

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.21.012

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

张英杰¹, 毛骁², 肖艳³, 蔡唐彦⁴, 郭洁梅¹, 陈鹏¹,
张鹏¹, 刘俊¹, 陈雨¹, 邱梦婷³, 苏友新[✉]

1. 福建中医药大学中医学院, 福建省福州市闽侯上街邱阳路1号, 350122; 2. 浙江省杭州市西湖区周浦社区卫生服务中心;
3. 福建中医药大学康复医学院; 4. 福建卫生职业技术学院

[摘要] **目的** 探讨痛风宁治疗高尿酸血症(HUA)脾虚湿盛证的可能作用机制。**方法** 60只小鼠中随机选取10只作为正常组常规饲养,其余50只予高脂高糖饲料联合劳倦过度+次黄嘌呤联合氧嗪酸钾混悬液构建HUA脾虚湿盛证病证结合动物模型。造模成功后为更好地观察痛风宁对模型小鼠肠道菌群的影响,在维持病证结合造模的基础上,采用混合抗生素混悬液灌胃,诱导加重模型小鼠肠道菌群紊乱。造模成功的50只小鼠随机分为模型组、痛风宁组、别嘌醇组、益生菌组、别嘌醇+益生菌组,每组10只。痛风宁组以19.11 g/(kg·d)痛风宁药液灌胃,别嘌醇组以78 mg/(kg·d)别嘌醇混悬液灌胃,益生菌组以3 g/(kg·d)双歧杆菌乳杆菌三联活菌片混悬液灌胃,别嘌醇+益生菌组以78 mg/(kg·d)别嘌醇及3 g/(kg·d)双歧杆菌乳杆菌三联活菌片混悬液灌胃,正常组、模型组以19.11 ml/(kg·d)生理盐水灌胃;均连续干预21天。为了维持稳定的高尿酸状态,除正常组外,其余各组小鼠在给药干预的同时均继续进行造模。比较各组小鼠脾虚证候积分,血尿酸水平,菌群结构的变化,肠道灌洗液中乙酸、丁酸含量,小肠组织中腺苷脱氨酶(ADA)、黄嘌呤氧化酶(XOD)含量,三磷酸腺苷结合盒转运蛋白G2(ABCG2)、葡萄糖转运体9(GLUT9)蛋白及mRNA表达。**结果** 与正常组比较,模型组脾虚证候积分、血尿酸水平、厚壁菌门相对丰度、厚壁菌门/拟杆菌门值,副拟杆菌属、克雷伯菌属、肠球菌属丰度,肠道灌洗液乙酸含量,小肠组织中ADA及XOD含量、GLUT9蛋白及mRNA表达升高($P<0.05$);肠道菌群操作分类单元(OTU)数目、拟杆菌门相对丰度,乳杆菌属、未培养拟杆菌属丰度,肠道灌洗液丁酸含量,小肠组织中ABCG2蛋白及mRNA表达显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,痛风宁组、益生菌组、别嘌醇+益生菌组小鼠脾虚证候积分、血尿酸水平、厚壁菌门相对丰度、肠道灌洗液乙酸含量,小肠组织中ADA及XOD含量、GLUT9蛋白及mRNA表达明显降低,肠道菌群OTU数目、杆菌门相对丰度、肠道灌洗液丁酸含量、小肠组织中ABCG2蛋白及mRNA表达显著升高($P<0.05$);益生菌组厚壁菌门/拟杆菌门值降低;痛风宁组乳杆菌属、未培养拟杆菌属丰度显著升高,副拟杆菌属、克雷伯菌属、肠球菌属等丰度显著降低($P<0.05$)。与痛风宁组比较,益生菌组、别嘌醇组血尿酸水平、副拟杆菌丰度,小肠组织中ADA及XOD含量、GLUT9 mRNA表达升高,厚壁菌门相对丰度、乳杆菌丰度、ABCG2 mRNA表达显著降低;益生菌组小肠组织GLUT9蛋白表达升高;益生菌组、别嘌醇+益生菌组小鼠脾虚证候积分明显较高,小鼠肠道灌洗液丁酸含量较低;别嘌醇组小鼠肠道菌群OTU数目、拟杆菌门、肠道灌洗液丁酸含量相对丰度,小肠组织中ABCG2蛋白表达降低,肠道灌洗液乙酸含量、克雷伯菌丰度,GLUT9蛋白表达显著升高($P<0.05$)。**结论** 痛风宁治疗高尿酸血症(HUA)脾虚湿盛证可能与其调整肠道益生菌(乳杆菌等)与致病菌(克雷伯菌等)的丰度及菌群代谢产物乙酸、丁酸的生成;降低肠道内ADA及XOD表达、减少肠道尿酸生成;上调肠上皮尿酸盐转运体ABCG2表达、下调GLUT9表达,促进肠道尿酸排泄三方面因素相关。

[关键词] 高尿酸血症; 肠道菌群; 尿酸代谢; 脾虚湿盛证; 痛风宁

基金项目:国家自然科学基金(81973891);国家中医药管理局2021年岐黄学者支持项目(国中医药人教函[2022]6号);福建省卫生健康委员会医学创新课题(2019-CX-40)

✉ 通讯作者:suyouxin777@hotmail.com

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是一种由于机体嘌呤代谢紊乱所致的代谢性疾病。近年来该病发病率持续升高,可能与高嘌呤饮食、果糖饮料的流行有关^[1]。本团队前期研究^[2-3]结果提示,HUA 患者以脾虚为本,多由嗜食肥甘厚腻,水液失于运化,酿生湿浊所致,脾虚湿盛是本病的主要证型。痛风宁是我们在上述研究及临床实践基础上创立的经验方,具有健脾胃、利湿浊的功效,可降低尿酸水平^[4-5]。近年有研究表明,肠道菌群失调在 HUA 发生发展过程中扮演重要角色^[6],可以影响肾脏、肠道的尿酸排泄,以及体内尿酸的生成,从而促进 HUA 的发生发展^[7-8]。已有研究证实,中医脾虚证候与肠道菌群失调的关系密切^[9]。本研究观察痛风宁对 HUA 脾虚湿盛证肠道菌群失调模型小鼠肠道菌群及肠道尿酸代谢的影响,探究痛风宁降尿酸的可能作用机制,为其临床运用提供依据。本研究经福建中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号:FJTCM IACUC2020098)。

