

蕨菜乙醇提取物降尿酸作用机理及肾保护作用研究

谷仿丽, 韩邦兴*, 陈乃富, 赵 颂

皖西学院生物与制药工程学院, 六安 237012

摘要:为研究蕨菜乙醇提取物降尿酸作用机理及其肾保护作用,将蕨菜乙醇提取物灌胃模型小鼠1周,于给药第3 d,氧嗪酸钾灌胃复制高尿酸血症小鼠模型,检测血清尿酸水平、血及肝脏黄嘌呤氧化酶活性,探讨其治疗高尿酸血症作用机理;蕨菜乙醇提取物灌胃模型小鼠1周,检测血Cr与BUN、肾组织NO与ET水平、肾组织形态学,考察其肾保护作用。结果发现蕨菜乙醇提取物可显著降低小鼠血清尿酸水平,对小鼠血及肝脏黄嘌呤氧化酶活性无显著影响,显著降低血Cr、血BUN、肾组织ET水平,升高肾组织NO水平,肾组织形态学正常。结果表明蕨菜乙醇提取物具有降尿酸及肾保护作用,其降尿酸作用机制不在影响黄嘌呤氧化酶活性,确切的作用机制还有待于进一步研究。

关键词:蕨菜;乙醇提取物;高尿酸血症;尿酸;黄嘌呤氧化酶;肾脏

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.016

Mechanism of Lowering Uric Acid and Renoprotective Function of Ethanol Extract from *Pteridium aquilinum* in Hyperuricemia Mice

GU Fang-li, HAN Bang-xing*, CHEN Nai-fu, ZHAO Song

College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China

Abstract: To study the effect and mechanism of the ethanol extract from *Pteridium aquilinum* on lowering uric acid and renoprotective function, the mice model of hyperuricemia was established by oxygen hydrochloride acid potassium salt. The ethanol extracts of *P. aquilinum* were continuously *i. g.* administered once a day to the mouse model for one week. One hour after the final treatment, the urate levels in serum and the hepatic xanthine oxidase (XOD) activity in serum and liver were tested to explore the mechanism of anti-hyperuricemia. After the model mice were *i. g.* administered with the ethanol extracts of *P. aquilinum* for one week, the creatinine (Cr) and urea nitrogen (BUN) levels in their serum, as well as the NO, and ET levels in their renal tissue and the histopathology of kidney were tested to investigate the effect on renal function. The results indicated that *P. aquilinum* ethanol extract can significantly lower the urate and Cr levels in the serum and the BUN and ET in renal tissue of model mice, respectively. *P. aquilinum* ethanol extract can also elevate the NO levels in renal tissue while showed no effect on the kidney histopathology. Hence, it was concluded that *P. aquilinum* ethanol extract can reduce the urate level in serum and protect renal function, the mechanism of lowering uric acid was not through the route of common intervening the activity of xanthine oxidase.

Key words: *Pteridium aquilinum*; ethanol extracts; hyperuricemia; uric acid; xanthine oxidase; renal

尿酸(Uric acid, UA)是嘌呤(次黄嘌呤、黄嘌呤)代谢的终末产物,黄嘌呤氧化酶活性升高(尿酸生产增多)和(或)肾脏尿酸转运体异常(尿酸排泄减少)是引发高尿酸血症的主要因素。先前认为无症状高尿酸血症无需治疗,但近年研究表明高尿酸血症除可引起痛风外,还可通过启动炎症反应、损失

血管内皮、血管平滑肌增值等引起肾损伤,肾损伤后引起尿酸进一步排泄减少,最终导致肾功能不全^[1];并与高血压、动脉粥样硬化、肥胖、胰岛素抵抗的发生密切相关^[2],且随着血尿酸水平的升高,引发以上疾病的风险性增加^[3,4]。因此,降低高尿酸血症患者的尿酸水平十分必要。

目前临床上治疗高尿酸血症的药物非常有限,多选用黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌醇和促进尿酸排泄药如苯溴马隆、丙磺舒等,但这些药物毒副作用大,患者常常不能耐受,在一定程度上限制了其使

收稿日期: 2016-12-06 接受日期: 2017-02-14

基金项目: 安徽省自然科学基金(1508085KH203);安徽省优秀青年人才支持计划;安徽省大学生创新创业训练计划(AH201410376002)

