

doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2019.03.003

三种互花米草天然化合物降尿酸作用研究

张焕仕^{1,2**}, 张鹤云², 宰学明³, 赵飞¹, 雷鹏¹, 刘畅¹, 朱昌玲¹, 钦佩^{2*}

(1. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 211111; 2. 南京大学盐生植物实验室, 江苏 南京 210093;
3. 金陵科技学院园艺园林学院, 江苏 南京 210038)

摘要 采用腹腔注射次黄嘌呤的方法构建高尿酸血症小鼠动物模型, 选择苯溴马隆为阳性对照, 选择互花米草精粉和去糖互花米草精粉作为拟阳性对照, 研究异戊基奎尼酸(绿原酸)、苜蓿素和对香豆酸三种互花米草天然化合物的降尿酸作用。结果表明: 对香豆酸可显著降低高尿酸血症小鼠的血清尿酸和血糖水平, 其降尿酸和降血糖效果优于苯溴马隆。对香豆酸、绿原酸和苜蓿素能降低血清肌酐、尿素氮、总胆固醇和甘油三酯水平, 同时还可以显著提高血清总蛋白浓度, 具有一定的保护肾、降血脂作用。研究结果也表明, 互花米草精粉具有更强的保肾护肝作用。

关键词 互花米草; 对香豆酸; 高尿酸血症; 尿酸

中图分类号: Q949

文献标识码: A

文章编号: 1006-9690(2019)03-009-04

Study on the Effect of Three Natural Compounds in *Spartina alterniflora* on Uric Acid

Zhang Huanshi^{1,2**}, Zhang Heyun², Zai Xueming³, Zhao Fei¹, Lei Peng¹,
Liu Chang¹, Zhu Changling¹, Qin Pei^{2*}

(1. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 211111, China;
2. Halophyte Research Lab, Nanjing University, Nanjing 210093, China;
3. Department of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

Abstract The mice models of hyperuricemia were established by intraperitoneal injection of hypoxanthine. The benzbromarone was selected as the positive control. The *Spartina alterniflora* powder and the deglycosylated *S. alterniflora* powder were selected as the pseudo-positive controls to study the uric acid-lowering effect of three kinds of *S. alterniflora* compounds, quinic acid (chlorogenic acid), triclin and p-coumaric acid. The results showed that p-coumaric acid could significantly reduce serum uric acid and blood glucose levels in mice with hyperuricemia, and was superior to bromomalon in reducing uric acid and lowering blood glucose. The p-coumaric acid, chlorogenic acid and triclin can also lower serum creatinine, urea nitrogen, total cholesterol and triglyceride levels, and also significantly increase serum total protein concentration, which has certain functions of protecting kidney and lowering blood fat. The results also show that *S. alterniflora* powder may have a stronger liver-kidney-protecting effect.

Key words *Spartina alterniflora*; P-coumaric acid; Hyperuricemia; Uric acid

互花米草(*Spartina alterniflora* Loisel.) 是禾本科米草属多年生草本植物, 原产于北美大西洋沿岸, 多在中潮带上部至高潮带生长发育。1979年南京大学仲崇信教授等将互花米草由美国引入我国, 目前在

我国沿海地区分布总面积达到 55 468 hm²^[1]。研究表明, 互花米草富含黄酮、多糖、皂苷等多种生物活性成分^[2-4]。通过 GC-MS 分析显示, 米草多糖的单糖主要为鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、

收稿日期: 2019-05-05, 录用日期: 2019-05-29

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC0506005); 江苏省“333 高层次人才培养工程”项目。

