

· 论 著 ·

# 碱性饮用水预防小鼠高尿酸血症的作用研究

于莎莉<sup>1</sup>, 林晨<sup>2</sup>, 蒋志韬<sup>3</sup>, 朱超<sup>4</sup>, 赵新元<sup>1</sup>

1.南通大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 江苏 南通 226019; 2.上海市浦东新区疾病预防控制中心病媒生物与寄生虫病防治科;  
3.中国计量大学机电工程学院机械设计制造及其自动化系; 4.海军军医大学第三附属医院肾内科

**摘要:** **目的** 观察碱性饮用水预防小鼠高尿酸血症的作用。**方法** 60只雄性SPF级昆明小鼠随机分为6组:碱性饮用水干预组(包括pH 7.3、pH 8.0、pH 9.3饮用水干预组),分别饮用pH值为7.3±0.5、8.0±0.5和9.3±0.6的饮用水;对照组、模型组和阳性药物组(别嘌醇终浓度为2 g/L)饮用普通双蒸水。除对照组外,各组小鼠连续酵母(1.5 g/mL)灌胃13 d,第14天腹腔注射300 mg/kg的氧嗪酸钾后禁食不禁水1 d。第16天取血清检测尿酸、肌酐和尿素氮,取肾脏组织切片染色后观察形态,采用蛋白质免疫印迹法检测肾脏组织中中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(NGAL)、金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP1)、有机阴离子转运蛋白1(OAT1)、尿酸盐转运蛋白1(URAT-1);采用实时荧光定量PCR检测URAT-1和OAT1的mRNA。**结果** 模型组小鼠血清尿酸含量高于对照组和pH 9.3饮用水干预组(均 $P<0.05$ )。pH 9.3饮用水干预组小鼠肾小管病变个数和肾小管病变面积少于模型组(均 $P<0.05$ )。pH 9.3饮用水干预组小鼠NGAL和URAT-1蛋白相对表达量低于模型组,OAT1蛋白相对表达量高于模型组(均 $P<0.05$ )。pH 9.3饮用水干预组小鼠URAT-1 mRNA的相对表达量低于模型组,OAT1 mRNA的相对表达量高于模型组(均 $P<0.05$ )。**结论** pH值为9.3±0.6的碱性饮用水能有效预防小鼠高尿酸血症及其引起的急性肾脏组织损伤。

**关键词:** 高尿酸血症;碱性水;小鼠;尿酸;肾脏

中图分类号: R589.7 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087(2021)08-0772-05

## Preventive effect of alkaline drinking water on hyperuricemia in mice

YU Shali\*, LIN Chen, JIANG Zhitao, ZHU Chao, ZHAO Xinyuan

\*Department of Environmental Hygiene, School of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019, China

**Abstract: Objective** To observe the preventive effect of alkaline drinking water on hyperuricemia in mice. **Methods** Sixty male SPF Kunming mice were randomly divided into six groups: pH 7.3, pH 8.0, pH 9.3 intervention groups, in which the mice were given water with pH values of 7.3±0.5, 8.0±0.5 and 9.3±0.6, respectively; the control group, model group and positive drug group (with 2 g/L allopurinol) were given double distilled water. Except for the control group, the mice in each group were given yeast by gavage (1.5 g/mL) for 13 days. On the 14th day, the mice were injected with 300 mg/kg potassium oxyzinat by intraperitoneal injection, and then fasted for 1 day. On the 16th day, serum uric acid, creatinine and urea nitrogen were detected, and renal tissues were stained to observe the morphology. The expression levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1), organic anion transporter 1 (OAT1) and urate transporter 1 (URAL-1) in renal tissues were determined by western blotting. The mRNA expression levels of URAL-1 and OAT1 were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. **Results** The level of serum uric acid was higher in the model group than in the control group and in the pH 9.3 intervention group (both  $P<0.05$ ). The number and area of renal tubular lesions were less in the pH 9.3 intervention group than in the model group (all  $P<0.05$ ). The relative expression levels of NGAL and URAT-1 proteins were lower in the pH 9.3 intervention group than in the model group, and the relative expression

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2021.08.004

基金项目: 江苏省高校自然科学研究面上项目(16KJB330007)

作者简介: 于莎莉, 博士, 讲师, 主要从事环境污染与人群健康相关研究工作

通信作者: 赵新元, E-mail: zhaoxinyuan@ntu.edu.cn

level of OAT1 protein was higher in the pH 9.3 intervention group than in the model group (all  $P < 0.05$ ). The relative expression level of URAT-1 mRNA was lower in the pH 9.3 intervention group than in the model group, and the relative expression level of OAT1 mRNA was higher in the pH 9.3 intervention group than in the model group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Alkaline drinking water with pH value of  $9.3 \pm 0.6$  can effectively prevent hyperuricemia and acute kidney injury in mice.

