

高尿酸血症大鼠肾脏抗氧化酶活力的实验研究

任美玲 马 玲 刘成刚 李冬戈 陈 瑜 贾怀妙

摘 要 **目的** 建成可靠的高尿酸血症(HUA)大鼠模型,研究 HUA 大鼠血清中氧化应激相关指标及肾功能的变化。**方法** 采用单一酵母喂饲和氧嗪酸联合酵母喂饲两种方法建成可靠的 HUA 大鼠模型,检测尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、过氧化氢的含量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力水平。**结果** 酵母组和氧嗪酸酵母组 UA、BUN、CREA 值均高于对照组($P < 0.05$);酵母组和氧嗪酸酵母组 SOD 活力明显低于对照组($P < 0.05$);相比对照和酵母组,氧嗪酸酵母组 GSH-Px 活力明显降低($P < 0.05$);过氧化氢差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 单一酵母喂饲和氧嗪酸联合酵母喂饲均可建成可靠的 HUA 大鼠模型;两种喂饲方法诱导的 HUA 模型大鼠机体处于氧化应激状态,肾功能出现损害。

关键词 高尿酸血症 氧化应激 肾损伤

中图分类号 R151.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.006

Experimental Study on Antioxidant Enzyme Activity in Kidney of Rats with Hyperuricemia. Ren Meiling, Ma Ling, Liu Chengang, et al. School of Public Health, Xinjiang Medicine University, Xinjiang 830054, China

Abstract Objective HUA rat model was established to study the changes of serum oxidative stress and renal function in HUA rats. **Methods** A reliable HUA rat model was established by single yeast feeding and oxoxalic acid combined with yeast feeding. Detection of the vitality level of UA, CREA, BUN, SOD, GSH-Px and hydrogen peroxide was done. **Results** The UA, BUN and CREA values of yeast group and oxymatrine group were higher than those of control group ($P < 0.05$). The activity of SOD in yeast group and oxazinium yeast group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). Compared with yeast and control, GSH-Px activity was significantly decreased ($P < 0.05$), but there were no differences in hydrogen peroxide ($P > 0.05$). **Conclusion** A reliable HUA rat model can be constructed by two methods: single yeast feeding and aerobic ammonium sulfate combined with yeast feeding. Two kinds of feeding methods induced HUA model rats were in oxidative stress state, renal function damage.

Key words Hyperuricemia; Oxidative stress; Renal injury

由于遗传性和(或)获得性原因引起尿酸排泄减少和(或)嘌呤代谢障碍,导致血尿酸(uric acid, UA)升高,从而引发高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)。大量调查研究表明,目前全球 HUA 发生率高达5%~25%^[1,2]。2013 年相关报道显示,我国目前约有 1.2 亿 HUA 患者,且表现出发生率高、人群趋向年轻化、经济快速发展地区高于贫困落后地区的流行趋势^[3,4]。多方面研究发现 HUA 与高血压、心血管疾病、代谢综合征以及肾脏疾病关系密切,特别是对肾脏的损伤^[5]。任何原因引起的肾脏损害都会使血清

UA 水平升高,肾脏损害和 HUA 之间为恶性循环,最终引起肾衰竭^[6]。氧化应激是病理条件下,由于活性氧(reactive oxygen species, ROS)、活性氮(reactive nitrogen species, RNS)生成过多,或清除能力下降,引起组织氧化损伤^[7]。对于尿酸的抗氧化和促氧化作用,学术界争议不断。不少研究表明,尿酸是 ROS 的强力清除剂,有抗氧化及保护血管内皮的作用。近年来更多研究表明,UA 抗氧化作用有局限性,轻微水平的 HUA 即可使 UA 由抗氧化剂转变为促氧化剂。因此,UA 被认为可由多种途径打破机体氧化-还原平衡,促使应激状态^[8]。本研究通过建立可靠的 HUA 模型及相关指标检测,进一步探讨高 UA 水平对机体氧化应激及肾功能的影响,也为开展有针对性的干预及此类疾病的治疗提供依据。

