

可溶性尿酸对肠上皮细胞的影响及其机制

杨婉¹, 吕秋兰², 徐大星¹, 刘秀¹, 王鹏君², 邢士超³

(青岛大学, 山东 青岛 266071 1 基础医学院病原生物学系; 2 附属医院医学研究中心; 3 附属医院内分泌与代谢病科)

[摘要] **目的** 探讨可溶性尿酸(sUA)对肠上皮细胞的影响及其机制。**方法** 将大鼠肠上皮细胞(IEC-6 细胞)随机分为对照组和实验组,对照组采用 0 mg/L sUA 刺激 IEC-6 细胞;实验组分别用 25、50、100、200、400 mg/L 浓度的 sUA 刺激 IEC-6 细胞,观察 sUA 对细胞活力的影响,并筛选出对 IEC-6 细胞毒性较小的 sUA 浓度。采用蛋白印迹法和实时荧光定量 PCR,检测 sUA 刺激对 IEC-6 细胞蛋白激酶 C(PKC)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)表达的影响;采用 PKC 抑制剂抑制 PKC 的表达,观察 PKC 降低对炎症因子表达的影响。采用活性氧检测试剂盒检测 sUA 对 IEC-6 细胞线粒体活性氧(ROS)的影响,线粒体膜电位试剂盒检测 IEC-6 细胞膜电位变化,免疫荧光方法检测 IEC-6 细胞紧密连接蛋白(ZO-1)表达。**结果** 25、50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组细胞活力与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);200、400 mg/L 浓度 sUA 刺激组细胞活力受损较为显著,差异有统计学意义($F=20.519, P<0.05$)。25、50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组 IEC-6 细胞 PKC、TNF α mRNA 和蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义($F=36.750\sim81.660, P<0.05$)。PKC 抑制剂组 PKC、TNF α 蛋白表达显著低于对照组,差异有统计学意义($t=16.646, 22.572, P<0.05$)。25、50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组 ROS 较对照组增多($F=341.708, P<0.05$)。50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组线粒体膜电位较对照组明显降低,差异有统计学意义($F=400.952, P<0.05$)。100 mg/L 浓度 sUA 刺激组 ZO-1 蛋白表达较对照组降低,差异有统计学意义($t=50.508, P<0.05$)。**结论** sUA 能激活由 PKC 介导的免疫应答,产生过量的 ROS,释放炎症因子,引起肠上皮细胞炎症反应。

[关键词] 肠细胞;高尿酸血症;尿酸;紧密连接蛋白质类

[中图分类号] R392.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2022)01-0013-06

doi: 10.11712/jms.2096-5532.2022.58.010 **[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]**

[网络出版] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20220127.1750.006.html>; 2022-01-29 10:29:58

INFLUENCE OF SOLUBLE URIC ACID ON INTESTINAL EPITHELIAL CELLS AND ITS MECHANISM YANG Wan, LÜ Qiulan, XU Daxing, LIU Xiu, WANG Pengjun, XING Shichao (School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the influence of soluble uric acid (sUA) on intestinal epithelial cells and its mechanism. **Methods** Rat intestinal epithelial cells (IEC-6) were randomly divided into control group and experimental group. The IEC-6 cells in the control group were stimulated with 0 mg/L sUA, and those in the experimental group were stimulated with 25, 50, 100, 200, or 400 mg/L sUA. The influence of sUA on cell viability was observed, and sUA concentration with little toxicity to IEC-6 cells was screened out. Western blot and quantitative real-time PCR were used to observe the influence of sUA stimulation on the expression of protein kinase C (PKC) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in IEC-6 cells; a PKC inhibitor was used to inhibit the expression of PKC, and then the influence of PKC reduction on the expression of inflammatory factors was observed. The reactive oxygen detection kit was used to observe the effect of sUA on mitochondrial reactive oxygen species (ROS); the mitochondrial membrane potential kit was used to measure the change in membrane potential; immunofluorescence assay was used to measure the expression of the tight junction protein zonula occluden-1 (ZO-1) in IEC-6 cells. **Results** There was no significant difference in viability between the 25/50/100 mg/L sUA stimulation groups and the control group ($P>0.05$), and the 200/400 mg/L sUA stimulation groups had a significantly greater reduction in cell viability ($F=20.519, P<0.05$). Compared with the control group, the 25/50/100 mg/L sUA stimulation groups had significantly higher mRNA and protein expression of PKC and TNF- α ($F=36.750\sim81.660, P<0.05$). Compared with the control group, the PKC inhibitor group had significantly lower protein expression of PKC and TNF- α ($t=16.646, 22.572; P<0.05$). The 25/50/100 mg/L sUA stimulation groups had a significant increase in

