

张艺薇,龙维虎,唐东红,等. 基于 CRISPR/Cas9 系统构建 *Uox* 基因敲除的高尿酸血症小鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(3): 411-419.

ZHANG Y W, LONG W H, TANG D H, et al. Construction of hyperuricemic mouse model with *Uox* gene knockout based on CRISPR/Cas9 system [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(3): 411-419.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.03.009

基于 CRISPR/Cas9 系统构建 *Uox* 基因敲除的高尿酸血症小鼠模型

张艺薇¹, 龙维虎¹, 唐东红¹, 范胜涛¹, 王鹏², 王陈芸¹, 李哲丽¹,
黄璋琼^{1*}, 叶尤松^{1*}

(1. 北京协和医学院中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118;
2. 北京唯尚立德生物科技有限公司, 北京 102200)

【摘要】 目的 通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *Uox* 基因敲除且能稳定遗传的小鼠品系,并评价其是否能够模拟高尿酸血症患者的疾病特点。**方法** 在 *Uox* 基因 Exon 2 ~ 4 的前后两侧设计双 sgRNA,将基因敲除所需的 sgRNA 与 Cas9 mRNA 按照一定比例显微注射进小鼠的受精卵中,培养 2 ~ 4 h 后,将胚胎移植至代孕母鼠体内并最终获得 F0 代小鼠。对 F0 代小鼠进行 PCR 鉴定与测序分析,筛选适合的 *Uox* 基因阳性敲除小鼠与野生型(wide type, WT)小鼠合笼获得 F1 代,再挑选 F1 代中杂合子(基因型为 *Uox*^{+/−})雌鼠与雄鼠合笼得到纯合的 F2 代小鼠(基因型为 *Uox*^{−/−})。最后检测 *Uox*^{−/−} 小鼠与 WT 小鼠血清尿酸、尿液尿酸,血清中肌酐、尿素、丙氨酸氨基转移酶、门冬氨酸氨基转移酶的含量并进行对比,通过苏木素-伊红(HE)染色结合 Masson 染色观察肾和肝组织的病理变化。**结果** 与 WT 小鼠相比, *Uox*^{−/−} 小鼠血清尿酸(雄鼠:(478.4 ± 114.6) μmol/L, *P* < 0.001;雌鼠:(507.7 ± 129.6) μmol/L, *P* < 0.001)、尿液尿酸(雄鼠:(4116.8 ± 1928.1) μmol/L, *P* < 0.001;雌鼠:(2998.0 ± 547.7) μmol/L, *P* < 0.01)、血清中肌酐((91.8 ± 55.6) μmol/L, *P* < 0.001)、尿素((28.6 ± 13.9) mmol/L, *P* < 0.05)、丙氨酸氨基转移酶((53.3 ± 23.3) U/L, *P* < 0.01)及门冬氨酸氨基转移酶((203.3 ± 70.3) U/L, *P* < 0.001)水平均显著升高。组织病理学的结果显示, *Uox*^{−/−} 小鼠的肝中可见中量肝细胞变性,肾中可见中重度的肾小管囊性扩张、变性和纤维化,肾小球肥大增生,小血管扩张充血,间质单核及淋巴细胞浸润。**结论** 通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 *Uox* 基因 Exon 2 敲除的小鼠纯合品系,可以作为高尿酸领域相关研究的动物模型。

【关键词】 高尿酸血症;动物模型;CRISPR/Cas9;基因敲除;尿酸氧化酶

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 03-0411-09

Construction of hyperuricemic mouse model with *Uox* gene knockout based on CRISPR/Cas9 system

【基金项目】 云南省技术创新人才培养对象项目(202105AD160018),中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-043),国家自然科学基金联合基金项目(U2202214),科技创新 2030 重大专项(2023ZD0406306)。

Funded by Technology Innovation Talents Project of Yunnan Province (202105AD160018), Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Innovation Fund for Medical Sciences (2021-I2M-1-043), Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U2202214), Scientific and Technological Innovation 2030 Important Special Project (2023ZD0406306).

【作者简介】 张艺薇,女,在读硕士研究生,研究方向:药理学及人类疾病转基因动物模型建立。Email:EvieChang2001@163.com

【通信作者】 黄璋琼,女,主任技师,研究方向:药理学及人类疾病转基因动物模型建立。Email:hzhq2013@163.com;
叶尤松,男,主任技师,研究方向:人类疾病动物模型研究与创制。Email:13529205033@163.com。

* 共同通信作者

ZHANG Yiwei¹, LONG Weihu¹, TANG Donghong¹, FAN Shengtao¹, WANG Peng²,
WANG Chenyun¹, LI Zheli¹, HUANG Zhangqiong^{1*}, YE Yousong^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 2. Beijing Viewsolid Biotech Co., Ltd., Beijing 102200, China)

Corresponding author: HUANG Zhangqiong. E-mail: hzhq2013@163.com; YE Yousong. E-mail: 13529205033@163.com

