

降尿酸中药药效物质筛选方法学研究进展

任玲玲, 张迟, 曾金祥*, 毛竹, 李敏, 朱继孝, 朱玉野, 钟国跃, 刘红宁
(江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004)

[摘要] 体内血清尿酸浓度长期过高时,可诱发痛风并引起一系列代谢性疾病。近 20 年来,由于生活水平的不断提高及饮食结构的改变,高尿酸血症及痛风的发病率不断增高。降低血清尿酸水平是高尿酸血症与痛风防治的首要方法,但目前临床应用的降尿酸西药均具有较严重的毒副作用。降尿酸中草药在长期的使用过程中安全有效,随着现代科学技术的迅速发展,应用及开发不同筛选方法从这些中草药中寻找高效、安全的药效物质已成为高尿酸血症及痛风防治药物研究的热点。本文对降尿酸中草药提取物、提取物部位及活性单体成分等药效物质筛选方法进行了综述,发现降尿酸药效物质筛选方法主要有体内法和体外法,体内法主要应用于筛选药材提取物降尿酸活性与机制,体外方法多用于单体活性成分筛选且以黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制剂筛选为主,分子对接联用同源建模及亲和超滤联用液质联用(AUF-LC-MS)技术已成为促尿酸排泄成分及 XOD 抑制剂筛选的新趋势,而体外细胞模型将为促尿酸排泄药中草药药效物质筛选开辟新途径。综述为高尿酸血症及痛风的中草药药效物质筛选及药物开发提供了一定的参考依据。

[关键词] 痛风; 降尿酸; 中草药; 药效物质; 筛选方法

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0227-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191706

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190515.1654.008.html>

[网络出版时间] 2019-05-16 15:43

Methodology for Screening Effective Substances of Chinese Herbal Medicine for Reducing Serum Uric Acid Level

REN Ling-ling, ZHANG Chi, ZENG Jin-xiang*, MAO Zhu, LI Min, ZHU Ji-xiao, ZHU Yu-ye,
ZHONG Guo-yue, LIU Hong-ning
(Research Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Resources and Minority Medicine,
Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Gout is caused by the nucleation and growth of monosodium urate crystals in tissues and around joints, which is followed by long-standing hyperuricemia and serum urate of above the saturation threshold. It could cause a series of complications, such as cardiovascular, hypertension, and renal complications. Over the past two decades, the incidences of hyperuricemia and gout have been increasing due to the continuous improvement of living standards and the changes in dietary structure. The prime and most important therapy for hyperuricemia and gout is to reduce serum uric acid levels, but the western medicine for reducing uric acid in clinical application has serious toxic and side effects. With the rapid development of modern science and technology, the application and development of different screening methods for effective ingredients with a low toxicity and side effects from Chinese herbal medicines for reducing serum uric acid levels has attracted much attention in the research and development of drugs for the prevention and treatment of hyperuricemia and gout. In this study, the screening methods for extracts,

[收稿日期] 20190227(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660648);江西省自然科学基金项目(20171BAB205090);江西中医药大学民族药协同创新项目(JXXT2018001);江西中医药大学研究生创新基金项目(JZYC18S11)

[第一作者] 任玲玲,在读硕士,从事中药药效物质基础与质量标准研究,Tel:0791-87119065,E-mail:971641696@qq.com

[通信作者] *曾金祥,教授,从事中药药效物质基础与质量标准研究,Tel:0791-87119065,E-mail:zjx@jxutcm.edu.cn

fractions, active monomer components and other effective substances were reviewed and analyzed. According to the findings, the screening methods had a considerable progress both *in vivo* and *in vitro*. The results showed that the *in vivo* methods were mainly applied for studying the urate lowering effect and mechanisms of herbal extracts, while the studies for xanthine oxidase (XOD) inhibitors mainly depended on the *in vitro* methods. Molecular docking homology modeling and liquid chromatography-mass spectrometry have become a new trend for screening effective substances with XOD inhibitory activities and uric acid excretion activities, while cell model will open up a new way for screening effective substances for uric acid excretion. The review provides certain reference for effective components screening of hyperuricemia and gout.

[**Key words**] gout; reducing uric acid; Chinese herbal medicine; effective substance; screening method

体内嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄减少可引起血尿酸浓度升高,长期高尿酸血症可诱发痛风并可导致高血压、糖尿病、心血管疾病等多种并发症^[1]。近年来,流行病学调查显示,高尿酸血症和痛风严重影响人们的生活质量和健康,且患病率仍在快速增加^[2]。黄嘌呤氧化酶(XOD)可催化嘌呤代谢生成尿酸,而肾脏及肠道分别负责尿酸排泄的 2/3 与 1/3^[3]。因此,抑制 XOD 活性减少尿酸生成与调控肾、肠道尿酸相关转运体[如尿酸盐阴离子转运体 1 (URAT1),葡萄糖转运蛋白 9 (GLUT9),有机阴离子转运体(OATs)等]促进尿酸排泄是高尿酸血症与痛风防治的首要方法^[4]。目前临床使用的别嘌醇、苯溴马隆、拉布立酶等虽然疗效较好,但都存在一定的肝肾损害、过敏反应等毒副作用^[5]。许多降尿酸中草药在长期使用过程中存在疗效显著、安全性高、毒副作用低等特点,应用及开发不同方法筛选高效、毒副作用低的提取物或提取物部位以及活性单体成分等中草药降尿酸药效物质已成为当前研究热点^[6-7]。中草药降尿酸药效物质筛选方法主要有体内法与体外法,张雪等^[8]曾对降尿酸药物筛选的方法学进行了简单综述,但其综述文献较少,难以全面反映降尿酸药物筛选方法的研究进展。近年来许多新的方法不断出现,本文对这些筛选方法进行分析与总结,综述其研究动态及发展趋势,以为降尿酸中草药药效物质的筛选及进一步开发提供参考依据。

