

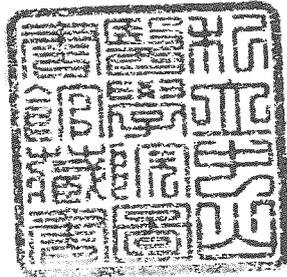
R
008.8
4054

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

(I) 以尿酸酶法及高效液相色層分析血中茶鹼及咖啡因 之代謝物與尿酸值之關係

Relationship of Caffeine and Theophylline Metabolites on
the Level of Human Serum Uric Acid Evaluated by High
Performance Liquid Chromatography and Uricase Method

(II) 茶鹼及咖啡因在鼠肝細胞中對尿酸生成之影響 Effects of Caffeine and Theophylline on the Uric Acid Formation in the Rat Hepatocytes



指導教授: 王朝鐘教授 (Chau-Jong Wang)
謝易修副教授 (Yih-Shou Hsieh)

研究生: 袁素娟 (Su-Jen Yuan)

參考書恕不外借

中華民國八十六年六月

中山醫學院圖書館



C046146

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所
----- 組 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：(I)以尿酸酶法及高效液相色層分析血中茶鹼及咖啡因之代謝物與尿酸值之關係
(II)茶鹼及咖啡因在鼠肝細胞中對尿酸生成之影響

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：王朝鐘

研究生簽名： 袁素娟 學號：R8302113
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 6 月 16 日

備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：袁素娟 聯絡電話：(04)3896190-13313

地址：台中市建國北路一段110號

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員審核合格，並口試通過。

口試委員

私立中山醫學院
生物化學研究所教授兼所長
(本論文指導教授)

王朝鐘 博士

王朝鐘

私立中山醫學院
生物化學研究所副教授
(本論文指導教授)

謝易修 博士

謝易修

私立中台醫事技術專科學校
護理科副教授兼主任

胡月娟 碩士

胡月娟

中華民國八十六年六月

學生袁素娟論文題目為(I)以尿酸酶法及高效液相色層分析血中茶鹼及咖啡因之代謝物與尿酸值之關係,(II)茶鹼及咖啡因在鼠肝細胞中對尿酸生成之影響,其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過,並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：王朝鐘教授

簽名：

王朝鐘

謝易修副教授

簽名：

謝易修

中華民國

86年

7

月

30

日

誌謝

增加新知識、新觀念、不斷的學習是一位教師對教育學子所應負起的責任，也是「終身學習」理念者所應有的表現，三年來，我抱持著如此的信念，接受碩士班教育。三年，不算短的日子裡，我同時扮演著教師、學生、妻子、母親、女兒的多重角色，其中所遭遇的挫折、甘苦，實在難以筆墨形容。如今即將畢業的此刻，回顧過去，我變得更堅強、內斂、願意面對挑戰，也增加了教學的題材、擴充了課程的廣度與深度、更樹立兒女求學的榜樣。如果這些算是成就，最要感謝的是王朝鐘教授及謝易修副教授不厭其煩的教導，中國醫藥學院郭憲文副教授、中山醫學院李妙真、陳美倫講師在統計上的指導，以及本所教師們的鼓勵。

以護理專業出身的我，「實驗」是一大挑戰，特別要感謝本院附設醫院生化室蔡安容組長在臨床檢驗尿酸值上之鼎力相助，學弟妹張明誠、朱玉娟、李孟訓在實驗過程之協助，更要感謝外子翁桓盛給予無限的關心和支持。

最後僅以此論文獻給先父、先母及家人，還有親愛的同事、學生們。

目錄

	頁 數
第一部份 以尿酸酶法及高效液相色層分析血中茶 鹼及咖啡因之代謝物與尿酸值之關係	1
縮寫表	2
中文摘要	3-4
英文摘要	5-6
緒論	7-12
材料與方法	13-17
結果	18-21
討論	22-25
圖	26-37
表	38-40
參考文獻	41-45
第二部份 茶鹼及咖啡因在鼠肝細胞中對尿酸生成 之影響	46
縮寫表	47
中文摘要	48-49
英文摘要	50-51
緒論	52-55
材料與方法	56-63
結果	64-65
討論	66-68
圖	69-71
表	72-74
參考文獻	75-79

第一部份

以尿酸酶法及高效液相色層分析血中茶鹼及
咖啡因之代謝物與尿酸值之關係

Relationship of Caffeine and Theophylline Metabolites on
the Level of Human Serum Uric Acid Evaluated by High
Performance Liquid Chromatography and Uricase Method

縮寫表(第一部份)

HPLC: High performance liquid chromatography

UUA: 以 Uricase 分析之 Uric acid

HUA: 以 HPLC 分析之 Uric acid

DMUA: 1, 3-Dimethyluric acid

TMUA: 1, 3, 7-Trimethyluric acid

4-AAP: 4-aminoantipyrine

DCHBS: 3, 5-dichloro-2-hydroxybenzene

sulfonate

第一部份

以尿酸酶法及高效液相色層分析血中茶鹼及咖啡因 之代謝物與尿酸值之關係

Relationship of Caffeine and Theophylline Metabolites on
the Level of Human Serum Uric Acid Evaluated by High
Performance Liquid Chromatography and Uricase Method

摘 要

本研究旨在分析血清中之尿酸分子成分，藉以探討高尿酸血症病人在醫院所測之尿酸值偏高(尿酸值 $>7\text{mg/dl}$)，卻沒有痛風的症狀及急性發作現象的可能原因。本實驗於民國 84 年 11 月 1 日至 85 年 4 月 30 日間，在中部某一區域醫院內科門診部就診之病人做為研究之母群，樣本取得分成尿酸值正常、高尿酸血症無痛風發作及醫師診斷為痛風病人等三組，並透過該院檢驗室收集血清，做常規尿酸酶法分析以得知臨床分析之尿酸值，再以高效液相色層分析(High performance liquid chromatography; HPLC)血清中之尿酸、1,3-二甲基尿酸(茶鹼代謝物)及 1,3,7-三甲基尿酸(咖啡因代謝物)等之含量，並以 SAS 軟體進行統計分析。結果:HPLC 分析所得之尿酸值均低於尿酸酶法所分析之值；而兩者之差距與 1,3-二甲基尿酸及 1,3,7-三甲基尿酸同時存在時成正相關($P<0.05$)，與任何一者單獨

存在時有些微差異，但無統計上之意義；當1,3-二甲基尿酸及1,3,7-三甲基尿酸之濃度大時較具影響。此結果顯示，受檢病人中若含有高濃度甲基尿酸衍生物(來自於茶鹼及咖啡因的代謝)，將影響病人尿酸之檢測值偏高。

關鍵詞(Key word):

高尿酸血症(Hyperuricemia);

痛風(Gout);

1,3-二甲基尿酸(1,3-Dimethyluric Acid);

1,3,7-三甲基尿酸(1,3,7-Trimethyluric Acid);

高效液相色層分析(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)。

Relationship of Caffeine and Theophylline Metabolites on
the Level of Human Serum Uric Acid Evaluated by High
Performance Liquid Chromatography and Uricase Method

Abstract

The purpose of this study was to analyze the component of uric acid in the serum, so as to explore the possibly factors which showed the hyperuricemia patients whose uric acid values checked in hospital above the average (uric acid value $>7\text{mg/dl}$) had no symptoms of gout and also the phenomenons of acute outbreak.

The samples came from the patients of the hospital medical outpatient department in a certain area in the middle part of Taiwan since 1 Nov.1995 to 30 April 1996. They were divided into three groups: regular uric acid value patients, hyperuricemia but on gout occuring patients and diagnosed gouty patients. After the hospital laboratory collecting the sera, using regular uricase analysis, We got the uric acid value of clinical analysis. Then we used HPLC to find out the concentrations of uric acid, 1,3-dimethyluric acid (theophylline metabolites and 1,3,7-trimethyluric acid, Lastly, We used SAS software to do stastical analysis. Conclusion: all the uric acid values analyzed with HPLC were lower then the values analyzed with uricase. Furthermore, their

difference had positive correlation with 1,3-dimethyluric acid and 1,3,7- trimethyluric acid, if both of them exist simultaneously ($p < 0.05$), Slightly difference but had on stastical meaning if only one of them exist. If the concentrations of 1,3-dimethyluric acid and 1,3,7-trimethyluric acid were high, the affect would be more obviously.

The result showed that among the checked patients, those having high concentration of methyl uric acid derivatives (from caffeine and theophylline metabolites) would get higher uric acid value.

緒論

高尿酸血症病人在醫院所檢測之尿酸值很高，卻沒有痛風的症狀及急性發作現象，其原因目前仍不清楚，本研究因此想藉由 HPLC 分析血清中尿酸分子成份，以瞭解是否病人血中含有某類尿酸的衍生物(如茶鹼代謝物 1,3-二甲基尿酸及咖啡因代謝物 1,3,7-三甲基尿酸)，而這些尿酸衍生物可能造成醫院檢驗科所測之尿酸值偏高，因為醫院是幾乎全部採尿酸酶(Uricase)法分析(1)，而此方法可能對尿酸衍生物有所作用，因此，測出的值可能會有偏高的情形。

作者為了驗證上述推論，選擇中部某一區域醫院內科門診部病人血清進行分析，而研究進行相關內容敘述如下：

一. 痛風(Gout)

痛風是一種不正常的嘌呤代謝疾病，當痛風完全發展時，會有以下情況之單獨或一起出現的情形：(1)血清尿酸濃度增加；(2)反覆發作一特有形式的急性關節炎，在發炎關節滑液內白血球可發現單鈉尿酸鹽(monosodium urate mono-hydrate)結晶；(3)單鈉尿酸鹽聚積沉殿物(痛風石)，積在關節內或關節附近，有時會導致嚴重跛足或關節畸形；(4)腎臟被侵犯；(5)尿酸腎結石(2)。

男性在青春前期以前較少見，好發生於 40-60 歲男性，女性在停經後較會發生。Statland(3)指出，血中尿酸值之臨床參考範圍是

2.5-7.0mg/dl，高決策值(decision level)為 8.0mg/dl，低決策值為 2.0mg/dl，當血中尿酸值高於 8.0mg/dl 或低於 2.0mg/dl 時，臨床醫師應診斷該異常值之病因，如病人為腎結石或痛風之高危險群患者。若是在發炎關節找到細胞內尿酸鹽結晶即可確立為痛風，但不能排除同時存在其他種的關節炎病(2, 4-6)。

痛風在一般人口之發生率為每千人中有 0.20-0.35 人，流行率約為每千人中有 2-2.6 人。此隨著年齡增大而逐漸增加，亦隨著血中尿酸濃度之增高而逐漸增加(7-9)。

痛風的死亡率低，嚴重時才引起關節變形，但反覆而劇烈的疼痛或關節發炎使病人如受酷刑，痛楚難忍。痛風的治療並不困難，正確、規則的接受藥物治療，再加以飲食限制嘌呤的攝取、體重控制和維持合理的體重、適當的運動、多攝取水分(2000-3000ml/day)、適當攝取酒精以外的飲料，如茶、咖啡等，均是正向的健康行為且具良好成效(7, 10-12)。袁氏(13)調查臨床痛風病人發現，患者的飲食行為在得此病前後有關高嘌呤食物之攝取有明顯的降低，喝酒情形明顯改善，喝水量增加，但在飲料中的茶、咖啡及日常活動則未有明顯改變，其中病人平日喝茶的頻率增加或濃度越高時，其所測得的尿酸值越降低；而喝咖啡的頻率增加或濃度越高時，其所測得的尿酸值反而增高。

二. 高尿酸血症(Hyperuricemia)

是一種生化反應的情形，當尿酸之合成增加或排泄減少或兩者同時發生時，會造成血中尿酸濃度增高，如血中尿酸值超過臨床參考範圍，即是高尿酸血症。臨床高尿酸常見的病因有：1. 尿酸之合成增加 2. 腎臟排泄尿酸減少 3. 其他，如飲用乙醇(改變尿酸代謝途徑)；因熱病(熱昏厥、熱衰竭、中暑)併發高尿酸血症；劇烈運動後併發高尿酸血症(6, 12)。

所有痛風病人都有高尿酸血症，而只有不到百分之五的高尿酸血症病人會發生痛風(2)。周氏(8)調查發現，臺灣中部地區原住民罹患高尿酸血症和痛風的病例是平地人的三倍，主因可能是家族遺傳或腎臟功能異常導致排泄尿酸困難。賴氏(14)調查發現，宜蘭縣東澳里及東岳村成人受檢者之高尿酸血症和種族及喝酒有明顯的正相關。黃氏(15)調查宜蘭縣南澳鄉成人原住民血中尿酸值升高的危險因子指出，高尿酸血症和種族及飲食生活習慣(包括喝酒)有相關。

三. 尿酸(Uric Acid)

尿酸是人類內生性和外來的核酸嘌呤(purine)如鳥糞核苷(guanosine)或腺核苷(adenosine)的代謝終末產物[嘌呤代謝成尿酸的過程(見圖 2)(16-17)]。成人體內平均含有 1.1 克尿酸，其中的 15%存在血液中，當存在血中的尿酸超過其溶解極限時，血清中尿酸濃度即會增高(16)。在 37°C 時，血清尿酸飽和度為 7mg/dl，超過此值時，即為高尿酸，而當病人如未有任何其他痛風症狀，僅只尿酸高時，稱為高尿酸血症(2)。

尿酸主要來自體內組織核蛋白崩壞、體內合成及食物。當攝取大量核酸食物或細胞的大量破壞，體內尿酸即會增加。尿酸之內在生成部位，已知者有肝臟、骨髓、肌肉等(2,10)。

尿酸為弱酸性物質，尿酸分子式為 $C_5H_4N_4O_3$ (見圖 1);分子量為 168.11 dalton。尿酸在正常人的體液中，以單價尿酸鹽陰離子形式存在，大多與鈉或鉀離子結合，其溶解度高(16-19)。

大部份的尿酸(60-80%)經腎絲球過濾後，由尿液排出。少量尿酸(30%)則經由膽汁、胃液、腸液，經細菌分解後由糞便排泄。目前應用在分析尿酸之方法包括磷鎢酸法(1912年 Folin 等最早提出此分析方法應用在血中尿酸之測定，是早期臨床實驗室測定之方法)、尿酸酶(uricase)法(1980年 Fossati 利用尿酸酶氧化尿酸產生尿囊素(allantoin)及過氧化氫，以測定血中尿酸，目前臨床實驗室普遍應用之方法)、高效液相色層分析法(1979年首先被提出應用在尿酸之測定)等(1,16)。

Loenen(20)研究老人和婦女的飲食攝取與血中尿酸值的關係指出，尿酸值和常吃肉、魚有正的相關。Brand(21)研究冠狀動脈心臟疾病患者指出，病人血中尿酸值和血壓值有明顯的相關性。袁氏(13)調查臨床痛風病人也發現，尿酸值高的人不見得會高血壓，而高血壓的人幾乎都有高尿酸值，且喝茶、咖啡和尿酸值有相關。