[Abstract] Objective To construct a uricase-deficient mouse model with stable inheritance using the CRISPR/Cas9 system, and evaluate its ability to simulate the disease characteristics of patients with hyperuricemia. **Methods** Double single guide RNAs (sgRNAs) were designed on both sides of exon 2 ~ 4 of the *Uox* gene. sgRNA and Cas9 mRNA for gene knockout were microinjected into the fertilized eggs of mice. After culture for 2 ~ 4 h, the embryos were transferred to surrogate mother mice to produce an F0 generation. *Uox*-knockout mice were identified by polymerase chain reaction and sequencing analysis. Positive mice were then mated with wild-type (WT) mice to produce an F1 generation, and heterozygous female and male F1 mice were then selected to obtain homozygous F2 mice. Serum and urine levels of uric acid, creatinine, and urea, and serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were detected and compared between homozygous and wild-type mice. Pathological changes in kidney and liver tissues were observed by hematoxylin and eosin and Masson staining. **Results** Urine levels of serum uric acid (male: (4116.8 ± 1928.1) μmol/L, *P* < 0.001; female: (2998.0 ± 547.7) μmol/L, *P* < 0.01) and serum levels of uric acid (male: (478.4 ± 114.6) μmol/L, *P* < 0.001; female: (507.7 ± 129.6) μmol/L, *P* < 0.001), creatinine ((91.8 ± 55.6) μmol/L, *P* < 0.001), urea ((28.6 ± 13.9) mmol/L, *P* < 0.05), ALT ((53.3 ± 23.3) U/L, *P* < 0.01), and AST ((203.3 ± 70.3) U/L, *P* < 0.001) were significantly increased in *Uox*^{-/-} mice compared with WT mice. Histopathological examination showed moderate hepatocyte degeneration in the liver, moderate-to-severe tubular cystic dilation, degeneration, and fibrosis in the kidney, glomerular hypertrophy and hyperplasia, small-vessel dilation and congestion, and infiltration of stromal monocytes and lymphocytes in *Uox*^{-/-} mice. **Conclusions** We successfully established a homozygous uricase-deficient mouse strain using CRISPR/Cas9 technology, as a suitable animal model for research in the field of hyperuricemia.

[Keywords] hyperuricemia; animal model; CRISPR/Cas9; gene knockout; uricase
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是主要由嘌呤代谢紊乱, 尿酸排泄障碍等因素引起的以持续性异常高水平血清尿酸 (serum uric acid, SUA) 为特征的代谢异常综合征。在临床上指, 成年男性和女性在正常嘌呤饮食情况下, 非同日两次空腹 SUA 水平超过 420 μmol/L^[1]。诸多临床数据显示, 除了因尿酸盐晶体沉积而导致的痛风性关节炎、尿酸盐性肾病之外, HUA 患者还存在有高血压、Ⅱ型糖尿病、代谢综合征、冠心病等多种疾病的患病风险^[2-6]。近年来, 随着人们物质生活水平的提高和饮食结构的变化, HUA 的患病率正在逐年上升, 呈现出城市化、年轻化的发展趋势^[7]。然而 HUA 通常无法通过药物完全治愈, 目前只能达到控制尿酸水平及阻止痛风发生的程度。

因此, 一种高效、稳定的 HUA 动物模型对于

降尿酸药物的研发是至关重要的。目前 HUA 动物模型的构建方法主要有两种: 药物造模和基因干预造模。其中, 基因干预的主要手段是通过敲除与尿酸代谢或排泄相关的关键基因, 使得动物体内尿酸水平积累升高。相较于给予高嘌呤饮食或氧嗪酸钾等药物的造模方法^[8], 基因干预造模可以获得能够稳定遗传的动物模型, 更适合长期深入的科学研究。

尿酸是机体嘌呤代谢的产物, 在小鼠等其他哺乳动物体内, 尿酸可以被尿酸氧化酶 (urate oxidase, UOX) 继续氧化成溶解性更好的尿囊素, 从而排出体外。而人类和猿类在进化过程中, 因为体内的 *Uox* 基因出现无义突变而沉默失活, 嘌呤代谢最终只能生成尿酸^[9]。当尿酸生成速度超过肾的排泄能力时, SUA 水平会显著升高, 进而引发 HUA。有研究表明 UOX 不仅可以降低人

血清中的尿酸水平,还可以治疗由 HUA 引起的痛风症状^[10]。从路径上看,UOX 缺失不仅可以使得小鼠体内的尿酸积累,还可以消除 UOX 对于小鼠和人在嘌呤代谢途径上的差异,是一种更为理想的 HUA 模型构建方法。

近年来,CRISPR/Cas9 基因编辑技术凭借其简单的构建体系、精确的靶向能力和较高的成功率被广泛应用于动物疾病模型的构建过程。本研究即是利用 CRISPR/Cas9 系统剪切 *Uox* 基因的蛋白编码区,并通过非同源末端连接 (non-homologous end-joining, NHEJ) 进行 DNA 修复,从而使得 UOX 蛋白失活,实现 *Uox* 基因的敲除。在获得 *Uox* 基因敲除小鼠模型后,又对敲除小鼠的尿酸、血清生化和组织病理进行了初步评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级野生型 C57BL/6 鼠,其中雌鼠 3 ~ 4 周龄,20 只,体质量 12 ~ 15 g;雄鼠 8 周龄,5 只,体质量 22 ~ 25 g;SPF 级 ICR 雌鼠和雄鼠均为 8 周龄,5 只,体质量 25 ~ 35 g;所有小鼠购自并饲养于中国医学科学院医学生物学研究所【SCXK (滇) K2022-0002】,【SYXK (滇) K2022-0006】。*Uox*^{-/-} C57BL/6 小鼠在北京唯尚立德生物科技有限公司协助下由研究人员所在 SPF 级实验室构建获得。小鼠饲养环境:12 h 交替昼夜,温度 20 ~ 26 °C,湿度 30% ~ 70%。本研究所有饲养和动物实验操作程序均经中国医学科学院医学生物学研究所伦理委员会批准 (DWSP202302027),本实验遵守实验动物使用的 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

spCas9-gRNA 靶点效率检测试剂盒 (VK007, 北京唯尚立德), TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit 5.0 (9765, TaKaRa), 高效率高成功率 PCR 酶 KOD FX Neo (KFX-201, TOYOBO), 血清肌酐 (serum creatinine, SCR) 测定试剂盒 (S03076, 深圳雷杜), 尿素 (blood urea, BU) 测定试剂盒 (S03036, 深圳雷杜), 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 测定试剂盒 (S03030, 深圳雷杜), 门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 测定试剂盒

