

SUI Xiukun, GUO Zhifeng, ZHANG Hongyu, WANG Hailong, WU Feng, YANG Chao, GUO Yaxiu, MA Ting, LI Yinghui, DAI Zhongquan. Effect of Prolonged Fasting on Uric Acid Metabolism and Its Regulation Mechanism (in Chinese). *Chinese Journal of Space Science*, 2023, **43**(2): 310–320. DOI:10.11728/cjss2023.02.220225021

长期禁食对尿酸代谢的影响及其调控机制探讨*

隋修锟^{1,2,3} 郭志峰² 张洪玉² 王海龙²
吴峰² 杨超² 郭雅秀²
马婷¹ 李莹辉² 戴钟铨²

1(哈尔滨工业大学(深圳)电子与信息工程学院 深圳 518055)

2(中国航天员科研训练中心 航天医学基础与应用国家重点实验室 北京 100094)

3(深圳市绿航星际太空科技研究院 深圳 518003)

摘要 为研究长期禁食过程中大鼠尿酸代谢的变化及其潜在的调控机制,以 Sprague-Dawley (SD) 大鼠为动物模型,通过病理组织切片、生化检测、荧光定量 PCR (qRT-PCR) 以及蛋白免疫印迹 (Western blotting) 等方法分析不同禁食时间 (1, 2, 3, 5, 7 天) 大鼠尿酸水平及其代谢相关基因和蛋白的表达变化。结果表明,长期禁食未对大鼠肾脏组织产生明显的损伤,引起了血尿酸水平上升、尿酸水平波动性变化和血液尿酸酶活性升高;随着禁食时间的延长,主要尿酸转运蛋白的 mRNA 和蛋白表达水平逐渐上调。长期禁食过程中大鼠尿酸代谢变化可能与尿酸转运蛋白及尿酸酶活性有关。

关键词 长期禁食, 尿酸代谢, 调控机制, 低代谢

中图分类号 V524

Effect of Prolonged Fasting on Uric Acid Metabolism and Its Regulation Mechanism

SUI Xiukun^{1,2,3} GUO Zhifeng² ZHANG Hongyu² WANG Hailong²
WU Feng² YANG Chao² GUO Yaxiu² MA Ting¹
LI Yinghui² DAI Zhongquan²

1(Department of Electronic and Information Engineering, Harbin Institute of Technology, Shenzhen 518055)

2(State Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application,
China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094)

* 深圳市科创委基础研究项目 (JCYJ20200109110630285), 中国航天员科研训练中心航天医学基础与应用国家重点实验室项目 (SMFA17A02, SMFA18B02, SMFA18B06, SMFA19A01, SMFA19C03) 和飞天基金项目 (2022SY54B0506) 共同资助

2022-02-25 收到原稿, 2022-10-21 收到修定稿

E-mail: 7suixiukun@163.com; daizhq77@163.com

©The Author(s) 2023. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

3(Space Science and Technology Institute (Shenzhen), Shenzhen 518003)

Abstract To investigate the changes of uric acid metabolism in rats during prolonged fasting and its potential regulatory mechanism. Sprague-Dawley (SD) rats were used as animal models. The changes of uric acid level and metabolism-related gene and protein expression in rats during different fasting periods (1, 2, 3, 5, and 7 days) were analyzed by pathological tissue sections, biochemical tests, quantitative PCR (qRT-PCR), and western blotting. The results showed that prolonged fasting did not cause significant damage to kidney tissue, but remarkably increased the blood uric acid level and blood uricase activity. It also resulted in fluctuating changes in urine uric acid level. The mRNA and protein expression levels of main uric acid transporters were increased gradually with the fasting duration. The elevation of serum uric acid caused by prolonged fasting is related to uric acid transporter and uricase activity.

Key words Prolonged fasting, Uric acid metabolism, Regulatory mechanism, Hypometabolism

0 引言

低代谢调节是面向未来长期载人空间飞行的人体潜能开发技术,是控制长期飞行载荷、维护航天员健康和应对各种应急状况的有效手段^[1]。众多研究表明,科学禁食可以有效地防治肥胖、糖尿病等现代慢性代谢疾病,改善机体能量代谢,提高免疫力等^[2,3]。长期禁食过程中伴随着机体多种适应性变化,包括能量供应底物由葡萄糖转换为酮体,从而形成能量代谢新稳态,以及机体静息能量代谢率下降^[4,5]。这使得禁食被认为是研究空间低代谢调节技术的重要模式之一,具有应用于未来载人星际航行的潜能。

尿酸(Uric Acid, UA)是机体内和食物中嘌呤核苷酸的最终代谢产物,其主要在肝脏中生成,并由肾脏(65%~75%)和肠道(25%~35%)排泄^[6]。正常人体每日尿酸生成和排出处于动态平衡。禁食过程中,由于体内合成代谢下降、能量代谢底物转换,细胞自噬增强等因素,引起尿酸代谢异常,使得尿酸水平升高^[7-9]。当血尿酸浓度在超饱和状态时($>420 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),血液中的尿酸可以刺激肾小管内尿酸盐结晶的析出,并在关节、软骨、结缔组织、肾间质等组织部位沉积,增大了痛风等疾病的发生风险^[10]。也有研究表明,尿酸是一种具有比抗坏血酸更强的抗氧化能力的水溶性抗氧化剂,能够清除人体中超过 60% 的自由基,防止细胞溶解凋亡^[11,12]。此外,尿酸还会刺激机体的免疫系统,诱发机体产生免疫应答^[13]。因此,尿酸具有双重作用。长期高尿酸与人类多种疾病发生密切相

关,又对某些器官和组织起保护作用,然而禁食过程中尿酸代谢变化及其作用机制尚不完全清楚。

尿酸主要以尿酸盐的形式存在,大多数动物的尿酸可经尿酸酶转化成溶解度较高的尿囊素等物质排出体外,而人缺乏尿酸酶,尿酸就成为嘌呤类物质在机体代谢的终产物^[14]。正常情况下,尿酸的排泄由肾小球的滤过、近端小管的重新收、分泌及分泌后再吸收等过程调节^[15]。尿酸经肾脏转运需要依赖肾小管上皮细胞刷状缘侧(管腔膜)和基底外侧膜上固定的转运蛋白。除了滤过不需要转运蛋白参与外,其余尿酸代谢过程均需要尿酸转运蛋白发挥作用。尿酸转运蛋白主要分为两类:尿酸重吸收转运蛋白和尿酸排泄转运蛋白^[16]。尿酸重吸收转运蛋白主要包括尿酸阴离子转运蛋白 1(URAT1)和葡萄糖转运蛋白 9(GLUT9)。尿酸排泄转运蛋白主要包括尿酸转运蛋白的吸收和尿酸转运蛋白的排泄。尿酸转运蛋白从肾小管细胞的吸收主要由 OAT1 和 OAT3 完成,尿酸从肾小管细胞向其管腔的排泄主要通过尿酸盐转运蛋白(UAT)、耐多药蛋白 4(Mrp4/ABCC4)和磷酸盐转运蛋白(NPT1)完成。各种尿酸转运蛋白的功能状态在一定程度上影响体内尿酸的变化。尿酸代谢是一个复杂的过程,目前对禁食过程中体内尿酸水平升高与尿酸代谢之间的联系研究尚少。