四. 1, 3-二甲基尿酸(1, 3-Dimethyluric acid)



是茶鹼(Theophylline)代謝後的產物，分子式為 $C_7H_8N_4O_3$ (見圖 3)，分子量為 196.20 dalton，溶解度高⁽²²⁻²⁵⁾。

五. 1, 3, 7-三甲基尿酸(1, 3, 7-Trimethyluric acid)

是咖啡因(Caffeine)代謝後的產物，分子式為 $C_8H_{10}N_4O_3$ (見圖 3)，分子量為 210.20 dalton，溶解度高⁽²²⁻²⁵⁾。

六. 鳥嘌呤(Guanine)

是原核生物與真核生物的核甘酸中，主要的嘌呤鹼基之一，是與胞嘧啶(cytosine)配對，分子式為 $C_5H_5N_5O$ (見圖 4)，分子量為 187.60 dalton，溶解於微酸中^(11, 17-19, 23)。

七. 高效液相色層分析(High performance liquid chromatography; HPLC)

HPLC 是一種化學分析的技術，發展在 1960 年代，1970 年代以穩定進步且被應用，在 1979 年首先被提出應用在尿酸之測定，這是一種能夠快速而非破壞性的使複雜混合物分離成為個別成份的方法，是在高壓下利用數種不同的物理特徵(如吸附力、溶解度…等)，

將一混合物置於兩種不同相(即固定相與移動相)下之相對作用，而把其中的成份一一分離。其基本的裝置包括溶媒供應(Solvent supply)、高壓幫浦(High pressure pump)、樣本注入裝置(Injector)、填充可耐高壓的固定相(Stationary phase)物質的管柱(Column)、檢出器(Detector)與記錄器(Recorder)(1, 26-30)。

材料與方法

一. 實驗材料

A. 藥物來源

1. 購自美國 Sigma Chemical Company

- (1) Uric acid(2, 6, 8-Trihydroxypurine)sodium salt
- (2) 1, 3-Dimethyluric acid
- (3) 1, 3, 7-Trimethyluric acid
- (4) Caffeine(anhydrous)

2. 購自德國 Merck 公司

- (1) Acetonitrile(氰甲烷)
- (2) 2-Propanol
- (3) Sodium acetate anhydrous
- (4) Tetrahydrofuran

3. 購自皓峰企業股份有限公司

- (1) Acetonitrile(氰甲烷), LC 級
- (2) Dichloromethane(二氯甲烷), LC 級

4. Glacial Acetic acid(冰醋酸)購自聯工化學廠股份有限公司

5. Uric acid reagent(Uricase method)購自美國 Beckman.

B. 血清來源

血清樣本來自中部某一區域醫院內科門診病人，共分成三組，第一組為尿酸檢查正常者(尿酸值 $\leq 7\text{mg/dl}$)，第二組為高尿酸血症無痛風症狀者(尿酸值 $> 7\text{mg/dl}$)，第三組則為經醫師診斷是痛風疾病者。尿酸值正常者為對照組，三組病人之年齡均相似，每組 32 名，研究個案數共 96 名。每個病人血清由該院檢驗科生化室收集、保存，再一併將病人血清及尿酸檢驗報告取回本醫學院生化研究所實驗室，進行樣本萃取及分析。

二. 尿酸及尿酸衍生物之分離

A. 血清萃取方法

血清樣本入實驗室放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷凍後，參考 Leakey (22) 等人方法以 HPLC 同時分析人類血中茶鹼、咖啡因及其代謝物做萃取，取血清 100 毫微升以異丙醇(2-Propanal)和二氯甲烷(Dichloromethane)以 1 : 9 的混合液做溶劑萃取，共萃取二次，每次使用之溶劑為 1.5 毫升，將下層液吸出，置入 $10\times 75\text{mm}$ 的玻璃試管中，再將試管置於 heater block 上(溫度控制在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下)，以氮氣(oxygen-free nitrogen)吹乾。吹乾的萃取物加入 $100\mu\text{l}$ 的 mobile phase A 溶液去溶解，溶解後再離心 5 min，取 $20\mu\text{l}$ 進行 HPLC 分析(流程見圖 5)。

B. 高效液相色層分析(High-performance liquid chromatography; HPLC)

經 A. 處理之萃取物，參考 Leakey 的實驗方法⁽²²⁾、Tanaka⁽²⁴⁾ 及 Lee⁽³¹⁾之研究，取 20 μ l 做樣本直接注射入高效液相色層分析儀(HPLC)(L-6200A intelligent pump, Hitachi, TOKYO Japan)，其分析條件為：

使用 column : RP-18 column(250 \times 4.5mm I. D. 5 μ m). 以下列條件沖提之：流速為 0.8ml/min, 移動相為 pump A(0.01% THF in 10mM Acetate, PH4.0)，pump B[6%acetonitrile, 2.0% Tetrahydrofuran(THF) in 10mM Acetate, PH4.0]，沖提為 100% B，0%A 到 85% B，15%A 沖提流速為 5% B/min，偵測器(L-4250 uv/vis detector)偵測設定波長為 270nm，分析一個樣本時間共需 20 分鐘。

三、臨床尿酸梅法分析尿酸值

尿酸酶法(Uricase method)為酵素分析法，其特異性與準確度較之磷鎢酸法(phosphotungstic acid method)高，其分析的原理是尿酸在尿酸酶氧化分解下，生成尿囊素、二氧化碳及過氧化氫(H₂O₂)。利用此化學反應的原理，被研發而應用於臨床實驗室的方法^(16, 19, 32)如下：

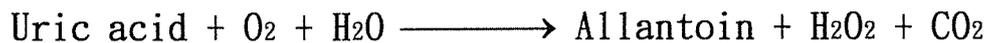
1. 尿酸酶--過氧化酶(uricase-peroxidase method)

2. 尿酸酶--觸酶法(uricase- catalase method)
3. 尿酸酶--紫外線吸收法(uricase-UV method)
4. 尿酸酶--電極法(uricase-electrode method)

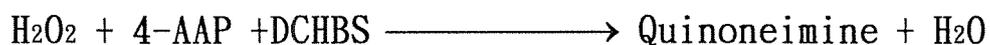
本研究使用尿酸酶--過氧化酶法以測定尿酸值，其分析方法及原理(16, 32)如下：

使用 uric acid reagent 採 timed-endpoint 的方法 (16, 19, 32) 來測量尿酸濃度，尿酸是被 uricase 氧化產生尿囊素(allantoin) 和過氧化氫(H₂O₂)，過氧化氫和 4-aminoanti-pyrine(4-AAP)及 3,5-dichloro-2-hydroxybenzene sulfonate(DCHBS)被過氧化梅(peroxidase)催化反應產生一種有顏色的產物(Quinoneimine)，而使用之血清樣本與 reagent 的體積比率為 1 : 25，吸光波長為 520nm，當 Quinoneimine 顏色愈濃，表示吸光愈大。即當血清樣本的 uric acid 含量愈多，Quinoneimine 的顏色(紅色)就愈濃。其化學反應式如下：

Uricase



Peroxidase



四. 高尿酸血症及痛風診斷之確立

當存在血清中的尿酸單鈉超過其溶解度極限時，血清中之尿酸鹽濃度就會比正常高。在 37°C 下，血漿中尿酸鹽的飽和度為 7.0mg/dl，超過此值時視為高尿酸血症(2)。高尿酸血症之過飽和的體液中所沉積出來的尿酸單鈉結晶，會沉積在軟性組織及關節中，可產生發炎的病灶，稱為痛風石(tophi)。所以，具高尿酸血症、有急、慢性關節炎發作且有尿酸單鈉沉澱物時，即診斷為痛風(2-7, 11)。而診斷之確立均由該醫院內科醫師依上述之情況而定。

五. 資料之統計

血清經尿酸酶法及 HPLC 分析後，將數據整理，以 SAS for window 6.11 version 套裝軟體進行資料處理，依據研究之目的和變項性質，選擇適用的統計法，其中包括平均數與標準差、卡方檢定、單因子變異數分析及薛費氏事後比較等方法(33)。

結果

每個受檢者血清由醫院檢驗科生化室收集後以尿酸酶法分析，再將此血清做適當處理，送至本實驗室進行 HPLC 分析。分析血清樣本前，先做各欲分析物質之標準試劑(standard agent)圖[見圖 6(A)]，而後再打入受檢者血清萃取物，尿酸、1,3-二甲基尿酸及 1,3,7-三甲基尿酸等三種物質，在 10 分鐘內可被完全分離定量，其收回率為 71.2-90.3%，而其出現的曲線依序為尿酸、1,3-二甲基尿酸及 1,3,7-三甲基尿酸[見圖 6(B)]。

一. 不同組別病人血中尿酸值經臨床尿酸酶法(Uricase)及 HPLC 分析之比較

研究對象分正常、高尿酸血症及痛風等三組，每組 32 名，男女人數均相同，總個案數為 96 名，受檢者的血中尿酸經臨床尿酸酶法分析，其平均值在正常組為 4.72 ± 1.19 mg/dl，高尿酸血症組為 9.02 ± 1.34 mg/dl，而痛風組為 8.91 ± 1.04 mg/dl。而 HPLC 分析的結果，正常組為 2.17 ± 1.22 mg/dl，高尿酸血症組為 4.89 ± 2.22 mg/dl，而痛風組為 4.58 ± 2.21 mg/dl。各組均較尿酸酶法分析之值為低，且正常組與高尿酸血症組，以及正常組與痛風組等均有差異，並具統計上之意義（見表一）。

二. 不同組別病人 UUA 與 HUA 之差異和 DMUA、TMUA 的相關

性

由表 2 中知，臨床尿酸酶法與 HPLC 分析尿酸值之差異，比 DMUA 及 TMUA 之和，在各組均較大，顯示受檢者之血清以臨床生化使用尿酸酶法檢查的尿酸值，改以 HPLC 分析之後發現除尿酸外，還有 DMUA、TMUA 以及其他非本實驗欲測之物質。至於 UUA 與 HUA 之差和 DMUA 之值相比較時，其相關係數成負相關，且未具統計上的意義，亦即是 UUA - HUA 的值越大時，DMUA 不一定隨著增大。

再看 UUA - HUA 之差和 TMUA 之值相比較時，其相關係數成負相關，且未具統計上的意義，亦即是 UUA - HUA 的值越大時，TAUM 也未隨著增大。再看表 2 中 UUA - HUA 和 DMUA + TMUA 之值相比較，三組均具統計上的意義($P < 0.05$)。

三. 不同組別之各自變項相關情形

在正常組中，UUA 與 HUA 之值有相關性，且當 UUA 之值越大時，HUA 值也跟著大，至於 DMUA 與 UUA、HUA 均成負相關，即當 UUA、HUA 值越大時，DMUA 並未水隨著增大。而 TMUA 與 UUA、HUA 也有相關且具統計上的差異。當 UUA、HUA 值越大時，TMUA 也跟著大。可見 TMUA 比 DMUA 更會影響血清中之尿酸值[見表 3(A)]。

至於高尿酸血症組及痛風組中，只有 UUA 與 HUA 之值有相關，即當 UUA 之值越大時，HUA 值也跟著大，而 DMUA 及 TMUA 對 UUA 與

HUA 的值之影響，則不具統計上的差異[見表 3(B)、(C)]。

四. 不同組別之點分佈情形

每個受檢者之血清，以臨床尿酸酶法及 HPLC 分析尿酸值，將尿酸酶法分析而得的尿酸值減去以 HPLC 分析而得的尿酸值(即 UUA - HUA)當作 X 坐標，而以血清由 HPLC 測得的兩種尿酸衍生物 1, 3-二甲基尿酸及 1, 3, 7 三甲基尿酸值之和(即 DMUA + TMUA)為 Y 坐標，所形成的點分佈圖形三組，如圖 7(A)、(B)、(C)。

在(A)圖以 UUA - HUA 來預測 DMUA + TMUA 的值，顯示點的分佈集中，表示兩者相關性大，證明在正常組中，當 UUA - HUA 值大時，DMUA + TMUA 值也跟著大。(B)圖以 UUA - HUA 來預測 DMUA + TMUA 的值，顯示點的分佈較不集中，表示兩者相關性較小，也即是在高尿酸血症組中當 UUA - HUA 值大時，DMUA + TMUA 值不一定隨著增大。至於(C)圖，則與(A)有較相同的結果，即是在痛風組中，當 UUA - HUA 值大時，DMUA + TMUA 也跟著大。

五. 低濃度甲基尿酸對尿酸值之影響

由表 2 中知，當 DMUA 及 TMUA 單獨存在受檢者的血清中時，對 UUA - HUA 之影響不具統計上的意義，而當兩者同時存在時會造成對 UUA - HUA 影響，當 UUA - HUA 的尿酸值越大時，DMUA + TMUA 值也越大，而 UUA - HUA 值越小時，DMUA + TMUA 值越小。

那麼，在何種濃度下才會影響？低濃度？高濃度？作者以 1mg/dl 及 2mg/dl 的 DMUA 和 TMUA 去實驗，結果顯示 DMUA 和 TMUA 無論是單獨或兩者同時存在，均對血清中之尿酸值不具影響[見圖 8(A)]。

六. 高濃度甲基尿酸值之影響

作者漸次增加 DMUA 和 TMUA 的濃度一再做實驗，結果在兩者濃度達 10mg/dl 時，開始有影響(未呈現在圖中)，且當兩者濃度達 14mg/dl 時，影響最大，但在統計上仍未達顯著意義[見圖 8(B)]。

討論

從以上數據顯示，人體血清中含茶鹼及咖啡因之代謝物，以尿酸酶法(uricase method)分析時將造成偽陽性，使尿酸值偏高，此結果進一步以 HPLC 方法分析得到印證。

甲基尿酸與咖啡因、茶鹼的相互關係由圖 3 可知，咖啡因在人體中可代謝成甲基物質，其中，TMUA(1, 3, 7-三甲基尿酸)是其最終產物，而茶鹼又可代謝為 DMUA(1, 3-二甲基尿酸)⁽²⁰⁾，此 TMUA 與 DMUA 均屬高溶解性物質，理論上應會和黃嘌呤(Xanthine)產生競爭性抑制作用，去競爭黃嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase)⁽¹⁷⁾，使尿酸的產生相形減少，而干擾尿酸酶法分析的尿酸值，以致造成偽陽性的尿酸值偏高。

過去許多相關的研究中，Buchanan⁽³⁴⁾曾經研究茶鹼、咖啡因攝取對尿酸排泄的關係時，就發現磷鎢酸(phosphotungstate)法在檢定尿酸值時，會被 Caffeine、Theophylline 等干擾分析引起偽陽性的尿酸值增高現象。而 Buchanan⁽³⁵⁾在研究甲基嘌呤代謝，他認為尿酸酶法使用來測定尿酸值不會被 theophylline 的代謝物所影響。Morita⁽³⁶⁾研究男性氣喘病人給予每 12 小時的口服 200 ~ 400mg 的茶鹼，發現病人的尿酸值為 $6.3 \pm 0.4 \text{ mg/dl}$ ，而對照組為 $4.3 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$ ，此值是具有統計上的差異($P < 0.05$)，但同樣方法在女性氣喘病人為 $4.5 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$ ，而對照組為 $3.9 \pm 0.4 \text{ mg/dl}$ ，卻

