

# 复方土茯苓颗粒对 HUA 大鼠 XO 活性及其 mRNA 的抑制作用

朱明敏<sup>1,2</sup>, 师晓毅<sup>1,2</sup>, 孙维峰<sup>1\*</sup>

(1. 广州军区广州总医院, 广州 510010; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:观察复方土茯苓颗粒对高尿酸血症大鼠血尿酸(UA),黄嘌呤氧化酶(XO)活性及肝脏中黄嘌呤氧化酶(XDH)mRNA 表达水平的抑制作用。方法:48 只 SD 大鼠随机分成正常组,模型组,非布司他组(4 mg·kg<sup>-1</sup>),复方土茯苓颗粒低、中、高剂量组(1,2,4 g·kg<sup>-1</sup>),除正常组外,其余各组制备高尿酸血症模型及给予相应药物干预,每天 1 次,共给药 5 d。实验结束后测定各组大鼠的血 UA,肝 XO 活性以及肝中的 XDH mRNA 表达水平。结果:模型组大鼠的血 UA,肝 XO 活性,肝 XDH mRNA 表达水平均比正常组明显升高( $P < 0.05$ );经药物治疗后,各给药组大鼠血 UA,肝 XO 活性,肝 XDH mRNA 表达水平均比模型组明显降低( $P < 0.05$ ),复方土茯苓颗粒低剂量组与模型组无明显差别。结论:复方土茯苓颗粒可以有效降低高尿酸血症大鼠血 UA,并可以抑制 XO 活性与肝脏中 XDH mRNA 表达水平。

**[关键词]** 复方土茯苓颗粒;高尿酸血症;黄嘌呤氧化酶;黄嘌呤氧化酶 mRNA

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0127-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050127

## Inhibition Effect of Compound Tufuling Granules on Activity and mRNA of Xanthine Oxidase in Hyperuricemic Rats

ZHU Ming-min<sup>1,2</sup>, SHI Xiao-yi<sup>1,2</sup>, SUN Wei-feng<sup>1\*</sup>

(1. General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China;  
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the inhibition effect of compound Tufuling granules (CTG) on uric acid (UA), activity of xanthine oxidase (XO), and xanthine dehydrogenase (XDH) mRNA in hyperuricemic rats. **Method:** The 48 SD rats were randomly divided into normal group, model group, febuxostat group (4 mg·kg<sup>-1</sup>), CTG low-dose group, CTG mid-dose group and CTG high-dose group (1, 2, 4 g·kg<sup>-1</sup>). Rats in all other groups except normal group were used to establish hyperuricemia (HUA) models and received corresponding drugs for intervention, once a day for 5 days. After experiment, UA of serum, activity of XO, and XDH mRNA in liver were detected. **Result:** In model group, levels of UA, activity of XO, and XDH mRNA expression levels in liver were significantly higher than normal group ( $P < 0.05$ ). After treatment, levels of UA, activity of XO, and XDH mRNA expression levels were significantly lower in various treatment groups than those in model group ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between CTG low dose group and model group. **Conclusion:** CTG may reduce the UA of serum, and inhibit the activity of XO and XDH mRNA expression level in hyperuricemic rats.

**[Key words]** compound Tufuling granules; hyperuricemia; xanthine oxidase; xanthine dehydrogenase mRNA

高尿酸血症(HUA)是由体内嘌呤代谢紊乱所引起  
的血尿酸(UA)失衡状态,是痛风发作的基础。

嘌呤代谢紊乱一般包括有尿酸合成增多和尿酸排泄  
减少,其中以尿酸合成增多较为常见。嘌呤代谢过

**[收稿日期]** 20150118(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072915);广东省自然科学基金项目(s2012010009032);广东省科技计划重大专项(2012A080201012)

