

基于斑马鱼模型及分子对接技术探究艾叶黄酮的降尿酸作用及药效活性成分

刘勇杰¹, 王平^{2,4}, 夏婧^{2,4}, 朱澳华¹, 咎俊峰¹, 陈霖霖^{3,4}, 刘军锋^{1,3,4*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北中医药大学老年医学研究所, 湖北 武汉 430065

3. 湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 湖北 武汉 430065

4. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 探索艾叶 *Artemisiae Argyi Folium* 黄酮的降尿酸 (uric acid, UA) 作用及发挥药效的活性成分。方法 采用氧嗪酸钾 (250 $\mu\text{mol/L}$) 联合黄嘌呤 (10 $\mu\text{mol/L}$) 建立急性高尿酸血症斑马鱼模型, 艾叶醇提物 (250、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 处理后检测斑马鱼体内 UA、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 活性。通过艾叶黄酮与 XO 的分子对接, 分析各黄酮类化合物与 XO 的结合模式并计算比较结合能。通过 XO 抑制率实验研究艾叶黄酮对 XO 的抑制率。结果 艾叶醇提物能显著降低高尿酸血症模型斑马鱼 UA、MDA、ROS 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著升高 SOD 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著降低 XO 活性 ($P < 0.01$)。分子对接结果显示, 多数艾叶黄酮化合物均能与 XO 关键氨基酸结合, 且与 XO 的结合能较低。XO 抑制率实验结果表明木犀草素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮和芹菜素能明显抑制 XO 活性。结论 艾叶醇提物具有明显的降 UA 作用, 其机制可能是黄酮类化合物抑制 XO 活性, 其主要发挥降 UA 作用的化合物可能是木犀草素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮和芹菜素。

关键词: 艾叶黄酮; 黄嘌呤氧化酶; 降尿酸; 分子对接; 斑马鱼; 木犀草素; 泽兰黄酮; 芹菜素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8470-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.015

Investigation of uric acid-lowering effect and bioactive components of flavonoids from *Artemisiae Argyi Folium* based on zebrafish model and molecular docking techniques

LIU Yongjie¹, WANG Ping^{2,4}, XIA Jing^{2,4}, ZHU Aohua¹, ZAN Junfeng¹, CHEN Linlin^{3,4}, LIU Junfeng^{1,3,4}

1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Institute of Gerontology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources and Compounds, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

4. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To explore the uric acid (UA) -lowering effects of flavonoids from Aiyue (*Artemisiae Argyi Folium*) and their bioactive constituents responsible for pharmacological activity. **Methods** An acute hyperuricemia zebrafish model was established using oxonic acid potassium (250 $\mu\text{mol/L}$) combined with xanthine (10 $\mu\text{mol/L}$). The zebrafish were treated with ethanol extracts of *Artemisiae Argyi Folium* (250, 500, 1 000 $\mu\text{g/mL}$), and the levels of UA, malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) activity, and xanthine oxidase (XO) activity were measured. Molecular docking was used to analyze the binding modes between *Artemisiae Argyi Folium* flavonoids and XO and calculate binding energies. The inhibition rates of flavonoids

收稿日期: 2024-08-14

基金项目: 湖北省自然科学基金-中医药创新发展联合基金资助项目 (2024AFD285)

作者简介: 刘勇杰 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与开发。E-mail: 1356344781@qq.com

*通信作者: 刘军锋 (1977—), 副教授, 主要从事中药物质基础及作用机制、中药资源与开发研究。E-mail: 1105787683@qq.com

on XO were studied through XO inhibition assays. **Results** The ethanol extract of *Artemisiae Argyi Folium* significantly reduced UA, MDA and ROS levels in the hyperuricemia zebrafish model ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while significantly increasing SOD activity ($P < 0.05, 0.01, 0.001$) and significantly reducing XO activity ($P < 0.01$). Molecular docking results showed that most flavonoids from *Artemisiae Argyi Folium* could bind to key amino acids of XO with relatively low binding energies. XO inhibition assays indicated that luteolin, quercetin, kaempferol, eupatilin, and apigenin could significantly inhibit XO activity. **Conclusion** The ethanol extract of *Artemisiae Argyi Folium* has a significant UA-lowering effect, likely due to the inhibition of XO activity by its flavonoid compounds. The main compounds contributing to the UA-lowering effect may be luteolin, quercetin, kaempferol, nepetin, and apigenin.

