

# 高尿酸血症对大鼠血压和血清脂联素的影响

赵平, 张向阳, 迪力达尔·希力甫

(新疆医科大学第一附属医院心脏中心, 新疆乌鲁木齐市 830054)

[关键词] 高尿酸血症; 脂联素; 一氧化氮; 内皮素 1; 高血压

[摘要] 目的 观察高尿酸血症对大鼠血压和血清脂联素的影响, 探讨高尿酸血症导致的血清脂联素的变化与血管内皮功能的关系。方法 36 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组。使用高酵母膏饲料联合氧嗪酸钾悬液腹腔注射 6 周诱导大鼠高尿酸血症 ( $n=12$ )。别嘌醇组 ( $n=12$ ) 在给予酵母提取物和氧嗪酸钾同时给予别嘌醇灌胃。普通饲料饲养的大鼠作为对照 ( $n=12$ )。测量大鼠收缩压。6 周后处死大鼠, 全自动生化分析仪检测血清尿酸, ELISA 法检测血清脂联素、一氧化氮和内皮素 1, 免疫组织化学法检测大鼠主动脉内膜层内皮型一氧化氮合酶的表达量。结果 与正常对照组相比, 模型组大鼠血尿酸、内皮素 1、收缩压显著升高, 血清脂联素、一氧化氮及主动内膜层内皮型一氧化氮合酶表达量显著降低。与模型组相比, 别嘌醇组血尿酸、内皮素 1、收缩压降低, 血清脂联素和一氧化氮水平升高, 主动脉内膜内皮型一氧化氮合酶表达增加。脂联素与血尿酸、内皮素 1、收缩压呈负相关。结论 高尿酸血症诱导的大鼠高血压与血清脂联素、一氧化氮的降低及内皮素的升高有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Influence of Hyperuricemia on Blood Pressure and Serum Adiponectin in Rats

ZHAO Ping, ZHANG Xiang-Yang, and Dilidaer Xilifu

(Heart Central of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

[KEY WORDS] Hyperuricemia; Adiponectin; Nitric Oxide; Endothelin 1; Hypertension

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the impact of hyperuricemia (HUA) on blood pressure and serum adiponectin (APN) and to explore the relationship between endothelial function and the change of serum APN induced by hyperuricemia. **Methods** Thirty six male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups. HUA was induced in rats over 6 weeks by a high yeast extract (YE) diet united intraperitoneal injection of potassium oxonate (OA) suspension ( $n=12$ ). Allopurinol was administered simultaneously with the OA and YE in allopurinol treatment group. Normal diet fed rats were used as control. Systolic blood pressure (SBP) was measured. At the end of 6th week plasma uric acid were detected by automatic biochemical analysis. APN, endothelin 1 (ET-1), nitrogen monoxidum (NO) were measured by ELISA and the expression of endothelial nitricoxide synthase (eNOS) in aortic tunica intima was assessed by immunohistochemistry. **Results** Compared with control, levels of UA, ET-1, SBP were significantly higher in model group, but levels of APN, NO and expression of eNOS in aortic tunica intima were significantly lower. There was an increase of serum APN, NO and higher expression of eNOS in aortic tunica intima in allopurinol treatment group, but a decrease of UA, ET-1 and SBP. APN was negatively related to SUA, ET-1 and SBP. **Conclusion** Decrease of serum adiponectin and nitric oxide, and increase of endothelin 1 levels may be involved in the hyperuricemia induced hypertension in rats.

脂联素 (adiponectin, APN) 是脂肪细胞分泌的 30 kDa 的细胞因子<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2,3]</sup>证实血 APN 水平与血管内皮舒张功能有关, 是一种血管内皮保护性细胞因子。APN 的分泌和调节受多种因素的影响, 文献[4]表明血 APN 与血尿酸呈负相关, 但血 APN

水平是否受高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 的影响尚未知。高尿酸血症和低血脂联素均与血管内皮功能紊乱密切相关。本文拟通过建立高尿酸血症大鼠模型, 观察高尿酸血症诱导的高血压大鼠血清 APN、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和内皮素 1 (endoth