(S03040, 深圳雷杜), 尿酸检测试剂盒 (C012-2-1, 南京建成生物), M2 培养基 (M1250, 南京爱贝生物), M16 培养基 (M1735, 南京爱贝生物), 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) (S221112, 宁波三生生物)、孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) (B221104, 宁波三生生物)。倒置显微镜 (Olympus, IX73, 日本), 显微操作装置 (Narishige, MMO-202ND, 日本), 微量自动注射仪 (Eppendorf, FemtoJet 4i, 德国), 二氧化碳培养箱 (Thermo, BB15, 美国), SZX7 立体显微镜 (Olympus, SZX7, 日本), 正置白光拍照显微镜 (Olympus, BX43, 日本), 全自动生化分析仪 (深圳雷杜, Chemray 240, 中国), PCR 仪 (Bio-rad, C1000 Touch, 美国), 多功能微孔板检测仪 (Agilent, BioTek Synergy HTX, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 设计

根据 CRISPR/Cas9 靶点设计原则,在 *Uox* 基因 (NCBI Gene ID: 22262) Exon 2 ~ 4 的前后两侧设计 Cas9 靶点,并对所设计的 3 对 sgRNA 进行活性检测 (该工作由北京唯尚立德生物科技有限公司完成),最终选择两侧活性最高的 sgRNA 用于后续基因敲除小鼠的构建。

1.2.2 胚胎实验

(1) 胚胎实验前准备: ICR 雄鼠结扎: 雄鼠麻醉后, 结扎其两侧输精管, 待休养恢复两周后与 ICR 雌鼠合笼, 筛除未结扎成功的雄鼠; 超数排卵: 对 3 ~ 4 周龄雌性 C57BL/6 小鼠注射 10 IU PMSG, 间隔 48 h 后再注射 10 IU hCG, 当晚与雄性 C57BL/6 小鼠合笼; 假孕鼠准备: 选取发情期 ICR 雌鼠与 ICR 结扎雄鼠于上述同一时段合笼, 次日检查见栓情况。

(2) 显微注射及胚胎移植: 促排次日对见栓雌鼠实施安乐死并在输卵管壶腹部收集受精卵。将受精卵于 37 °C, 5% CO₂ 培养至原核期时, 将 sgRNA (20 ng/μL) 和 Cas9 mRNA (100 ng/μL) 一起显微注射到小鼠受精卵中, 经恢复培养 2 ~ 4 h 后, 移植到假孕 ICR 母鼠输卵管壶腹部, 缝合后将移植鼠放回饲养间, 定期观察其是否怀孕。

1.2.3 F0 代小鼠基因型鉴定

对适龄 F0 代小鼠编号分笼, 取小鼠 2 ~

5 mm 尾组织提取 DNA,随后通过 PCR 反应验证基因敲除情况(引物序列见表 1)。配制 25 μL 的 PCR 体系:ddH₂O 3 μL ,上下游引物各 1 μL ,模板 2 μL ,2 $\times$ buffer 12.5 μL ,dNTPs 5 μL ,PCR 酶 KOD FX Neo 0.5 μL ;PCR 反应参数的设置为

94 $^{\circ}\text{C}$ 起始变性 2 min,循环参数设置为 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,35 个循环后 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。随后对 PCR 鉴定阳性的小鼠反应产物进行测序,来确定带有突变的首建鼠(founder)。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

代次 Generation	基因型 Genotype	引物 Primers	引物序列(5'-3') Sequences of primer(5'-3')
F0	KO	M-KO-T28-FP	ATCAGGAGAGGTTGGAGATAGG
		M-KO-T28-RP	AAGTCTGTGCCATCTTAGAGAAC
	WT	M-KO-T28-FP	ATCAGGAGAGGTTGGAGATAGG
		M-KO-T28-WT-RP	CCGTGTAGGTAATCCTTCTTGG
F1	KO	M-KO-T28-SENS	GTGACTCAGAAGTCGCTGTAAC
		M-KO-T28-ANTI	AACTGTTGCCGCCATCTCT

1.2.4 建立稳定遗传的 *Uox*^{-/-} 小鼠品系

将带有突变的首建鼠与野生型(wide type, WT)小鼠交配,得到 F1 代杂合子小鼠(基因型为 *Uox*^{+/-}),同“1.2.3”中描述的方法进行基因型鉴定和 DNA 测序,证实 *Uox* 基因的敲除。随后选择 F1 代杂合的雌鼠和雄鼠交配获得后代 F2 代,挑选出 F2 代中的纯合子小鼠(基因型为 *Uox*^{-/-}),即得到稳定遗传的 *Uox* 基因敲除小鼠品系

