

文章编号:1004-7220(2017)01-0088-04

无症状高尿酸血症大鼠血液流变学和氧化应激

李葵花¹, 李璐², 许士奇¹, 佟晓波¹, 谢利德¹

(1. 承德医学院 血液流变学研究室,承德 067000;2. 河北大学附属医院 麻醉科,保定 071000)

摘要: **目的** 从血液流变学的角度对长期无症状高尿酸血症开展系统研究,为该症的临床处理提供参考依据。**方法** 将20只SD大鼠随机平均分为空白对照组和模型组。通过对大鼠腹腔注射250 mg/(kg·d)氧嗪酸钾诱导8周无症状高尿酸血症模型,采血测量尿酸水平、血液流变学指标、氧化和抗氧化指标。**结果** 模型组大鼠红细胞的聚集指数、破碎率、血清黄嘌呤氧化酶活性(XOD)、血浆纤维蛋白原、血液黏度显著升高,红细胞的取向指数、电泳率、血清超氧化物歧化酶活性(SOD)、活化部分凝血酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)显著降低。**结论** 无症状高尿酸血症水平下机体氧化应激增强,使大鼠红细胞流变特性发生不良变化,血液处于高黏高凝状态。研究结果提示临床诊治中应对无症状高尿酸血症正确认识并及时干预。

关键词: 高尿酸血症;血液流变学;氧化应激

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.01.015

Hemorheology and oxidative stress in rats with asymptomatic hyperuricemia

LI Kui-hua¹, LI Lu², XU Shi-qi¹, TONG Xiao-bo¹, XIE Li-de¹ (1. Hemorheology Department, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China)

Abstract: Objective To launch systematic research on long-term asymptomatic hyperuricemia (HUA) from hemorheological viewpoint, so as to provide references for clinical treatment of asymptomatic HUA. **Methods** Twenty rats were randomly and evenly divided into normal control group and model group. The rats were intraperitoneally injected with 250 mg/(kg·d) oxonate for 8 weeks to induce the model of asymptomatic HUA. The blood samples were obtained to measure the serum uric acid, hemorheological parameters, oxidative and anti-oxidative indices. **Results** The aggregation index, haemolysis rate, serum xanthine oxidase (XOD), plasma fibrinogen and blood viscosity significantly increased, while the orientation index, electrophoresis rate, serum superoxide dismutase (SOD), activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) significantly induced. **Conclusions** The asymptomatic HUA can lead to more serious oxidative stress, deteriorate the hemorheological parameters of red blood cells in rats, and induce higher blood viscosity and coagulation status. The research findings indicate that asymptomatic HUA should be correctly understood and timely intervened in clinical diagnosis.

Key words: Hyperuricemia; Hemorheology; Oxidative stress

收稿日期:2016-04-18; 修回日期:2016-06-01

基金项目:河北省高等学校科学技术研究项目(QN20131033),承德医学院自然科学重点课题(201709)。

通信作者:谢利德,教授,Tel:(0314)2517065;E-mail:xielide65@163.com。

尿酸是嘌呤在一系列酶的参与下分解代谢的终产物。由于尿酸的合成增加或排泄减少,或两方面的共同作用,引起血液中尿酸浓度的升高,称为高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)。采用酶法测定血清尿酸值,认为男性患者 > 416 $\mu\text{mol/L}$ 、女性患者 > 357 $\mu\text{mol/L}$ 有诊断价值,并把无痛风症状发作的 HUA 称为无症状高尿酸血症^[1]。本课题组前期的研究从血液流变学角度提示了急性尿酸水平升高是疾病急性期预后良好的预测因子^[2];当高尿酸水平维持更长时间时,尿酸常引起肾脏病变,此时尿酸就成为疾病发展的不利因素^[3]。但目前尚缺少从血液流变学角度对长期 HUA 开展系统研究,本文通过建立长期无症状 HUA 大鼠模型,研究其血液流变特性和氧化应激,为 HUA 的有效处理提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

实验所需的主要仪器有全自动血流变仪、红细胞变形仪、细胞电泳仪、全自动生化分析仪、分光光度计、血凝仪。主要试剂有氧嗪酸钾(上海金穗生物);羧甲基纤维素钠、聚丙烯吡咯烷酮(北京冰达生物);尿酸试剂盒(北化康泰);丙二醛试剂盒、黄嘌呤氧化酶试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒(北京原子高科);凝血 4 项检测试剂盒(北京中勤世帝)。