* 通讯作者: 钦佩(1946-) 男, 硕士, 教授, 研究方向为海滨湿地生态和米草生态工程。Email: qinpei@nju.edu.cn

** 共同通讯作者: 张焕仕(1978-) 男, 博士, 副研究员, 研究方向为土壤生态学与植物资源利用。Email: zhanghuanshi@126.com

葡萄糖、半乳糖^[3]。韩顺风等研究确定了互花米草中含有的对羟基肉桂醛、麦角甾醇、麦黄酮等15个化合物的结构^[4]。

近年来随着经济发展和生活水平提高,高尿酸血症发病率越来越高。高尿酸血症除了会引发痛风以外,还与高血压、动脉粥样硬化、慢性肾脏疾病以及其它代谢紊乱症的发生具有内在联系^[5-6]。目前常用高尿酸血症临床治疗药物(如别嘌醇)均存在较大毒副作用,对胃肠道、肝脏、肾脏等存在一定程度损伤,引起人们对传统类高尿酸血症治疗药物安全性的关注^[7]。因此,从植物资源中寻找安全、有效的降尿酸药物已成为一个研究热点^[8-10]。为探索互花米草降尿酸的生物功效,我们对互花米草进行了活性物质提取、分离、纯化和鉴定,获得多个单体化合物(另文发表)。其中,异戊基奎尼酸、对香豆酸和苜蓿素都是典型的抗菌消炎、保肝利胆、降血脂、抗氧化、抗痛风等的功能成分。本试验选择互花米草提取物中分离纯化的异戊基奎尼酸、苜蓿素和对香豆酸进行降尿酸动物模型试验,选择苯溴马隆为阳性对照,选择两种形态的米草提取物作为拟阳性对照,考察米草天然化合物降低小鼠血尿酸的效应,为互花米草的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

昆明种小白鼠 雄性 80只,体重20~25g,由南京医科大学动物饲养中心提供,清洁级:二级,动物合格证号:SCXK(苏)2016-0003。造模剂次黄嘌呤由Aladdin Chemistry公司生产(批号:31813);阳性对照:苯溴马隆(德国赫曼大药厂,批号:180619);拟阳性对照:互花米草精粉、去糖互花米草精粉;空白对照处理:生理盐水;试验处理:米草提取物中分离鉴定的三个化合物:绿原酸(异戊基奎尼酸)、苜蓿素、对香豆酸;羧甲基纤维素钠(CMC-Na)由世贸天珍制药有限公司生产。注射器:1ml、5ml;离心管:1.5ml、2ml、5ml;采血用毛细血管;饲喂器:平头9#针头;贝克曼LX20全自动生化分析仪。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂配制

(1) 互花米草精粉配制

采集互花米草地上部分100kg,晒干、切割成2~3cm长,加20倍热水浸提,浓缩提取液为深棕色液体(10kg左右)喷雾干燥制得互花米草精粉。准确称取米草精粉1g,用0.8% CMC-Na溶液将米草精粉(按总皂

苷含量5.7%计)配制成4.5mg/ml剂量试液。

(2) 去糖互花米草精粉配制

称取米草精粉2g,用20ml 70%乙醇沉淀并过滤去除米草精粉的多糖,浓缩制成去糖米草精粉浸膏,再用0.8% CMC-Na溶液将去糖米草精粉浸膏(按总皂苷含量5.7%计)配制成4.5mg/ml的剂量试液。

(3) 试验药剂配制

分别称取20mg 绿原酸、20mg 苜蓿素、20mg 对香豆酸,各自溶于40ml 0.8% CMC-Na溶液中,使三种化合物的CMC-Na溶液浓度均为0.5mg/ml。

1.2.2 模型动物试验组别设计

空白对照组(生理盐水)10只小鼠;模型组(CMC-Na)10只小鼠;米草精粉组(4.5mg/ml)10只小鼠;去糖米草精粉组(4.5mg/ml)10只小鼠;绿原酸组(0.5mg/ml)10只小鼠;苜蓿素组(0.5mg/ml)10只小鼠;对香豆酸组(0.5mg/ml)10只小鼠;苯溴马隆组(0.5mg/ml)10只小鼠。