1.2.5 SUA 与尿液尿酸(urine uric acid, UUA)测定

SUA 检测:采样前一晚禁食 12 h,小鼠尾静脉采血 100 μL ,室温静置 1 ~ 2 h 后见血清析出,以 3500 r/min 离心 15 min,收集血清备用;UUA 检测:采样前同样禁食 12 h,应激法采集尿液。SUA 和 UUA 均使用尿酸测试盒进行测定,以蒸馏水作空白对照、标准品作阳性对照,加样品 5 μL ,混合酶溶液 250 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后,于 510 nm 下测定吸光度值 A。计算公式如下:

$$\text{UA 浓度}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{A 测定} - \text{A 空白}}{\text{A 标准} - \text{A 空白}} \times$$
$$\text{C 标准品} \times \text{F 稀释倍数}$$

1.2.6 组织病理学检测

小鼠深度麻醉后,取肾组织和肝组织,经 4% 多聚甲醛固定 48 h,进行组织修剪、脱水、包埋、切片,随后进行苏木素-伊红(HE)染色或 Masson 染色、封片、最后镜检合格的样片。在显微镜不同倍数下详细观察组织切片情况,对切片中基本病

理改变如充血、淤血、出血、水肿、变性、坏死、纤维化、炎性变化等情况进行评价和描述。

1.2.7 生化检测结果

采样前一晚禁食禁水 12 h,小鼠尾静脉采血 300 μL ,室温静置 1 ~ 2 h 后见血清析出,以 3500 r/min 离心 15 min,收集血清。按说明书配制试剂混合液加入仪器,上机检测。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10.0 软件统计分析数据,数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。两组数据间比较采用非配对 *t* 检验方法(unpaired student's *t* test)分析,多组数据间比较采用非配对单因素方差法(One-way ANOVA)分析,*P* < 0.05 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 sgRNA 活性分析

经检测,所设计的 3 对 sgRNA 中以 *Uox*-L2(86%)和 *Uox*-R2(98%)的活性最高,选择 *Uox*-L2 和 *Uox*-R2 进行 sgRNA 载体构建和体外转录,最终获得可用于显微注射的 sgRNA 溶液。(表 2,图 1)。

2.2 F0 和 F1 代小鼠的基因型鉴定

经 PCR 鉴定和 DNA 测序,本实验 F0 代共获得小鼠 8 只,其中有 3 只阳性敲除鼠。将 F0 代 1 号雄鼠与野生型 C57BL/6 雌鼠合笼,共获得 15 只 F1 后代,其中 10 只为基因型 *Uox*^{+/-} 的杂合子

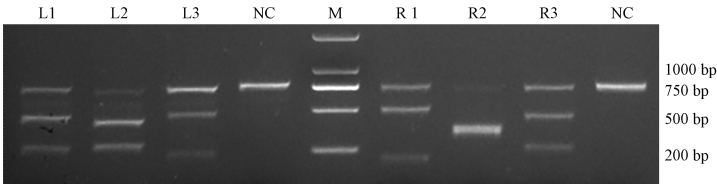
表 2 sgRNA 序列及活性分析

Table 2 Sequences and activity for sgRNA		
sgRNA	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	活性/% Reactivity/%
<i>Uox</i> -L1	AATATAACCGACTGGTTGAGG	65
<i>Uox</i> -L2	CGGTATATGATTACCCCGAGG	86
<i>Uox</i> -L3	CAAGGGACCTCACACGTCTGG	14
<i>Uox</i> -R1	TTACTGGATCATTTGCTACAGG	57
<i>Uox</i> -R2	TGTAAATCTCTTGCTATATGG	98
<i>Uox</i> -R3	TGTCCCATTGATTCTTGAGG	58

小鼠。然后将 F1 代杂合子雌雄鼠相互合笼,筛选得纯合的 *Uox*^{-/-} 小鼠,保种繁育用于后续实验。F1 代及之后代次的小鼠 *Uox* 基因 5'-AACACAACAACAAAAAAA-3' 前均缺失 2013 bp,即敲除*Exon 2*。(表 3,图 2)。

2.3 尿酸测定结果

本研究对 WT、*Uox*^{+/-}、*Uox*^{-/-} 三种类型的 8 周龄雌鼠与雄鼠分别进行 SUA 和 UUA 检测。其结果显示,与 WT 小鼠(雄性和雌性)及 *Uox*^{+/-}

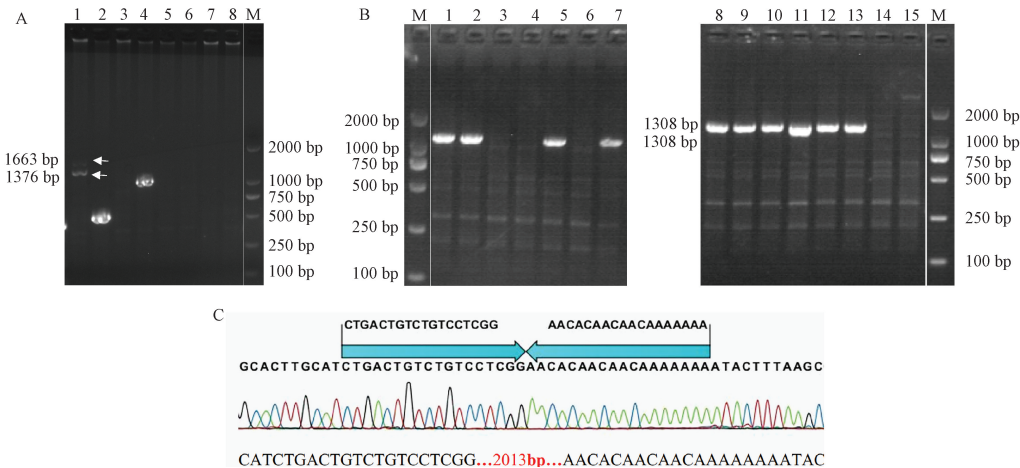


注:M:Maker;NC:阴性对照;L1 ~ L3:*Uox*-L1 ~ L3;R1 ~ R3:*Uox*-R1 ~ R3。

图 1 sgRNA 靶点活性检测

Note. M. Maker. NC. Negative control. L1 ~ L3. *Uox*-L1 ~ L3. R1 ~ R3. *Uox*-R1 ~ R3.

