

## 穿山龙醇提取物对高尿酸血症小鼠的治疗作用

单海丽<sup>1</sup>, 单瑞平<sup>2</sup>, 傅旭春<sup>3</sup>

1. 浙江大学医学院附属第二医院药剂科, 浙江 杭州 310009

2. 浙江万晟药业有限公司, 浙江 杭州 310013

3. 浙江大学城市学院药物研究所, 浙江 杭州 310015

**[摘要]** **目的:** 研究穿山龙醇提取物对高尿酸血症小鼠的降血尿酸作用。**方法:** 分别用次黄嘌呤灌胃同时皮下注射氧嗪酸钾(模型A)和皮下注射尿酸(模型B)的方法建立两种小鼠高尿酸血症模型,并用穿山龙醇提取物干预两种模型,评估其降尿酸的效果。用高效液相色谱法测定血尿酸含量。**结果:** 对于次黄嘌呤和氧嗪酸钾诱导的小鼠高尿酸血症模型,模型A组、空白对照组和穿山龙醇提取物组的血尿酸水平分别为(40.03 ± 27.24)、(4.08 ± 1.47)和(18.10 ± 8.87) g/mL,穿山龙醇提取物组与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );对于尿酸诱导的小鼠高尿酸血症模型,模型B组、空白对照组和穿山龙醇提取物组的血尿酸水平分别为(18.57 ± 3.83)、(4.29 ± 2.36)和(15.36 ± 2.71) g/mL,穿山龙醇提取物组与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:** 对于上述两种高尿酸血症动物模型,穿山龙醇提取物组均有显著的降血尿酸作用。

**[关键词]** 穿山龙/治疗应用; 中草药提取物; 高尿酸血症/药物治疗; 次黄嘌呤; 尿酸; 疾病模型, 动物

**[中图分类号]** R96 **[文献标志码]** A

### Hypouricemic effect of ethanol extracts from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*

SHAN Hai-li<sup>1</sup>, SHAN Rui-ping<sup>2</sup>, FU Xu-chun<sup>3</sup> (1. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; 2. Zhejiang Wansheng Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou 310013, China; 3. Institute of Materia Medica, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China)

Corresponding author: FU Xu-chun, E-mail: fuxc@zucc.edu.cn

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of ethanol extracts from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* on hyperuricemic mice. **Methods:** The hyperuricemia was induced by gavage of hypoxanthine and subcutaneous injection of potassium oxonate (model A) or subcutaneous injection of uric acid (model B) in ICR male mice. The mice in

收稿日期:2014-05-21 接受日期:2014-11-02

基金项目:杭州市科技发展计划项目(20100331T01).

第一作者:单海丽(1984-),女,硕士,药师,主要从事药理学与临床药学研究;E-mail: 251787862@qq.com

通讯作者:傅旭春(1960-),男,博士,教授,主要从事新药研发和药物动力学研究;E-mail: fuxc@zucc.edu.cn

ethanol extracts groups were administrated with *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* ethanol extracts 5.4 g/kg by gavage, the positive control groups were given with 10 mg/ml allopurinol or 5 mg/ml benzbromarone by gavage, respectively. The plasma uric acid levels were measured by using HPLC. **Results:** The plasma uric acid levels of model group, control group and ethanol extract group in model A mice were (40.03 ± 27.24), (4.08 ± 1.47) and (18.10 ± 8.87) g/mL (compared with model group,  $P < 0.05$ ), respectively. The plasma uric acid levels of model group, control group and ethanol extract group in model B mice were (18.57 ± 3.83), (4.29 ± 2.36) and (15.36 ± 2.71) g/mL (compared with model group,  $P < 0.05$ ), respectively. **Conclusion:** The ethanol extracts from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* have certain hypouricemic effect in hyperuricemic mice induced by hypoxanthine and potassium oxonate or by uric acid.

[**Key words**] DIOSCOREA NIPPONICA/therapeutic use; Drugs, Chinese herbal; Hyperuricemia/drug therapy; Hypoxanthine; Uric acid; Disease models, animal

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2014,43(6):49-53.]

