

金灵泰, 张铭, 方双琪, 等. 基于斑马鱼模型探究药食同源复方降尿酸作用及成分分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 410–416.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110251

JIN Lingtai, ZHANG Ming, FANG Shuangqi, et al. Study on Lowering Uric Acid Effect and Component Analysis of Drug Food Homologous Compound Based on Zebrafish Model[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 410–416. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110251

· 营养与保健 ·

基于斑马鱼模型探究药食同源复方降尿酸作用及成分分析

金灵泰¹, 张 铭^{2,*,†}, 方双琪², 徐 蕾²

(1. 中国科学技术大学附属第一医院离子医学中心(合肥离子医学中心), 安徽合肥 230088;

2. 安徽中森生物技术有限公司, 安徽桐城 231400)

摘要:目的: 探究芹菜籽、蒲公英、菊苣和玉米须四种药食同源中药联用下的降尿酸活性和作用机制, 分析这四种中药复合提取物中具备降尿酸作用的主要效应成分。方法: 随机选取 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼, 通过 250 $\mu\text{mol/L}$ 氧嗪酸钾和 10 $\mu\text{mol/L}$ 黄嘌呤钠盐诱导建立斑马鱼高尿酸模型, 将已建立的斑马鱼模型随机分为对照组、模型组、别嘌醇组 (136 $\mu\text{g/mL}$) 和复方提取物低、中、高 (250、500 及 1000 $\mu\text{g/mL}$) 剂量组, 每组 30 尾, 连续干预 24 h 后, 测定斑马鱼体内的尿酸荧光值和次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1 (*HPRT1*)、葡萄糖转运蛋白 9 (*GLUT9*)、有机阴离子转运体 (*OAT1*) 基因表达水平; 采用超高压液相色谱-串联高分辨质谱仪为主要手段, 以乙腈-甲酸水为流动相, 梯度洗脱, ESI 离子源正、负离子扫描模式, 结合软件数据库搜索及相关文献进行成分鉴定。结果: 与模型组相比, 复方提取物低、中、高剂量组均能极显著降低高尿酸斑马鱼模型的血尿酸水平 ($P < 0.01$), 且能够有效上调高尿酸斑马鱼体内 *HPRT1*、*OAT1* 的相对表达量、下调 *GLUT9* 的相对表达 ($P < 0.05$); 初步筛选鉴定出黄酮及其苷类、有机酸、香豆素、萜类等 22 种活性成分, 均为复方提取物中具有降尿酸机制的效应物质。结论: 复方提取物可能通过上调模型组斑马鱼体内 *HPRT1*、*OAT1* 的表达量、下调 *GLUT9* 的表达, 发挥多方位降尿酸的作用; 所筛选鉴定的化学成分为下一步筛选作用靶点提供参考。

关键词: 复方提取物, 高尿酸血症, 降尿酸, 斑马鱼, 超高压液相色谱-串联高分辨质谱

中图分类号: Q953.33

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)19-0410-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110251

本文网刊:



Study on Lowering Uric Acid Effect and Component Analysis of Drug Food Homologous Compound Based on Zebrafish Model

JIN Lingtai¹, ZHANG Ming^{2,*,†}, FANG Shuangqi², XU Qiang²

(1. Ion Medical Center of the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China

(Hefei Ion Medical Center), Hefei 230088, China;

2. Anhui Zhongsen Biotech Co., Ltd., Tongcheng 231400, China)

Abstract: Objective: In order to explore the uric acid-lowering activity and mechanism of four traditional Chinese medicines, celery seed, dandelion, chicory and corn silk, and analysis of the main functional components with uric acid-lowering effect in these four kinds of traditional Chinese medicine compound extracts. Methods: Hyperuricemia model in zebrafish was induced by potassium oxazinate and sodium xanthine, then they were randomly divided into control group, model group, allopurinol group (136 $\mu\text{g/mL}$) and compound extract low, medium, high doses group (250, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$), with 30 rats in each group. After continuous intervention for 24 h, the fluorescence level of uric acid and the gene expression levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 (*HPRT1*), glucose transporter9 (*GLUT9*), and organic

收稿日期: 2022-11-24 +并列第一作者

基金项目: 天然药清动植物提取物中试研究及产业化 (2022Z0056)。

作者简介: 金灵泰 (1982-), 男, 本科, 药师, 研究方向: 天然药物活性成分分离鉴定, E-mail: 737575767@qq.com。

作者简介/通信作者*: 张铭 (1982-), 男, 硕士, 研发总监, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: 981027447@qq.com。

anion transporter (*OAT1*) in zebrafish were measured. Using liquid chromatography-series high resolution mass spectrometer as the main method, and acetonitrile formate water as the mobile phase, gradient elution, ESI ion source positive and negative ion scanning mode, and then combined with software database search and related literature for component identification. Results: Compared with the model group, the low, medium and high dose groups of the compound extract could reduce the blood uric acid level of the hyperuric acid zebrafish model ($P<0.01$), and could effectively up-regulate the relative expression of *HPRT1* and *OAT1* and down-regulate the relative expression of *GLUT9* in the hyperuric acid zebrafish ($P<0.05$). At the same time, 22 active ingredients including flavonoids and their glycosides, organic acids, coumarins, and terpenes were initially screened and identified, all of which are effective substances in the compound extract with a uric acid-lowering mechanism. Conclusion: The compound extract may play a multifaceted role in lowering uric acid by up-regulating the gene expression of *HPRT1*, *OAT1*, and down-regulating the gene expression of *GLUT9* in the model group of zebrafish. The chemical components screened and identified can provide a reference for the next step of screening the target.

