯黄稀少4分),饮食情况(正常1分、食量较少2分、食量减少3分、食量极少4分),体味(无异味1分、淡臭2分、臭3分、恶臭4分)。

1.4.2 负重力竭游泳实验 造模前对各组小鼠进行连续3天的无负重游泳训练,造模第1天湿浊内蕴证候积分评定后进行负重力竭游泳。比较造模第1、28天负重力竭游泳实验中每只小鼠从入水到力竭的总时间。达到力竭标准后,立即将小鼠捞出并用吹风机吹干。

1.4.3 生化法检测血清 UA、XDH、XOD 和 BUN 水平 于末次负重力竭游泳实验结束后3 h,每组采用随机数字表法选取6只小鼠,腹腔注射0.3%戊巴比妥钠(0.2 ml/10 g)麻醉小鼠,腹主动脉取血,收集全血于1.5 ml EP管中静置30 min,4℃、3500 r/min、离心半径8.6 cm、离心15 min,收集上层血清,放于液氮中速冻,并保存在-80℃冰箱待检。采用全自动生化分析仪检测血清UA、XDH、XOD和BUN水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.4.4 ELISA 法检测血清 TNF-α 和 IL-1β 水平 取上述血清进行检测,实验操作严格按照相应ELISA试剂盒说明书进行。待反应终止后15 min内,使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度(OD)值。以标准品浓度为横坐标,对应的OD值为纵坐标,绘制标准曲线并拟合回归方程,计算血清TNF-α和IL-1β水平。

1.4.5 肝脏指数和肾脏指数 腹主动脉取血后,收集各组小鼠肝脏和双侧肾脏,称取质量,计算肝脏指数和肾脏指数。肝/肾脏指数(%)=肝/肾脏质量(g)÷体质量(g)×100%。

1.4.6 HE 染色法观察肝脏、肾脏病理形态 每组采用随机数字表法选取3只小鼠肝脏、肾脏,将其放于4%多聚甲醛中固定48 h。固定完成后,将组织依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸蜡后包埋,制备4 μm厚度切片。切片经脱蜡、水化,苏木素染色、伊红复染、脱水、透明及封片后,于光学显微镜下观察肝脏、肾脏的整体结构和病理变化。

1.4.7 免疫组化法检测肾脏组织 OAT1 和 GLUT9 蛋白表达 取上述固定于4%多聚甲醛中的肾组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸蜡后包埋,制备4 μm厚度切片。切片经脱蜡、水化、抗

原修复,3%过氧化氢溶液室温孵育10 min以封闭内源性过氧化物酶,PBS洗涤,滴加5%山羊血清室温封闭30 min后,分别滴加一抗(OAT1,1:500;GLUT9,1:1000)于4℃孵育过夜。次日滴加HRP标记的山羊抗兔IgG(1:1000)室温孵育1 h,DAB显色(棕黄色为阳性染色),复染细胞核,脱水封片,显微镜下观察OAT1和GLUT9蛋白表达。

1.4.8 实时荧光定量PCR法检测肾组织 *ABCG2*、*HIF-1α*、*URAT1*、*OAT1* 和 *GLUT9* mRNA 表达 每组随机选取6只小鼠的肾组织70 mg,研磨后4℃、3000 r/min、离心半径10 cm、离心15 min,收集上清液;用RNA提取试剂盒提取总RNA;紫外吸收法测定RNA浓度和纯度;变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性;反转录合成cDNA;PCR扩增与样本检测:预变性95℃、10 min;循环阶段95℃、15 s,45个循环→60℃、60 s,45个循环;熔解阶段95℃、15 s→60℃、60 s→95℃、30 s→60℃、15 s。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。引物序列由江苏康为世纪科技股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 小鼠肾组织 *ABCG2*、*HIF-1α*、*URAT1*、*OAT1*、*GLUT9* mRNA 引物序列

Table 1 Primer sequences of *ABCG2*, *HIF-1α*, *URAT1*, *OAT1*, and *GLUT9* mRNA in mice kidney

