

# 血管内皮功能紊乱在高尿酸血症肾损害中的作用

王洪云<sup>1</sup>, 许冬梅<sup>2</sup>, 王培培<sup>2</sup>, 孔祥雷<sup>2</sup>, 唐利军<sup>2</sup>, 贾晓妍<sup>2</sup>

(1. 山东大学医学院; 2. 山东省千佛山医院肾内科, 山东省济南市 250014)

[关键词] 高尿酸血症; 肾疾病; 血管内皮

[摘要] **目的** 探讨血管内皮功能紊乱在高尿酸血症肾损害发病机制中的作用。**方法** 将 36 只雄性 Wister 大鼠随机分为对照组、高尿酸血症模型组(模型组)和苯溴马隆治疗组(治疗组), 每组 12 只。应用氧嗪酸钾(尿酸酶抑制剂)联合高酵母饲料建立高尿酸血症肾损害大鼠模型, 治疗组在建立高尿酸血症模型基础上加用苯溴马隆(立加利仙)降尿酸治疗, 对照组给予普通饲料及等量蒸馏水灌胃, 于 2、4、6 周末自大鼠颈静脉窦取血, 检测血尿酸、肌酐水平。6 周末处死全部大鼠, 取肾组织进行 HE、Masson 染色, 观察肾脏病理改变并测量肾间质纤维化面积, 检测肾间质小管内皮型一氧化氮合酶、内皮素 1、低氧诱导因子 1 $\alpha$  表达。**结果** 2 周末, 模型组血尿酸水平较对照组及治疗组明显升高; 6 周末, 模型组血肌酐水平较对照组及治疗组明显升高, 而后两组之间无明显差异。模型组肾间质纤维化面积较对照组及治疗组均显著增加, 模型组大鼠肾组织内皮型一氧化氮合酶表达明显低于对照组及治疗组, 而内皮素 1 及低氧诱导因子 1 $\alpha$  表达均明显高于对照组及治疗组。**结论** 血尿酸水平升高可减少肾间质小管内皮型一氧化氮合酶合成并促进内皮素 1 表达, 从而影响肾间质血管内皮功能, 通过缺血缺氧机制导致肾间质纤维化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Role of Vascular Endothelial Dysfunction in Kidney Damage Induced by Hyperuricemia

WANG Hong-Yun<sup>1</sup>, XU Dong-Mei<sup>2</sup>, WANG Pei-Pei<sup>2</sup>, KONG Xiang-Lei<sup>2</sup>, TANG Li-Jun<sup>2</sup>, and JIA Xiao-Yan<sup>2</sup>

(1. Department of Medicine, Shandong Univeristy; 2. Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan, Shandong 250014, China)

[KEY WORDS] Hyperuricemia; Kidney Disease; Vascular Endothelium

[ABSTRACT] **Aim** To discuss the role of endothelial dysfunction in the kidney damage induced by hyperuricemia. **Methods** 36 male Wister rats were randomly divided into three groups, namely control group, hyperuricemia model group, benzbromarone treatment group ( $n = 12$ ). Application of Oteracil potassium (uricase inhibitor) and high yeast feeding were used to establish the hyperuricemia model. In addition to the same treatment, the treatment group were added benzbromarone to control hypeuricemia. Control group were fed normal diet and tap water, at the weekend of 2, 4, 6, blood uric acid and creatinine level were tested. All rats were sacrificed at the end of 6 weeks, HE and Masson staining of renal organizations were applied to observe the pathological changes, and measure the interstitial fibrosis area. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS), endothelin-1 (ET-1) and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) expressions in renal interstitial tubular were detected by immunohistochemistry. **Results** After 2 weeks the blood uric acid level in model group was higher than that of the control group and treatment group. At the end of 6 weeks, the serum creatinine level in the model group was much higher than that of the control group and the treatment group, there was no obvious difference between the two latter groups. The renal interstitial fibrosis was more serious than that of the normal control group and the treatment group. The nitric oxide synthase expression in the model group was significantly lower than that in the control group and treatment group, while both the endothelin-1 and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  expression in the model group was significantly higher than that in the control group and treatment group. **Conclusion** Hyperuricemia can reduce the sy-

