

# 芒果苷对高尿酸血症小鼠血尿酸及嘌呤代谢 相关酶表达的影响

林华<sup>1</sup>, 袁丽仙<sup>2</sup>, 高丽辉<sup>1</sup>, 李玲<sup>1</sup>, 牛艳芬<sup>1\*</sup>

(1. 昆明医科大学 生物医学工程研究中心, 昆明 650500;

2. 云南省曲靖市第二人民医院, 云南 曲靖 655000)

**[摘要]** **目的:**研究芒果苷对氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠血尿酸的影响以及对磷酸核糖焦磷酸合成酶(PRPS), 磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶(PRPPAT)和次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT) mRNA表达水平的影响。**方法:**雄性昆明种小鼠60只,随机分为正常组、高尿酸血症模型组、芒果苷1.5, 3.0, 6.0 mg·kg<sup>-1</sup>组、别嘌醇组(1.0 mg·kg<sup>-1</sup>),每组10只。按10 mL·kg<sup>-1</sup>每天灌胃给药2次,连续10次,给药后1 h再灌胃给予氧嗪酸钾(500.0 mg·kg<sup>-1</sup>)诱导形成高尿酸血症小鼠。磷钨酸法测血清尿酸水平,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测小鼠肝脏PRPS, PRPPAT和脑组织中HGPRT mRNA的表达水平。**结果:**灌胃给予氧嗪酸钾后,与正常组比较,模型组小鼠血尿酸水平显著升高( $P < 0.05$ );给予芒果苷和别嘌醇后,与模型组比较,芒果苷各剂量(1.5, 3.0, 6.0 mg·kg<sup>-1</sup>)和别嘌醇(1.0 mg·kg<sup>-1</sup>)均能显著降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与正常组和模型组比较,芒果苷各剂量组小鼠肝脏PRPS和PRPPAT mRNA的表达没有显著性差异,小鼠脑组织中HGPRT mRNA表达水平也没有显著性差异。**结论:**在本实验条件下,芒果苷的降尿酸作用与嘌呤代谢相关酶PRPS, PRPPAT和HGPRT mRNA的表达无关。

**[关键词]** 芒果苷; 高尿酸血症; 磷酸核糖焦磷酸合成酶; 磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶; 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0055-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190292

## Effect of Mangiferin on mRNA Expressions of Hepatic PRPS, PRPPAT and Cerebral HGPRT in Hyperuricemic Mice Induced by Potassium Oxonate

LIN Hua<sup>1</sup>, YUAN Li-xian<sup>2</sup>, GAO Li-hui<sup>1</sup>, LI Ling<sup>1</sup>, NIU Yan-fen<sup>1\*</sup>

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

2. Qujing Second People's Hospital of Yunnan Province, Qujing 655000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of mangiferin on the mRNA expression of phosphoribosylpyrohoosphate synthetase (PRPS), phosphate ribose pyrophosphate amide transferase (PRPPAT) in liver and hypoxanthine-guanine phosphate transfer enzyme (HGPRT) in brain of hyperuricemic mice induced by potassium oxonate. **Method:** Hyperuricemic mice were induced through intraperitoneal injection with uricase inhibitor potassium oxonate. The serum uric acid level was determined by the phosphotungstic acid method. The mRNA expression levels of PRPS and PRPPAT in liver as well as HGPRT in brain of hyperuricemic mice were measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** An intraperitoneal injection with potassium oxonate caused a marked increase in serum uric acid level, compared with normal control group ( $P <$

**[收稿日期]** 20180723(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81760666);云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(2017FE468(-024))

**[第一作者]** 林华, 硕士, 实验师, 从事内分泌药理学研究, Tel:0871-65922743, E-mail:382339698@qq.com

**[通信作者]** \*牛艳芬, 博士, 副研究员, 从事内分泌药理学研究, Tel:0871-65922743, E-mail: 506355389@qq.com

0.05)。Intragastric administration with mangiferin at the doses of 1.5, 3.0, 6.0 mg·kg<sup>-1</sup> was able to significantly reduce serum uric acid levels, compared with hyperuricemic control group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Moreover, the increase in the mRNA expression levels of PRPS and PRPPAT in liver, as well as the decrease in the mRNA expression of HGPRT in brain were observed in hyperuricemic control group, but with no statistically difference. Mangiferin has no impact on the mRNA expressions of PRPS, PRPPAT and HGPRT, compared with hyperuricemic control group. **Conclusion:** The hypouricemic effect of mangiferin might not be related with PRPS, PRPPAT and HGPRT in therapeutic dose.