中药穿山龙为薯蓣科植物穿龙薯蓣 (*Dioscorea nipponica* Makino) 的干燥块茎,性甘、苦、温,归肝、肾、肺经,具有祛风除湿、舒筋活络、活血止痛和止咳平喘等作用,用于治疗风湿痹病、关节肿胀、疼痛麻木、跌扑损伤、闪腰岔气、咳嗽气喘等症<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明,穿山龙具有改善冠状动脉循环、增加冠状动脉流量、抗动脉粥样硬化、调节免疫、镇咳、祛痰、平喘、抗炎镇痛等作用<sup>[2-3]</sup>。近年来,对穿山龙提取方法、药理作用等的研究报道也比较多<sup>[4-8]</sup>。

穿山龙已经在中医临床实践中用于治疗高尿酸血症<sup>[9]</sup>以及由此引起的痛风性关节炎<sup>[10]</sup>,但这方面的动物实验研究报道尚不多见。本文分别用次黄嘌呤灌胃同时皮下注射氧嗪酸钾及仅皮下注射尿酸的方法建立小鼠高尿酸血症模型,考察穿山龙的降血尿酸作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验用动物为清洁级 18 ~ 22 g 雄性 ICR 小鼠 80 只,购自浙江省医学科学院〔动物生产许可证号:SCXK(浙)2008-0033〕。

### 1.2 仪器与试剂

PL2001-L 电子天平、AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;安捷伦 HPLC 1200 高效液相色谱仪;BUCHI R-210 旋转蒸发仪;

BECKMAN 64R 高速离心机。穿山龙饮片(批号 090804),杭州医药股份有限公司;薯蓣皂苷对照品(批号 111707-200501),中国药品生物制品检定所;尿酸(纯度 99%,批号 STBB7849V)和氧嗪酸钾(纯度 97.5%,批号 9B0F01),Sigma-Aldrich 公司;次黄嘌呤(纯度 > 99%,美国 SigmaH-9377),杭州昊天生物技术有限公司;色谱甲醇(批号 1105066),美国 TEDIA 天地试剂公司;乙酸(分析纯,批号 20060309),杭州化学试剂有限公司;别嘌醇片(批号 090102),重庆青阳药业有限公司;苯溴马隆片(批号 100861),德国舒曼大药厂;其他试剂均为分析纯。

### 1.3 穿山龙醇提取物的制备

薯蓣皂苷是穿山龙降血尿酸的有效成分,也是中国药典规定的指标成分<sup>[1]</sup>。由于薯蓣皂苷在醇提取物中的含量明显高于水提取物中的含量,因此选择乙醇溶液作为提取溶媒。称取一定量穿山龙饮片,用 10 倍量(V/W)的 80% 乙醇(V/V)回流提取 2 次,每次 2 h。合并提取液,旋转蒸发浓缩至近干,用纯净水将浓缩后的穿山龙醇提取物稀释至 0.54 g/mL,备用。

### 1.4 小鼠高尿酸血症模型的建立

模型 A:以 1% 羧甲基纤维素钠水溶液分别配制 50 mg/mL 次黄嘌呤混悬液和 40 mg/mL 氧嗪酸钾混悬液。参考文献[11],采用次黄嘌呤混悬液 10 mL/kg 灌胃同时皮下注射氧嗪酸钾混悬

液 10 mL/kg 的方法建立次黄嘌呤和氧嗪酸钾诱导的小鼠高尿酸血症模型。

模型 B:以 1% 羧甲基纤维素钠水溶液配制 40 mg/mL 尿酸混悬液。参考文献[12],采用皮下注射尿酸混悬液 10 mL/kg 的方法建立尿酸诱导的小鼠高尿酸血症模型。

### 1.5 分组与给药

根据引起小鼠高尿酸血症的不同机制选择合适的阳性对照药。次黄嘌呤是体内经黄嘌呤氧化酶等作用合成尿酸的重要原料,可以增加小鼠体内尿酸合成,而尿酸酶抑制剂氧嗪酸钾可以抑制尿酸在小鼠体内经尿酸酶降解,两者合用能有效提高小鼠体内血尿酸水平,黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌醇比较适合作为模型 A 的阳性对照药。苯溴马隆是促尿酸排泄药,适合作为直接注射尿酸引起高尿酸血症的模型 B 的阳性对照药。

模型 A:将小鼠随机分为 4 组,即空白对照组、模型 A 组、穿山龙醇提取物组、别嘌醇对照组,每组 10 只。在造模后 1 h 按 10 mL/kg 剂量灌胃给药,空白对照组和模型组给予相同体积的纯净水。参照《中国药典》(2010 版)的穿山龙推荐剂量<sup>[1]</sup>,穿山龙醇提取物组给予 5.4 g/kg(按生药量计)的穿山龙醇提取物,别嘌醇对照组给予以 1% 羧甲基纤维素钠水溶液配制的 10 mg/mL 别嘌醇混悬液。小鼠阳性对照药剂量参照成人剂量按体表面积换算得到。

