

· 药理与临床 ·

二妙丸水提取物对高尿酸血症小鼠尿酸失衡及其相关基因和蛋白水平的影响

吕耀中¹, 胡庆华¹, 王 星¹, 欧阳臻², 孔令东^{1*}

(1. 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要:目的 研究二妙丸水提取物对高尿酸血症小鼠尿酸失衡及其相关基因和蛋白水平的影响。方法 用氧嗪酸钾盐诱导小鼠以建立高尿酸血症模型。二妙丸 (3.9、7.8 g/kg)、黄柏 (1.95、3.9 g/kg) 和苍术 (1.95、3.9 g/kg) 各水提取物分别连续 ig 给予小鼠 1 周, 末次给药 1 h 后, 分别测定小鼠血清、肝脏和尿液中尿酸水平, 测定血肌酐 (SCr) 和尿肌酐 (UCr) 水平及肝脏黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活性; 采用 RT-PCR 方法测定小鼠肝脏 XOD 和肾脏尿酸盐重吸收转运子 mURAT1 mRNA 表达水平; 利用 Western Blotting 方法测定小鼠肝脏 XOD 和肾脏 mURAT1 蛋白水平。结果 与模型组比较, 二妙丸水提取物低、高剂量和黄柏水提取物高剂量均显著降低血清和肝脏尿酸水平, 及 SCr 水平, 增加尿液中尿酸水平和 UCr 水平。二妙丸和黄柏水提取物 2 个剂量均显著抑制肝脏 XOD 活性, 下调 XOD mRNA 和蛋白表达, 降低肾脏 mURAT1 mRNA 和蛋白表达水平。而苍术水提取物 2 个剂量对上述指标均无显著影响。结论 二妙丸水提取物具有抑制高尿酸血症小鼠尿酸生成和促进尿酸排泄的双重调节作用, 以降低血清尿酸水平, 其机制可能与抑制 XOD 与 mURAT1 mRNA 和蛋白表达水平有关。

关键词:二妙丸水提取物; 高尿酸血症; 黄嘌呤氧化酶; 尿酸盐重吸收转运子

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)03-0418-06

Effects of Ermiao Pill water extracts on imbalance of urate levels and its related genes and protein levels in hyperuricemic mice

LÜ Yao-zhong¹, HU Qing-hua¹, WANG Xing¹, OU YANG Zhen², KONG Ling-dong¹

(1. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2. College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract : Objective To investigate the effects of Ermiao Pill water extracts on imbalance of urate levels and its related genes and protein levels in hyperuricemic mice. **Methods** A mouse model of hyperuricemia was established by oxygen hydrochloride acid potassium salt. The water extracts of Ermiao Pill (3.9 and 7.8 g/kg), *Cortex Phellodendri Chinensis* (1.95 and 3.9 g/kg), and *Rhizoma Atractylodis* (1.95 and 3.9 g/kg) were ig administered in a volume of 15 mL/kg once daily to the different groups of animals continuously for one week, respectively. One hour after the final treatment, the urate levels in serum, urinary, and liver, as well as the creatinine levels in serum and urinary, and the hepatic xanthine oxidase (XOD) activity were measured. Expressions of hepatic XOD mRNA and renal mURAT1 mRNA were analyzed by semi-quantitative RT-PCR method and their protein levels were assayed by Western blotting method. **Results** Compared to vehicle-model group, Ermiao Pill water extracts at two doses and *Cortex Phellodendri Chinensis* at high dose significantly reduced serum uric acid, liver uric acid, and serum creatinine levels, elevated urinary uric acid, and creatinine levels. In addition, The water extracts of Ermiao Pill and *Cortex Phellodendri Chinensis* at two doses remarkably inhibited hepatic XOD activity, down-regulated its mRNA and protein levels, and suppressed mRNA and protein levels of renal mURAT1. However, *Rhizoma Atractylodis* at two doses had no significant effects in the present study. **Conclusion** Ermiao Pill water extracts process bidirectional actions of inhibiting the production of hepatic uric acid and promoting the excretion of urinary uric acid, resulting in serum urate reduction in hyperuricemic mice. The mechanisms might be involved in down-regulation of mRNA and protein levels of hepatic XOD and renal mURAT1.

