

以 hURAT1 为靶点的排尿酸药物体外细胞筛选模型的建立和应用

陈嘉盛, 吴 婷, 丘玉昌, 曹 莹, 庞建新*

(南方医科大学 药学院 广东省新药筛选重点实验室, 中国广东 广州 510515)

摘 要: 人尿酸盐阴离子转运体 1(human urate anion transporter 1, hURAT1)是人肾小管重吸收尿酸的主要转运蛋白,以 hURAT1 为靶点,筛选 hURAT1 抑制剂是近年来降尿酸药物开发的热点,因此建立 hURAT1 抑制剂体外细胞筛选模型具有重要的意义与实用价值。本实验首先构建了表达 *SLC22A12* (hURAT1 编码基因)的慢病毒载体,感染 MDCK 细胞后,通过 G418 筛选出稳转细胞株(稳转株);随后采用 Western-blot 及免疫荧光方法检测目的蛋白的表达,并通过液闪计数器检测 hURAT1 稳转株对^[14C]尿酸的摄取作用及 hURAT1 抑制剂苯溴马隆、丙磺舒对^[14C]尿酸摄取的抑制效果。实验结果显示,hURAT1 稳转株目的蛋白表达量为对照稳转株的两倍,并且吸收尿酸的量明显大于对照细胞($P>0.001$)。此外,实验中测得 hURAT1 稳转株对尿酸吸收的 K_m 值为 $365.4 \mu\text{mol/L}$,苯溴马隆及丙磺舒对尿酸吸收的 IC_{50} 分别为 $0.18 \mu\text{mol/L}$ 和 $66.82 \mu\text{mol/L}$ 。以上结果表明,本实验成功构建了稳定表达 hURAT1 的 MDCK 细胞株,并建立了一套 hURAT1 抑制剂体外准确筛选和评价的方法体系。

关键词: 人尿酸盐阴离子转运体 1;尿酸;慢病毒载体;MDCK 细胞模型;药物筛选与评价;同位素标记法;抑制剂

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2016)03-0248-07

A Cell Line Stably Expressing Lentivirus-mediated hURAT1 as an *In Vitro* Model of Screening Uricosuric Agents

CHEN Jia-sheng, WU Ting, QIU Yu-chang, CAO Ying, PANG Jian-xin*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Screening, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

Abstract: The human urate anion transporter (hURAT1) is thought to be an essential membrane protein that mediates the reabsorption of urate on the apical side of the proximal tubule. Screening hURAT1 inhibitors has become a hot research topic in recent years. Therefore, construction of an *in vitro* hURAT1 inhibitor screening model is of significance in developing new uricosuric agents. Here, lentivirus vectors carrying *SLC22A12* (hURAT1 coding gene) were constructed and then MDCK cells stably expressing hURAT1 (MDCK-URAT1) were established by lentivirus infection and G418 selection. The expression of hURAT1 in MDCK-URAT1 was validated by Western-blot and immunofluorescence. In addition, the ^[14C] uric acid uptake experiments were performed and the interactions of hURAT1 with benzbromarone and probenecid were examined. According to the results, a significant increase in not only hURAT1 expression but also uric acid uptake (with a K_m value of $365.4 \mu\text{mol/L}$) was shown in MDCK-URAT1 ($P>0.001$). The IC_{50} values of the inhibition by benzbromarone and probenecid were $0.18 \mu\text{mol/L}$ and $66.82 \mu\text{mol/L}$, respectively. In conclusion, a method for detecting the activity of hURAT1-targeting drugs *in vitro* was successfully established and would contribute to the development of uricosuric drugs.

Key words: human urate anion transporter 1 (hURAT1); uric acid; lentivirus vector; MDCK cell model; drug

收稿日期: 2015-12-21;修回日期: 2016-03-08

基金项目: 广东省科技计划项目(2014A020210013)

作者简介: 陈嘉盛(1990-),男,广东广州人,硕士研究生,主要从事降尿酸药物研究及新药评价;* 通讯作者: 庞建新(1965-),男,广东广州人,南方医科大学药学院教授,博士,主要从事抗肿瘤药理及新药评价研究, Tel: 020-61648673, E-mail: pjx@smu.edu.cn.

screening and evaluation; isotope labeling; inhibitor

高尿酸血症是人体内嘌呤代谢紊乱致使血液中尿酸增多而引起的一种代谢性疾病。近年来我国高尿酸血症的发病率不断升高,血液尿酸过高可引起痛风、关节组织纤维化甚至坏死、肾功能损伤以及心血管疾病等诸多疾病^[1]。目前临床上常用的降尿酸药物,如苯溴马隆、丙磺舒、别嘌醇等,在毒副作用或疗效方面各有缺点。因此,为进行促尿酸排泄化合物的早期筛选和开发新型降尿酸药物,构建降尿酸药物药效评价细胞模型尤为重要。