Key words: flavonoids from *Artemisiae Argyi Folium*; Xanthine oxidase; uric acid-lowering; molecular docking; zebrafish; luteolin; nepetin; apigenin

尿酸 (uric acid, UA) 水平过高会增加痛风、肾病及心血管疾病风险^[1-3]。高尿酸血症的治疗通常依赖于别嘌呤醇和非布司他等药物, 这些药物通过抑制黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 活性来减少 UA 生成。然而这些药物可能伴随一些不良反应, 别嘌呤醇常导致严重的过敏反应, 如皮疹、瘙痒性丘疹、荨麻疹和水疱性反应等; 非布司他常导致肝功能异常, 如肝功能衰竭和黄疸等^[4]。因此, 从天然产物中寻找新的替代或补充治疗药物及其前体化合物十分必要。黄酮是一类广泛存在于植物中的多酚类化合物, 因其具有多种生物活性而备受关注。其中, 黄酮类化合物在降低 UA 水平方面的潜力近年来引起了大量研究者的兴趣。已有研究表明, 一些黄酮类化合物可通过调节 UA 在肾脏的重吸收或抑制 XO 的活性发挥降 UA 作用^[5]。已有研究表明艾叶提取物可降低高尿酸血症小鼠 UA 水平^[6], 但发挥药效的活性成分未见报道。

本研究通过斑马鱼实验、分子对接和体外酶学实验等探究艾叶醇提物的降 UA 作用及发挥药效的活性成分, 旨在找到其发挥降 UA 作用的化学成分, 为开发不良反应更小的降 UA 天然药物提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

AB 品系野生型斑马鱼由国家水生物种资源库国家斑马鱼中心提供, 养殖于本实验室循环养殖系统, 环境温度 28 °C, 养殖用水 pH 7.4, 昼夜交替周期为 14 h/10 h。

1.2 药品与试剂

艾叶购于李时珍医药集团有限公司, 经湖北中医药大学陈霖研究员鉴定为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶。金合欢素 (批号 PS011043, 质量分数 >98%)、泽兰黄酮 (批号 PS011078, 质量分数 >95%) 购于成都普思生物科技股份有限公司; 槲皮素 (批号 100081-200907, 质量

分数 98%) 购于中国食品药品检定研究院; 山柰酚 (批号 H1817030, 质量分数 97%)、芹菜素 (批号 L1927042, 质量分数 ≥98%)、木犀草素 (批号 L1807023, 质量分数 ≥98%)、氧嗪酸钾 (批号 K2228489, 质量分数 ≥98.0%)、别嘌呤 (批号 C2215368, 质量分数 98%)、黄嘌呤 (批号 L2107070, 质量分数 98%)、UA (批号 L2215157, 质量分数 99%) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 黄嘌呤氧化酶 (批号 C14951018) 购于上海麦克林生化科技有限公司; 总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (批号 091323240207)、活性氧检测试剂盒 (批号 080923240115) 及脂质氧化丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号 090423231215) 购于碧云天生物技术有限公司; XO 比色法试剂盒 (批号 WA238VV09710) 购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。

1.3 仪器

Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪、柱温箱、DAD 检测器及变色龙色谱在线分析软件 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; CNW Athena C₁₈-WP 色谱柱 (上海安谱实验科技股份有限公司); WD-9415B 型超声清洗器 (北京市六一仪器厂); AB135-S 型电子分析天平 (瑞士梅特勒托利多仪器公司); PURELAB Ultra 超纯水系统 [威立雅 (中国) 环境服务有限公司]; KZ-II 型高速组织研磨仪 (武汉塞维尔生物科技有限公司); N60 Implen 型紫外分光光度计 (北京诺汇诚科技有限公司)。

2 方法

2.1 艾叶醇提物的制备及总黄酮含量测定

2.1.1 艾叶醇提物的制备 艾叶粉碎后过 2 号筛, 取 10 g 艾叶粉末, 加 100 mL 体积分数 80% 乙醇回流提取 1 h, 静置至室温后滤出醇提液, 再次加入 100 mL 体积分数 80% 乙醇回流提取 1 h, 滤过后合