Key words: Ermiao Pill water extracts; hyperuricemia; xanthine oxidase (XOD), mURAT1

收稿日期: 2009-06-22

基金项目: 教育部 2006 年新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-06-0442)

作者简介: 吕耀中 (1983—), 男, 山西省长治市人, 南京大学生命科学院 2005 级研究生, 主要从事中药抗痛风作用的研究。

Tel: 13913897763 E-mail: zhong12921@sohu.com

痛风是一组嘌呤代谢紊乱的慢性终身罹患性疾病,其高发率、复发率和危害性日趋严重。现代医学将痛风归属于中医“历节痛”、“黄汗”、“痛风”、“白虎历节”或“脚气病”等范畴。湿毒内生是本病主要病机,在痛风发病过程中湿热瘀浊是贯穿始终的中医症候。清热燥湿是中医治疗痛风主要治则之一,其代表方二妙散/丸始载于《丹溪心法》,由黄柏、苍术两味中药组成,在中医临床上常用二妙丸为基本方治疗高尿酸血症和痛风,取得了良好效果^[1,2],该方一直被《中国药典》收载。高尿酸血症是痛风主要病理特征,尿酸生成增多或排泄减少均可导致血清尿酸水平的升高,实验研究表明二妙丸系列类方具有显著的免疫增强、抗炎、镇痛、降尿酸等作用^[3]。本课题组在氧嗪酸钾盐所致高尿酸血症小鼠模型上证实了二妙丸和黄柏水提取物具有降血清尿酸作用,其作用与肝脏尿酸合成酶黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)活性抑制有一定相关性,但还可能存在其他降尿酸的途径^[4]。二妙丸水提取物干预高尿酸血症尿酸失衡作用机制尚需进一步探索。本实验基于前期工作,在评价二妙丸水提取物对高尿酸血症小鼠血清、肝脏和尿中尿酸水平、肾功能等影响基础上,重点研究其对肝脏 XOD 和肾脏尿酸盐重吸收转运子 mURAT1 的 mRNA 和蛋白表达的影响,为其治疗高尿酸血症和痛风提供依据。

1 材料

1.1 动物:昆明种小鼠,雄性,体质量 25~30 g,购自河南省实验动物中心,生产许可证号:SCXK(豫)2005-0001。实验前适应环境 1 周,自由饮水、进食,每日 12 h 照明,室温(25±2)。

1.2 主要试剂和仪器:黄柏(生)产地四川,由安徽协和成药业饮片有限公司生产,批号 080722;苍术(炒)产地江苏,由安徽协和成药业饮片有限公司生产,批号 080212;药材均经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定。氧嗪酸钾盐和别嘌呤醇均购自 SIGMA-ALDRICH 公司;肌酐(Cr)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所,批号 20080918。其他试剂为国产分析纯。XHF—高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司);3K15 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);T6 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司);Chemi Doc XRS 化学发光成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

样品提取液制备 取二妙丸组方中黄柏与苍术

各 125 g,加 10 倍量水煎煮 2 次,每次 60 min,合并滤液浓缩至 480.8 mL,含生药量 0.52 g/mL(HPLC 法测定,含盐酸小檗碱 10 mg/kg、苍术素 0.76 μg/g),冷藏备用。另取黄柏、苍术各 125 g,分别加 10 倍量水,煎煮 2 次,每次 60 min,合并滤液浓缩至 480.8 mL,含生药量为 0.26 g/mL,冷藏备用。二妙丸、黄柏、苍术的给药剂量均按生药量计算。

2.2 实验分组及给药:昆明种雄性小鼠 72 只,随机分为 9 组,即对照组,模型组,二妙丸水提取物低、高剂量(3.9、7.8 g/kg)组,黄柏水提取物低、高剂量(1.95、3.9 g/kg)组,苍术水提取物低、高剂量(1.95、3.9 g/kg)组,别嘌呤醇(5.0 mg/kg)组,每组 8 只。二妙丸、黄柏、苍术、别嘌呤醇各剂量组分别 ig 给药,给药容积为 15 mL/kg,对照组和模型组 ig 给予等量生理盐水。每天上午给药 1 次,连续给药 7 d。

