

· 论著 ·

[文章编号] 1007-0893(2023)20-0001-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.20.001

改良生酮饮食对高尿酸小鼠的影响及其作用机制研究

王莎¹ 孙文玉² 童国相³ 贺合理¹

(1. 长沙医学院附属第一医院, 湖南 长沙 410219; 2. 长沙医学院, 湖南 长沙 410219; 3. 湖南循证生物科技有限公司, 湖南 衡阳 421099)

[摘要] 目的: 观察改良生酮饮食对高尿酸血症(HUA)模型小鼠的影响并探讨其作用机制。方法: 使用腺嘌呤和氧嗪酸钾建立 HUA 模型小鼠进行体内试验, 检测小鼠体质量及尿氢离子浓度指数(pH)水平, 血糖、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、胰岛素抵抗水平及血清中尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)水平, 并检测脂肪组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、1型纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及白细胞介素-6(IL-6)的水平, 观察小鼠肾组织病理学变化, 考察桑叶水改良生酮饮食的降尿酸效果。结果: 改良生酮饮食相较于经典生酮饮食能够降低高尿酸模型小鼠体质量及血清中 UA、BUN 和 CRE 水平, 降低脂肪组织中促炎脂肪因子的水平, 调节尿 pH, 同时改善高尿酸模型小鼠的血糖血脂水平、胰岛素抵抗水平和肾组织损伤。结论: 桑叶水改良生酮饮食能够有效降低腺嘌呤和氧嗪酸钾致 HUA 小鼠的血清 UA 水平, 其作用机制可能与调节尿 pH、改善血糖血脂水平和胰岛素抵抗水平、降低促炎症脂肪因子水平有关。

[关键词] 高尿酸血症; 生酮饮食; 桑叶水; 小鼠; 动物实验**[中图分类号]** R 151.2; R 589 **[文献标识码]** A

Study on the Effect of Modified Ketogenic Diet on Hyperuricemic Mice and Its Mechanism of Action

WANG Sha¹, SUN Wenyu², TONG Guoxiang³, HE Heli¹

(1. The First Affiliated Hospital of Changsha Medical College, Hunan Changsha 410219; 2. Changsha Medical College, Hunan Changsha 410219; 3. Hunan Evidence-Based Biotechnology Co., Ltd, Hunan Hengyang 421099)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of a modified ketogenic diet on mice with a hyperuricemia(HUA) model and explore its mechanism of action. **Methods** Adenine and potassium oxonate were used to establish HUA model mice for in vivo experiments. The body mass and urine potential of hydrogen (pH) levels, blood glucose, total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), insulin resistance levels, and serum levels of uric acid (UA), blood urea nitrogen (BUN), and creatinine (CRE) were detected, and the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in adipose tissue were also examined. Histopathological changes were observed, and the uric acid-lowering effect of a modified ketogenic diet with mulberry leaf water was investigated. **Results** The modified ketogenic diet was able to reduce body mass and serum levels of UA, BUN, and CRE, decrease the expression of pro-inflammatory adipokines in adipose tissue, and regulate urinary pH, as well as improve glycemic lipid levels, insulin resistance levels, and renal tissue injury in mice modeled with hyperbaric acid, as compared with the classical ketogenic diet. **Conclusion** The modified ketogenic diet of mulberry leaf water can effectively reduce the serum UA level in mice with hyperuricemia caused by adenine and potassium oxonate, and its mechanism of action may be related to the regulation of urinary pH, improvement of blood glucose, blood lipid level, and insulin resistance level, and reduction of pro-inflammatory adipokines expression.

