

國家科學及技術委員會補助專題研究計畫報告

年齡相關心血管內皮發炎疾病的性別差異研究 (L03)

報告類別：成果報告
計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSTC 111-2629-B-436-001-
執行期間：111年08月01日至113年07月31日
執行單位：馬偕學校財團法人馬偕醫護管理專科學校化妝品應用與管理科

計畫主持人：張靜雯
共同主持人：林郁進

計畫參與人員：其他-其他：曾隆彥
其他-其他：許慈恩
其他-其他：陳郁琇

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)
本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

中華民國 113 年 10 月 31 日

中文摘要：冠心血管內皮發炎易衍生動脈粥狀硬化、心肌梗塞及中風等心血管疾病，總死亡人數高達全球死亡人數的30%。高尿酸血症是冠心血管內皮發炎的獨立且重要風險因子，也是更年期後婦女心血管疾病罹患率急遽上升的主要原因之一。在心血管內皮發炎衍生疾病上，高尿酸、年齡及性別在兩性健康差異上是重要的影響因子。實驗設計上利用腹腔注射尿酸鉀鹽(potassium oxonate, 300 mg/kg) 建立高尿酸血症模型(3月齡及6月齡小鼠；雌雄各半)，並希望能同時建立心血管內皮發炎模型。誘導前1小時口服給予小鼠不同劑量的別嘌吟醇(40 mg/kg)、益母草鹼(Leonurine, 15、30、60 mg/kg)及益母草乙醇萃取物(300 mg/kg)。連續誘導及投藥28天。實驗結果顯示，益母草鹼(60 mg/kg)具有明顯降低血清尿酸值及抑制肝臟中XOD活性的作用。在半定量RT-PCR顯示益母草鹼對於血管中IL-1β、IL-6及CRP mRNA表現量沒有影響。組織病理學檢查結果未發現血管有組織異常病徵，但小鼠腎臟及肝臟皆有發炎、纖維化及組織變性壞死等現象。性別不同的小鼠並未出現病徵差異。綜合以上結果可知，尿酸鉀鹽可破壞小鼠肝臟及腎臟，使尿酸升高而成功建立高尿酸血症模型。雖然臟器有發炎現象，但冠狀動脈及主動脈血管內皮在病理組織切片中並未觀查到發炎病徵，可能是誘導劑量或誘導時間未能對冠狀動脈血管內皮組織或細胞造成發炎影響。惟高尿酸血症是心血管疾病中血管內皮發炎的重要影響因子，因此後續探討與建立實驗動物高尿酸血症併發心血管內皮發炎模型是應該繼續努力的工作。

中文關鍵詞：性別差異分析、高尿酸血症、心血管疾病、冠心血管內皮發炎、益母草鹼

英文摘要：Inflammation of the coronary endothelium can easily lead to cardiovascular diseases such as atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke, which accounts for up to 30% of global deaths. Hyperuricemia is not only an independent and important risk factor for coronary cardiovascular endothelial inflammation, but also one of the main reasons for the sharp increase in the incidence of cardiovascular disease in postmenopausal women. In diseases derived from cardiovascular endothelial inflammation, high serum uric acid, age and gender are important influencing factors on gender health differences. The experimental design used intraperitoneal injection of potassium oxonate (300 mg/kg) to establish a hyperuricemia model (3-month-old and 6-month-old mice; half male and half female). It is hoped that the cardiovascular endothelial inflammation profile can be assessed simultaneously. Mice were orally administered different doses of allopurinol (40 mg/kg), Leonurine (15, 30, 60 mg/kg) and Leonurine ethanol extract (300 mg/kg) 1 hour before induction. Continuous induction and administration for 28 days. Experimental results show that Leonurine (60 mg/kg) can significantly reduce serum uric acid levels and inhibit XOD activity in the liver.

Semiquantitative RT-PCR showed that the IL-1B/ IL-6/CRP mRNA expression levels did not change in Leonurine. Histopathological examination showed no abnormalities or serious symptoms in the vascular tissue, but inflammation, fibrosis, tissue degeneration and necrosis were found in the kidneys and livers of the mice. There were no differences in symptoms between mice of different genders. Based on the above results, it can be seen that potassium oxonate can damage the liver and kidneys of mice and increase uric acid. Therefore, a hyperuricemia model has been successfully established. Although there is inflammation in the organs, no signs of inflammation were observed in the pathological tissue sections of the coronary artery and aortic endothelium; it may be that the induction dose or induction time has not yet caused inflammatory damage to the coronary endothelial tissue or cells. However, hyperuricemia is one of the important influencing factors of vascular endothelial inflammation in cardiovascular diseases. Therefore, continued efforts should be made to further explore and establish a model of hyperuricemia complicated by cardiovascular endothelial inflammation in experimental animals.

英文關鍵詞：gender difference analysis, hyperuricemia, cardiovascular disease, vascular endothelial inflammation, Leonurine

國家科學及技術委員會補助專題研究計畫報告

年齡相關心血管內皮發炎疾病的性別差異研究

報告類別：進度報告

成果報告：完整報告/精簡報告

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 111-2629-B-436-001-

執行期間：111年8月1日至113年7月31日

執行機構及系所：馬偕學校財團法人馬偕醫護管理專科學校

化妝品應用與管理科

計畫主持人：張靜雯

共同主持人：林郁進

計畫參與人員：陳郁琇、許慈恩、曾隆彥

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關_____

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

中華民國 113 年 10 月 20 日

中文摘要

冠心血管內皮發炎易衍生動脈粥狀硬化、心肌梗塞及中風等心血管疾病，總死亡人數高達全球死亡人數的30%。高尿酸血症是冠心血管內皮發炎的獨立且重要風險因子，也是更年期後婦女心血管疾病罹患率急遽上升的主要原因之一。在心血管內皮發炎衍生疾病上，高尿酸、年齡及性別在兩性健康差異上是重要的影響因子。實驗設計上利用腹腔注射尿酸鉀鹽 (potassium oxonate, 300 mg/kg) 建立高尿酸血症模型 (3月齡及6月齡小鼠；雌雄各半)，並希望能同時建立心血管內皮發炎模型。誘導前 1 小時口服給予小鼠不同劑量的別嘌呤醇 (40 mg/kg)、益母草鹼 (Leonurine, 15、30、60 mg/kg) 及益母草乙醇萃取物 (300 mg/kg)。連續誘導及投藥28天。實驗結果顯示，益母草鹼(60 mg/kg)具有明顯降低血清尿酸值及抑制肝臟中XOD活性的作用。在半定量RT-PCR顯示益母草鹼對於血管中 IL-1B、IL-6及CRP mRNA表現量沒有影響。組織病理學檢查結果未發現血管有組織異常病徵，但小鼠腎臟及肝臟皆有發炎、纖維化及組織變性壞死等現象。性別不同的小鼠並未出現病徵差異。綜合以上結果可知，尿酸鉀鹽可破壞小鼠肝臟及腎臟，使尿酸升高而成功建立高尿酸血症模型。雖然臟器有發炎現象，但冠狀動脈及主動脈血管內皮在病理組織切片中並未觀查到發炎病徵，可能是誘導劑量或誘導時間未能對冠狀動脈血管內皮組織或細胞造成發炎影響。惟高尿酸血症是心血管疾病中血管內皮發炎的重要影響因子，因此後續探討與建立實驗動物高尿酸血症併發心血管內皮發炎模型是應該繼續努力的工作。

關鍵詞：性別差異分析、高尿酸血症、心血管疾病、冠心血管內皮發炎、益母草鹼

Abstract

Inflammation of the coronary endothelium can easily lead to cardiovascular diseases such as atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke, which accounts for up to 30% of global deaths. Hyperuricemia is not only an independent and important risk factor for coronary cardiovascular endothelial inflammation, but also one of the main reasons for the sharp increase in the incidence of cardiovascular disease in postmenopausal women. In diseases derived from cardiovascular endothelial inflammation, high serum uric acid, age and gender are important influencing factors on gender health differences. The experimental design used intraperitoneal injection of potassium oxonate (300 mg/kg) to establish a hyperuricemia model (3-month-old and 6-month-old mice; half male and half female). It is hoped that the cardiovascular endothelial inflammation profile can be assessed simultaneously. Mice were orally administered different doses of allopurinol (40 mg/kg), Leonurine (15, 30, 60 mg/kg) and Leonurine ethanol extract (300 mg/kg) 1 hour before induction. Continuous induction and administration for 28 days. Experimental results show that Leonurine (60 mg/kg) can significantly reduce serum uric acid levels and inhibit XOD activity in the liver. Semiquantitative RT-PCR showed that the IL-1B/ IL-6/CRP mRNA expression levels did not change in Leonurine. Histopathological examination showed no abnormalities or serious symptoms in the vascular tissue, but inflammation, fibrosis, tissue degeneration and necrosis were found in the kidneys and livers of the mice. There were no differences in symptoms between mice of different genders. Based on the above results, it can be seen that potassium oxonate can damage the liver and kidneys of mice and increase uric acid. Therefore, a hyperuricemia model has been successfully established. Although there is inflammation in the organs, no signs of inflammation were observed in the pathological tissue sections of the coronary artery and aortic endothelium; it may be that the induction dose or induction time has not yet caused inflammatory damage to the coronary endothelial tissue or cells. However, hyperuricemia is one of the important influencing factors of vascular endothelial inflammation in cardiovascular diseases. Therefore, continued efforts should be made to further explore and establish a model of hyperuricemia complicated by cardiovascular endothelial inflammation in experimental animals.

Key words: gender difference analysis, hyperuricemia, cardiovascular disease, vascular endothelial inflammation, Leonurine

目 錄

壹、前言.....	1
貳、研究目的.....	3
參、文獻探討.....	4
肆、研究方法.....	13
伍、結果與討論（含結論與建議）.....	16
陸、參考文獻.....	18
柒、附錄.....	23

壹、前言

尿酸是人體嘌呤代謝的最終產物，主要在肝臟中由黃嘌呤脫氫酶/氧化酶 (XDH/XO) 生成，是尿酸代謝過程中的關鍵指標，負責將次黃嘌呤轉化為黃嘌呤，進而將黃嘌呤轉化為尿酸(Zhang *et al.*, 2018)，透過腎臟排出體外。高尿酸血症 (Hyperuricemia, HUA) 的特徵是血液中尿酸值升高。痛風是因細胞外尿酸鹽過飽和，導致單一鈉尿酸鹽晶體在關節及其他組織中沉積，從而引發的疾病(Hall *et al.*, 1967)。

HUA 被定義為血清尿酸鹽濃度超過 7.0 mg/dL，使體液中尿酸鹽達到飽和，由於過度食用富含嘌呤的食物，痛風和 HUA 的盛行率顯著上升(Roddy, Choi 2014)。中老年男性及停經後女性的 HUA 發病率通常較高，但發病年齡卻有逐漸下降的趨勢。因此，高尿酸血症已成為嚴重的公共衛生問題，不僅嚴重影響患者的生活品質，還造成社會經濟負擔，值得全球的關注。

HUA 與高血壓及代謝症候群的發病機制相關。根據臨床報告，尿酸不僅與痛風的風險增加有關，也與心血管疾病、腎結石、糖尿病、肥胖及血脂異常的風險上升有關(Abeles, 2015; Feig, 2014)。因此，迫切需要一個合理且廣泛認可的動物模型來研究 HUA，以便於藥物篩選及發病機制的深入研究(Tang *et al.*, 2017)。

氧酸鉀 (Potassium oxonate) 是一種選擇性競爭性尿酸酶抑制劑，可以阻斷肝臟中尿酸酶的活性，並在齧齒動物中引發高尿酸血症(Stavric *et al.*, 1975; Wang *et al.*, 2016; Yong *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017)。目前最常用的齧齒動物 (大鼠和小鼠) 對 HUA 的動物模式仍存在限制(Puig, Martinez, 2008; Stavric *et al.*, 1975; Wang *et al.*, 2016; Yong *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017)。使用齧齒動物模型的研究顯示(Puig, Martinez, 2008; Stavric *et al.*, 1975)，需要另一種動物模型來研究氧酸鉀的藥物敏感性和穩定性。小鼠和大鼠對藥物的敏感性相對較低。大小鼠和人類都是哺乳類動物，但在分類學上與人類尚有差異，在解剖和生理學特徵也與人類存在顯著差異。儘管從動物模式中可得出的參數作為參考值的用途仍有限。但對於建立和發展與人類血清尿酸代謝相似的新型高尿酸血症動物模型仍有其必要性，並對其進行深入研究，是高尿酸血症研究領域的迫切需求。

益母草 (*Leonurus japonicus*) 著錄於神農本草經，列為上品藥，自古中醫臨床上常用於調節女性經期紊亂、痛經、閉經和產後出血等疾病，現代實驗也證實益母草具有抗發炎、抗凝血、降血脂及利尿消腫等功效；在已發現的 284 種成分，也被發現多種活性成分，包括調理婦女經期、抗發炎、降血脂及心臟保護等作用等，在藥理活性研究方面，普遍認為益母草及其活性成分(益母草鹼 Leonurine)具有活血化瘀、抗發炎、降血脂及心臟保護等功能。

早期認為 Leonurine 對大鼠離體子宮有促進收縮作用(Yeung *et al.*, 1977)。近年來陸續發現還具有廣泛的生物活性，包括抗發炎 (Song *et al.*, 2015)、抗氧化活性(Sun *et al.*, 2005)、抗血小板聚集活性(Zhou *et al.*, 1996)、興奮子宮活性(Lin *et al.*, 2013)、抗腫瘤活性(Mao *et al.*, 2015)、心血管保護作用(Zhu *et al.*, 2018)和大腦保護作用(Liu, Zhang, *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2021)等。Li 等(2020)報導 Leonurine 也具有抗氧化、發炎、纖維化、細胞凋亡和多種代謝紊亂作用(Li *et al.*, 2020)。Han 等(2022)發現 Leonurine 促進 Nrf2 核易位和抑制 TLR4/NF- κ B 徑

路，減輕大鼠缺血性急性腎損傷。Zhang 等(2022)進一步報導 Leonurine 對 Cisplatin (一種化療藥) 引起的複雜急性腎損傷具有防護作用。Wang 等(2022)發現合成 Leonurine 鹽酸鹽可更有效促進幼鼠子宮的發育，增加子宮係數/子宮腔大小及增加子宮腺體數量與增厚子宮壁，因此推論 Leonurine 可能具有雌激素樣作用。

Leonurine 被視為一種具有治療心血管系統和中樞神經系統疾病潛力的候選藥物成分，主要呈現是經由抗動脈粥樣硬化、減少心肌梗塞和心臟保護作用來防治心血管疾病；在動脈粥樣硬化中，Leonurine 抗氧化壓力和抗發炎作用，在心肌梗塞中，Leonurine 經由活化 PI3K/Akt 訊號徑路、下調 Bax 和 Fas 的表達、上調 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表達、上調 mTOR/ERK 訊號通路促進心肌收縮和血管生成，也減少鈣離子超載和抗細胞凋亡作用而產生心臟保護作用(Huang *et al.*, 2021)。

貳、研究目的

許多國家公共衛生調查顯示女性更年期後罹患心血管疾病人數急遽升高，逼近男性心血管疾病盛行率，曾有學者推測這是更年期後婦女失去「女性荷爾蒙」保護所致；但近十餘年來，調查研究顯示補充女性荷爾蒙對健康促進的成效仍有疑義，而且，發現高尿酸血症可能是更重要且獨立的危險因子，其作用機轉可能與高尿酸造成心血管內皮發炎有關。

年輕族群罹患高尿酸血症（痛風）以男性居多，但中老年後女性罹患率急遽升高，兩性心血管疾病盛行率逐漸接近，顯然高尿酸、年齡與性別三個因子在兩性健康（尤其心血管內皮發炎性疾病）差異上扮演重要角色。過去臨床觀察已發現此差異，後續利用實驗動物進行生理/病理探討的研究文獻較少，在健康維護/促進上的新活性成分/產品開發也少。

不同性別/不同年齡的疾病探討與活性成分開發是本計畫努力的重點。本計劃利用氧酸鉀鹽（potassium oxonate）誘導不同性別/不同年齡 ICR 小鼠（3月齡、6月齡）建立模擬人類年齡相關性高尿酸所致冠心血管內皮發炎模型，在生理/病理學上進行性別/年齡差異分析，同時探討益母草鹼（Leonurine）與益母草乙醇萃取物的保護能力與作用機轉。

參、文獻探討

1. 疾病的重要性：

(1) 心血管疾病是臺灣十大死因第二名，且不同性別/年齡罹患率不同：

世界衛生組織(WHO) 2017 報導全球每年約 1,730 萬人死於心血管疾病 (Cardiovascular disease, CVD) (約佔死亡總數 30%)，若無有效防治措施，預估 2030 年將攀升至 2,300 萬人(WHO, 2018)。因心血管疾病的死亡人數約佔全球死亡人數的 30%；CVD 是一組包括心臟和血管的疾病，因此冠心病 (coronary heart disease, CHD)、冠狀動脈疾病 (coronary artery disease, CAD) 和急性冠狀動脈綜合徵 (acute coronary syndrome, ACS) 及其他心臟血管疾病都被歸類為 CVD (Yucel, 2022)。

我國衛生福利部統計指出，2020 年臺灣前七大死因依序為惡性腫瘤(癌症)、心臟疾病、肺炎、腦血管疾病、糖尿病、事故傷害及高血壓性疾病(衛福部，2021)，其中心臟疾病與高血壓都屬於心血管疾病範疇。

