基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1454-03

尿酸酶在用氧嗪酸建立高尿酸血症模型大鼠体内的降尿酸作用

甘志勇[1],张 纯[1],冯 娟[1],杨晓兰[1],袁拥华[2],廖 飞[1]

(1.重庆医科大学重庆市生物化学和分子药理学重点实验室,重庆 400016;2.重庆医科大学附属儿童医院药剂科,重庆 400014)

【摘 要】目的:用尿酸酶抑制剂氧嗪酸建立高尿酸血症大鼠模型,考察尿酸酶的体内降尿酸作用。方法:大鼠腹腔注射氧嗪酸钾建立高尿酸血症大鼠模型,尿酸酶滤菌后尾静脉注射给药;大鼠眼眶静脉采血,据对尿酸酶 Vm/Km 的改变测定血浆尿酸酶抑制剂含量,动力学尿酸酶法测定血浆尿酸水平。结果:每天腹腔注射氧嗪酸钾持续 7 d 后,大鼠血浆尿酸可维持在 0.40 mmol/L 以上,但大鼠体内尿酸酶抑制剂也维持在很高水平。持续给予氧嗪酸钾 21 d,每只大鼠给予 0.5 U 聚乙二醇修饰尿酸酶,配对 t 检验发现血浆尿酸有统计显著性下降,但降幅小于 12%;给予低剂量或未经修饰尿酸酶则血浆尿酸水平无显著变化。结论:用尿酸酶抑制剂建立的高尿酸血症动物模型评价尿酸酶的降尿酸作用可靠性有限。

【关键词】高尿酸血症;尿酸酶;氧嗪酸钾

【中国图书分类法分类号】R346.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-17

Action of uricase to lower plasma urate in hyperuricemic rat model developed with oxonate

GAN Zhi-yong, et al

(*Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To test the action of uricase to lower plasma urate in hyperuricemic rat model developed with oxonate. *Methods*: Potassium oxonate was given via intraperitoneal injection. Uricase after the filtration of bacteria was given via caudal vein injection. Blood samples were taken from orbital vein to determine equivalents of competitive inhibitors on uricase by their alteration on uricase Vm/Km and plasma uric acid levels by a direct kinetic uricase method. *Results*: After the continuous administration of potassium oxonate to rats once a day for one week, plasma uric acid levels were kept over 0.40 mmol/L, meanwhile uricase-inhibiting substances were kept at steady high levels. To hyperuricemic rats after continued administration of potassium oxonate for 3 weeks, the injection of 0.5 U uricase modified with monoether poly (ethylene glycol) reduced plasma uric acid levels by paired t-test analysis with an average degree less than 12%. The injection of unmodified uricase or lower levels of modified uricase produced no expected action. *Conclusion*: Because of serious interference from the uricase inhibitor in rat in vivo, hyperuricemic rats developed with uricase inhibitors show limited reliability for evaluating the pharmacological actions of uricases.

【Key words】Hyperuricemia; Uricase; Potassium oxonate

尿酸酶催化尿酸氧化成过氧化氢和尿囊素等物质。人体缺乏尿酸酶,尿酸是人体嘌呤分解代谢终产物,并主要由肾脏排泄。尿酸生成增加或排泄减慢都使血浆尿酸显著升高,此即高尿酸血症,其可诱发并加剧痛风、心血管疾病、肿瘤融解综合症等疾病进程。人体可耐受尿酸酶作用于尿酸的产物过氧化氢,且尿囊素无明显病理生理作用并可经肾脏排泄。因此,尿酸酶是治疗高尿酸血症的候选药物。

用敲除尿酸酶基因的高尿酸血症动物可在体评价药用尿酸酶,但其成本和技术瓶颈限制了常规应用[1]。小鼠腹腔注射尿酸建立的高尿酸血症模型不能有效维持,无法用于评价尿酸酶的药理作用[2]。另外,用尿酸酶抑制剂降低动物体内尿酸酶活性也可建立高尿酸血症动物模型[3-7];此模型可评价黄嘌呤氧化酶抑制剂或尿酸转运载体抑制剂类抗高尿酸血症药物[8]。但常见候选药用尿酸酶都对建立高尿酸血症动物模型所用尿酸酶抑制剂很敏感[3,5-7]。故在尿酸酶抑制剂建立的高尿酸血症动物模型体内,尿酸酶的降尿酸药理作用可能受

