

海带褐藻多糖硫酸酯对腺嘌呤诱导的小鼠高尿酸血症的拮抗作用

张大艳¹, 肖 为¹, 陶叶杏², 谷毅鹏³, 刘华忠^{4*}

¹广东海洋大学食品科技学院, 湛江 524088; ²桂林医学院科学实验中心, 桂林 541004;

³中国农业科学院广西水牛研究所, 南宁 530001; ⁴广东海洋大学理学院, 湛江 524088

摘要: 本文探讨了海带褐藻多糖硫酸酯 (fucoidan from *Laminaria japonica*, FL) 对腺嘌呤诱导的小鼠高尿酸血症的拮抗作用。首先利用腺嘌呤灌胃法建立高尿酸血症动物模型, 再以不同剂量 (0.100、0.150、0.200 g/kg) 的海带褐藻多糖硫酸酯治疗 4 周, 最后对小鼠血清尿酸、肌酐、肝脏匀浆液中腺苷脱氨酶 (ADA) 和黄嘌呤氧化酶 (XOD) 的活性及小鼠肾脏组织病理学变化进行检测 (HE 染色)。结果表明, 与空白组相比, 腺嘌呤能极显著升高小鼠血清尿酸、肌酐水平、肝脏 XOD 及 ADA 活性 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 海带褐藻多糖硫酸酯各剂量均能极显著降低小鼠血清尿酸、肌酐水平、肝脏 XOD 及 ADA 活性 ($P < 0.01$)。光镜观察结果显示, 与模型组相比, 海带褐藻多糖硫酸酯治疗组小鼠的肾损伤有一定程度恢复。综上所述, 海带褐藻多糖硫酸酯对腺嘌呤诱导的小鼠高尿酸血症有一定程度的缓解作用。

关键词: 海带褐藻多糖硫酸酯; 高尿酸血症; 嘌呤代谢

中图分类号: Q493.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.021

Antagonistic Effect of Fucoidan from *Laminaria japonica* Against Adenine-Induced Hyperuricemia in Mice

ZHANG Da-yan¹, XIAO Wei¹, TAO Ye-xing², GU Yi-peng³, LIU Hua-zhong^{4*}

¹College of Food Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

²Science Experiment Center, Guilin Medical University, Guilin 541004, China; ³Guangxi

Buffalo Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Nanning 53001, China;

⁴College of science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: The antagonistic effect of fucoidan from *Laminaria japonica* (FL) on hyperuricemia in mice induced by adenine was studied. The hyperuricemia mice model was established by oral gavage of adenine, and then cured by different doses of FL (0.100, 0.150, 0.200 g/kg) for 4 weeks. The level of mice serum uric acid, creatinine, the activity of homogenate of adenosine deaminase (ADA) and xanthine oxidase (XOD) in liver, and HE staining of kidney were measured. Results showed that, mice exposed to the adenine presented significantly higher level of uric acid, creatinine, activities of ADA and XOD ($P < 0.01$) than these of normal mice, but mice exposed to the different doses of FL significantly reduced the level of uric acid, creatinine, activities of ADA and XOD ($P < 0.01$) when compared to model group. In addition, the kidney histopathology was observed to restore to normal conditions in FL treatment mice. In conclusion, FL exhibited an obviously positive effect on hyperuricemia mice.

Key words: fucoidan; hyperuricemia; purine metabolism

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是由于机体内的嘌呤代谢异常或肾脏对尿酸的排泄障碍而引起血液中尿酸浓度的不正常升高而导致的一种代谢性疾病^[1]。近年来, 随着生活质量的不断提高, 人们

摄入富含蛋白质和嘌呤的食物也不断增多, 进而高尿酸血症的患者也逐年增多^[2]。目前, 黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌醇^[3]、丙磺舒、苯溴马隆^[4,5]等是治疗高尿酸血症的主要药物, 但这些药物大多在体内的代谢时间长, 易造成蓄积, 对机体毒副作用较大。因此, 急需探索出一些既能降低血清尿酸水平而又对机体无损害或损害较小的药物或前体物。