[收稿日期] 2011-08-17

[作者简介] 王洪云, 硕士研究生, 主要从事高尿酸血症肾损害发病机制的研究, E-mail 为 autumn0113.happy@163.com。通讯作者许冬梅, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事高尿酸血症肾损害及对各种原发性及继发性肾小球疾病发病机制的研究, E-mail 为 xudm@sdhospital.com.cn。

nt thesis of nitric oxide synthase but increase the production of endothelin-1 in the renal interstitial vascular endothelial cells, thus affecting the endothelial function of renal interstitial vascular and leading to renal interstitial fibrosis through an mechanism of ischemia and hypoxia.

随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变,高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)和痛风的发病率逐年升高。高尿酸血症定义为男性  $>7.0 \text{ mg/dL}$  ( $416.4 \text{ }\mu\text{mol/L}$ ), 女性  $>6.0 \text{ mg/dL}$  ( $356.9 \text{ }\mu\text{mol/L}$ )。目前大量研究证实高尿酸血症是肾脏疾病独立的危险因素<sup>[1-3]</sup>。研究表明高尿酸血症可导致内皮源性舒血管因子和缩血管因子比例失衡,从而导致内皮功能紊乱<sup>[4,5]</sup>。本文将进一步探讨高尿酸血症肾损害大鼠肾间质血管内皮功能改变,以了解血管内皮功能紊乱在高尿酸血症肾损害发病机制中的作用及早期干预治疗的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 36 只, 体重  $160 \pm 20 \text{ g}$ , SPF 级动物饲养房, 9~15 h 日夜交替, 大鼠自由饮食饮水。

### 1.2 实验仪器和试剂

全自动生物化学分析仪(罗氏 MODULAR 血生物化学分析仪); 兔抗大鼠内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、内皮素 1(ET-1)、低氧诱导因子  $1\alpha$ (HIF- $1\alpha$ ) 多克隆一抗抗体及免疫组织化学试剂盒(武汉博士德公司)。氧嗪酸钾(济南德信佳生物科技公司); 苯溴马隆片(立加利仙, 昆山龙灯瑞迪制药有限公司分装, 国药准字 J20100001)。

### 1.3 各种灌胃液及高酵母饲料的制备

1.3.1 氧嗪酸钾溶液制备 使用电子天平准确称取氧嗪酸钾 100 g, 将氧嗪酸钾以蒸馏水配制成 100 g/L 的悬浊液 1 L, 置 4℃ 冰箱备用。

1.3.2 氧嗪酸钾 + 苯溴马隆溶液的制备 使用电子天平准确称取氧嗪酸钾 100 g, 苯溴马隆 3.75 g, 混合后加蒸馏水配制成含氧嗪酸钾 100 g/L、苯溴马隆 3.75 g/L 的悬浊液 1L, 置 4℃ 冰箱备用。

1.3.3 高酵母饲料的制备 将酵母干粉均匀拌入粉碎的大鼠颗粒饲料中重新压粒成形, 控制其在饲料中的质量分数为 10%。

### 1.4 实验分组及处理方法

大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组 ( $n = 12$ )、高尿酸血症模型组(简称模型组,  $n = 12$ )、苯溴马隆治疗组(简称治疗组,  $n = 12$ )。模型组饲以质

量分数 10% 的高酵母饲料, 并以  $800 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  氧嗪酸钾溶液灌胃, 每天 2 次, 以制备高尿酸血症模型; 治疗组饲以质量分数 10% 的高酵母饲料, 并以  $800 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  氧嗪酸钾 +  $25 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  苯溴马隆溶液灌胃, 每天 2 次; 对照组饲以普通大鼠颗粒饲料, 并给予同体积蒸馏水每天 2 次灌胃。实验进行 6 周。