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
<i>ABCG2</i>	上游: CATTTCATCAGCCTCGGTATT	154
	下游: ATCCGCAGGGTTGTGTAG	
<i>HIF-1α</i>	上游: AAGGACAAAGTCACCACAGGACA	172
	下游: AGGGAGAAAATCAAGTCGTGCT	
<i>URAT1</i>	上游: TGCTGGGTGTCTATGGC	107
	下游: CAGTGGAAGTTCTTGCTCT	
<i>OAT1</i>	上游: CTGGACAAGCAAGGACG	141
	下游: CACGATGTTGAAGGGA	
<i>GLUT9</i>	上游: GAAACACTGGCTGCTATC	162
	下游: CACAATGCTGAGGTAAGG	
<i>GAPDH</i>	上游: AAATTCAACGGCACAGTCAA	133
	下游: TAGACTCCACGACATACTCAGCA	

注: *ABCG2*, 三磷酸腺苷结合转运蛋白G2; *HIF-1α*, 缺氧诱导因子-1α; *URAT1*, 尿酸盐阴离子转运体1; *OAT1*, 有机阴离子转运蛋白1; *GLUT9*, 葡萄糖转运体9; *GAPDH*, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.5 统计学方法

采用SPSS v26.0软件进行统计分析。所有资料均符合正态分布,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用Tukey检验或Bonferroni校正,方差不齐时两两比较采用Dunnett's T_3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 2 各组小鼠造模不同时间湿浊内蕴证候积分比较

Table 2 Comparison of damp-turbidity internal accumulation syndrome scores in each group of mice (分, $\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
空白组	12	5.00±0.00	5.45±0.25	5.44±0.37	5.48±0.92	5.64±0.81
化模组	12	5.00±0.00	5.71±0.68	5.73±0.63	6.08±0.41	6.05±0.31
UOX ^{-/-} 组	12	5.00±0.00	5.77±0.75	6.07±1.41	5.94±0.23	6.09±0.42
化模高脂劳倦组	12	5.00±0.00	6.11±1.33	6.29±1.20 ^{a)}	13.79±1.13 ^{b) c) d)}	16.18±2.18 ^{b) c) d)}
UOX ^{-/-} 高脂劳倦组	12	5.00±0.00	5.96±0.92	6.75±1.59 ^{a)}	14.22±2.07 ^{b) c) d)}	17.20±0.49 ^{b) c) d)}

注: a) 与空白组同时时间点比较, $P<0.05$; b) 与空白组同时时间点比较, $P<0.01$; c) 与化模组同时时间点比较, $P<0.01$; d) 与 UOX^{-/-}组同时时间点比较, $P<0.01$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠造模不同时间湿浊内蕴证候积分比较

表 2 示, 造模第 1、7 天, 各组小鼠湿浊内蕴证候积分比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 造模第 14 天, 与空白组比较, 化模高脂劳倦组、UOX^{-/-}高脂劳倦组小鼠湿浊内蕴证候积分升高 ($P<0.05$); 造模第 21、28 天, 与空白组、化模组和 UOX^{-/-}组比较, 化模高脂劳倦组、UOX^{-/-}高脂劳倦组小鼠湿浊内蕴证候积分均升高 ($P<0.01$), 且平均分均>11 分。

2.2 各组小鼠造模不同时间负重力竭游泳时间比较

表 3 示, 造模第 1 天, 各组小鼠负重力竭游泳时间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。造模第 28 天, 与空白组比较, 其余各组小鼠负重力竭游

表 3 各组小鼠造模不同时间负重力竭游泳时间比较

Table 3 Comparison of exhaustive loaded swimming time in each group of mice (s, $\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	第 1 天	第 28 天
空白组	12	332.13±48.50	333.04±10.15
化模组	12	350.20±51.16	219.35±12.43 ^{a)}
UOX ^{-/-} 组	12	348.61±44.12	203.97±9.14 ^{a)}
化模高脂劳倦组	12	340.87±27.90	141.51±4.26 ^{a) b) c)}
UOX ^{-/-} 高脂劳倦组	12	336.71±30.73	108.24±14.98 ^{a) b) c) d)}

注: a) 与空白组同时时间点比较, $P<0.01$; b) 与化模组同时时间点比较, $P<0.01$; c) 与 UOX^{-/-}组同时时间点比较, $P<0.01$; d) 与化模高脂劳倦组同时时间点比较, $P<0.01$ 。

泳时间缩短 ($P<0.01$); 与化模组和 UOX^{-/-}组比较, 化模高脂劳倦组、UOX^{-/-}高脂劳倦组小鼠负重力竭游泳时间缩短 ($P<0.01$); 与化模高脂劳倦组比较, UOX^{-/-}高脂劳倦组小鼠负重力竭游泳时间缩短 ($P<0.01$)。