2.3 动物造模:采用氧嗪酸钾盐法诱导小鼠产生高尿酸血症,每天在给药前 1 h,除对照组 ig 给予等量生理盐水外,其余各组分别 ig 给予氧嗪酸钾溶液(250 mg/kg),给药容积为 15 mL/kg。

2.4 实验取材:在末次给药后 1 h,小鼠眼球后静脉丛取血(取血前 12 h 禁食,不禁水),离心取血清,置于 4℃ 保存。断颈处死动物后,于冰台快速分取肝脏、肾脏等组织,液氮冷冻后置于 -70℃ 条件下保存。

2.5 尿酸水平测定

2.5.1 小鼠血清尿酸测定:按文献方法^[4],采用磷钨酸还原法测定血清中尿酸水平。

2.5.2 小鼠肝脏中尿酸水平测定:小鼠肝脏组织加 10 倍量 50 mmol/L、pH 7.4 预冷的磷酸钾盐酸缓冲液,匀浆,在 4℃、12 000 ×g 条件下冷冻离心 40 min。弃去上层脂质及沉淀,吸取中层清液,采用磷钨酸还原法^[4]测定尿酸水平。

2.5.3 尿液中尿酸水平测定:同血清尿酸测定方法,以 100 μL 稀释尿液代替血清加入反应体系。

2.6 血清肌酐(SCr)和尿液肌酐(UCr)测定:按试剂盒说明书进行测定。

2.7 肝脏 XOD 活性测定:按文献方法^[4],采用比色法测定。

2.8 RT-PCR 法测定 XOD 和 mURAT1 mRNA 表达:小鼠组织(肝脏或肾脏)0.1 g 加入 1 mL Trizol Reagent(Invitrogen),按照试剂盒说明书提取总 RNA。取总 RNA 1 μL,加 DEPC 水稀释后,在 260、280 nm 下测定吸光度(A)值,以 A₂₆₀/A₂₈₀ 值确定其纯度。利用琼脂糖凝胶电泳方法鉴

定,在紫外灯下观察总 RNA 完整性。

取 1 μL 总 RNA,按照 Promega 试剂盒说明书上操作步骤进行反转录,合成 cDNA。分别根据基因库中 XOD、mURAT1 和 GAPDH mRNA 的核苷酸序列 (NM_017154, NM_009203 和 NM_008084),用 Primer premier 5.0 软件设计引物,并由南京生兴生物工程技术有限公司合成。引物序列分别为 XOD (5'-TGA GGCCGGTGTGATGATGT-3'; 5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'), mURAT1 (5'-GCTACCA GAA TCGGCA-CGCT-3'; 5'-CACCGGAA GTCCACAATCC-3') 和 GAPDH (5'-GAGAA GATTTGACACCAC-3'; 5'-CATCACAATGCCAGTGGTAC-3')。PCR 反应体系总体积为 25 μL 。XOD 扩增条件为 94 预变性 2 min;94 变性 30 s、58 退火 30 s、72 延伸 45 s,共 30 个循环;72 延伸 10 min。mURAT1 扩增条件为 94 预变性 2 min;94 变性 30 s、58 退火 35 s、72 延伸 45 s,共 35 个循环;72 延伸 10 min。GAPDH 扩增条件为 94 预变性 2 min;94 变性 30 s、58 退火 35 s、72 延伸 45 s,共 35 个循环;72 延伸 10 min。PCR 扩增产物 -20 保存。

各取 PCR 产物 8 μL ,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色后,在凝胶影像分析仪 (Bio-Rad Chemi Doc XRS) 上进行成像,并对条带进行吸光度分析。计算待测基因与 GAPDH 的比值,从而得到待测基因的相对表达值。

2.9 Western Blotting 法测定 XOD 和 mURAT1 蛋白表达:小鼠肝脏在 10 倍量的 10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA 和 250 mmol/L sucrose 裂解液 (pH 7.4,含有 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin 和 0.1 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluoride) 中匀浆。匀浆液在 3 000 $\times g$ 、4 条件下离心 15 min。取上清,12 000 $\times g$ 、4 条件下离心 20 min,获得上清液,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