沒有顯著的差異。Morita⁽³⁶⁾還以靜脈注射 250mg 的 aminophylline 在健康的成年男性病人做研究對象，並沒有產生抑制尿酸清除率的作用，所以，Theophylline 會抑制尿酸清除率的作用是不可能的。Ferrer⁽³⁷⁾以老鼠接受高劑量的咖啡因做實驗，證明了 theophylline 會降低次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HGPRTase)的活性，而有 Lesch-Nyhan syndrome(性聯遺傳疾病)的奇異神經症狀如痙攣、舞蹈症、生長和智能的阻滯之發生。而 Nolan⁽³⁸⁾同樣以 rat 攝取 theophylline 做研究，也證明引起相同的行為，且 caffeine 和 theophylline 抑制 HGPRTase 的活性。後來

Morita⁽³⁶⁾在人類紅血球測驗 theophylline 對 HGPRTase 活性的影響時，發現 theophylline 的濃度必需超過 5mM 時才有輕微的抑制(治療濃度為 0.05 ~ 0.1mM)，因此，他認為 theophylline 誘發血清尿酸的增加，不能被解釋為 HGPRTase 受抑制的影響所致。在各學者的不同研究對象及研究結果中，Theophylline 誘發高尿酸血症的說法及其機制，Morita⁽³⁶⁾和 Yamamoto⁽³⁹⁾都存疑且認為原因不明，並有待進一步的研究。

作者為驗證自己的推論:尿酸酶法分析的血中尿酸值是否受 DMUA 和 TMUA 的干擾，而造成偽陽性的尿酸值增高現象，將受檢病人之血清做尿酸酶法及 HPLC 分析後做比較，發現各不同組別病人血清，經 HPLC 分析之尿酸值(HUA)遠較尿酸酶法分析之值(UUA)為低，其中 HPLC 可測出尿酸及其衍生物 DMUA 和 TMUA，由此可知 HPLC 在分析功能中可提供較多的參考訊息。

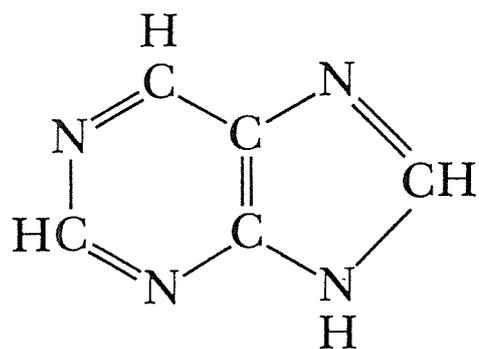
既然 UUA 與 HUA 有差異，和 DMUA 及 TMUA 又有何相關性？在表 2 中，可知 UUA - HUA 和 DMUA 之值成負相關，即 UUA - HUA 的值越大時，DMUA 不一定隨著增大。而 UUA - HUA 和 TMUA 之值的關係也成負相關，即 UUA - HUA 的值越大時，TMUA 也未見得隨著增大。當 DMUA 與 TMUA 二者同時存在病人的血中時，是否影響 UUA - HUA？筆者發現 UUA - HUA 與 DMUA + TMUA 有正相關，且三組病人均具統計上的意義 ($P < 0.05$)，也即是 UUA - HUA 之值越大時，DMUA + TMUA 也越大。

UUA、HUA、DMUA 和 TMUA 等自變項間存在何種關係呢？由表 3(A) 知，正常組的 UUA 與 HUA 之值有相關，當 UUA 之值越大時，HUA 值也跟著大，至於 DMUA 與 UUA、HUA 均成負相關，TMUA 與 UUA、HUA 有相關且具統計上的差異，可見 TMUA 比 DMUA 更會影響血中的尿酸值。而高尿酸血症組及痛風組則只有 UUA 與 HUA 之值有關，即是當 UUA 值越大時 HUA 值也隨著增大，而 DMUA 及 TMUA 對 UUA 與 HUA 之值的影響則不具統計上的意義，也即是 DMUA、TMUA 單獨存在血清中時，對尿酸值沒有影響。

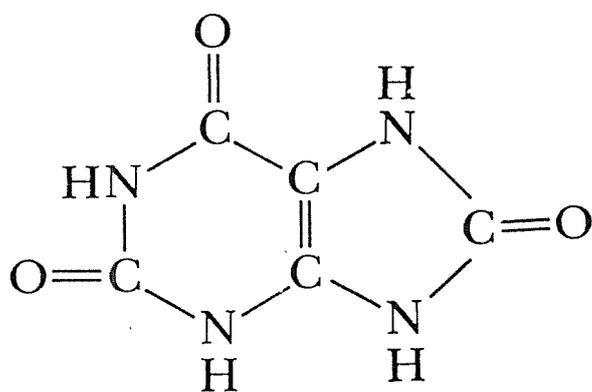
在表 2 已知尿酸值經尿酸酶法及 HPLC 分析之間的差異 (UUA - HUA) 和 DMUA 及 TMUA 之值 (DMUA + TMUA) 有相關，那麼以點分佈情形來看兩者的相關性，在正常組及痛風組中，點的分佈集中，表示 UUA - HUA 值大時，DMUA + TMUA 值也跟著增大，高尿酸血症組中，點分佈較不集中，表示兩者相關性較小，即是 UUA - HUA 值大時，DMUA + TMUA 值不一定隨著增大，顯示 DMUA、TMUA 在不同組別病人對不同尿酸值檢查法，有不同的影響。

最後，探討的是 DMUA 與 TMUA 的濃度是否為尿酸值的一個影響要素？DMUA 與 TMUA 在低濃度時，不論單獨存在或同時存在，對尿酸值均無影響，直到當兩者濃度達到 12mg/dl 時，出現影響，但在統計上仍未達顯著意義。

綜合以上結果證明，HPLC 在分析尿酸的功能上較尿酸酶法有高的靈敏度和特異性；而 HPLC 分析所得之尿酸值均低於尿酸酶法所分析之值，而其間的差異是 DMUA、TMUA 在 HPLC 會被分析出來，且還有一些未知的雜訊；而 UUA - HUA 與 DMUA 及 TMUA 同時存在時成正相關($P < 0.05$)，與任何一者單獨存在時無統計上的意義；受檢者中若含有高濃度的 DMUA 或 TMUA(來自於茶鹼或咖啡因的代謝)時，將影響病人尿酸使用 uricase 法之檢測值偏高。



嘌呤(Purine)



尿酸(Uric acid)

圖 1. 嘌呤、尿酸之結構式

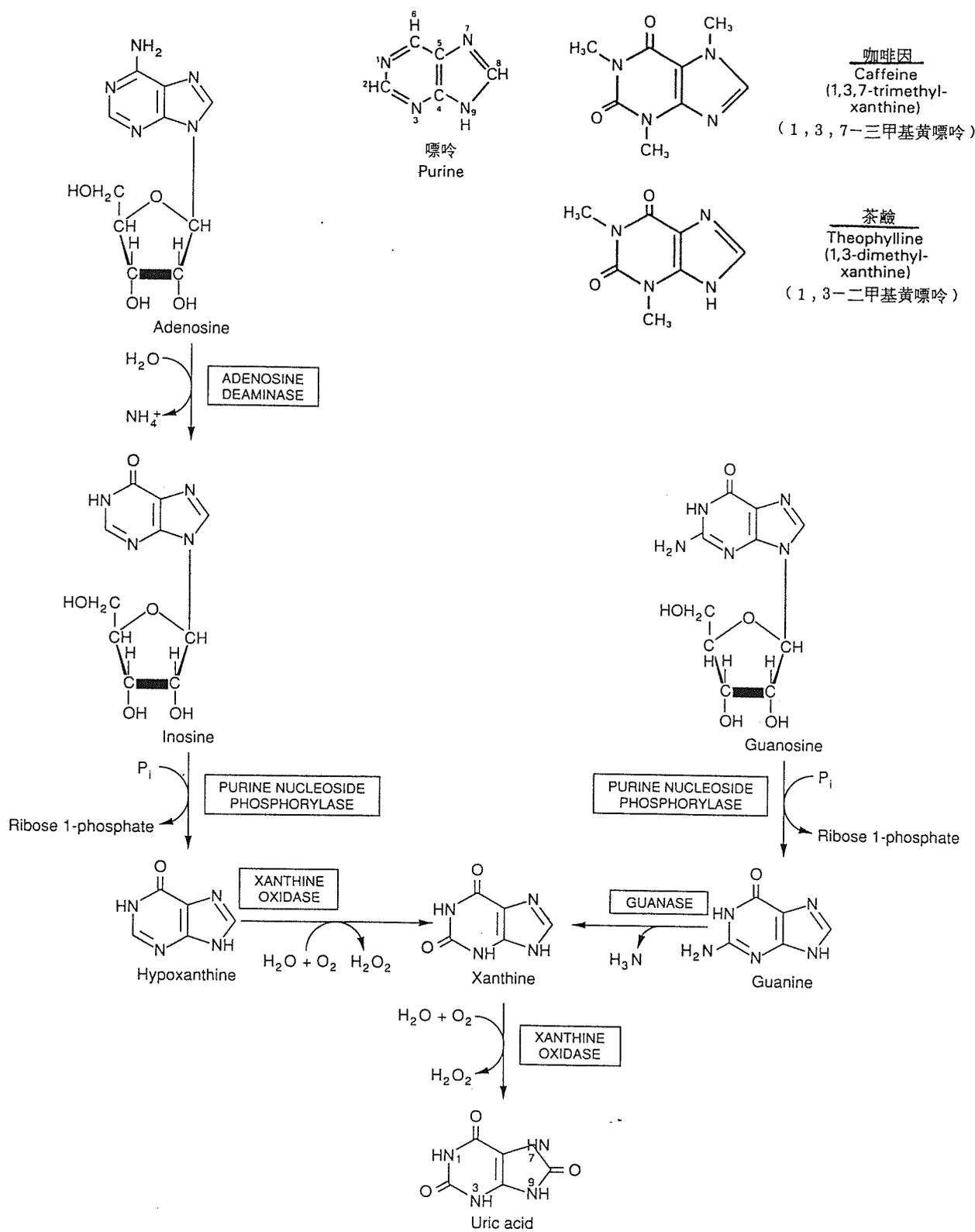


圖 2. 嘌呤(purine)代謝成尿酸的過程

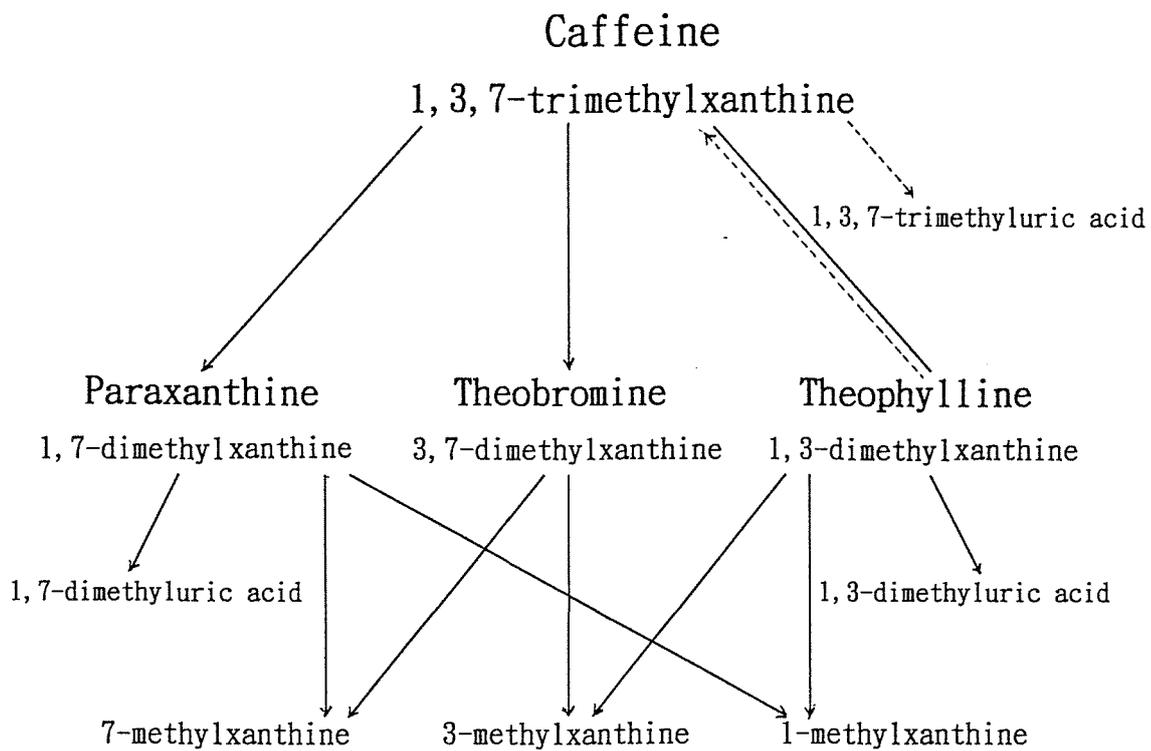
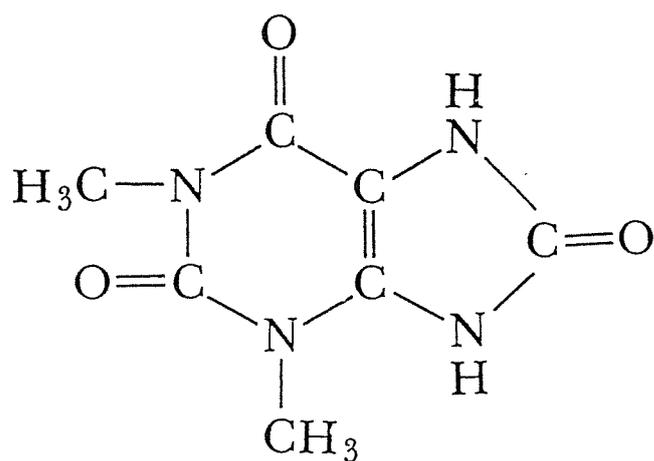
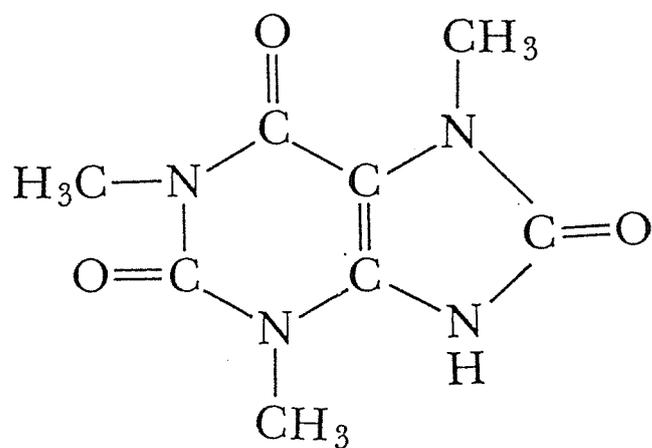