**Keywords:** hyperuricemia; alkaline water; mice; uric acid; kidney

高尿酸血症是嘌呤代谢紊乱引起的代谢性疾病, 临床症状主要为关节疼痛(痛风)和肾功能障碍等<sup>[1-2]</sup>。高尿酸血症的病理学基础是机体内尿酸生成与排泄的动态失衡, 即尿酸生成过多和(或)排泄减少<sup>[3-4]</sup>。目前常采用抑制尿酸合成、促进尿酸排泄或尿酸分解的药物预防高尿酸血症<sup>[5]</sup>, 虽然药效显著, 但价格贵且不良反应明显<sup>[6-8]</sup>。

碱性饮用水的 pH 值为 8~9, 大于普通饮用水(pH 值为 7 左右的中性水), 且富含矿物质。研究表明, 饮用碱性饮用水可降低肾结石发病风险, 保护肾脏功能<sup>[9]</sup>; 对胃食管反流病<sup>[10]</sup>、镉暴露相关的动脉粥样硬化<sup>[11]</sup>和骨折风险<sup>[12]</sup>均有一定的预防作用, 但预防高尿酸血症的作用尚不明确。本研究采用小鼠酵母粉灌胃法观察不同 pH 值饮用水对小鼠肾脏的组织病理学、生化指标及尿酸转运基因水平的影响, 探索碱性饮用水对高尿酸血症的预防作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 实验用雄性 SPF 级昆明小鼠 60 只, 约 6 周龄, 体重 ( $32 \pm 2$ ) g, 来源于南通大学动物实验中心。实验动物生产许可证号为 SCXK(苏)2019-000, 使用许可证号为 SYXK(苏)2020-0029。于南通大学实验动物中心的 SPF 级屏障环境进行实验。实验通过南通大学实验动物伦理审查(审批号: S20200608-002)。

**1.2 主要仪器与试剂** 小型台式高速冷冻离心机(Eppendorf, 5430R); 全自动血生化分析仪(迈瑞, BS-480); 显微镜(Leica, DM4000B); 化学发光凝胶成像仪(伯乐, ChemiDoc)。酵母粉(OXOID, LP0021); 别嘌呤粉末(Sigma, A8003); 氧嗪酸钾(Sigma, 156124); Trizol 裂解液(Takara, T9108); 反转录试剂盒(Takara, RR036A); 实验室用双蒸水(pH=6.8); pH 值分别为  $7.3 \pm 0.5$ 、 $8.0 \pm 0.5$ 、 $9.3 \pm 0.6$  的饮用水(网购); 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)抗体(Abcam, ab216462); 金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP1)抗体(Bioss, bs-0415R); 有机阴离子转运蛋白 1(or-

ganic anion transporter 1, OAT1) 抗体(Immunoway, YT3220); 尿酸盐转运蛋白 1(urate transporter 1, URAT-1) 抗体(Proteintech, 14937-1-AP)。

**1.3 溶液配制** 液体 1: 将酵母粉溶解于 pH 值为 6.8 的双蒸水, 配成 1.5 g/mL。液体 2: 在液体 1 中加入别嘌呤粉末(别嘌呤终浓度为 2 g/L), 配成 1.5 g/mL。液体 3: 将酵母粉溶解于 pH 值为  $9.3 \pm 0.6$  的饮用水, 配成 1.5 g/mL。液体 4: 将酵母粉溶解于 pH 值为  $8.0 \pm 0.5$  的饮用水, 配成 1.5 g/mL。液体 5: 将酵母粉溶解于 pH 值为  $7.3 \pm 0.5$  的饮用水, 配成 1.5 g/mL。