机体内,尿酸经肾小球滤过、肾小管重吸收、肾小管再分泌及分泌后重吸收4个过程排泄出体外^[2],而原尿中90%的尿酸被近曲小管S1段的人尿酸盐阴离子转运体1(human urate anion transporter 1, hURAT1, 编码基因 *SLC22A12*^[3])重吸收进入上皮细胞,继而重新进入血液循环^[4]。因此, hURAT1 作为降尿酸药物的靶点越来越受到重视^[5,6]。本实验主要针对以 hURAT1 为靶点的药物的开发,构建了一套检测结果精确,且稳定方便的化合物体外活性检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

MDCK 细胞株(美国 ATCC 公司); EZShuttle™-Gateway® PLUS-*SLC22A12* 穿梭质粒、pEZ-Lv151 载体质粒(广州复能基因有限公司); EZRecombinase™ LR Cloning Kit、Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit、Lenti-Pac™ HIV and FIV qRT-PCR Titration Kits、E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit(美国 Omega Bio-tek 公司); 限制性内切酶 *Spe I* 与 *Xmn I*(美国 NEB 公司); Goat anti-rabbit *SLC22A12* Antibody(美国 Santa Cruz 公司); GAPDH antibody Rabbit(广州晶欣生物科技有限公司); 羊抗兔 IgG-HRP、兔抗羊 IgG-HRP、脱脂奶粉、RIPA 裂解液、BSA(武汉博士德生物工程有限公司); 兔抗羊 IgG-FITC(美国 EarthOx 公司); Pierce™ BCA Protein Assay Kit、G418 Disulfate(美国 Thermo Fisher 公司); [¹⁴C] Uric acid(美国 ARC 公司); HI-SAFE II scintillant(美国 PerkinElmer Life 公司); 其余生化试剂购自美国 Sigma 公司与上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 主要仪器

多功能酶标仪(GENios Pro, 瑞士 TECAN 公

(*Life Science Research*, 2016, 20(3): 248~254)

司); 液体闪烁计数仪(TRI-CARB2900TR, 美国 PACKARD 公司); iQ5 Real Time PCR Detection System(美国 Bio-Rad 公司); 紫外-可见分光光度计(NanoDrop 8000, 美国 Thermo Fisher 公司); 荧光倒置显微镜(LH-M100CB-1, 日本 Nikon 公司)。

1.3 细胞培养

hURAT1 稳转细胞株(MDCK-hURAT1)与空载体稳转细胞株(MDCK-NEG)均在 5% CO₂、37 °C 的空气环境下使用含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素双抗溶液、0.3 g/L G418 的高糖 DMEM 培养液进行培养。野生型 MDCK 细胞和 293T 细胞的培养除培养基中不含 G418 外,其余培养条件同上。

1.4 表达 *SLC22A12* 基因慢病毒的构建

按 EZRecombinase™ LR Cloning Kit 说明书,将 EZShuttle™ Gateway PLUS-*SLC22A12* 穿梭质粒、pEZ-Lv151 载体质粒与 LR Recombinase Enzyme Mix 等试剂混合,25 °C 反应 60 min,反应产物转化大肠杆菌,挑取单克隆,摇菌后用 E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit 提取质粒 DNA 进行双酶切鉴定与测序。选取酶切及测序结果正确的质粒作为慢病毒表达质粒(hURAT1-Lv151)。根据 Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit 操作说明,将慢病毒表达质粒(含目的基因质粒或对照空载体质粒)与病毒包装质粒共转染 293T 细胞,培养 12 h 后更换完全培养基,48 h 后收集富含病毒颗粒的上清液,浓缩病毒液,并使用 Lenti-Pac™ HIV and FIV qRT-PCR Titration Kits 进行慢病毒滴度测定。

1.5 MDCK 细胞 G418 最低致死浓度的测定

将冻存的 MDCK 细胞复苏培养,传代 3 至 4 代使细胞达到良好的生长状态。将细胞以 5 000 cells/well 密度接种到 24 孔板,12 h 换液,每孔加入不同浓度 G418 (0.1 g/L、0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L、0.8 g/L、1.0 g/L、1.2 g/L) 的筛选培养基,隔天更换一次筛选培养基,培养 14 d,以造成细胞全部死亡的最低 G418 浓度作为后续实验筛选稳定细胞系的 G418 浓度。

1.6 MDCK 细胞的病毒感染、G418 筛选及镜下观察

将 MDCK 细胞接种到 6 孔板(板 1)中培养,另用一块 6 孔板(板 2)以相同细胞密度接种一孔用于第二天计数。各孔加入 2 mL DMEM 培养基(添加

5%热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液), 在5% CO₂条件下, 37 °C培养24 h后, 胰酶消化用于计数的孔内细胞并计数, 得到板1每孔细胞数。将板1中的细胞分为两组, 每3孔为一组, 各对应一种慢病毒, 按感染复数 (multiplicity of infection, MOI)=50将目的基因慢病毒和对照慢病毒分别加入到两组MDCK细胞中, 混匀后于37 °C、5% CO₂培养48 h。感染48 h后, 胰酶消化病毒感染过的细胞, 随后将各组中的3孔细胞合并收集, 转移至新的6孔板中培养, 其中每块新的6孔板留出一孔用于阴性对照(即不加G418培养)。根据MDCK细胞G418最低致死浓度测定的结果, 用含0.6 g/L G418的DMEM培养基(添加10%热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液)进行药筛培养。连续加药培养12天, 待细胞长满后, 使用光学显微镜观察稳转后的两种细胞的细胞形态, 并收取细胞样品进行RT-PCR及Western-blot检测。