[Keywords] Hyperuricemia; Ketogenic diet; Mulberry leaf water; Mouse; Animal experiment

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是血液中尿酸盐水平过饱和的一种病理状态,其主要特征是机体内嘌呤代谢长期紊乱以及血液中尿酸水平的持续升高,长期尿酸水平的升高可导致痛风的发生^[1-2]。近年来,随着生

活水平不断提高,人们的饮食习惯也发生改变,对高营养、高蛋白、高嘌呤食物的摄入增多,导致 HUA 和痛风的发病率日益增高,该病已成为一种常见病。据报道,中国的痛风和 HUA 患病率分别为 1.1% 和 13.3%,且该数据还

[收稿日期] 2023-08-10**[基金项目]** 湖南省教育厅科学研究项目(21C0901)**[作者简介]** 王莎,女,副主任医师,主要研究方向是内分泌方面。

在持续升高^[3]。目前西医临床治疗的主要药物有别嘌呤醇、苯溴马隆片等,具有疗效好但毒副作用大的特点^[4-6]。已有大量研究表明,桑叶中生物活性物质具有明显的降尿酸作用^[7-9],生酮饮食在HUA及痛风患者中有较好治疗效果^[10]。本研究探讨桑叶水改良生酮饮食对HUA模型小鼠的疗效及作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

氧嗪酸钾和腺嘌呤均购自Sigma公司;尿酸(uric acid, UA)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, CRE)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和三酰甘油(triglyceride, TG)试剂盒均购自南京建成有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、1型纤溶酶原激活物抑制物(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1beta, IL-1 β)及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒均购自上海江莱生物科技有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。RM2035型石蜡切片机(德国LEICA);ASP300型自动脱水机(德国LEICA);EG1160型石蜡包埋机(德国LEICA);显微镜(奥林巴斯CX23);OneTouch Ultra血糖仪(美国Life Scan)。

桑叶中药水煎液:取桑叶100 g、桑叶水煎液浓缩至2 g·mL⁻¹,置冰箱内保存,使用时蒸馏水稀释至0.05 g·mL⁻¹,小鼠灌胃给药浓度0.5 g·kg⁻¹。

1.2 实验动物

购置无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级昆明雄性小鼠48只,(6±1)周龄,体质量18~22 g,购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002,动物质量合格证号:320727210100363775。饲养在长沙医学院实验动物中心,实验单位使用许可证号:SYXK(湘)2022-0013,于恒温(20~26℃)、恒湿(相对湿度40%~70%)环境中适应性饲养1周后开始实验。本研究经长沙医学院附属第一医院伦理委员会批准,批准号:P20210324。

1.3 方法

1.3.1 分组与造模 将48只雄性昆明小鼠随机分为两组,分别为空白对照组24只,高尿酸模型组24只。随后将空白对照组分为对照组8只、对照组+经典生酮饮食组8只、对照组+改良生酮饮食组8只;高尿酸模型组分为模型组8只、模型组+经典生酮饮食组8只、模型组+改良生酮饮食组8只,共6组。采用氧嗪酸钾200 mg·kg⁻¹和腺嘌呤50 mg·kg⁻¹给高尿酸模型组小鼠灌胃21 d建立高尿酸模型小鼠,对照组给予等体积0.9%

氯化钠注射液灌胃。

1.3.2 动物喂养 对照组+改良生酮饮食组和模型组+改良生酮饮食组给予生酮饮食饲料喂养和灌胃桑叶中药水煎液(0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)及碳酸氢钠片(0.01 g·kg⁻¹·d⁻¹)。对照组和模型组给予普通饲料喂养和灌胃同等体积的0.9%氯化钠注射液;对照组+经典生酮饮食组和模型组+经典生酮饮食组给予经典生酮饮食饲料喂养和灌胃同等体积的0.9%氯化钠注射液。饮食喂养均持续3个月。配置小鼠普通饲料、经典生酮饲料及改良生酮饲料。小鼠普通饲料和经典生酮饮食均购自南通特洛菲实验公司。改良生酮饲料在经典生酮饮食饲料基础上添加桑叶中药水煎液及碳酸氢钠片。

1.3.3 样本采集与处理 小鼠禁食、不禁水12 h后用异氟醚对小鼠进行全身麻醉,待小鼠深度麻醉后眼眶静脉窦入路采集小鼠血液。各组小鼠分别在不同时间点(第1、7、14、21、110天)采血进行生化测定。第110天采血后,用二氧化碳安乐死处死小鼠。二氧化碳安乐死的过程是逐渐填满二氧化碳,填充率为腔体体积的10%~30%。取肾脏组织及附睾脂肪组织用福尔马林溶液固定,-80℃保存。采样前1 d,将小鼠放入代谢笼,收集尿液样本24 h。