1 材料与方法

1.1 动物及饲料

SPF 级雄性 KM 小鼠 60 只,2 月龄,体质量 (22±2) g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006,委托福建中医药大学动物实验中心代购和饲养,实验动物使用许可证号:SYXK(闽)2019-0007。饲养条件为:规律进食,自由饮水,室温 (25±2) °C,相对湿度 40%~70%,光暗周期 12 h/12 h。高脂高糖饲料由蔗糖、胆固醇、胆酸盐、猪油、蛋黄粉和普通饲料组成(组成比例为:15%、4%、0.3%、10%、10%、60.7%),购于江苏美迪森生物医药有限公司。

1.2 主要药物

痛风宁组成:土茯苓、草薢、丹参、川牛膝、秦艽、肿节风、泽泻、金钱草、苍术、黄柏,组成比例为 10:5:5:4:3:5:5:7:3:2,饮片购自福建中医药大学附属国医堂,并经福建中医药大学中西医结合研究院鉴定,药物经煎煮、过滤、浓缩成含原药材 1 g/ml 痛风宁药液,高压灭菌后密封装好,置于 4 °C 冰箱保存备用。次黄嘌呤粉剂、氧嗪酸钾粉剂(100 g/瓶,批号:C10881059、H2026116,美国 Sigma 化学试剂公司);混合抗生素混悬液:将硫酸庆大霉素片放入高压灭菌后的研钵中,研磨成粉末后与头孢拉定胶囊中的药粉按 3:4 比例混

合,使用生理盐水配制成抗生素混悬液,硫酸庆大霉素、头孢拉定浓度分别为 0.10、0.13 g/ml 于 4 °C 冰箱内储存备用,头孢拉定胶囊(0.25 g 粒,批号:2181200221,山东新华制药股份有限公司),硫酸庆大霉素片(40 mg/片,批号:191201,福建汇天生物药业有限公司);别嘌醇片(0.5 mg/片,批号:20200701,广东彼迪药业有限公司);双歧杆菌乳杆菌三联活菌片(0.5 g/片,批号:202004117,内蒙古双奇药业股份有限公司)。

1.3 主要试剂与仪器

尿酸测试盒(批号:20200711,南京建成生物工程研究所);小鼠腺苷脱氨酶(ADA)、黄嘌呤氧化酶(XOD)ELISA 试剂盒(批号:210316、210320,江苏酶免实业有限公司);增强型 RIPA 裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:18G26C02、17B21C83、17E10A92、18G24C46,武汉博士德生物工程有限公司);三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 (ABCG2)、葡萄糖转运体 9 (GLUT9) 多克隆抗体(批号:10035211、00121594,武汉三鹰生物技术有限公司);动物用异氟烷(100 ml/瓶,批号:970-00026-00,深圳市瑞沃德生命科技有限公司);Trizol 试剂盒(批号:332336AX,北京艾德莱生物科技有限公司);反转录试剂盒、预混液形式的两步法 RT-qPCR 试剂、高灵敏度染料法定量 PCR 检测试剂盒(批号:L/N7E602G2、017E2210DA、7E560E1,南京诺唯赞生物科技有限公司);特超敏化学发光检测试剂盒(批号:220512E01-02,苏州优逸兰迪生物科技有限公司)。

动物实验跑台(ZH-PT 型,安徽正华生物仪器设备有限公司);全自动酶标仪(ELX800 型,美国 Bio-Tek 公司);低速离心机(TDZ4A-WS 型,湖南湘仪仪器有限公司);低温高速离心机(64 R 型,美国 BECKMAN 公司);PCR 扩增仪(PE9600 型,美国 PE 公司);高通量测序仪(HiSeq 2500 型,美国 Illumina 公司);双色红外激光成像系统(Odyssey 型,美国 LICOR 公司);气相色谱-质谱联用仪(TRACE 1310 型,美国 Thermo 公司)。

1.4 造模及鉴定

60 只 KM 小鼠适应性喂养 7 天后,按随机数字表法分为正常组 10 只、造模组 50 只。采用分阶段造模干预,第 1~21 天:正常组予常规饲养,自由饮食;造模组采用高脂高糖饲料联合劳倦过度构建脾虚湿盛证模型^[10],并在第 15~21 天采用次黄嘌

吟 300 mg/(kg·d) + 氧嗪酸钾 250 mg/(kg·d) 灌胃进一步构建 HUA 脾虚湿盛证病证结合小鼠模型^[11]。于造模前及造模结束后 3% 异氟烷 500 ml/min 吸入麻醉小鼠后眼眶静脉采血检测其血尿酸, 并进行脾虚湿盛证候积分^[12]评定。造模结束后小鼠血尿酸水平达到正常组尿酸平均值的 2 倍及以上, 且达到脾虚湿盛证评定标准(证候积分 ≥ 11 分)则判定造模成功^[13]。50 只小鼠均造模成功。为更好地观察痛风宁对模型小鼠肠道菌群的影响, 在维持病证结合造模的基础上, 参照文献[14]的方法, 采用头孢拉定 2 g/(kg·d) 联合硫酸庆大霉素 1.5 g/(kg·d) 抗生素混悬液灌胃 7 天, 诱导加重模型小鼠肠道菌群紊乱。

1.5 分组及干预

造模成功后, 为了维持稳定的高血尿酸状态, 除正常组外, 其余各组小鼠在给药干预的同时, 均继续给予高脂高糖饲料喂养, 并联合 250 mg/(kg·d) 氧嗪酸钾+300 mg/(kg·d) 次黄嘌呤灌胃。将造模成功的 50 只模型小鼠采用随机数字表法分为模型组、痛风宁组、别嘌醇组、益生菌组、别嘌醇+益生菌组, 每组 10 只。

按人与动物千克体重折算的等效剂量换算^[15]给药量, 正常组、模型组以 19.11 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 痛风宁组以 19.11 g/(kg·d) 痛风宁药液灌胃, 别嘌醇组以 78 mg/(kg·d) 别嘌醇混悬液灌胃, 益生菌组以 3 g/(kg·d) 双歧杆菌乳杆菌三联活菌片混悬液灌胃, 别嘌醇+益生菌组以 78 mg/(kg·d) 别嘌醇及 3 g/(kg·d) 双歧杆菌乳杆菌三联活菌片混悬液灌胃(间隔 1 h)。药物灌胃分上下午各 1 次, 间隔 8 h, 连续干预 21 天。为了维持稳定的高血尿酸状态, 除正常组外, 其余各组小鼠在给药干预的同时, 均继续给予高脂高糖饲料喂养, 并于药物灌胃 1 h 前予 250 mg/(kg·d) 氧嗪酸钾+300 mg/(kg·d) 次黄嘌呤灌胃。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 脾虚证候积分 干预结束后次日清晨观察各组小鼠大便性状、体神态、毛色、饮食情况、体味, 进行脾虚证候积分评定^[12]: 大便性状(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)。