模型 B:将小鼠随机分为 4 组,即空白对照组、模型 B 组、穿山龙醇提取物组、苯溴马隆对照组,每组 10 只。除了阳性对照药改为以 1% 羧甲基纤维素钠水溶液配制的 5 mg/mL 苯溴马隆混悬液外,其余给药方法同模型 A。

### 1.6 外标法测定血尿酸含量<sup>[13]</sup>

给药 2 h(次黄嘌呤和氧嗪酸钾造模)或 1.5 h(尿酸造模)后采血 0.5 mL,置肝素管中上下翻转摇匀,3500 r/min 离心 5 min。取上清液 100  $\mu$ L 于离心管中,加入 900  $\mu$ L 甲醇,混匀后室温下超声 20 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 200  $\mu$ L,加入 200  $\mu$ L 的 0.2% 乙酸溶液,混匀后进样分析,用外标法测定尿酸含量。

色谱条件:Phenomenex C18 POLAR-RP 80A 色谱柱(250 mm  $\times$  4.60 mm,4.6  $\mu$ m);流动相为 0.2% 乙酸溶液-甲醇(94:6);柱温为 30  $^{\circ}$ C;流速为 1.0 mL/min;紫外检测波长为 288 nm;进样

量为 10  $\mu$ L。经专属性、精密度、稳定性、线性关系、加样回收率等方法学验证,该色谱条件符合定量测定的要求。

### 1.7 数据统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析。数据呈正态分布,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两两间比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 穿山龙醇提取物对模型 A 小鼠血尿酸水平的影响

空白对照组、模型 A 组、穿山龙醇提取物组和别嘌醇对照组的血尿酸水平如表 1 所示。

表 1 穿山龙醇提取物对模型 A 小鼠血尿酸水平的影响  
Table 1 Effects of ethanol extract from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* on the plasma uric acid level in hyperuricemic mice induced with hypoxanthine and potassium oxonate ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	给药剂量 (g/kg)	血清尿酸水平 ( $\mu$ g/mL)
空白对照组	10	0	4.08 $\pm$ 1.47
模型 A 组	10	0	40.03 $\pm$ 27.24 <sup>*</sup>
穿山龙醇提取物组	10	5.4	18.10 $\pm$ 8.87 <sup>#</sup>
别嘌醇对照组	10	0.10	1.56 $\pm$ 1.28 <sup>##</sup>

与空白对照组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.01$ ;与模型 A 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

上述实验结果显示,穿山龙醇提取物组的血尿酸水平显著低于模型 A 组( $P < 0.05$ ),表明穿山龙醇提取物可以降低次黄嘌呤和氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠的血尿酸水平。

### 2.2 穿山龙醇提取物对模型 B 小鼠血尿酸水平的影响

空白对照组、模型 B 组、穿山龙醇提取物组和苯溴马隆对照组的血尿酸水平如表 2 所示。

上述实验结果显示,穿山龙醇提取物组的血尿酸水平显著低于模型 B 组( $P < 0.05$ ),表明穿山龙醇提取物可以降低尿酸诱导的高尿酸血症小鼠的血尿酸水平。

## 3 讨论

痛风是一种由于嘌呤代谢紊乱所致的疾病,其临床特点为高尿酸血症及由此而引起的急性痛

**表 2** 穿山龙醇提取物对模型 B 小鼠血尿酸水平的影响  
**Table 2** Effects of ethanol extract from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* on the plasma uric acid level in hyperuricemic mice induced with uric acid ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	给药剂量 (g/kg)	血清尿酸水平 ( $\mu\text{g/mL}$ )
空白对照组	10	0	4.29 $\pm$ 2.36
模型 B 组	10	0	18.57 $\pm$ 3.83 *
穿山龙醇提取物组	10	5.4	15.36 $\pm$ 2.71 #
苯溴马隆对照组	10	0.05	6.38 $\pm$ 2.19 ##

与空白对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型 B 组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

风性关节炎反复发作,还可引起慢性间质性肾炎和尿酸肾结石形成。近年来,随着人们生活水平的提高,饮食结构发生变化,糖、脂肪、蛋白质的摄入量明显增加,高尿酸血症和痛风的发病率迅速增加,严重危害人们的健康。目前我国临床常用的抗痛风类药物是秋水仙碱、别嘌吟、丙磺舒和苯溴马隆等西药。这些药物都有较大的毒副作用。在中药宝库中寻找和筛选疗效确切、毒副作用小的降血尿酸药物很有意义。