* 通信作者 Tel: 86-564-3305033; E-mail: hanbx1978@sina.com

用。近年上市的非嘌呤型黄嘌呤氧化酶抑制剂非布司他降尿酸效果优于别嘌呤醇,可用于肾功能损伤的高尿酸血症患者^[5],但价格较高,增加了患者负担。中药有效成分、复方以黄嘌呤氧化酶、肾脏尿酸转运体为主要靶点应用于治疗高尿酸血症的研究越来越多,有成为疗效确切、安全性高的降尿酸药物的潜能^[6]。

蕨菜为蕨科蕨属植物蕨 *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn 的幼嫩叶,具清热化痰、利尿安神等功效。课题组前期深入研究了蕨菜的化学成分,并对黄酮类化合物进行了分离鉴定^[7-9];药理学研究发现蕨菜黄酮具有改善高脂大鼠的脂代谢紊乱、免疫调节等^[10]功能;其乙醇提取物具有降低高尿酸血症模型大、小鼠血清尿酸水平的作用。为此,本课题组拟基于黄嘌呤氧化酶作用靶点对蕨菜乙醇提取物进行降尿酸作用机理的初步探讨,并研究其对肾组织影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠,雄性,体重 25 ± 2 g;购自南京医科大学动物实验中心,许可证号:SCXK(苏)2002-0031。整个实验过程大、小鼠均正常饮食饮水。

1.2 药物和试剂

蕨菜采自安徽省六安市天堂寨地区,杀青后于烘箱中 103 °C 烘干至恒重,研碎过筛的蕨菜粉末,备用。尿酸、黄嘌呤氧化酶、肌酐、尿素氮、一氧化氮、内皮素试剂盒由南京建成生物工程研究所生产;氧嗪酸钾盐由美国 Sigma 公司生产;苯溴马隆片由宜昌长江药业有限公司,批准文号:国药准字 H20040348;别嘌呤醇片由广州白云山制药总厂生产,批准文号:国药准字 H44021492。苯溴马隆片、别嘌呤醇片研成粉末,临用前用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配制成一定浓度溶液备用。

1.3 实验仪器

UV1902 光束紫外可见分光光度计由上海奥析科学仪器有限公司生产;MR-96 酶标仪由深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产;台式高速离心机、旋转蒸发器等。

2 实验方法

2.1 受试物的制备

蕨菜乙醇提取物的制备:取干燥至恒重的蕨菜

干粉 500 g,加入 10 倍 75% 乙醇于 70 °C 提取 2 h,以相同条件提取 2 次,冷却后过滤,合并滤液,浓缩至 250 mL,每 1 mL 含生药量 2 g,备用。

2.2 蕨菜乙醇提取物对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用机理的初步研究

选取 70 只健康雄性昆明种小鼠,随机分成 7 组,每组 10 只,分别为正常组、模型组、蕨菜乙醇提取物(高、中、低)剂量组、别嘌呤醇组、苯溴马隆组。正常组与模型组每日灌胃 0.5% CMC-Na 溶液,蕨菜乙醇提取物高、中、低组分别灌胃蕨菜乙醇提取物 40 、 20 、 10 g/kg(生药量)、别嘌呤醇组灌胃别嘌呤醇 120 mg/kg、苯溴马隆组灌胃苯溴马隆 10 mg/kg,所用药物均用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液助悬,灌胃容量为 20 mL/kg,每天 1 次,连续 7 d。依据文献^[11],于给药第 3 d,除正常组外,其他各组灌胃给予氧嗪酸钾盐溶液 250 mg/kg,每天 1 次,连续 5 d 复制高尿酸血症小鼠模型。于末次灌胃氧嗪酸钾盐 1 h 后,摘眼球取血,离心取血清,按试剂盒说明书检测尿酸水平、黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XO)活性。取肝组织,生理盐水漂洗,滤纸吸干,放入 -80 °C 冰箱中,用于检测 XO 活性。

2.3 蕨菜乙醇提取物对高尿酸血症小鼠肾组织影响的研究

分组、给药及造模同 2.1 。于末次灌胃氧嗪酸钾盐 1 h 后,摘眼球取血,离心取血清,按试剂盒说明书检测尿酸水平、肌酐(Creatinine, Cr)、尿素氮(Urea nitrogen, BUN)水平。取肾组织,生理盐水漂洗,取一半放入 10% 福尔马林溶液中,用于病理组织学观察;一半放入 -80 °C 冰箱中,用于检测一氧化氮(Nitric oxide, NO)、内皮素(Endothelin, ET)水平。