1.6.2 血尿酸水平检测 末次干预结束后次日清晨 3% 异氟烷吸入麻醉后, 腹主动脉采血, 收集入离心管中, 于 4℃ 冰箱静置 4 h 后 3000 r/min 4℃ 离心(离心半径 6.5 cm) 20 min。分装血清, -20℃ 保存备用。采用尿酸检测试剂盒检测血清中尿酸水平, 严格参照说明书操作。

1.6.3 肠道菌群结构及多样性分析 末次干预结束后次日清晨无菌、规范收集每只小鼠粪便 4~6 粒约 0.5 g, 行 16S rRNA 测序。经 DNA 提取、PCR 扩增纯化、Biomarker Technologies Corporation 对纯化的混合样品进行细菌 rRNA 基因的高通量测序, 经文库质量评估后, 使用 Illumina HiSeq 2500 平台进行分析, 通过对原始测序序列的拼接过滤和数据评估, 获得后续分析可用的高质量测序标签, 对处理后的标签做操作分类单元(OTU)聚类, 进而进行物种注释和多样性分析。

1.6.4 气相色谱与质谱联用法测定小鼠肠道灌洗液中乙酸、丁酸含量 将采血后的小鼠置于冰上进行肠道插管, 以十二指肠起始端作为入口, 结肠末端为出口, 两端进行插管, 采用生理盐水灌肠, 收集冲洗液, 3000 r/min 4℃ 离心 5 min(离心半径 6.5 cm), 取上清液(即肠道灌洗液), 于 -20℃ 保存备用。取 0.1 ml 肠道灌洗液于 1.5 ml 离心管中, 加入 0.05 ml 50% 硫酸, 加入 0.2 ml 内标溶液(2-甲基戊酸 25 mg/L, 甲基叔丁基醚), 涡旋 30 s, 振荡 10 min, 超声 10 min(冰水浴), 10 000 r/min(离心半径 6 cm) 4℃ 离心 15 min, -20℃ 静置 30 min, 取出上清于进样瓶中, 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)上检测乙酸、丁酸的含量。

1.6.5 检测小肠组织中 ADA、XOD 含量 于冰上快速获取小肠, 用生理盐水冲洗干净, 经液氮冷冻后转入 -80℃ 冰箱保存备用。在装有小肠组织的 EP 管内加入 9 倍体积的生理盐水, 低温下机械匀浆, 制备成 10% 的匀浆液, 3000 r/min、4℃ 离心 10 min(离心半径 6 cm), 取上清液进行测定。严格按照试剂盒说明进行操作。

1.6.6 蛋白免疫印迹法检测小肠组织中 ABCG2、GLUT9 蛋白表达 蛋白提取按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行。采用 BCA 法测定蛋白浓度。配制 10% 分离胶, 5% 浓缩胶, 浓缩胶 70 V 恒压, 至溴酚蓝进入分离胶后改 110 V 恒压, 电泳至溴酚蓝刚出凝胶下端。200 mA 恒流转膜 90 min。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 2 h, TBST 洗膜 5 min, 3 次。孵育一抗 ABCG2、GLUT9 (1:1000) 和内

参 GAPDH (1 : 5 000), 4 ℃ 孵育过夜, 第 2 天室温孵育 20 min, TBST 洗膜 5 min, 3 次。加入山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1 : 10 000), 37 ℃ 孵育 2 h, TBST 洗膜 5 min, 3 次。特超敏化学发光试剂显影反应 2 min, Odyssey 双色激光成像系统扫描成像。Image J v1.8.0 软件测定条带灰度值, 以 GAPDH 为内参对照计算。

1.6.7 RT-qPCR 检测小肠组织中 ABCG2、GLUT9 mRNA 表达 肠组织总 RNA 提取采用 Trizol 法。去除基因组 DNA, 加入 gDNA 缓冲消除剂 (5×) 2.0 μl, gDNA 消除剂 1.0 μl, RNA 150 ng, 无菌无酶水补至 10 μl, 混匀, 42 ℃ 反应 2 min。根据反转录试剂盒说明书进行反转录, RT-qPCR 反应体系为 20 μl, 包含 SYBR Green 荧光染料 (2×) 10 μl, 上游引物 (10 μmol/L) 0.4 μl, 下游引物 (10 μmol/L) 0.4 μl, cDNA 模板 1.0 μl, 无菌无酶水 补至 20 μl。扩增条件为 94 ℃ 预变性 5 min, 1 循环; 95 ℃ 变性 3 s, 60 ℃ 退火/延伸 30 s, 40 循环。引物序列见表 1, 均委托福建尚亚生物工程有限公司进行合成并验证。RT-qPCR 结果用 2^{-ΔΔCt} 计算, 以相对值表示。

表 1 ABCG2、GLUT9 及 GAPDH 基因的引物序列
Table 1 Primer sequences for ABCG2, GLUT9, and GAPDH genes

基因	引物	基因引物序列	扩增片段长度
ABCG2	上游引物	5'-CCTCACCTTACTGGCTTCCG-3'	112 bp
	下游引物	5'-ATCCGCAGGGTTGTTGTAGG-3'	
GLUT9	上游引物	5'-GACAAGATCCCATACATCACCT-3'	111 bp
	下游引物	5'-GCCACCAATGAGGAGAGGTC-3'	
GAPDH	上游引物	5'-ACAGGCTGCTGGACCTCATG-3'	189 bp
	下游引物	5'-GGTCTGGGATGGAACTGG-3'	

注: ABCG2, 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2; GLUT9, 葡萄糖转运体 9。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布, 以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐时多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 法检验。方差不齐时采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况、脾虚证候积分、血尿酸水平比较