Key words: compound extract; hyperuricemia; uric acid; zebrafish; UPLC-MS/MS

高尿酸血症是由于体内嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄障碍引起的,以血尿酸水平升高为主要表现的代谢性疾病^[1]。嘌呤代谢的关键酶异常和负责肾尿酸排泄的转运体异常是造成尿酸合成增加和排泄减少的关键因素^[2],*HPRT1*(次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1)功能缺陷导致过多嘌呤被分解成尿酸并从细胞中排出^[3],是引起血尿酸浓度升高的主要原因之一;参与肾小管重吸收尿酸盐的转运体 *GLUT9*(葡萄糖转运蛋白 9),可使尿酸盐从肾小管细胞膜上被重吸收到血液中;而 *OAT1*(有机阴离子转运体)作为尿酸排泄的转运体^[4],其作用是将尿酸从血液吸收到肾小管细胞中,因此 *HPRT1*、*OAT1* 和 *GLUT9* 的异常表达和功能变化与高尿酸血症的发生有着紧密的联系。

据流行病学资料显示,高尿酸血症在世界各地的流行率相当高,特别是在中国,过去十年高尿酸症的流行率几乎翻了一番,达到 13.0%^[5],同时高尿酸血症也是引起多种严重负担性疾病的危险因素,如痛风、心血管疾病、糖尿病,甚至肾脏损伤等^[6]。目前临床应用上降尿酸药有苯溴马隆、非布司他、别嘌醇等^[7],虽然它们有明显的降尿酸作用,但需要一个较长的服用周期,一旦停药,就会恢复尿酸水平,同时长时间口服别嘌醇这类黄嘌呤氧化酶抑制剂会带来一定的不良反应,如史蒂文斯约翰逊综合征^[8]、肝肾毒性^[9]、骨髓抑制^[10]和表皮坏死松解^[11]等,具有一定的限制性。近年来,随着健康产业的不断升温,药食同源中药在医药和功能食品领域备受关注,众多研究表明,药食同源中药中含有黄酮类、酚酸类、皂苷等多种成分,毒副作用小,在降尿酸等药理活性方面具有显著优势。同时,合理配伍的药食同源复方合剂较之单方相比,具有多组分、多途径、多靶点的特点,因此从药理角度出发,选择合适的药食同源复方,多方位抑制尿酸的生成、促进尿酸的排泄,发挥积极的降尿酸作用。

多项药理研究显示,芹菜籽^[12]、菊苣^[13]、蒲公英^[14]、玉米须^[15]都具有降尿酸、抗痛风的功效。同时,随着基因组分析、活体成像和高通量小分子筛选等新技术的发展,斑马鱼模型被广泛应用于中药不同

提取部位的药效评价、中药单体和活性成分高通量筛选、中药安全性评价等各个方面。因此,本实验探究由芹菜籽、蒲公英、玉米须、菊苣组成的药食同源复方(以下简称复方提取物)对黄嘌呤钠盐联合氧嗪酸钾诱导建立的高尿酸(HUA)斑马鱼模型的降尿酸作用及机制,并利用超高液相色谱-串联高分辨质谱仪(UPLC-MS/MS)和数据处理软件对样品中的中药化学成分进行分析,旨在天然药用植物联用治疗高尿酸血症提供新思路,为下一步筛选作用靶点提供成分参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

芹菜籽、菊苣、蒲公英、玉米须 均购自安徽润邦中药饮片有限公司;野生型 AB 品系斑马鱼 购自杭州环特生物科技有限公司,实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2022-0004,斑马鱼饲养在 28℃ 海水(水质:每升含 200 mg 海盐;电导率 450~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$; pH5~8.5)中,使用受精后 5 d(5 dpf)的斑马鱼用于复方提取物最大耐受浓度测定和降尿酸功效评价。

氧嗪酸钾 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;黄嘌呤钠盐、二甲基亚砜、甲醇 美国 Sigma 公司;甲酸 中国国药集团;Amplex Red Uric 尿酸试剂盒 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;RNA-Quick Purification Kit 型 RNA 快速提取试剂盒 中国 YiShan Biotech 公司;FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司。

