

当归养心汤对心肌梗死大鼠干预作用的血液代谢组学研究

李雪¹, 王婷¹, 朱立波¹, 董辉², 胡海燕^{1*}, 徐红丹^{3*}

(1. 吉林大学第一医院, 吉林 长春 130021; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 无锡卫生高等职业技术学校, 江苏 无锡 214000)

摘要: **目的** 基于UPLC-MS法与血液代谢组学技术分析当归养心汤对心肌梗死大鼠干预效应。**方法** 采用皮下注射异丙肾上腺素诱导大鼠实验性心肌梗死。空白组大鼠灌胃给予生理盐水, 模型组、当归养心汤组大鼠灌胃给予丙肾上腺素(85 mg/kg), 连续2 d, 之后当归养心汤组大鼠灌胃给予当归养心汤进行干预(每天11.7 g/kg, 连续4周)。测定各组大鼠血清CK、LDH、AST、SOD活性和MDA水平, 采集大鼠血液样本代谢数据进行分析, 通过比对Metlin及相关标准品数据库鉴定差异代谢产物。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠血清CK、LDH、AST活性升高($P<0.05$), 提示造模成功; 与模型组比较, 当归养心汤组大鼠血清CK、LDH、AST活性降低($P<0.01$)。主成分分析结果显示, 空白组和模型组大鼠的组内聚类明显, 组间分离明显, 且当归养心汤组大鼠的代谢轨迹发生偏移, 向空白组方向发展, 证明当归养心汤对心肌梗死有治疗作用。共鉴定出17个血液生物标志物, 主要涉及亚油酸代谢、鞘磷脂代谢、花生四烯酸代谢、色氨酸代谢。**结论** 当归养心汤对心肌梗死具有改善作用, 其机制可能与调节亚油酸代谢、花生四烯酸代谢有关。

关键词: 当归养心汤; 心肌梗死; 代谢组学; 生物标志物

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)01-0271-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.052

心肌梗死与心肌缺血坏死有关, 是由供血减少和心肌分布低于正常生理功能所必需的临界水平所致。已证实的心肌梗死发病机制中涉及脂质过氧化反应^[1]。炎症介质诱导的冠状动脉痉挛损害脂质稳态等病因^[2]。现阶段, 西药如二硝酸异山梨酯(血管扩张剂)、维拉帕米(钙拮抗剂)、普萘洛尔(β -肾上腺素能阻滞剂)、卡托普利(血管紧张素转换酶抑制剂)、三甲噻(脂肪酸氧化抑制剂)已被用于心肌梗死的临床治疗, 然而这些常用药物一直受到其不良反应的限制。因此亟需寻找一种新的心脏保护药物用于心梗的有效治疗。近年来, 中药因其在治疗心肌梗死方面的优越性和低副作用引起广泛关注^[3]。

当归养心汤出自《景岳全书》, 主治心虚惊悸等症, 由麦门冬、归身、升麻、甘草、人参、生地黄组成, 临床上是治疗心梗的对症方剂^[4-6], 具有疗效显著、副作用小等特点。但基于中药复方多成分多靶点的作用机制, 采用经典的药效学实验难以进行有效表征和评价, 更无法对有效成分进行解读。代谢组学是对生物系统中的小分子代谢产物进行综合分析的技术, 是临床诊断或制药工业研究中新颖的系统生物学技术^[7], 被定位于活性分子、单味药制剂

和复方的应用^[8]。因此, 本研究采用血液代谢组学研究当归养心汤对心肌梗死大鼠的保护作用。

1 材料

1.1 仪器 Q-Exactive 超高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); XPE105 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); RT-9000 型半自动生化分析仪(美国 Rayto 公司); JIDI-4D-WS 型自动平衡实验室离心机(广州吉迪仪器有限公司); MilliQ water 净化系统(上海技舟化工科技有限公司)。

1.2 试剂与药物 当归养心汤为实验室自制, 当归、麦冬、升麻、炙甘草、人参、生地黄药材购自北京同仁堂哈尔滨连锁药店, 经黑龙江中医药大学陈孝忠教授鉴定为正品。异丙肾上腺素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乳酸脱氢酶(LDH, 批号 20190321)、肌酸激酶(CK, 批号 20190301)、天冬氨酸转氨酶(AST, 批号 20190401)、超氧化物歧化酶(SOD, 批号 20190314)、丙二醛(MDA, 批号 20190316)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。其余试剂均为分析纯。