[收稿日期] 2011 03 20

[作者简介] 赵平, 硕士研究生, 医师, E-mail 为 doctorzhaop@163.com。通讯作者张向阳, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的基础与临床研究。迪力达尔·希力甫, 博士研究生, 医师。

elin 1, ET 1) 水平的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

体重 200 ~ 220 g 的雄性 SD 大鼠 36 只, 由新疆医科大学实验动物中心 (SCXK (新) 2003 2001) 提供。

### 1.2 主要仪器设备

低速自动平衡离心机 LD25 2; BECKMAN 全自动生化分析仪 (DXC800) 以检测血清尿酸 (UA)、肌酐 (SCr)、尿素氮 (BUN); 酶联免疫吸附法血清 APN、NO、ET 1 BIO RAD 伯乐 680 型全自动酶标仪; 高清彩色病理图像系统 (Motic Auto Microscope System 1.0, 德国)。

### 1.3 药品与试剂

按 1 kg 酵母提取物 [YE, 北京奥博星生物技术有限责任公司 (20090705)] 加入 4 kg 基础饲料压制含 20% 酵母膏的高酵母颗粒型饲料 (YE 饲料); 氧嗪酸钾 [OA, 德国 Aldrich Chemical Company (20120312 本品为尿酸酶抑制剂)], 与生理盐水混匀, 配成 30 g/L 混悬液; 别嘌醇片 [重庆科瑞制药有限公司 (H50020455)], 碾碎与生理盐水混匀配成 10 g/L 的混悬液; 大鼠 APN、NO、ET 1 酶联免疫分析试剂盒购自美国 R&D 公司; 一抗兔抗大鼠 NOS 3 (eNOS) 抗体 [北京奥博星生物技术有限公司 (bF 0163R)]; 二抗免疫组织化学法染色试剂盒 [北京中杉金桥公司 (SP9002)]。

### 1.4 实验分组和处理

36 只大鼠预饲养 1 周后称重 (平均 200 ~ 220 g), 随机分为 3 组, 每组 12 只。正常对照组: 普通饲料饲养; 模型组: YE 饲料饲养, 同时给予 OA 200 mg/(kg · d) 腹腔注射; 别嘌醇组: 在接受与模型组相同处理的同时给予别嘌醇 50 mg/(kg · d) 灌胃。各组大鼠自由饮水。灌胃及腹腔注射量均为 0.5 mL/100 g。大鼠每周称重两次, 据体重变化调整给药量。第 6 周末大鼠在接受 OA 注射 2 h 左右实施安乐死, 各组同时处死采样。自腹主动脉采血 5 mL, 低速离心机 3000 r/min 离心 15 min, 留血清。分离大鼠胸主动脉, 10% 甲醛固定, 经脱水、包埋, 制成 4 μm 厚的切片。

### 1.5 大鼠收缩压的测量

尾套法测量收缩压 (SBP), 动物预饲养期间对其进行血压测量预训练, 以使之适应该操作。分别在 0 周、2 周、4 周、6 周周末测量 SBP, 每次每只重

复测 3 次, 取其平均值。

### 1.6 免疫组织化学法检测胸主动脉内膜层内皮型一氧化氮合酶表达

链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶法检测大鼠胸主动脉内膜层内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 表达量。切片常规脱蜡复水, 蒸馏水洗片 3 次; 柠檬酸钠液进行抗原修复, 0.01% 的 PBS (以下浓度同此) 洗片 3 次; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除内源性过氧化物酶, PBS 洗片 3 次, 正常山羊血清封闭液封闭 10 min; 滴加按 1:200 稀释的一抗工作液, 4 °C 过夜后 PBS 洗片 3 次; 滴加生物素标记的二抗 (1:200), 37 °C 保温 30 min 后 PBS 洗片 3 次; 滴加 HRP 标记的链霉素抗生物素蛋白 (1:300), 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗片 3 次。加入配好的 DAB 显色液, 光镜下 (10 倍) 观察, 蒸馏水冲洗终止反应; 苏木素复染细胞核。经脱水和封片在光镜下 (400 倍) 观察并照相。血管内膜棕黄色颗粒为 eNOS 蛋白免疫组织化学染色阳性, 高倍镜下随机选择 5 个视野, 计算每个视野 eNOS 表达所占面积百分比, 取其均值作为蛋白表达的相对含量。