褐藻多糖硫酸酯 (Fucoïdan polysaccharide sulfate, FPS) 是由高度支链化的 α -L-岩藻糖-4-硫酸酯聚合成的天然硫酸酯多糖类物质^[6]。研究表明,海带来源的褐藻多糖硫酸酯 (fucoïdan from *Laminaria japonica*, FL) 具有良好的抗凝血、抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗氧化及免疫调节等生物活性^[7],对于肾脏和肝脏均有保护作用^[8,9]。本课题通过研究不同剂量的海带褐藻多糖硫酸酯对腺嘌呤诱导的高尿酸血症小鼠的拮抗作用,为进一步开发和利用海带褐藻多糖硫酸酯治疗高尿酸血症提供动物试验依据,拓宽其应用范围。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级性成熟的昆明雄性小鼠,8周龄共72只,个体质量 28.57 ± 1.05 g,购自广西医科大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK桂2014-0002。

1.1.2 试剂

海带褐藻多糖硫酸酯(西安百川生物科技有限公司);腺嘌呤(Adenine, Sigama-Aldrich);别嘌呤醇(Allopurinol, Sigma-Aldrich);尿酸、肌酐、XOD、ADA及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器设备

MP200A型电子天平(上海精科);U-3310型分光光度计(日立);ULT-2186-3超低温冰箱(美国Revco公司);BX51型多功能显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组和处理

72只雄性昆明小鼠适应性饲养7d,随机分为6组,分别是正常对照组、模型组、阳性对照组以及FL低、中、高剂量组。

各组处理情况如下所示:正常组:灌胃蒸馏水,上午和下午各一次;模型组:上午定时灌胃75 mg/(kg·d)的腺嘌呤,下午灌胃等体积的蒸馏水;阳性对照组:上午定时灌胃75 mg/(kg·d)的腺嘌呤,下午灌胃45 mg/(kg·d)^[1]的别嘌呤醇;FL低剂量组:上午定时灌胃75 mg/(kg·d)的腺嘌呤,以100 mg/(kg·d)剂量在下午定时灌胃海带褐藻多糖硫酸酯;FL中剂量组:上午定时灌胃75 mg/(kg·d)的腺嘌呤,以150 mg/(kg·d)剂量在下午定时灌胃海带褐藻多糖硫酸酯;FL高剂量组:上午定时灌

胃75 mg/(kg·d)的腺嘌呤,以200 mg/(kg·d)剂量在下午定时灌胃海带褐藻多糖硫酸酯。各处理组每次灌胃体积均为0.2 mL,实验周期为4周。

1.2.2 样品制备

实验开始时记录小鼠体重,以后每隔7d称重一次并记录,4周实验结束时,摘眼球取血,分离血清,-20℃保存。脱颈椎处死小鼠,解剖取心、肝、肾脏于-70℃冰箱中保存备用。

1.2.3 组织病理学检测

用预冷生理盐水清洗小鼠肾脏,用吸水纸擦干并称重,然后将一侧肾脏于10%中性甲醛溶液中固定24h,脱水石蜡包埋,以4~5 μ m厚度连续切片,置于干净载玻片后,用苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察病理变化。

1.2.4 小鼠脏器系数测定

用预冷生理盐水清洗小鼠心脏、肝脏、肾脏,称重后,按公式:脏器系数=脏器重量(g)/体重(100g)来计算小鼠心、肝脏、肾脏系数。

1.2.5 高尿酸血症相关指标的测定

摘眼球取血后,4℃放置12h,以3500 rpm离心,分离得到的血清按试剂盒方法测定尿酸、肌酐含量。

肝脏样品加生理盐水匀浆,制成10%的组织液,4000 rpm离心后取上清,按试剂盒方法测定肝脏XOD和ADA活力。

1.2.6 数据分析

实验结果采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,用JMP软件进行数据分析,采用t检验进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 实验结果