1.3 动物 雄性 Wistar 大鼠 24 只, 体质量(200±10) g,

收稿日期: 2021-12-06

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82003975); 中国博士后科学基金项目(2017M621319); 黑龙江省卫生健康委科研课题项目(2020-301); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2016213); 无锡市卫生健康委科研面上项目(M202170)

作者简介: 李雪(1984—), 女, 主管护师, 研究方向为胃肠疾病护理。E-mail: 285590892@qq.com

* **通信作者:** 胡海燕(1974—), 女, 主任护师, 研究方向为造口伤口管理。E-mail: N0289@163.com

徐红丹(1984—), 女, 副教授, 研究方向为中药防治精神疾病和皮肤疾病。E-mail: 121871802@qq.com

购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(黑) 2019-0001。饲养于吉林大学第一医院实验室内, 12 h/12 h 明暗交替, 温度 25 ℃, 相对湿度 60%, 给予充足的饲料和饮用水, 适应性饲养 7 d。本实验所涉及的动物相关操作严格遵守有关准则, 并经吉林大学第一医院实验动物伦理委员会批准。

2 方法

2.1 当归养心汤灌胃溶液配制 按原方配比取当归 20 g、麦冬 20 g、升麻 15 g、炙甘草 10 g、人参 10 g、生地黄 10 g, 加入 10 倍量水煎煮 1 h, 共 2 次, 合并滤液, 减压浓缩至 111 mL (生药量 1.17 g/mL), 大鼠灌胃给药剂量为 10 mL/kg。

2.2 模型复制及代谢样本制备 将大鼠按体质量随机分为空白组、模型组、当归养心汤组, 每组 8 只。各组大鼠皮下注射异丙肾上腺素溶液, 每次间隔 24 h, 连续 2 d, 诱导实验性心肌梗死模型^[9-11]。空白组大鼠灌胃给予等体积生理盐水, 模型组和当归养心汤组大鼠在实验第 27、28 天灌胃给予 85 mg/kg 异丙肾上腺素, 而当归养心汤组大鼠灌胃给予当归养心汤, 每天 11.7 g/kg, 连续 4 周。最后一次给药后 12 h, 各组大鼠用乙醚麻醉, 处死, 采集血液样本, 在 4 ℃ 下 4 000 r/min 离心 15 min, -80 ℃ 下冷冻保存。

分别取各组大鼠血清 200 μL, 加入 600 μL 乙腈中, 漩涡搅拌 30 s, 6 000 r/min 离心 10 min, 使蛋白质沉淀。收集 750 μL 上清液, 在 37 ℃ 下用 N₂ 干燥。加入 100 μL 1% 乙腈重组干燥残渣, 13 000 r/min 离心 15 min, 即得进样溶液, 进行 UPLC-MS 分析。

2.3 生化指标检测 取各组大鼠血清, 严格按照试剂盒说明书操作, 检测血清 CK、LDH、AST、SOD 活性和 MDA 水平, 评价心脏损伤。

2.4 色谱条件 Accucore™ Vanquish™ C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.6 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈 (含 0.1% 甲酸) (A) - 0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱, 程序见表 1; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 2 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A 乙腈(含 0.1% 甲酸)/%	B 0.1% 甲酸/%
0.0	1	99
2.5	11	89
7.0	20	80
10.0	38	62
11.0	60	40
13.0	99	1