因此,为了研究长期禁食对大鼠尿酸代谢及其调控途径的影响,以 SD 大鼠为动物模型,通过分析不同禁食时间(1, 2, 3, 5, 7 天)大鼠尿酸水平及其代谢相关基因和蛋白的表达变化,阐明长期禁食过程大鼠尿酸

的变化及其代谢调节机制。本研究可为长期禁食安全性提供数据支撑,也将为长期禁食低代谢调节技术的深入研究提供保障。

1 研究方法

1.1 实验动物

6~8 周龄清洁级 SD 雄性大鼠 36 只,体重 170~190 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(动物质量合格证号:110011210100824578),饲养在中国航天员科研训练中心实验动物房。环境适应期间,每 6 只大鼠饲养于一个笼中(545 mm×395 mm×20 mm),饲以标准鼠料,自由进食和饮水。室内温度为(26±1)℃,光照 12 L:12 D,湿度为 40%~60%。本研究得到了中国航天员科研训练中心动物伦理与实验安全委员会的批准(ACC-IACUC-2021-030),所有程序均按照动物伦理委员会的规定进行,实验过程按照实验动物的使用 3 R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂

10% 水合氯醛、4% 多聚甲醛、DEPC 处理水(北京索莱宝科技有限公司),Trizol (Invitrogen), PrimeScript RT Reagent Kit 和 TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa),硝酸纤维素膜、化学发光试剂(Merck millipore),大鼠尿囊素(Allantoin)ELISA 检测试剂盒、大鼠尿酸酶(Uricase)ELISA 检测试剂盒(上海江莱生物科技有限公司),RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、BCA 蛋白定量试剂盒(江苏康为世纪生物科技股份有限公司), β -actin 兔单克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔二抗(CST),URAT1 兔多克隆抗体、GLUT9 兔多克隆抗体(Proteintech),UAT 兔多克隆抗体(Immuno way biotechnology)。

1.3 主要仪器

石蜡组织切片机(LEICA RM2016,上海徕卡仪器有限公司),显微镜(Eclipse Ci-E,尼康),LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪、Cobas c501 生化分析仪(罗氏),Tanon 5200 全自动化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司),大鼠代谢笼(ZH-B6,安徽正华生物仪器设备有限公司),-80℃ 超低温冰箱(Thermo)。

1.4 实验动物分组

动物适应性饲养 1 周后,将 36 只大鼠随机分为

正常对照组和不同时长的禁食组(禁食 1, 2, 3, 5, 7 天),每组 6 只,禁食开始后将大鼠分别置于单独的代谢笼中,禁食实验于当日上午 9 点统一开始,禁食组禁食不禁水,对照组自由采食标准饲料和饮水。

1.5 样本收集

在各组大鼠的禁食实验结束后,腹腔注射 10% 水合氯醛(0.1 mL/10 g)麻醉,心脏取血,4℃ 静置 1 h,3000 r·min⁻¹ 离心 30 min,将分离出的血清分装入洁净的 1.5 mL 离心管中,置于-80℃ 低温冰箱内保存。冰台上剖腹快速分离大鼠肾脏组织,左肾放入 4% 多聚甲醛中固定,右肾装入冻存管中,置于液氮中冷冻,用于后续苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色和蛋白免疫印迹检测;收集各组代谢笼中大鼠尿液,分装至清洁的 1.5 mL 离心管中,置于-80℃ 低温冰箱内保存。

1.6 生化指标检测

取上述血清及尿液样本,利用罗氏 Cobas c501 自动生化分析仪及配套检测试剂,检测大鼠血清中的血尿酸、血肌酐、尿素及尿尿酸;使用大鼠尿囊素酶联免疫吸附测定试剂盒和大鼠尿酸酶酶联免疫吸附测定试剂盒,检测各组大鼠尿液尿囊素水平和血清尿酸酶浓度。按照试剂盒说明书操作,采用酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度(Optical Density, OD)值。

1.7 肾脏组织病理学分析

取 4% 多聚甲醛固定 24 h 的左肾,常规石蜡包埋,厚度 4 μ m 切片,HE 染色后,光学显微镜下观察各组大鼠肾脏组织形态学变化。HE 染色切片评估肾脏组织病理学变化,按照不同病理损伤程度对其评分,其中 0, 1, 2, 3, 4 和 5 分别表示正常、病变非常少、病变非常轻微、病变轻微、病变中等和严重的组织学病变,评估基于肾脏组织发生的主要病理学变化(即炎症细胞浸润、肾小管上皮细胞脱落水肿、扩张和肾小球肿胀萎缩硬化坏死)。

1.8 荧光定量 PCR

取 100 mg 大鼠肾脏组织,加入 1 mL Trizol 试剂,按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,取 1 μ g RNA 进行反转录扩增制备 cDNA,然后取 2 μ L 反转录产物进行荧光定量 PCR 检测。通过 NCBI(美国国立生物技术信息中心)的 GenBank 数据库检索大鼠全基因序列并进行引物设计,选用 β -actin 作为内参。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成,引物

序列如下。GLUT9 上游引物 5'-GCTTGCCCTAG-CTTCCCTGA-3', 下游引物 5'-AGGAAGGAGGAC-CCGAAGG-3', PCR 产物长度为 159 bp。OAT1 上游引物 5'-TCAGCAAAGATGGAGGTCTGG-3', 下游引物 5'-TAAAGCGGAGGCAAGATTCG-3', PCR 产物长度为 75 bp。URAT1 上游引物 5'-TGAGGATGGCTGGGTTTACG-3', 下游引物 5'-CCAGCC-AGGAAGATGGACTG-3', PCR 产物长度为 117 bp。Mrp4 上游引物 5'-GGTTGTCAGAACCTGAGGGG-3', 下游引物 5'-AAGGGTCCAGGTTCTTCC-T-3', PCR 产物长度为 145 bp。NPT1 上游引物 5'-CCTTGGAACGAGGCAGACTT-3', 下游引物 5'-CATGGGCCAACCCAGAAGAT-3', PCR 产物长度为 110 bp。UAT 上游引物 5'-ATCAACTTCCAGACTCAGGGC-3', 下游引物 5'-AACCCATTTGGGATGCTGGT-3', PCR 产物长度为 176 bp。 β -actin 上游引物 5'-AGATGACCCAGATCATGTTTGAGA-3', 下游引物 5'-ATGGCATGAGGGAGCGCGTAA-3', PCR 产物长度为 172 bp。qRT-PCR 的反应总体积为 20 μ L。其中, TB Green Premix Ex Taq 10 μ L, 上游引物 0.8 μ L, 下游引物 0.8 μ L, ddH₂O 3.4 μ L, cDNA 模板 5 μ L。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。通过所测靶基因和内参基因的 C_t 值, 根据公式 $\Delta\Delta C_t = (\text{待测组目的基因平均 } C_t \text{ 值} - \text{待测组内参基因平均 } C_t \text{ 值}) - (\text{对照组目的基因平均 } C_t \text{ 值} - \text{对照组内参基因平均 } C_t \text{ 值})$, 计算相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.9 蛋白免疫印迹

