

3,5,2',4'-四羟基查尔酮对小鼠尿酸及尿酸合成相关酶基因的影响

刘 恺^{1,2}, 林 华¹, 高丽辉¹, 刘 旭¹, 李 玲¹, 牛艳芬^{1*}

¹昆明医科大学生物医学工程研究中心, 昆明 650500; ²衡阳市中心医院药学部临床药理学, 衡阳 421001

摘要:用氧嗪酸钾诱导高尿酸血症动物模型,对化合物3,5,2',4'-四羟基查尔酮(P40)的降尿酸作用及尿酸合成相关酶基因进行研究。用磷钨酸法测定小鼠血清尿酸水平,用RT-PCR测定脑组织中次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)、肝脏中的磷酸核糖焦磷酸合成酶(PRPS)和磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶(PRPPAT)mRNA的表达水平。结果表明:灌胃给予高尿酸血症小鼠P40 2、4、8 mg/kg和阳性对照药别嘌醇1 mg/kg,共给药5次,每天2次,均显著降低血清尿酸水平($P < 0.05, 0.01$),具有显著的降尿酸作用;但对HGPRT、PRPS、PRPPAT的mRNA表达水平无明显影响。

关键词:3,5,2',4'-四羟基查尔酮;高尿酸血症;尿酸;次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶;磷酸核糖焦磷酸合成酶;磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.1.023

Effects of 3,5,2',4'-Tetrahydroxychalcone on Serum Uric Acid Levels and Some Key Enzymes Involved in Uric Acid Production in Oxonate-induced Hyperuricemic Mice

LIU Kai^{1,2}, LIN Hua¹, GAO Li-hui¹, LIU Xu¹, LI Ling¹, NIU Yan-fen^{1*}

¹Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

²Central Hospital of Hengyang, Hengyang 421001, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of 3,5,2',4'-tetrahydroxychalcone (P40) on serum uric acid level, the mRNA expression level of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) of brain, 5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate synthetase (PRPS) and phosphoribosyl amidotransferase (PRPPAT) of liver in hyperuricemic mice. The hyperuricemic mice were induced by an intraperitoneal injection of uricase inhibitor potassium oxonate. All drugs were given intragastrically twice daily for five doses. Serum uric acid levels were determined at 1 h after the last dosage. The effects of P40 with different doses on HGPRT, PRPS and PRPPAT mRNA expression level were examined by the means of RT-PCR. The results showed serum uric acid levels in the model group were increased obviously ($P < 0.01$). Compared with the model group, serum uric acid levels were decreased significantly in groups received P40 at the doses of 2, 4, 8 mg/kg ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). P40 at doses of 2, 4, 8 mg/kg had no significant effect on the mRNA expression of HGPRT, PRPS and PRPPAT in hyperuricemic mice ($P > 0.05$). Hence, P40 can reduce the serum uric acid levels in oxonate-induced hyperuricemic mice, but not inhibiting the mRNA expression of HGPRT in brain as well as PRPS and PRPPAT in liver under the experimental condition.

Key words: 3,5,2',4'-tetrahydroxychalcone; hyperuricemia; hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; 5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate synthetase; phosphoribosyl amidotransferase

痛风是由于嘌呤代谢紊乱引起尿酸生成增多或排泄减少的一种临床综合症,其临床主要表现是高

尿酸血症。研究发现我国高尿酸血症的发病率呈逐渐上升趋势^[1,2],且高尿酸血症与肥胖症,心脑血管疾病,糖尿病等代谢性疾病密切相关^[3,4]。原发性高尿酸血症的发生与尿酸生成增多和排泄减少有关,其中尿酸生成增多在高尿酸血症病因中约占10%,其主要原因是嘌呤代谢过程中酶的异常引起,

收稿日期:2015-09-08 接受日期:2015-11-25

基金项目:国家自然科学基金(81260503);云南省应用基础研究计划(2012FB020)

* 通讯作者 Tel:86-015987121575; E-mail:506355389@qq.com

特别是一些关键酶如黄嘌呤氧化酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT)、磷酸核糖焦磷酸合成酶(5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate synthetase, PRPS)和磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶(phosphoribosyl amidotransferase, PRPPAT),它们的基因突变都可引发嘌呤核苷酸代谢紊乱,进而引起高尿酸血症和痛风。

