

持续高尿酸血症对大鼠血管内皮细胞功能影响的实验研究

黄修献 吴新华 李利华 赖敏 杨瑛

【摘要】 目的 探讨持续高尿酸血症对大鼠血管内皮细胞功能的影响。方法 SD 雄性大鼠 20 只,持续 12 d 给予氧嗪酸钾($750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,建立高尿酸血症模型。分次在灌胃前以及第 4、8 和 12 天通过大鼠眼球后静脉丛取血,测定血尿酸和一氧化氮水平。第 12 天取血后处死大鼠并留取腹主动脉和肾脏标本行 HE 染色观察尿酸盐沉积。测量值采用自身配对 *t* 检验分析。结果 灌胃第 4 天大鼠血尿酸升高,与基线血尿酸水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。第 8 天,大鼠血尿酸较第 4 天下降,但仍比基线血尿酸的均值高。第 12 天血尿酸水平又上升,与基线血尿酸水平比较明显升高($P < 0.05$)。与基线水平比较,灌胃第 4、8 天一氧化氮水平呈下降趋势,第 12 天一氧化氮水平下降有统计学差异($P < 0.05$)。腹主动脉和肾脏标本均未见尿酸盐沉积。结论 高尿酸血症呈时间依赖性对血管内皮细胞功能损伤,促进心血管疾病的发生发展。

【关键词】 高尿酸血症; 尿酸; 一氧化氮; 内皮,血管; 大鼠,Sprague-Dawley

多数流行病学研究发现,高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)与高血压病、冠心病、代谢综合征和糖尿病相关联,但 HUA 作为心血管疾病独立危险因素还存在争议,尚需要进一步研究来证实^[1]。通过研究各种心血管危险因素对血管内皮细胞损伤的机制来探讨其对心血管疾病的作用是医学研究的重要途径。本研究通过建立持续大鼠 HUA 模型,动态检测血尿酸(uric acid, UA)和一氧化氮(nitric oxide, NO)的水平,探讨 HUA 对大鼠血管内皮细胞功能的影响。

一、资料与方法

1. 动物:SD 雄性大鼠,12 周龄,体重(200 ± 30)mg,由大理学院动物实验中心提供。

2. 试剂:氧嗪酸钾(Oxonic acid),购自德国 Bio basicinc 公司;NO 试剂盒,购自南京建成生物公司;UA 试剂盒,购自上海复星长征医学科学有限公司。

3. HUA 动物模型建立:SD 雄性大鼠 20 只,分笼喂养。适应性喂养 1 周后,1 次/d 给予氧嗪酸钾(750 mg/kg),并按大鼠体重给以生理盐水(1 ml/kg)稀释灌胃,共 12 d。分别在灌胃前、第 4 天、第 8 天和第 12 天通过吸入异氟烷麻醉大鼠后,经大鼠眼球后静脉丛取血 $1 \sim 1.5 \text{ ml}$ 。于第 12 天取血后处死大鼠并留取腹主动脉和肾脏标本。实验期间动物饮水,饲料喂养均不限,每隔 4 d 称体重,期间依据大鼠体重变化调整氧嗪酸钾的剂量。

4. 血标本处理:每次所取血标本经离心(4500 r/min , 5 min ,离心半径 12.3 cm),取血清 $50 \mu\text{l}$ 行血清 UA 测量。剩余血清装于 EP 离心管中,在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存 1 个月后集中行 NO 测定。

5. 血 UA 和 NO 测定:血 UA 经日立全自动 7180 生化分析仪采用 Trinder's 方法测定;血清 NO 水平经 752 型分光光度仪采用硝酸还原酶法测定,按试剂说明书进行操作。

6. 腹主动脉和肾脏标本病理检查:标本经 10% 的中性甲醛液固定、脱水 and 石蜡包埋后,用 Leitz 切片机连续切片。经 HE 染色后,分别经电子显微镜观察腹主动脉内膜、肾小球的病理变化。

