

痛风颗粒各部位对高尿酸血症大鼠尿酸和黄嘌呤氧化酶活性的影响

徐玲玲, 刘 静, 徐 熠

上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 药剂科, 上海 200437

摘要: **目的** 通过观察痛风颗粒各部位对高尿酸血症大鼠血尿酸、尿尿酸、血黄嘌呤氧化酶活性和肝脏黄嘌呤氧化酶活性的影响, 探讨其治疗痛风的物质基础和机制。**方法** 以腺嘌呤合乙胺丁醇法诱导大鼠高尿酸血症模型, 分别用磷钨酸法和酶比色法检测尿酸和黄嘌呤氧化酶的含量。**结果** 黄酮类成分在降尿酸和抑制黄嘌呤氧化酶活性上均起主要作用; 生物碱类成分对尿中尿酸的排泄和血清黄嘌呤氧化酶活性的抑制起较重要作用, 有机酸类成分均未表现出明显作用; 全方和有效部位组合有明显的降尿酸和抑制黄嘌呤氧化酶活性的作用。**结论** 黄酮类、生物碱和有机酸类有效部位组合后的药效与处方药一致, 是该处方的有效部位群, 对高尿酸血症模型大鼠表现出的降尿酸和抑制黄嘌呤氧化酶活性的作用最为显著。

关键词: 痛风颗粒; 有效部位; 黄酮; 生物碱; 有机酸; 尿酸; 黄嘌呤氧化酶活性

中图分类号: R285.5; R286.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)04-0500-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.008

Effects of various fractions in Tongfeng Granule on uric acid and xanthine oxidase activity of hyperuricemic rats

XU Ling-ling, LIU Jing, XU Yi

Department of Pharmacy, Yueyang Hospital of Chinese Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

Abstract: Objective To discuss the material foundation and mechanism of Tongfeng Granule by observing the effects of various fractions in Tongfeng Granule on the blood uric acid (UA), urinary UA, blood xanthine oxidase (XOD) activity and liver XOD activity of hyperuricemic rats. **Methods** The hyperuricemia rat model was established by adenine and ethambutol, and the contents of UA and XOD were determined with phosphotungstic acid method and enzyme colorimetric method, respectively. **Results** The flavonoids played the leading roles in dropping UA and inhibition on XOD activity; The alkaloids in the excretion of UA urine and restraining serum SOD activity played the more important role, but organic acids had no obvious effect. Prescription and effective parts combination had obvious activity in dropping UA and inhibition on XOD activity. **Conclusion** The effective parts of orthogonal design research shows that the combination of flavonoids, organic acids, and alkaloids is the strongest to anti gout. A combination (flavonoids, alkaloids, and organic acid) shows the active role in dropping UA and inhibition of XOD in hyperuricemia model rats.

Key words: Tongfeng Granule; effective parts; flavonoids, alkaloids; organic acids, uric acid; xanthine oxidase

痛风是由于嘌呤代谢紊乱导致血尿酸水平增高和/或尿酸排泄减少而导致尿酸盐在组织沉积的疾病^[1]。近年来, 痛风的发病率呈逐年上升的趋势^[2], 且与代谢综合征、感染性疾病、糖尿病及心脑血管疾病关系密切^[3-4], 已成为威胁我国人民健康的常见病, 其生化标志是高尿酸血症。黄嘌呤氧化酶(XOD)是人体内产生尿酸过程中的关键酶, 同时也是治疗高尿酸血症的药物作用靶点^[5]。痛风颗粒

是源自上海市名老中医夏涵教授的经典方, 笔者前期对痛风颗粒的抗痛风作用进行了研究, 实验表明, 该方具有明显的抗炎、降尿酸作用, 而且起效快、作用维持时间长, 无明显不良反应^[6]。但该方作用的物质基础和机制尚不明确, 本实验通过观察痛风颗粒各部位对高尿酸血症模型大鼠中尿酸、黄嘌呤氧化酶水平的影响, 为进一步了解其作用机制提供理论依据。

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 上海市卫生局科研课题(2010013)

作者简介: 徐玲玲, 主任药师, 研究方向: 医院药学和中药制剂质量标准。Tel: (021) 65161782-2131 E-mail: xulingling53@163.com

1 材料

1.1 动物

健康 SD 大鼠 64 只, 雄性, 清洁级, 由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物中心提供。实验动物饲养许可证号: SYXK(沪)2011-0109。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[7]。