1 体内筛选法

体内筛选方法^[9-17]一般程序是首先建立高尿酸血症动物模型,然后给药进行干预,根据干预前后高尿酸血症动物模型血清尿酸水平的变化判断中草药的降尿酸活性,最后通过动物肝脏 XOD 的活性及/或肾、肠道尿酸转运体的 mRNA 或蛋白表达变化研究活性中草药的降尿酸机制。其中建模常用药物有氧嗪酸钾^[9-14]、果糖^[15-16]及尿酸^[17]等,例如以氧嗪酸钾及尿酸钠诱导高尿酸血症小鼠模型,研究发现

七叶莲总皂苷^[9]、短管兔耳草醇提取物^[10]、土肉桂叶中的精油^[11]、菰腺忍冬^[12]、芒果苷^[13]、虎杖-桂枝药对配伍^[14]及虎杖提取物及其有效部位(二苯乙烯类和蒽醌类)^[15]、短穗兔耳草 70% 乙醇提取物^[16]、复方土茯苓颗粒^[17-18]是效果显著的降尿酸中草药,其机制多与抑制 XOD 活性^[9-15,17]、调控肾脏尿酸转运体 URAT1^[9,10,13-14], GLUT9^[10,16,18], OAT1^[10,13] 的 mRNA 或蛋白表达相关。另外,应用果糖诱导高尿酸血症大鼠,周盼^[19]、王雨等^[20]分别发现大黄酸^[19]、菊苣提取物^[20]可以降低血清尿酸水平;应用尿酸诱导小鼠高尿酸血症,徐象威等^[21]发现芒果苷均具有降尿酸功效。这些药物通过下调调控肠道中 GLUT9 mRNA 及蛋白、上调多药耐药相关转运体 2 (MRP2) mRNA 及蛋白促进肠道中尿酸的排泄并改善肠道功能^[19-20]或调控小鼠肠道尿酸转运体三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 (ABCG2) mRNA 及蛋白表达是这些药物潜在机制^[21]。

2 体外筛选方法

体外筛选方法主要基于抑制 XOD 活性可减少尿酸生成、或活性成分必先与靶蛋白相结合等原理建立,主要有紫外分光光度法、高效液相色谱 (HPLC) 法、亲和超滤联用液质联用 (AUF-LC-MS) 法、电化学法、分子对接法等。

2.1 紫外分光光度法^[22-30] 紫外分光光度法是筛选降尿酸中草药药效物质的经典及主要方法,主要应用于 XOD 抑制剂的筛选。其原理是 XOD 催化嘌呤类物质生成尿酸或氧自由基,尿酸可在 295 nm 处产生吸收;而氧自由基可与加入的氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 反应,产物在 560 nm 处产生吸收。如果 XOD 的活性被抑制,则在 295 nm 或 560 nm 处的吸光度下降,借此可筛选具有 XOD 抑制活性的药效物质^[18-26]。紫外-可见分光光度法简单快速,既可用于具有 XOD 抑制活性的提取物及单体成分筛选,同时还可应用于活性单体成分的导向筛选,是应用最

为广泛的体外筛选方法,如应用紫外分光光度法。Umamaheswari 等^[22]对劲直刺桐叶的几种不同提取物进行了 XOD 抑制活性测定,结果三氯甲烷提取物抑制效果最好,其半数抑制浓度(IC_{50})为 $(21.2 \pm 1.6) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。杨道茂等^[23]对 9 种中草药提取物抑制 XOD 的活性进行筛选,发现葛花、猫须草和金银花提取物的分别为 0.65, 0.96, 0.74 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ZHU 等^[24]对侧柏叶中的提取物中 XOD 抑制剂的进行了导向分离筛选,结果发现槲皮素和芦丁有较好的 XOD 抑制活性。Ho 等^[25]发现疏花蛇菰中的 XOD 抑制活性部位为乙酸乙酯部位,并从中导向筛选得到 2 个抑制活性较强的水溶性鞣质单体化合物,其分别为 1,3-二-*O*-没食子酸 4,6-(*S*)-六羟基二苯酚- β -*D*-吡喃葡萄糖,1-*O*-(*E*)-咖啡酰-4,6-(*S*)-六羟基二酚基- β -*D*-吡喃葡萄糖。夏宏军等^[26]发现银杏中银杏酸的取代基为完全饱和的十三碳链脂肪烃和具有一个不饱和度的十五碳链取代基对 XOD 的 IC_{50} 值分别为 $(31.81 \pm 1.87) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(25.48 \pm 0.66) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$)。徐婷婷等^[27]证实了土茯苓表儿茶素、落新妇苷等黄酮类成分可抑制 XOD 活性。齐万虎等^[28]发现黄瑞香木犀草素,5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮,daphnodorin A,瑞香苷 4 个单体化合物对 XOD 有很好的抑制作用。李英等^[29]对金银花中酚酸类和黄酮类成分进行 XOD 抑制活性筛选结果可知 3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯、槲皮素和木犀草素的抑制效果较好,其分别为 8.36, 6.46, 2.08 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