Heraeus Fresco17 高速冷冻离心机 德国 Thermo Fisher 公司;T100 普通 PCR 扩增仪、CFX Connect 荧光定量 PCR 仪 新加坡 BIO-RAD 公司;Multiskan FC 多功能酶标仪、ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 m $\times$ 100 mm, 1.8 μm)色谱柱、Q Exactive Orbitrap 高分辨液质联用仪、U3000 超高液相色谱及自动进样器 中国赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 复方提取物的制备 经查询中国药典,初步确定药食同源复方用量。准确称取芹菜籽 10 g,蒲公英

英 8 g, 菊苣 5 g, 玉米须 5 g, 粉碎后过 40 目筛, 其中芹菜籽粉碎后采用 0.5 mol/L 的碳酸钠室温静置 1 h 除脂, 取出芹菜籽与其他三种药材混匀, 按照 1:12(药材: 酶解液体积)的比例加入物料比 0.04% 纤维素酶, 调节 pH5.0~5.5, 60 ℃ 酶解 4 h, 收集酶解液过滤, 减压浓缩, 60 ℃ 真空干燥得到复方提取物浸膏。

1.2.2 复方提取物降尿酸活性与机制探究

1.2.2.1 斑马鱼最大耐受浓度测定(MTC) 随机抽样选取 180 尾 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼, 转入 6 孔板中, 每孔处理 30 尾。除对照组外, 每组分别给予复方提取物 125、250、500、1000、2000 μg/mL 浓度的水溶液, 经过 28 ℃ 处理 24 h 后, 观察记录每组斑马鱼状态及死亡率。

1.2.2.2 斑马鱼造模、分组及给药 参考张瑛毓^[16]和 Zhang 等^[17]确立建立斑马鱼高尿酸(HUA)模型的方法, 使用氧嗪酸钾 250 μmol/L 和黄嘌呤钠盐 10 μmol/L 处理 5 dpf 斑马鱼, 28 ℃ 孵育 24 h, 诱导建立斑马鱼高尿酸模型。随机选取造模后的斑马鱼于 6 孔板中, 每孔 30 尾, 水浴给予低、中、高浓度(250、500 及 1000 μg/mL)浓度复方提取物水溶液, 设置正常对照组和模型组, 正常组对照组斑马鱼给与等体积养鱼用水, 同时以别嘌呤醇水溶液为阳性对照, 每组三个平行。参照 Xiong 等^[18]确定阳性药别嘌呤醇的给药浓度为 136 μg/mL。

1.2.2.3 检测指标 尿酸荧光值的测定: 28 ℃ 处理 1 d 后, 利用尿酸试剂盒, 使用多功能酶标仪软件采集数据, 分析斑马鱼体内尿酸荧光值。

测定 *HPRT1*、*OAT1*、*GLUT9* 基因相对表达量: 利用 RNA 快速提取试剂盒对各组斑马鱼提取总 RNA, 紫外-可见光分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度。取 2.0 μg 斑马鱼样品总 RNA, 按 cDNA 第一链合成试剂盒说明操作, 合成 20.0 μL cDNA, 通过 q-PCR 检测 *β-actin*、*HPRT1*、*GLUT9* 和 *OAT1* 基因的表达。使用 *β-actin* 作为基因表达的内参来计算 *HPRT1*、*OAT1*、*GLUT9* 基因的 RNA 相对表达量。引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列信息
Table 1 Primer sequence information

基因	引物序列
<i>β-actin</i>	Forward 5'-TCGAGCAGGAGATGGGAACC-3'
	Reverse 5'-CTCGTGGATACCGCAAGATTC-3'
<i>HPRT1</i>	Forward 5'-CACGCTAACAGGAAAGAACG-3'
	Reverse 5'-GGTGTCTCTCTCACCAGCAA-3'
<i>OAT1</i>	Forward 5'-GGACGATATCCTGCCAGCTC-3'
	Reverse 5'-CGTCCTGTAAGGCCAGATCC-3'
<i>GLUT9</i>	Forward 5'-AGATCGAACGCAGCATCACA-3'
	Reverse 5'-GCGTCATATTCGGTTCCAGC-3'

1.2.3 复方提取物有效成分分析

1.2.3.1 供试品溶液的制备 取样品 200 mg, 置于 15 mL 离心管内, 加入 10 mL 50% 甲醇水溶液(v:v,

水: 甲醇=50:50), 涡旋振荡 5 min 后, 超声 30 min, 14000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 待 UPLC-MS/MS 分析测定。

1.2.3.2 液相条件 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 m×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 35 ℃; 进样体积: 10 μL; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: A(0.1% 甲酸水); B(乙腈), 梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱流动相比例
Table 2 Proportion of mobile phase eluted by gradient

时间	流速(mL/min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~5	0.3	3~5	97~95
5~8	0.3	5~8	95~92
8~20	0.3	8~15	92~85
20~30	0.3	15~16	85~84
30~45	0.3	16~40	84~60
45~70	0.3	40~3	60~97