正常组小鼠大便成形, 体神态正常, 毛色光亮

顺滑, 饮食良好, 无异味。与正常组比较, 造模组小鼠普遍出现大便湿烂、稀溏, 神态倦怠嗜睡, 蜷缩畏寒, 毛色无光泽甚至竖毛蓬松, 食量减少等脾虚表现; 与模型组比较, 痛风宁组、益生菌组、别嘌醇+益生菌组大便成形, 活动增加, 痛风宁组小鼠毛色、饮食、体味均有所改善, 别嘌醇组各项体征未见明显改善。表 2 示, 与正常组比较, 其余各组小鼠脾虚证候积分、血尿酸水平均明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 除别嘌醇组脾虚证候积分外, 其余各药物干预组脾虚证候积分、血尿酸水平均明显降低 ($P<0.05$); 与痛风宁组比较, 益生菌组、别嘌醇组、别嘌醇+益生菌组小鼠脾虚证候积分明显升高, 益生菌组、别嘌醇组血尿酸水平亦升高 ($P<0.05$)。

表 2 各组小鼠脾虚证候积分、血尿酸比较
Table 2 Comparison of spleen deficiency syndrome scores, blood uric acid among the groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脾虚证候积分/分	血尿酸/ μmol·L ⁻¹
正常组	10	6.222±0.441	98.083±6.030
模型组	10	17.111±1.453 ^{a)}	247.883±12.763 ^{a)}
痛风宁组	10	9.667±1.000 ^{a) b)}	152.933±17.327 ^{a) b)}
益生菌组	10	11.444±1.509 ^{a) b) c)}	216.467±13.113 ^{a) b) c)}
别嘌醇组	10	17.222±1.202 ^{a) c)}	176.683±9.311 ^{a) b) c)}
别嘌醇+益生菌组	10	13.222±1.563 ^{a) b) c)}	148.333±7.212 ^{a) b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与痛风宁组比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠粪便 16s rRNA 测序结果

2.2.1 各组小鼠肠道菌群 OTU 聚类分析结果 表 3 示, 与正常组比较, 模型组、别嘌醇组、别嘌醇+益生菌组小鼠肠道菌群 OTU 数目显著减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各药物干预组小鼠肠道菌群 OTU 数目显著升高 ($P<0.05$); 与痛风宁组比较, 别嘌醇组小鼠肠道菌群 OTU 数目减少 ($P<0.05$), 益生菌组、别嘌醇+益生菌组小鼠肠道菌群 OTU 数目差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2.2 各组小鼠肠道菌群在门水平物种组成相对丰度比较 研究^[16-17]显示, 厚壁菌和拟杆菌的丰度相对变化 (厚壁菌/拟杆菌) 是评价肠道菌群的稳态的金指标。表 4 示, 与正常组比较, 模型组、别嘌醇组、别嘌醇+益生菌组拟杆菌门相对丰度降低, 模型组、痛风宁组、别嘌醇组厚壁菌门相对丰度升高, 模型组、别嘌醇组厚壁菌门/拟杆菌门值升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各药物干预组中拟杆菌门相对丰度明显升高, 厚壁菌门相对丰度降低, 益生菌组厚壁菌门/拟杆菌门值降低 ($P<$

表3 各组小鼠肠道菌群OTU聚类分析结果

Table 3 Cluster analysis results of Operational Taxonomic Units in the intestinal microbiota of the groups (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	OTU
正常组	10	1096.200±95.205
模型组	10	386.500±100.194 ^{a)}
痛风宁组	10	1018.200±133.382 ^{b)}
别嘌呤组	10	781.000±205.628 ^{a) b) c)}
益生菌组	10	990.800±108.957 ^{b)}
别嘌呤+益生菌组	10	912.375±163.260 ^{a) b)}

注: OTU, 操作分类单元。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与痛风宁组比较, $P<0.05$ 。

0.05)。与痛风宁组比较, 别嘌呤组拟杆菌门相对丰度降低, 益生菌组、别嘌呤+益生菌组厚壁菌门相对丰度亦降低 ($P<0.05$)。

2.2.3 各组小鼠肠道菌群在属水平物种组成相对丰度比较 统计同一细菌丰度在组间的差异情况后显示, 乳杆菌、未培养拟杆菌、副拟杆菌、克雷伯菌、肠球菌在正常组与模型组间, 且至少有一个治疗组与模型组间差异存在统计学意义 ($P<0.05$)。表5示, 与正常组比较, 模型组乳杆菌属、未培养拟杆菌属丰度显著降低, 副拟杆菌属、克雷伯菌属、肠球菌属丰度显著升高 ($P<0.05$); 痛风宁组乳杆菌属丰度显著升高, 副拟杆菌属丰度显著降低 ($P<0.05$); 别嘌呤组乳杆菌属丰度降低, 克

雷伯菌属丰度升高 ($P<0.05$); 益生菌组乳杆菌属、未培养拟杆菌属丰度升高 ($P<0.05$); 别嘌呤+益生菌组乳杆菌属丰度升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 痛风宁组乳杆菌属、未培养拟杆菌属丰度显著升高, 副拟杆菌属、克雷伯菌属、肠球菌属丰度显著降低 ($P<0.05$); 别嘌呤组乳杆菌属、未培养拟杆菌属丰度升高, 克雷伯菌属、肠球菌属丰度降低 ($P<0.05$); 益生菌组乳杆菌属、未培养拟杆菌属丰度显著升高, 克雷伯菌属、肠球菌属丰度显著降低 ($P<0.05$); 别嘌呤+益生菌组乳杆菌属、未培养拟杆菌属丰度显著升高, 副拟杆菌属、克雷伯菌属、肠球菌属丰度显著降低 ($P<0.05$)。与痛风宁组比较, 别嘌呤组、益生菌组乳杆菌属丰度显著降低, 副拟杆菌属丰度显著升高, 别嘌呤组克雷伯菌属丰度显著升高, 别嘌呤+益生菌组乳杆菌属丰度较低 ($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠肠道灌洗液中乙酸、丁酸含量比较

表6示, 与正常组比较, 其余各组小鼠肠道灌洗液乙酸含量升高、丁酸含量降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 痛风宁组、益生菌组、别嘌呤+益生菌组小鼠肠道灌洗液乙酸含量均下降、丁酸含量升高, 别嘌呤组丁酸含量升高 ($P<0.05$); 与痛风宁组比较, 益生菌组、别嘌呤+益生菌组小鼠肠道灌洗液丁酸含量降低, 别嘌呤组乙酸含量升高、丁酸含量降低 ($P<0.05$)。