### 1.5 大鼠一般情况监测

每日观察三组大鼠进食情况、精神状态; 每周监测大鼠外观、体重变化。

### 1.6 生物化学指标检测

分别于 2、4、6 周末, 大鼠禁食 10 h 后, 颈静脉窦取血, 分离出血清, 在全自动生物化学分析仪上测定血清尿酸 (serum uric acid, SUA)、肌酐 (creatinine, Cr) 水平。

### 1.7 病理检查

于第 6 周末处死全部大鼠, 取肾组织, 先肉眼观察其病变, 后用 10% 中性甲醛溶液固定, 经脱水、石蜡包埋,  $3 \text{ }\mu\text{m}$  厚度切片, 常规 HE 和 Masson 染色, 普通光镜下观察。

### 1.8 免疫组织化学检测肾组织内皮型一氧化氮合酶、内皮素 1 和低氧诱导因子 $1\alpha$ 表达

$3 \text{ }\mu\text{m}$  石蜡切片常规脱蜡, 染色程序按试剂盒说明进行。一抗工作浓度均为 1:100。每张切片随机选取 10 个避开肾小球的高倍视野 ( $\times 400$ ), 测量免疫组织化学阳性区域面积和光密度值 (OD 值), 计算免疫组织化学指数 (IHCP) = 阳性区域面积  $\times$  OD。

### 1.9 统计学方法

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间差异比较采用  $t$  检验; 三组间差异比较采用方差分析。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

灌胃 2 周后, 对照组及治疗组大鼠饮食、进水较前无明显变化, 皮毛光泽, 体重平稳增长; 模型组大鼠饮水量及尿量(通过更换垫料频率估测)较对照组及治疗组增加, 皮毛粗糙无光泽, 体重增长较对照组明显缓慢, 后期体重下降。

2.2 血尿酸和肌酐水平

灌胃 2 周后,模型组血尿酸水平较对照组及治疗组明显升高,三组血肌酐水平差异尚无显著性。4 周后,模型组血尿酸、肌酐水平较对照组及治疗组均明显升高;而治疗组与对照组差异无显著性。6 周后,模型组大鼠血尿酸、肌酐水平较对照组及治疗组明显升高;治疗组血肌酐较对照组明显升高,而两组间血尿酸水平差异无显著性(表 1)。

2.3 肾脏病理变化

肉眼见对照组及治疗组大鼠双肾色深红,表面光滑,形态正常;模型组大鼠双肾色苍白,体积增大。HE 及 Masson 染色光镜下发现对照组及治疗组未见病理改变;模型组表现为明显肾间质小管病变,大量炎症细胞在肾间质聚集,肾间质水肿;肾小管周围伴有间质纤维化;肾小管上皮细胞肿胀,散在肾小管坏死、灶状萎缩;肾小球病变相对较轻(表 2 和图 1)。

表 1. 实验过程中各组动物血生物化学指标的改变 (μmol/L,n=12)

Table 1. The change of blood biochemical indicators of each group in the experimental process

分 组	时间	尿酸	肌酐
对照组	2 周	92.5 ± 24.8	21.1 ± 1.8
	4 周	113.1 ± 34.3	22.7 ± 3.4
	6 周	125.8 ± 26.6	23.2 ± 1.8
模型组	2 周	174.9 ± 13.8 <sup>a</sup>	20.8 ± 7.5
	4 周	211.1 ± 30.9 <sup>a</sup>	23.6 ± 2.3 <sup>a</sup>
	6 周	176.2 ± 22.5 <sup>a</sup>	40.9 ± 5.7 <sup>a</sup>
治疗组	2 周	97.7 ± 25.2 <sup>b</sup>	25.9 ± 2.5
	4 周	137.5 ± 36.3 <sup>b</sup>	24.2 ± 4.7 <sup>b</sup>
	6 周	117.8 ± 20.15 <sup>b</sup>	25.0 ± 2.2 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组同时间相比;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组同时间相比。

