

• 实验研究 •

尿酸酶缺失大鼠的血细胞和血液流变学变化*

万绪莲¹, 李律宇², 李 丹³, 罗光云¹, 李 宁¹, 云 宇³, 段为钢^{1△}

(1. 云南中医药大学, 云南 昆明, 650500; 2. 云南中医药大学第三附属医院, 云南 昆明 650500;
3. 昆明医科大学, 云南 昆明 650500)

摘要: 目的 检测雄性尿酸酶缺失大鼠(Kunming-DY 大鼠)的血细胞和血液流变学变化以完善其生物学资料。
方法 与同龄雄性野生型 SD 大鼠对照,用磷钨酸法检测尿酸酶缺失大鼠 45 d 日龄的血尿酸水平,记录体质量和出入量,断尾采血用全自动动物血细胞分析仪分析 21 项血细胞指标,腹主动脉采血用全自动动物血液流变仪检测 23 项血液流变学指标。**结果** 45 d 日龄尿酸酶缺失大鼠的血尿酸水平明显升高,饮水量和尿量明显增加;白细胞数量减少,但淋巴细胞比例增加,红细胞体积变小,血小板体积也变小;多项血液流变学指标也有所改善。**结论** 尿酸酶基因缺失大鼠具有慢性感染、营养性贫血、小细胞低色素特征的“贫血”倾向,血小板功能更倾向于成熟,有利于止血,血液黏度也有所下降。

关键词: 尿酸酶缺失大鼠;高尿酸血症;血细胞分析;血液流变学;Kunming-DY 大鼠;大鼠模型

中图分类号: R-332

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2022)06-0066-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2022.06.014

Changes of Blood Cells and Hemorheology in Uricase-Deficient Rats

WAN Xulian¹, LI Lvyu², LI Dan³, LUO Guangyun¹, LI Ning¹, YUN Yu³, DUAN Weigang¹

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
2. The third Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
3. Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To examine the changes of blood cells and hemorheology in male uricase-deficient rats (Kunming-DY rats) to improve and perfect its biological data. **Methods** Compared with male wild-type SD rats of the same age, serum uric acid (SUA) in uricase-deficient rats of 45-day age was determined using the phosphotungstic acid method. Their weight, intake and excreta were recorded. Their tail blood was collected in which the blood cells were analyzed by an automatic animal blood cell analyzer, and 21 results were obtained. The blood from their abdominal aorta was drawn whose 23 hemorheological indexes were analyzed by an automatic animal blood rheometer. **Results** The SUA level, intake of water and urine volume of uricase-deficient rats of 45-day age were significantly increased. The number of white blood cells decreased with the proportion of lymphocytes increasing, and red blood cell volume decreased along with platelet volume decreasing. In addition, several hemorheological indexes were improved. **Conclusion** The uricase-deficient rats are prone to infection, nutritional anemia, and "anemia" characterized by small cell low pigment. The platelet function is more mature, which is conducive to hemostasis, and the blood viscosity is also reduced.

KEY WORDS: uricase deficiency rats; hyperuricemia; blood cell analysis; hemorheology; Kunming-DY rats; rat model

高尿酸血症已经成了危害人类健康的“第四高”^[1], 究高尿酸血症的发病机制以及相关疾病的防治新策略与痛风、高血压、糖尿病等疾病高度关联^[2-3]。为了研 略,我们前期以 SD 大鼠为试验大鼠,采用CRISPR/

收稿日期: 2022-08-12

* 基金项目: 云南省应用基础研究项目(202101AY070001-007, 202101AZ070001-010, 202101AZ070001-093)