圖 3. 甲基黃嘌呤與甲基尿酸在血中的相互關係 (22)



二甲基尿酸(1,3-dimethyluric acid)



三甲基尿酸(1,3,7-trimethyluric acid)

圖 4. (A) 二甲基尿酸、三甲基尿酸之結構式

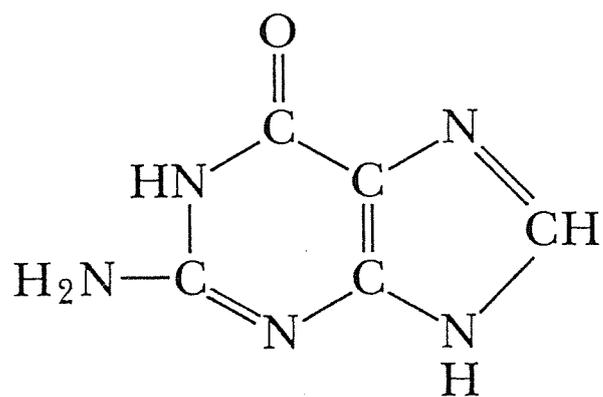


圖 4. (B) 鳥嘌呤(Guanine)之結構式

100 μ l serum+2-Propanol-Dichloromethane(10:90, v:v)1.5ml
(into eppendorf tube)



下層液吸出置入 10×75mm glass tube



上層液+2-Propanol-Dichloromethane(10:90, v:v)1.5ml



再將下層液吸出置入 10×75mm glass tube



以氮氣吹乾(<37°C under agentle stream of oxygen-free nitrogen)