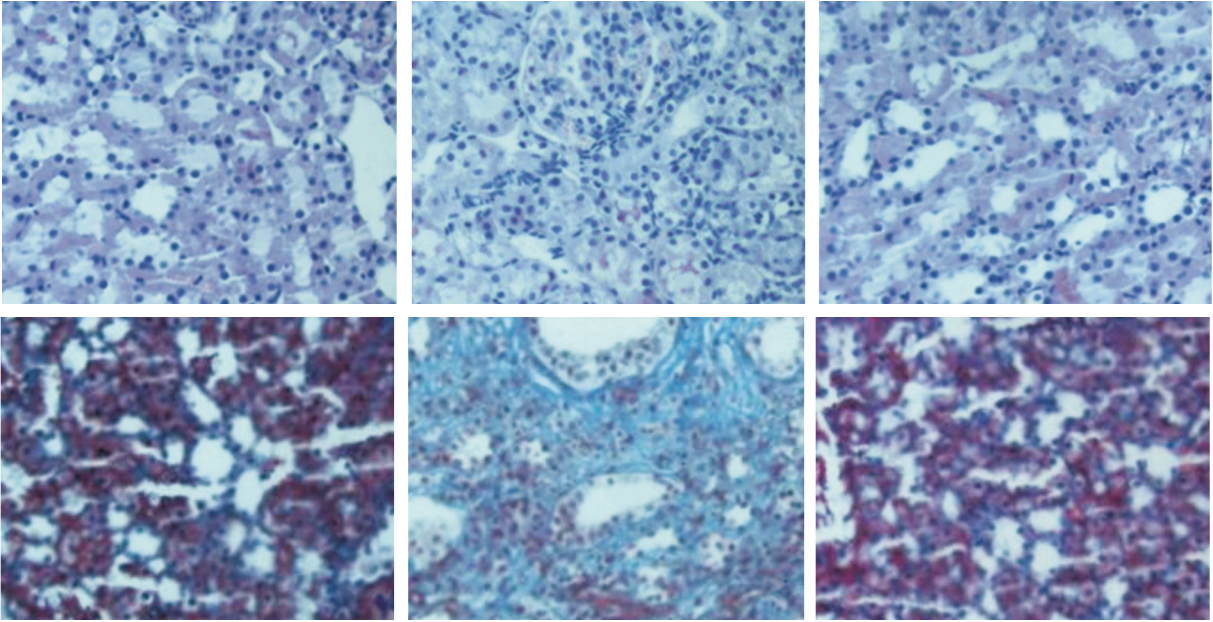


图 1. HE 染色(上图)及 Masson 染色(下图)观察肾组织病理变化(×20) 从左到右依次为对照组、模型组和治疗组。

Figure 1. Pathological changes of renal organizations by HE dyeing and Masson dyeing

2.4 内皮型一氧化氮合酶、内皮素 1 和低氧诱导因子 1α 的表达

实验结束时对照组及治疗组大鼠肾组织 eNOS 在肾小管上皮细胞中呈弱阳性表达,高尿酸血症肾损害模型组肾组织 eNOS 表达量较对照组及治疗组明显减少( $P < 0.05$ )。ET-1 及 HIF-1α 在对照组及治疗组大鼠肾组织中弥漫分布,染色浅;而模型组 ET-1 及 HIF-1α 在肾小管上皮细胞及肾间质血管内皮细胞表达明显增强( $P < 0.05$ ;表 2 和图 2)。