2.4 数据处理

采用 SPSS 13.0 软件统计处理数据,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

3 实验结果

3.1 蕨菜乙醇提取物对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用机理的初步研究

与正常组比较,模型组小鼠血清尿酸水平、血清及肝脏黄嘌呤氧化酶活性明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,蕨菜乙醇高、中提取物组、苯溴马隆组、别嘌呤醇组均显著降低模型小鼠血清尿酸水平($P < 0.01$),蕨菜乙醇提取物组、苯溴马隆组血清及肝脏黄嘌呤氧化酶活性无明显变化($P > 0.05$),别嘌

呤醇组血清及肝脏黄嘌呤氧化酶活性明显降低($P < 0.01$)。见表1。

表1 蕨菜乙醇提取物对高尿酸血症小鼠血清尿酸水平及黄嘌呤氧化酶活性的影响

Table 1 Effect of *P. aquilinum* ethanol extract on uric acid in serum and the activity of xanthine oxidase in hyperuricemia mice

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	尿酸 UA ($\mu\text{mol/L}$)	血黄嘌呤氧化酶 XOD in serum (U/L)	肝黄嘌呤氧 XOD in liver (U/L)
正常组 Normal control	-	152 ± 18.5	0.11 ± 0.031	1.12 ± 0.234
模型组 Model group	-	213 ± 32.5 ^{ΔΔ}	0.17 ± 0.044 ^{ΔΔ}	1.78 ± 0.421 ^{ΔΔ}
蕨菜乙醇提取物组 <i>P. aquilinum</i> ethanol extract group	40	166 ± 23.4 ^{**}	0.16 ± 0.038	1.81 ± 0.501
	20	180 ± 28.3 ^{**}	0.17 ± 0.045	1.96 ± 0.448
	10	198 ± 25.6	0.15 ± 0.033	1.88 ± 0.522
苯溴马隆 Benzbromarone	0.01	175 ± 22.7 ^{**}	0.18 ± 0.045	1.73 ± 0.571
别嘌呤醇组 Allopurinol	0.12	171 ± 29.0 ^{**}	0.13 ± 0.029 ^{**}	1.40 ± 0.356 [*]

注:与正常组相比,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Note:compared with normal group,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$;compared with model group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 蕨菜乙醇提取物对高尿酸血症小鼠肾保护作用研究

与正常组相比,模型组血清尿酸水平、Cr、BUN、肾组织 ET 显著升高($P < 0.05$),肾组织 NO 水平显著降低($P < 0.05$),肾小管上皮损伤,表明高尿酸血症模型成功,并导致肾组织损伤;与模型组比较,蕨菜乙醇提取物高剂量组及苯溴马隆血清尿酸水平、Cr、BUN、ET 显著降低($P < 0.05$),NO 水平显著升

高($P < 0.05$)。见表2。模型组肾小管上皮细胞空泡及颗粒变性,刷状缘脱落,肾小管上皮细胞片状再生,肾间质多灶状单个核细胞浸润伴纤维组织增生;正常组与蕨菜乙醇提取物高剂量肾组织正常,中剂量组肾小管上皮细胞损伤脱落,低剂量组肾间质单个核细胞浸润,别嘌呤醇组肾小管上皮细胞损伤脱落,刷状缘丢失,苯溴马隆组肾小管上皮细胞颗粒变性。见图1。

表2 蕨菜乙醇提取物对高尿酸血症小鼠血尿酸、肾功能、肾组织 NO、ET 含量的影响

Table 2 Effect of *P. aquilinum* ethanol extract on renal function,NO,ET of renal tissue in hyperuricemia mice