并滤液，将滤液浓缩至 10 mL，即得到质量浓度为 1 g/mL 的艾叶醇提物。

2.1.2 总黄酮含量测定 参考文献方法^[7]使用《中国药典》2020 年版铝盐显色法测定艾叶醇提物中总黄酮含量。

2.2 艾叶醇提物对斑马鱼的作用研究

2.2.1 斑马鱼最大耐受浓度 (maximum tolerated concentration, MTC) 的测定 随机选取 90 尾受精后 5 d (5 day post fertilization, 5 dpf) 的野生型 AB 品系斑马鱼，将斑马鱼转入 24 孔板中，15 尾/孔。用养鱼用水配制质量浓度分别为 250、500、1 000、2 000、4 000 $\mu\text{g/mL}$ (以艾叶生药量计，下同) 的艾叶醇提物溶液，除对照组外其余各孔分别加入艾叶醇提物 2 mL，对照组加入 2 mL 养鱼用水，28 $^{\circ}\text{C}$ 处理 3 d，根据斑马鱼状态及死亡率确定 MTC。

2.2.2 斑马鱼的分组、造模及给药 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼随机分为对照组、模型组、阳性药 (136 $\mu\text{g/mL}$) 组及艾叶低、中、高 (250、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 剂量组。除对照组外，其余各组均使用含 250 $\mu\text{mol/L}$ 氧嗪酸钾和 10 $\mu\text{mol/L}$ 黄嘌呤的养鱼水进行造模。阳性药组在养鱼水中给予别嘌呤醇，艾叶低、中、高剂量组分别在养鱼水中给予相应艾叶醇提物，对照组给予等量养鱼用水^[8-9]。24 h 后收集各组斑马鱼于 EP 管中，加 PBS 清洗 3 遍，吸干 PBS 后称定质量并将斑马鱼保存于 -80°C 备用。

2.2.3 HPLC 检测斑马鱼 UA 水平 每组取适量斑马鱼并称定质量，加入 200 μL PBS 后经组织研磨仪匀浆，15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min，取上清，测定 UA 水平。色谱条件参考文献方法^[10]并稍作优化，使用 Athena C₁₈-WP 色谱柱 (250 mm \times 4.9 mm, 5 μm)，流动相为 pH 2.5 乙酸水 (A)-5% 甲醇 (B)；0~12 min，5% B；进样体积 20 μL ；体积流量 1 mL/min；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长 294 nm。采用 PBS 配制 UA 质量浓度分别为 5、10、15、20、25 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。在上述色谱条件下进样，以样品质量浓度 (p) 为横坐标、色谱峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线，得到标准曲线 $A=1.5305p+0.9389$ ($r=0.9998$)。以样品峰面积计算 UA 浓度，并计斑马鱼体内 UA 水平。

斑马鱼体内 UA 水平=(UA 浓度 \times PBS 体积)/(斑马鱼质量)

2.2.4 斑马鱼氧化应激水平的测定 按照“2.2.2”项方法处理斑马鱼，按照试剂盒说明书测定各组斑马鱼 MDA、ROS 水平及 SOD 活性。

2.2.5 斑马鱼 XO 活性的测定 按照“2.2.2”项方法处理斑马鱼，按照试剂盒说明书测定各组斑马鱼体内 XO 活性。

2.3 艾叶黄酮与 XO 的分子对接

XO 的 X-ray 晶体三维结构文件来源于 RCSB 蛋白数据库^[11]。该结构包含 6 个配体，其中 FAD 和 MOS 为 XO 催化黄嘌呤羟基化必要配体^[12]，保留这些配体并删除其余配体，去掉靶蛋白的水分子并进行加氢、加电荷和计算电荷。通过 TCSP 数据库和文献^[13]检索收集艾叶中存在的黄酮类成分，用 swissADME 数据库预测所有化合物的 ADME 性质，根据 Lipinski 类药性五原则筛选出 33 种候选黄酮，在 pubchem 中下载黄酮类成分结构。选择 MO 和 FAD 2 个位点进行分子对接^[11]。其中 MO 中心对接盒子的中心坐标为 21.229、13.900、117.409，盒子的大小为 40 \times 40 \times 40 个网格点，每个网格点大小为 0.037 5 nm。FAD 中心对接盒子的中心坐标为 31.449、53.456、99.022，盒子的大小为 40 \times 58 \times 40 个网格点，每个网格点大小为 0.508 nm。设置参数后运行 vina 进行半柔性对接。

2.4 艾叶黄酮对 XO 抑制率的测定

2.4.1 酶促反应体系的建立 反应体系以黄嘌呤为底物，在适宜条件下 XO 可将黄嘌呤催化为 UA，加入各黄酮类成分后反应一定时间，以反应终止时体系中黄嘌呤的浓度计算相应黄酮的 XO 抑制率。根据预实验确定酶促反应体系中 XO 终浓度为 5 U/L，底物黄嘌呤终浓度为 0.40 mmol/L，黄酮类成分浓度分别为 0.05、0.10、0.20 mmol/L，反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，反应时间为 60 min。