Figure 1 Detection of target activity for sgRNA



注:A:F0 代基因型鉴定;B:F1 代基因型鉴定;C:F1 代鼠 *Uox* 基因敲除前后碱基变化示意图。

图 2 F0 和 F1 代的基因型鉴定

Note. A. Genotyping for F0. B. Genotyping for F1. C. Schematic diagram of base changes after knockout of *Uox* in F1.

Figure 2 Genotyping identify for F0 and F1

小鼠(雄性和雌性)相比, *Uox*^{-/-} 小鼠(雄性和雌性)的 SUA 水平均显著升高(图 3A, *P* < 0.001), 且均值大于 420 μmol/L; 同样与 WT 小鼠(雄性和雌性)相比, *Uox*^{-/-} 小鼠(雄性和雌性)的 UUA 水平也显著升高(图 3B,雄鼠:*P* < 0.001,雌鼠:*P* < 0.01)。

2.4 病理检测结果

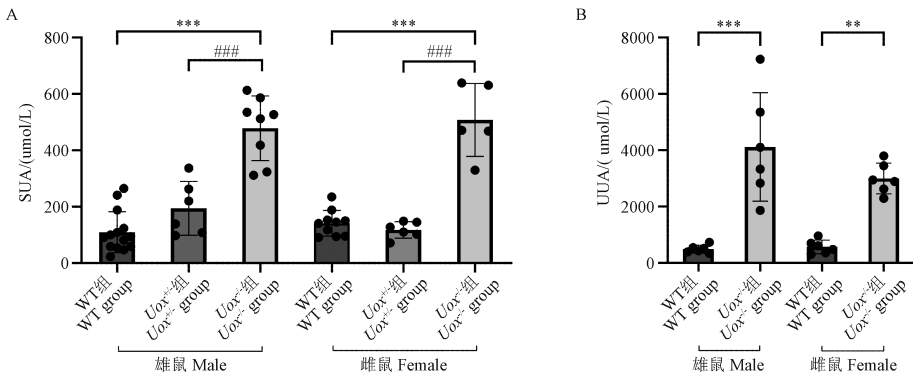
对 6 周龄小鼠的肝组织进行 HE 染色,肾组

织进行 HE 和 Masson 染色,与 WT 小鼠对比, *Uox*^{-/-} 小鼠可见肾小管中重度扩张,上皮细胞变性,管腔形状不规则,部分管腔中可见细胞碎片和蛋白管型;肾实质中肾小球分布出现异常,小球萎缩,系膜及基质增生;肾表面被膜、肾小管及周围组织出现大量纤维化;间质单核及淋巴细胞浸润(图 4A ~ 4B)。肝实质内见中等量的肝细胞变性,胞质疏松淡染;偶见粒细胞灶性浸润(图 4A)。

表 3 小鼠基因型鉴定结果及小鼠 *Uox* 基因敲除前后碱基变化

Table 3 Statistics of identification results for mouse genotype and base changes after knockout of *Uox*

代次 Generation	数量 Quantity	编号 Identification number		阳性编号 Positive mice	碱基变化(5'-3') Change of base(5'-3')
		♂	♀		
F0	8	1 ~ 2	3 ~ 8	1	ACGTCTACGTGGAAGAGGTC 前缺失 2300 bp 2300 bp deletion before ACGTCTACGTGGAAGAGGTC
				2	ATGTTTCATAGTTTTAAATT 前缺失 3050 bp,插入 17 bp 3050 bp deletion and 17 bp insertion before ATGTTTCATAGTTTTAAATT
				4	AGCAAGAGATTTACAATTTA 前缺失 2476 bp,插入 3 bp 2476 bp deletion and 3 bp insertion before AGCAAGAGATTTACAATTTA
F1 (1 ♂ × C57BL/6 ♀)	15	1# ~ 6#	7# ~ 15#	1#,2#,5#,7#, 8#,9#,10#, 11#,12#,13#	AACACAACAACAAAAAAA 前删除 2013 bp 2013 bp deletion before AACACAACAACAAAAAAA

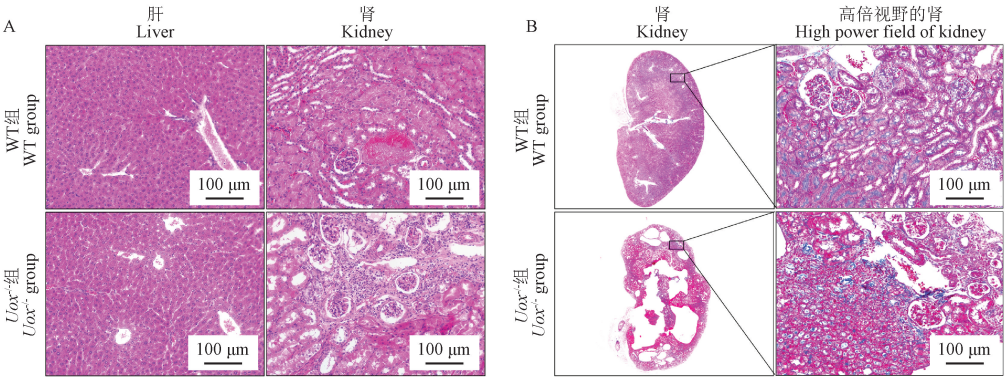


注:A:SUA 水平;B:UUA 水平;与同性别 WT 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与同性别 *Uox*^{+/-} 组相比, ### $P < 0.001$ 。(下图同)