2.1 病理学观察结果

2.2 对高尿酸小鼠血清尿酸的影响

由表1可知,与空白组相比,模型组小鼠血清尿酸和肌酐水平升高极显著($P < 0.01$),而阳性对照组和中、高剂量治疗组均无统计学差异。与模型组相比,阳性对照组和各药物治疗组小鼠血清尿酸水平均极显著降低($P < 0.01$),各治疗组肌酐水平有所降低。说明海带褐藻多糖硫酸酯能明显地降低血清尿酸水平,并对小鼠肾脏损伤有一定的缓解作用。

2.3 对高尿酸小鼠肝脏XOD及ADA活性的影响

由表2可知,与空白组相比,模型组小鼠肝脏ADA和XOD的活性升高极显著($P < 0.01$)。与模

型组相比,阳性对照组与治疗组中的高剂量组小鼠

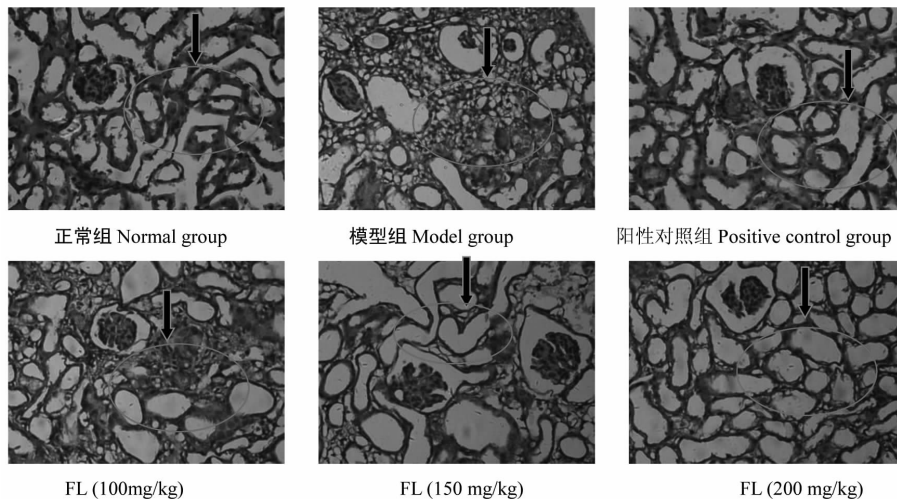


图1 海带多糖硫酸酯对肾脏组织病理学变化的影响(HE,10×40)

Fig. 1 Effect of fucoidan from *L. japonica* on kidney tissue pathological change

表1 海带褐藻多糖硫酸酯对小鼠血清尿酸和肌酐水平的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of fucoidan from *L. japonica* on serum uric acid and Cr levels in mice ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	尿酸 Serum uric acid ($\mu\text{mol/L}$)	肌酐 Cr (mmol/L)
正常组 Normal group	255.29 \pm 36.00 ^{Cc}	121.12 \pm 5.76 ^{De}
模型组 Model group	448.71 \pm 30.89 ^{Aa}	247.54 \pm 37.38 ^{Aa}
阳性对照组 Positive control group	279.45 \pm 12.91 ^{BCe}	128.72 \pm 20.63 ^{CDde}
FL (100 mg/kg)	316.53 \pm 19.62 ^{Bb}	167.25 \pm 16.53 ^{Bb}
FL (150 mg/kg)	263.21 \pm 15.67 ^{Cc}	142.06 \pm 18.56 ^{BCDed}
FL (200 mg/kg)	271.76 \pm 21.35 ^{BCe}	149.13 \pm 17.79 ^{BCe}

注:同列间多重比较,大写字母表示差异极显著, $P < 0.01$;小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。下同。

Note: Within the same column, capital letter indicated extremely significant difference, $P < 0.01$; Lowercase letters indicated significant difference, $P < 0.05$. Same as below.