材料与方法

1. 实验动物:新疆医科大学动物实验中心供给 30 只健康成年雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠,体重

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB722400)

作者单位:830054 乌鲁木齐,新疆医科大学公共卫生学院(任美玲、马玲);832000 新疆兵团第八师石河子市疾病预防控制中心(任美玲、刘成刚、陈瑜、贾怀妙);830054 乌鲁木齐,新疆医科大学第六附属医院(李冬戈)

通讯作者:马玲,电子信箱:1318700841@qq.com

216.1 ± 15.2 g, 实验动物许可证号为 SYXK(新)2003 - 0004。饲养条件: 12h 昼夜光照, 相对湿度 45% ~ 60%, 温度 22 ~ 25℃。顺应性喂饲 7 天后, 随机分 3 组, 每组 10 只, 依次为对照组(普通饲料)、酵母组(酵母饲料)和氧嗪酸钾 + 酵母组(腹腔注射 + 酵母饲料)连续造模 4 周, 每天染毒 1 次, 容量为 4ml/kg。每天观察大鼠皮毛精神、食粪尿量等情况, 称重并记录。整个实验过程中, 动物可自由饮水。

2. 试剂与设备: 氧嗪酸钾购自美国 Oxoid 公司, 97% 酵母购自美国 Sigma 公司, 羧甲基纤维素钠粉剂(福晨化学试剂厂), 过氧化氢、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)试剂盒均购自南京建成工程研究所, LX20 全自动生化分析仪购自美国 Beckman 公司, 高速台式离心机(TGL - 16B, 上海), 恒温水浴箱(NTS - 4000B, EYELA), 可见分光光度计, 电子分析天平, 酶标仪等。

3. 检测方法及指标: 染毒造模结束后, 各组大鼠禁食、禁水 12h 后, 用 20% 乌拉坦、5ml/kg 体重麻醉, 经腹主动脉取血, 静置 1h 后, 高速离心并在 2h 内分离血清, 装管检测。以 UA 程度连续不变高于对照作为 HUA 大鼠造模成功依据。用生化分析仪检测血清 BUN、CREA、UA 的含量, 用试剂盒测定酶活性, 其中, 可见光分光光度法测过氧化氢含量, 血清 SOD 用黄嘌呤氧化酶法, GSH - Px 用二硫对二硝基苯甲酸(DTNB)直接显色法, 试剂均质控合格。

表 2 大鼠肾脏抗氧化酶活力比较($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	GSH - Px (U/L)	SOD (U/ml)	过氧化氢 (mmol/L)
对照组	3594.81 ± 874.94	176.14 ± 25.67	185.84 ± 104.97
酵母组	3627.12 ± 1315.36	127.93 ± 27.79 *	179.77 ± 80.01
氧嗪酸酵母组	2502.03 ± 1005.84 * #	109.05 ± 61.50 *	210.96 ± 102.64

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与酵母组比较, # $P < 0.05$

3. HUA 建模对大鼠肾脏的影响: 与对照组比较, 酵母组和氧嗪酸酵母组大鼠 UA、BUN、CREA 明显升高($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 相较酵母组, 氧嗪酸酵母组 CREA 升高、BUN 降低($P < 0.05$), 差异有统计学意义(表 3)。

表 3 HUA 建模对大鼠肾脏的影响($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

组别	UA	BUN	CREA
对照组	93.07 ± 17.81	10.15 ± 0.60	42.64 ± 2.28
酵母组	138.32 ± 30.10 *	14.20 ± 1.23 *	56.46 ± 6.33 *
氧嗪酸酵母组	150.43 ± 71.91 *	12.49 ± 1.46 * #	62.58 ± 8.96 * #