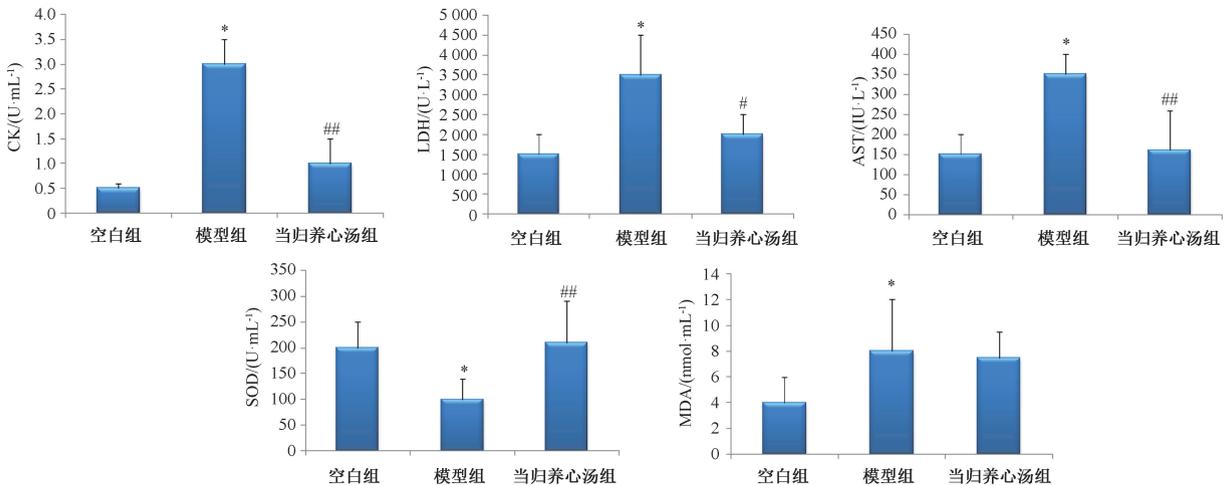
2.5 代谢组学数据处理 采用 XCMS、MetaboAnalyst 4.0 在线软件对非监督的高分辨质谱数据进行数据整合分析, 首先采用化学计量学方法对多维数据进行降维处理, 筛选对分组影响最大的二维或三维数据, 获取主成分分析图和代谢关系互作图, 通过对代谢水平的整体认识达到理解模型和疾病的目的, 最后通过空白组和模型组间的变量重要投用值 (VIP>1) 筛选潜在生物标志物。将获得的生物标志物根据保留时间、核质比及质谱碎裂信息比对代谢物组数据库 Metlin, 作进一步筛选。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 18.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 Student's *t* 分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 当归养心汤对心肌梗死大鼠 CK、LDH、AST、SOD 活性和 MDA 水平的影响 与空白组比较, 模型组大鼠血清 CK、LDH、AST 活性和 MDA 水平升高 (P<0.05), SOD 活性降低 (P<0.05), 提示模型复制成功; 与模型组比较, 当归养心汤组大鼠血清 CK、LDH、AST 活性降低 (P<0.05, P<0.01), SOD 活性升高 (P<0.01), 结果见图 1。由此可知, 异丙肾上腺素能够诱导急性细胞坏死, 使大鼠体内发生氧化应激反应, 当归养心汤可降低由氧化应激引起的损伤。

3.2 代谢组学结果 采用 UHPLC/Orbitrap 技术对各组大鼠的血液样品进行数据采集和处理。所有实验组的基峰强度色谱图见表 2、图 2。



注: 与空白组比较, * P<0.05; 与模型组比较, # P<0.05, ## P<0.01。

图 1 各组大鼠生化指标 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

表 2 大鼠血液生物标志物

序号	保留时间/min	m/z	代谢产物	分子式	VIP	代谢通路
1	0.60	204.1233	L-乙酰基肉碱	C ₉ H ₁₇ NO ₄	1.31	不明
2	0.65	229.1547	L-异亮氨酸-L-脯氨酸	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	1.72	不明
3	1.00	160.0762	酪胺	C ₈ H ₁₁ NO	1.53	酪氨酸代谢
4	1.62	232.1544	异丁酰-L-肉碱	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	1.86	不明
5	3.73	318.2999	植物鞘氨醇	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	3.40	鞘脂代谢
6	4.59	302.3050	鞘氨醇	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	5.01	鞘脂代谢
7	7.24	400.3416	L-棕榈酰肉碱	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	5.96	鞘脂代谢
8	7.83	524.3712	溶血酶 C(C18:0)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	14.78	鞘脂代谢
9	0.56	167.0204	尿酸	C ₂₇ H ₅₅ NO ₉ P	2.64	不明
10	1.62	203.0820	L-色氨酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	4.04	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成
11	4.93	564.3297	溶血酶 C(C18:2)	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	3.26	鞘脂代谢
12	5.58	540.2397	溶血酶 C(C16:0)	C ₂₇ H ₅₁ NO ₉ P	2.40	鞘脂代谢
13	9.81	327.2327	二十二碳六烯酸	C ₂₅ H ₅₁ NO ₉ P	5.33	不明
14	10.09	303.2325	花生四烯酸	C ₂₂ H ₃₁ O ₂	5.95	花生三烯酸代谢
15	10.25	279.2325	亚油酸	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	5.11	亚油酸代谢
16	2.29	260.1853	己酸卡尼丁	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	3.26	不明
17	5.16	372.3103	十四酰卡宁	C ₁₃ H ₂₅ NO ₄	0.43	不明

