

高尿酸血症诱导心血管内皮细胞损伤的实验研究

滕志涛 汤金霞 郭志勇 陈聪 赵培勇 秦春新

【摘要】 目的 研究高尿酸血症对血管内皮氧化氮产物合酶的影响而诱发的血管内皮功能损伤。方法 体内研究方面,通过饲喂尿酸酶抑制剂在实验大鼠体内制造高尿酸血症。饮水方式服用别嘌呤醇作为阻断剂来拮抗高尿酸血症。40只大鼠被随机分为对照组,别嘌呤醇组,氧嗪酸钾盐组(尿酸酶抑制剂)和联合用药组(别嘌呤醇+尿酸酶抑制剂),每组10只。于实验的第1、8天断头处死各组5只大鼠,并检测其血清尿酸及氧化氮产物(亚硝酸盐/硝酸盐)水平。体外研究方面,采用人脐静脉内皮细胞系 ECV-304,观察不同浓度的尿酸对人脐静脉内皮细胞不同时间氧化氮产物水平的影响。结果 第8天,联合用药组与氧嗪酸钾盐组比较,血清尿酸明显下降[(0.70±0.09) mg/L vs. (1.67±0.16) mg/L],氧化氮产物[(1.54±0.33) mmol/L vs. (0.98±0.26) mmol/L, 均 $P<0.05$]升高。与对照组比较,氧嗪酸钾盐组第1天氧化氮产物[(1.32±0.28) vs. (1.59±0.24) mmol/L]、第8天氧化氮产物[(0.98±0.26) mmol/L vs. (1.57±0.28) mmol/L]均减少;0、20、40、60 mg/L的尿酸对培养的 ECV-304 细胞产生的氧化氮产物洗脱后 20 min 相对强度分别为 387 a.u.、352 a.u.、282 a.u.、166 a.u.;氧嗪酸钾盐组第8天收缩压较对照组增高[(168.4±18.2) mmHg vs. (149.8±14.6) mmHg] ($P<0.05$)。结论 氧嗪酸钾盐可以诱导大鼠产生高尿酸血症,进一步导致血清氧化氮产物水平降低,这种作用可以通过应用别嘌呤醇降低尿酸水平得到改善。细胞水平研究发现尿酸会降低 ECV-304 细胞的氧化氮产物浓度。

【关键词】 高尿酸血症; 氧化氮类; 别嘌呤醇; 内皮功能损伤

虽然一些文献认为高尿酸血症与健康成年人的心血管功能障碍没有关系^[1],但是更多的研究支持高尿酸血症的存在与心血管及肾脏疾病紧密关联,并且其可能的相关机制是通过产生活性氧类物质引起内皮功能损伤^[2]。活性氧类物质和尿酸的产物黄嘌呤氧化酶可能最终发挥了致病作用。研究表明,黄嘌呤氧化酶的抑制剂别嘌呤醇可以逆转内皮细胞损伤^[3]。此外,一些动物实验也显示,由高尿酸血症诱导的高血压和血管疾病至少可以在一定程度上被一氧化氮合酶底物——L精氨酸所减轻^[4]。心血管疾病患者的内皮功能障碍病理过程主要受活性氧产物的介导,最终损害一氧化氮的产生。活性氧物质可以由多种机制产生,其中之一就是黄嘌呤氧化酶反应的产物产生超氧化物阴离子。本文主要观察、分析了通过使用尿酸酶抑制剂(氧嗪酸钾盐)而制造的动物高尿酸血症动物模型和经过尿酸培养后 ECV-304 细胞氧化氮产物的变化过程。

一、材料与方法

1. 动物与方法: 选取 40 只饲养于标准动物实

验环境内的雌性 wistar 大鼠(由浙江大学动物饲养中心提供,采用标准鼠粮饲养,鼠粮由浙江大学动物饲养中心制备,分组单独饲养。动物合格证:浙医鼠 2009022302,采用浙医制分组专业鼠笼饲养)经口途径服用尿酸酶抑制剂氧嗪酸钾盐而产生高尿酸血症。

2. 体内研究: 正常对照鼠仅服用药物溶剂。通过饮水服用别嘌呤醇用于阻断高尿酸血症并作为对照组。大鼠共分为 4 组: 对照组、氧嗪酸钾盐组、别嘌呤醇组以及联合用药组(各 10 只)。在实验的第 1、8 天,每组各五只大鼠被分别断头处死,取血离心后用全自动生化分析系统免疫荧光法(日立, 7600-010)分析血清尿酸浓度以及亚硝酸盐/硝酸盐水平。

