

4 个新黄酮类化合物抗中性粒细胞呼吸爆发作用比较

邵峰¹,唐芳瑞¹,陈慧娟¹,王倩¹,刘荣华^{1*},任刚¹,陈兰英²,黄慧莲¹
(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004;
2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,南昌 330006)

[摘要] 目的:比较 4 个新黄酮类化合物抗中性粒细胞呼吸爆发作用。方法:采用化学发光法,以抗坏血酸(V_c)为参照,以 IC₅₀ 作为评价指标,比较 4 个新黄酮类化合物抗中性粒细胞呼吸爆发作用的强弱关系。结果:4 个新黄酮类化合物抗中性粒细胞呼吸爆发作用呈对数量效关系,且作用强弱依次为 2,4-dihydroxy-5-methoxy-benzophenone, R(+)-dalbergiphenol, R(-)-latifolin, 2-O-methylatifolin。结论:新黄酮类化合物分子结构中交叉共轭结构,有利于化合物抗中性粒细胞呼吸爆发能力的提高。A 环酚羟基是重要的活性基团,而 B 环酚羟基和甲氧基的取代可减弱化合物的活性。
[关键词] 新黄酮; 中性粒细胞呼吸爆发; 化学发光法
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0280-03
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121011.1704.001.html>
[网络出版时间] 2012-10-11 17:04

Comparison of Activities of Four Neoflavonoids on Neutrophils Respiratory Burst

SHAO Feng¹, TANG Fang-rui¹, CHEN Hui-juan¹, WANG Qian¹,
LIU Rong-hua^{1*}, REN Gang¹, CHEN Lan-ying², HUANG Hui-lian¹
(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM (Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Nanchang 330004, China; 2. Traditional Chinese Medicine Solid Preparation Technique of Manufacture Country Engineering Research Center, Nanchang 330006, China)

[Abstract] Objective: To compare inhibition effect of four neoflavonoids on respiratory burst of rat neutrophils. Method: Vc as reference, chemi-luminescence was used to compare strengths of the four neoflavonoids compounds in antineutrophill rspiratory burst. Result: Four neoflavonoids have different effect on neutrophils respiratory burst, and the marked logarithmic relationship existed between bioactivity and chemical structure. The inhibition abilities of four neoflavonoids on neutrophils respiratory burst were as follows: 2, 4-dihydroxy-5-methoxy-benzophenone, R(+)-dalbergiphenol, R(-)-latifolin, 2-O-methylatifolin. Conclusion: In chemical structure of neoflavonoids, the Cross-Shaped conjugation of A ring was favorable for the inhibition effect of four neoflavonoids on neutrophils respiratory burst, and the phenolic hydroxyl group, in A ring, was the key bioactivity group. In addition, the hydroxymethylation of hydroxyl in B ring was not favorable for improving bioactivity.
[Key words] neoflavonoids; neutrophils respiratory burst; chemi-luminescence

新黄酮类化合物是降香黄檀 *Dalbergia odorifera*^[1-2]、交趾黄檀 *D. cochinchinensis*^[3]、小花黄檀 *D. parviflora*^[4]、印度黄檀 *D. sissoo*^[5]等黄檀属植物的心木、根、皮中所含有的一类特色成分。大多数

[收稿日期] 20120704(006)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060373);江西省自然科学基金项目(2008GDY0019);江西省卫生厅基金项目(2009A100);江西省研究生创新专项资金项目(YC10A123)
[第一作者] 邵峰,硕士,讲师,从事中药质量控制与评价研究,Tel:0791-7118658,E-mail:shaofeng0729@yahoo.com.cn
[通讯作者] *刘荣华,博士,教授,硕士生导师,从事中药质量控制与评价研究,Tel/Fax:0791-7118658,E-mail:rhliu@163.com