2.3 各组小鼠造模第 28 天血清 UA、XDH、XOD、BUN 水平比较

表 4 示, 与空白组比较, 其余各组小鼠血清 UA、XDH、XOD、BUN 水平均升高 ($P<0.01$)。与化模组比较, UOX^{-/-}组血清 XDH 水平降低 ($P<0.01$); 化模高脂劳倦组血清 UA 水平降低, BUN 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); UOX^{-/-}高脂劳倦组血清 UA 水平降低, XDH 和 BUN 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 UOX^{-/-}组比较, 化模高脂劳倦组和 UOX^{-/-}高脂劳倦组 UA 水平降低、BUN 水平升高, UOX^{-/-}高脂劳倦组 XDH 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组小鼠造模第 28 天血清 TNF-α、IL-1β 水平比较

表 5 示, 与空白组比较, 其余各组小鼠血清 TNF-α 和 IL-1β 水平升高 ($P<0.01$)。与化模组比较, UOX^{-/-}组 TNF-α 水平降低、化模高脂劳倦组和 UOX^{-/-}高脂劳倦组 TNF-α 水平升高, UOX^{-/-}组、化模高脂劳倦组和 UOX^{-/-}高脂劳倦组 IL-1β 水平升高

表 4 各组小鼠造模第 28 天血清 UA、XDH、XOD、BUN 水平比较

Table 4 Comparison of serum UA, XDH, XOD and BUN levels in each group of mice on day 28 after modeling ($\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	UA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	XDH/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	XOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组	6	88.57±6.51	0.58±0.14	2.11±0.26	8.30±0.35
化模组	6	298.51±7.02 ^{a)}	17.98±0.38 ^{a)}	5.74±0.34 ^{a)}	72.16±4.16 ^{a)}
UOX ^{-/-} 组	6	305.07±3.34 ^{a)}	17.31±0.29 ^{a) b)}	5.68±0.71 ^{a)}	74.80±1.04 ^{a)}
化模高脂劳倦组	6	285.71±1.78 ^{a) b) d)}	18.49±1.40 ^{a)}	5.89±0.45 ^{a)}	79.46±3.85 ^{a) c) e)}
UOX ^{-/-} 高脂劳倦组	6	279.11±7.64 ^{a) b) d)}	19.67±1.31 ^{a) b) d)}	5.91±0.28 ^{a)}	77.52±1.64 ^{a) c) d)}

注: UA, 尿酸; XDH, 黄嘌呤脱氢酶; BUN, 血尿素氮; XOD, 黄嘌呤氧化酶。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与化模组比较, $P<0.01$; c) 与化模组比较, $P<0.05$; d) 与 UOX^{-/-}组比较, $P<0.01$; e) 与 UOX^{-/-}组比较, $P<0.05$ 。

($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 $UOX^{-/-}$ 组比较, 化模高脂劳倦组、 $UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组 $TNF-\alpha$ 水平升高 ($P<0.01$)。

表5 各组小鼠造模第28天血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 水平比较
Table 5 Comparison of serum $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ levels in each group of mice on day 28 after modeling ($pg\cdot ml^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	$TNF-\alpha$	$IL-1\beta$
空白组	6	129.58±1.91	101.59±1.20
化模组	6	280.14±7.20 ^{a)}	271.80±9.12 ^{a)}
$UOX^{-/-}$ 组	6	260.80±10.42 ^{a)b)}	288.20±11.74 ^{a)c)}
化模高脂劳倦组	6	302.90±13.60 ^{a)b)d)}	284.14±8.10 ^{a)c)}
$UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组	6	297.44±9.21 ^{a)b)d)}	290.34±16.51 ^{a)c)}

注: $TNF-\alpha$, 肿瘤坏死因子- α ; $IL-1\beta$, 白细胞介素- 1β 。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与化模组比较, $P<0.01$; c) 与化模组比较, $P<0.05$; d) 与 $UOX^{-/-}$ 组比较, $P<0.01$ 。

2.5 各组小鼠造模第28天肝脏、肾脏指数比较

表6示, 各组小鼠肝脏指数比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与空白组比较, 其余各组小鼠肾脏指数升高 ($P<0.01$); 与化模组比较, $UOX^{-/-}$ 组和 $UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组肾脏指数升高 ($P<0.01$); 与 $UOX^{-/-}$ 组比较, 化模高脂劳倦组肾脏指数降低, $UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组肾脏指数升高 ($P<$