小鼠肾脏在 10 倍量的 buffer 1 (300 mmol/L D-甘露醇、5 mmol/L EGTA、pH 7.4 10 mmol/L HEPES-Tris) 中匀浆,在匀浆液中加入 120 mmol/L MgCl_2 至终浓度为 12 mmol/L,静置 20 min,在 2 400 $\times g$ 、4 条件下离心 15 min,其上清液在 30 000 $\times g$ 、4 条件下离心 30 min。取沉淀用 buffer 2 (150 mmol/L D-甘露醇、2.5 mmol/L EGTA、5 mmol/L pH 7.4 HEPES-Tris) 悬浮,加入至终浓度 静置

min 后,在 2 400 $\times g$ 、4 条件下离心 15 min,取上清液在 30 000 $\times g$ 、4 条件下离心 30 min,所得沉淀用裂解液溶解,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

上述所提取的蛋白分别经 12% SDS-PAGE 胶电泳分离后,在 300 mA 条件下转移 2 h,将蛋白转移到 PVDF 膜上,并在 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后分别用 XOD (1 1 000)、mURAT1 (1 500) 一抗及其对应的内参 GAPDH (1 5 000) 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (1 1 000) 在 4 条件下孵育过夜。PVDF 膜经 0.5% PBS-T 溶液洗膜 3 次,每次 5 min。PVDF 膜再与 HRP 标记的二抗 (1 4 000) 进行反应,室温摇床轻摇 1 h 后再用 0.5% PBS-T 溶液洗膜 3 次,每次 5 min。在膜上加入显色液 Lumi GLO (Cell Signaling, Beverly, MA) 2 mL,室温 1 min,曝光于 X 光胶片上 (Kodak, New Haven, CT)。

2.10 数据处理及统计:所有实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 进行单因素方差分析,两组均数间差异采用 t 检验。同时采用 Bonferroni alpha 修正方法防止假阳性结果。

3 结果

3.1 对小鼠血清、肝脏和尿液中尿酸水平的影响:与对照组比较,模型组血清和肝脏中尿酸水平显著升高 ($P < 0.001$),而尿液中尿酸水平显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组比较,二妙丸和黄柏水提取物 2 个剂量组、阳性对照组均显著降低血清和肝脏中尿酸水平 ($P < 0.001, 0.01, 0.05$),增强尿液中尿酸水平 ($P < 0.01, 0.001$)。而苍术水提取物 2 个剂量组对各尿酸水平均无显著影响 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

3.2 对小鼠血肌酐 (SCr)、尿肌酐 (UCr) 水平的影响:与对照组比较,模型组 SCr 水平升高 ($P < 0.001$),而 UCr 水平降低 ($P < 0.001$)。与模型组比较,二妙丸和黄柏水提取物 2 个剂量组、阳性对照组均显著降低 SCr 水平 ($P < 0.01, 0.001$),除黄柏水提取物低剂量组外,其他各组均增加 UCr ($P < 0.01$),有一定的量效关系。而苍术水提取物 2 个剂量组对 SCr 和 UCr 水平均无显著影响 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

3.3 对小鼠肝脏 XOD 活性、XOD mRNA 和蛋白表达的影响:与对照组比较,模型组肝脏 XOD 活性及 XOD mRNA 和蛋白表达均提高 ($P < 0.001$)。与模型组比较,二妙丸和黄柏水提取物 2 个剂量组、阳性对照组均显著抑制 活性 ($< 0.001, 0.01$ 、

表 1 二妙丸、黄柏、苍术水提取物对高尿酸血症小鼠生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of water extracts of Ermiao Pill, Cortex Phellodendri Chinensis and Rhizoma Atractylodis on biochemical indexes in hyperuricemic mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