取 50 mg 大鼠肾组织, 加入含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液提取蛋白, 混合匀浆, 置于冰上孵育 20 min, 4 $^{\circ}$ C 12000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 20 min, 取上清, 采用 BCA 法进行蛋白定量, 具体方法参照试剂盒说明书。取 100 μ g 蛋白样品, 加入蛋白上样缓冲液, 120 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 蛋白变性后, 经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 浓缩胶电泳电压为 80 V, 分离胶电泳电压为 120 V, 电泳结束后采用湿转法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 加入 5% 脱脂奶粉于室温封闭 1 h, 分别加入 GLUT9, UAT, URAT1 和 β -actin 抗体 (1:1000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:3000), 室

温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。采用 ECL 化学发光法显色并观察结果, 利用 Image J 软件处理系统分析目标条带的灰度值。

1.10 统计学分析

使用 GraphPad 8.0 软件进行统计学分析, 数据资料均采用均数 $\pm$ 标准差表示, 各组数据符合正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果分析

2.1 长期禁食对大鼠肾脏功能的影响

2.1.1 肾组织 HE 染色

HE 染色结果显示: 光镜下未禁食对照组大鼠肾组织结构正常, 肾小管上皮细胞无水肿, 排列整齐, 肾小球大小均匀, 肾间质无炎症细胞浸润, 肾小管均结构完整, 无特殊病理改变; 相比于未禁食对照组 (见图 1a), 禁食 1 天组、禁食 2 天组及禁食 3 天组的肾脏组织结构正常, 未见明显病变 (见图 1b~d)。禁食 5 天组整体肾组织结构正常, 仅部分肾小管出现扩张, 上皮细胞出现轻微的疏松水肿脱落 (见图 1e); 禁食 7 天后, 肾脏组织可见少量上皮细胞疏松水肿脱落及炎症细胞浸润, 整体肾组织结构完整 (见图 1f)。根据各组大鼠肾脏组织病理变化程度进行 HE 切片图像量化分析发现, 与对照组相比, 禁食大鼠肾脏组织病理变化差异并不显著 (见图 2), 这也在一定程度上表明禁食并未对大鼠肾脏带来严重的病理性损伤。

2.1.2 肾功能指标变化

血液肌酐和尿素水平是反应肾功能状况的指标。与对照组相比, 整个禁食过程中大鼠血肌酐水平并未发生显著的变化; 血液尿素水平在禁食开始后出现轻微下降趋势, 但经过统计学分析, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。在禁食 7 天时, 血液尿素水平较对照组明显升高, 差异极显著 ($P < 0.01$), 如图 3 所示。

2.2 长期禁食大鼠血尿酸与尿酸水平的变化

禁食开始前, 大鼠血尿酸浓度保持在 (1.38 ± 0.2) mg $\cdot$ dL⁻¹。随着禁食的进行, 大鼠血尿酸水平开始逐渐上升, 禁食 1 天后血尿酸浓度为 (1.58 ± 0.2) mg $\cdot$ dL⁻¹, 禁食 3 天后血尿酸浓度为 (1.84 ± 0.17) mg $\cdot$ dL⁻¹, 但与对照组相比并无显著性差异 ($P > 0.05$)。随着禁食时间的延长, 血尿酸水平继续上升, 禁食 7 天后血尿酸水平升高至 (2.3 ± 0.56) mg $\cdot$ dL⁻¹, 较对

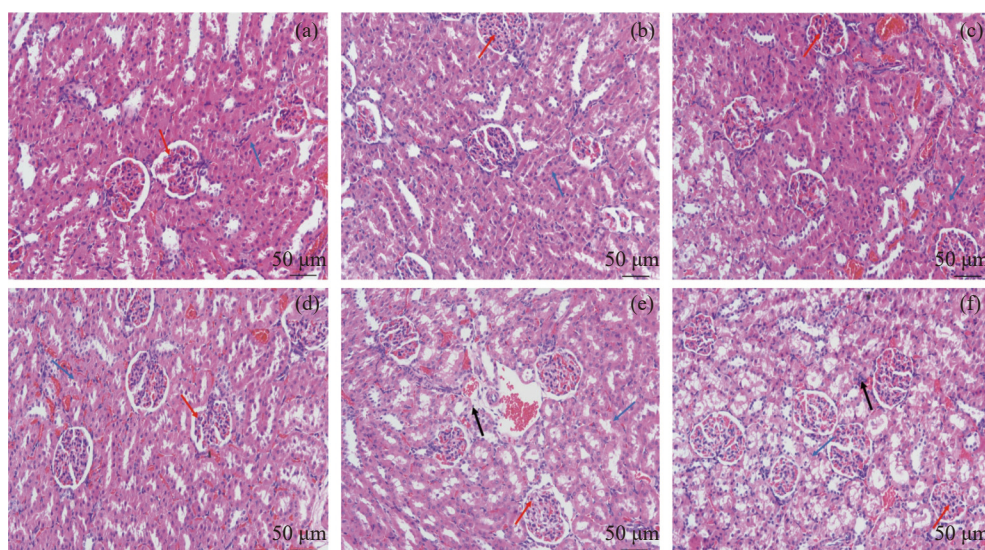


图1 不同禁食时间各组大鼠肾病理形态学变化 ($n=3$)。(a) 正常对照组肾脏, (b) 禁食1天肾脏, (c) 禁食2天肾脏, (d) 禁食3天肾脏, (e) 禁食5天肾脏, (f) 禁食7天肾脏。红色箭头表示肾小球, 蓝色箭头表示肾小管上皮细胞, 黑色箭头表示上皮细胞脱落及炎症细胞浸润

Fig. 1 Pathological changes of the kidneys during different fasting duration in rats ($n=3$ in each group).

(a) Normal control group, (b) fasting for 1 day, (c) fasting for 2 days, (d) fasting for 3 days,

(e) fasting for 5 days, (f) fasting for 7 days. Red arrow: glomerulus. Blue arrow: tubular epithelial cells.