1.2.3.3 质谱条件 采用 Q Exactive Orbitrap 高分辨质谱进行质谱数据采集, 检测模式为 Full MS-ddMS2, 正离子和负离子模式分别扫描, 扫描范围为 m/z 100~1200, MS1 分辨率设置为 70000, MS2 分辨率设置为 17500, 离子源电压为 3.2 kV, 毛细管离子传输管温度为 320 ℃, 辅助气加热温度为 350 ℃, 鞘气流速为 40 L/min, 辅助气流速为 15 L/min, AGC Target 设置为 1e6, TopN 设置为 5, 触发 MS2 扫描的碰撞能量采用阶梯式碎裂电压 NCE, 设置为 30, 40, 50。

1.2.3.4 化学成分鉴定 采用 Compound discover 3.2 软件进行原始 Raw 质谱数据特征峰提取, 特征峰元素匹配、分子式预测及同位素分布匹配的质量偏差均设置为 5 ppm 以内。利用 BATMAN-TCM、GeneCards、中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库进行特征峰鉴定。阳性结果筛选标准为质量偏差<5 ppm、符合同位素分布及 mzVault best match 数据库匹配得分>70 分。

1.3 数据处理

实验数据采用 SPSS 26.0 分析, 统计学处理结果采用平均值±标准差(mean±SE)表示, $P<0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 复方提取物对斑马鱼的最大耐受浓度

斑马鱼用 125、250、500、1000 μg/mL 的复方提取物进行药浴暴露处理, 结果发现, 实验组中斑马鱼均未发现异常行为和毒副作用, 且表现出与空白对照组相似的活性状态; 而当给药浓度达到 2000 μg/mL 时斑马鱼行动迟缓, 整体状态不佳。因此, 选择 250、500、1000 μg/mL 复方提取物水溶液作为实验的低、中、高剂量对斑马鱼进行降尿酸实验。

2.2 复方提取物对 HUA 斑马鱼降尿酸活性评价

斑马鱼的降尿酸功效如表 3 所示, 模型组中斑马鱼的尿酸荧光值约为 14984, 与正常对照组相比明

显升高, 这表明成功构建了斑马鱼 HUA 模型。此外, 由表可知, 与模型组相比, 复方提取物低、中、高浓度组中的尿酸荧光值均有一定程度的下降, 其中高浓度复方提取物组中斑马鱼体内的尿酸荧光值仅约为 5385, 较模型组相比下降了 64.06% ($P<0.01$), 复方提取物对于 HUA 斑马鱼的降尿酸效果显著。同时复方提取物组与阳性药别嘌醇组相比, 尿酸荧光值无显著差异 ($P>0.05$), 说明复方提取物的降尿酸功效能够达到阳性药物别嘌醇的水平。文献报道, 芹菜籽、蒲公英、玉米须和菊苣均有不同程度的降尿酸功效^[19-20], 本实验结果也证实, 复方提取物能够降低高尿酸斑马鱼体内尿酸水平; 此外有研究表明^[21], 别嘌醇在降尿酸的同时具有一定的肾脏毒性等副作用, 而许多天然植物药不仅毒性低^[22], 活性成分多样, 而且降尿酸功效能够达到化学药的水平^[23], 这与本实验结果一致。

表 3 复方提取物降尿酸功效评价(n=3)
Table 3 Evaluation of the effect of compound extract on lowering uric acid (n=3)

组别	浓度(μg/mL)	尿酸荧光值(mean±SE)
正常对照组	—	3816±156***
模型对照组	—	14984±807
别嘌醇	136	5155±171***
复方提取物	低 250	10958±884**
	中 500	8485±788**
	高 1000	5385±998**

注: 与模型对照组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

2.3 复方提取物对斑马鱼体内 OAT1、GLUT9、HPRT1 表达水平的影响

2.3.1 RNA 提取结果及引物序列信息 样品处理结束后, 提取斑马鱼总 RNA, 用紫外-可见分光光度计测定 RNA 的浓度及 A_{260}/A_{280} 比值, A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.2 之间, 结果表明提取得到斑马鱼总 RNA 质量较好, 可用于后续 q-PCR 实验。

2.3.2 复方提取物对尿酸合成 (HPRT1)、重吸收 (GLUT9)、排泄 (OAT1) 基因表达的影响 研究发现, 过量的尿酸生成和排泄障碍是导致体内尿酸水平升高的主要原因, HPRT1 是目前被熟知的能够影响尿酸合成增加的一大遗传因素, HPRT 既催化嘌呤碱基的补救合成, 又参与嘌呤类药物的代谢, 是调控该

类药物合成代谢途径的关键酶^[24]。肾脏是尿酸排泄的主要器官, 研究发现, 在近曲小管的尿酸重吸收过程中 GLUT9 发挥着不可忽视的作用, 甚至可能比 URAT1 的作用更为明显^[25]。OAT1/OAT3 是负责尿酸分泌的主要蛋白, 且均在肾近曲小管细胞的基底外侧膜中高度表达, 研究表明, OAT1 蛋白通过有机离子与双羧酸的交换参与肾中尿酸的转运, 特别在尿酸的分泌排泄方面表现突出。