1.2 动物模型及取材

20 只健康雄性 SD 大鼠购于北京大学医学部实验动物中心,体重(220 \pm 10) g。大鼠随机分成 HUA 模型组和空白对照组,每组 10 只,HUA 组腹腔注射 250 mg/(kg · d) 氧嗪酸钾^[3,4],对照组腹腔注射羧甲基纤维素钠乳剂。在模型建立的第 0、2、4、6、8 周末,内眦采血 0.5 mL,提取血清。在模型建立第 8 周末,20% 乌拉坦(5 mL/kg)麻醉后,用肝素抗凝、枸橼酸钠抗凝及不抗凝注射器从右心室取血。去除可能存在溶血的样本进行测量。

1.3 尿酸水平的检测

取不同时期的血清,酶法测量血尿酸水平,具体步骤按照试剂盒说明进行。

1.4 血液流变学参数的检测

取 8 周肝素抗凝血,用全自动血流变仪测量全血黏度及血浆黏度;用红细胞变形仪测量红细胞的变形指数(deformation index, DI)、聚集指数(aggre-

gation index, AI)、松弛指数(relaxation index, RI)、取向指数(DI orientation, DI_(or));用细胞电泳仪测量红细胞的电泳率(electrophoretic mobility, EPM),具体操作按仪器操作的常规方法进行。采用文献[2]中的方法测量红细胞的破碎率(haemolysis rate, HR)。

1.5 凝血 4 项的检测

取 8 周枸橼酸钠抗凝血浆,用 Clauss 法测定血浆纤维蛋白原含量(fibrinogen, Fib),凝固法测量活化部分凝血酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和凝血酶时间(thrombin time, TT)。

1.6 氧化及抗氧化指标的检测

取第 8 周的血清,羟胺法测量总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)活性,比色法测量黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)活性,硫代巴比妥酸法测量血浆丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量^[2]。

1.7 统计学方法

实验结果以均值 \pm 标准差表示,用 SPSS 19.0 软件进行组间 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血尿酸水平变化

从造模的第 2 周开始,HUA 模型组大鼠血尿酸水平相对稳定[(124.02 \pm 32.15) $\mu\text{mol/L}$],与对照组[(57.16 \pm 11.69) $\mu\text{mol/L}$]相比显著升高($P < 0.01$),与本课题组前期研究结果一致^[3]。

2.2 血液流变学参数变化

HUA 引起血浆黏度及全血黏度的显著升高($P < 0.01$,见表 1)。同时,HUA 使红细胞的 AI 和 HR 显著升高,DI_(or) 和 EPM 明显降低($P < 0.05$),但 DI 和 RI 的变化无统计学差异(见表 2)。

表 1 血液黏度的测量结果($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, * $P < 0.01$)

Tab. 1 Measurement results of blood viscosity

组别	血浆黏度/ (mPa · s)	全血黏度/(mPa · s)		
		10 s ⁻¹	50 s ⁻¹	200 s ⁻¹
对照组	1.58 \pm 0.27	15.69 \pm 0.35	10.03 \pm 0.25	6.93 \pm 0.25
模型组	2.53 \pm 0.36*	17.24 \pm 1.22*	11.13 \pm 0.57*	7.74 \pm 0.33*

表2 红细胞流变学指标的测量结果($\bar{x} \pm s$, $n=8$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Tab. 2 Measurement results of erythrocyte heoromolgical properties

组别	DI	AI	RI	DI _{or}	EPM	HR/%
对照组	52.84 ± 1.45	49.01 ± 2.05	49.22 ± 0.89	25.90 ± 2.56	0.99 ± 0.08	45.08 ± 8.99
模型组	50.80 ± 3.49	52.54 ± 2.41**	48.26 ± 1.05	21.60 ± 3.76*	0.91 ± 0.09*	55.89 ± 9.17*

2.3 凝血功能的变化

常用Fib、APTT、PT和TT反映机体凝血功能变化,其中Fib是影响凝血功能和血浆黏度的重要指标。HUA模型组大鼠Fib浓度较对照组显著增高,APTT和PT明显缩短($P < 0.05$)。TT在两组间无统计学差异(见表3)。

表3 凝血功能的测量结果($\bar{x} \pm s$, $n=8$, * $P < 0.05$)