1.7 稳转株蛋白表达的Western-blot检测

消化细胞, 1 000 r/min离心5 min收集细胞, 用1 mL预冷的1×PBS洗涤3次, 并进行细胞计数, 最后一次洗涤后尽量吸干PBS。按1 mL RI-PA/10⁷ cells加入细胞裂解液, 将细胞涡旋混匀, 冰上放置0.5 h, 每10 min漩涡振荡一次。超声破碎后, 13 000 g、4 °C离心10 min, 取上清, 使用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定样品总蛋白浓度。根据样品浓度与体积, 按比例加入5× loading buffer, 95 °C加热5 min, 选择10%的SDS-PAGE胶进行电泳。电压条件: 4%浓缩胶80 V, 10%分离胶120 V。使用半干转膜法, 在21 V电压下转膜40 min, 5%脱脂奶粉溶液封闭, 一抗(hURAT1一抗稀释比例1:100, GAPDH一抗稀释比例1:1 000)在4 °C条件下孵育过夜, TBST洗3次后用1:3 000稀释HRP标记的兔抗羊(hURAT1二抗)和羊抗兔(GAPDH二抗)酶标二抗于室温孵育2 h, TBST洗膜后用ECL显色。

1.8 稳转株蛋白表达的免疫荧光检测

分别将hURAT1稳转株及空载体稳转株细胞计数后培养于玻底培养皿, 待细胞生长至融合率约为80%后, 取出细胞, 用PBS洗3次, 每次5 min。4%多聚甲醇覆盖细胞, 室温静置15 min后用PBS洗3次, 每次5 min。1% BSA覆盖细胞, 37 °C孵育1 h后加入1% BSA稀释的一抗(稀释比例1:100), 4 °C孵育过夜, 37 °C复温1 h, 用PBS洗3次, 每次5 min。1% BSA稀释的二抗(稀释比例

1:50)覆盖细胞, 37 °C避光孵育30 min, 用PBS洗3次, 每次5 min。5 mg/L DAPI RT避光染色5 min, 用PBS洗3次, 每次5 min。最后加入PBS覆盖细胞, 使用荧光显微镜观察并在相同曝光条件下拍摄细胞照片。

1.9 hURAT1稳转株尿酸吸收功能及吸收特性检测

将hURAT1稳转株细胞或空载体稳转株细胞以1×10⁵ cells/well浓度接种到24孔板, 其中3孔细胞用于总蛋白测定。使用不含G418的完全培养基培养48 h后, 消化、收集用于总蛋白测定的3孔细胞进行蛋白含量测定, 其余孔细胞用于进行尿酸吸收实验, 具体操作如下。吸去孔内培养液, 每孔加入0.5 mL尿酸吸收缓冲液(葡萄糖酸钠125 mmol/L, 葡萄糖酸钾4.8 mmol/L, 葡萄糖酸钙1.3 mmol/L, 硫酸镁1.2 mmol/L, 磷酸二氢钾1.2 mmol/L, HEPES 25 mmol/L, 葡萄糖5.6 mmol/L, pH 7.4)^[7]洗两次, 随后每孔加入0.5 mL尿酸吸收缓冲液, 37 °C孵育10 min。吸去孔内液体, 加入0.2 mL含[¹⁴C]尿酸(尿酸吸收量效曲线测定使用的胞外尿酸终浓度为50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、500 μmol/L和1 000 μmol/L, 其余尿酸吸收实验使用的胞外尿酸终浓度均为25 μmol/L)与含或不含药物的尿酸吸收缓冲液(空白对照孔加入等体积缓冲液)开始进行尿酸吸收, 最终含药缓冲液中用于溶解药物的DMSO不超过0.2% (v/v)。吸收时间(尿酸吸收时效曲线测定所设的吸收时间为1 min、2 min、5 min、10 min和30 min, 其余尿酸吸收实验所设的吸收时间均为2 min)到达后, 迅速吸去孔内液体并用0.5 mL冰冷DPBS洗一次, 再用1 mL冰冷DPBS洗两次。每孔加入0.25 mL 0.1 mol/L NaOH以裂解细胞, 室温裂解20 min后吹匀孔内细胞裂解液, 转移至闪烁瓶, 各孔再用0.25 mL 0.1 mol/L NaOH洗两遍, 洗后液体并入闪烁瓶, 每个闪烁瓶加入4 mL闪烁液, 混匀后用液闪仪进行测定。