肝脏 ADA 活性极显著降低($P < 0.01$),中剂量组 XOD 活性显著降低($P < 0.01$)。结果表明,海带褐藻多糖硫酸酯能拮抗腺嘌呤的毒副作用,修复小鼠

肝脏内 ADA 和 XOD 水平的异常,对肝脏损伤具有一定的保护作用。

表2 海带褐藻多糖硫酸酯对小鼠肝脏 XOD 及 ADA 活性的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of fucoidan from *L. japonica* on the XOD and ADA activities in mice liver ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	ADA (U/mgprot)	XOD (U/gprot)
正常组 Normal group	4.98 \pm 0.81 ^{Cc}	21.22 \pm 2.77 ^{Bb}
模型组 Model group	8.23 \pm 0.92 ^{Aa}	28.24 \pm 1.55 ^{Aa}
阳性对照组 Positive control group	5.89 \pm 1.08 ^{BCbc}	22.34 \pm 2.63 ^{Bb}
FL (100 mg/kg)	7.28 \pm 1.36 ^{ABa}	26.50 \pm 2.62 ^{Aa}
FL (150 mg/kg)	6.95 \pm 1.12 ^{ABab}	21.78 \pm 2.84 ^{Bb}
FL (200 mg/kg)	4.81 \pm 1.55 ^{Cc}	15.94 \pm 1.04 ^{Cc}

2.4 对高尿酸小鼠体重及各脏器系数的影响

由表3和表4可知,与正常组相比,模型组小鼠的体重显著降低($P < 0.05$),从第三周开始,体重极显著下降($P < 0.01$),肝脏和肾脏系数极显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,阳性对照组和各剂量

组的肝脏和肾脏系数均有所下降($P < 0.05$),而心脏系数无统计学差异,说明海带褐藻多糖硫酸酯对腺嘌呤所致的高尿酸血症小鼠的肝脏和肾脏损伤具有保护作用。

表3 海带褐藻多糖硫酸酯对小鼠体重的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of fucoidan from *L. japonica* on body weight of mice ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	体重 Weight (g)				
	0 w	1 w	2 w	3 w	4 w
正常组 Normal group	28.83 ± 2.69	38.75 ± 2.05 ^{Aa}	41.50 ± 2.84 ^{Aa}	41.92 ± 2.39 ^{Aa}	43.83 ± 2.66 ^{Aa}
模型组 Model group	28.17 ± 2.17	35.50 ± 2.91 ^{Ab}	35.75 ± 5.61 ^{Ab}	32.91 ± 6.89 ^{Bb}	33.67 ± 7.42 ^{BCbc}
阳性对照组 Positive control group	28.58 ± 1.31	29.44 ± 1.88 ^{Dc}	30.22 ± 3.90 ^{Bc}	28.63 ± 3.50 ^{Bb}	28.71 ± 4.15 ^{BCcd}
FL (100 mg/kg)	28.58 ± 1.31	31.08 ± 3.32 ^{CDde}	35.00 ± 4.81 ^{Bbc}	32.73 ± 4.20 ^{Bb}	31.30 ± 5.23 ^{BCbcd}
FL (150 mg/kg)	28.67 ± 1.30	32.58 ± 4.40 ^{BCDcd}	32.25 ± 7.70 ^{Bbc}	31.00 ± 8.54 ^{Bb}	33.00 ± 7.02 ^{BCbc}
FL (200 mg/kg)	28.00 ± 1.35	29.18 ± 3.84 ^{Dc}	31.89 ± 5.64 ^{Bbc}	32.63 ± 5.37 ^{Bb}	32.25 ± 5.09 ^{BCcd}