1.3.4 相关指标的检测 (1)体质量及尿氢离子浓度指数(potential of hydrogen, pH)常规检测:各试验组小鼠于造模21 d后,分别记录其在第1、7、14、21天的体质量及尿pH水平。饮食喂养3个月后再检测。

(2)胰岛素耐量试验(insulin tolerance test, ITT):实验结束后,在处死小鼠前,提前将小鼠禁食6~8 h,测得小鼠空腹血糖后,以0.7 mU·g⁻¹剂量腹腔注射胰岛素溶液,之后分别在15、30、60、90、120 min测得小鼠血糖值,共计6次。记录每次测得的血糖值。保持安静环境,避免小鼠产生应激。(3)血清生化指标检测:各试验组小鼠于造模21 d后,分别于第1、7、14、21天采用试剂盒检测小鼠血清中UA、BUN、CRE、TC和TG的水平,使用血糖仪检测小鼠血糖及胰岛素抵抗水平,饮食喂养3个月后再检测。(4)促炎症脂肪因子检测:实验结束处死小鼠后,提取脂肪组织,采用双抗体夹心酶联法检测脂肪组织中TNF- α 、PAI-1、IL-1 β 及IL-6的水平。

1.3.5 组织病理学观察 试验结束处死小鼠后,剖取全肾组织,用0.9%氯化钠注射液清洗后,浸泡在福尔马林溶液中固定。取肾组织进行脱水、石蜡包埋、制片(4 μ m)、HE染色、利用PRECICE全自动数字切片扫描系统观察各组织病理变化。

1.4 统计学分析

采用SPSS 28.0软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异

具有统计学意义。

2 结果

2.1 改良生酮饮食对正常小鼠及高尿酸小鼠体质量及尿 pH 水平的影响

长期饮食喂养后,与对照组相比,模型组小鼠体质量增加、尿 pH 降低;与对照组+经典生酮饮食组相比,对照组+改良生酮饮食组体质量降低;与模型组相比,模型组+改良生酮饮食组与模型组+经典生酮饮食组小鼠体质量降低、尿 pH 升高,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);模型组+改良生酮饮食组效果优于模型组+经典生酮饮食组,仅小鼠体质量的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见插页 1 图 1。

2.2 改良生酮饮食对正常小鼠及高尿酸小鼠血糖及血脂、胰岛素抵抗水平的影响

长期饮食喂养后,与对照组相比,模型组小鼠 TC、TG、血糖水平显著升高;与模型组相比,模型组+改良生酮饮食组与模型组+经典生酮饮食组小鼠 TC、TG、血糖水平降低,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);模型组+改良生酮饮食组效果优于模型组+经典生酮饮食组,仅血糖水平差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),见插页 1 图 2A~C。ITT (插页 1 图 2D) 结果显示,在 HUA 小鼠中,改良生酮饮食可显著增强 HUA 小鼠的胰岛素敏感性 ($P < 0.05$)。

2.3 改良生酮饮食对正常小鼠及高尿酸小鼠血清尿酸、尿素氮、肌酐的影响

长期饮食喂养后,与对照组相比,模型组小鼠 UA、BUN、CRE 水平显著升高;与模型组相比,模型组+改良生酮饮食组与模型组+经典生酮饮食组小鼠 UA、BUN、CRE 水平降低,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);模型组+改良生酮饮食组效果优于模型组+经典生酮饮食组,UA 和 BUN 的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见插页 2 图 3。