**[第一作者]** 朱明敏,博士,从事风湿病的治疗与研究,Tel:13826053939,E-mail:rock3590@163.com

**[通讯作者]** \*孙维峰,主任医师,教授,博士生导师,从事风湿病的治疗与研究,Tel:020-88653518,E-mail:sunwf3@sina.com

程可以通过从头合成和补救合成两种途径并经过多种酶的催化来完成,在下游通路,代谢中间产物统一经过黄嘌呤氧化酶(XO)的催化最后合成尿酸<sup>[1]</sup>。因此,黄嘌呤氧化酶对于尿酸合成途径的影响至关重要。黄嘌呤氧化酶与黄嘌呤氢化酶(XDH)是同一酶类的两种不同存在形式,统称为黄嘌呤氧化还原酶,都是 XDH mRNA 表达而来<sup>[2]</sup>。过去人们普遍认为,90% 的高尿酸血症是由尿酸排泄减少引起的,而不是生成过多。然而,最近的临床试验<sup>[3]</sup>证明刺激尿酸排泄只成功降低约 67% 患者的血尿酸水平,而联合 XO 抑制剂(别嘌呤醇或非布司他)治疗可以产生高达 100% 的有效率。这说明抑制尿酸生成是治疗高尿酸血症不可忽视的环节。复方土茯苓颗粒是经验方泄浊除浊方精简提纯而来,为广州军区广州总医院孙维峰教授所创,已在临床使用多年,能有效降低高尿酸血症病人体内的尿酸水平<sup>[4]</sup>。本研究旨在通过构建高尿酸血症大鼠模型,研究复方土茯苓颗粒对该模型体内黄嘌呤氧化酶活性及基因表达的抑制作用,以探讨该颗粒降低血尿酸的可能机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 采用 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,体重(200 ± 10) g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2014-0002。

**1.2 药物及试剂** 复方土茯苓颗粒(药物组成为土茯苓 35 g,草薢 18 g,山慈菇 15 g,王不留行 10 g 和牛膝 10 g,采用水提、醇沉工艺制备<sup>[5]</sup>,并按统一的质控方法控制药物质量<sup>[6]</sup>,由广州军区广州总医院药剂科提供,批号 13K05001),非布司他(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号 1402704),氧嗪酸钾和次黄嘌呤(均购自美国 Sigma 公司,批号分别为 STBC1486V, WXBB0387V),黄嘌呤氧化酶荧光试剂盒(美国 Life 公司,批号 1480473),XDH/XO 原位杂交试剂盒(博士德生物技术有限公司,批号 007870402-125040WH)。

**1.3 仪器** Pico17 型高速低温离心机(美国 Thermo 公司),T10 型匀浆机(德国 IKA 公司),G0 型全波长多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),ASP-200S 型组织脱水机、包埋机、切片机(德国 Leica 公司),7150 型全自动生化分析仪(日本日立公司),BX41M 型显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 所有大鼠适应性喂养 3 d 后按随机数字表法随机分成 6 组,即正常组,模型组,西药组,复方土茯苓颗粒低、中、高剂量组。实验开始

后,除正常组外,其余各组给予氧嗪酸钾(一种尿酸酶抑制剂,以消除实验大鼠体内尿酸酶的影响)100 mg·kg<sup>-1</sup> ip 和次黄嘌呤 500 mg·kg<sup>-1</sup> ig 以诱导高尿酸血症。造模剂给药每天 1 次,持续至实验结束,共 8 d。在实验的第 4 天开始,给予造模剂 0.5 h 后,复方土茯苓颗粒低、中、高剂量组分别按 1,2,4 g·kg<sup>-1</sup> 的剂量(按成人剂量以体表面积换算法换算)给予复方土茯苓颗粒溶液 ig,西药组给予非布司他 4 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量 ig,模型组与正常组均以适量生理盐水 ig。治疗药物每天 1 次,共治疗 5 d。整个实验持续 8 d。

**2.2 标本采集** 在治疗的第 5 天(也就是实验的第 8 天)给药治疗 3 h 后通过心脏采血 3 mL,离心机 3 000 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃ 离心 15 min 分离血清,-20 ℃ 保存待测;采血后颈部脱臼处死大鼠,剖腹收集肝脏两小块,一块快速置入液氮保存待制成 10% 的组织匀浆后检测,另一块以 4% 多聚甲醛固定后待原位杂交检测。

**2.3 大鼠肝脏组织匀浆制备** 取肝脏组织一小块,以 4 ℃ 预冷的生理盐水漂洗后用滤纸吸干表面水分,然后用电子天平称重,放入干净的小烧杯以眼科剪刀迅速剪碎,随后移入离心管内,加入 9 倍质量分数的冷生理盐水,在冰浴中以匀浆器搅拌 3 ~ 5 min 直至离心管内变成混浊液而无可见肝脏组织碎片,最后于离心机上,以 3 500 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃ 离心 15 min,取上清液保存待测。