2.4.2 色谱条件及标准曲线的建立 参考文献方法^[14]稍作优化，使用 Athena C₁₈-WP 色谱柱 (250 mm \times 4.9 mm, 5 μm)；流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (A)-5% 甲醇 (B)；0~18 min，5% B；进样体积 20 μL ；体积流量 1 mL/min；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长 254 nm。采用 PBS 配制黄嘌呤浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L 的系列对照品溶液。在上述色谱条件下进样，以 p 为横坐标、 A 为纵坐标绘制标准曲线，得到的标准曲线为 $A=167.42p+0.4526$ ($r=0.9998$)。

2.4.3 艾叶黄酮对 XO 抑制率的测定 取 100 μL

50 U/L 的 XO 溶液于 24 孔板中, 各给药组分别加入 50、100、200 μL 的别嘌呤醇、木犀草素、金合欢素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮和芹菜素 (1 mmol/L) 的对照品溶液, 对照组加入等体积 PBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。加入 400 μL 的黄嘌呤溶液 (1 mmol/L) 启动反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min 后, 加入 500 μL HCl (1 mol/L) 终止反应。将反应溶液定容至 2 mL, 进样检测黄嘌呤浓度, 计算 XO 抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(A - B)}{(C - B)}$$

A 为给药组反应后黄嘌呤浓度; B 为对照组反应后黄嘌呤浓度; C 为对照组反应前黄嘌呤浓度

2.5 统计学分析

利用 GraphPad prism 10.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

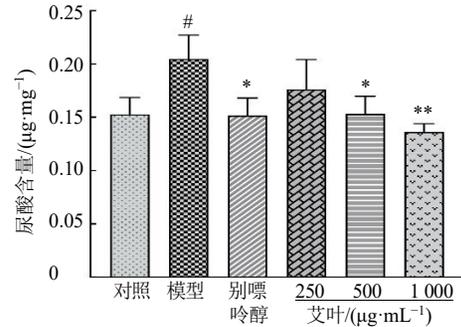
3.1 艾叶醇提取物总黄酮含量测定

艾叶醇提取物中总黄酮质量浓度为 18.4 mg/mL。

3.2 艾叶醇提取物对斑马鱼的作用研究

3.2.1 斑马鱼的 MTC 斑马鱼经 250、500、1 000、2 000、4 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 艾叶醇提取物药浴处理 3 d 后, 艾叶醇提取物各剂量组死亡率依次为 0、0、0、53.3% 和 93.3%。因此, 斑马鱼的 MTC 为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 选择 250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量作为低、中、高剂量。

3.2.2 对斑马鱼 UA 水平的影响 如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组 UA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性药组及艾叶醇提取物中、高剂量组 UA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 提示艾叶醇提取物能显著降低高尿酸血症斑马鱼体内的 UA 水平。



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 艾叶醇提取物对高尿酸血症斑马鱼 UA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of alcoholic extract of *Artemisiae Argyi Folium* on uric acid levels in zebrafish with hyperuricaemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2.3 斑马鱼氧化应激水平的测定 如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼 MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$), SOD 活力显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 艾叶醇提取物低、中、高剂量组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.001$), SOD 活力显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼 ROS 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 艾叶醇提取物低、中、高剂量组 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结果表明, 艾叶醇提取物能够促进高尿酸血症斑马鱼的氧化还原平衡, 改善斑马鱼机体的氧化应激状态。其原因可能是模型组斑马鱼由于 UA 水平升高而使氧化应激反应加剧^[15], 经艾叶醇提取物处理后, 斑马鱼 UA 水平降低, 从而改善了氧化应激状态。

3.2.4 斑马鱼 XO 活性的测定 如图 4 所示, 与

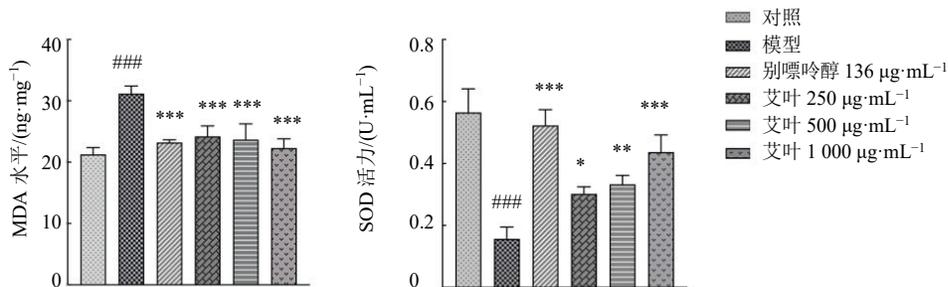


图 2 艾叶醇提取物对高尿酸血症斑马鱼体内 MDA 水平和 SOD 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of alcoholic extract of *Artemisiae Argyi Folium* on MDA level and SOD activity in zebrafish with hyperuricemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