P40(C₁₅H₁₂O₅)化学名为3,5,2',4'-四羟基查尔酮(图1),系中国科学院昆明植物研究所朱华结研究员课题组以3,5-二羟基苯甲酸为原料合成的查尔酮类化合物^[5]。本课题组前期研究发现P40在体外对黄嘌呤氧化酶有抑制作用,抑制类型为竞争性抑制剂;灌胃给予P40可降低高尿酸血症小鼠的血尿酸水平,并发现其降尿酸的机制与抑制黄嘌呤氧化还原酶活性相关^[6,7],已获国家发明专利(专利号:ZL 2010 1 0144406.9)。然而,P40对嘌呤代谢的其它关键酶的影响尚未见报道,因此,本文将研究P40对嘌呤代谢过程中的关键酶——脑组织中HGPRT、肝脏中PRPS和PRPPAT mRNA表达的影响,进一步了解其治疗高尿酸血症和痛风作用机制。

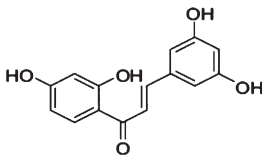


图1 3,5,2',4'-四羟基查尔酮(P40)的结构式

Fig. 1 Structure of 3,5,2',4'-tetrahydroxychalcone (P40)

1 材料与方法

1.1 试验药物

P40:由中科院昆明植物研究所朱华结研究员课题组合成并提供,分子量为272.25;别嘌醇片:广东彼迪药业有限公司产品。临用前用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配制成不同浓度备用。

1.2 动物

昆明种小鼠,由昆明医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(滇)2011-0004,饲养管理条件:SPF级动物实验室,室温为20±2℃,相对湿度60%~70%。

1.3 试剂

尿酸测定试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合

成;总RNA提取试剂盒:TIANGEN公司产品;Revert Aid™ First Strand Fermentas cDNA Synthesis;Fermentas公司产品;PCR Master Mix Kit:TIANGEN公司产品。氧嗪酸钾:Aldrich产品,纯度97%,批号STBC1486。其他试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器

全波长酶标仪:Molecular Devices公司,型号:SPECTRA MAX190;超声细胞破碎仪(美国Sonic公司,型号:SONICS VCX30);ND-1000分光光度计(NanoDrop公司);Gene Cycle™ PCR扩增仪(BIO-RAD公司);水平电泳仪(BIO-RAD);凝胶成像分析仪(BIO-RAD,型号:Gel Doc XR)

1.5 方法

健康雄性昆明种小鼠60只,随机分为空白对照组,高尿酸血症模型对照组,P40低、中、高剂量组(2、4、8 mg/kg),别嘌醇组(1 mg/kg,阳性对照),每组10只,连续灌胃给药5次,每天2次。末次给药前1 h腹腔注射450 mg/kg氧嗪酸钾造成高尿酸血症模型^[8,9],并禁食。末次给药1 h后,眼球后静脉丛取血0.8 mL,3000 rpm离心10 min,取血清100 μL用于测定尿酸水平,同时取肝、脑组织,液氮速冻1 h后,-80℃冰箱贮存待测HGPRT、PRPS、PRPPAT mRNA的表达。

1.5.1 尿酸测定

用磷钨酸法测定血清尿酸水平^[10]。

1.5.2 HGPRT、PRPS、PRPPAT mRNA表达的测定

取小鼠组织(肝脏和脑)60 mg,加入1 mL裂解液中,将组织剪碎,再用超声波细胞破碎仪破碎,按照试剂盒说明书提取总RNA,反转录合成cDNA。按照PCR试剂盒说明书进行扩增,PCR引物序列如表1。取各PCR产物10 μL,经1.5%琼脂糖凝胶电泳、核酸染料染色后,在BIO-RAD凝胶成像系统进行凝胶成像,并对条带进行灰度分析。

1.5.3 统计学处理

试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Graphpad 5.0软件进行单因素方差分析,用Dunnett's进行统计学检验。

