

小鼠免疫力的实验研究[J]. 实用预防医学, 2017, 24(2): 225-227.

[17] 高文芹, 贾力, 赵余庆. 人参的抗癌作用及其机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 53-58.

[18] Guo F, Mead J, Aliya N, *et al.* RO 90-7501 enhances TLR3 and RLR agonist induced antiviral response [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e42583.

[19] Trapp S, Derby N R, Singer R, *et al.* Double-stranded RNA

analog poly (I : C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G[J]. *J Virol*, 2009, 83(2): 884-895.

[20] Van D N, Goff D, Katsura C, *et al.* The interferon-induced protein BST-2/CD317 restricts release of virions from infected cells and is down-regulated from the cell surface by HIV-1 Vpu [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(4): 245-252.

## 30种黄酮抑制黄嘌呤氧化酶活性的筛选

郝悦<sup>1,2</sup>, 焦安妮<sup>3</sup>, 于敏<sup>2</sup>, 高金芝<sup>1</sup>, 何鑫<sup>2</sup>, 张梦鸽<sup>1</sup>, 焦连庆<sup>2\*</sup>, 张晶<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省中医药科学院植物化学所, 吉林 长春 130012; 3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130121)

**摘要:** 目的 筛选30种黄酮抑制黄嘌呤氧化酶活性。方法 改良的HPLC法测定各黄酮抑制率, 以筛选活性成分。腹腔注射氧嗪酸钾诱导高尿酸血症小鼠模型后, 磷钨酸法检测血清尿酸水平, 分光光度法检测血清黄嘌呤氧化酶水平, 脲酶法检测血清尿素氮水平, 肌氨酸氧化酶法测血清肌酐水平。结果 12种黄酮在120 μmol/L浓度下、9种黄酮在60 μmol/L浓度下对黄嘌呤氧化酶有抑制作用, 以木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚作用最强, IC<sub>50</sub>值分别为42.02、120.22、135.98、184.36 μmol/L。与模型组比较, 木犀草素组(20、40、80 mg/kg)、芹菜素组(200 mg/kg)、山柰酚组(150、300 mg/kg)尿酸、黄嘌呤氧化酶、尿素氮、肌酐水平显著降低(P<0.05, P<0.01)。

**结论** 3种黄酮(木犀草素、山柰酚、芹菜素)可明显抑制黄嘌呤氧化酶活性, 从而呈现出降尿酸作用。

**关键词:** 黄酮; 黄嘌呤氧化酶; 高尿酸血症

**中图分类号:** R966

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2019)01-0055-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.01.012

## Activity screening of thirty flavonoids on the inhibition of xanthine oxidase

HAO Yue<sup>1,2</sup>, JIAO An-ni<sup>3</sup>, YU Min<sup>2</sup>, GAO Jin-zhi<sup>1</sup>, HE Xin<sup>2</sup>, ZHANG Meng-hu<sup>1</sup>, JIAO Lian-qing<sup>2\*</sup>, ZHANG Jing<sup>1\*</sup>

(1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Institute for Plant Chemistry, Jilin Provincial TCM Academy, Changchun 130012, China; 3. School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130121, China)

**ABSTRACT: AIM** To screen thirty flavonoids on the inhibition of xanthine oxidase activity. **METHODS** Modified HPLC was adopted in the inhibition rate determination of various flavonoids for active constituents screening. After the induction of hyperuricemia mouse models by intraperitoneal injection of oteracil potassium, the serum levels of uric acid, xanthine oxidase, urea nitrogen, creatinine were detected by methods of phosphotungstic acid, spectrophotometry, urease, and sarcosine oxidase, respectively. **RESULTS** Twelve flavonoids at the concentration of 120 μmol/L, and nine flavonoids at the concentration of 60 μmol/L exhibited inhibitory effects on xanthine oxidase, among which luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol with IC<sub>50</sub> values of 42.02, 120.22, 135.98, 184.36 μmol/L, respectively were found to be the strongest. Compared with the model group, luteolin