图 3 尿酸检测结果($n = 5 \sim 12$)

Note. A. Level of SUA. B. Level of UUA. Compared with WT group of the same gender, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with *Uox*^{+/-} group of the same gender, ### $P < 0.001$. (The same in the following figure)

Figure 3 Results of uric acid($n = 5 \sim 12$)



注:A:肾和肝的 HE 染色结果;B:肾的 Masson 染色结果。

图 4 组织病理结果($n = 3$)

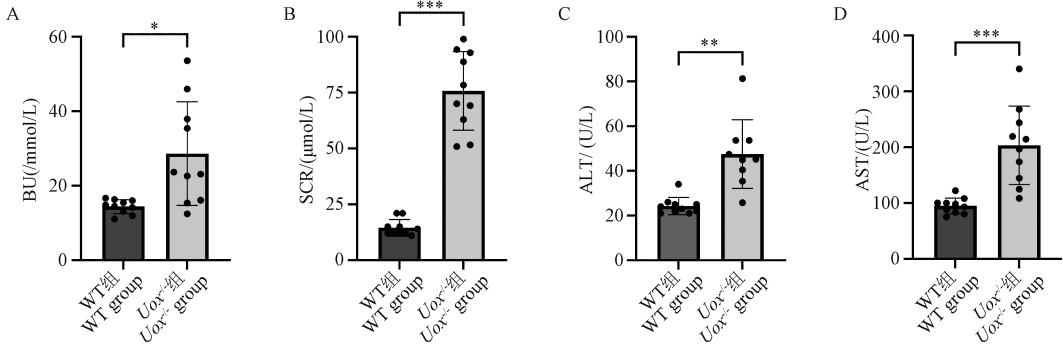
Note. A. HE staining for kidneys and livers. B. Masson staining for kidneys.

Figure 4 Results of histopathology($n = 3$)

2.5 血清生化检测结果

为了验证尿酸对肾功能的影响,测定了 5 ~ 7 周龄 WT 和 *Uox*^{-/-}小鼠的 SCR 和血清 BU 水平。检测结果显示,与 WT 小鼠相比,*Uox*^{-/-}小鼠的 SCR 和 BU 均显著升高(图 5A, *P* < 0.05;图 5B, *P*

< 0.001),表明肾小球滤过受损。同时为了检查尿酸对肝的影响,也测定了 WT 和 *Uox*^{-/-}小鼠的 ALT 和 AST 水平。检测结果显示,与 WT 小鼠相比,*Uox*^{-/-}小鼠的 ALT 和 AST 均显著升高(图 5C, *P* < 0.01;图 5D, *P* < 0.001),表明肝功能受损。



注:A:血清尿素含量;B:血清肌酐含量;C:血清丙氨酸氨基转移酶含量;D:血清门冬氨酸氨基转移酶含量。

图 5 血清生化检测结果(*n* = 9 ~ 10)

Note. A. BU content. B. SCR content. C. ALT content in serum. D. AST content in serum.

Figure 5 Results of biochemical tests for serum(*n* = 9 ~ 10)

3 讨论

UOX 是导致人与小鼠 HUA 患病率差异的最主要因素之一,敲除 *Uox* 基因不仅可以导致小鼠体内尿酸水平自发性升高,更使得小鼠与人的尿酸代谢途径一致,更有利于 HUA 以及其他相关疾病病理机制的深入研究。

本研究中,基因修饰主要包括 Cas9 mRNA 合成的 Cas9 蛋白在特定 sgRNA 的辅助下定向切割 DNA 链和 DNA 链通过 NHEJ 方式修复两大过程。NHEJ 是在不依赖于同源 DNA 序列的情况下,使用 DNA 连接酶将 DNA 双链断裂(double strand breaks,DSBs)末端直接连接的一种修复过程,在细胞修复中占较大比例。虽然这种修复方式迅速高效,但也因此牺牲了 DSBs 修复的准确性,使得本研究所获得的 3 只 F0 代敲除阳性小鼠之间存在序列差异。实验最终选择生长状态最佳的 F0-1 号雄性小鼠用于繁育后代,F0-1 的 PCR 鉴定结果显示在 > 1000 bp 位置有一深一浅两个条带,提示 F0-1 是带有两种基因型细胞的嵌合体。对 F0-1 与 WT 小鼠的后代(即 F1 代)进行 PCR 鉴定与 DNA 测序,测序结果显示,F1 代敲除阳性的 *Uox*^{+/-}小鼠,均是在 5'-AACACAACAACAAAA AAA-3' 前缺失 2013 bp,与 F0-1 上方较浅条带一