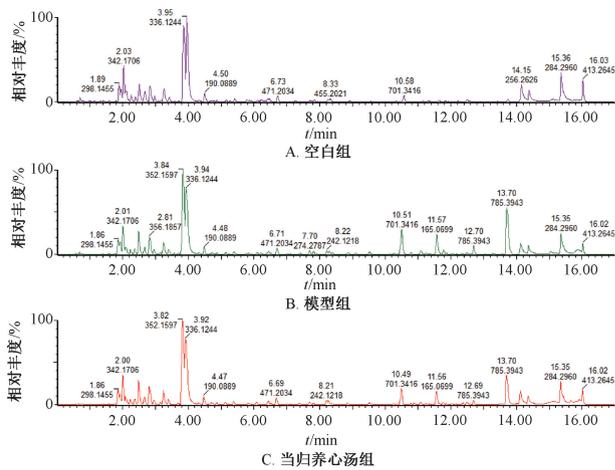
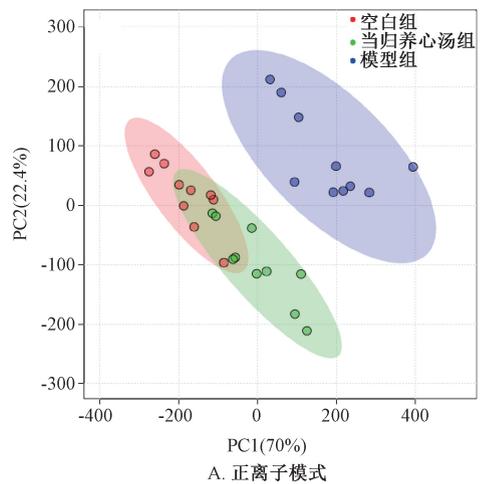


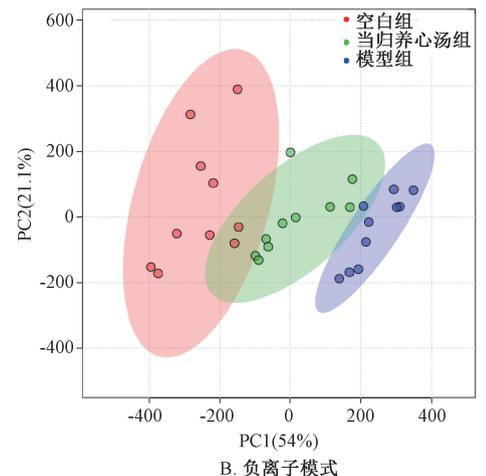
图 2 各组大鼠血液代谢指纹图谱

对高分辨质谱原始数据进行 PCA 预处理，找出其代谢特征。将数据集中每个数据文件中的峰与精确质量/保留时间对以及它们相关的峰面积对齐，由此将数据组合成一个矩阵。由图 3 可知，模型组大鼠的代谢曲线与空白组不同，表明心肌梗死能够改变生化状态；当归养心汤组大鼠的代谢曲线与模型组有较大差异，接近空白组，说明当归养心汤治疗后心肌梗死引起的偏差明显改善，与生化及病理行为学研究结果一致。从代谢角度和生化指标层面证明数据的可靠性。通过对比质谱信息和 XCMS 自带的软件识别系统达到鉴定成分的目的。

通过开源的 MetaboAnalyst 4.0 网站对聚焦分析得到的生物标志物进行代谢富集分析，初步获取在心肌梗死发生发展过程中影响较大的前几位代谢类型，分别为鞘脂代谢、亚油酸代谢、花生三烯酸代谢和色氨酸代谢，见图 4。最终通过 STRING 数据库及数据可视化工具，对代谢物和相关代谢酶的代谢通路进行构建及可视化。