收稿日期: 2018-03-01

作者简介: 郝悦(1992—), 女, 硕士生, 从事天然药物化学研究。Tel: 15764317120, E-mail: 1252293335@qq.com

\* 通信作者: 焦连庆(1965—), 博士, 主任药师, 从事天然药物化学及代谢研究。Tel: 18686602593, E-mail: jllq51@tom.com

张晶(1971—), 博士, 教授, 从事天然药物化学研究。Tel: 13353144693, E-mail: zhjing0701@163.com

groups (20, 40, 80 mg/kg), apigenin groups (200 mg/kg), kaempferol groups (150, 300 mg/kg) demonstrated significantly decreased levels of uric acid, xanthine oxidase, urea nitrogen, and creatinine ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION** The three flavonoids, luteolin, kaempferol, and apigenin can obviously inhibit xanthine oxidase activity and thus produce hypouricemic effects.

**KEY WORDS:** flavonoids; xanthine oxidase; hyperuricemia

黄嘌呤氧化酶是一种复合黄素酶,也是体内核酸代谢的重要酶,其作用是将体内黄嘌呤和次黄嘌呤氧化后生成尿酸,该成分产生过多、肾脏尿酸排泄障碍或这2个因素的综合作用将导致高尿酸血症发生<sup>[1-2]</sup>。在我国,痛风已成为仅次于糖尿病的第二大代谢类疾病,患者高达8 000万人,故抑制黄嘌呤氧化酶活性,从根本上减少体内尿酸产生,是治疗高尿酸血症的重要途径之一。目前,临床上使用的黄嘌呤氧化酶抑制剂主要为别嘌呤醇,但在显著治疗痛风的同时存在严重的毒副作用,约2%的患者对该药物过敏,约3%~10%的患者在治疗过程中出现不良反应<sup>[3]</sup>,从而限制了其临床应用,故开发出新型抑制剂具有重要意义。

黄酮存在于蔬菜、水果、牧草、药用植物中,具有广泛的药理活性,包括抗肿瘤、清除自由基、抗病毒等<sup>[4-5]</sup>,而且毒副作用小。文献报道,一些植物所含总黄酮能抑制黄嘌呤氧化酶活性<sup>[6-8]</sup>,故本实验考察30种黄酮其抑制作用,从而筛选出活性成分,为治疗高尿酸血症奠定基础。

## 1 材料

1.1 动物 雄性ICR小鼠,体质量22~25 g,购自长春亿斯实验动物技术有限责任公司,动物许可证号SCXK-(吉)011-0007,饲养条件符合实验动物福利伦理委员会要求。小鼠自由饮食饮水,室温23.0~25.0℃,湿度55%~65%,每天更换垫料,适应性饲养1周。

1.2 试药 槲皮素、木犀草素、芹菜素、水飞蓟宾、山柰酚、二氢杨梅素、芦丁(陕西慧科植物开发有限公司,含有量>98%);白杨素、黄芩素、汉黄芩素、高良姜素、大豆苷、黄豆黄苷、染料木素、染料木苷、山柰酚-3-O-芸香糖、橙皮素(南京泽朗医药科技有限公司,含有量>98%);杨梅素、花旗松素、柚皮素、甘草素、葛根素、山姜素、大豆黄素、黄豆黄素、异鼠李素、黄芩苷、野黄芩苷、甘草苷、木犀草苷(南京源植科技有限公司,含有量>98%)。黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、别嘌呤醇、氧嗪酸钾购自美国Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。黄嘌呤氧化酶、尿酸、尿素

氮、肌酐试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 BP211D电子天平(万分之一,德国Sartorius公司);KQ-250DB数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TGL-16G离心机(上海安亭科学仪器制造厂);SpectraMax Plu384续光谱扫描式酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];UV-1801紫外分光光度计[北京北分瑞利分析仪器(集团)有限责任公司]。