2 实验结果

2.1 P40对氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的影响

结果见表2:与空白对照组相比,模型组血清尿酸水平显著升高,提示模型成功;与模型组相比,

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primers sequences

基因 gene	引物(5'-3') primer(5'-3')
HGPRT	上游引物 Forward primer: GTTCTTTGCTGACCTGCTG 下游引物 Reverse primer: GCCTGTATCCAACACTTCG
PRPS	上游引物 Forward primer: AAGTTTAGCAACCAGGAGACC 下游引物 Reverse primer: CCCGAATCCACTGAAGAA
PRPPAT	上游引物 Forward primer :CGAGGAATGTGCTGTGTTT 下游引物 Reverse primer:TACGAATGGCTGGCAGTT
mGAPDH	上游引物:Forward primer: TGAGCCCGTGCTGACTATGT 下游引物 Reverse primer: CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

P40(2,4,8 mg/kg) 治疗组中血尿酸水平显著降低, 与等摩尔的别嘌醇(1 mg/kg) 相比, 差异无统计学意义($P < 0.05, 0.01$), P40(2 mg/kg) 意义($P > 0.05$)。

表 2 P40 对高尿酸血症小鼠血清尿酸(SUA) 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of P40 on serum uric acid levels in hyperuricemic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	血清尿酸 SUA ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照 Control	0.5% CMC-Na	106.77 \pm 2.20
模型对照 Model	0.5% CMC-Na	144.39 \pm 9.21 ^{##}
P40 低剂量 P40-L	2	122.47 \pm 4.13 [*]
P40 中剂量 P40-M	4	116.66 \pm 3.23 ^{**}
P40 高剂量 P40-H	8	126.80 \pm 6.59 [*]
别嘌醇 Allopurinol	1	104.66 \pm 6.94 ^{**}

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 P40 对氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠 HGPRT、PRPS、PRPPAT mRNA 的影响

与正常组相比,模型组的 HGPRT mRNA 表达产物有所上调,但差异无统计学意义。与模型组相比, P40 各剂量组和别嘌醇组对氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠脑组织中 HGPRT mRNA 表达没有明显影响,结果见图 2。

与正常组相比,模型组的 PRPS mRNA 表达产物有所下调,但差异无统计学意义;与模型组相比, P40 各剂量组可以下调高尿酸血症小鼠肝组织中 PRPS mRNA 的表达,且随着剂量的增加表达水平降低,但是差异无统计学意义,别嘌醇组 PRPS mRNA 的表达与模型组相比没有下调。结果见图 3。

与正常组相比,模型组的 PRPPAT mRNA 表达产物有所下调,但差异无统计学意义;与模型组相比, P40 各剂量组和别嘌醇组可以下调高尿酸血症小鼠肝组织中 PRPPAT mRNA 的表达,且随着剂量的增加表达水平降低,但是差异无统计学意义。结果见图 4。

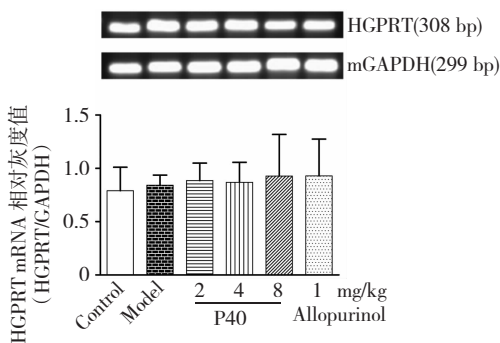


图 2 P40 对氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠 HGPRT mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effects of P40 on expression of HGPRT mRNA in potassium oxonate-induced hyperuricemic mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

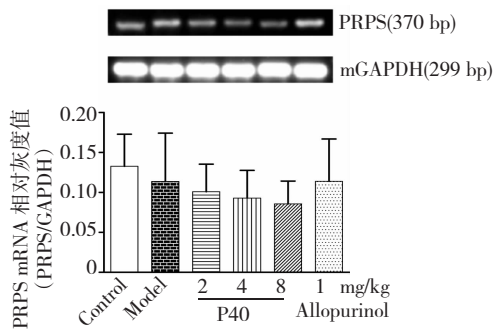


图3 P40对氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠PRPS mRNA相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effects of P40 on expression of PRPS mRNA in potassium oxonate-induced hyperuricemic mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与空白对照组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note:Compared with model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; compared with control group,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