1.2.3 处理方法

对各组受试动物每天给药一次(每天给药前称体重),连续给药7天,各动物组实验方法:1、3、4、5、6、7组动物分别进行胃内给药,模型组胃内给CMC-Na;具体情况如下:(1)空白对照组(生理盐水)0.1ml/10g;(2)模型组(CMC-Na)0.1ml/10g;(3)米草精粉组0.1ml/10g;(4)去糖米草精粉组0.1ml/10g;(5)绿原酸组0.1ml/10g;(6)苜蓿素组0.1ml/10g;(7)对香豆酸组0.1ml/10g;(8)苯溴马隆组0.1ml/10g。

第8天最后一次给药30min后,除生理盐水组,其他各组腹腔注射已配制的50mg/ml次黄嘌呤,按剂量1000mg/kg体重给药。在给药后30~40min,立刻摘除眼球采血置离心管中,在室温下待血清渗出,取出离心(15000rpm 4min)。吸取上层血清置带盖的样品管中,根据所得血清体积,全部用生理盐水配制到所需体积。在贝克曼LX20全自动生化分析仪上测定血尿酸(uric acid,UA)、血糖(blood glucose,GLU)、尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、肌酐(creatinine,Cr)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、总蛋白(total protein,TP)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase,GPT)等指标。

1.3 数据分析

所有数据经SPSS19.0软件包处理,采用单因素方差分析,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与讨论

2.1 各组血清 UA、Cr、BUN 和 GPT 的变化

由表 1 可知,小鼠经由连续 7 d 的胃内给药后,模型组血清 UA 显著升高为空白组的 5.45 倍;苯溴马隆是我国临床上常用的抑制尿酸治疗痛风的药物^[11],本试验中高尿酸小鼠模型经过胃内给苯溴马隆后降低了血清中 UA 水平,由此表明高尿酸小鼠模型和治疗组模型建立成功。试验结果表明,三种米草化合物和两个米草精粉组都不同程度的降低了高尿酸血症小鼠血清 UA 水平,且对香豆酸组降尿酸效果显著($P < 0.05$)。由此可见,在本试验条件下米草对香豆酸组与阳性药苯溴马隆组相比具有较好的降尿酸优势。

表 1 各组小鼠血清 UA、Cr、BUN 和 GPT 的变化

Table 1 Changes of serum UA, Cr, BUN and GPT in each group of mice

组别 Group	UA ($\mu\text{mol/L}$)	Cr (mmol/L)	BUN (mmol/L)	GPT (mmol/L)
生理盐水组	127.68 $\pm$ 21.63	19.65 $\pm$ 3.29	5.59 $\pm$ 0.89	39.3 $\pm$ 7.69
CMC 模型组	695.25 $\pm$ 64.37	25.3 $\pm$ 4.43	8.74 $\pm$ 0.60	54.27 $\pm$ 15.09
绿原酸组 ¹	555.85 $\pm$ 35.62	21.28 $\pm$ 1.89*	7.77 $\pm$ 0.54*	47.72 $\pm$ 4.20
苜蓿素组	637.1 $\pm$ 26.35	19.92 $\pm$ 2.54*	7.92 $\pm$ 0.73*	47.95 $\pm$ 6.57
对香豆酸组	505.2 $\pm$ 20.93*	19.06 $\pm$ 1.41*	7.72 $\pm$ 0.84*	50.71 $\pm$ 11.32
米草精粉组	531.04 $\pm$ 74.93	19.38 $\pm$ 5.03**	5.83 $\pm$ 0.49***	37.51 $\pm$ 4.36*
米草去糖组	537.31 $\pm$ 67.92	19.53 $\pm$ 5.24**	6.46 $\pm$ 0.65***	39.47 $\pm$ 8.01*
苯溴马隆组	602.80 $\pm$ 87.8	20.51 $\pm$ 3.77*	7.33 $\pm$ 0.65**	40.58 $\pm$ 6.38

注: * $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异非常显著, *** $P < 0.001$ 表示差异极显著; ¹ 本试验中的绿原酸是异戊基奎尼酸,下同。