各组斑马鱼体内 HPRT1、GLUT9、OAT1 基因表达水平如表 4 所示。与正常对照组相比, 模型组中斑马鱼体内 HPRT1、OAT1 基因表达水平极显著下降 ($P<0.01$), GLUT9 基因表达水平极显著上升 ($P<0.01$), 使用 250、500、1000 μg/mL 复方提取物处理 24 h 后, 与模型组相比, 斑马鱼体内的 HPRT1、OAT1 基因表达水平均有上调趋势, GLUT9 表达水平有下降趋势, 其中高剂量复方提取物组中斑马鱼体内的 HPRT1 基因表达水平显著上调了约 64% ($P<0.05$), OAT1 极显著上调 231% ($P<0.01$)。

李少鹏^[26]考察芹菜籽提取物对高尿酸大鼠体内黄嘌呤氧化酶的影响, 发现芹菜籽提取物对黄嘌呤氧化酶的活性有抑制作用, 猜测可能是通过上调 HPRT1 的表达来抑制尿酸生成。Wang 等^[27]对玉米须的降尿酸活性成分进行筛选, 发现玉米须在明显改善肾脏损伤, 促进尿酸排泄的同时, 还对高尿酸小鼠肝脏的黄嘌呤氧化酶有抑制作用; 李丽玉^[28]选用鹌鹑为实验对象建立 HUA 模型, 研究菊苣对鹌鹑体内尿酸含量的影响, 结果显示菊苣可能发挥抑制尿酸生成、促进尿酸排泄的作用, 通过抑制腺苷脱氨酶活性、上调 OAT3 基因表达; 姚江琪^[29]研究发现, 在小鼠肝脏中, 蒲公英可以降低 GLUT9 的表达量。本实验结果表明, 复方提取物可能通过抑制 HUA 斑马鱼体内的 GLUT9, 上调 HPRT1 和 OAT1 基因表达水平来降低 HUA 斑马鱼体内的血尿酸浓度, 且其促进尿酸排泄的效果优于抑制尿酸生成。

2.4 复方提取物成分分析

为了探究复合提取物中的主要功效性成分, 根据“1.2.3”项下的方法, 借助 UPLC-MS/MS 技术对复方提取物进行分析, 其正负离子模式下基峰色谱图如图 1、图 2 所示。根据“1.2.3.4”的方法对复方提取物中化学成分, 进行了全面具体的解析, 最终鉴定出

表 4 样品处理后斑马鱼 RNA 相对表达量
Table 4 Relative expression of zebrafish RNA after sample treatment

组别	浓度(μg/mL)	HPRT1 相对表达量(mean±SE)	OAT1 相对表达量(mean±SE)	GLUT9 相对表达量(mean±SE)
正常对照组	—	1.89±0.09**	2.67±0.11***	0.646±0.05**
模型对照组	—	1.00±0.07	1.00±0.06	1.00±0.02
别嘌醇	136	1.90±0.13**	1.72±0.08**	0.468±0.11**
复合提取物低剂量组	250	1.24±0.12*	2.31±0.30**	0.897±0.07***
复合提取物中剂量组	500.00	1.44±0.16*	2.81±0.36**	0.785±0.06***
复合提取物高剂量组	1000.00	1.64±0.17*	3.31±0.33**	0.681±0.05***