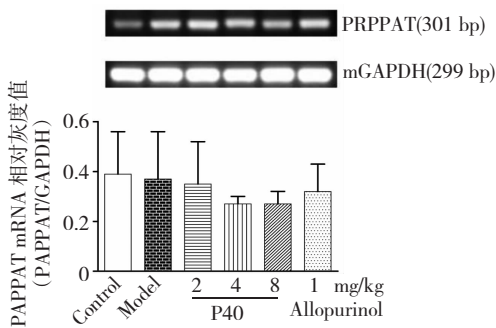


图4 P40对氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠PRPPAT mRNA相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 Effects of P40 on expression of PRPPAT mRNA in potassium oxonate-induced hyperuricemic mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与空白对照组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note:Compared with model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; compared with control group,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

3 讨论

本实验采用一次性腹腔注射氧嗪酸钾复制急性高尿酸血症动物模型,在该模型上观察到P40能明显降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平,其效价与阳性对照药别嘌醇相当,这与前期研究结果一致^[6,7]。此外,别嘌醇为临床一线降尿酸药物,其成人临床用量为50~100 mg/d,若按50 mg/d计算,小鼠剂量应

是8.3 mg/kg(成人剂量的10倍),然而,前期预实验结果表明别嘌醇剂量低至1 mg/kg即能明显降低氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠的血尿酸水平,且比较稳定,这可能与种属有关,提示小鼠体内的尿酸氧化酶并未被氧嗪酸钾完全抑制,部分尿酸被尿酸氧化酶分解为水溶性尿囊素,随尿排出体外,因而,别嘌醇的动物用量远远小于人用剂量。

高尿酸血症与内源性嘌呤代谢紊乱密切相关。PRPS是嘌呤核苷酸从头合成和补救合成途径的关键酶,其作用是催化5'-磷酸核糖和ATP合成磷酸核糖焦磷酸(Phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP),PRPP作为嘌呤合成的前体促进嘌呤核苷酸在体内的合成代谢。PRPS基因突变导致PRPS活性升高,使PRPP和嘌呤核苷酸生成过多,导致了嘌呤代谢终产物尿酸的增多。PRPPAT也属于嘌呤核苷酸从头合成途径的限速酶,在PRPPAT的催化下,谷氨酰胺提供酰胺基取代了PRPP的焦磷酸基团,形成 β -5-磷酸核糖胺(β -5-phosphoribasylamine, PRA),PRA是嘌呤核苷酸合成代谢过程中的一个中间产物,PRPPAT受到嘌呤核苷酸的负反馈抑制,如果PRPPAT的基因突变导致酶的活性升高会促进嘌呤核苷酸的从头合成,也会导致尿酸的增多。HGPRT是嘌呤核苷酸补救合成途径中的限速酶,调节次黄嘌呤和鸟嘌呤的循环利用(图5)。HGPRT在PRPP存在下将次黄嘌呤催化反应转化为次黄嘌呤核苷酸,把鸟嘌呤转化为鸟嘌呤核苷酸。当HGPRT基因突变致酶活性降低时,次黄嘌呤核苷酸和鸟嘌呤核苷酸合成减少,引起PRPP蓄积,PRPP作为谷氨酰胺转氨酶的底物加速了该酶催化的嘌呤从头合成,进而导致血中尿酸水平增高,出现高尿酸血症;同时HGPRT活性不足时,鸟嘌呤和次黄嘌呤不能被利用合成核苷酸或被清除将导致代谢产物尿酸的生成的增多。在本实验中,P40对HGPRT、PRPS、PRPPAT mRNA表达水平的影响不明显,可能是P40对XOD/XDH有较高的选择性,与新的黄嘌呤氧化酶抑制剂非布索坦类似。P40和选择性XO抑制剂——非布索坦一样,同为非嘌呤类似物,结构中缺少嘌呤环,其作用特点之一是其对黄嘌呤氧化酶的抑制作用具有高度选择性,非布索坦对其它嘌呤和嘧啶代谢的酶没有明显的活性,靶点的专一性使得其更不易由于影响嘌呤代谢过程中的酶类的活性引发不良反应,而这正是别嘌醇发生不良反应的一个重要原因^[11-13]。然而,P40对HGPRT、PRPS和PRPPAT的活性是否有影响还有待进一步研究。此外,