7. 统计学分析:应用 SPSS 15.0 软件包进行统计分析,计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,测量值采用自身配对 *t* 检验统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 大鼠 HUA 模型的一般情况:实验期间动物因吸入麻醉过深致呼吸抑制死亡 6 只,经眼球后静脉丛取血引起感染死亡 4 只。实验结束时,存活动物体重均有增加,同实验前体重比较差异无统计学意义。

2. 血 UA 水平的变化:在灌胃第 4 天后大鼠血 UA 升高,与基线血 UA 水平比较差异有统计学意义。继续灌胃至第 8 天,大鼠血 UA 较第 4 天下降,但仍较基线血 UA 的均值升高。在灌胃第 12 天大鼠血 UA 水平又上升,分别比基线、第 4 天和第 8 天的血 UA 水平明显升高(表 1)。

3. NO 水平的变化:灌胃后 NO 水平与其基线水平比较呈下降趋势。基线 NO 水平与其在第 4 天和第 8 天的水平比较,差异无统计学意义。第 12 天 NO 水平与基线水平比较有统计学差异(表 1)。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.01.040

作者单位:671000 云南省,大理学院附属医院心内科(黄修献、吴新华、李利华、杨瑛);海南医学院附属医院神经外科(赖敏)

通讯作者:吴新华,Email:henryhuang@hotmail.com

表1 不同时间血 UA 及 NO 水平比较

时间 (d)	例数	UA		NO	
		$\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$	<i>P</i> 值	$\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$	<i>P</i> 值
0	10	85.70 ± 38.08	-	22.72 ± 5.06	-
4	10	150.90 ± 64.84	0.022	21.92 ± 5.36	0.551
8	10	95.30 ± 27.31	0.554	15.05 ± 8.49	0.075
12	10	182.70 ± 92.44	0.014	13.81 ± 6.50	0.009

注:表中的 *P* 值均是与 0 d(基线水平)比较所得

4. 病理标本检查结果:腹主动脉和肾脏标本 HE 染色后在光镜下观察,分别示肾小球、肾小管、血管内膜、中膜和外膜的结构完整。两者均未见尿酸盐沉积(图 1,2)。

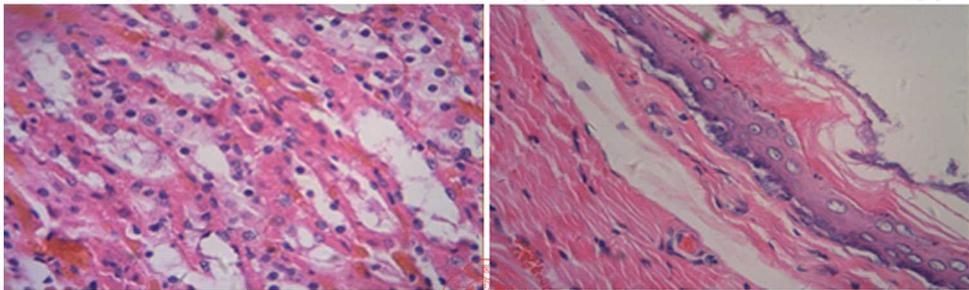


图1 肾小球、肾小管结构完整,未见尿酸盐沉积(HE × 100) 图2 腹主动脉血管内膜、中膜和外膜完整,未见尿酸盐沉积(HE × 40)

三、讨论

UA 是人体嘌呤代谢的产物,血 UA 水平升高与体内的核酸代谢异常和肾脏排泄减少有关。NO 是在 NO 合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)作用下,催化体内的左旋精氨酸转变成 L-瓜氨酸而生成。NO 主要由血管内皮细胞合成,是反映血管内皮细胞功能障碍的公认指标之一,当内皮细胞功能障碍时释放 NO 可减少。多项研究支持血管内皮细胞释放 NO 减少与心血管疾病的发生发展呈负相关,改善血管内皮细胞的 NO 水平是心血管疾病治疗的靶点^[2]。UA 对血管内皮细胞功能的损伤机制尚未完全阐明。体外细胞培养发现,UA 可通过内皮细胞的氧化应激和激活 RAS 导致人脐静脉内皮细胞功能障碍^[3]。Gersch 等^[4]报道血浆中的 UA 可直接与 NO 发生快速而且不可逆的反应,生成氨基尿嘧啶,导致 NO 下降而损伤血管内皮细胞功能。有研究认为 UA 对血管内皮细胞功能的损伤是通过氧化应激引起的炎症反应^[5]。最近有研究报道,UA 在体外细胞培养可激活人类 T 细胞,介导炎症反应^[6]。