紫外可见分光光度法虽然简单、快速、应用广泛,但因中草药中许多成分对紫外-可见光有吸收,故往往产生假阳性或假阴性结果^[30],需要结合或开发其他方法以进一步验证成分的活性。

2.2 HPLC 筛选方法^[31-36] XOD 催化黄嘌呤(XAN)氧化时产生尿酸,同时会消耗 XAN。尿酸与 XAN 及待筛选成分在色谱柱上有良好的分离度。当催化反应进行时,尿酸的浓度会逐渐增加,而 XAN 的浓度会逐渐降低。而在一定的时间内,固定催化体系如酶,XAN,生成尿酸与消耗 XAN 的量不变。而当 XOD 的活性被抑制时,生成的尿酸与消耗的 XAN 量会降低。基于这一原理并利用 HPLC 的分离作用,人们构建了 HPLC 筛选方法筛选中草药抑制 XOD 活性成分^[31-36]。与单纯的紫外分光光度法相比,HPLC 筛选方法虽然需要复杂的样品前处理过程,但在一定程度上提高了筛选的可靠性,准确度更高。

根据尿酸的色谱峰面积变化,Kaufmann 等^[31]运用 HPLC 对紫苏提取物中进行 XOD 抑制的生物活性测定,结果显示该方法可以成功测定紫苏提取物对 XOD 的抑制活性。刘又豪等^[32]用 HPLC 法对尾巨桉桉叶提取物的活性进行了筛选,确定了鞣花酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷酸和五没食子酰葡萄糖为桉叶抑制 XOD 的活性成分,其 IC_{50} 分别为 22.51, 32.96, 31.75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,鞣花酸是 3 种单体中活性最强的抑制剂;姚兰等^[33]建立一种酶-底物反应体系 HPLC 法,对 10 种不同批次的大叶冬青药材的 XOD 抑制活性进行了筛选,发现这 10 批大叶冬青药材对 XOD 均有较好的抑制作用;李相成等^[34]应用 HPLC 法探究虎杖中不同溶剂提取物对 XOD 的作用,发现虎杖中的乙酸乙酯、正丁醇(质量浓度为 200, 100, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时),其分别为 14.46, 82.97 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,且两者均为混合型抑制剂;杨增明等^[35]通过高效液相色谱检测尿酸生成量检测了土连翘、越橘叶、山茶、金沸草、土木香等中草药对 XOD 的抑制程度,发现土连翘具有较好的抑制活性。孙永丽等^[36]应用 HPLC 根据 XAN 的色谱峰面积变化筛选了 14 种中草药的 XOD 抑制活性,发现使君子、苏木、虎杖和牡丹皮四味中药的 70% 乙醇提取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用较强,其 IC_{50} 分别为 10.04, 8.02, 2.06, 1.36 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 AUF-LC-MS 联用筛选方法^[37-44]亲和超滤(AUF),成分必与靶酶或靶蛋白等靶标通过亲和作用(Affinity)结合在一起后才能发挥药效作用。超滤技术(Ultrafiltration)利用超滤膜不同孔径选择性地使小分子通过但将靶标生物大分子截留。中草药具有潜在活性的化学成分通过亲和作用与靶标结合,可与之一起被超滤膜截留而从中草药复杂的成分中分离出来。然后应用甲醇、乙腈或酸性溶液等试剂将其从靶标分子中解离出来,最后再次通过超滤作用分离得到潜在活性的中草药成分。包含超高效液相色谱在内的高效液相色谱(LC)具有强大的分离能力,可以对解离的成分进行分离。质谱(MS,特别是 Q-TOF/MS)通过成分精确分子量、分子碎片、文献及标准品等可以快速鉴别成分。因此 AUF-LC-MS 联用筛选方法集结了亲和作用、超滤分离、色谱分离及质谱鉴定等多种技术,无需经历传统的提取、分离、结构鉴定及活性测试,具有快速、简便以及高通量筛选等诸多优势,已在中草药潜在的 XOD 抑制剂的体外筛选中获得了广泛应用。SHU 等^[37]采用超高效液相四极杆质谱(UPLC-TQ-MS)对