### 1.7 大鼠血脂联素、一氧化氮、内皮素 1 的检测

采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清 APN、NO 和 ET 1。纯化的大鼠 APN、NO 和 ET 1 抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 向包被单抗的微孔中加入待测指标使之与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的待测指标抗体结合, 形成抗原-抗体-酶标复合体, 彻底洗涤后加底物 TMB 使酶降解而出现呈色。TMB 在 HRP 酶的转化下生成蓝色, 经酸作用最终成黄色。在酶标仪上测定其 OD 值, 再由标准曲线计算样品浓度。

### 1.8 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两间比较采用 *q* 检验, 变量间分析采用 Pearson 相关性分析。所有数据均采用 SPSS13.0 统计软件进行处理, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清尿酸、脂联素、一氧化氮、内皮素 1 和收缩压水平

与正常对照组相比, 6 周后模型组血清 UA、ET-1 和 SBP 显著升高, 差异有统计学意义 (*P* < 0.001); 而血 APN、NO 明显降低 (*P* < 0.05)。别嘌醇组大鼠血清 UA 水平与正常对照组差异无显著性 (*P* > 0.05), 但别嘌醇组大鼠血 APN 和 NO 水平比模型组显著升高, 血清 UA、ET 1 水平和 SBP 比模型组显著降低 (*P* < 0.05; 表 1)。

表 1. 6 周时各组大鼠血清尿酸、脂联素、一氧化氮、内皮素 1、收缩压水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Results of serum UA, APN, and NO in all groups at the end of 6th week( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	UA( $\mu\text{mol/L}$ )	APN( $\mu\text{g/L}$ )	NO( $\mu\text{mol/L}$ )	ET 1( $\mu\text{g/L}$ )	SBP( mmHg)
正常对照组	45.1 $\pm$ 5.6	63.6 $\pm$ 9.2	24.1 $\pm$ 2.0	85.2 $\pm$ 8.7	115.8 $\pm$ 4.6
模型组	216.0 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	52.6 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	17.2 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	163.1 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	156.0 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>
别嘌醇组	44.8 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>	59.6 $\pm$ 9.2 <sup>b</sup>	22.1 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	92.9 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	119.2 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.001$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

### 2.2 不同时期各组大鼠收缩压的变化

0 周时各组大鼠 SBP 均在基线水平, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。第 2 周时模型组大鼠 SBP 开始高于正常对照组 (124.1  $\pm$  5.1 mmHg 比 110.8  $\pm$  3.5 mmHg,  $P < 0.05$ ); 别嘌醇组 SBP 虽高于正常对照组, 但差异无统计学意义 (120.8  $\pm$  4.7 mmHg 比 110.8  $\pm$  3.5 mmHg,  $P > 0.05$ )。第 4 周时模型组大鼠 SBP 较正常对照组明显升高 (146.2  $\pm$  4.5 mmHg 比 110.8  $\pm$  4.5 mmHg,  $P < 0.05$ ); 而别嘌醇组 SBP 与正常对照组接近 (116.6  $\pm$  6.1 mmHg 比 110.8  $\pm$  4.5 mmHg,  $P > 0.05$ ), 但明显低于模型组 ( $P < 0.05$ )。第 6 周时模型组大鼠 SBP 依然显著高于正常对照组和别嘌醇组, 差异有统计学意义 (156.0  $\pm$  3.8 mmHg 比 115.7  $\pm$  4.1 mmHg,  $P < 0.05$ ); 别嘌醇组大鼠 SBP 高于正常对照组, 但差异无统计学意义 (119.2  $\pm$  4.3 mmHg 比 115.7  $\pm$  4.1 mmHg,  $P > 0.05$ ; 图 1)。