3 讨 论

高尿酸血症作为肾脏疾病发生及进展的独立危险因素越来越被人们关注。本实验通过氧嗪酸钾灌胃联合高酵母饲料喂养大鼠建立高尿酸血症肾损害模型。与人类不同,大鼠及很多哺乳动物肝脏中含有尿素酶,可以将尿酸继续分解为易于溶解的尿囊素,因此人类血尿酸水平明显高于这些哺乳动物<sup>[6]</sup>。Fridovich 在 1965 年发现氧嗪酸钾盐(potassium oxonate)无论在体内还是体外均可有效抑制尿



表 2. 肾间质纤维化面积及 eNOS、ET-1 和 HIF-1α 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2. The renal fibrosis area and the expression of eNOS, ET-1 and HIF-1α

分 组	肾间质纤维化面积	eNOS	ET-1	HIF-1α
对照组	6.43% ± 0.26%	7.09% ± 1.15%	2.00% ± 0.35%	3.98% ± 1.02%
模型组	15.92% ± 1.89% <sup>a</sup>	2.81% ± 0.91% <sup>a</sup>	11.81% ± 0.91% <sup>a</sup>	8.73% ± 1.99% <sup>a</sup>
治疗组	6.28% ± 0.37% <sup>b</sup>	8.11% ± 1.29% <sup>b</sup>	1.95% ± 0.29% <sup>b</sup>	4.36% ± 1.52% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组相比。

