

一种复合萃取物降尿酸量效与时效关系研究

陈旅翼¹, 李赫宇², 赵玲^{3*}

1. 中南民族大学药学院, 湖北 武汉 430743

2. 天津市益倍建生物技术有限公司, 天津 300457

3. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023

摘要: 目的 研究一种复合萃取物(主要由葡萄皮、葡萄籽、红酒萃取物及人参、枸杞萃取物组成)体内降尿酸作用的量效和时效关系。方法 雄性昆明种小鼠随机分为对照组, 模型组, 别嘌醇组及复合萃取物高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg)组。时效关系研究中, 各组分别连续给药2、4、7、10、13、16、20 d后, ip 氧嗪酸钾溶液 20 mL/kg 造模; 量效关系研究中, 各组连续ig 给药7 d后, ip 氧嗪酸钾溶液 20 mL/kg 造模; 按照试剂盒方法分别测定小鼠血清及尿液中尿酸水平及肝组织中黄嘌呤氧化酶(XOD)活性。结果 时效关系研究发现, 复合萃取物组给药4 d即显示出明显的降尿酸活性, 连续给药7 d后, 其低、中、高3个剂量组均表现出显著的活性, 且在连续20 d的实验过程中, 小鼠生理和精神状态都非常好。量效关系研究表明, 复合萃取物低剂量(100 mg/kg)时即显示良好的降尿酸活性, 并存在一定的量效关系, 以高剂量组最为显著, 且高剂量组还显示出显著的抑制肝脏 XOD 的活性。结论 复合萃取物在体内具有良好的降尿酸活性, 呈现一定的量效和时效关系, 其降尿酸作用与抑制 XOD 活性有关。

关键词: 复合萃取物; 降尿酸; 量效关系; 时效关系; 葡萄籽; 人参萃取物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)22-4039-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.018

Study on dose-effect and time-effect relationships of reducing uric acid of one complex extraction

CHEN Lv-yi¹, LI He-yu², ZHAO Ling³

1. College of Pharmacy, South-central University For Nationalities, Wuhan 430743, China

2. Tianjin Ubasic health Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China

3. College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China

Abstract: Objective To study the time-effect and dose-effect relationships of reducing uric acid of one complex extraction. **Methods** Sixty male Kunming mice were randomly divided into blank group, model group, allopurinol group, and three groups of high, medium, and low complex extraction group. In the study of time-effect relationship, the mice were continuously treated with complex extraction for 2, 4, 7, 10, 13, 16, and 20 d, then the rats model was established by ip administration with oxonic acid potassium salt (20 mL/kg); In the study of dose-effect relationship, the mice were continuously treated with complex extraction for 7 d, then the rats model was established by ip administration with oxonic acid potassium salt (20 mL/kg). The mice urine, blood, and liver tissue were collected. **Results** In the study of time-effect relationship, after 4 d of administration, the serum uric acid concentration was decreased obviously, and 7 d later, the low, medium, and high dose groups showed the significant activity of lowering uric acid, and the physiological and mental state of mice were very good in 20 d tests. Study on the relationship between dose and effect found that in low dose (100 mg/kg) showed good reduction of serum uric acid value activity ($P < 0.05$), and the high dose group (400 mg/kg) showed the most significant activity ($P < 0.001$). There was a certain dose-effect relationship. The high-dose group also showed significant inhibition of liver xanthine oxidase (XOD) activity ($P < 0.05$). **Conclusion** The complex extraction has good reduction activity on uric acid *in vivo*, and shows certain dose-effect and time-effect relationships. The lowering effect on uric acid has relation with the inhibitory activity on xanthine oxidase.

Key words: extractive complex; reducing uric acid; dose-effect relationship; time-effect relationship; grapestone; ginseng extract

收稿日期: 2016-01-17

作者简介: 陈旅翼(1983—), 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为高尿酸与痛风研究。Tel: (027)67841196 E-mail: clyhappy05@163.com

*通信作者 赵玲(1982—), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向为天然活性成分研究。E-mail: zhaolingcpu@126.com