ROS compared with the control group ($F=341.708, P<0.05$). The 50/100 mg/L sUA stimulation groups had a significant reduction in mitochondrial membrane potential compared with the control group ($F=400.952, P<0.05$). The 100 mg/L sUA stimulation group had a significant reduction in the protein expression of ZO-1 compared with the control group ($t=50.508, P<0.05$). **Conclusion** This

[收稿日期] 2020-07-30; **[修订日期]** 2021-07-15

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81671625);青岛市产业培育计划(科技惠民专项)(17-3-3-15-nsh);青岛市市南区科技发展计划(2013-13-008-YY)

[第一作者] 杨婉(1994-),女,硕士研究生。

[通信作者] 邢士超(1980-),男,博士,副教授,硕士生导师。
E-mail: xingshichao@qdu.edu.cn.

study shows that sUA can activate the immune response mediated by PKC, produce excessive ROS, release inflammatory factors, and induce inflammatory response in intestinal epithelial cells.

[KEY WORDS] enterocytes; hyperuricemia; uric acid; tight junction proteins

尿酸是核酸及嘌呤类化合物的最终代谢产物。除肾脏外,约有 1/3 尿酸经肠上皮细胞转运至肠腔内代谢^[1]。肠上皮细胞功能紊乱是引发代谢病的风险因素,目前尿酸对肠上皮细胞的影响尚不清楚。肠上皮细胞在保护肠道屏障,调节黏膜免疫系统等方面具有重要的作用^[2]。肠屏障功能受损后,肠道通透性增加,易引发一系列的炎症^[3-5]。蛋白激酶 C (PKC)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是控制细胞分化、增殖等过程的重要调节因子^[6]。本研究采用大鼠肠上皮细胞(IEC-6 细胞)模型探讨可溶性尿酸(sUA)能否激活诱导炎症反应、引起肠上皮细胞损伤,为高尿酸血症及其并发症的预防和治疗提供新的方向。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

IEC-6 细胞(CRL-1592)购自 ATCC 美国模式培养物集存库;DMEM 培养基、胎牛血清、PBS 缓冲液、胰蛋白酶、Trizol、三氯甲烷均购于碧云天公司;二甲基吡啶(MTS)细胞增殖试剂盒、二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)活性氧检测试剂盒、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒、细胞核染料 DAPI 均购于索莱宝公司;引物、Taq DNA 聚合酶购于上海生物工程公司;紧密连接蛋白(ZO-1)抗体购于美国 CST 公司;PKC 抗体、肿瘤坏死因子 α (TNF α) 抗体、 β -actin 抗体、羊抗兔 IgG 抗体购于美国 Abcam 公司;PKC 抑制剂(Sotrastaurin)购于 APE \times BIO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 IEC-6 细胞培养 配制含有体积分数 0.10 的胎牛血清、100 kU/L 青霉素 G 和 100 U/L 链霉素的 DMEM 培养基,将 IEC-6 细胞置于该培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 0.05 CO_2 的细胞培养箱中培养。细胞长至 80%~90%融合时,用胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 sUA 制备 取 1 mol/L 氢氧化钠溶液溶解