**1.4 分组与处理** 昆明小鼠适应性饲养约 7 d, 实验第 1 天体重约 39 g。将小鼠随机分为对照组、模型组、阳性药物组、pH 9.3 饮用水干预组、pH 8.0 饮用水干预组和 pH 7.3 饮用水干预组, 每组 10 只。对照组仅饮用双蒸水; 模型组给予液体 1, 按照 30 g/kg 每天灌胃 1 次; 阳性药物组给予液体 2, 按照酵母摄入浓度 30 g/kg 每天灌胃 1 次; pH 9.3、pH 8.0 和 pH 7.3 饮用水干预组分别给予液体 3、4、5, 按照酵母摄入浓度 30 g/kg 每天灌胃 1 次。连续灌胃 13 d, 灌胃期间小鼠正常饮食, 对照组、模型组与阳性药物组饮用普通双蒸水, 其他组饮用相应液体。第 14 天按照上述步骤灌胃后, 除对照组外, 其他 5 组小鼠腹腔注射 300 mg/kg 氧嗪酸钾。第 15 天小鼠禁食不禁水。

**1.5 生化指标检测** 实验第 16 天, 小鼠腹腔注射 0.2 mL/10 g 的 10% 乌拉坦麻醉, 从腹主动脉取血, 以半径 5 cm, 4 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 采用全自动生化分析仪检测血清尿酸、尿素氮和肌酐含量。

**1.6 组织病理学观察** 颈椎脱臼处死小鼠, 每组选 3 只小鼠同侧肾脏, 清洗表面血液后观察形态。观察结束后浸泡于福尔马林, 24 h 后脱水经石蜡包埋, 切片后进行苏木精-伊红(HE)染色。观察小鼠肾近曲小管上皮细胞损伤和肾间质水肿情况。

**1.7 肾脏损伤因子蛋白质免疫印迹试验** 检测各组小鼠肾脏组织损伤因子 NGAL、TIMP1 蛋白和尿酸转运基因 URAT-1、OAT1 蛋白表达水平。清洗肾脏表

面血液后取肾皮质收集至 EP 管中，迅速放入液氮，部分组织进行研磨裂解，测量全蛋白浓度后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。转膜后，用脱脂牛奶封闭，一抗孵育过夜，洗 3 次后，二抗孵育 1 h，用化学发光成像并分析结果。成像结果采用 Image J V1.48u 软件对每组条带的灰度值进行统计分析。

**1.8 肾脏组织尿酸转运基因 URAT-1、OAT1 的表达** 清洗肾脏表面血液后取肾皮质收集到 EP 管中，迅速放入液氮后，部分组织放置于已装有 1 mL Trizol 裂解液的研磨器中，均浆后取上清液加氯仿等试剂，提取总 RNA，测定浓度后按照试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA，然后用荧光染料渗入法进行实时荧光定量 PCR 检测，以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算基因的相对表达量。

**1.9 统计分析** 采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。采用 SPSS 26.0 软件统计分析，定量资料服从正态分布采用均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 描述，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 LSD 法。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 小鼠血清尿酸、尿素氮和肌酐含量比较** 各组小鼠血清尿酸含量差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。进一步两两比较结果显示，模型组小鼠血清尿酸含量高于对照组 ( $P<0.05$ )；阳性药物组和 pH 9.3 饮用水干预组小鼠血清尿酸含量低于模型组 ( $P<0.05$ )。各组小鼠血清尿素氮、肌酐含量差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 各组小鼠血清尿酸、尿素氮和肌酐含量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	尿酸 (mmol/L)	尿素氮 (mmol/L)	肌酐 ( $\mu\text{mol/L}$ )
对照组	51.33±20.94	2.79±0.18	24.02±1.30
阳性药物组	69.15±14.79 <sup>a</sup>	2.65±0.07	20.52±2.40
模型组	123.86±20.88 <sup>b</sup>	2.68±0.28	20.55±3.22
碱性饮用水干预组			
pH 7.3	125.36±4.66	2.95±0.79	23.33±5.80
pH 8.0	102.80±31.32	2.23±0.13	27.43±7.46
pH 9.3	77.06±25.89 <sup>a</sup>	2.46±0.40	23.34±4.81
F 值	8.858	1.921	1.699
P 值	<0.001	0.128	0.169