[**Key words**] mangiferin; hyperuricemia; phosphoribosylpyrohoosphate synthetase (PRPS); phosphate ribose pyrophosphate amide transferase (PRPPAT); hypoxanthine-guanine phosphate transfer enzyme (HGPRT)

高尿酸血症是痛风的生化基础,也是代谢紊乱综合征、心血管、慢性肾脏疾病等的独立危险因素<sup>[1-2]</sup>,因而,控制高尿酸血症具有重要的临床意义。研究表明尿酸是人体嘌呤代谢的终末产物,嘌呤代谢过程中的某些关键酶的基因缺失或功能障碍是尿酸生成增多的主要原因,如磷酸核糖焦磷酸合成酶(phosphoribosylpyrohoosphate synthetase, PRPS),磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶(amidophosphoribosyl transterase, PRPPAT),次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoibosyl transferase, HGPRT),嘌呤核苷磷酸化酶(purine nucleoside phosphorylase, PNP)和黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)等,任何一种酶的基因突变引发的酶结构或活性改变都可引发嘌呤核苷酸代谢紊乱,促使血尿酸生成增加,进而引起高尿酸血症和痛风等疾病的发生<sup>[3-5]</sup>。

芒果苷又名芒果素、知母宁,是芒果叶中的主要活性成分,可从百合科植物知母中提取,也可从漆树科植物东北龙胆、川西獐牙菜,水龙骨科植物光石韦等中提取得到<sup>[6-8]</sup>,资源非常丰富。在一些传统的中药复方中含有芒果苷,如百合知母汤、知黄痛风汤,桂枝芍药知母汤和升陷汤等,临床用于治疗消化、泌尿、神经系统疾病以及痛风等疾病<sup>[9]</sup>。笔者前期研究发现芒果苷具有降低高尿酸血症小鼠血清尿酸的作用,其降尿酸作用与抑制黄嘌呤氧化酶的活性有关<sup>[10-11]</sup>,而对嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)的活性无明显影响<sup>[12]</sup>,但对嘌呤代谢途径中的其他关键酶是否有影响尚不明确。因此,本研究以嘌呤代谢途径中的关键酶磷酸核糖焦磷酸合成酶(PRPS),磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶(PRPPAT),次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)为靶点,从尿酸生成途径,进一步研究芒果苷对嘌呤代谢关键酶的影响,以期为阐明芒果苷降低尿酸的作用机制提供实验和理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性昆明种小鼠,体质量18~22g,四川成都达硕生物科技有限公司,动物合格证号SCXK(川)2013-0024,饲养条件,室温为(25±2)℃,相对湿度60%~70%。动物实验研究获得昆明医科大学实验动物伦理委员会批准,编号KYL20170116。

**1.2 药物和试剂** 芒果苷(陕西森弗生物技术有限公司,纯度90.0%,批号20161107);别嘌呤(广东彼迪药业有限公司,批号20160901);氧嗪酸钾(美国Sigma Alderich公司,批号STBC1486);尿酸试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20170546);总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号K9530];逆转录试剂盒,PCR Master Kit(美国Thermo Scientific公司,批号分别为00145682,00164583);琼脂糖[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号WD1125S6013J]。

**1.3 仪器** 5415R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司);VCX310型超声波粉碎仪(美国Sonic公司);Gel Doc XR+型凝胶成像系统,MyCycler型PCR仪(美国Bio-Rad公司);ND-1000型核酸蛋白分析仪(美国NanoDrop公司);synergy2型酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

## 2 方法

**2.1 分组和给药** 昆明种小鼠60只,适应性饲养后,随机分为6组,每组10只,分为正常组、模型组、芒果苷<sup>[10,13]</sup>(1.5,3.0,6.0 mg·kg<sup>-1</sup>)组和阳性药别嘌呤<sup>[4]</sup>(1.0 mg·kg<sup>-1</sup>)组。高尿酸血症小鼠模型复制:模型组、芒果苷各剂量组和别嘌呤组灌胃给予氧嗪酸钾(500.0 mg·kg<sup>-1</sup>),每天2次,连续10次,诱导形成高尿酸血症小鼠<sup>[11-12]</sup>,正常组灌胃给予等量溶媒(0.5%CMC-Na)。正常组和模型组灌胃给予等量溶媒(0.5%CMC-Na),芒果苷各组灌胃给予不同剂量芒果苷,别嘌呤组给予别嘌呤,每天2次,连