吕婧等<sup>[6]</sup>研究了穿山龙水提取物对尿酸钠诱导的 Wistar 大鼠急性痛风性关节炎的治疗作用,结果表明穿山龙可以减轻急性痛风性关节炎的关节肿胀程度,降低血浆中白细胞数量和血清中白细胞介素  $1\beta$  含量。周琦等<sup>[14]</sup>研究了穿山龙总皂苷对尿酸酶抑制剂奥替拉西钾诱导的高尿酸血症昆明小鼠的降血尿酸作用,结果表明穿山龙总皂苷可显著降低高尿酸血症小鼠血清尿酸水平,同时降低血清黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性并回调肾组织阴离子转运体 1 的表达量。由于黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶是参与尿酸形成的关键酶,而肾组织阴离子转运体 1 是尿酸分泌的重要转运体,因此,穿山龙总皂苷可能通过抑制黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性而降低尿酸生成,以及通过提高肾组织阴离子转运体 1 的表达而促进尿酸的排泄。

中药由于其成分复杂,通常体现出多成分、多靶点的药理作用特点。本文的研究结果显示:穿山龙醇提取物对直接注射尿酸诱导的小鼠高尿酸血症有显著的降血尿酸效果,提示其可能具有促进尿酸排泄的作用;穿山龙醇提取物对次黄嘌呤和氧嗪酸钾诱导的小鼠高尿酸血症同样有显著的

降血尿酸效果,提示穿山龙醇提取物可能也具有抑制黄嘌呤氧化酶活性的作用。穿山龙醇提取物含有薯蓣皂苷等成分,与周琦等<sup>[14]</sup>提出的穿山龙总皂苷降血尿酸作用机制一致。吕婧等<sup>[6]</sup>和周琦等<sup>[14]</sup>的研究结果还显示,穿山龙水提取物和穿山龙总皂苷的药效具有一定的剂量依赖性。穿山龙醇提取物对降血尿酸作用的影响是否也有类似的剂量依赖性有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京:中国医药科技出版社,2010,250-251. Membership of the Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. **Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I)** [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press,2010: 250-251. (in Chinese)
- [2] 楼芳嫣. 中药穿地龙的研究进展[J]. 中国药师, 2010,13(7):1041-1043. LOU Fang-fan. Advance of the study on *Rhizoma Dioscorea Nipponica* Makino [J]. **China Pharmacist**, 2010,13(7):1041-1043. (in Chinese)
- [3] 张伟锋,刘宝山. 薯蓣皂苷的药理作用研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2010,5(6):543-545. ZHANG Wei-feng, LIU Bao-shan. Advance in the study on pharmacological activities of diosgenin [J]. **World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine**, 2010,5(6):543-545. (in Chinese)
- [4] 王 俊,杨克迪,陈 钧. 超临界  $\text{CO}_2$  萃取穿山龙中薯蓣皂苷元的研究[J]. 中国药理学杂志, 2003,38(8):580-583. WANG Jun, YANG Ke-di, CHEN Jun. Study on supercritical- $\text{CO}_2$  extraction of diosgenin from *Dioscorea nipponica* [J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2003,38(8):580-583. (in Chinese)
- [5] 徐雄良,柯尊洪,张志荣. 正交试验法优选穿山龙总皂苷的提取工艺[J]. 华西药学杂志, 2003,18(2):95-98. XU Xiong-liang, KE Zun-hong, ZHANG Zhi-rong. Orthogonal test for optimization of extracting procedure to total saponins from *Rhizoma Dioscoreae Nipponicae* [J]. **West China Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2003,18(2): 95-98. (in Chinese)
- [6] 吕 婧,苗志敏,阎胜利,等. 穿山龙治疗急性痛风性关节炎的效果[J]. 青岛大学医学院学报, 2009,45(4):389-391. LU Jing, MIAO Zhi-min, YAN Sheng-li, et al. The effect of *Dioscorea Nipponica* Makino on rats with acute