## 2 方法

### 2.1 黄嘌呤氧化酶活性抑制作用测定

采用改良的HPLC法<sup>[9-10]</sup>。取不同质量浓度供试品各200 μL、黄嘌呤氧化酶400 μL(20 U/L),37℃下孵化15 min后,加入黄嘌呤贮备液400 μL(0.4 μmol/L)启动反应,37℃下反应30 min后,在反应液中加入盐酸500 μL(1 mol/L)终止反应,反应液用PBS缓冲液(pH 7.5)定容至2 mL,即得供试品溶液,取20 μL进行分析,平行3次,取峰面积平均值。

色谱条件为流动相0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(含1%甲醇);检测器DAD检测器;检测波长254 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温室温;进样量20 μL。再计算抑制率,公式为抑制率 =  $[(A-C) / (B-C)] \times 100\%$ (A为加入抑制剂的反应体系30 min反应液中黄嘌呤质量浓度,B为未加入抑制剂的反应体系0 min反应液中黄嘌呤质量浓度,C为未加入抑制剂的反应体系30 min反应液中黄嘌呤质量浓度),根据抑制率和样品质量浓度进行线性回归,测定IC<sub>50</sub>。

2.2 建模、分组、给药 120只小鼠随机分为空白组、模型组、别嘌呤醇组及4种黄酮高、中、低剂量组,每组8只。各组小鼠每天灌胃1次,连续7 d,空白组、模型组小鼠给予等剂量0.5% CMC-Na,别嘌呤醇按10 mg/(kg·d)剂量给药,黄酮组按相应剂量给药。末次给药前1 h,除空白组外各组小鼠腹腔注射270 mg/kg氧嗪酸钾盐以建立高尿酸血症小鼠模型,空白组小鼠腹腔注射等量0.5% CMC-Na。1 h后,各组小鼠摘除眼球取血,测定血清尿酸、黄嘌呤氧化酶、尿素氮、肌酐

水平。

2.3 血清尿酸、黄嘌呤氧化酶水平检测 取血液样品，室温下凝固 30 min 后，3 500 r/min 离心取上清液，尿酸试剂盒（磷钨酸法）检测血清尿酸水平，黄嘌呤氧化酶试剂盒（分光光度法）检测血清黄嘌呤氧化酶水平。

2.4 肾脏功能检测 按“2.3”项下方法制备血清，脲酶法检测血清尿素氮水平，肌氨酸氧化酶法检测血清肌酐水平。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 17.0 软件进行处理，数据采用( $\bar{x} \pm s$ )表示，多组间均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA)，组间均数比较采用独立 *t* 检

验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 活性成分筛选 表 1 显示，12 种黄酮（占比 43%）在 120  $\mu\text{mol/L}$  浓度下、9 种黄酮（占比 30%）在 60  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对黄嘌呤氧化酶有抑制作用； $\text{IC}_{50}$  值最小的为木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚 (42.02、120.22、135.98、184.36  $\mu\text{mol/L}$ )，故选择四者作为活性成分进行下一步体外实验。另外，别嘌呤醇作为一种常用的黄嘌呤氧化酶抑制剂，在相同条件下  $\text{IC}_{50}$  为 126.57  $\mu\text{mol/L}$ ，抑制效果不如木犀草素和槲皮素，故再进行体内实验。