续 10 次。末次给药 1 h 后,小鼠眼眶静脉取血,3 600 r·min<sup>-1</sup> 常温离心 10 min,取血清,采用磷钨酸法测定血清尿酸水平;采血之后立即处死动物,在冰台上快速分离取脑组织及肝脏,经液氮冷冻后置于 -80 °C 冰箱保存,备测肝脏中 PRPS, PRPPAT 和脑中 HGPRT mRNA 的表达量。

**2.2 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 PRPS, PRPPAT 和 HGPRT mRNA 表达量** 根据 GenBank 中 mPRPS, mPRPPAT 和 mHGPRT 核苷酸序列,利用 DNAMAN 引物设计软件设计引物(表 1),由北京鼎

国昌盛生物技术有限责任公司合成。按试剂盒说明书提取总 RNA,取总 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应,PRPS, PRPPAT 和 HGPRT mRNA PCR 扩增的条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 40 s,分别在 53.0,52.0,60.0 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环,72 °C 延伸 5 min,其产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,用 Bio-Rad 凝胶成像仪进行凝胶成像,并采用 Quantity One 分析软件对各组条带进行光密度分析,计算待测 mRNA 与 GAPDH 的比值,得到待测 mRNA 的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

名称	序列(5'-3')	退火温度/°C	循环数/个	长度/bp
PRPS	AAGTTTAGCAACCAGGAGACC CCCGAATCCACTGAAGAA	53	35	370
PRPPAT	CGAGGAATGTGGTGTGTTT TACGAATGGCTGCCACTT	52	35	301
HGPRT	GTTCTTTGCTGACCTGCTG GCCTGTATCCAACACTTCG	60	35	308
GAPDH	TGAGGCCGGTCTGAGTATGT CAGTCTTCTGGGTGCCAGTGAT	55	35	299

**2.3 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数比较采用单因素方差分析,组间比较方差齐时选择 LSD 法,方差不齐时选择秩和检验方法;检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的影响** 与正常组比较,模型组小鼠血清尿酸水平显著升高( $P < 0.01$ ),提示灌胃给予氧嗪酸钾诱导高尿酸血症小鼠模型成功;与模型组比较,芒果苷各剂量组(1.5,3.0,6.0 mg·kg<sup>-1</sup>)和别嘌醇组(1.0 mg·kg<sup>-1</sup>)均能有效降低小鼠血清尿酸水平( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 芒果苷对高尿酸血症小鼠血尿酸的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

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

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	血尿酸/μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	113.62 ± 10.93
模型	-	143.27 ± 12.97 <sup>1)</sup>
芒果苷	1.5	130.96 ± 8.39 <sup>2)</sup>
	3.0	126.41 ± 10.20 <sup>2)</sup>
	6.0	120.22 ± 8.32 <sup>2)</sup>
别嘌醇	1.0	114.93 ± 9.08 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 3 同)。

**3.2 对高尿酸血症小鼠 PRPS, PRPPAT, HGPRT mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肝脏 PRPS 和 PRPPAT mRNA 的表达有升高趋势,但差异无统计学意义,与模型组比较,芒果苷 1.5,3.0,6.0 mg·kg<sup>-1</sup> 有下调高尿酸血症小鼠肝脏 PRPS 和 PRPPAT mRNA 表达的趋势,但差异无统计学意义,别嘌醇(1.0 mg·kg<sup>-1</sup>)组能下调 PRPS mRNA 的表达( $P < 0.05$ );此外,与正常组比较,模型组小鼠脑组织中 HGPRT mRNA 表达有所降低,但差异无统计学意义,芒果苷各剂量组(1.5,3.0,6.0 mg·kg<sup>-1</sup>)及别嘌醇组与模型组比较,HGPRT mRNA 表达水平略有上升,但差异没有达到统计学意义。见表 3,图 1。