尿酸盐,充分搅拌后配制成 20 g/L 的尿酸溶液,用 0.22 μm 注射式过滤器过滤,制成澄清淡黄色溶液。

1.2.3 细胞活力检测 IEC-6 细胞分别用 0、25、50、100、200、400 mg/L 浓度 sUA 刺激 24 h 后,改用不含血清的培养基,按照 MTS 细胞增殖试剂盒说明,加入 MTS 放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 2 h。使用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度值,以其表示细胞活力。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 PKC、TNF α mRNA 表达 分别应用 0、25、50、100 mg/L 浓度的 sUA(分别为 A、B、C、D 组)刺激 IEC-6 细胞 6 h,RT-PCR 方法检测 PKC、TNF α mRNA 表达。根据试剂说明书步骤进行操作。所用引物及其序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达量。

1.2.5 PKC 和 TNF α 蛋白表达检测 采用 Western blot 方法。分别用 0、25、50、100 mg/L 浓度的 sUA(分别为 A、B、C、D 组)刺激 IEC-6 细胞 24 h;PKC 抑制剂组应用 100 mg/L 浓度 sUA 刺激 IEC-6 细胞 24 h 后,加入 0.05 mg/L 的 PKC 抑制剂继续刺激 24 h。去除培养液,用 PBS 冲洗 3 次。加入 RIPA 裂解液,室温下 12 000 r/min 离心取上清液,提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度。各组取 30 μL 总蛋白加入 SDS-PAGE 凝胶蛋白上样缓冲液,放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE 凝胶分离。蛋白经凝胶电泳分离后,转印至硝酸纤维素膜上。加入 50 g/L 的脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别加入兔源 PKC 抗体(1 : 1 000)、TNF α 抗体(1 : 1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。以 TBST 清洗 3 次,每次 10 min。加入二抗(1 : 5 000)室温下孵育 1 h 后,以 TBST 洗膜 3 次。最后通过化学发光法显影,应用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参照蛋白灰度值的比值表示 PKC、TNF α 蛋白表达水平。

1.2.6 细胞内活性氧(ROS)的水平测定 应用 DCFH-DA ROS 检测试剂盒。IEC-6 细胞接种在

表 1 PCR 引物及其序列

引物名称	上游序列	下游序列
PKC	5'-CAGCCTGGACTACAACGACC-3'	5'-GATTCTGCCTGTGGACCGTTC-3'
TNF α	5'-GCGGCCACAGAAAACACT-3'	5'-CTCCCAATGGTCAAGGCATC-3'
GAPDH	5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTCCG-3'	5'-ACATTGGGGGTAGGAACACGGA-3'

12孔板,分别用0、25、50、100 mg/L 浓度 sUA(分别为 A、B、C、D 组)刺激 24 h 后,去除细胞培养液,加入 10 mg/L 荧光探针 DCFH-DA。将细胞放于 37 ℃ 环境中孵育 20 min,用无血清培养液清洗 3 次,去除残余未进入细胞内的探针,最后应用荧光显微镜和流式细胞仪检测细胞中 ROS 的含量。

1.2.7 细胞线粒体膜电位检测 采用 JC-1 线粒体膜电位试剂盒。IEC-6 细胞接种在 12 孔板,分别加入 0、25、50、100 mg/L 浓度 sUA(分别为 A、B、C、D 组)刺激 24 h 后,弃去原有培养液,PBS 冲洗;加入 JC-1 工作液,37 ℃ 细胞培养箱孵育 20 min;孵育结束后,使用 JC-1 缓冲液洗涤 3 次。设置荧光酶标仪的激发波长 490 nm、发射波长 590 nm,检测各组细胞线粒体膜电位。以荧光信号的强度表示细胞线粒体膜电位的变化。