萃取物+100 μ l mobile phase A solution



取 20 μ l 做樣本進行 HPLC 分析

圖 5. 血清樣本尿酸及其衍生物萃取過程

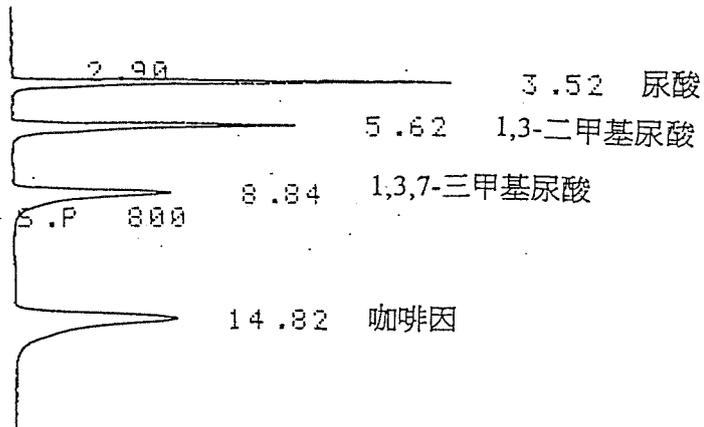


圖 6. (A) 標準試劑 HPLC 分析

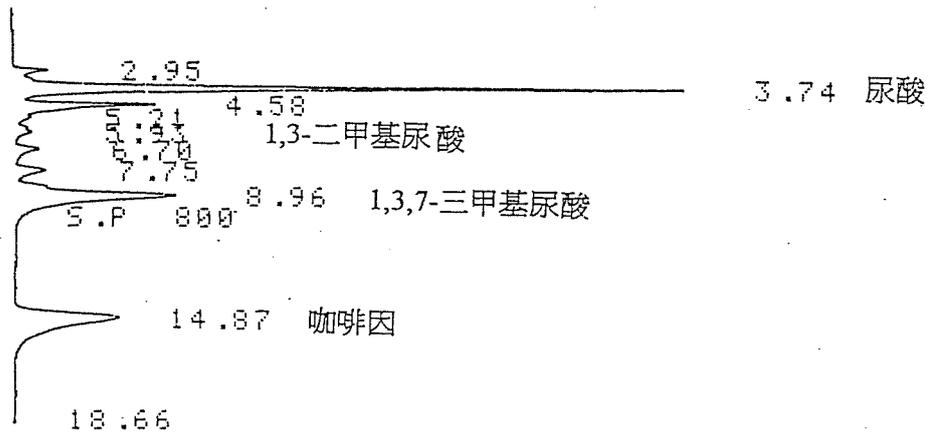


圖 6. (B) 受檢者血清樣本 HPLC 分析

Normal Group

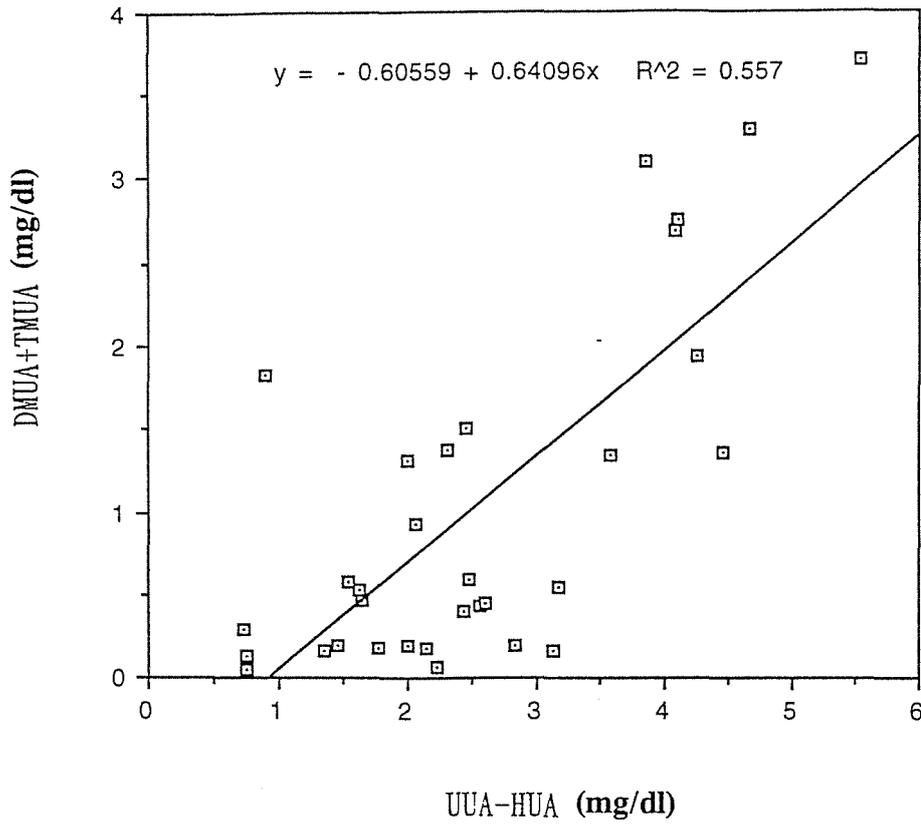


圖 7. (A) 正常組點分佈

Hyperuricemia Group

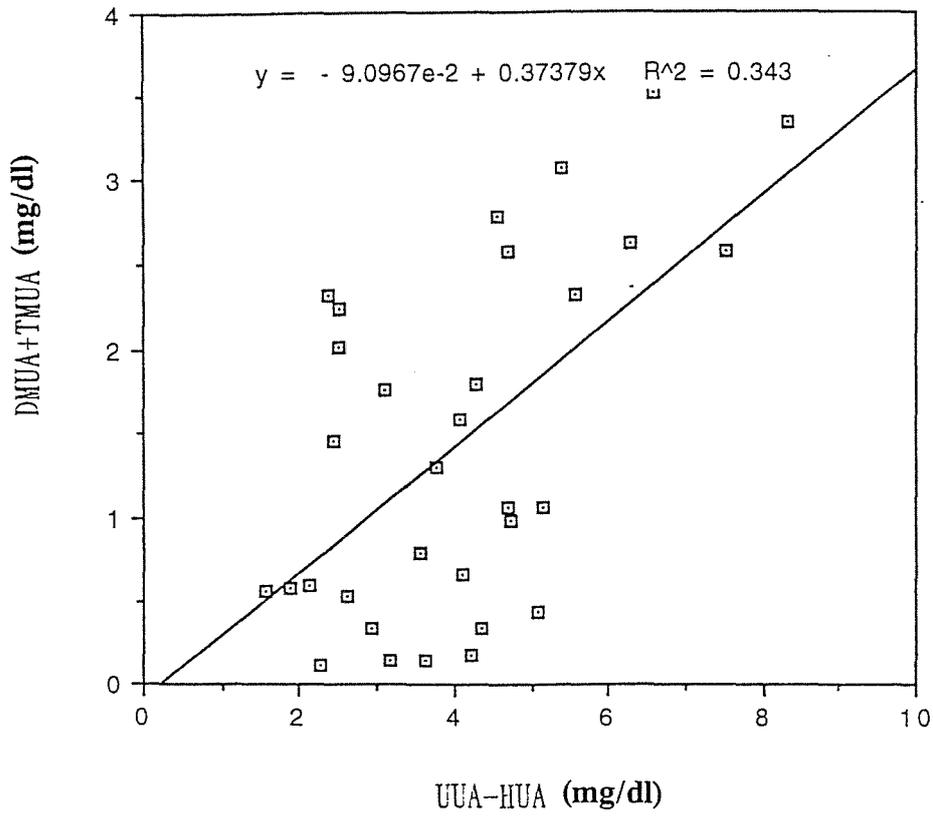


圖 7. (B) 高尿酸血症組點分佈

Gout Group

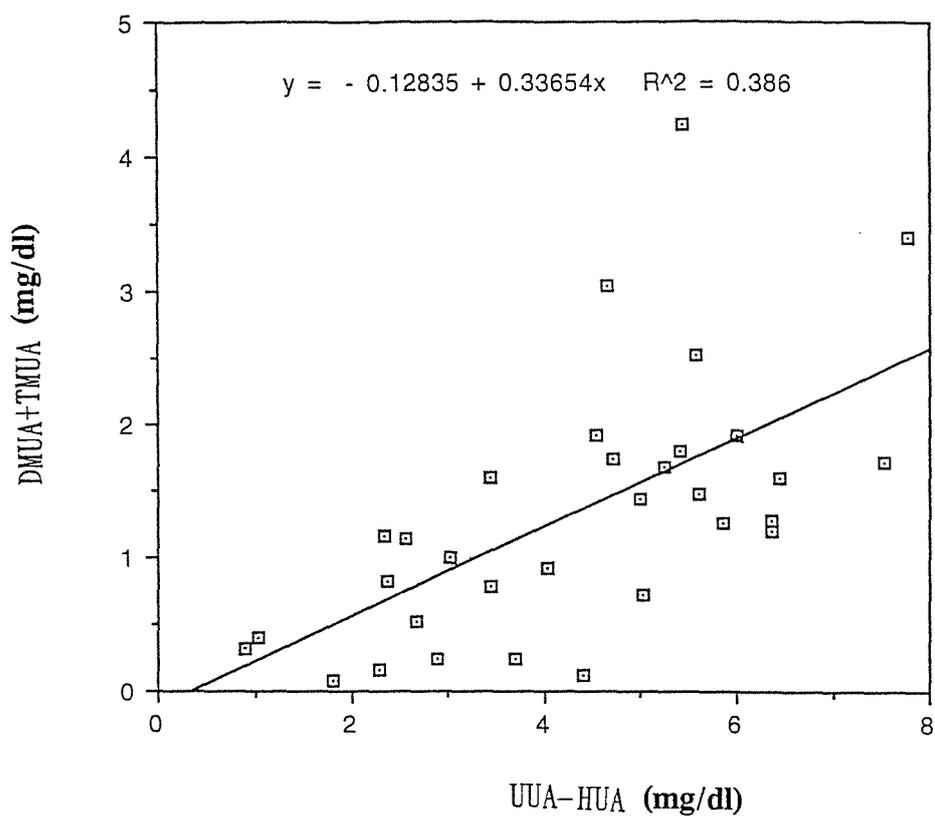


圖 7. (C) 痛風組點分佈

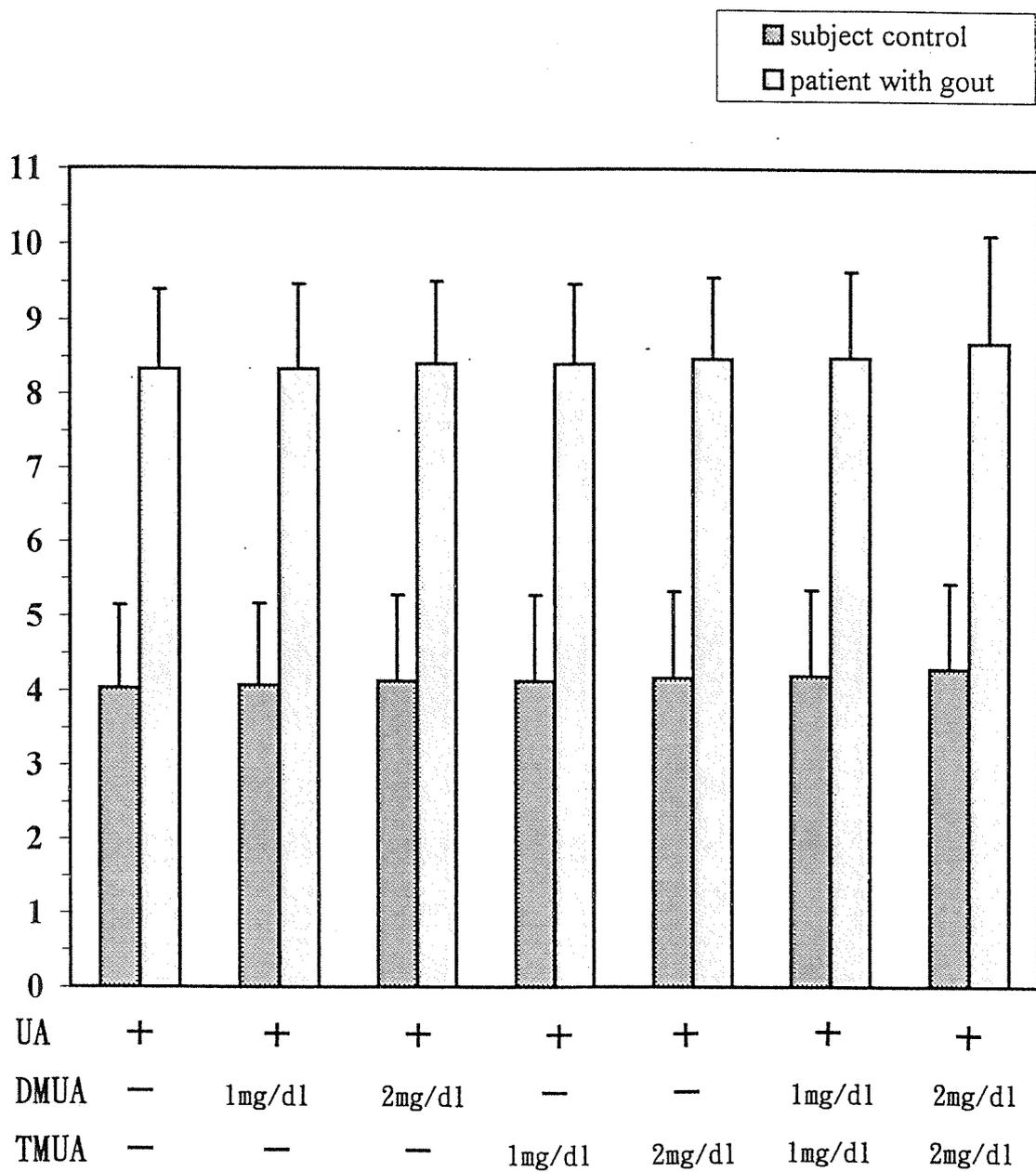


圖 8. (A) 低濃度甲基尿酸對尿酸值之影響

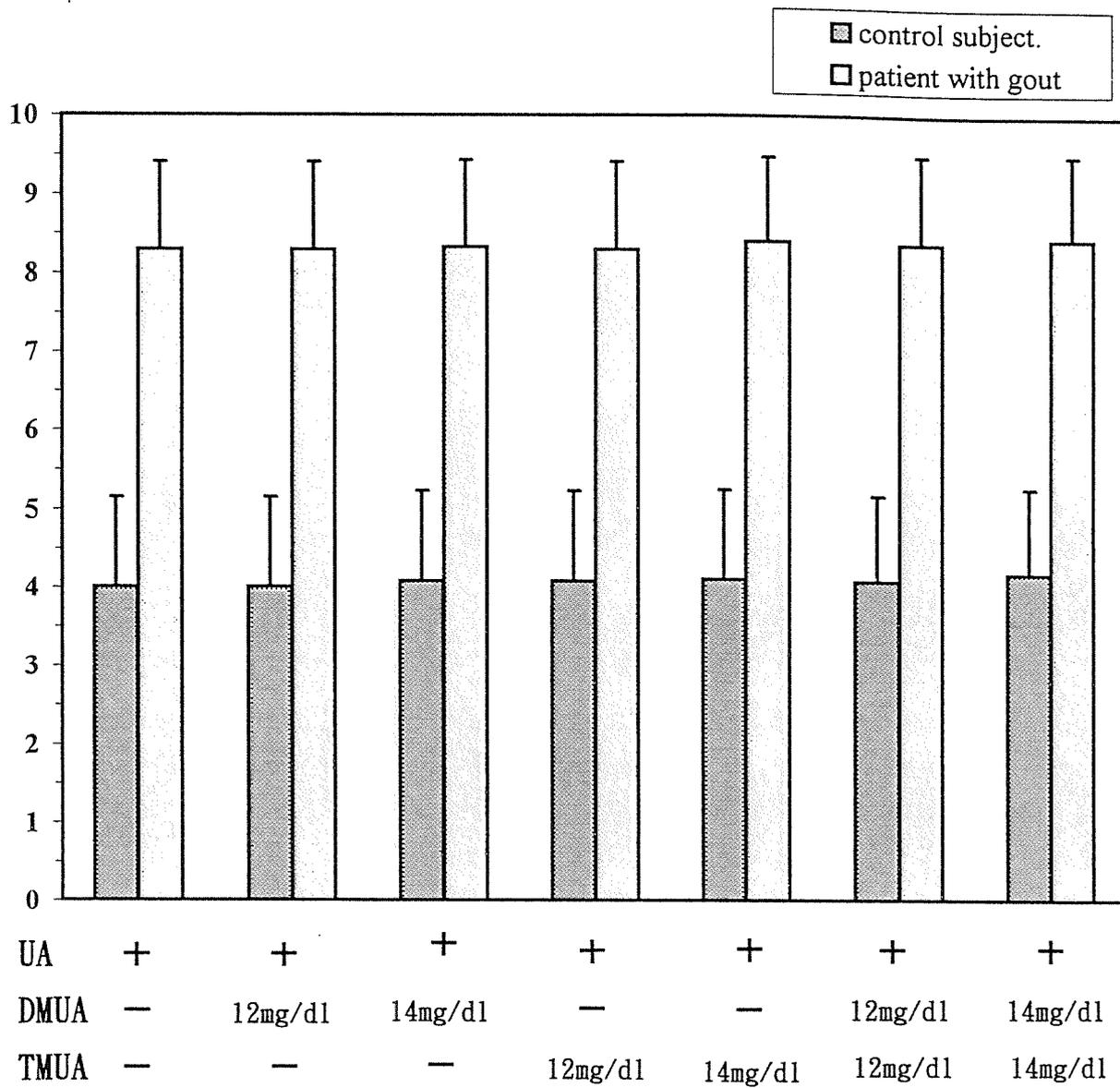


圖 8. (B) 高濃度甲基尿酸對尿酸值之影響

表 1. 不同組別病人血中尿酸值經 Uricase 分析及 HPLC 分析之比較

	正常組 (mg/dl)	高尿酸血症 (mg/dl)	痛風組 (mg/dl)	F 值	Scheff'e 事後檢定
UUA	4.72 ± 1.19 ^a	9.02 ± 1.34	8.91 ± 1.04	134.0**	1/2,1/3
HUA	2.17 ± 1.22	4.89 ± 2.22	4.58 ± 2.21	18.9**	1/2,1/3
DMUA	0.18 ± 0.32	0.42 ± 0.44	0.22 ± 0.36	3.73*	1/2
TMUA	0.85 ± 1.00	1.01 ± 0.85	1.10 ± 1.01	0.57	

註 a: Mean ± SD, n=32. *P<0.05

UUA: 表示以 uricase 分析血清所得之尿酸實際值

HUA: 表示以 HPLC 分析血清所得之尿酸實際值

DMUA: 表示以 HPLC 分析血清所得之 1,3-二甲基尿酸實際值

TMUA: 表示以 HPLC 分析血清所得之 1,3,7-三甲基尿酸實際值

表 2. 不同組別病人 UUA 與 HUA 之差異和 DMUA、TMUA 的相關性

	正常組 (mg/dl)	高尿酸血症組 (mg/dl)	痛風組 (mg/dl)	F 值	Scheff'e 事後檢定
UUA - HUA ^a	2.55 ± 1.24 ^b	4.13 ± 1.59	4.33 ± 1.80	12.45**	1/2, 1/3
UUA - HUA/DMUA	- 0.053 (P=0.770)	- 0.113 (P=0.538)	- 0.075 (P=0.682)		
UUA - HUA/TMUA	0.431* (P=0.014)	- 0.309 (P=0.085)	0.347* (P=0.051)		
DMUA + TMUA	1.03 ± 1.07	1.43 ± 1.05	1.33 ± 0.97	1.32	
UUA - HUA/ DMUA + TMUA	0.747** (P=0.001)	0.570** (P=0.007)	0.622* (P=0.01)		

a: 差異為 Uricase 分析法與 HPLC 分析法之尿酸值

b: Mean ± SD, n=32. *P<0.05; **P<0.01

表 3. 各自變項相關表 (A) 正常組 (B) 高尿酸血症 (C) 痛風組

(A) 正常組	UUA	HUA	DMUA	TMUA
UUA	1			
HUA	1.00**	1		
DMUA	- 0.053	- 0.053	1	
TMUA	0.431*	0.431*	0.090	1

*P<0.05; **P<0.01

(B) 高尿酸血症	UUA	HUA	DMUA	TMUA
UUA	1			
HUA	1.00**	1		
DMUA	0.113	0.113	1	
TMUA	- 0.308	- 0.308	0.234	1

*P<0.05; **P<0.01

(C) 痛風組	UUA	HUA	DMUA	TMUA
UUA	1			
HUA	1.00**	1		
DMUA	- 0.075	- 0.075	1	
TMUA	0.347	0.347	- 0.279	1

*P<0.05; **P<0.01

參考文獻(References)

1. 張錦標：臨床尿酸分析與應用。國防醫學。20:392-399, 1995
2. 陳肇真等譯：Harrison's 內科學。合記。台北。590-598, 1991
3. Statland BE: Clinical decision levels for laboratory tests. Medical Economics Company Inc. Oradell. New Jersey. 2nd edition. 208-209, 1987
4. Wolfe F: Gout and hyperuricemia. AFP Practical Therapeutics. 43:2141-2150, 1991
5. 陳永泰等編譯：病理學。合記。台北。121-127, 1991
6. Harlay A: Hyperuricemia and its complications. Revue de l infirmiere. 42:38-39, 1992
7. Levinson DJ, Becker MA: Clinical gout and the pathogenesis of hyperuricemia, in arthritis and allied conditions, Philadelphia, Lea & Febiger, 12th ed, 1773-1806, 1992
8. 呂傳欽：痛風關節炎。榮總護理。7:326-333, 1990
9. Talbott JH, Yu TF: Gout and uric acid metabolism. New York. Stratton, 1976

10. 周昌德: 臺中縣和平鄉風濕病義診中原住民痛風及高尿酸血症之初步調查報告. 中國風濕病雜誌. 11:67-79, 1995
11. Claudio VS, Laguna RT: Nutrition and diet therapy dictionary. Chapman & Hall. New York 70-108, 243, 1991
12. Brunner & Suddarth's: Medical & Surgical Nursing. J. B. Lippincott. USA. 1432-1433, 1992
13. 袁素娟、陳美倫、郭憲文: 高尿酸血症或痛風病人飲食行為之探討. 1997(正投稿中)
14. 賴守志: 宜蘭縣東澳里東岳村高尿酸血症調查. 疫情報導. 7:99-105, 1991
15. 黃介良、陳國東: 宜蘭縣南澳鄉泰雅族高尿酸血症之流行病學調查報告. 疫情報導. 12:131-141, 1996
16. 何敏夫: 臨床生化學. 合記. 台北. 158-162, 1992
17. Murray RK, Mayes PA, Granner DK & Rodwell VW: Harper's Biochemistry. Appleton & Lange. USA. 333-355, 1990
18. Abeles AH, Frey PA, Jencks WP: Biochemistry. Jones & Bartlett. USA. 722-727, 1992
19. Armstrong FB: Biochemistry. Oxford University Press. USA. 216-221, 415-416, 1989
20. Loenen HM, Eshuis H, Lowik MR, et al: Serum uric

- acid correlates in elderly men and women with special reference to body composition and dietary intake. *J. Clin. Epidemiol* 43:1297-1303, 1990
21. Brand FN, McGee DL, Kannel WB, Strokes IIIJ, Castelli WP: Hyperuricemia as a risk factor of coronary heart disease: the Framingham study. *Am. J. Epidemiol* 121:11-18, 1985
22. LeaKey TEB: Simultaneous analysis of the theophylline, caffeine and eight of their metabolic products in human plasma by gradient highperformance liquid chromatography. *J. Chromato.*, 507:199-220, 1990
23. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE & Kinneary JF: The merch index—an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Merch & Co., Inc.. 1674, 9421, 1996
24. Tanaka E: Simultaneous determination of caffeine and its primary demethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromato.*, 575:311-314, 1992
25. Biochemicals and reagents for life science research. Sigma chemical. USA. 399, 1046, 1997

26. 吳良碧:高性能液相層析法在食品分析上的應用. 食品工業. 19-27, 1987
27. 郭美琴:液相層析儀. 食品香料化學與加工. 食品工業發展研究所. 78-83, 1987
28. Engelhardt H: Practice of high performance liquid chromatography. Springer-Verlag. 1986
29. Kabra PM, Marto LJ: Liquid chromatography in clinical analysis. Chin-Ming. Taipei. 1-47, 1985
30. Hamiton R, & Sewell P: Introduction to high performance liquid chromatography, Halsted press, New York, 1977
31. Lee H, Wang L, & Shih JF: Mutagenicity of particulates from the laboratory combustion of plastics. Mutat. Res., 346. 135-144, 1995
32. Campbell MK: Biochemistry. Sanders college publishing. International edition. 74-75, 537, 1991
33. 李金泉:SAS/PC 實務與應用統計分析. 松崗:台北, 1994
34. Buchanan OH, Christman AA, Block WD: The metabolism of the methylated purines. II. Uric acid excretion following the ingestion of caffeine, theophylline, and theobromine. J Biol Chem 157:189-192, 1945
35. Buchanan OH, Block WD & Christman AA: The meta-

- bolism of the methylated purines. I. The enzymatic determination of urinary uric acid. J Biol Chem 157:181, 1945
36. Morita Y, Nishida Y, Kamatani N & Miyamoto T: theophylline increases serum uric acid levels. J. Allergy clin. Immunol. 74:707-712, 1984
37. Ferrer I, Costell M, Grisolia S: Lesch-Nyhan syndrome-like behavior in rats from caffeine ingestion: changes in HGPRTase activity, urea, and some nitrogen metabolism enzymes. FEBS Lett 141:275-279, 1982
38. Nolan LL, Kidder GW: Caffeine: its action on purine metabolizing enzymes. Biochem Biophys Res Commun 91:253-256, 1979
39. Yamamoto T, Moriwaki Y, Suda M, Takahashi S, Hiroishi K & Higashino K: Theophylline-induced increase in plasma uric acid-purine catabolism increased by theophylline. International Journal of Clinical Pharmacology. Therapy & Toxicology. 29:257-261, 1991

第二部份

茶鹼及咖啡因在鼠肝細胞中對尿酸生成之影響

Effects of Caffeine and Theophylline on the Uric
Acid Formation in the Rat Hepatocytes

縮寫表(第二部份)

HPLC: High performance liquid chromatography

UA: Uric acid

DMUA: 1, 3-Dimethyluric acid

TMUA: 1, 3, 7-Trimethyluric acid

EGTA: Ethylene Glycol-bis(β -amino ethyl ether)N, N'-Tetraacetic Acid

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

PSN: Penicillin, Streptomycin, Neomycin

第二部份

茶鹼及咖啡因在鼠肝細胞中對尿酸生成之影響 Effects of Caffeine and Theophylline on the Uric Acid Formation in the Rat Hepatocytes

摘要

本研究旨在探討茶鹼(1,3-二甲基黃嘌呤)及咖啡因(1,3,7-三甲基黃嘌呤)在大白鼠肝細胞中對尿酸生成之影響，以及此兩種物質是否會與黃嘌呤氧化酶作用，而與黃嘌呤產生競爭性抑制，減少尿酸之形成。將SD-rat以灌流方式取得肝細胞，再依實驗需要之細胞數目培養於含有10%胎牛血清，1% PSN antibiotic mixture，1% Glutamine之Williams E培養基中，置於37℃，5% CO₂之培養箱中培養。肝細胞代謝鳥嘌呤(Guanine)為尿酸的最大量時間5小時，再依Guanine之有、無，分別加入茶鹼、咖啡因以及兩者，分別收集肝細胞培養液，分別以尿酸酶法及HPLC分析，並以SAS軟體進行統計分析。結果顯示：在茶鹼及咖啡因存在下有降低鳥嘌呤生成尿酸之趨勢，且大部分具統計上意義，同時此兩種物質都會與黃嘌呤氧化酶作用，而與黃嘌呤產生競爭性抑制，減少尿酸之形成。但較高濃度之茶鹼或咖啡因可能也部分形成尿酸，造成提升血清之尿酸增加。

關鍵詞(Key word):

1, 3-二甲基黃嘌呤(1, 3-Dimethylxanthine);

1, 3, 7-三甲基黃嘌呤(1, 3, 7-Trimethylxanthine);

茶鹼(Theophylline);

咖啡因(Caffeine);

鳥嘌呤(Guanine)

黃嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase);

競爭性抑制(Competitive inhibition)

Effects of Caffeine and Theophylline on the Uric Acid Formation in the Rat Hepatocytes

Abstract

The present study was to investigate effects of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) and theophylline (1,3-Dimethylxanthine) on the uric acid formation in the rat hepatocytes, and to determine whether these two substances can react with xanthine oxidase, and compete with xanthine, thus inducing competitive inhibition and decreasing the formation of uric acid.