表4 海带褐藻多糖硫酸酯对小鼠各脏器系数的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of fucoidan from *L. japonica* on LRW, KRW and HRW in mice ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	肝脏系数 LRW (%)	肾脏系数 KRW (%)	心脏系数 HRW (%)
正常组 Normal group	3.64 ± 0.90 ^{Bc}	1.23 ± 0.14 ^{Bc}	0.51 ± 0.10 ^{Aab}
模型组 Model group	5.10 ± 0.50 ^{ABa}	1.69 ± 0.24 ^{Aa}	0.54 ± 0.11 ^{Aab}
阳性对照组 Positive control group	4.73 ± 1.10 ^{Aab}	1.55 ± 0.41 ^{ABab}	0.47 ± 0.10 ^{Aab}
FL (100 mg/kg)	4.54 ± 0.57 ^{Aab}	1.51 ± 0.28 ^{ABab}	0.51 ± 0.07 ^{Aab}
FL (150 mg/kg)	4.42 ± 0.57 ^{ABb}	1.42 ± 0.15 ^{ABbc}	0.44 ± 0.05 ^{Ab}
FL (200 mg/kg)	4.42 ± 0.30 ^{ABb}	1.39 ± 0.19 ^{Bbc}	0.49 ± 0.08 ^{Aab}

3 讨论

现代研究表明,高尿酸血症是嘌呤代谢紊乱所致,而高蛋白膳食的过量摄入是引起嘌呤代谢紊乱的决定性因素。目前,临床上主要采取促尿酸代谢和抑制尿酸在体内生成来治疗高尿酸血症^[10]。但是,作为促进尿酸排泄的苯溴马隆,以及黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇,均存在一定的不良反应,会造成过敏、造血功能异常、肝肾功能障碍、痛风发作等副作用^[11,12],从而限制了它们在临床上的应用。所以,探索既能降低尿酸而又对机体毒副作用较小的天然药物则具有重要的意义。现代研究表明,多糖类化合物对高尿酸血症及肾脏和肝脏损伤有一定的治疗作用。如姬松茸多糖可显著降低肾损伤小鼠血清尿素氮和肌酐的含量,从而对肾脏具有保护作用^[13]。张灏等^[14]证明了海参皂苷多糖可明显地改

善酵母浸粉诱导的小鼠高尿酸血症。马剑茵等^[15]探讨了海带褐藻多糖硫酸酯在四氯化碳所致小鼠急性肝损伤模型中的作用,结果表明高剂量的褐藻多糖硫酸酯能在一定程度上减轻小鼠的肝损伤,对小鼠急性肝损伤具有保护作用。已有研究表明,褐藻多糖硫酸酯能预防高血脂,对高血压和高血糖也有一定作用,并具有消水利肿的功效,因此可以用作辅助降压药物来治疗高血压,也可以用来治疗肾病^[16],故本试验研究其对高尿酸血症小鼠的拮抗效应。

研究表明褐藻多糖硫酸酯可明显地降低小鼠血清尿酸水平,并可降低肌酐的含量,减轻腺嘌呤对小鼠肾脏造成的损伤,进而对于尿酸在机体内的代谢具有十分重要的作用。此外褐藻多糖硫酸酯对肝脏XOD和ADA的活性也有明显地抑制作用,而肝脏中的XOD、ADA均为体内尿酸合成中的关键性酶,

在尿酸合成过程中发挥极其重要的作用,当肝脏中的 XOD、ADA 活性升高时,可促进体内核酸分解代谢,其可将次黄嘌呤、黄嘌呤氧化生成尿酸,从而影响尿酸水平使其升高^[17],从而说明褐藻多糖硫酸酯在抑制机体内尿酸的合成中具有一定的积极意义。本研究表明海带褐藻多糖硫酸酯具有降低尿酸和保护肾脏、肝脏的作用,但其具体的作用机制以及是通过哪些相关的信号通路发挥作用还需深入研究。