表6 各组小鼠造模第28天肝脏、肾脏指数比较
Table 6 Comparison of liver and kidney indexes in each group of mice on day 28 after modeling ($\%$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	肝脏指数	肾脏指数
空白组	12	2.43±0.16	0.60±0.02
化模组	12	2.51±0.20	0.83±0.06 ^{a)}
$UOX^{-/-}$ 组	12	2.21±0.41	1.12±0.03 ^{a)b)}
化模高脂劳倦组	12	2.65±0.54	0.86±0.01 ^{a)c)}
$UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组	12	2.44±0.37	1.20±0.02 ^{a)b)d)e)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与化模组比较, $P<0.01$; c) 与 $UOX^{-/-}$ 组比较, $P<0.01$; d) 与 $UOX^{-/-}$ 组比较, $P<0.05$; e) 与化模高脂劳倦组比较, $P<0.01$ 。

0.05 或 $P<0.01$); 与化模高脂劳倦组比较, $UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组肾脏指数升高 ($P<0.01$)。

2.6 各组小鼠造模第28天肝脏、肾脏病理形态比较

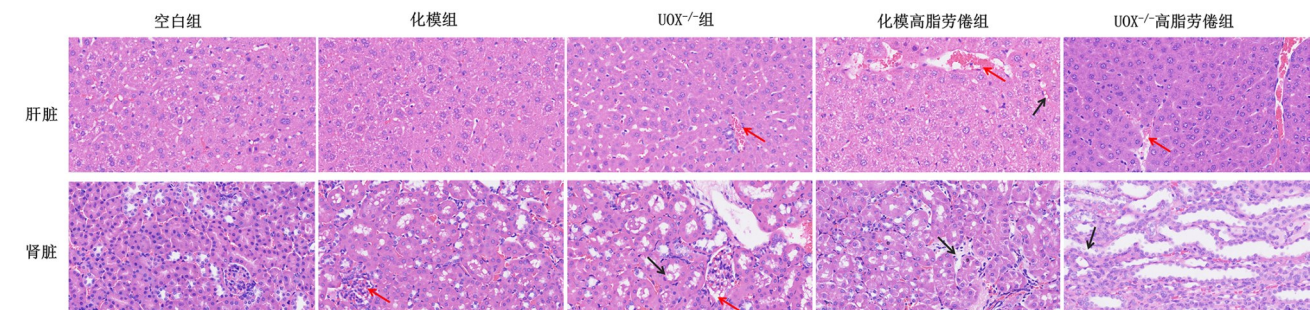
图1示, 空白组小鼠肝脏和肾脏结构均清晰, 肝细胞索排列整齐, 肾小球、肾小管结构完整, 未见明显病理改变。化模组小鼠肝脏 HE 染色未见明显异常, 但肾脏可见肾小球上皮细胞空泡样改变及肾小管上皮细胞轻度扩张。 $UOX^{-/-}$ 组小鼠肝脏可见部分中央静脉及肝血窦淤血; 肾脏可见肾小球上皮细胞空泡样改变及肾小管上皮细胞扩张、坏死。化模高脂劳倦组和 $UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组小鼠可见脂肪变性, 中央静脉以及肝血窦明显淤血; 肾脏病理损伤均较化模组和 $UOX^{-/-}$ 组加重。

2.7 各组小鼠造模第28天肾脏组织 OAT1、GLUT9 蛋白表达情况

图2示, 免疫组化结果表明, 空白组小鼠肾脏组织 OAT1 和 GLUT9 蛋白表达较弱, 呈少量棕黄色、染色浅, 均匀分布于近端小管上皮细胞基底侧膜和基底膜。化模组、 $UOX^{-/-}$ 组 OAT1 和 GLUT9 蛋白表达较空白组增加, 染色加深且范围扩大。与化模组和 $UOX^{-/-}$ 组比较, 化模高脂劳倦组、 $UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组 OAT1 和 GLUT9 蛋白表达进一步增加, 染色更深、棕黄色沉积明显。

2.8 各组小鼠造模第28天肾脏组织 $ABCG2$ 、 $HIF-1\alpha$ 、 $URAT1$ 、 $OAT1$ 、 $GLUT9$ mRNA 表达比较

