

本文引用:刘李玖韬,杨洁,陈秉朴.锌- α 2-糖蛋白在高尿酸血症模型小鼠肾脏中表达的变化[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):384-388.

锌- α 2-糖蛋白在高尿酸血症模型小鼠肾脏中表达的变化

刘李玖韬¹,杨洁²,陈秉朴^{1*}

(1.右江民族医学院基础医学院,广西百色533000;2.右江民族医学院附属医院,广西百色533000)

[摘要] **目的** 以高尿酸血症模型小鼠为研究对象,探讨血清尿酸水平与肾脏组织中锌- α 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** 将20只SPF级昆明小鼠随机分为模型组和空白对照组,97%氧嗪酸钾盐按0.5 g/(kg·d)腹腔注射,建立高尿酸血症小鼠模型,造模7 d后,尾静脉采血检测血清尿酸(SUA)水平确定模型建立成功,利用Western Blotting及实时荧光定量PCR技术检测肾脏中ZAG mRNA及蛋白水平。**结果** 与空白组相比,模型组小鼠肾脏组织ZAG mRNA及蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 血清尿酸可能影响肾脏ZAG的水平,但是ZAG与尿酸互相影响的具体机制仍需进一步研究。

[关键词] 锌- α 2-糖蛋白;高尿酸血症;肾脏;小鼠

[中图分类号] R259;R589.7

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.005

Expression of Zinc- α 2-glycoprote in the Kidney of Mice with Hyperuricemia

LIU Liwentao¹, YANG Jie², CHENG Bingpu^{1*}

(1. Basic Medical School, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China;

2. The Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the correlation between serum uric acid and kidney zinc- α 2-glycoprotein (ZAG) in hyperuricemia mice model, in order to seek a new potential target for prevention and treatment of hyperuricemia. **Methods** 20 SPF Kunming mice were randomly divided into hyperuricemia model group and control group, 97% sylvite acid potassium salt of 0.5 g/(kg·d) was injected into the abdominal cavity. The hyperuricemia mice model was confirmed by the serum uric acid (SUA) level 7 days later. The levels of ZAG mRNA and protein were detected by Western blotting and real-time fluorescence quantitative. **Results** Compared with the blank group, the levels of ZAG mRNA and protein in the kidney tissue in the model group increased, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Serum uric acid may affect the level of ZAG, and the correlation mechanism between ZAG and uric acid needs to be further explored.

[Keywords] zinc- α 2-glycoprotein; hyperuricemia; kidney; mice

血液中尿酸(uricemia,UA)浓度超出正常范围的病态改变称高尿酸血症(hyperuricemia,HUA)。正常情况下,血尿酸盐饱和度为6.7 mg/dL,国际上HUA诊断标准为血清尿酸(Serum uric acid,SUA)水平男>420 μ mol/L (7 mg/dL),女>357 μ mol/L

(6 mg/dL)。目前,美国HUA患病率21%^[1],中国患病率13%至25%^[2]。HUA在许多人类疾病如痛风、心血管疾病、糖尿病和肾脏疾病的病理生理过程中起着重要的作用,HUA的防治能控制多种代谢性疾病的发生。本课题组前期研究结果表明锌- α 2-糖

[收稿日期] 2018-01-19

[基金项目] 广西高校科学技术研究项目(ZD2014105);广西高校少数民族人类学重点实验室项目[桂教科研(2015)5号]。

[作者简介] 刘李玖韬,男,在读硕士研究生,研究方向:分子人类学。

[通讯作者] *陈秉朴,男,硕士,教授,E-mail:715042882@qq.com。

蛋白(zinc α -2 glycoprotein,ZAG)的表达变化与SUA水平密切相关^[3-4]。本研究在前期研究基础上,进一步探讨ZAG在HUA模型小鼠肾脏中的表达变化。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

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,体质量(25±2)g。实验动物生产证号:SCXK桂2017-0003,使用证SYXK桂-0004。

