

建立高尿酸血症动物模型实验研究

施琬, 黄惠珠, 李钟, 胡旭光, 韩彬

广东药学院中药学院, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 探讨构建科学、合理、稳定的高尿酸血症动物模型, 为治疗高尿酸血症药物药效及机制研究奠定基础。方法: 采用次黄嘌呤、氧嗪酸钾和乙胺丁醇三者联合应用造模。模型组采用次黄嘌呤(25 g/kg) 饲料喂养, 乙胺丁醇(250 mg/kg) 灌胃并同时皮下注射氧嗪酸钾(200 mg/kg); 模型组灌胃给予腺嘌呤(100 mg/kg) 和乙胺丁醇(250 mg/kg)。连续检测大鼠血清中尿酸水平, 并进行肾脏组织病理学观察, 综合评价其对肾脏的影响。结果: 模型组大鼠连续给药10天后, 其尿酸水平均明显升高, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组在造模的第3、7天的给药后3h血清尿酸值已明显升高, 12~24h与空白对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模后模型组大鼠的尿素氮与空白对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。2组模型动物血清肌酐和谷丙转氨酶与空白对照组比较无差异。模型组肾小管-间质病理损害程度积分均低于模型组($P < 0.05$)。结论: 两种造模方法均能有效造模, 模型组更适合于高尿酸血症治疗药物药效筛选及作用机制的研究。

[关键词] 高尿酸血症; 次黄嘌呤; 氧嗪酸钾; 乙胺丁醇; 动物模型; 大鼠

[中图分类号] R589.7 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415(2015)06-0273-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.06.128

痛风是由于长期嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄减少所引起的常见代谢性疾病, 临床上首先表现为高尿酸血症, 其诊断标准定义为尿酸水平男性 $>420 \mu\text{mol/L}$, 女性 $>357 \mu\text{mol/L}$, 其主要临床表现为反复发作的急性痛风性关节炎、慢性痛风性关节炎、痛风石、痛风性肾病, 严重者出现关节畸形及功能障碍, 有些患者还可伴发高脂血症、糖尿病、高血压病及心脑血管病^[1-2]。

复制大鼠持续性高尿酸血症模型的意义主要是为了研究治疗高尿酸血症药物的药效和作用机制, 现有造模方法虽可使大鼠尿酸较快升高, 但尿酸水平维持时间较短, 很难观察到药物降尿酸的全程作用以及用于作用机制的研究, 且大部分实验显示大鼠肾脏损害出现早并且较重, 与人类发病过程不符。故目前尚缺乏理想的大鼠持续性高尿酸血症动物模型^[3-4], 从而对该类药物的研究带来很大影响, 故积极摸索造模方法具有重要意义。

目前, 制作高尿酸血症动物模型给药类型主要有3种: ①促进尿酸生成增多, 如补充尿酸、酵母、腺嘌呤、次黄嘌呤; ②抑制尿酸分解, 如给予氧嗪酸钾; ③抑制尿酸排泄: 如灌胃乙胺丁醇。本实验拟采取含次黄嘌呤饲料喂养、皮下注射氧嗪酸钾和灌胃乙胺丁醇3种药物联合造模, 与腺嘌呤联合乙胺丁醇造模做比较, 观察受试动物大鼠血清尿酸值的变化, 以探讨3种药物作用下, 复制大鼠高尿酸模型的可行性。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠, 雄性, 体重180~220g, 购自广州中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(粤)2013-0034。

1.2 试剂与仪器 盐酸乙胺丁醇片(生产批号: 130102), 广州白云山明兴制药有限公司; 腺嘌呤(生产批号: ZXRYE-TP), 梯希爱(上海)工业发展有限公司; 次黄嘌呤(生产批号: ZY131028), 上海紫一试剂厂; 氧嗪酸钾(生产批号: 131015) 瀚渤(上海)贸易有限公司; 肌酐试剂盒(生产批号: 20140108), 谷丙转氨酶试剂盒(生产批号: 20140106), 尿素氮试剂盒(生产批号: 20140108), 尿酸试剂盒(生产批号: 20131217), 南京建成生物工程研究所; 德国sigma高速离心机; AMS-18自动生化分析仪, 北京奥普森生物科技有限公司。