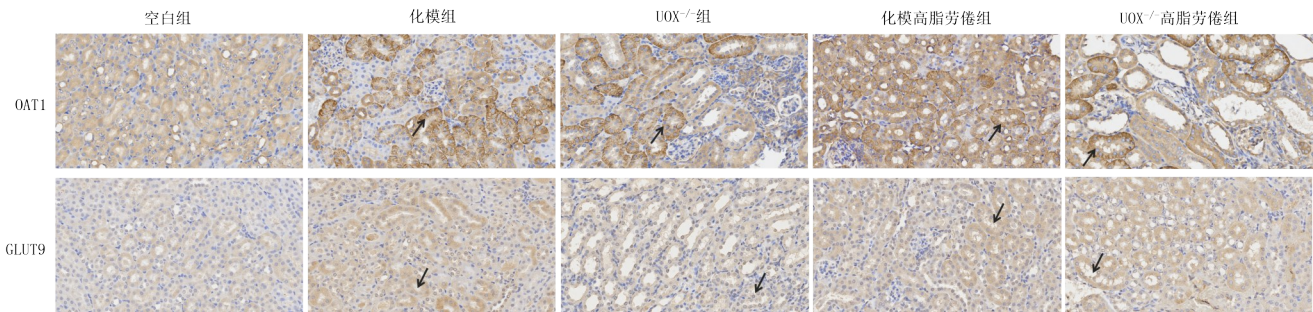
表7示, 与空白组比较, 其余各组小鼠肾脏组织 $ABCG2$ mRNA 表达降低, $HIF-1\alpha$ 、 $URAT1$ 、 $OAT1$ 和 $GLUT9$ mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与化模组比较, $UOX^{-/-}$ 组肾脏组织 $ABCG2$ mRNA 表达降低, $UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组 $URAT1$ 和 $OAT1$ mRNA 表达升高 ($P<0.05$); 与 $UOX^{-/-}$ 组比较, $UOX^{-/-}$ 高脂劳倦组 $GLUT9$ mRNA 表达升高 ($P<0.05$); 与



注: 肝脏病理图中黑色箭头指示脂肪变性 (圆形空泡), 红色箭头指示肝血窦、部分中央静脉淤血; 肾脏病理图中黑色箭头指示肾小管扩张, 红色箭头指示肾小球变形、萎缩。

图1 各组小鼠造模第28天肝脏、肾脏HE染色结果 (×400)

Figure 1 HE staining results of liver and kidney on day 28 after modeling (×400)



注：OAT1，有机阴离子转运蛋白1；GLUT9，葡萄糖转运体9；黑色箭头指示OAT1和GLUT9阳性表达，呈棕黄色颗粒，主要位于肾近端小管上皮细胞基底侧膜。

图2 各组小鼠肾脏组织OAT1、GLUT9免疫组化染色结果（×400）

Figure 2 Immunohistochemical staining results of OAT1 and GLUT9 in kidney tissue on day 28 after modeling (×400)

表7 各组小鼠造模第28天肾脏组织ABCG2、HIF-1α、URAT1、OAT1、GLUT9 mRNA表达比较

Table 7 Comparison of mRNA expressions of ABCG2, HIF-1α, URAT1, OAT1 and GLUT9 in kidney tissue in each group of mice on day 28 after modeling (x̄±s)

组别	鼠数	ABCG2	HIF-1α	URAT1	OAT1	GLUT9
空白组	6	1.06±0.14	1.06±0.61	0.77±0.47	1.08±0.27	0.67±0.47
化模组	6	0.33±0.17 ^{a)}	2.52±1.01 ^{b)}	4.04±0.39 ^{a)}	1.63±0.45 ^{b)}	2.13±0.80 ^{a)}
UOX ^{-/-} 组	6	0.12±0.04 ^{a) c)}	2.16±0.37 ^{a)}	4.39±0.13 ^{a)}	1.75±0.33 ^{a)}	1.79±0.24 ^{a)}
化模高脂劳倦组	6	0.33±0.39 ^{a)}	2.55±1.13 ^{b)}	4.06±0.60 ^{a)}	1.61±0.38 ^{b)}	1.96±0.68 ^{b)}
UOX ^{-/-} 高脂劳倦组	6	0.22±0.12 ^{a)}	2.19±0.34 ^{a)}	4.53±0.16 ^{a) c)}	2.20±0.19 ^{a) c) e)}	2.56±0.58 ^{a) d)}