Black arrow: epithelial cell exfoliation and inflammatory cell infiltration

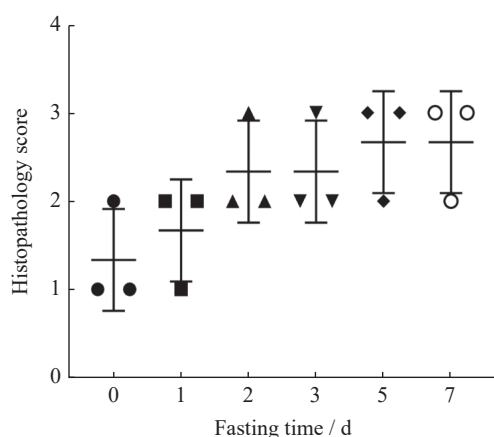


图2 不同禁食时间各组大鼠肾脏组织病理形态学变化检测评分 ($n=3$)

Fig. 2 Histological scores in kidneys during different fasting duration in rats ($n=3$ in each group)

对照组显著升高,有统计学差异($P<0.01$)(见图4a)。

与血尿酸水平相比,禁食过程中尿尿酸变化较大(见图4b)。禁食开始前,大鼠尿尿酸平均值在(2.75 ± 0.68) $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$,禁食1天后尿尿酸水平显著升高,达到(6.88 ± 0.97) $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$,且有统计学差异($P<0.01$)。此后,尿尿酸持续维持在较高的水平。禁食

3天的尿尿酸水平较禁食1天有轻微下降,但仍显著高于禁食前水平,且有统计学差异($P<0.05$)。随着禁食时间的延长,尿尿酸水平逐渐下降,禁食7天后尿尿酸(1.84 ± 1.29) $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$,降到基础值之下。

2.3 大鼠血液尿酸酶与尿液尿囊素水平变化

尿酸酶是一种参与生物体内嘌呤代谢过程的氧化酶,能够催化尿酸氧化降解生成尿囊素。禁食开始前,大鼠血液尿酸酶活性保持稳定;禁食2天后,血液尿酸酶活性升高(见图5a),较禁食前升高55.7% ($P<0.05$)。但随着禁食时间的延长,血液尿酸酶开始下降,在禁食7天后较禁食2天时下降39.7%,较禁食前下降6.1%左右,但无显著性差异($P>0.05$)。尿液中尿囊素的含量在禁食1天后达到最高水平,较禁食前升高71.8%左右,且有统计学差异($P<0.01$)。此后,尿液尿囊素水平开始下降,但仍高于禁食前的水平(见图5b)。

2.4 长期禁食对大鼠肾组织中尿酸转运蛋白 mRNA 表达的影响

荧光定量PCR检测发现,长期禁食过程中,大鼠肾脏组织主要尿酸转运蛋白(UAT除外)的mRNA水平在禁食1天后都表现出显著升高趋势,且与

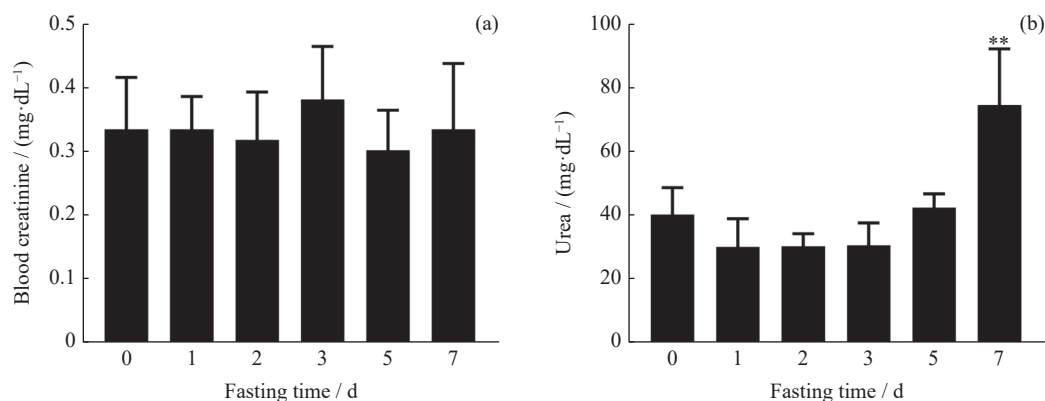


图 3 不同禁食时间大鼠血肌酐 (a) 和尿素 (b) 变化。n=6, ** $P<0.01$, 与 0 d (对照组) 比较

Fig. 3 Changes of blood creatinine (a) and urea (b) during different fasting duration in rats.

n=6, ** $P<0.01$, compared with 0 d (control group)

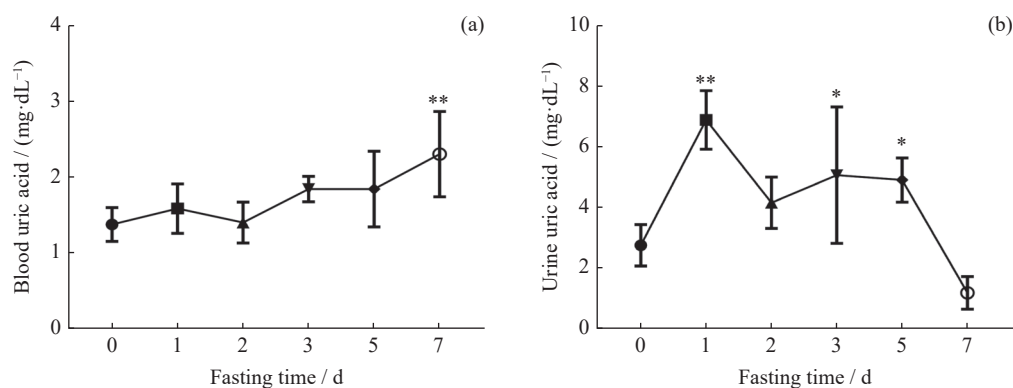


图 4 不同禁食时间大鼠血尿酸 (a) 和尿酸尿 (b) 变化。n=6, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与 0 d (对照组) 比较

Fig. 4 Changes of blood uric acid (a) and urine uric acid (b) during different fasting duration in rats.

n=6, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with 0 d (control group)

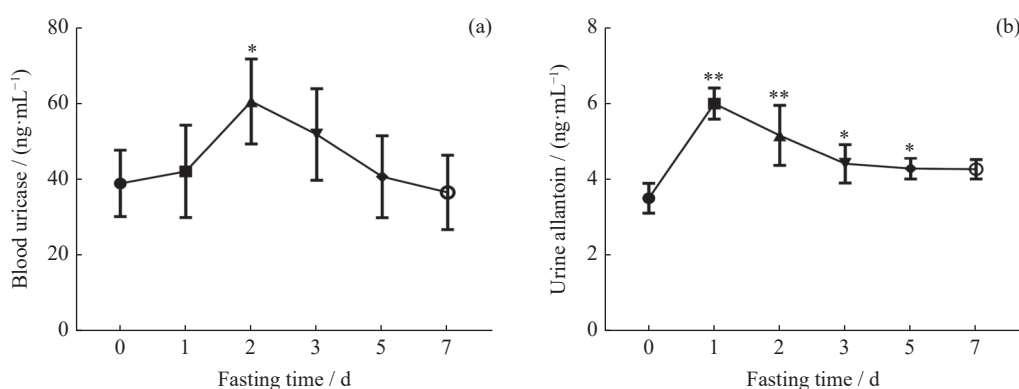


图 5 不同禁食时间大鼠血液尿酸酶 (a) 和尿液尿酸素 (b) 水平变化。n=6, * $P<0.05$,

** $P<0.01$, 与 0 d (对照组) 比较

Fig. 5 Changes of blood uricase (a) and urine allantoin (b) during different fasting duration in rats.