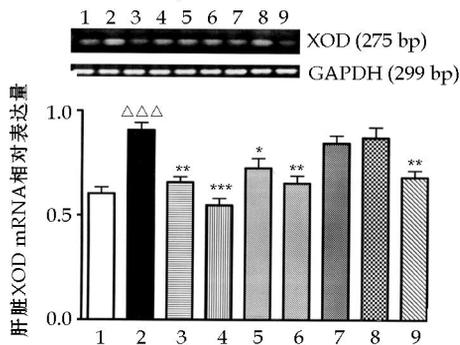
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血清尿酸/(mg·L ⁻¹)	尿液尿酸/(mg·mL ⁻¹)	肝脏尿酸/(mg·g ⁻¹)	SCr/(mg·L ⁻¹)	UCr/(mg·mL ⁻¹)	肝 XOD/(nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)
对照	-	36.2 ± 1.3	0.609 ± 0.019	0.358 ± 0.006	8.8 ± 0.1	1.041 ± 0.064	3.07 ± 0.14
模型	-	48.1 ± 1.4	0.407 ± 0.018	0.409 ± 0.006	10.4 ± 0.3	0.669 ± 0.059	4.64 ± 0.08
二妙丸	3.90	42.1 ± 0.9**	0.728 ± 0.079**	0.369 ± 0.007***	8.7 ± 0.4**	1.013 ± 0.090**	3.77 ± 0.21**
	7.80	39.9 ± 1.2***	0.795 ± 0.066***	0.340 ± 0.008***	8.2 ± 0.3***	1.106 ± 0.069***	3.36 ± 0.19***
黄柏	1.95	43.6 ± 1.1*	0.592 ± 0.041**	0.368 ± 0.013*	9.1 ± 0.3**	0.817 ± 0.087	3.82 ± 0.28*
	3.90	41.6 ± 0.6***	0.709 ± 0.058***	0.351 ± 0.017**	8.4 ± 0.3***	1.034 ± 0.033***	3.38 ± 0.23***
苍术	1.95	45.5 ± 1.8	0.403 ± 0.035	0.384 ± 0.011	9.7 ± 0.4	0.637 ± 0.058	4.37 ± 0.24
	3.90	44.3 ± 2.3	0.458 ± 0.050	0.389 ± 0.013	10.4 ± 0.7	0.796 ± 0.101	4.43 ± 0.22
别嘌醇	0.005	32.1 ± 1.1***	0.646 ± 0.072**	0.317 ± 0.012***	8.4 ± 0.3***	0.904 ± 0.069	1.89 ± 0.20***

与对照组比较: P < 0.001; 与模型组比较: *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001

P < 0.001 vs control group; *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 vs model group

0.05), 下调 XOD mRNA 表达 (P < 0.001, 0.01, 0.05), 二妙丸和黄柏水提取物高剂量组、阳性对照组降低 XOD 蛋白表达水平 (P < 0.05, 0.01), 而苍术水提取物 2 个剂量组对肝脏 XOD 活性及其表达均无显著影响 (P > 0.05)。结果见表 1、图 1 和图 2。

3.4 对小鼠肾脏 mURAT1 mRNA 和蛋白表达的影响: 与对照组比较, 模型组肾脏 mURAT1 mRNA 和蛋白表达均提高 (P < 0.001)。与模型组比较, 二

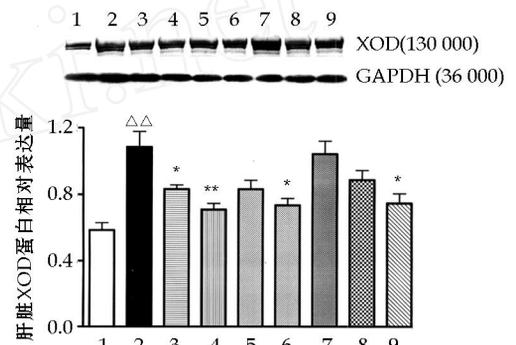


1-对照组 2-模型组 3,4-二妙丸水提取物 (3.90, 7.80 g·kg⁻¹) 组 5,6-黄柏水提取物 (1.95, 3.90 g·kg⁻¹) 组 7,8-苍术水提取物 (1.95, 3.90 g·kg⁻¹) 组 9-别嘌醇 (5 mg·kg⁻¹) 组
1-control group 2-model group 3, 4-Ermiao Pill water extracts (3.90 and 7.80 g·kg⁻¹) group 5, 6-Cortex Phellodendri Chinensis water extracts (1.95 and 3.90 g·kg⁻¹) group 7, 8-Rhizoma Atractylodis (1.95 and 3.90 g·kg⁻¹) group 9-allopurinol (5 mg·kg⁻¹) group

与对照组比较: P < 0.001
与模型组比较: *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001
P < 0.001 vs control group
*P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 vs model group

图 1 二妙丸、黄柏、苍术水提取物对高尿酸血症小鼠肝脏 XOD mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 1 Effects of water extracts of Ermiao Pill, Cortex Phellodendri Chinensis, and Rhizoma Atractylodis on hepatic XOD mRNA expression