2.4 改良生酮饮食对正常小鼠及高尿酸小鼠脂肪组织的影响

长期饮食喂养后,与对照组相比,模型组小鼠脂肪组织中 TNF- α 、PAI-1、IL-1 β 、IL-6 水平升高;与模型组相比,模型组+改良生酮饮食组与模型组+经典生酮饮食组小鼠促炎脂肪因子水平均降低,TNF- α 、PAI-1 和 IL-1 β 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$);模型组+改良生酮饮食组效果优于模型组+经典生酮饮食组,仅 IL-1 β 的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见插页 3 图 4。

2.5 改良生酮饮食对正常小鼠及高尿酸小鼠肾组织的影响

与对照组相比,模型组小鼠肾组织出现明显病理性

变化,与对照组+经典生酮饮食组相比,对照组+改良生酮饮食组肾组织炎症浸润减少;与模型组+经典生酮饮食组相比,模型组+改良生酮饮食组肾组织炎症浸润减少,见插页 2 图 5。

3 讨论

HUA 作为一种动脉粥样硬化及冠心病疾病的独立危险因素,与代谢综合征的肥胖、血脂指标异常、高血压、冠心病、脑血管病和胰岛素抵抗等情况均存在紧密的联系^[11]。已有研究表明,生酮饮食在 HUA 及痛风患者中有较好治疗效果^[10]。桑叶总黄酮与别嘌醇的降尿酸效果相当^[12]。故以此为根据,使用传统中药联合生酮饮食对高尿酸小鼠进行治疗,探讨改良生酮饮食对 HUA 的作用机制。

本实验结果显示,长期饮食喂养后,改良生酮饮食相较于经典生酮饮食能够有效降低 HUA 小鼠体质量及血清中 UA、BUN、CRE 水平,调节尿 pH,且 HE 染色结果显示,改良生酮饮食能够明显改善 HUA 小鼠的肾组织损伤。这提示改良生酮饮食相较于经典生酮饮食具有更高的安全性和更好的疗效。近年来的研究表明,炎症因子与 HUA 合并代谢异常指标密切相关,高尿酸症患者血清中的促炎症脂肪因子 TNF- α 、PAI-1、IL-1 β 、IL-6 明显高于正常组,与血尿酸水平成正相关^[13]。HUA 患者相较于健康对照组受检者存在更多脂类代谢异常、糖酵解加剧、谷氨酰胺水平下降问题^[14-15]。本实验结果显示,长期饮食喂养后,在 HUA 小鼠中,改良生酮饮食组相较于经典生酮饮食组能够有效降低血糖血脂水平及脂肪组织中促炎症脂肪因子的水平,且 ITT 结果显示,在 HUA 小鼠中,改良生酮饮食较经典生酮饮食显著增强了 HUA 小鼠的胰岛素敏感性。这提示改良生酮饮食可以有效改善 HUA 小鼠的血糖血脂水平及胰岛素抵抗水平,同时降低脂肪组织中促炎脂肪因子的水平。

综上所述,改良生酮饮食能够显著降低 HUA 小鼠的血 UA 水平,其机制可能与调节尿 pH、改善血糖血脂水平及胰岛素抵抗水平、降低促炎症脂肪因子水平有关,同时对肾组织有明显保护作用,但其具体作用机制还有待进一步研究探索。

[参考文献]

- [1] 王菱,彭艾.中国高尿酸血症及痛风诊疗指南(2019)解读[J].西部医学,2021,33(9):1254-1257.
- [2] 罗是是,王振平,陈峰,等.痛风性膝关节炎的 MRI 诊断[J].实用医学杂志,2018,4(34):645-648.
- [3] SONG S H, PARK D H, BAE M S, et al. Ethanol Extract of *Cudrania tricuspidata* Leaf Ameliorates Hyperuricemia in Mice via Inhibition of Hepatic and Serum Xanthine Oxidase

