

车前子提取物部位群抗痛风的作用

曾金祥, 毕莹, 许兵兵, 魏娟, 任刚, 熊浩仲, 朱继孝*, 朱玉野, 罗光明
(江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**探讨车前子部位群的抗痛风活性与机制,为后续研究提供参考依据。**方法:**以系统溶剂法提取分离车前子。90只昆明种小鼠,随机分为9组,每组10只,分别为正常组,高尿酸血症组(模型组),别嘌呤醇组($0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),总提取物组($25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),石油醚组($25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),二氯乙烷组($25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),乙酸乙酯组($25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),正丁醇组($25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),水部位组($25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。除正常组外,其余各组采用氧嗪酸钾盐诱导小鼠急性高尿酸血症模型,ig给予相应药物,正常组和模型组给予等体积生理盐水,连续给药7d。观察车前子总提取物及5个部位对小鼠血清尿酸水平及肝脏黄嘌呤氧化酶(XOD)活性的影响。**结果:**系统溶剂法提取分离车前子得到5个部位,分别为石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水部位。与正常组比较,模型组小鼠血清尿酸的水平与XOD活性明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,别嘌呤醇、车前子总提取物及各不同部位均可降低小鼠血清尿酸的水平与XOD活性($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**车前子及不同提取部位具有一定的抗痛风作用。

[关键词] 车前子; 高尿酸; 黄嘌呤氧化酶; 抗痛风; 活性部位

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0132-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015080132

Anti-gout Effect of Various Fractions from Plantaginis Semen ZENG Jin-xiang, BI Ying, XU Bing-bing, WEI Juan, REN Gang, XIONG Hao-zhong, ZHU Ji-xiao*, ZHU Yu-ye, LUO Guang-ming (*The Chinese Medicine Resource and National Medicine Research Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-gout effect and mechanism of Plantaginis Semen (PS) extract parts on the level of uric acid in hyperuricemia mice. **Method:** Five fractions including the petrol ether extract, the dichloromethane extract, the ethyl acetate extract, the butanol extract and the water-soluble extract were obtained by systematic solvent extraction. 90 Kunming mice were randomly divided into 9 groups: the normal group (normal saline), the hyperuricemia group (normal saline), the allopurinol group ($0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), the total extract of PS (TPS, $25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the five fractions groups ($25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The hyperuricemia mice were induced by using oxygen oxazine acid potassium. The mice were administrated of the corresponding medicines for 7 days, and then the level of uric acid and the activity of xanthine oxidase were observed. **Result:** TPS and five fractions were obtained. Compared with the normal group, the level of uric acid and the activity of xanthine oxidase increased obviously in the hyperuricemia group ($P < 0.01$). All treatment groups could reduce the level of serum uric acid obviously, and inhibit the activity of xanthine oxidase of hyperuricemia mice ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** The PS and its different extracts have good anti-gout effect in hyperuricemia mice.

[Key words] Plantaginis Semen; hyperuricemia; xanthine oxidase; anti-gout; active fractions

痛风(gout)是由于嘌呤类物质代谢紊乱,产生尿酸过多和(或)尿酸排泄减少,血尿酸浓度持续增高导致尿酸盐结晶沉积软组织所致的一组代谢性疾

病,而高尿酸血症是痛风最重要的生化基础^[1]。通过抑制体内黄嘌呤氧化酶(XOD)活性或促进尿酸的排泄可有效防治痛风。但目前抑制XOD活性

[收稿日期] 20140829(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260630);江西省卫生厅项目(2012A039)

[第一作者] 曾金祥,博士,副教授,从事中药资源及中药生物传感研究,Tel: 0791-87118873, E-mail: zjinxiang@163.com

[通讯作者] *朱继孝,博士,副教授,从事药用植物研究,Tel: 0791-87118873, E-mail: zhujx81@sina.com

的药物如别嘌醇、非布索坦,促进尿酸排泄的药物如苯溴马隆以及其他如秋水仙碱与甾体类药物虽然具有较好的疗效,但却存在严重的毒副作用^[2-4],因此寻找安全有效的替代药物是抗痛风治疗亟需解决的问题。由于 XOD 抑制剂类抗痛风药物安全性要相对高于其他药物^[5],天然抗痛风及风湿类药用植物证明长期使用安全并含有 XOD 抑制剂^[6-7],因而已是抗痛风药物研究热点。