Tab. 3 Measurement results of coagulant properties of blood

组别	Fib/(g · L ⁻¹)	APTT/s	PT/s	TT/s
对照组	1.83 ± 0.31	41.87 ± 7.27	18.72 ± 0.86	27.48 ± 0.57
模型组	2.00 ± 0.27*	35.42 ± 10.62*	17.49 ± 1.10*	26.97 ± 0.45

2.4 血清XOD、T-SOD及MDA变化

HUA模型组大鼠血清XOD活性显著升高($P < 0.01$),在进一步促进血尿酸升高的同时,产生了更多的超氧阴离子自由基;T-SOD的活力明显降低($P < 0.01$),显示机体清除氧自由基能力的明显下降;MDA水平存在升高的趋势,但差异没有统计学意义(见表4)。

表4 血清SOD、XOD及MDA水平的测定结果

($\bar{x} \pm s$, $n=8$, * $P < 0.01$)

Tab. 4 Measurement results of serum oxidant parameters

组别	XOD/ (U · L ⁻¹)	T-SOD/ (U · mL ⁻¹)	MDA/ (nmol · mL ⁻¹)
对照组	48.10 ± 3.05	289.45 ± 19.11	5.35 ± 0.70
模型组	56.56 ± 4.34*	227.42 ± 29.11*	6.08 ± 0.85

3 讨论

HUA与饮食及生活方式的关系密切,患者的血尿酸水平及流变学指标的干扰因素较多。动物模型可以排除上述因素的影响,研究单纯HUA引起的血液流变学改变,从而指导临床对HUA的正确认识及处理手段。应用氧嗪酸钾抑制动物体内尿酸酶活性是国际上普遍采用的HUA动物造模方法。本研究

通过对大鼠腹腔注射氧嗪酸钾后发现,大鼠血尿酸水平在8周造模期内稳定保持在正常水平的2倍左右,关节及肾脏内无尿酸盐结晶,无症状HUA造模成功^[1,3-4]。

长期HUA作用后血液黏度升高主要来自血浆黏度的升高和红细胞特性的改变。血浆纤维蛋白原作为凝血因子I不仅直接参与凝血过程,也是影响血浆黏度的重要指标。HUA大鼠血浆纤维蛋白原升高,表明血浆Fib在凝血酶的作用下更容易形成不稳定的可溶性纤维蛋白,进一步形成稳定的纤维蛋白;长期HUA的作用使APTT和PT明显缩短,说明尿酸可能导致内源性和外源性凝血机制的激活,提示HUA使血液趋于高凝状态,发生血栓的几率增大。HUA模型组大鼠Fib升高同时也是导致其血浆黏度升高的主要因素,进而影响全血黏度。通过对比发现,长期HUA大鼠红细胞的电泳率降低,反映其表面负电荷减少,降低了红细胞间的电离排斥力,使红细胞更容易聚集在一起,在流动中沿轴向的取向能力降低,从而容易与血管内皮细胞发生黏附,使血流缓慢,血液黏度增加。红细胞变形能力降低极有可能导致红细胞的聚集,减弱微循环,进而影响血液黏度^[5]。长期HUA造成红细胞破碎率增大,说明其渗透脆性增加,对外界渗透压改变的抵抗能力下降,提示长期HUA对红细胞膜骨架可能产生影响,进一步影响红细胞的特性,调节血液黏度。血液黏度升高反过来又会导致血液中红细胞聚集成串,红细胞弯曲变形能力下降,最终造成以血液流变学参数异常为特点的临床病理综合征^[6]。于瑞丽等^[7]在对HUA大鼠灌胃葛根醇提液后发现,尿酸下降的同时会有效降低血液黏度,HUA所致血液流变学参数的异常情况得到一定程度的改善。