1-对照组 2-模型组 3,4-二妙丸水提取物 (3.90, 7.80 g·kg⁻¹) 组 5,6-黄柏水提取物 (1.95, 3.90 g·kg⁻¹) 组 7,8-苍术水提取物 (1.95, 3.90 g·kg⁻¹) 组 9-别嘌醇 (5 mg·kg⁻¹) 组
1-control group 2-model group 3, 4-Ermiao Pill water extracts (3.90 and 7.80 g·kg⁻¹) group 5, 6-Cortex Phellodendri Chinensis water extracts (1.95 and 3.90 g·kg⁻¹) group 7, 8-Rhizoma Atractylodis water extracts (1.95 and 3.90 g·kg⁻¹) group 9-allopurinol (5 mg·kg⁻¹) group

与对照组比较: P < 0.01
与模型组比较: *P < 0.05 **P < 0.01

P < 0.01 vs control group
*P < 0.05 **P < 0.01 vs model group

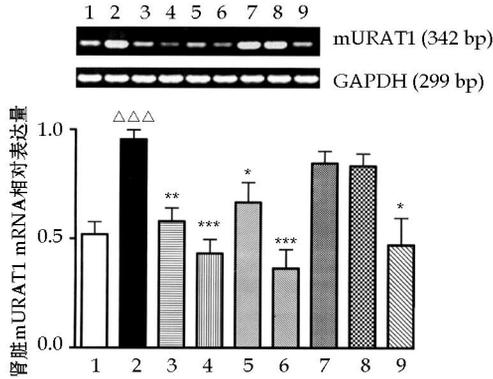
图 2 二妙丸、黄柏、苍术水提取物对高尿酸血症小鼠肝脏 XOD 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 2 Effects of water extracts of Ermiao Pill, Cortex Phellodendri Chinensis, and Rhizoma Atractylodis on hepatic XOD protein levels in hyperuricemic mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

妙丸和黄柏水提取物 2 个剂量组、阳性对照组均显著抑制 mURAT1 mRNA 高表达 (P < 0.001, 0.01, 0.05) 和 mURAT1 蛋白表达, 而苍术水提取物 2 个剂量组对肾脏 mURAT1 表达均无显著影响 (P > 0.05)。结果见图 3 和 4。

4 讨论

随着人们高蛋白、高嘌呤饮食的增加, 高尿酸血



1-对照组 2-模型组 3、4-二妙丸水提取物 (3.90、7.80 g · kg⁻¹) 组 5、6-黄柏水提取物 (1.95、3.90 g · kg⁻¹) 组 7、8-苍术水提取物 (1.95、3.90 g · kg⁻¹) 组 9-别嘌醇 (5 mg · kg⁻¹) 组

1-control group 2-model group 3, 4-Ermiao Pill water extracts (3.90 and 7.80 g · kg⁻¹) group 5, 6-Cortex Phellodendri Chinensis (1.95 and 3.90 g · kg⁻¹) group 7, 8-Rhizoma Atractylodis water extracts (1.95 and 3.90 g · kg⁻¹) group 9-allopurinol (5 mg · kg⁻¹) group

与对照组比较: P < 0.001
与模型组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001
P < 0.001 vs control group
* P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001 vs model group

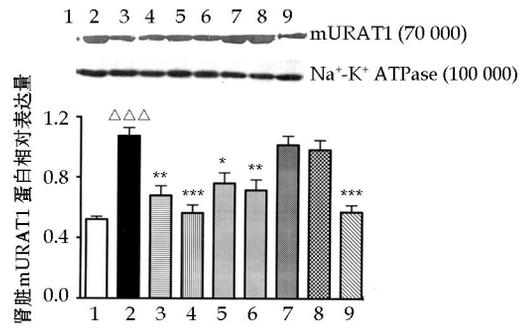
图 3 二妙丸、黄柏、苍术水提取物对高尿酸血症小鼠肾脏 mURAT1 mRNA 表达的影响 (x̄ ± s, n = 4)

Fig. 3 Effects of water extracts of Ermiao Pill, Cortex Phellodendri Chinensis, and Rhizoma Atractylodis on renal mURAT1 mRNA expression in hyperuricemic mice (x̄ ± s, n = 4)

