·专题报道·

中国南海海绵提取物 renierol 对黄嘌呤氧化酶的抑制作用

尚雁君[1],郭跃伟[2],黄才国[1*],贾 睿[2],许强芝[1],魏善建[1],焦炳华[1],张建荣[3]
(1. 第二军医大学基础医学部生物化学及分子生物学教研室,上海 200433;2. 中国科学院上海药物研究所,上海 201203;3. 第二军医大学长海医院实验诊断科,上海 200433)

[摘要] **目的**:本实验的目的是探讨中国南海海绵提取物 renierol 对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及对小鼠高尿酸血症的影响。**方法**:从海绵中分离提取 renierol 成分,将 20、40、60 μg/ml renierol 或 1 μg/ml 阳性对照别嘌呤醇(1 μg/ml),分别加入黄嘌呤溶液(50 μmol/ml)和 0.1 U/ml 黄嘌呤氧化酶中,利用 5 min 超氧离子生成量来测定黄嘌呤氧化酶活性(NBT 显色法)。再将 20、40、60 μg/ml renierol 或 100 U/ml 阳性对照 SOD 加入 25℃预热过的邻苯三酚,在波长 420 nm 处测定吸光值,观察 renierol 对自由基的直接清除作用。建立尿酸酶抑制剂氧嗪酸钾造成小鼠高尿酸血症模型,并给高、中、低剂量 renierol 组小鼠口服 10、20、30 mg·kg^{-1} renierol,别嘌呤醇组给药量为 2 mg·kg^{-1},用全自动生化分析仪测定实验鼠的血清尿酸值,观察 renierol 体内降尿酸作用。**结果**:Renierol 体外是黄嘌呤氧化酶的竞争性抑制剂,其 IC_{50} 为 1.36 μg·ml^{-1},在体内也有明显的降尿酸作用。**结论**:Renierol 通过抑制黄嘌呤氧化酶来降血尿酸。

[关键词] renierol;海绵;海洋生物学;黄嘌呤氧化酶;高尿酸血症
[中图分类号] R 282.77;R 589.7 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)01-0025-03

Inhibition of xathine oxidase by renierol extracted from South China Sea sponge

SHANG Yan-jun[1], GUO Yue-wei[2], HUANG Cai-guo[1*], JIA Rui[2], XU Qiang-zhi[1], WEI Shan-jian[1], JIAO Bin-hua[1], ZHANG Jian-rong[3] (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai 201203; 3. Department of Clinical Laboratory, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[**ABSTRACT**] **Objective**: To study the inhibition of xanthine oxidase by renierol extracted from South China Sea sponge and study the influence of renierol on hyperuricemia in mice. **Methods**: After extracted from South China Sea sponge, renierol (20, 40, 60 μg/ml) was added to a system containing xanthine oxidase (0.1 μ/ml) and xanthine (50 μmol/ml); allopurinol (1 μg/ml) was also addded to the system as positive control. The 5 min-fomation of superoxide anions was used to determine the activity of xanthine oxidase (Nitro Blue Btetrazolium reduction). Renierol (20, 40, 60 μg/ml) was added to 25℃ pre-heated pyrogallol autoxidation to observe its eliminating effect on free radicals through determining the absorbance rate at 420 nm wavelength. Potassium oxonate, a uricase inhibitor, was used to induce hyperuricemia in mice and the mice were then treated with oral renierol (10, 20, 30 mg·kg^{-1}) or allopurinol (2 mg/kg) as positive control. The decrease of serum uric acid induced by renierol was determined by automatic biochemical analyzer. **Results**: Renierol was demonstrated to be a competitive inhibitor of xanthine oxidase *in vitro*, with its IC_{50} value being 1.36 μg·ml^{-1}. It also decreased uric acid *in vivo*. **Conclusion**: Renierol can decrease serum uric acid through inhibiting the xanthine oxidase.