参考文献

- 1 Wang K(王珂), Wang RP(王瑞坡), Li J(李姣), *et al.* The preventive and therapeutic effects of mulberry leaf flavonoids on adenine induced hyperuricemia and kidney injury in rats. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:172-175.
- 2 Chen TH(陈铁晖), Yan GH(严国鸿), Chen H(陈华). Research Progress on chemical constituents and antitumor effects of curcuma longa. *Strait J Prev Med*(海峡预防医学杂志), 2004, 10(4):23-25.
- 3 Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev*, 2006, 58:87-114.
- 4 Corrado A, D Onofrio F, Santoro N, *et al.* pathogenesis, clinical findings and management of acute and chronic gout. *Minerva Med*, 2006, 97:495-509.
- 5 Choi HK, Curhan G. Coffee, tea and caffeine, consumption and serum uric acid level. *Arthritis Rheumatol*, 2007, 57:816-821.
- 6 Duarte ME, Cardoso MA, Noseda MD, *et al.* Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr Res*, 2001, 333:281-293.
- 7 Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro S, *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(1):21-28.
- 8 Veena CK, Josephine A, Preetha SP, *et al.* Renal peroxidative changes mediated by oxalate: The protective role of fucoidan. *Life Sci*, 2006, 79:1789-1795.
- 9 Hayakawa K, Nagamine T. Effect of fucoidan on the biotini-dase kinetics in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*, 2009, 4: 1211-1217.
- 10 Xiao W(肖为), Tao YX(陶叶杏), Gu YP(谷毅鹏), *et al.* The antagonistic effect of *Gelidium amansii* alcohol extract against hyperuricemia in mouse. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:1428-1431.
- 11 Umamaheswari M, Asokkumar K, Sivashanmugam AT, *et al.* *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124: 646-648.
- 12 Halevy S, hislain PD, Mockenhaupt M, *et al.* Allopurinol is the most common cause of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Europe and Israel. *J Am Acad Dermatol*, 2008, 58:25-32.
- 13 Duan XP(段县平). Effects of Agaicus Blazei Murrill Polysaccharid on urea and creatinine of serum in kidney failure mice. *J Tianjin Agric Univ*, 2010, 17(1):19-20.
- 14 Zhang H(张灏), Xu HJ(徐慧静), Gao YN(高旖旎), *et al.* Effect of sea cucumber saponins and polysaccharides in hyperuricemic mice. *Food Sci*, 2013, 34:219-222.
- 15 Ma JY(马剑茵), Wang X(王铤), Xu YF(徐勇飞). Protective effect of fucoidan *Laminaria japonica* on acute liver injury in mice. *Chin J Mar Drugs*, 2009, 28(6):40-44.
- 16 Ma H(马浩), Xia YM(夏亚穆). Advances in the biological activity of fucoidan. *Chem Bioeng*, 2013, 30(1):8-9.
- 17 Lin ZJ, Zhang B, Liu XQ, *et al.* Abdominal fat accumulation with hyperuricemia and hypercholesterolemia quail model induced by high fat diet. *Chin Med Sci J*, 2009, 24:191-194.
- 28 Liu W(刘文). The key technology study of oyster processing residues in comprehensive utilization. Ningbo: Ningbo University(宁波大学), MSc. 2013.
- 29 Wang Y(王颖), *et al.* A new kind of oyster ready-to-use food processing technology. *Stor Proc*(保鲜与加工), 2010, 10(57):48-49.
- 30 Wang D(王丹). The development of the beverage fermented oyster. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学), MSc. 2011.

(上接第 474 页)

- 26 Li QF(李祺福), *et al.* Regulation effect of oyster low molecular active peptide BPO-L on human lung adenocarcinoma A549 cell cycle, associated cancer gene and tumor-suppressor gene expression. *J Xiamen Univ, Nat Sci*(厦门大学学报, 自科版), 2008, 47:104-110.
- 27 Li Y(李泳), *et al.* Antioxidant clathration study of vitamin C and vitamin B in oyster shell powder as carrier. *Yunnan Chem Technol*(云南化工), 2009, 36(1):18-20.