HUA所致血液流变学参数的改变可能与尿酸的抗氧化与促氧化能力密切相关。有研究认为,尿酸是人体内特有的天然水溶性抗氧化剂,60%的尿

酸能清除氧自由基和其他活性自由基,增强红细胞膜脂质抗氧化、防止细胞溶解和凋亡^[8]。研究还发现,尿酸具有氧化应激作用,可促进低密度脂蛋白的氧化和脂质过氧化,加速血管损伤及斑块形成^[9-10]。红细胞在循环过程中要时刻应对来自血浆及细胞内自氧化的自由基,对氧化损伤极为敏感。本课题组前期研究发现,在急性 HUA 中尿酸的抗氧化性起了主要作用,通过抑制红细胞膜脂质的过氧化,对红细胞起到一定保护作用,短期急性 HUA 改善了红细胞的流变学特性,向有利于血液流动的方向进行^[2]。本实验结果发现,长期无症状 HUA 大鼠的血浆黄嘌呤氧化酶活力和血浆丙二醛水平上升,同时超氧化物歧化酶活力下降,说明长期 HUA 中产生了更多的超氧阴离子自由基,同时机体对氧自由基的清除能力降低,尿酸表现为促氧化能力,红细胞暴露在氧化应激的情况中。红细胞的力学特性主要与其细胞膜决定^[11]。当患者体内的氧化应激增强,体内的红细胞膜容易产生氧化损伤,红细胞带 3 蛋白受自由基攻击可造成构象的改变^[12],带 3 蛋白与膜骨架蛋白结合情况发生变化,从而影响红细胞的变形能力、聚集能力和取向能力,进而影响血液黏度^[13]。

综合本实验与前期研究结果^[2]可以看出,HUA 在急性期表现出尿酸的抗氧化能力,对血液流变学起到一定的改善作用,但在长期无症状高尿酸作用表现出尿酸的促氧化能力,对血液流变学的特性产生不利影响。研究结果将为临床 HUA 的正确认识与及时处理提供数据参考。但尿酸的抗氧化和促氧化作用存在的穿梭时期尚需对不同程度、不同时期的 HUA 进行更深入研究才能确定,而 HUA 与血液流变学和氧化应激指标是否存在相关性也需要更多临床数据的支持。

参考文献:

[1] 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]. 中国全科医学, 2010, 13(11): 1145-1149.

[2] 李葵花,王喜福,刘玉玲,等. 急性高尿酸血症大鼠的红细胞血液流变学研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2015, 32(2): 321-325.

[3] 王爱玲,于海荣,孙阁,等. 无症状高尿酸血症对大鼠血压及尿蛋白 β_2 -微球的影响[J]. 河北医学, 2015, 21(6): 905-907.

[4] YAMADA H, KOTAKI H, FURITSU H, et al. Mechanism of the uricosuric action of the anti-inflammatory drug E3040 used to treat inflammatory bowel disease I: Study using a rat model of hyperuricemia [J]. Biopharm Drug Dispos, 1999, 20(2): 77-83.

[5] 郭涛,郝栋伟,李明华,等. 基于浸入边界法研究超弹性红细胞在剪切流中的运动特性[J]. 医用生物力学, 2015, 30(3): 243-248.

GUO T, HAO WD, LI MH, et al. Motion characteristics of hyper-elastic red cells in shear flow based on immersed boundary method [J]. J Med Biomech, 2015, 30(3): 243-248.

[6] 吴萍,乔爱科. 中老年人群血液黏度的有创检测及其影响因素分析[J]. 医用生物力学, 2014, 29(6): 554-559.

WU P, QIAO AK. Invasive detection of blood viscosity and its influencing factors in middle-aged and elderly people with cardiovascular diseases [J]. J Med Biomech, 2014, 29(6): 554-559.

[7] 于瑞丽,陈素红,吕圭源,等. 葛根提取物对高尿酸血症模型大鼠尿酸及血脂的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(3): 455-459.

[8] 单宝菊,罗海彦. 高尿酸血症与缺血性卒中及其危险因素[J]. 国际脑血管病杂志, 2010, 18(10): 768-772.

[9] STRAZZULLO P, PUIG JG. Uric acid and oxidative stress: Relative impact on cardiovascular risk [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2007, 17(6): 409-414.

[10] GÜR M, SAHIN DY, ELBASAN Z, et al. Uric acid and high sensitive C-reactive protein are associated with sub-clinical thoracic aortic atherosclerosis [J]. J Cardiol, 2013, 61(2): 144-148.

[11] 傅怡,吴洁,孙仁,等. 造影红细胞对剪切流中肿瘤细胞黏附的影响[J]. 医用生物力学, 2015, 30(2): 99-103.

FU Y, WU J, SUN R, et al. Effects of ghost red blood cells on tumor cell adhesion in shear flow [J]. J Med Biomech, 2015, 30(2): 99-103.

[12] 常文露,孙永叶,汪求真,等. 红细胞膜带 3 蛋白水平与中老年人生理状况相关分析[J]. 卫生研究, 2011, 40(3): 323-326.

[13] XIONG Y, LI Y, XIONG Y, et al. Cluster of erythrocyte band 3: A potential molecular target of exhaustive exercise-induced dysfunction of erythrocyte deformability [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2013, 91(12): 1127-1134.