注：a 表示与模型组比较， $P<0.05$ ；b 表示与对照组比较， $P<0.05$ 。

**2.2 小鼠肾脏组织病理学改变** HE 染色结果显示：

对照组和阳性药物组小鼠肾细胞形态未出现明显异常；模型组肾小球萎缩、变性，数量较少，肾小管结构紊乱，上皮细胞呈现明显水肿、坏死，肾小管腔内出现淡红色絮状物，肾小管与肾间质界限不清晰，局部有炎性细胞浸润；pH 9.3 饮用水干预组肾皮、髓质结构清晰，肾小球未见增生或萎缩，肾小管上皮细胞未见肿胀、变性及坏死，管腔中未见管型，肾间质中未见炎性细胞浸润；pH 7.3 和 pH 8.0 饮用水干预组肾小球萎缩、变性，数量较少，肾小管结构紊乱，上皮细胞呈现明显水肿、坏死，肾小管腔内出现淡红色絮状物，肾小管与肾间质界限不清晰，局部有炎性细胞浸润。

各组小鼠肾小管病变个数和病变面积差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。进一步两两比较结果显示，模型组小鼠肾小管病变个数和面积多于对照组 ( $P<0.05$ )；阳性药物组和 pH 9.3 饮用水干预组小鼠肾小管病变个数和面积均少于模型组 ( $P<0.05$ )。见表 2。

表 2 各组小鼠肾脏病理切片肾小管病变个数和面积比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	病变个数	病变面积 ( $\mu\text{m}^2$ )
对照组	0	0
阳性药物组	10±3 <sup>a</sup>	150 558±38 014 <sup>a</sup>
模型组	30±5 <sup>b</sup>	497 299±50 520 <sup>b</sup>
碱性饮用水干预组		
pH 7.3	27±6	422 436±85 608
pH 8.0	28±4	444 988±99 170
pH 9.3	13±3 <sup>a</sup>	173 985±49 432 <sup>a</sup>
F 值	30.722	30.670
P 值	<0.001	<0.001

注：a 表示与模型组比较， $P<0.05$ ；b 表示与对照组比较， $P<0.05$ 。

**2.3 小鼠肾脏组织 NGAL、TIMP1、URAT-1 和 OAT1 蛋白水平** 各组小鼠肾脏组织 NGAL、TIMP1、URAT-1、OAT1 蛋白的相对表达量差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。进一步两两比较结果显示，模型组 NGAL、TIMP1、URAT-1 蛋白相对表达量高于对照组 ( $P<0.05$ )，OAT1 蛋白相对表达量低于对照组 ( $P<0.05$ )；阳性药物组和 pH 9.3 饮用水干预组 NGAL 和 URAT-1 蛋白相对表达量低于模型组 ( $P<0.05$ )、OAT1 蛋白相对表达量高于模型组 ( $P<0.05$ )；阳性药物组 TIMP1 蛋白相对表达量低于模型组 ( $P<0.05$ )；pH 8.0 饮用水干预组 URAT-1 蛋白相对表达量低于模型组 ( $P<0.05$ )。见表 3。

**2.4 小鼠肾脏组织 URAT-1、OAT1 基因水平** 各组小鼠肾脏组织 URAT-1 和 OAT1 mRNA 的相对表达量差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较结果显示, 模型组 URAT-1 mRNA 相对表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ ), OAT1 mRNA 相对表达量低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 阳性药物组和 pH 9.3 饮用水干预组的 URAT-1 mRNA 相对表达量低于模型组 ( $P < 0.05$ ), OAT1 mRNA 相对表达量高于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

**表 3** 各组小鼠肾脏组织 NGAL、TIMP1、URAT-1 和 OAT1 蛋白的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	NGAL	TIMP1	URAT-1	OAT1
对照组	1.01±0.11	0.98±0.05	1.03±0.08	0.95±0.05
阳性药物组	1.37±0.37 <sup>a</sup>	1.37±0.13 <sup>a</sup>	1.07±0.17 <sup>a</sup>	0.88±0.07 <sup>a</sup>
模型组	4.08±0.67 <sup>b</sup>	2.13±0.33 <sup>b</sup>	1.86±0.26 <sup>b</sup>	0.57±0.13 <sup>b</sup>
碱性饮用水干预组				
pH 7.3	3.49±0.82	2.29±0.35	1.72±0.10	0.68±0.08
pH 8.0	4.78±1.00	1.78±0.31	1.25±0.20 <sup>a</sup>	0.56±0.07
pH 9.3	1.59±0.31 <sup>a</sup>	2.29±0.41	0.92±0.18 <sup>a</sup>	1.00±0.19 <sup>a</sup>
F值	19.383	9.993	14.740	9.598
P值	<0.001	0.001	<0.001	0.001