1.2 药物和试剂

痛风颗粒全方、由全方提取分离得到的黄酮类、生物碱、有机酸类有效部位及其组合由上海诗丹德生物技术有限公司提供, 质量分数均大于 50%^[8], 批号 120626, 其中总黄酮以芦丁为对照品溶液, 采用紫外分光光度法在 513 nm 波长处测得质量分数为 54.9%; 总生物碱以苦参碱为对照品溶液, 采用紫外分光光度法在 420 nm 波长处测得质量分数为 52.2%; 总有机酸以绿原酸为对照品, 采用高效液相色谱法, 以乙腈-1%冰醋酸为流动相, 测得质量分数为 58.6%。有效部位组合按照 25:2:10 组成。

苯溴马隆(立加利仙), 德国赫曼大药厂, 批号 1100799; 腺嘌呤, 美国 Sigma 公司, 批号 W20110620; 盐酸乙胺丁醇, 上海信谊药厂有限公司, 批号 120605。临用前以蒸馏水配成所需浓度。

1.3 仪器及试剂盒

Alpha-150p 紫外可见分光光度计(上海谱元仪器有限公司); PR0200 Bio-Gen Series 匀浆机(PRO Scientific inc); TGL-16M 离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); LeicaHI1210 恒温水浴锅; BS124S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

黄嘌呤氧化酶(XOD)试剂盒, 批号 20120816; 尿酸(UA)试剂盒, 批号 20120724; 考马斯亮兰(Coomassie blue)试剂盒, 批号 20120808; 均购自南京建成生物工程有限公司。

2 方法

2.1 动物造模

将雄性 SD 大鼠 64 只适应性饲养 3 d 后, 随机分为对照、模型、全方、阳性、黄酮类、生物碱、有机酸类有效部位及其组合共 8 组, 每组 8 只。除对照外各组以腺嘌呤合盐酸乙胺丁醇混悬液(以腺嘌呤 100 mg/kg、盐酸乙胺丁醇 250 mg/kg 溶于蒸馏水中, 配制成腺嘌呤、盐酸乙胺丁醇质量浓度分别为 1%、2.5%的混悬液)诱导大鼠高尿酸血症动物模型^[9], 对照组不予处理。

2.2 实验操作

64 只大鼠正常饲养 3 d 后, 于造模前 5 d, 除对照组及模型组给等量蒸馏水, 其他各组开始 ig 给药, 1 次/d。第 6 天开始上午 ig 给药, 下午造模, 连续 10 d, 第 9 天将各组大鼠留尿 3 h, 新鲜尿样以 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。并于第 10 天造模前 0.5 h 给药 1 次。各组按上述造模方法造模 0.5 h 后, 大鼠腹主动脉取血, 2 500 r/min 离心 10 min, 取血清。同一方向切取肝脏, 匀浆取上清液。

2.3 指标检测

分别测定大鼠血尿酸、尿酸、血黄嘌呤氧化酶活性和肝脏黄嘌呤氧化酶活性(考马斯亮兰试剂盒先进行蛋白定量)。采用磷钨酸法分别检测各组大鼠尿酸, 酶比色法检测黄嘌呤氧化酶。具体操作按试剂盒说明书进行。

2.4 统计学处理

采用 SPSS for Windows 16.0 统计软件进行分析, 所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间资料比较 One-Way ANOVA 方差分析进行检验。

3 结果

3.1 对高尿酸血症模型大鼠血尿酸的影响

与对照组相比, 模型组差异具有显著性 ($P < 0.01$), 说明造模成功。与模型组比较, 全方组、苯溴马隆阳性组、有效部位组合和黄酮类组差异均具有显著性 ($P < 0.01$), 说明痛风颗粒、苯溴马隆、有效部位组合和黄酮类能不同程度地降低高尿酸血症大鼠的血尿酸水平, 以苯溴马隆和有效部位组合最为显著, 结果见表 1。

表 1 痛风颗粒各部位对高尿酸血症大鼠尿酸影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 1 Effects of various fractions in Tongfeng Granule on blood uric acid in hyperuricemic rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	血尿酸/ (mg·L ⁻¹)	尿酸/ (mg·L ⁻¹)
对照		40.68±7.37**	130.95±19.09**
模型		77.86±2.81 ^{△△}	168.90±49.31 ^{△△}
全方	6.88	43.91±7.92**	233.63±71.94** ^{△△}
阳性	0.005 25	41.49±6.57**	235.86±28.49** ^{△△}
组合	6.88	42.56±3.78**	234.38±19.53** ^{△△}
黄酮	6.88	46.01±6.87**	213.17±12.72** ^{△△}
生物碱	6.88	73.76±3.75 ^{△△}	192.34±35.14 ^{△△}
有机酸	6.88	72.52±1.64 ^{△△}	179.32±35.38 [△]