Khosla 等^[7]通过建立 HUA 大鼠模型,发现血 UA 增高的同时伴有 NO 水平减低,但没有对两者动态观察。本研究动态观察 UA 对血管内皮细胞功能的影响。灌胃后大鼠血 UA 均较基线水平升高,第 4 天大鼠血 UA 较基线水平明显升高,且有统计学意义,表明 HUA 模型建立成功。观察到第 8 天大鼠的血 UA 水平较第 4 天降低,第 12 天又上升。Habu 等^[8]通过实验研究发现,大鼠肾小管的有机阴离子家族(organic anion transporter, rOAT)在血 UA 升高时可代偿表达,加强转运血 UA 到肾小管中,有助于 UA 排出体外,而且在达到平台期前,rOAT 对 UA 转运呈剂量和时间依赖性。第 8 天血 UA 较第 4 天下降,笔者推测期间大鼠肾小管的 rOAT 在达到平台期之前,随着血 UA 的升高而加强对血 UA 排泄,从而引起血 UA 较前下降可能。第 12 天血 UA 水平又升高,可能是肾小管的 rOAT 对血 UA 转运随着时间的延长而达到饱和状态,血 UA 排出到肾小管中减少,导致血 UA 进一步升高。但以上推论缺少测定大鼠尿液中的 UA 水平等相关指标的证据,可待以后进一步研究支持。大鼠血清 NO 水平进行性下降,在第 12 天时血清 NO 水平与基线 NO 比较有统计学意义,在第 8 天大鼠血 UA 水平较第 4 天下降,血清 NO 并没有相应的上升,表明 HUA 对内皮细胞功能损伤呈时间依赖性和持续性,而且早期并不需要尿酸盐沉积在血管内皮细胞才发挥损伤作用。这可能有助于解释 Waring 等^[9]在健康人群中给予 UA 造成急性 HUA,研究 UA 对血管内皮细胞功能的影响,结论认为 UA 没有对血管内皮细胞功能发生损伤作用,其可能原因是其观察时间不够长。

总之,本研究表明 HUA 呈时间依赖性地对大鼠血管内皮细胞功能损伤,而且持续大鼠 HUA 模型符合人体 HUA 的慢性病理状态,较可靠地证实 HUA 对血管内皮细胞功能损伤的影响。但研究只初步探讨 HUA 对血管内皮细胞功能的损伤作用,对其损伤的分子细胞信号传导机制尚需深入研究阐明。

参 考 文 献

[1] Feig DI, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid and cardiovascular risk. N Engl J Med, 2008, 359(17):1811-1821.

- [2] Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*, 2005, 26(1/2):33-65.
- [3] Yu MA, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, 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 Hypertens*, 2010, 28(6):1234-1242.
- [4] Gersch C, Palić SP, Kim KM, et al. Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27(8):967-978.
- [5] Corry DB, Tuck ML. Uric acid and the vasculature. *Curr Hypertens Rep*, 2006, 8(2):116-119.
- [6] Webb R, Jeffries M, Sawalha AH. Uric acid directly promotes human T-cell activation. *Am J Med Sci*, 2009, 337(1):23-27.
- [7] Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int*, 2005, 67(5):1739-1742.
- [8] Habu Y, Yano I, Okuda M, et al. Restored expression and activity of organic ion transporters rOAT1, rOAT3 and rOCT2 after hyperuricemia in the rat kidney. *Biochem Pharmacol*, 2005, 69(6):993-999.
- [9] Waring WS, Adwani SH, Breukels O, et al. Hyperuricaemia does not impair cardiovascular function in healthy adults. *Heart*, 2004, 90(2):155-159.

(收稿日期:2010-08-10)

(本文编辑:郝锐)

黄修献, 吴新华, 李利华, 等. 持续高尿酸血症对大鼠血管内皮细胞功能影响的实验研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(1): 206-208.