注: a 表示与模型组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

**表 4** 各组小鼠肾脏组织 URAT-1 和 OAT1 mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	URAT-1	OAT1
对照组	1	1
阳性药物组	0.80±0.13 <sup>a</sup>	0.74±0.06 <sup>a</sup>
模型组	2.19±0.34 <sup>b</sup>	0.41±0.14 <sup>b</sup>
碱性饮用水干预组		
pH 7.3	2.80±0.62	0.39±0.14
pH 8.0	2.11±0.63	0.51±0.07
pH 9.3	1.37±0.22 <sup>a</sup>	0.67±0.07 <sup>a</sup>
F值	11.295	18.361
P值	<0.001	<0.001

注: a 表示与模型组比较,  $P < 0.05$ ; b 表示与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

本实验给小鼠灌服酵母粉饲料模拟人服用高嘌呤类食物时引起嘌呤代谢紊乱导致的尿酸升高, 同时给予氧嗪酸钾腹腔注射来抑制小鼠体内的尿酸酶, 排除尿酸酶的干扰, 模拟人体产生高尿酸血症的机制<sup>[13]</sup>。

由于造模后小鼠可能出现短暂性的尿酸升高而后降低, 对小鼠禁食不禁水 1 天后采血, 以验证模型的稳定性。

模型组小鼠血清尿酸含量高于对照组, 表明高尿酸血症模型建模成功。阳性药物组小鼠血清尿酸含量低于模型组, 表明阳性药物降低血清尿酸成立。与模型组相比, pH 9.3 饮用水干预组小鼠血清尿酸含量降低, 其他干预组小鼠血清尿酸含量差异不明显, 后续将扩大样本量进一步研究。

与对照组相比, 模型组小鼠肾小管病变个数和面积增加, 表明高尿酸血症能够引起小鼠肾脏组织损伤; 与模型组相比, pH 9.3 饮用水干预组 NGAL 蛋白相对表达量降低, TIMP1 无明显差异, 提示 pH 值为 9.3±0.6 的饮用水可能预防小鼠高尿酸血症引起的急性肾损伤<sup>[14-15]</sup>。与对照组相比, 模型组 URAT-1 蛋白相对表达量升高, OAT1 蛋白相对表达量降低; 与模型组相比, pH 9.3 饮用水干预组 URAT-1 蛋白相对表达量降低, OAT1 蛋白相对表达量升高。URAT-1 和 OAT1 的 mRNA 结果与蛋白相对表达量结果相似。提示 pH 值为 9.3±0.6 的饮用水能作用于小鼠肾近端小管刷状缘侧的尿酸盐阴离子转运体 URAT-1, 抑制 URAT-1 mRNA 的表达进而减少 URAT-1 蛋白的生成, 减少肾对尿酸盐的重吸收, 降低血清尿酸水平; 同时, pH 值为 9.3±0.6 的饮用水作用于小鼠肾近端小管基底膜侧的肾组织尿酸转运蛋白 OAT1, 增加 OAT1 mRNA 的表达进而增加 OAT1 蛋白的生成, 分泌尿酸盐进入管腔, 起到肾分泌作用, 降低血清尿酸水平。

### 参考文献

- [1] AKKASILPA S, AVIHINGSANON Y, HANVIVADHANAKUL P, et al. Clinical manifestations of patients with hyperuricemia [J]. J Med Assoc Thai, 2004, 87 (Suppl.2): S41-S44.
- [2] 康俏玲, 方卫莲. 2 型糖尿病合并高尿酸血症患者血黏度及下肢血管流量研究 [J]. 预防医学, 2020, 32 (2): 175-177.
- [3] 李少峰, 陈燕, 董陆玲, 等. 张家口市体检人群高尿酸血症患病现状及影响因素分析 [J]. 预防医学, 2018, 30 (3): 236-239.
- [4] GUASCH-FEERÉ M, BULLÓ M, BABIO N, et al. Mediterranean diet and risk of hyperuricemia in elderly participants at high cardiovascular risk [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013, 68 (10): 1263-1270.
- [5] YU K H, CHEN D Y, CHEN J H, et al. Management of gout and hyperuricemia: multidisciplinary consensus in Taiwan [J]. Int J Rheum Dis, 2018, 21 (4): 772-787.
- [6] 孙珊珊, 曲连悦, 杜荣, 等. 高尿酸血症药物预防研究进展 [J]. 中国临床药理学与预防学, 2019, 24 (5): 589-594.

(下转第 779 页)