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs blank group

3.2 对高尿酸血症模型大鼠尿酸的影响

与模型组相比，全方组、苯溴马隆组和有效部位组合组尿酸排泄明显大于模型组，差异具有显著性 ($P < 0.01$)。黄酮类组排泄量大于模型组，差异具有一定的显著性 ($P < 0.05$)，说明全方组、苯溴马隆组、有效部位组合和黄酮类组均能不同程度地增高高尿酸血症模型大鼠体内尿酸的排泄，从而达到降尿酸作用，结果见表 1。

3.3 对高尿酸血症模型大鼠血黄嘌呤氧化酶活性的影响

与对照组相比，模型组差异具有显著性 ($P < 0.01$)，说明造模成功。全方组和有效部位组合组与模型组相比差异具有显著性 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)，全方组和有效部位组合组能不同程度地抑制黄嘌呤氧化酶的活性，见表 2。

3.4 对高尿酸血症模型大鼠肝脏黄嘌呤氧化酶活性的影响

与对照组相比，模型组差异具有显著性 ($P < 0.01$)，说明造模成功。全方组、有效部位组合和黄酮类组肝脏黄嘌呤氧化酶活性明显低于模型组，差异具有显著性 ($P < 0.01$)。生物碱和有机酸类组肝脏黄嘌呤氧化酶活性低于模型组，差异具有显著性 ($P < 0.05$)，说明全方组、黄酮类、生物碱、有机酸类成分及其组合组均能不同程度地降低高尿酸血症模型大鼠肝脏内黄嘌呤氧化酶的活性，降低尿酸的合成，从而达到一定的降尿酸作用，见表 2。

表 2 痛风颗粒各部位对高尿酸血症大鼠黄嘌呤氧化酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effects of various fractions in Tongfeng Granule on XOD activity in hyperuricemic rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	血黄嘌呤氧化 酶/(mg·L ⁻¹)	肝脏黄嘌呤氧化 酶/(mg·L ⁻¹)
对照		41.52 ± 3.26**	19.90 ± 2.64**
模型		51.63 ± 8.40 ^{△△}	27.82 ± 2.64 ^{△△}
全方	6.88	42.09 ± 5.52**	21.89 ± 2.00**
阳性	0.005 25	50.50 ± 2.08 [△]	25.29 ± 3.30 ^{△△}
组合	6.88	43.76 ± 4.99*	21.56 ± 2.28**
黄酮	6.88	46.69 ± 7.46	25.69 ± 1.99** ^{△△}
生物碱	6.88	47.80 ± 9.28	25.36 ± 2.99* ^{△△}
有机酸	6.88	48.39 ± 8.94 [△]	26.14 ± 2.17* ^{△△}

与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与对照组比较：[△] $P < 0.05$
^{△△} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs blank group

4 讨论

中医文献中并无高尿酸血症记载，中医学中把痛风归属于“痹症”、“风湿痹症”范畴^[10]。高尿酸血症往往伴随高血脂血症、脂肪肝、糖尿病等代谢性疾病，因此所表现出来的中医证型主要是湿热蕴结，久而瘀血阻滞^[11]。中医在临床上主要采用清热利湿、伸筋活络的治疗方法。本方正是结合该观点采用茵陈和连钱草清热利湿，加之伸筋草的通路作用，在临床上治疗达到显著的疗效。目前高尿酸血症动物模型包括 3 种：促进尿酸生成，如腺嘌呤、黄嘌呤、尿酸、酵母等；抑制尿酸排泄，如吡嗪酰胺、乙胺丁醇等；抑制尿酸分解，如尿酸酶抑制剂（氧嗪酸钾）、基因敲除法获得尿酸酶缺乏的动物模型^[12]。由于大鼠体内存在正常水平尿酸酶，血尿酸较低，而人类在进化过程中，编码尿酸酶的基因发生突变，缺乏尿酸酶^[13]。因此在大鼠体内构建一个类似尿酸酶缺乏的机体内环境成为了高尿酸血症模型方向一直探讨的问题。直接注射尿酸的模型，由于模型维持时间较短 (<4 h)，不符合一些指标、病变的观察。将药物添加到饲料中的给药方式虽然比较方便，但难以准确掌握给药量，也造成药物的大量浪费。基因敲除的方法制备的模型具有稳定的特性，但同时由于技术要求较高，价格昂贵难以全面推广，而且动物的存活期不足 4 周，不便于用在实验研究。综合和考虑以上因素，本实验采用腺嘌呤合盐酸乙胺丁醇灌胃的方法，模拟相对稳定的高尿酸血症模型。