注: 与模型对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

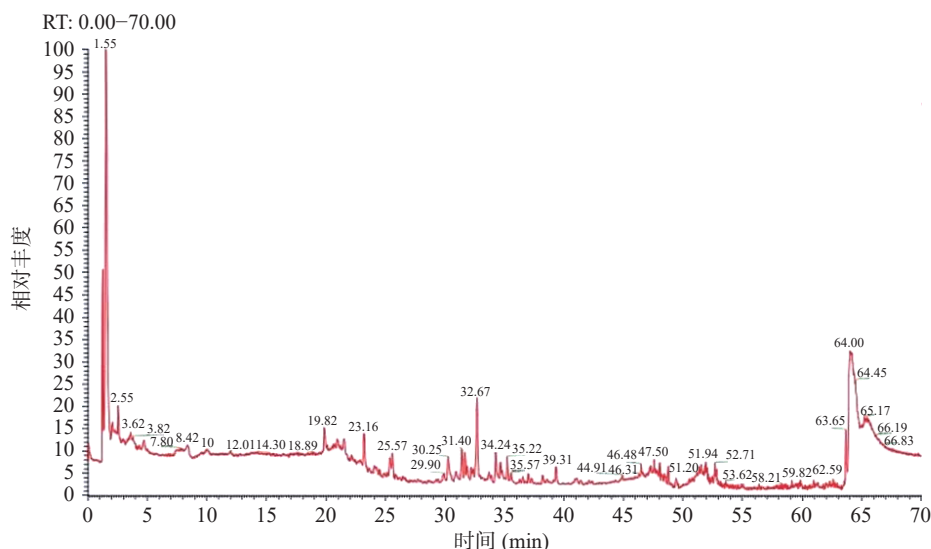


图1 正离子模式下的样品 TIC 图

Fig.1 TIC diagram of sample in positive ion mode

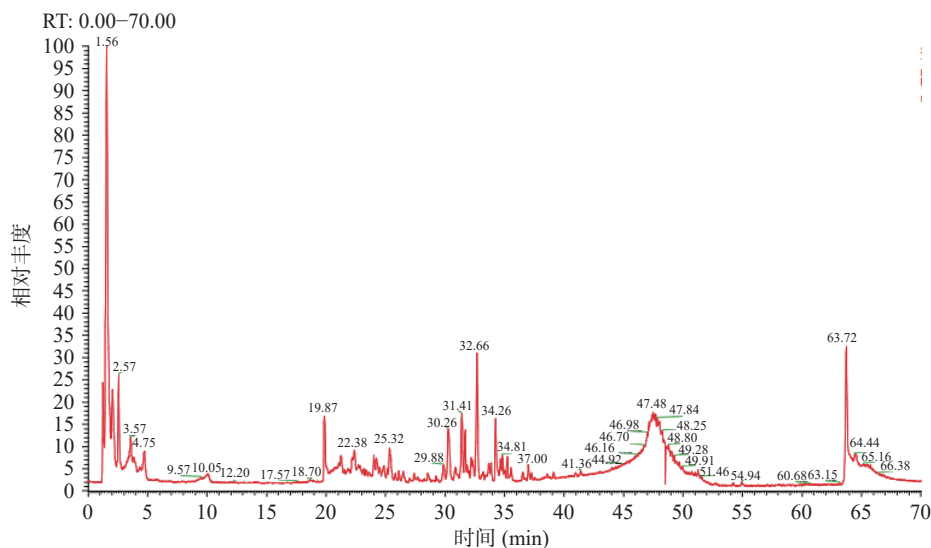


图2 负离子模式下的样品 TIC 图

Fig.2 TIC diagram of samples in negative ion mode

83 种化合物,其中数据库匹配度在 90 分以上的化学成分鉴定结果如表 5 所示。由表可知,复方提取物中含有黄酮及其苷类、酚酸、香豆素及其萜类等物质,其中黄酮类占比较多,包括芦丁、木犀草素、槲皮

素、芹菜苷、山奈酚、芹菜素-7-O-葡萄糖苷等,有机酸类包括菊苣酸、绿原酸、咖啡酸等,香豆素及其萜类包括异鼠李素、秦皮甲素、山萘苦素、七叶内酯等。

表5 部分复方提取物化学成分鉴定信息

Table 5 Identification information of chemical constituents of compound extracts

NO	T _R (min)	化合物	分子式	理论值(m/z)	测定值(m/z)	二级质谱(m/z)
1	31.583	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1456	609.1421	609, 151, 300
2	20.729	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	285.0399	285.0381	265, 151, 167
3	24.673	芹菜苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.295	565.210	269, 431, 271
3	24.377	山奈酚-3-O-桑布双糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	581.0501	581.0497	449, 187, 153
4	28.72	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0399	285.0392	285, 133, 151
5	1.722	柯伊利素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.2741	301.2654	254, 266
6	21.41	芹菜素-7-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₁₂ O ₁₀	473.4510	433.4539	266, 338
7	1.765	木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0932	447.0856	285
8	18.924	山奈酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0404	285.0409	257, 229
9	24.901	菊苣酸	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	473.0721	473.0740	473, 179, 293

续表 5

NO	T _R (min)	化合物	分子式	理论值(m/z)	测定值(m/z)	二级质谱(m/z)
10	18.924	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0872	353.0795	191
11	24.49	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	179.0342	179.0344	179, 135
12	29.173	异绿原酸B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1190	515.1186	515, 353
13	21.701	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	130.0348	130.0246	301, 151
14	24.963	山奈酚-3-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1657	595.1549	449, 287, 153
15	25.982	木犀草素-7-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0927	447.0918	151, 133
16	25.622	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0501	193.0503	193, 134
17	30.944	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0877	463.0871	463, 151
18	25.894	异绿原酸A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1190	515.1179	515, 353
19	24.673	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	310.0505	310.0525	253, 151
20	34.985	秦皮甲素	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	339.0231	339.0210	176.9, 133
21	25.982	山莴苣苦素	C ₂₃ H ₂₂ O ₇	409.2450	409.2447	226, 151
22	32.951	七叶内酯	C ₉ H ₆ O ₄	177.0118	177.0182	177, 133, 121