臺灣國民的健康狀況，可由臺灣國民健康保險 (National Health Insurance, NHI) 索賠暨死亡登記相關人口調查數據及臺灣營養與健康調查(Nutrition and Health Survey in Taiwan, NAHSIT) 資料作為精準預防保健的基礎。Chang 等(2022)利用 NHI 結合 1993-1996 年 NAHSIT 資料，開發心血管事件的風險預測模型，同時利用 2002 年臺灣高血壓、高血糖和高脂血症調查(The Taiwanese Survey on Hypertension, Hyperglycemia, and Hyperlipidemia, TwSHHH)數據進行驗證；分析結果發現 NAHSIT 數據(包括 1,658 名男性和 1,652 名女性，年齡在 35-70 歲之間) 每 1,000 人的 MACEs (major adverse cardiovascular events)年發病率男性為 13.77 且女性為 7.76，而 TwSHHH 數據顯示相同疾病發病率男性為 7.27 且女性為 3.58；二種數據在模型中都具有合理區別度，NAHSIT 可預測一般人群 MACEs 風險，而 NHI 數據可用於識別疾病狀態(Chang *et al.*, 2022)。

臺灣更年期後婦女因 CVD 的死亡率每 5 年成長一倍，遠高於全球成長率(衛福部，2013)。鑒於 CVD 後遺症包括心肌梗塞、中風等疾病是家庭社會重大負擔的疾病，防治更年期婦女罹患 CVD 成為預防醫學上重要課題。

CVD 的預防保健策略應重視全面評估和管理，逐一剷除各個風險因子。許多研究顯示收縮壓、糖尿病、吸煙和高脂血症是導致 CVD 病程進展的風險因子(Okwuosa *et al.*, 2012; Kiramijyan *et al.*, 2013; Erbel *et al.*, 2014; Quercioli *et al.*, 2013)。也有學者報導 CVD 患者的生活風險促進因子包括身體活動程度低、體重指數高、飲酒、吸煙和營養因素，也包括各種營養風險促進因子如不健康飲食行為包括不健康食物的過多攝取(如精製食品、不健康脂肪、過多糖和鈉等)及健康食物的過低攝取(如水果、蔬菜、全穀物、纖維、魚和堅果等)(Busnatu *et al.*, 2022)。

Shahi等(2022)使用競爭風險模型來評估 866 名 20-74 歲超重和肥胖者在亞茲德 (Yazd)進行一項為期 10 年CAD發病率及其預測因子有關的健康心臟系列 (Healthy Heart Cohort, YHHC) 縱向研究；分析結果發現在第 II 型糖尿病的病因特异性模型和

Fine-Gray 模型中，危險促進因子如高三酸甘油酯血症、大學教育值（負相關）、尿酸、年齡、收縮壓和女性（負相關）與 CAD 風險增加相關；而且，除了傳統的心臟代謝風險因子外，尿酸增加了超重和肥胖成年人罹患 CAD 的風險(Shahi *et al.*, 2022)。

(2) 高尿酸血症(HUA)是心血管疾病(CVD)獨立且重要的風險因子 (不論男性或女性)

Kim等(2022)報導非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)及高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是 CVD獨立且相關的危險因子，且 HUA 會增加罹患 NAFLD 的風險(Kim *et al.*, 2022)。顯示HUA是CVD更重要的風險因子。

Zhang等(2022)針對422名經皮冠狀動脈介入治療(percutaneous coronary intervention, PCI)的急性冠狀動脈症候群(acute coronary syndrome, ACS)及高血壓患者進行為期一年的隨訪，以探討一年總主要不良心血管事件(total major adverse cardiovascular events, tMACEs)和多支冠狀動脈疾病(multivessel coronary artery disease, MCAD)的危險因子及與血清尿酸值(serum uric acid, sUA)之間的量效關係值、tMACEs與冠狀動脈疾病的嚴重程度以及sUA值與冠狀動脈疾病嚴重度之間的相關性(Gensini score)；分析結果顯示sUA是ACS合併高血壓患者經過PCI術後 1 年tMACEs和MCAD的獨立危險因子(Zhang *et al.*, 2022)。

尿酸(Uric Acid, UA)是嘌呤代謝的最終代謝產物，成人空腹sUA高於 7.0 mg/dL就符合HUA的定義。在已開發國家中，HUA罹患率與盛行率都持續上升(Kuo *et al.*, 2015)。HUA影響身體各種健康狀況，也會增加心肌梗塞和中風的風險(Bos *et al.*, 2006)。HUA患者 sUA每增加 1 mg/dL，因 CVD 死亡風險增加 8-13%(陳源德等，2016)，且停經女性因體內雌激素濃度遽降，原有雌激素促進腎臟排泄尿酸作用也急遽降低，尿酸滯留體內不僅容易引發高尿酸血症，也引致冠狀動脈內皮發炎，間接升高冠狀動脈疾病發生率及盛行率。

雖然，許多學者報導 HUA 是 CVD 的風險促進因子，但究竟是「UA本身增加 CVD 風險」？或是「UA 介導 CVD 發生風險」？Culleton等(1999)認為，過高的 sUA 雖提高 CVD 的發生率，但仍歸因於其他危險因子的共同作用(Culleton *et al.*, 1999)。然而，其他學者卻認為 UA 是 CVD 的獨立危險因子(Gagliardi *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009)。

(3) 高尿酸血症(HUA)引發血管內皮發炎的可能機制：

血管內皮功能障礙是動脈粥樣硬化的主要原因。動脈粥樣硬化是內皮功能障礙和氧化壓力相關慢性發炎的結果之一(Cai, 2005)。一氧化氮(Nitric oxide, NO)產生誘導細胞增殖並促進傷口修復，進而保護ECs功能並預防動脈粥樣硬化(Zghonda *et al.*, 2012)。NO 的產生和抗氧化酶的表達會在早期預防動脈粥樣硬化時被誘導出現(Cai, 2005; Yang *et al.*, 2017)。

以NO的生物利用度降低為特徵的內皮功能障礙是冠狀動脈疾病第一階段。Papežíková等(2013)曾利用乙醯膽鹼(acetylcholine, Ach)刺激人類臍帶內皮細胞 (human umbilical endothelial cells, HUVECs)，經由電化學測量NO，發現UA顯著降低NO的釋放，同時顯示UA不僅增加精氨酸酶(arginase)活性、降低內皮NO合成酶(endothelial NO synthase)的磷酸化(phosphorylation)且增加細胞內超氧化物(superoxide)的形成(Papežíková *et al.*, 2013)。NO 的產生依賴 eNOS 的活性，它受兩個重要的磷酸化多位點、活化 Ser1177 和抑制 Thr495 的調節(Mount *et al.*, 2007)。Zhao等(2016)證明，高量葡萄糖產生ROS，導致細胞活力降低(Zhao

et al., 2016)。

雖然尿酸(UA)已被證實是一種抗氧化劑，但眾所周知，UA會引起血管內皮、平滑肌細胞發炎及細胞內的氧化壓力，從而導致內皮功能障礙(圖1)(Saito et al., 2020)。雖然細胞外 UA 充當抗氧化劑，但細胞內 UA 卻代表促氧化劑(El-Din et al., 2017)。由於尿酸酶(uricase)的存在，哺乳動物血清尿酸(sUA)值較低，尿酸酶若降低或缺乏會導致sUA值升高；在嘌呤代謝過程中，經由黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)的活性產生氧自由基(O_2^-)，導致發炎反應並損害內皮功能。內皮作為內分泌器官分泌血管擴張劑例如NO和前列腺素I₂(prostaglandin I₂)和血管收縮劑例如內皮素-1(endothelin-1)、血栓素A₂(thromboxane A)和血管緊張素 II(angiotensin II)，以調節血管張力、血栓形成、發炎和氧化(Marunashi et al., 2018)。

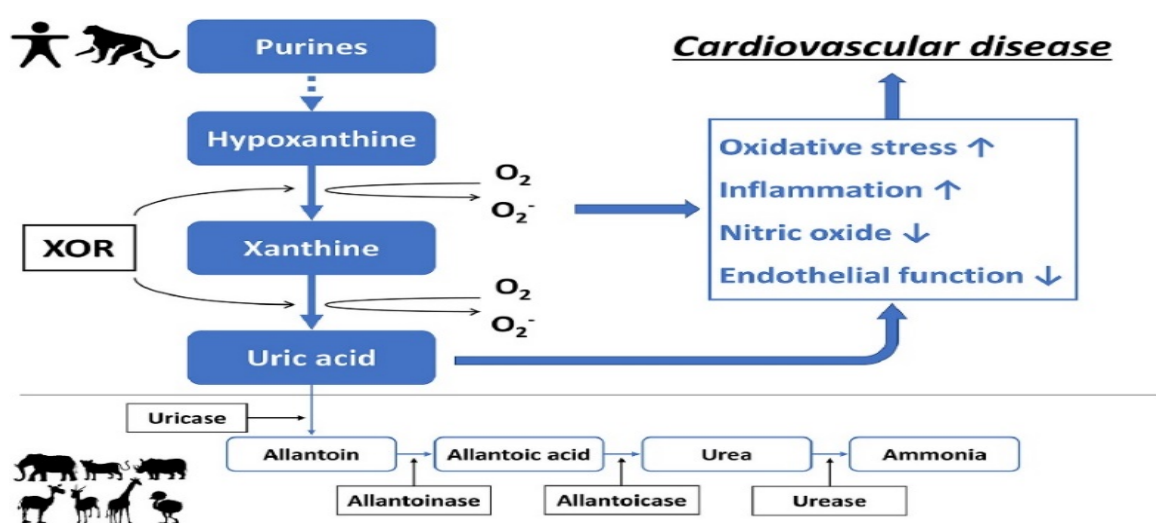


圖 1. 嘌呤代謝(Purine metabolism)和心血管疾病的潛在機制(Saito et al., 2020)。

換言之，內皮功能障礙是指體內平衡內皮衍生的血管舒張因子和血管收縮因子之間的不平衡所致。儘管存在許多混雜因素，但多項體內研究包括不同人群/不同內皮功能測試等試驗結果都表明血清尿酸升高與內皮功能障礙有顯著相關性(Prasad et al., 2017; Tanaka et al., 2018; Saito et al., 2019; Saito et al., 2020)。

SIRT1 是 sirtuin 蛋白家族的成員，介導多種生理作用。在哺乳動物中，SIRT1 可保護循環系統的功能，降低冠心病風險，並在動脈粥樣硬化發病機制中預防早期內皮功能障礙(Winnik et al., 2015)。SIRT1 經由活化內皮細胞中的內皮 NOS (endothelial NOS, eNOS) 產生並降低巨噬細胞中 NF- κ B 活性來避免產生動脈粥樣硬化作用(Stein et al., 2010)。SIRT1 還經由誘導星形膠質細胞和內皮細胞中的過氧化氫酶(catalase)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性來抑制 ROS(Cheng et al., 2014)。SIRT1 和 HO-1 也是已知 NO 生成和傷口修復調節劑(Wu et al., 2020)。

(4) 高尿酸血症生理學：尿酸的形成、代謝、尿酸鹽重吸收和排泄轉運蛋白

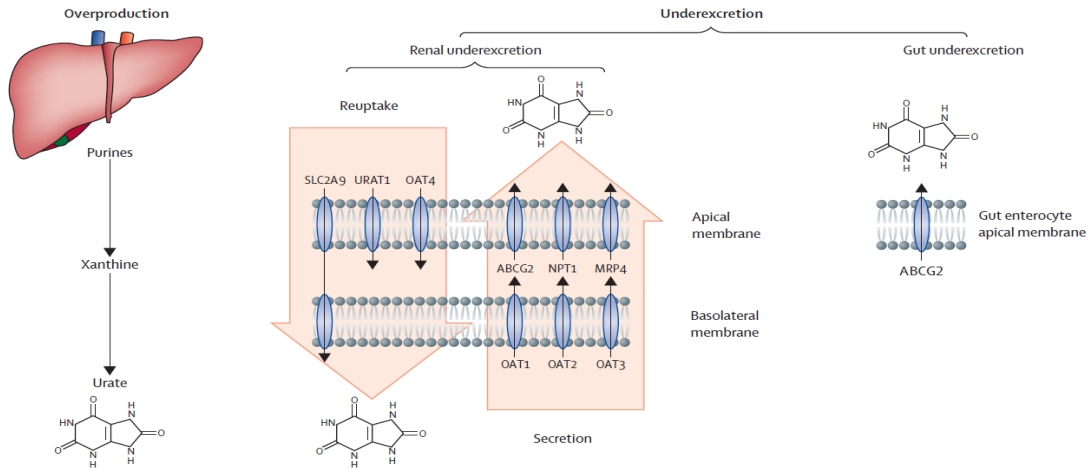


圖2.高尿酸血症的機轉 (Dalbeth et al., 2016)

嘌呤(Purine)在人體代謝最終產物是尿酸(Uric acid, UA)，體內嘌呤在肝臟代謝形成尿酸，最後由腎臟將尿酸隨尿液排出體外，如果體內產生過多尿酸或腎臟排泄尿酸不良，就會形成高尿酸血症 (Hyperuricemia, HUA) (圖2) (Dalbeth et al., 2016)。黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase, XO) 會分解嘌呤 (Hille, 2010)。黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD) 將次黃嘌呤(Hypoxanthine)分解為黃嘌呤(Hypoxanthine)再轉變為尿酸(Wan et al., 2019)。

不當飲食會影響尿酸代謝，例如果糖和植物性化合物 (如Methylxanthine, flavonoids) 會提高內源性尿酸合成速率，例如酒精代謝會增加NADH含量而刺激乳酸脫氫酶 (Lactate dehydrogenase, LDH)，並增加乳酸的合成；又如乳酸會活化尿酸鹽陰離子轉運蛋白1 (urate transporter 1, URAT1)載體，從而減少尿酸的排泄；以上各機制都會造成HUA(圖3) (Lima & Chaves, 2015)。

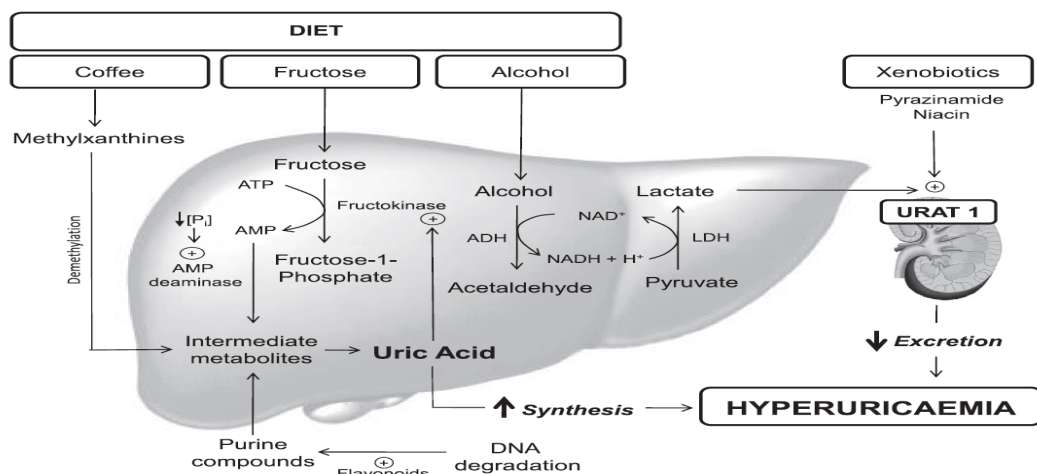


圖3.尿酸合成和排泄調節因子關係圖(Lima & Chaves, 2015)

尿酸鹽轉運蛋白的表達和功能變化與 HUA 有關。尿酸轉運蛋白分為兩類：尿酸鹽重吸收轉運蛋白，包括 URAT1，有機陰離子轉運蛋白 4 (Organic anion transporter 4, OAT4) 和葡萄糖轉運蛋白 9 (glucose transporter 9, GLUT9)，以及尿酸鹽排泄轉運蛋白，包括 OAT1、OAT3、尿酸轉運蛋白 (UAT)、多藥耐藥蛋白 4 (MRP4/ABCC4)、ABCG-2 和鈉依賴性磷酸轉運蛋白。在腎臟中，尿酸轉運蛋白降低尿酸鹽的重吸收並增加其分泌。研究尿酸轉運蛋白可為治療 HUA 相關疾病提供新的策略，如痛風，慢性腎病，高脂血症，高血壓，冠狀動脈心臟病，糖尿病和其他疾病(Xu *et al.*, 2017)。

HUA是痛風(Gout)發病的病因基礎。依據全球衛生數據交換註冊表 (GHDx) 和世界衛生組織 (WHO) 關於預測死亡率的數據庫顯示，過去25年中，痛風的發生率、患病率和健康損失顯著增加，男性均高於女性。痛風的負擔隨著年齡的增長而線性增加，直到 64 歲，而且與社會人口統計學指標 (Socio-Demographic Index, SDI) 相關，高SDI地區的痛風發生風險比低SDI地區高出3倍；預測 2060 年，痛風死亡率可能會增加55%。痛風的流行病學負擔在世界範圍內仍然很高，尤其是在男性和高 SDI 國家中，這種趨勢不太可能很快被扭轉 (Mattiuzzi and Lippi, 2020)。

尿酸/尿酸鹽沉積可能導致痛風、傷害內皮功能而升高慢性腎病、代謝紊亂及心血管疾病的發生風險。雖然急性痛風性關節炎的發作強度大但因頻率低且能自癒，患者疏於自覺使痛風病況起伏不定，惡化衍生疾病如腎病與提升洗腎機率等，加重國家、社會、家庭照護與經濟負擔。

