

利湿活血方对高尿酸血症大鼠尿酸及肾脏抗氧化能力的影响

吴丽 王林元 王小花 王成龙 刘畅 张建军 王淳

【摘要】 目的 探讨不同剂量的利湿活血方对酵母膏联合腺嘌呤诱导的高尿酸血症大鼠尿酸生成、肾脏抗氧化能力的影响。**方法** 将 70 只雄性 SD 大鼠随机分成空白组、模型组、四妙丸组、苯溴马隆组及利湿活血方高、中、低(7.74 g/kg、3.87 g/kg、1.935 g/kg)剂量组,共 7 组,每组 10 只。除空白组外,其余各组利用酵母膏联合腺嘌呤连续灌胃 14 天,制备高尿酸血症大鼠模型。造模成功后,各药物组给予相应药物,空白组和模型组给予等体积蒸馏水,连续灌胃 14 天后取材,检测各组大鼠血清中尿酸(uric acid, UA)、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)、腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA),血清及肾脏组织中过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平。**结果** 与模型组比较,利湿活血方高剂量组、利湿活血方中剂量组可减少血清中 UA 含量,降低 XOD、ADA 活性,差异有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$);利湿活血方高、中、低剂量组均可升高血清及肾脏组织中 SOD、T-AOC 活性,降低 MDA 含量,差异有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$)。**结论** 中药利湿活血方有显著的减少高尿酸血症大鼠血尿酸的生成,增强高尿酸血症大鼠肾脏抗氧化和清除氧自由基能力的作用,对高尿酸血症的综合治疗有较好的效果。

【关键词】 高尿酸血症; 尿酸; 肾脏; 抗氧化; 利湿活血方

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.06.002

Effects of Lishi Huoxue prescription on uric acid and renal antioxidant capacity in hyperuricemia rats WU Li, WANG Linyuan, WANG Xiaohua, et al. College of traditional Chinese medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: WANG Chun, E-mail: chunwang_2008@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects and mechanism of different doses of Lishi Huoxue prescription on uric acid, renal antioxidant capacity in hyperuricemia rats induced by yeast extract and adenine. **Methods** Male SD rats were randomly divided into 7 groups: the blank group, model group, Simiaowan group, Benzbromarone group Lishi Huoxue high, medium, and low-dose (7.74 g/kg, 3.87 g/kg, 1.935 g/kg) group. In addition to the blank group, the rest groups were intragastric administration with yeast extract and adenine for two weeks. After the model was established successfully, the appropriate drugs were administered to the rats of the administration groups, the blank group and model group were given distilled water for 14 days. uric acid (UA), xanthine (XOD), adenosine deaminase (ADA), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA) were detected. **Results** Compared with the model group, the UA, XOD and ADA of Lishi Huoxue high and

基金项目: 国家自然科学基金(81273632)

作者单位: 100029 北京中医药大学中医学院[吴丽(硕士研究生)、王成龙(硕士研究生)、刘畅(硕士研究生)、张建军、王淳];北京中医药大学中药学院[王林元、王小花(硕士研究生)]

作者简介: 吴丽(1990-),女,2015 级在读硕士研究生。研究方向: 中医临床药学。E-mail: 15811286527@163.com

通信作者: 王淳(1970-),博士,副教授,硕士生导师。研究方向: 中医药治疗高尿酸血症和痛风。E-mail: chunwang_2008@163.com

medium groups were obviously reduced ($P < 0.01$, $P < 0.05$); SOD, T-AOC activity in *Lishi Huoxue* high, medium and low-dose groups were increased in serum and renal while MDA content was decreased, results had significant difference ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** The *Lishi Huoxue* prescription can reduce the production of serum uric acid, and can improve the renal antioxidant capacity in hyperuricemia rats. The *Lishi Huoxue* can achieve the good therapeutic effect in the treatment of hyperuricemia.