致,该缺失最终造成 Exon 2 的敲除。
对本研究中繁育获得的 WT、*Uox*^{+/-}、*Uox*^{-/-} 3 种类型小鼠的 SUA 和 UUA 进行检测,结果显示,无论对于雌鼠还是雄鼠,*Uox*^{-/-}小鼠的 SUA 水平和 UUA 水平均显著高于 *Uox*^{+/-}小鼠和 WT 小鼠,其中血清尿酸均值(雄鼠:(478.4 ± 114.6) μmol/L, *P* < 0.001;雌鼠:(507.7 ± 129.6) μmol/L, *P* < 0.001) > 420 μmol/L;尿液尿酸均值为雄鼠(4116.8 ± 1928.1) μmol/L (*P* < 0.001),雌鼠(2998.0 ± 547.7) μmol/L (*P* < 0.01)。*Uox*^{+/-}小鼠和 WT 小鼠之间并未显现出尿酸水平的差异,说明 *Uox* 基因杂合亦可满足小鼠机体的尿酸代谢需求。由于样本量有限,尿酸水平在性别之间差异并不明显,有待进一步扩大数量后再验证。SCR 和 BU 分别为含氮的有机物和蛋白质代谢的终末产物,主要从肾小球滤出,故其血清中含量可用作肾小球滤过功能的诊断和过筛指标。当肾小球滤过率下降到正常的 50%以下时,SCR 和血清中 BU 的浓度才迅速升高。本研究检测结果显示,*Uox*^{-/-}小鼠的 SCR 约是 WT 小鼠的 6 倍(*P* < 0.001),血清 BU 约是 WT 小鼠的 2 倍(*P* < 0.05),都高于正常值范围(BU:9.3 ~ 12.1 mmol/L;CREA:11 ~ 28 μmol/L)^[11-12],提示 *Uox*^{-/-}小鼠的肾小球滤过功能出现

明显受损。 $Uox^{-/-}$ 小鼠的 SUA、SCR 和血清 BU 的数值对比野生型较为离散,这很大程度是受个体动物对尿酸升高的适应能力和病理损伤程度差异等因素的影响。在组织病理检查中发现,与 WT 小鼠对比, $Uox^{-/-}$ 小鼠的肾表面被膜、肾小管及周围组织出现大量纤维化,肾间质见单核及淋巴细胞浸润,肾小管中重度扩张、变性,肾小球萎缩、肾小球膜及基质增生,这些病理特征与人肾小管间质性肾炎病理较为相似^[13]。

ALT 和 AST 是反映肝实质损害的重要指标,且 ALT 水平与肝损伤程度呈正比,当 1% 的肝细胞发生坏死时,血清 ALT 水平即可升高一倍。有文献报道,ALT 是 HUA 的独立危险因素,对 ALT 水平的监测或许可以成为 HUA 的预防手段^[14-15]。本研究的生化结果显示, $Uox^{-/-}$ 小鼠的血清 ALT 和 AST 水平相较于 WT 小鼠升高一倍左右(ALT: $P < 0.01$;AST: $P < 0.001$),且都高于正常值范围(ALT:14 ~ 38 U/L;AST:28 ~ 78 U/L)^[16-17],这与 $Uox^{-/-}$ 小鼠在肝实质中观察到肝细胞变性的病理特征相吻合。有研究表明肝损伤与高水平尿酸通过胰岛素抵抗、氧化应激、诱导炎症介质释放等途径诱导肝细胞损伤有关^[18-19],而本研究中所构建的 $Uox^{-/-}$ 小鼠是否也存在相似的致病途径有待进一步研究。

作为 HUA 及相关疾病机制研究、治疗药物开发的关键工具,HUA 模型的研发仍处于早期阶段。药物诱导模型所使用药物主要为尿酸前体(腺嘌呤)、UOX 抑制剂(氧嗪酸钾)和尿酸排泄抑制剂(果糖或乙胺丁醇)三类,虽然造模方法简单,但存在 HUA 水平维持时间短、肾损害严重的问题,即使改良后的二联用药方案,仍很难达到 HUA 患者的临床诊断水平(420 $\mu\text{mol/L}$),且抑制剂的使用与临床 HUA 发病机制存在差异^[20]。在遗传修饰的造模方法中,除 Uox 基因外, $Glut9$ 、 $Glut12$ 、 $Slc22a12$ 、 $Abcg2$ 等也被选中作为靶基因被敲除,实现了 HUA 水平的动物造模^[21-24],但由于其所敲除的基因也是药物治疗靶点,因此这种模型在降尿酸药物的研究上存在局限性。

与现有的 Uox 基因敲除的大小鼠模型相比^[25-27],本研究所构建的 $Uox^{-/-}$ 小鼠的肾小球滤过功能损伤更为严重,肾小球系膜细胞及基质增生,小球体肥大,为进一步研究 HUA 相关肾病提

供了效果明显的小鼠模型。近年来,HUA 逐渐成为继高血压、高血糖、高血脂外的第四大代谢疾病,给人类的生命健康带来诸多隐患,本研究后续将对所构建的 $Uox^{-/-}$ 小鼠做更深入的研究,旨在为 HUA 领域研究提供有价值的参考和依据。

参 考 文 献(References)