作者介绍:甘志勇(1983-),男,硕士,
研究方向:蛋白质药物化学修饰与给药技术。
通讯作者:廖 飞,男,教授,E-mail:liaofeish@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30672009)。

到这类抑制剂的干扰。

氧嗪酸对常见尿酸酶都有很强竞争性抑制作用[3]。本文用氧嗪酸钾建立高尿酸血症大鼠模型,初步考察其体内尿酸酶抑制剂的变化及其对尿酸酶降尿酸药理作用的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 18 只[(220 + 20) g,n=18]由本校动物中心提供并按规范要求饲养,动物实验已得到本校伦理委员会许可。

1.2 化学物质

尿酸(BIO BASIC INC 公司,纯度 >99%,批号:YYC523B048Y),氧嗪酸钾(山东中科泰斗化学有限公司,纯度>97%),N- 羟基丁二酰亚胺(NHS)(Alfa Aesar,纯度 >98%,批号:10113280);二乙基三胺五乙酸(DETAPA)(Alfa Aesar,纯度 >98%),单甲氧基聚乙二醇 5000(mPEG5k)(Sigma-Aldrich 公司,批号:1385331),二乙基氨基乙基(DEAE)纤维素(Whatman 公司,纯度 >98%,批号:010410)。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

UV-7504 分光光度计(上海欣茂仪器有限公司),ZF-20C 暗箱式自动紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂),AR2140 电子分析天平(奥豪斯国际贸易(上海)有限公司)。

1.4 尿酸酶活性测定

缓冲液为含 0.10 mmol/L DETAPA 的 50.0 mmol/L 硼砂缓冲液(pH 9.2)并预热到 25℃,加入尿酸到终浓度为 75.0 μmol/L,再加入适量尿酸酶样品,混匀后以 2 s 以上间隔记录 293 nm 吸收的变化[9,10]。尿酸在 293 nm 吸光系数为 11.5 L/(mmol·cm);在25 ℃时 1 min 氧化 1 μmol 尿酸的尿酸酶量为 1 U。

1.5 苛求芽孢杆菌胞内尿酸酶制备

苛求芽孢杆菌(A.T.C.C 26904)胞内尿酸酶经一次DEAE-纤维素层析纯化,即用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)加 0.80 mol/L NaCl 线性梯度洗脱[9],合并比活性 5.0 U/mg 以上洗脱液,对含 0.10 mmol/L DETAPA 的 50 mmol/L 硼砂缓冲液(pH 9.2)透析并冻干用作分析工具酶。供注射的候选药用尿酸酶用苛求芽孢杆菌胞内尿酸酶经连续两次 DEAE- 纤维素层析纯化,合并 NaCl 梯度洗脱时比活性 7.0 U/mg 以上的酶液,对 50 mmol/L 硼砂缓冲液(pH 9.2)透析过夜并冻干;此尿酸酶经十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,没有明显的杂蛋白。

1.6 mPEG5k 活化

mPEG5k (3 g,0.6 mmol) 与 0.12 g 琥珀酸酐,在含 3 ml 吡啶的 100 ml 四氢呋喃(THF)中氮气保护下 60 ℃反应 24 h;减压除去大部分 THF,用 100 ml 乙醚沉淀 3 次得到 mPEG 5000- 琥珀酸(单酯)粉末;再溶于 50 ml THF,加入 0.173 g NHS 和 0.31 g 二环己基碳二酰亚胺(DCC),室温搅拌反应 8 h 后滤去不溶物,得到 mPEG5000- 琥珀酸的 NHS 酯(mPEG5k-NHS)[11]。产物用大量乙醚重复洗涤并沉淀 3 次纯化后(收率约 75%);用与萘替乙二胺反应,使用(甲醇 : 氯仿 =5 : 1)为展开剂薄层层析检测确认是活泼酯。