n=6, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with 0 d (control group)

禁食前相比具有统计学差异 ($P<0.01$) (见图 6)。随着禁食时间延长, 尿酸重吸收蛋白 URAT1 和 GLUT9

的 mRNA 的表达不断升高, 显著高于禁食前水平。其中, GLUT9 的 mRNA 表达水平在禁食 7 天后较禁

食前升高 2 倍(见图 6 a);而 URAT1 在禁食 3 天后的 mRNA 表达量是禁食前的 300 多倍,且直到整个禁食实验结束都保持较高水平(见图 6 b)。OAT1 mRNA 也呈现升高的趋势,但是仅在禁食 7 天时具有统计学差异($P<0.01$)(见图 6 c)。尿酸重吸收相关蛋白 NPT1 和 Mrp4 的 mRNA 表达水平也随着禁食时间延长不断升高(见图 6 d f),显著高于禁食前水平,禁食 7 天时 NPT1 mRNA 表达量是禁食前的 3 倍。UAT mRNA 表达呈现下降的趋势,但是只在禁食 5 天时表现出统计学差异($P<0.01$)(见图 6 e)。尤其值得关注的是,禁食前 2 天,这些转运蛋白的表达趋势存在个体差异化表达变化现象。

2.5 长期禁食大鼠肾脏组织中主要尿酸转运蛋白的蛋白表达变化

蛋白免疫印迹检测肾组织尿酸转运蛋白 GLUT9, URAT1 和 UAT 蛋白表达变化见图 7。由图 7 可以看出,与对照组相比, GLUT9, URAT1 和 UAT 的表达水平随着禁食时间的延长开始逐步升高,且到整个禁食结束都维持在较高的水平。其中, GLUT9 蛋白表达水平在禁食 3 天后显著升高($P<0.01$); URAT1 蛋白表达水平在禁食 1 天后升高接近 2 倍,此后一直维持在较高水平;分泌相关蛋白 UAT 在禁食 2 天后开始呈现高表达,且直到禁食 7 天都维持在较高水

平。尿酸转运蛋白的表达水平随着禁食时间的延长不断升高,且这种重吸收和分泌的同向表达对于维持尿酸水平稳定具有重要意义。

2.6 长期禁食大鼠血尿酸与主要尿酸转运蛋白相关性分析

为了进一步确认血尿酸水平与主要尿酸转运蛋白之间的关系,对长期禁食大鼠血尿酸水平与尿酸转运蛋白相对表达(mRNA 和蛋白)变化之间进行相关性分析,发现血尿酸水平与尿酸重吸收转运蛋白 GLUT9 和 URAT1(见图 8 a b)mRNA 表达量之间呈显著正相关,与尿酸排泄相关转运蛋白 UAT(见图 8 c)相关性差异不显著。但是血尿酸水平与主要转运蛋白 GLUT9, URAT1 和 UAT 的蛋白相对表达水平之间都具有显著相关性($P<0.05$, 见图 8 d~f)。相关性分析也进一步确认了血尿酸水平与尿酸转运蛋白之间有重要的关系。

3 讨论

禁食有着悠久的历史,能够给人类健康带来多方面益处^[4]。研究表明禁食可以降低人体代谢率,实现低代谢状态,降低食物的消耗。这使得禁食诱导低代谢技术成为人类长期载人航天保障航天员健康和应

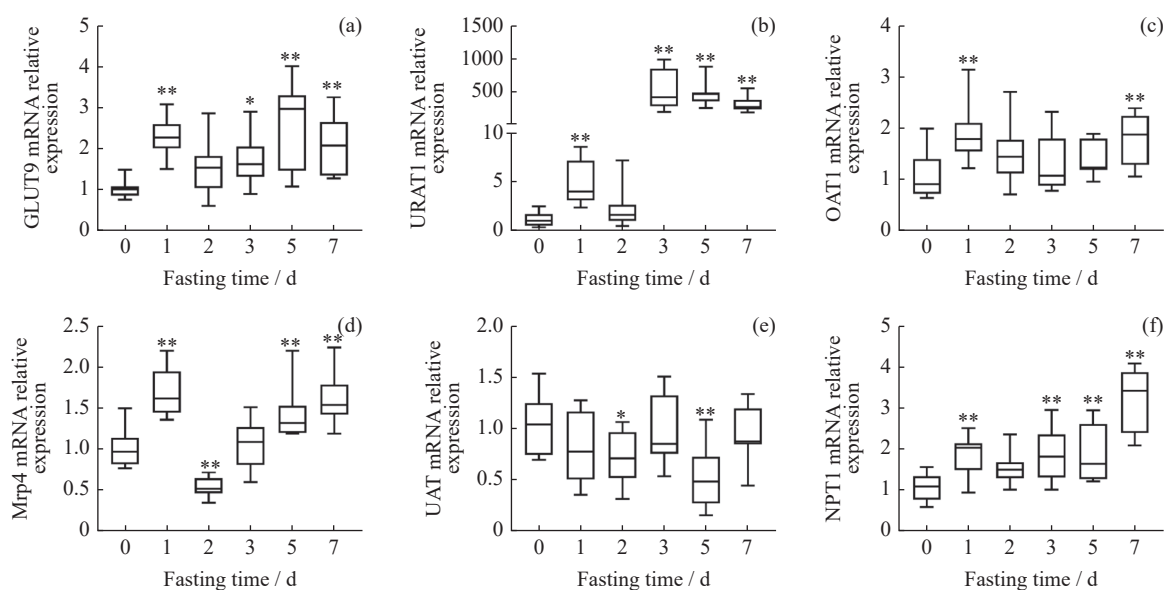


图 6 不同禁食时间大鼠尿酸转运蛋白 mRNA 表达水平变化。n=6, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与 0 d (对照组) 比较。
(a) GLUT9, (b) URAT1, (c) OAT1, (d) Mrp4, (e) UAT, (f) NPT1

Fig. 6 mRNA changes of urate transporter during different fasting duration in rats. n=6, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with 0 d (control group). (a) GLUT9, (b) URAT1, (c) OAT1, (d) Mrp4, (e) UAT, (f) NPT1