2 方法

2.1 药物配制 饲料制作: 用打粉机将正常饲料粉碎成粉末后加入次黄嘌呤搅拌均匀, 取出加入灭菌蒸馏水和好, 用50 mL针筒挤出圆柱状饲料。放入烘箱烘干至饲料中残留水分挥发即可。盐酸乙胺丁醇配制: 将药片压碎, 加蒸灭菌蒸馏水溶解、混匀, 配成25 mg/mL。氧嗪酸钾盐配制: 干粉研磨约至细粉后, 滴加入橄榄油研磨, 可保存2~3天。

2.2 动物分组及处理 将雄性SD大鼠30只随机分为空白对照组、模型组、组, 共3组, 每组10只。大鼠均单笼饲养。实验前24h开始喂饲饲料, 模型组饲料中含次黄嘌呤25

[收稿日期] 2014-12-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173194)

[作者简介] 施琬(1990-), 男, 在读硕士研究生。

[通讯作者] 韩彬, E-mail: hblz99@21cn.com。

g/kg, 正常对照组和模型组给予正常饲料, 连续喂饲。开始实验前, 记录大鼠12h的摄食量。模型组灌胃给予乙胺丁醇250 mg/kg, 给药体积为10 mL/kg, 同时皮下注射氧嗪酸钾200 mg/kg, 给药体积为0.5 mL/kg; 模型组灌胃给予腺嘌呤100 mg/kg和乙胺丁醇250 mg/kg制备而成的混悬液, 给药体积为10 mL/kg。连续10天。

2.3 血尿酸测定 造模前1天, 于各组大鼠眼眶后静脉丛取血置于1.5 mL离心管中, 收集的血液样品常温放置3h, 4000 rpm/min离心15 min, 得血清。模型组于开始实验的第3和7天皮下注射氧嗪酸钾后的第3、6、12、24 h于大鼠眼眶后静脉丛取血置于1.5 mL离心管中, 收集的血液样品常温放置3h。4000 rpm/min, 半径10 cm离心15 min, 得血清。实验第10天给药后第6h于各组大鼠眼眶后静脉丛取血处死前采血置于5 mL离心管中, 所收集的血液样品常温放置3h。4000 rpm/min离心15 min, 得血清。各批次血清样本均使用自动生化分析仪测定血尿酸。

2.4 肾脏病理及损害程度的判断 造模第10天给药后6h处死各组大鼠, 沿腹中线逐层剪开腹膜, 推开内脏组织, 找到肾脏, 剪开肾包膜, 观察肾脏肉眼改变, 组织标本置于10%中性福尔马林缓冲液中保存固定48h后, 用石蜡包埋机常规包埋, 行切片及HE染色。肾小管-间质病理损害程度的判断: 每张切片随机选取10个不重叠视野测定, 计算病变面积与同视野肾皮质总面积的百分比, 按以下方法换算为分数后取平均值。肾小管间质炎症程度半定量评分法: 0分, 无炎症细胞浸润; 1分, 炎症细胞浸润<25%; 2分, 炎症细胞浸润25%~49%; 3分, 炎症细胞浸润50%~75%; 4分, 炎症细胞浸润>75%。肾小管病变的评分观察指标包括以下2个方面: 肾小管变性、坏死; 肾小管扩张、萎缩。按病变程度与范围进行半定量评分: 0分, 无小管病变; 1分, 病变小管面积<10%; 2分, 病变小管面积10%~25%; 3分, 病变小管面积26%~75%; 4分, 病变小管面积>75%。以上结果的判读采用盲法进行, 由2名与本实验无关的病理研究员实施^[6]。

2.5 统计学方法 采用SPSS17.0软件进行统计, 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 分级组间多重比较采用非参数秩和检验与秩变换分析方法。

3 实验结果

3.1 各组血尿酸值比较 见表1、表2。模型组、空白组大鼠连续给药10天后, 其血尿酸水平均明显升高, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。模型组在造模的第3和7天的给药后3h血尿酸值已明显升高, 到12h时, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 到24h时的尿酸值虽然下降, 但亦高于空白对照组($P<0.05$)。

3.2 各组尿素氮、肌酐、转氨酶变化比较 见表3。造模后模型组、空白组的尿素氮与空白对照组比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。2组模型动物血清肌酐和谷丙转氨酶与空白对照组

比较无差异。

表1 各组造模前后血尿酸值比较($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol/L}$

组别	n	造模前	造模后
空白对照组	8	95.63± 7.09	96.63± 12.49
模型组	8	100.63± 8.58	381.75± 61.75 ^①
模型组	8	98.25± 9.24	235.25± 24.20 ^①