3. 体外研究: 使用本实验室自有的人脐静脉内皮细胞系 ECV-304 用于体外研究。设置 4 个细胞组,每组 12 孔细胞。待细胞生长密度适中后,分别使用不同浓度的尿酸(20、40、60 mg/L)进行处理,然后分别进行不同时间段(0、5、10、15、20 min)的氧化氮产物测量。对照组及经尿酸酶抑制剂处理的各组氧化氮产物水平均经荧光法氧化氮产物检测试剂盒(碧云天公司, S0025)测量,实验重复

表1 四组大鼠尿酸、氧化氮产物指标变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	尿酸平均值(mg/L)			氧化氮产物平均值(mmol/L)		
	第1天	第8天	P值	第1天	第8天	P值
对照组	0.78±0.09	0.76±0.09		1.59±0.24	1.57±0.28	
氧嗪酸钾盐组	0.93±0.12	1.67±0.16 ^a	0.02	1.32±0.28 ^a	0.98±0.26 ^a	0.03
别嘌呤醇组	0.76±0.08	0.74±0.10		1.58±0.36	1.58±0.31	
联合用药组	0.91±0.13	0.70±0.09 ^b	0.02	1.40±0.27	1.54±0.33 ^b	0.03

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与氧嗪酸钾盐组比较, ^b $P<0.05$

两次。首先, 各处理组内皮细胞使用培养液清洗一遍, 随后加入分子探针 DAFFM 于 37 °C 暗环境下孵育 30 min。之后洗去探针并加入含 100 μmol/L 的 L-精氨酸(氧化氮产物合酶底物)于细胞中并再孵育 10 min。之后于荧光显微镜下直接观察氧化氮产物。各处理组均每隔 5 min 测定一次, 共测 5 次, 荧光强度使用荧光定量软件进行。

4. 统计学分析: 4 组间血尿酸水平、氧化氮产物均数差别比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)方法进行处理, 组间两两比较采用 q 检验(SNK)方法, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 氧嗪酸钾盐诱导高尿酸血症: 各个分组同组内各大鼠基础尿酸差异无统计学意义($P>0.05$)。别嘌呤醇组血清尿酸与氧嗪酸钾盐组比较, 联合用药组第 1 天血清尿酸浓度轻度下降, 联合用药组与氧嗪酸钾盐组第 8 天比较血清尿酸浓度明显下降差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 1。

2. 氧嗪酸钾盐组氧化氮产物降低: 与对照组比较, 氧嗪酸钾盐组大鼠氧化氮产物减少, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与氧嗪酸钾盐组比较, 联合用药组氧化氮产物第 1 天无差异, 在第 8 天升高。别嘌呤醇组大鼠氧化氮浓度未见明显变化。同组内各大鼠氧化氮产物差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

3. 尿酸降低 ECV-304 细胞产生的氧化氮产物: 体外实验研究了尿酸与培养的 ECV-304 内皮细胞氧化氮产物的相互影响关系。结果显示, 尿酸可以呈剂量依赖性方式抑制氧化氮的产生(培养液尿酸浓度分别为 0, 20, 40, 60 mg/L)。洗脱后 20 min 相对强度分别为 387 a.u.、352 a.u.、282 a.u.、166 a.u. 0~20 min 浓度曲线如图 1 所示。

三、讨论

高尿酸血症是一种常见的临床疾病, 在沿海地区, 血尿酸升高与嘌呤的过量合成和肾脏对尿酸的

排出减少有关。高尿酸血症可以诱发多种心血管疾病, 许多临床研究结果表明, 高尿酸血症和痛风易与肥胖、糖尿病及高血压等疾病并存。高尿酸血症对心血管疾病的影响可能与其诱导血管内皮损伤有关, 在高血压发病方面血清尿酸水平每增加 1 mg/dl, 发生高血压的危险就增加 23%, 高尿酸血症已成为高血压的独立危险因素。在我国陈涛等^[5]调查了 7 839 例资料发现高血压前期的危险随着尿酸水平的增加而增加, 而这一影响与性别相关, 流行病学发现在女性人群中高尿酸水平与高血压和高血压前期相关联^[6]。高尿酸血症对血管损伤的具体机制尚不清楚, 而干预高尿酸血症对血管内皮功能的影响尚无实验依据。