### 4 讨论

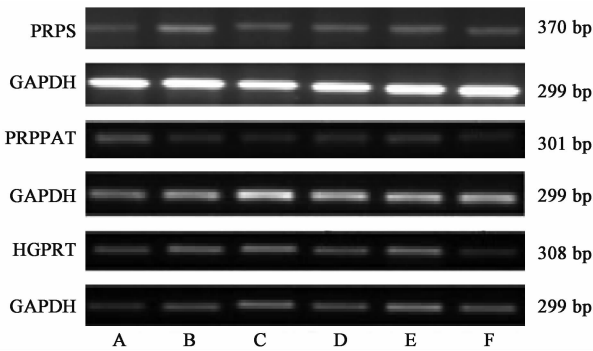
本研究结果表明灌胃给尿酸酶抑制氧嗪酸钾(500 mg·kg<sup>-1</sup>)能够成功诱导高尿酸血症小鼠模型,芒果苷 1.5,3.0,6.0 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃给药可以降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平,与前期研究结果一致<sup>[8,10]</sup>。

尿酸是人体嘌呤代谢的终末产物,在人体嘌呤核苷酸的合成和分解代谢过程中许多关键酶参与了反应<sup>[14-15]</sup>(图 2)。肝脏作为嘌呤核苷酸从头合成的主要器官,反应过程十分复杂,PRPS 作为嘌呤从头

表 3 芒果苷对高尿酸血症小鼠肝组织 PRPS, PRPPAT 和脑组织 HGPRT mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3 Effect of mangiferin on mRNA expression of liver PRPS, PRPPAT and brain HGPRT in hyperuricemic mice ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量 /mg · kg <sup>-1</sup>	PRPS /GAPDH	PRPPAT /GAPDH	HGPRT /GAPDH
正常	-	0.13 ± 0.04	0.57 ± 0.20	1.22 ± 0.21
模型	-	0.20 ± 0.09	0.69 ± 0.22	0.99 ± 0.26
芒果苷	1.5	0.13 ± 0.04	0.48 ± 0.21	1.06 ± 0.22
	3.0	0.14 ± 0.09	0.48 ± 0.22	1.07 ± 0.33
	6.0	0.11 ± 0.03	0.47 ± 0.05	1.01 ± 0.22
别嘌醇	1.0	0.09 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.43 ± 0.23	0.99 ± 0.23



A. 正常组; B. 模型组; C. 芒果苷低剂量组; D. 芒果苷中剂量组; E. 芒果苷高剂量组; F. 别嘌醇组

图 1 小鼠 PRPS, PRPPAT, HGPRT mRNA 表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of mRNA expression of liver PRPS, PRPPAT and brain HGPRT in hyperuricemic mice

高, 则 PRPP 增多, 促进了核酸和嘌呤碱的合成, 尿酸的生成增多。其次, PRPPAT 作为另一个嘌呤代谢关键限速酶, 在肝脏催化谷氨酰胺和 PRPP, 形成 1-氨基-5-磷酸核糖 (PRA), PRPPAT 基因突变则会导致 PRPPAT 数量增多或活性增强, 促成 PRA 生成增多, 促进了嘌呤核苷酸的从头合成途径, 使次黄嘌呤核苷酸合成增加, 以致尿酸生成增多<sup>[16-17]</sup>。HGPRT 是嘌呤核苷酸补救合成途径中的限速酶之一, 重要器官 (如脑、骨髓) 在缺乏从头合成所需酶系时, 补救合成途径对于核酸的基本结构单位—嘌呤的合成具有不可替代的意义, HGPRT 基因缺陷可使 HGPRT 活性下降, 使得次黄嘌呤和鸟嘌呤转化为次黄嘌呤核苷酸和鸟嘌呤核苷酸受阻, PRPP 蓄积, 嘌呤向尿酸的迅速转化使得尿酸大量生成<sup>[18-19]</sup>。在本实验条件下, 高尿酸血症小鼠肝脏 PRPS, PRPPAT mRNA 的表达有升高趋势, 脑 HGPRT mRNA 的表达呈下降趋势, 芒果苷灌胃给药对嘌呤代谢途径中的 PRPS, PRPPAT 和 HGPRT mRNA 表达的影响不明显, 提示芒果苷的降尿酸作用可能与嘌呤代谢关键酶 PRPS, PRPPAT 和 HGPRT mRNA 的表达无关; 前期报道了芒果苷对嘌呤代谢酶 PNP 的活性也无明显影响<sup>[11]</sup>, 而能抑制黄嘌呤氧化酶的活性<sup>[8]</sup>, 说明芒果苷对嘌呤代谢酶的作用有一定的选择性, 黄嘌呤氧化酶是其主要的靶点。

[参考文献]

[1] Lee J M, Kim H C, Cho H M, et al. Association between serum uric acid level and metabolic syndrome [J]. Prev Med Public Health, 2012, 45(3): 181-187.