与空白对照组比较, ① $P<0.05$

表2 2组造模第3和7天血尿酸值比较($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol/L}$

采血时间点	空白对照组	模型组	
		第3天	第7天
3h	95.36± 12.60	485.13± 116.60 ^①	483.13± 78.81 ^①
6h	97.20± 12.56	531.63± 188.03 ^①	422.50± 94.39 ^①
12h	96.28± 11.32	402.25± 84.47 ^①	365.38± 94.39 ^①
24h	96.63± 12.49	159.38± 54.40 ^①	218.75± 57.68 ^①

与空白对照组比较, ① $P<0.05$

表3 各组尿素氮、肌酐、谷丙转氨酶变化比较($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol/L}$

组别	n	尿素氮	肌酐	谷丙转氨酶
空白对照组	8	3.04± 0.51	54.5± 15.59	20.25± 6.14
模型组	8	6.2± 0.72 ^①	59.5± 6.95	23.75± 4.33
模型组	8	8.14± 2.1 ^①	60.38± 15.55	23.25± 6.69

与空白对照组比较, ① $P<0.05$

3.3 各组肾脏病理改变及损害程度比较 见图1、图2、图3、图4、图5、图6、表4、表5。空白对照组大鼠肾单位结构正常, 肾小管结构清晰, 上皮细胞排列整齐。髓质集合管管腔规则。模型组肾小球病变不明显, 单位组织结构完整, 肾间质小血管轻微充血, 肾小管管腔呈不规则形, 部分上皮细胞水肿, 胞浆淡染。肾髓质由大量密集平行排列的集合管组成, 集合管管腔较大, 披覆单层立方或柱状上皮, 核圆居中, 胞浆染色淡, 无明显病变。模型组肾小球未见明显病变, 肾小管病变较严重, 部分上皮细胞变扁平, 部分肾小管内可见炎细胞聚集, 肾间质水肿, 伴中量炎细胞浸润。肾髓质集合管内可见白细胞管型。模型组肾小管-间质病理损害程度积分均低于模型组($P<0.05$)。

4 讨论

大鼠高尿酸血症模型的建立, 自2001年熊湘明等^[6]以灌胃腺嘌呤100 mg/kg和乙胺丁醇250 mg/kg取得成功后, 该方法得到广泛应用。而徐立等^[7]以喂饲含次黄嘌呤50 g/kg的饲料和皮下注射尿酸酶抑制剂200 mg/kg, 陈光亮等^[8]则以皮下注射氧嗪酸钾200 mg/kg和灌胃乙胺丁醇250 mg/kg, 也都成功建立。

高尿酸血症的相对稳定和维持一直是此类模型制作过程中的难点, 既往研究表明, 连续给予造模剂各组大鼠血清尿酸值变化与单次给予造模剂不同, 后者仅可使受试动物血清尿酸值

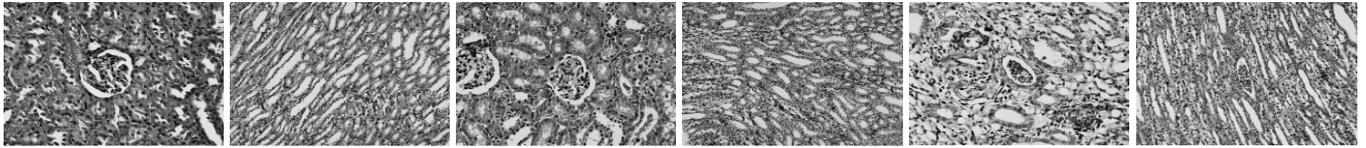


图1 空白对照组 肾小管 (×400) 图2 空白对照组 肾髓质 (×200) 图3 模型组 肾小管 (×400) 图4 模型组 肾髓质 (×200) 图5 模型组 肾小管 (×400) 图6 模型组 肾髓质 (×200)

表4 各组大鼠肾脏病理改变评分分级 (n=8)

组别	炎细胞浸润					肾小管损伤				
	0分	1分	2分	3分	4分	0分	1分	2分	3分	4分
空白对照组	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
模型组	0	6	2	0	0	0	2	5	1	0
模型组	0	0	1	5	2	0	0	0	5	3