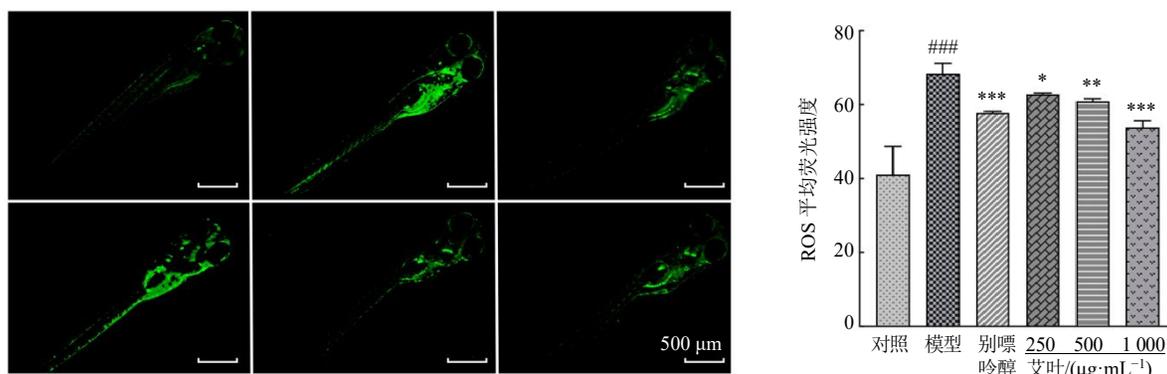


图 3 艾叶醇提取物对高尿酸血症斑马鱼体内 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of alcoholic extract of *Artemisiae Argyi Folium* on level of ROS in zebrafish with hyperuricaemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

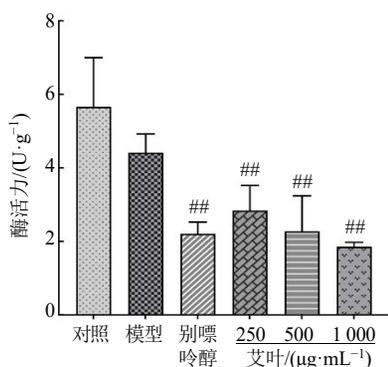


图 4 艾叶醇提取物对高尿酸血症斑马鱼 XO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of alcoholic extracts of *Artemisiae Argyi Folium* on XO activity in hyperuricemic zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

对照组比较,艾叶低、中、高剂量组斑马鱼 XO 活性均显著降低 ($P < 0.01$),推测艾叶醇提取物可能通过抑制斑马鱼 XO 活性,从而抑制 UA 的生成。

3.3 分子对接

3.3.1 准确性验证 使用 pymol 软件将 XO 中的原始配体 FAD 提取出来,根据“2.3”项下方法将 FAD 与去除 FAD 的 XO 进行分子对接,结果见图 5。用 pymol 计算对接后的配体分子与原配体分子的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) = 0.845。用同样方法将水杨酸与 XO 的 MO 中心进行对接,对接后的配体分子与原配体分子的 RMSD = 0.000,表明该方法参数设置合理,程序适用,可用于后续黄酮类化合物的分子对接。

3.3.2 艾叶黄酮与 XO 的分子对接 艾叶黄酮与

XO 的 FAD 和 MO 中心对接的最低结合能、关键键和 $\pi-\pi$ 相互作用见表 1。在 XO 的 MO 中心,ARG-880、GLU-802、PHE-914 和 PHE-1009 是 XO 催化黄嘌呤生成 UA 过程中的关键氨基酸。艾叶黄酮化学成分,如木犀草素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮、棕矢车菊素、异泽兰黄素、茵陈色原酮、高车前素、6-甲基苜蓿素和芹菜素等均能与这些关键氨基酸结合,这说明以上化学成分可能竞争黄嘌呤与 XO 的结合位点来抑制 XO 的催化反应。FAD 主要负责黄嘌呤羟基化反应的电子转移,分子对接研究发现牡荆素、圣草酚、木犀草素、6-甲基苜蓿素、棕矢车菊素、异泽兰黄素、矢车菊黄素和曼荆子黄素等黄酮能与 FAD 形成氢键,因此推测以上化学成分可能通过抑制 UA 生成反应的电子转移过程来抑制 UA 生成。