A. 正离子模式



B. 负离子模式

图 3 各组大鼠整体代谢轮廓的主成分分析图

4 讨论

异丙肾上腺素诱导的大鼠模型的病理生理和形态学变化与人心肌梗死相似，为多发性心肌梗死病变^[9-12]。为全

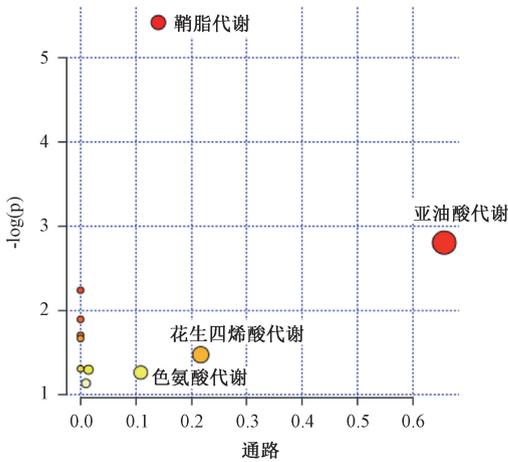


图4 大鼠血液代谢通路富集分析图

面了解心肌梗死的生物学过程，评价不同药物的药理作用，本研究基于UPLC/QTOF-MS分析当归补血汤干预心肌梗死大鼠体内药理作用的潜在生物标志物和代谢途径，见图5。

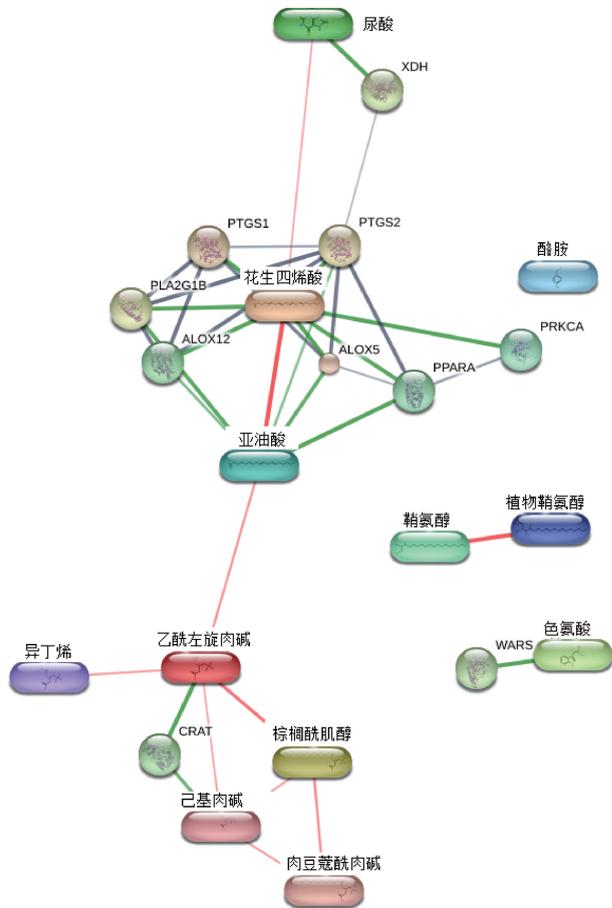


图5 大鼠血液标志物代谢通路

4.1 脂肪酸氧化途径 心脏的大部分能量产生是由脂肪酸的氧化作用产生的，心肌梗死患者主要的心肌能量底物从脂肪酸转变为葡萄糖，并且参与脂肪酸氧化酶活性降低。左旋肉碱是线粒体脂肪酸氧化所必需的辅助因子，脂肪酰辅酶A作为脂肪酰肉碱，经由肉毒碱（或肉碱）转运进入线粒体。在这种肉碱依赖性途径中产生的酰基肉碱在软骨

外膜和内膜基质侧之间，作为脂肪酸载体，在内膜基质侧分别作用于肉碱-棕榈酰转移酶（CPT）I和II。抑制脂肪酸氧化会导致有毒中间体积累，如长链圆筒肉碱衍生物。长链酰基辅酶A（CoA）和酰基肉碱的心肌积累增加可能会产生氧化磷酸化的解偶联、线粒体排列能力的改变、肌膜功能受损和细胞内Ca²⁺处理等有害影响^[12-13]。本研究中心肌梗死大鼠L-乙酰肉碱、异丁酰-L-肉碱、L-棕榈酰肉碱水平升高。当归养心汤可以改善酰基肉碱的变化，满足能量需求。此外，己酰卡尼汀和十四酰卡尼汀分别是与中链脂肪酸和长链脂肪酸氧化有关的长链酰基肉碱^[14-15]。虽然在心肌梗死大鼠体内未观察到两者的积累，但当归养心汤干预后可防止心肌梗死过程中因脂肪酸氧化加速而造成潜在的积累，改善异丙肾上腺素诱导的能量下降病理状态。心肌梗死大鼠体内不饱和脂肪酸亚油酸的升高也表明不饱和脂肪酸的氧化受到抑制，导致心肌脂质毒性^[16]。