[2] Zoccali C, Mallamaci F. Uric acid, hypertension, and cardiovascular and renal complications [J]. Curr Hypertens Rep, 2013, 15(6): 531-537.

[3] 苗志敏. 痛风病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 25-34.

[4] 刘恺, 林华, 高丽辉, 等. 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[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(1): 131-135.

[5] Boban M, Kocic G, Radenkovic S, et al. Circulating purine compounds, uric acid, and xanthine oxidase/dehydrogenase relationship in essential hypertension and end stage renal disease [J]. Ren Fail, 2014, 36(4): 613-618.

[6] 姚风艳, 孙连娜. 芒果苷药理作用及其结构修饰的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 248-252.

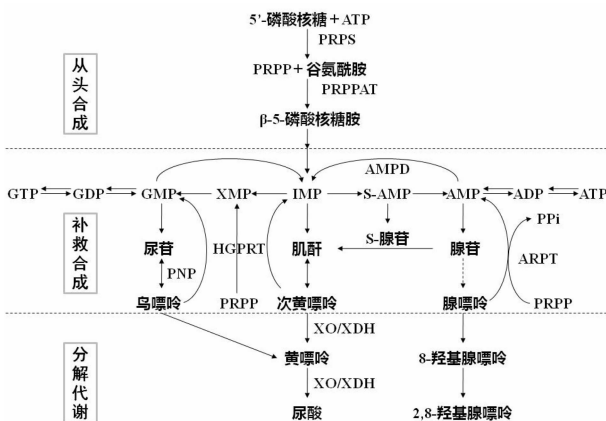


图 2 嘌呤核苷酸代谢

Fig. 2 Metabolism of purine nucleotides

合成和补救合成途径的首要步骤, 其作用是催化 5-磷酸核糖的磷酸核糖基合成 5-磷酸核糖-1-焦磷酸核糖 (PRPP), 同时 PRPS 也是嘧啶和其他多种物质合成的关键酶, PRPS 基因突变, 导致 PRPS 活性增

- [ 7 ] 杨海光,方莲花,杜冠华. 芒果苷的药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016,32(1): 5-8.
- [ 8 ] 张幸福,骆桂法,王燕. HPLC 同时测定抱茎獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,20(12):61-64.
- [ 9 ] 孙晨瑜,谢国勇,秦民坚. 芒果苷在植物界的分布及药理活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2017,36(4):39-45.
- [10] NIU Y F, LU W, GAO L H, et al. Reducing effect of mangiferin on serum uric acid levels in mice [J]. Pharm Biol, 2012, 50(9):1177-1182.
- [11] 牛艳芬,高丽辉,刘旭,等. 芒果苷对氧嗪酸钾所致慢性高尿酸血症大鼠尿酸及肝肾功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2012,28(11): 1578-1581.
- [12] 袁丽仙,牛艳芬,高丽辉,等. 嘌呤核苷磷酸化酶检测体系优化及芒果苷对其活性的影响[J]. 中国药理学通报, 2012,28(7): 966-969.
- [13] 徐象威,牛艳芬,高丽辉,等. 基于肠道尿酸转运体 ABCG2 的芒果苷降尿酸作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(17):230-234.
- [14] Mandal A K, Mount D B. The molecular physiology of uric acid homeostasis [J]. Annu Rev Physiol, 2015, 77:323-346.
- [15] 朱明敏,师晓毅,孙维峰. 复方土茯苓颗粒对 HUA 大鼠 XO 活性及其 mRNA 的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016,22(15):127-130.
- [16] Hsu K C, WANG F S. Fuzzy optimization for detecting enzyme targets of human uric acid metabolism [J]. Bioinformatics, 2013, 29(24):3191-3198.
- [17] Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion[J]. Int J Cardiol, 2016, 213:8-14.
- [18] LI H G, HOU P Y, ZHANG X, et al. Hypouricemic effect of allopurinol are improved by pallidifloside D based on the uric acid metabolism enzymes PRPS, HGPRT and PRPPAT[J]. Fitoterapia, 2016, 113:1-5.
- [19] Tabunoki H, Ono H, Ode H, et al. Identification of key uric acid synthesis pathway in a unique mutant silkworm Bombyx mori model of Parkinson's disease [J]. PLoS One, 2013, 8(7):e69130.

[责任编辑 周冰冰]