第一作者简介: 万绪莲(1998-),女,硕士研究生,主要研究方向:痛风、高尿酸血症防治新策略。

△通信作者: 段为钢, E-mail: deardwg@126.com

Cas9 技术成功研制了尿酸酶缺失大鼠(Kunming-DY 大鼠)^[4]。该大鼠血尿酸明显升高,与成年男性血尿酸相似或略高,可以稳定繁殖,成年后的1年生存率可达90%^[4-5],尽管具有轻度的多器官损伤^[6]。由于该大鼠无尿酸酶活性,其尿酸代谢与人进一步相似,可以避免造模剂带来的干扰,有望为高尿酸血症和相关疾病的防治研究提供更好的模型动物^[5],同时该模型动物在研究高尿酸血症方面表现出一定的优势^[7-9]。为此,本研究以45 d日龄SD大鼠为对照,特观察同龄尿酸酶缺失大鼠血细胞和血液流变学变化。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料与仪器 雄性尿酸酶缺失大鼠(Kunming-DY 大鼠)由实验室自制,按照SFP标准繁育。雄性SD大鼠(生产许可证号:SCXK(滇)K2015-0002)由昆明医科大学按照SPF标准繁育。尿酸检测试剂盒(磷钨酸法)(南京建成生物工程研究所)、氨丁三醇(Tris 碱,>99.9%)(德国BioFroxx公司)、全自动动物血细胞分析仪(型号:PE-3070VET)(深圳市普康电子有限公司)、全自动动物血液流变仪(型号:HL5000)(康宇医疗器械有限公司)、酶标仪(型33号:K6600-A)(北京凯奥科技发展有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 随机选取10只40 d日龄的SD大鼠(WT)和7只尿酸酶缺失大鼠($Uox^{-/-}$),适应性饲养到第45 d日龄称重置于代谢笼记录24 h出入量。实验后置于固定器从尾部采抗凝血(EDTA-K2 抗凝)0.2 mL用于血细胞分析。动物用乌拉坦(1.0 g/kg)麻醉后从腹主动脉采抗凝血(肝素抗凝)3 mL用于血液流变学检测,同时采不抗凝血0.5 mL用于血尿酸检测。

1.2.2 血细胞检测 按照说明书操作开启全自动动物血细胞分析仪,选择大鼠模块,将采到的EDTA-K2抗凝血混匀后直接进样检测,收集检测数据。2 h内完成血样收集和血细胞检测。

1.2.3 血液流变学检测 按照说明书操作开启全自动动物血液流变仪,选择大鼠模块,将采到的肝素抗凝血混匀后置于预定的进样盘,自动检测,收集检测数据。2 h内完成血样收集和血液流变检测。

1.2.4 尿酸检测 血液样品凝固后于3 000 r/min,离心5 min制备血清,制备的血清直接用于尿酸检

测。尿酸的含量测定方法则按照厂家提供的说明书进行。

1.3 数据处理 数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。由于总量性(如24 h进食量、饮水量、尿量、排便量等)指标受体质量影响,故校正为200 g大鼠的指标(校正公式1)。组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

$$\text{指标指数}(*200\text{g}) = \frac{\text{指标值}}{\text{体质量}(\text{g})} \times 200(\text{g}) \quad (\text{公式1})$$

2 结果

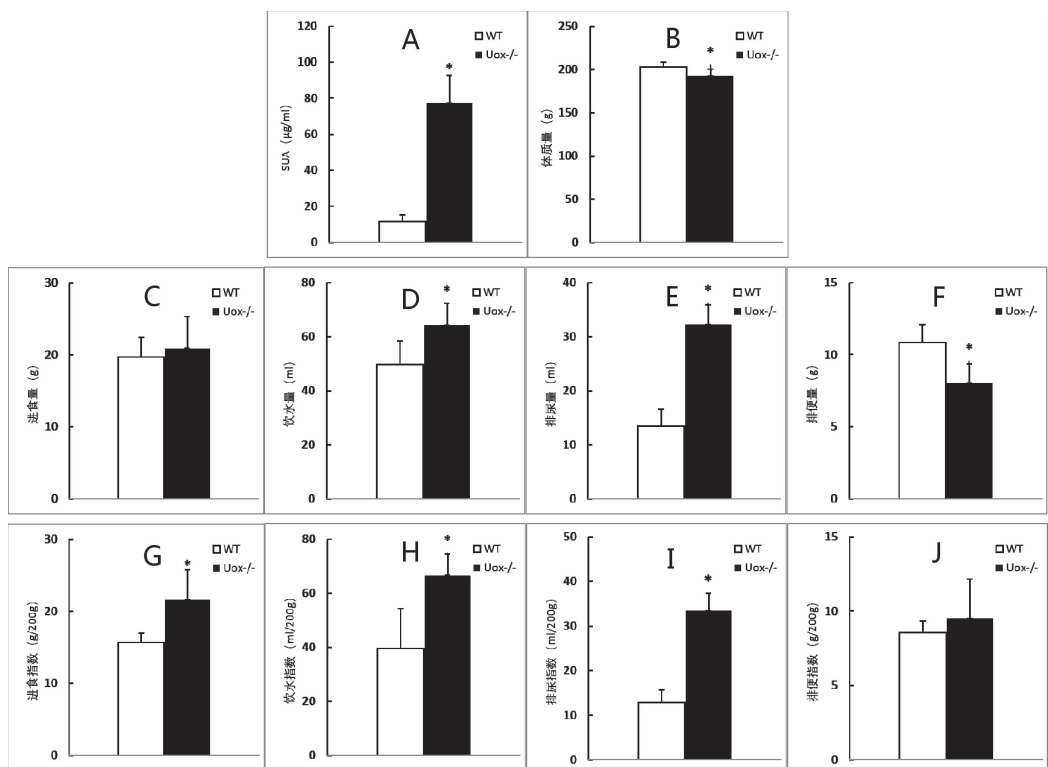
2.1 尿酸酶缺失大鼠的血尿酸水平、体质量和出入量变化 45 d日龄尿酸酶缺失大鼠的血尿酸明显高于野生型SD大鼠(图1A),但体质量略低于同龄野生型大鼠(图1B),且差异均有统计学意义($P < 0.05$),这与我们的前期研究结果一致。