4.2 甘油磷酸代谢 甘油磷酸酯是细胞膜的结构成分。溶酶体降解表明潜在的脂质紊乱与异丙肾上腺素诱导的心肌梗死的形成密切相关^[17]。与正常大鼠相比，异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠血清溶酶体水平降低，这与生理学研究检测到的心肌梗死大鼠的膜破裂相一致。当归养心汤干预后能维持甘油磷酸酯的正常水平。

4.3 花生四烯酸代谢 花生四烯酸代谢可能遵循多种相互关联的途径，导致多种炎症物质（缓激肽、血清素、组胺、前列腺素、细胞因子）的产生或释放^[18]。花生四烯酸的增加与非致命性急性心肌梗死的风险增加有关，也是心肌梗死发病时炎症的重要生物标志物^[19]。因此，这种病理代谢涉及到缺血心肌细胞、浸润的中性粒细胞、凝固的血小板，与本研究中异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠生化指标检测结果相符合。

4.4 鞘脂代谢 鞘磷脂在细胞生长、分化和关键信号转导途径中起着重要的生理作用^[20]，植物鞘磷脂和鞘磷脂是参与鞘磷脂代谢的2种重要代谢产物。由鞘氨醇代谢而来的植物鞘氨醇会阻止软骨通透性转换孔的开放，抑制细胞色素C的释放和caspase-3的激活，从而导致细胞凋亡，诱导心肌梗死的发生^[21]。植物鞘氨醇和鞘氨醇在心肌梗死大鼠体内的积累可能加速心肌细胞凋亡。当归养心汤能够降低植物鞘氨醇和鞘氨醇水平，提示当归养心汤对心肌细胞的保护作用可能与抑制细胞凋亡有关。蛋白水解酶-异亮氨酸-L-脯氨酸是大蛋白的蛋白水解酶分解产物，能抑制组织蛋白酶B的表达^[22]，在细胞损伤中起着关键作用，可能是心肌细胞死亡的指标^[23]。模型组大鼠L-异亮氨酸-L-脯氨酸升高提示心肌细胞自噬消化和心肌细胞损伤参与异丙肾上腺素诱导心肌梗死的过程，经当归养心汤干预后这些损伤得到改善。色氨酸代谢中L-色氨酸是一种重要的能量代谢前体，可以转化为丙酮酸、富马酸等生物分子，进入柠檬酸循环^[24]。本研究中，心肌梗死大鼠血清L-色氨酸水平降低，其原因可能是缺氧导致代谢重构，难以满足心肌细胞能量需求^[25]。当归养心汤能逆转L-色氨酸的下降，满足

机体的能量供应。嘌呤代谢尿酸是嘌呤代谢的最终氧化产物,但目前很难确定尿酸和心血管疾病之间是否存在独立的联系^[26],因为氧化应激也在其中起着重要作用^[27]。心肌梗死大鼠血清尿酸水平高,经当归养心汤处理后降至正常水平。

参考文献:

[1] Kulminski A M, Culminkaya I, Arbeev K G, et al. The role of lipid-related genes, aging-related processes, and environment in healthspan[J]. *Aging Cell*, 2013, 12(2): 237-246.

[2] Spite M, Serhan C N. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins[J]. *Circ Res*, 2010, 107(10): 1170-1184.

[3] Kang Y J. Herbogenomics: from traditional chinese medicine to novel therapeutics[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008, 233(9): 1059-1065.

[4] 齐泽华, 韩涛, 刘兆喆, 等. 加味当归养心汤对乳腺癌术后应用蒽环类药物的心脏毒性的影响[J]. *创伤与急危重病医学*, 2015, 3(3): 174-176.

[5] 崔子安. 二仙汤合养心汤治疗更年期综合征[J]. *山西医药杂志*, 1983, 12(6): 377.