表4 各组小鼠肠道菌群门水平组成比较

Table 4 Comparison of the composition of the intestinal microbiota at the phylum level among the groups (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	拟杆菌门	厚壁菌门	厚壁菌门/拟杆菌门
正常组	10	74.454±6.194	18.443±1.863	0.249±0.033
模型组	10	36.245±6.159 ^{a)}	35.610±3.472 ^{a)}	0.997±0.155 ^{a)}
痛风宁组	10	67.351±4.878 ^{b)}	27.417±1.700 ^{a) b)}	0.409±0.409
别嘌呤组	10	53.498±0.677 ^{a) b) c)}	26.229±2.619 ^{a) b)}	0.490±0.052 ^{a)}
益生菌组	10	72.892±2.056 ^{b)}	14.196±2.804 ^{b) c)}	0.195±0.042 ^{b)}
别嘌呤+益生菌组	10	60.450±1.477 ^{a) b)}	21.028±2.425 ^{b) c)}	0.348±0.044

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与痛风宁组比较, $P<0.05$ 。

表5 各组小鼠肠道菌群属水平组成比较

Table 5 Comparison of the composition of the intestinal microbiota at the genus level among the groups (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	乳杆菌属	未培养拟杆菌属	副拟杆菌属	克雷伯菌属	肠球菌属
正常组	10	12.563±1.033	9.949±1.507	2.360±0.737	0.037±0.024	0.020±0.016
模型组	10	0.481±0.188 ^{a)}	0.771±0.382 ^{a)}	21.383±7.395 ^{a)}	24.411±5.729 ^{a)}	12.745±7.165 ^{a)}
痛风宁组	10	23.610±3.919 ^{a) b)}	13.090±0.972 ^{b)}	0.758±0.213 ^{a) b)}	0.230±0.208 ^{b)}	0.187±0.085 ^{b)}
别嘌呤组	10	7.393±1.164 ^{a) b) c)}	13.546±2.794 ^{b)}	5.847±2.008 ^{c)}	0.888±0.495 ^{a) b) c)}	0.156±0.122 ^{b)}
益生菌组	10	7.470±0.357 ^{a) b) c)}	15.552±1.166 ^{a) b)}	1.591±0.197 ^{c)}	0.118±0.046 ^{b)}	0.003±0.001 ^{b)}
别嘌呤+益生菌组	10	18.143±3.112 ^{a) b) c)}	13.533±1.032 ^{b)}	0.776±0.138 ^{b)}	0.258±0.023 ^{b)}	0.115±0.115 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与痛风宁组比较, $P<0.05$ 。

表 6 各组小鼠肠道灌洗液乙酸、丁酸含量比较
Table 6 Comparison of the acetic acid and butyric acid contents in the intestinal lavage fluid among the groups (μg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	乙酸	丁酸
正常组	10	2.059±0.465	1.923±0.106
模型组	10	11.685±1.483 ^{a)}	0.199±0.024 ^{a)}
痛风宁组	10	5.588±1.534 ^{a) b)}	1.566±0.093 ^{a) b)}
益生菌组	10	5.511±1.115 ^{a) b)}	0.825±0.082 ^{a) b) c)}
别嘌呤组	10	13.579±1.312 ^{a) c)}	0.520±0.063 ^{a) b) c)}
别嘌呤+益生菌组	10	7.605±0.789 ^{a) b)}	1.306±0.178 ^{a) b) c)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与痛风宁组比较， $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠小肠组织中 ADA、XOD 含量检测结果
表 7 示，与正常组比较，其余各组 XOD 含量明显升高，模型组、益生菌组、别嘌呤组小鼠小肠组织中 ADA 含量明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组小肠组织中 ADA 及 XOD 含量均明显下降 ($P<0.05$)；与痛风宁组比较，益生菌组、别嘌呤组小鼠小肠组织中 ADA 及 XOD 含量明显升高 ($P<0.05$)，别嘌呤+益生菌组小鼠小肠组织中 ADA 及 XOD 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 7 各组小鼠小肠组织中 ADA、XOD 含量比较
Table 7 Comparison of the ADA and XOD contents in the small intestine tissues of the groups (U/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ADA	XOD
正常组	10	37.023±3.698	458.133±7.344
模型组	10	98.140±4.122 ^{a)}	813.867±23.245 ^{a)}
痛风宁组	10	39.374±7.535 ^{b)}	569.267±44.762 ^{a) b)}
益生菌组	10	64.056±4.122 ^{a) b) c)}	698.400±23.444 ^{a) b) c)}
别嘌呤组	10	60.530±4.122 ^{a) b) c)}	657.600±25.339 ^{a) b) c)}
别嘌呤+益生菌组	10	41.137±5.758 ^{b)}	588.000±49.880 ^{a) b)}

注：ADA，腺苷脱氨酶；XOD，黄嘌呤氧化酶。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与痛风宁组比较， $P<0.05$ 。

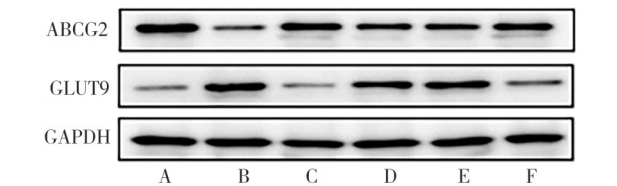
2.5 各组小鼠小肠组织中 ABCG2、GLUT9 蛋白表达比较
表 8 示，与正常组比较，模型组、益生菌组、别嘌呤组小鼠小肠组织中 ABCG2 蛋白表达明显下降，GLUT9 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组小鼠小肠组织中 ABCG2 蛋白表达升高，GLUT9 蛋白表达下降 ($P<0.05$)；与痛风宁组比较，益生菌组小鼠小肠组织 GLUT9 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，别嘌呤组小鼠小肠组织中 ABCG2 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，GLUT9 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。各组小鼠小肠组织中 ABCG2、

GLUT9 蛋白电泳图见图 1。

表 8 各组小鼠小肠组织中 ABCG2、GLUT9 蛋白相对表达比较
Table 8 Comparison of the relative expression of ABCG2 and GLUT9 proteins in the small intestine tissues of the groups (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ABCG2	GLUT9
正常组	10	0.856±0.017	0.132±0.056
模型组	10	0.251±0.017 ^{a)}	1.182±0.374 ^{a)}
痛风宁组	10	0.757±0.079 ^{b)}	0.276±0.090 ^{b)}
益生菌组	10	0.636±0.125 ^{a) b)}	0.614±0.030 ^{a) b) c)}
别嘌呤组	10	0.491±0.013 ^{a) b) c)}	0.803±0.016 ^{a) b) c)}
别嘌呤+益生菌组	10	0.753±0.081 ^{b)}	0.389±0.155 ^{b)}