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	尿酸 UA ($\mu\text{mol/L}$)	肌酐 Cr ($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮 BUN ($\mu\text{mol/L}$)	内皮素 ET (ng/gprot)	一氧化氮 NO ($\mu\text{mol/gprot}$)
正常组 Normal control	-	143 ± 20.3	1.12 ± 0.29	12.9 ± 1.31	32 ± 11.2	0.92 ± 0.31
模型组 Model group	-	205 ± 26.5 ^{ΔΔ}	1.76 ± 0.44 ^Δ	15.0 ± 1.89 ^Δ	69 ± 22.1 ^Δ	0.53 ± 0.18 ^Δ
蕨菜乙醇提取物组 <i>P. aquilinum</i> ethanol extract group	40	161 ± 19.4 ^{**}	1.32 ± 0.38 [*]	13.2 ± 1.33 [*]	40 ± 15.3 [*]	0.81 ± 0.28 [*]
	20	183 ± 30.9 ^{**}	1.56 ± 0.53	13.8 ± 2.12	52 ± 20.5	0.68 ± 0.22
	10	193 ± 35.7	1.67 ± 0.50	14.5 ± 1.93	60 ± 26.2	0.60 ± 0.25
别嘌呤醇组 Allopurinol	0.12	174 ± 16.8 ^{**}	1.53 ± 0.48 [*]	13.7 ± 1.98 [*]	45 ± 16.3 [*]	0.75 ± 0.16 [*]
苯溴马隆 Benzbromarone	0.01	180 ± 24.1 ^{**}	1.72 ± 0.60	15.2 ± 2.03	62 ± 16.6	0.49 ± 0.19

注:与正常组相比,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Note:compared with normal group,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$;compared with model group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

4 讨论与结论

氧嗉酸钾是目前国内外最常用的高尿酸血症造模药物^[12],可通过竞争性抑制哺乳动物,如大、小鼠的尿酸酶活性,使体内血尿酸水平短时间升高,并可维持较长时间。本实验中,采用氧嗉酸钾连续灌胃5d复制大、小鼠高尿酸血症模型,结果模型组大、小鼠血尿酸水平显著升高,表明高尿酸血症模型复

制成功。

尿酸生成的相关酶如黄嘌呤氧化酶、磷酸核糖焦磷酸合成酶、次黄嘌呤尿嘌呤磷酸核糖转移酶缺乏超活性及肌腺苷酸脱氨酶缺乏均会引起尿酸生成增多,其中黄嘌呤氧化酶是尿酸生成的关键控速酶;排泄减少主要是由于肾脏小管上皮尿酸转运体基因突变或缺失引起;尿酸生成增多和排泄减少均导致高尿酸血症。因此,控制尿酸生成速度的黄嘌呤氧