Hepatocytes of SD-rat could be obtained by perfusion. According to the cell numbers of experimental requirement, hepatocytes were then cultured in the William E medium which contained 10% serum of cow embryos, 1% PSN antibiotic mixture and 1% Glutamine, at 37 °C in the culture chamber with 5% CO₂. Hepatocytes metabolized guanine to uric acid exhausting 5 hours most, then, depended on possessing guanine or not, added in caffeine, theophylline and both in separate, and collected their culture liquids individually. After that, using uricase method and HPLC(High Performance Liquid Chromatography) to analyze them independently and using SAS software to do statistical analysis.

Conclusion :The uric acid formation which comes of

guanine has a decreasing tendency in existence of caffeine and theophylline, and almost all has statistical meaning. Meanwhile both substances can react with xanthine oxidase, and compete with xanthine, thereby inducing competitive inhibition and decreasing the formation of uric acid. However, in higher concentration, possibly part of caffeine and theophylline forms uric acid, thus increasing the contents of uric acid in the sera.

緒論

尿酸是人體嘌呤代謝的最主要終產物，嘌呤主要來源有三方面，即身體的合成、組織中核酸的分解以及飲食中的核蛋白(如魚、肉、豆及內臟類)。正常人一般飲食，每天約可產生尿酸 750mg，其中有 60-80%經腎絲球過濾後，由尿液排出，剩餘的由膽汁、胃液、腸液，經由細菌分解後由糞便排泄⁽¹⁾。正常人血中尿酸值在尿酸的生成率相當於排泄率時會維持一種恆定值，當存在血中的尿酸超過其溶解極限時，血中的尿酸濃度即會增高^(2,3)，一般在 37 °C 時，血清尿酸飽和度為 7mg/dl，超過此值時即屬高尿酸，當病人沒有任何痛風症狀，僅只尿酸高時，稱為高尿酸血症。有的高尿酸血症者會因此而產生尿酸鹽堆積在軟的、骨骼組織像關節、軟骨及肌腱處，而引發痛風性關節炎及腎結石的危險症狀⁽⁴⁻⁶⁾。血中尿酸濃度越高，罹患痛風的機率也就越大，此外，長期的「高尿酸血症」也可引起腎臟疾病、尿道結石，甚至合併高血脂症、糖尿病或心臟病⁽⁵⁻⁷⁾。中老年人的血中尿酸值也常有偏高的情形，黃氏⁽⁸⁾研究高尿酸血症之流行病學調查發現，中老年人血中尿酸值偏高和高血壓、糖尿病、心臟病、腎臟病及飲食營養有密切關係，由此而知高的尿酸值可帶來互為因果的許多疾病是不容忽視的。

探究尿酸值偏高的原因，首先是高嘌呤食物如內臟、海產食物、魚類、家禽、肉汁、豆類、香菇、銀耳、紫菜等的攝取，或含酒精的飲料，還有長期服用利尿劑、阿斯匹靈^(3-5,9)，過去的研究均證明

前述情形都會導致尿酸濃度增高情形。至於茶、咖啡是我們平日很普遍且常飲用的食品成份，其中所含的茶鹼(Theophylline)和咖啡因(Caffeine)是否與尿酸值有相關，是本研究所要探討的。

作者依第一部份的研究結果得知茶鹼及咖啡因代謝物之 DMUA 和 TMUA 在高濃度時，且二種同時存在時，會促使尿酸值偏高。而進一步欲瞭解茶鹼及咖啡因是否會與黃嘌呤氧化酶作用，在尿酸生成上又扮演何種角色，是本研究之目的。因此作者以鼠肝細胞進行分析，而研究進行相關內容敘述如下：

一. 茶鹼(Theophylline ; 1,3-Dimethylxanthine)

是 Theobromine 的同質異構物，分子式為 $C_7H_8N_4O_2$ (見圖 1)，分子量為 180.17 dalton。少量的茶鹼含在茶中，是由二甲基尿素(Dimethylurea)和乙基氰化醋酸鹽(ethyl cyanoacetate)開始合成，1,3-二甲基尿酸是其終產物，茶鹼有利尿的作用且是心臟興奮劑，平滑肌的鬆弛劑。不吸煙者，半衰期 7-9 小時，吸煙者為 4-5 小時，一天口服 16mg/kg 分 3 或 4 劑，廣泛被使用來治療支氣管氣喘之治療，副作用有嘔心、嘔吐，而暈眩可能發生(4, 9-12)。

二. 咖啡因(Caffeine ; 1,3,7-Trimethylxanthine)

分子式 $C_8H_{10}N_4O_2$ (見圖 1)，分子量為 194.19 dalton，咖啡因存在茶、咖啡、可樂飲料、巧克力、可可及許多感冒的成藥中，適當

的攝取可達到提神醒腦的效果。其分子式 $C_8H_{10}N_4O_2$ (見圖 1)，分子量為 194.19 dalton，它可代謝為甲基物質，茶鹼為其中間產物，1, 3, 7-三甲基尿酸(TMUA)及一甲基物質為其終產物，咖啡因有利尿、增加胃酸分泌、心臟及呼吸興奮作用。半衰期為 3-10 小時，口服 200mg/1 次，每天用量超過 1gm 可能出現思考及語言的散漫、心律不整及激動，副作用有神經不安、失眠、神經質、心跳快速也可能發生(4, 9-10, 13)。

三. 黃嘌呤(Xanthine)

是腺嘌呤(adenine)和鳥嘌呤(guanine)異化作用時的中間產物，它是低黃嘌呤氧化作用或鳥嘌呤脫氨基作用水解而形成。黃嘌呤的氧化作用是受黃嘌呤氧化酶催化而成尿酸，尿酸則是人類嘌呤(purine)代謝的主要終產物(4, 5, 12)。

四. 黃嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase)

黃嘌呤氧化酶可催化次黃嘌呤(hypoxanthine)氧化成黃嘌呤，最後形成尿酸，在肝、小腸及腎中都可發現這些酵素，它也催化許多種類的醛使其氧化(4, 5, 12)。

五. 鳥嘌呤(Guanine)

是原核生物與真核生物的核苷酸中，主要的嘌呤鹼基之一，是與胞嘧啶(cytosine)配對，分子式為 $C_5H_5N_5O$ [見第一部份圖 4(B)]，分子量為 187.60 dalton，溶解於微酸中。鳥嘌呤會經由鳥嘌呤酶(guanase)的作用代謝成黃嘌呤(xanthine)，再經黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)作用分解成尿酸(4, 14-15)。

六. 高效液相色層分析(High performance liquid chromatography ; HPLC)

HPLC 是一種化學分析的技術，發展在 1960 年代，1970 年代以穩定進步且被應用，在 1979 年首先被提出應用在尿酸之測定，這是一種能夠快速而非破壞性的使複雜混合物分離成為個別成份的方法，是在高壓下利用數種不同的物理特徵(如吸附力、溶解度...等)，將一混合物置於兩種不同相(即固定相與移動相)下之相對作用，而把其中的成份一一分離。其基本的裝置包括溶媒供應(Solvent supply)、高壓幫浦(High pressure pump)、樣本注入裝置(Injector)、填充可耐高壓的固定相(Stationary phase)物質的管柱(Column)、檢出器(Detector)與記錄器(Recorder) (16-20)。

材料與方法

一.動物來源

SD-rat 雄性大白鼠(約 200gm 重)購自臺大醫院動物中心，使用前至少飼養於動物房一周。在動物房中以 Purina Lab Chow 為飼料，蒸餾水不限制飲用，並維持在 12 小時亮及 12 小時暗的循環中。

二.取肝細胞的步驟及培養

肝細胞的取得與培養係根據 Bonney 氏等之方法⁽²¹⁾並參考 Butterworth 氏之研究⁽²²⁾，以肝臟灌流方式而得(two stage liver perfusion method)。

1. 老鼠秤重, 麻醉老鼠。
(每 100g 體重 0.2ml 的 Pentobarbital 50mg/ml 打腹腔)
2. 固定老鼠，由肛門上方剪開，成 V 字形，達劍突下方(蓋住劍突避免感染)。
3. 將內臟往右撥開，找出肝門靜脈。
4. 以 20G 血管導管穿刺肝門靜脈(插管與血管平行，讓針管看得見)。
5. 拔除內面針管留下軟針。
6. 待血液由針尾流出接上 A 液管。(加有 EGTA 而不含鈣、鎂離子之 HBSS 緩衝液灌流管)

- (事先將 A 液管和幫浦連接好，將管內充滿 A 液，不可有氣泡)
7. 打開幫浦後立刻剪斷下腔靜脈。
 8. A 液灌流 100ml，留 50ml 洗肝臟用。
 9. 先夾住下腔靜脈，剪開上腔靜脈，換上 B 液(HBSS 緩衝液)灌流 100ml，按摩肝臟(要使用前才將 B 液中加入 Collagenase(100unit/ml)40mg 混勻，注意:Collagenaase 未使用前須放於冰上，Collagenase 可以破壞肝臟的結締組織)。
 10. B 液灌流後，再以 A 液灌流 25ml，剩下的用來泡 Liver 置於冰上(以下所有動作要在冰上進行)。
 11. 在無菌操作台內小心將肝臟放入培養皿中，用剪刀迅速剪碎肝臟。
 12. 用篩子過濾到無菌燒杯中，再用 William E(OK)沖洗肝臟碎片。
 13. 將無菌燒杯中的液體抽入無菌離心管中(分 4 管，離心 600 rpm, 4 °C，10 分鐘)。
 14. 抽去上層液，加入 William E(OK)使細胞懸浮，比例為: (William E+Cell): (Percoll+HBSS)=3:2 (30ml:20ml) (Percoll+HBSS)混合比例為 Percoll:HBSS=9:1 (18ml:2ml)。
 15. 離心 600 rpm，4 °C，10 分鐘。
 16. 取下層活細胞，將上層死細胞及液體抽除，加入 William E(OK)使細胞懸浮(因 Liver Cell 滲透性高，故沉於下層)。
 17. 以顯微鏡數細胞數目(Cell:Trypan Blue=1:1 各取 100ml 充份混合)。
 18. 細胞數目(Cell/ml)=(5 大格活細胞總數/5)× 2 × 10⁴。
 19. 一盤 5ml 約種 1.0 × 10⁶，1ml 純細胞加 4ml William E(非 OK)的培養基中，將之置放 37 °C，5% CO₂ 培養箱中培養。

20. 於 12hrs 後更換培養基，除去未貼壁之細胞，更換的 William E 視培養時間選用 OK 的。

三. 藥物來源

1. 購自美國 Sigma Chemical Company

(1) Uric acid(2, 6, 8-Trihydroxypurine) Sodium salt

(2) Guanine

(3) Theophylline(1, 3-Dimethylxanthine)

(4) Caffeine(1, 3, 7-Trimethylxanthine)

2. 購自德國 Merck 公司

(1) Acetonitrile(氰甲烷)

(2) 2-Propanol

(3) Sodium acetate anhydrous

(4) Tetrahydrofuran

3. 購自皓峰企業股份有限公司

(1) Acetonitrile(氰甲烷)，LC 級

(2) Dichloromethane(二氯甲烷)，LC 級

4. Glacial acetic acid(冰醋酸)購自聯工化學廠股份有限公司

5. Uric acid regent(Uricase method)購自美國 Beckman

四. 實驗方法

將貼壁後的細胞培養液換成 William E(OK)，每盤視不同情況需要分別加入 3cc 或 4cc 的 William E(OK)，再置入 incubator 中，按研究設計圖示⁽²³⁾分別依下列所述加以處理：

	01	X	02
R			
	03		04

01: 介入物品前之培養液

02: 介入物品後之培養液

R: randomization

03、04: 控制組之培養液

X: 介入物品

(A) Guanine

(B) Theophylline

(C) Caffeine

(D) Theophylline and Caffeine

(A) 時間與肝細胞代謝 Guanine 為尿酸之實驗

--- 目的在找出代謝 maximum 的時間

1. 由 incubator 隨機取出 3 盤，不加任何物品直接吸出放試管中，此為控制組。

2. 再由 incubator 取出剩下的 24 盤，加入已溶解好之 Guanine 使每盤中分別為 Guanine 0.5mg/ml，再置入 incubator，分別於 1、2、3、4、5、6、7、8 小時每一次隨機取 3 盤，直接吸出放試管中(所得結果如圖 2)。

(B) 茶鹼(Theophylline; 1, 3-Dimethylxanthine)對 Guanine 代謝生成尿酸之實驗(見表 1)

1. 由 incubator 隨機取出 3 盤，不加任何物品直接吸出放試管中，此為控制組。
2. 再由 incubator 取出剩下的 9 盤，加入已溶解好之 Theophylline，使分別為 Theophylline 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml，各 1ml 於 3 盤，再置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為控制組。
3. 由 incubator 隨機取出 3 盤，加 Guanine 於每盤中，使 Guanine 之量為 0.5mg/ml 置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為實驗組。
4. 再由 incubator 取出剩下的 9 盤，加入已溶解好之 Guanine 0.5mg/ml，1ml 於每盤中，再分別加入 Theophylline 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml 各 3 盤，每盤均加入 1ml，置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為實驗組。

(C) 咖啡因(Caffeine; 1, 3, 7-Trimethylxanthine)對 Guanine 代謝生成尿酸之實驗(見表 2)

1. 由 incubator 隨機取出 3 盤，不加任何物品直接吸出放試管中，此為控制組。
2. 再由 incubator 取出剩下的 9 盤，加入已溶解好之 Caffeine，使分別為 Caffeine 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml，各 1ml 於 3 盤，再置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為控制組。
3. 由 incubator 隨機取出 3 盤，加 Guanine 於每盤中，使 Guanine 之量為 0.5mg/ml 置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為實驗組。
4. 再由 incubator 取出剩下的 9 盤，加入已溶解好之 Guanine 0.5mg/ml，1ml 於每盤中，再分別加入 Caffeine 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml 於 3 盤，每盤均加入 1ml，置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為實驗組。