根据结合能大小筛选出低于所有黄酮结合能均值的黄酮,再根据与关键氨基酸形成相互作用力的数量筛选出可能具有较强 XO 抑制活性的化合物。木犀草素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮、芹菜素和金合欢素在 MO 中心和 FAD 中心的结合能均低于其他化学成分,且能与 XO 形成至少 3 个及以上的关键作用力。推测木犀草素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮、芹菜素和金合欢素具有较好的抑制 XO 活性,各化学成分与 XO 的 MO 中心结合模式见图 6。

3.4 艾叶黄酮对 XO 抑制率的测定

如图 7 所示,在相同浓度下木犀草素与阳性药别嘌呤醇具有相近的 XO 抑制率,而槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮、芹菜素也具有抑制 XO 活性,且抑制作用呈浓度相关性。该实验结果提示

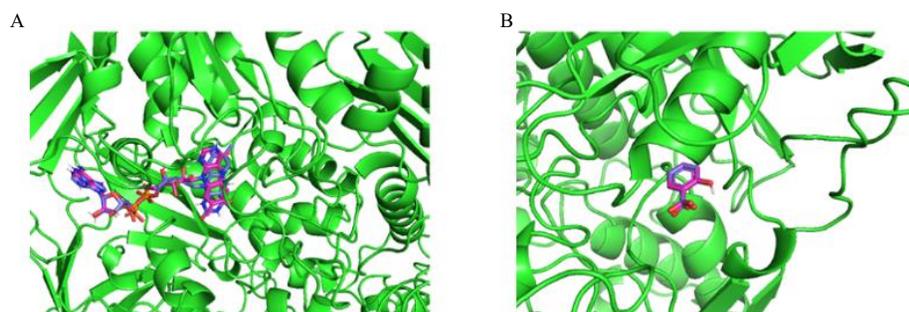


图 5 FAD (A)、水杨酸 (B) 与 XO 的结合模式

Fig. 5 Binding pattern diagrams of FAD (A), salicylic acid (B) with XO

表 1 艾叶黄酮与 XO 的结合能及关键作用力

Table 1 Binding energy and key effector of *Artemisiae Argyi Folium* flavonoids and XO

化合物	最低结合能/ (kcal·mol ⁻¹)		与 MO 结构域的关键氢键		与 MO 结构域的 π 相互作用		与 FAD 结构域的关键氢键	
	FAD	Mo	配体	氨基酸	配体	氨基酸	配体	受体
芹菜素	-8.7	-8.8	4OH	ARG-880	B 环	PHE-914	—	—
茵陈色原酮	-8.1	-7.6	4OH	ARG-880	B 环	PHE-1009	—	—
			4OH	ARG-880	B 环	PHE-1009	—	—
高车前素	-8.7	-8.1	4C=O	GLU-802	B 环	PHE-914	—	—
			4OH	ARG-880	B 环	PHE-1009	—	—
木犀草素	-8.9	-9.2	3OH	ARG-880	B 环	PHE-914	—	—
			—	—	B 环	PHE-1009	4OH	FAD
圣草酚	-8.9	-8.9	3OH	ARG-880	—	—	4OH	FAD
牡荆素	-8.9	-5.0	5OH	GLU-802	—	—	4OH	FAD
异泽兰黄素	-8.6	-6.8	3 ^o OCH ₃	ARG-880	—	—	4OCH ₃	FAD
槲皮素	-9.2	-8.2	3OH	GLU-802	A 环	PHE-914	—	—
			4C=O	ARG-880	B 环	PHE-914	—	—
			5OH	ARG-880	C 环	PHE-1009	—	—
异野漆树苷	-8.4	-5.5	4OH	ARG-880	B 环	PHE-914	—	—
			—	—	B 环	PHE-1009	—	—
矢车菊黄素	-8.3	-6.0	4OCH ₃	GLU-802	—	—	4OCH ₃	FAD
紫花牡荆素	-7.9	-7.3	3OCH ₃	GLU-802	—	—	—	—
6-甲氧基苜蓿素	-8.3	-6.8	3OCH ₃	ARG-880	B 环	PHE-914	—	—
			—	—	B 环	PHE-1009	4OH	FAD
棕矢车菊素	-8.5	-8.0	4C=O	GLU-802	B 环	PHE-914	—	—
			4OH	ARG-880	B 环	PHE-1009	4OH	FAD
木犀草素-7-O-芸香糖苷	-8.0	-5.8	3OH	ARG-880	B 环	PHE-914	—	—
			3OH	ARG-880	B 环	PHE-1009	—	—
芦丁	-8.0	-2.7	5OH	GLU-802	—	—	—	—
山柰酚	-9.0	-9.3	4C=O	ARG-880	A 环	PHE-914	—	—
			4C=O	ARG-880	C 环	PHE-914	—	—
			7OH	GLU-802	C 环	PHE-1009	—	—
泽兰黄酮	-8.9	-8.5	4OH	GLU-802	B 环	PHE-914	—	—
			3OH	ARG-880	B 环	PHE-1009	—	—
鼠李素	-8.2	-8.3	4C=O	ARG-880	A 环	PHE-914	—	—
			3OH	GLU-802	C 环	PHE-914	—	—
			—	—	C 环	PHE-1009	4OH	FAD
香叶木素	-8.6	-8.8	3OH	ARG-880	—	—	—	—
柚皮素	-8.7	-8.2	4OH	ARG-880	B 环	PHE-914	—	—
金圣草黄素	-8.4	-8.3	4C=O	ARG-880	A 环	PHE-914	—	—
			7OH	GLU-802	C 环	PHE-914	—	—
			3OCH ₃	GLU-802	C 环	PHE-1009	4OH	FAD
金合欢素	-8.7	-8.5	4OCH ₃	ARG-880	B 环	PHE-914	—	—
			—	—	B 环	PHE-1009	—	—