黄柏、掌叶大黄、银杏、赤芍、山茱萸几种常见中草药 XOD 抑制效果并进行了分类,证实了其分类与植物中的相关抗氧化物质的量一致(如铵生物碱,黄酮类)。徐晨等^[38]应用 AUF-LC-MS 技术对二妙丸中的有效化学成分进行分离和筛选,鉴定出了 9 种潜在的 XOD 抑制剂。彭韵洁等^[39]、唐英等^[40]先应用 LC 分别对红车轴乙醇提取物、山竹果乙醇提取物中的化合物进行分离,再以电喷雾质谱(ESI-MS)负离子模式在线检测化学成分,并通过超滤质谱技术筛选 XOD 抑制剂,结果在红车轴乙醇提取物中得到 5 个具有 XOD 抑制活性的单体化合物,其分别为大豆素,樱黄素,染料木素,得鸢尾素和山槐素,山竹果乙醇提取物中筛选得到 3-异倒捻子素, Mangostanol, 8-desoxygartanin, Gartanin 和 α -倒捻子素 5 个单体化合物。LIU 等^[41]利用超滤质谱技术同时联用傅里叶变换离子回旋共振质谱(FT-ICR-MS)对丹参提取物中 XOD 抑制剂进行了筛选分离和结构鉴定,研究结果表明,1,2-萘醌基团是抑制剂发挥抑制作用的重要结构,脂环上的呋喃和羟基取代可以不同程度增强抑制剂的抑制能力。SONG 等^[42]引入靶蛋白酶活性位点阻断剂对菊花提取物中的化学成分进行了分离筛选,得到木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素、芹菜素 4 种单体化合物,IC₅₀ 分别为 23.61, 38.80, 1.54, 1.96 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。WANG 等^[43]建立一种将超滤质谱技术与高速逆流色谱(HPCCC),快速制备色谱(RP-MPLC)联用的方法,在卷柏粗提物中快速筛选、鉴定得到 2 个 XOD 抑制剂,分别为穗花杉双黄酮和罗伯斯塔双黄酮,进一步研究,发现这 2 个单体化合物都是非竞争性的黄嘌呤氧化酶抑制剂(XODI),IC₅₀ 分别为(16.26 \pm 0.15) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 (11.98 \pm 0.12) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ZHANG 等^[44]采用固相金属亲和色谱对秋鼠曲草中潜在的 XODI 成分进行了筛选,发现木犀草素-O-葡萄糖苷、木犀草素两种效果较好的黄酮类成分。

2.4 电化学生物传感筛选法^[45-48] 电化学生物传感器是将生物活性分子作为分子识别元件固定在电极表面,然后通过生物分子间的特异性识别作用,使目标分子捕获到电极表面,产生可被检测的电流、电阻或电容等信号,实现对目标分析物的定量或定性分析的一种装置。XOD 是一种含有钼蝶呤(Mo),铁流中心([2Fe-2S])和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD⁺)活性中心的黄素酶,其在催化嘌呤类物质氧化时,黄嘌呤(XAN)的电子通过 MO 活性中心经 [2Fe-2S] 传送至,被还原成。XOD 可以催化黄嘌呤

氧化产生尿酸,并将电子传递给氧气产生活性氧。尿酸与活性氧及 FADH 均可在电极上被氧化产生电流信号而被检测。同时,当 XOD 活性被抑制时,催化反应所产生的电流信号会降低。电化学生物传感器具有灵敏度与选择性高、简单快速,易微型化、且能在复杂体系样品中进行检测等优势。因此,以 XOD 为生物识别元件,人们构建了一系列的电化学生物传感器筛选中草药中 XOD 抑制剂^[45-48]。王娟等^[45]基于 XOD 催化黄嘌呤氧化过程中的电子转移信号降低,构建电化学生物传感法对车前子单体成分 XOD 抑制剂进行了筛选,得到木犀草素,毛蕊花糖苷,金圣草黄素,吡啶-3-甲醛,圣草酚,(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮及二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯 7 个有效成分,且都为竞争型抑制剂,其中木犀草素、毛蕊花糖苷、金圣草黄素的 IC₅₀ 分别为 4.6, 7.7, 53.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。周娟等^[46]建立了一种将多壁碳纳米管吸附在丝印碳糊电极表面上的方法,并且用计时电流分析方法测定尿酸用来检测 XOD 的活性。高洪福等^[47]通过在热解石墨电极上修饰双十二烷基二甲基溴化铵与单壁碳纳米管来探讨 XOD 在电极上的电化学性质,以及运用循环伏安法对 XOD 的电化学行为进行测定,为后续应用该方法筛选 XOD 抑制剂奠定了理论依据。李振国^[48]通过黄嘌呤氧化酶/单壁碳纳米管-双十二烷基二甲基溴化铵(XOD/SWNTs-DDAB)修饰电极研究芹菜素对 XOD 的抑制作用,结果表明修饰电极可灵敏地测定芹菜素对 XOD 抑制作用。