不考虑体质量因素时,45 d日龄的尿酸酶缺失大鼠的24 h进食量无明显变化(图1C),但24 h饮水量(图1D)和24 h排尿量(图1E)明显增加,同时24 h排便量却有所减少(图1F)。考虑到体质量因素时,校正后的指标尿酸酶缺失大鼠24 h进食量则明显增加(图1G),且24 h饮水量(图1H)和24 h排尿量(图1I)进一步增加,同时24 h排便量却无明显差异(图1J)。见图1。

2.2 尿酸酶缺失大鼠的血细胞指标变化 45 d日龄尿酸酶缺失大鼠的白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和中间细胞(主要包含单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)数目明显低于野生型SD大鼠(图2A);但尿酸酶缺失大鼠的淋巴细胞比例高于野生型SD大鼠,中性粒细胞略低,而中间细胞比例无明显变化(图2B)。

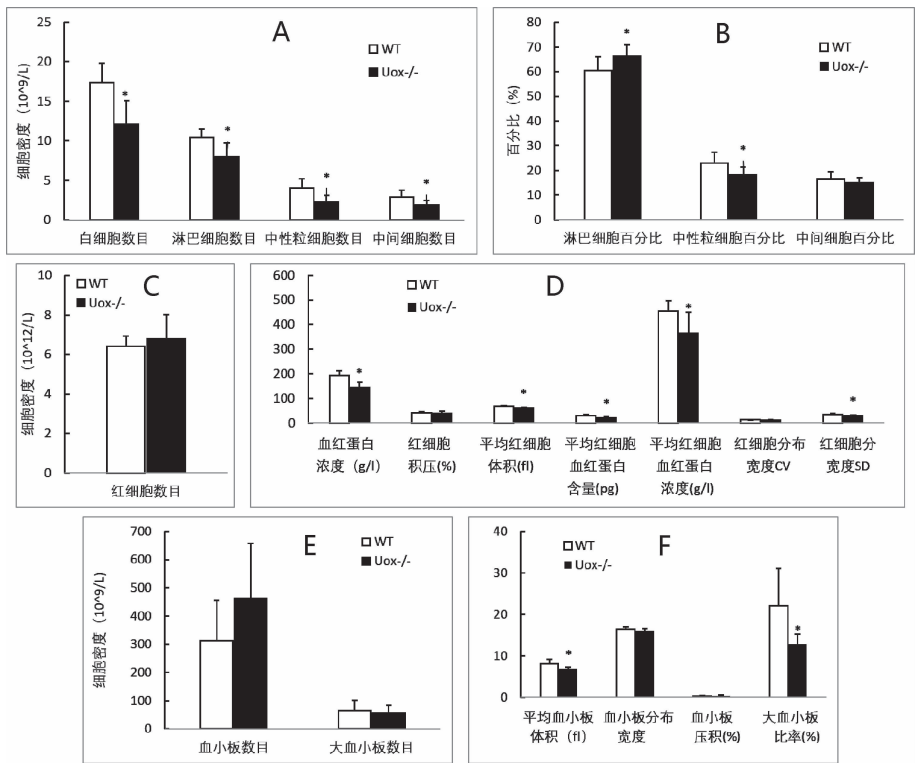
与野生型SD大鼠相比,45 d日龄尿酸酶缺失大鼠的红细胞数目无明显改变(图2C),红细胞压积和红细胞分布宽度CV(变异系数)无明显改变(图2D);但血红蛋白浓度、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白含量、平均红细胞血红蛋白浓度以及红细胞分布宽度SD(标准差)明显减小(图2D)。