1.7 尿酸酶的 mPEG5k 修饰

尿酸酶溶于 50 mmol/L 硼砂缓冲液(pH 为 9.2),以亚基分子量 36 kD 和每个亚基含有 18 个氨基估计其氨基含量(Genebank 登录号 FJ393559),加入尿酸酶摩尔量 200 倍的 mPEG5K-NHS 粉末[11];在 4 ℃温和搅拌 45 min,再用含 100 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 为 8.0) 透析过夜[12]。经 SDS - PAGE 分析,此混合物中未修饰尿酸酶占 20%左右;此混合物用 0.22 μm 微孔滤膜除菌后作为 PEG 修饰尿酸酶注射制剂使用。未修饰尿酸酶也滤除细菌后备用。

1.8 高尿酸血症大鼠模型建立和应用

健康 SD 大鼠[体重(220 ± 20) g,n=18]每天上午腹腔注射氧嗪酸钾 200 mg/kg。连续给予氧嗪酸钾 21 d 后,一组尾静脉注射修饰尿酸酶共 0.5 U,另一组注射未修饰尿酸酶共 0.5 U,一组注射等体积生理盐水为对照[13]。在指定时间每次从大鼠眼眶静脉取血 0.5 ml,3 600 r/min 离心 10 min 后所得血浆立即用高氯酸(终浓度 5%)变性蛋白,加饱和碳酸钾调到中性,30 min 后室温离心,并测定上清液中尿酸和尿酸酶抑制剂含量。

1.9 尿酸测定

用动力学尿酸酶法测定尿酸以避免抑制性杂质的干扰[9,14-16]。反应缓冲液与测定活性时相同并预热至 25℃,尿酸酶终浓度为 0.04 U/ml(在 293 nm 无吸收);将 1.195 ml 含100 μl 中性样品的混合物转移到 10 mm 光径石英比色杯中测定 293 nm 起始吸收;再加入 5 μl 尿酸酶浓缩液到石英杯中混匀,在 7.0 min 内以 5 s 间隔测定 293 nm 吸收变化,用 Visual 6.0 编写的程序分析反应过程预测终点吸收;校正加入尿酸酶溶液对起点吸收的影响,起点和终点的吸收差即是反应混合物中尿酸的净吸收,再换算成尿酸浓度。

1.10 尿酸酶抑制剂测定

氧嗪酸是尿酸酶竞争性抑制剂[3]。苛求芽孢杆菌胞内尿酸酶米氏常数(Km)约 0.22 mmol/L[9]。测定低浓度底物下最大反应速度与米氏常数的比值(Vm/Km)可估计尿酸酶抑制剂的当量浓度[17]。所用反应体系为测定活性的硼砂缓冲液且预热至 25 ℃,1.20 ml 混合物中含 200 μl 中和后的样品,0.10 U/ml 尿酸酶和 20 μmol/L 尿酸,以 5 s 间隔监测 15 min 内 293 nm 的吸收变化;分析反应曲线测定 Vm/Km;以氧嗪酸为参考,尿酸酶抑制剂含量换算为氧嗪酸当量;工作曲线为每个浓度下 3 次测定的均值。

1.11 蛋白定量

用与牛血清白蛋白(BSA)作为参考蛋白,Bradford 法测定。

1.12 统计分析

结果为均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$,图中用竖线表示),用 Microsoft Excel 提供的统计分析模块进行 t 检验分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高尿酸血症的大鼠模型

苛求芽孢杆菌胞内尿酸酶 Km 很高,便于用低浓度底物测定 Vm/Km 对竞争性抑制剂的响应(图 1),但此方法测量

尿酸酶抑制性物质的精度较低。健康大鼠血浆尿酸常低于 0.05 mmol/L 且尿酸酶抑制剂低于检测限。首次给予氧嗪酸钾后，大鼠血浆中尿酸酶抑制剂可在 1.5 h 达到峰值但随后在 2 h 内下降到低于检测限，血浆尿酸也同步显著升高但峰值低于 0.40 mmol/L。如给予腹腔注射氧嗪酸钾(200 mg/kg)时同步用尿酸(200 mg/kg)灌胃，血浆尿酸在 3 h 后达到峰值并超过 0.40 mmol/L (P<0.05，n=5)，但随后在 2 h 内下降到 0.10 mmol/L 以下(图 2)。