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与酵母组比较, # $P < 0.05$

4. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析, 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。经正态性、方差齐性检验后, 多组比较采用 One - way ANOVA 分析; 两两比较, 方差齐, 进行 SNK 检验, 方差不齐, 进行 Games - Howell 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HUA 建模对大鼠体重的影响: 与对照组比较, 酵母组大鼠体重增加明显; 氧嗪酸酵母组体重略有下降, 且大鼠精神不振, 皮毛无光泽, 多饮多尿。染毒造模后, 各组大鼠均无死亡。3 组大鼠体重比较, 差异无统计学意义(表 1)。

表 1 HUA 建模对大鼠体重的影响($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{g}$)

组别	造模前	第 2 周	第 4 周
对照组	216.07 ± 14.41	289.15 ± 21.60	306.64 ± 18.08
酵母组	218.33 ± 21.10	296.20 ± 31.03	312.06 ± 31.03
氧嗪酸酵母组	216.03 ± 14.71	281.79 ± 12.46	291.52 ± 14.16

2. 大鼠肾脏抗氧化酶活力比较: 与对照组比较, 酵母组和氧嗪酸酵母组 SOD 活力明显降低($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 氧嗪酸酵母组 GSH - Px 活力明显低于对照和酵母组($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 3 组过氧化氢含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 2)。

讨 论

复制大鼠 HUA 模型, 若血 UA 升高不能达到较高水平或高 UA 水平维持时间过短, 均很难观察实验过程, 导致研究结论不可靠, 故本研究采用了单一酵母喂饲和氧嗪酸联合酵母喂饲两种方法造模。造模实验动物的选择以禽类和啮齿类最常见^[9]。但禽类嘌呤代谢途径虽与人类相似, 却非哺乳动物, 其生理特征等与人类相差甚远, 普通实验室也无法饲养, 用其造模对后续应用很受限, 故未采用。啮齿类属哺乳动物, 操作及饲养简便, 且与人类多方面理化特征相近, 由于雌、雄大鼠的血尿酸正常值差别较大, 雌鼠个

体间尿酸值波动较明显可能与其体内激素分泌有关^[10]。故本研究选取雄性大鼠。国内制备持续性大鼠 HUA 模型主要采用嘌呤类和尿酸酶抑制剂,但腺嘌呤有毒性作用,大量服用会增加动物病死率,同时可能会造成严重的肾脏损害;氧嗪酸钾的结构与尿酸嘌呤环类似,能在短时间内增高血尿酸水平,并可维持较长时间,是目前国内外 HUA 造模最常见药物^[11]。有研究者认为使用氧嗪酸钾造模必须连续给药,中途不能停药,否则造模效果会受到影响^[12]。本研究造模:单纯酵母喂饲、氧嗪酸 100mg/(kg·d)腹腔注射+酵母喂饲,连续造模 4 周不间断。相较对照,两实验组 UA 水平升高显著,且差异有统计学意义,各组大鼠体重增长稳定,可认为建立了可靠的 HUA 大鼠模型。

近年来 HUA 颇受关注,主要原因是 HUA 患者易发生多种血管性疾病,这可能与 UA 诱导氧化应激、炎症反应等密切相关^[13]。当尿酸与某些氧化物反应时,能产生促进自由基链反应的其他自由基,并氧化损伤细胞。尿酸本身及其下游自由基可能作为生物活性炎症因子,通过活化 NADPH 氧化酶依赖性途径产生细胞内氧化物,进而活化细胞内氧化-还原依赖性信号转导通路导致氧化应激^[14]。SOD 是机体内天然的超氧自由基清除因子;过氧化氢是体内最常见的一种氧自由基,也是造成组织器官损伤的主要 ROS 成分;GSH-Px 是“抗氧化剂复合链”的主要成员之一,能催化过氧化氢生成水和氧化型谷胱甘肽^[15]。