- gouty arthritis [J]. **Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis**, 2009, 45(4):389-391. (in Chinese)
- [7] 赵璐,王铁杰,程磊,等. 穿山龙指纹图谱及其抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖活性相关性研究[J]. **沈阳药科大学学报**, 2013, 30(5):366-373.  
ZHAO Lu, WANG Tie-jie, CHENG Lei, et al. HPLC fingerprint analysis of *Dioscorea nipponica* Mak. and the correlation with its anticancer activity on human HepG2 cell [J]. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**, 2013, 30(5):366-373. (in Chinese)
- [8] 陈新焰,许凤,赵世华,等. 穿山龙对胰岛素抵抗糖尿病大鼠血糖改善作用及其机制[J]. **辽宁中医药大学学报**, 2009, 11(9):156-159.  
CHEN Xin-yan, XU Feng, ZHAO Shi-hua, et al. Observation of *Dioscorea Nipponica* Makino in the treatment of diabetic rat [J]. **Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine**, 2009, 11(9):156-159. (in Chinese)
- [9] 赵明成,谷慧敏,陈伟,等. 浊瘀清汤治疗高尿酸血症 64 例[J]. **中医研究**, 2012, 25(4):21-23.  
ZHAO Ming-cheng, GU Hui-min, CHEN Wei, et al. Treatment for 64 cases of hyperuricemia by using Zhuo Yu Qing Tang [J]. **Traditional Chinese Medicinal Research**, 2012, 25(4):21-23. (in Chinese)
- [10] 高菁,李靖,于秀辰,等. 商宪敏教授论治痛风经验[J]. **北京中医药大学学报(中医临床版)**, 2005, 12(3):30-31.  
GAO Jing, LI Jing, YU Xiu-chen. The experience of Professor Shang Xian-min on treating gout [J]. **Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine (Clinical Medicine)**, 2005, 12(3):30-31. (in Chinese)
- [11] 徐立,时乐. 小鼠代谢性高尿酸血症模型的复制方法初探[J]. **中国比较医学杂志**, 2006, 16(1):1-4.  
XU Li, SHI Le. A preliminary study on the establishment of a mouse model of hyperuricemia [J]. **Chinese Journal of Comparative Medicine**, 2006, 16(1):1-4. (in Chinese)
- [12] 陈光亮,孙秀霞,王钦茂,等. 小鼠高尿酸血症模型的研究[J]. **中国药理学通报**, 2001, 17(3):350-352.  
CHEN Guang-liang, SUN Xiu-xia, WANG Qin-mao, et al. Studies on mouse hyperuricemia model [J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2001, 17(3):350-352. (in Chinese)
- [13] 王建平,傅旭春,白海波. 泽泻降血尿酸乙醇提取物的提取工艺研究[J]. **中国中药杂志**, 2010, 35(14):1809-1811.  
WANG Jian-ping, FU Xu-chun, BAI Hai-bo. Study on extracting process of ethanol extract with hypouricemic effect from *Rhizoma Alismatis* [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2010, 35(14):1809-1811. (in Chinese)
- [14] 周琦,张翀,于栋华,等. 穿山龙总皂苷对高尿酸血症的降尿酸及细胞抗炎作用研究[J]. **中华中医药杂志**, 2013, 28(5):1444-1448.  
ZHOU Qi, ZHANG Chong, YU Dong-hua, et al. Study on uric acid reducing effect of total saponins from *Rhizoma Dioscoreae Nipponicae* in treating hyperuricemia and *in vitro* study of its anti-inflammatory effect [J]. **China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy**, 2013, 28(5):1444-1448. (in Chinese)

[本文编辑 沈敏 蒋婉洁]

(上接第 14 页)

- [34] LEE B E, KIM G H, PARK DO Y, et al. Acetic acid-indigo carmine chromoendoscopy for delineating early gastric cancers: its usefulness according to histological type [J]. **BMC Gastroenterol**, 2010, 10:97.
- [35] KIKUSTE I, MARQUES-PEREIRA R, MONTEIRO-SOARES M, et al. Systematic review of the diagnosis of gastric premalignant conditions and neoplasia with high-resolution endoscopic technologies [J]. **Scand J Gastroenterol**, 2013, 48(10):1108-1117.
- [36] 郭涛,陆星华,周炜洵,等. 放大胃镜结合窄带成像技术在早期胃癌诊断中的应用价值研究[J]. **中华消化内镜杂志**, 2011, 28(7):375-379.  
GUO Tao, LU Xing-hua, ZHOU Wei-xun, et al. Magnifying endoscopy with narrow-band imaging for early gastric cancer diagnosis [J]. **Chinese Journal of Digestive Endoscopy**, 2011, 28(7):375-379. (in Chinese)

[本文编辑 沈敏 蒋婉洁]