- Activity [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018: 1-9.
- [4] 陈一萍, 张劼, 周嘉, 等. 别嘌醇药物不良反应风险因素研究进展 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36 (1): 137-141.
- [5] CHOU H W, CHIU H T, TSAI C W, et al. Comparative effectiveness of allopurinol, febuxostat and benzbromarone on renal function in chronic kidney disease patients with hyperuricemia: a 13-year inception cohort study [J]. Nephrol Dial Transplant, 2018, 33 (9): 1620-1627.
- [6] KIM S, KIM H J, AHN H S, et al. Renoprotective effects of febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia: A systematic review and meta-analysis [J]. Kidney Research and Clinical Practice, 2017, 36 (3): 274-281.
- [7] 宋向飞, 雷雅坤, 刘宁, 等. 药食同源花叶类植物对高尿酸血症的功效及机理研究进展 [J]. 华北农学报, 2021, 36 (S1): 195-201.
- [8] 张鹏宇. 中药对痛风性关节炎炎症因子的影响的研究概述 [J]. 环球中医药, 2019, 12 (11): 1770-1773.
- [9] 吴美音, 陈淑宁, 高洁, 等. 菊苣、葛根、桑叶配方对高尿酸合并关节炎小鼠的降尿酸和痛风性关节炎的干预效果 [J]. 食品工业科技, 2020, 41 (16): 308-313.
- [10] 李钰琦, 周永波, 单勇军, 等. 生酮饮食在代谢疾病治疗的应用及方案研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44 (22): 352-359.
- [11] LEE S J, OH B K, SUNG K C. Uric acid and cardiometabolic diseases [J]. Clinical Hypertension. 2020, 26 (1): 13.
- [12] 朱发伟, 楼招欢. 桑抹茶对高尿酸血症模型大鼠血尿酸水平及肠道菌群的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34 (8): 1084-1088.
- [13] 郑红, 李旭东, 王华国. 促炎症脂肪因子与高尿酸血症相关性研究 [J]. 西部医学, 2014, 26 (10): 1374-1376.
- [14] 方宁远, 吕力为, 吕晓希, 等. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识 (2023 年版) [J]. 中国实用内科杂志, 2023, 43 (6): 461-480.
- [15] 杨瑞凤, 郭永平, 魏丽, 等. 高尿酸血症患者糖、脂代谢异常的临床研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018, 19 (2): 121-124.

[文章编号] 1007-0893(2023)20-0004-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.20.002

祛瘀止痛方治疗蛛网膜下腔出血头痛的效果研究

鲁红伟 王丽萍*

(开封市人民医院, 河南 开封 475000)

[摘要] 目的: 分析祛瘀止痛方治疗蛛网膜下腔出血 (SAH) 头痛的效果。方法: 选择 2019 年 9 月至 2021 年 9 月期间开封市人民医院收治的 98 例 SAH 头痛患者作为研究对象, 使用随机数字表将其分为对照组与观察组, 各 49 例。对照组患者采取常规对症治疗联合脑脊液置换术, 观察组患者在其基础上应用祛瘀止痛方治疗。针对两组患者的临床疗效、疼痛数字评价量表 (NRS) 评分、美国国立卫生研究院卒中量表 (NIHSS) 评分、Barthel 指数 (BI) 评分以及不良反应情况进行比较。结果: 观察组患者治疗总有效率高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗后观察组患者疼痛 NRS 评分低于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗后观察组患者 BI 评分高于对照组, NIHSS 评分低于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组患者不良反应率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 祛瘀止痛方治疗 SAH 头痛效果确切, 可以有效缓解患者的疼痛症状, 促进神经功能恢复, 保障日常生活能力, 安全性佳。

[关键词] 蛛网膜下腔出血; 头痛; 祛瘀止痛方

[中图分类号] R 743.35 **[文献标识码]** B

Effect of Quyu Zhitong Prescription on Subarachnoid Hemorrhage Headache

LU Hongwei, WANG Liping*

(Kaifeng People's Hospital, Henan Kaifeng 475000)

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of Quyu Zhitong prescription on headache caused by subarachnoid hemorrhage (SAH).

[收稿日期] 2023 - 08 - 20

[基金项目] 开封市科技发展计划项目 (2003062)

[作者简介] 鲁红伟, 男, 副主任医师, 主要研究方向是中医药治疗缺血性脑血管病。

[*通信作者] 王丽萍 (E-mail: wlp661@126.com)