车前子具有清热利尿,渗湿通淋,明目,祛痰的功效。L D Kong^[8]等发现车前子提取物在体外能较好地抑制 XOD 活性。而笔者已有研究^[9]表明其醇提物在体内具有显著的降尿酸作用,其抑制作用机制与抑制 XOD 活性密切相关,并且还具具有能减少细胞毒性,改善肾脏功能促进尿酸排泄作用。这些结果表明车前子具有重要的抗痛风药用开发价值。因此,本研究进一步深入探讨车前子提取物抗痛风活性部位群,并探讨其对 XOD 的抑制活性,以为后续抗痛风开发提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 90 只雄性昆明种小鼠,体重(20±2)g,由湖南斯莱克实验动物有限公司提供,SPF 级,实验动物合格证号 SCXK(湘)2011-0003。实验期间室温(24±2)℃。

1.2 药物及试剂 车前子由江西修水宁红万春中药材有限责任公司采自江西九江,并经江西中医药大学中药资源与民族药研究中心张寿文教授鉴定为车前科植物车前 *Plantago asiatica* 的干燥成熟种子。氧嗉酸钾盐(批号 20130911,南京拜傲斯生物科技有限公司),别嘌醇片(批号 20130202,广东彼迪药业有限公司);XOD 测定试剂盒(批号 20130909),考马斯亮蓝蛋白测试盒(批号 20130902),尿酸测定试剂盒(批号 20130905)均为南京建成生物工程研究所产品。黄嘌呤氧化酶(批号 EC1.17.3.2,南京建成生物工程研究所),黄嘌呤(批号 20140214,国药集团化学试剂有限公司)。乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 HHS II-1 型电热恒温水温箱(上海博迅实业有限公司),CPA225D 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),UV2100 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 车前子样品制备 取车前子 200 g,加入 8 倍

药材量的 85%,75%,65% 乙醇加热回流 3 次,每次 2 h,3 次回流所得滤液混合后浓缩至 120 mL,含生药量 1.67 g·mL⁻¹,取出 50 mL 作为全部位组药物,将剩余 70 mL 浓缩液分别以 1:1 的石油醚、二氯甲烷、水饱和乙酸乙酯、水饱和正丁醇进行依次萃取,剩余部位为水部位,将萃取所得部位及水部位用减压蒸馏装置挥发溶剂近干,转移至烧杯中,水浴锅蒸干。将所得浸膏分别加水超声溶解,定容至 70 mL,冷藏备用。车前子的给药剂量均按饮片量计算。

2.2 总提物体外抑制 XOD 活性 取少量总提取物旋干,称取 16 mg 总提取物,并用少量 DMSO 溶解,并于 50 mL 量瓶中定容配成 320 mg·L⁻¹ 溶液。另配 XOD 为 0.5 U·mL⁻¹,黄嘌呤 150 μmol·L⁻¹,120 mmol·L⁻¹ pH 7.5 的磷酸盐缓冲液。反应溶液组成为:820 μL 磷酸盐缓冲液,500 μL 提取物溶液和 20 μL 黄嘌呤氧化酶,在 30℃ 水浴 10 min 后加入 660 μL 黄嘌呤启动反应。在相同情况下以磷酸盐缓冲液代替黄嘌呤做正常。在 290 nm 下测定反应 5 min 时尿酸吸光度(A),并扣除相同浓度的黄嘌呤溶液 A 后为 A 值,同法在没有提取物存在的情况下测定空白吸光度并扣除相同浓度黄嘌呤溶液 A 为 B 值,其抑制率计算公式为(1-A/B)×100%。每个值均平行测定 3 次,取平均值作为测定结果。