表5 各组肾小管-间质病理损害程度积分比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	炎细胞浸润	肾小管损伤	总积分
空白对照组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	1.40±0.55 ^②	2.20±0.45 ^②	3.60±0.89 ^②
模型组	2.83±0.41 ^①	3.17±0.41 ^①	6.00±0.63 ^①

与空白对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

短暂升高, 维持时间约 12 h。而连续给予造模剂可使受试动物血清尿酸值持续升高, 并可在给予造模剂时段内始终维持在较高水平。根据既往报道, 若一次性灌胃给予次黄嘌呤 500 mg/kg 和尿酸酶抑制剂 50 mg/kg, 大鼠血尿酸在造模后 3、6、9 h 均高于正常水平, 但 12 h 后基本降至正常水平^[9]; 若每 12 h 给予次黄嘌呤 500 mg/kg 灌胃, 同时皮下注射尿酸酶抑制剂 200 mg/kg, 大鼠血尿酸不断升高, 但出现了动物死亡, 可能是尿酸沉积于肾组织导致肾脏严重损伤^[10]。本实验模型组采用尿酸前体物的次黄嘌呤、抑制尿酸排泄的乙胺丁醇和抑制尿酸酶活性的氧嗪酸钾, 三药联用造模, 在造模的 24 h 内, 大鼠的血尿酸明显高于正常值, 但波动较大, 特别是 12 h 以后, 血尿酸值下降, 但仍可维持在空白对照组的 1 倍以上, 且无动物死亡。

次黄嘌呤为人体生成尿酸的前体物质, 加上皮下注射尿酸酶抑制剂抑制尿酸分解, 乙胺丁醇抑制尿酸排泄, 可使尿酸在体内蓄积, 从而增加血尿酸水平, 并可以维持较长时间的高尿酸水平, 如给予合理的剂量, 可以造成长期高尿酸血症的大鼠模型, 但其中关键是给予次黄嘌呤的方法, 若在药效实验时再增加灌胃给药环节, 则可能会增加动物的死亡率。

造模过程中对肾脏的影响也一直是需要特别关注的问题。既要考虑造模药物自身对肾脏的作用, 而过高的尿酸血症本身也会引起急性尿酸性肾病。从图 5 和图 6 可以看到, 模型组肾小管病变较严重, 肾小球虽未见明显病变, 但尿素氮与空白对照组比较差异显著。腺嘌呤本身就导致大鼠慢性肾功能衰

竭^[11], 其造模引起的肾脏病变也并非全因高尿酸血症引发, 故不宜作为理想的高尿酸血症模型药物。

本实验采用尿酸前体物质, 尿酸排泄抑制剂和尿酸酶活性抑制剂三者联合应用造模, 较好的模拟了人体尿酸代谢异常的过程, 且可以保证在整个过程中高尿酸血症持续维持, 适合于高尿酸血症治疗药物药效及作用机制的筛选, 此为本次实验的突出创新点。若需建立稳定持续、长期可用的高尿酸血症大鼠模型, 可考虑适量减少饲料中次黄嘌呤量, 使动物血尿酸值升高控制在更为合理及安全的水平上。由于人类在进化过程中, 编码尿酸酶的基因发生了突变, 尿酸酶缺乏, 而大鼠体内尿酸酶的存在, 使其造模较为困难^[12], 建立更合乎人类发病机制、与人体尿酸代谢异常相似的动物模型, 仍需继续探索, 目前可根据实验条件及研究需要选择合适的动物及造模方法。

[参考文献]

- [1] 中国医师协会心血管内科医师分会. 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]. 中国当代医药, 2009, 24(16): 5-8.
- [2] Lee SJ, Terkeltaub RA. New developments in clinically relevant mechanisms and treatment of hyperuricemia[J]. Curr Rheumatol Rep, 2006, 8: 224-230.
- [3] 刘静, 徐玲玲. 常用痛风模型的作用机制及评价[J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1193-1194.
- [4] 刘淑芬, 曾学军. 高尿酸血症动物模型研究进展[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(3): 344-347.
- [5] 曹雪娇, 侯卫平, 张媛媛, 等. P2X7/NALP3 在急性肾小管坏死肾组织中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(6): 558-563.
- [6] 熊湘明, 曲竹秋. 大鼠高尿酸血症模型的建立[J]. 天津中医学院学报, 2001, 20(4): 28-29.
- [7] 徐立, 时乐. 大鼠持续性高尿酸血症模型复制方法探讨[J]. 山东医药, 2008, 48(34): 39-40.
- [8] 陈光亮, 武松, 那莎, 等. 萘醇总皂苷对慢性高尿酸血症大鼠尿酸排泄指标的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(1): 75-80.
- [9] 徐立, 时乐, 赵芳, 等. 大鼠急性高尿酸血症模型的复制方法初探[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(7): 976-978.