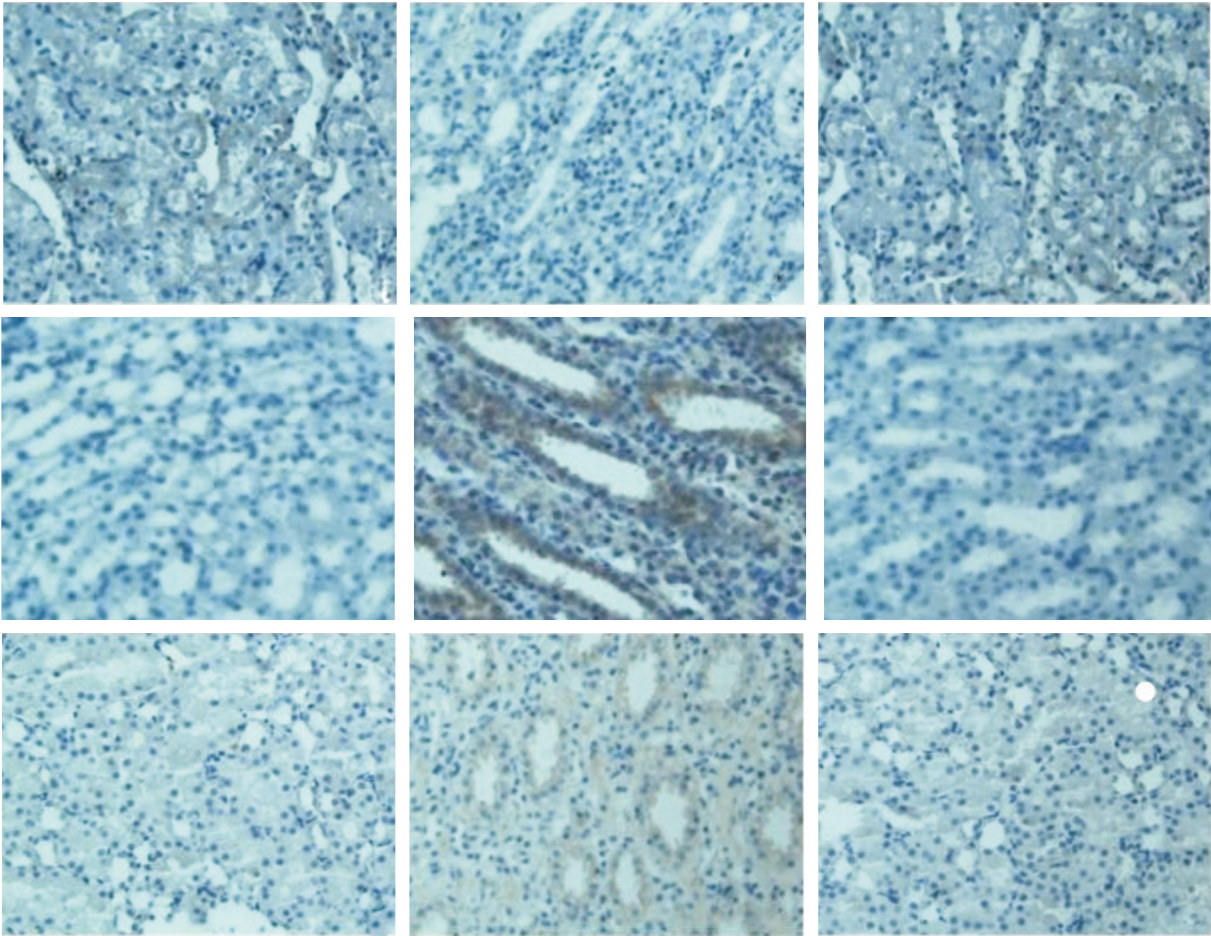


图 2. 免疫组织化学检测 eNOS( 上图)、ET-1( 中图) 和 HIF-1α( 下图) 表达 (× 20) 从左到右依次为对照组、模型组和治疗组。  
Figure 2. Expressions of eNOS, ET-1 and HIF-1α by immunohistochemistry

酸酶活性,降低血液和尿液中尿囊素并提高尿酸水平。酵母含有丰富的蛋白质、核苷酸、B 族维生素等,在体内充分水解能产生含氮的有机碱(包括嘌呤碱类、嘧啶碱类)和磷酸,当大剂量的酵母进入体内后,能干扰机体正常的嘌呤代谢,致嘌呤代谢紊乱,其主要表现为黄嘌呤氧化酶活性增加,加速了尿酸的生成,从而产生大量尿酸<sup>[7]</sup>。本文通过应用氧嗪酸钾溶液灌胃<sup>[8,9]</sup>,辅以高酵母饲料,于实验 2 周后成功建立 HUA 大鼠模型,6 周末 HUA 模型组大鼠出现明显肾脏损害。

高尿酸血症模型组肾间质 eNOS 表达量较对照组及治疗组明显减少 ( $P < 0.05$ ),证实血尿酸水平升高可抑制肾间质血管内皮细胞的合成。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)为一氧化氮合成的限速酶,包括 eNOS 和诱生型 NOS(iNOS)。eNOS 受刺激活化后释放一氧化氮,生理情况下一氧化氮的释放具有改善肾脏血液动力学,参与维持正常肾血流量和肾小球滤过率,扩张肾血管,抑制血小板聚集而改善微循环;抑制炎症细胞浸润;抑制系膜细胞增生、减少系膜基质产生,延缓肾间质纤维化等肾脏保

护作用。eNOS 合成的减少是肾脏损害的机制之一。

同时,模型组大鼠肾间质 ET-1 表达量较对照组及治疗组大鼠明显增加 ( $P < 0.05$ ),表明高尿酸血症可促进肾间质血管内皮细胞分泌 ET-1。ET-1 是目前已知作用最强、最持久的内源性缩血管活性多肽,它与内皮素 A 型受体 (endothelin A receptor, ETAR) 结合产生极强的收缩血管和支气管作用<sup>[10]</sup>。生理状态下,ET-1 可通过收缩血管、调节肾小球超滤过系数 (Kf),影响肾小管分泌、排泄等方面与其他肾脏调节因素一起维持正常肾脏功能。然而,这种调节机制一旦紊乱,ET-1 便作为一种致病因子引发或参与肾脏病理生理过程。ET-1 异常表达及释放均可导致肾脏疾病发生发展<sup>[11-14]</sup>。病理状态的肾间质 ET-1 分泌增多可导致肾间质血管强烈而持久地收缩,肾循环血流量减少,肾脏灌注不良,进一步导致肾小球系膜细胞收缩,肾小球滤过率下降,最终导致肾脏损害。