- [1] 方宁远,吕力为,吕晓希,等.中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识(2023 年版)[J].中国实用内科杂志,2023,43(6):461-480.
FANG N Y, LYU L W, LYU X X, et al. China multi-disciplinary expert consensus on diagnosis and treatment of hyperuricemia and related diseases (2023 edition) [J]. Chin J Pract Intern Med, 2023, 43(6): 461-480.
- [2] VARELDZIS R, PEREZ A, REISIN E. Hyperuricemia: an intriguing connection to metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and hypertension [J]. Curr Hypertens Rep, 2024, 26(6): 237-245.
- [3] HAN Y, HAN X, YIN Y, et al. Dose-response relationship of uric acid with fasting glucose, insulin, and insulin resistance in a united states cohort of 5, 148 non-diabetic people [J]. Front Med, 2022, 9: 905085.
- [4] LIN Z, WU S, CHEN Z, et al. Poor serum uric acid control increases risk for developing hypertension: a retrospective cohort study in China [J]. Front Endocrinol, 2024, 15: 1343998.
- [5] YANG Y, ZHANG X, JIN Z, et al. Association of serum uric acid with mortality and cardiovascular outcomes in patients with hypertension: a meta-analysis [J]. J Thromb Thrombolysis, 2021, 52(4): 1084-1093.
- [6] DU L, ZONG Y, LI H, et al. Hyperuricemia and its related diseases: mechanisms and advances in therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 212.
- [7] LI Y, SHEN Z, ZHU B, et al. Demographic, regional and temporal trends of hyperuricemia epidemics in mainland China from 2000 to 2019: a systematic review and meta-analysis [J]. Glob Health Action, 2021, 14(1): 1874652.
- [8] DHOUIBI R, AFFES H, SALEM M B, et al. Creation of an adequate animal model of hyperuricemia (acute and chronic hyperuricemia); study of its reversibility and its maintenance [J]. Life Sci, 2021, 268: 118998.
- [9] LIU Y, JARMAN J B, LOW Y S, et al. A widely distributed gene cluster compensates for uricase loss in hominids [J]. Cell, 2023, 186(16): 3400-3413.
- [10] LU J, DALBETH N, YIN H, et al. Mouse models for human hyperuricaemia: a critical review [J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(7): 413-426.
- [11] OTTO G P, RATHKOLB B, OESTEREICHER M A, et al. Clinical chemistry reference intervals for C57BL/6J,

C57BL/6N, and C3HeB/FeJ mice (mus musculus) [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(4): 375-386.

[12] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床常用生化检验项目参考区间: 第 5 部分. 血清尿素、肌酐: WS/T 404.5-2015 [S]. 2015.

National Health Commission of the People's Republic of China. Reference interval for commonly used clinical biochemical test items part 5: serum urea and creatinine: WS/T 404.5-2015 [S]. 2015.

[13] JOYCE E, GLASNER P, RANGANATHAN S, et al. Tubulointerstitial nephritis: diagnosis, treatment, and monitoring [J]. Pediatr Nephrol, 2017, 32(4): 577-587.

[14] 金钊. 体检人群高尿酸血症患病率及其与肠道菌群的相关性研究 [D]. 杭州: 浙江大学; 2020.

JIN C. Analysis of the prevalence of hyperuricemia and its correlation with gut microbiota in health cheek-up population [D] Hangzhou: Zhejiang University; 2020.

[15] CHEN S, GUO X, YU S, et al. Association between serum uric acid and elevated alanine aminotransferase in the general population [J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13(9): 841.

[16] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床常用生化检验项目参考区间: 第 1 部分. 血清丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶和 γ -谷氨酰基转移酶: WS/T 404.1-2012 [S]. 2013.

National Health Commission of the People's Republic of China. Reference interval for commonly used clinical biochemical test items part 1: serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, and γ -glutamyl transferase: WS/T 404.1-2012 [S]. 2013.

[17] 黎桂玲, 刘科, 黎雄才, 等. 不同生理阶段及性别 SPF 级 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠血液生理生化指标测定与比较 [J]. 广东农业科学, 2019, 46(12): 102-109.

LI G L, LIU K, LI X C, et al. Determination and comparison of blood physiological and biochemical indexes between SPF BALB/c mice and C57BL/6 mice in different physiological stages and genders [J]. Guangdong Agric Sci, 2019, 46(12): 102-109.

[18] XIE D, ZHAO H, LU J, et al. High uric acid induces liver fat accumulation via ROS/JNK/AP-1 signaling [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2021, 320(6): E1032-E1043.

[19] WAN X, XU C, LIN Y, et al. Uric acid regulates hepatic steatosis and insulin resistance through the NLRP3 inflammasome-dependent mechanism [J]. J Hepatol, 2016, 64(4): 925-932.

[20] 段为钢. 一种高尿酸血症大鼠模型及其构建方法: CN202010301568.2 [P]. 2020-07-17.

DUAN W G. A hyperuricemia rat model and its construction method: CN202010301568.2 [P]. 2020-07-17.

[21] PREITNER F, BONNY O, LAVERRIÈRE A, et al. Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(36): 15501-15506.

[22] AUBERSON M, STADELMANN S, STOUDEMANN C, et al. SLC2A9 (GLUT9) mediates urate reabsorption in the mouse kidney [J]. Pflugers Arch, 2018, 470(12): 1739-1751.

[23] TAKADA T, ICHIDA K, MATSUO H, et al. ABCG2 dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2014, 33(4/6): 275-281.

[24] TOYODA Y, TAKADA T, MIYATA H, et al. Identification of GLUT12/SLC2A12 as a urate transporter that regulates the blood urate level in hyperuricemia model mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(31): 18175-18177.

[25] 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.

[26] YU Y, ZHANG N, DONG X, et al. Uricase-deficient rat is generated with CRISPR/Cas9 technique [J]. PeerJ, 2020, 8: e8971.

[27] XIE D, ZHAO H, LU J, et al. High uric acid induces liver fat accumulation via ROS/JNK/AP-1 signaling [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2021, 320(6): E1032-E1043.

[收稿日期] 2024-12-05