1.2.8 ZO-1 表达检测 采用免疫荧光方法。选取 100 mg/L 浓度的 sUA 刺激 IEC-6 细胞 24 h 后,弃去培养液,用 PBS 冲洗 3 次后,加入 40 g/L 的多聚甲醛室温固定 30 min;再次用 PBS 冲洗 3 次,加入 5 g/L 的 Tritox-100,室温静置 20 min;去除 Tritox-100 液后 PBS 漂洗 3 次,室温下应用体积分数 0.05 山羊血清封闭 30 min,然后加入 ZO-1 抗体,4 ℃ 孵育过夜;吸出一抗,PBS 冲洗;加入荧光二抗,室温孵育 1 h。细胞核染料 DAPI 染核,使用荧光显微镜观察荧光强度,使用 Image Pro Plus 软件分析 ZO-1 表达水平。

以上所有实验均重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间比较采用单因素方差分析(ANOVA)和 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 sUA 刺激对 IEC-6 细胞活力的影响

与 0 mg/L sUA 刺激组(对照组)相比较,200、400 mg/L 浓度 sUA 刺激组细胞活力降低,差异有显著性($F = 20.519, P < 0.05$)。25、50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组细胞活力与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。因此,为了避免 sUA 刺激导致细胞死亡而影响实验结果,后续实验采用 25、50、100 mg/L 浓度的 sUA。

2.2 sUA 刺激对 IEC-6 细胞 PKC、TNF α mRNA

和蛋白表达的影响

RT-PCR 检测结果显示,25、50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组 IEC-6 细胞 PKC mRNA 的表达均高于 0 mg/L 浓度 sUA 刺激组(对照组),差异有统计学意义($F = 51.317, P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组的 PKC 蛋白表达较对照组增高,差异有统计学意义($F = 73.293, P < 0.05$)。25、50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组 TNF α 蛋白和 mRNA 表达明显高于对照组,差异有统计学意义($F = 81.660、36.750, P < 0.05$)。见图 2 和表 2。

2.3 PKC 抑制剂对 PKC 及 TNF α 表达的影响

加入 PKC 抑制剂(实验组)刺激 IEC-6 细胞 24 h 后,PKC 抑制剂组 PKC、TNF α 蛋白表达显著低于 0 mg/L 浓度 sUA 刺激组,差异有统计学意义($t = 16.646、22.572, P < 0.05$)。见图 3 和表 3。

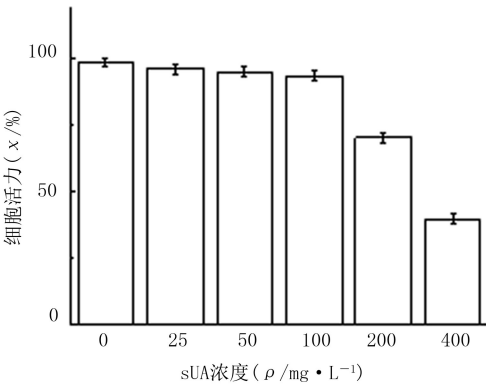


图 1 不同浓度 sUA 刺激后 IEC-6 细胞活力比较

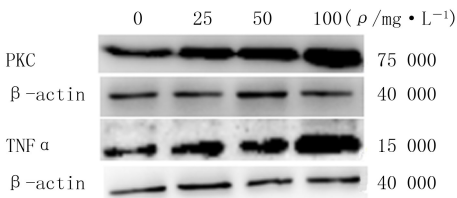


图 2 Western blot 检测不同浓度 sUA 刺激组 PKC 和 TNF α 蛋白表达

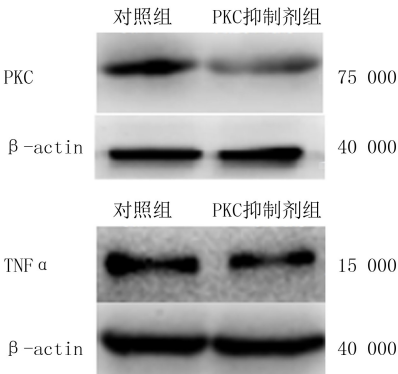


图 3 Western blot 检测 PKC 抑制剂对 PKC 和 TNF α 蛋白表达影响

表 2 不同浓度 sUA 刺激组 PKC、TNFα mRNA 和蛋白表达水平比较($n=12,\bar{x}\pm s$)