2.3 车前子提取物及各部位指纹图谱测定 取 **2.1** 项下车前子总提取物及各部位适量,挥干溶剂,用甲醇溶解定容,至生药浓度为 1 g·mL⁻¹。色谱柱为 Venusil MP-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.5% 的乙酸水溶液,梯度条件为 0~12 min:2%~17% 乙腈,12~17 min:17%~29% 乙腈,17~22 min:29%~29% 乙腈,22~27 min:29%~100% 乙腈,27~30 min:100%~100% 乙腈。检测波长 254 nm,柱温 30℃。实验重复性、精密性及稳定性均符合指纹图谱要求。

2.4 各部位对高尿酸血症小鼠的影响

2.4.1 小鼠分组及给药 将 90 只小鼠随机分为 9 组,每组 10 只,分别为正常组、高尿酸血症组(模型组)、别嘌醇组(阳性药组)、总提物组、石油醚、二氯乙烷、乙酸乙酯、正丁醇、水部位组。其中总提取物组、石油醚组、二氯甲烷组、乙酸乙酯组、正丁醇组和水部位组给药剂量按生药折算均为 25 g·kg⁻¹,别嘌醇混悬于 0.8% CMC-Na 中,其剂量为 10 mg·kg⁻¹。正常和模型组,ig 给予相应体积的生理盐水。按 15 mL·kg⁻¹ ig 给药。连续给药 7 d,每天 1 次,最后 1 次于造模 1 h 后给药。

2.4.2 高尿酸血症小鼠模型的建立 采用尿酸酶抑制剂氧嗪酸钾盐为化学诱导剂,抑制小鼠体内尿酸分解,造成小鼠高尿酸血症模型。于给药前 1 h,按照 $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量,对小鼠 *ip* 氧嗪酸钾盐(混悬于 0.8% CMC-Na 溶液)。正常组 *ip* 相应体积 0.8% CMC-Na 溶液。给药 1 h 后,小鼠眼眶后静脉丛采血,全血 $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,离心后上层血清置于 4 °C 冰箱中备用。并于冰台快速分取肝脏组织块,立即投入液氮中冷冻,取出后置于 -70 °C 冰箱中保存。

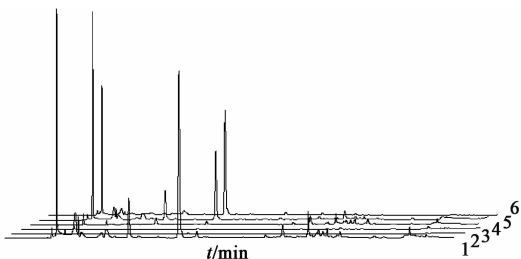
2.4.3 血清尿酸水平检测 按照尿酸测定试剂盒说明书步骤进行操作。

2.4.4 肝脏 XOD 活性测定 肝脏组织块称重后按体积比加 9 倍预冷的生理盐水制成 10% 匀浆, $2\,500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液按照试剂盒规定方法测定蛋白含量和 XOD 活性。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 车前子提取物 HPLC 指纹图谱分析 与总提取物组比较,石油醚及二氯甲烷部位显示的色谱峰数目较少信号较弱。乙酸乙酯部位在色谱流动相极性较强部分色谱峰数目较少信号较弱,但在中等及较弱部分色谱峰数目及强度具有一定的相似性。正丁醇与水部位则在色谱流动相极性较强部位与总提取物色谱峰数目及信号强度存在一定的相似性。这表明,不同极性萃取溶剂使车前子化学成分得到了一定的分离,但部位间化学成分或多或少存在一定的交叉性。见图 1。



1. 总提取物;2. 石油醚;3. 二氯甲烷;4. 乙酸乙酯;5. 正丁醇;6. 水部位

图 1 车前子提取物指纹图谱

Fig.1 Plantaginis Semen extract fingerprint

3.2 总提取物对 XOD 体外抑制及各部位对高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的影响 在 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的提取物存在下,体外黄嘌呤氧化酶抑制活性为