1.1.2 试剂与仪器 实时荧光定量PCR相关试剂购自天根生化科技(北京)有限公司:FastKing RT kit(With gDNASE, Lot#Q5607)、Buffer RZ(Lot#Q5208)、Super Real Premix Plus(STBR GREEN, Lot#P5219)、RNAsimple Total RNA Kit (Lot#Q5414);购置 Santa Cruz ZAG蛋白一抗(Lot#G1006);购自 Santa Cruz 小鼠抗 β -Actin(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号16AV0212)、山羊抗小鼠IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:127655);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),台式高速冷冻离心机1-15PK(SIGMR公司),超微量紫外分光光度计P360,荧光定量PCR仪LightCycler 96,全自动酶标仪Multiskam MK3(美国Thermo公司),PRC仪(美国伯乐PTC-200),全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司JS-680B)。

1.1.3 动物模型复制方法 20只SPF级昆明种雄性小鼠随机分为空白对照组(normal uric acid, NUA)、HUA模型组,每组10只。用97%氧嗪酸钾盐(尿酸酶抑制剂)按0.5 g/(kg·d)腹腔注射建立HUA小鼠模型^[4],每日1次,连续7 d。第7天通过尾静脉采血检测SUA及血脂水平评判造模是否成功,空白对照组用等体积生理盐水腹腔注射。

1.1.4 标本采集 造模成功后,采用断颈法处死各组小鼠,腹部正中切口取肾脏组织,-80℃保存。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计合成 在NCBI上搜索相关基因,上海生工生物工程技术有限公司合成ZAG及GAPDH内参引物。ZAG上游引物序列:5'-GTG A-CA ACT ACC AGC CGT GT-3',下游引物序列:5'-

TTG TTG GCC TTG TTC CAG TG-3',大小107 bp;内参基因上游引物序列:5'-GGT TGT CTC CTG CGA CTT CA-3',下游引物序列:5'-TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC-3',大小138 bp。

1.2.2 总RNA提取及逆转录反应 取室温平衡-80℃保存的100 mg小鼠肾脏组织样本置于研钵中,加入液氮充分研磨至粉末,加1 mL Buffer RZ在15~30℃放置5 min分离核蛋白与核酸,低温离心取上清转入一个新的无RNase的离心管中,加氯仿震荡混匀,室温静置5 min,4℃离心,取上水相液转移到新管中,然后缓慢加入0.5倍体积无水乙醇,将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中,4℃离心,弃废液,加入500 μ L去蛋白液RD低温离心,弃废液,加入500 μ L漂洗液RW离心,弃废液(重复1次),吸附柱放入2 mL收集管中去除残余液体,充分晾干。于冰上加入适量的RNase-free水溶解4℃离心。立刻用紫外分光光度计进行检测其mRNA浓度及OD260/OD280比值。取RNA浓度<1 μ g/mL进行逆转录反应。方法参照天根试剂公司说明书。合成的cDNA置于-20℃低温保存。

1.2.3 实时荧光定量PCR 提取小鼠肾脏组织总RNA,测定浓度后利用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA,采用荧光定量PCR反应试剂盒于荧光定量PCR仪上检测目的基因mRNA表达量。PCR扩增后选择基线,以正常组小鼠为校正对象,根据Ct值依次计算基因的相对表达量,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算结果。反应体系20 μ L,内含2 \times SuperReal PreMix Plus 10 μ L,10 μ M的上下游引物各0.6 μ L,cDNA 2 μ L,其余加无酶水补足。设置3个复孔。反应条件:预变性95℃15 min,变性95℃10 s,退火/延伸60℃20 s,共40个循环(荧光定量PCR仪扩增)。

1.2.4 Western Blotting技术检测ZAG表达 碾磨组织,提取蛋白,BCA法测蛋白浓度调整上样浓度,之后将蛋白变性保存备用。然后制备SDS-PAGE胶,蛋白上样,在110V恒压下进行电泳,条带均匀出现后在300 mA恒流下进行湿转,约1 h。封闭液封闭后4℃摇床孵育一抗(浓度1:500)过夜,洗膜,加二抗(浓度1:5000)室温孵育1.5 h,再次洗膜后暗室曝光,凝胶图像系统分析目标蛋白灰度值,样本蛋白含量以目的条带与内参条带的积分吸光度比值表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。方差齐时组间比较采用 t 检验, 方差不齐用多个样本比较的秩和检验 (Kruskal-Wallis 法, 即 H 值检验), 以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠生化指标检测结果