注：ABCG2，三磷酸腺苷结合转运蛋白G2；HIF-1α，缺氧诱导因子-1α；URAT1，尿酸盐阴离子转运体1；OAT1，有机阴离子转运蛋白1；GLUT9，葡萄糖转运体9。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与化模组比较， $P<0.05$ ；d) 与UOX^{-/-}组比较， $P<0.05$ ；e) 与化模高脂劳倦组比较， $P<0.01$ 。

化模高脂劳倦组比较，UOX^{-/-}高脂劳倦组OAT1 mRNA表达升高（ $P<0.01$ ）。

3 讨论

动物模型是实验研究的基础，在阐明HUA发病、中医药降尿酸机制中发挥重要作用。湿浊内蕴证是HUA主要证型^[10]，现有HUA造模多采用增加尿酸前体物质或补充尿酸氧化酶抑制剂等方法，使血尿酸急性上升，无法复刻HUA整体状态，且缺乏中医证候模型^[11]。《脾胃论》记载“饮食不节，则胃先病，脾无所禀而后病”，《景岳全书》论述“劳倦最能伤脾”，饮食不节、劳倦过度损伤脾胃，脾失健运则水湿不化，湿浊内蕴。因此，本研究采用饮食不节联合劳倦过度法诱导湿浊内蕴证候模型。结果显示，与空白组比较，化模高脂劳倦组、UOX^{-/-}高脂劳倦组小鼠湿浊内蕴证候积分升高，血清UA水平升高，负重力竭游泳时间缩短，提示HUA湿浊内蕴证候模型小鼠制备成功。

UA是嘌呤代谢的最终产物，血肌酐和BUN水平是评价肾功能损伤的重要指标^[12]。黄嘌呤氧化还原酶包括XOD和XDH，可催化嘌呤代谢生成

UA^[13]，本实验结果表明，与空白组比较，各造模组血清BUN、XDH和XOD水平升高。肝脏是UA合成的主要场所，肾脏是UA排泄主要途径，占其排泄总量的2/3^[14]。与空白组比较，各造模组小鼠肾脏指数升高，肾小球上皮细胞空泡样改变，肾小管上皮细胞破裂、坏死，且高脂饮食和负重力竭游泳制备的HUA湿浊内蕴证候模型的肾脏病理变化更显著。

肾脏调节UA主要是通过肾小球滤过、近端小管重吸收、肾小管分泌和分泌后重吸收4个步骤完成，除滤过外均涉及各种尿酸转运蛋白，包括URAT1、GLUT9、ABCG2和OAT1^[15-16]。URAT1、GLUT9分布于近端小管上皮细胞基底外侧膜和顶端膜上，介导UA在管腔内进行重吸收^[17]。ABCG2位于肾小管上皮细胞刷状缘和基底膜上，调控UA从细胞转运至肾小管管腔，是调节UA分泌的关键尿酸转运蛋白^[18]。UA分泌蛋白OAT1多表达于肾脏近端小管的基底膜上^[19]。本研究结果显示，各造模组肾脏组织ABCG2 mRNA表达降低，URAT1、OAT1和GLUT9 mRNA表达升高；与化模组比较，

UOX^{-/-}组肾脏组织 *ABCG2* mRNA 表达降低, UOX^{-/-}高脂劳倦组 *URAT1* 和 *OAT1* mRNA 表达升高; *OAT1* 和 *GLUT9* 蛋白表达趋势与 mRNA 基本一致。上述结果提示 HUA 模型小鼠肾脏 UA 排泄减少、重吸收增加, 且 UOX 基因敲除造成的肾功能受损更严重。

UA 具有抗氧化能力, 对抗自由基和活性氧, 抑制细胞死亡以保护神经。然而, UA 可转化为促氧化剂和促炎分子, UA 水平升高时会加剧氧化应激, 介导炎症反应、氧化应激、血管内皮功能障碍和胰岛素抵抗^[20]。研究^[21]显示, HUA 和痛风小鼠肾脏 HIF-1 α 、TNF- α 和 IL-1 β 水平升高。本实验结果显示, 与空白组比较, 各造模组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平和肾脏组织 *HIF-1 α* mRNA 表达升高; 与化模组比较, 化模高脂劳倦组、UOX^{-/-}高脂劳倦组血清 TNF- α 、IL-1 β 水平升高; 与 UOX^{-/-}组比较, 上述两组血清 TNF- α 水平亦升高。上述结果提示, 湿浊内蕴证模型在 HUA 病理基础上叠加了炎症反应与缺氧应激。