(5) 高尿酸血症與代謝性疾病是彼此互相影響的風險因子

曾有學者報導尿酸(UA)可以獨立預測第 II 型糖尿病相關心血管疾病的發生(Zoppini *et al.*, 2009)。Chen等(2022)使用 2011 年和 2015 年中國健康與退休縱向研究 (CHARLS) 的兩波數據，評估尿酸與代謝症候群之間的雙向關聯；在一項為期四年的隨訪研究中，分別有 719 名和 625 名參與者被觀察到新罹患高尿酸血症(HUA)和代謝症候群，且評估發現一種疾病會增加另一種疾病的風險，無論男性還是女性，且收縮壓和三酸甘油酯 (triglycerides) 與 血清尿酸值(sUA)之間具有雙向影響關係(Chen *et al.*, 2022)。

Busnatu等(2022)報導高果糖攝入與血漿三酸甘油酯(TG)值升高及胰島素抵抗(IR)、糖尿病高尿酸血症和非酒精性脂肪肝疾病有關(Busnatu *et al.*, 2022)。Zhang等(2022)在天津慢性低級別全身性發炎與健康 (Tianjin Chronic Low-grade Systemic Inflammation and Health, TCLSIH) 系列研究中，對20,766名無高尿酸、癌症及心血管疾病的男性與女性進行飲食模式與高尿酸血症 (HUA)關聯性的研究中發現：富含果糖的甜味模式與高尿酸血症的發生率獨立相關(Zhang *et al.*, 2022b)。

Obermayr等(2008)報導血清尿酸值(HUA)升高是腎臟疾病的危險因子(Obermayr *et al.*, 2008)。Costa等(2022)報導HUA在慢性腎臟病 (CKD) 患者中很常見，他們在一項回顧性研究，包括 922 名未接受透析的 3、4 或 5 期 CKD 成年患者(大多是白人女性)，平均年齡為 64 ± 16 歲，發現分別有 70%患者出現繼發性甲狀腺功能亢進症(SHPT) 且 62.4% 患者出現 HUA；而SHPT患者的UA值更高 (7.2 ± 1.8 對 6.6 ± 1.7 mg/dL) 且HUA發生率更高 (66% 對 33%)；整體而言，HUA患者多為女性，eGFR較低，磷酸鹽較高，PTH較

高；而一般人群中，HUA與繼發性甲狀旁腺功能亢進症 (SHPT) 相關，其作用機制可能與維生素 D 代謝有關(Costa *et al.*, 2022)。

(6) 婦女隨著年齡增加，血清尿酸值(sUA)會隨之升高，並衍生各種疾病：

許多國家的公共衛生調查發現，血清尿酸(sUA)不僅與代謝性疾病有關，也與更年期有關(Wingrove *et al.*, 1998)。在日本、中國、韓國和菲律賓婦女的絕經前和絕經後婦女中都發現了相同的事實。

2008年，美國針對7,662名 20歲(含)以上女性健康和營養的第三次全國調查，研究更年期及其後，使用激素及與sUA之間的關係，發現絕經期與較高的sUA值具有獨立且含量相關(Hak and Choi, 2008)。2006-2008年在德國南部針對1,530名32-81歲女性進行的研究結果顯示，更年期狀態和較高的sUA值有關(Stöckl *et al.*, 2012)。2013年，日本調查749名年齡30-74歲女性的血管功能後發現，尿酸(UA)可作為女性族群血管內皮功能障礙的風險標誌物，尤其在絕經後女性更是獨立的危險因子(Marunashi *et al.*, 2013)。Liu等(2014)報導1,022名中國絕經後婦女(42-80歲)年度健康檢查也發現更年期症候群的臨床症狀表現強度與較高的sUA值呈現正相關且獨立相關(Liu *et al.*, 2014)。韓國釜山國立大學醫院健康促進中心在2010-2014統計分析2,241名就診婦女後，發現UA可作為絕經前和絕經後代謝症候群的預測因子(Joo *et al.*, 2014)。

(7) 高尿酸造成更年期婦女血管內皮發炎遽然升高心血管疾病發生風險：

Calvo 等(2014)在 1995-2007 年調查絕經後白人婦女和菲律賓女性冠狀動脈鈣化的嚴重程度和病程進展，發現尿酸(UA)是冠狀動脈鈣化嚴重程度的種族特異性標誌物，且認為絕經後婦女血清尿酸(sUA)值的增加可能是因為更年期導致的代謝變化，並且可能與這些婦女罹患冠心病風險的增加有關(Calvo *et al.*, 2014)。

雖然醫學上已知 UA 是絕經後婦女冠狀動脈疾病的危險因子，但機制尚不清楚。在一項針對 229 名絕經後婦女的前瞻性研究中，發現 sUA 值與絕經後婦女的冠狀動脈微血管內皮功能障礙有關，並且可能與發炎有關，同時確立了 sUA 值經由絕經後婦女血管內皮發炎與早期冠狀動脈粥樣硬化直接相關(Prasad *et al.*, 2017)。

Cho 等(2019)進一步指出更年期後婦女的高尿酸血症(HUA)罹患率逐漸上升，這種關聯性可能與年齡和其他混雜因子的關聯性不高，顯示 HUA 本身是停經的獨立危險因子(Cho *et al.*, 2019)。在亞洲包括日本、中國、韓國和菲律賓婦女的停經後前後婦女相關調查中也發現類似結果(Marunashi *et al.*, 2013；Liu *et al.*, 2014；Joo *et al.*, 2014)。

Sunni 等(2013)報導婦女體內雌二醇、孕激素或濾泡刺激素與 sUA 值有負相關現象，更年期過後婦女，隨著卵巢功能的下降，各種激素的分泌也會下降，會導致 UA 重吸收增加，使 UA 過量而出現沉積(Mumford *et al.*, 2013)。但是，Simon 等(2006)探討 2,763 名參加心臟和雌激素-孕激素替代療法研究(HERS)的絕經後婦女，在平均隨訪 4.1 年期間的非致死性心肌梗塞死亡或 CHD 死亡，他們遺憾地發現使用雌激素-孕激素治療只能略微降低 sUA 值(Simon *et al.*, 2006)。顯然，更年期婦女無法以服用雌激素等荷爾蒙來降低 sUA 值而緩解冠狀血管內皮發炎所致 CVD，開發其他抗發炎藥物(適用於尿酸-冠狀血管內皮發炎)顯示出重要性。

(8) 血管內皮發炎所致心血管疾病，不僅存在於女性：

Saenz-Medina等(2022)報導內皮功能障礙是CVD的早期致病事件，並且與高血壓、冠心病、中風或糖尿病和肥胖的血管併發症中的氧化壓力和低慢性發炎有關；在HUA實驗模型中發現內皮功能障礙血清標誌物的升高，在結石患者尿液分析中也檢測到與心血管疾病相關蛋白質的表達較高，同時發現腎結石患者的心血管疾病發病率較高，相對風險估計在1.20 和 1.24 之間，血管疾病風險評分也較高，但在亞組的分析中沒有在性別或年齡方面得到確切且一致的結果，可確定是內皮功能障礙也與尿石症密切相關，但有關內皮功能障礙、發炎或氧化壓力的全身性血清標誌物仍待進一步試驗/確認(Saenz-Medina *et al.*, 2022)。

(9) 不同年齡及不同性別對高尿酸血症(HUA)的反應不同

就基因遺傳分析上，高尿酸對男性罹患冠心病 (coronary heart disease, CHD) 及心肌梗塞 (myocardial infarction, MI)影響較大，降低尿酸值對男性避免CHD及MI的健康促進是有益處。Yang等(2022)針對全球最大血清尿酸鹽全基因組關聯研究 (457,690人)，利用孟德爾隨機法(Mendelian randomization method) 研究與尿酸值、冠心病、心肌梗塞的相關性；利用基因預測結果發現血清尿酸值(sUA)與冠心病和心肌梗塞致死的風險相關，但沒有發現 CHD/MI 對sUA值有反向因果關係的證據，且降低 sUA 值的治療可能對預防 CHD及MI 在心血管的健康促進上有益，尤其是對男性而言(Yang *et al.*, 2022)。

基因遺傳上的分析是HUA對男性罹患冠心病及心肌梗塞影響較大，但女性進入更年期後，受 HUA 的影響更大，顯然，不同性別在不同年齡對 sUA 的反應不同，顯然需要進一步的探討與研究。

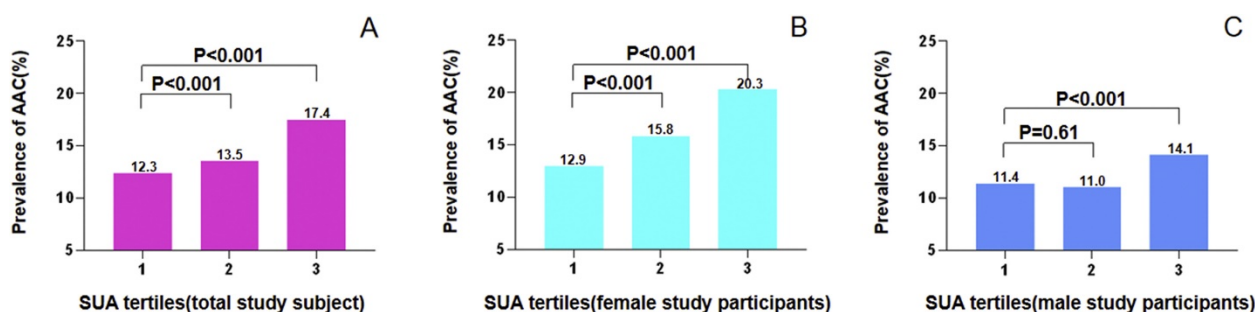


圖 4. 根據血清尿酸值(sUA)在(A)總體受試者、(B)女性、和(C)男性中 AAC 罹患率。更年期婦女隨著年齡增加，血清尿酸值會隨之升高並影響血管內皮功能(Yan *et al.*, 2020)

主動脈弓鈣化 (Aortic arch calcification, AAC) 反映了亞臨床冠狀動脈粥樣硬化 (subclinical coronary atherosclerosis)，並與隨後的心血管發病率和死亡率風險密切相關。Yan等(2020)為更了解 sUA 在動脈硬化(arteriosclerosis)和 CVD 中的作用，並確認 sUA 與 AAC 之間的關聯，在一項針對中老年族群有關 sUA 與主動脈弓鈣化獨立相關研究中，納入 5,920 名年齡大於 45 歲且沒有 CVD 病歷的受試者進行分析；如圖4所示，在所有 5,920 名受試者中，851名 (14.4%) 參與者檢測到 AAC。所有參與者在 sUA 三分位數中發現 AAC 比例呈上升趨勢 (圖5A)；鑑於男性受試者 sUA 值高於女性，因此男性和女性分別進行分析；在女性組中發現 AAC 罹患率隨 sUA 三分位數增加的趨勢 (圖5B)，然而，男性組的趨勢沒有明顯差異或不典型 (圖5C)；得到的結論是 sUA 與中老年人群的

AAC 獨立相關，尤其是在女性族群更明顯相關(Yan *et al.*, 2020)。Yan等(2020)甚至推論與男性相比，sUA 可能是女性 CVD 的一個更強的指標(Yan *et al.*, 2020)，其他學者也支持這個論點(Fang, 2000; Lin *et al.*, 2013; Kawabe *et al.*, 2016)。

曾有學者認為在更年期前，女性的 sUA值 通常低於男性，這可能是由於雌激素的作用。雌激素狀態是 CVD 女性預後的標誌，尤其是絕經後女性(Morise, 2006)。然而，與患有亞臨床冠狀動脈粥樣硬化和隨後的 CVD 的男性相比，血清尿酸值(sUA) 對女性癒後的預測價值更高(Yan *et al.*, 2020)。

(10) 高尿酸血症(HUA)與心血管疾病(CVD)的生物標誌物：

Maulana等(2022)針對「老年人群冠心病尿酸值預後生物標誌物」主題，在 PubMed、CINAHL 和 ScienceDirect 資料庫中進行廣泛搜索，在 592 項研究中，大多數證據表明高尿酸(尤其是痛風)與老年人群冠心病癒後不良存在獨立相關性，尿酸值已被確定為冠心病預後不良的潛在生物標誌物。並建議醫護人員應先學習如何控制尿酸不良及對冠心病癒後的影響(Maulana *et al.*, 2022)

Wang等(2022)觀察 289 名 A 型主動脈狹窄 (Acute Type a Aortic Dissection, AAD) 患者，以術後一年是否死亡為指標，評估 A 型 AAD 患者長期死亡的獨立危險因子，分析結果顯示，年齡、高血壓、白蛋白含量、尿酸-白蛋白比率(uric acid-to-albumin ratio, UAR) 和 D-二聚體含量都可能是死亡的獨立危險因子，其中 UAR 被視為長期死亡率的一個新的獨立危險因素。UAR、年齡和 D-二聚體含量的組合是死亡的最佳預測指標(Wang *et al.*, 2022)。

急性冠狀動脈症候群 (ACS) 基本上被定義為送達心肌組織的氧氣量減少，稱為“缺血”。心肌梗塞就是一個危險疾病。Yucel(2022)報導早期發現冠狀動脈缺血至關重要。心臟生物標誌物(Cardiac biomarkers)是心臟組織損傷後釋放到循環中的內源性物質，它們在 ACS 患者的診斷、管理和風險分層中扮演種重要角色。1960年代開始應用心臟生物標誌物包括天冬氨酸氨基轉移酶(aspartate aminotransferase)、乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase)及肌紅蛋白(myoglobin)；1980年代使用的肌酸磷化酶(Creatine Kinase-MB, CK-MB mass)是一種心臟特異性同工酶 (CK-MB)，也是近10年來診斷 ACS的首選生物標誌物，但缺點是檢測結果的偽陽性太高；1990年代，在急性胸痛發作後 6-12 小時取樣一種心臟特異性分子「心肌肌鈣蛋白(cardiac troponins)」，檢測肌鈣蛋白 T (troponin T) 和 I (troponin I) 的靈敏度接近 100%。今天，高靈敏度肌鈣蛋白以其高心臟特異性和高檢測靈敏度被公認為心臟標誌物的黃金標準。另外，對髓過氧化物酶(myeloperoxidase)和心臟型脂肪酸結合蛋白(heart-type fatty acid-binding protein)等新biomarkers的開發和驗證不斷被研究與推出，臨床診斷工具將會日臻完善(Yucel, 2022)。

當供應心臟的主要血管受損時，就會發生冠心病。冠心病不是急性事件，血流量減少可能導致胸痛(心絞痛)、呼吸急促或各種不同CAD症狀，當血流完全阻塞時會發生心臟病；因此，癒後生物標誌物和患者冠心病發展候選者的隨訪更為重要，此時高敏感度 C 反應蛋白(C-reactive protein)和同型半胱氨酸(homocysteine)就是最佳biomarker(Yucel, 2022)。

2. 現有臨床治療藥物改善CAD情況：

Lin 等(2017)對臺灣 8,047 位痛風患者，其中 1,422 名患者在隨訪期間服用 allopurinol (A 組)、4,141 位患者服用 benzbromarone (B 組)及 2,484 位患者併服二種藥物 (A/B 組)；實驗結果顯示降尿酸藥物(Allopurinol, benzbromarone) 無論是單獨使用還是聯合使用，在確定的每日劑量數和 CAD 風險之間具有劑量-反應的線性關係，亦即對降低痛風患者罹患冠心病(CAD)的風險有意義(Lin *et al.*, 2017)。

3 誘導藥及其疾病模型：

與健康小鼠相比，氧酸鉀鹽(Potassium oxonate) 在腹腔注射 (250 mg/kg, ip) 兩週後，可顯著增加血清尿酸值、黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO)及肝黃嘌呤脫氫酶 (hepatic xanthine dehydrogenase, XDH) 活性和肝臟脂質過氧化物 (hepatic lipid peroxidation) (約 2 倍) (Dolati *et al.*, 2018)。

4. 實驗動物年齡之選擇：(雌雄各半)

實驗動物與人類年齡的對比，大多採相對比較值。以 C57BL/6J 小鼠為例，小鼠在 35 天開始性成熟，但實際成熟應從 3 個月開始，一直到 6 個月止，此期間屬於穩定發育至尚未受到衰老影響的年齡(約為人類 20-30 歲；圖 5)。

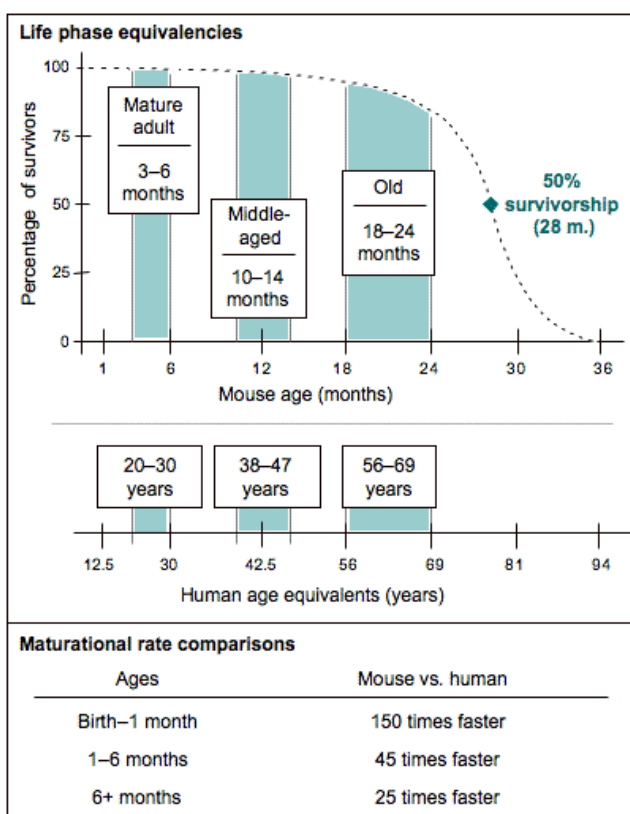


圖 5. C57BL/6J 小鼠成熟生活史階段的代表性年齡範圍且與人類對比(Flurkey *et al.*, 2007)。

超過 6 月齡小鼠開始進入中年，小鼠可能出現與年齡相關的變化(如雌性小鼠在 8 個月後產仔數降低而逐漸停止繁殖)並被可檢出某些特定衰老生物標誌物；小鼠在 10 月齡時處於穩定中年時期(約為人類 38 歲)，此時期檢測到年輕成人開始衰老過程的生物標誌物，例如活化型/記憶型 T 細胞的積累 (accumulation of activated/memory T cells)，中年組的年齡上限通常是 14 個月(約為人類 47 歲)；惟須注意若研究衰老生物標誌物的出現時機，常將中年鼠被納入衰老研究中進行比較分析。