表 1 活性成分筛选结果

Tab. 1 Results of active constituent screening

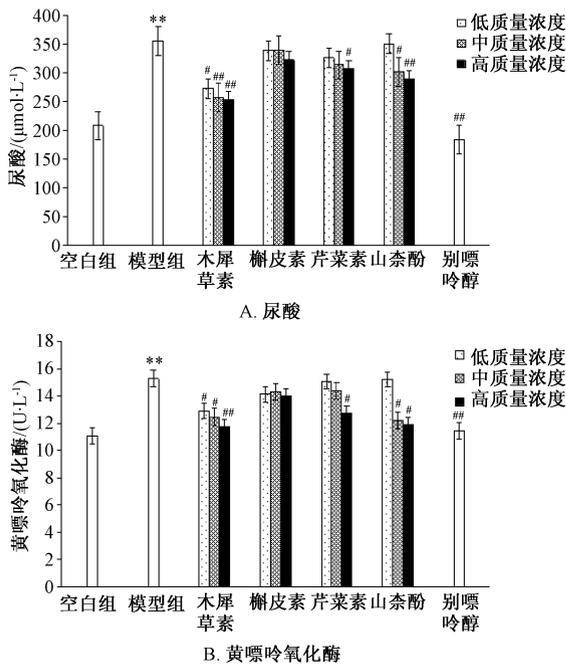
成分	抑制率/%		$\text{IC}_{50}$ / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
	120 $\mu\text{mol/L}$	60 $\mu\text{mol/L}$	
白杨素	9.41	2.39	—
芹菜素	45.93	37.81	135.98
木犀草素	76.51	63.78	42.02
黄芩素	—	—	—
汉黄芩素	4.56	—	—
高良姜素	12.21	7.23	—
山柰酚	37.50	29.51	184.36
槲皮素	52.78	31.11	120.22
杨梅素	2.57	—	—
异鼠李素	37.45	27.61	261.20
柚皮素	—	—	—
山姜素	—	—	—
花旗松素	—	—	—
二氢杨梅素	4.48	—	—
染料木素	—	—	—
大豆黄素	—	—	—
黄豆黄素	—	—	—
山柰酚-3-O-芸香糖	—	—	—
芦丁	—	—	—
大豆苷	—	—	—
黄豆黄苷	—	—	—
染料木苷	—	—	—
黄芩苷	—	—	—
野黄芩苷	—	—	—
甘草苷	—	—	—
木犀草苷	34.57	23.8	256.12
葛根素	—	—	—
甘草素	—	—	—
水飞蓟宾	12.62	8.26	—
橙皮素	—	—	—
别嘌呤醇	45.37	37.44	126.57

注：—表示该成分无抑制作用，无法测出抑制率和  $\text{IC}_{50}$

3.2 对小鼠血清尿酸、黄嘌呤氧化酶的影响 图 1 显示，与空白组比较，模型组小鼠血清尿酸、黄嘌呤氧化酶水平显著升高 ( $P < 0.01$ )，表明造模成功；与模型组比较，木犀草素组 (20、40、

80 mg/kg)、芹菜素组 (200 mg/kg)、山柰酚组 (150、300 mg/kg) 显著降低尿酸水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，而木犀草素组 (20、40、80 mg/kg)、芹菜素组 (200 mg/kg)、山柰酚组 (150、300 mg/kg)

显著降低黄嘌呤氧化酶水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 其中木犀草素 80 mg/mL 组与别嘌呤醇组最接近, 作用最强。另外, 槲皮素组两者水平均无明显变化 ( $P > 0.05$ )。



注: 与空白组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

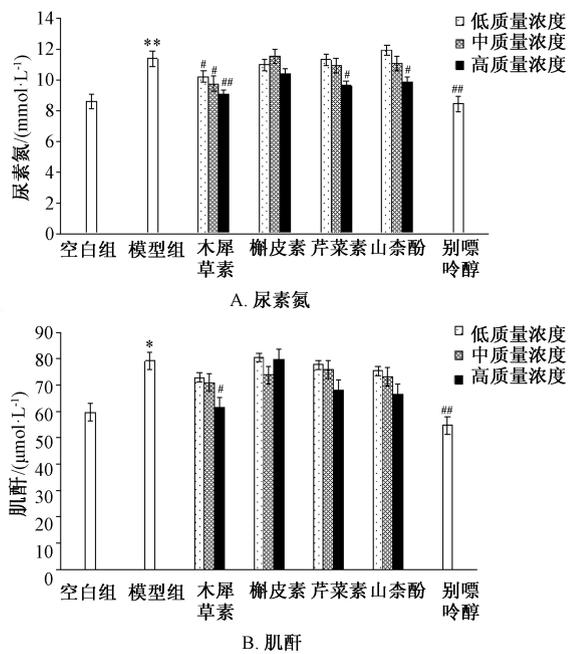
图1 4种黄酮对小鼠血清尿酸、黄嘌呤氧化酶水平的影响  
Fig. 1 Effects of four flavonoids on mouse serum levels of uric acid and xanthine oxidase