血清 Cr、BUN 水平能较为准确的反应肾实质受损的情况,是肾功能的核心指标^[12]。在本试验设计范围内,三个米草化合物组显著降低血清 Cr、BUN 水平($P < 0.05$),阳性对照苯溴马隆组效果是显著($P < 0.05$)和非常显著($P < 0.01$),两个米草精粉组效果则为非常显著($P < 0.01$)和极显著($P < 0.001$)(表 1)。这说明上述三个米草化合物在肾功能影响方面安全性较好,不仅没有对肾功能造成不良影响,还有一定的保肾作用。同时,米草精粉组可能因同时含有多种生物活性成分而表现出更强的降低血清 Cr 和 BUN 水平作用。

血清 GPT 水平测定结果表明,各试验处理都不同程度降低了高尿酸血症小鼠血清 GPT 水平,但三种米草化合物和苯溴马隆组的 GPT 水平与模型组之间的差异没有统计学意义($P > 0.05$),两个米草精粉组的差异显著($P < 0.05$),其谷丙转氨酶非常接近生理盐水组的正常水平。由此可推测,三种米草化合物没有对肝功能造成显著影响,且米草精粉组有一定的护肝作用。

2.2 各组血清 GLU、TC、TG 和 TP 的变化

测定各组小鼠血清 GLU、TC、TG 和 TP 的变化结果表明(表 2)与 CMC 模型组相比,对香豆酸组可非常显著的降低血清 GLU 和 TC 水平($P < 0.01$),包括阳性对照组和苯溴马隆组的其它试验样品的抑制 GLU 效果不显著($P > 0.05$),但显著的降低了 TC 水平($P < 0.05$)。各试验组都能显著降低血清 TG 水平,其中苜蓿素组和米草精粉组效果具有极显著降低效应($P < 0.001$),优于苯溴马隆组的降 TG 效果($P < 0.01$)。

比较空白对照组和 CMC 模型组发现,腹腔注射次黄嘌呤会导致高尿酸血症小鼠血清 TP 水平显著下降。而与 CMC 模型组相比,各试验组和苯溴马隆组效果都非常显著的提高了 TP 水平($P < 0.01$),尤以三个米草化合物组和去糖米草精粉组血清 TP 浓度非常接近生理盐水组的正常水平(表 2)。

表 2 各组小鼠血清 GLU、TC、TG 和 TP 的变化

Table 2 Changes of serum GLU, TC, TG and TP in each group of mice

组别 Group	GLU (mmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	TP (mmol/L)
生理盐水组	7.66 $\pm$ 1.32	4.12 $\pm$ 0.52	2.15 $\pm$ 0.38	50.57 $\pm$ 1.95
CMC 模型组	10.18 $\pm$ 2.4	4.14 $\pm$ 0.17	2.34 $\pm$ 0.48	38.84 $\pm$ 8.84
绿原酸组	9.63 $\pm$ 1.86	3.74 $\pm$ 0.31*	1.70 $\pm$ 0.33*	50.33 $\pm$ 2.62**
苜蓿素组	8.15 $\pm$ 2.59	3.80 $\pm$ 0.39*	1.53 $\pm$ 0.21***	50.32 $\pm$ 2.36**
对香豆酸组	7.39 $\pm$ 1.22**	3.68 $\pm$ 0.43**	1.84 $\pm$ 0.24*	50.11 $\pm$ 3.58**
米草精粉组	9.18 $\pm$ 1.73	3.71 $\pm$ 0.53*	1.57 $\pm$ 0.24***	48.57 $\pm$ 2.53**
米草去糖组	8.83 $\pm$ 1.78	3.74 $\pm$ 0.44*	1.98 $\pm$ 0.16*	50.11 $\pm$ 2.37**
苯溴马隆组	9.03 $\pm$ 1.18	3.79 $\pm$ 0.43*	1.72 $\pm$ 0.23**	48.60 $\pm$ 4.30**