在连续给予氧嗪酸钾 1 周后，大鼠血浆中尿酸稳态水平逐渐升高；在每天同一时间再给氧嗪酸钾之前，血浆尿酸也可维持在 0.40 mmol/L 以上，但尿酸酶抑制剂也维持在较高的稳态水平(图 3)。在持续给予氧嗪酸钾 4 周后，血浆尿酸下降而尿酸酶抑制剂水平基本稳定；第 6 周后血浆尿酸已低于 0.40 mmol/L。

2.2 *尿酸酶在体内的降尿酸作用*

对持续给予氧嗪酸钾 3 周的大鼠，最后一次腹腔注射氧嗪酸钾 24 h 后尾静脉注射尿酸酶[5]。给药前 3 组大鼠血浆尿酸水平无统计差异。给予尿酸酶 2 h 后，对照组血浆尿酸为 (0.62 ± 0.18) mmol/L (n=5)，给予未修饰尿酸酶组的血浆尿酸为(0.58 ± 0.14) mmol/L (n=5)，给予修饰尿酸酶组的血浆尿酸为(0.55 ± 0.15) mmol/L(n=6)，三者组间比较均无统计差异。给予修饰尿酸酶组经给药前后配对 t 检验分析，降尿酸作用具有统计显著性(P<0.05)，但其降幅低于 12%；将修饰尿酸酶用量降到 0.3 U 已观察不到降尿酸作用；对未修饰尿酸酶组即使进行给药前后的配对 t 检验也观察不到降尿酸作用。给予尿酸酶作用 4 h 后测定血浆尿酸的结果类似。

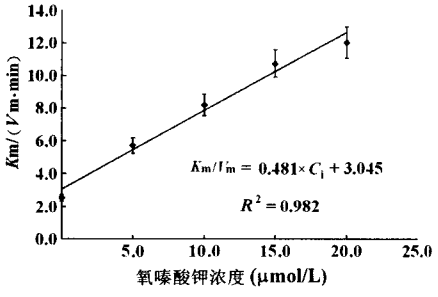
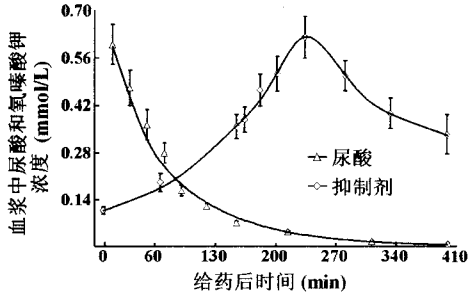
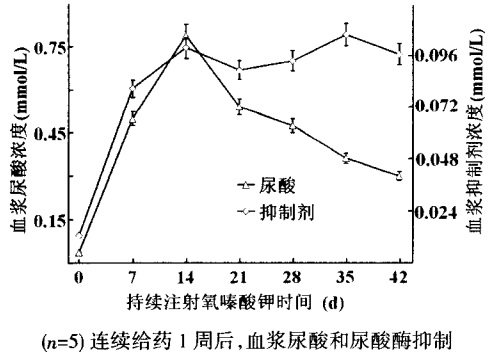