组别	PKC		TNFα	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
A 组	1.09±0.14	1.01±0.95	1.06±0.56	1.04±0.20
B 组	3.16±0.85 *	2.15±0.25	3.85±0.28 *	2.61±0.56 *
C 组	3.66±0.80 *	3.13±0.53 *	3.97±0.32 *	2.78±0.30 *
D 组	7.92±0.73 *	6.67±0.79 *	4.19±0.37 *	6.21±1.07 *

与 A 组比较, * $F=36.750\sim81.660,P<0.05$ 。

表 3 PKC 抑制剂对 PKC、TNFα 蛋白表达的影响($n=12,\bar{x}\pm s$)

组别	PKC	TNFα
对照组	1.01±0.95	1.04±0.20
实验组	0.28±0.21 *	0.43±0.32 *

注:对照组为 0 mg/L 浓度 sUA 刺激组。与对照组比较, * $t=16.646、22.572,P<0.05$ 。

2.4 sUA 刺激对 IEC-6 细胞线粒体膜电位及 ROS 水平的影响

50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组线粒体膜电位与 0 mg/L 浓度 sUA 刺激组(对照组)相比明显降低,差异有统计学意义($F=400.952,P<0.05$)。与对照组相比较,25、50、100 mg/L 浓度 sUA 刺激组 ROS 以剂量依赖性方式升高,差异有统计学意义($F=341.708,P<0.05$)。见表 4。

2.5 sUA 刺激对 IEC-6 细胞 ZO-1 蛋白及细胞核 DAPI 染色的影响

以 100 mg/L 浓度 sUA 刺激组(实验组)ZO-1

以及细胞核 DAPI 染色表达明显低于 0 mg/L 浓度 sUA 刺激组(对照组),差异均具有统计学意义($t=50.508、199.070,P<0.05$)。见图 4 和表 5。

表 4 不同浓度 sUA 刺激后 IEC-6 细胞线粒体膜电位和 ROS 水平比较($n=12,\bar{x}\pm s$)

组别	线粒体膜电位	ROS
A 组	137.73±2.603	41.86±0.11
B 组	123.20±1.153	59.92±0.17 *
C 组	70.43±1.173 *	73.92±0.17 *
D 组	59.10±1.970 *	81.13±0.11 *