考虑到性别的影响, 本文选择了雌性大鼠作为实验对象, 本文发现实验大鼠服用尿酸酶抑制剂会发展为明显的高尿酸血症, 而诱导出的高尿酸血症显示出可以导致氧化氮产物水平降低, 业已发现氧化氮产物合成异常与高血压、冠心病等多种心血管疾病有关。本研究动物体内结果证实高尿酸血症可以导致氧化氮产物减少, 在体外细胞培养高尿酸血症抑制血管内皮细胞氧化氮产物浓度, 而且这种抑制与尿酸浓度线性相关, 在体和体外细胞研究结果揭示了高尿酸血症与心血管疾病之间的机制联系。之前一直缺乏高尿酸与心血管疾病之间的“桥”的实验依据, 根据本研究结果可以推测高尿酸血症抑制氧化氮产物合成是其导致心血管疾病的机制之一, 同时本文发现大鼠的在体试验证实高尿酸血症大鼠的血清亚硝酸盐水平下降的变化可以被别嘌呤醇逆转随即伴有氧化氮产物的相应变化, 通过反向推断进一步证实了高尿酸血症对氧化氮产物的影响。

研究采用的 ECV-304 细胞是人脐静脉血管内皮细胞株, 血管内皮细胞为人体最大的内分泌器官, 主要依靠合成氧化氮产物和内皮素等调节血压, 体外实验发现尿酸可以损害培养的内皮细胞基

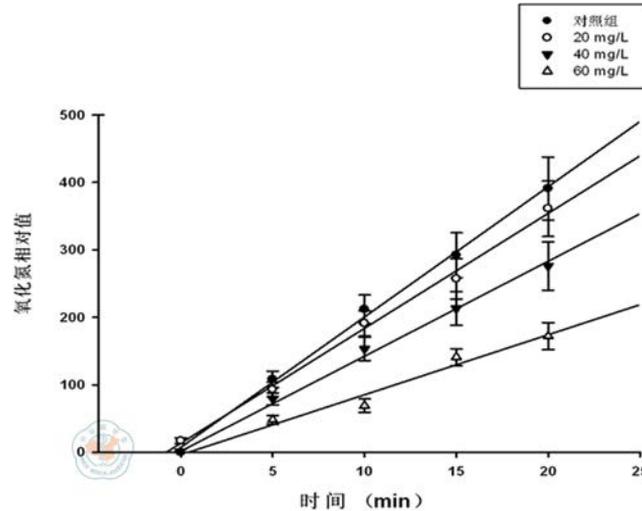


图1 尿酸对氧化氮产物的抑制作用

础的氧化氮产物产生量。结果提示高尿酸血症可以通过损害血管内皮细胞产生氧化氮产物的功能，而且抑制程度成浓度依赖性。而在流行病学也发现高尿酸与患高血压前期和高血压的危险存在着剂量一反应关系^[6]。这也从另一方面印证了本研究结果。

高尿酸血症导致氧化氮产物合成减少的具体机制可能与尿酸介导的氧化应激和炎症反应有关^[7]，高尿酸血症是结果之一或是始动因素目前尚无定论，目前可以肯定高尿酸血症是高血压的独立危险因素，有研究^[8]显示高尿酸血症个体中 TNF- α 308A 携带者的基因型与高尿酸血症伴脂代谢紊乱和高血压有关。

虽然我们通过所采用的这一种实验方法及实验动物物种确立了本文结论，但还需要进一步使用其他方法在其他动物种属上进行实验验证以获得更加充分的数据资料以证实该现象存在于人类心血管疾病的发展过程中，另外静脉内皮细胞与动脉内皮细胞分泌功能的差异尚需要进一步对比研究。

参 考 文 献

- [1] Waring WS, Adwani SH, Breukels O, et al. Hyperuricaemia does not impair cardiovascular function in healthy adults[J]. *Heart*, 2004, 90(11): 155-159.
- [2] Feig DI, Kang DH, Nakagawa T, et al. Uric acid and hypertension[J]. *Curr Hypertens*, 2006, 8(9): 111-115.
- [3] Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction[J]. *Kidney*, 2005, 67(3): 1739-1742.
- [4] Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Lopez-Molina R, et al. Effects of acute and chronic L-arginine treatment in experimental hyperuricemia[J]. *Am J Physiol Renal*, 2007, 292(1): F1238-1244.
- [5] 陈涛, 李卫, 胡泊, 等. 尿酸与高血压前期的关系[J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16(8): 688-691.
- [6] 彭浩, 丁建松, 彭颖, 等. 女性人群血清尿酸水平与高血压及高血压前期的关系[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 19(3): 236-239.
- [7] 闫婕, 陶慧, 林发全. 血尿酸水平与血管内皮细胞损伤关系的研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2013, 15(9): 996-999.
- [8] 李成乾, 王芳, 王颜刚. 高尿酸血症患者 G-308A TNF- α 基因型分布与心血管疾病危险因素相关性研究[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2010, 10(1): 29-32.

(收稿日期: 2014-02-24)
(本文编辑: 张岚)