注：ABCG2，三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2；GLUT9，葡萄糖转运体 9。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与痛风宁组比较， $P<0.05$ 。



注：A，正常组；B，模型组；C，痛风宁组；D，益生菌组；E，别嘌呤组；F，别嘌呤+益生菌组；ABCG2，三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2；GLUT9，葡萄糖转运体 9。
图 1 各组小鼠小肠组织中 ABCG2、GLUT9 蛋白表达情况
Figure 1 Expression of ABCG2 and GLUT9 proteins in the small intestine tissues of the groups

2.6 各组小鼠小肠组织中 ABCG2、GLUT9 mRNA 表达比较

表 9 示，与正常组比较，模型组小鼠小肠组织中 ABCG2 mRNA 表达明显下降，痛风宁组、别嘌呤+益生菌组 ABCG2 mRNA 表达明显升高，模型组、

表 9 各组小鼠小肠组织中 ABCG2、GLUT9 mRNA 相对表达比较
Table 9 Comparison of the relative expression of ABCG2 and GLUT9 mRNA in the small intestine tissues of the groups (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ABCG2	GLUT9
正常组	10	1.077±0.046	1.015±0.141
模型组	10	0.586±0.095 ^{a)}	2.525±0.223 ^{a)}
痛风宁组	10	2.491±0.421 ^{a) b)}	1.255±0.179 ^{b)}
益生菌组	10	1.273±0.074 ^{a) b) c)}	1.666±0.093 ^{a) b) c)}
别嘌呤组	10	1.237±0.143 ^{b) c)}	1.871±0.158 ^{a) b) c)}
别嘌呤+益生菌组	10	2.082±0.391 ^{a) b)}	1.404±0.385 ^{a) b)}

注：ABCG2，三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2；GLUT9，葡萄糖转运体 9。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与痛风宁组比较， $P<0.05$ 。

益生菌组、别嘌醇组、别嘌醇+益生菌组 GLUT9 mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组小鼠小肠组织中 ABCG2 mRNA 表达升高, GLUT9 mRNA 表达下降 ($P<0.05$); 与痛风宁组比较, 益生菌组、别嘌醇组小鼠小肠组织中 ABCG2 mRNA 表达降低, GLUT9 mRNA 表达升高 ($P<0.05$), 别嘌醇+益生菌组小肠组织中 ABCG2、GLUT9 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

脾运化水谷精微营养全身, 运化水液, 调节水液代谢, 若脾虚失运则水湿不化、湿浊内生。HUA 患者以脾虚为本, 嗜食肥甘厚腻, 水液失于运化, 酿生湿浊。痛风宁是我们团队经多年临床实践总结出的效验方, 方中苍术、黄柏、川牛膝合为三妙丸, 具有健脾除湿清热排浊之功; 土茯苓清热除湿、通利关节, 《本草纲目》记载具有“健脾胃、止泄泻”等功效, 萆薢、泽泻、金钱草可清热除湿, 通利关节, 分清去浊; 丹参、肿节风、秦艽清热凉血, 通络止痛。诸药合用, 共奏健脾胃、利湿浊、清湿热之功, 标本兼治。本研究结果显示, 模型小鼠出现毛色无光泽甚至竖毛蓬松, 神态倦怠嗜睡, 蜷缩畏寒, 大便湿烂等脾虚表现, 脾虚证候积分升高。经过药物干预后, 痛风宁组、益生菌组、别嘌醇+益生菌组小鼠脾虚症状均得到改善, 而别嘌醇组小鼠脾虚症状无明显改善。以上表明肠道菌群紊乱得到纠正后, 模型小鼠的脾虚症状也能得到相应改善, 与既往研究结果^[9]一致。而痛风宁组小鼠脾虚症状改善最为明显, 证实了痛风宁健脾胃、利湿浊的功效。

肠道菌群是肠道中正常存在的微生物群体, 对于维持机体健康意义重大。既往研究显示, 尿酸与肠道菌群的改变密切相关^[18], 肠道菌群失调在 HUA 发生发展过程中扮演重要角色, 可以影响肠道嘌呤代谢、尿酸分解和排泄^[7-8]。双歧杆菌乳杆菌三联活菌片可直接补充机体正常细菌, 调整肠道菌群平衡, 抑制并清除肠道中对机体具有潜在危害的细菌^[19]。本研究结果显示, 经该益生菌片干预后模型小鼠血尿酸降低, 虽然效果不及痛风宁, 但验证了通过影响肠道菌群可对血尿酸起到调节作用, 纠正菌群紊乱可以降低模型小鼠血尿酸。

肠道菌群正常情况下丰度较高, 机体内益生菌、条件致病菌及病原菌的种类和数量较为稳定, 当机体出现病变时则会导致肠道菌群丰度降低, 原有的菌群结构紊乱^[6]。本研究结果显示, 模型组厚

壁菌门/拟杆菌门值较正常组升高, 经益生菌干预后模型小鼠肠道菌群厚壁菌门/拟杆菌门值降低, 与正常组比较差异无统计学意义, 紊乱得到了明显纠正, OTU 数目与正常组无明显差异, 拟杆菌门、厚壁菌门、副拟杆菌属、克雷伯菌属、肠球菌属各水平多种菌群丰度也与正常组无明显差异, 提示通过益生菌治疗, 可有效纠正小鼠肠道菌群紊乱。别嘌醇为黄嘌呤氧化酶抑制剂, 可抑制尿酸合成, 降低体内尿酸含量, 是临床治疗 HUA 的一线用药^[1], 在本实验中将其作为痛风宁降低血尿酸的阳性对照药物, 经其干预后也对纠正模型小鼠菌群紊乱起到一定积极作用, 侧面印证了尿酸代谢与肠道菌群的关联。值得注意的是, 痛风宁在改善小鼠肠道菌群方面的效果也十分显著, 与其他给药组比较其菌群丰度更接近正常, 可能是中药经口服后进入肠腔与肠道菌群接触, 其有效成分会对肠道菌群结构与代谢产生影响。但不排除痛风宁通过降低小鼠血尿酸, 继而影响肠道菌群, 其中的作用关系需要进一步探索。