【Key words】 Hyperuricemia; UA; Renal; Antioxidant capacity; *Lishi Huoxue* prescription

高尿酸血症是嘌呤代谢障碍引起的代谢性疾病,尿酸作为嘌呤代谢的终产物主要由细胞代谢分解的核酸和其他嘌呤类化合物以及食物中的嘌呤经酶的作用分解而来,人体尿酸水平在 37℃ 的饱和浓度约为 420 $\mu\text{mol/L}$ (7 mg/dL),高于此值即为高尿酸血症^[1]。随着人们生活水平的提高,饮食结构的改变,嘌呤饮食的增多,机体嘌呤的代谢发生紊乱,从而引起高尿酸血症的发生。国内外许多研究表明,长期持续的高尿酸血症是引起肾脏损害的重要原因之一^[2]。利湿活血方是课题组针对高尿酸血症属于湿热浊瘀蕴阻的病机并结合临床用药经验所创制,前期研究表明,其具有降低高尿酸血症模型大鼠血清尿酸含量,保护主动脉形态的功能^[3]。本课题利用酵母膏合腺嘌呤制备高尿酸血症大鼠模型,研究利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠血清尿酸(uric acid, UA)、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)、腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)、血清及肾脏过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)的影响,探讨中药利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠的尿酸生成、血清及肾脏抗氧化能力的影响,为临床综合治疗高尿酸血症及其并发症提供更合理的治法及科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,70 只,体质量 230 ~ 250 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2014-0006。

1.2 药物及试剂

利湿活血方:由金钱草 6 g、土茯苓 3 g、粉防己 3 g、黄柏 3 g、萆薢 3 g、三七 2 g、川牛膝 3 g、赤芍 3 g、青风藤 3 g 配伍组成,药材均经北京中医药大学中医学院科研实验中心李伟老师鉴定为合格,由北京中医药大学中医学院临床中药室制备,其中金钱草、土茯苓、萆薢、川牛膝、赤芍用水提取,粉防己、

黄柏、三七、青风藤用醇提取;酵母膏:国药集团化学试剂有限公司,生产批号:20140216;腺嘌呤:国药集团化学试剂有限公司,生产批号:20140414;四妙丸(6 g/袋):吉林紫馨药业股份有限公司,生产批号:150406;苯溴马隆片/立加利仙(50 mg/片,有效期 5 年):德国赫曼大药厂,生产批号:1207036,分装企业为昆山龙灯瑞迪制药有限公司,分装批号:130519;UA、ADA 试剂盒:中生北控股份有限公司,生产批号:20160715、20160815;SOD、T-AOC、MDA 试剂盒:南京建成生物工程研究所,生产批号:20160718、20160716、20160721。

1.3 实验仪器

台式高速冷冻离心机 Neofuge15R, Heal Force; 日本日立 7160 全自动生化仪;紫外分光光度仪, UV-7504pc。

1.4 实验分组与给药

大鼠适应性饲养 7 天后(自由饮食、饮水,室温 20±2℃,相对湿度 65% ~ 70%),将其随机分成空白组、模型组、四妙丸组、苯溴马隆组及利湿活血方高、中、低(7.74 g/kg、3.87 g/kg、1.935 g/kg)剂量组,共 7 组,每组 10 只。除空白组外,其余六组灌胃酵母膏 10 g/(kg·d)、腺嘌呤 100 mg/(kg·d),连续 14 天,制备高尿酸血症大鼠模型。造模成功后,各给药组每天灌胃相应药物,四妙丸组每天灌胃四妙丸 1.6 g/kg(相当于成人每日临床用量的 8 倍),苯溴马隆组灌胃苯溴马隆 10 mg/(kg·d)(相当于成人每日临床用量 7 倍);利湿活血方高、中、低各剂量组按生药分别为 7.74 g/kg、3.87 g/kg、1.935 g/kg(分别相当于成人每日临床用量的 16 倍、8 倍、4 倍)灌胃,空白组和模型组给予等体积蒸馏水,连续 14 天。按每 100 g 体重灌胃 1 mL 给药,每日 1 次。本实验所用给药剂量为根据《中药药理研究方法学》人与大鼠用药量的等效剂量折算^[4],并在预试验中加以探索所得。

1.5 实验指标检测

末次给药 2 小时后,大鼠称重,腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉采血,分离血清,检测大鼠

