

基于高尿酸血症小鼠模型探讨血尿酸与 ZAG 的相关性^①

杨洁¹, 刘李文韬¹, 陈秉朴¹②, 李海¹, 黄秀峰¹, 吴荣敏¹, 刘虹兵²

(1. 右江民族医学院基础医学院, 广西 百色 533000

E-mail: 407768465@qq.com;

2. 右江民族医学院附属医院内分泌内科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 以高尿酸血症小鼠模型为基础, 探讨小鼠血清尿酸与锌 $\alpha 2$ 糖蛋白(ZAG)的相关性, 以寻求防治高尿酸血症的新靶点。**方法** 利用尿酸酶抑制剂法建立高尿酸血症小鼠模型, 将 30 只 SPF 级昆明种小鼠随机分为高尿酸血症组和空白对照组, 造模 14 d 后, 尾静脉采血检测血清尿酸(SUA)水平确定模型建立成功, 内眦静脉取血检测肾功能、血脂, 利用酶联免疫吸附试验检测小鼠血清 ZAG 浓度。**结果** 高尿酸血症组除高密度脂蛋白(HDL-C)低于空白对照组外($P < 0.05$), 尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、空腹血糖(FPG)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、SUA、ZAG、低密度脂蛋白(LDL-C)等指标均高于空白对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$); SUA 水平与 BUN、CREA、ZAG、FPG、TC、TG、LDL-C 呈正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 与 HDL-C 呈负相关($P < 0.001$); SUA 与 ZAG 的一元线性回归方程为: $Y(\text{SUA}) = -239.758 + 2.533X(\text{ZAG})$ 。**结论** 尿酸酶抑制剂诱导的高尿酸血症小鼠, 血糖升高同时合并血脂代谢紊乱, ZAG 显著升高, 并与 SUA 高度正相关, ZAG 有望成为防治高尿酸血症的新靶点。

关键词: 高尿酸血症; 锌 $\alpha 2$ 糖蛋白; 相关性

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)01-0026-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.01.007

尿酸(uric acid, UA)是人体嘌呤代谢终产物, 不仅具有强大的抗氧化作用, 同时具有升高血压和刺激神经的作用^[1]。体内嘌呤代谢紊乱, 尿酸生成增多和(或)排泄减少, 使血液中尿酸浓度高出正常范围可导致高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)^[2]。血清尿酸(serum uric acid, SUA)持续升高是痛风的生化基础, 其结晶析出沉积在关节部位引起局部炎症反应时导致痛风^[3]。此外, 高尿酸血症患者常伴有脂类代谢异常、糖酵解加剧等现象, 三酰甘油降解生成游离脂肪酸再酯化进入其他组织的过程可以增加三磷酸腺苷(ATP)的利用率, 加速 ATP 分解^[4], 产生嘌呤代谢物, 使内源性尿酸生成增加。锌 $\alpha 2$ 糖蛋白(zinc- $\alpha 2$ -glycoprotein, ZAG)是一种新近发现的脂肪因子, 研究提示与脂肪分解密切相关。ZAG 过表达可以上调脂肪分解酶, 即甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)和激素敏感性脂解酶(hormone sensitive lipase, HSL)的表达, 促进脂肪分解^[5]。SUA 水平与 ZAG 浓度的关联性国内外鲜有报道。本课题组基于高尿酸血症的小鼠模型, 初步探讨新脂肪因子 ZAG 与高尿酸血症的相关

性, 为预防及治疗高尿酸血症寻找新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级昆明种雄性小鼠 30 只, 由右江民族医学院动物实验中心提供, 重量(25 ± 2)g。实验动物合格证号: SCXK 桂 2012-0003。

1.1.2 试剂与仪器 氧嗪酸钾盐(批号 P137112, Aladdin 公司), ZAG 蛋白测定试剂盒(批号: E03Z0038, BlueGene 公司), 多管架自动平衡离心机 L530(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), 酶标仪 Multiskan MK3(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 将 30 只 SPF 级昆明种雄性小鼠随机分为空白对照组(normal uric acid, NUA), 高尿酸(hyperuricemia, HUA)模型组, 每组 15 只。HUA 组根据尿酸酶抑制法抑制小鼠体内尿酸分解, 即用 97% 氧嗪酸钾盐按 0.5g/(kg · d)腹腔注射^[6], 建立小鼠高尿酸血症模型; 空白对照组用等体积生理盐水腹腔注射; 每日 1 次, 造模周期 14 d。第 14

① 基金项目: 广西高校科学技术研究项目(ZD2014105); 2016 年广西硕士研究生创新课题; 广西高校少数民族人类学研究重点实验室[桂教科研(2015)5 号]