**2.4 大鼠血清 UA 及肝脏匀浆 XO 活性检测** 血清中 UA 含量检测:以全自动生化分析仪测定血清中 UA 含量。肝脏匀浆中 XO 活性检测:严格按照荧光试剂盒说明书进行,先准备 XO 标准品曲线,将肝提取样品稀释在 1 × 反应缓冲液中,微量板的各孔中反应体系为 50 μL,然后加入相同的体积的含有 0.4 U·mL<sup>-1</sup> HRP 的 100 μmol·L<sup>-1</sup> Amplex Red 试剂或 200 μmol·L<sup>-1</sup> 次黄嘌呤混合,在 37 ℃ 孵育 30 min,然后用酶标仪在多个时间点测量在 530 ~ 560 nm 的吸光度 A。

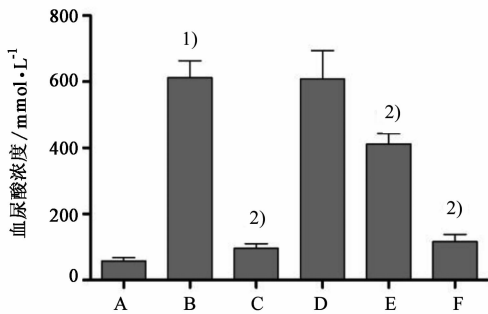
**2.5 原位杂交技术** 每组随机选取 4 块经多聚甲醛固定 60 min 的肝组织,常规脱水、浸蜡、包埋、切片,HE 染色,并利用地高辛标记的 XDH 寡核苷酸探针,标记肝组织中的 XDH mRNA 序列,进行原位杂交实验。将所得原位杂交染色结果用病理图像分析仪半定量,以胞质出现棕色颗粒为阳性,测定阳性反应面积。每张切片选取 4 周及中央 6 个区域,均取该区域中阳性反应最多的视野,400 倍物镜下测定阳性反应面积比(阳性面积/肝组织面积),并用

Imaga-ProPlus 6.0 软件分析。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 软件统计数据, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异性比较用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 T3 法检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠血 UA 的影响** 与正常组比较, 模型组血 UA 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 表明造模方法有效, 实验大鼠经氧嗪酸钾腹腔注射和次黄嘌呤 ig 后, 呈高尿酸血症状态。与模型组比较, 非布司他治疗组, 其血 UA 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 复方土茯苓颗粒中, 高剂量组的血 UA 水平明显低于模型组 ( $P < 0.05$ )。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 非布司他; D. 复方土茯苓颗粒  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. 复方土茯苓颗粒  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; F. 复方土茯苓颗粒  $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 (图 2~4 同); 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (图 2~3 同)

图 1 复方土茯苓颗粒对大鼠血 UA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effects of compound Tufuling granules on UA in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**3.2 对大鼠肝脏中 XO 活性的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠经造模诱导后, XO 活性显著提高 ( $P < 0.05$ )。非布司他组 XO 活性比较于模型组也明显下降 ( $P < 0.05$ ), 达到治疗效果。3 个复方土茯苓颗粒组中, 中、高剂量组的 XO 活性比较于模型组明显下降 ( $P < 0.05$ ), 其中, 高剂量组的 XO 活性与非布司他组的程度相当, 没有明显差别。见图 2。

**3.3 对大鼠肝脏中 XDH mRNA 表达的影响** 在对肝脏进行固定包埋切片并进行原位杂交试验的结果中, 各组结果趋向性大致与血尿酸浓度和 XO 活性结果相似。模型组  $516.52 \pm 129.98$  的 XDH mRNA 表达水平远远高于正常组  $95.82 \pm 32.09$ , 说明模型组大鼠在接受造模剂诱导后, 肝脏内 XDH mRNA 表达量明显增加 ( $P < 0.05$ )。西药组大鼠  $215.28 \pm$

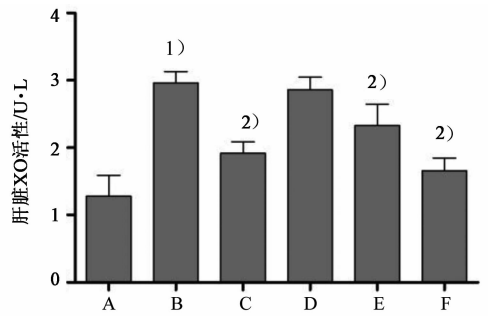


图 2 复方土茯苓颗粒对大鼠肝脏中 XO 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Effects of compound Tufuling granules on XO activity in liver of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