40.15%。表明车前子提取物中原形化学成分在体外对黄嘌呤氧化酶具有抑制活性。高尿酸血症模型组小鼠血清尿酸显著高于正常小鼠血清尿酸水平 ($P < 0.01$)。别嘌呤醇在给药剂量为 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时能显著地降低高尿酸血症小鼠血清尿酸,与模型组小鼠血清尿酸水平有极显著性差异 ($P < 0.01$),与正常组(正常小鼠)血清尿酸水平没有显著差异。车前子总提取物组、正丁醇、二氯甲烷与水部位给药组与模型组相比均有明显差异 ($P < 0.01$),具有显著的降尿酸作用,石油醚、乙酸乙酯给药组与模型组相比有明显差异 ($P < 0.05$),具有一定降尿酸作用。见表 1。

表 1 车前子不同提取物对高尿酸血症小鼠血清尿酸的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table1 Effects of Plantaginis Semen different extract on serum uric acid of high uric acid hematic disease in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	血清尿酸 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	尿酸抑制率 /%
正常	-	20.86 ± 2.33	-
模型	-	$36.39 \pm 3.06^{1)}$	-
别嘌呤醇	0.01	$18.92 \pm 1.98^{3)}$	48.07
总提取物	25	$21.13 \pm 2.15^{3)}$	41.93
石油醚	25	$28.87 \pm 3.47^{2)}$	20.67
二氯甲烷	25	$24.18 \pm 3.59^{3)}$	33.55
乙酸乙酯	25	$29.34 \pm 3.48^{2)}$	19.37
正丁醇	25	$22.99 \pm 2.11^{3)}$	36.82
水部位	25	$25.32 \pm 2.68^{3)}$	30.42

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与高尿酸模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 对高尿酸血症小鼠肝脏 XOD 的影响 别嘌呤醇组和车前子各部位组对高尿酸血症小鼠肝脏 XOD 活性均有一定抑制作用。与模型组比较,在给定剂量下,车前子提取物正丁醇部位具有最强的肝脏 XOD 抑制活性,具有极显著性差异 ($P < 0.01$),接近于别嘌呤醇的抑制活性。总提取物组及水部位组对肝脏 XOD 抑制活性稍弱 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),而石油醚、二氯甲烷部位对肝脏 XOD 活性抑制则进一步降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

血清尿酸水平与痛风、高血压、心血管疾病、肾脏疾病等有紧密的联系^[10]。尿酸水平升高是痛风的生化基础,体内尿酸的浓度主要和尿酸的生成和排泄相关,而 XOD 是影响尿酸生成的关键因素。因此抑制 XOD 活性是治疗痛风的重要途径,而 XOD 抑制剂类抗痛风安全性要强于其他药物因而具有重要研究价值^[5]。本研究结果表明车前子不同浓度

表 2 车前子不同提取物对高尿酸血症小鼠肝脏 XOD 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of Plantaginis Semen different extract on liver XOD of high uric acid hematic disease in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	XOD 活性 /U·g ⁻¹	活性抑制率 /%
正常	-	148.86 ± 13.28	-
模型	-	178.23 ± 15.31 ¹⁾	-
别嘌醇	0.01	128.26 ± 14.56 ³⁾	28.04
总提物	25	136.64 ± 11.87 ³⁾	23.34
石油醚	25	145.91 ± 14.39 ²⁾	18.13
二氯甲烷	25	146.91 ± 14.66 ²⁾	17.57
乙酸乙酯	25	141.53 ± 12.27 ²⁾	20.59
正丁醇	25	127.49 ± 13.84 ³⁾	28.47
水部位	25	139.74 ± 15.86 ²⁾	21.59