尿酸是人嘌呤代谢的产物, 由于尿酸在体液中溶解度有限, 当体内嘌呤代谢紊乱或摄入嘌呤过多导致体内嘌呤的量过高, 产生尿酸过多/或者尿酸排泄减少, 体液中蓄积的尿酸浓度超过其饱和浓度时, 易在组织中析出结晶, 引发高尿酸血症 (hyperuricemia), 有 5%~12% 的高尿酸血症患者最终发展为痛风^[1-2]。研究表明, 高尿酸血症不仅是痛风最重要的生化基础和诱发痛风最危险的因素, 而且还与高血压、肾脏疾病、代谢综合征、高脂血症、糖尿病、胰岛素抵抗和心脑血管疾病等多种代谢紊乱综合征有关, 已成为严重威胁人类健康的代谢性疾病^[3]。因此, 在人们生活质量日益提高及对健康迫切需求的时代, 除了调整饮食结构外, 通过天然健康食品或复合物来辅助调节体内尿酸水平, 对于预防痛风及相关疾病具有重要的意义。

本实验受试物为一种复合萃取物, 主要由葡萄皮、葡萄籽、红酒萃取物及人参、枸杞萃取物组成, 均为食品级原料。前期研究发现, 该复合萃取物在体外对尿酸合成关键酶——黄嘌呤氧化酶 (XOD) 具有良好的抑制作用^[4], 本实验则针对该复合物体内降尿酸的量效和时效关系开展研究。

1 材料

1.1 仪器

BS124S 型电子天平 (Sartorius Corporation, 德国); KD-160 型鼠称 (TANITA 公司); Mini-shaker 培养板振荡器 (Kylin-Bell Lab Instruments, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司); WH-2 型漩涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂); DZF-6020 型真空干燥箱 (上海恒科技术有限公司); DG5033A 型酶标仪 (华东电子); 96 孔细胞培养板 (Corstar[®] Corporation, 美国); HH-4 型恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); MILLI-Q Biocel 型超纯水装置 (Millipore, 美国)。

1.2 样品与试剂

复合萃取物样品 [TransAgeTM, 传世-安健 红酒素, 活性成分为反式白藜芦醇 (450 mg/袋) 和复合植物多糖 (葡萄多糖、人参多糖、枸杞多糖)], 批号 20150520-01, 由天津市益倍建生物技术有限公司提供; 别嘌醇片 (批号 20140908, 江苏方强制药厂有限责任公司); 氧嗪酸钾 (AR, 批号 090202, 质量分数 \geq 99%, Amresco 公司); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 相对分子质量 300~800, 中国医药集团上海化学试剂公司); 磷酸 (AR, 南京汉邦化学试剂公司); 氯化钠 (AR, 南京化学试

剂有限公司); 尿酸、XOD 测定试剂盒 (南京建成生物科技有限公司)。

1.3 动物

雄性昆明种小鼠 (18~22 g), 购于华中科技大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (鄂) 2015-0018, 实验动物许可证 (No. 00119121)。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 CMC-Na 溶液 称取 CMC-Na 2.5 g 加入 500 mL 纯净水中, 加热, 超声使溶解, 静置过夜。

2.1.2 复合萃取物供试品溶液 精密称取 250、500、1 000 mg 复合萃取物样品加入 50 mL 0.5% 的 CMC-Na 溶液混悬, 按每只小鼠 20 mL/kg 给药配制成 100、200、400 mg/kg 的供试品溶液。

2.1.3 别嘌醇溶液 精密称取一定量别嘌醇, 加入 50 mL 0.5% 的 CMC-Na 溶液混悬, 配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的样品。

2.1.4 氧嗪酸钾溶液 称取氧嗪酸钾适量, 以 0.5% CMC-Na 溶液混悬, 配制成 12.5 mg/mL 的造模溶液。

2.2 动物饲养

昆明种小鼠, 分笼饲养于室内, 室温 20~22 °C, 相对湿度 35%~50%, 自由饮食、饮水, 适应性饲养 5 d 后, 开始实验。

2.3 动物分组及造模

60 只昆明种雄性小鼠, 按体质量随机分为 6 组, 分别为对照组, 模型组, 别嘌醇 (10 mg/kg) 组, 复合萃取物高、中、低剂量 (400、200、100 mg/kg) 组, 每组 10 只。