血清中 UA、MDA 含量及 XOD、ADA、SOD、T-AOC 活性;取出右肾,匀浆检测其 SOD、T-AOC 活性及 MDA 含量。

1.6 统计学处理

实验数据用统计软件 SPSS 20.0 进行分析,所有计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组按单因素方差分析的模型假设,先对数据进行正态性检验和方差齐性检验,数据符合正态分布,且方差齐,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较用 LSD 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠血清 UA 含量及 XOD、ADA 活性的影响

与空白组比较,模型组动物血清 UA 含量及 XOD、ADA 活性升高,差异有统计学意义($P<0.001$)。与模型组比较,四妙丸组、苯溴马隆组、利湿活血方高、中剂量组大鼠血清 UA 降低,差异有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.01$);四妙丸组、利湿活血方高、中剂量组血清 XOD 活性降低,差异有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.05$);苯溴马隆组、利湿活血方高剂量组血清 ADA 活性降低,差异有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.01$)。见表 1。

2.2 利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠血清 SOD、

T-AOC 活性及 MDA 含量的影响

与空白组相比,模型组血清 SOD、T-AOC 活性降低而 MDA 水平升高,差异有统计学意义($P<0.001$)。与模型组相比,苯溴马隆组、利湿活血方高、中、低剂量组血清 SOD 活性升高,差异有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$);四妙丸组、苯溴马隆组、利湿活血方高、中剂量组血清 T-AOC 活性升高,差异有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.05$);苯溴马隆组、利湿活血方高剂量组血清 MDA 水平明显降低差异有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。见表 2。

2.3 利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠肾脏 SOD、T-AOC 活性及 MDA 含量的影响

与空白组相比,模型组肾脏 SOD、T-AOC 活性降低,差异有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.01$),而 MDA 的含量升高,差异有统计学意义($P<0.001$)。与模型组相比,苯溴马隆组、利湿活血方高剂量组 SOD 活性升高,差异有统计学意义($P<0.05$);苯溴马隆组、利湿活血方高剂量组 T-AOC 活性升高,差异有统计学意义($P<0.05$);四妙丸组、苯溴马隆组、利湿活血方高、中剂量组的肾脏 MDA 水平降低,差异有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$)。见表 3。

表 1 利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠血清 UA 含量及 XOD、ADA 活性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	给药剂量	UA($\mu\text{mol/L}$)	XOD(U/L)	ADA(U/L)
空白组	—	121.85 \pm 8.08	4.05 \pm 0.71	6.65 \pm 1.82
模型组	—	154.38 \pm 6.75 ^a	6.63 \pm 1.00 ^a	11.03 \pm 2.19 ^a
四妙丸组	1.60 g/kg	141.46 \pm 10.57 ^b	4.95 \pm 1.02 ^d	10.66 \pm 0.88
苯溴马隆组	10 mg/kg	133.82 \pm 12.53 ^d	6.24 \pm 0.77	7.66 \pm 1.93 ^d
利湿活血方高剂量组	7.74 g/kg	135.38 \pm 6.65 ^d	4.89 \pm 0.60 ^d	8.06 \pm 1.35 ^c
利湿活血方中剂量组	3.87 g/kg	140.13 \pm 8.02 ^c	5.41 \pm 0.45 ^b	9.89 \pm 1.90
利湿活血方低剂量组	1.935 g/kg	149.14 \pm 10.30	6.18 \pm 1.05	10.72 \pm 0.94

注:与空白组比较,^a $P<0.001$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$,^d $P<0.001$ 。