HIF-1 $\alpha$  是一种能特异性地结合于促红细胞生成素基因低氧反应元件上的蛋白,是由对氧敏感的  $\alpha$  亚基和稳定表达的  $\beta$  亚基组成的异源二聚体。HIF-1 $\alpha$  转移到细胞核内与 HIF-1 $\beta$  结合而激活它的靶基因, HIF-1 的生物效应是由 HIF-1 $\alpha$  亚基实现的<sup>[15]</sup>。在正常氧分压条件下, HIF-1 $\alpha$  在胞浆中含量很低,不表现生物活性<sup>[16]</sup>。细胞处于低氧状态时, HIF-1 $\alpha$  不能被羟化,从而不能被希佩尔-林道病肿瘤抑制蛋白 (protein von HippelLindau, pVHL) 识别,因此 HIF-1 $\alpha$  不能被泛素化和被蛋白酶体降解,致使其表达量在细胞内呈指数式地大量增加<sup>[17]</sup>。因此 HIF-1 $\alpha$  表达增加表明高尿酸血症模型组肾间质处于缺血缺氧状态。

综上所述,通过本实验我们了解到血尿酸水平升高可通过减少肾间质血管内皮细胞 eNOS 合成,并促进 ET-1 分泌,影响肾间质血管内皮功能,通过缺血缺氧机制导致肾间质纤维化。及早地给予降尿酸治疗可减轻肾损害的发生。

# [参考文献]

[1] Iseki K, Oshiro S, Tozawa M, et al. Significance of hyperuricemia on the early detection of renal failure in a cohort of screened subjects [J]. Hypertens Res, 2001, 24: 691-697.

[2] Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, et al. Uric acid and incident kidney disease in the community [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19: 1 204-211.

[3] Bellomo G, Venanzi S, Verdura C, et al. Association of uric acid with change in kidney function in healthy normotensive individuals [J]. Am J Kidney Dis, 2010, 56(2): 264-272.

[4] Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction [J]. Kidney Int, 2005, 67: 1 739-742.

[5] Zoccali C, Maio R, Mallamaci F, et al. Uric acid and endothelial dysfunction in essential hypertension [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17: 1 466-471.

[6] Hediger MA. Kidney function: gateway to a long life [J]. Nature, 2002, 417: 393-395.

[7] 孟永会, 曾俞霖. 高尿酸血症动物模型研究 [J]. 中国民族民间医药, 2010, (11): 124-125.

[8] Hall IH, Scoville JP, Reynolds DJ, et al. Substituted cyclic imides as potential anti-gout agents [J]. Life Sci, 1990, 46(26): 1 923-927.

[9] Kazumi IVAKI, Yukio YONETANI. Hyperuricemic effects of chnll-nersicagentsinrats [J]. Japan J Phanncol, 1982, 32: 343.

[10] Masaki T. Historical review: endothelin [J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(4): 219-224.

[11] Granger JP, Abram S, Stec D, et al. Endothelin, the kidney, and hypertension [J]. Curr Hypertens Rep, 2006, 8(4): 298-303.

[12] 高维明, 张会临. 山葡萄多酚对血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(6): 715-716.

[13] Kohan DE. The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2006, 15(1): 34-40.

[14] Van de Water FM, Russel FGM, Masereeuw R. Regulation and expression of endothelin-1 (ET-1) and ET-receptors in rat epithelial cells of renal and intestinal origin [J]. Pharmacol Res, 2006, 54(6): 429-435.

[15] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation [J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(12): 5 447-454.

[16] Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by hypoxia depends upon redox-induced changes [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 22 642-647.

[17] Liu YV, Baek JH, Zhang H, et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 $\alpha$  and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 $\alpha$  [J]. Mol Cell, 2007, 25(2): 207-217.

(此文编辑 许雪梅)