進入 18 月齡小鼠屬於老齡鼠(約為人類 56 歲)，意謂著此時期可檢測到幾乎所有衰老時期的生物標誌物變化；老年時期的上限應該是 24 月齡(對比人類約 69 歲) (Flurkey *et al.*, 2007)。

肆、研究方法

1. 實驗設計：

(1) 實驗動物：

ICR 小鼠 (22-25g；雄性、雌性) 購自樂斯科生物科技(股)公司。小鼠飼養在大葉大學動物房，不同性別動物分籠飼養且分開在不同空間飼養，環境溫度 20-26°C、相對濕度 50±10%且 12 小時光/暗週期循環下，動物可以自由取食及飲水。小鼠經馴化一週後，相同性別之實驗動物各自隨機分組。

本實驗規劃方案已獲得本校及大葉大學實驗動物使用與照護委員會(IACUC) 審查同意書 (本校編號 111MKCAUP00001 及大葉大學編號 111009)；所有實驗動物的使用與護理均依行政院農委會 107 年 6 月 22 日發布「實驗動物照護及使用指引」之規定並遵「動物實驗倫理 3R 原則」。

(2) 實驗分組：

參酌Zhang等(2017)方法，本試驗使用2月齡及5月齡ICR小鼠，試驗組別分為空白對照組、誘導對照組、治療對照組、試驗組，共七個測試組。

實驗動物之使用數量為 7組 × 10隻/組 × 2 種不同月齡 (2月齡及5月齡) × 2 個性別 (雌、雄)，其中雄性小鼠140隻及雌性小鼠140隻(Zhang *et al.*, 2017)誘導及投藥一個月後 (即為3月齡及6月齡) 犧牲，後續進行檢測分析。

2. 實驗方法：

空白組不誘導，僅投予vehicle；誘導組(Potassium oxonate 300 mg/kg；腹腔注射)包括誘導對照組、治療對照組及試驗組，其中誘導對照組(不投藥，僅口服投予生理食鹽水)、治療對照組(Allopurinol 40 mg/kg/day；口服投予)、試驗組(Leonurine 15, 30, 60mg/kg 及 *Leonurus japonicus* ethanol extract 300mg/kg；口服投予)，誘導前一個小時先投藥(治療對照組及試驗組)，投藥期間為 4 週。

動物犧牲後，採集血液、心臟、冠狀動脈、主動脈、肝臟及腎臟等檢體。血液檢體在室溫下凝固後離心 (4°C, 3,000 rpm, 10 mins)，取得血清後儲存於-20°C冰箱，備測。

器官組織檢體除了準備進行病理組織學檢查外，取組織 (肝臟及腎臟) 檢體，分別稱重，置於均質機中，加入 2 倍量(ml/g) 0.9% normal saline 均質後離心 (4°C, 8,000 rpm, 10 mins)，取上清液，預備進行肝臟及腎臟相關檢測項目。

3. 儀器、試劑藥品及抗體：

(1) 儀器：

ELISA reader (BioTek Instruments Ins., USA)、西方墨點法設備 (Bio-Rad, USA)、RT-PCR (QIAGEN, Germany)。其餘儀器設備需向共同實驗室申請借用。

(2) 試劑藥品及抗體：

A. 誘導用藥：

氧酸鉀鹽(Potassium oxonate, Oxonic acid potassium salt)：(≥98%；SML0670，CAS Number 24697-74-3，Sigma-Aldrich Inc, USA)；使用前，依廠商說明書溶解及配製。

B. 治療對照藥：

Allopurinol 40mg/kg (APL), Sigma-Aldrich Inc, USA。

C. 試驗組：Leonurine, Sigma-Aldrich Inc, USA。

LEL: Leonurine 15mg/kg

LEM: Leonurine 30mg/kg

LEH: Leonurine 60mg/kg

LJE: *Leonurus japonicus* ethanol extract 300mg/kg

Leonurus japonicus ethanol extract 製備法：益母草藥材(購自康麗生計有限公司，404 台中市北區健行路 397 號)，並依臺灣中藥典(IV)記載藥材特徵及顯微組織鑑定法鑑別確定其基原為 *Leonurus japonicus*。藥材經破碎為約 2 cm 長度後，以清水掠洗瀝乾經乾燥後，秤取 3 kg 經 95% ethanol 萃取及 50-60°C 濃縮成乾浸膏(含水量低於 5%)後裝瓶備用。

C. 麻醉用藥：

Zoletil (舒泰)：VIRBAC 維克藥廠(法國)，由台灣維克法蘭斯股份有限公司代理(動物藥入字第 05393 號)。

D. 檢測試劑：

RNA Keeper：PROTECH (RT-R485)，波仕特股份有限公司。

E. 檢測抗體：

- Serum/Liver Detection: Uric acid, Xanthine Oxidase (XO)

- PCR：IL-6, IL-1 β , NF κ B, CRP。

F. 其他試劑：

均為分析純的標準實驗室試劑，並盡量購買原廠試劑。

4. 檢測細目、方法及其研究意義：

A. Serum Biochemical Indexes Detection：

(A) 尿酸分析 Uric acid Array：

使用套裝檢驗試劑分析 (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK)。取血清加入反應試劑並混合均勻，於37°C下反應 5 分鐘，使用分光光度計於520 nm 檢測quinoneimine 之吸光值 (Fossati *et al.*, 1982)。

(B) Serum Xanthine Oxidase (XO) Array：

使用套裝檢驗試劑分析，取血清加入Xanthine Oxidase Assay 試劑並混合均勻，於25°C下反應，以570nm 每5分鐘檢測一次，直到檢測數值最大為止， $DA570 = (A570)_{final} - (A570)_{initial}$ (SIGMA ALDRICH, MAK078)。

B. Liver Biochemical Indexes Detection：

Liver Xanthine Oxidase Assay：

使用套裝檢驗試劑進行分析，取肝臟均質液加入Xanthine Oxidase Array 試劑並混合均勻，於25°C下反應，以570nm 每5分鐘檢測一次，直到檢測數值最大為止， $DA570 = (A570)_{final} - (A570)_{initial}$ (SIGMA ALDRICH, MAK078)。

C. RNA分離和Real-time PCR即時PCR分析：

提取肝臟/腎臟以使用 Trizol 試劑製備總 RNA，然後合成 cDNA。使用 Superscript III First Strand (Invitrogen, USA) 對分離的 10 µg 總 RNA 進行逆轉錄-PCR。然後利用 RT-PCR 擴增 20-50ng cDNA。使用的引子如下(Qin *et al.*, 2018)：

Primer name	Sequence (5' → 3')
IL-6-F	TGGAATGAGAAAAGAGTTGTGC
IL-6-R	CTCTGAAGGACTCTGGCTTTG
NF-kB-F1	TGGAACAGCCCAAACAGC
NF-kB-R1	CACCTGGCAAACCTCCAT
CRP-F(mouse)	CCAGGACTCCTTGTCCTTGA
CRP-R(mouse)	CAGTGGCTTCTTTGACTCTGC
IL-1beta-F(mouse)	GCTTCAGGCAGGCAGTATCA
IL-1beta-R(mouse)	TGCAGTTGTCTAATGGGAACG

D. 組織病理學檢查(Histological Analysis)：

取小鼠心臟、冠狀動脈、主動脈、肝、腎及其他出現病變須檢視之器官組織。將組織檢體放在10%福馬林溶液中固定24小時以上，再包埋於石蠟中，切製成 4 µm 的組織切片。此組織切片以蘇木精和伊紅 (Haematoxylin and eosin stain, H&E) 進行染色，利用顯微鏡檢查組織病理學上的變化。心臟、冠狀動脈及主動脈主要觀察內皮損傷或病變；腎臟主要觀察腎臟尿酸性損傷，肝臟主要觀察發炎所致細胞浸潤。

5. 統計分析：

本試驗之結果數據以 One-way ANOVA 分析變異數，再利用 Scheffer's multiple range test 檢定組間之顯著性，若 p value 小於 0.05 則表示具統計意義。

伍、結果與討論（含結論與建議）

高尿酸血症(HUA) 是指個體血液中尿酸含量持續較高（超過7.0 mg/dl）的病症，雖然HUA不是一種疾病，但它會導致一系列危險情況，包括尿酸血症、痛風、冠心病和慢性腎病（*Bao et al., 2022*）。血液尿酸（SUA）與尿液尿酸（UUA）有直接相關，這種情況通常歸咎於過量的飲食嘌呤，如腺嘌呤（*A.J. et al., 1976*）及排泄不足有關（*Boss and Seegmiller, 1979*），使SUA和UUA排泄產生失衡狀態。腎臟從體內清除可溶性廢物，尿素本身沒有毒性，但在腎臟功能不佳的情況下，其缺陷會增加血液和尿素以外氮化合物的濃度，而且還會提高尿酸和肌酐，這些廢物的積累是造成疾病的原因（*Dhouibi et al., 2021*）。

實驗結果顯示，由腹腔注射尿酸鉀鹽（potassium oxonate）誘導小鼠產生高尿酸血症，在體重與器官重量（心臟、肝臟及腎臟）係數比較如表1~3所示，3月齡及6月齡的公、母鼠空白對照組(Sham)與誘導組(CTL)有顯著的差異($p < 0.05$, $P < 0.01$)，其中ALP、LEM及LEH與CTL組有顯著差異($p < 0.05$, $P < 0.01$)，其他組分別亦有差異，顯示高尿酸血症會產生發炎而增加心臟、肝臟及腎臟的重量。

對於血液中尿酸的影響如圖6~7所示，在3月齡及6月齡的公、母鼠中空白對照組(Sham)與誘導組(CTL)有顯著的差異($p < 0.01$, $P < 0.001$)，ALP組與誘導組(CTL)相比，也有顯著的差異($p < 0.01$, $P < 0.001$)。3月齡及6月齡的公、母鼠中，LEH 組與誘導組(CTL)比較，也有顯著的差異($p < 0.05$)。但相較其他各組間，則未有差異。

對於肝臟中XOD的影響如圖8~9所示，在3月齡及6月齡的公、母鼠中空白對照組(Sham)與誘導組(CTL)有顯著的差異($p < 0.01$)。ALP組與誘導組(CTL)相比，也有顯著的差異($P < 0.01$)。ALP組與誘導組(CTL)比較，也有顯著的差異($p < 0.05$, $P < 0.01$)。3月齡及6月齡的公、母鼠中，LEH 組與誘導組(CTL)比較，也有顯著的差異($p < 0.05$)。但相較其他各組間，則未有差異。對於mRNA中如表4~6所示，血管中IL-1 β , IL-6及CRP mRNA的表現，結果顯示各組無顯著差異。

在組織病理學檢查未發現血管有組織異常現象；心臟切片中有出現1-2隻個體異常，多數小鼠未發現有發炎等症狀；腎臟組織切片，在3月齡及6月齡的公、母鼠中空白對照組(Sham)與誘導組(CTL)有顯著的差異($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)，切片發現組織有變性壞死，纖維化及發炎等現象。在肝臟組織切片，3月齡公鼠及母鼠於各組間無顯著差異，但在6月齡的公鼠中發現有組織增生、發炎等現象，6月齡的母鼠中也發現有組織增生的異常現象，如表7~10及圖10~17所示。

益母草鹼（60 mg/kg，口服）有效降低血清中UA的濃度與肝臟中XOD的含量，在血管中mRNA及組織切片中未發現異常症狀，腎臟及肝臟的組織切片中觀查，Sham組的細胞為正常狀態（未受損），但誘導各組中的則產生嚴重程度不一的慢性發炎，其中包括腎小管壞死、擴張和間質纖維化。

雖然從血液及肝臟組織中發現益母草鹼（60 mg/kg）有效降低誘發數值（UA, XOD），但在切片中未觀查到血管內皮有發炎現象，可能原因為誘導劑量或時間對內皮

細胞慢性發炎尚未影響有關。結果表明，益母草鹼可促進UA經腎臟和腸道排泄，減少肝臟嘌呤合成，進一步維持UA穩定；本實驗雖未發現對心血管內皮產生發炎等疾病，但不能排除其可能的潛力。

高尿酸血症是心血管疾病中血管內皮發炎的重要影響因子，因此，後續摸索、評估與建立實驗動物高尿酸血症併發心血管內皮發炎模型是應繼續努力的工作。

陸、參考文獻

- A.J. Clifford, D.L. Story. Levels of Purines in Foods and Their Metabolic Effects in Rats. *J. Nutr.* 1976, 106(3):435–442.
- Abeles A.M. Hyperuricemia, gout, and cardiovascular disease: an update. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2015. 17: 13.
- Bao R, Chen Q, Li Z, *et al.* Eurycomanol alleviates hyperuricemia by promoting uric acid excretion and reducing purine synthesis. 2022. 2022 (96) 153850.
- Bos MJ, Koudstaal PJ, Hofman A, *et al.* Uric acid is a risk factor for myocardial
- Boss, J. Seegmiller. Hyperuricemia and gout. Classification, complications and management. *N. Engl. J. Med.*, 1979. 300 (1979): 1459-146.
- Busnatu SS, Salmen T, Pana MA, *et al.* The Role of Fructose as a Cardiovascular Risk Factor: An Update. *Metabolites*, 2022. 12(1) 67-75.
- Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*, 2005. 68(1): 26–36.
- Calvo RY, Araneta MR, Kritz-Silverstein D, *et al.* Relation of serum uric acid to everity and progression of coronary artery calcium in postmenopausal White and Filipino women (from the Rancho Bernardo study). *American Journal of Cardiology*, 2014. 113: 1153–1158.
- Chang HY, Fang HL, Huang CY, *et al.* Developing and Validating Risk Scores for Predicting Major Cardiovascular Events Using Population Surveys Linked with Electronic Health Insurance Records. *Int J Environ Res Public Health*, 2022. 19(3) 1319-1330.
- Chen JH, Chuang SY, Chen HJ, *et al.* Serum uric acid level as an independent risk factor for all-cause, cardiovascular, and ischemic stroke mortality: A Chinese cohort study. *Arthritis Rheumatol*, 2009. 61: 225–232.
- Chen WY, Fu YP, Zhou M. The bidirectional relationship between metabolic syndrome and hyperuricemia in China: A longitudinal study from CHARLS. *Endocrine*, 2022.
- Cheng Y, Takeuchi H, Sonobe Y, *et al.* Sirtuin 1 attenuates oxidative stress via upregulation of superoxide dismutase 2 and catalase in astrocytes. *J Neuroimmunol*, 2014. 269 (1–2): 38–43.
- Cho SK, Winkler CA, Lee SJ, *et al.* The Prevalence of Hyperuricemia Sharply Increases from the Late Menopausal Transition Stage in Middle-Aged Women. *Journal of Clinical Medicine*, 2019. 8(3): 296-307.
- Costa TEM, Lauar JC, Innechi MR, *et al.* Hyperuricemia is associated with secondary hyperparathyroidism in patients with chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol*, 2022.
- Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, *et al.* Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: The Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*, 1999. 131: 7–13.
- Dalbeth N, Merriman TR, Stamp LK. Gout. *Lancet*, 2016. 388: 2039–2052.
- Dhouibi R, Affes H, Salem MB, Moalla D, Marekchi R, Charfi S, Hammami S, Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal KM, Ksouda K. Creation of an adequate animal model of hyperuricemia (acute and chronic hyperuricemia); study of its reversibility and its maintenance. *Life Sciences*, 2021. 268: 118998.
- Dolati K, Rakhshandeh H, Golestani M, *et al.* Inhibitory Effects of *Apium graveolens* on Xanthine Oxidase Activity and Serum Uric Acid Levels in Hyperuricemic Mice. *Prev Nutr Food Sci.* 2018. 23(2): 127-133.
- El-Din UAAS, Salem MM, Abdulazim DO. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: a review. *J Adv Res*, 2017. 8:537–548.
- Erbel R, Lehmann N, Churzidse S, *et al.* Progression of coronary artery calcification seems to be inevitable, but predictable e results of the Heinz Nixdorf Recall (HNR) study. *Eur Heart J*, 2014. 35(42):2960-2971.
- Fang MH. Serum uric acid and cardiovascular mortality the NHANES I epidemiologic follow-up