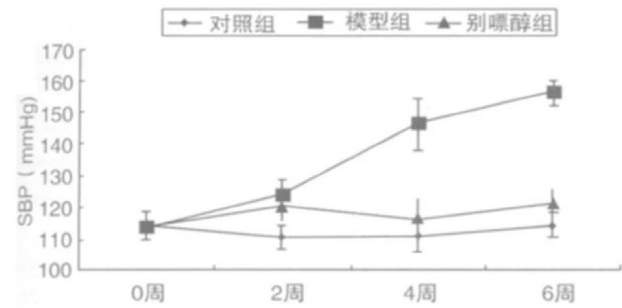


图 1. 别嘌醇对高尿酸血症大鼠血压的影响

Figure 1. The influence of allopurinol on SBP in hyperuricemia rats

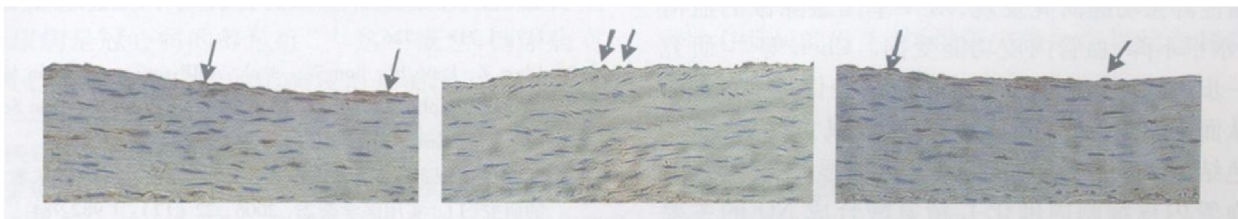


图 2. 各组大鼠胸主动脉内膜抗 eNOS 免疫组织化学染色 (×400) 从左至右分别为正常对照组、模型组、别嘌醇组。

Figure 2. Immunohistochemical staining for eNOS in aortic tunica intima in different groups

### 2.3 脂联素与一氧化氮、内皮素 1、血清尿酸及收缩压的关系

Pearson 相关分析显示, APN 与 NO 无显著相关关系 ( $r = 0.057$ ,  $P = 0.742$ ), 与 ET 1、UA 和 SBP 呈负相关 ( $r$  分别为  $-0.561$ 、 $-0.48$ 、 $-0.57$ ,  $P < 0.05$ ; 表 2)。

表 2. 脂联素与一氧化氮、内皮素 1、尿酸及收缩压间的相关关系

Figure 2. The relationship between APN and NO, ET 1, UA, SBP

	$r$	$P$ 值
NO	0.057	0.742
ET 1	-0.561	<0.001
UA	-0.48	0.003
SBP	-0.57	<0.001

注: 以上分析所用数据包括三组大鼠 6 周时相应指标的所有数据。

### 2.4 主动脉内膜内皮型一氧化氮合酶表达

免疫组织化学染色结果发现, eNOS 蛋白仅特异性在血管内皮细胞层表达丰富, 平滑肌层含量很少。计算机图像分析系统处理发现, 模型组 eNOS 表达量 (38.3  $\pm$  4.5) 比正常对照组 (48.3  $\pm$  4.2) 明显降低 ( $P < 0.05$ ), 别嘌醇组 eNOS 表达量 (46.1  $\pm$  4.2) 比模型组显著升高, 而与正常对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 图 2)。

### 3 讨 论

APN 是人体血浆含量丰富的一种脂肪源性细胞因子,约占血浆总蛋白的 0.01%。人 APN 基因位于 3q27,该基因也是 2 型糖尿病和代谢综合征的易感基因,与高血压、冠心病密切相关<sup>[1]</sup>。文献报道,APN 启动子基因多态性、种族、性别是影响 APN 表达的主要因素,他汀类调脂药物和胰岛素增敏剂罗格列酮也可上调血 APN 的水平。本研究通过对高尿酸血症大鼠血 APN 的检测,发现高尿酸血症大鼠血 APN 水平显著降低。别嘌醇是腺苷酶抑制剂,主要作用是降尿酸,别嘌醇组的血尿酸维持在正常水平的同时未出现 APN 水平的下降。经 Pearson 相关性分析显示血尿酸与 APN 水平呈负相关。这提示血 APN 的降低与血尿酸的升高直接相关,血 APN 的水平可受血尿酸的影响。