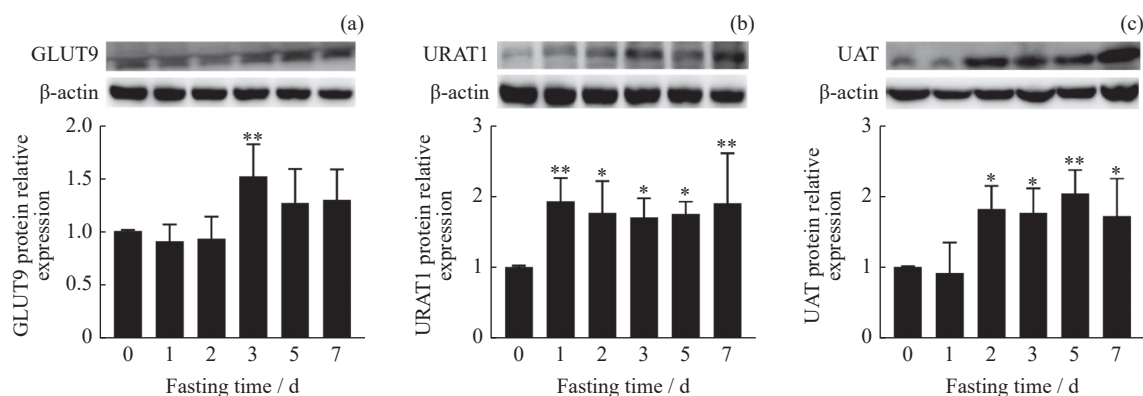


图 7 不同禁食时间大鼠主要尿酸转运蛋白 (GLUT9, URAT1, UAT) 的蛋白表达水平变化。

$n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与 0 d (对照组) 比较。(a) GLUT9 蛋白相对表达量, (b) URAT1 蛋白相对表达量, (c) UAT 蛋白相对表达量

Fig. 7 Protein changes of major urate transporter (GLUT9, URAT1, UAT) during different fasting duration in rats. $n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, compared with 0 d (control group). (a) The protein relative expression of GLUT9 protein, (b) the protein relative expression of URAT1 protein, (c) the protein relative expression of UAT protein

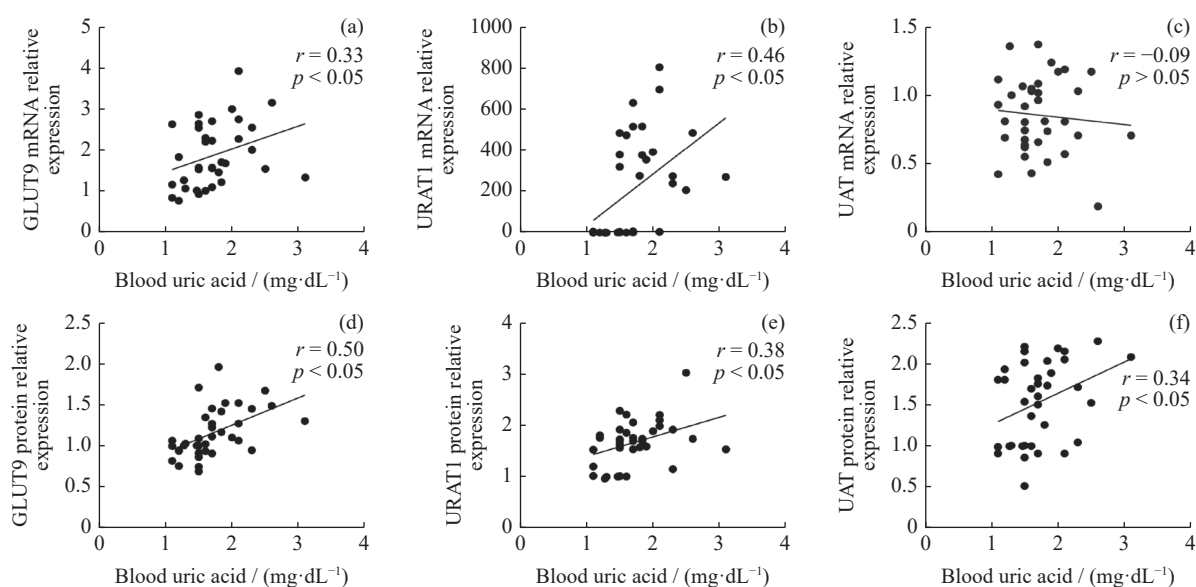


图 8 不同禁食时间大鼠血尿酸与主要尿酸转运蛋白 mRNA 和蛋白相对表达量之间相关性分析。血尿酸与尿酸转运蛋白 GLUT9 (a), URAT1 (b), UAT (c) mRNA 相对表达量, 以及 GLUT9 (d), URAT1 (e), UAT (f) 蛋白相对表达量之间相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis between blood uric acid and mRNA and protein relative expression of main uric acid transporter during different fasting duration in rats. The correlation analysis between blood uric acid and the mRNA expression and protein expression of (a)(d) GLUT9, (b)(e) URAT1, (c)(f) UAT

对不同应急状态中潜在的应用模式^[1]。前期研究也证实了禁食对糖脂代谢、神经、免疫等空间飞行关注的医学问题都有很多益处,但禁食导致的尿酸代谢异常及其潜在危害尚不完全清楚^[17-19]。高尿酸血症是临

床中一种复杂的慢性代谢性疾病,是多种代谢性疾病的关联因素^[20-22]。在禁食低代谢模式中尿酸一过性升高。这种尿酸水平的变化对机体的影响尚不清楚。本研究利用大鼠动物模型,结合长期禁食的方

式,观察长期禁食对尿酸代谢的影响及其潜在的调控方式。

相对于短期禁食,长期禁食使体内能量代谢底物的变化更加剧烈,自噬水平升高,可能导致尿酸的局部浓度增加,形成尿酸结晶,进而会产生炎症等现象,存在病理性损伤的危险。因此,首先利用 HE 染色分析了长期禁食过程中大鼠肾脏组织的形态学特征。分析发现,长期禁食肾脏组织的形态结构基本正常,肾小球结构清晰可见,未见肾小球萎缩扩张,上皮细胞未见严重的炎症浸润。这在一定程度上表明肾脏组织结构和功能没有发生显著变化。肌酐和尿素反映肾功能损伤的指标^[23]。当血液肌酐超过正常范围时,意味着肾小球滤过作用出现问题,有可能发生肾功能不全、肾衰竭等。通过对血液中肌酐水平监测发现,整个禁食过程中血液肌酐并未出现显著性的变化。与肌酐变化不同的是血液尿素含量在禁食 7 天后显著升高。尿素是体内蛋白质代谢的产物,从肾小球滤过而排出体外,也是评估肾小球滤过功能的指标之一。禁食 7 天后血液尿素水平开始显著升高。这是随着禁食时间延长,体内部分组织蛋白降解代谢的结果。对肾脏组织一些基本指标进行监测的结果显示,长期禁食未对肾脏组织造成显著性损伤。上述结果表明大鼠 7 天禁食是安全的。