(D) 茶鹼(Theophylline)與咖啡因(Caffeine)對 Guanine 代謝生成尿酸之實驗(見表 3)

1. 由 incubator 隨機取出 3 盤，不加任何物品直接吸出放試管中，此為控制組。

2. 再由 incubator 取出剩下的 9 盤，加入已溶解好之 Theophylline 及 Caffeine 各 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml 各 3 盤，每盤均加入 1ml，再置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為控制組。
3. 由 incubator 隨機取出 3 盤，加 Guanine 0.8mg/ml，1ml 於每盤中，再置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為實驗組。
4. 再由 incubator 取出剩下的 9 盤，加入已溶解好之 Guanine 0.5mg/ml，1ml 於每盤中，再分別加入 Theophylline 及 Caffeine 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml 各 3 盤，每盤均加入 1ml，再置入 incubator 中，等 5 小時後取出直接吸出放試管中，此為實驗組。

五. 臨床分析尿酸值

使用 uric acid reagent 採 timed-endpoint 的方法^(15, 24-25)測量每一樣本之尿酸濃度(方法如第一部份)。

六. 高效液相色層分析(High performance liquid chromatography; HPLC)

參考 Leakey⁽²⁶⁾的研究方法，取每一 sample 之溶液 100 毫升 (μ l)，以異丙醇(2-Propanal)和二氯甲烷(Dichloromethane)用 1:9

的混合液做溶劑萃取，共萃取二次，每次使用 1.5 毫升的溶劑，將下層液吸出，置於 10 × 75mm 的玻璃試管中，再將試管置於 heater block 上(溫度控制在 37 °C 以下)，以氮氣(oxygen-free nitrogen)吹乾。吹乾的萃取物加入 100 毫升 mobile phase A 溶劑去溶解，溶解後再離心 5min，取 20 毫升進行 HPLC 分析(流程如第一部份圖 5)。

經前處理之萃取物參考 Leakey⁽²⁶⁾、Snyderwine⁽²⁷⁾及 Lee⁽²⁸⁾之研究方法，取 20 μ l 做樣本直接注射入高效液相色層分析儀，其分析條件見第一部分。

七. 資料之統計

血清經尿酸酶法及 HPLC 分析後，將數據整理，以 SAS for window 6.11 version 套裝軟體進行資料處理，依據研究之目的和變相性質，選擇適用的統計法，其中包括平均數與標準差、卡方檢定等方法⁽²⁹⁾。

結果

將 SD-rat 以灌流方式取得肝細胞，每盤培養皿中，約種 1.0×10^6 個純細胞 1ml，再加入 4ml 含有 10% 胎牛血清，1% PSN antibiotic mixture，1% Glutamine 之 Williams E 培養基，而後置於 37 °C，5% CO₂ 之培養箱中培養，12 小時後更換培養基(仍是 4ml)，加入溶解好之鳥嘌呤(Guanine)0.5mg/ml，1ml 於每盤中，再置入 incubator，分別於 1、2、3、4、5、6、7、8 小時取出培養皿，收集培養溶液，再以尿酸酶法及 HPLC 分析尿酸值，找出鳥嘌呤代謝的最大量的時間，由圖 2 可知是培養後 5 小時。

依肝細胞中有、無鳥嘌呤之加入，分別進行茶鹼、咖啡因以及兩者同時存在下之實驗，並依不同濃度進行之。首先由表 1 知，當 Theophylline 單獨以 0.1mg/ml、0.2 mg/ml 及 0.4 mg/ml 的濃度在肝細胞中 5 小時後取出溶液分析，無論是尿酸酶法或 HPLC，尿酸值均因 Theophylline 的濃度倍數增加而有漸次增加的情形。另一組添加 Guanine 0.5 mg/ml 的實驗中，測出的尿酸值比單獨 Guanine 0.5mg/ml 時有意義的下降，但在 Theophylline 三種以倍數增加的不同濃度中，其尿酸值亦漸次增加，但較之無 Guanine 之控制組的尿酸值仍然較低。

表 2 是以 Caffeine 單獨以 0.1mg/ml、0.2 mg/ml 及 0.4 mg/ml 的濃度在肝細胞中 5 小時後取出溶液分析，無論是尿酸酶法或 HPLC

方法加以分析，尿酸值也同 Theophylline 的實驗有隨倍數增加而漸次增加的情形。在另一組添加 Guanine 0.5 mg/ml 的實驗中，不論是尿酸酶法或 HPLC，測出的尿酸值有意義的下降，而不論 Guanine 有或無的實驗，其尿酸值有比 Theophylline 較明顯的減少，這是值得注意及探討的。

表 3 是以 Theophylline 和 Caffeine 同時各以 0.1mg/ml、0.2 mg/ml 及 0.4 mg/ml 的濃度在肝細胞中 5 小時後取出溶液分析，無論是尿酸酶法或 HPLC 檢測，尿酸值也有隨倍數增加而漸次增加的情形。在另一組添加 Guanine 0.5 mg/ml 的實驗中，測出的尿酸值仍然有意義的下降，但較之單獨 Theophylline 或 Caffeine 存在時較偏高些，這其中要說明的是此兩物質的濃度是其單獨存在時之總和，也即是表 3 的實驗中 Theophylline 和 Caffeine 的量是它們單獨實驗時之和，因此，實際上它們同樣降低 Guanine 生成尿酸。

再探究 Guanine 降低尿酸之生成，以 HPLC 分析的結果，由表 1 中可知 Theophylline 代謝成 DMUA 的量有隨 Theophylline 之濃度增加而增高的現象。表 2 中 Caffeine 則代謝物 TMUA 的量有隨 Caffeine 之濃度增加而增高的現象而其 DMUA 的量很小，因而未列入表中。表 3 中則同時有 DMUA 及 TMUA 的代謝物，這些 DMUA 及 TMUA 將是影響 Guanine 生成尿酸時的原因之一。

討論

由以上結果顯示，在鼠肝細胞中，茶鹼及咖啡因有抑制鳥嘌呤代謝為尿酸的作用。鳥嘌呤是原核生物與真核生物的核苷酸(核酸的構造單位)中二個主要的嘌呤鹼基之一[另一為腺嘌呤(adenine)]，它會經由鳥嘌呤酶(guanase)的作用分解成黃嘌呤(xanthine)，再經黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)作用氧化為尿酸(見圖3)。在這過程中，外加一些物質有時會帶來尿酸值之增高的現象，研究者欲找出其原因，而有了以下諸多研究內容。

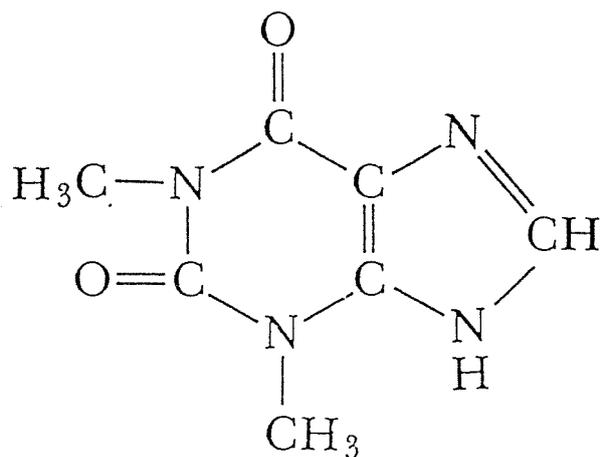
Morita⁽¹¹⁾在人類紅血球測驗 theophylline 在次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HGPRTase)活性的影響，發現 theophylline 的濃度在超過 5mM 時，才有輕微的抑制，而治療濃度只要 0.05-0.1mM，因此，theophylline 誘發血清中的尿酸值增高，是不能被解釋為 HGPRTase 受抑制的影響。Yamamoto⁽³⁰⁾也以人類紅血球測驗 theophylline 在 HGPRTase、5'-核苷酸酶(5'-nucleotidase)、腺嘌呤核苷去氨基酶(adenosine deaminase)和嘌呤核苷磷酸化酶(purine phosphorylase)等的嘌呤代謝過程所需之酶活性的影響，發現茶鹼不會影響核苷酸的濃度，也不影響嘌呤代謝酶的活性，而 theophylline 誘發血清中的尿酸值增高，可能是嘌呤降解所導致。Ferrer⁽³¹⁾以老鼠接受高劑量的 Caffeine 做實驗，證明降低了 HGPRTase 的活性而有 Lesch-Nyhan syndrome-like 行為(一種性聯遺傳疾病)出現。Birkett⁽³²⁾

研究治痛風藥 allopurinol 顯示在人體內黃嘌呤會將一甲基黃嘌呤轉換成一甲基尿酸。Nolan⁽³³⁾研究 Caffeine 在嘌呤代謝中有酶存在時的作用指出，Caffeine 在人體內或體外有嘌呤代謝酶存在下，有抑制的作用，但 Caffeine 沒有干擾嘌呤的輸送過程。而甲基嘌呤(茶鹼)是一種弱的嘌呤抑制劑。事實上，在第一部份作者提過，到目前為止，學者們對 theophylline 誘發高尿酸血症的機制，原因仍然不明作者為驗證鳥嘌呤生成尿酸時，添加或服用 theophylline、Caffeine 會造成影響，而採不同檢測方法以期瞭解其原因。

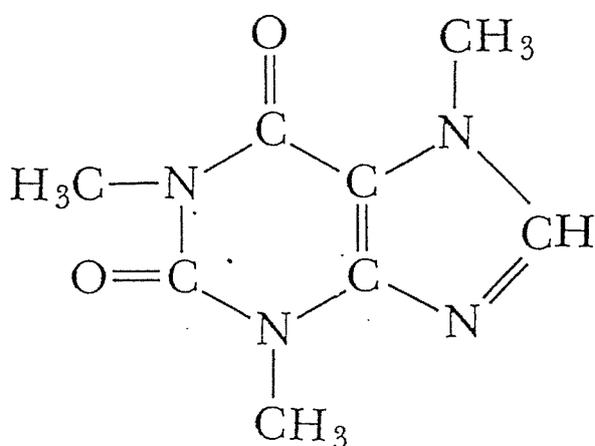
由圖 2 中，已知 Guanine 代謝的最大時間是 5 小時，實驗時以此時間做為實驗物質由培養箱中取出培養基的時間，由表 1、2、3 中，有一共通點，即不論用尿酸酶法或 HPLC 分析，尿酸值均隨加入之物質濃度改變，當濃度越高時，尿酸值也越高。而實驗組有加 Guanine 的，其尿酸值均有明顯的下降後，在隨加入物質之濃度改變，也是濃度越高時，尿酸值也越高，但再高也低於單獨 Guanine 存在時，這顯示無論是茶鹼或咖啡因在鳥嘌呤生成尿酸上均有影響，且大部份具統計上的意義，也同時此兩者物質都會與黃嘌呤氧化酶作用，而與黃嘌呤顯然有產生競爭性抑制，也減少了尿酸的形成。

Theophylline 和 Caffeine 促使尿酸值偏高總歸有幾種可能原因，除了上述幾種可能原因外，theophylline、Caffeine 與 Guanine 可能競爭黃嘌呤氧化酶，導致尿酸生成減少，而 theophylline、Caffeine 的代謝物 DMUA 和 TMUA 干擾，導致偽陽性尿酸值偏高；或 DMUA、TMUA 生成後以脫甲基的方式形成尿酸，使尿酸

增加，Birkett⁽³¹⁾的研究顯示甲基黃嘌呤可氧化成甲基尿酸，這印證了第二種可能原因。第三種可能是 theophylline 和 Caffeine 先脫甲基後成為黃嘌呤，再與黃嘌呤氧化酶作用而形成尿酸。而作者以為 theophylline 和 Caffeine 存在下有降低鳥嘌呤生成尿酸的情形，可能是 theophylline 和 Caffeine 與黃嘌呤競爭黃嘌呤氧化酶，而導致尿酸生成減少，而 DMUA、TMUA 的存在干擾尿酸酶法測出之尿酸值，導致高尿酸血症的尿酸值增加而無痛風症狀的情形。



茶鹼(Theophylline; 1, 3-dimethylxanthine)



咖啡因(Caffeine; 1, 3, 7-trimethylxanthine)