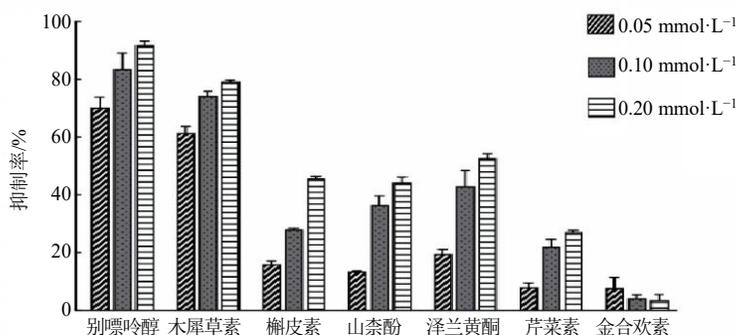


图 7 别嘌呤醇、木犀草素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮、芹菜素和金合欢素对 XO 的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Inhibition of XO by allopurinol, lignans, quercetin, kaempferol, nepetin, apigenin and chrysophanin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组斑马鱼 XO 活性发现艾叶醇提物可能通过抑制 XO 活性达到降 UA 作用。研究发现，多种植物中的黄酮类化合物均有抑制 XO 活性的作用^[5]，因此，利用分子对接技术模拟了艾叶中各黄酮与 XO 的结合情况。分子对接结果解释了艾叶醇提物发挥降 UA 作用的机制。XO 中有 2 个 [2Fe-2S] 簇中心、1 个 FAD 中心和 1 个 MO 中心，其中 MO 中心负责与黄嘌呤结合并发生羟基化反应，[2Fe-2S] 簇中心和 FAD 中心负责反应后的电子转移。在 MO 中心，ARG-880 和 GLU-802 能够稳定反应中间体；PHE-914 和 PHE-1009 形成夹心状占据底物黄嘌呤的芳香环，并通过强烈的 $\pi-\pi$ 堆积作用稳定黄嘌呤，其对黄嘌呤与 XO 的识别有关键作用^[16-18]。FAD 主要负责黄嘌呤羟基化反应后的电子转移，黄嘌呤在 MO 中心被转化为 UA 后将产生 1 个电子，该电子经 [2Fe-2S] 转移至 FAD 中心，并经 FAD 转移至超氧阴离子及过氧化氢中，若黄酮占据 FAD 中心，则可能影响黄嘌呤羟基化反应后的电子转移及超氧阴离子和过氧化氢的生成，进而阻断 UA 的生成反应^[19]。根据各黄酮在 XO 的 MO 和 FAD 2 个关键活性位点的结合能与与关键氨基酸形成作用力的数量，从 33 种黄酮中筛选出可能具有较高抑制活性的黄酮，并通过体外实验了进一步验证了分子对接的结论。结果发现，木犀草素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮、芹菜素均能抑制 XO 的活性，且具有剂量相关性。其中，木犀草素的抑制率接近同等浓度的别嘌呤醇，这与研究报道结果相似^[20]。