尿酸是嘌呤代谢的终产物,禁食过程中体内部分组织细胞碎片以及其他代谢产物都可以为嘌呤合成提供大量的前体物质,这也可能是禁食引起尿酸升高的重要原因。本实验中经过 7 天的长期禁食,大鼠血液尿酸水平呈现上升趋势,但只在禁食 7 天出现显著性差异。与血液尿酸水平变化不同,尿尿酸水平出现波动性的变化。禁食 1 天后尿尿酸显著升高,此后稍有下降,一直维持在 $4.5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ 左右。禁食 7 天后,尿尿酸水平显著下降到基础值之下。血尿酸水平升高理论上应该伴随着尿尿酸水平的下降,而禁食初期尿尿酸水平的一过性升高与预想不符。初步猜测可能是由于禁食初期肾脏代偿性排出增加,导致尿尿酸升高,这在一定程度上体现了肾脏的一种适应性调节。而随着禁食时间延长,大鼠体质逐渐变弱,体内自噬、氧化等反应增加,机体为应对氧化带来的潜在危害,通过调节自身尿酸水平实现抗氧化作用^[24]。此外,尿酸代谢也受尿酸酶的影响,尿酸在尿酸酶的催化下可以进一步转化成溶解度较高的尿囊素^[25]。为

了进一步确定体内尿酸水平的变化原因,检测禁食过程中尿酸酶及尿囊素的变化情况。禁食 2 天后血液尿酸酶活性升高,但随着禁食时间的延长,血液尿酸酶开始下降,其变化并不明显。尿液中尿囊素的含量在禁食 1 天后达到最高水平,此后开始下降,但直到禁食后期都高于未禁食的水平。尿囊素是大鼠体内尿酸酶降解尿酸后的产物,尿液中尿囊素水平高一定程度上说明尿酸降解的程度高。禁食 1 天后,尿囊素水平显著升高,理论上此时尿尿酸水平应该出现下降,但结合上述结果可以发现,此时尿尿酸水平也出现升高,这表明尿酸水平可能还受到其他因素的影响。禁食早期尿尿酸水平显著升高,禁食后期血尿酸水平开始上升,这可能也与随着禁食时间延长大鼠肾脏负责尿酸转运吸收等相关蛋白功能失调,造成尿酸无法外排有关。

正常情况下体内尿酸的生成与排泄速度基本恒定^[26]。肾脏尿酸的转运和重吸收与 OAT1, URAT1, GLUT9, UAT, Mrp4 和 NPT1 等多种尿酸转运蛋白密切相关。OAT1 位于肾小管上皮细胞基底侧膜,负责将尿酸从肾小管毛细血管运输至肾小管上皮细胞内,在肾脏中起到分泌尿酸的作用^[27]。URAT1 在近曲小管上皮细胞表面表达,参与尿酸从肾脏转运至血液过程,是调节血尿酸水平的重要机制^[28]。GLUT9 作为葡萄糖转运体家族的一员,可通过转运葡萄糖来加速对尿酸重吸收^[29]。UAT 在整个细胞脂质层中表达,具有高选择性和电压敏感性,主要将尿酸盐分泌到管腔中,再经肾脏排出体外^[30]。Mrp4 在近端小管的尿酸盐分泌中起作用,可进行三磷酸腺苷依赖性尿酸排泄,消耗 ATP 获得供能将肾小管上皮细胞内的尿酸分泌至小管腔^[31]。荧光定量 PCR 检测发现,与未禁食对照组比较,尿酸重吸收相关蛋白 URAT1 和 GLUT9 的 mRNA 表达水平在禁食 1 天后显著升高,且随着禁食时间延长这种变化趋势更加显著。蛋白免疫印迹分析尿酸重吸收相关蛋白可以发现,URAT1 在禁食 1 天后呈现表达升高的趋势,而 GLUT9 蛋白在禁食 3 天后变化显著。与之不同的是,尿酸分泌相关蛋白的变化呈现一定的波动性,禁食 1 天后大部分尿酸分泌相关蛋白的 mRNA 表达水平升高,随后开始出现短暂下降趋势,禁食 3 天后又开始升高,且直到禁食实验结束基本维持在较高的表达水平。与大部分尿酸分泌相关蛋白的变化趋势不同,UAT 的

mRNA 表达水平随着禁食时间的延长呈现下降的变化趋势。但是蛋白表达分析发现, 禁食 2 天后其开始出现显著上升的表达变化。从 mRNA 和蛋白表达变化可以看出, 禁食 1 天后尿酸重吸收相关蛋白的表达水平开始升高, 此时血尿酸水平并未出现显著性上升, 而尿尿酸水平出现一过性升高的变化, 这种变化可能与此时部分尿酸分泌蛋白活性增加, 加速体内尿酸排泄有关。尿酸分泌蛋白在禁食 2 天后出现下降变化, 而重吸收蛋白的活性仍处于较高水平, 但是尿酸酶的活性增强使部分尿酸进一步降解为尿囊素排出体外, 从而使血液尿酸仍保持在一定的范围。随着禁食时间的延长, 血液尿酸出现升高趋势, 这可能与尿酸重吸收作用增强以及分泌作用降低有关。在整个禁食过程进入 5 天以后, 血液尿酸水平的变化幅度显著高于前期, 此时尿酸重吸收和尿酸分泌相关蛋白的功能都显著增高, 这在一定程度上为机体尿酸水平的平衡提供了保障。但是从尿酸酶水平的变化可以看出, 此时体内尿酸降解的效率低于禁食前期, 这也在一定程度上影响了血尿酸水平的变化。

前期研究报道, 禁食过程中尿酸水平呈升高的趋势, 而过高水平的尿酸对机体具有一定的副作用, 长期禁食过程中尿酸水平也呈现一定的波动性变化, 血液尿酸水平随着禁食时间的延长而不断升高, 而尿液尿酸仅在禁食开始后出现升高, 随后开始下降, 但整体仍高于禁食前的水平, 禁食 7 天后开始显著下降并维持在较低的水平。尿酸水平受到多种因素的影响, 本研究通过对尿酸转运蛋白、尿酸酶等影响尿酸生成和转运等的因素进行分析, 初步结果表明长期禁食过程中尿酸水平会一定程度升高, 且与尿酸转运蛋白密切相关。本研究还存在一定的问题需后续进一步解决。首先, 禁食对机体有多种有益作用, 尿酸具有氧化和抗氧化等作用, 禁食过程中升高的尿酸水平是否是机体自身的一种保护机制仍未得到确认。其次, 大鼠体内天然存在的尿酸酶是将尿酸进一步降解的关键, 也是影响尿酸水平的因素, 而人体缺乏这种降解尿酸的酶, 因此, 尿酸酶是否是影响禁食过程中人体尿酸的重要因素也需进一步考量。