与野生型SD大鼠相比,尿酸酶缺失大鼠血小板数目、大血小板数目(图2E),血小板分布宽度和血小板压积(图2F)无明显改变;但血小板体积和大血小板比率明显减小(图2F)。见图2。



注:A. 大鼠血尿酸(SUA)水平;B. 大鼠体质量;C-F,分别为大鼠 24 h 进食量、饮水量、尿量和排便量;G-J,分别为大鼠 24 h 进食量、饮水量、尿量和排便量校正成 200 g 大鼠的数值。WT:野生型 SD 大鼠;Uox^{-/-}:尿酸酶缺失大鼠。与 WT 比较,*P<0.05。

图 1 尿酸酶缺失大鼠的血尿酸水平、体质量和出入量变化



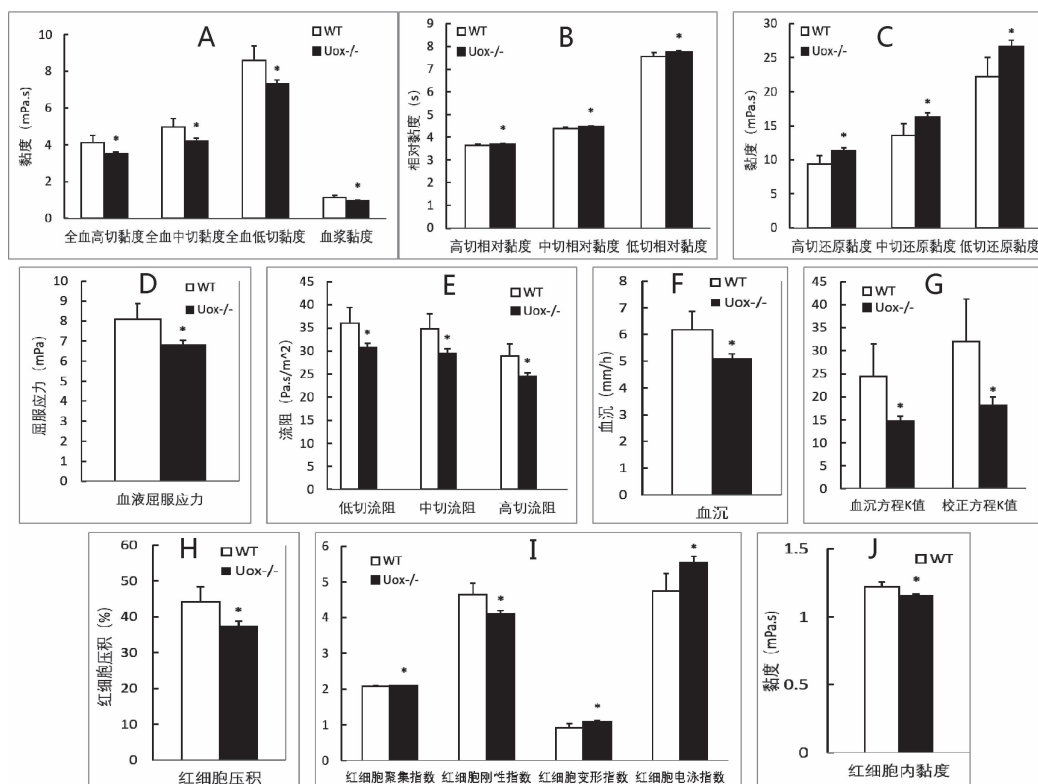
注:A. 白细胞计数分析;B. 白细胞比例分析;C. 红细胞计数;D. 红细胞分析;E. 血小板计数;F. 大鼠血小板分析。WT:野生型 SD 大鼠;Uox^{-/-}:尿酸酶缺失大鼠。与 WT 比较,*P<0.05。