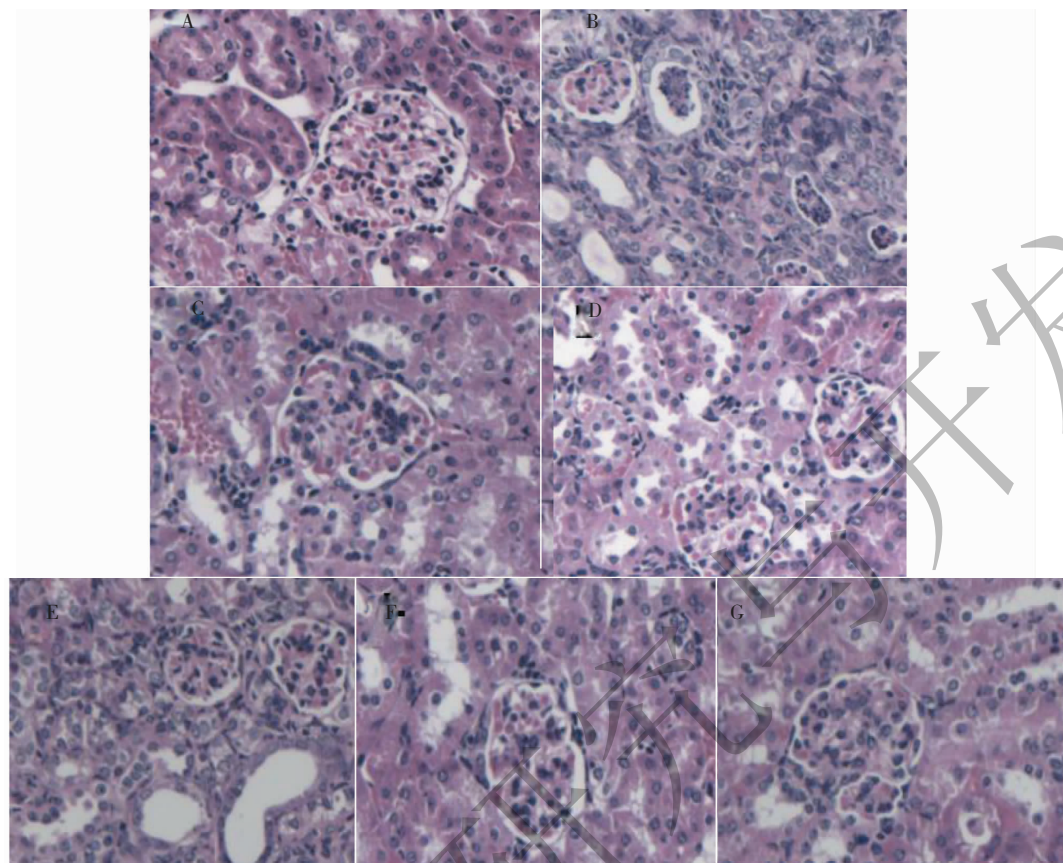


图1 正常组(A)、模型组(B)、蕨菜乙醇提取物高剂量组(C)、中剂量组(D)、低剂量组(E)、别嘌醇组(F)及苯溴马隆组(G)中高尿酸血症小鼠肾脏组织形态(HE×400)

Fig. 1 The renal morphology in hyperuricemia mice from normal control group (A), model group (B), *P. aquilinum* ethanol extract high dose group (C), middle dose group (D), low dose group (E), allopurinol group (F) and benzbromarone group (G) (HE×400)

化酶和负责尿酸转运的肾脏各种转运蛋白是目前抗高尿酸血症的主要作用靶点^[13]。本课题组在前期研究发现蕨菜乙醇提取物具有降低尿酸血症动物尿酸水平的作用。为此,本课题组以黄嘌呤氧化酶为作用靶点进行了蕨菜乙醇提取物降尿酸作用机理研究的初步研究,发现蕨菜乙醇提取物具有降低尿酸作用,但对血及肝脏黄嘌呤氧化酶活性均无影响,表明其降尿酸作用的靶点不是通过影响黄嘌呤氧化酶的活性,可能是通过影响其他尿酸生成酶的活性或作用于肾脏小管上的尿酸转运蛋白。

NO是强烈的血管舒张因子,可扩张肾脏血管,增加肾血流量,促进肾小球率过滤,保护肾单位;ET是强烈的血管收缩活性肽,收缩肾脏血管,减少肾血流,对肾功能产生不良影响^[14]。尿酸可通过抑制NO分泌、促进ET-1分泌造成肾血管强烈收缩,肾血流量减少而引起缺血缺氧,肾小球滤过率降低而

引起毒性物质排出减少,导致肾脏功能不全;Scr、BUN是肾功能的核心指标,能较为准确的反应肾实质受损的情况^[15]。为此,本课题选取血Cr与BUN、肾组织NO与ET-1及肾组织形态学作为探讨蕨菜乙醇提取物对高尿酸血症小鼠肾脏保护作用的判断性指标,结果发现蕨菜乙醇提取物组血Scr、BUN、肾组织ET-1显著降低,肾组织NO水平显著升高,高剂量肾组织形态正常,优于别嘌醇、苯溴马隆,表明其可通过调节肾血流量,保护肾脏免受损伤。

综上所述,蕨菜乙醇提取物具有降血尿酸及保护肾组织作用,其降尿酸作用机制不是通过影响黄嘌呤氧化酶活性,可能是通过影响其他尿酸生成酶的活性或作用于肾脏小管上的尿酸转运蛋白,其确切作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