44.29 在西药非布司他干预下, XDH mRNA 表达量比模型组明显下降 ( $P < 0.05$ )。复方土茯苓颗粒低剂量组  $437.86 \pm 114.17$  的 XDH mRNA 表达量与模型组无明显差别, 中剂量组  $297.14 \pm 130.60$ , 高剂量组  $193.73 \pm 43.32$  则明显下降 ( $P < 0.05$ ), 其中高剂量组与西药组没有明显差别。见图 3, 4。

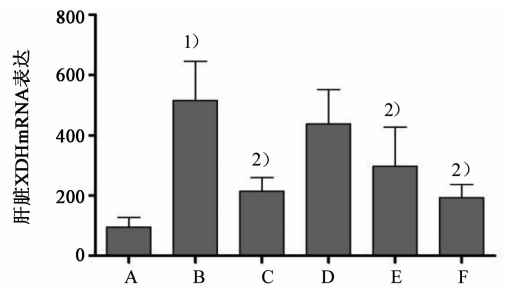


图 3 复方土茯苓颗粒对大鼠肝脏中 XDH mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Effects of compound Tufuling granules on XDH mRNA in liver of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

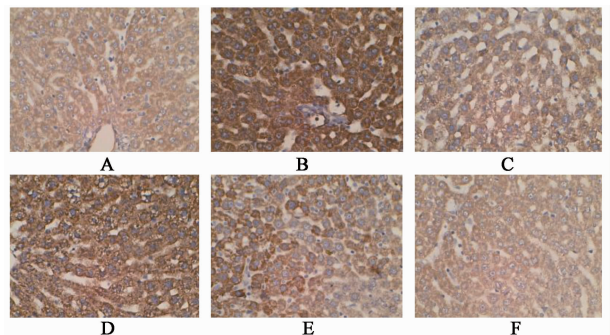


图 4 复方土茯苓颗粒对大鼠肝脏中 XDH mRNA 表达的影响 (原位杂交,  $\times 400$ )

Fig. 4 Effects of compound Tufuling granules on XDH mRNA in liver of rats (ISH,  $\times 400$ )

### 4 讨论

过去人们普遍认为, 90% 的高尿酸血症是由尿酸排泄减少引起的, 而不是生成过多。然而, 最近的

临床试验<sup>[6]</sup>证明刺激尿酸排泄只成功降低约 67% 患者的血尿酸水平,而联合 XO 抑制剂(别嘌呤醇或非布司他)治疗可以产生高达 100% 的有效率。这说明抑制尿酸生成是治疗高尿酸血症不可忽视的环节。XDH 是基因表达产物,XO 由 XDH 转换而来,两者共同在嘌呤代谢过程起关键作用。嘌呤代谢合成尿酸过程中,XO 起着主要催化作用。非布司他是一种非选择性的 XO 抑制剂,比较于使用了半个多世纪的别嘌呤醇,有着疗效更高和副作用更小的优势,但是非布司他在国内被批准上市不久,而且价钱较为昂贵,因此未能得到大范围应用。

高尿酸血症在中医理论里无相应的病证名。从本病中后期有关症状来看可归属于“痹证”、“历节”等范畴。尿酸盐极易在肾脏沉积,造成肾脏损害,根据肾功能损害程度不同可将该病归属于“淋证”、“腰痛”、“水肿”等。本病证多属本虚标实。复方土茯苓颗粒,由原经验方“泄浊除痹方”精简保留关键的 5 味中药,再经现代化工艺制成<sup>[4]</sup>。方中土茯苓为君药,泄浊解毒、健脾除湿、通利关节;萆薢为臣药,利湿浊、祛风湿;佐以山慈菇清热解毒、消痈散结,王不留行活血通络,牛膝活血通经、补肝肾。诸药合用,共奏利湿泄浊、化痰祛瘀之功。临床中也证实此颗粒与原方疗效无明显差别<sup>[3]</sup>。