基因的表达与时间相关,给药时间短,也可能导致基因表达的差异性不显著,随着用药时间的延长是否会对基因表达产生影响还有待进一步研究。P40 对

HGPRT、PRPS 和 PRPPAT 的活性是否有影响尚需进一步研究。

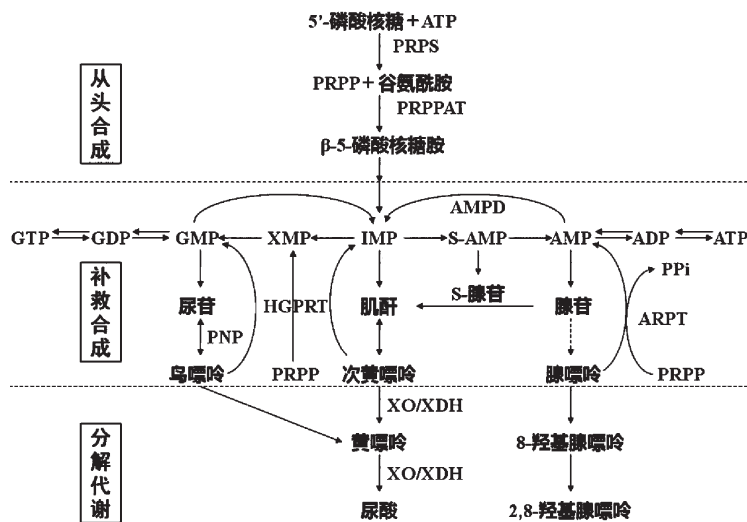


图5 嘌呤核苷酸代谢图

Fig. 5 Purine nucleotide metabolism

4 结论

P40 能有效降低氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠的血尿酸水平,但在有效治疗剂量下对嘌呤代谢关键酶 HGPRT、PRPS 和 PRPPAT 的 mRNA 表达水平无明显影响。

参考文献

- Miao ZM, Li C, Chen Y, *et al.* Dietary and lifestyle changes associated of hyperuricemia and gout in the Shandong coastal cities of Eastern China. *Rheumatol*, 2008, 35:1859-1864.
- Miao ZM (苗志敏), Zhao SH (赵世华), Wang YG (王颜刚), *et al.* Epidemiological survey of hyperuricemia and gout in coastal areas of Shandong Province. *Chin J Endocrinol Metab* (中华内分泌代谢杂志), 2006, 22:421-425.
- Noskance L, Laaksonen DE, Lindstrom J, *et al.* Serum uric acid as a harbinger of metabolic outcome in subjects with impaired glucose tolerance; the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes Care*, 2006, 29:709-711.
- Nislanen LK, Laaksonen DE, Nyysönen. *et al.* Uric acid level as a risk factor for cardiovascular and all cause mortality in middle-aged men; a prospective cohort study. *Arch Intern Med*, 2004, 164:1546-1551.
- Liao TG (廖头根), Wang QA (汪秋安), Fang WQ (方伟琴), *et al.* Studies on the synthesis of novel chalcone and biological activity. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2006, 26:685-689.

- Niu YF, Zhu HJ, Liu J, *et al.* 3,5,2',4'-Tetrahydrochalcone, a new non-purine xanthine oxidase inhibitor. *Chem-Biol Interact*, 2011, 189:161-166.
- Niu YF (牛艳芬), Liu K (刘恺), Gao LH (高丽辉), *et al.* Effects of 3,5,2',4'-tetrahydrochalcone on serum uric acid levels and the content of hepatic XO/XDH in mice. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2015, 50:34-38.
- Ducki S. Antimitotic chalcones and related compounds as inhibitors of tubulin assembly. *Anti-Cancer agents Me*, 2009, 9:336-347.
- Juvalle K, Pape VF, Wiese M. Investigation of chalcones and benzochalcones as inhibitors of breast cancer resistance protein. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20:346-355.
- Tian J, Li G, Liu Z, *et al.* Hydroxysafflor yellow A inhibits rat brain mitochondrial permeability transition pores by a free radical scavenging action. *Pharmacology*, 2008, 82:336-347.
- Takano Y, Hase AK, Horiuchi H, *et al.* Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sci*, 2005, 76:1835-1847.
- Zhao L, Takano Y, Horiuchi H. Effect of febuxostat, a novel non-purine, selective inhibitor of xanthine oxidase (NP-SIXO), on enzymes in purine and pyrimidine metabolism pathway. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(Suppl 9):S531.
- Hande KR, Noone RM, Sone WJ. Severe allopurinol toxicity: Description and guidelines for prevention in patients with renal insufficiency. *Am J Med*, 1984, 76(1):47-55.