现代中医临床用药多以组方为主,与单一药物相比,中药复方具有多成分、多靶点以及有效成分不明确特性,因此,分析中药成分是研究药效物质的基础,也是控制中药复方质量的关键因素。本实验以 UPLC-MS/MS 平台为基础,结合在线数据库及文献,对由芹菜籽、蒲公英、玉米须、菊苣组成的复方提取物进行成分鉴定,发现了芹菜素、槲皮素、木犀草素、山奈酚、绿原酸、七叶内酯、秦皮素等单一功效成分。Feng 等^[30]论述了天然化合物降低尿酸的潜在活性和作用机制,发现木犀草素、芹菜素等黄酮类成分能抑制黄嘌呤氧化还原酶(XOR),调节 GLUT9、尿酸阴离子转运蛋白 1(URAT1)、乳腺癌抗性蛋白(BCRP/ABCG2)和 OAT1,使血尿酸降低;Wang 等^[31]研究发现,酚酸类物质如绿原酸、菊苣酸等,可以通过抑制小鼠肝脏黄嘌呤氧化酶活性,起到抑制尿酸生成的作用;另有研究报道,香豆素可以抑制黄嘌呤氧化酶活性^[32];Chen 等^[33]经体外实验证实七叶内脂、秦皮素是有效抑制黄嘌呤氧化酶活性的药物,能够降低血尿酸水平。本研究表明,复方提取物中含有黄酮及其苷类、有机酸、香豆素及其萜类等多种类活性物质,这些成分之间相互配合、相互作用,共同发挥复方提取物多方位降尿酸的功效。

3 结论

本研究结果表明,由芹菜籽、蒲公英、玉米须、菊苣组成的药食同源复方提取物对 HUA 斑马鱼体内尿酸水平具有显著的调节作用,复方提取物可能通过上调 HUA 斑马鱼体内的 *HPRT1* 和 *OAT1* 的表达、下调 *GLUT9* 的表达来抑制体内尿酸的生成,促进尿酸排泄。与单味药材相比,几种药材联用可以通过多通路、多靶点、协同增效来发挥降尿酸的功效,较单味药材机制更多,可适用于临床多种不同类型高尿酸血症人群使用。此外,本研究还利用 UPLC-MS/MS 联用技术,结合在线数据库和相关文献对复方提取物中的化学成分实现了快速识别鉴定,了解了复方提取物中的主要效应成分。综上,芹菜籽、蒲公英、玉米须、菊苣联用后具有调节高尿酸斑马鱼体内尿酸水平的作用,为下一步降尿酸复方产品的开发提供理论依据,同时提取物的成分分析能够快速、准确地从复杂混合物中寻找及发现活性成分,为下一步探究活性靶点带来一定的参考价值。

参考文献

[1] YANG Y J, YAN D G, CHENG H Z, et al. Discovery of novel 1, 2, 4-triazole derivatives as xanthine oxidoreductase inhibitors with hypouricemic effects[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 129(9): 106162–106103.

[2] HELGET N, MIKULS T R. Long-term adherence to urate-lowering therapy in gout: A glass half empty or a glass half full?[J]. The Journal of Rheumatology, 2022, 10(27): 34–36.

[3] YONG T Q, LIANG D L, XIAO C, et al. Hypouricemic effect of 2,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester in hyperuricemic mice through inhibiting XOD and down-regulating URAT1[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 153(9): 113303–113304.

[4] MA J W, BIAN X Y, SU Q, et al. The urate-lowering efficacy of febuxostat and its relationship with residual renal function in peritoneal dialysis patients with hyperuricemia[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2022, 102(36): 2874–2880.

[5] 冯文韬. 清热利湿通络法治疗急性痛风性关节炎的临床观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017. [FENG W T. Clinical observation on the treatment of acute gouty arthritis by clearing heat and dispelling dampness and regulating collaterality[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2017.]

[6] 陈玲. 四种降尿酸药物有效性与安全性的网状 Meta 分析[D]. 大理: 大理大学, 2019. [CHEN L. Network meta-analysis of efficacy and safety of four uric acid lowering drugs[D]. Dali: Dali University, 2019.]

[7] 李丹, 张剑勇. 痛风现代流行病学及降尿酸药物研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(4): 73–76. [LI D, ZHANG J Y. Modern epidemiology of gout and research progress of uric acid lowering drugs[J]. Rheumatology and Arthritis, 2016, 5(4): 73–76.]

[8] 何俊锋. 非布司他与别嘌醇在痛风治疗中降尿酸有效性和安全性比较[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(17): 12–13. [HE J F. Comparison of the efficacy and safety of febuxostat and allopurinol in the treatment of gout[J]. Journal of Clinical Rational Drug Use, 2017, 10(17): 12–13.]