HUA 模型组甘油三酯 (TG) 及 SUA 水平明显高于空白对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), HUA 模型组总胆固醇 (TC)、肌酐 (CREA)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 无明显升高 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 模型组与空白对照组小鼠血清生化

指标	指标检测结果		T 值	P 值
	$(n=10, \bar{x}\pm s)$			
	组别			
	NUA 组	HUA 组		
SUA (mmol/L)	60.77±17.40	137.93±29.21**	7.192	<0.001
CREA (umol/L)	7.30±2.58	8.42±1.53	1.471	>0.05
TC (mmol/L)	3.36±0.52	3.13±0.41	1.289	>0.05
TG (mmol/L)	2.50±0.42	1.58±0.45**	5.343	<0.001
HDL-C (mmol/L)	2.68±0.51	2.62±0.36	0.380	>0.05
LDL-C (mmol/L)	100.32±0.04	0.33±0.08	0.276	>0.05

注: 与空白对照组比较, ** $P<0.01$ 。

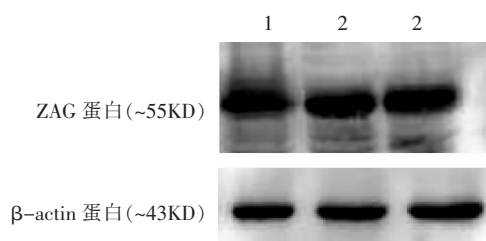
2.2 HUA 模型小鼠肾脏 ZAG 蛋白水平检测结果

结果显示, 模型组小鼠肾脏组织 ZAG 蛋白水平明显高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2 和图 1。

表 2 模型组与空白对照组小鼠肾脏组织 ZAG

分组	蛋白表达水平结果	
	n	$(\bar{x}\pm s)$
空白对照组	10	0.87±0.137
模型组	10	1.077±0.143*
T 值		2.648
P 值		<0.05

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$ 。



注: 1. 空白组; 2. 模型组; β -actin 蛋白为内参

图 1 ZAG 蛋白在空白对照组与模型组小鼠肾脏中的表达

2.3 HUA 模型小鼠肾脏 ZAG mRNA 表达水平检测结果

结果显示, 模型组小鼠肾脏组织 ZAG mRNA 水平明显高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 模型组与空白对照组小鼠肾脏组织 ZAGmRNA

分组	表达水平结果	
	n	$(\bar{x}\pm s)$
空白对照组	10	1.00±0.00
模型组	10	0.20±0.22*
T 值		-8.727
P 值		<0.05

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$ 。

3 讨论

3.1 高尿酸肾损伤机制

尿酸是嘌呤衍生物, 低级动物体内的尿酸氧化酶将尿酸分解为溶于水的尿囊素以排出体外, 但人类在进化过程中, 因尿酸氧化酶基因发生突变而失活, 不能生成尿囊素, 只能以尿酸排出体外。人体内尿酸 2/3 经肾脏排出, 1/3 通过粪便和汗液排出。SUA 水平取决于肾小管功能的完整性和肾小管上皮细胞中尿酸转运体的表达。尿酸通过直接和间接的方式造成体内的各种损伤, 同时有抗氧化和促氧化作用, 在肥胖状态下则为促氧化作用, 可促进成熟脂肪细胞中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶的活性及 ROS 的产生, 且尿酸可激活脂肪细胞的局部肾素-血管紧张素系统 (Renin-Angiotensin-System, RAS) 产生活性氧簇 (ROS), ROS 的产生及尿酸直接或间接使得机体产生炎症反应。而细胞线粒体 ROS 合成增多, 膜电位下降, 线粒体相关蛋白 prohibitin 表达下调, 激活线粒体途径导致细胞凋亡^[6], 同时也可引起炎症因子释放进一步增加, 血管内皮细胞损伤进一步加重。尿酸过多会导致一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 降低, 抑制一氧化氮释放^[6], 影响血管内皮功能。尿酸可导致细胞线粒体内的钙稳态失衡从而介导炎症反应^[7]。在尿酸产生过程中, 因黄嘌呤氧化酶作用, 产生大量超氧阴离子自由基 (O_2^-), 启动自由基生成连锁反应, 进一步造成组织损伤。这些炎症因子和炎症反应都可损害肾脏。大