[**KEY WORDS**] renierol; sponge; marine biology; xanthine oxidase; hyperuricemia
[Acad J Sec Mil Med Univ,2006,27(1):25-27]

目前治疗痛风的药物主要有:(1)降尿酸药:包括促尿酸排泄药和尿酸生成抑制剂,临床使用的是黄嘌呤氧化酶的竞争性抑制剂别嘌呤醇。(2)抗炎药:包括秋水仙碱、非类固醇抗炎药和肾上腺皮质激素等。痛风急性发作时主要使用抗炎药,慢性期主要应用别嘌呤醇,但长期应用别嘌呤醇会造成严重的变态反应、肝毒性等不良反应,但到目前为止仍未找到理想的药物[1,2]。海绵属于最简单的多细胞动物,种类繁多,已知的有 1 万多种,分布极广,其中蕴含的次生代谢产物结构新颖,具有多方面的生物活性,作用机制往往比较独特[3]。自 20 世纪 70 年代以来,人们已从海绵中发现许多结构独特、具有强烈的抗菌、抗病毒、抗心血管和抗肿瘤等生理活性的化合物。我国南海地处热带、亚热带,海域辽阔,海绵资源极其丰富,是世界上海绵集中分布的海域之一[4]。本文主要研究中国南海海绵中提取的化合物 renierol 对

[基金项目] 上海市中药现代化专项基金(05DZ19714). Supported by Fund for Modernization of Traditional Chinese Herbs of Shanghai Municipal Government(05DZ19714).
[作者简介] 尚雁君,硕士生. E-mail:syjsmmu@163.com
* Corresponding author. E-mail:huangcaig@hotmail.com

黄嘌呤氧化酶的抑制作用和体内降尿酸作用。

1　材料和方法

1.1　*药物和试剂*　黄嘌呤、别嘌呤醇、四唑硝基氮蓝(Nitro Blue Btetrazolium)、超氧化物歧化酶购自美国 Sigma 公司；黄嘌呤氧化酶购自 Roche 公司；邻苯三酚购自上海国药集团化学试剂有限公司；氧嗪酸钾(oxonic acid，potassium salt)购自 Alorich 公司；焦磷酸钠盐(sodium pyrophosphate decahydrate ace reagent)购自 ICN Biomedical 公司。

1.2　Renierol 的分离纯化　我国南海海绵于 2004 年在中国南海海域采集，并由中国科学院上海药物研究所鉴定，丙酮提取，提取液减压浓缩至无有机溶剂，得浸膏，用水溶解粗浸膏，然后用乙醚萃取数次，合并乙醚萃取液减压浓缩得到乙醚浸膏，该浸膏经硅胶柱层析，石油醚-乙醚梯度洗脱，石油醚-乙醚 1∶1洗脱部分经凝胶 LH-20 柱(石油醚-氯仿/甲醇 2∶1∶1 洗脱)，得到纯化合物 renierol。结构使用核磁共振法确定。

1.3　Renierol 对黄嘌呤氧化酶活性的影响

1.3.1　*利用超氧离子致 NBT 显色测定黄嘌呤氧化酶活性*　反应方程式见图 1。

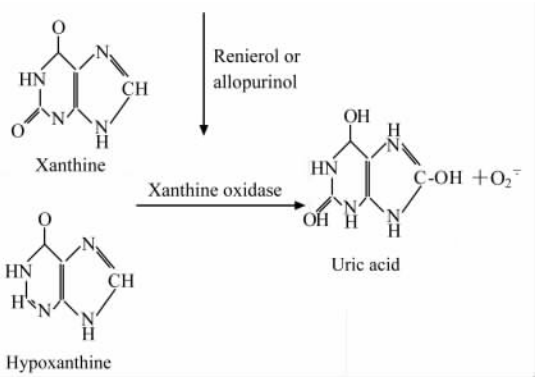

图 1　黄嘌呤氧化酶抑制剂作用机制

Fig 1　Inhibition mechanism of xanthine oxidase inhibitor

反应体系分为 3 组，其中模型组中加入黄嘌呤(50 μmol/L)、黄嘌呤氧化酶(0.1 U/mol)和 NBT(50 μmol/L)，而实验组中按样品 renierol 的浓度分别再在模型组的基础上加入 20、40 和 60 μg/ml 的 renierol，阳性对照组也在模型组基础上加入 1 μg/ml 的别嘌呤醇，反应体系中加入磷酸盐缓冲液(50 mmol/L，pH 值 7.2)至终体积 600 μl。反应以加入黄嘌呤氧化酶为开始，室温反应 5 min，用 CE-2021 分光光度计在 560 nm 下测定光密度，以每分钟的光密度增加量作为反应速度，将实验组和阳性对照组测得的光密度值除以模型组的光密度值算出其抑制率后加以比较。黄嘌呤溶解于 1 μmol/L NaOH，其他组分溶解于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液和 0.1 mmol/L EDTA 所配溶液[5]。