本实验通过观察全方以及各有效部位不同组合的降尿酸、抑制黄嘌呤氧化酶活性的综合作用，寻找全方降尿酸作用的物质基础及可能的作用机制。结果表明，全方有明显的降尿酸和抑制黄嘌呤氧化酶活性的作用 ($P < 0.01$)；黄酮、有机酸、生物碱有效部位组合有抑制黄嘌呤氧化酶活性和降尿酸的作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。全方组、苯溴马隆组和有效部位组合组大鼠通过尿量的增加而增加了总尿酸的排出，提示作用机制可能是促进高尿酸血症大鼠尿酸排泄的作用。但血和肝脏黄嘌呤氧化酶活性测定结果表明苯溴马隆组与模型组比较差异无有统计学意义，实验结果中黄酮、有机酸、生物碱有效部位组能降低大鼠肝脏黄嘌呤氧化酶的活性，但不能降低血中酶的活性，这可能与各部位群作用的组织选择性有关，值得后期进一步探讨。目前研究表明苯溴马隆主要是通过抑制近端肾小管对尿酸的重

吸收而促进尿酸排泄，尚无足够证据证明其具有抑制 XOD 活性的作用。本实验结果表明黄酮有效部位组具有显著的降尿酸和抑制黄嘌呤氧化酶活性作用，其作用明显强于生物碱和有机酸，值得后期进一步探讨。全方组和有效部位组合组具有显著地抑制黄嘌呤氧化酶活性的作用 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。说明全方和有效部位组合组降尿酸机制不同于苯溴马隆，可能通过抑制黄嘌呤氧化酶活性达到降尿酸效果。3 个有效部位各自的降尿酸和抑制黄嘌呤氧化酶活性均较全方的药效弱，而配伍后的药效与全方一致。这体现了复方配伍药效物质基础的综合性和整体性。

理想的抗痛风药物，除了需要具有降尿酸作用，还要针对痛风发作症状，具有抗炎和镇痛等综合作用^[14]，因此本实验为进一步寻找痛风颗粒抗痛风作用的有效成分研究提供了方向，并为临床研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 潘善余. 痛风的病因病机及治疗浅探 [J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(3): 12.
- [2] 朱 君, 余军文. 高尿酸血症和痛风的流行病学及其危险因素的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2001, 8(1): 191-195.
- [3] Iseki K, Ikemiya Y, Inoue T, *et al.* Significance of hyperuricemia as a risk factor for developing ESRD in a screened cohort [J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 44(4): 642-650.
- [4] Sundström J, Sullivan L, D'Agostino R B, *et al.* Relations of serum uric acid to longitudinal blood pressure tracking and hypertension incidence [J]. *Hypertension*, 2005, 45(1): 28-33.
- [5] 黄 海, 高展翔, 王红妹, 等. 加味茵陈五苓散对高尿酸血症大鼠黄嘌呤氧化酶活性的调节作用 [J]. 福建中医学院学报, 2010, 20(4): 33-35.
- [6] 徐 熠, 徐玲玲, 年 华. 痛风颗粒抗炎降尿酸作用的实验研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2011, 11(1): 52-54.
- [7] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [S]. 2006.
- [8] 刘 静, 徐玲玲, 徐 熠, 等. 痛风颗粒各部位群中总黄酮和绿原酸的含量测定 [J]. 中国药师, 2013, 16(2): 218-220.
- [9] 熊湘明, 曲竹秋. 大鼠高尿酸血症模型建立 [J]. 天津中医学院学报, 2001, 20(4): 28-29.
- [10] 毛黎明, 朱彩凤. 慢性痛风性肾病中医辨治 [J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(6): 38-39.
- [11] 丁林宝, 晏 飞, 张玉萍. 中医药治疗社区高尿酸血症患者 100 例临床观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(7): 565-566.
- [12] 刘 静, 徐玲玲. 常用痛风模型的作用机制及评价 [J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1193-1194.
- [13] Wu X W, Muzny D M, Lee C C, *et al.* Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution [J]. *J Mol Evol*, 1992, 34(1): 78-84.
- [14] 时 乐, 徐 立, 尹 莲. 加味四妙丸抗痛风作用有效部位群的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(6): 386-387.