

虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用与酶动力学研究

李相成*, 刘小红, 高华^{#a}, 范美玲, 刘坤, 王威^{#b}(青岛大学医学院, 山东青岛 266021)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0494-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.20

摘要 目的:研究虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用与酶动力学。方法:质量浓度分别为200、100、50 μg/ml的虎杖总提取物、石油醚提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物、水提取物与120 μl黄嘌呤氧化酶(0.02 U/ml)作用于240 μl黄嘌呤溶液(300 μmol/L),采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤反应体系尿酸生成量,计算抑制率。以40、20、10、5 μg/ml虎杖乙酸乙酯提取物与100、80、60、40 μg/ml虎杖正丁醇提取物作用于240 μl黄嘌呤溶液,采用HPLC法测定尿酸生成量。酶动力学研究采用双倒数作图法确定有效溶剂提取物的抑制类型,采用二次作图法求药物对游离酶的抑制常数(K_i)、药物对酶底物络合物的抑制常数(K_{is})。结果:质量浓度为200、100、50 μg/ml时,虎杖乙酸乙酯、正丁醇提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制率均大于50%;虎杖乙酸乙酯提取物的 K_i 和 K_{is} 分别为14.46、61.82 μg/ml,虎杖正丁醇提取物的 K_i 和 K_{is} 分别为82.97、148.93 μg/ml。结论:虎杖乙酸乙酯、正丁醇提取物对黄嘌呤氧化酶具有抑制作用,二者均为混合型抑制,对游离酶的抑制作用均强于对酶-底物复合物的抑制作用。该结论为虎杖治疗痛风的新药开发和抑制黄嘌呤氧化酶作用有效成分研究提供了依据。

关键词 虎杖;痛风;黄嘌呤氧化酶;尿酸

Study on Inhibition and Enzyme Kinetics of Different Solvent Extractions From *Polygonum cuspidatum* on Xanthine Oxidase

LI Xiang-cheng, LIU Xiao-hong, GAO Hua, FAN Mei-ling, LIU Kun, WANG Wei (Medical College, Qingdao University, Shandong Qingdao 266021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibition and Enzyme kinetics of different solvent extractions from *Polygonum cuspidatum* on xanthine oxidase. METHODS: Total extractions, ethyl acetate extractions, *n*-butanol extractions, water extractions from *P. cuspidatum* with concentrations of 200, 100, 50 μg/ml+120 μl xanthine oxidase (0.02 U/ml) were respectively acted on 240 μl xanthine solution (300 μmol/L). HPLC was employed to test the formation amount of uric acid in the xanthine oxidase-xanthine reaction system and calculate the inhibition rate. 40, 20, 10, 5 μg/ml ethyl acetate extractions from *P. cuspidatum* and 100, 80, 60, 40 μg/ml *n*-butanol extractions from *P. cuspidatum* were acted on 240 μl xanthine solution. Uric acid content was determined by HPLC. The inhibitory type of effective solvent extractions was determined by double reciprocal plot and K_i and K_{is} were obtained by quadratic mapping in the enzyme kinetics experiment. RESULTS: The inhibition rates of ethyl acetate and *n*-butanol extractions from *P. cuspidatum* on xanthine oxidase were more than 50% with different concentrations (200, 100, 50 μg/ml). The K_i and K_{is} of petroleum ether and ethyl acetate extractions from *P. cuspidatum* on free enzyme were 14.46, 61.82 μg/ml respectively and the K_i and K_{is} of *n*-butanol from *P. cuspidatum* were 82.97, 148.93 μg/ml. CONCLUSIONS: The ethyl acetate and butanol extractions from *P. cuspidatum* showed significant inhibitory activities with mixed inhibitions. The inhibitory effects of both on free enzyme were stronger than those on enzyme-substrate complex. The study provides supporting ideas for the development of *P. cuspidatum* on treatment of gout and the study of active ingredients inhibiting xanthine oxidase.

KEYWORDS *Polygonum cuspidatum*; Gout; Xanthine oxidase; Uric acid

高尿酸血症是嘌呤代谢紊乱或(和)尿酸排泄减少所引起的一组异质性疾病,是引发痛风的重要生化基础^[1]。近年研究表明,高尿酸血症与心血管疾病、慢性肾脏病及代谢综合征,如糖尿病、肥胖等密切相关,是一种严重影响公共健康的疾病^[2-4]。黄嘌呤氧化酶能催化黄嘌呤和次黄嘌呤的氧化生成尿酸,尿酸浓度过高会导致高尿酸血症。黄嘌呤氧化酶作为尿酸生成的关键酶是降低尿酸药物的作用靶点^[5]。别嘌呤醇是