3.3 对小鼠血清尿素氮、肌酐水平的影响 图2显示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清尿素氮、肌酐水平显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明造模成功; 与模型组比较, 木犀草素组 (20、40、80 mg/kg)、芹菜素组 (200 mg/kg)、山柰酚组 (300 mg/kg) 显著降低尿素氮水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而木犀草素组 (80 mg/kg) 显著降低肌酐水平 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

近年来, 高尿酸血症发病率显著年轻化<sup>[11-12]</sup>, 并被认为是心血管事件的独立危险因素<sup>[13]</sup>。目前, 用于减少尿酸的药物主要是西药, 如别嘌呤醇、苯溴马隆、非布索坦等, 可抑制合成, 促进尿酸排泄, 虽然药物作用靶点清晰有效, 但副作用严重, 长期服用可引起肝肾损伤、发热、皮疹、骨髓抑制等副作用<sup>[14-16]</sup>; 源自天然产物的黄嘌呤氧化酶抑制剂具有来源广泛、安全性高的特点, 许多含黄酮的蔬菜<sup>[17-18]</sup>、真菌<sup>[19]</sup>、植物<sup>[20-21]</sup>都具有该作用。

本实验筛选了30种黄酮对黄嘌呤氧化酶活性



注: 与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

图2 4种黄酮对小鼠血清尿素氮、肌酐水平的影响  
Fig. 2 Effects of four flavonoids on mouse serum levels of urea nitrogen and creatinine

的抑制作用, 发现木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚  $IC_{50}$  值最低, 即抑制作用最强<sup>[22]</sup>, 而且给予四者后高尿酸血症小鼠血清尿酸、黄嘌呤氧化酶水平显著降低。尿素氮、肌酐是肾功能指标, 肾功能损害时将导致两者水平升高<sup>[23]</sup>, 本实验发现以上4种黄酮对两者水平的影响程度不如尿酸、黄嘌呤氧化酶水平显著, 推测可能对小鼠肾脏中尿酸排泄无明显影响, 需要进一步实验证实。

然后, 分析了30种黄酮的结构, 发现对黄嘌呤氧化酶的抑制作用依次为黄酮>黄酮醇>异黄酮>二氢黄酮>二氢黄酮醇>黄酮苷, 可能与成分脂溶性、羟基位置、氢键有关。其中, 黄酮、黄酮醇为平面型分子, 堆砌紧密, 分子间引力较大, 脂溶性较强; 二氢黄酮、二氢黄酮醇为非平面分子, 分子间引力降低, 有利于水分子进入, 脂溶性降低; 异黄酮的B环受吡喃环碳基的立体阻碍形成非平面分子, 故脂溶性降低; 黄酮中的羟基被糖苷化后, 水溶性增加, 脂溶性降低, 而脂溶性增加可使其更容易与黄嘌呤氧化酶的疏水活性中心结合, 从而表现出良好的酶抑制活性<sup>[24]</sup>; 黄酮中  $C_5$  和  $C_7$  位上的羟基与  $C_2-C_3$  之间的双键能明显提高该成分抑制黄嘌呤氧化酶的作用<sup>[25]</sup>。

综上所述, 3种黄酮 (木犀草素、山柰酚、芹

菜素) 可作为预防和治疗小鼠高尿酸血症的潜在药物, 能为进一步研究痛风提供新思路, 同时也为相关资源开发利用提供科学依据。

参考文献:

[ 1 ] 焉翠蔚, 赵庆娅, 张 璐, 等. 海带提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(12): 36-40.