SOD、GSH-Px 和过氧化氢酶作为体内主要的抗氧化酶,相互间还起保护作用,SOD 保护 GSH-Px 和过氧化氢酶免受 O_2^+ 的灭活,同时 GSH-Px 和过氧化氢酶保护 SOD 不被过氧化氢灭活,所以 SOD、GSH-Px 和过氧化氢中任何一个减少,均会对机体的抗氧化能力造成严重影响。试验中酵母组、氧嗪酸酵母组大鼠血清中 SOD 活力显著降低,提示机体大量自由基形成,SOD 清除氧自由基能力明显降低。相比对照组,酵母组 GSH-Px 活力无显著变化,提示酵母组大鼠细胞正处于防御阶段;氧嗪酸酵母组 GSH-Px 活力程度显著降低,提示机体过氧化物增多,抗氧化能力下降。3 组过氧化氢比较差异无统计学意义,可能是其生成与消耗相差不大,但也不排除由于样本量小所造成的第 2 类错误,有待于进一步研究。造模成功后,相较对照组,酵母组和氧嗪酸酵母组大鼠血清中 BUN 和 CREA 均显著增加,且差异有

统计学意义,提示该两组大鼠均出现肾脏损害。

从本研究结果可以看出,单一酵母喂饲和氧嗪酸联合酵母喂饲都能建立稳定的 HUA 模型,两种方法喂饲的 HUA 模型大鼠抗氧化能力下降,机体处于氧化应激状态,且出现肾脏损伤。高尿酸血症的发病机制与机体氧化应激存在着密切的关系,氧化应激可能参与对肾脏的损伤。

参考文献

- 1 张美琳,黄国伟.膳食因素与高尿酸血症及代谢综合征关系研究进展[J].中国慢性病预防与控制,2010,18(4):433-435
- 2 Alikor CA,Emem-Chioma PC,Odia OJ. Prevalence of hyperuricaemia in a rural population of Nigerian Niger Delta region[J]. Niger J Med,2013,22(3):187-192
- 3 中国医师协会心血管内科医师分会.无症状高尿酸血症合并心血管疾病诊治建议中国专家共识[J].中国医学前沿杂志,2010,2(3):4
- 4 陈伟,肖杨.高尿酸血症与相关疾病的研究进展[J].中国实验诊断学,2016,1(20):2147-2150
- 5 Pantsulaia T. Role of TGF-beta in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Georgian Med News,2006;13-18
- 6 Yamada A,Sato KK,Kinuhata S, et al. Association of visceral fat and liver fat with hyperuricemia[J]. Arthritis Care Res;Hoboken,2016,68(4):553-561
- 7 朱林佳,张红.氧化应激在慢性胰腺炎发病机制中的作用研究进展[J].新乡医学院学报,2016,33(3):239-242
- 8 Sautin YY,Johnson RJ. Uric acid the oxidant-antioxidant paradox[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids,2008,27(6):608-619
- 9 林伟青,谢建祥.高尿酸血症动物模型研究进展[J].中国药物与临床,2005,5(2):115-118
- 10 刘淑芬,曾学军.高尿酸血症动物模型研究进展[J].基础医学与临床,2011,31(3):344-347
- 11 Zhao X,Zhu J X,Mo S F, et al. Effects of cassia oil on serum and hepatic uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver[J]. J Ethnopharmacol,2006,103(3):357-365
- 12 Mazzali M,Kanellis J,Han L, et al. Hyperuricemia induces a primary renal arteriolopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2002,282(6):991-997
- 13 Jin M,Yang F,Yang I, et al. Uric acid,hyperuricemia and vascular diseases[J]. Front Biosci;Landmark Ed,2012,17:656-669
- 14 Krishnan E. Inflammation,oxidative stress and lipids;the risk triad for atherosclerosis in gout[J]. Rheumatology;Oxford,2010,49(7):1229-1238
- 15 Bahrami S,Hatam GR,Razavi M. In vitro cultivation of axenic amastigotes and the comparison of antioxidant enzymes at different stages of Leishmania tropica[J]. Trop Biomed,2011,28(2):411-417

(收稿日期:2017-05-15)

(修回日期:2017-06-20)