2.3.1 时效关系研究 上述 6 组动物置于代谢笼中, 自由饮食、饮水, 对照组及模型组 ig 给予 0.5% CMC-Na, 其他各组每天 ig 相应药物, 给药体积均为 20 mL/kg, 分别连续给药 2、4、7、10、13、16、20 d。末次给药前 1 h, 对照组 ip 0.5% 的 CMC-Na 溶液 20 mL/kg, 其他各组 ip 氧嗪酸钾溶液 20 mL/kg, 1 h 后, 眼眶内侧毛细管取血。

2.3.2 量效关系研究 上述 6 组动物, 置于代谢笼中, 自由饮食、饮水, 对照组及模型组 ig 给予 0.5% CMC-Na, 其他各组每天 ig 相应的药物, 连续给药 7 d。第 6 天, 除对照组 ip 0.5% 的 CMC-Na 溶液 20 mL/kg, 其他各组 ip 氧嗪酸钾溶液 20 mL/kg, 代谢笼中收集小鼠 24 h 的尿液。第 7 天, 即末次给药前 1 h, 再次给予氧嗪酸钾溶液, 摘眼球取血, 脱颈处死小鼠, 于同一位置取肝脏组织。

2.4 血液、尿液样品及肝组织的处理及测定

2.4.1 血清中尿酸水平的测定 血液样品 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于 1.5 mL 离心管内, 得血清样品, 按尿酸测定试剂盒的测定方法测定血清中尿酸水平。

2.4.2 尿液中尿酸水平的测定 收集的尿液加入 10 倍量的纯净水稀释, 50 °C 加热使沉淀物溶解, 2 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 按尿酸测定试剂盒的测定方法测定尿液中尿酸水平。

2.4.3 肝组织中 XOD 活性测定 取肝组织适量, 在精密天平上称取 0.05 g 左右, 匀浆, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 得肝组织样品, 按 XOD 试剂盒方法测定肝组织中 XOD 活性。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用方差分析进行统计学检验。

3 结果

3.1 时效关系

与对照组比较, 模型组各时间点小鼠血清中尿酸水平均增加, 差异非常显著 ($P < 0.001$), 表明小鼠高尿酸模型造模成功。从复合萃取物降尿酸时效关系结果 (表 1) 可以看出, 中、高剂量复合萃取物组在给药 4 d 后, 即出现明显效果 ($P < 0.05$)。

在连续给药 7 d 后, 复合萃取物 3 个剂量组均表现出显著的降尿酸活性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且随着给药时间的延长, 降尿酸效果更加显著, 以高剂量组 (400 mg/kg) 效果最为明显。在整个实验过程中, 别嘌醇组小鼠出现了毛色不顺、精神状态差、体质量下降等不良反应, 而复合萃取物各组小鼠的生理状态如毛色、食欲、体质量、活动能力和精神状态都非常好, 说明复合萃取物较别嘌醇具有更高的安全性。

3.2 量效关系

与对照组比较, 模型组小鼠血清尿酸水平、肝组织 XOD 活性及 24 h 尿酸排泄量均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 连续给药 7 d 后, 与模型组比较, 别嘌醇组小鼠血清尿酸水平、肝组织 XOD 活性和 24 h 尿酸排泄量均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 复合萃取物低、中、高 3 个剂量组均显著降低小鼠血清尿酸水平, 在低剂量 (100 mg/kg) 的时候即显示良好的降低血清尿酸的活性 ($P < 0.01$), 且呈一定的剂量依赖关系, 以高剂量组 (400 mg/kg) 最为显著 ($P < 0.001$); 复合萃取物高剂量组还显示出显著的抑制 XOD 活性的作用 ($P < 0.05$); 复合萃取物中剂量组 (200 mg/kg) 促尿液尿酸排泄作用强于高剂量组 (400 mg/kg), 见表 2。