- study, 1971-1992. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Med Assoc*, 2000. 283(18): 2404-2410.
- Feig D.I. Serum uric acid and the risk of hypertension and chronic kidney disease. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2014. 26: 176–185.
- Flurkey K, Curren JM, Harrison DE. The Mouse in Aging Research. Figure 20-3. *Adapted from Figure 20-3: Fox JG, et al. The Mouse in Biomedical Research 2nd Edition. American College Laboratory Animal Medicine (Elsevier), Burlington, MA. 2007. pp.637-672.*
<https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker#>
- Gagliardi AC, Miname MH, Santos RD. Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 2009. 202: 11–17.
- Hak AE and Choi HK. Menopause, postmenopausal hormone use and serum uric acid levels in US women – The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Research & Therapy*, 2008. 10(5): R116-123.
- Hall A.P., Barry P.E., Dawber T.R., McNamara P.M. Epidemiology of gout and hyperuricemia. A long-term population study. *Am. J. Med.* 1967. 42: 27–37.
- Han L, Chen A, Liu L, *et al.* Leonurine Preconditioning Attenuates Ischemic Acute Kidney Injury in Rats by Promoting Nrf2 Nuclear Translocation and Suppressing TLR4/NF- κ B Pathway. *Chem Pharm Bull*, 2022. 70(1): 66–73.
- Hille R. ChemInform abstract: The mononuclear molybdenum enzymes. *ChemInform*, 2010. 28 (10): 2757-2816.
- Huang Lu, Xu DQ, Chen YY, *et al.* Leonurine, a potential drug for the treatment of cardiovascular system and central nervous system diseases. *Brain and Behavior*, 2021. 11: e01995.
- infarction and stroke: The Rotterdam study. *Stroke*, 2006. 37: 1503–1507.
- Joo JK, Hong GP, Han SE, *et al.* The Association between Serum Uric Acid Level and Incidence of Metabolic Syndrome according to Menopausal Status in Korean Women. *Journal of Menopausal Medicine*, 2014. 20: 126-132.
- Kawabe M, Sato A, *et al.* Gender differences in the association between serum uric acid and prognosis in patients with acute coronary syndrome. *J Cardiol*, 2016. 67(2): 170-176.
- Kim K, Kang K, Sheol H, *et al.* The Association between Serum Uric Acid Levels and 10-Year Cardiovascular Disease Risk in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Int J Environ Res Public Health*, 2022. 19(3) 1042-1054.
- Kiramijyan S, Ahmadi N, Isma'eel H, *et al.* Impact of coronary artery calcium progression and statin therapy on clinical outcome in subjects with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, 2013. 111(3):356-361.
- Kuo CF, Grainge MJ, Zhang W, *et al.* Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol*, 2015. 11: 649–662.
- Li YY, Lin YK, Liu XH, *et al.* Leonurine: From Gynecologic Medicine to Pleiotropic Agent. *Chin J Integr Med*, 2020. 26(2):152-160.
- Lima W and Chaves VE. Uric acid as a modulator of glucose and lipid metabolism. *Biochimie*, 2015. 116: 17-23.
- Lin GM, Li YH, Lin CL, *et al.* Gender differences in the impact of diabetes on mortality in patients with established coronary artery disease: a report from the eastern Taiwan integrated health care delivery system of coronary heart disease (ET-CHD) registry, 1997-2006. *J Cardiol*, 2013. 61(6): 393-398.
- Lin HC, Daimon M, Wang CH, *et al.* Allopurinol, benzbromarone and risk of coronary heart disease in gout patients: A population-based study. *Int J Cardiol*, 2017. 233: 85-90.
- Liu PJ, Ma F, Lou HP, *et al.* Relationship Between Serum Uric Acid Levels and Metabolic Syndrome in Chinese Postmenopausal Women. *Climacteric*, 2014. 17(2): 148-154.
- Liu XH, Pan LL, Zhu YZ. Active chemical compounds of traditional Chinese medicine Herba

- Leonuri: Implications for cardiovascular diseases. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2012. 39: 274-282.
- Mao F, Zhang L, Cai MH, *et al.* Leonurine hydrochloride induces apoptosis of H292 lung cancer cell by a mitochondria-dependent pathway. *Pharmaceutical Biology*, 2015. 53: 1684-1690.
- Maruhashi T, Hisatome I, Kihara Y, *et al.* Hyperuricemia and endothelial function: from molecular background to clinical perspectives. *Atherosclerosis*, 2018. 278: 226–231.
- Maruhashi T, Nakashima A, Soga J, *et al.* Hyperuricemia is independently associated with endothelial dysfunction in postmenopausal women but not in premenopausal women. *BMJ Open*, 2013. 3 (11) e003659.
- Mattiuzzi C and Lippi G. Recent updates on worldwide gout epidemiology. *Clinical Rheumatology*, 2020. 39: 1061–1063.
- Maulana S, Nuraeni A, Nugraha BA. The Potential of Prognostic Biomarkers of Uric Acid Levels in Coronary Heart Disease Among Aged Population: A Scoping Systematic Review of the Latest Cohort Evidence. *J Multidiscip Healthc*, 2022. 15: 161–173.
- Morise AP. Assessment of estrogen status as a marker of prognosis in women with symptoms of suspected coronary artery disease presenting for stress testing. *Am J Cardiol*, 2006. 97(3):367-371.
- Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. 42(2): 271–279.
- Mumford SL, Dasharathy SS, Pollack AZ, *et al.* Serum uric acid in relation to endogenous reproductive hormones during the menstrual cycle: findings from the BioCycle study. *Hum Reprod*, 2013. 28(7): 1853-1862.
- Obermayr RP, Temml C, Gutjahr G, *et al.* Elevated uric acid increases the risk for kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2008. 19: 2407–2413.
- Okwuosa TM, Greenland P, Burke GL, *et al.* Prediction of coronary artery calcium progression in individuals with low Framingham risk score: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2012. 5(2): 144-153.
- Papežíková I, Pekarová M, Kolářová H, *et al.* Uric acid modulates vascular endothelial function through the down regulation of nitric oxide production. *Free Radic Res*, 2013. 47(2): 82-88.
- Prasad M, Matteson EL, Herrmann J, *et al.* Uric acid is associated with inflammation, coronary microvascular dysfunction, and adverse outcomes in postmenopausal women. *Hypertension*, 2017. 69: 236–242.
- Puig J.G., Martínez M.A. Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2008. 20: 187–191.
- Qin ZZ, Wang SB, Lin YH, Zhao Y, Yang SQ, Song JK, Xie T, Tian JL, Wu S, and Du GH. Antihyperuricemic effect of mangiferin aglycon derivative J99745 by inhibiting xanthine oxidase activity and urate transporter 1 expression in mice. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018. 8(2): 306-315.
- Quercioli A, Montecucco F, Pataky Z, *et al.* Improvement in coronary circulatory function in morbidly obese individuals after gastric bypass-induced weight loss: relation to alterations in endocannabinoids and adipocytokines. *Eur Heart J*, 2013. 34(27): 2063-2073.
- Roddy E., Choi H.K. Epidemiology of gout. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2014. 40: 155–175.
- Saenz-Medina J, Muñoz M, Rodriguez C, *et al.* Endothelial Dysfunction: An Intermediate Clinical Feature between Urolithiasis and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*, 2022. 23(2): 912-931.
- Saito Y, Kitahara H, Nakayama T, *et al.*, Relation of elevated serum uric acid level to endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndrome. *J Atheroscler Thromb*, 2019. 26: 362–367.
- Saito Y, Tanaka A, Node K, *et al.* Uric acid and cardiovascular disease: A clinical review. *Journal of Cardiology*, 2020. 5: 23-30.

- Shahi MA, Namayandeh SM, Midbody ME, *et al.* 10 -Years Coronary Artery Disease Incidence and its Predictors in Overweight and Obese Adults Using A Competing Risk Model: A Longitudinal Study of Yazd Healthy Heart Cohort (YHHC). 2022. 2022: 1-23.
- Simon JA, Lin F, Vittinghoff E, *et al.* Heart and Estrogen-Progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Annals of Epidemiology*, 2006. 16(2):138-145.
- Song XJ, Wang TC, Zhang ZC, *et al.* Leonurine exerts anti-inflammatory effect by regulating inflammatory signaling pathways and cytokines in LPS-induced mouse mastitis. *Inflammation*, 2015. 38: 79–88.
- Stavric B., Clayman S., Gadd R.E., Hébert D. Some in vivo effects in the rat induced by chlorprothixene and potassium oxonate. *Pharmacol. Res. Commun.* 1975. 7: 117–124.
- Stein S, Lohmann C, Schafer N, *et al.* SIRT1 decreases Lox-1-mediated foam cell formation in atherosclerosis. *Eur Heart J*, 2010. 31(18):2301–2309.
- Stöckl D, Döring A, Thorand B, Heier M, *et al.* Reproductive Factors and Serum Uric Acid Levels in Females From the General Population: The KORA F4 Study. *PLoS One*, 2012. 7(3): e32668.
- Sun J, Huang SH, Zhu YC, *et al.* Anti-oxidative stress effects of *Herba leonuri* on ischemic rat hearts. *Life Sciences*, 2005. 76: 3043-3056.
- Tanaka A, Kawaguchi A, Tomiyama H, *et al.* Cross-sectional and longitudinal associations between serum uric acid and endothelial function in subjects with treated hypertension. *Int J Cardiol*, 2018. 272: 308–313.
- Tang DH, Ye YS, Wang HY, Li ZL, Zheng H, Ma KL. Potassium oxonate induces acute hyperuricemia in the tree shrew (*tupaia belangeri chinensis*). *Exp Anim*. 2017.66(3):209-216.
- Wan Y, Wang F, Zou B, Shen YF, Li YZ, Zhang A, Fu GM. Molecular mechanism underlying the ability of caffeic acid to decrease uric acid levels in hyperuricemia rats. *Journal of Functional Foods*, 2019. 57: 150-156.
- Wang J, Wei J, Zhou Y, *et al.* Leonurine hydrochloride-a new drug for the treatment of menopausal syndrome: Synthesis, estrogen-like effects and pharmacokinetics. *Fitoterapia*, 2022. 157: 105108.
- Wang M., Zhao J., Zhang N., Chen J. Astilbin improves potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney injury through regulating oxidative stress and inflammation response in mice. *Biomed. Pharmacother.* 2016. 83: 975–988.
- Wang X, Deng C, Guo F, *et al.* Preoperative Uric Acid-to-albumin Ratio as a New Indicator for Predicting Long-term Prognosis in Patients with Acute Type a Aortic Dissection. 2022. 2200: 1-17.
- WHO, [https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) ◦ 2018 (2022/2/19)
- Wingrove CS, Walton C, Stevenson JC. The effect of menopause on serum uric acid levels in non-obese healthy women. *Metabolism*, 1998. 47: 435–438.
- Winnik S, Auwerx J, Sinclair DA, *et al.* Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: From bench to bedside. *Eur Heart J*, 2015. 36(48): 3404–3412.
- Wu CW, Nakamoto Y, Hisatome T, *et al.* Resveratrol and its dimers ϵ -viniferin and δ -viniferin in red wine protect vascular endothelial cells by a similar mechanism with different potency and efficacy. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020. 36(7): 535-542.
- Xu L, Shi Y, Zhuang S, *et al.* Recent advances on uric acid transporters. *Oncotarget*, 2017. 8(59): 100852-100862.
- Yan W, Sun G, Luo A, *et al.* Serum uric acid is independently associated with aortic arch calcification in a cross-sectional study of middle-aged and elderly women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2020. 30(6) 932-938.
- Yang FK, Lu YL, Chen SZ, *et al.* Sex-specific Effect of Serum Urate Levels on Coronary Heart Disease and Myocardial Infarction Prevention: A Mendelian Randomization Study. *Nutr*

- Metab Cardiovasc Dis*, 2022.
- Yang X, Li Y, Li Y, *et al.* Oxidative stress mediated atherosclerosis: Mechanisms and therapies. *Front Physiol*, 2017. 8: 600-616.
- Yeung HW, Kong YC, Lay WP, *et al.* The structure and biological effect of leonurine. *Planta Med*, 1977. 31(1): 51-56.
- Yong T, Zhang M., Chen D., Shuai O., Chen S., Su J., Jiao C., Feng D., Xie Y. Actions of water extract from *Cordyceps militaris* in hyperuricemic mice induced by potassium oxonate combined with hypoxanthine. *J. Ethnopharmacol.* 2016. 194: 403–411.
- Yucel C. Chapter 4 - Cardiac biomarkers: definition, detection, diagnostic use, and efficiency. *The Detection of Biomarkers*, 2022. (2022) 113-130.
- Zghonda N, Yoshida S, Ezaki S, *et al.* Epsilon-Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012. 76(5): 954–960.
- Zhang G.B., Ren S.S., Wang B.Y., Tian L.Q., Bing F.H. Hypouricemic effect of flaccidoside II in rodents. *J. Nat. Med.* 2017. 71: 329–333.
- Zhang HJ, Li LN, Zhou J, *et al.* Effects of *Gnaphalium affine* D. Don on hyperuricemia and acute gouty arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017. 203: 304–311.
- Zhang Q, Sun Q, Tong Y, *et al.* Leonurine attenuates cisplatin nephrotoxicity by suppressing the NLRP3 inflammasome, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum stress. *Int Urol Nephrol*, 2022.
- Zhang S, Liu X, Song B. Impact of serum uric acid levels on the clinical prognosis and severity of coronary artery disease in patients with acute coronary syndrome and hypertension after percutaneous coronary intervention: a prospective cohort study. *BMJ Open* 2022. 12: e052031.
- Zhang T, Rayamajhi S, Meng G, *et al.* Dietary patterns and risk for hyperuricemia in the general population: Results from the TCLSIH cohort study. *Nutrition*, 2022b. 93: 111501.
- Zhang, R., Zhan, S., Li, S., Zhu, Z., He, J., Lorenzo, J. M., *et al.* Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of extracts from *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne in hyperuricemic mice. *Food Funct.* 2018. 9 (11), 5778–5790.
- Zhao H, Ma T, Fan B, *et al.* Protective effect of trans-delta-viniferin against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells through the SIRT1 pathway. *Free Radic Res*, 2016. 50(1): 68–83.
- Zhou YP, Liu WH, Shao GX. Structure-activity relationship of leonurine, syringy 4-hydroxybutunidine and syringic acid aminoesters in inhibiting platelet aggregation. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 1996. 31: 271-274.
- Zhu YZ, Wu WJ, Zhu Q, *et al.* Discovery of leonuri and therapeutical applications: From bench to bedside. *Pharmacology & Therapeutics*, 2018. 188: 26-35.
- Zoppini G, Targher G, Negri C, *et al.* Elevated serum uric acid concentrations independently predict cardiovascular mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2009. 32: 1716–1720.
- 陳德源、李奕德、林世昌等。臺灣痛風與高尿酸血症 2016 診治指引。社團法人中華民國風濕病醫學會，2016。台北市。
- 衛福部。https://www.mohw.gov.tw/cp-3217-22911-1.html。2013。(2024/10/30 下載)
- 衛福部。109 年國人死因統計結果。https://www.mohw.gov.tw/cp-5017-61533-1.html。2022/02/18 下載。

柒、附錄

Table 1. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on Heart index in 3-month-old and 6-month-old mice with potassium oxonate-induced hyperuricemia model.

Groups	3 month male	3 month female	6 month male	6 month female
Sham	0.4022±.011	0.4018±.005	0.3918±0.018	0.3884±0.013
CTL	0.4391±.006 ^{##}	0.4495±.011 ^{##}	0.4341±0.022 [#]	0.4307±0.014 [#]
ALP	0.4099±.006 ^{**}	0.4058±.007 ^{**}	0.3963±0.006	0.3665±0.021 [*]
LEL	0.4160±.010	0.4223±.006	0.4131±0.017	0.3993±0.007
LEM	0.4101±.010 [*]	0.4227±.009 [*]	0.3749±0.020 [*]	0.3862±0.007 [*]
LEH	0.4077±.008 ^{**}	0.4106±.012 [*]	0.3792±0.014 [*]	0.3823±0.008 [*]
LJE	0.4183±.009	0.4177±.010	0.3437±0.020 ^{**}	0.3635±0.023 [*]

Each value represents [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ as compared with the Sham group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ as compared with the CTL group. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

Table 2. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on Hepatic index in 3-month-old and 6-month-old mice with potassium oxonate-induced hyperuricemia.

Groups	3 month male	3 month female	6 month male	6 month female
Sham	4.5820±0.095	3.9950±0.121	4.9445±0.138	4.2422±0.215
CTL	5.4019±0.206 ^{##}	5.2282±0.171 ^{##}	5.5383±0.209 [#]	5.1591±0.151 ^{##}
ALP	4.8097±0.165 [*]	4.8060±0.100 [*]	4.9263±0.184 [*]	5.4280±0.169 [*]
LEL	5.3733±0.186	5.1747±0.141	5.4260±0.143	5.1260±0.094
LEM	5.0887±0.102	4.9754±0.091	5.0920±0.193	5.3952±0.210
LEH	4.8781±0.130 [*]	5.5614±0.215 [*]	4.9902±0.066 [*]	5.0820±0.075 [*]
LJE	5.1096±0.066	5.0687±0.136	5.0485±0.148	5.2430±0.144

Each value represents [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ as compared with the Sham group; ^{*} $P < 0.05$ as compared with the CTL group. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

Table 3. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on Kidney index in 3-month-old and 6-month-old mice with potassium oxonate-induced hyperuricemia.