肠道菌群可通过多种途径影响尿酸代谢。一方面肠道菌群自身可通过对尿酸的分解直接影响血尿酸水平, 如当肠道内益生菌 (如乳杆菌) 含量升高时, 可增加尿酸在肠道中的分解, 使得尿酸肠道清除率增加, 降低血尿酸水平^[20]; 另一方面, 肠道菌群自身可通过影响嘌呤代谢的关键酶而参与尿酸生成, 如大肠杆菌增多会促进肠上皮细胞 XOD 的释放, 催化更多的次黄嘌呤、黄嘌呤转化为尿酸^[8]。另外, 肠道菌群代谢产物短链脂肪酸如乙酸可促进腺嘌呤核苷三磷酸降解为腺嘌呤核苷酸, 进而增加嘌呤核酸降解, 最终导致尿酸生成增多^[21]。丁酸可促进肠上皮细胞的再生和修复, 进而上调肠上皮细胞中 ABCG2 表达, 促进血尿酸向肠腔内的分泌, 下调 GLUT9 表达, 减少肠道尿酸经肠黏膜的重吸收, 最终增加尿酸从肠道排泄, 降低血尿酸水平^[22]。本研究结果显示, 痛风宁干预后肠道拟杆菌门增多, 厚壁菌门减少, 菌群紊乱得到纠正, 肠道内有益菌 (乳杆菌等) 增多, 有害菌 (克雷伯菌等) 减少; 代谢产物乙酸减少、丁酸增多; 使小肠组织中 ADA、XOD 活性降低; ABCG2 表达上调、GLUT9 表达下调, 从而促进了尿酸肠道代谢。

综上所述, 小鼠肠道菌群紊乱与血尿酸升高关系密切, 调节小鼠肠道菌群紊乱可纠正其高尿酸状态, 降尿酸治疗可调整小鼠的菌群紊乱, 痛风宁可调控 HUA 脾虚湿盛证肠菌失调模型小鼠的肠道菌

群结构及丰度,降低模型小鼠的血尿酸水平,减轻脾虚证候。具体可能与以下原因相关:调整肠道内益生菌(乳杆菌等)与致病菌(克雷伯菌等)的丰度及菌群代谢产物乙酸、丁酸的生成;使小肠组织中 ADA、XOD 表达降低,减少肠道尿酸生成;上调肠上皮尿酸盐转运体 ABCG2、下调 GLUT9 表达,从而促进肠道尿酸排泄。

本研究发现痛风宁可降低血尿酸,减轻脾虚湿盛状态,调节肠道菌群,但是并未深入阐述痛风宁是如何通过调节某些肠道菌群及其分泌物进而影响到肠组织尿酸排泄的转运蛋白中涉及的分子机制,未来可进一步通过多组学联合,关键基因表达调控等手段来开展相关研究。

参考文献

- [1]中华医学会内分泌学分会. 中国高尿酸血症与痛风诊疗指南(2019)[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36(1): 1-13.
- [2]李雯燕,王文静,刘佳,等. 从“脾虚湿盛”论治痛风全程体会[J]. 中医临床研究, 2021, 13(2): 67-69.
- [3]刘芬芬,羊维,黄琳,等. 基于脾主运化理论探讨间歇期及慢性期痛风治疗策略[J]. 中医杂志, 2015, 56(6): 475-477.
- [4]苏友新,陈伟宏,陈凡,等. 痛风宁颗粒对 30 例慢性痛风性关节炎患者血尿酸、血沉、血脂及血流变的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2005, 13(1): 16-18.
- [5]苏友新,陈伟宏,陈凡,等. 痛风宁颗粒治疗慢性痛风性关节炎 30 例临床研究[J]. 福建中医学院学报, 2003, 13(3): 12-14.
- [6]金钊,徐明智. 肠道菌群与高尿酸血症及痛风的相关性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(8): 980-984.
- [7]BUSH KT, SINGH P, NIGAM SK. Gut-derived uremic toxin handling in vivo requires OAT-mediated tubular secretion in chronic kidney disease [J]. JCI Insight, 2020, 5(7): e133817.
- [8]CRANE JK. Role of host xanthine oxidase in infection due to enteropathogenic and Shiga-toxigenic Escherichia coli[J]. Gut Microbes, 2013, 4(5): 388-391.
- [9]闻向晖,刘秋萍,余怡然,等. 内湿致病与肠道菌群失调的关系[J]. 中医杂志, 2018, 59(16): 1377-1379.
- [10]张雅莉,吉燕华,姜瓊娜,等. 大小鼠脾虚及湿盛模型的研究[J]. 江西中医药, 2020, 51(5): 61-63.
- [11]朱祥祥,方颖莹,庞敏霞,等. 不同造模因素复制小鼠高尿酸血症模型的比较研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(2): 142-148.
- [12]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.
- [13]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.
- [14]曾奥,张华玲,谭周进,等. 小鼠菌群失调腹泻模型的建立及超微七味白术散的疗效[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1341-1348.
- [15]吴秉纯. 医学动物实验基础及基本技术方法[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社, 2008: 184.
- [16]HUANG B, GUI MX, AN HL, et al. Babao Dan alleviates gut immune and microbiota disorders while impacting the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway to attenuate 5-Fluorouracil-induced intestinal injury [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 166: 115387. doi: 10.1016/j.biopha. 2023. 115387.
- [17]HUANG B, GUI MX, NI ZN, et al. Chemotherapeutic drugs induce different gut microbiota disorder pattern and NOD/RIP2/NF- κ B signaling pathway activation that lead to different degrees of intestinal injury [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10: e0167722.
- [18]JACKSON MA, VERDI S, MAXAN ME, et al. Gut microbiota associations with common diseases and prescription medications in a population-based cohort[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2655. doi: 10.1038/s41467-018-05184-7.
- [19]谢建伟. 双歧杆菌三联活菌制剂治疗肠道菌群失调的效果及对免疫功能的影响探讨[J]. 中国实用医药, 2019, 14(26): 70-71.
- [20]SZULIŃSKA M, ŁONIEWSKI I, VAN HEMERT S, et al. Dose-dependent effects of multi species probiotic supplementation on the lipopolysaccharide (LPS) level and cardiometabolic profile in obese postmenopausal women: a 12-week randomized clinical trial [J]. Nutrients, 2018, 10(6): 773.
- [21]PUIG JG, FOX IH. Ethanol-induced activation of adenine nucleotide turnover. Evidence for a role of acetate [J]. J Clin Invest, 1984, 74(3): 936-941.
- [22]SHANG HX, SUN J, CHEN YQ. Clostridium butyricum CGMCC0313.1 modulates lipid profile, insulin resistance and colon homeostasis in obese mice [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0154373.