量的研究表明,在高尿酸环境下,尿酸结晶可通过阻塞肾小管引发炎症反应、影响血糖代谢、升高血压及诱导细胞凋亡等造成肾脏血管、肾小球、肾小管结构及功能异常^[8]。

3.2 模型选择

灵长类动物与人有相似的尿酸代谢途径,但因价格昂贵而失去实验优势,故现阶段常用造模动物是啮齿类大鼠、小鼠。♀鼠个体之间血UA值波动较大,考虑与♀鼠激素分泌波动有关。HUA模型复制主要是干扰嘌呤和尿酸代谢,但直接补充尿酸造模与人原发性HUA发病原因及发病机制大相径庭。增加UA前体物质虽可使SUA升高,但人类因内源性嘌呤产生过多所致的HUA仅占10%~15%,人HUA以肾脏排泄尿酸减少型为主。在造模过程中,长时间SUA升高可反馈性地引起尿酸酶表达增多与活性升高,连续给药一段时间后SUA不升反降。且长时间和大剂量使用抑制UA排泄剂和模型SUA水平显著升高时肾损害更加明显,肾损害既有属于造模药物的副反应者,也有属于高尿酸血症导致的并发症,这对考察造模效果和判断肯定因素或否定因素存在一定困难^[9]。故本实验以♂小鼠为模型动物,采用抑制尿酸排泄法连续造模7天,造模成功后小鼠肾脏没有明显损害。

3.3 ZAG与高尿酸血症

脂肪组织可分泌瘦素(Leptin)、脂联素(Adiponectin)、血管紧张素原(Angiotensinogen)、抵抗素(Resistin)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(Plasminogen activator inhibitor-1)、白介素-6(Interleukin-6)等,这些统称为脂肪因子,通过多种途径参与复杂的代谢过程,在HUA发病机制中发挥作用^[10]。

1961年,Burgi等^[11]最先从人血清中分离得到的一种43u的可溶性的能被锌盐沉淀并与血浆 α 2球蛋白的电泳迁移率相似的糖蛋白,故名ZAG。人与小鼠的ZAG在氨基酸序列方面,具有59%的同源性,在与脂代谢密切相关的特殊区域有100%的同源性^[12]。ZAG大量分布于人和小鼠具有分泌功能的正常上皮细胞胞浆的白色及棕色脂肪组织中^[13]。HUA与代谢综合征(metabolicsyndrome)的许多因素如肥胖、脂代谢异常、高血压及胰岛素抵抗等密切相关,常与肥胖、高脂血症及高血压病等合并存在^[14]。

ZAG既然已经被确认为脂肪细胞分泌的一种新型脂质动员因子,必然与脂代谢相关,研究表明,ZAG mRNA水平与肥胖度和胰岛素抵抗参数呈负相关,与脂联素含量呈正相关,与瘦素mRNA水平呈负相关,重组ZAG能促进脂联素从人脂肪细胞释放^[15]。外源性TNF- α 和IL-6均能抑制分化成熟的脂肪细胞中ZAG基因的表达^[16-17]。据此推测,ZAG通过协调多种信号转导途径和其他脂肪细胞因子,参与代谢的调控,影响HUA发生,也就是说HUA状态下ZAG的表达发生改变。于是,我们开展了ZAG和HUA相关性研究,结果证实了HUA小鼠血清ZAG浓度升高,SUA值与ZAG呈正相关,同时脂代谢紊乱^[3-4]。

3.4 ZAG在肾脏中的表达

ZAG既然大量存在于具有分泌功能的上皮细胞组织中,那么肾小管的上皮细胞组织中同样会存在ZAG,当肾发生损害时,肾脏中的ZAG表达也会发生改变。Gohda等^[18]的研究证实,肥胖糖尿病小鼠模型KK/Ta小鼠肝脏和肾脏组织中ZAG mRNA的表达比正常BALB/c小鼠增高,比较第8周和第20周时KK/Ta小鼠肾脏组织中ZAGmRNA水平发现,随着喂养时间延长,ZAG水平进一步增高。基于HUA和ZAG都与肥胖糖尿病、脂代谢紊乱相关,并且高尿酸损害肾脏。因此,有理由推测在HUA与ZAG相关及HUA模型肾脏中的ZAG表达发生改变。于是,我们前期开展了ZAG和HUA相关性研究,在证实HUA小鼠血清ZAG浓度升高,SUA值与ZAG呈正相关^[3-4]的基础上,进一步开展HUA模型小鼠肾脏中表达变化的研究。