② 通信作者, E-mail: 715042882@qq.com

d,鼠尾静脉采血检测血尿酸值,模型组血尿酸水平较空白对照组升高,证明高尿酸血症模型建立成功。小鼠内眦静脉采血,全血室温下静置2h,4000 r/min,离心10 min,取血清,送右江民族医学院附属医院检验科,检测指标:SUA、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, CREA)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)。

1.2.2 小鼠血清 ZAG 蛋白检测 使用小鼠锌离子 $\alpha 2$ 糖蛋白 ELISA 试剂盒检测小鼠血清 ZAG 蛋白表达水平,根据说明书,取出试剂盒,室温平衡 30 min。取出酶标板,按照标准品的次序分别加入 100 μ l 的标准品溶液于空白微孔中,余孔加入等量小鼠血清样品,空白对照孔加入 100 μ l PBS,在各孔中加入 50 μ l 的酶标记溶液(不含空白对照孔),将酶标板用封板膜密封后,37 $^{\circ}$ C 孵育反应 1 h。洗板 3 次,拍干。各孔加入显色剂 A 50 μ l,再加入显色剂 B 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 避光反应 10~15 min,最后加入 50 μ l 终止液。5 min 内酶标仪 450 nm 读取 OD 值,绘制标准曲线,根据标准曲线计算出相应浓度值(mg/L)。

1.2.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t

检验,采用一元线性回归进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠生化指标检测结果 在 HUA 组与 NUA 组中 BUN、CREA、FPG、TC、TG、HDL-C、LDL-C、SUA、ZAG 等指标差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。其中 HUA 组除 HDL-C 低于 NUA 组外,其余指标均高于 NUA 组,见表 1。

表 1 两组小鼠生化指标检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

指标	NUA 组	HUA 组	t	P
BUN(mmol/L)	7.59 \pm 0.93	9.88 \pm 0.93	6.744	<0.001
CREA(μ mol/L)	12.40 \pm 1.58	22.20 \pm 2.04	14.710	<0.001
FPG(mmol/L)	6.33 \pm 0.99	8.09 \pm 0.60	5.888	<0.001
TC(mmol/L)	2.35 \pm 0.20	3.23 \pm 0.50	6.328	<0.05
TG(mmol/L)	1.04 \pm 0.22	2.11 \pm 0.76	5.237	<0.05
HDL-C(mmol/L)	2.58 \pm 0.33	2.01 \pm 0.16	6.019	<0.05
LDL-C(mmol/L)	0.14 \pm 0.02	0.36 \pm 0.34	2.502	<0.05
SUA(mmol/L)	60.50 \pm 7.23	563.30 \pm 28.40	66.448	<0.05
ZAG(mg/L)	138.38 \pm 20.20	297.22 \pm 57.30	10.125	<0.05

2.2 小鼠 SUA 与生化指标的相关性分析 小鼠生化指标中除 HDL-C 与尿酸水平呈负相关外($P < 0.001$),余 BUN、CREA、ZAG、FPG、TC、TG、HDL-C、LDL-C 等指标均与小鼠 SUA 呈正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),见表 2。

表 2 血尿酸水平与各指标的相关性 ($n = 30$)

相关系数	BUN	CREA	ZAG	FPG	TC	TG	HDL-C	LDL-C
r 值	0.820	0.960	0.897	0.771	0.814	0.757	-0.775	0.473
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05

2.3 SUA 与 ZAG 的一元线性回归分析 SUA 与 ZAG 的 Pearson 相关性为 0.897,单尾显著性检验的概率 $P < 0.001$,建立回归方程为: $Y(SUA) = -239.758 + 2.533X(ZAG)$,所以小鼠血清中 SUA 的浓度与 ZAG 浓度呈正相关。

3 讨论

高尿酸血症的发生机制是体内嘌呤代谢物的紊乱,即生成的尿酸过多和/或尿酸排泄障碍^[7]。人和猿类与其他哺乳动物有所不同,由于在进化过程中编码尿酸酶基因的缺失,导致不能合成有活性的尿酸酶,将尿酸分解为溶解度较好的尿囊素通过肾脏排出体外^[8]。氧嗪酸钾结构与尿酸的嘌呤环相似,可部分抑制尿酸氧化酶的活性,减少尿酸的分解,使啮齿类动物

血尿酸水平升高,常被用来诱导产生高尿酸血症模型^[6],是目前报道最多、使用最广的高尿酸血症动物模型。含氧嗪酸钾药物构建的高尿酸血症模型具有较高血尿酸水平且较持续、稳定;给药途径有喂饲、灌胃、腹腔注射及皮下注射等方式^[9]。王凯等^[10]研究证明,当氧嗪酸钾给药剂量为 500 mg/kg 时,能成功诱导出小鼠高尿酸血症模型。动物模型是研究疾病发病机制和药理药效的重要手段。科学、合理、持久、稳定的动物模型能为疾病的发病机制、药物作用机制及药效的研究等提供有利的保障。