图 2 尿酸酶缺失大鼠的血细胞指标变化

2.3 尿酸酶缺失大鼠的血液流变学指标变化 与野生型 SD 大鼠相比,45 d 日龄尿酸酶缺失大鼠全血高切、中切和低切黏度以及血浆黏度均减小(图 3A),但相应的相对黏度增加(图 3B),相应的还原黏度则进一步显著增加(图 3C)。

与野生型 SD 大鼠相比,45 d 日龄尿酸酶缺失大

鼠的血液屈服应力减小(图 3D),相应的低切、中切和高切流阻减少(图 3E)。与血细胞检测结果类似,尿酸酶缺失大鼠的血沉减慢(图 3F),其方程 K 值也减小(图 3G);红细胞压积(图 3H)、红细胞刚性指数(图 3I)和红细胞内黏度(图 3J)减小,而红细胞聚集指数、红细胞变形指数和红细胞电泳指数(图 3I)则增加。见图 3。



注:A. 全血和血浆黏度;B. 全血相对黏度;C. 全血还原黏度;D. 血液屈服应力;E. 血液流阻;F. 血沉;G. 血沉方程 K 值;H. 红细胞压积;I. 红细胞指数;J. 红细胞内黏度。WT:野生型 SD 大鼠;Uox^{-/-}:尿酸酶缺失大鼠。与 WT 比较,*P<0.05。

图 3 尿酸酶缺失大鼠的血液流变学指标变化

3 讨论

野生型 SD 大鼠正常表达尿酸酶,表达丰度最高部位是肝脏。与传统的基因敲除不同,Kunming-DY 大鼠是基于封闭群大鼠,即 SD 大鼠,采用 CRISPR/Cas9 技术敲除尿酸酶基因 2~4 号外显子区域^[4]。先获得杂合子,通过不断交配获得纯合子,纯合子再相互交配选种获得性状较为稳定的尿酸酶缺失大鼠。

尿酸酶缺失后,该大鼠的血尿酸明显升高,但比文献报道的基于近交系 C57/6J 小鼠研制的尿酸酶缺失小鼠要明显的低^[10],成年后的 1 年生存率达 90%以上,虽然表现出生长略有减慢,多饮多尿现象,但表型基本健康,也能正常繁育^[4-6,11]。这些现象也在本研究中得到重现,说明该大鼠生长略有减慢,多饮多尿现

象能够稳定重现。

本研究发现,与同龄野生 SD 大鼠不同,尿酸酶缺失大鼠的白细胞数量偏少,且淋巴细胞比例增高,说明该大鼠可能存在慢性感染。尿酸酶缺失大鼠的红细胞数量无明显变化,但血红蛋白、红细胞体积、红细胞血红蛋白含量及浓度以及红细胞分布宽度 SD 明显减少,说明该大鼠具有营养性贫血倾向,可能存在一定的铁利用障碍,具有小细胞低色素特征的“贫血”倾向。尿酸酶缺失对血小板数量影响较小,但血小板体积和大血小板比率均减少,说明该大鼠的血小板功能更倾向于成熟,有利于止血。

从血液流变学指标看,尿酸酶缺失后,大鼠的全血黏度、血液屈服应力、血液流阻、血沉均出现明显下

降。由于血液黏度主要受红细胞影响,变小的红细胞有利于全血黏度下降。由于红细胞内的血红蛋白浓度也是下降的,因此红细胞内的黏度也由此减小。与相关黏度指标下降不同,尿酸酶缺失大鼠的还原黏度是增加的。全血还原黏度是指单位红细胞压积时的全血黏度值,考察的是单位红细胞压积对全血相对黏度的贡献。这提示在尿酸酶缺失大鼠中,单位红细胞压积对血液的黏度贡献是增加的。由于红细胞内的血红蛋白含量有所减小,红细胞的刚性也有所减弱。因为红细胞体积变小,红细胞的流动性有所改善,在电场的作用下更容易发生迁移。本研究结果表明雄性尿酸酶缺失大鼠在 45 d 日龄时,血尿酸水平明显升高,且具有多饮多尿现象,但其白细胞数量略有减少,多个血液流变学指标也总体改善。