综上, 本模型在化学诱导或基因敲除基础上叠加了中医病因, 使模型兼具病证特征, 更贴近中医临床对 HUA 病机的认识。同时, 本研究引入 UOX 基因敲除这一遗传学方法, 构建接近人类 UA 代谢遗传基础的疾病背景, 并与中医病因叠加, 为研究特定基因背景下的证候演变提供新工具。该模型不仅可用于筛选和评价具有降低 UA 作用的中药复方, 更能用于深入研究健脾化湿治法在调节代谢、抑制炎症等方面的机制。本研究存在一定局限性, 在证候评价方面, 湿浊内蕴证候积分虽经标准化制定, 但仍存在一定主观性, 未来可结合代谢组学、肠道菌群等客观指标进行多维评价; 本实验观察周期仅 28 天, 缺乏更长时间点的动态病理演变观察, 难以反映湿浊内蕴证的慢性进展过程。

所有作者均声明不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Bai H D, Zhang Z D, Zhu M T, et al. Research progress of treating hyperuricemia in rats and mice with traditional Chinese medicine [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1428558. DOI: 10.3389/fphar.2024.1428558.
- [2] 中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会. 痛风及高尿酸血症中西医结合诊疗指南[J]. *中医杂志*, 2023, 64(1): 98-106.
- [3] 杜利莉, 章丹宁, 薛梅, 等. 中医证候动物模型建立及评价方法研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2025, 41(1): 11-18.
- [4] 张馨, 崔娜, 侯俊玲, 等. 急性慢性高尿酸血症大鼠模型的建立[J]. *世界中医药*, 2023, 18(16): 2309-2313, 2318.
- [5] Lu J, Hou X, Yuan X, et al. Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(1): 69-80.
- [6] Wen S S, Wang D, Yu H Y, et al. The time-feature of uric acid excretion in hyperuricemia mice induced by potassium oxonate and adenine [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5178.
- [7] Duan F F, Guo Y, Li J W, et al. Antifatigue effect of luteolin-6-C-neohesperidoside on oxidative stress injury induced by forced swimming of rats through modulation of Nrf2/ARE signaling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 3159358. DOI: 10.1155/2017/3159358.
- [8] 肖艳, 陈鹏, 郭洁梅, 等. 高尿酸血症脾虚湿盛证病证结合小鼠模型的建立及其肠道菌群特征分析[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(8): 3815-3820.
- [9] 尚冰, 丛培玮, 王蕊芳, 等. 对脾虚大鼠模型建立模糊数学评价体系的研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(3): 64-66.
- [10] 张英杰, 毛骁, 肖艳, 等. 痛风宁对高尿酸血症脾虚湿盛证模型小鼠肠道菌群及肠道尿酸代谢的影响[J]. *中医杂志*, 2023, 64(21): 2232-2240.
- [11] 白慧洁, 史艳梅, 李秀敏, 等. 基于中西医临床病证特点的高尿酸血症动物模型分析[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(4): 1946-1949.
- [12] Liu Y, Peng B Z, Li D X, et al. Hyperuricemia exacerbates acetaminophen hepatotoxicity via JNK activation and mitophagy reduction [J]. *Biochem Pharmacol*, 2026, 243: 117487. DOI: 10.1016/j.bcp.2025.117487.
- [13] Bereda G, Omulio F P. Dual mechanisms of hyperuricemia-associated renal injury: a systematic review of crystal-dependent and crystal-independent pathways [J]. *Int J Rheum Dis*, 2025, 28(12): e70493.
- [14] 王雨, 林志健, 张冰. 尿酸代谢紊乱相关疾病的现代认知及中医药防治进展[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(12): 3160-3167.
- [15] Zhao D P, Wang Y N, He T T, et al. Puerariae lobatae Radix aqueous extract ameliorates asymptomatic hyperuricemia in a potassium oxonate-induced rat model by dual modulation of uric acid production and excretion [J]. *Front Nutr*, 2025, 12: 1685674. DOI: 10.3389/fnut.2025.1685674.
- [16] Wang S F, Zhu Q F, Zhang C C, et al. Aloe-emodin attenuates hyperuricemia-induced renal injury in mice by mitigating inflammation and oxidative stress [J]. *Front*