本文在成功建立高尿酸小鼠模型的基础上,发现高尿酸血症组 BUN 和 CREA 明显升高,说明该组小鼠已有一定程度肾功能损伤,与胡庆华等^[11]研究结果

一致。有研究报道,高尿酸是诱发急性肾损伤的高危因素^[12],肾损伤降低肾小球的滤过率,导致血清BUN、CREA升高。此外,高尿酸血症组FPG较空白对照组明显升高,与小鼠血清尿酸水平呈正相关。万盟等^[13]发现注射尿酸诱导高尿酸血症小鼠模型中血糖水平是升高的,与我们的结果一致。尿酸水平与血糖相互影响的具体机制,仍需进一步研究。既往研究认为血清HDL-C是高尿酸血症的保护因素^[14],血尿酸水平与HDL-C呈负相关^[15],这跟我们研究结果是一致的。同时,本研究也发现高尿酸组TC、TG也显著升高,且与尿酸水平呈正相关,该结果提示高尿酸血症合并脂代谢紊乱。

本实验结果提示与空白对照组相比,高尿酸血症组小鼠血清ZAG浓度升高,血清尿酸值与ZAG呈正相关。ZAG是脂肪细胞分泌的一种新型脂肪动员因子,能促进脂肪的分解。有研究表明,ZAG也可以通过 β 2-肾上腺素受体激动剂使蛋白磷酸酶(PP2A)活性增加,从而抑制胰岛素活性,进一步产生胰岛素抵抗^[16],而胰岛素抵抗可提高尿酸水平^[17]。综上所述,高尿酸血症小鼠体内ZAG升高,如抑制ZAG则可能抑制胰岛素抵抗,改善胰岛素敏感性,从而降低高尿酸血症的发生,但是ZAG与尿酸水平互相影响的具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 张瑞芬,赵晶. 痛风发病机制研究进展[J]. 实用药物与临床,2007,10(4):244-246.

[2] 马思佳,霍娇,张立实. 高尿酸血症动物模型研究进展[J]. 卫生研究,2015,44(1):158-162.

[3] 中华医学会风湿病学分会. 原发性痛风诊治指南(草案)[J]. 中华风湿病学杂志,2004,8(3):178-181.

[4] 杨倩春. 中老年人群高尿酸血症及常见体质类型的代谢组学特征[D]. 广州:广州中医药大学,2013.

[5] 刘延杰,季虹,荣海钦. 锌 α 2糖蛋白对体质量及脂代谢的影响[J]. 医学综述,2010,16(2):173-175.

[6] Huang CG, Shang YJ, Zhang J, et al. Hypouricemic effects of phenylpropanoid glycosides acteoside of *Scrophularia ningpoensis* on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated Mice[J]. The American Journal of Chinese Medicine,2008,36(1):149-157.

[7] Gibson T. Hyperuricemia, gout and the kidney[J]. Current Opinion in Rheumatology,2012,24(2):127-131.

[8] Bobulescu I A, Moe OW. Renal Transport of Uric Acid: Evolving Concepts and Uncertainties [J]. Advances in Chronic Kidney Disease,2012,19(6):358-371.

[9] 杨会军,李兆福,彭江云. 高尿酸血症动物模型研究概况[J]. 中医学报,2013,28(1):60-62.

[10] 王凯,夏德萌,郝晓伟,等. 氧嗪酸钾诱导高尿酸血症小鼠血清代谢组学研究[J]. 药学服务与研究,2015,15(6):416-421.

[11] 胡庆华,张宪,王钰,等. 芒果苷促进高尿酸血症小鼠尿酸排泄和肾功能改善以及调节相关肾脏转运体的作用[J]. 药学学报,2010,45(10):1239-1246.

[12] 王妍,鄂静,李博,等. 高尿酸血症与急性肾损伤的相关性 Meta 分析[J]. 宁夏医学杂志,2016,38(3):215-217.

[13] 万盟,张倩,杨小红,等. 别嘌醇与苯溴马隆对高尿酸小鼠糖代谢的影响[J]. 中国医药导报,2014,11(25):18-21.

[14] 关宝生,王艳秋,白雪,等. 高尿酸血症的危险因素[J]. 中国老年学,2016,36(1):69-70.

[15] Fu S, Luo L, Ye P, et al. Epidemiological associations between hyperuricemia and cardiometabolic risk factors: a comprehensive study from Chinese community [J]. BMC Cardiovascular Disorders,2015,15(1):1-5.

[16] Ceperuelo-Mallafre V, Ejarque M, Duran X. Zinc- α 2-Glycoprotein Modulates AKT-Dependent Insulin Signaling in Human Adipocytes by Activation of the PP2A Phosphatase[J]. Plos One,2015,10(6):e129644.

[17] 王彦斌,邱服斌,任素芳. 高尿酸血症与冠心病及危险因素的相关性分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(1):9-11.

收稿日期:2016-11-21;修回日期:2017-02-13