1.10 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。各组合计数资料采用频数或频率表示, 图表中正态分布的计量资料用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组合定量指标比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 含SLC22A12基因慢病毒的构建

首先对慢病毒表达质粒进行双酶切测定与测序,保证所构建质粒序列的正确性。根据限制性内切酶 *Spe* I 与 *Xmn* I 对慢病毒表达质粒的酶切结果(图 1)可知,本实验中的慢病毒表达质粒 hURAT1-Lv151 构建成功,而且测序结果也显示该质粒包含完整的 hURAT1 表达序列。随后运用上述表达质粒构建含 hURAT1 表达基因的慢病毒,经病毒滴度检测,目的基因慢病毒滴度为 3.24×10^7 TU/mL,对照慢病毒滴度为 1.01×10^8 TU/mL,滴度结果表明慢病毒滴度较高,适合用于感染细胞,其构建是成功的。

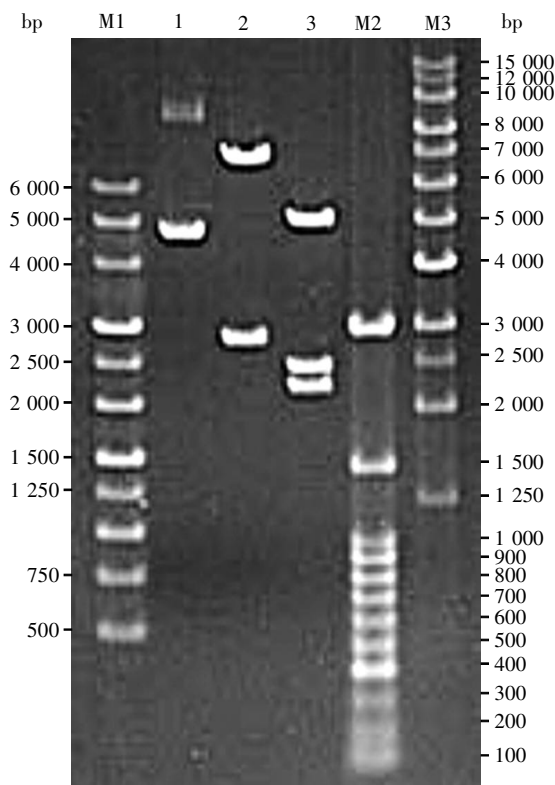


图 1 慢病毒质粒 hURAT1-Lv151 的酶切结果

M1、M2 和 M3 分别为 DNA Ladder 6 000、100 和 15 000; 1: 未酶切的 hURAT1-Lv151 质粒; 2: *Spe* I 对质粒的酶切结果,出现预期中的两条条带 (~7 028 bp/ 2 857 bp); 3: *Xmn* I 对质粒的酶切结果,出现预期中的 3 条条带 (~4 978 bp/ 2 596 bp/ 2 311 bp)。

Fig.1 Enzyme digestion results of hURAT1-Lv151 plasmid

Lane M1, M2, M3: DNA Ladder 6 000, 100, 15 000; Lane 1: hURAT1-Lv151 plasmid; Lane 2: Plasmid digested by *Spe* I, containing two expected bands (~7 028 bp/ 2 857 bp); Lane 3: Plasmid digested by *Xmn* I, containing three expected bands (~4 978 bp/ 2 596 bp/ 2 311 bp)。

2.2 hURAT1 稳转株及空载体稳转株的细胞形态

运用所构建的慢病毒感染普通 MDCK 细胞,经 0.6 g/L G418 筛选后,得到稳定转染细胞株。用

显微镜观察 hURAT1 稳转株 (MDCK-hURAT1) 及空载体稳转株 (MDCK-NEG) 细胞的外观形态(图 2),镜下观察结果显示两种细胞外观形态及生长状态均良好,两者无明显差异。

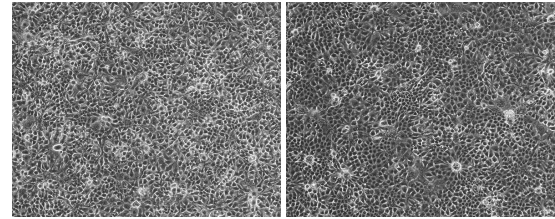


图 2 hURAT1 稳转株(左)与空载体稳转株(右)的显微镜观察($\times 100$)

Fig.2 Microscope photos of the MDCK-hURAT1 (left) and MDCK-NEG cells (right) ($\times 100$)