2.5 分子对接技术^[49-57] 分子对接与 AUF-LC-MS 方法一样均基于中草药成分欲发挥药效作用必先与靶标大分子发生相结合而进行药物筛选。但与 AUF-LC-MS 偏重于鉴定与靶标发生亲和作用成分不同的是,分子对接是采用现代计算机技术基于结合时分子间几何和能量的最佳匹配来筛选潜在的活性成分。其思想起源于 Fisher E 的“钥匙和锁模型”,要求成分与靶标分子结构均明确。因其具有目标明确可进行高通量筛选等优势,可有效避免化合物难以获取无法进行活性筛选的不足,已成为降尿酸中草药药物筛选研究的重要方法与有力工具^[49-57]。王雪洁^[49]对菊苣中提取分离的化学成分同几种相应靶蛋白(如 XOD, GDA, ADA 等)进行了分子对接实验,并对有效作用于相应靶蛋白的化学成分进行了总结。冯荣楷等^[50]通过 Surflex-Dock 和 FAF-Drugs 2 个软件对 2 种中草药中的 65 个成分与 XOD 进行分子柔性对接,进一步分析其与 XOD

活性位点的结合模式。数据显示,其中 51 个化合物有着比别嘌呤醇更好的结合模式,以花旗松素 3-O- α -L 鼠李糖苷、阿斯特酚苷和虎杖苷 4 个化合物的效果最好。张明波等^[51]基于分子对接法探讨中药虎杖化学成分与 XOD 的对接方式来阐明抗痛风机制,发现虎杖中黄酮类和二苯乙烯类成分可通过疏水和氢键相互作用可与 XOD 形成稳定复合物,从而达到抑制 XOD 的活性,减少尿酸生成,发挥抗痛风的作用。DONG 等^[52]应用酶动力学研究和分子对接方法,研究短松叶素、高良姜素、松属素、光干草宁等黄酮类对 XOD 的抑制机理,发现黄酮类与 XOD 可通过多个结合位点相互作用。分子对接结果显示,短松叶素和高良姜素可与 XOD 一些氨基酸残基形成氢键,并且产生 π - π 相互作用。LIN 等^[53]运用分子对接法对白杨素抑制 XOD 的机理进行了考察,得出白杨素可使 XOD 的分子结构发生变化,且与 XOD 中的氨基酸残基发生氢键和范德华力作用。谢晶等^[54]运用分子对接技术对藏药短管兔耳草中与 XOD 可结合成分的抑制活性进行筛选,发现成

分与 XOD 的结合方式主要以氢键、范德华力及疏水作用力为主,其中以黄酮类化合物中木犀草素-3',7 葡萄糖醛酸苷对接函数得分最高。叶素梅^[55]运用分子对接技术研究了芹菜素对 XOD 抑制作用机理,发现芹菜素通过结合 XOD 的活性空腔,同时与周围氨基酸相互作用,占据疏水通道,抑制 XOD 活性。杨德俊等^[56]运用 Discovery Studio 3.0 (DS) 中 LibDock 对接模块虚拟筛选红茴香中小分子化合物对 XOD 的抑制活性,结果显示红茴香中黄酮苷类成分包括槲皮素 4'-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮苷、芹菜素-6-O- β -D-芦丁糖苷等与 XOD 有着较高的对接分数。

周月等^[57]采用分子对接方法对菊苣潜在的调控肠道浓度型核苷转运蛋白(CNT2)的有效成分进行筛选,并从中筛选得出了 21 个活性化合物,其中主要是酚酸类和倍半萜类成分,3,4-二咖啡酰奎宁酸,1,3-二咖啡酰奎宁,菊苣苷 K,菊苣苷 N,11 β ,13-二氢山莴苣苦素等。降尿酸中药药效物质筛选方法学比较分析见表 1。

表 1 不同降尿酸中草药药效物质筛选方法比较

Table 1 Comparison of screening methods for effective substances of different chinese herbs for reducing uric acid

方法	具体方法	原理	应用对象	优缺点
体内筛选法 ^[9-21]	基于高尿酸血症动物模型筛选方法	建立高尿酸血症动物模型,之后给药进行干预,再通过动物肝脏 XOD 的活性及/或肾、肠道尿酸转运体的 mRNA 或蛋白表达变化筛选活性中草药物质	提取物	可确切反映中草药活性成分在体内的药理作用,但存在动物及所需样品量大、周期长、效率低等不足
体外筛选法 ^[22-57]	紫外分光光度法 ^[22-30]	XOD 催化嘌呤类物质生成的尿酸或氧自由基可在紫外波长 295nm 处或加入 NBT 后在 560nm 处产生吸收,通过吸光度的变化筛选具有 XOD 抑制活性成分	单体成分	简单、快速、应用广泛,但可导致假阳性或假阴性结果
	HPLC 筛选方法 ^[31-36]	利用高效液相色谱的分离功能选择性地测定尿酸或 XAN 峰面积的变化筛选具有降尿酸活性的中草药提取物或单体成分		准确度高,但需要复杂的样品前处理过程
	AUF-LC-MS 联用筛选方法 ^[37-44]	成分基于亲和作用与 XOD 结合后,应用甲醇、乙腈等将其从 XOD 分子中解离,采用超滤作用分离得到潜在 XOD 抑制活性中草药成分,最后应用质谱方法鉴定成分的结构		具有快速、简便以及高通量筛选等优点
	电化学生物传感筛选法 ^[45-48]	XOD 催化嘌呤类物质氧化产生的尿酸、氧自由基或催化过程的传递电子等可在电极上产生灵敏的电信号,当抑制剂存在时,电信号会降低,因而可筛选 XOD 抑制活性成分		灵敏度与选择性高、简单快速,易微型化
	分子对接技术 ^[49-57]	根据 Fisher E 的“钥匙和锁模型”,采用现代计算机技术基于分子间几何和能量的最佳匹配来筛选潜在的活性成分		目标明确、可进行高通量筛选