与 A 组比较, * $F=400.952、341.708,P<0.05$ 。

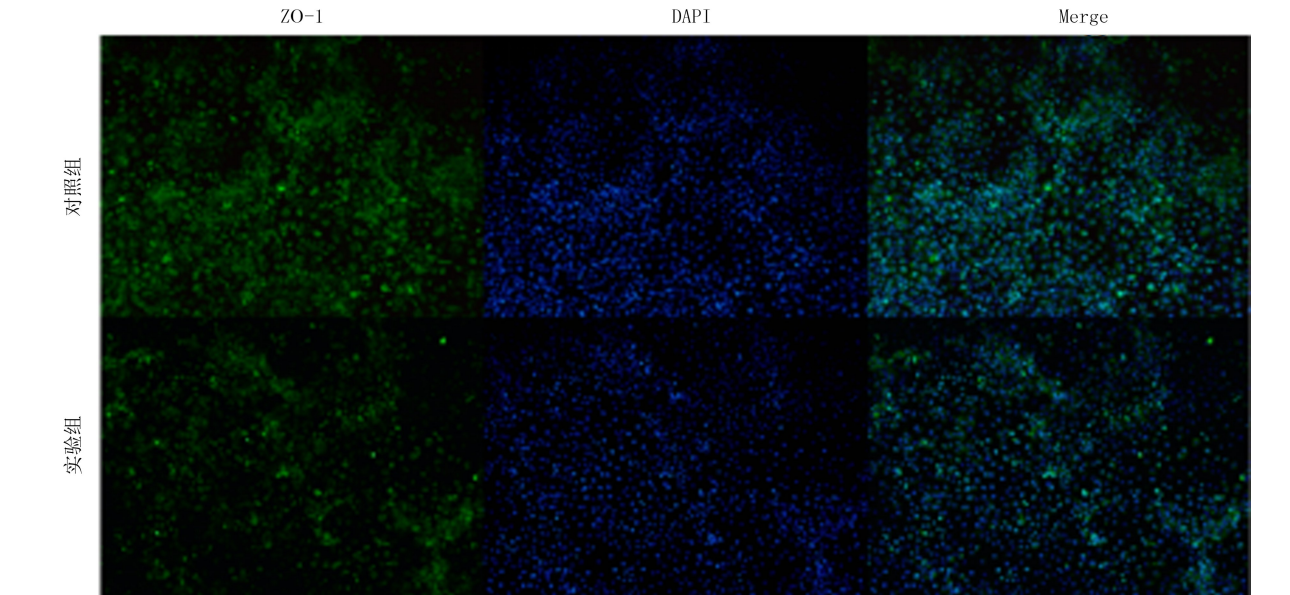
表 5 两组 ZO-1 和 DAPI 表达比较($n=12,\bar{x}\pm s$)

组别	ZO-1	DAPI
对照组	236.42±1.13	219.55±0.20
实验组	72.91±3.17 *	67.75±1.30 *

与对照组比较, * $t=50.508、199.070,P<0.05$ 。

3 讨 论

高尿酸血症不仅会导致痛风,同时还与糖尿病、肥胖等代谢疾病密切相关^[7-9]。肠道是尿酸排泄的重要途径,肠上皮细胞作为肠屏障的一部分,在维持肠道微生态相对稳定中发挥重要作用^[10-11]。肠黏膜上皮细胞与尿酸的相互作用不仅影响尿酸的转运与代谢,还可能损伤肠黏膜屏障,从而促进炎症以及代谢疾病的发生^[12-13]。目前,有关尿酸对肠上皮细胞影响的研究较少。探讨尿酸对肠道上皮细胞的影响



图中 Merge 是 ZO-1 和 DAPI 的叠加图像。

图 4 免疫荧光检测细胞中 ZO-1 蛋白和 DAPI 的表达

及其机制,对深入了解高尿酸血症的发病机制及发生发展过程有着重要的意义。

尿酸是一种内源性危险信号,结晶后的尿酸晶体能诱导炎症反应,激活免疫系统^[14-15]。目前大部分研究集中于探讨尿酸晶体诱发的炎症反应及免疫过程。有研究显示,sUA可能是一种促炎剂,能够不依赖尿酸晶体诱发炎症反应和免疫过程^[16-18]。本研究结果表明,25、50、100 mg/L的sUA刺激能显著激活IEC-6细胞的PKC通路介导的免疫应答,促进TNF α 等炎症因子表达,引发炎症反应。为了进一步探究该过程中PKC通路对炎症因子表达增加是否起关键作用,本文检测抑制细胞中PKC的表达后PKC、TNF α 蛋白水平的变化。结果显示,sUA刺激可增加IEC-6细胞中PKC的表达,抑制PKC表达后PKC、TNF α 蛋白表达显著降低。