2.3 稳转株 hURAT1 表达的 Western-blot 检测结果

在表型观察结果的基础上,进一步运用 Western-blot 方法对稳转株中目的蛋白 hURAT1 的表达情况进行分析,最终显影结果如图 3 所示。结果显示 hURAT1 稳转株(MDCK-hURAT1)对应的 hURAT1 蛋白条带比空载体稳转株(MDCK-NEG)与野生株 MDCK 对应条带更加明显。进一步运用 ImageJ 软件对 Western-blot 结果进行灰度分析,结果如表 1 所示,目的基因稳转株细胞的 hURAT1 表达量相对于空载体稳转株提高了一倍,说明对 MDCK 细胞的改造成功使其过表达 hURAT1, hURAT1 稳转株的构建是成功的。

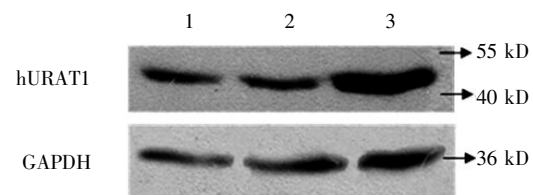


图 3 Western-blot 显影结果

1: MDCK 细胞; 2: MDCK-NEG 细胞; 3: MDCK-hURAT1 细胞。

Fig.3 Results of Western-blot

1: MDCK; 2: MDCK-NEG; 3: MDCK-hURAT1.

2.4 hURAT1 稳转株及空载体稳转株的免疫荧光结果

为进一步确定 hURAT1 稳转株目的蛋白的表达情况,本文又运用绿色免疫荧光标记对 hURAT1 蛋白的表达情况进行了分析。结果显示, hURAT1 稳转细胞株细胞膜上的绿色荧光明显强于空载体稳转细胞株(图 4)。结合 Western-blot 实验结果,进一步说明 MDCK-hURAT1 细胞株目的

表1 ImageJ 软件对 Western-blot 结果的分析
Table 1 Western-blot results analyzed by ImageJ software

Samples	GAPDH	hURAT1	hURAT1/GAPDH	MDCK-hURAT1/MDCK-NEG
MDCK-hURAT1	59 089	91 719	1.55	2.00
MDCK-NEG	50 286	39 013	0.77	1.00
MDCK	42 938	38 296	0.89	

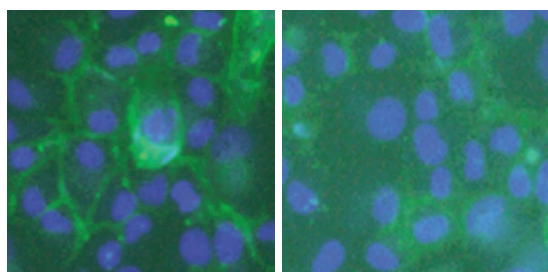


图4 hURAT1 稳转株(左)与空载体稳转株(右)细胞免疫荧光照片($\times 400$)

hURAT1 蛋白使用绿色荧光标记, 细胞核使用 DAPI 染色(蓝色), 两图均于同一曝光条件下拍摄, 其中绿色荧光曝光时间为 1.5 s, DAPI 曝光时间为 200 ms。

Fig.4 Immunolocalization of MDCK -hURAT1 (left) and MDCK-NEG (right) ($\times 400$)

The hURAT1 was labelled with green fluorescence and nuclei were counter stained using DAPI (blue). Both photos were taken under the same exposure conditions which were 1.5 s for green fluorescence and 200 ms for DAPI.

蛋白表达量明显高于 MDCK-NEG 细胞株。

2.5 稳转细胞株功能性检验结果

为考察 hURAT1 稳转株实际吸收尿酸的能力是否有提高, 通过与空载体稳转细胞株在同等条件下进行尿酸吸收, 检测 hURAT1 稳转细胞株吸收尿酸的能力。hURAT1 稳转细胞株与空载体稳转细胞株在 $25 \mu\text{mol/L}$ [^{14}C]尿酸下吸收 2 min 的尿酸吸收情况如图 5 所示, 结果表明稳转目的基因后的细胞株吸收尿酸的能力明显增强。

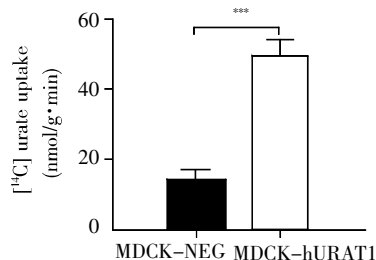


图5 稳转株 ^{14}C 尿酸吸收结果

hURAT1 稳转株与空载体稳转株在 $25 \mu\text{mol/L}$ [^{14}C]尿酸下吸收 2 min 的吸收结果($n=6$); $***P<0.001$ 。

Fig.5 [^{14}C] urate uptake of stably transfected MDCK cell lines

Uptake of $25 \mu\text{mol/L}$ [^{14}C] urate for 2 min in MDCK-hURAT1 and MDCK-NEG cells ($n=6$); $***P<0.001$ 。