1.3.2　*邻苯三酚自氧化实验*　将实验分为 3 组，即模型组、renierol 样品组按其浓度再分为 20、40 和 60 μg/ml 浓度组及阳性对照 SOD(100 U/ml)组。加入邻苯三酚前，先加入样品组和阳性对照组中的物质，于 25℃恒温 20 min 后加入 25℃预热过的邻苯三酚，迅速摇匀，立即倾入光径 1 cm 比色杯中，在波长 420 nm 处测定光密度值 D_0、$D_{\text{renierol样品}}$ 和 D_{SOD}。抑制率＝($D_0-D_{\text{renierol样品}}/D_{\text{SOD}}$) $D_0\times100\%$[6]。

1.4　*高尿酸血症模型的建立和 renierol 的影响*　昆明种雄性小鼠，体质量 18～22 g，随机分成 6 组，每组 10 只，即假手术组、模型组、高、中、低剂量 renierol 组和别嘌呤醇组，实验中高、中、低剂量每天 ig 给药 1 次，连续 3 d，高、中、低剂量组 renierol 的剂量分别为 10、20、30 mg·kg^{-1}，别嘌呤醇剂量为 2 mg·kg^{-1}，模型组给予相同体积生理盐水，在最后 1 d 给药前 1 h，除假手术组外所有组均腹腔注射 900 mg·kg^{-1}的氧嗪酸钾，1 h 后眼眶取血，用全自动生化分析仪测定血清中尿酸值[7]。

1.5　*统计学处理*　SAS 统计学软件，结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。体内实验采用成组资料的 t 检验。

2　结　果

2.1　*Renierol 的分子结构和理化性状*　Renierol 的分子结构见图 2。Renierol 的理化性状如下：黄色粉末。EIMS(m/z)：233 (M^+)；^{1}HNMR ($CHCl_3$，400 MHz，δ)：8.94 (d，J＝4.9 Hz，H-3)，7.92 (d，J＝4.9 Hz，H-4)，5.19 (d，J＝4.7 Hz，H-9)，4.15 (s，OCH_3)，2.10 (s，CH_3)；^{13}CNMR ($CHCl_3$，100 MHz)：160.3 (s，C-1)，152.8 (d，C-3)，118.2 (s，C-4)，139.1 (s，C-4a)，184.5 (s，C-5)，121.7 (s，C-6)，158.2 (s，C-7)，181.6 (s，C-8)，130.7 (s，C-8a)，64.1 (t，C-9)。

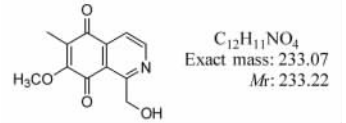

图 2　Renierol 的分子结构

Fig 2　Molecular structures of renierol

2.2　*Renierol 对黄嘌呤氧化酶活性的影响*　通过超氧离子致 NBT 显色法测定超氧离子生成量，显示 renierol 对黄嘌呤氧化酶有显著的抑制作用，Linerweaver-Burk 作图(图 3)提示其为黄嘌呤氧化酶的竞争性抑制剂。通过抑制剂浓度对抑制率作图，

测出其半数抑制浓度(IC_{50})为 1.36 $\mu g \cdot ml^{-1}$。

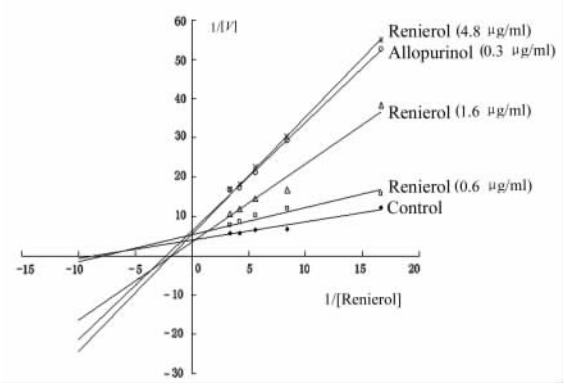

图 3 Renierol 对黄嘌呤氧化酶的 Linweaver-Burk 曲线

Fig 3 Lineweaver-Burk curve of renierol's effect on xanthine oxidase

2.3 邻苯三酚自氧化法测定 renierol 对超氧离子的直接清除作用 其中 SOD 组的清除率为 77%,而 renierol 组的清除率仅为 9.5%,结果显示其对氧自由基没有直接清除作用。