[9] 裴媛, 王瑞. HLA-B*5801 基因多态性与别嘌醇致皮肤不良

- 反应的文献分析[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(3): 154–156. [PEI Y, WANG R. Literature analysis of HLA-B-*5801 gene polymorphism and adverse reactions caused by allopurinol[J]. Chinese Pharmacovigilance, 2019, 16(3): 154–156.]
- [10] 周新朋. 加味四妙散治疗慢性肾脏病Ⅲ~Ⅳ期高尿酸血症临床观察[D]. 济南: 山东中医药大学, 2014. [ZHOU X P. Clinical observation of Jiawei Simiao powder in treating stage Ⅲ~Ⅳ hyperuricemia of chronic kidney disease[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2014.]
- [11] 陈一萍, 张劼, 周嘉, 等. 别嘌醇药物不良反应风险因素研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(1): 137–141. [CHEN Y P, ZHANG J, ZHOU J, et al. Research progress of risk factors of adverse drug reactions allopurinol[J]. Journal of Guangxi Medical University, 2019, 36(1): 137–141.]
- [12] HANG N T, TU U T, VAN P N. Green extraction of apigenin and luteolin from celery seed using deep eutectic solvent[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2022, 207(10): 114406.
- [13] POUILLE C L, OUZAZ S, ROELS E, et al. Chicory: Understanding the effects and effectors of this functional food[J]. *Nutrients*, 2022, 14(5): 957–958.
- [14] CHOI J Y, JANG T W, SONG P H, et al. Combination effects of metformin and a mixture of lemon balm and dandelion on high-fat diet-induced metabolic alterations in mice[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(3): 580–582.
- [15] TIAN J, XU J, XU W, et al. Screening of active ingredient of *Stigmamaydis inhibiting* xanthine oxidase and its effect[J]. Journal of Jilin University, 2011, 37(3): 433–436.
- [16] 张瑛毓. 斑马鱼高尿酸血症模型构建及降尿酸功能食药材筛选[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020. [ZHANG Y Y. Construction of hyperuricemia model of zebrafish and screening of uric acid-lowering functional food herbs[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.]
- [17] ZHANG Y Y, LI Q, WANG F Z, et al. A zebrafish (*danio rerio*) model for high-throughput screening food and drugs with uric acid-lowering activity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(2): 494–498.
- [18] XIONG X Y, LIANG J, SHENG Y G, et al. A natural complex product Yaocha reduces uric acid level in a live zebrafish model[J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2020, 102(3): 106–108.
- [19] 刘涛. 薏仁木瓜化浊汤对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用及其机制研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2020. [LIU T. Effect and mechanism of coix seed papaya turbidite decoction on reducing uric acid in hyperuricemia mice[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2020.]
- [20] LING D K, CHENG Y. A Chinese herbal medicine *Ermiao wan* reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 93(3): 325–330.
- [21] LYNCH E D, GU R, PIERCE C, et al. Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen[J]. Hearing Research, 2005, 201(2): 81–89.
- [22] LI F, ZHANG Y Z, ZHANG D, et al. Correction: Molecular mechanisms involved in drug-induced liver injury caused by urate-lowering Chinese herbs: A network pharmacology study and biology experiments[J]. PloS One, 2020, 15(3): 231–216.
- [23] 慕艳, 邓幸飞, 李聪, 等. 降尿酸功效食品开发及产业发展研究现状[J]. 食品安全导刊, 2022(17): 113–115. [QI Y, DENG X F, LI C, et al. Research status and industry development of functional foods to reducing uric acid[J]. China Food Safety Magazine, 2022(17): 113–115.]
- [24] EIKAN M, IKAN M, TAKAYASU M, et al. HPRT-related hyperuricemia with a novel p. V35M mutation in HPRT1 presenting familial juvenile gout[J]. CEN Case Reports, 2020, 9(3): 15–18.
- [25] NOVIKOV A, FU Y L, HUANG W, et al. SGLT2 inhibition and renal urate excretion: role of luminal glucose, GLUT9, and URAT1[J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2019, 316(1): F173–F185.
- [26] 李少鹏. 芹菜籽提取物抗急性痛风性关节炎及高尿酸血症的活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019. [LI S P. Effect of celery seed extract on acute gouty arthritis and hyperuricemia[D]. Changchun: Jilin University, 2019.]
- [27] WANG X Z, YUAN L Y, ZHI J B, et al. Screening of uric acid-lowering active components of corn silk polysaccharide and its targeted improvement on renal excretory dysfunction in hyperuricemia mice[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 9(86): 104698–104700.
- [28] 李丽玉. 基于肾脏排泄途径的菊苣降尿酸作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015. [LI L Y. Study on uric acid lowering mechanism of chicory based on renal excretion pathway[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2015.]
- [29] 姚江奇. 蒲公英精酿啤酒开发及其抑制小鼠尿酸升高的功效研究[D]. 杨林: 西北农林科技大学, 2012. [YAO J Q. Development of dandelion craft beer and its inhibitory effect on uric acid in mice[D]. Yanglin: Northwest A&F University, 2012.]
- [30] FENG S M, WU S J, XIE F, et al. Natural compounds lower uric acid levels and hyperuricemia: Molecular mechanisms and prospective[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 123(5): 87–102.
- [31] WANG Y, LIN Z J, LIN B, et al. *Cichorium intybus* L. promotes intestinal uric acid excretion by modulating ABCG2 in experimental hyperuricemia[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 14(1): 33–35.
- [32] 刘雪梅. 具有 XO1 活性的食源性植物多酚提取物的筛选、降尿酸活性评价及功效因子靶向鉴定[D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [LIU X M. Screening, evaluation of uric acid lowering activity and targeted identification of efficacy factors of foodborne plant polyphenol extracts with XO1 activity[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]
- [33] CHEN L, CHEN S, YUAN C, et al. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2008, 75(6): 1416–1425.