在临床上使用的黄嘌呤氧化酶抑制剂,但有皮肤过敏、肝炎、超敏反应综合征等不良反应,在一定程度上限制了其使用^[6-9]。2008年欧盟药监局和2009年美国FDA批准上市的治疗高尿酸血症和痛风的新药非布索坦(Febuxostat),是一种非嘌呤类黄嘌呤氧化酶抑制剂,其药效优于别嘌呤醇^[9],但最常见的副作用为肝功能异常、恶心想吐、皮疹、关节痛等^[10]。筛选抑制黄嘌呤氧化酶作用植物资源,系统研究其物质基础和作用机制,有望研制出高效、低毒、成分清楚、作用机制明确的组合物或先导化合物。

虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)为蓼科虎杖属植物,其根茎和根入药,具有利湿退黄、清热解毒、散瘀止痛、止咳化痰的功能,临床主要用于治疗高脂血症、肝炎、关节炎病等^[11]。已有文献报道虎杖提取物可降低高尿酸血症模型动

* 硕士研究生。研究方向:天然产物活性成分。电话:0532-82991172。E-mail:xiangchengjil@163.com

a 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:天然产物活性成分与创新药物。电话:0532-82991203。E-mail:gaohuaqy@126.com

b 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:天然产物活性成分与创新药物。电话:0532-82991172。E-mail:w.w.wangwei@263.net

物血尿酸水平和抑制黄嘌呤氧化酶活性,可改善痛风性关节炎的病理改变^[12],但缺乏虎杖提取物对黄嘌呤氧化酶抑制活性物质基础和作用机制的系统深入的研究。笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤反应体系尿酸生成量,体外测定不同分离部位抑制作用,并进一步进行有效部位酶动力学抑制机制的探讨,以为虎杖治疗痛风新药开发和抑制黄嘌呤氧化酶作用有效成分研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);BT 125D型电子天平(德国Sartorius公司);HH420-2B型精密恒温水浴锅(上海比朗仪器有限公司);S25型微型漩涡混合仪(德国IKA公司)。

1.2 药材

虎杖药材购于安徽省亳州市永刚饮片有限公司(批号:121221),经大连大学冯宝民教授鉴定为真品。标本存放于青岛大学药学院,样品编号:QY-2012-PC-01。

1.3 试剂

黄嘌呤(批号:125K5302,纯度:≥99%)、别嘌呤醇(批号:046K0668)、尿酸(批号:106K0690,纯度:≥99%)、黄嘌呤氧化酶(批号:1001643586,质量浓度:11 mg/ml,活性:0.3 U/mg)均购自美国Sigma公司;其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 虎杖提取物的制备

取虎杖药材1 kg加80%乙醇6 L回流提取2次,每次2 h,提取液合并,减压回收乙醇得提取物282 g。取提取物250 g加水800 ml使溶解,依次分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇振摇提取5次,每次500 ml,减压回收溶剂得虎杖石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水提取物。

2.2 尿酸的测定^[13]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:100 mmol/L磷酸二氢钠溶液(pH 3.5),流速:1.0 ml/min;检测波长:90 nm;柱温:25 ℃。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取尿酸对照品16.81 mg,置于250 ml量瓶中,加水约150 ml,加0.01 mol/L氢氧化钠12.5 ml使尿酸溶解,加水至刻度,摇匀;精密吸取10 ml,置于100 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,制成尿酸质量浓度为6.724 μg/ml的对照品溶液。

2.2.3 样品测定 分别精密吸取供试品、对照品溶液各20 μl,按“2.2.1”项下方法进样测定,记录色谱图。采用外标一点法测定尿酸生成量。

2.3 虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的测定

取不同供试品溶液[虎杖总提取物、石油醚提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物50、100、200 μg/ml与别嘌呤醇0.5 μg/ml,含1%二甲亚砜(DMSO)的0.07 mol/L磷酸缓冲液(PBS)]共200 μl加入0.07 mol/L PBS140 μl,黄嘌呤氧化酶溶液120 μl(0.02 U/ml,含0.07 mol/L PBS),25 ℃保温15 min,加入黄嘌呤溶液240 μl(300 μmol/L,含0.07 mol/L PBS),25 ℃保温15 min,加入1 mol/L盐酸100 μl终止反应。设空白对照,供试品溶液用含1% DMSO的0.07 mol/L PBS代替。采用HPLC法测定尿酸生成量,每组质量浓度平行3次,计算抑制率。

2.4 虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶抑制动力学的测定

取不同供试品溶液(虎杖乙酸乙酯提取物40、20、10、5 μg/ml,正丁醇提取物100、80、60、40 μg/ml,含1% DMSO的0.07 mol/L PBS)200 μl,加入0.07 mol/L PBS140 μl,加入黄嘌呤溶液240 μl(100、75、50、37.5 μmol/L,0.07 mol/L PBS),黄嘌呤氧化酶溶液120 μl(0.05 U/ml,0.07 mol/L PBS),25 ℃保温1 min,加入1 mol/L盐酸100 μl终止反应。设空白对照,供试品溶液用含1% DMSO的0.07 mol/L PBS代替。采用HPLC法测定尿酸生成量,每组质量浓度平行3次,按Lineweaver-Burk双倒数图法确定抑制作用类型。