症和痛风的发生率逐年升高,专家预测其在中国可能成为仅次于糖尿病的代谢性疾病。鉴于其高危害性并严重威胁健康,大力加强高尿酸血症、痛风研究和防治具有重要理论和临床意义。本研究证实二妙丸具有抑制尿酸生成和促进尿酸排泄的双重调节作用,以干预高尿酸血症小鼠尿酸盐失衡。二妙丸是清热燥湿代表方,本研究结果为以中医清热燥湿治则治疗痛风提供了科学依据。

给予二妙丸及黄柏水提取物可逆转氧嗪酸钾盐所致高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的升高,这与本课题组前期工作一致^[4],进一步证实二妙丸水提取物具有降尿酸作用。

肝脏富含 XOD,是体内尿酸合成主要部位。XOD 是一个诱导酶,常作为研究高尿酸血症病理机制和药物作用的靶点之一^[5]。本研究证实二妙丸及黄柏水提取物可抑制氧嗪酸钾盐所引起小鼠肝脏活性及其 和蛋白表达的升高 并伴随



1-对照组 2-模型组 3、4-二妙丸水提取物 (3.90、7.80 g · kg⁻¹) 组 5、6-黄柏水提取物 (1.95、3.90 g · kg⁻¹) 组 7、8-苍术水提取物 (1.95、3.90 g · kg⁻¹) 组 9-别嘌醇 (5 mg · kg⁻¹) 组

1-control group 2-model group 3, 4-Ermiao Pill water extracts (3.90 and 7.80 g · kg⁻¹) group 5, 6-Cortex Phellodendri Chinensis water extracts (1.95 and 3.90 g · kg⁻¹) group 7, 8-Rhizoma Atractylodis water extracts (1.95 and 3.90 g · kg⁻¹) group 9-allopurinol (5 mg · kg⁻¹) group

与对照组比较: P < 0.001
与模型组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001
P < 0.001 vs control group
* P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001 vs model group

图 4 二妙丸、黄柏、苍术水提取物对高尿酸血症小鼠肾脏 mURAT1 蛋白表达的影响 (x̄ ± s, n = 4)

Fig. 4 Effects of water extracts of Ermiao Pill, Cortex Phellodendri Chinensis, and Rhizoma Atractylodis on renal mURAT1 protein levels in hyperuricemic mice (x̄ ± s, n = 4)

肝尿酸水平的降低。表明抑制尿酸合成仅是二妙丸及黄柏水提取物降尿酸的途径之一。

尿酸水平升高是肾功能异常的主要危险因素^[6]。氧嗪酸钾盐引起 SCr 水平的升高和 UCr 水平的降低,并伴随尿液中尿酸的降低,提示该模型动物肾功能失常,且肾脏尿酸排泄能力降低。二妙丸及黄柏水提取物可显著逆转上述作用,表明它们具有一定的肾功能保护作用,并提示二妙丸及黄柏水提取物降尿酸作用有可能与其增强动物肾脏排泄尿酸功能有关。

人尿酸盐转运子 1 (hURAT1) 位于人肾脏近曲端小管上皮细胞的管腔膜,是肾小管腔尿酸重吸收至肾小管上皮细胞内的主要转运蛋白,在肾脏尿酸盐重吸收的过程中起重要作用^[7]。小鼠尿酸盐转运系统与人类具有相似性。小鼠肾脏参与尿酸盐重吸收过程,其特异尿酸盐转运子 mURAT1 与人类 hURAT1 有 74% 同源性,mURAT1 功能与人类类似也得到证实^[8]。本研究发现高尿酸

血症小鼠肾脏 mURAT1 mRNA 和蛋白高表达,表明氧嗪酸钾盐所引起小鼠血清尿酸水平的升高与肾脏 mURAT1 过表达致尿酸重吸收功能增强有关。二妙丸及黄柏水提取物可显著降低高尿酸血症小鼠肾脏 mURAT1 mRNA 和蛋白表达,表明二妙丸及黄柏水提取物可通过抑制高尿酸血症小鼠肾脏尿酸重吸收转运子功能而达到降低血清尿酸的目的, mURAT1 可成为二妙丸水提取物干预高尿酸血症小鼠以维持体内尿酸盐平衡的关键靶点,二妙丸及黄柏水提取物对 mURAT1 调控机制等后续的相关研究仍在进行中。