图 1 测定尿酸酶抑制剂当量浓度的工作曲线



(n=5) 给予氧嗪酸钾 2 h 后，血浆尿酸水平已有统计显著性升高

图 2 单次给予氧嗪酸钾并灌胃尿酸时的血浆尿酸和尿酸酶抑制剂变化曲线



(n=5) 连续给药 1 周后，血浆尿酸和尿酸酶抑制物质水平都统计显著性升高

图 3 持续给予氧嗪酸钾过程中血浆尿酸和尿酸酶抑制剂的变化曲线

3 讨 论

据建模过程中血浆尿酸水平的变化可选择连续给予氧嗪酸钾 3 周的大鼠给药考察尿酸酶的药理作用。注射给药后尿酸酶主要分布在血液中。修饰尿酸酶在大鼠体内半衰期接近 1 d (数据未给)。考虑所用尿酸酶的最适 pH 效应，每只大鼠注射 0.5 U 尿酸酶后血浆尿酸酶浓度有望高于 30 U/L，与临床治疗有效所需酶活性水平相当[18]。本文结果表明高尿酸血症大鼠体内需较高浓度尿酸酶抑制剂才能维持体内较高尿酸浓度水平；低剂量修饰尿酸酶和未修饰尿酸酶基本没有降尿酸作用，而且与临床治疗相当剂量的聚乙二醇修饰尿酸酶的降尿酸作用也很微弱。可见，用尿酸酶抑制剂建立的高尿酸血症大鼠模型评价尿酸酶降尿酸药效作用的可靠性有限。

现有尿酸酶作为降尿酸药物都还不满意，需要进行分子工程改造以提高成药性，这就需要对大量突变体进行药理作用评价。用尿酸酶抑制剂建立高尿酸血症动物模型评价尿酸酶的药理作用可靠性低，我们尝试用离体血浆测定尿酸酶的降尿酸作用、用健康大鼠测定体内循环半衰期、模拟体内药效初步评价尿酸酶的药理作用；此系统简便、实用、可靠，可用于快速筛选尿酸酶突变体及其制剂。

参 考 文 献

[1] Kelly S J, Delnomdedieu M, Oliverio M I, et al. Diabetes insipidus in uricase-deficient mice: a model for evaluating therapy with poly(ethylene glycol)-modified uricase[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(5): 1001-1009.

[2] 李晓娟，李依芯，陈建华. 重组尿酸酶部分理化性质及其初步药效学研究[J]. 药物生物技术，2007，14(2)：131-135.

[3] Fridovich I. The competitive inhibition of uricase by oxonate and by related derivatives of s-triazines[J]. J Biol Chem, 1965, 240(6): 2491-2494.

[4] 林韦青，谢建祥. 高尿酸血症动物模型研究进展[J]. 中国药物与临床，2005，5(2)：115-118.

[5] Habu Y, Yano I, Takeuchi A, et al, Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: roles of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(6): 1107-1114.

[6] Johnson W J, Stavric B, Chartrand A. Uricase inhibition in the rat by s-triazines: an animal model for hyperuricemia and hyperuricosuria[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1969, 131(1): 8-12.

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1457-06

汉族人群 Klotho 基因多态性及其与心动周期信号谱特征的相关性研究

马厚勋,田小春,翟福利,刘晓林,金炯娜,周 平,吴 平
(重庆医科大学附属第一医院老年科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索中国汉族人群(Klotho,KL)基因 G-395A、F352V 及 C370S 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms,SNP)及其与心动周期信号谱特征的相关关系。方法:随机选择汉族自然人群个体 177 为研究对象[男 96,女 81 例,平均年龄(65.11 ± 10.7)岁],获取其静脉血白细胞基因组 DNA。采用等位基因特异性引物 PCR 技术检测 Klotho 基因 3 个位点的基因型,利用《HPS 谱及其混沌特征分析系统软件》检测人群的卧位心动周期信号谱(Heart period signal,HPS)参数。结果:① KL 基因 G-395A SNP AA 基因型携带者其绝对高频功率(Absolute high frequency power,AHP)及相对高频率(Relative high frequency power,RHP)参数较其 GA 携带者降低,均有显著性差异($P<0.05$);同时携带 AA 基因型者的 RHP 参数也较 GG 携带者降低,亦有显著性差异($P<0.05$)。②KL 基因 F352V SNP VV 突变基因型携带者其相对超低频率(Relative ultra-lower frequency power,RUP)、超低频/高频比值(Ratio of AUP to AHP,RUH)参数值较 FF 野生型纯合子基因型携带者低,差异有显著性($P<0.05$);携带 VV 基因型者绝对低频功率(Absolute low frequency power,ALP)、AHP、RHP 以及总功率(Total power value,TPV)较其 FF 野生型携带者高,也有显著性差异($P<0.05$);汉族人群 KL 基因 F352V 多态性的突变型 VV 基因型纯合子携带者其 RUP、RUH 参数值也较其 FV 杂合子携带者降低;突变型 VV 基因型纯合子携带者其 RHP 参数值则较 FV 杂合子携带者高,亦有显著性差异($P<0.05$)。③KL 基因 C370S 多态性的突变型 SS 基因型纯合子携带者其低频/高频比值(Ratio of absolute low frequency power to AHP,RLH)参数值较 CC 野生型纯合子携带者低有显著性差异,同时也较 CS 杂合子携带者低,其差异亦有显著性($P<0.05$)。结论:KL 基因 G-395A SNP 突变型 AA 与 AHP、RHP 减低有关;F352V SNP 突变型 VV 与 RUP、RUH 减低有关,亦与其 ALP、AHP、RHP 以及总功率(Total power value,TPV)增高有关,这就提示 klotho 基因多态性与心动周期信号谱特征的有明确相关性。