2.6 hURAT1 稳转株吸收尿酸时效及量效关系的测定结果

为了考察 hURAT1 稳转株尿酸吸收的特点, 对其尿酸吸收的时效曲线及量效曲线进行了测定。其吸收尿酸的时效及量效关系如图 6A、B 所示, 结果显示 hURAT1 稳转株细胞吸收尿酸的速率从 5 min 后开始明显减缓, 随着 [^{14}C]尿酸浓度的增加, 细胞对尿酸的吸收速率逐渐下降并趋于饱和。此外, 通过对数据进行 Eadie-Hofstee 作图(图 6C), 得出 hURAT1 对尿酸的亲合力大小 K_m 值为 $365.4 \mu\text{mol/L}$ 。

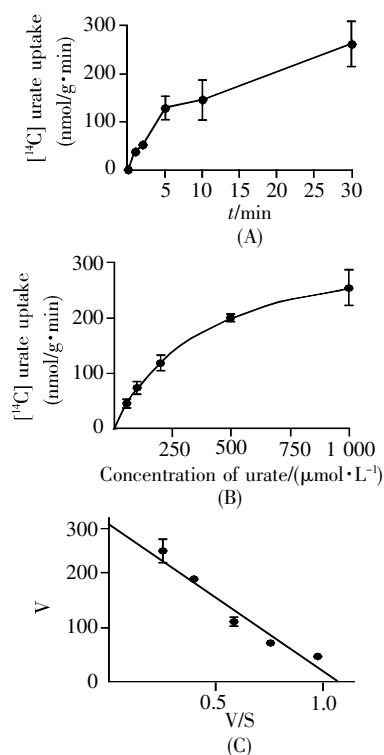


图6 hURAT1 稳转株对 ^{14}C 尿酸的吸收特性($n=6$)

(A) $25 \mu\text{mol/L}$ [^{14}C]尿酸吸收的时效关系;(B) 2 min 内 [^{14}C]尿酸吸收的量效关系;(C) Eadie-Hofstee 图。

Fig.6 [^{14}C] urate uptake characterizations of MDCK-hURAT1 ($n=6$)

(A) Time course of $25 \mu\text{mol/L}$ [^{14}C] urate uptake; (B) Concentration-dependent uptake of [^{14}C] uric acid for 2 min in MDCK-hURAT1 cells; (C) Eadie-Hofstee plot.

2.7 阳性抑制药对 hURAT1 稳转株尿酸吸收的抑制结果

运用构建的 hURAT1 稳转细胞株对 URAT1 抑制剂苯溴马隆及丙磺舒的药效进行测定, 其结果如图 7 所示。实验结果显示, 随着药物浓度的

增加,细胞对 $[^{14}\text{C}]$ 尿酸的吸收逐渐减少。根据实验结果计算出苯溴马隆的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $0.18 \mu\text{mol/L}$, 丙磺舒的 IC_{50} 为 $66.82 \mu\text{mol/L}$, 两药药效差异与文献报道的结果接近^[8,9], 说明本实验体系能准确地评价化合物对 URAT1 的抑制效果。

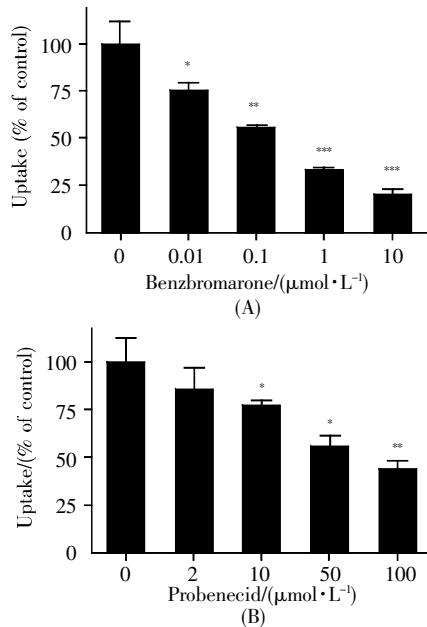


图7 阳性抑制药对 hURAT1 稳转株尿酸吸收的抑制结果

在尿酸浓度为 $25 \mu\text{mol/L}$, 吸收时间为 2 min 的条件下, 苯溴马隆(A)与丙磺舒(B)对 hURAT1 稳转株 $[^{14}\text{C}]$ 尿酸吸收的抑制效果($n=6$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组相比。

Fig.7 Inhibition of urate uptake in MDCK-hURAT1 by positive inhibitor

Concentration-dependent inhibition of $25 \mu\text{mol/L}$ $[^{14}\text{C}]$ uric acid uptake in MDCK-hURAT1 cells by benzbromarone (A) and probenecid (B) for 2 min ($n=6$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, compared with the control group.