Groups	3 month male	3 month female	6 month male	6 month female
Sham	3.2092±0.125	3.3645±0.067	3.5152±0.108	3.6582±0.130
CTL	3.6314±0.124 ^{##}	3.9234±0.179 ^{##}	4.0463±0.143 ^{##}	4.1770±0.087 ^{##}
ALP	3.4672±0.135 [*]	3.4593±0.114 [*]	3.6316±0.116 [*]	3.7985±0.111 [*]
LEL	3.6593±0.101	3.7323±0.112	3.9185±0.108	4.0271±0.125
LEM	3.6006±0.116	3.6349±0.085	3.8738±0.140	3.9017±0.191
LEH	3.5430±0.058 [*]	3.4310±0.108 [*]	3.5115±0.169 [*]	3.7580±0.131 [*]
LJE	3.5509±0.099	3.7271±0.098	3.8223±0.216	3.9803±0.113

Each value represents ^{##} $P < 0.01$ as compared with the Sham group; ^{*} $P < 0.05$ as compared with the CTL group. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

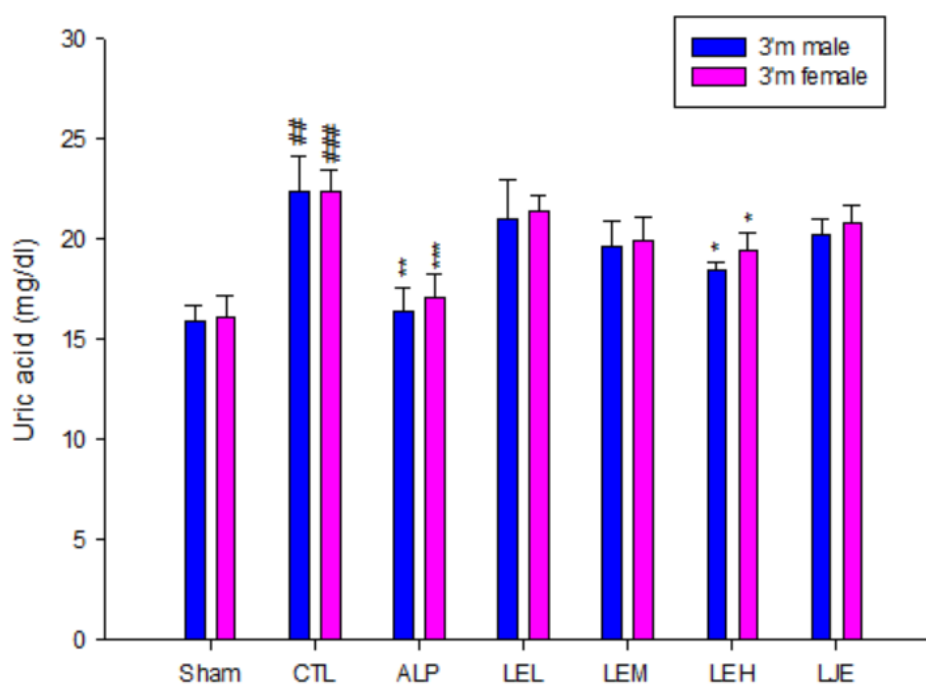


Fig. 6. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on uric acid levels in 3-month-old mice with potassium oxonate-induced hyperuricemia. Each value represents ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ as compared with the Sham group; ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ as compared with the CTL group. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

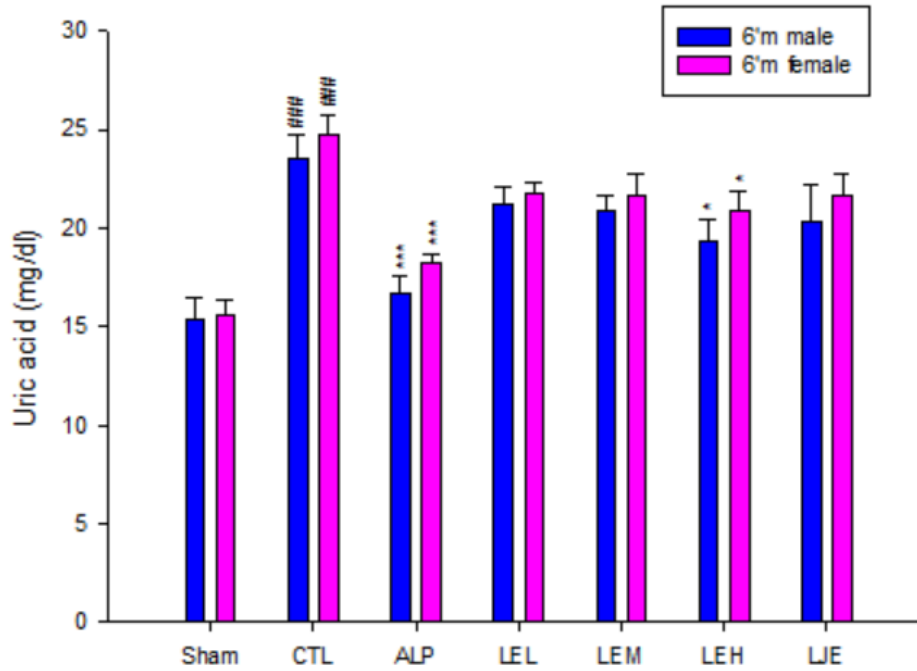


Fig. 7. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on uric acid levels in 6-month-old mice with potassium oxonate-induced hyperuricemia. Each value represents ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ as compared with the Sham group; ^{*} $P < 0.01$ as compared with the CTL group. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

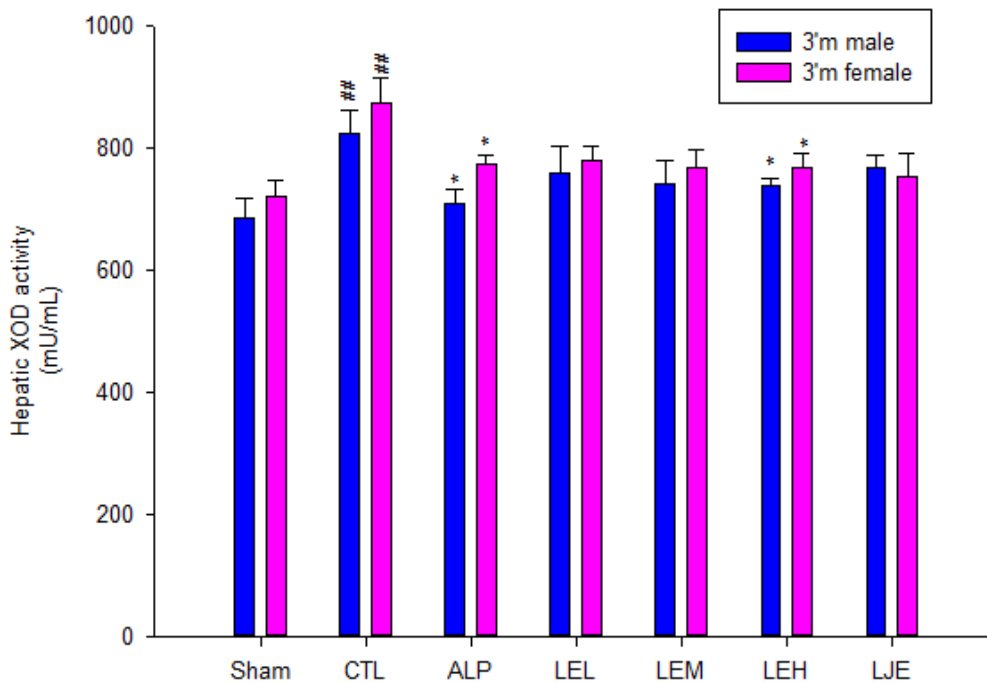


Fig. 8. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on XOD levels in 3-month-old mice with potassium oxonate-induced hyperuricemia. Each value represents ^{##} $P < 0.01$ as compared with the Sham group; ^{*} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ as compared with the CTL group. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

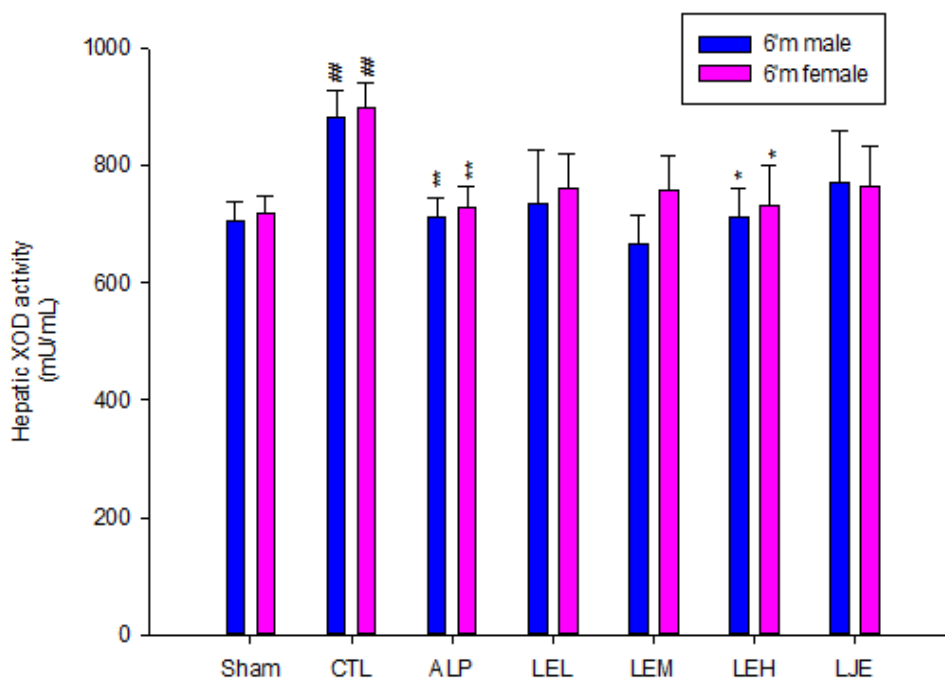


Fig. 9. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on XOD levels in 6-month-old mice with potassium oxonate-induced hyperuricemia. Each value represents ^{##} $P < 0.01$ as compared with the Sham group; ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ as compared with the CTL group. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

Table 4. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on IL-1 β mRNA levels in 3-month-old and 6-month-old mice with hyperuricemia induced by potassium oxalate.

Groups	3 month male	3 month female	6 month male	6 month female
CTL	24.04 \pm 0.52	24.71 \pm 0.31	25.17 \pm 0.31	25.51 \pm 0.33
ALP	24.20 \pm 1.07	24.23 \pm 0.60	23.64 \pm 0.71	25.08 \pm 0.40
LEL	23.74 \pm 0.38	24.24 \pm 0.44	23.31 \pm 0.55	25.11 \pm 0.43
LEM	23.25 \pm 0.71	23.81 \pm 0.51	23.66 \pm 0.35	24.16 \pm 0.23
LEH	24.21 \pm 0.27	24.87 \pm 0.80	23.60 \pm 0.29	24.12 \pm 0.25
LJE	24.02 \pm 0.22	24.29 \pm 0.09	23.98 \pm 0.40	24.32 \pm 0.44

Data are expressed as the mean \pm SEM. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

Table 5. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on IL-6 mRNA levels in 3-month-old and 6-month-old mice with hyperuricemia induced by potassium oxalate.

Groups	3 month male	3 month female	6 month male	6 month female
CTL	31.64±0.60	31.58±0.65	31.46±0.77	32.07±0.52
ALP	30.17±2.29	32.61±0.48	31.52±0.57	30.37±1.29
LEL	30.03±1.07	32.34±0.58	30.18±1.03	32.74±0.54
LEM	29.41±1.68	31.97±0.33	29.94±0.80	32.97±0.74
LEH	31.50±1.67	32.35±0.33	33.09±0.16	32.73±0.51
LJE	30.12±0.94	31.40±0.58	32.41±0.15	32.97±1.08

Data are expressed as the mean ± SEM. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

Table 6. Effects of Leonurine and *Leonurus japonicus* ethanol extract on CRP mRNA levels in 3-month-old and 6-month-old mice with hyperuricemia induced by potassium oxalate.

Groups	3 month male	3 month female	6 month male	6 month female
CTL	25.11±0.06	27.08±1.00	25.10±0.46	25.92±0.39
ALP	24.51±0.38	24.21±0.37	25.14±0.45	25.43±0.39
LEL	24.11±0.21	23.95±0.43	25.26±0.80	24.99±0.71
LEM	24.81±0.26	24.77±0.88	24.86±0.23	25.56±0.96
LEH	24.14±0.07	24.93±0.37	24.83±0.15	25.54±0.70
LJE	25.29±0.30	27.11±0.34	26.08±0.63	27.27±0.42

Data are expressed as the mean ± SEM. (One-way ANOVA followed by Scheffe's multiple range tests).

Table 7. Summary of histopathological sections of 3-month-old male mice with hyperuricemia induced by potassium oxalate treated with motherwort alkaloids and motherwort ethanol extract.

Organ	Histopathology	Group						
		Sham	CTL	ALP	LEL	LEM	LEH	LJE
Kidney								
	Degeneration/necrosis, tubule, multifocal	0.00±0.00	3.00±0.29 ^{###}	2.70±0.26	3.00±0.33	2.90±0.31	2.90±0.27	2.40±0.16
	Dilatation, tubular, multifocal	0.00±0.00	3.10±0.37 ^{###}	2.90±0.50	3.00±0.57	3.00±0.47	3.00±0.42	2.40±0.16
	Fibrosis, interstitial, multifocal	0.00±0.00	0.70±0.26 [#]	0.60±0.26	0.70±0.36	0.60±0.22	0.60±0.22	0.00±0.00 [*]
	Inflammation, multifocal	0.00±0.00	2.20±0.13 ^{###}	2.10±0.27	2.00±0.25	2.10±0.27	2.00±0.29	1.70±0.15 [*]
	Regeneration, tubular, multifocal	0.00±0.00	2.60±0.30 ^{###}	2.50±0.30	2.60±0.42	2.60±0.37	2.60±0.26	2.00±0.00
	Uric acid crystal, tubular, multifocal	0.00±0.00	2.30±0.15 ^{###}	2.10±0.27	2.00±0.29	2.00±0.25	2.00±0.21	2.00±0.00
Liver								
	Inflammation, multifocal	0.00±0.00	0.70±0.51	0.20±0.20	0.30±0.15	0.20±0.13	0.10±0.10	0.00±0.00
	Necrosis, multifocal	0.00±0.00	0.70±0.51	0.00±0.00	0.20±0.13	0.20±0.13	0.10±0.10	0.30±0.21
	Granuloma, serosa, multifocal	0.00±0.00	1.10±0.37 ^{##}	0.60±0.26	0.80±0.29	0.40±0.16	0.30±0.21	0.90±0.31

-: No significant lesions.

¹: Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

² Incidence: Affected mice/ Total examined mice.

³ The final numerical score was calculated by dividing the sum of the number per grade of affected mice by the total number of examined mice.

⁴ The subtotal mean score was calculated by dividing the sum of the number per grade of each lesion of affected mice by the total number of examined mice (n = 5-7).

Statistically significant difference compared to the Sham group at $p < 0.05$.

* Statistically significant difference compared to the CTL group at $p < 0.05$.

Table 8. Summary of histopathological sections of 3-month-old female mice with hyperuricemia induced by potassium oxalate treated with motherwort alkaloids and motherwort ethanol extract.

Organ	Histopathology	Group						
		Sham	CTL	ALP	LEL	LEM	LEH	LJE
Kidney								
	Degeneration/necrosis, tubule, multifocal	0.0±0.00	1.60±0.22 ^{###}	0.80±0.24	1.60±0.37	1.40±0.45	1.40±0.42	1.60±0.26
	Dilatation, tubular, multifocal	0.0±0.00	1.50±0.22 ^{###}	0.80±0.24	1.50±0.30	1.30±0.39	1.30±0.39	1.50±0.34
	Fibrosis, interstitial, multifocal	0.0±0.00	0.40±0.16 [#]	0.20±0.13	0.40±0.26	0.40±0.22	0.40±0.26	0.40±0.22
	Inflammation, multifocal	0.0±0.00	1.30±0.21 ^{###}	0.50±0.24	1.20±0.32	1.00±0.33	0.80±0.35	1.10±0.31
	Regeneration, tubular, multifocal	0.0±0.00	1.20±0.24 ^{###}	0.60±0.26	1.10±0.34	1.00±0.36	0.70±0.36	1.20±0.35
	Uric acid crystal, tubular, multifocal	0.0±0.00	0.80±0.24 ^{##}	0.70±0.21	0.80±0.24	0.80±0.32	0.70±0.36	0.80±0.24
Liver								
	Inflammation, multifocal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.30±0.30	0.20±0.20	0.20±0.20	0.20±0.20	0.30±0.21
	Necrosis, multifocal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.20±0.20	0.00±0.00	0.00±0.00	0.30±0.21
	Granuloma, serosa, multifocal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

-: No significant lesions.

¹: Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

² Incidence: Affected mice/ Total examined mice.

³ The final numerical score was calculated by dividing the sum of the number per grade of affected mice by the total number of examined mice.

⁴ The subtotal mean score was calculated by dividing the sum of the number per grade of each lesion of affected mice by the total number of examined mice (n = 5-7).

Statistically significant difference compared to the Sham group at $p < 0.05$.

* Statistically significant difference compared to the CTL group at $p < 0.05$.

Table 9. Summary of histopathological sections of 6-month-old male mice with hyperuricemia induced by potassium oxalate treated with motherwort alkaloids and motherwort ethanol extract.

Organ	Histopathology	Group						
		Sham	CTL	ALP	LEL	LEM	LEH	LJE
Kidney								
	Degeneration/necrosis, tubule, multifocal	0.00±0.00	2.89±0.26 ^{###}	2.56±0.41	3.00±0.50	2.67±0.23	2.11±0.30	2.78±0.43
	Dilatation, tubular, multifocal	0.00±0.00	3.22±0.43 ^{###}	2.44±0.41	2.89±0.48	2.67±0.23	1.67±0.16	3.00±0.37
	Fibrosis, interstitial, multifocal	0.00±0.00	0.89±0.26 ^{##}	0.33±0.23	0.89±0.20	0.78±0.27	0.44±0.24	0.89±0.26
	Inflammation, multifocal	0.00±0.00	1.89±0.20 ^{###}	1.67±0.23	1.89±0.35	1.89±0.26	1.44±0.29	1.89±0.26
	Regeneration, tubular, multifocal	0.00±0.00	2.00±0.23 ^{###}	1.78±0.27	1.78±0.32	1.56±0.24	0.89±0.26	1.78±0.27
	Uric acid crystal, tubular, multifocal	0.00±0.00	1.89±0.30 ^{###}	1.56±0.24	1.56±0.29	1.56±0.24	1.11±0.26	1.67±0.23
Liver								
	Hyperplasia, Kuffer cell, multifocal	0.00±0.00	2.00±0.00 ^{###}	2.00±0.00	1.22±0.27	1.56±0.17	1.22±0.22	1.67±0.16
	Inflammation, multifocal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.44±0.29	0.33±0.33	0.00±0.00	0.00±0.00
	Necrosis, multifocal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.33±0.33	0.00±0.00	0.00±0.00
	Granuloma, serosa, multifocal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.22±0.22	0.44±0.29	0.00±0.00	0.22±0.22

-: No significant lesions.