3 结果

3.1 虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用

阳性对照别嘌呤醇(0.5 μg/ml)抑制率为(59.81±0.70)%,在50、100、200 μg/ml质量浓度下,虎杖正丁醇、乙酸乙酯提取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用明显强于虎杖石油醚、水提取物(均大于50%),且与质量浓度呈正相关。虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶抑制率的计算结果见表1。

表1 虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶抑制率的计算结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Results of inhibition rate of different solvent extractions from *P. cuspidatum* on xanthine oxidase ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

提取物	不同质量浓度下酶抑制率, %		
	200 μg/ml	100 μg/ml	50 μg/ml
虎杖总提取物	86.34 ± 0.25	72.38 ± 0.77	56.78 ± 0.51
虎杖石油醚提取物	50.49 ± 0.58	35.68 ± 0.97	29.25 ± 0.85
虎杖乙酸乙酯提取物	91.73 ± 0.21	84.24 ± 0.61	67.58 ± 0.58
虎杖正丁醇提取物	82.37 ± 0.39	69.96 ± 1.19	51.84 ± 1.02
虎杖水提取物	16.48 ± 0.94		
别嘌呤醇(0.5 μg/ml)	59.81 ± 0.70		

3.2 虎杖不同溶剂提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制动力学

在50、100、200 μg/ml质量浓度下,虎杖乙酸乙酯、正丁醇提取物Lineweaver-Burk双倒数直线均相交于第二象限,详见图1、图2。通过米氏方程转换式计算米氏常数(K_m ,即在酶促反应速度达到最大反应速度一半时所对应的底物浓度)和最大酶促反应速度(V_{max} ,即酶被底物饱和时的反应速度)。结果,虎杖乙酸乙酯提取物 $K_m(40 \mu\text{g/ml}) > K_m(20 \mu\text{g/ml}) > K_m(10 \mu\text{g/ml}) > K_m(5 \mu\text{g/ml}) > K_m(0 \mu\text{g/ml})$, $V_{max}(40 \mu\text{g/ml}) < V_{max}(20 \mu\text{g/ml}) < V_{max}(10 \mu\text{g/ml}) < V_{max}(5 \mu\text{g/ml}) < V_{max}(0 \mu\text{g/ml})$;虎杖正丁醇提取物 $K_m(100 \mu\text{g/ml}) > K_m(80 \mu\text{g/ml}) > K_m(60 \mu\text{g/ml}) > K_m(40 \mu\text{g/ml}) > K_m(0 \mu\text{g/ml})$, $V_{max}(100 \mu\text{g/ml}) < V_{max}(80 \mu\text{g/ml}) < V_{max}(60 \mu\text{g/ml}) < V_{max}(40 \mu\text{g/ml}) < V_{max}(0 \mu\text{g/ml})$ 。 K_m 随着虎杖乙酸乙酯、正丁醇提取物质量浓度的增加而增大,而 V_{max} 则相反,表明虎杖乙酸乙酯、正丁醇提取物抑制机制均为混合型抑制:既能和游离酶结合,又能和酶-底物复合物在非活性中心结合^[14]。利用二次作图法以Lineweaver-Burk双倒数图中各条直线的斜率和纵轴截距分别对虎杖乙酸乙酯、正丁醇提取物质量浓度作图^[15],计算得虎杖乙酸乙酯提取物对游离酶的抑制常数(K_i)和对酶-底物复合物的抑制常数(K_{is})分别为14.46、61.82 μg/ml;虎杖正丁醇提取物 K_i 和 K_{is} 分别为82.97、148.93 μg/ml。两者对游离酶的抑制作用均强于对酶-底物复合物的抑制作用。虎杖乙酸乙酯、正丁醇提取物对黄嘌呤氧

化酶抑制动力学 Lineweaver-Burk 双倒数图见图1、图2(图中S为浓度, V为速度)。

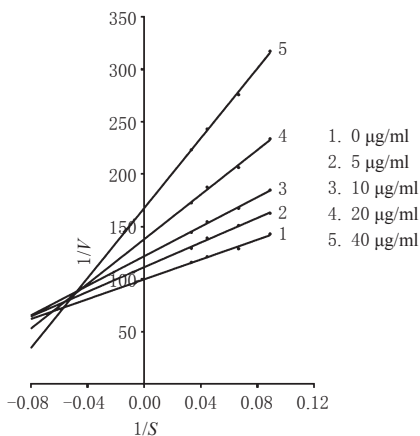


图1 虎杖乙酸乙酯提取物对黄嘌呤氧化酶抑制动力学 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig 1 Lineweaver-Burk plots of inhibition kinetics of ethyl acetate extractions from *P. cuspidatum* on xanthine oxidase