- [10] 徐立, 时乐. 灌服与喂饲次黄嘌呤复制大鼠持续性尿酸血症模型方法初探[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1671-1673.
- [11] 耿静. 腺嘌呤所致大鼠慢性肾功能衰竭的实验研究[J]. 河南中医学院学报, 2008, 23(6): 24-25.
- [12] Wu XW, Muzny DM, Lee CC, et al. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution[J]. *J Mol Evol*, 1992, 34(1): 78-84.

(责任编辑: 骆欢欢)

体外试验评价甘草对肠黏膜 P-糖蛋白的影响

李秀琼¹, 孙亚彬², 刘思佳³, 张继平⁴

1. 佛山市中医院药剂科, 广东 佛山 528000
2. 南方医科大学南方医院药物临床机构, 广东 广州 510515
3. 南方医科大学南方医院药学部, 广东 广州 510515
4. 南方医科大学附属佛山医院, 广东 佛山 528000

[摘要] 目的: 观察甘草对 P-糖蛋白 (P-gp) 底物经大鼠不同区段肠黏膜透过性的差异, 以评价其对肠黏膜 P-gp 功能的影响。方法: 通过对大鼠口服甘草煎液、生理盐水一周后, 使用体外扩散池 (Ussing Chamber) 技术评价罗丹明 123 (R123) 和荧光素钠 (CF) 经大鼠空肠回肠结肠黏膜的经时吸收方向和分泌方向的透过量和表观渗透系数。R123 和 CF 在接受室的浓度用荧光分光光度计检测。结果: R123 的透过性比较中, 甘草组与生理盐水组组内比较, 差异有统计学意义 ($F=5.602$, $P=0.000$)。CF 的透过性比较中, 甘草组组内比较, 差异有统计学意义 ($F=20.140$, $P=0.000$)。结论: 甘草对底物药物 R123 的影响可能与存在于肠黏膜的 P-gp 有关, 这可能是甘草与药物产生协同作用的机制之一。

[关键词] 甘草; Ussing Chamber 技术; P-糖蛋白 (P-gp)

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 06-0276-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.06.129

中医学素有“十方九草, 无草不成方”之说, 甘草配伍其他药物有增强药物疗效的作用。许立等^[1]研究提示了甘草对肝药酶有诱导作用。由于多药耐药蛋白 P-糖蛋白 (P-gp) 的底物特异性很大程度上与细胞色素 P450 相似^[2], 二者有很多重叠的底物, 所以研究甘草对肠黏膜 P-gp 产生的影响是非常有意义的。因此, 笔者采用体外扩散池 (Ussing chamber) 实验技术的方法来分析甘草对 P-gp 底物经大鼠不同区段肠黏膜的透过的影响, 找出甘草对 P-gp 底物药物吸收影响的机理之一。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 罗丹明 123 (R123, 批号 046K3688), 荧光素钠 (CF, 批号 047K0676), 羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液

(Hepes) [(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine]ethanesulfonic acid, 批号 016K54331)], Trizma base [Tris (hydroxyethyl aminomethane), 批号 103K5411]。以上试剂均采购自美国 Sigma 公司。二甲基亚砜 (DMSO) 购自广州化学试剂厂, 戊巴比妥钠购自中国医药 (集团) 上海化学试剂厂, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与设备 荧光分光光度计 (美国 Waters 公司, 型号为 474); CQ-20 超声波清洗器 (明珠电器); TGL-16B 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); 单向电容运转电动机 (上海非标电机有限公司); 7 mL Ussing chamber 装置 (Harvard, 美国)。

1.3 药物溶液的制备

1.3.1 甘草提取液 甘草称重后加入 15 倍量的蒸馏水, 浸泡

[收稿日期] 2014-11-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81073061); 南方医科大学南方医院院长基金项目 (2012C028); 广东省医学科研基金项目 (B2013244)

[作者简介] 李秀琼 (1977-), 女, 主管中药师, 主要从事中药药理与临床应用研究工作。

[通讯作者] 张继平, E-mail: fszjping@163.com