新黄酮类化合物的分子结构具有 4-苯基色酮骨架结构^[6]。大量研究表明,该类化合物具有较好的抗氧化^[7]、抗炎^[8]、抗过敏^[8]、抗雄性激素样作用^[3]、抗真菌^[6]、抗白蚁^[6]、抑制 β -分泌酶^[5]及抑制 HIV-1 复制酶^[9],等生物活性。然而,新黄酮类化合物抗中性粒细胞呼吸爆发的实验研究报道较少。因此,本实验以抗坏血酸(V_C)为参照,比较从黄檀属植物中分离得到的 4 个新黄酮类化合物对大鼠中性粒细胞呼吸爆发的抑制作用,并初步推断其分子结构与抗中性粒细胞呼吸爆发作用之间的关系。

1 材料

1.1 材料 4 个新黄酮类化合物: $R(-)$ -latifolin (**1**), 2-*O*-methyllatifolin (**2**), $R(+)$ -dalbergiphenol (**3**), 2,4-dihydroxy-5-methoxy-benzophenone (**4**) 均从黄檀属植物中分离制备得到,经¹H-NMR,¹³C-NMR 确定结构,纯度>95%。

1.2 仪器 BPCL-K 型超微弱发光仪(北京生物物理所),Sigma 2-16K 型台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司),XSZ-D2 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂),Ce-601T 型 1/10 万电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),KQ-300DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),HH-2 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

1.3 试剂 淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司,葡聚糖 T500 购自美国 Pharmacia 公司,小牛血清(FCS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司,瑞-姬氏染色液购自南京建成生物工程研究所,二甲亚砜(DMSO)购自上海凌峰化学试剂有限公司,抗坏血酸(V_C)、佛波豆蔻酸乙酯(PMA)、台盼蓝、Luminol 均购自美国 Sigma 公司,其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司;双蒸水(自制)。

1.4 动物 SD 大鼠 30 只,清洁级,雌雄不限,体重 250~300 g,由江西中医学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(赣)2011-0001。

2 方法

2.1 样品溶液的配制 按 1.1 项所得到的 4 个新黄酮类化合物分别用 DMSO 配制成质量浓度为 100 mg·L⁻¹的母液,然后将母液用 DMSO 稀释成不同质量浓度的待测样品。

2.2 中性粒细胞呼吸爆发抑制率的测定^[10] 大鼠中性粒细胞(PMN)的分离:取 SD 大鼠,雌雄不限,乙醚麻醉,眼眶取血,1%肝素钠抗凝,葡聚糖 T-500 沉降红细胞,淋巴细胞分离液分离,低渗除去残留红细胞,用台盼蓝排斥实验检测大鼠 PMN 细胞纯度和活度均在 95% 以上,再用细胞稀释液调整细胞密度

为 2×10⁶个/mL⁻¹。4℃保存,在 12 h 内使用,中性粒细胞活力恒定,对实验结果无影响。

中性粒细胞在受到外源性刺激剂 PMA 激活后发生呼吸爆发,产生大量的活性氧自由基,自由基被发光剂 Luminol 捕获产生化学发光(CL),PMN-CL 强度与 PMN 的细胞数量及 PMN 的呼吸爆发和吞噬功能正相关。

取上述 PMN 悬液 1 mL 放入发光杯中,加入 Luminol 0.2 mL,置于超微弱发光测量仪(参数设定:发光池温度 37℃,电压 1 000 V,最长检测时间 1 800 s,计数时间间隔 5 s)发光池中孵育 10~20 min,记录自发光过程,按 5 s 记数 1 次,然后,加入样品溶液(以 DMSO 10 μL 为空白对照)继续测定 5 min,加入 10 μL PMA 刺激剂,继续测定 15~20 min,记录测定结果,PMN-CL 强度以发光记数峰高表示。分别采集两组数据:①PMN 自发光稳定期的 CL 值,以此为本底;②经刺激剂 PMA 刺激后的 PMN-CL 强度最高峰值。PMN 呼吸爆发的发光值 PMN-CL 强度以 PMA 刺激后的 PMN-CL 强度最高峰值减去本底来表示。测定 5 个浓度下的 PMN 发光抑制率,并计算 IC₅₀ 值。