ROS作为一种重要的信号分子,可调节细胞的代谢、增殖并参与多种疾病的发生发展^[19]。已有研究表明,线粒体产生过量的ROS,引起炎性细胞因子的分泌^[20]。尿酸最初被认为是一种抗氧化剂,可以去除ROS,防止老化和氧化应激^[21]。近几年研究发现,尿酸不一定是抗氧化剂,某些情况可能会变成促氧化剂。SAUTIN等^[22]研究表明,尿酸能激活成熟脂肪细胞中NADPH氧化酶并促使ROS产生增加,诱导脂肪细胞中的氧化还原依赖性信号传导和氧化应激。高浓度的尿酸还可引起 β -细胞、血管平滑肌细胞和人脐静脉内皮细胞的氧化应激^[23-25]。结合本研究结果,我们推测sUA导致ROS的产生可能是引起炎症反应的另一个机制,但需要进一步的研究探讨。

由于线粒体是细胞中ROS的主要来源,本文进一步研究了sUA刺激对线粒体膜电位的影响。结果表明,高浓度的sUA刺激可导致IEC-6细胞线粒体膜电位下降。线粒体膜电位对维持线粒体功能具有重要作用,若线粒体受损则会通过低效氧化磷酸化不断增加ROS的产生,损害细胞功能^[26]。有研究显示,高尿酸血症可改变细胞内线粒体的面积与功能,使机体处于氧化应激状态^[27-28]。本文结果与其一致。提示sUA可能通过诱导IEC-6细胞氧化应激,增加ROS的产生,最终导致线粒体损伤。

ZO-1蛋白连接邻近的肠上皮细胞,并且与调节肠道通透性的胞浆肌动蛋白和肌球蛋白网络有关^[29-30]。本文研究结果显示,当sUA浓度为200、400 mg/L时,IEC-6细胞活力明显降低,对IEC-6

细胞毒性较大。提示sUA破坏了肠细胞间的ZO-1蛋白,进一步损坏肠黏膜屏障,而这些变化与尿酸引起的炎症反应密切相关。

综上所述,尿酸能激活PKC信号通路,改变细胞氧化应激状态,反馈上调炎症因子的表达,进一步扩大炎症反应。尿酸引起的炎症反应可能是其损害肠道黏膜屏障的重要机制之一。这一发现对于进一步研究高尿酸血症并发症的机制及靶点治疗具有重要的指导意义。但该研究结果还需要进一步的动物实验验证。

[参考文献]

- [1] MANDAL A K, MOUNT D B. The molecular physiology of uric acid homeostasis[J]. *Annual Review of Physiology*, 2015, 77:323-345.
- [2] PETERSON L W, ARTIS D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(3):141-153.
- [3] BROQUET A H, HIRATA Y, MCALLISTER C S, et al. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in Rotavirus-infected intestinal epithelium[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 186(3):1618-1626.
- [4] ABREU M T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(2):131-144.
- [5] ELINAV E, HENAO-MEJIA J, FLAVELL R A. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses[J]. *Mucosal Immunology*, 2013, 6(1):4-13.
- [6] MAKHOUL S, DORSCHER S, GAMBARYAN S, et al. Feedback regulation of syk by protein kinase C in human platelets[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 21(1):E176.
- [7] 马东芹. 血尿酸与2型糖尿病主要代谢指标的相关性研究[D]. 长春:吉林大学, 2015.
- [8] 穆尧,张莹,韩松. 血尿酸水平与男性人群代谢综合征发病关系的系统综述与Meta分析[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2016, 19(12):1752-1757.
- [9] BILLIET L, DOATY S, KATZ J D, et al. Review of hyperuricemia as new marker for metabolic syndrome[J]. *ISRN Rheumatology*, 2014, 2014:52954.
- [10] MABBOTT N A, DONALDSON D S, OHNO H, et al. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium[J]. *Mucosal Immunology*, 2013, 6(4):666-677.
- [11] OUELLETTE A J. Paneth cells and innate mucosal immunity[J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2010, 26(6):547-553.
- [12] AMAR J, CHABO C, WAGET A, et al. Intestinal mucosal

- adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes; molecular mechanisms and probiotic treatment[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2011,3(9):559-572.
- [13] CANI P D, AMAR J, IGLESIAS M A, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2007,56(7):1761-1772.
- [14] MARTINON F, PÉTRILLI V, MAYOR A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. *Nature*, 2006,440(7081):237-241.
- [15] GHAEMI-OSKOUIE F, SHI Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation[J]. *Current Rheumatology Reports*, 2011,13(2):160-166.
- [16] CRIŞAN T O, CLEOPHAS M C, OOSTING M, et al. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2016,75(4):755-762.
- [17] XIAO J, FU C S, ZHANG X L, et al. Soluble monosodium urate, but not its crystal, induces toll like receptor 4-dependent immune activation in renal mesangial cells[J]. *Molecular Immunology*, 2015,66(2):310-318.
- [18] XIAO J, ZHANG X L, FU C S, et al. Soluble uric acid increases NALP3 inflammasome and interleukin-1 β expression in human primary renal proximal tubule epithelial cells through the Toll-like receptor 4-mediated pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015,35(5):1347-1354.
- [19] SENA L A, CHANDEL N S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species[J]. *Molecular Cell*, 2012,48(2):158-167.
- [20] CHANDEL N S, TRZYNA W C, MCCLINTOCK D S, et al. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2000,165(2):1013-1021.
- [21] MURAOKA S, MIURA T. Inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules[J]. *Pharmacology & Toxicology*, 2003,93(6):284-289.
- [22] SAUTIN Y Y, NAKAGAWA T, ZHARIKOV S, et al. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes; NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2007,293(2):C584-C596.
- [23] YU M N, SÁNCHEZ-LOZADA L G, JOHNSON R J, et al. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction[J]. *Journal of Hypertension*, 2010,28(6):1234-1242.
- [24] ZHANG Y N, YAMAMOTO T, HISATOME I, et al. Uric acid induces oxidative stress and growth inhibition by activating adenosine monophosphate-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase signal pathways in pancreatic β cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013,375(1-2):89-96.
- [25] CHAO H H, LIU J C, LIN J W, et al. Uric acid stimulates endothelin-1 gene expression associated with NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2008,29(11):1301-1312.
- [26] BARDAWEEL S K, GUL M, ALZWEIRI M, et al. Reactive oxygen species: the dual role in physiological and pathological conditions of the human body[J]. *The Eurasian Journal of Medicine*, 2018,50(3):193-201.
- [27] BRAGA T T, FORNI M F, CORREA-COSTA M, et al. Soluble uric acid activates the NLRP3 inflammasome[J]. *Scientific Reports*, 2017,7:39884.
- [28] JHANG J J, LIN J H, YEN G C. Beneficial properties of phytochemicals on NLRP3 inflammasome-mediated gout and complication[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018,66(4):765-772.
- [29] BLAIR S A, KANE S V, CLAYBURGH D R, et al. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease[J]. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 2006,86(2):191-201.
- [30] MARCHIANDO A M, SHEN L, GRAHAM W V, et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2010,189(1):111-126.

(本文编辑 黄建乡)

医学学术论文文题的拟定

文题又称题名、篇名,是论文的总标题。文题是论文的总纲,是最恰当、最简明的词语反映论文中最重要的特定内容的逻辑组合,是医学论文精髓的集中体现。文题是论文的第一信息,有提示论文主题、反映学术价值、吸引读者阅读和提供检索信息等作用。文题的拟定原则要体现论文研究的性质、对象、方法和价值等重要信息。文题拟定的基本要求是具体确切、表达得当,简短精炼、高度概括,概念术语、书写规范,突出创新、力求醒目。文题一般不宜超过 20 个汉字,必要时可以使用副标题和分标题,数字宜用阿拉伯数字,尽可能不用标点符号和非特定词(如“的研究”、“的观察”等)。