4 结论

研究表明, 长期禁食不影响大鼠肾脏的组织形态

特征和功能。机体通过尿酸重吸收和分泌相关蛋白及尿酸酶的活性变化来调节体内尿酸代谢。禁食初期, 大鼠在尿酸酶的作用下分解体内多余尿酸, 而随着禁食时间的延长, 尿酸酶活性降低, 此时尿酸重吸收和转运蛋白的平衡可能是维持大鼠体内尿酸水平的关键。此外, 禁食过程中一定程度的高尿酸水平可能与尿酸具有抗氧化功能有关, 是机体的一种自我保护机制。上述大鼠长期禁食研究结果可为探索人体禁食低代谢调节技术的应用模式提供参考和依据。

参考文献

- [1] DAI Zhongquan, LI Yinghui, YANG Chao, *et al.* Space hypometabolic regulation technology for future manned interplanetary flight[J]. *Manned Spaceflight*, 2021, **27**(3): 269-275 (戴钟铨, 李莹辉, 杨超, 等. 面向未来载人星际航行的空间低代谢调节技术[J]. *载人航天*, 2021, **27**(3): 269-275)
- [2] PAK H H, HAWS S A, GREEN C L, *et al.* Fasting drives the metabolic, molecular and geroprotective effects of a calorie-restricted diet in mice[J]. *Nature Metabolism*, 2021, **3**(10): 1327-1341
- [3] DE CABO R, MATTSON M P. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2019, **381**(26): 2541-2551
- [4] ANTON S D, MOEHL K, DONAHOO W T, *et al.* Flipping the metabolic switch: understanding and applying the health benefits of fasting[J]. *Obesity*, 2018, **26**(2): 254-268
- [5] MATTSON M P, LONGO V D, HARVIE M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes[J]. *Ageing Research Reviews*, 2017, **39**: 46-58
- [6] MANDAL A K, MOUNT D B. The molecular physiology of uric acid homeostasis[J]. *Annual Review of Physiology*, 2015, **77**: 323-345
- [7] DE TOLEDO F W, GRUNDLER F, BERGOUIGNAN A, *et al.* Safety, health improvement and well-being during a 4 to 21-day fasting period in an observational study including 1422 subjects[J]. *PLoS One*, 2019, **14**(1): e0209353
- [8] MOJTO V, GVOZDJAKOVA A, KUCHARSKA J, *et al.* Effects of complete water fasting and regeneration diet on kidney function, oxidative stress and antioxidants[J]. *Bratislava Medical Journal*, 2018, **119**(2): 107-111
- [9] CAMELO L, DE SOUZA MARINHO T, ÁGUILA M B, *et al.* Intermittent fasting exerts beneficial metabolic effects on blood pressure and cardiac structure by modulating local renin-angiotensin system in the heart of mice fed high-fat or high-fructose diets[J]. *Nutrition Research*, 2019, **63**: 51-62
- [10] LI L J, ZHANG Y P, ZENG C C. Update on the epidemiology, genetics, and therapeutic options of hyperuricemia [J]. *American Journal of Translational Research*, 2020, **12**(7): 3167-3181

- [11] SPITSIN S V, SCOTT G S, MIKHEEVA T, *et al.* Comparison of uric acid and ascorbic acid in protection against EAE[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, **33**(10): 1363-1371
- [12] AMES B N, CATHCART R, SCHWIERS E, *et al.* Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, **78**(11): 6858-6862
- [13] SHI Y, EVANS J E, ROCK K L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells[J]. *Nature*, 2003, **425**(6957): 516-521
- [14] WANG Z, CUI T, CI X Y, *et al.* The effect of polymorphism of uric acid transporters on uric acid transport[J]. *Journal of Nephrology*, 2019, **32**(2): 177-187
- [15] SATO Y, FEIG D I, STACK A G, *et al.* The case for uric acid-lowering treatment in patients with hyperuricaemia and CKD[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2019, **15**(12): 767-775
- [16] XU L Q, SHI Y F, ZHUANG S G, *et al.* Recent advances on uric acid transporters[J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(59): 100852-100862
- [17] GABEL K, KROEGER C M, TREPANOWSKI J F, *et al.* Differential effects of alternate-day fasting versus daily calorie restriction on insulin resistance[J]. *Obesity*, 2019, **27**(9): 1443-1450
- [18] PHILLIPS M C L. Fasting as a therapy in neurological disease[J]. *Nutrients*, 2019, **11**(10): 2501
- [19] LI C Y, OSTERMANN T, HARDT M, *et al.* Metabolic and psychological response to 7-day fasting in obese patients with and without metabolic syndrome[J]. *Forschende Komplementarmedizin*, 2013, **20**(6): 413-420
- [20] XIONG Q, LIU J, XU Y C. Effects of uric acid on diabetes mellitus and its chronic complications[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2019, **2019**: 9691345
- [21] CORTESE F, GIORDANO P, SCICCHITANO P, *et al.* Uric acid: from a biological advantage to a potential danger. A focus on cardiovascular effects[J]. *Vascular Pharmacology*, 2019, **120**: 106565
- [22] EL DIN U A A S, SALEM M M, ABDULAZIM D O. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: a review[J]. *Journal of Advanced Research*, 2017, **8**(5): 537-548
- [23] VEGA J, HUIDOBRO E J P. Effects of creatine supplementation on renal function[J]. *Revista Médica de Chile*, 2019, **147**(5): 628-633
- [24] ENSMINGER D C, SALVADOR-PASCUAL A, ARANGO B G, *et al.* Fasting ameliorates oxidative stress: a review of physiological strategies across life history events in wild vertebrates[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2021, **256**: 110929
- [25] BRAGA T T, FORESTO-NETO O, CAMARA N O S. The role of uric acid in inflammasome-mediated kidney injury[J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2020, **29**(4): 423-431
- [26] RICHETTE P, BARDIN T. Gout[J]. *The Lancet*, 2010, **375**(9711): 318-328
- [27] LIU X D. SLC family transporters[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, **1141**: 101-202
- [28] SHIBASAKI K, KIMURA M, IKARASHI R, *et al.* Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia[J]. *Metabolism*, 2012, **8**(3): 484-491
- [29] BU P L, LE Y, ZHANG Y, *et al.* Hormonal and chemical regulation of the Glut9 transporter in mice[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2017, **360**(1): 206-214
- [30] UEMURA N, MURAKAMI R, CHIBA Y, *et al.* Immunoreactivity of urate transporters, GLUT9 and URAT1, is located in epithelial cells of the choroid plexus of human brains[J]. *Neuroscience Letters*, 2017, **659**: 99-103
- [31] BOBULESCU I A, MOE O W. Renal transport of uric acid: evolving concepts and uncertainties[J]. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2012, **19**(6): 358-371