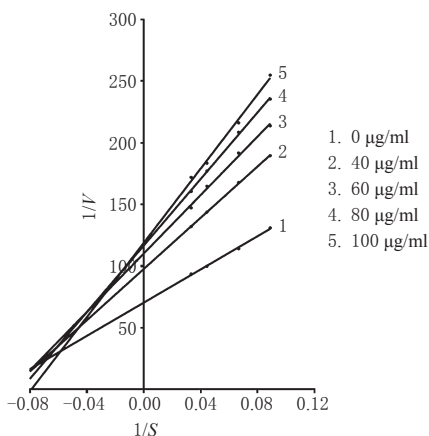


图2 虎杖正丁醇提取物对黄嘌呤氧化酶抑制动力学 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig 2 Lineweaver-Burk plots of inhibition kinetics of *n*-butanol extractions from *P. cuspidatum* on xanthine oxidase

4 讨论

筛选抗高尿酸血症作用的植物资源,系统研究其物质基础和作用机制,有望研制出高效、低毒、成分清楚、作用机制明确的抗高尿酸血症多靶点组合物和先导化合物。目前测定黄嘌呤氧化酶活性主要采用NBT/MTS-PMS比色法、紫外分光光度法、辣根过氧化物酶分光光度法、电化学法和放射化学法等^[16],应用广泛的紫外分光光度法,由于反应体系中天然产物化学成分、黄嘌呤和尿酸紫外吸收相互干扰,会影响测定结果的准确性。笔者建立了HPLC法测定黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤反应体系尿酸生成量的体外黄嘌呤氧化酶抑制活性与机制研究方法,优化了底物浓度、酶浓度、孵育温度和孵育时间。本研究应用建立的研究方法确定虎杖提取物乙酸乙酯和正丁醇部位为黄嘌呤氧化酶抑制作用的有效部位,两者均为混合型抑制,为虎杖治疗痛风的新药开发和抑制黄嘌呤氧化酶作用有

效成分研究提供了依据。

参考文献

- [1] Punzi L, So A. Serum uric acid and gout: from the past to molecular biology[J]. *Curr Med Res Opin*, 2013, 29(Suppl 3):3.
- [2] Puddu P, Puddu GM, Cravero E, et al. The relationship among hyperuricemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *J Cardiol*, 2012, 59(3):235.
- [3] Zoccali C, Mallamaci F. Uric acid, hypertension, and cardiovascular and renal complications[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2013, 15(6):531.
- [4] Behradmanesh S, Horestani MK, Baradaran A, et al. Association of serum uric acid with proteinuria in type 2 diabetic patients[J]. *J Res Med Sci*, 2013, 18(1):44.
- [5] Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol[J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(1):87.
- [6] Doghramji PP. Managing your patient with gout: a review of treatment options[J]. *Postgrad Med J*, 2011, 123(3):56.
- [7] Terkeltaub R, Bushinsky DA, Becker MA. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(Suppl 1):S4.
- [8] EI-Zawawy H, Mandell BF. Managing gout: how is it different in patients with chronic kidney disease?[J]. *Cleve Clin J Med*, 2010, 77(12):919.
- [9] Burns CM, Wortmann RL. Gout therapeutics: new drugs for an old disease[J]. *Lancet*, 2011, 377(9760):165.
- [10] Gaffo AL, Saag KG. Febuxostat: the evidence for its use in the treatment of hyperuricemia and gout[J]. *Core Evid*, 2009(4):25.
- [11] 孔晓华,周玲芝.中药虎杖的研究进展[J]. *中医药导报*, 2009, 15(5):108.
- [12] 侯建平,王亚军,严亚峰,等.虎杖提取物抗动物高尿酸血症的实验研究[J]. *西部中医药*, 2012, 25(5):21.
- [13] Nguyen MTT, Awale S, Tezuka Y, et al. Hypouricemic effects of acacetin and 4, 5-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats[J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 28(12):2231.
- [14] 帅丽,杨天鸣,陈婧斯,等.首乌总提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制[J]. *光谱实验室*, 2012, 29(2):745.
- [15] 袁勤生. *现代酶学*[M].上海:华东理工大学出版社, 2001:31.
- [16] 李忠琴,许小平,杨海麟,等.辣根过氧化物酶分光光度法测定黄嘌呤氧化酶的活性[J]. *分析化学*, 2006, 34(6):821.

(收稿日期:2014-06-09 修回日期:2014-07-23)

(编辑:张 静)