【关键词】Klotho 单核苷酸多态性; 心动周期信号
【中国图书分类法分类号】R153.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-22

作者介绍:马厚勋(1966-),男,主任医师,博士,
研究方向:老年心血管疾病基础与临床。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30672212);重庆医科大学创新项目(编号:CX0507)。

[7] Stavric B,Nera E A.Use of the uricase-inhibited rat as an animal model in toxicology[J].Clin Toxicol,1978,13(10): 47-74.

[8] Nguyen M T,Awale S,Tezuka Y,et al. Hypouricemic effects of acacetin and 4,5-o-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats[J]. Biol Pharm Bull,2005,28(12): 2231-2234.

[9] Zhao Y S,Zhao L N,Yang G Q,et al. Characterization of a uricase from Bacillus fastidious A.T.C.C.26904 and its application to serum uric acid assay by a patented kinetic uricase method[J].Biotechnol Appl Biochem,2006,45(2):75-80.

[10] 赵利娜,廖 飞,赵运胜. 用积分法考察黄嘌呤对 Candida species 尿酸酶的抑制作用[J].第四军医大学学报,2005,26(19):1729-1731.

[11] Kynclova E,Elsner E,Kopf A,et al. Novel method for coupling of poly (ethylene glycol) to carboxylic acid moieties of proteins [J]. J Mol Recognit,1996,9(5-6):644-651.

[12] Zhao Y S,Yang X L,Li X Y,et al. Reversible inactivation of an intracellular uricase from Bacillus fastidiosus via dissociation of homotetramer into homodimers in solutions of low ionic strength[J].Biosci Biotechnol Biochem,2009,43(9): 2141-2144.

[13] Iwaki K,Yonetani Y. Hyperuricemic effects of cholinergic agents in rats [J]. Jpn J Pharmacol,1982,32(2):343-349.

[14] Liao F,Zhao Y S,Zhao L N,et al. Kinetic method for enzymatic analysis by predicting background with uricase reaction as a model[J].J Med Coll PLA,2005, 20(6):338-344.

[15] Liao F,Zhao Y S,Zhao L N,et al. Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method[J]. J Zhejiang Univ Sci B,2006,7(6):497-502.

[16] Zhao Y S,Yang X Y,Lu W,et al. Uricase based method for determination of uric acid in serum[J]. Michrochim Acta,2009,164(1):1-6.

[17] Meyer-Almes F J,Auer M. Enzyme inhibition assays using fluorescence correlation spectroscopy:a new algorithm for the derivation of k_{cat}/K_M and Ki values at substrate concentrations much lower than the Michaelis constant [J]. Biochem,2000,39(43):13261-13268.

[18] Sundy J S,Ganson N J,Kelly S J,et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous PEGylated recombinant mammalian urate oxidase in patients with refractory gout[J]. Arthritis Rheum,2007,56(3):1021-1028.

(责任编辑:关蕴良)