¹: Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

² Incidence: Affected mice/ Total examined mice.

³ The final numerical score was calculated by dividing the sum of the number per grade of affected mice by the total number of examined mice.

⁴ The subtotal mean score was calculated by dividing the sum of the number per grade of each lesion of affected mice by the total number of examined mice (n = 5-7).

Statistically significant difference compared to the Sham group at $p < 0.05$.

* Statistically significant difference compared to the CTL group at $p < 0.05$.

Table 10. Summary of histopathological sections of 6-month-old female mice with hyperuricemia induced by potassium oxalate treated with motherwort alkaloids and motherwort ethanol extract.

Organ	Histopathology	Group						
		Sham	CTL	ALP	LEL	LEM	LEH	LJE
Kidney								
	Degeneration/necrosis, tubule, multifocal	0.00±0.00	2.80±0.32 ^{###}	2.50±0.30	3.10±0.34	2.70±0.26	2.67±0.28	2.80±0.29
	Dilatation, tubular, multifocal	0.00±0.00	3.20±0.29 ^{###}	2.70±0.33	3.00±0.36	2.90±0.34	2.89±0.26	3.00±0.29
	Fibrosis, interstitial, multifocal	0.00±0.00	1.30±0.26 ^{###}	0.90±0.27	1.20±0.32	1.20±0.35	1.22±0.27	1.30±0.30
	Inflammation, multifocal	0.00±0.00	2.10±0.27 ^{###}	1.90±0.23	2.10±0.18	2.00±0.21	1.89±0.20	2.00±0.21
	Regeneration, tubular, multifocal	0.00±0.00	1.90±0.27 ^{###}	1.50±0.22	1.90±0.23	1.90±0.23	1.78±0.22	1.90±0.18
	Uric acid crystal, tubular, multifocal	0.00±0.00	1.80±0.13 ^{###}	1.50±0.16	1.50±0.16	1.50±0.16	1.44±0.17	1.50±0.16
Liver								
	Hyperplasia, Kuffer cell, multifocal	0.00±0.00	2.10±0.10 ^{###}	1.60±0.22	1.90±0.10	1.80±0.20	2.00±0.00	2.10±0.10
	Inflammation, multifocal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Necrosis, multifocal	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Granuloma, serosa, multifocal	0.00±0.00	0.20±0.20	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.60±0.30

-: No significant lesions.

¹: Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%).

² Incidence: Affected mice/ Total examined mice.

³ The final numerical score was calculated by dividing the sum of the number per grade of affected mice by the total number of examined mice.

⁴ The subtotal mean score was calculated by dividing the sum of the number per grade of each lesion of affected mice by the total number of examined mice (n = 5-7).

Statistically significant difference compared to the Sham group at $p < 0.05$.

* Statistically significant difference compared to the CTL group at $p < 0.05$.

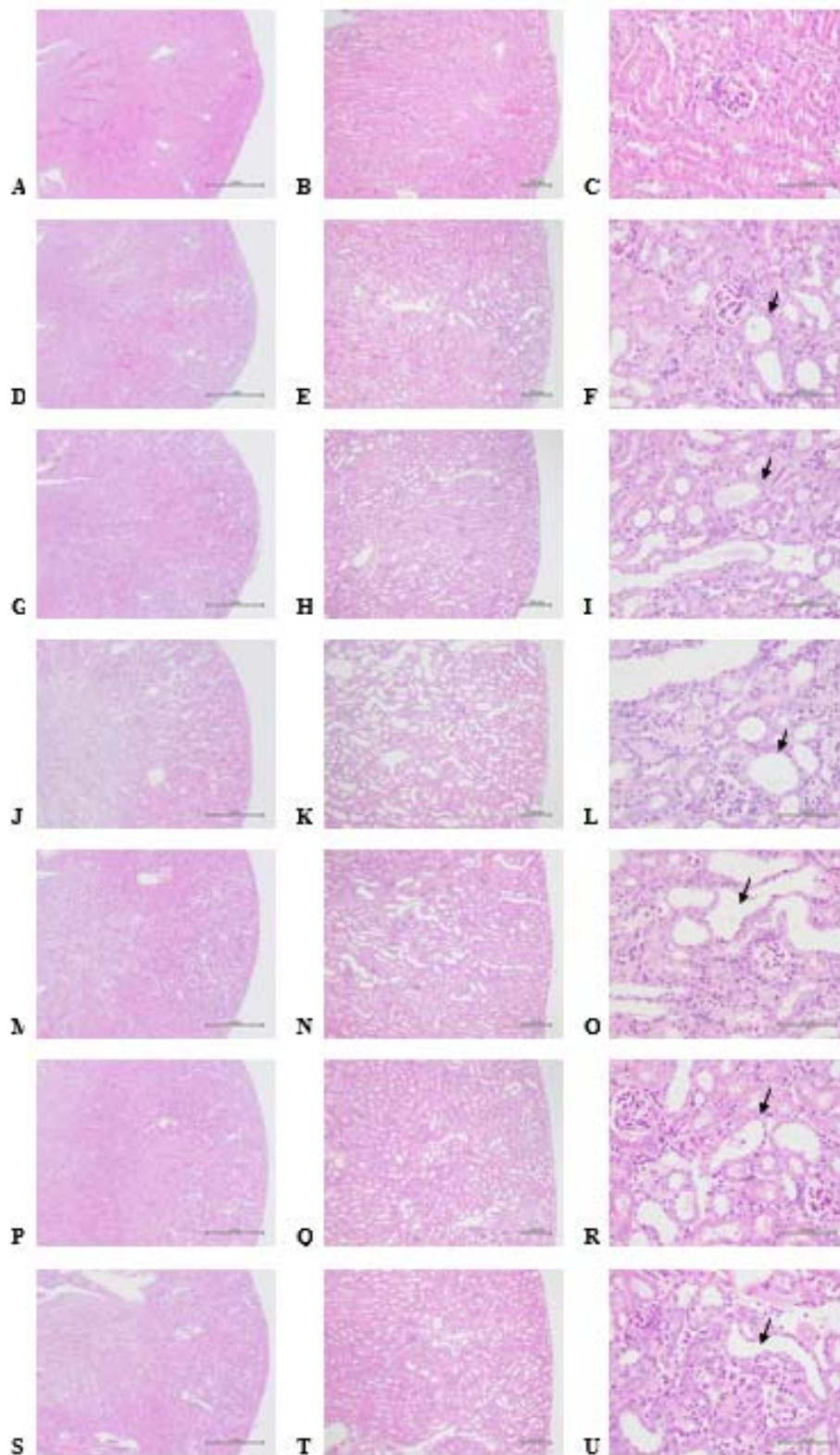


Fig. 10. Histopathological findings of the kidneys in the potassium oxonate induced hyperuricemic mice for 3 mos. No significant lesion of the kidneys was found in Sham (A-C); however, multifocal interstitial nephritis with inflammatory cell infiltration, tubular degeneration/necrosis, dilation (arrow) and regeneration, interstitial fibrosis with uric acid crystals in the kidneys were found in the CTL (D-F), ALP (G-I), LEL (J-L), LEM (M-O), LEH (P-R) and LJE (S-U) groups. H&E stain. 40x, 100x, 400x. Arrow.

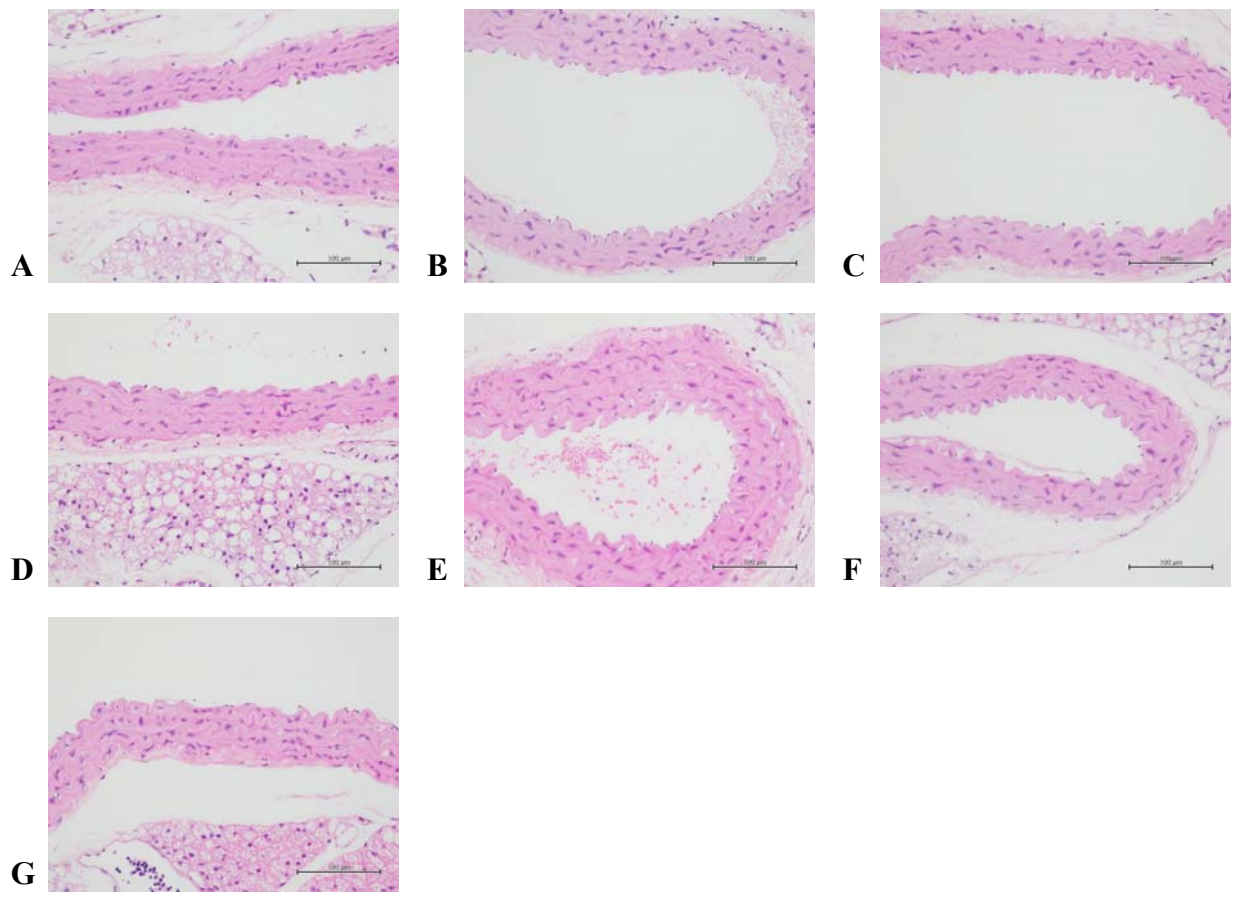


Fig. 11. Histopathological findings of the aorta in the potassium oxonate induced hyperuricemic mice for 3 mos. No significant lesion of the aorta was found in Sham (A), CTL (B), ALP (C), LEL (D), LEM (E), LEH (F) and LJE (G) groups. H&E stain. 400x. Arrow.

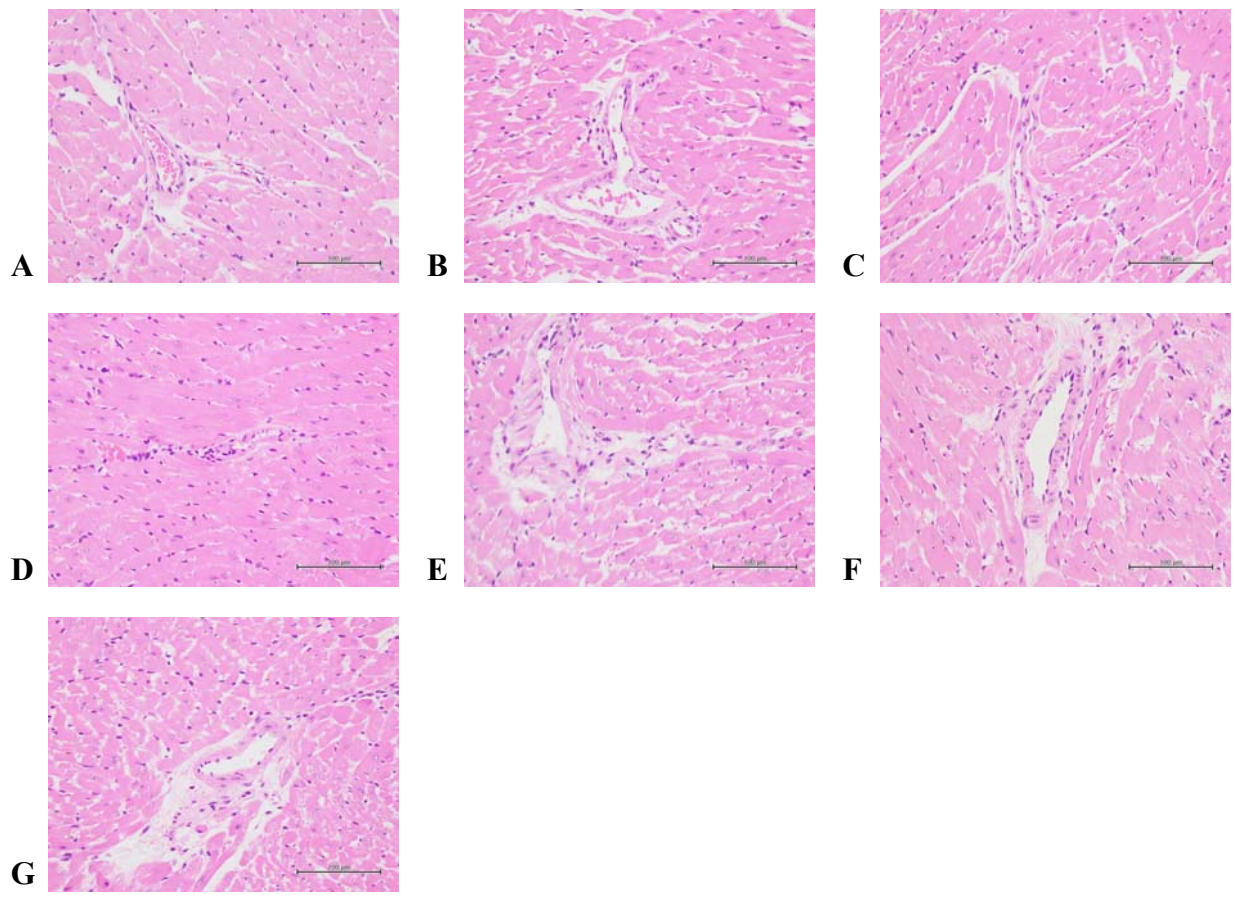


Fig. 12. Histopathological findings of the heart in the potassium oxonate induced hyperuricemic mice for 3 mos. No significant lesion of the heart was found in Sham (A), CTL (B), ALP (C), LEL (D), LEM (E), LEH (F) and LJE (G) groups. H&E stain. 400x. Arrow.

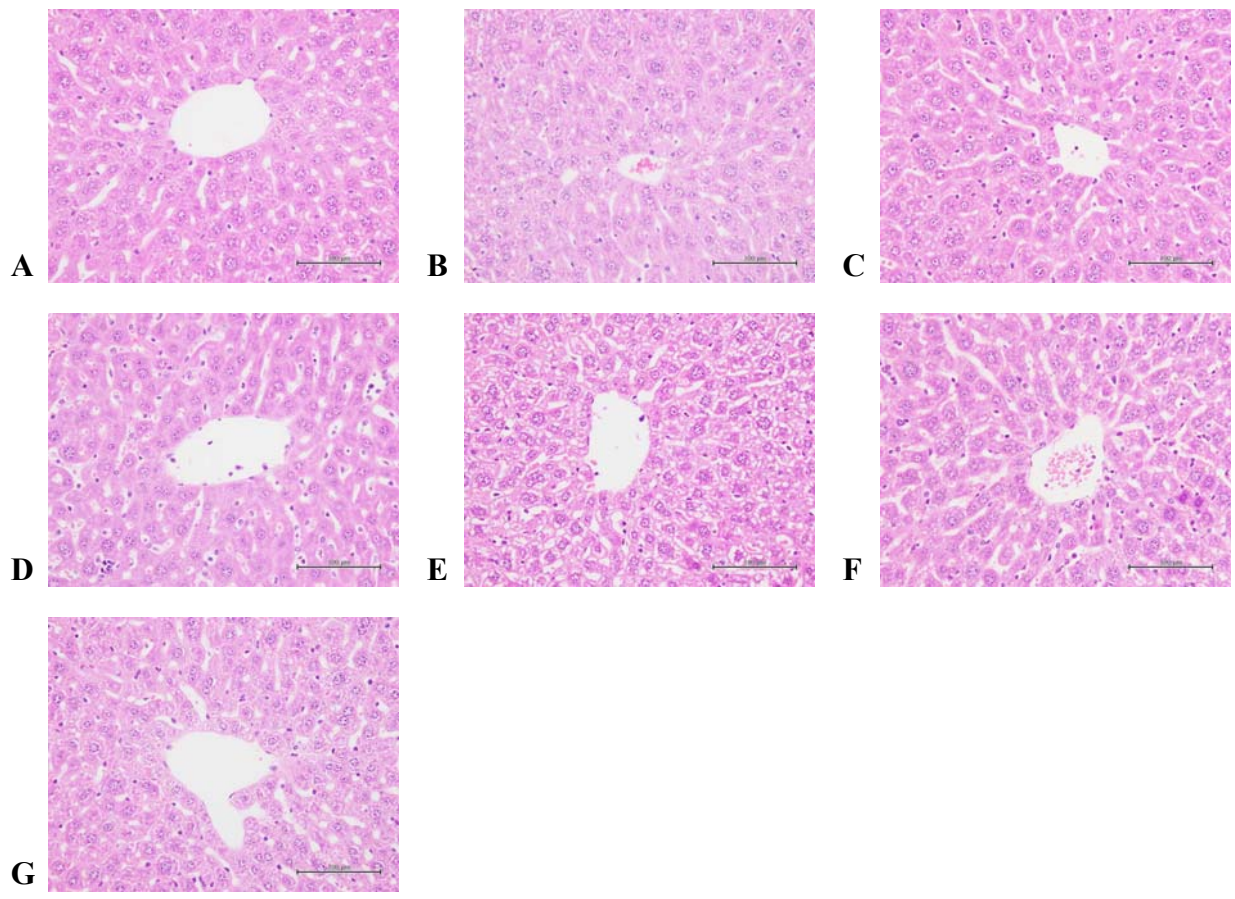


Fig. 13. Histopathological findings of the liver in the potassium oxonate induced hyperuricemic mice for 3 mos. No significant lesion of the liver was found in Sham (A), CTL (B), ALP (C), LEL (D), LEM (E), LEH (F) and LJE (G) groups. H&E stain. 400x. Arrow.