2.3 米草化合物对体重的影响

测定结果表明(表 3),试验各组(包括生理盐水组、CMC 组和苯溴马隆组)喂养 7 天后体重均有增加,而且在本试验设计范围内,各组动物增重的水平差异不显著($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠体重变化(g)

Table 3 Changes in body weight of mice in each group(g)

组别 Group	第 1 天体重 Day 1 weight	第 8 天体重 Day 8 weight	增重 weight gain
生理盐水组	25.5 $\pm$ 0.9	30.8 $\pm$ 1.9	5.3
CMC 模型组	25.6 $\pm$ 1.4	30.8 $\pm$ 1.3	5.2
绿原酸组	24.8 $\pm$ 0.9	31.0 $\pm$ 1.3	6.2
苜蓿素组	25.3 $\pm$ 0.8	29.3 $\pm$ 2.6	4.0
对香豆酸组	24.1 $\pm$ 1.2	29.5 $\pm$ 1.7	5.4
米草精粉组	25.8 $\pm$ 0.9	30.2 $\pm$ 1.3	4.4
米草去糖组	25.1 $\pm$ 0.9	29.7 $\pm$ 1.5	4.6
苯溴马隆组	23.9 $\pm$ 1.0	29.6 $\pm$ 1.4	5.7

3 结论

在本试验设计范围内,互花米草中分离纯化出

的对香豆酸可显著降低由次黄嘌呤诱导的高尿酸血症小鼠的血清尿酸和血糖水平,优于临床上常用的苯溴马隆的降尿酸和血糖效果。对香豆酸、绿原酸和苜蓿素还能降低高尿酸血症小鼠的血清肌酐、尿素氮、总胆固醇和甘油三酯等,同时还可以显著提高血清总蛋白浓度,具有一定的保护肾、降血脂作用。研究结果也表明,互花米草精粉可能因同时含有多种生物活性成分而具有更强的保肾护肝作用。本研究不仅初步揭示了互花米草发挥降尿酸药效的物质基础,同时也为进一步深入开发降尿酸药物提供了依据和参考。

参考文献:

- [1] Zhang D, Hu Y, Liu M, et al. Introduction and spread of an exotic plant, *Spartina alterniflora*, along coastal marshes of China [J]. *Wetlands*, 2017, 37: 1181–1193.
- [2] 钦佩, 谢民, 周爱堂. 互花米草初级生产与类黄酮的生成 [J]. *生态学报*, 1991, 11(4): 293–298.
- [3] 徐年军, 何艳丽, 武敏, 等. 大米草多糖的提取及其单糖组成的 GC-MS 分析 [J]. *海洋科学*, 2010, 34(9): 15–18.
- [4] 韩顺风, 张怡评, 洪专, 等. 响应曲面法优化互花米草中总黄酮的提取工艺研究 [J]. *中医药导报*, 2014, 20(2): 65–71.
- [5] Prasad S O, Qing Y. Associations between hyperuricemia and chronic kidney disease: A review [J]. *Nephro-urology Monthly*, 2015, 7(3): 27–33.
- [6] Karis E, Crittenden D, Pillinger MH. Hyperuricemia, gout, and related comorbidities: cause and effect on a two-way street [J]. *South Med J*, 2014, 107(4): 235–241.
- [7] Li J, Zhang X, Wang X, et al. Protective effects of cortex fraxini coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice [J]. *Eur J Pharm*, 2011, 666: 196–204.
- [8] 薛雪梅, 徐鑫, 尹超, 等. 高良姜总黄酮降尿酸作用研究 [J]. *湖南中医杂志*, 2018, 32(4): 143–145.
- [9] 谷仿丽, 韩邦兴, 陈乃富, 等. 蕨菜乙醇提取物降尿酸作用机理及肾保护作用研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30: 629–633.
- [10] 林恋竹, 刘雪梅, 赵谋明. 神秘果树叶提取物降尿酸作用及其有效成分鉴定 [J]. *中国食品学报*, 2018, 18(1): 270–277.
- [11] 黄映红. 苯溴马隆和别嘌醇对高尿酸血症和痛风患者降尿酸疗效及安全性分析 [J]. *中国实用医药*, 2018, 13(23): 137–138.
- [12] Wang Y, Xu A, Liu P, et al. Effects of *Fuzhuan* Brick-Tea water extract on mice infected with *E. coli* O157: H7 [J]. *Nutrients*, 2015, 7: 5309–5326.
- [14] 高雷, 张平, 程钢. 正交试验法优选黄蜀葵花中金丝桃苷的提取工艺 [J]. *中国药师*, 2009, 12(3): 354–356.
- [15] 尤洁. 槐米中芦丁的提取条件研究 [J]. *亚太传统医药*, 2016, 12(13): 43–44.
- [16] 洪军, 胡晓稳, 王佩, 等. 槐米中芦丁的提取及抗氧化活性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2015, 13(15): 16–18.
- [17] Yao Y P, Tian C G, Cao W. Antioxidative constituents of ethanol extract from buckwheat seeds by HPLC-Electro-Spray MS [J]. *Agri Sci China*, 2008, 7(3): 356–362.
- [18] 王立军, 黎莎莎, 孟庆艳, 等. 不同采收期大花罗布麻叶中黄酮类成分含量的测定 [J]. *中国酿造*, 2016, 35(06): 179–181.
- [17] 黄克南, 周江煜. 金莲花不同植株部位的金丝桃苷含量比较 [J]. *广西中医药*, 2014, 37(3): 68–71.
- [18] 庄向平. 虞杏英银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法. *中草药*, 1992, 23(3): 122–124.
- [19] 卫星星, 王转花. 高效液相色谱法测定苦荞籽壳中芦丁和槲皮素的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(12): 1909–1910.
- [20] 李卓恒, 孟德胜, 卢来春, 等. RP-HPLC 法测定不同产地不同部位贯叶金丝桃中金丝桃苷的含量 [J]. *中国药房*, 2012, 23(43): 4082–4083.
- [21] Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, et al. Antiretroviral activity in a marine red alga: reverse transcriptase inhibition by an aqueous extract of *Schizymeniapacifica* [J]. *J Cancer Res Clin*, 1987, 113(5): 413–416.
- [22] 石秋梅, 邓翻云, 吴敏言. HPLC 法同时测定新疆产 2 种罗布麻叶中芦丁、金丝桃苷及异槲皮苷的量 [J]. *中草药*, 2014, 45(9): 1326–1329.

(上接第 8 页)

中总黄酮的提取条件,比较了乙醇体积分数、料液比、提取时间、超声功率 4 个因素对总黄酮提取率的影响,确定最佳提取工艺为 60% 乙醇溶液、料液比为 1:30,超声功率为 80 W,提取 60 min;经 HPLC 初步鉴定,老鸦瓣黄酮类物质主要包括芦丁、杨梅素、山奈酚等种类,可为老鸦瓣叶的生物资源合理应用提供依据。

参考文献:

- [1] 王晓阁, 龙全江, 赵悦. 光慈菇药用历史变迁与现代研究概况 [J]. *甘肃中医学院学报*, 2015, 32(6): 72–74.
- [2] 尹艺林, 郭雷. 光慈菇主要成分分析测定 [J]. *中国林副特产*, 2009, 6(3): 32–35.
- [3] 赵群, 刘枫, 宋向文, 等. 光慈菇药材的特异性 PCR 鉴定 [J]. *中药材*, 2017, 40(7): 1540–1546.
- [4] 杨小花, 郭巧生, 朱再标, 等. 不同采收期老鸦瓣生物量积累及药材品质研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(4): 624–629.
- [5] 张文清. 中药非药用部位资源的合理开发利用可行性探析 [J]. *海峡药学*, 2015, 27(11): 24–26.