Effects of *Tongfengning* (痛风宁) on Intestinal Flora and Intestinal Uric Acid Metabolism in Model Mice of Hyperuricemia of Spleen Deficiency with Exuberance of Dampness Syndrome

ZHANG Yingjie¹, MAO Xiao², XIAO Yan³, CAI Tangyan⁴, GUO Jiemei¹, CHEN Peng¹, ZHANG Peng¹, LIU Jun¹, CHEN Yu¹, QIU Mengting³, SU Youxin¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122; 2. Zhoupu Community Health Service Center of Xihu District, Hangzhou, Zhejiang Province; 3. School of Rehabilitation Medicine, Fujian

University of Traditional Chinese Medicine; 4. Fujian Health College

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanisms of *Tongfengning* (痛风宁, TFN) in treating hyperuricemia (HUA) of spleen deficiency with exuberance of dampness syndrome. **Methods** Ten of 60 mice were randomly selected, and were fed with regular diet as the control group, while the remaining 50 mice were fed with high-fat and high-sugar diet combined with excessive exercise and potassium oxonate-allopurinol suspension to establish an HUA animal model of syndrome of spleen deficiency with exuberance of dampness. After the successful modeling, in order to better observe the effects of TFN on the intestinal microbiota of the model mice, a mixed antibiotic suspension was administered by gavage to induce further dysbiosis of the intestinal microbiota in the model mice. Fifty successfully modeled mice were randomly divided into model group, TFN group, allopurinol group, probiotics group, and an allopurinol + probiotics group, 10 in each group. The TFN group was administered TFN liquid at a dosage of 19.11 g/(kg·d) by gavage. The allopurinol group was administered allopurinol suspension at a dosage of 78 mg/(kg·d) by gavage. The probiotics group was administered live combined *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* tablets suspension at a dosage of 3 g/(kg·d) by gavage. The allopurinol + probiotics group was administered allopurinol at a dosage of 78 mg/(kg·d) and live combined *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* tablets suspension at a dosage of 3 g/(kg·d) by gavage. The control group and model group were administered normal saline at a dosage of 19.11 ml/(kg·d) by gavage. The interventions were continued for 21 days. In order to maintain a stable high blood uric acid state, all groups but the control group continued modeling while receiving drug intervention. The changes in spleen deficiency syndrome scores, blood uric acid levels, microbial community structure, acetic acid and butyric acid content in intestinal lavage fluid, adenosine deaminase (ADA) and xanthine oxidase (XOD) content in small intestine tissue, as well as ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2), glucose transporter 9 (GLUT9) protein and mRNA expression in the small intestine tissue were compared among the groups of mice. **Results** Compared with the control group, the model group showed increased spleen deficiency syndrome scores, blood uric acid levels, relative abundance of phylum Firmicutes, Firmicutes/Bacteroidetes ratio, abundance of *Bacteroides* genus, *Klebsiella* genus, and *Enterococcus* genus, acetic acid content in intestinal lavage fluid, ADA and XOD content in small intestine tissue, as well as GLUT9 protein and mRNA expression ($P < 0.05$). The number of operational taxonomic units (OTUs) of intestinal microbiota, relative abundance of Bacteroidetes phylum, abundance of *Lactobacillus* genus and uncultured *Bacteroides* genus, butyric acid content in intestinal lavage fluid, and ABCG2 protein and mRNA expression in small intestine tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, in the group treated with TFN, probiotics, and allopurinol + probiotics, the spleen deficiency syndrome score, blood uric acid level, relative abundance of Firmicutes, acetic acid content in intestinal lavage fluid, ADA and XOD content in small intestine tissue, GLUT9 protein and mRNA expression significantly decreased. The number of gut microbiota OTUs, relative abundance of proteobacteria, butyric acid content in intestinal lavage fluid, ABCG2 protein and mRNA expression in small intestine tissue significantly increased ($P < 0.05$). In the probiotics group, the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes decreased. In the TFN group, the abundance of *Lactobacillus* and uncultured Bacteroidetes significantly increased, while the abundance of Parabacteroides, *Klebsiella*, and *Enterococcus* significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the TFN group, allopurinol group and the probiotics group showed elevated blood uric acid levels, abundance of Bacteroidetes, ADA and XOD levels in intestinal tissue, and GLUT9 mRNA expression. The relative abundance of Firmicutes, abundance of lactobacilli, and ABCG2 mRNA expression significantly decreased. The probiotics group showed elevated GLUT9 protein expression in intestinal tissue. The probiotics group and the allopurinol plus probiotics group showed significantly higher scores for spleen deficiency syndrome in mice, and lower levels of butyric acid in mouse intestinal lavage fluid. The allopurinol group showed decreased numbers of OTUs in mouse intestinal flora, decreased abundance of proteobacteria, and butyric acid levels in intestinal lavage fluid. The allopurinol group also showed decreased ABCG2 protein expression in intestinal tissue, increased acetic acid levels in intestinal lavage fluid, increased abundance of *Klebsiella*, and significantly elevated GLUT9 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusions** The treatment of HUA with TFN may be associated with the regulation of intestinal probiotics (such as lactobacilli) and pathogenic bacteria (such as *Klebsiella*), as well as the production of bacterial metabolites such as acetic acid and butyric acid. It may also involve reducing the expression of ADA and XOD in the intestines, decreasing intestinal uric acid production, upregulating the expression of intestinal epithelial urate transporter ABCG2, downregulating GLUT9 expression, and promoting intestinal uric acid excretion. These factors are related to the syndrome of spleen deficiency with exuberance of dampness.

Keywords hyperuricemia; intestinal microbiota; uric acid metabolism; syndrome of spleen deficiency with exuberance of dampness; *Tongfengning* (痛风宁)

(收稿日期: 2023-04-06; 修回日期: 2023-09-04)

[编辑: 王利芬]