表 1 复合萃取物降尿酸作用时效关系 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Time-effect relationship for uric acid reduction of complex extraction ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药不同时间血清尿酸/(μg·L ⁻¹)						
		2 d	4 d	7 d	10 d	13 d	16 d	20 d
对照	—	31.8±1.9	32.5±3.6	32.7±3.5	36.1±2.1	31.7±2.9	32.2±4.70	35.1±5.4
模型	—	54.1±3.6 ^{###}	56.7±4.1 ^{###}	58.1±5.8 ^{###}	54.1±4.2 ^{###}	59.1±5.7 ^{###}	63.1±5.7 ^{###}	59.3±7.1 ^{###}
别嘌醇	10	45.5±3.5 ^{**}	44.2±3.8 ^{**}	42.8±4.6 ^{***}	34.5±3.8 ^{***}	32.2±4.5 ^{***}	35.8±2.4 ^{***}	32.8±3.7 ^{***}
复合萃取物	100	53.0±4.2	51.2±3.6	49.1±3.0 ^{**}	48.1±3.1 [*]	46.1±5.7 ^{**}	47.2±5.4 ^{**}	46.8±3.9 ^{**}
	200	55.0±4.8	49.9±4.3 [*]	51.3±5.1 [*]	48.8±5.7 ^{**}	47.2±5.0 ^{**}	46.3±4.2 ^{***}	47.2±4.8 ^{**}
	400	54.9±3.2	50.8±3.2 [*]	47.8±6.0 ^{**}	46.7±5.9 ^{**}	44.5±3.8 ^{***}	45.8±3.2 ^{***}	48.8±5.5 ^{**}

与对照组对比: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组对比: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下表同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, following tables are same

表 2 复合萃取物降尿酸作用量效关系 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Dose-effect relationship for uric acid reduction of complex extraction ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尿酸/(μg·L ⁻¹)	XOD/(U·g ⁻¹)	24 h 尿酸排泄量/μmol
对照	—	32.4±2.5	10.25±1.52	23.58±3.58
模型	—	56.1±3.7 ^{###}	13.11±1.83 [#]	32.68±3.60 ^{##}
别嘌醇	10	39.8±4.6 ^{***}	9.41±1.27 ^{**}	18.77±1.68 ^{***}
复合萃取物	100	45.2±4.8 ^{**}	12.13±2.39	20.52±3.05 ^{***}
	200	45.8±3.2 ^{**}	11.88±2.48	28.52±3.89 ^{***}
	400	34.7±4.5 ^{***}	10.05±1.84 [*]	20.94±2.67 ^{***}

4 讨论

本实验采用氧嗪酸钾抑制体内尿酸酶活性,从而减少尿酸分解,提高尿酸蓄积,同时阻碍尿酸排泄,诱导小鼠产生高尿酸,时效关系及量效关系实验均显示模型制备成功。3 个剂量的复合萃取物连续给药不同时间均有显著的降低血清中尿酸水平的作用,且随着给药时间的延长,降尿酸效果更加显著,以高剂量组(400 mg/kg)效果最为明显。量效关系实验结果表明,连续给药 7 d 后,复合萃取物低、中、高 3 个剂量组均显著降低小鼠血清尿酸水平,在低剂量(100 mg/kg)的时候即显示良好的降低血清尿酸的活性($P < 0.01$),且呈一定的剂量依赖关系;结果还发现复合萃取物中剂量组(200 mg/kg)促尿液尿酸排泄作用强于高剂量组(400 mg/kg),其原因经分析可能为高剂量组已经显著抑制了 XOD 的活性,使体内尿酸生成显著减少,最终导致尿液中尿酸排泄量也相应减少。结合前期的体外对 XOD 抑制活性的研究结果^[4],推测复合萃取物降尿酸的机制可能是通过抑制肝脏 XOD 活性来减少尿酸的生成。

综上所述,复合萃取物在小鼠体内具有显著的降尿酸活性,且呈一定量效和时效关系,以高剂量(400 mg/kg)最为显著。复合萃取物均由食品级原料组成,在人们日益追求健康的时代,具有极大的开发为调节体内尿酸水平及预防痛风相关疾病的保健食品的潜力,这对人类健康有着非常重要的现实意义。

参考文献

- [1] Dubchak N, Falasca G F. New and improved strategies for the treatment of gout [J]. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 2010(3): 145-166.
- [2] 展鹏,刘涛,刘新泳. 以黄嘌呤氧化酶为靶点的新型非嘌呤类抗痛风及高尿酸血症药物研究进展 [J]. *中国药物化学杂志*, 2012, 22(5): 403-415.
- [3] Ding X Q, Pan Y, Wang X, et al. Wuling San ameliorates urate under-excretion and renal dysfunction in hyperuricemic mice [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(3): 214-221.
- [4] 赵玲,陈旅翼,李赫宇. 一种复合萃取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(17): 198-200.