[ 2 ] Roddy E, Zhang W Y, Doherty M. The changing epidemiology of gout [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, 3(8): 443-449.

[ 3 ] Terkeltaub R A. Gout [J]. *New Engl J Med*, 2003, 349: 1647-1655.

[ 4 ] Vázquez-Mellado J, Meoño Morales E, Pacheco-Tena C, et al. Relation between adverse events associated with allopurinol and renal function in patients with gout[J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(10): 981-983.

[ 5 ] 刘 炎. 植物黄酮类化合物功能的研究进展[J]. 科技信息, 2012(18): 131-132.

[ 6 ] 郑小微, 夏道宗, 张 英. 梅花总黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及其抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 168-170, 173.

[ 7 ] 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.

[ 8 ] Wang K, Wang R P, Li J, et al. The preventive and therapeutic effects of mulberry leaf flavonoids on adenine induced hyperuricemia and kidney injury in rats[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2012, 24: 172-175.

[ 9 ] 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.

[ 10 ] 罗六保, 谢志鹏. 紫外分光光度法测定中药中黄嘌呤氧化酶抑制活性研究[J]. 化学世界, 2009, 50(5): 270, 273-275.

[ 11 ] Pascart T, Richette P. Current and future therapies for gout [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18(12): 1201-1211.

[ 12 ] Kim K Y, Ralph Schumacher H, Hunsche E, et al. A literature review of the epidemiology and treatment of acute gout [J]. *Clin Ther*, 2003, 25(6): 1593-1617.

[ 13 ] Zhang J, Dierckx R, Mohee K, et al. Xanthine oxidase inhibition for the treatment of cardiovascular disease: An updated systematic review and meta-analysis [J]. *ESC Heart Fail*,

2017, 4(1): 40-45.

[ 14 ] Chaichian Y, Chohan S, Becker M A. Long-term management of gout: nonpharmacologic and pharmacologic therapies [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2014, 40(2): 357-374.

[ 15 ] Chen I H, Kuo M C, Hwang S J, et al. Allopurinol-induced severe hypersensitivity with acute renal failure [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2005, 21(5): 228-232.

[ 16 ] Hammer B, Link A, Wagner A, et al. Hypersensitivity syndrome during therapy with allopurinol in asymptomatic hyperuricemia with a fatal outcome [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2001, 126(47): 1331-1334.

[ 17 ] Nile S H, Nile A S, Keum Y S, et al. Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors [J]. *Food Chem*, 2017, 235: 119-126.

[ 18 ] Dew T P, Day A J, Morgan M R. Xanthine oxidase activity *in vitro*: effects of food extracts and components [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(16): 6510-6515.

[ 19 ] Song Y S, Kim S H, Sa J H, et al. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 88(1): 113-116.

[ 20 ] Zhu C, Tai L L, Wan X C, et al. Comparative effects of green and black tea extracts on lowering serum uric acid in hyperuricemic mice [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 2123-2128.

[ 21 ] Lemos Lima Rde C, Ferrari F C, de Souza M R, et al. Effects of extracts of leaves from *Sparattosperma leucanthum* on hyperuricemia and gouty arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 161: 194-199.

[ 22 ] 祁 鑫, 王昌禄, 李凤娟, 等. 常见蔬菜提取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的筛选研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(5): 511-514.

[ 23 ] 黄敬群, 朱妙章, 王四旺. 染料木素、芹菜素、槲皮素、芦丁和落新妇苷对高尿酸血症小鼠黄嘌呤氧化酶活性及血清尿酸水平的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(4): 561-565.

[ 24 ] da Silva S L, da Silva A, Honório K M, et al. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase [J]. *J Mol Struc-Theochem*, 2004, 684(1-3): 1-7.

[ 25 ] Montoro P, Braca A, Pizza C, et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species [J]. *Food Chem*, 2005, 92(2): 349-355.