参考文献:

- [1] 林淑芃.《中国高尿酸血症与痛风诊疗指南(2019)》解读[J]. 临床内科杂志,2020,37(6):460-462.
- [2] SINGH S K,SINGH R,SINGH S K,et al. Prevalence of hyperuricemia and the relationship between serum uric acid and hypertension in new onset diabetic patients;a cross-sectional Indian study[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2022,15:1809-1817.
- [3] SANDOVAL-PLATA G,NAKAFFERO G,CHAKRAVORTY M,et al. Association between serum urate,gout and co-morbidities;a case-control study using data from the UK Biobank[J]. Rheumatology,2021,60(7):3243-3251.
- [4] YU Y,ZHANG N,DONG X X,et al. Uricase-deficient rat is generated with CRISPR/Cas9 technique[J]. Peer J, 2020,8:e8971.
- [5] GAO Y F,YU Y,QIN W,et al. Uricase-deficient rats with similarly stable serum uric acid to human's are sensitive model animals for studying hyperuricemia[J]. PLoS One,2022,17(3):e0264696.
- [6] FAN N,YU Y,LI L Y,et al. Uricase deficiency causes mild and multiple organ injuries in rats[J]. PLoS One, 2021,16(8):e0256594.
- [7] 董鲜祥,范楠,云宇,等. 排毒养颜胶囊对尿酸酶缺失大鼠的降血尿酸作用[J]. 云南中医学院学报,2020,43(3):1-4.
- [8] FAN N,LI L Y,XIA H,et al. Aboriginal bacterial flora in the uricase-deficient rat gut is not the main factor affecting serum uric acid[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2021,2021:e5587642.
- [9] 殷娜,李小丝,刘维超,等. 健脾渗湿方对尿酸酶基因缺失高尿酸血症模式动物肾损伤及肠道微生态干预的研究[J]. 云南中医学院学报,2021,44(4):9-16.
- [10] LU J,HOU X,YUAN X,et al. Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders[J]. Kidney Int,2018,93(1):69-80.
- [11] 范楠,段为钢,云宇. 雄性 Kunming-DY 大鼠血尿酸水平的主要影响因素[J]. 云南中医学院学报,2020,43(6):12-17.
- [9] 徐岩,衣华强. 奇经八脉理论溯源[J]. 天津中医药大学学报, 2022,41(3):286-290.
- [10] 胡冠书.《黄帝内经》气街探义[J]. 河南中医,2019,39(7): 985-988.
- [11] 肖红,郭长青. 十二经筋与十二经脉关系探讨[J]. 中华中医药杂志,2013,28(10):2860-2863.
- [12] 臧颖颖,袁静云,孙娇,等.《黄帝内经》络脉理论与血症治疗探析[J]. 中华中医药杂志,2022,37(4):1991-1994.
- [13] 王莹,鲁明源. 基于《黄帝内经》探讨阳明本义及其生理功能与病机特点[J]. 北京中医药大学学报,2022,45(4): 370-375.
- [14] 陈轶玮. 针刀松解腰大肌联合中药(独活寄生汤加减)治疗强直性脊柱炎的临床观察[D]. 济南:山东中医药大学, 2019.
- [15] 杨红,王海东. 名医王海东“脐下营解结术”临床应用经验[J]. 世界最新医学信息文摘(电子版),2020,20(60): 204-205.
- [16] 侯学思,赵吉平,王宁,等. 针刺治疗子宫腺肌病继发性痛经:前瞻性病例系列研究[J]. 中国针灸,2020,40(8): 834-838.
- [17] 陈彩红,李军.《傅青主女科》痛经篇浅探[J]. 河南中医, 2013,33(12):2082-2083.
- [18] 何宁宁,李开平. 从《内经》角度探析针刀的理论渊源与作用原理[J]. 中国医药导报,2017,14(21):155-158.

(上接第 65 页)