PMN 发光抑制率

$$= \frac{\text{PMN-CL 强度}_{\text{空白对照}} - \text{PMN-CL 强度}_{\text{样品}}}{\text{PMN-CL 强度}_{\text{空白对照}}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 样品抗中性粒细胞呼吸爆发作用的量效关系 如图1所示,4 个新黄酮类化合物抗中性粒细胞呼吸爆发作用效果均呈明显的剂量依赖关系。在一定浓度范围内,4 个新黄酮类化合物浓度与中性粒细胞呼吸爆发抑制率均呈良好的对数相关。化合物浓度与抑制率之间的关系式中, Y 为清除率(%), X 为新黄酮化合物质量浓度(mg·L⁻¹),且 R^2 均>0.96,见表 1。

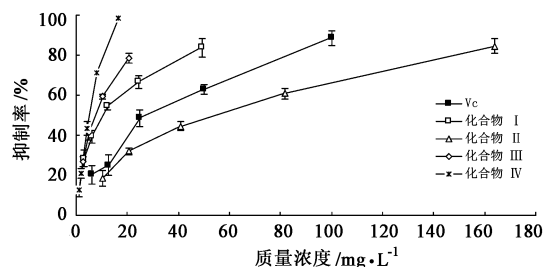


图1 4个新黄酮类化合物抗中性粒细胞呼吸爆发作用

3.2 样品抗中性粒细胞呼吸爆发作用的 IC₅₀ 值 上述实验结果表明,4 个新黄酮类化合物均具有抗中性粒细胞呼吸爆发作用,且作用强弱依次为化合物 4>化合物 3>化合物 1>化合物 2。4 个新黄酮类化合

表 1 4 个新黄酮类化合物质量浓度与抑制率之间线性关系

样品	线性方程	线性范围 /mg·L ⁻¹	R ²
V _c	Y = 25.134LnX - 31.778	20.37 ~ 88.556	0.963 6
化合物 1	Y = 19.89LnX + 4.638 2	3.07 ~ 49.18	0.995 0
化合物 2	Y = 23.226LnX - 38.192	10.25 ~ 163.93	0.981 3
化合物 3	Y = 23.88LnX + 4.6873	1.28 ~ 20.49	0.996 2
化合物 4	Y = 32.056LnX + 4.188 6	1.02 ~ 16.39	0.968 1

物所对应的 IC₅₀ 值分别为 (3.59 ± 0.04), (6.84 ± 0.20), (9.54 ± 0.68), (43.54 ± 3.51) mg·L⁻¹。

4 讨论

中性粒细胞呼吸爆发是机体氧自由基的重要来源。中性粒细胞呼吸爆发,可产生大量的活性氧(O₂⁻),在没有抗氧化剂存在的情况下,O₂⁻会引发一系列的链式反应,产生更多的自由基,如·OH、H₂O₂,等^[10]。所产生的过多或清除不足的氧自由基均可损伤细胞膜,使细胞死亡,引起器官或组织损伤^[11]。目前,基于中性粒细胞呼吸爆发效应的化学发光技术在中药抗氧化活性成分筛选研究方面已得到广泛应用,并取得了大量的研究成果^[12-14]。本实验结果发现:除 A 环酚羟基数量多于其他化合物外,化合物 4 分子内部特有的交叉共轭结构,有利于半醌式结构中自由基电子的稳定分布,可中断中性粒细胞产生自由基的链式反应,因此,化合物 4 对抗氧化活性明显优于其他 3 个化合物。与化合物 1 相比,当 A 环取代基的种类、数量及连接位置均相同时,化合物 2 在 B 环上羟基被甲氧基化后,增大了空间位阻,使其更不易与自由基结合,最终,导致化合物 2 所表现出的抗氧化活性仅为化合物 1 活性的 1/5。