表 2 利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠血清 SOD、T-AOC 活性及 MDA 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	给药剂量	SOD(U/mL)	T-AOC(U/mL)	MDA(nmol/mL)
空白组	—	92.83 \pm 1.66	9.61 \pm 0.33	4.49 \pm 0.41
模型组	—	83.64 \pm 3.62 ^a	8.66 \pm 0.23 ^a	5.35 \pm 0.68 ^a
四妙丸组	1.60 g/kg	84.18 \pm 2.29	9.27 \pm 0.15 ^c	5.18 \pm 0.59
苯溴马隆组	10 mg/kg	89.79 \pm 4.51 ^d	9.40 \pm 0.17 ^c	4.65 \pm 0.40 ^c
利湿活血方高剂量组	7.74 g/kg	92.02 \pm 1.78 ^d	9.20 \pm 0.18 ^b	4.68 \pm 0.22 ^b
利湿活血方中剂量组	3.87 g/kg	88.12 \pm 2.59 ^c	9.17 \pm 0.37 ^b	4.84 \pm 0.20
利湿活血方低剂量组	1.935 g/kg	87.64 \pm 2.10 ^c	9.00 \pm 0.27	5.08 \pm 0.38

注:与空白组比较,^a $P<0.001$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$,^d $P<0.001$ 。

表 3 利湿活血方对高尿酸血症大鼠肾脏 SOD、T-AOC 活性及 MDA 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	给药剂量	SOD(U/mg)	T-AOC(nmol/mg)	MDA(nmol/mg)
空白组	—	4.26±1.61	1.36±0.22	0.43±0.04
模型组	—	2.27±0.65 ^b	0.98±0.14 ^a	0.57±0.08 ^b
四妙丸组	1.60 g/kg	3.08±0.20	1.24±0.31	0.45±0.04 ^c
苯溴马隆组	10 mg/kg	3.63±0.56 ^c	1.31±0.27 ^c	0.46±0.03 ^d
利湿活血方高剂量组	7.74 g/kg	3.50±1.16 ^c	1.31±0.29 ^c	0.46±0.07 ^d
利湿活血方中剂量组	3.87 g/kg	2.38±0.80	1.09±0.31	0.49±0.07 ^c
利湿活血方低剂量组	1.935 g/kg	2.31±0.45	1.08±0.12	0.51±0.07

注：与空白组比较，^a $P<0.01$ ，^b $P<0.001$ ；与模型组比较，^c $P<0.05$ ，^d $P<0.01$ ，^e $P<0.001$ 。

3 讨论

尿酸是机体内嘌呤代谢的终产物,体内尿酸生成增多和(或)排泄减少时出现循环血尿酸含量增高,所以从病因上分析,尿酸产生过多和(或)经肾排泄不足是高尿酸血症发生的主要病因。若高尿酸血症长期得不到缓解,尿酸盐沉积于四肢关节就会诱发痛风的发作,并会导致冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑血管疾病、肾功能不全以及代谢综合征等多种疾病^[5-6],其中高尿酸血症引起的肾损害最为常见。如果尿酸性肾损害得不到及时治疗,将最终发展为尿毒症,使病情恶化。因此,对高尿酸血症及其早期肾损害的防治尤为重要。

XOD、ADA 是体内嘌呤代谢的关键酶,有研究表明,XOD 主要存在于肝脏中,随着机体的高嘌呤饮食的增加,XOD 活性逐渐增强,从而导致肝细胞膜的通透性增加,使细胞中 XOD 释放入血中而致血清中 XOD 活性升高^[7]。在尿酸的生成过程中,嘌呤核苷酸先在单核苷酸酶的催化下代谢生成嘌呤核苷(鸟苷和腺苷),其中的腺苷在 ADA 的催化下转化成次黄嘌呤核苷,次黄嘌呤核苷和鸟苷在嘌呤核苷磷酸酶的催化下,分别生成次黄嘌呤和鸟嘌呤。其中次黄嘌呤经过 XOD 的催化生成黄嘌呤。黄嘌呤进一步经过 XOD 的氧化转化为尿酸,可见机体尿酸水平的高低与 ADA、XOD 活性的变化密切相关。

高尿酸血症的发生、发展与机体氧化应激存在着密切关系。有研究发现,血清尿酸水平升高可导致氧化应激损伤增加,从而使机体抗氧化能力的降低^[8-9]。SOD 的主要作用是清除机体的超氧阴离子,使氧自由基进一步生成 H₂O₂,是天然的抗氧化酶,在机体的氧化与抗氧化平衡中发挥重要作用,其活性的强弱是评价组织器官抗氧化能力的关键指标之一。T-AOC 是一个体系内各种抗氧化物质和酶的总体水平的体现,其活性可反映机体自由基