3 文献分析与总结

体内法虽然经典成熟、可充分反映药物的药理作用以及机体对药物的吸收代谢过程,但因其要首

先建立高尿酸血症动物模型,故周期长、筛选药物用量大,难以满足快速、简便、高通量筛选的需要。体外筛选方法具有高效、灵敏、准确、经济等特点,特别

适合高通量药物的筛选。但这些方法筛选出来的降尿酸中草药仍需要在体内进行活性验证。

另一方面, XOD 一定条件下在体外仍可保持稳定的活性, 而调控尿酸转运体的相关因子难以在体外单独存活。故体外筛选方法大部分主要以 XOD 抑制的筛选为主。虽然目前尚未见有体外法筛选促尿酸排泄中草药药效物质的相关报告, 但目前已建立了尿酸转运蛋白稳定表达的细胞模型考察体外测定药物对尿酸重吸收功能的影响可筛选出降尿酸药物, 使在细胞水平上筛选降尿酸中草药药效物质也成为可能^[58], Wempe 等^[59]采用非洲爪蟾卵细胞表达人尿酸转运体(hURAT1; SLC22A12)做为细胞模型, 陈嘉盛等^[60]构建了稳定表达 hURAT1 的 MDCK 细胞株, 分别建立了基于 URAT1 抑制剂体外准确筛选和评价的方法体系。这些方法虽然在实际筛选过程操作复杂试剂与设备昂贵, 目前虽尚未见有应用于降尿酸中草药药效物质的筛选, 但无疑为降尿酸中草药药效物质的筛选开辟了一条新的途径。

分子对接技术虽然已用于调控肠道尿酸转运体核苷转运蛋白(CNT2)中草药药效物质筛选, 但大部分尿酸转运体如 URAT1, OATs 等的结构尚未完全阐述清楚, 故分子对接技术应用于 URAT1, OATs 促尿酸排泄药物的筛选仍非常有限。GLUT9 的分子结构清楚, 而 URAT1 的结构与其具有 90% 的同源性。基于此, YONG 等^[61]等采用同源性建模方法并应用分子对接技术研究了一系列苯溴马隆类似物与 URAT1 结合机制, 预测了这些化合物对 URAT1 的潜在抑制活性。这种方法同样有望成为降尿酸中草药潜在的 URAT1 抑制剂筛选的有力工具。另外, 分子对接技术与亲和超滤-色谱-质谱联用也开始应用于降尿酸中草药药效物质的快速筛选, 如谢晶等^[54]运用分子对接技术对亲和超滤技术和超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术联用捕集到的有 XOD 抑制作用的有效成分进行分子对接, 发现有效成分的结合方式主要以氢键、范德华力及疏水作用力为主, 其中以黄酮类化合物中木犀草素-3', 7 葡萄糖醛酸苷作用效果最好。这无疑为降尿酸中草药药效物质的筛选提供了新的思路。

总之, 降尿酸中草药药效物质的体内与体外筛选方法研究均获得了很大进展。其中, 体内法主要应用于中草药提取物药效与机制研究, 体外筛选法主要应用于单体活性成分筛选, 但仍以 XOD 抑制剂筛选为主。体外细胞模型筛选方法虽然复杂且仪器

与试剂昂贵, 但已为促尿酸排泄中草药效物质筛选开辟了新途径。分子对接联用同源建模及色谱-质谱法为 XOD 抑制剂及促尿酸排泄成分筛选提供了新的思路。可以预见随着现代科学技术的不断发展, 体外筛选模型将更加具有新颖性和实用性, 而结合体内药效验证, 必将大大促进降尿酸中草药药效物质的筛选。

[参考文献]