天然黄酮类化合物及其衍生物的往往具有较高的清除自由基活性;天然黄酮化合物母核上的羟基取代基数目越多,其清除氧自由基活性越强^[15]。从化合物 1 与化合物 3 的分子结构比较来看,在 A 环结构相同的前提下,化合物 1 比化合物 3 在 B 环上多一个羟基,即化合物 1 可多电离出一个氢原子与氧自由基中和,从而增强化合物 1 对氧自由基的清除能力。但本实验结果并非如此,究其原因可能是化合物 1 与化合物 3 的抗中性粒细胞呼吸爆发作用机制存在一定差异。在抗中性粒细胞呼吸爆发的过程中,与化合物 1 相比,化合物 3 除能够清除中性粒细胞呼吸爆发所产生的氧自由基外,更侧重于直接抑制中性粒细胞呼吸爆发,该推断尚待进一步确证。

[参考文献]

[1] Chan Shih-Chuan, Chang Yuan-Shiun, Kuo Sheng-

Chu, et al. Neoflavonoids from *Dalbergia odorifera*[J]. Phytochemistry, 1997, 46(5):947.
[2] Wang Wen, Zhu Qixiu, Huang Minghua, et al. A new compound from *Dalbergia odorifera* T. chen [J]. Chin Chem Letter,2000,11(11):993.
[3] Vibha pathak, Osamu Shirota, Setsuko Sekita, et al. Anti-androgenic phenolic constituents from *Dalbergia cochinchinensis* [J]. Phytochemistry, 1997, 46(7):1219.
[4] Nuanta Muangnocharoen, August W Frahm. Neoflavanoids of *Dalbergia parviflora* [J]. Phytochemistry,1982, 21(3):767.
[5] Ramakrishna NVS, Kumar EKS, Kulkarni AS, et al. Screening of natural products for new leads as inhibitors of β -amyloid production: latifolin from *Dalbergia sissoo* [J]. Indian J Chem, 2001,40:539.
[6] Nobuhiro Sekine, Tatsuya Ashitani, Tetsuya murayama, et al. Bioactivity of Latifolin and its derivative against termites and fungi[J]. Agr Food Chem,2009,57:5707.
[7] Whang W K, Park H S, Ham I, et al. Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress[J]. Exp Mol Med, 2005, 37:436.
[8] Chan S C, Chang Y S, Wang J P, et al. Three new flavonoids and antiallergic, Anti-inflammatory constituents from the heart wood of *Dalbergia odorifera* [J]. Planta Medica,1998,64(2):153.
[9] M_arquez N, Sancho R, Bedoya L M, et al. A natural occurring 4-phenylcoumarin, inhibits HIV-1 replication by targeting the NF- κ B pathway [J]. Antiviral Res, 2005, 66:137.
[10] 刘荣华,余伯阳,陈兰英,等. 山里红叶多元酚类成分对大鼠中性粒细胞呼吸爆发的抑制作用[J]. 中国药科大学学报,2008,39(5):428.
[11] 海春旭. 自由基医学[M]. 西安:第四军医大学出版社,2006:77.
[12] 张申,李湘君,卫涛涛. 银杏叶提取物对巨噬细胞呼吸爆发、炎症细胞因子和 COX-2 mRNAs 及蛋白表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15(5):538.
[13] 林以宁,朱丹妮,余伯阳,等. 麦冬类药材皂苷元含量与其抑制中性粒细胞呼吸爆发的相关性[J]. 中国药科大学学报,2007, 38(6):549.
[14] 刘荣华,余伯阳,陈兰英,等. 山楂叶抗大鼠 PMN 呼吸爆发谱效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15):1884.
[15] 钟建青,李波,贾琦,等.天然黄酮类化合物及其衍生物的构效关系研究进展[J]. 药学学报,2011, 46(6):622.

[责任编辑 邹晓翠]