圖 1. 茶鹼、咖啡因之結構式

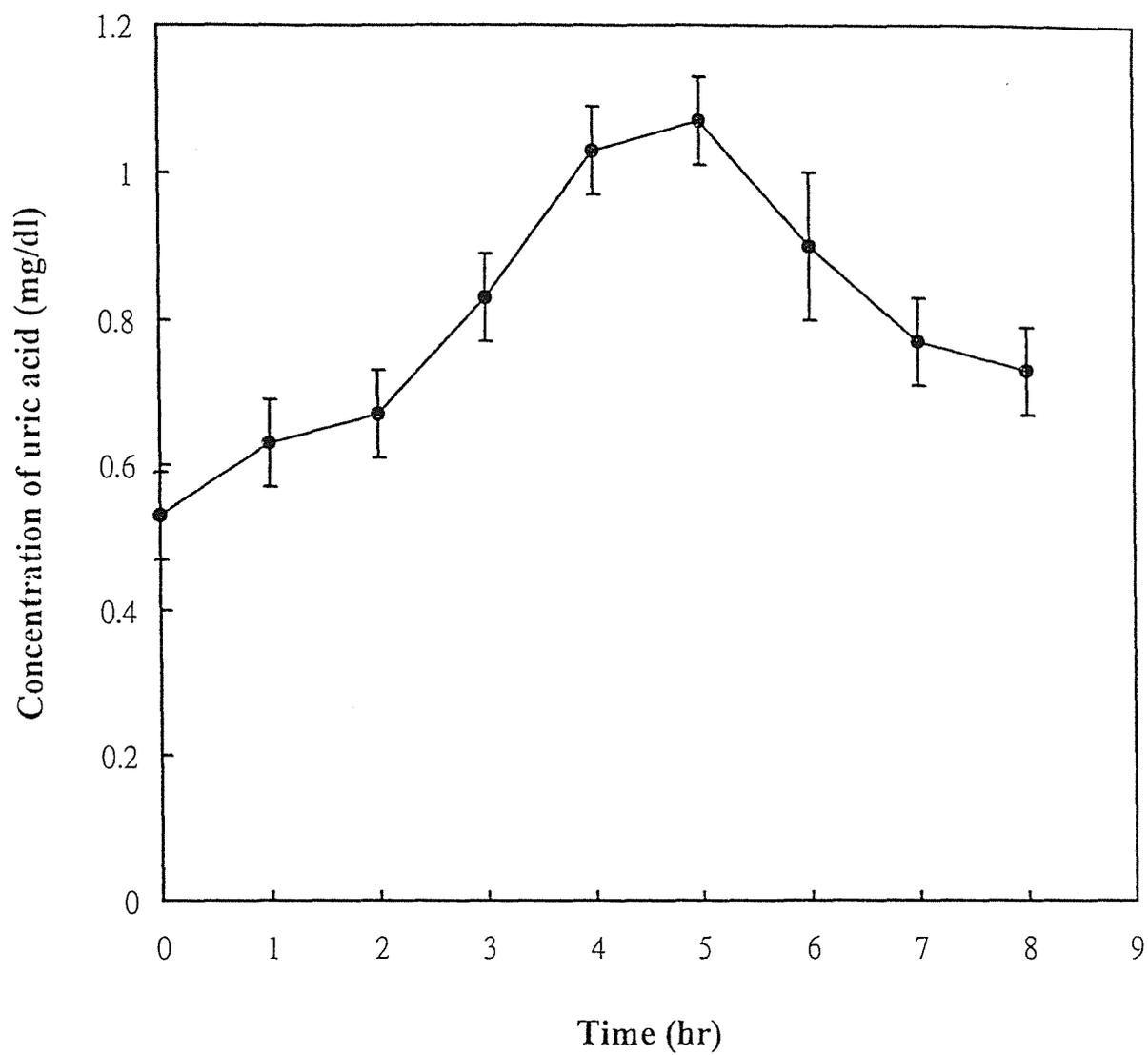


圖 2. 時間與肝細胞代謝 Guanine 為尿酸之關係

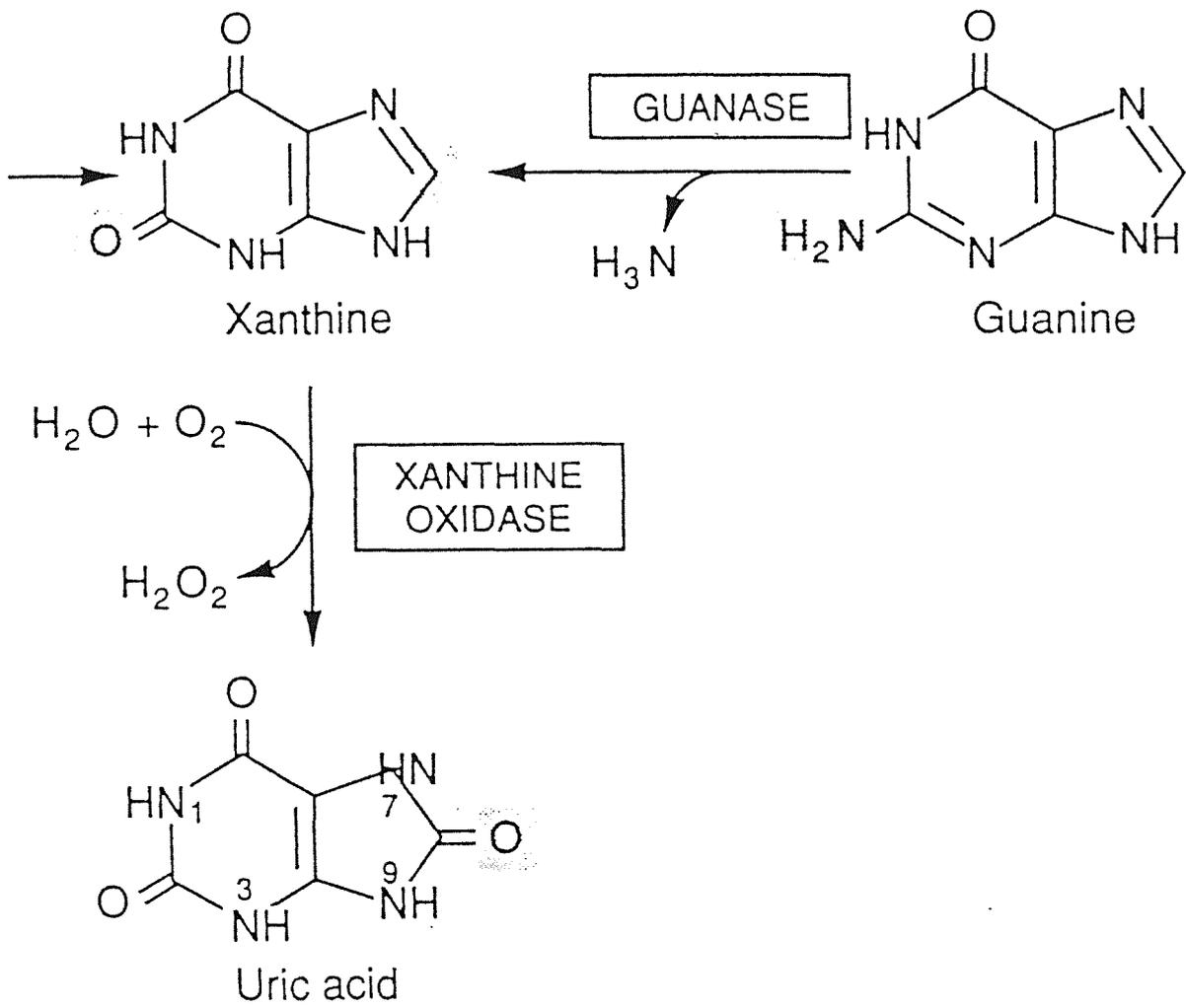


圖 3. 鳥嘌呤(Guanine)代謝成尿酸的過程

表 1. 茶鹼(Theophylline)對 Guanine 代謝生成尿酸之影響

Treatment ^a	Uricase	HPLC	
	UA(mg/dl)	UA(mg/dl)	DMUA
Normal	0.56 ± 0.15	0.37 ± 0.06	
Theophylline(0.1mg/ml)	0.76 ± 0.25	0.23 ± 0.06 *	0.20 ± 0.10
Theophylline(0.2mg/ml)	0.96 ± 0.32	0.37 ± 0.06	0.17 ± 0.06
Theophylline(0.4mg/ml)	1.10 ± 0.17 *	0.47 ± 0.06	0.17 ± 0.06
Guanine(0.5mg/dl)	1.23 ± 0.21	1.07 ± 0.06	
Guanine(0.5mg/dl) plus:			
Theophylline(0.1mg/ml)	0.53 ± 0.06 *	0.50 ± 0.10 *	0.17 ± 0.06
Theophylline(0.2mg/ml)	0.63 ± 0.12 *	0.63 ± 0.06 *	0.30 ± 0.10
Theophylline(0.4mg/ml)	0.97 ± 0.35	0.73 ± 0.06 *	0.33 ± 0.06

a: 利用 SD-rat 的肝細胞，每盤細胞數 1.0×10^6 ，置 incubator 中培養，於 Guanine 代謝 maximum 的時間 5 小時後，立刻收集溶液，溶液取 100 ul 經由萃取(同第一部份之血清萃取方法)後，打入 HPLC 分析而得，另部份則以 Uricase 分析。

b: Mean ± SD, n=3, * P<0.05; compared with Guanine alone treated group.

表 2 咖啡因(Caffeine)對 Guanine 代謝生成尿酸之影響

Treatment ^a	Uricase	HPLC	
	UA(mg/dl)	UA(mg/dl)	DMUA ± TMUA
Normal	0.60 ± 0.10	0.37 ± 0.06	
Caffeine(0.1mg/ml)	0.63 ± 0.15	0.17 ± 0.15 *	0.17 ± 0.06
Caffeine(0.2mg/ml)	0.60 ± 0.20	0.33 ± 0.06	0.17 ± 0.06
Caffeine(0.4mg/ml)	0.63 ± 0.21	0.40 ± 0.10	0.20 ± 0.10
Guanine(0.5mg/dl)	1.40 ± 0.40	1.00 ± 0.10	
Guanine(0.5mg/dl) plus:			
Caffeine(0.1mg/ml)	0.60 ± 0.10 *	0.43 ± 0.06 **	0.17 ± 0.06
Caffeine(0.2mg/ml)	0.70 ± 0.10 *	0.53 ± 0.06 **	0.20 ± 0.10
Caffeine(0.4mg/ml)	0.87 ± 0.06 *	0.63 ± 0.06 **	0.27 ± 0.06

a: 利用 SD-rat 的肝細胞，每盤細胞數 1.0×10^6 ，置 incubator 中培養，於 Guanine 代謝 maximum 的時間 5 小時後，立刻收集溶液，溶液取 100 ul 經由萃取(同第一部份之血清萃取方法)後，打入 HPLC 分析而得，另部份則以 Uricase 分析。

b: Mean ± SD, n=3, * P<0.05; ** P<0.01 compared with Guanine alone treated group.

表 3 茶鹼(Theophylline)與咖啡因(Caffeine)對 Guanine 代謝生成尿酸之影響

Treatment ^a	Uricase	HPLC	
	UA(mg/dl)	UA(mg/dl)	DMUA + TMUA
Normal	0.53 ± 0.06	0.40 ± 0.10	
Theo. + Caf. (各 0.1mg/ml)	0.70 ± 0.26	0.36 ± 0.06 *	0.17 ± 0.06
Theo. + Caf. (各 0.2mg/ml)	0.67 ± 0.06 *	0.33 ± 0.06	0.20 ± 0.10
Theo. + Caf. (各 0.4mg/ml)	0.93 ± 0.15 *	0.67 ± 0.06 *	0.23 ± 0.06
Guanine(0.5mg/dl)	1.42 ± 0.21	1.07 ± 0.06	
Guanine(0.5mg/dl) plus:			
Theo. + Caf. (各 0.1mg/ml)	0.70 ± 0.20 *	0.57 ± 0.06 **	0.17 ± 0.06
Theo. + Caf. (各 0.2mg/ml)	0.87 ± 0.15 *	0.63 ± 0.12 *	0.20 ± 0.06
Theo. + Caf. (各 0.4mg/ml)	0.97 ± 0.21	0.67 ± 0.06 **	0.30 ± 0.10

a: 利用 SD-rat 的肝細胞，每盤細胞數 1.0×10^6 ，置 incubator 中培養，於 Guanine 代謝 maximum 的時間 5 小時後，立刻收集溶液，溶液取 100 ul 經由萃取(同第一部份之血清萃取方法)後，打入 HPLC 分析而得，另部份則以 Uricase 分析。

b: Theo. 表 Theophylline; Caf. 表 Caffeine

c: Mean ± SD, n=3, * P<0.05; ** P<0.01; compared with Guanine alone

參考文獻(References)

1. 陳肇真等譯:Harrison's 內科學. 合記. 台北. 590-598, 1991
2. 賴守志:宜蘭縣東澳里東岳村高尿酸血症調查. 疫情報導. 7:99-105, 1991
3. Wolfe F: Gout and hyperuricemia. AFP Practical Therapeutics. 43:2141-2150, 1991
4. Murray RK, Mayes PA, Granner DK & Rodwell VW: Harper's Biochemistry. Appleton & Lange. USA. 333- 355, 1990
5. Claudio VS, Laguna RT: Nutrition and diet therapy dictionary. Chapman & Hall. New York 70-108, 243, 1991
6. Claudio VS, Laguna RT: Nutrition and diet therapy dictionary. Chapman & Hall. New York 70-108, 243, 1991
7. Levinson DJ, Becker MA: Clinical gout and the pathogenesis of hyperuricemia, in arthritis and allied conditions, Lea & Febiger. Philadelphia. 12th ed, 1773-1806, 1992
8. 黃介良、陳國東:宜蘭縣南澳鄉泰雅族高尿酸血症之流行

- 病學調查報告. 疫情報導. 12:131-141, 1996
9. 魏茂、陳勝美: 臨床藥品手冊. 金玉堂. 台中. 375-377, 1994
 10. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE & Kinneary JF: The merch index — an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Merch & Co., Inc., 1674, 9421, 1996
 11. Morita Y, Nishida Y, Kamatani N & Miyamoto T: Theophylline increases serum uric acid levels. J. Allergy clin. Immunol. 74:707-712, 1984
 12. Gibaldi M: Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics. Lea & Febiger. USA. 334, 435, 494-496. 1988
 13. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW & Gilman AG: The pharmacological basis of therapeutics. Mc Graw-Hill. New York. 672-677, 1996
 14. Abeles AH, Frey PA, Jencks WP: Biochemistry. Jones & Bartlett. USA. 722-727, 1992
 15. Armstrong FB: Biochemistry. Oxford University Press. USA. 216-221, 415-416, 1989
 16. 張錦標: 臨床尿酸分析與應用. 國防醫學. 20:392-399, 1995

17. 郭美琴:液相層析儀. 食品香料化學與加工. 食品工業發展研究所. 78-83, 1987
18. Engelhardt H: Practice of high performance liquid chromatography. Springer-Verlag. 1986
19. Kabra PM, Marto LJ: Liquid chromatography in clinical analysis. Chin-Ming. 1-47, 1985
20. Hamiton R, & Sewell P: Introduction to high performance liquid chromatography, Halsted Press,
21. Bonney VR, Becker JE, Walker PR & Potter VR: Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of regulation of enzyme synthesis. In Vitro. 9:399-413, 1974
22. Butterworth BE, Ashby J, Bermudex E, Casciano D, Mirsalis J, Probst G & Williams G.: A protocol and guide for the in vitro rat hepatocyte DNA repair assay. Mutation Research 189:113-121, 1987
23. 李文昭、周輝政、劉瓊瑛、陳盈秀、關婷、蘇淑貞:護理研究—原理與方法. 台北:文軒. 185-220, 1991
24. 何敏夫:臨床化學原理與實驗. 台北:合記. 242-246, 1997
25. Campbell MK: Biochemistry. Sanders college publishing. International edition. 74-75, 537, 1991
26. Leakey TEB: Simutaneous analysis of the theo-

- phylline , caffeine and eight of their metabolic products in human plasma by gradient high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 507:199-220, 1990
27. Snyderwine EG, Roller PP, Wirth PJ, Adamson RH, Sato S and Thorgeirsson SS: Synthesis, purification and mutagenicity of 2-hydroxyamino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline. *Carcinogenesis*, 8:1017-1020, 1987
28. Lee H, Wang L & Shih JF: Mutagenicity of particulates from the laboratory combustion of plastics. *Mutat. Res.* 346:135-144, 1995
29. 李金泉:SAS/PC 實務與應用統計分析. 松崗:台北, 1994
30. Yamamoto T, Moriwaki Y, Suda M, Takahashi S, Hiroishi K & Higashino K: Theophylline-induced increase in plasma uric acid-purine catabolism increased by theophylline. *International Journal of Clinical Pharmacology. Therapy & Toxicology*. 29:257-261, 1991
31. Ferrer I, Costell M, Grisolia S: Lesch-Nyhan syndrome-like behavior in rats from caffeine ingestion: changes in HGPRTase activity, urea, and

some nitrogen metabolism enzymes. FEBS Lett
141:275, 1982

32. Birkett DJ, Miners JO & Attwood J: Coadministration of allopurinol has shown that 1-MU is formed from 1-methylxanthine(1-MX), in vivo, and catalysed by xanthine oxidase. Brit. J. Clin. Pharmacol. 15: 117 ,1983

33. Nolan LL, Kidder GW: Caffeine:its action on purine metabolizing enzymes. Biochem Biophys Res Commun 91:253, 1979