此前的研究已经表明,复方土茯苓颗粒可以在尿酸排泄阶段,可能通过上调 miR-34a 以抑制大鼠肾小管中尿酸盐阴离子交换器 1 (URAT1) 基因的表达,从而降低尿酸重吸收,促进排泄<sup>[7-8]</sup>;在尿酸盐沉积阶段,抑制大鼠膝关节滑膜细胞中炎症因子白细胞介素-6 (IL-6), IL-1 $\beta$  的表达,减缓因尿酸盐结晶沉积造成的关节炎症反应<sup>[9]</sup>。此前课题组成员还在体外实验中发现,从泄浊除痹方(复方土茯苓颗粒原方)提取的总皂苷可以降低 XO 的活性,其对 XO 产生的 50% 抑制率所需剂量为 29.37 mg·L<sup>-1</sup><sup>[10]</sup>,但此抑制作用在活体内的效应如何尚未明确。

在本动物实验中,笔者通过给予氧嗪酸钾 100 mg·kg<sup>-1</sup> ip 和次黄嘌呤 500 mg·kg<sup>-1</sup> ig 的方法以诱导高尿酸血症,实验结果表明,经造模干预后,模型组大鼠的血尿酸、肝脏 XO 活性和 XDH mRNA 表达均明显升高,说明该造模方法有效,可以获得高尿酸血症模型。西药组经非布司他治疗,也可以在血 UA,肝脏 XO 活性和 XDH mRNA 表达 3 个方面起治疗作用,有效治疗高尿酸血症。与西药组比较,复方土茯苓颗粒各剂量组除低剂量组外,中、高剂量组也可以在试验所提及的 3 个方面改善高尿酸血

症,其中高剂量组可以获得与西药非布司他类似的效应。复方土茯苓颗粒各剂量组的结果对比中可以看出,中药复方土茯苓颗粒治疗高尿酸血症呈一定的量效关系,剂量越高,作用越强。本实验可以看出,当实验大鼠在病理诱导下,肝脏中 XDH mRNA 表达水平升高,XO 的活性单位随之相应增加,从而催化体内嘌呤代谢合成尿酸过程,使外周血尿酸增加,造成高尿酸血症。而复方土茯苓颗粒治疗高尿酸血症、使血尿酸下降的其中一个机制,很可能就是通过直接或间接的作用抑制肝脏中 XDH mRNA 的表达水平,降低 XO 的活性单位,减少尿酸生成。下一步,笔者将针对复方土茯苓颗粒抑制 XO 的具体作用机制进行研究。

[参考文献]

- [1] Roche A, Pérez-Dueñas B, Camacho J A, et al. Efficacy of rasburicase in hyperuricemia secondary to Lesch-Nyhan syndrome [J]. Am J Kidney Dis, 2009, 53(4):667-680.
- [2] 李丽书,陈献华,邵叶波,等.黄嘌呤氧化还原酶的结构、功能和作用[J].细胞生物学杂志,2004,26(4):381-384.
- [3] Naomi Schlesinger. New agents for the treatment of gout and hyperuricemia: febuxostat, puricase, and beyond [J]. Curr Rheumatol Rep, 2010, 12(2):130-134.
- [4] 王天,孙维峰.复方土茯苓颗粒治疗高尿酸血症患者疗效分析[J].华南国防医学杂志,2012,26(2):128-130,133.
- [5] 刘志刚,邓伟杰,郑鹏成,等.复方土茯苓颗粒提取、醇沉工艺研究[J].中华中医药学刊,2011,29(7):1594-1595.
- [6] 刘志刚,邓伟杰,孙维峰,等.复方土茯苓颗粒定性定量方法研究[J].药物分析杂志,2011,31(1):119-123.
- [7] Sun W F, Zhang X X, Sun F Y, et al. MicroRNA expression patterns of the kidney in hyperuricemia mice treated with Xiezhuo Chubi decoction[J]. Chin J Integr Med, 2011,17(1):35-42.
- [8] Sun W F, Zhu M M, Li J, et al. Effects of Xie-Zhuo-Chu-Bi-Fang on miR-34a and URAT1 and their relationship in hyperuricemic mice [J]. J Ethnopharmacol,2015,161:163-169.
- [9] 朱明敏,李静,张欢欢,等.复方土茯苓颗粒对大鼠滑膜细胞炎症因子及 mi-RNA 的影响[J].广州中医药大学学报,2014,31(4):578-586.
- [10] 刘若霞.泄浊除痹方总皂苷的分离纯化及其对 XOD 活性和 GLUT9 基因表达的影响[D].广州:广州中医药大学,2012.

[责任编辑 周冰冰]