综上，本研究通过动物实验证明了艾叶醇提物具有降 UA 作用，通过分子对接及 XO 抑制率实验发现发挥降 UA 作用的主要成分为黄酮类化

合物。分子对接研究发现艾叶中黄酮类化合物可能通过竞争黄嘌呤结合位点或影响反应的电子转移过程而抑制 XO 活性，进而影响 UA 的生物合成。通过体外酶学实验研究发现木犀草素、槲皮素、山柰酚、泽兰黄酮、芹菜素在一定浓度下均能抑制 XO 活性，推断其可能为发挥降 UA 作用的关键化学成分。本研究系统阐述了艾叶醇提物的降 UA 作用、机制及物质基础，为研发降 UA 药物提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kuwabara M, Fukuuchi T, Aoki Y, *et al.* Exploring the multifaceted nexus of uric acid and health: A review of recent studies on diverse diseases [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(10): 1519.
- [2] Maloberti A, Mengozzi A, Russo E, *et al.* The results of the URRAH (uric acid right for heart health) project: A focus on hyperuricemia in relation to cardiovascular and kidney disease and its role in metabolic dysregulation [J]. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2023, 30(5): 411-425.
- [3] 孙泽锐, 王宣军, 盛军. 高尿酸血症研究进展 [J]. 云南民族大学学报 (自然科学版), 2021, 30(2): 135-142.
- [4] Liu Y R, Liu K H, Qin L P, *et al.* Chemical constituents, pharmacological activities, processing and clinical application of traditional Chinese medicine *Scrophulariae Radix*: A review [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2023, 48(16): 4302-4319.
- [5] 李美萍, 王微, 张婕, 等. 艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 22-30.
- [6] 李秀清, 纪宝玉, 裴莉昕, 等. 槐米的红外快速鉴别与总黄酮、总酚酸、还原糖含量测定 [J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(8): 200-207.

- [7] 董艳, 张正海, 魏连会, 等. 基于斑马鱼模型汉麻仁脱脂粉降尿酸作用 [J]. 食品工业, 2023, 44(1): 166-70.
- [8] 金灵泰, 张铭, 方双琪, 等. 基于斑马鱼模型探究药食同源复方降尿酸作用及成分分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 410-416.
- [9] Ferin R, Pavão M L, Baptista J. Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(7/8): 665-669.
- [10] Enroth C, Eger B T, Okamoto K, *et al.* Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(20): 10723-10728.
- [11] Okamoto K, Matsumoto K, Hille R, *et al.* The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21): 7931-7936.
- [12] 石好, 路艳霞, 阳航, 等. 基于网络药理学探讨艾叶黄酮治疗类风湿性关节炎的作用机制 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2023, 45(3): 332-338.
- [13] 孙永丽, 赵焕新, 白虹. HPLC 法体外筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(8): 1391-1396.
- [14] Elsayed S, Elsaid K A. Protein phosphatase 2A regulates xanthine oxidase-derived ROS production in macrophages and influx of inflammatory monocytes in a murine gout model [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1033520.
- [15] Ou R R, Lin L Z, Zhao M M, *et al.* Action mechanisms and interaction of two key xanthine oxidase inhibitors in galangal: Combination of *in vitro* and *in silico* molecular docking studies [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 162: 1526-1535.
- [16] Pauff J M, Hemann C F, Jünemann N, *et al.* The role of arginine 310 in catalysis and substrate specificity in xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(17): 12785-12790.
- [17] Cao H N, Hall J, Hille R. Substrate orientation and specificity in xanthine oxidase: Crystal structures of the enzyme in complex with indole-3-acetaldehyde and guanine [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(3): 533-541.
- [18] Singh J V, Bedi P M S, Singh H, *et al.* Xanthine oxidase inhibitors: Patent landscape and clinical development (2015-2020) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2020, 30(10): 769-780.
- [19] 于媛芳, 赵启文, 李振. 中药单体对黄嘌呤氧化酶的抑制作用 [J]. 黑龙江科学, 2023, 14(8): 106-108.
- [20] 夏佳璇. 艾叶酚类成分的质量控制与药代动力学研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.

[责任编辑 罗 曦]