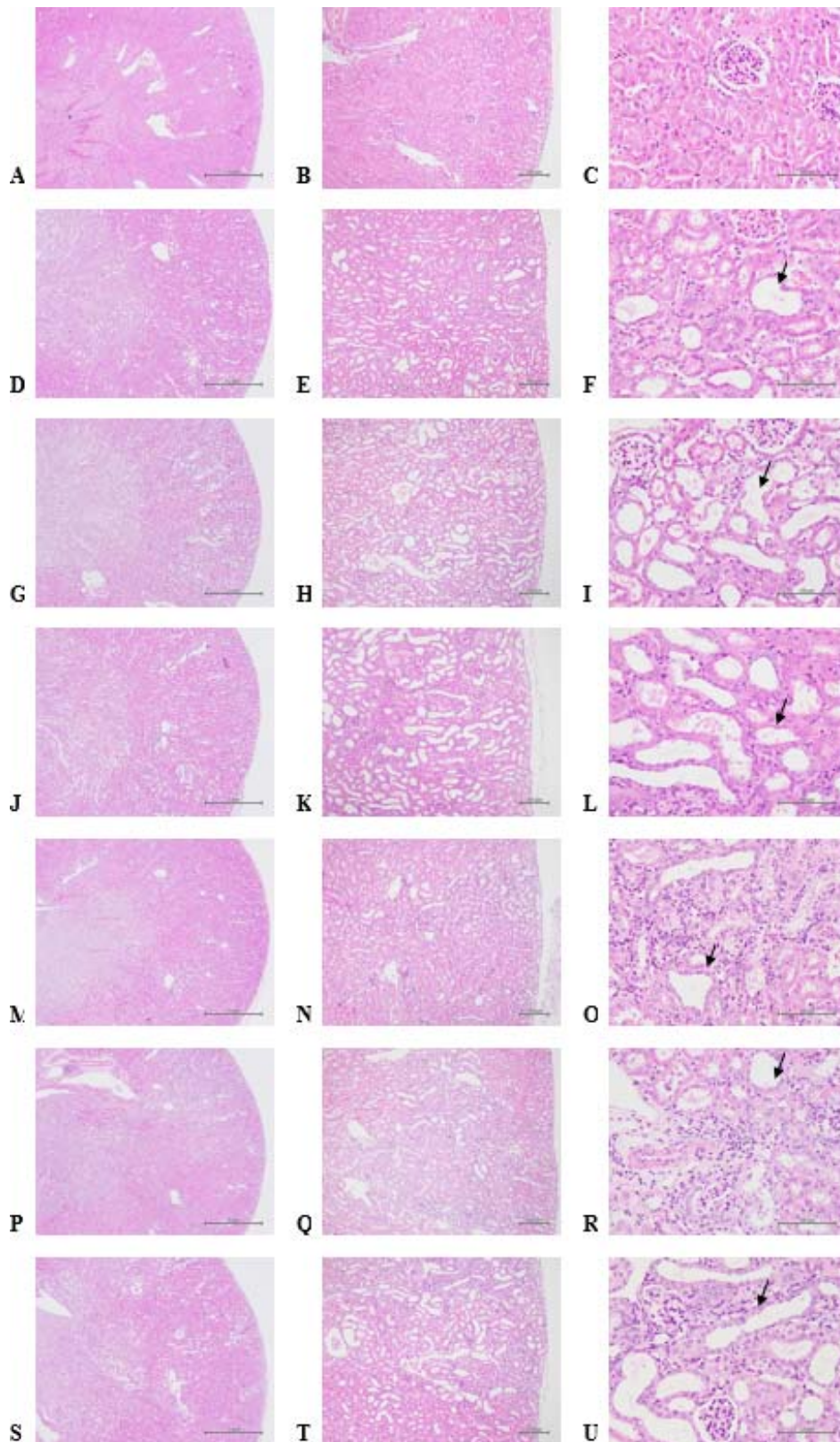


Fig. 14. Histopathological findings of the kidneys in the potassium oxonate induced hyperuricemic mice for 6 mos. No significant lesion of the kidneys was found in Sham (A-C); however, multifocal interstitial nephritis with inflammatory cell infiltration, tubular degeneration/necrosis, dilation (arrow) and regeneration, interstitial fibrosis with uric acid crystals in the kidneys were found in the CTL (D-F), ALP (G-I), LEL (J-L), LEM (M-O), LEH (P-R), and LJE (S-U) groups. H&E stain. 40x, 100x, 400x. Arrow.

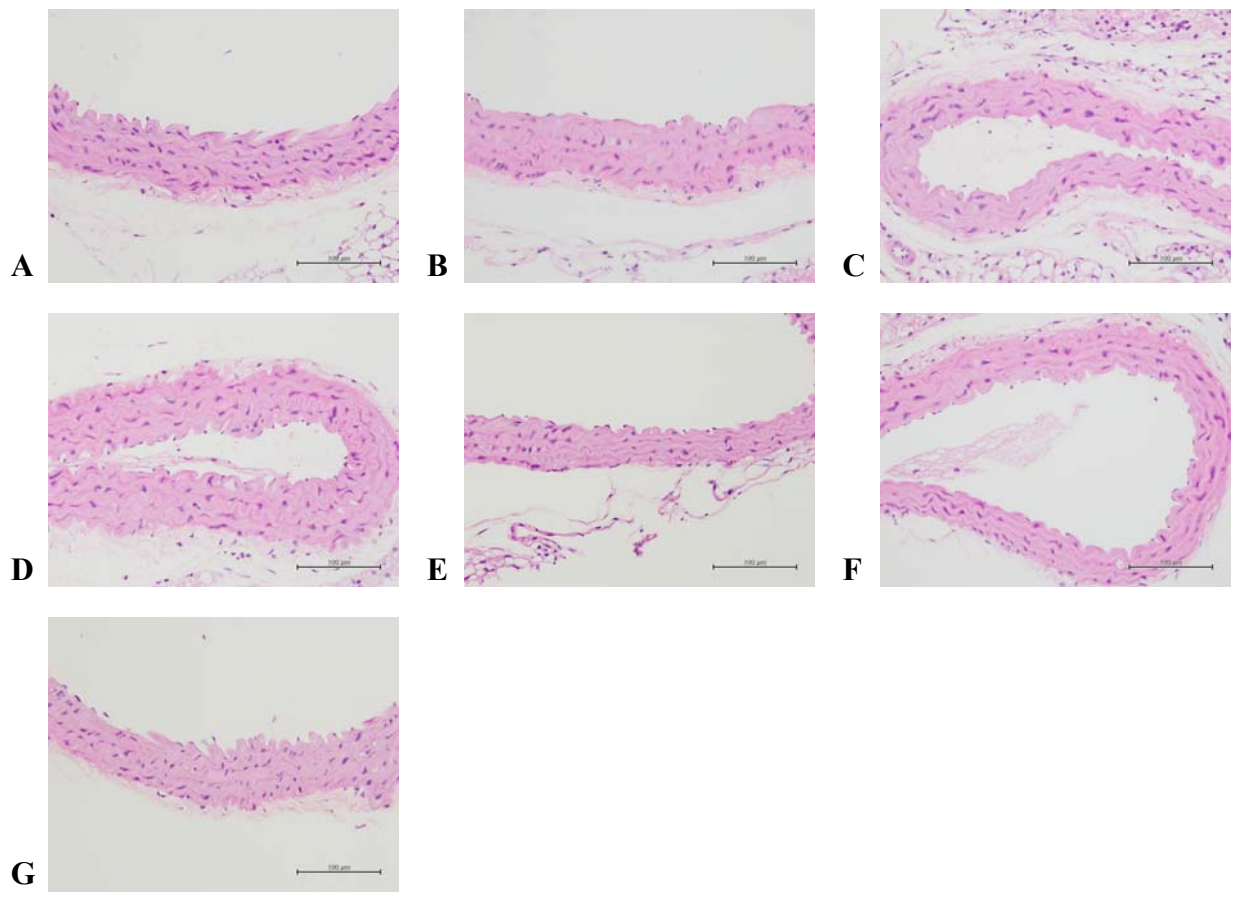


Fig. 15. Histopathological findings of the aorta in the potassium oxonate induced hyperuricemic mice for 6 mos. No significant lesion of the aorta was found in Sham (A), CTL (B), ALP (C), LEL (D), LEM (E), LEH (F) and LJE (G) groups. H&E stain. 400x. Arrow.

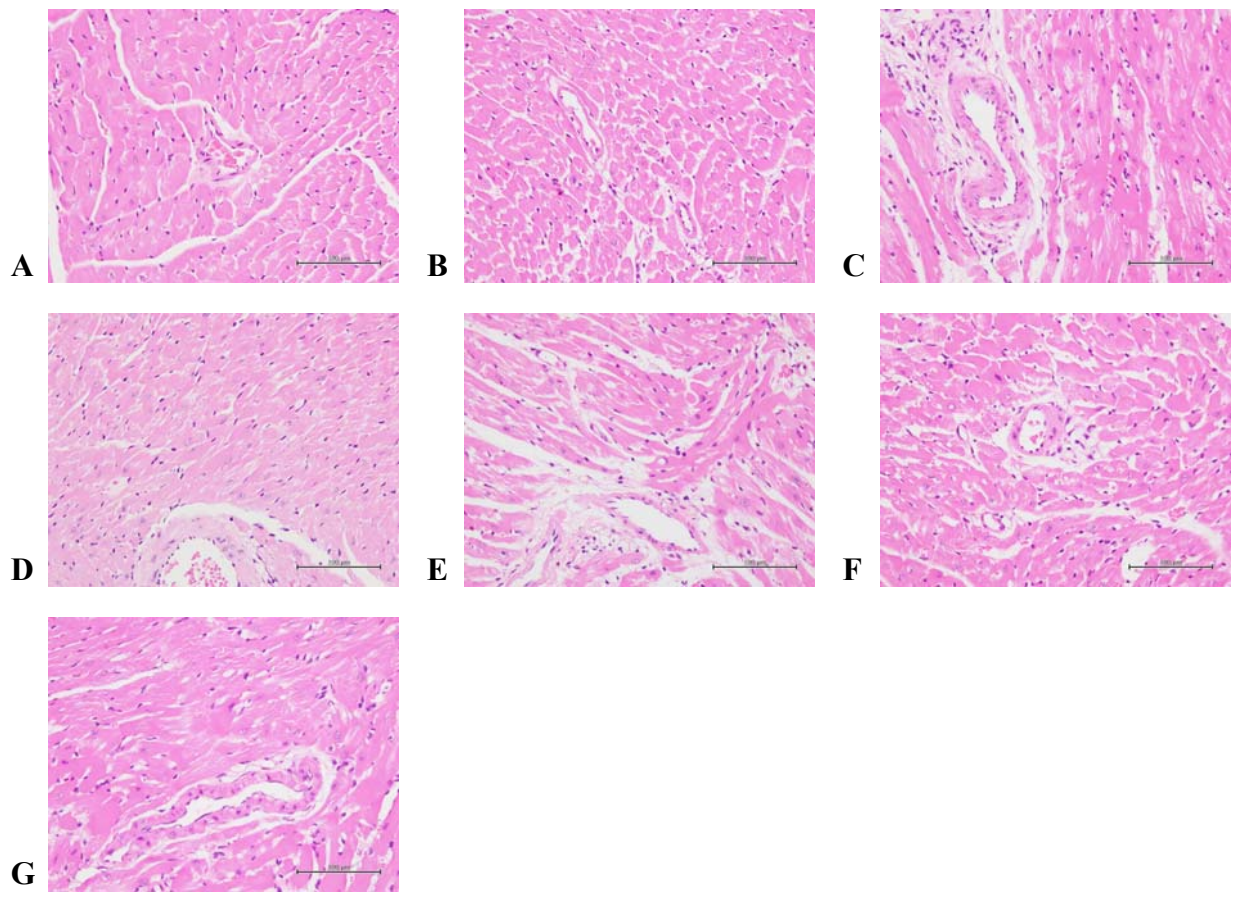


Fig. 16. Histopathological findings of the heart in the potassium oxonate induced hyperuricemic mice for 6 mos. No significant lesion of the heart was found in Sham (A), CTL (B), ALP (C), LEL (D), LEM (E), LEH (F) and LJE (G) groups. H&E stain. 400x. Arrow.

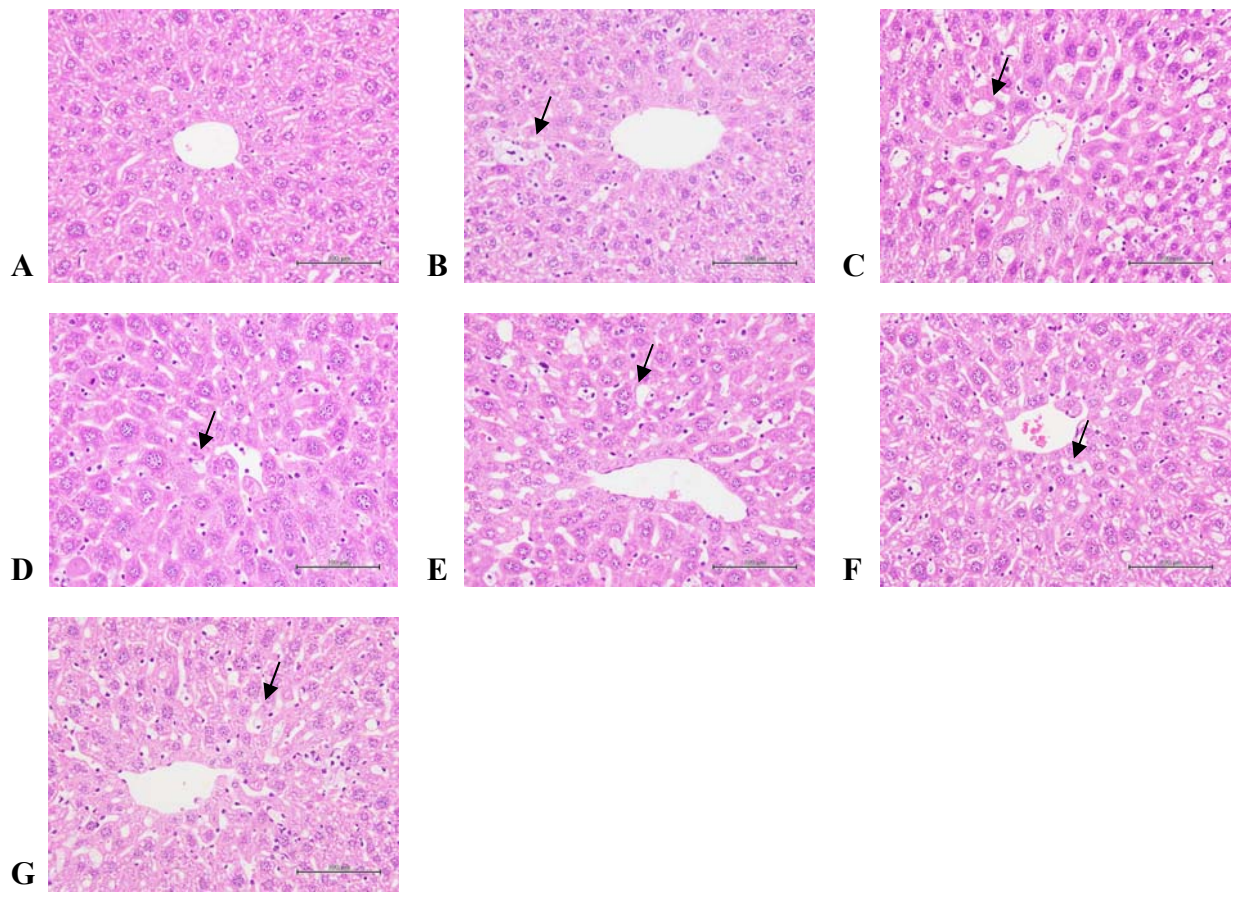


Fig. 17. Histopathological findings of the liver in the potassium oxonate induced hyperuricemic mice for 6 mos. No significant lesion but Kuffer's cell hyperplasia (arrow) in the liver was found in Sham (A), CTL (B), ALP (C), LEL (D), LEM (E), LEH (F) and LJE (G) groups. H&E stain. 400x. Arrow.