- [1] Choi H K, Mount D B, Reginato A M. Pathogenesis of Gout[J]. Ann Intern Med, 2005, 143(7):499-516.
- [2] Theodore R. The Challenges of Approaching and Managing [J]. Rheum Dis Clin N Am, 2019, 45(1): 145-157.
- [3] Sorensen L B. Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid [J]. Arthritis Rheum, 2010, 8(4):694-706.
- [4] Perez-Ruiz F, Nicola D, Tomas B. A review of uric acid, crystal deposition disease, and gout [J]. Adv Ther, 2015, 32(1): 31-41.
- [5] Lee M H H, Graham G G, Williams K M, et al. A benefit-risk assessment of benzbromarone in the treatment of gout [J]. Drug Saf, 2008, 31:643-665.
- [6] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 [J]. J Nat Prod, 2012, 75:311-335.
- [7] 张晨辉, 谢雄雄, 曾金祥, 等. 药用植物中黄嘌呤氧化酶抑制剂的研究进展 [J]. 中成药, 2018, 40(10): 2255-2260.
- [8] 张雪, 俸婷婷, 黄俊飞, 等. 降尿酸药物筛选方法学研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6):48-49, 50.
- [9] 朱玲玲, 陈宝军. 七叶莲总皂苷体内外降尿酸作用及对高尿酸血症小鼠尿酸转运蛋白的影响 [J]. 新中医, 2018, 50(5):41-44.
- [10] 曾金祥, 许兵兵, 李敏, 等. 藏药短管兔耳草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]. 中国新药杂志, 2015, 24(21):2489-2493.
- [11] WANG S Y, YANG C W, LIAO J W, et al. Essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice [J]. Phytomedicine, 2008, 15(11):940-945.
- [12] Chien S C, YANG C W, Tseng Y H, et al. *Lonicera hypoglauca* inhibits xanthine oxidase and reduces serum uric acid in mice [J]. Planta Med, 2009, 75(4): 302-306.
- [13] 林华, 袁丽仙, 高丽辉, 等. 芒果苷对高尿酸血症小鼠

- 尿酸及嘌呤代谢相关酶表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 55-59.
- [14] 施琬, 李钟, 顾祖莲, 等. 虎杖-桂枝药对配伍对大鼠慢性高尿酸血症和肾、肠尿酸转运体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 107-112.
- [15] 任丽, 欧水平, 陈灵, 等. 虎杖提取物及其有效部位的大鼠抗痛风性关节炎试验[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 111-115.
- [16] 熊雯雯, 张红阳, 文乐, 等. 短穗兔耳草提取物对高尿酸血症小鼠黄嘌呤氧化酶和肾脏尿酸转运体的影响研究[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(13): 1538-1543.
- [17] 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(5): 127-130.
- [18] LIU Y W, SUN W F, ZHANG X X, et al. Compound tufuling granules regulate glucose transporter 9 expression in kidney to influence serum uric acid level in hyperuricemia mice[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(11): 823-829.
- [19] 周盼. 基于肠道转运体研究大黄酸干预尿酸代谢的分子机制[D]. 泉州: 华侨大学, 2017.
- [20] 王雨, 林志健, 边猛, 等. 维药菊苣提取物对高尿酸血症状态下肠道屏障的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 1718-1723.
- [21] 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分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 145-149.
- [22] Umamaheswari M, Asokkumar K, Sivashanmugam A T, et al. *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 124(3): 646-648.
- [23] 杨道茂, 欧阳明安. 9 种中药提取物黄嘌呤氧化酶抑制活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(4): 597-600, 578.
- [24] 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 acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver[J]. J Ethnopharmacol, 2004, 93(1): 133-140.
- [25] Ho S T, Tung Y T, HUANG C C, et al. The Hypouricemic effect of *Balanophora laxiflora* extracts and derived phytochemicals in hyperuricemic mice[J]. Evid-based Compl Alt, 2012, doi: 10.1155/2012/910152.
- [26] 夏宏军, 褚梦颖, 徐云婷, 等. 银杏酸单体对黄嘌呤氧化酶的体外抑制活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(8): 1387-1391.
- [27] 徐婷婷, 承志凯, 尹莲, 等. 土茯苓抑制黄嘌呤氧化酶活性的物质基础研究[J]. 中药材, 2012, 35(4): 582-585.
- [28] 齐万虎, 蒋企洲, 蒋建勤. 黄瑞香中化学成分抑制黄嘌呤氧化酶活性及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 141-144.
- [29] 李英, 陈君, 李萍. 金银花中酚酸类和黄酮类成分的黄嘌呤氧化酶抑制活性[J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(5): 407-411.
- [30] 杨连菊, 冯学锋, 徐子芳, 等. 炉甘石药材及饮片中氧化锌紫外可见测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 89-91.
- [31] Kaufmann C M, Grassmann J, Letzel T. HPLC method development for the online-coupling of chromatographic *Perilla frutescens* extract separation with xanthine oxidase enzymatic assay [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 124: 347-357.
- [32] 刘又豪, 赵力超, 卢嘉欣, 等. 桉叶提取物抑制黄嘌呤氧化酶活性成分的分纯化及其动力学研究[J]. 广东农业科学, 2014, 41(14): 100-105.
- [33] 姚兰, 焦安妮, 冯琳琳, 等. 大叶冬青药材的黄嘌呤氧化酶抑制作用的谱效关系研究[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4838-4843.
- [34] 李相成, 刘小红, 高华, 等. 虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用与酶动力学研究[J]. 中国药房, 2015, 26(4): 494-496.
- [35] 杨增明, 杨树娟. 土连翘体外抑制黄嘌呤氧化酶活性研究[J]. 中药材, 2010, 33(6): 964-967.
- [36] 孙永丽, 赵焕新, 白虹. HPLC 法体外筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(8): 1391-1396.
- [37] SHU L, XING J, ZHONG Z, et al. Ultrahigh performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry inhibitors fishing assay: a novel method for simultaneously screening of xanthine oxidase inhibitor and superoxide anion scavenger in a single analysis[J]. Anal Chim Acta, 2012, 715(1): 64-70.
- [38] 徐晨, 刘舒, 刘志强, 等. 离心超滤质谱法筛选中药复方二妙丸中黄嘌呤氧化酶抑制剂[J]. 高等学校化学学报, 2014, 35(8): 1640-1645.
- [39] 彭韵洁, 陈荣达, 贺益强, 等. 红车轴中异黄酮类物质的分析鉴定及活性评价研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 294-297.
- [40] 唐英, 刘春明, 任浚萁, 等. 山竹果中 α -葡萄糖苷酶和黄嘌呤氧化酶抑制剂的超滤质谱分析[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2322-2325.
- [41] LIU Y, LIU S, LIU Z Q. Screening and determination of potential xanthine oxidase inhibitors from *Radix Salviae*