- Nutr, 2025, 12: 1677560. DOI: 10.3389/fnut. 2025. 1677560.
- [17] Yang J Y, Chen J L, Liu Z M, et al. The role of the intestinal microbiome in the pathogenesis and treatment of hyperuricemia: a review[J]. Food Sci Nutr, 2025, 13 (10): e70982.
- [18] 冯学轩, 刘月姝, 饶子亮, 等. 急、慢性高尿酸血症模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 74-80.
- [19] 张婷婷, 党翔, 杨青, 等. 痛风清利合剂通过调节尿酸转运蛋白和 JAK2/STAT3 信号通路缓解大鼠高尿酸血症[J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(5): 984-994.
- [20] Du L, Zong Y, Li H, et al. Hyperuricemia and its related diseases: mechanisms and advances in therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 212.
- [21] Zhao Z T, Tong X W, Sun J, et al. Curcumin ameliorates hyperuricemia and gout-induced damage via modulating the ROS-dependent NEK7-NLRP3 inflammasome activation[J]. Smart Mol, 2025, 3(3): e20250002.

Establishment and Evaluation of Hyperuricemia Mouse Model with Damp-Turbidity Internal Accumulation Syndrome

ZHANG Yue¹, LI Xiangyu¹, YANG Xuan¹, WANG Shenzhi², FAN Xinrong¹

1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To establish and evaluate a hyperuricemia (HUA) mouse model with the damp-turbidity internal accumulation syndrome. **Methods** Thirty-six C57BL/6J mice were randomly divided into control group, chemically induced model group (Model), and model combined with high-fat and fatigue group (Model+HF). Twenty-four uricase gene knockout (UOX^{-/-}) mice were randomly divided into UOX^{-/-} group and UOX^{-/-}+HF group, with 12 mice in each group. The Model group and the Model+HF group established the HUA model by intragastric administration of potassium oxyazinate combined with adenine. The Model+HF group and the UOX^{-/-}+HF group adopted a high-fat diet combined with weight-bearing exhaustive swimming to establish the HUA model with the damp-turbidity internal accumulation syndrome. On day 1, 7, 14, 21, and 28 after modeling, the damp-turbidity internal accumulation syndrome score of each group was evaluated. On day 1 and day 28, a weight-bearing swimming exhaustion test was performed, and the exhaustive swimming time was recorded. On day 28, liver and kidney indexes were calculated, and hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe histopathological changes in liver and kidney tissues. Serum levels of uric acid (UA), xanthine dehydrogenase (XDH), xanthine oxidase (XOD) and urea nitrogen (BUN) were detected through biochemical assays. ELISA was used to detect serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β). Immunohistochemistry was used to detect the protein expression of organic anion transporter 1 (OAT1) and glucose transporter 9 (GLUT9) in renal tissues. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expressions of adenosine triphosphate binding transporter G2 (ABCG2), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), urate anion transporter 1 (URAT1), and GLUT9 in renal tissues. **Results** On day 14 of modeling, the damp-turbidity internal accumulation syndrome scores of mice in the Model+HF group and the UOX^{-/-}+HF group were elevated compared with the control group ($P < 0.05$); on day 28, the scores significantly increased, and the exhaustive swimming time was shortened ($P < 0.01$), indicating successful establishment of the damp-turbidity internal accumulation syndrome model. Compared with the control group, all other groups exhibited increased kidney index, serum levels of UA, XDH, XOD, BUN, TNF- α , and IL-1 β , elevated renal mRNA expression of HIF-1 α , URAT1, OAT1, and GLUT9, and decreased renal ABCG2 mRNA expression ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Significant pathological damage in the kidney was observed in the Model+HF group and the UOX^{-/-}+HF group compared to the Model group and the UOX^{-/-} group, with decreased serum UA and increased BUN and TNF- α levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), as well as increased expression of OAT1 and GLUT9 in the renal tissue. **Conclusion** Both chemical induction and gene knockout, combined with a high-fat diet and weight-bearing exhaustive swimming, can successfully establish mouse models of HUA with damp-turbidity internal accumulation syndrome. Chemical induction is simple to operate and cost-effective, suitable for short-term drug screening, while UOX gene knockout induces spontaneous elevation of serum uric acid levels without drug administration, which may better mimic human metabolic characteristics.

Keywords hyperuricemia; damp-turbidity internal accumulation syndrome; animal model establishment; disease-syndrome combination

(收稿日期: 2026-01-08; 录用日期: 2026-02-14; 修回日期: 2026-03-12)

[编辑: 焦 爽]