1 Prasad Sah OS, Qing YX. Associations between hyperurice-

- mia and chronic kidney disease; A review [J]. *Nephrourol Mon*, 2015, 7(3): 27233.
- 2 Karis E, Crittenden DB, Pillinger MH. Hyperuricemia, gout, and related comorbidities; cause and effect on a two-way street[J]. *South Med J*, 2014, 107(4): 235-241
 - 3 Gaffo AL, Edwards NL, Saag KG, et al. Gout. Hyperuricemia and cardiovascular disease; how strong is the evidence for a causal link[J]? *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(4): 240.
 - 4 Lei SX(雷三霞), Yu CG(于长国), Zeng CY(曾春艳). Progress in hyperuricemia and renal injury. *J Med Postgra* (医学综述), 2014, 20: 1775-1777.
 - 5 Liu YK(刘永贵), Zhao JL(赵丽嘉), Cui YL(崔艳丽), et al. Research progress on anti-hyperuricemia drugs[J]. *Drugs Clin* (现代药物与临床), 2015, 30: 345-350.
 - 6 Wang HQ(王红权), Zhan J(詹杰), Wang XB(王小波), et al. Research progress in treatment of hyperuricemia with active ingredients of traditional Chinese medicine[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2015, 29: 471-476.
 - 7 Chen NF(陈乃富), Chen ND(陈乃东), Chen CW(陈存武), et al. Isolation and identification of flavonoids from *Pteridium aquilinum*(L.) Kuhn[J]. *J Biol* (生物学杂志), 2011, 28: 87-89.
 - 8 Chen ND, Chen NF, Chen CW, et al. Separation and structure elucidation of a new homoflavanol derivative from *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27: 1764-1769.
 - 9 Chen ND, Chen NF, Wang T, et al. A novel homoflavanoid from *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 577-580.
 - 10 Chen ND, Chen NF, Chen CW, et al. A novel bihomoflavanonol with an unprecedented skeleton from *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn [J]. *Chin Herbal Med*, 2013, 5(2): 96-100.
 - 11 Ding XQ, 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.
 - 12 Ma SJ(马思佳), Huo J(霍娇), Zhang LS(张立实). Research progress for animal hyperuricemia model [J]. *J Hygiene Res* (卫生研究), 2015, 44: 158-162.
 - 13 Wu XR(吴新荣), Zang LP(臧路平), Liu ZG(刘志刚). Research advances on drug therapy targets in hyperuricemia [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2010, 26: 1414-1417.
 - 14 Zhao W(赵卫). Effect of Yishen Huoxue granule on renal function and ET, NO in elderly hypertensive patients [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 2010, 29(5): 306-307.
 - 15 Li N(李宁), Ma JL(马居里), Guo W(郭伟). The effects of Fuzhengxiezhuobaoshen decoction on ET-1, Scr, BUN renal function and renal pathological changes in CRF rats [J]. *Chin J Integr Tradit Western Nephrol* (中国中西医结合肾病杂志), 2012, 13: 770-772.
-
- (上接第 587 页)
- 9 Xiao JB, Ni XL, Kai GY, et al. A review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting α -amylase [J]. *Food Sci Nutr*, 2013, 53: 497-506.
 - 10 Xiao JB, Kai GY, Yamamoto K, et al. Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors; a review on structure-activity relationship aspect [J]. *Rev Food Sci Nutr*, 2013, 53: 818-836.
 - 11 Xiao JB, Chen XQ, Zhang L, et al. Investigation of the mechanism of enhanced effect of EGCG on huperzine A's inhibition of acetylcholinesterase activity in rats by a multispectroscopic method [J]. *Food Chem*, 2008, 56: 910-915.
 - 12 Shao JN(邵静娜), Ge GP(葛国平), He WZ(何卫中), et al. Changes in biochemical components and the factors influencing the piling of Dark Tea [J]. *J Tea* (茶叶), 2015, 41: 137-141.
 - 13 Wang Q, Gong J, Chist Y, et al. Bioconversion of tea polyphenols to bioactive heabro-twnins by *Aspergillus fumigatus* [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36: 2515-2522.
 - 14 Foster MT, Gentile CL, Cox-York K, et al. Fuzhuan tea consumption imparts hepatoprotective effects and alters intestinal microbiota in high saturated fat diet-fed rats [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60: 1213-1220.
 - 15 Wang YL, Xu AQ, Liu P, et al. Effects of Fuzhuan Brick-Tea water extract on mice infected with *E. coli* O157:H7 [J]. *Nutrients*, 2015, 7: 5309-5326.
 - 16 Amy CK, Tiffany LW, Corey DB, et al. Antibacterial activity and phytochemical profile of fermented *Camellia sinensis* (fuzhuan tea) [J]. *Food Res Int*, 2013, 53: 945-949.
 - 17 Li Z, Scott MJ, Fan EK, et al. Tissue damage negatively regulates LPS-induced macrophage necroptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23: 1428-1447.