本实验结果发现,模型组大鼠 6 周后 SBP 显著升高,但别嘌醇组大鼠血压正常。可见高尿酸血症可诱导高血压,这与文献报道是一致的<sup>[5]</sup>。Long 等<sup>[6]</sup>用高尿酸血症动物模型证实了高尿酸血症可通过损害血管内皮细胞功能而导致高血压。循环中的 NO、ET-1 的水平可反映血管内皮功能的功能状态,血 NO、ET-1 的变化可作为血管内皮激活和功能受损的标记<sup>[7,8]</sup>。本实验可见,模型组大鼠血清 NO 水平下降而 ET-1 水平升高,表明模型组大鼠血管内皮功能受损。血管内皮在生理情况下的内分泌功能(如分泌 NO/ET-1)对维持血管张力和心血管稳态起重要作用<sup>[9]</sup>。大鼠 SBP 的升高不仅是高尿酸血症大鼠血管内皮细胞功能紊乱的结果,也可视为血管内皮功能紊乱的表现。同样,别嘌醇组大鼠血 NO、ET-1 和 SBP 均是正常的,可见血管内皮功能紊乱与高尿酸血症密切相关。

APN 具有抗炎、抗氧化、改善胰岛素抵抗等功能,因此,低 APN 与血管内皮功能不全密切相关。贾少丹等<sup>[10]</sup>研究表明,血 APN 浓度低于 6.3 mg/L 可作为独立预测冠状动脉内皮功能不全的指标。Ouedraogo 等<sup>[11]</sup>通过对 APN 基因敲除鼠血管内皮依赖性舒张功能研究发现,APN 基因敲除鼠的血清 NO 水平下降,血管内皮功能受损。Chen 等<sup>[12]</sup>研究进一步表明,APN 是通过 AMPK 途径促进 eNOS 活化从而调整 NO 的合成。本实验大鼠主动脉 eNOS 染色结果表明模型组 eNOS 表达明显下降。eNOS 是血管内皮细胞内催化 L 精氨酸合成 NO 的主要酶,模型组 eNOS 表达的降低解释了血 NO 降低的原因,别嘌醇组大鼠主动脉 eNOS 表达是正常的,可见

高尿酸血症与血管内皮功能的损害有密切关系。刘平等<sup>[13]</sup>对不合并胰岛素抵抗的高血压患者进行研究,结果显示血浆 APN 水平与高血压呈负相关。本实验结果与文献一致:APN 与 SBP 呈明显的负相关。此外,APN 和 ET-1 也呈负相关。因此,高尿酸血症不仅是损伤血管内皮功能的直接原因,还可导致血清 APN 的降低,后者进一步加重血管内皮的损伤。

#### [参考文献]

- [1] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 26 746 - 749.
- [2] Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, et al. Association of hypo adipone-ctinemia with impaired vasoreactivity [J]. *Hypertension*, 2003, 42: 231 - 234.
- [3] Tan KC, Xu A, Chow WS, et al. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium dependent vasodilation [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 765 - 769.
- [4] 苗蕾,姚华,孙玉萍,等.血清脂联素水平与新疆维吾尔族高尿酸血症的相关性[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(24): 4 601-602.
- [5] Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction [J]. *Kidney Int*, 2005, 67: 1 739 - 742.
- [6] Long CL, Qin XC, Pan ZY. Activation of ATP sensitive potassium channels protects vascular endothelial cells from hypertension and renal injury induced by hyperuricemia [J]. *Hypertension*, 2008, 26 (12): 2 326-338.
- [7] Woodman RJ, Chew GT, Watts GF, et al. Mechanisms, significance and treatment of vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus: focus on lipid regulating therapy [J]. *Drugs*, 2005, 65: 31 - 74.
- [8] Thorand B, Baumert J, Chambless L, et al. Elevated markers of endothelial dysfunction predict type 2 diabetes mellitus in middle aged men and women from the general population [J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2006, 26: 398-405.
- [9] Esper R, Nordaby R, Vilarino J, et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2006, 5: 4-21.
- [10] 贾少丹,王颜刚,李慧凤,等.不同尿酸浓度与氧化应激和内皮损伤指标研究[J]. *中华内科学杂志*, 2008, 47(8): 638-641.
- [11] Ouedraogo R, Gong Y, Berzins B, et al. Adiponectin deficiency increases leukocyte endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 1 718 - 726.
- [12] Chen Z, Peng IC, Sun W, et al. AMP activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633 [J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 496-505.
- [13] 刘平,王砚青,卞茸文.原发性高血压患者血清脂联素水平的研究[J]. *实用医学杂志*, 2006, 22(17): 1 982-984.

(此文编辑 许雪梅)