[6] 方炳福. 养心汤临床应用举隅[J]. *安徽中医学院学报*, 1988, 8(3): 24-25.

[7] Dunn W B, Ellis D I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies[J]. *Trends Analyt Chem*, 2005, 24(4): 285-294.

[8] Wang Y Q, Li C S, Li L H, et al. Application of UHPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics in the evaluation of metabolites and taste quality of Chinese fish sauce (Yu-lu) during fermentation[J]. *Food Chem*, 2019, 296: 132-141.

[9] Xu X F, Hu H C, Lin Y, et al. Differences in leukocyte telomere length between coronary heart disease and normal population: a multipopulation meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5046867.

[10] Bhanushali A A, Contractor A, Das B R. Variant at 9p21 rs1333049 is associated with age of onset of coronary artery disease in a Western Indian population: a case control association study[J]. *Genet Res (Camb)*, 2013, 95(5): 138-145.

[11] Gaba R C, Gundavaram M S, Parvinian A, et al. Efficacy and safety of flow-directed pulmonary artery catheter thrombolysis for treatment of submassive pulmonary embolism[J]. *Am J Roentgenol*, 2014, 202(6): 1355-1360.

[12] Kitabayashi C, Naruko T, Sugioka K, et al. Positive association between plasma levels of oxidized low-density lipoprotein and myeloperoxidase after hemodialysis in patients with diabetic end-stage renal disease[J]. *Hemodial Int*, 2013, 17(4): 557-567.

[13] Lopaschuk G D, Gamble J. The 1993 merck frosst award. acetyl-CoA carboxylase: an important regulator of fatty acid

oxidation in the heart[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994, 72(10): 1101-1109.

[14] Ziadeh R, Hoffman E P, Finegold D N, et al. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in pennsylvania: neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies[J]. *Pediatr Res*, 1995, 37(5): 675-678.

[15] Bene J, Komlósi K, Gasztonyi B, et al. Plasma carnitine ester profile in adult celiac disease patients maintained on long-term gluten free diet[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(42): 6671-6675.

[16] Swirski F K, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure[J]. *Science*, 2013, 339(6116): 161-166.

[17] Senn T, Hazen S L, Tang W. Translating metabolomics to cardiovascular biomarkers[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2012, 55(1): 70-76.

[18] Hjelte L E, Nilsson A. Arachidonic acid and ischemic heart disease[J]. *J Nutr*, 2005, 135(9): 2271-2273.

[19] Baylin A, Campos H. Arachidonic acid in adipose tissue is associated with nonfatal acute myocardial infarction in the central valley of Costa Rica [J]. *J Nutr*, 2004, 134(11): 3095-3099.

[20] Egom E E, Mamas M A, Clark A L. The potential role of sphingolipid-mediated cell signaling in the interaction between hyperglycemia, acute myocardial infarction and heart failure[J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2012, 16(8): 791-800.

[21] Greenberg A J, Hackett S R, Harshman L G, et al. Environmental and genetic perturbations reveal different networks of metabolic regulation[J]. *Mol Syst Biol*, 2014, 7(1): 563.

[22] Ohshita T, Nikawa T, Towatari T, et al. Effects of selective inhibition of cathepsin B and general inhibition of cysteine proteinases on lysosomal proteolysis in rat liver *in vivo* and *in vitro*[J]. *Eur J Biochem*, 2010, 209(1): 223-231.

[23] Devika P T, Prince P. Preventive effect of (-) epigallocatechin-gallate (EGCG) on lysosomal enzymes in heart and subcellular fractions in isoproterenol-induced myocardial infarcted Wistar rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 172(3): 245-252.

[24] Knapp F. Radioiodinated 15-(p-iodophenyl)-3,3-dimethylpentadecanoic acid: a useful new agent to evaluate myocardial fatty acid uptake[J]. *J Nucl Med*, 1986, 27(4): 521-531.

[25] Tuunanen H, Knuuti J. Metabolic remodelling in human heart failure[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(2): 251-257.

[26] Skak-Nielsen H, Torp-Pedersen C, Finer N, et al. Uric acid as a risk factor for cardiovascular disease and mortality in overweight/obese individuals [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59121.

[27] Glantzounis G K, Tsimoyiannis E C, Kappas A M, et al. Uric acid and oxidative stress[J]. *Curr Pharm Design*, 2005, 11(32): 4145-4151.