3 讨论

高尿酸血症是继高血脂、高血糖之后又一高发发病率的代谢性疾病^[10], 中国成人高尿酸血症发病率为 12%。高尿酸血症被认为是痛风的标志, 统计结果显示约有 5%~12% 的高尿酸血症最终可发展为痛风^[11]。高尿酸血症除了引起痛风外, 也是高血压、心血管疾病、糖尿病和肾脏病变的高危因素^[12,13]。90% 的原发性高尿酸血症是由于肾脏尿酸清除过低引起的^[14]。尿酸的清除除少部分经小肠排泄外, 主要通过肾小管重吸收和分泌控制^[15], 其中, 重吸收是维持血中尿酸浓度的主要因素。hURAT1 是肾小管上皮细胞最主要的尿酸重吸收转运体, 其通过与多种单价的有机阴离子和少数的无机阴离子交换完成对尿酸的重吸收, 主要参

与尿酸在近端小管的重吸收。研究表明, 抑制 hURAT1 将大大减少尿酸重吸收而促进尿酸排泄^[16], 因而 hURAT1 抑制剂又被称为促尿酸排泄药。由于 hURAT1 强大的尿酸重吸收能力, 以其作为靶点开发新型降尿酸药物成为新药开发的热点。2015 年 FDA 批准了新的 hURAT1 特异抑制剂 Lesinurad 用于临床降尿酸, 该药物被认为是近几十年来唯一新开发的促尿酸排泄药^[17]。

尽管国内高尿酸血症发病率高, 但能有效用于降尿酸的药物种类极少, 尤其是促尿酸排泄药。目前国内临床使用的排尿酸效果较明显的有苯溴马隆, 但其毒副作用大, 可引起严重的肝脏毒性, 尤其是暴发性肝炎^[18], 一直没被美国 FDA 批准上市, 欧洲曾经也一度叫停, 但由于实在没有更有效的药物, 部分国家(包括我国)还在使用^[19]。因此, 开发新的促尿酸排泄药尤为紧迫。当前国内研究甚至筛选排尿酸新化合物最常用的是动物模型, 但由于动物实验周期较长, 使用药物量大, 操作繁琐, 且作用靶点不明确, 并不适合大规模化合物活性筛选。因此, 构建 hURAT1 抑制剂体外细胞筛选模型对研发新的促尿酸排泄药有重要的应用价值。

本实验选用贴壁性强、生长速度快的 MDCK 细胞构建细胞模型, 避免了细胞在进行吸收实验时经多次洗涤后容易掉落的问题, 保证了实验结果的准确性与操作方便性, 同时由于 MDCK 细胞具有形成单层致密细胞层的特性^[20], 亦可运用于 Transwell 模型的实验^[9]。虽然国外有文献报道使用脂质体转染 MDCK 细胞并构建稳转细胞系^[8], 但由于常见的脂质体转染方法对 MDCK 细胞的转染率较低, 且转染后的细胞蛋白表达稳定性较差, 所以本实验选用效果更好的慢病毒感染方式, 其能高效地使目的基因(*SLC22A12*)经过反转录整合到细胞基因组, 从而使 MDCK 细胞稳定、高水平地表达 hURAT1 蛋白(图 3、图 4)。在 Western-blot 检测结果中, 空载体稳转株与野生型 MDCK 细胞处也可见少量的 hURAT1 蛋白表达条带(图 3); 同时稳转空载体的 MDCK 细胞的免疫荧光照片中也有少量绿色荧光(图 4), 这主要是由于 MDCK 来源于犬的肾小管上皮细胞, 能表达犬的 URAT1, 与 hURAT1 同源性高, 可能存在共同的抗原决定簇。有研究显示 Cl^- 会降低 hURAT1 对尿酸的吸收^[21], 因此本实验采用不含 Cl^- 的缓冲体系进行 hURAT1 稳转细胞株的尿酸吸收考察实验, 这

样能更好地反映化合物对 hURAT1 的抑制效果。研究中通过对体外培养的 hURAT1 稳转细胞株与空载体稳转细胞株进行表型观察及功能检测发现, 虽然两种细胞外观形态及生长状态均相似(图 2), 但在转运尿酸的能力方面, 稳转 hURAT1 细胞比对照细胞高出 1 倍以上(图 5)。

在细胞内尿酸含量检测方面, 由于细胞内尿酸含量极低 (pmol 级), 即使是目前灵敏度较高的尿酸检测试剂盒(如 Sigma 公司货号为 MARK077 与 Life technologies 公司货号为 A22181 的尿酸检测试剂盒), 也由于其最低定量限的限制, 并不能准确地检测胞内尿酸水平, 更难以准确评价给药后胞内尿酸含量水平的细微变化。本课题组前期应用这些尿酸检测试剂盒开展的大量实验也证明了这一点, 同时也没有查到使用试剂盒检测培养细胞胞内尿酸的相关国外文献。因此, 本研究采用 ^{14}C 标记尿酸进行实验, 使用同位素标记法进行检测, 其灵敏度及准确性明显高于其他尿酸检测方法, 这也可能是目前唯一可行的检测方法。实验中通过尿酸吸收的时效及量效曲线的测定, 对所构建细胞株及整个方法体系的最佳实验条件进行了摸索, 得出细胞尿酸吸收实验的最佳吸收时间为 2 min, hURAT1 对尿酸吸收的 K_m 值为 $365.4 \mu\text{mol/L}$ (图 6)。此外, 阳性药活性测定结果(图 7) 也表明本方法所得出的化合物对 hURAT1 的抑制活性数据具有可信性与准确性。