代谢以及机体对外来刺激的代偿能力,是用来衡量机体组织非酶促和酶促防御体系对活性氧自由基分解和清除的总体能力^[10]。MDA 作为脂质过氧化程度的评价指标,是生物膜不饱和脂肪酸与氧自由基脂质过氧化反应的重要代谢产物,能够定量评价反应细胞受自由基攻击氧化损伤的程度。SOD、T-AOC 活性的增强,可加强机体内对氧自由基的清除,减少脂质过氧化损伤,从而可使 MDA 含量降低。

中医学认为,高尿酸血症多因过食肥甘厚腻伤及脾胃,致使中焦运化失职,导致中满而出现湿蕴浊郁,瘀血阻滞而引发。利湿活血方是课题组根据高尿酸血症的病因病机结合临床用药特点创制的以清热利湿化瘀散结为治法的经验方^[3]。方中金钱草清热利尿,消石化坚,黄柏可增强其清热除湿之功;三七、赤芍、川牛膝三者配伍,活血通脉,化瘀消肿;土茯苓、粉防己、萆薢、青风藤利尿除湿,通利经络,全方共奏清热利尿除湿、活血化瘀散结之功,切中病机。本实验研究显示,利湿活血方能有效降低高尿酸血症大鼠血清 XOD、ADA 活性,减少黄嘌呤分解,从而使生成 UA 减少;升高血清及肾组织 SOD、T-AOC 活性,清除体内氧自由基,减少肾脏 MDA 含量;利湿活血方保护肾脏的作用机制可能与其抗氧化效应有关。

课题组前期研究结果表明^[11],利湿活血方在降低高尿酸血症大鼠血清尿酸的同时,还对肾脏功能和形态的损伤具有一定的保护作用。本实验基于前期的实验结果,进一步研究了利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠的尿酸生成相关酶及肾脏抗氧化能力等方面的影响,表明利湿活血方能降低尿酸生成相关酶水平,增强高尿酸血症大鼠的肾脏抗氧化能力,清除过量的活性氧自由基。因此,利湿活血方在降低高尿酸血症模型大鼠血清尿酸的同时,还能保护肾脏,抗氧化应激损伤可能是其机制之一,

本方的组方法则和用药经验可为临床综合治疗高尿酸血症及其并发症提供思路与借鉴。

参 考 文 献

- [1] 葛均波,徐永健. 内科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:790.
- [2] 谷现恩. 高尿酸血症与肾脏损害[J]. 中医临床医生, 2011, 39(3):3-5.
- [3] 刘畅,王淳,郑媛,等. 利湿活血方对高尿酸血症模型大鼠血管内皮功能的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(1): 10-15.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2011:1261-1263.
- [5] Khanna D, Fitzgerald JD, Khanna PP, et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia [J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2012, 64(10): 1431-1446.
- [6] Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Comorbidities of gout and hyperuricemia in the US general population: NHANES 2007-2008 [J]. Am J Med, 2012, 125(7): 679-687.
- [7] 孔悦,张冰,刘小青,等. 黄嘌呤氧化酶活性在高尿酸血症动物模型中的变化[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(6): 38-40.
- [8] 徐玉龙,刘兆阳,丁琪. 血尿酸水平与氧化应激在急性脑梗死发生中的关系探讨[J]. 卒中与神经疾病, 2010, 17(1): 9-19.
- [9] Kurra V, Eraranta A, Jolma P, et al. Hyperuricemia, oxidative stress and carotid artery tone in experimental renal insufficiency [J]. Am J Hypertens, 2009, 22(9): 964-970.
- [10] 张先平,王乾兴,陈斌,等. 当归多糖抑制氧化损伤延缓造血干细胞衰老[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 407-412.
- [11] 郑媛,王淳,李伟,等. 复方痛风康对高尿酸血症模型大鼠肾功能的保护作用及影响 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β_1 的研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(7): 575-578.

(收稿日期: 2016-10-27)

(本文编辑: 韩虹娟)