2.4 Renierol 对高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的影响 在此实验条件下,模型组小鼠血清尿酸水平(0.305±0.089) $\mu mol \cdot ml^{-1}$ 与假手术组(0.075±0.20) $\mu mol \cdot ml^{-1}$ 相比有明显升高,renierol 高、中、低剂量组(10、20、30 $mg \cdot kg^{-1}$)与模型组相比,均有明显的下降[(0.217±0.076)、(0.178±0.066)和(0.133±0.047) $\mu mol \cdot ml^{-1}$, $P<0.05$ 或 $P<0.01$],并呈量效关系,别嘌呤醇组为(0.139±0.037) $\mu mol \cdot ml^{-1}$,说明 renierol 在体内也有明显的降尿酸作用。

3 讨 论

由于在人体内黄嘌呤和次黄嘌呤都能在黄嘌呤氧化酶的催化下生成尿酸和超氧离子,同时本反应还是体内产生超氧离子的主要反应之一[8]。所以可以分别通过测定尿酸和 O_2^- 的生成量来观察样品对黄嘌呤氧化酶的抑制作用,本实验采用 O_2^- 致 NBT 显色的方法,间接观察 renierol 对黄嘌呤氧化酶的抑制作用,结果显示 renierol 能显著降低 O_2^- 对 NBT 引起的显色反应,也就是说其抑制了 O_2^- 的生成,说明 renierol 有可能有抑制黄嘌呤氧化酶的作用,但也有可能本身具有清除氧自由基的作用,所以又采取了邻苯三酚自氧化实验来证明其本身是否有此清除作用,实验证明 renierol 本身几乎没有清除氧自由基的作用,故得出结论为 O_2^- 生成的减少确实是由于 renierol 抑制了黄嘌呤氧化酶的作用,通过不同浓度的 renierol 对黄嘌呤氧化酶抑制率作图,可以看出 renierol 和别嘌呤醇同样是黄嘌呤氧化酶的竞争性抑制剂。

人体内尿酸主要随尿液排除体外,而在小鼠体内由于存在尿酸氧化酶,所以尿酸可以进一步被分解。氧嗪酸钾是尿酸氧化酶的抑制剂,小鼠腹腔注射氧嗪酸钾可以造成小鼠高尿酸血症模型,在给小鼠造模之前给予小鼠 renierol,观察 renierol 是否能抑制尿酸的生成,实验证明 renierol 对此模型有明显的降尿酸作用。

海绵是地球上最原始的多细胞生物,出现于距今 600 万年前的寒武纪时代,分布自潮汐地带,到水深上千米的世界各大海域中。海绵的种类繁多,约有 5 000 多种。多数海绵具有寿命长、不易被其他生物捕食、不能被细菌分解等特点,有研究者认为,这可能是海绵存在多变的化学防御物质,产生众多生理活性物质的一个原因。另外,海洋微生物与海绵共生是使海绵产生多种强烈生理活性及化学结构新颖化合物的又一因素[4]。我们证明了 renierol 在体外有明显的黄嘌呤氧化酶抑制作用,在体内也有明显的降尿酸作用,而且作为天然产物,来源很丰富,取材较为简单方便,成本较低且毒性较小,有希望开发成为抗痛风的新药。

[参 考 文 献]

[1] 吴生元,彭江云,吴 洋,等. 中药"痛风消"组合剂的主要药效学试验[J]. 云南中医中药杂志,2001,22:27-29.

[2] Emmerson BT. 痛风的药物治疗[J]. 国外医学·药学分册,1996,23:350-353.

[3] 邱 彦,邓志威,裴月湖,等. 中国南海海绵 *Hyrtios erectus* 中二倍半萜类化学成分[J]. 中国天然药物,2003,9:137-141.

[4] 梁利岩,邓松之. 中国南海海绵化学成分研究进展[J]. 广州化学,1999,2:57-64

[5] Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, et al. Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide badical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 3476-3479.

[6] 许申鸿,杭 瑚,李运平. 超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法的研究及改进[J]. 化学通报,2001(8):516-519 .

[7] 王海东,葛 飞,郭玉松,等. 金钱草提取物对高尿酸血症小鼠的影响[J]. 中国中药杂志,2002,27:939-944.

[8] 任 颖,刘静兰,王秋玉. 自由基与衰老[J]. 长春中医学院学报,1997,13:59.

[收稿日期] 2005-11-11 [修回日期] 2005-12-14

[本文编辑] 尹 荼