总之, 本实验在国内首次使用慢病毒感染的方式构建了稳定表达 hURAT1 的 MDCK 细胞株, 并测定了该细胞株对 ^{14}C 尿酸的吸收特性, 开发了一套以 hURAT1 为靶点、MDCK 细胞为载体、同位素标记法为检测策略的降尿酸化合物体外活性检测方法体系, 其结果准确可靠, 为降尿酸药物的开发提供了切实可行的评价方法和研究思路。

参考文献(References):

- [1] CHANG H Y, TUNG C W, LEE P H, *et al.* Hyperuricemia as an independent risk factor of chronic kidney disease in middle-aged and elderly population[J]. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2010, 339(6): 509–515.
- [2] RICHELTE P, BARDIN T. Gout[J]. *The Lancet*, 2010, 375(9711): 318–328.
- [3] ENOMOTO A, NIWA T, KANAI Y, *et al.* Urate transporter and renal hypouricemia[J]. *The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 2003, 51(9): 892–897.
- [4] 张蓓, 孙玉萍, 姚华. hURAT1, SLC2A9, ABCG2 与高尿酸血症、痛风的关系及临床意义[J]. *医学综述*(ZHANG Bei, SUN Yu-ping, YAO Hua. The relationship of hURAT1, SLC2A9 and ABCG2 with hyperuricemia and gout and the clinical significance[J]. *Medical Recapitulate*), 2013, 19(2): 216–218.
- [5] ICHIDA K, HOSOYAMADA M, HISATOMI I, *et al.* Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan—influence of URAT1 gene on urinary urate excretion[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004, 15(1): 164–173.
- [6] MATSUO H, NAKAYAMA A, SAKIYAMA M, *et al.* ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 3755.
- [7] YU Z F, FONG W P, CHENG C H K. Morin (3, 5, 7, 2', 4'-pentahydroxyflavone) exhibits potent inhibitory actions on urate transport by the human urate anion transporter (hURAT1) expressed in human embryonic kidney cells[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, 35(6): 981–986.
- [8] SHIN H J, TAKEDA M, ENOMOTO A, *et al.* Interactions of urate transporter URAT1 in human kidney with uricosuric drugs[J]. *Nephrology*, 2011, 16(2): 156–162.
- [9] NAKANISHI T, OHYA K, SHIMADA S, *et al.* Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATV1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2013, 28(3): 603–611.
- [10] SMITH E U R, DIAZ-TORNE C, PRERZ-RUIZ F, *et al.* Epidemiology of gout: an update[J]. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2010, 24(6): 811–827.
- [11] WORTMANN R L. Gout and hyperuricemia[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2002, 14(3): 281–286.
- [12] STRASAK A M, KELLEHER C C, BRANT L J, *et al.* Serum uric acid is an independent predictor for all major forms of cardiovascular death in 28,613 elderly women: a prospective 21-year follow-up study[J]. *International Journal of Cardiology*, 2008, 125(2): 232–239.
- [13] KAWASHIMA M, WADA K, OHTA H, *et al.* Association between asymptomatic hyperuricemia and new-onset chronic kidney disease in Japanese male workers: a long-term retrospective cohort study[J]. *BioMed Central Nephrology*, 2011, 12: 31.
- [14] 陈颖, 李长贵, 苗志敏. 原发性高尿酸血症发病机制的研究进展[J]. *国际遗传学杂志*(CHEN Ying, LI Chang-gui, MIAO Zhi-min. Pathogenesis of primary hyperuricemia[J]. *International Journal of Genetics*), 2006, 29(1): 59–61.
- [15] WU X, MUZYNY D M, LEE C C, *et al.* Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1992, 34(1): 78–84.
- [16] HEDIGER M A. Physiology and biochemistry of uric acid[J]. *Revue Therapeutische Umschau*, 2004, 61(9): 541–545.
- [17] DIAZ-TORNE C, PEREZ-HERRERO N, PEREZ-RUIZ F. New medications in development for the treatment of hyperuricemia of gout[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2015, 27(2): 164–169.
- [18] JANSEN T L, REINDERS M K, VAN ROON E N, *et al.* Benzbromarone withdrawn from the European market: another case of “absence of evidence is evidence of absence”?[J]. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2004, 22(5): 651–651.
- [19] BACH M H, SIMKIN P A. Uricosuric drugs: the once and future therapy for hyperuricemia?[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2014, 26(2): 169–175.
- [20] IRVINE J D, TAKAHASHI L, LOCKHART K, *et al.* MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999, 88(1): 28–33.
- [21] ENOMOTO A, KIMURA H, CHAIROUNGDU A, *et al.* Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels[J]. *Nature*, 2002, 417(6887): 447–452.