- Miltiorrhizae using ultrafiltration liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogra B, 2013, 923 (4):48-53.
- [42] SONG H P, ZHANG H, FU Y, et al. Screening for selective inhibitors of xanthine oxidase from *Flos Chrysanthemum* using ultrafiltration LC-MS combined with enzyme channel blocking [J]. J Chromatogra B, 2014, 961:56-61.
- [43] WANG J, LIU S, MA B, et al. Rapid screening and detection of XOD inhibitors from *S. tamariscina*, by ultrafiltration LC-PDA-ESI-MS combined with HPLCC [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(28):7379-7387.
- [44] ZHANG H J, HU Y J, XU P, et al. Screening of potential xanthine oxidase inhibitors in *Gnaphalium hypoleucum* DC. by immobilized metal affinity chromatography and ultrafiltration-ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Molecules, 2016, 21(9):1242-1252.
- [45] 王娟, 许兵兵, 曾金祥, 等. 车前子中黄嘌呤氧化酶抑制剂成分的电化学生物传感筛选研究 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(7):1215-1222.
- [46] 周娟, 刘敏, 丁虹. 丝印电极法体外筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂方法研究 [J]. 化学学报, 2008, 66(8):995-998.
- [47] 高洪福, 曲岩, 肖伍英, 等. 黄嘌呤氧化酶在 SWNTs + DDAB/EPG 上的电化性质研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2012, 35(4):96-96.
- [48] 李振国. 芹菜素对黄嘌呤氧化酶电极的抑制作用研究 [J]. 中医临床研究, 2010, 2(20):14-15.
- [49] 王雪洁. 菊苣治疗高尿酸血症多靶点作用机制的分子对接研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [50] 冯荣楷, 郭潮辉, 周志敏. 中草药有效成分化合物与黄嘌呤氧化酶的分子对接及药物特性研究 [J]. 计算机与应用化学, 2013, 30(1):8-12.
- [51] 张明波, 冯冠英, 栾泽柱, 等. 基于分子对接方法的虎杖抗痛风作用机制研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(10):2164-2165.
- [52] DONG Y, HUANG H, ZHAO M, et al. Mechanisms underlying the xanthine oxidase inhibitory effects of dietary flavonoids galanginandpinobanksin [J]. J Funct Foods, 2016, 24:26-36.
- [53] LIN S, ZHANG G, LIAO Y, et al. Dietary flavonoids as xanthine oxidase inhibitors: structure-affinity and structure-activity relationships [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(35):7784-7794.
- [54] 谢晶, 张晨辉, 曾金祥, 等. 基于液质联用及分子对接技术的短管兔耳草中 XOD 捕集成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17):3595-3603.
- [55] 叶素梅. 芹菜素对黄嘌呤氧化酶活性的抑制机理研究 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(21):67-71.
- [56] 杨德俊, 姚香草, 许重远, 等. 红茴香小分子化合物降尿酸活性及 ADMET 性质的分子对接 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(23):2750-2752, 2777.
- [57] 周月, 张冰, 林志健, 等. 基于分子对接技术虚拟筛选菊苣与肠道 CNT2 结合的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21):3962-3967.
- [58] 曾宇鹏, 谢席胜. 高尿酸对肾小管上皮细胞 HK-2 增殖、凋亡的影响及其机制研究 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(24):4042-4045.
- [59] Wempe M F, Jutabha P, Quade B, et al. Developing potent human uric acid transporter 1 (hURAT1) Inhibitors [J]. J Med Chem, 2011, 54(8):2701-2713.
- [60] 陈嘉盛, 吴婷, 丘玉昌, 等. 以 hURAT1 为靶点的排尿酸药物体外细胞筛选模型的建立和应用 [J]. 生命科学研究, 2016, 20(3):248-254.
- [61] YONG T Q, ZUO D, CHEN S D, et al. Homology modeling and molecular docking of URAT1 with chemotherapeutic agents in hyperuricemia and gout [J]. Bioinfo Proteom Img Anal, 2017, 3(2):203-209.

[责任编辑 周冰冰]