醇提取物在 80 mg·L⁻¹ 时对 XOD 体外抑制活性达到 40.15% , 与 Kong L D 等^[8] 的研究结果基本相符, 这表明在体外的车前子提取物化学原形成分对 XOD 具有抑制活性。车前子提取物成分在体内同样对 XOD 具有抑制活性, 但体内外抑制活性是否属相同成分, 这有待进一步研究确认。车前子还具有利尿功效, 这使得车前子提取物可通过促进尿液的排泄提高尿酸的排泄。笔者正在进行的车前子药物质基础研究结果并结合文献调查表明, 车前子中的一些化学成分如毛蕊花糖苷等既能抑制 XOD 的活性^[11], 又能促进尿液的排泄^[12], 而且在抗痛风方面安全^[9], 因此具有重要的抗痛风药用开发价值。

车前子提取物各部位在给定剂量下均能在一定程度降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平, 抑制高尿酸血症小鼠肝脏 XOD 活性, 但提取部位群降尿酸水平与黄嘌呤氧化酶抑制活性并不平行。为解析这种现象笔者对车前子提取物不同极性部位的代表性指纹图谱进行了分析。从指纹图谱可以看出, 车前子化学成分复杂, 不同极性的化合物在不同部位间仍存在一定的交叉性, 这可能是导致各部位均具有一定的降尿酸效果及肝脏 XOD 抑制活性的原因之一。另外, 车前子具有苯乙醇苷、黄酮苷、环烯醚萜苷、甾类等不同极性成分, 现代研究表明这些成分对 XOD 活性及尿酸排泄均可能有一定的影响^[9,13], 这与中药的多成分多靶点协同作用相符。化学成分的复杂性及多途径多靶点作用的结果导致车前子提取物降血清尿酸机制相对复杂, 进而导致降血清尿酸水平与肝脏 XOD 抑制活性不平行现象出现。

综上所述, 车前子提取物具有较好的 XOD 抑制剂开发前景。但由于其化学成分复杂且在不同极性溶剂中严重交叉, 同时作为种子类药材的高油高糖

含量特点可能会为后续的 XOD 抑制剂的分离纯化研究带来很大的挑战。

[参考文献]

[1] 金沈锐, 秦旭华. 痛风及高尿酸血症动物模型的研究现状和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13 (1): 55-58.

[2] Halpern R, Fuldeore M J, Mody R R, et al. The effect of serum urate on gout flares and their associated costs: an administrative claims analysis [J]. J Clin Rheumatol, 2009, 15 (1): 3-7.

[3] Burke A, Smyth E, Fitz Gerald. Analgesic-antipyretic agents: pharmacotherapy of gout [J]. Goodman & Gilman's Pharmacol Bas Ther, 2006; 706-709.

[4] Michael E, Ernst, Pharm D, et al. Febuxostat: a selective Xanthine-Oxidase/Xanthine-Dehydrogenase inhibitor for the management of hyperuricemia in adults with gout [J]. Clin Ther, 2009, 31 (11): 2503-2507.

[5] A L Ariev, N A Kunitskaya, L S Kozina. New data on gout and hyperuricemia: incidence rates, risk factors and aging-associated manifestations [J]. Adv Gerontol, 2013 (3): 138-142.

[6] 王占奎, 张庆祥. 中医药治疗实验性高尿酸血症研究进展 [J]. 山东中医药杂志, 2010, 30 (6): 428-431.

[7] 朱继孝, 曾金祥, 罗光明, 等. 栀子降尿酸有效部位研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (14): 159-161.

[8] Kong L D, Cai Y, Huang W W, et al. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout [J]. J Ethnopharmacol, 2000, 73: 199-207.

[9] 曾金祥, 魏娟, 毕莹, 等. 车前子醇提物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (9): 173-177.

[10] Kutzing M K, Firestein B L. Altered uric acid levels and disease states [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324 (1): 1-4.

[11] 尚雁君, 李医明, 蒋山好, 等. 玄参中苯丙素苷 Acetoside 对小鼠高尿酸血症的影响 [J]. 解放军学报, 2006, 22 (1): 30-34.

[12] 耿放. 基于生物质谱技术的车前子药物质析与质量标准研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2010.

[13] Zhu J X, Wang Y, Kong L D, et, al. Effects of biota orientalis extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 93: 133-137.

[责任编辑 周冰冰]