本实验在高尿酸血症小鼠模型上未观察到苍术降尿酸及改变与尿酸合成和排泄有关组织 XOD 和 mURAT1 表达等作用,提示二妙丸水提取物所具有降尿酸作用可能主要源于黄柏。黄柏与苍术配伍作用及其机制仍需要进一步探索。

参考文献:

- [1] 余建纯. 二妙散内服为主治疗痛风性关节炎 32 例临床观察 [J]. 中医正骨, 2005, 17(10): 675.
- [2] 张友安. 二妙散加味配合金黄散外敷治疗痛风急性发作 34 例 [J]. 山西中医, 2007, 17(1): 21.
- [3] 朱晓勤, 尹 莲, 徐 立. 二妙丸系列方有效部位群药效学比较研究 [J]. 中医药导报, 2008, 14(2): 12-15.
- [4] Kong L D, Yang C, Ge F, et al. A Chinese herbal medicine Ermiao Wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93: 325-330.
- [5] Terkeltaub R, Bushinsky D A, Becker M A. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(1): S4.
- [6] Becker M A, Jolly M. Hyperuricemia and associated diseases [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2006, 32(2): 275-293.
- [7] Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels [J]. *Nature*, 2002, 417(6887): 393-395.
- [8] Hosoyamada M, Ichida K, Enomoto A, et al. Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(2): 261-268.

灵芝孢子油体内抗 Friend 鼠白血病病毒的实验研究

黄鸣清, 谢友良, 蒋东旭, 陈长青, 江 滨, 赖小平

(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探讨灵芝孢子油体内抗 Friend 鼠白血病病毒 (Friend murine leukemia virus, Fr. MuLV) 感染的疗效和作用机制。方法 用 Fr. MuLV 感染 BALB/C 雌性小鼠, 造模小鼠 ig 给药 21 d, 比较各组动物的体质量、脾指数、胸腺指数, CD₄⁺、CD₈⁺、CD₄⁺/CD₈⁺ 等指标变化情况。结果 小鼠感染 Fr. MuLV 后体质量严重减轻, 脾明显肿大, 胸腺萎缩, CD₄⁺、CD₈⁺、CD₄⁺/CD₈⁺ 值均显著降低。灵芝孢子油 50、100、200 mg/kg 剂量均可显著改善体质量增长抑制、脾肿大及胸腺萎缩 ($P < 0.01$), 100、200 mg/kg 剂量组 CD₄⁺、CD₈⁺、CD₄⁺/CD₈⁺ 值均有明显升高 ($P < 0.01, 0.05$)。结论 灵芝孢子油对 Fr. MuLV 感染小鼠有保护作用, 能够改善体质量增长抑制, 抑制脾肿大及胸腺萎缩, 升高感染小鼠的 T 淋巴细胞。

关键词: Friend 鼠白血病病毒; 灵芝孢子油; 淋巴细胞

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)03-0423-04

In vivo treatment for Friend murine leukemia virus with ganoderma spore oil

HUANG Ming-qing, XIE You-liang, JIANG Dong-xu, CHEN Chang-qing, JIANG Bin, LAI Xiao-ping
(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract : Objective To study the effects of ganoderma spore oil on Friend murine leukemia virus (Fr. MuLV) and its mechanism. **Methods** The BALB/C female mouse was infected with Fr. MuLV, body weight, spleen index, thymus index, the percentages of CD₄⁺, CD₈⁺, and CD₄⁺/CD₈⁺ were measured. **Results** Compared to the control group, body weight extenuation, splenomegaly, and atrophy of thymus gland severely in the model group, the percentages of CD₄⁺, CD₈⁺, and CD₄⁺/CD₈⁺ were significantly decreased in the model. Body weight, spleen index, and thymus index ($P < 0.01$) in ganoderma spore oil group were improved with the dosage of 50, 100, and 200 mg/kg, the percentages of CD₄⁺,

收稿日期: 2009-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (“岭南地产药材抗流感病毒药效物质基础”, 编号 u0732004)

作者简介: 黄鸣清 (1980 →), 男, 福建福州人, 广州中医药大学 2007 级博士, 主要从事中药新药研究与开发。