本实验通过HUA模型组小鼠与空白对照组小鼠ZAG条带灰度值对比,发现高尿酸小鼠模型肾脏的ZAG是上升的,RT-PCR结果也表明HUA模型组小鼠肾脏ZAG mRNA水平高于空白对照组小鼠,表明肾脏细胞分泌ZAG。可以推测,肾脏分泌ZAG,同时在7d模型小鼠中ZAG表达上高,且脂代谢紊乱,尤以甘油三酯明显,表明尿酸可能通过影响甘油三酯的代谢引起ZAG蛋白的变化,但是ZAG与尿酸互相影响的具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHU Y, PANDYA B J, CHOI H K. Prevalence of gout and hyper-

- uricemia in the US general population: The National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2008 [J]. *Arthritis Rheum*, 2011,63(10):3136–3141.
- [2] LIU R, HAN C, WU D, et al. Prevalence of hyperuricemia and gout in mainland China from 2000 to 2014: A systematic review and meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:762820.
- [3] 杨洁, 刘李文韬, 陈秉朴, 等. 锌- α 2-糖蛋白与高尿酸血症的相关性研究[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(2):173–176.
- [4] 杨洁, 刘李文韬, 陈秉朴, 等. 基于高尿酸血症小鼠模型探讨血尿酸与ZAG的相关性[J]. *右江民族医学院学报*, 2017, 39(1):26–28.
- [5] 张涛, 李英, 迟雁青, 等. 尿酸对人肾小管上皮细胞线粒体氧化损伤与凋亡的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2014, 30(5):356–362.
- [6] 王洪云, 许冬梅, 王培培, 等. 血管内皮功能紊乱在高尿酸血症肾损害中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(4):335–339.
- [7] 齐卡, 冯哲, 洪权, 等. 尿酸通过诱导线粒体钙稳态失衡介导内皮细胞炎症反应[J]. *山东医药*, 2010, 50(20):15–18.
- [8] 徐玮, 陈卫东. 高尿酸血症对肾损伤的机制研究进展[J]. *安徽医学*, 2017, 38(5):665–667.
- [9] 刘李玖韬, 杨洁, 陈秉朴. 高尿酸血症动物模型研究述评[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(12):1431–1436.
- [10] RUSSELL S T, TISDALE M J. Mechanism of attenuation of skeletal muscle atrophy by zinc- α 2-glycoprotein[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(10): 4696–4704.
- [11] BURGI W, SCHMID K. Preparation and properties of Zn- α 2-glycoprotein of normal human plasma[J]. *J Biol Chem*, 1961, 236: 1066–1074.
- [12] SANCHEZ L M, CHIRINO A J, BJORKMAN P. Crystal structure of human ZAG, a fat-dep letting factor related to MHC molecules[J]. *Science*, 1999, 283(5409):1914–1919.
- [13] BING C, BAOY, JENKINS J, et al. Zinc- α 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(8):2500–2505.
- [14] DUNSTAN D W, ZIMMET P Z, WELBORN T A, et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study[J]. *Diabetes Care*, 2002, 25(5):829–834.
- [15] MRACEKT, DING Q, TZANAVARI T, et al. The adipokine zinc- α 2-glycoprotein is downregulated with fat mass expansion in obesity[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2010, 72(3):334–341.
- [16] SELVA D M, LECUBE A, HERNANDEZ C, et al. Lower zinc- α 2-glycoprotein production by adipose tissue and liver in obese patients unrelated to insulin resistance[J]. *J Clin Endocrinol Meta*, 2009, 94(11):4499–4507.
- [17] MRACEKT, GAO D, TZANAVARI T, et al. Downregulation of zinc- α 2-glycoprotein in adipose tissue and liver of obese ob/ob mice and by tumour necrosis factor- α in adipocytes[J]. *J Endocrinol*, 2010, 204(2):165–172.
- [18] GOHDA T, MAKITA Y, SHIKE T, et al. Identification of epistatic interaction Involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type2 diabetes model: is Zn- α 2 glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? [J]. *Diabetes*, 2003, 52(8):2175–2181.

(本文编辑 李杰)